

# The Effect of Plasma Therapy Regulating Cell Pyroptosis Pathway on Coronavirus Induced Pneumonia

Binjian Zhou<sup>1</sup> Mingxia Jiang<sup>2</sup> Chunsheng Luo<sup>3</sup> Qingtian Wu<sup>1</sup>

1. Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China
2. Jiamusi Infectious Disease Hospital, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China
3. Jiamusi Central Blood Station, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China

## Abstract

**Objective:** Exploring the effect of plasma therapy on regulating cell pyroptosis pathways in coronavirus induced pneumonia. **Methods:** Collect 41 hospitalized patients with coronavirus induced pneumonia at Jiamusi Infectious Disease Hospital, and divide them into an experimental group (infused with convalescent plasma from recovered individuals, n=26) and a control group (not infused with convalescent plasma from recovered individuals, n=15) based on whether they receive convalescent plasma from recovered individuals. The database analyzed the differential gene expression between plasma transfusion and non transfusion, and screened for co expressed pyroptosis genes in the NLRP3/CASPASE-1 pathway, and measured the changes in the expression levels of pyroptosis proteins at different time periods. **Conclusion:** Transfusion of convalescent plasma can neutralize the coronavirus in patients with coronavirus induced pneumonia, reduce viral load, and improve cell pyroptosis. It may play a certain therapeutic role in the treatment of patients with coronavirus induced pneumonia.

## Keywords

convalescent plasma; coronavirus; pyroptosis

# 血浆疗法调节细胞焦亡途径对冠状病毒诱导肺炎的影响

周彬健<sup>1</sup> 姜明霞<sup>2</sup> 罗纯生<sup>3</sup> 吴庆田<sup>1</sup>

1. 佳木斯大学, 中国·黑龙江 佳木斯 154007
2. 佳木斯市传染病医院, 中国·黑龙江 佳木斯 154007
3. 佳木斯市中心血站, 中国·黑龙江 佳木斯 154007

## 摘要

**目的:** 探讨血浆疗法调节细胞焦亡途径对冠状病毒诱导肺炎的影响。**方法:** 收集佳木斯市传染病医院因冠状病毒诱导肺炎住院治疗患者41名, 并根据是否输注冠状病毒康复者恢复期血浆将患者分为实验组(输注康复者恢复期血浆者, n=26)和对照组(未输注康复者恢复期血浆者, n=15)。数据库分析输注血浆和未输注血浆后基因表达差异筛选出NLRP3/CASPASE-1通路共同表达的焦亡基因, 并测定不同时间段相关焦亡蛋白表达量的变化。**结论:** 输注康复者恢复期血浆能中和因冠状病毒诱导肺炎患者体内的冠状病毒, 降低病毒载量, 改善细胞焦亡现象, 在冠状病毒诱导肺炎患者治疗中可能起到一定的治疗作用。

## 关键词

恢复期血浆; 冠状病毒; 焦亡

## 1 引言

2019年暴发的冠状病毒已导致世界范围内的大流行,

**【基金项目】** 国家重点专科建设项目(项目编号: GJ202302); 黑龙江省自然科学基金资助项目(项目编号: LH2020H003)。

**【作者简介】** 周彬健(1994-), 女, 中国黑龙江佳木斯人, 硕士, 中级检验师, 从事病毒感染研究。

**【通讯作者】** 吴庆田(1974-), 男, 中国黑龙江佳木斯人, 博士, 教授, 从事病原生物学研究。

世界各国政府实施了非药物干预措施使全球新增确诊和疑似病例数量有一定的下降趋势。然而, 传播风险依然严峻, 对于因冠状病毒诱导肺炎的患者治疗仍是临床医生面临的一大挑战<sup>[1]</sup>, 冠状病毒是一种线性单股正链RNA病毒, 可引起人类呼吸道感染<sup>[2,3]</sup>。同时有文章指出在冠状病毒患者的血液中, 大约有6%的单核细胞存在焦亡, 焦亡的细胞不断胀大至细胞膜破裂, 并释放细胞因子和趋化因子, 焦亡细胞越多, 患者症状越重。与轻度及中度症状的冠状病毒患者相比, 重症患者血液中焦亡标志物水平显著上升<sup>[4]</sup>。目前, 对于冠状病毒没有特异治疗药物, 仍以对症支持治疗为主<sup>[5]</sup>。《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)》指出

新冠康复者恢复期血浆 (convalescent plasma, CP) 治疗适用于病情进展较快、重症/危重症新冠患者。但康复者恢复期血浆疗效如何, 目前尚不明确。论文对输注 CP 治疗冠状病毒诱导肺炎患者和未输注 CP 治疗病毒感染患者体内细胞焦亡相关蛋白的表达情况, 来评估 CP 在治疗重症新冠病毒患者短期内改善细胞焦亡的效果。

## 2 对象与方法

### 2.1 对象

收集佳木斯市传染病医院重症医学科住院治疗的冠状病毒诱导肺炎患者, 纳入符合条件的研究对象 41 名, 并根据其是否输注 CP 分为实验组 (n=26) 和对照组 (n=15), 实验组无发生输血不良反应者。该研究已通过我院医学伦理委员会审议。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 冠状病毒 CP 的采集与制备

捐献者血浆均由佳木斯中心血站负责采集, 根据捐献者体重及个人意愿每次采集 200~400mL; 采集后的血浆由佳木斯中心血站负责分装、速冻、检测, 并将检测合格的血浆送至佳木斯市传染病医院。

#### 2.2.2 治疗原则

临床医生根据临床状况、患者体重等明确输注剂量, 一般输注剂量为 200~500mL (4~5mL/kg)。

#### 2.2.3 治疗监测指标

①数据库分析。在 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 检索到文件编号为 GSE11378 人源基因芯片, 找到芯片平台 GPL6260。通过 perl 软件分析, 得到未使用 CP 治疗组和使用 CP 治疗新冠组, 并进行整理分析。采用 R 包 “pheatmap” “ggplot2” 得到表达差异基因, 并绘制火山图和热图。通过 R 包 “VennDiagram” 提取焦亡基因, 并且进行韦恩图绘制, 得到交集基因。最后通过 R 包对焦亡基因的表达差异进行分析, 提取出 caspae-1、IL1 $\beta$ 、IL-18 及其上游 NLRP3 作为焦亡检测指标。

②焦亡相关蛋白检测。焦亡相关蛋白检测采集新冠病毒诱导肺炎患者全血于 EDTA-K2 抗凝管中, 加入淋巴细胞分离液分离单核细胞后提取蛋白, WesternBlot 法分析对照组和实验组患者输注 CP 前、输注过程中、输注后各时间点 (0, 3, 5, 7/ 天) 焦亡相关蛋白表达量的动态变化。

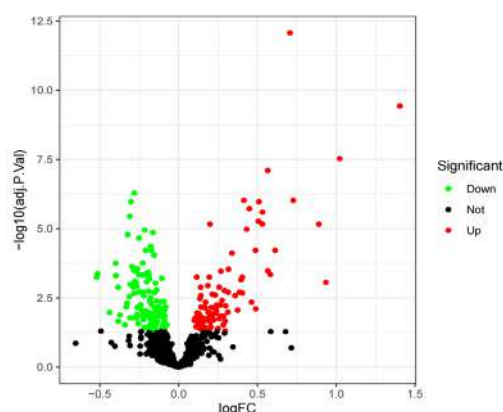
#### 2.2.4 统计学分析

采用 SPSS 29.0 统计学软件进行统计学分析;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

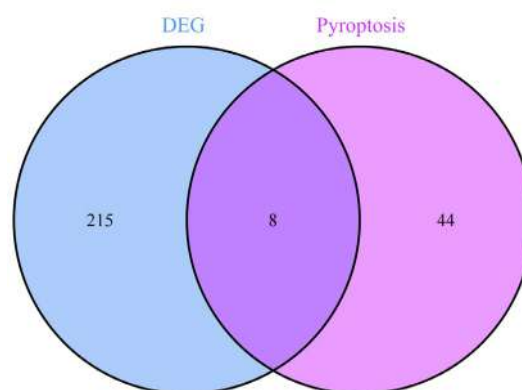
## 3 结果

GEO 数据库富集出 CP 治疗和未使用 CP 治疗因冠状病毒诱导肺炎患者差异表达基因 (图 1A), 将富集出的差异基因与焦亡基因取交集分析出相关焦亡基因的改变 (图 1B、

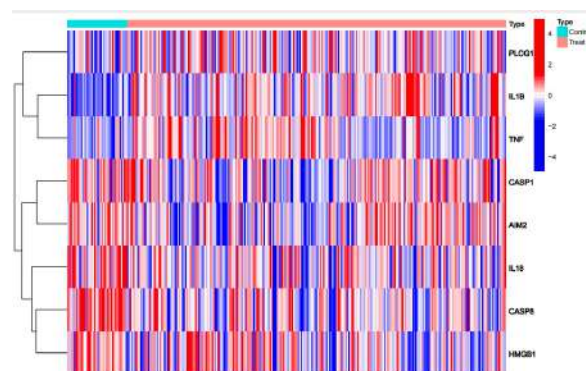
C), 选取 caspae-1、IL1 $\beta$ 、IL-18 及其上游 NLRP3 蛋白, 对比输注 CP (实验组) 和未输注 CP (对照组) 前后患者体内焦亡相关蛋白指标表达量, 将输注 CP 浆当天记为第 0 天, 在 0、3、5、7 天对两组患者体内的 NLRP3、caspase-1、cleve-caspase-1、IL1 $\beta$ 、IL-18 蛋白水平进行检验并统计分析, 在 CP 治疗第 7 天时实验组焦亡蛋白表达量明显下降 (图 1D、E), 和非 CP 治疗组相比两组差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 这表明 CP 治疗可能有助于改善因冠状病毒诱导肺炎引起的细胞焦亡现象并且治疗效果优于非 CP 治疗组。



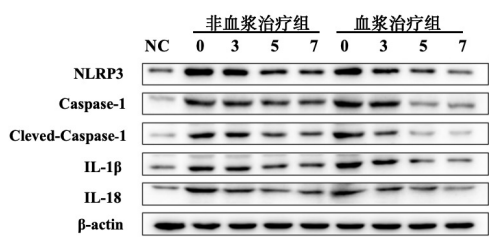
(A) 数据库分析 CP 疗法和非 CP 疗法治疗肺炎患者差异表达基因



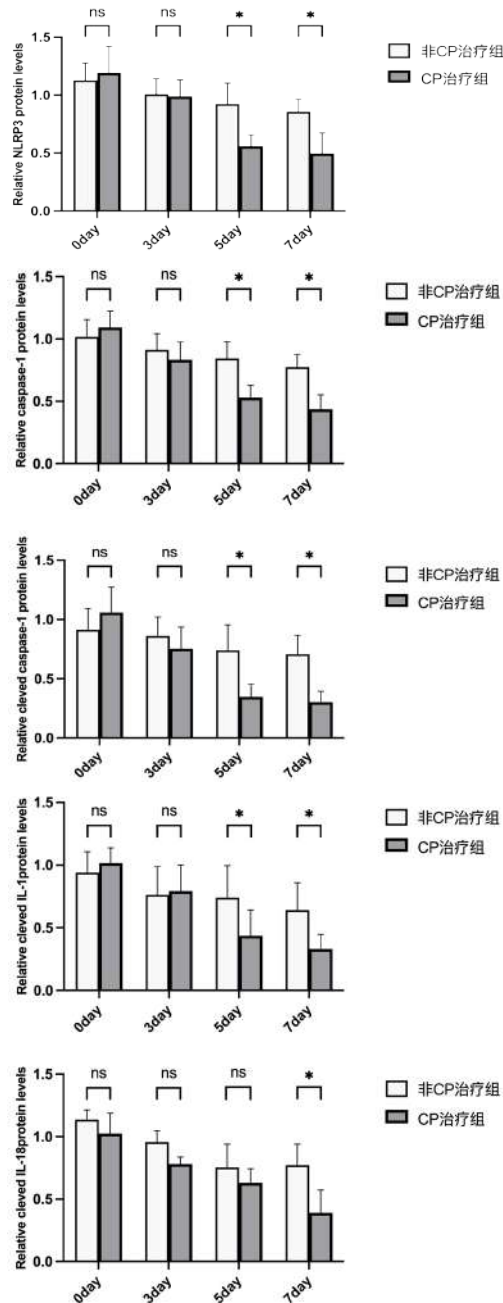
(B) 差异基因与焦亡基因交集分析



(C) 热图分析出患者相关焦亡基因差异表达情况



(D) 冠状病毒诱导肺炎患者 CP 治疗和非 CP 治疗前后 Western blot 检测焦亡相关蛋白表达水平



(E) 焦亡蛋白 Western blot 结果定量分析

图 1 血浆疗法调节冠状病毒诱导肺炎患者细胞焦亡现象

## 4 讨论

在冠状病毒之前，已经对 CP 疗法在其他病毒感染暴发中的使用进行了调查，结果是肯定的，如甲型 H1N1 流感、甲型 H5N1 禽流感。据研究表明，CP 中和抗体的作用不仅限于清除病毒，还包括加速被感染细胞的清除，并被认为是预防病毒性疾病所必需的。随着大规模流行病的发生，CP 治疗越来越被广泛地应用于临床治疗中，相比于抗病毒药物及激素对患者产生的不良反应，CP 治疗更为安全。因此 CP 治疗在病毒感染性疾病具有良好的应用前景。

本研究中，对输注冠状病毒 CP 的 26 名患者和未输注 CP 的 15 名患者体内焦亡相关蛋白指标表达情况进行统计分析发现，在 CP 治疗前后监测焦亡指标 NLRP3、Caspase-1、Cleve caspase-1、IL1 $\beta$ 、IL-18 蛋白，短期内所有焦亡指标均得到明显的改善且与未输入 CP 组比两组差异具有统计学意义，这表明输注 CP 能中和患者体内的病毒，降低病毒载量，改善焦亡现象，证明 CP 疗法调节血液中细胞焦亡途径对冠状病毒诱导肺炎有一定的治疗效果。综上所述，在目前缺乏有效治疗方法并且冠状病毒毒株毒力逐渐减弱的情况下，CP 疗法对改善因冠状病毒诱导肺炎患者细胞焦亡效果明显，但此方法是一种经验性的治疗方法，还需要现代循证医学支持。且论文研究也存在一些不足之处如纳入研究的临床病例数较少，虽然研究患者在近期内取得了良好的治疗效果，但远期治疗效果仍需观察。另外，综合治疗以及血浆中的其他免疫因子如各种酶类、抗凝血因子、激素类和补体等是否也参与了患者的免疫系统的提高，也有待进一步考证。

## 参考文献

- [1] JEAN S S, LEE P I, HSUEH P R. Treatment options for COVID-19: the reality and challenges[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2020,53(3):436-443.
- [2] Umakanthan S, Sahu P, Ranade A V, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19)[J]. Postgrad Med J, 2020,96(1142):753-758.
- [3] Wiersinga W J, Rhodes A, Cheng A C, et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review[J]. JAMA, 2020,324(8):782-793.
- [4] Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, et al. Fc  $\gamma$  R-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation[J]. Nature, 2022,606(7914):576-584.
- [5] Aminjafari A, Ghasemi S. The possible of immunotherapy for COVID-19: a systematic review[J]. Int Immunopharmacol, 2020,83:106455.