

# 巨噬细胞诱导极化对痛风炎症反应的影响

张梦莹<sup>1</sup> 李 志<sup>2</sup> 李雪琴<sup>1</sup> 钟 民<sup>1</sup> 吕 坤<sup>1</sup>

( 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 1.中心实验室; 2.风湿免疫科,安徽 芜湖 241001)

**【摘要】**目的: 了解体外诱导极化的 M1 和 M2 型巨噬细胞对尿酸钠结晶 (MSU) 诱导的急性痛风模型炎症反应的影响。方法: 选用雄性 BALB/c 小鼠作为实验对象 随机分为空白对照组、模型组、模型 M1 型巨噬细胞组和模型 M2 型巨噬细胞组。小鼠皮下气囊注射 MSU 结晶诱导小鼠急性痛风模型。体外将巨噬细胞诱导极化为 M1 和 M2 型巨噬细胞 并分别注射于小鼠痛风模型皮下气囊。于炎症诱导后 4 h、12 h 和 24 h 检测不同组别皮下气囊浸润的炎性细胞数量变化 并应用 ELISA 法测定囊内灌洗液中 IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  的水平。结果: ①在 4 h、12 h 和 24 h 时间点模型组、模型 M1 型巨噬细胞组和模型 M2 型巨噬细胞组皮下气囊炎性细胞均高于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。在 4 h 时间点 模型组及模型 M1 型巨噬细胞组和模型 M2 型巨噬细胞组间皮下气囊炎性细胞数量无差异 ( $P > 0.05$ ); 而在 12 h 和 24 h 模型 M1 型巨噬细胞组皮下气囊炎性细胞高于模型组 而模型 M2 型巨噬细胞组皮下气囊炎性细胞低于模型组 ( $P < 0.05$ )。②在 3 个时间点 模型组、模型 M1 型巨噬细胞组及模型 M2 型巨噬细胞组 IL-1 $\beta$  均高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); 在 3 个时间点比较 IL-1 $\beta$  水平在模型组低于模型 M1 型巨噬细胞组 ( $P < 0.01$ ) 而高于模型 M2 型巨噬细胞组 ( $P < 0.01$ )。TGF- $\beta$  水平在模型组高于模型 M1 型巨噬细胞组 ( $P < 0.01$ ) 而低于模型 M2 型巨噬细胞组 ( $P < 0.01$ )。结论: 巨噬细胞的极化在痛风炎症反应不同阶段起到不同的作用。

**【关键词】**巨噬细胞; 尿酸钠结晶; 痛风; IL-1 $\beta$ ; TGF- $\beta$

**【中图分类号】**R 589.7 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.004

## Effects of differentiated macrophages on gouty inflammation

ZHANG Mengying LI Zhi LI Xueqin ZHONG Min LYU Kun

Central Laboratory ,The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College ,Wuhu 241001 ,China

**【Abstract】Objective:** To observe the effects of polarized M1 and M2 macrophages *in vitro* on monosodium urate (MSU) crystals-induced acute gouty inflammation. **Methods:** Male BALB/c mice selected as experimental models ,were randomly divided into group of blank control ,models ,M1 macrophages and M2 macrophages. Acute mouse gouty inflammation model was developed by subcutaneous injection of MSU crystals. M1 and M2 macrophages were polarized *in vitro* and injected into subcutaneous air sacs of gouty inflammation model. The levels of IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  in subcutaneous air sacs were dynamically detected by ELISA before and after infusion of macrophages. **Results:** ①The number of infiltrate inflammatory cells from model group ,M1 macrophage group and M2 macrophage group was significantly increased compared to the blank controls at 4 h ,12 h and 24 h ( $P < 0.01$ ) ,whereas remained no difference at 4 h among groups of models ,M1 macrophages and M2 macrophages ( $P > 0.05$ ) .However ,the number of inflammatory cells of model group was significant lower than that of M1 macrophages group ,but significant higher than that of M2 macrophages group at 12 h and 24 h after stimulation ( $P < 0.05$ ) ; ②IL-1 $\beta$  level in model group and groups of M1 macrophages and M2 macrophages was higher than that of control group at 3 time points ( $P < 0.01$ ) .IL-1 $\beta$  level in model group was lower than that of M2 macrophages group ,yet higher than that of M1 macrophages group ( $P < 0.01$ ) .Model group had higher TGF- $\beta$  level than M1 macrophages group ,but lower level than M2 macrophages group. **Conclusion:** Differentiation of macrophages may diversely function in the conversion of inflammation of the gout.

**【Key words】**macrophage; monosodium urate crystals; gout; IL-1 $\beta$ ; TGF- $\beta$

痛风是尿酸钠或尿酸钠结晶 (monosodium urate monohydrate crystals ,MSU) 从超饱和的细胞外液沉积于组织或器官引起的一组临床综合征。临床表现为急性关节炎、痛风石及慢性关节炎、痛风性肾病 ,严重者可出现关节致残、肾功能不全。近年来 随着

人们饮食结构的改变 肥胖人群增多 其发病率逐年增高 并有年轻化的趋势。本文以鼠皮下气囊痛风模型为研究手段 探讨痛风的发作及自发缓解机制。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 BALB/c 小鼠 6~8 周

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK2013F07)

收稿日期: 2015-11-04

作者简介: 张梦莹 (1983-) ,女 检验师 (电话) 13955356393 (电子信箱) 51591569@qq.com.

龄,体质量(20±2)g,由南京青龙山实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0006。实验前实验室标准条件下常规饲养一周。

1.2 药品与试剂 尿酸钠(sigma公司);IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$  ELISA试剂盒(美国RB公司);DMEM和RPMI1640培养液(Hyclone公司);胎牛血清(Gibco公司);青霉素-链霉素-胰蛋白酶(碧云天公司);LPS、IFN- $\gamma$ 、IL-4(Peprotech公司);APC标记的抗小鼠CD206抗体(BD公司),APC标记的抗小鼠INOS抗体(Ebioscience公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 尿酸钠结晶的制备 无菌条件下将6 mL 1 mol/L NaOH溶液、1 g尿酸钠加入194 mL蒸馏水混合并煮沸,经搅拌使尿酸充分溶解,自然降温,滴入1 mol/L的HCl调pH值为7.0,溶液呈乳白色后立即离心,4℃冷却1 h后离心收集结晶,置于180℃干燥箱烘2 h,低温干燥。临用前将尿酸钠结晶100 mg,加9.9 mL PBS和0.1 mL吐温20,制备成10 mg/mL无菌尿酸钠溶液。

1.3.2 小鼠骨髓来源的巨噬细胞极化及鉴定 将小鼠颈椎脱臼处死后,无菌分离股骨和胫骨,用无菌1 mL注射器吸入L929条件DMEM培养基(含有20%小鼠成纤维细胞株L929培养3天的上清、20%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素),1 mL无菌注射器吸取培养基吹下骨髓内容物入一无菌培养皿,并将细胞充分吹匀,接种于6孔细胞培养板中。在L929条件培养基中培养7 d后去除非贴壁细胞,再培养于完全RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、1000 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)中,1天后贴壁细胞即为骨髓来源的巨噬细胞。第8天后吸取上清以PBS洗涤2遍,再加入新的DMEM完全培养基,根据实验要求以IFN- $\gamma$ (100 U/mL)和LPS(100 ng/mL)共同刺激培养48 h,诱导出M1型巨噬细胞;以IL-4(20 ng/mL)刺激培养48 h诱导出M2型巨噬细胞。48 h后消化收集细胞进行流式细胞仪检测。同时收集细胞,用Trizol提取总RNA,行实时定量PCR检测M1型、M2型特异基因。qPCR反应步骤如下:95℃预变性30 s,95℃变性30 s,60℃延伸34 s,共进行40个循环。同一样本3复孔,以GAPDH作为内参照。实验结果以荧光定量PCR分析软件BIO-RAD CFX Manager自动进行分析。其相对定量值使用比较Ct法进行计算,计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.3.3 小鼠皮下气囊急性痛风模型、分组及用药 将小鼠随机分组,即空白对照组、模型组、模型M1

和M2型巨噬细胞共4组,各组每个时间点6只。小鼠第1天背部皮下注射灭菌过滤空气5 mL,形成适当大小的气囊,随后每天注入3 mL空气,使膨胀3天,第7天皮下气囊注射200  $\mu$ L的MSU 10 mg/mL,即可诱导急性痛风炎症模型。空白对照组气囊注射200  $\mu$ L的PBS。其中同时,模型M1、M2型巨噬细胞组分别注射 $5 \times 10^7$ /mL的M1、M2型巨噬细胞100  $\mu$ L;空白对照组、模型组给予相应体积的PBS。

1.4 检测MSU诱导的急性痛风模型气囊中炎症细胞和促炎症因子 各组小鼠诱导炎症4 h、12 h和24 h时间点,向皮下气囊注射2 mL PBS冲洗,按摩5 min,抽出灌洗液装于5 mL的离心管中,1500 r/min离心5 min,上清液分装于EP管中,于-80℃冰箱保存待测,采用ELISA法检测冲洗液中IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$ 的含量,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。且管底细胞进行炎症细胞计数。

1.5 统计学方法 应用SPSS 18.0统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ ,组间数据比较进行方差分析。

## 2 结果

2.1 对极化后的巨噬细胞行流式检测 巨噬细胞膜蛋白表达的差异是鉴定不同类型巨噬细胞的重要方法。刺激细胞48 h后,对已报道的M1型巨噬细胞的标志NOS2和M2型巨噬细胞的标志CD206的表达进行了流式检测(图1)。

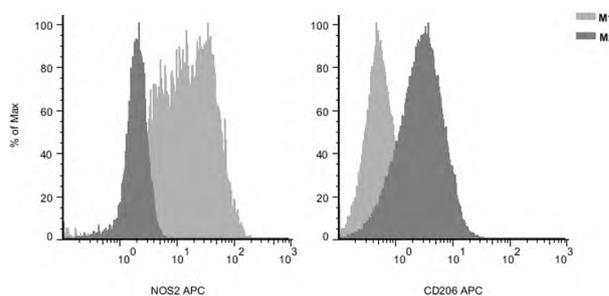
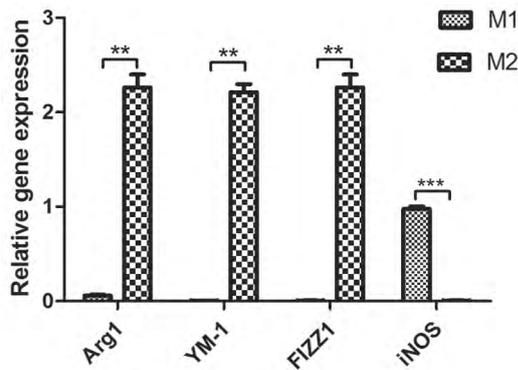


图1 流式检测体外极化的巨噬细胞相关标志的表达

2.2 实时定量PCR检测相关基因的mRNA表达 刺激48 h后,用Trizol提取消化细胞,提取总RNA,目的是对M1型和M2型巨噬细胞特征性的基因表达进行检测。发现经过体外诱导刺激之后,M1型和M2型特征性的相应标志的表达有着明显的升高(图2)。经流式细胞仪及实时定量PCR检测,证实体外诱导巨噬细胞M1和M2型巨噬细胞极化成功。



\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , M1 vs. M2.

图2 qPCR 检测刺激后巨噬细胞极化相关基因的表达

2.3 巨噬细胞对尿酸钠诱导的小鼠急性痛风模型炎症细胞数量的影响 MSU 结晶注入后在 4 h、12 h 和 24 h 时间点模型组、模型 M1 型巨噬细胞组和模型 M2 型巨噬细胞组皮下气囊炎性细胞均高于空白对照组。4 h 时间点 A 组比较差异有统计学意义，

进一步两两比较发现,各模型组与空白对照组间差异有统计学意义,3 个模型组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。而在 12 h 和 24 h 时间点 模型 M1 型巨噬细胞组皮下气囊炎性细胞高于模型组,而模型 M2 型巨噬细胞组低于模型组。见表 1。

2.4 巨噬细胞对尿酸钠诱导的小鼠急性痛风模型炎症因子的影响 于 4 h、12 h 和 24 h 时间点检测各组皮下气囊灌洗液中 IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$  水平。结果在 3 个时间点模型组、模型 M1 型巨噬细胞组及 M2 型巨噬细胞组 IL-1 $\beta$  均高于空白对照组;在 3 个时间点比较,模型 M1 型巨噬细胞组 IL-1 $\beta$  水平高于模型组,而模型 M2 型巨噬细胞组 IL-1 $\beta$  水平低于模型组。3 个时间点的 TGF- $\beta$  水平在模型 M1 型巨噬细胞组低于模型组,而模型 M2 型巨噬细胞组高于模型组。见表 2。

表 1 各组小鼠气囊灌洗液的炎性细胞数变化及巨噬细胞的作用( $\bar{x} \pm s$ ,  $\times 10^6$ /皮下气囊)

组别	n	0 h	4 h	12 h	24 h
空白对照组	6	-	2.81 $\pm$ 0.90	3.48 $\pm$ 0.86	1.26 $\pm$ 0.18
模型组	6	-	17.80 $\pm$ 3.22	19.82 $\pm$ 1.20	7.98 $\pm$ 2.85
模型 M1 型巨噬细胞组	6	-	18.14 $\pm$ 4.16	26.64 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	18.48 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>
模型 M2 型巨噬细胞组	6	-	16.62 $\pm$ 3.48	8.53 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>	4.32 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>
F			31.62	169.02	56.91
P			<0.01	<0.01	<0.01

a 与相应时间点模型对照组比较  $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠气囊灌洗液中 IL-1 $\beta$ 、和 TGF- $\beta$  水平表达( $n = 6$ )

组别	IL-1 $\beta$ /(pg/mL)			TGF- $\beta$ /(pg/mL)		
	4 h	12 h	24 h	4 h	12 h	24 h
空白对照组	30.45 $\pm$ 4.38	28.23 $\pm$ 3.56	27.82 $\pm$ 3.76	26.34 $\pm$ 2.47	28.32 $\pm$ 5.63	27.48 $\pm$ 3.42
模型组	140.65 $\pm$ 8.12	96.91 $\pm$ 9.47	46.33 $\pm$ 4.32	32.92 $\pm$ 3.10	57.27 $\pm$ 6.04	38.39 $\pm$ 5.13
模型 M1 型巨噬细胞组	250.68 $\pm$ 10.75 <sup>b</sup>	213.37 $\pm$ 6.75 <sup>b</sup>	87.69 $\pm$ 7.86 <sup>b</sup>	4.02 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	36.79 $\pm$ 5.03 <sup>b</sup>	24.62 $\pm$ 4.32 <sup>b</sup>
模型 M2 型巨噬细胞组	82.43 $\pm$ 9.48 <sup>b</sup>	56.64 $\pm$ 7.14 <sup>b</sup>	32.95 $\pm$ 5.43 <sup>b</sup>	69.75 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	86.38 $\pm$ 4.52 <sup>b</sup>	49.04 $\pm$ 3.47 <sup>b</sup>
F	754.52	814.73	141.85	600.32	137.83	43.15
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

b 与相应时间点模型对照组比较  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

近年来的体外研究提示单核巨噬细胞在单尿酸钠触发的初始炎症反应中起到核心作用。单核细胞在单尿酸钠结晶刺激下产生一系列促炎症因子,尤其是 IL-1 $\beta$ <sup>[1-2]</sup>,一直以来被认为是痛风和单尿酸钠结晶诱导的炎症中的核心细胞因子<sup>[3-4]</sup>。在鼠的痛风模型中,当鼠敲除 IL-1 受体或注射 IL-1 阻滞剂 rilonacept(列洛西普)后,单尿酸钠注入踝关节腔引起的炎症均显著下降<sup>[5-6]</sup>。给急性痛风患者注射抗 IL-1 因子拮抗剂,IL-1 受体抗体(阿那白滞素)、IL-1 $\beta$

抗体等均取得明显疗效,从而进一步证实 IL-1 $\beta$  在痛风发病机制中的核心作用<sup>[7-8]</sup>。本文在不同实验组测 IL-1 $\beta$  水平,旨在判断不同干预因素下痛风炎症发作程度的差异。

痛风性炎症的自限性从希波克拉底时代开始得到认识,并得到近代实验室研究的支持<sup>[9]</sup>。急性痛风短期内治疗的显著功效也提示明显的内源性机制限制了炎症的发展。研究发现 TGF- $\beta$  在痛风的自发缓解中起到重要作用<sup>[10]</sup>。越来越多的证据提示单核巨噬细胞系统不仅在痛风炎症启动中而且在炎症

进展及缓解中均起到轴心作用。体外研究提示,单尿酸钠结晶刺激可使分离的单核细胞由分泌促炎因子的 M1 型巨噬细胞转化成分泌抗炎因子 TGF- $\beta$  的 M2 型巨噬细胞<sup>[11]</sup>,该研究提示单核细胞可驱动炎症,而极化的巨噬细胞可缓解痛风炎症。然而其他研究显示单尿酸钠结晶在骨和骨髓诱导巨噬细胞均起到促炎症作用,而且巨噬细胞在启动炎症级联反应中起关键作用<sup>[12-13]</sup>。故单尿酸钠结晶体内募集的单核巨噬细胞群的真实功能表型仍有争议,甚至是相反的结论。大量证据表明单核巨噬细胞系统可因局部环境变化而表达不同的功能活性<sup>[14]</sup>。有研究提示单尿酸钠结晶在鼠的腹腔痛风模型中可募集单核细胞极化为具有促炎症反应的 M1 样巨噬细胞<sup>[15]</sup>。而 M2 型巨噬细胞在痛风的炎症反应中至今尚未见报道。本文的研究关键点在于,巨噬细胞不同的表型是否起到不同作用并参与了痛风炎症的发作与自发缓解。我们将小鼠骨髓来源的巨噬细胞进行体外诱导极化为 M1 和 M2 型巨噬细胞,分别注入单尿酸钠诱导的痛风皮下气囊模型中,检测不同组促炎症因子 IL-1 $\beta$  和抗炎因子 TGF- $\beta$  的水平。我们的研究提示 M1 型巨噬细胞注射入单尿酸钠诱导痛风模型,促使 IL-1 $\beta$  水平升高, M1 型巨噬细胞有促进痛风炎症进展持续的作用。而 M2 型巨噬细胞注射入单尿酸钠诱导痛风模型中,表现为 IL-1 $\beta$  水平降低,而 TGF- $\beta$  水平升高,提示 M2 型巨噬细胞有拮抗痛风炎症,促进炎症缓解的作用。动物痛风模型并不能等同于人类痛风炎症状态,但巨噬细胞的极化可能在痛风发生及缓解中起到一定的作用,为痛风的治疗提供一种思路。

### 【参考文献】

- [1] YAGNIK DR ,HILLYER P ,MARSHALL D *et al.* Non-inflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. Implications for the control of joint inflammation in gout [J]. *Arthritis Rheum* 2000 43( 8) : 1779-1789.
- [2] LANDIS RC ,YAGNIK DR ,FLOREY O *et al.* Safe disposal of inflammatory monosodium urate monohydrate crystals by differentiated macrophages [J]. *Arthritis Rheum* 2002 46( 11) : 3026-3033.
- [3] ROBERGE CJ ,GRASSI J ,DE MEDICIS R *et al.* Crystal-neutrophil interactions lead to interleukin-1 synthesis [J]. *Agents Actions* , 1991 34: 38-41.
- [4] CHEN CJ ,SHI Y ,HEARN A *et al.* MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals [J]. *J Clin Invest* 2006 116: 2262-2271.
- [5] MARTIN WJ ,WALTON M ,HARPER J. Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout [J]. *Arthritis Rheum* 2009 60( 1) : 281-289.
- [6] TORRES R ,MACDONALD L ,CROLL SD *et al.* Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis [J]. *Ann Rheum Dis* 2009 68( 10) : 1602-1608.
- [7] TERKELTAUB R ,SUNDY JS ,SCHUMACHER HR *et al.* The interleukin 1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study [J]. *Ann Rheum Dis* 2009 68( 10) : 1613-1617.
- [8] MCGONAGLE D ,TAN AL ,SHANKARANARAYANA S *et al.* Management of treatment resistant inflammation of acute on chronic tophaceous gout with anakinra [J]. *Ann Rheum Dis* 2007 66( 12) : 1683-1684.
- [9] SCHILTZ C ,LIOTÉ F ,PRUDHOMMEAUX F *et al.* Monosodium Urate Monohydrate Crystal-Induced Inflammation *in vivo* [J]. *Arthritis & Rheumatism* 2002 46( 6) : 1643-1650.
- [10] CHEN YU-HSIUAN ,HSIEH SONG-CHOU ,CHEN WEI-YU *et al.* Spontaneous resolution of acute gout arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGF $\beta$ 1 ,IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3 [J]. *Ann Rheum Dis* 2011 70: 1655-1663.
- [11] YAGNIK DR ,EVANS BJ ,FLOREY O *et al.* Macrophage release of transforming growth factor-1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation [J]. *Arthritis Rheum* , 2004 50: 2273-2280.
- [12] JARAMILLO M ,GODBOUT M ,NACCACHE PH *et al.* Signaling events involved in macrophage chemokine expression in response to monosodium urate crystals [J]. *J Biol Chem* 2004 279: 52797-52805.
- [13] MURAKAMI Y ,AKAHOSHI T ,HAYASHI I *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals [J]. *Arthritis Rheum* 2006 54: 455-462.
- [14] STOUT RD ,SUTTLES J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing micro-environments [J]. *J Leukoc Biol* 2004 76: 509-513.
- [15] WILLIAM JOHN MARTIN ,ODETTE SHAW ,XIAO LIU *et al.* Monosodium Urate Monohydrate Crystal - Recruited Non-inflammatory Monocytes Differentiate Into M1-like Pro-inflammatory Macrophages in a Peritoneal Murine Model of Gout [J]. *Arthritis & Rheumatism* , 2011 63( 5) : 1322-1332.