



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2022.01.012

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.01.012

· 临床研究 ·

趋化因子受体 2 抑制剂在急性痛风小鼠模型中的作用研究

宣丹丹 赵力 薛愉 赵天仪 曹灵 万伟国

【摘要】 目的 探讨趋化因子受体 2 (CXCR2) 抑制剂在急性痛风小鼠模型中的作用。**方法** 小鼠急性痛风足掌模型:12 只 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 3 组,每组 4 只,对照组:小鼠右后足掌注射生理盐水;实验组:小鼠右后足掌注射单钠尿酸盐 (MSU) 建立急性痛风足掌模型;干预组:小鼠右后足掌注射 MSU 及 CXCR2 抑制剂 SB225002。于注射 8 h 后测量 3 组小鼠右/左后足掌厚度比值,采用苏木素-伊红 (HE) 染色评估小鼠足掌关节炎症程度,采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测足掌组织白细胞介素 (IL)-1 β 水平。小鼠急性痛风腹腔模型:9 只 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 3 组,每组 3 只。对照组:小鼠腹腔注射生理盐水;实验组:小鼠腹腔注射 MSU 建立急性痛风腹腔模型;实验组:小鼠腹腔注射 MSU 及 CXCR2 抑制剂 SB225002。于 MSU 注射 4 h 后收取腹腔灌洗液检测中性粒细胞密度及比例、IL-1 β 及趋化因子水平。**结果** 在小鼠急性痛风足掌模型中,实验组小鼠右/左后足掌厚度比值高于对照组,干预组低于实验组 ($P < 0.05$);与对照组比较,实验组小鼠足掌关节炎症细胞浸润程度明显增加;与实验组比较,干预组小鼠足掌关节炎症细胞浸润程度明显下降;实验组足掌组织 IL-1 β 水平高于对照组,干预组低于实验组。在小鼠急性痛风腹腔模型中,实验组小鼠腹腔灌洗液中中性粒细胞密度和比例均高于对照组,干预组上述指标均低于实验组 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$);实验组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、CXCL8 水平均高于对照组,干预组小鼠腹腔灌洗液中 CXCL1、CXCL2、CXCL8 水平均低于实验组 ($P < 0.05$)。**结论** 抑制 CXCR2 可减轻小鼠急性痛风炎症反应,CXCR2 可能成为急性痛风治疗中抑制急性炎症的可行靶点。

【关键词】 痛风; 趋化因子受体 2; 中性粒细胞; 趋化因子**【中图分类号】** R589.7**【文献标识码】** A

Role of chemokine receptor 2 inhibitor in mouse model of acute gout Xuan Dandan, Zhao Li, Xue Yu, Zhao Tianyi, Cao Ling, Wan Weiguo. Department of Rheumatology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective To explore the role of chemokine receptor 2 (CXCR2) inhibitor in mouse model of acute gout. **Methods** Pawls model of acute gout mice;12 C57BL/6 male mice aged 6 to 8 weeks old were randomly divided into 3 groups (4 mice in each group). Mice in control group were injected with saline in the right hind pawl. Mice in experimental group were injected with MSU in the right hind pawl to establish pawls model of acute gout. Mice in intervention group were injected with MSU and CXCR2 inhibitor SB225002 in the right hind pawl. Right/left hind paw thickness ratio of mice in 3 groups was measured 8 h after injection. Degree of mice paw joint inflammation was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Interleukin (IL)-1 level was measured by western blotting. Peritoneal model of acute gout mice;9 C57BL/6 male mice aged 6 to 8 weeks old were randomly divided into 3 groups (3 mice in each group). Mice in control group were injected with saline intraperitoneally, mice in experimental group were injected with MSU intraperitoneally to establish peritoneal model of acute gout, mice in intervention group were injected with MSU and CXCR2 inhibitor SB225002 intraperitoneally. Intraperitoneal lavage fluid was collected for detection of neutrophil density and proportion, IL-1 and chemokines levels 4 h after MSU injection. **Results** In pawls model of acute gout mice, right/left hind paw thickness ratio in experimental group was higher than that in control group, and the ratio in intervention group was lower than that in experimental group ($P < 0.05$); compared with the control group, infiltration degree of inflammatory cell in

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题青年项目(20174Y0150)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院风湿科

通讯作者:万伟国, E-mail: wgw1969@sina.com

paw) was significantly increased in experimental group, while compared with experimental group, it was significantly reduced in intervention group; IL-1 level of paw tissue was higher in experimental group than that in control group, and the intervention group was lower than that in experimental group. In peritoneal model of acute gout mice, density and proportion of neutrophil of peritoneal lavage fluid in experimental group were higher than those in control group, and above indexes in intervention group were lower than those in experimental group ($P < 0.001$ or $P < 0.05$); levels of IL-1, CXCL1, CXCL2 and CXCL8 in experimental group were significantly higher than those in control group, and levels of CXCL1, CXCL2 and CXCL8 were lower in intervention group than those in experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of CXCR2 can reduce acute inflammatory response in mouse model of acute gout. CXCR2 may be a viable target to inhibit acute inflammation in the treatment of acute gout.

[Key words] Gout; Chemokine receptor 2; Neutrophil; Chemokine

痛风是一类尿酸沉积性炎症性疾病。近年来,痛风和尿酸血症继高血压、糖尿病、冠心病之后成为威胁人类健康的又一重大疾病,其患病率呈逐年上升趋势^[1]。一项纳入 2000~2014 年发表研究的 Meta 分析结果显示,我国大陆痛风患病率为 1.1%,高尿酸血症为 13.3%^[2]。我国 2004 年山东沿海地区痛风患病率为 1.14% (近 10 年内增加了 3 倍)^[3]。目前痛风急性发作控制手段主要为非甾体抗炎药 (NSAIDs)、秋水仙碱、糖皮质激素,对于部分肾功能不全合并胃肠道出血或存在其他药物禁忌的患者治疗手段有限。因此,探索新的药物治疗靶点很有必要。中性粒细胞的入侵和活化是痛风急性炎症的重要环节,可在巨噬细胞启动炎症之后使炎症进一步扩大,而这一过程依赖于趋化因子。根据 N 端半胱氨酸的位置,趋化因子可分为 4 种亚型: CXC、CC、C 或 CX3C。CXC 受体 2 (CXCR2) 属于 CXCR 家族,是 CXC 趋化因子的主要受体,在中性粒细胞上的表达量最高^[4]。由于对中性粒细胞的趋化作用, CXCR2 与炎症性疾病密切相关。通过抑制 CXCR2 可以减轻小鼠急性胰腺炎^[5]、环磷酸腺苷诱导的小鼠出血性膀胱炎^[6]、小鼠实验性结肠炎^[7]等。同样的,在关节炎小鼠模型中,也发现 CXCR2^{-/-}小鼠关节炎、滑膜厚度及关节破坏程度均较 WT 小鼠减轻。提示 CXCR2 是 BLT1 (LTB4 受体) 对中性粒细胞招募的关键下游受体之一^[8]。因此,我们推测 CXCR2 是痛风急性炎症过程中趋化中性粒细胞的关键受体之一,通过抑制 CXCR2 有望可以迅速减少中性粒细胞浸润,控制关节炎症,起到治疗作用。通过此研究我们希望探索痛风急性炎症治疗的新靶点,为今后药物研究提供新思路。

材料与方法

1. 材料: 21 只 C57BL/6 雄性小鼠购自杰思捷实验动物公司,鼠龄均为 6~8 周,体质量约 18~22 g, SPF 级。

2. 方法

(1) 实验动物分组及处理: 21 只小鼠饲养于我院

中心试验室,随机分为对照组、实验组及单钠尿酸盐 (MSU) + SB225002 干预组。小鼠急性痛风足掌模型分组: 小鼠编号、称重,按随机数字表将 12 只 6~8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠分为上述 3 组 (每组 4 只),对照组双侧足掌部注射生理盐水,实验组制作小鼠急性痛风足掌模型,干预组在制作小鼠痛风足掌模型同时腹腔注射 CXCR2 抑制剂 SB225002 50 μ g。小鼠急性痛风腹腔模型分组: 小鼠编号、称重,按随机数字表将 9 只雄性 C57BL/6 小鼠,随机分为上述 3 组 (每组 3 只),对照组腹腔注射生理盐水,实验组制作小鼠急性痛风腹腔模型,干预组在制作小鼠急性痛风腹腔模型同时注射 CXCR2 抑制剂 SB225002 50 μ g。

(2) 小鼠足掌痛风炎症模型的建立: 每只小鼠左侧后足掌部注射生理盐水,右侧后足掌部注射 MSU 晶体混悬液 50 μ l (20 mg/ml),于炎症高峰期 8 h 处死小鼠。游标卡尺测小鼠双侧足掌肿胀度 (右后足掌厚度/左后足掌厚度); 小鼠足掌采用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋切片行苏木素-伊红 (HE) 染色以评估小鼠关节炎程度。

(3) 小鼠急性痛风腹腔模型的建立: 采用 MSU 3 mg/0.5 ml 腹腔注射进行造模,均于 MSU 注射 4 h 后 (炎症最高峰) 处死小鼠,行腹腔灌洗,取腹腔液并离心收集腹腔细胞和腹腔上清液。

(4) CXCR2 抑制剂干预: 按照说明书,依次将 2% 二甲基亚砷 (DMSO) + 30% 聚乙二醇 300 (PEG300) + 5% 吐温 80 (Tween 80) + 双蒸水 (ddH₂O) 加入产品 SB225002 中,得到可以对小鼠腹腔注射的复合物,以 50 μ g:200 μ l 浓度腹腔注射。

(5) 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测足掌组织白细胞介素 (IL)-1 β 水平: 取小鼠右后足掌,加裂解液,组织匀浆,提取总蛋白,使用 BCA 系统进行蛋白初定量,利用 BCA 蛋白定量结果,均一化所有样本总蛋白浓度至 3 mg/ml,常规方法转膜,分别加入抗鼠 IL-1 β 抗体、抗鼠 GAPDH 抗体,孵育后漂洗,加入抗兔 IgG-HRP,孵育后增强化学发光显色,用 Image J 图像软件读取条带灰度值,并计算相关数据。

(6)流式细胞术检测腹腔液中中性粒细胞数量及密度:收集腹腔灌洗液离心沉淀,采用 F4/80-PerCP CY5.5 和 Ly6G-PE 抗体标记中性粒细胞,使用流式细胞仪进行检测, Ly6G^{high}F4/80-细胞群即为中性粒细胞,收集样品体积,根据 Ly6G + F4/80-细胞数量/细胞流式仪上样检测的液体体积计算密度。

(7)酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测腹腔液中 IL-1 β 及趋化因子水平变化:将前述留取的腹腔灌洗液,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测腹腔液中细胞因子水平。

3. 统计学处理:应用 Graph Pad Prism 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 急性痛风足掌模型 3 组小鼠右/左后足掌厚度比值、关节炎症程度及足掌组织 IL-1 β 水平比较:0 h 时,3 组小鼠右/左后足掌厚度比值比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。8 h 时,实验组小鼠右/左后足掌厚度比值高于对照组,干预组低于实验组($P < 0.05$)。见表 1。与对照组比较,实验组小鼠足掌关节炎症细胞浸润程度明显增加;与实验组比较,干预组小鼠足掌关节炎症细胞浸润程度明显下降,见图 1。实验组

表 1 急性痛风足掌模型 3 组小鼠右/左后足掌厚度比值比较 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	8 h
对照组	1.02 \pm 0.03	1.01 \pm 0.02
实验组	1.02 \pm 0.02	1.48 \pm 0.05 ^a
干预组	1.03 \pm 0.03	1.15 \pm 0.03 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验组比较,^b $P < 0.05$

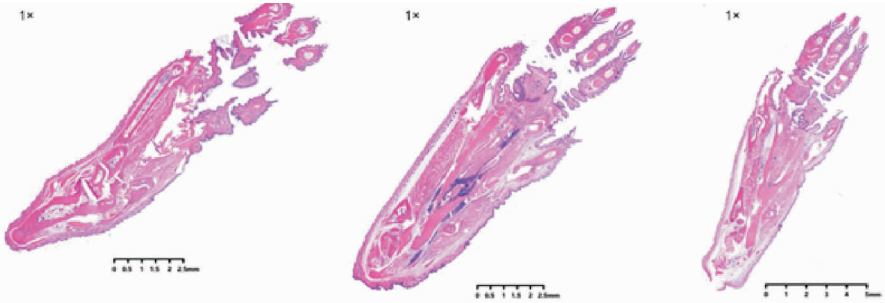


图 1 急性痛风足掌模型 3 组小鼠足掌病理检查结果 (HE 染色, $\times 1$)

表 3 急性痛风腹腔模型 3 组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 及趋化因子水平比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (pg/ml)	CXCL1 (pg/ml)	CXCL2 (pg/ml)	CXCL8 (pg/ml)
对照组	83.73 \pm 5.28	2 439.00 \pm 190.20	3 144.00 \pm 94.50	1 308.00 \pm 103.50
实验组	118.70 \pm 3.74 ^a	4 399.00 \pm 242.30 ^a	5 085.00 \pm 252.40 ^a	2 095.00 \pm 140.30 ^a
干预组	110.40 \pm 5.22	2 968.00 \pm 172.60 ^b	3 978.00 \pm 96.43 ^b	1 631.00 \pm 55.89 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验组比较,^b $P < 0.05$

(0.773)足掌组织 IL-1 β 水平高于对照组(0.042),干预组(0.595)低于实验组。

2. 急性痛风腹腔模型 3 组小鼠腹腔灌洗液中中性粒细胞密度和比例比较:实验组小鼠腹腔灌洗液中中性粒细胞密度和比例均高于对照组,干预组上述指标均低于实验组($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$),见表 2。

表 2 急性痛风腹腔模型 3 组小鼠腹腔灌洗液中中性粒细胞密度和比例比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	中性粒细胞密度 (个/ μ l)	中性粒细胞比例 (%)
对照组	10.66 \pm 5.17	0.78 \pm 0.15
实验组	4 476.00 \pm 185.80 ^a	69.33 \pm 3.38 ^a
干预组	399.30 \pm 68.20 ^b	15.81 \pm 5.28 ^c

注:与对照组比较,^a $P < 0.001$;与实验组比较,^b $P < 0.001$,^c $P < 0.05$

3. 急性痛风腹腔模型 3 组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 及趋化因子水平比较:实验组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、CXCL8 水平均高于对照组,干预组小鼠腹腔灌洗液中 CXCL1、CXCL2、CXCL8 水平均低于实验组($P < 0.05$),而干预组和实验组小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

讨 论

早在 1991 年就有学者发现痛风患者关节滑液中 CXCL8 (即 IL-8) 明显升高^[9]。CXCL8 是一种趋化因子,属于 CXC 家族。在 IL-1、TNF 等作用下可诱导单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和表皮细胞等合成分泌 CXCL8,可特异性趋化中性粒细胞进入炎症组织,发挥炎症作用。目前研究表明,急性痛风患者血清中可检测到炎症因子如 IL-1 β 、IL-6 及 CXCL8 水平升高^[10]。提纯后的中性粒细胞经过 MSU 刺激与单

核细胞共培养后同样也会出现 IL-1 β 、CXCL8、IL-6 和 TNF- α 水平升高^[11]。而正如前文所述,作为 CXCL8 对应的受体 CXCR2,已经在多种涉及中性粒细胞的研究中被发现可减轻中性粒细胞引起的急性炎症反应。

SB2250002 是一种强效的选择性 CXCR2 拮抗剂,可以抑制 IL-8 与 CXCR2 的结合。为了探讨 CXCR2 拮抗剂对痛风急性炎症的影响,我们采用小鼠痛风足掌模型进行了实验。实验结果证实,应用 CXCR2 拮抗剂 SB225002 干预后可以减轻痛风小鼠模型足掌的肿胀程度,减少炎症细胞的浸润,下调 IL-1 β 在足掌组织中的表达。为了更好地研究局部炎症因子及趋化因子水平,我们采用小鼠痛风腹腔模型再次进行实验,结果证实,应用 CXCR2 拮抗剂 SB225002 干预后可以减少腹腔灌洗液中中性粒细胞的比例及密度。CXCR2 作为治疗急性痛风的靶点具有较大的潜力,目前 CXCR2 的已知配体有 CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7 和 CXCL8^[12]。为了研究 CXCR2 抑制剂干预对局部炎症水平及趋化因子的影响,我们取腹腔灌洗液进行了 IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、CXCL8 检测。MSU 刺激单核巨噬细胞分泌 CXCL8,与 CXCR2 结合,刺激趋化因子 CXCL1、CXCL2、CXCL8 分泌,进一步召集中性粒细胞趋化至炎症部位,扩大炎症反应。本实验采用 CXCR2 抑制剂拮抗 CXCR2 后,减少了 CXCL1、CXCL2、CXCL8 的分泌,从而减少了中性粒细胞趋化。这些数据表明,抑制 CXCR2 可以减轻 MSU 导致的局部炎症。此外,在小鼠急性痛风足掌模型干预实验中,抑制 CXCR2 下调了 IL-1 β 表达,但腹腔模型干预实验中腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平虽有下降,但差异无统计学意义,考虑可能与干预时间较短有关,拟在下一步试验中增加不同干预时间点的探索,以期判断更好的干预点。

本实验运用两种动物模型对 CXCR2 抑制剂在痛风急性炎症中的抑制作用进行验证,探讨了干预 CXCR2 靶点在小鼠急性痛风模型中的抑炎作用,并创新通过流式细胞仪检测中性粒细胞密度及比例来阐述中性粒细胞的局部浸润效果。CXCR2 除了在急性炎症性疾病扮演重要角色外,可能在慢性疾病中也有作用。既往研究动脉粥样硬化的报道表明,部分 CXCR2 在慢性炎症的环境中可能由巨噬细胞表达^[13]。我们不能排除中性粒细胞浸润时,少数组织驻留的巨噬细胞在介导慢性效应中发挥作用的可能性。另外 CXCR2 信号通路在外周炎症和神经损伤诱导的病理性疼痛状态中

均可发挥作用^[14]。CXCR2 阻断可显著减少机械性痛觉过敏和减轻炎症性痛觉过度^[15],可能对于慢性痛风性关节炎的控制有所帮助。因此,在下一步试验中,我们还将探索 CXCR2 在慢性痛风性关节炎的作用,以期待未来 CXCR2 靶点在痛风性关节炎的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 林淑凡.《中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)》解读[J]. 临床内科杂志,2020,37(6):460-462.
- [2] Liu R, Han C, Wu D, et al. Prevalence of Hyperuricemia and Gout in Mainland China from 2000 to 2014: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:762820.
- [3] 阎胜利. 痛风的流行病学特点及诊治[J]. 山东医药, 2010, 50(43): 107.
- [4] Chuntharapai A, Lee J, Hébert CA, et al. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes[J]. J Immunol, 1994, 153(12): 5682-5688.
- [5] Steele CW, Karim SA, Foth M, et al. CXCR2 inhibition suppresses acute and chronic pancreatic inflammation[J]. J Pathol, 2015, 237(1): 85-97.
- [6] Dornelles FN, Andrade EL, Campos MM, et al. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(2): 452-467.
- [7] Bento AF, Leite DF, Claudino RF, et al. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice[J]. J Leukoc Biol, 2017, 84(4): 1213-1221.
- [8] Chou RC, Kim ND, Sadik CD, et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis[J]. Immunity, 2010, 33(2): 266-278.
- [9] Terkeltaub R, Zachariae C, Santoro D, et al. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation[J]. Arthritis Rheum, 1991, 34(7): 894-903.
- [10] Kienhorst LB, Van Lochem E, Kievit W, et al. Gout is a chronic inflammatory disease in which high levels of interleukin-8 (CXCL8), myeloid-related protein 8/myeloid-related protein 14 complex, and an altered proteome are associated with diabetes mellitus and cardiovascular disease[J]. Arthritis Rheum, 2015, 67(12): 3303-3313.
- [11] Martin WJ, Grainger R, Harrison A, et al. Differences in MSU-induced superoxide responses by neutrophils from gout subjects compared to healthy controls and a role for environmental inflammatory cytokines and hyperuricemia in neutrophil function and survival[J]. J Rheumatol, 2010, 37(6): 1228-1235.
- [12] Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor[J]. J Biol Chem, 1996, 271(34): 20545-20550.
- [13] Huo Y, Weber C, Forlow SB, et al. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium[J]. J Clin Invest, 2001, 108(9): 1307-1314.
- [14] Silva RL, Lopes AH, Guimarães RM, et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: role in peripheral and central sensitization[J]. Neurobiol Dis, 2017, 105: 109-116.
- [15] Lopes AH, Brandolini L, Aramini A, et al. DF2755A, a novel non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, reduces inflammatory and post-operative pain[J]. Pharmacol Res, 2016, 103: 69-79.

(收稿日期:2021-11-22)

(本文编辑:周三凤)