

阻断 CXCR2 对宫内绒毛膜羊膜炎大鼠胎盘组织 NLRP3 信号转导及 Th1/Th2 平衡的影响*

林建丽 李慧 吴小妹 周玉华

(海南医学院第一附属医院产科, 海南 海口 570100)

【摘要】目的 探讨阻断 CXC 受体 2(CXCR2)对宫内绒毛膜羊膜炎(CA)大鼠胎盘组织含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLRP3)信号转导及辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2(Th1/Th2)平衡的作用。**方法** 48 只 SD 孕鼠按随机数字表法分为 4 组, 即对照组、SB225002 组、LPS 组、LPS+SB225002 组, 每组 12 只, 按分组通过羊膜腔注射脂多糖(LPS)构建宫内绒毛膜羊膜炎模型, 并给予 CXCR2 阻断剂 SB225002 处理; 妊娠第 20 天剖腹取胎, HE 染色对胎盘组织进行病理形态学检查, 免疫荧光染色检测胎盘组织 NLRP3 表达, 实时荧光定量 PCR 反应和 Western blot 法测定胎盘组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量, ELISA 法检测血清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 及 IL-10 的含量, 流式细胞术测定外周血单个核细胞内 Th1/Th2 细胞比例变化。**结果** 与对照组比较, 经 LPS 诱导后孕鼠胎盘组织结构受损, 炎症细胞浸润明显, 血窦面积显著增加($P < 0.05$), NLRP3 阳性表达率显著升高($P < 0.05$), NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著上调($P < 0.05$), 血清内 IL-2、IFN- γ 水平显著升高而 IL-4、IL-5、IL-10 水平显著降低($P < 0.05$), Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均显著升高, Th2 细胞比例显著降低($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 经 LPS 诱导并给予 CXCR2 阻断剂 SB225002 处理的孕鼠, 其胎盘组织内炎症细胞浸润减轻, 血窦面积显著减小($P < 0.05$), NLRP3 阳性表达率显著降低($P < 0.05$), NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著下调($P < 0.05$), 血清内 IL-2、IFN- γ 水平显著降低, IL-4、IL-5、IL-10 水平则显著升高($P < 0.05$), 同时, Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均显著降低, 而 Th2 细胞比例显著升高($P < 0.05$)。**结论** 阻断 CXCR2 对孕鼠宫内绒毛膜羊膜炎病理过程有改善作用, 并有望成为早产防控的治疗靶点。

【关键词】 绒毛膜羊膜炎; CXC 受体 2; 含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3; 辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2

【中图分类号】 R714.25 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 11. 007

Effects of blocking CXCR2 on NLRP3 signal transduction and Th1/Th2 balance in placental tissue of intrauterine chorioamnionitis

LIN Jianli, LI Hui, WU Xiaomei, ZHOU Yuhua

(Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of blocking CXC receptor 2 (CXCR2) on the signal transduction of NLR family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3) in placental tissue of rats with intrauterine chorioamnionitis (CA) T helper cells 1/T helper cells 2 (Th1/Th2) balance. **Methods** 48 SD pregnant mice were divided into 4 groups according to the random table method, including control group, SB225002 group, LPS group, and LPS + SB225002 group, with 12 rats in each group. The intrauterine chorioamnionitis model was established by intra-amniotic injection of lipopolysaccharide (LPS) by group, and treated with CXCR2 antagonist SB225002. The placenta was removed by caesarean section on the 20th day of pregnancy. The placental tissue was pathologically examined by HE staining. The immunofluorescence staining was used to detect the expression of NLRP3 in placental tissue. The relative mRNA expression and protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 in placental tissue were determined by real-time fluorescence quantitative PCR reaction and Western blot. The levels of cytokines IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10 in serum were detected.

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(21A200041)

引用本文:林建丽,李慧,吴小妹,等.阻断 CXCR2 对宫内绒毛膜羊膜炎大鼠胎盘组织 NLRP3 信号转导及 Th1/Th2 平衡的影响[J].西部医学,2023,35(11):1594-1601. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 11. 007

ted by ELISA. The flow cytometry was used to measure the changes of Th1 and Th2 cells in peripheral blood mononuclear cells. **Results** Compared with the control group, the placental tissue structure of the pregnant mice was damaged after LPS induction, the inflammatory cell infiltration was obvious, the blood sinus area was significantly increased ($P < 0.05$), the positive expression rate of NLRP3 was significantly increased ($P < 0.05$), the relative mRNA and protein expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 were significantly up-regulated ($P < 0.05$), the levels of IL-2 and IFN- γ in serum were significantly increased, while the levels of IL-4, IL-5 and IL-10 were significantly decreased ($P < 0.05$), the proportion of Th1 cells and the ratio of Th1/Th2 were significantly increased, and the proportion of Th2 cells was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, in the pregnant mice induced by LPS and treated with the CXCR2 antagonist SB225002, the infiltration of inflammatory cells in the placental tissue was reduced, the area of the blood sinus was significantly reduced ($P < 0.05$), the positive expression rate of NLRP3 was significantly reduced ($P < 0.05$), the relative mRNA and protein expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the levels of IL-2 and IFN- γ in serum were significantly decreased, the level of IL-4, IL-5 and IL-10 were significantly increased ($P < 0.05$), the proportion of Th1 cells and the ratio of Th1/Th2 were significantly decreased, while the proportion of Th2 cells was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Blockade of CXCR2 can improve the pathological process of intrauterine chorioamnionitis in pregnant mice, and is expected to become a therapeutic target for preterm labor infection control.

【Key words】 Chorioamnionitis; CXC receptor 2; NLR family pyrin domain containing protein 3; T helper cells 1/T helper cells 2

早产是导致大约 85% 新生儿死亡的主要原因,而宫内感染是诱发早产的原因之一,占全球所有早产病例的 40% 左右^[1]。绒毛膜羊膜炎(Chorioamnionitis, CA)是一种常见的妊娠并发症,是世界范围内早产、死产的主要原因。CA 作为一种特异性的宫内感染性疾病,还与胎儿生长发育密切相关,此外,其能增加脑室内出血、脑室周围白质软化、支气管肺发育不良等疾病的发生率^[2-5],给个人和家庭造成较大压力,并给社会带来沉重的经济负担。胎盘组织对于胎儿多器官和系统的发育均十分重要,胎盘功能障碍会导致胎儿生长受限、早产、流产以及神经发育异常等^[6-7]。已知 CA 会导致胎盘组织出现炎症反应,炎症细胞和炎症因子均可诱导血管内皮发生损伤,导致胎盘血液灌注不良,这一现象与早期早产密切相关^[8]。趋化因子配体 1 (Chemokine ligand 1, CXCL1) 及其同源受体 (CXC receptor 2, CXCR2) 与 CA 的病理生理学过程有关,随着宫内炎症加剧而表达上调,此外,胎盘组织内炎症的严重程度与 CA 中 CXCL1 水平呈正相关^[9]。CXCR2 是典型的 G 蛋白偶联受体,作为特征明确的趋化因子受体之一,显示出强大的嗜中性粒细胞或髓源性抑制细胞趋化性,在不同疾病中参与免疫介导的炎症性病理过程^[10-11]。目前,CXCR2 被认为是控制发病机制中炎症损伤的潜在药理学靶点。关于 CXCR2 在 CA 进程中的作用及机制尚未明确,本研究旨在通过给予孕鼠羊膜腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导 CA 模型,观察 CXCR2 阻断剂 SB225002 对 CA 的影响并探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级健康成年 SD 大鼠,雌性 50 只,雄性 25 只,体质量 270~310 g,由海南药物研究所有限责任公司[生产许可证号:SCXK(琼)2020-0007]提供,雌鼠和雄鼠分笼饲养。动物房温度保持在 22~26 ℃之间,相对湿度为 40%~60%,每天照明 12 h,按时清洁排泄物,并补充食物,期间所有大鼠均自由摄食、饮水。本研究获得我院伦理委员会审核批准(批准文号:KT20210610188)

1.2 主要材料与试剂 CXCR2 阻断剂 SB225002(英国 Biorbyt 公司),LPS(美国 Sigma 公司),HE 染色试剂盒(北京雷根生物技术公司),Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),第一链 cDNA 合成试剂盒(上海生工生物工程公司),荧光定量 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(日本 Takakura 公司),IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 及 IL-10 特异性 ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技公司),RIPA 裂解液、BCA 蛋白测定试剂盒和 DAPI 染料(上海碧云天生物研究所),高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒(南京诺唯赞生物公司),大鼠外周血淋巴细胞分离液(北京凯诗源生物科技公司),免疫荧光染色试剂(上海晶莱生物公司),兔抗 NLRP3 单克隆抗体、兔抗 ASC 多克隆抗体及兔抗 Caspase-1 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记的 CD4 抗体、PE-A 标记的 IFN- γ 抗体以及 PE-A 标记的 IL-4 抗体(北京百奥莱博科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物模型制备与分组处理 将雌雄大鼠按 2:1 的数目比例进行合笼饲养,记录时间,以发现雌

性大鼠阴道栓形成或显微镜下观察到阴道分泌物涂片有大量精子则视为交配成功,记为受孕第1天。将孕鼠单笼饲养,随机选取48只为4组:对照组、SB225002组、LPS组、LPS+SB225002组,每组12只。LPS组和LPS+SB225002组的孕鼠在受孕第18天时,10%水合氯醛腹腔麻醉,无菌环境下备皮开腹,向孕鼠羊膜腔内分别注射0.5 mg/kg的LPS,对照组和SB225002组的孕鼠同时注射等体积生理盐水;接着给予SB225002组和LPS+SB225002组的孕鼠羊膜腔内注射3 mg/kg的CXCR2拮抗剂SB225002,对照组和LPS组同时注射等体积生理盐水。注射完毕后,将胚胎放回腹腔中,无菌生理盐水冲洗腹腔并分层关闭,监测孕鼠活动、摄食、阴道流血和感染等情况,各孕鼠实验前的体质量无统计学差异。

1.3.2 胎盘组织形态学检查 将各组孕鼠麻醉,剖腹留取胎盘组织,生理盐水清洗后滤纸吸干水分,置入4%多聚甲醛固定24 h,通过梯度酒精脱水与二甲苯透明后,浸蜡包埋,在病理切片机上制备4 μm厚的组织切片。将切片脱蜡至水,置入苏木精水溶液中染色5 min,在酸水与氨水中进行分色,浸泡数秒钟,流水冲洗,再置入伊红染色液染色2 min,进行脱水、透明,滴加树胶在已透明的组织切片上,晾干,在光学显微镜下观察胎盘组织病理学形态变化并采集图像。每张切片随机选取3个视野,通过Image-Pro Plus软件分析血窦面积,结果取平均值。

1.3.3 免疫荧光染色 取制备的胎盘组织切片,经梯度酒精脱水与二甲苯透明后,放入柠檬酸修复液里微波炉加热煮沸,室温冷却,PBS洗涤,浸入0.3% TritonX-100中孵育处理15 min,滴加10%山羊血清覆盖切片,37 °C封闭2 h。甩去残液,加入兔抗NLRP3单克隆抗体(1:200)作为一抗进行标记,4 °C孵育过夜;次日,甩去残液,PBS洗涤,以FITC标记山羊抗兔IgG(1:1 000)作为二抗,37 °C湿盒避光孵育1 h,PBS洗涤后,加入DAPI染料,37 °C湿盒避光染色10 min,滴加荧光抗淬灭剂封片,晾干,在荧光显微镜下观察各组大鼠胎盘组织内染色情况,并采集图像,每张切片随机取5个视野,计数该视野下NLRP3阳性表达数目,结果取平均值。

1.3.4 实时荧光定量PCR反应 取胎盘组织剪碎并研磨匀浆,Trizol试剂液提取总RNA,按说明步骤操作,经分光光度计检测样品纯度与浓度。根据第一链cDNA合成试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板,在荧光定量PCR系统进行定量扩增,检测目的基因在mRNA上的表达,具体按照SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒说明书

来配制反应体系,依次加入各试剂和引物,GAPDH基因为内参。扩增程序设置如下:95 °C 30 s,1个循环;95 °C 5 s,60 °C 30 s,40个循环。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,具体如下:NLRP3,上游引物5'-CCATCGGCAAGACCAAGA-3',下游引物5'-ACAGGCTCAGAATGCTCATC-3';ASC,上游引物5'-AACCCAAGCAAGATGCGGAAG-3',下游引物5'-TTAGGGCCTGGAGGAGCAAG-3';Caspase-1,上游引物5'-CAGACAAGGGTGCTAACAA-3',下游引物5'-TCGGAATAACGGAGTCAATCA-3';GAPDH,上游引物5'-TGACTTCAACAGCGACACCC-3',下游引物5'-CACCTGTTGCTGT AGCCAAA-3',扩增结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.3.5 Western blot法 取胎盘组织剪碎并研磨匀浆,预冷的RIPA裂解液裂解组织提取总蛋白,BCA法测定浓度。制备10%SDS-PAGE,将上样缓冲液与样本混合,沸水煮10 min使蛋白变性,取等量蛋白样品加入SDS-PAGE胶孔内,经电泳分离蛋白,电转至PVDF膜。制备封闭液,将转好的膜浸入5%脱脂奶粉中封闭2 h,TBST洗膜,加入一抗工作液,4 °C孵育过夜。次日,TBST洗膜,加入二抗工作液,室温孵育2 h。TBS再次洗膜后,利用ECL试剂显色,在凝胶成像系统下曝光,通过Image-Pro Plus分析软件统计各蛋白条带灰度值,GAPDH蛋白作为内参,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比作为目的蛋白的相对表达量。

1.3.6 酶联免疫吸附法 各组大鼠眼眶静脉丛采血,样品室温静置2 h,以4 000 r/min离心15 min,获取上清,使用特异性ELISA试剂盒测定各组样本血清中IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5以及IL-10的水平,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行,并制作标准曲线,计算各细胞因子的含量。

1.3.7 流式细胞术 采集各组大鼠外周血,将100 μL血液样本与200 μL PBS缓冲液混合,加入大鼠淋巴细胞分离液分离单核细胞,以4 000 rpm离心30 min,吸取上中层交界处含淋巴细胞与单核细胞混合液,继续以4 000 rpm离心30 min,保留沉淀。重悬沉淀,添加FITC标记的CD4抗体,室温避光静置30 min,再使用固定剂与破膜剂处理,分别加入PE-A标记的IFN-γ抗体、PE-A标记的IL-4抗体,室温避光静置30 min,离心后弃上清,PBS缓冲液重悬,通过流式细胞仪检测Th1、Th2细胞比例变化情况,并计算Th1/Th2比值。

1.4 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行数据分析,GraphPad Prism 8.30软件绘制统计图。符合正态分布的实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组

重复测量数据比较采用单因素方差分析,组内两两数据比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠胎盘组织病理学形态观察结果 通过 HE 染色观察各组大鼠胎盘组织形态学,可见对照组大鼠胎盘组织结构正常,血管规则,未见明显的炎症

细胞浸润;相较于对照组,SB225002 组大鼠胎盘组织未发生明显变化($P > 0.05$),而 LPS 组大鼠胎盘组织内蜕膜炎症细胞浸润及绒毛膜炎症程度明显,血管管腔不规则,胎盘血窦面积显著增加($P < 0.05$),胎盘结构发育受到破坏;与 LPS 组比较,LPS+SB225002 组大鼠胎盘组织内蜕膜炎症细胞浸润减轻,绒毛膜炎症现象也得到改善,胎盘血窦面积显著减小($P < 0.05$),见图 1。

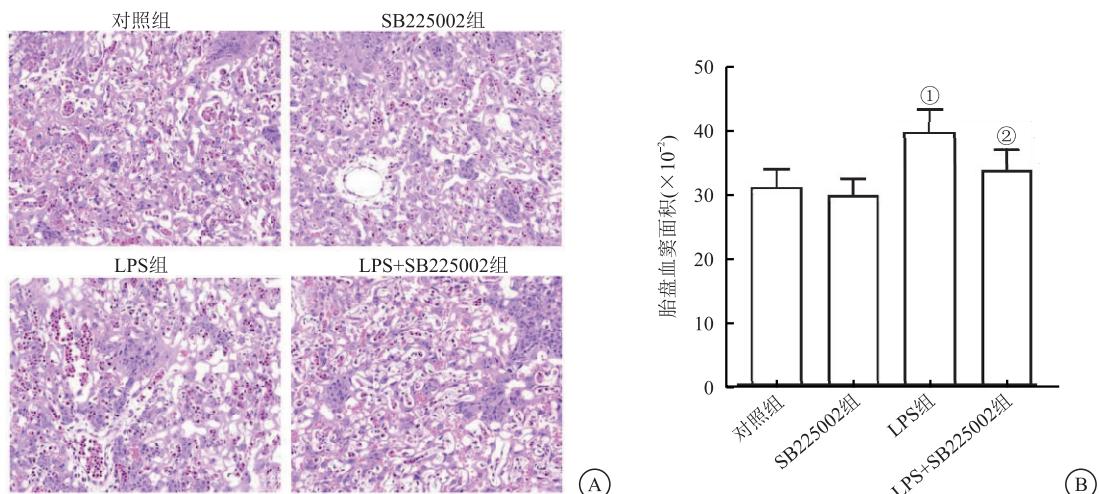


图 1 各组大鼠胎盘组织病理学形态图

Figure 1 Placental histopathological morphology of rats in each group

注:A. HE 染色观察各组胎盘组织形态学(100×);B. 各组胎盘血窦面积比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 LPS 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠胎盘组织内 NLRP3 表达水平比较

通过免疫荧光染色观察各组大鼠胎盘组织内 NLRP3 表达,图中红色荧光代表 NLRP3 阳性表达,相较于对照组,SB225002 组大鼠胎盘组织内红色荧光强度未发生明显变化,NLRP3 阳性表达率变化无显著差异($P >$

0.05),LPS 组大鼠胎盘组织内红色荧光强度明显增强,NLRP3 阳性表达率显著升高($P < 0.05$);而 LPS+SB225002 组大鼠胎盘组织内红色荧光强度明显减弱,NLRP3 阳性表达率显著低于 LPS 组($P < 0.05$),见图 2。

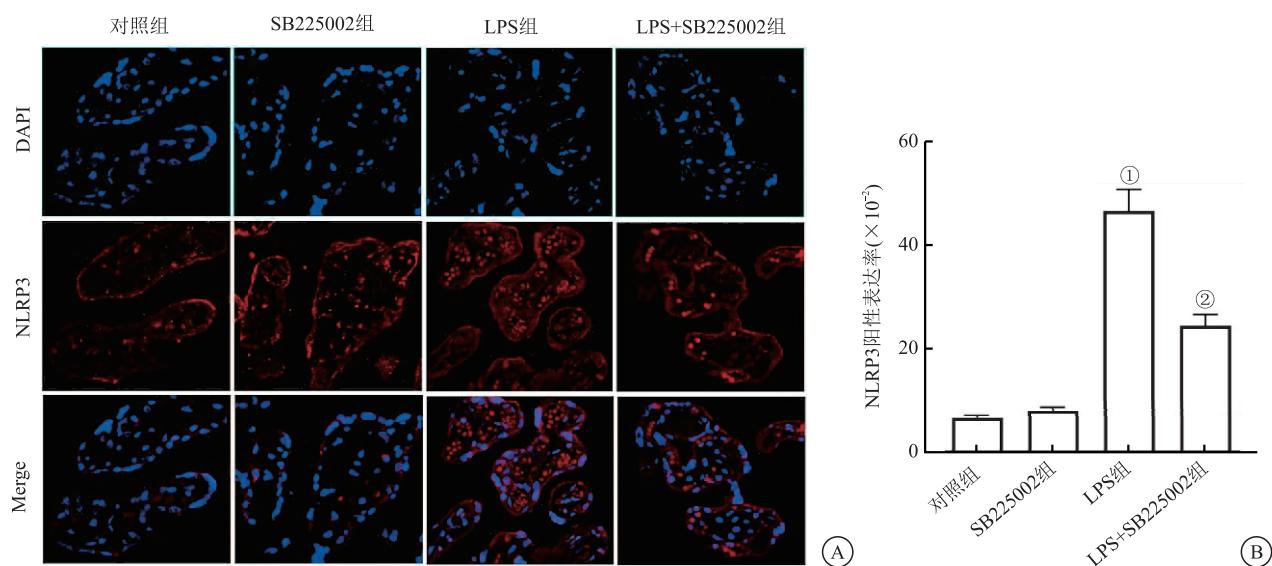


图 2 各组大鼠胎盘组织 NLRP3 表达检测

Figure 2 Detection of NLRP3 expression in placental tissue of rats in each group

注:A. 免疫荧光染色观察各组胎盘组织 NLRP3 染色(200×);B. 各组胎盘组织 NLRP3 阳性表达率比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 LPS 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠胎盘组织内 NLRP3 信号转导途径相关基因及蛋白表达水平比较 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与对照组比较,SB225002 组大鼠胎盘组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量变化无显著差异($P > 0.05$),LPS 组大鼠胎盘组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量均显著上调($P < 0.05$);与 LPS 组比较,LPS+SB225002 组大鼠胎盘组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量均显著下调($P <$

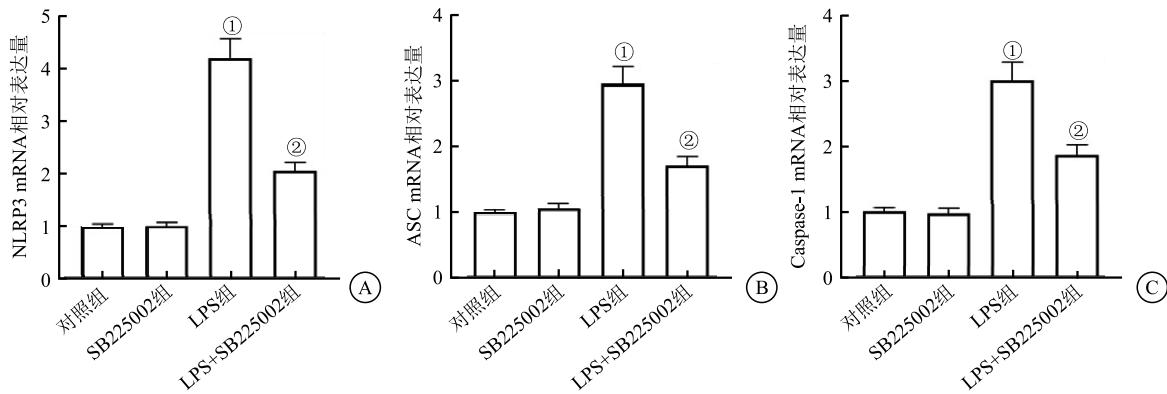


图 3 各组大鼠胎盘组织 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 mRNA 表达水平比较

Figure 3 The mRNA expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 in placental tissue of rats in each group

注: A. NLRP3 mRNA 相对表达量比较; B. ASC mRNA 相对表达量比较; C. Caspase-1 mRNA 相对表达量比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 LPS 组比较,② $P < 0.05$ 。

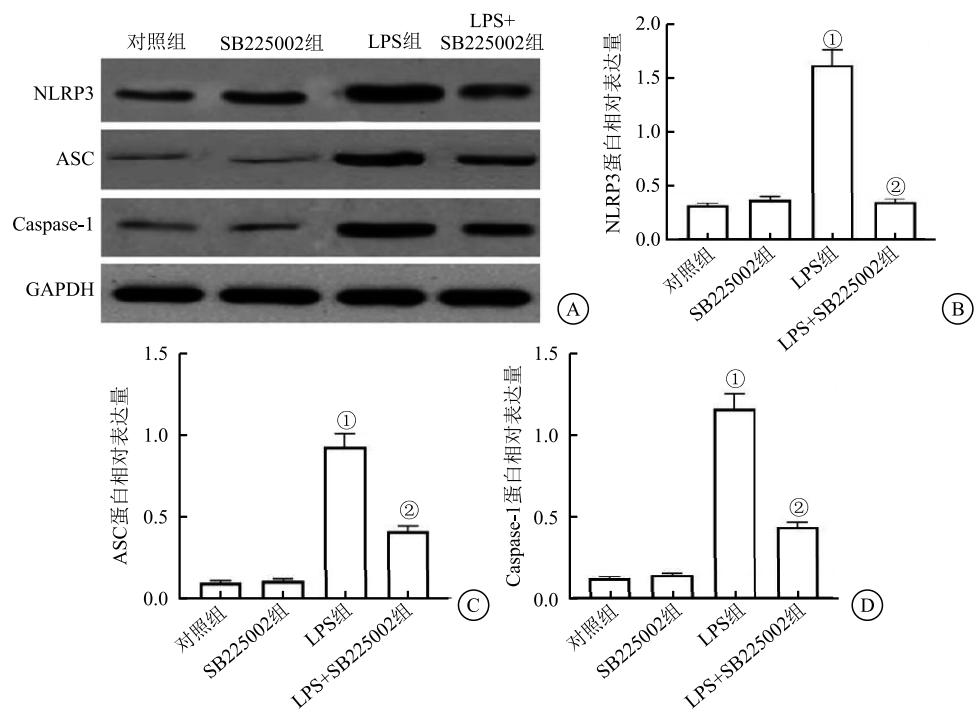


图 4 各组大鼠胎盘组织 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达水平比较

Figure 4 The protein expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 in placental tissue of rats in each group

注: A. Western blot 检测各组大鼠胎盘组织内 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白条带; B. NLRP3 蛋白相对表达量比较; C. ASC 蛋白相对表达量比较; D. Caspase-1 蛋白相对表达量比较。与对照组比较,① $P < 0.05$;与 LPS 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清炎性因子水平比较 ELISA 检测各组大鼠血清内 IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5 及 IL-10 水平

结果显示,与对照组比较,SB225002 组大鼠血清内 IL-2、IFN-γ、IL-4、IL-5 及 IL-10 水平变化均无显著差

异($P>0.05$),LPS 组大鼠血清 IL-2、IFN- γ 水平显著升高,IL-4、IL-5 及 IL-10 水平显著降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+SB225002 组大鼠血清 IL-2、

IFN- γ 水平显著降低,而 IL-4、IL-5 及 IL-10 水平均显著升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠血清细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

Table 1 Comparison of serum cellular secretion factor levels of rats in each group

组别	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5	IL-10
Control 组	223.34±21.52	31.09±3.12	8.81±0.82	32.83±3.21	19.34±1.72
SB225002 组	224.52±20.67	30.86±2.94	8.99±0.85	31.92±2.97	20.98±1.66
LPS 组	280.65±26.80 ^①	45.11±4.27 ^①	5.13±0.48 ^①	18.37±1.56 ^①	12.07±1.11 ^①
LPS+SB225002 组	245.01±23.33 ^②	33.79±3.21 ^②	7.97±0.64 ^②	30.20±3.29 ^②	16.83±1.37 ^②

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 LPS 组比较,② $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例分布比较
流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,SB225002 组大鼠外周血 Th1 细胞比例、Th2 细胞比例及 Th1/Th2 比值变化均无显著差异($P>0.05$),LPS 组大鼠外周血 Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均

显著升高,Th2 细胞比例显著降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+SB225002 组大鼠外周血 Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均显著降低,Th2 细胞比例显著升高($P<0.05$),见图 5。

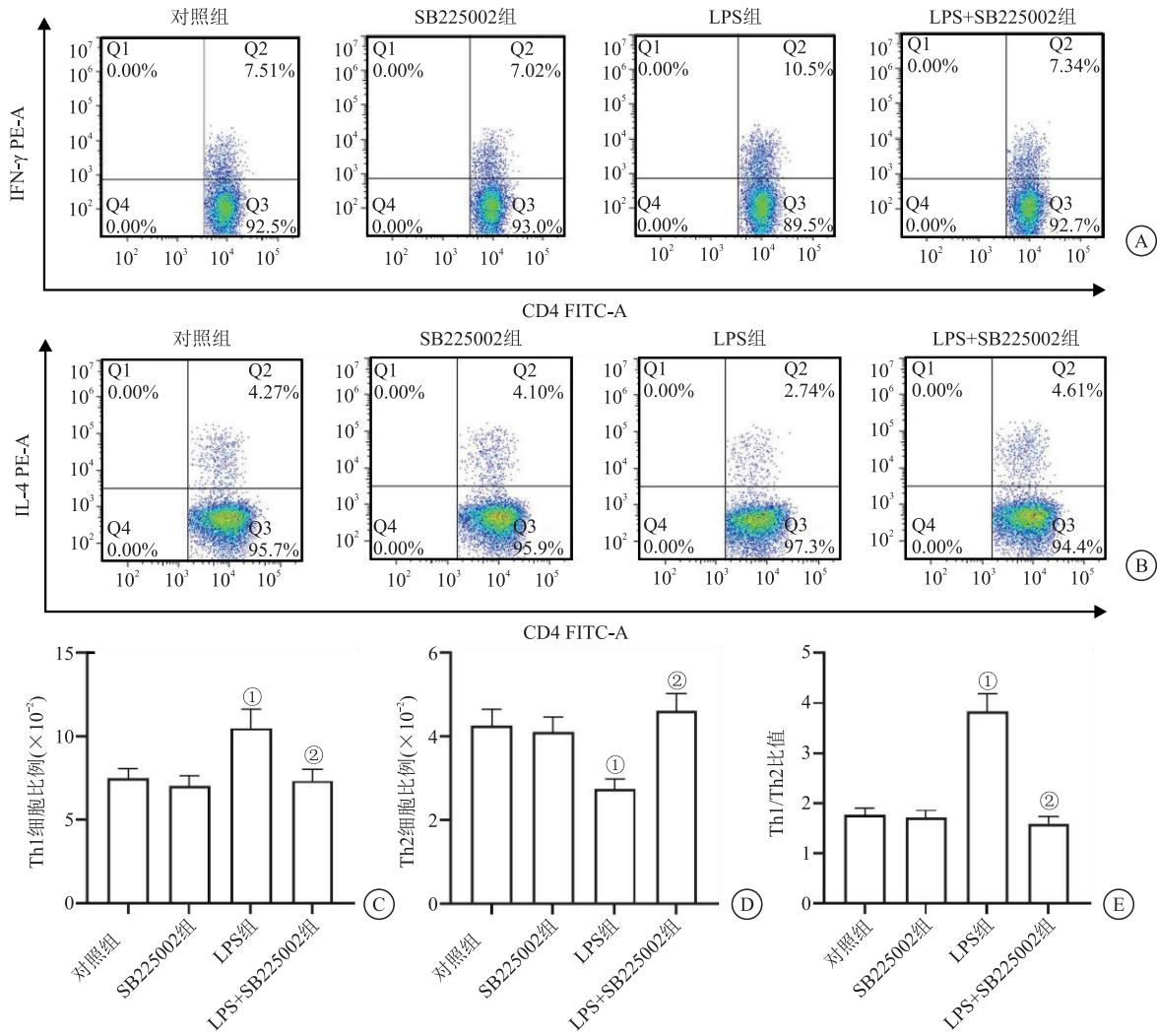


图 5 各组大鼠外周血 Th1/Th2 细胞比例分布

Figure 5 Distribution of Th1/Th2 cells in peripheral blood of rats in each group

注:A. 流式细胞术检测各组大鼠外周血 CD4 与 IFN- γ 标记的 Th1 细胞比例;B. 流式细胞术检测 CD4 与 IL-4 标记的 Th2 细胞比例;C. 各组大鼠外周血 Th1 细胞比例比较;D. 各组大鼠外周血 Th2 细胞比例比较;E. 各组大鼠外周血 Th1/Th2 比值比较。与对照组比较,① $P<0.05$;与 LPS 组比较,② $P<0.05$ 。

3 讨论

CA 主要表现为母体发热、白细胞增多、心动过速、子宫压痛以及胎膜早破等,临床 CA 的诊断最常在临产或是分娩时进行。CA 可引起胎儿炎症反应综合征,这是由于胎儿免疫系统被激活后释放了大量炎症因子,这些炎症因子会干扰胎儿脑细胞因子的正常表达,导致早产儿脑损伤^[12]。也有一些临床前研究表明,CA 引起的胎儿肺上皮损伤导致血管渗透压受损和细胞凋亡,使肺泡壁变薄,此外,炎症因子也会损伤胎儿肺毛细血管内皮细胞,使得肺泡及血管结构受损,最终引起支气管肺发育不良^[13-14]。LPS 是革兰氏阴性菌致炎的主要成分,用于建立妊娠相关的炎症性疾病模型,本研究采用孕鼠羊膜腔注射 LPS 诱导构建宫内 CA 模型,探讨了使用 SB225002 阻断 CXCR2 可对 CA 胎盘组织损伤起到明显的改善作用,为 CA 的临床诊疗提供新思路。

CXCR2 作为一种在嗜中性粒细胞中表达的趋化因子受体,在癌症和各种炎症或免疫疾病中都起着至关重要的作用,阻断 CXCR2 是多种疾病治疗的潜在新途径。Saintigny 等^[15] 研究表明 CXCR2 的表达水平与肺癌的侵袭和转移有关,肺癌细胞中 CXCR2 高表达与临床患者的预后不良有关,抑制 CXCR2 及其配体 CXCL8 可显著抑制肺癌细胞的增殖和迁移,并减少肿瘤血管生成。Zhu 等^[16] 研究指出在活动性溃疡性结肠炎患者的结肠黏膜组织和外周血细胞中 CXCR2 的表达显著增加,CXCR2 在中性粒细胞中也高表达,并与疾病活动度呈正相关,用 SB225002 阻断 CXCR2 可以显著改善 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎,并降低了中性粒细胞中促炎介质的产生,该研究表明了 CXCR2 通过调节中性粒细胞的免疫反应在溃疡性结肠炎的发病机制中起关键作用。Sharma 等^[17] 研究表明 CXCR2 在乳腺癌骨转移过程中调节破骨细胞活化,利用 Cl66-shCXCR2 敲低乳腺癌细胞中 CXCR2 表达并植入雌性 Balb/c 小鼠颅骨背侧皮瓣上后发现肿瘤生长和肿瘤诱导的骨溶解显著减少,同时,观察到注射乳腺癌 Cl66-Luc 细胞的 CXCR2^{-/-} 小鼠骨骼中的骨破坏和转移也较野生型小鼠中明显减少。Nie 等^[18] 研究发现在血管紧张素 II 诱导的腹主动脉瘤组织中的 CXCR2 表达增加,利用 SB265610 阻断 CXCR2 可减轻腹主动脉瘤中胶原沉积、弹性蛋白降解、金属基质金属蛋白酶表达以及巨噬细胞积累,从而降低腹主动脉瘤的形成。在本研究中,通过 SB225002 阻断 CXCR2 后 CA 大鼠胎盘组织内蜕膜炎症细胞浸润和绒毛膜炎症现象减轻,胎盘血窦面积也减小,由此推测,CXCR2 可能在 CA 的发病机制中起

着重要作用。

NLRP3 炎性体可作为多种炎性疾病的潜在治疗靶点。在羊膜腔感染或炎症下,绒毛膜羊膜中 NLRP3 炎性体激活与自发性早产有关,此外,在患有 CA 的自发性早产妇女的胎膜组织中也已检测到炎症小体相关基因 NLRP3 和 Caspase-1 的表达上调,同时表明了抑制 NLRP3 炎性体可延长妊娠期,不仅可以将 CA 诱发的早产率降低 30%,而且还可以显著提高新生儿存活率^[19]。奇异变形杆菌、阴道加德纳菌和 B 族链球菌是羊膜腔内感染常见的微生物,可诱导巨噬细胞中 NLRP3 炎性体激活^[20-22],这进一步暗示该途径与导致早产的机制有关,阻断 NLRP3 炎性体激活可作为相关疾病的治疗方案。本研究结果显示,利用 SB225002 阻断 CXCR2 后发现 CA 大鼠胎盘组织内 NLRP3 表达的荧光强度明显减弱,NLRP3、ASC 及 Caspase-1 的 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著下调,说明阻断 CXCR2 抑制了 NLRP3 途径的激活,这可能是其在 CA 中发挥保护作用的途径之一。

在 CA 中各种交联免疫因素从而导致患者的适应性免疫系统被激活,各细胞因子分泌及释放的变化可能会改变 T 细胞发育以促进 T 辅助细胞效应反应的发展^[23-25]。母体与胎儿间的免疫相容是妊娠成功的必备条件,其中 Th1/Th2 细胞极性的调节是保证胎儿健康生长的关键。已知 CA 孕妇外周血中 Th1 细胞分泌因子 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 水平均升高,而 Th2 细胞分泌因子 IL-4 和 IL-6 水平降低,说明 Th1/Th2 细胞极性状态向 Th1 偏移,Th1/Th2 平衡状态被打破^[26]。本研究同样显示,CA 大鼠血清 IL-2、IFN- γ 水平显著升高,IL-4、IL-5 及 IL-10 水平显著降低,外周血 Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均显著升高, Th2 细胞比例显著降低;而在 CXCR2 阻断剂 SB225002 作用下,CA 大鼠血清 IL-2、IFN- γ 水平表现为降低,IL-4、IL-5 及 IL-10 水平均表现为升高,同时,外周血 Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值均显著降低且 Th2 细胞比例显著升高,由此推测,阻断 CXCR2 参与调控 CA 中 Th1/Th2 失衡现象,抑制了 Th1/Th2 向 Th1 偏移。

4 结论

CXCR2 可能参与了孕鼠 CA 进程,阻断 CXCR2 可通过抑制 NLRP3 信号转导途径及调控 Th1/Th2 趋于平衡状态,从而对 CA 孕鼠起到一定的保护作用。由于受到产前产后诸多因素的干扰,CA 在妊娠中多发,对母婴结局造成了不良影响,本研究通过构建 CA 孕鼠大鼠模型并给予 CXCR2 拮抗剂 SB225002 处理后,取得了良好的实验效果,这为 CA 的治疗提供了提

供理论依据与实验支持。但也存在一定不足,需进一步从新生幼鼠角度进行相关功能检测,并深入探究相关的调控机制,以期为临幊上治疗CA提供新思路。

【参考文献】

- [1] JAIN V G, WILLIS K A, JOBE A, et al. Chorioamnionitis and neonatal outcomes[J]. *Pediatr Res*, 2022, 91(2): 289-296.
- [2] SULLIVAN G, GALDI P, BORBYE-LORENZEN N, et al. Preterm birth is associated with immune dysregulation which persists in infants exposed to histologic chorioamnionitis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 722489.
- [3] 张倩薇,丁冉,孙启斌,等.组织学绒毛膜羊膜炎暴露对呼吸窘迫综合征早产儿并发支气管肺发育不良的影响[J].中国小儿急救医学,2021,28(5):380-384.
- [4] 林桃,冯炳棋,黄燕清.胎膜早破新生儿脐血CRP、TNF- α 水平与早发型新生儿败血症的关系[J].海南医学,2020,31(17): 2233-2235.
- [5] CONDE-AGUDELO A, ROMERO R, JUNG E J, et al. Management of clinical chorioamnionitis: an evidence-based approach[J]. *Am J ObstetGynecol*, 2020, 223(6): 848-869.
- [6] SINGH A M, SHERENIAN M G, KIM K Y, et al. Fetal cord blood and tissue immune responses to chronic placental inflammation and chorioamnionitis[J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2018, 14: 66.
- [7] 杨鸿雁,梅奇华,王卓,等.妊娠高血压及先兆子痫孕妇胎盘发育不全的相关因素分析[J].西部医学,2020,32(3):438-442,447.
- [8] CAPPELLETTI M, PRESICCE P, KALLAPUR S G. Immunobiology of acute chorioamnionitis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 649.
- [9] BRY K J, JACOBSSON B, NILSSON S, et al. Gastric fluid cytokines are associated with chorioamnionitis and white blood cell counts in preterm infants[J]. *Acta Paediatr*, 2015, 104(6): 575-580.
- [10] CHENG Y, MA X L, WEI Y Q, et al. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1871(2): 289-312.
- [11] 陆柏江,皇甫少华,江滨.CXCR2在肿瘤进展中的作用[J].中国肿瘤外科杂志,2021,13(6):615-618,623.
- [12] OZEN M, KITASE Y, VASAN V, et al. Chorioamnionitis precipitates perinatal alterations of heme-oxygenase-1 (HO-1) homeostasis in the developing rat brain[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5773.
- [13] WANG X, LI H, ZHANG Q, et al. Histological chorioamnionitis is associated with an increased risk of wheezing in preterm children less than 34 gestational weeks[J]. *BMC Pediatr*, 2021, 21(1): 104.
- [14] FAVRAIS G, SALIBA E, SAVARY L, et al. Partial protective effects of melatonin on developing brain in a rat model of chorioamnionitis[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 22167.
- [15] SAINTIGNY P, MASSARELLI E, LIN S, et al. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 571-582.
- [16] ZHU F, HE H, FAN L, et al. Blockade of CXCR2 suppresses proinflammatory activities of neutrophils in ulcerative colitis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5237-5251.
- [17] SHARMA B, NANNURU K C, SAXENA S, et al. CXCR2: a novel mediator of mammary tumor bone metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1237.
- [18] NIE H, WANG H X, TIAN C, et al. Chemokine (C-X-C motif) receptor 2 blockade by SB265610 inhibited angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in Apo E^{-/-} mice[J]. *Heart Vessels*, 2019, 34(5): 875-882.
- [19] FARO J, ROMERO R, SCHWENKEL G, et al. Intra-amniotic inflammation induces preterm birth by activating the NLRP3 inflammasome[J]. *Biol Reprod*, 2019, 100(5): 1290-1305.
- [20] MARQUES L M, REZENDE I S, BARBOSA M S, et al. Ureaplasma diversum genome provides new insights about the interaction of the surface molecules of this bacterium with the host [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161926.
- [21] VICK E J, PARK H S, HUFF K A, et al. Gardnerella vaginalis triggers NLRP3 inflammasome recruitment in THP-1 monocytes[J]. *J Reprod Immunol*, 2014, 106: 67-75.
- [22] WHIDBEY C, VORNHAGEN J, GENDRIN C, et al. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury[J]. *EMBO Mol Med*, 2015, 7(4): 488-505.
- [23] MATTA P, SHERROD S D, MARASCO C C, et al. In utero exposure to histological chorioamnionitis primes the exometabolic profiles of preterm CD4⁺ T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2017, 199(9): 3074-3085.
- [24] 刘会雪,尹红亚,童重新,等.外周血淋巴细胞亚群、细胞因子在未足月胎膜早破孕妇中水平变化及与绒毛膜羊膜炎发生的相关性研究[J].临床误诊误治,2021,34(2):82-87.
- [25] HOYA M, NAGAMATSU T, FUJII T, et al. Impact of Th1/Th2 cytokine polarity induced by invariant NKT cells on the incidence of pregnancy loss in mice[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 79(3).
- [26] 尹红亚,刘会雪,童重新,等.未足月胎膜早破合并绒毛膜羊膜炎孕妇外周血miR-145表达及与Th1/Th2平衡的关系[J].中国计划生育和妇产科,2020,12(3):79-83.

(收稿日期:2022-06-14;修回日期:2023-09-22;编辑:刘灵敏)