

## • 研究论文 •

## NLRP3 炎症小体抑制剂 N14 对小鼠痛风性关节炎的治疗作用

姜晓琳<sup>1,2</sup>, 郭凯<sup>3</sup>, 贺玉伟<sup>3</sup>, 陈怡铭<sup>2</sup>, 杜姗姗<sup>1</sup>, 江余祺<sup>2,4,6</sup>, 李卓悦<sup>2,4,6\*</sup>,  
李长贵<sup>3\*</sup>, 秦冲<sup>2,4,5,6\*</sup>

(1. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042; 2. 中国海洋大学医药学院, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 3. 山东省免疫性疾病与痛风临床医学研究中心, 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266555; 4. 中国海洋大学蛋白质靶向降解与药物研发中心, 山东 青岛 266003; 5. 青岛海洋科学技术国家实验室海洋药物与生物制品实验室, 山东 青岛 266003; 6. 青岛海洋生物医药研究院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 探讨 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体抑制剂 N14 对尿酸钠 (mono sodium urate, MSU) 晶体诱导的痛风性关节炎 (gouty arthritis, GA) 小鼠的治疗作用。首先采用细胞计数试剂 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测 N14 对小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 活力的影响; 利用免疫印迹法 (Western blot) 检测 N14 对细胞上清中成熟的白介素 1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、胱天蛋白酶-1 (cysteinyl aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 活化物 caspase-1 p20 及细胞裂解液中 NLRP3、pro-caspase-1 和 pro-IL-1 $\beta$  表达的影响。通过 MSU 诱导的小鼠痛风性关节炎模型, 检测痛风性关节炎小鼠的红、肿、热、痛反应; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色进行小鼠足部病理学检测; 应用免疫印迹法检测小鼠足部组织中 NLRP3、pro-caspase-1 和 pro-IL-1 $\beta$  的表达; 并考察 N14 对小鼠血浆中谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 等含量的影响。本文中所有动物实验均获得青岛海洋生物医药研究院科学伦理委员会批准 (批准号: E-MBWNL-2024-20)。实验结果显示, J774A.1 细胞与高浓度的 N14 (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 共孵育后未见明显细胞毒性, 且有效阻止 MSU 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活。在小鼠痛风性关节炎模型中, N14 显著改善痛风性关节炎引起的红、肿、热、痛, 下调小鼠足部组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平, 同时对小鼠血浆中各项生化指标无显著影响, 具有良好的耐受性。综上, N14 通过抑制 NLRP3 炎症小体通路有效缓解小鼠痛风性关节炎, 对相关疾病的预防和治疗都具有重要意义。

**关键词:** 4-((二甲氨基)甲基)-N-((1,2,3,5,6,7-六氢-*s*-苊-4-基)氨基甲酰基)苯磺酰胺; 痛风性关节炎; 尿酸钠结晶; 炎症因子; NOD 样受体蛋白 3 炎症小体; 白细胞介素-1 $\beta$

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1229-09

## Therapeutic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor N14 in the treatment of gouty arthritis in mice

JIANG Xiao-lin<sup>1,2</sup>, GUO Kai<sup>3</sup>, HE Yu-wei<sup>3</sup>, CHEN Yi-ming<sup>2</sup>, DU Shan-shan<sup>1</sup>, JIANG Yu-qi<sup>2,4,6</sup>,  
LI Zhuo-yue<sup>2,4,6\*</sup>, LI Chang-gui<sup>3\*</sup>, QIN Chong<sup>2,4,5,6\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China; 2. Key Laboratory of Marine Drugs, Chinese Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Shandong Provincial Clinical Research Center for Immune Diseases and Gout, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266555, China; 4. Center for Targeted Protein Degradation and Drug Discovery, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 5. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266003, China; 6. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Monosodium urate (MSU)-induced the gouty arthritis (GA) model was used to investigate the

收稿日期: 2023-11-15; 修回日期: 2024-01-18.

基金项目: 山东省自然科学基金优秀青年基金项目 (ZR2021YQ53).

\*通讯作者 Tel: 15901038158, E-mail: lzy@ouc.edu.cn; changguili@vip.163.com; qc@ouc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1294

effect of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inhibitor N14 in alleviating GA. Firstly, the effect of NLRP3 inhibitor N14 on the viability of mouse monocyte macrophage J774A.1 was examined by the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The expression of mature interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (caspase-1) p20 in the cell supernatant and the expression of NLRP3, caspase-1 and pro-IL-1 $\beta$  proteins in the cell lysates was detected by Western blot for the inhibitory effect of N14 on the MSU-induced NLRP3 inflammasome activation in J774A.1 cells. Animal behavioral tests were used to detect redness, swelling, heat and pain in mice with gouty arthritis. Hematoxylin-eosin (H&E) staining revealed pathologic changes and inflammatory infiltration in foot sections. Protein expression of NLRP3, caspase-1, and pro-IL-1 $\beta$  in mouse hind paw tissues were assessed by Western blot. The effect of N14 on the plasma levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), creatinine (CRE), urea, and uric acid (UA) was investigated by the MSU-induced gouty arthritis model in mice. All animal experiments in this paper were approved by the Scientific Ethics Review Board of Qingdao Marine Biomedical Research Institute (grant No. E-MBWNL-2024-20). The experimental results showed that N14 did not exhibit cytotoxicity in mouse monocyte macrophage J774A.1 cells at concentrations up to 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and N14 effectively prevented MSU-induced activation of NLRP3 inflammasome. In the mouse gouty arthritis model, N14 significantly ameliorated the redness, swelling, heat and pain caused by GA, and down-regulated the levels of NLRP3 inflammasome-associated proteins in mouse hind paw tissues. Meanwhile, N14 appeared to be well tolerated, as it did not significantly affect various biochemical indices in mouse plasma. In conclusion, N14 effectively alleviated GA in mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome pathway, which is important for both prevention and treatment of related diseases.

**Key words:** 4-((dimethylamino)methyl)-*N*-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)carbamoyl)benzenesulfonamide; gouty arthritis; mono sodium urate crystal; inflammatory factor; NOD-like receptor protein 3 inflammasome; interleukin 1 $\beta$

痛风 (gout) 属于自身炎症性疾病,其特征为嘌呤代谢障碍,尿酸排泄不足,导致尿酸盐晶体在关节内和关节周围沉积。痛风性关节炎是痛风最常见的临床症状,最初表现为一个或多个关节突然出现重度的红、肿、热、痛,可导致关节损伤<sup>[1]</sup>,治疗不当则会进一步引起肾功能受损和尿酸结石等疾病<sup>[2]</sup>。但目前用于治疗痛风性关节炎的药物,如别嘌醇、秋水仙碱和糖皮质激素,它们极易引起消化道疾病和代谢紊乱等不良反应<sup>[3]</sup>。因此,目前临床上尚无有效治疗痛风性关节炎的药物,该治疗领域还存在巨大未被满足的医疗需求。

NOD样受体蛋白3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体是由NLRP3蛋白、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和半胱天冬酶-1前体 (pro-cysteinyl aspartate specific proteinase-1, pro-caspase-1) 组成的一种多蛋白复合体<sup>[4,5]</sup>。NLRP3炎症小体在天然免疫介导的炎症中发挥重要作用<sup>[6,7]</sup>,其异常活化与多种人类疾病密切相关,例如痛风<sup>[8]</sup>、2型糖尿病<sup>[9]</sup>、神经退行性疾病<sup>[10]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[11]</sup>及炎症性肠病<sup>[12]</sup>等。痛风的发病机制是尿酸钠 (mono sodium urate, MSU) 晶体通过刺激巨噬细胞,激活NLRP3炎症小体,并释放白介素1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ),引发强烈的炎症反应。因此,NLRP3炎症小体通路在痛风发作的起始起主要作

用<sup>[13]</sup>。NLRP3炎症小体的激活通常需要两步,即启动和激活。在启动部分,Toll样受体 (Toll-like receptors, TLR) 作为一种模式识别受体,能够识别病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 和损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs),从而激活核因子 $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 通路,促进NLRP3和pro-IL-1 $\beta$ 的转录。在激活部分,MSU晶体、无机颗粒、细菌毒素等促进ASC斑点及caspase-1的形成,活化的caspase-1将其效应底物pro-IL-1 $\beta$ 裂解为IL-1 $\beta$ ,释放到细胞外,引起机体的炎症反应<sup>[14,15]</sup>。

研究发现,NLRP3炎症小体的激活与痛风的发病机制密切相关,因此抑制NLRP3炎症小体的活化可以作为痛风的潜在治疗靶点<sup>[16,17]</sup>。NLRP3炎症小体抑制剂,包括萝卜硫素<sup>[18,19]</sup>、 $\beta$ -羟基丁酸酯 (BHB)<sup>[20]</sup>、OLT1177<sup>[21]</sup>和MCC950<sup>[22]</sup>等,可显著降低痛风性关节炎反应。萝卜硫素是一种口服NLRP3炎症小体抑制剂,可有效缓解急性痛风炎症,但也同时抑制AIM2样受体蛋白 (AIM2-like receptor, ALR) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白4 (NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 4, NLRP4) 炎症小体以及NF- $\kappa$ B的活化<sup>[19,23]</sup>。 $\beta$ -羟基丁酸酯通过阻止细胞中钾离子的外流,抑制ASC聚合和斑点形成,阻断

NLRP3 炎症小体活化<sup>[20]</sup>。以上两种化合物均缺乏特异性。OLT1177 目前已完成临床 II 期研究,但其没有展现出理想的剂量依赖性<sup>[21]</sup>。MCC950 在体内外模型中均具有良好的抑制活性,常被用作阳性对照,但在类风湿性关节炎 II 期临床研究中因肝毒性已被终止<sup>[22,24]</sup>。本研究团队基于 MCC950 的化学结构合成 NLRP3 抑制剂 N14,体外毒性结果表明 N14 明显低于 MCC950,体内疾病模型的结果证实 N14 通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活改善多种炎症性疾病<sup>[25]</sup>。因此,本文拟采用小鼠痛风性关节炎模型评价 N14 对该疾病的治疗作用,为后续 NLRP3 抑制剂在痛风的临床治疗提供理论和实验依据。

## 材料与方法

**实验动物** 雄性无特定病原 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6J 小鼠,体重  $20 \pm 3$  g, 6 周龄,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010。所有实验均在青岛海洋生物医药研究院 SPF 级动物实验中心进行。小鼠在特定的无菌设施条件下饲养,湿度为 50%,光照-黑暗周期为 12 h:12 h,并随意喂食标准饮食和无菌水,在进入研究前适应环境 1 周。所有动物实验均按照实验动物护理和使用指南进行,并获得青岛海洋生物医药研究院科学伦理委员会批准 (批准号: E-MBWNL-2024-20)。

**药品和试剂** MCC950 (CP-456773, S893001) 购自美国 Selleck 公司,秋水仙碱 (colchicine, HY-16569) 购自美国 MedChemExpress 生物科技公司,DMEM 培养基 (PM150210) 和胎牛血清 (164210-500) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,青链霉素混合液 (KGY0023) 购自南京凯基生物科技发展有限公司。J774A.1 鼠巨噬细胞购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (DY-401) 购自美国 R&D Systems 公司,脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (L2630) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,蛋白酶抑制剂 (57084100) 购自上海罗氏制药有限公司,细胞裂解液 (C1053) 购自北京普利莱基因技术有限公司。IL-1 $\beta$  抗体 (3A6)、caspase-1 抗体 (D7F10)、NLRP3 抗体 (D4D8T)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (3683S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。Lamin B1 抗体 (66095-1-Ig) 购自 Proteintech 公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 羊抗兔 IgG (A0208) 和抗鼠 IgG (A0216) 购自上海碧云天生物技术有限公司。乙二胺四乙酸 (EDTA) 组织脱钙液 (G1105) 购自武汉赛维尔生物技术有限公司, SolarFast SDS-PAGE 考马

斯亮蓝染色液 (G4540) 和苏木精伊红染色试剂盒 (G1120) 购自北京索莱宝生物科技有限公司,生化试剂盒 (140320110) 购自深圳迈瑞动物医疗科技有限公司。

**40 mg·mL<sup>-1</sup>尿酸钠溶液:** 将 800 mg 尿酸溶于 155 mL 沸腾的蒸馏水 (含 5 mL 1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH) 中。加入 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节溶液 pH 至 7.2 后,室温下搅拌逐渐冷却,4 °C 保存过夜。将形成的尿酸单钠盐晶体在 180 °C 下加热灭菌 2 h,以 40 mg·mL<sup>-1</sup> 的浓度悬浮于灭菌的磷酸盐缓冲液中,直接加入培养基使其达到所需浓度,用于每次实验。

**仪器** 热板测痛仪 (上海欣软信息科技有限公司, XR1700); Electric Von Frey 电子测痛仪 (美国 IITC Life Science 公司, BW-EVF2393); 通道式鼠足支撑力测量仪 (北京众实迪创科技发展有限公司, MKY-YLS-11A); 游标卡尺 (宁波得力工具有限公司, DL92150); 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司, Tanon 5200); 旋涡混合器 (北京金北德工贸有限公司, KA-1000); 全自动生化分析仪 (中国深圳迈瑞公司, BS-430); 脱水机 (德国 Leica 公司, HistoCore Pear D); 多样品组织研磨机 (上海净信实业发展有限公司, JXFSTPRP)。

**CCK-8 法检测细胞毒性** 取培养至对数生长期的鼠单核巨噬细胞 J774A.1,接种于 96 孔板。细胞分为正常组、DMSO 组、不同浓度的 N14 和 MCC950 组 (20、40、60、80、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 孵育 24 h, 每孔加入 CCK-8 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 培养 1 h 后, 在酶标仪 450 nm 处测定吸光度值。

**Western blot 测定蛋白的表达** J774A.1 细胞以每毫升  $2 \times 10^6$  个接种在 6 孔板中过夜。第二天早上将培养基更换为无血清培养基,并用终浓度为  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS 诱导 4.5 h。添加药物作用 2.5 h,最后使用 NLRP3 激活剂 MSU 刺激 30 min,收集上清及细胞裂解液,进行 Western blot 分析。

**实验分组及药物干预** 将在 SPF 环境下饲养 1 周后的雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为空白组、造模组 (MSU 组)、秋水仙碱组 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、N14 低剂量组 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、N14 高剂量组 ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、MCC950 低剂量组 ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、MCC950 高剂量组 ( $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 4 只。连续灌胃给药 3 天进行预处理,在第 3 天分别注入 25  $\mu\text{L}$   $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  MSU 混悬液及 25  $\mu\text{L}$  生理盐水溶液。观察小鼠后足肿胀情况、疼痛指数等行为学指标,若小鼠左侧后足出现明显肿胀,表明造模成功。

**小鼠血浆生化指标检测** 实验开始前,眼眶取血,室温静置 3 h 后 6 500  $\times g$  离心 15 min,收集上清。实验

结束后,对小鼠进行安乐死,采用相同方法收集小鼠血浆,利用全自动生化分析仪检测小鼠血浆中天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、空腹血糖(glucose-G, Glu-G)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、尿素(urea)和肌酐(creatinine)水平,其他血浆存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

**小鼠行为学指标检测** 小鼠注射MSU前3天和测量前1 h灌胃给予秋水仙碱( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、不同剂量的MCC950( $20, 40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )和N14( $20, 40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。在MSU注射后0、3、6、12、24、48、72、96、120、144 h测量小鼠左后足肿胀度、热痛、机械痛、平衡反应、温度等行行为学指标,并在0和72 h时拍照记录小鼠左后足形态。测定小鼠左侧后足肿胀度时,首先保定好小鼠,用游标卡尺测量左后足足垫厚度;使用热板测痛仪测量小鼠左后爪缩爪反应潜伏期(paw withdrawal latency, PWL),将小鼠逐只置于 $51.0^{\circ}\text{C}$ 热板测痛仪上,以舔后足为痛觉指标,记录每组小鼠的痛阈值;使用电子测痛仪评估小鼠后爪机械性刺激缩足反应阈值(paw withdrawal threshold, PWT)。将小鼠放入足底刺痛仪单独的有机玻璃盒中,静置15 min,使用探针刺向小鼠足底表面的中部,记录小鼠的机械痛阈值(g);利用通道式鼠足支撑力测量仪测量小鼠两足之间的支力量,差值越大说明疼痛越明显。为了尽量保证测量的准确性,整个实验过程均由同一个人操作,每组重复测量3次并求取平均值。

**H&E染色** 实验结束后处死小鼠,分离小鼠左侧足部,用4%多聚甲醛溶液浸泡固定48 h,利用EDTA脱钙液进行脱钙处理数周到数月,逐级脱水,石蜡包埋并切片,切片厚度为 $4\text{ }\mu\text{m}$ 。烘片后进行脱蜡水化,苏木素-伊红染色后脱水,二甲苯进行透明处理,滴加中性树脂进行封片,显微镜下观察小鼠足部组织病理学变化并拍照记录。

**ELISA检测小鼠血浆IL-1 $\beta$ 表达** 造模72 h后处死小鼠,摘眼球取血1 mL,  $6\ 500\times\text{g}$ ,离心10 min,分离血浆, $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。严格按照ELISA检测试剂盒说明书进行操作,测定小鼠血浆中IL-1 $\beta$ 细胞因子水平。

**Western blot检测小鼠组织匀浆目的蛋白表达** 造模72 h后,分离小鼠左侧足部脚垫,加入细胞裂解液,利用组织研磨机进行研磨, $12\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心15 min,取上清Western blot检测小鼠足垫组织匀浆中NLRP3、caspase-1、pro-IL-1 $\beta$ 的含量变化。

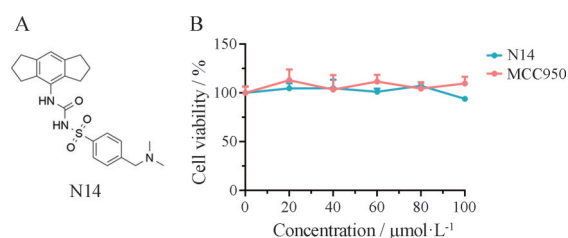
**统计学分析** 统计学处理采用GraphPad Prism 9.4.0软件进行数据分析,所有实验数据均以均值 $\pm$ 标

准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间对比采用单因素方差分析(one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test)。当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计显著性。

## 结果

### 1 N14对J774A.1无明显细胞毒性作用

N14的结构如图1A所示,由本课题组合成<sup>[25]</sup>。首先通过CCK-8法检测N14在不同浓度下对小鼠单核巨噬细胞J774A.1增殖能力的影响。结果如图1B所示,在J774A.1细胞中,  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  N14和阳性对照化合物MCC950均未见明显增殖抑制,证明N14无显著细胞毒性。



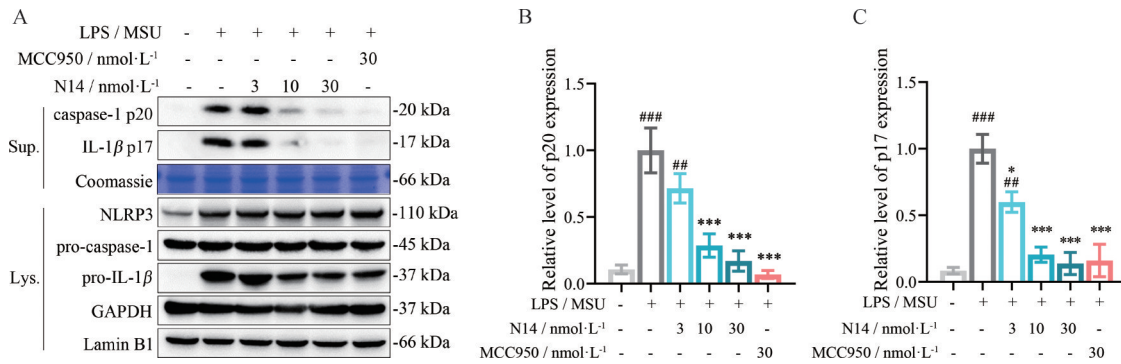
**Figure 1** N14 did not exhibit cytotoxicity in J774A.1 cells. A: Structure of N14; B: J774A.1 cells were treated with indicated concentration of N14 or MCC950 for 24 h. Cell viability were analyzed by CCK-8 assay.  $n = 3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . MCC950: A specific inhibitor of NLRP3 inflammasome

### 2 N14抑制J774A.1细胞中MSU诱导的NLRP3炎症小体活化

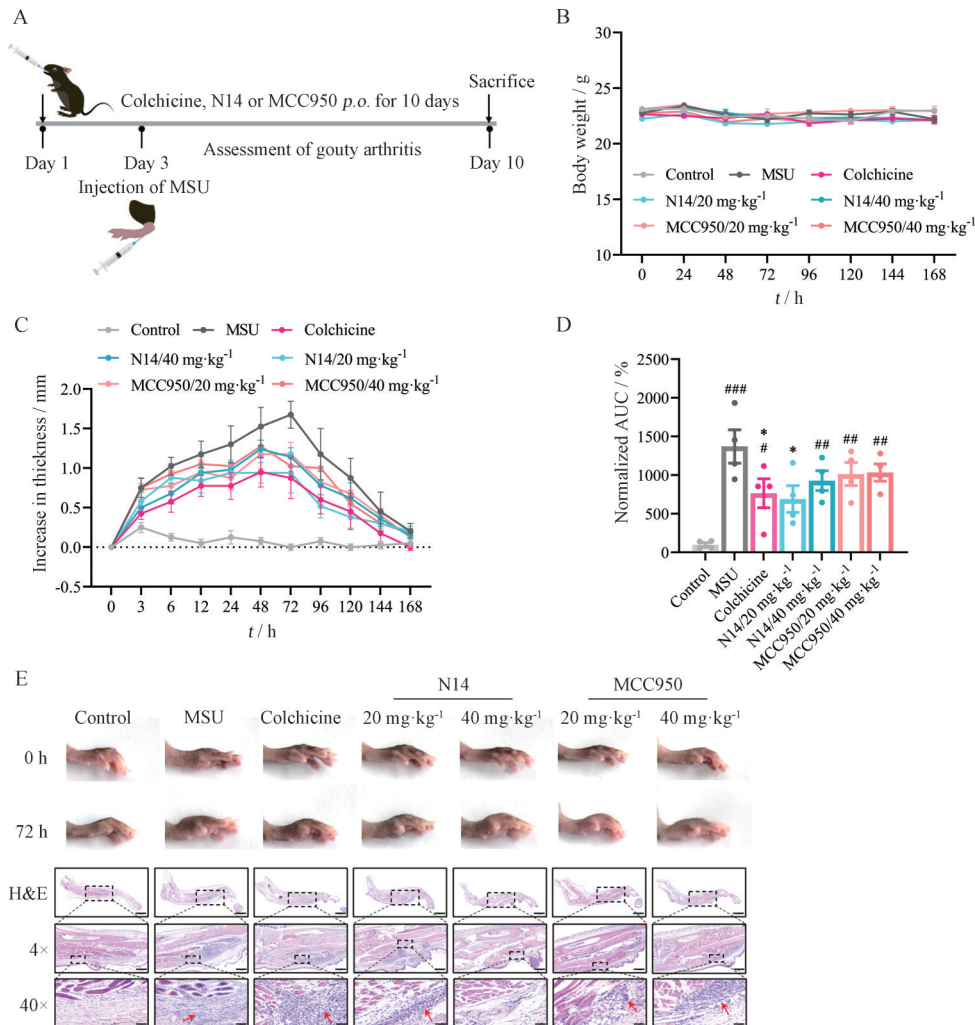
为评价N14对MSU诱导的NLRP3炎症小体活化的影响<sup>[26]</sup>,本研究首先利用LPS预处理J774A.1细胞诱导炎症小体前体蛋白表达,随后使用一系列浓度N14( $3, 10, 30\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )与细胞共孵育,最后加入MSU刺激NLRP3炎症小体形成。收集细胞培养上清和细胞裂解液,用免疫印迹法对细胞培养上清中caspase-1 p20和IL-1 $\beta$  p17及细胞裂解液中NLRP3炎症小体相关蛋白进行检测。N14剂量依赖性地抑制上清中caspase-1 p20和IL-1 $\beta$  p17的分泌,且对细胞裂解液中NLRP3、pro-caspase-1和pro-IL-1 $\beta$ 蛋白表达无显著影响(图2A~C)。上述实验结果表明,化合物N14在NLRP3炎症小体的激活阶段抑制其活化,从而降低相关炎症因子的释放。

### 3 N14缓解MSU诱导的小鼠痛风性关节炎

本研究接下来探讨N14对痛风性关节炎的抗炎作用及镇痛效果,通过注射MSU至小鼠左后足,建立小鼠痛风性关节炎模型(图3A)。实验期间各组小鼠体重无显著变化(图3B)。与空白对照组相比,模型组在72 h时出现严重左后足肿胀,足厚度增加1.8 mm。秋



**Figure 2** N14 inhibited MSU-induced NLRP3 inflammasome activation in J774A.1 cells. **A**: Western blot analysis of the protein expressions of caspase-1 p20 and IL-1 $\beta$  p17 in the supernatants (Sup.) and pro-caspase-1, pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3 in the cell lysates (Lys.), Lamin B1 was used as a loading control for cell lysates. Coomassie blue staining was provided as the loading control for the supernatants; **B**, **C**: Protein expression levels of caspase-1 p20 (**B**) and IL-1 $\beta$  p17 (**C**) were quantified by Image J.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs LPS + MSU group. LPS: Lipopolysaccharide; MSU: Mono sodium urate; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ ; Caspase-1: Cysteinyl aspartate specific proteinase-1; NLRP3: NOD-like receptor protein 3



**Figure 3** N14 significantly relieved paw edema and inflammation caused by gouty arthritis. **A**: Experimental scheme of the gouty arthritis model; **B**: Body weight; **C**: Paw edema measured at different time points after MSU injection; **D**: Normalized AUC of panel C; **E**: Representative pictures of foot paw of mice for 0 or 72 h after MSU injection. H&E staining of the foot paw from different groups. Red arrows indicate inflammatory cell infiltration. Scale bar: 2 mm, 500  $\mu$ m and 50  $\mu$ m.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$  vs MSU group. AUC: Area under curve; H&E: Hematoxylin-eosin

秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组均可减少小鼠足部厚度, 其中秋水碱和  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  N14 组显著缓解 MSU 诱导的小鼠左后足肿胀, 72 h 时足部厚度仅增加 0.8 mm (图 3C、D)。H&E 染色显示, 空白组小鼠足部滑膜上皮细胞结构光滑完整, 而模型组小鼠足部则显示出大量炎症细胞浸润。使用 N14 治疗后显著改善痛风性关节炎小鼠足部组织的炎症 (图 3E)。

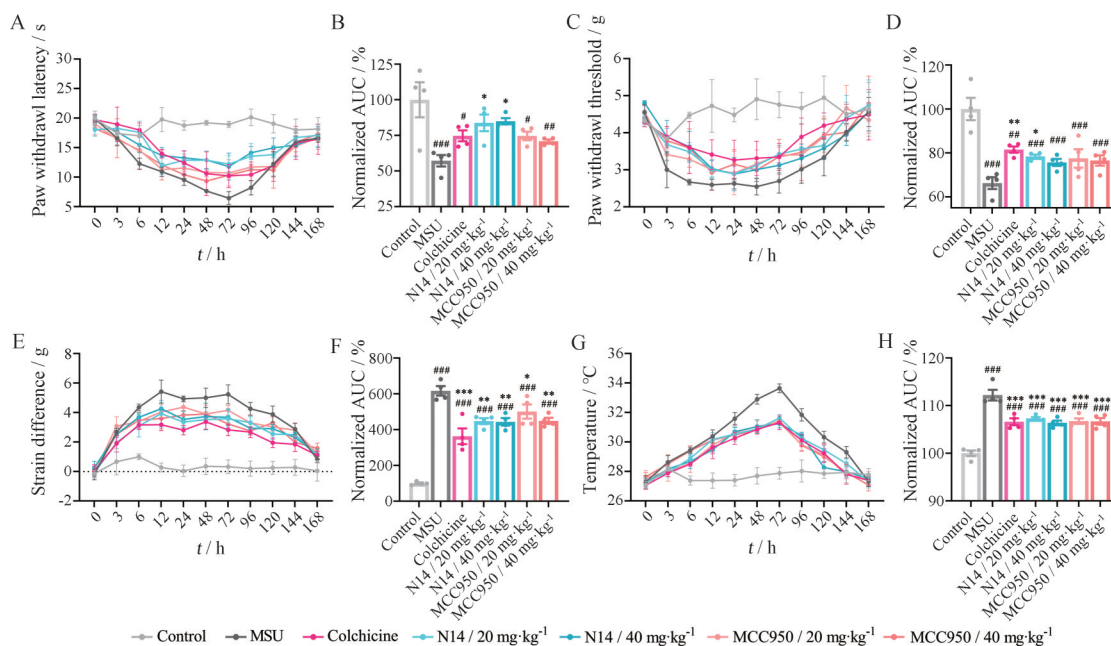
痛风性关节炎在临床上主要表现为剧烈疼痛并伴有肿胀发热。小鼠左后足 PWL 作为热敏感性指标, 检测结果如图 4A、B 所示, 注射 MSU 的小鼠表现出明显的热敏感性, N14 不同剂量均可显著缓解 MSU 引起的热敏感性。小鼠后足 PWT 作为机械异常性疼痛的指标, 用于检测小鼠足部疼痛反应, 阈值越小表明疼痛越剧烈。结果显示, 与模型组相比, 秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组小鼠左后足 PWT 均有所上升, 证明药物处理后使小鼠足部疼痛减弱 (图 4C、D)。此外, 本研究还通过测量小鼠自身的平衡调节评估疼痛程度, 图 4E、F 结果显示, 与模型组相比, 秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组小鼠支力差均显著下降, 有效缓解 MSU 引起的小鼠足部痛感。同时, 采用红外温度计测量肿胀后足的温度, 如图 4G、H 所示, 注射 MSU 可显著引起小鼠后足温度升高, 秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组均可显著降低小鼠左后足温度。

综上, 这些实验结果表明 N14 显著减轻 MSU 引起的小鼠足部炎症和红、肿、热、痛反应。

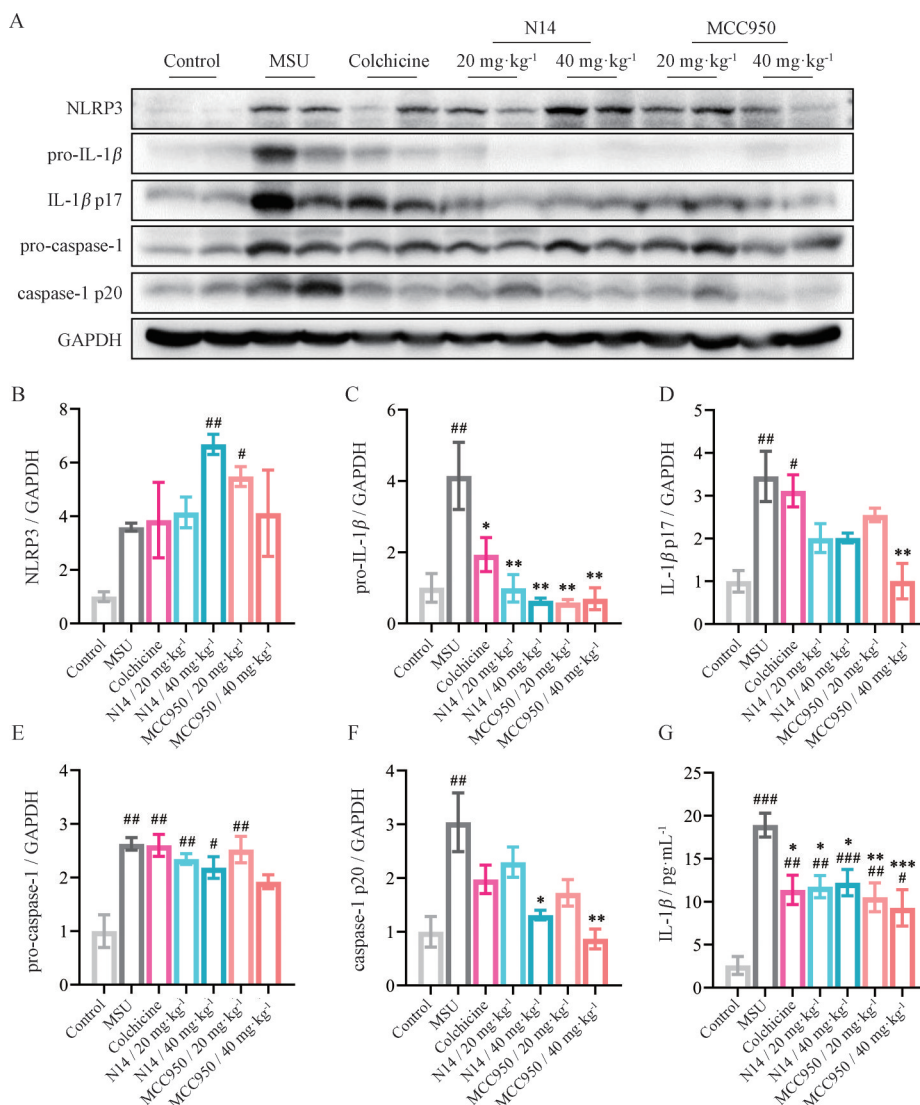
#### 4 N14 在 MSU 诱导的痛风性关节炎小鼠模型中抑制 NLRP3 炎症小体的激活

小鼠足部组织中的单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞受沉积在关节处的 MSU 晶体刺激后, 释放促炎因子  $\text{IL-1}\beta$ , 引起小鼠痛风性关节炎<sup>[27]</sup>。本研究进一步验证 N14 能否在小鼠体内抑制 MSU 诱导的 NLRP3 炎症小体激活。在模型建立 72 h 时处死小鼠, 检测各组血浆中炎症因子  $\text{IL-1}\beta$  含量和小鼠足部相关蛋白表达量。如图 5A~F 所示, 组织样本的 Western blot 结果表明, MSU 上调 NLRP3、pro-caspase-1、caspase-1 p20、pro- $\text{IL-1}\beta$  和  $\text{IL-1}\beta$  p17 蛋白的表达水平, 秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组显著下调 pro- $\text{IL-1}\beta$  蛋白的表达量, 其中  $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  N14 组和 MCC950 组也显著降低足部组织中 caspase-1 p20 和  $\text{IL-1}\beta$  p17 的表达水平。ELISA 结果表明, MSU 刺激明显增加小鼠血浆中促炎细胞因子  $\text{IL-1}\beta$  的分泌, 而秋水碱、N14 和 MCC950 不同剂量组的  $\text{IL-1}\beta$  水平显著低于模型组 (图 5G)。以上结果表明, 化合物 N14 通过抑制 MSU 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活, 降低炎症因子的分泌, 从而改善痛风性关节炎。

安全性评价是药物应用的前提, 血浆中 ALT 和



**Figure 4** N14 significantly reduced mechanical hyperalgesia and thermal sensitivity caused by gouty arthritis. A: Time course of the effects of colchicine and different doses of N14 or MCC950 on thermal sensitivity in the paw; B: Normalized AUC of panel A; C: Time course of the effects of colchicine and different doses of N14 or MCC950 on mechanical allodynia in the paw; D: Normalized AUC of panel C; E: Time course of the effects of colchicine and different doses of N14 or MCC950 on strain difference in the paw; F: Normalized AUC of panel E; G: Time course of the effects of colchicine and different doses of N14 or MCC950 on temperature in the paw; H: Normalized AUC of panel G.  $n = 4, \bar{x} \pm s$ .  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.01$ ,  $^{####}P < 0.001$  vs control group;  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs MSU group

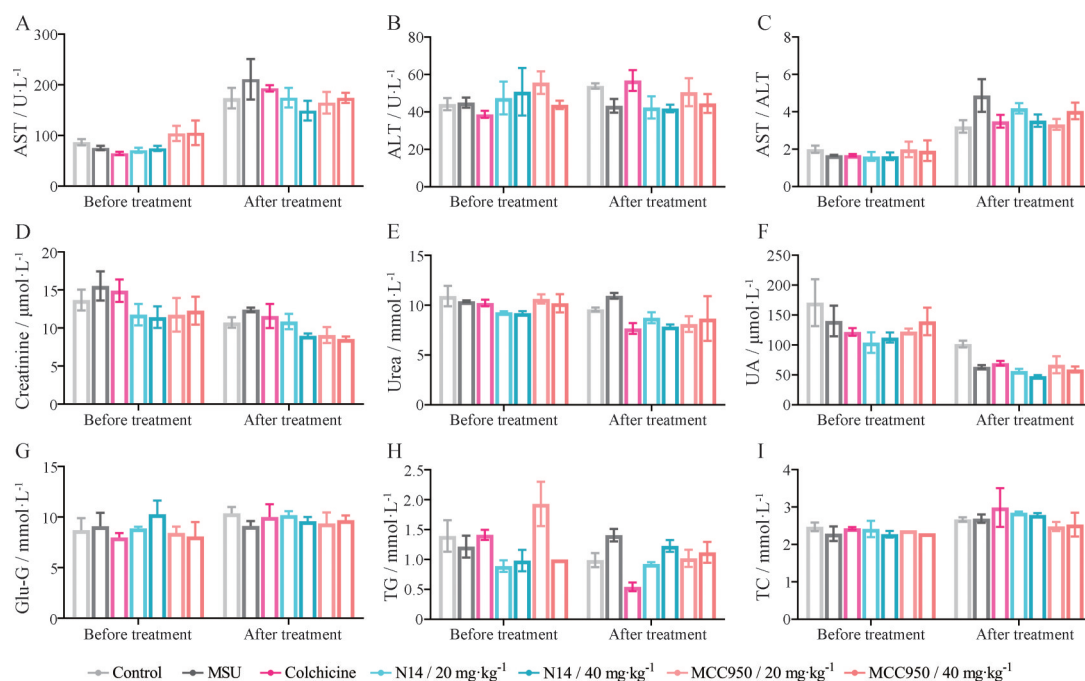


**Figure 5** N14 suppressed the activation of the NLRP3 inflammasome in paw tissue of MSU-induced gouty arthritis. A–F: The protein levels of NLRP3, pro-IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  p17, pro-caspase-1, and caspase-1 p20 in paw were measured by Western blot analysis, with GAPDH as the loading control; G: The protein level of the cleaved IL-1 $\beta$  in paw tissue homogenates was determined by ELISA.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs MSU group

AST是常规的肝功能检测指标, creatinine、urea、UA是肾功能检测指标, 如图6A~F所示, 与空白组相比, 模型组、秋水仙碱组、N14和MCC950各剂量组(20和40 mg·kg<sup>-1</sup>)小鼠血浆AST、ALT、AST/ALT、creatinine、urea、UA水平均无明显变化, 这表明短期内秋水仙碱、N14、MCC950均对小鼠肝肾功能无显著影响。此外, 血糖为机体代谢提供能量, 是保证糖代谢正常进行的重要条件, 同时也是体内糖代谢动态平衡的反映; TG、TC是评估动脉硬化的重要指标。如图6G~I所示, 与空白组相比, 模型组、秋水仙碱组、N14和MCC950各剂量组小鼠血浆Glu-G、TG、TC水平无显著变化。综上所述, N14对小鼠肝肾组织无明显损伤, 且不影响血糖和胆固醇的含量, 具有较好的安全性。

## 讨论

痛风是一种慢性疾病, 与遗传、环境和代谢密切相关<sup>[28]</sup>。痛风性关节炎在全球范围内普遍存在, 具有较高的发病率, 严重损害人类的正常生活。当血清中尿酸含量持续升高时, 在关节处沉积的MSU就会导致痛风性关节炎的发生<sup>[29]</sup>。根据临床表现痛风性关节炎大致分为4个阶段: 即无症状性高尿酸血症期、急性痛风发作期、发作间期和慢性痛风期。急性痛风发作是痛风性关节炎最主要的临床表现, 常以关节发红、发热、肿胀、疼痛的炎症反应为主<sup>[30]</sup>。目前, 对于痛风性关节炎发作与缓解的具体分子机制尚未明确, 但普遍认为MSU作为一种内源性损伤相关分子模式引起自身免疫所介导的炎症反应。NLRP3蛋白是一种细胞质模



**Figure 6** Safety properties of N14 in mice. Plasma aspartate transaminase (AST, A), alanine transaminase (ALT, B), AST/ALT ratio (C), creatinine (D), urea (E), uric acid (UA, F), glucose-G (Glu-G, G), triglyceride (TG, H) and total cholesterol (TC, I) levels in mice treated with vehicle, colchicine or different doses of N14 or MCC950 (20 and 40 mg·kg<sup>-1</sup>).  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$

式识别受体, 可以与衔接蛋白 ASC 以及效应蛋白 pro-caspase-1 结合形成 NLRP3 炎症小体, 而沉积于关节处的 MSU 被巨噬细胞吞噬识别后, 通过 MyD88 依赖性信号传导途径激活 NF- $\kappa$ B 通路, 从而激活 NLRP3 炎症小体, 在这个过程中活化的 caspase-1 将 pro-IL-1 $\beta$  切割成成熟的 IL-1 $\beta$  分泌到细胞外, 引起各种炎症反应。因此, NLRP3 炎症小体在痛风性关节炎中起关键作用<sup>[31]</sup>。

目前, 常用的痛风性关节炎建模方法有 MSU 混悬液关节腔注射、脚垫注射及气囊注射。关节腔或脚垫注射模型较为常用, 关节表现与人类急性痛风发作期的临床表现相似, 已被广泛应用于药理学等方面的研究<sup>[32]</sup>。关节腔注射多用于大鼠或家兔, 造模结果稳定, 但是这种方法存在一些缺陷, 如穿刺时易将 MSU 混悬液注入体外, 造成踝关节创伤性炎症反应, 从而影响实验结果。相比之下, 脚垫注射一般使用小鼠, 具有简便、易操作等优点。而气囊注射模型用于模拟痛风性滑膜炎的病理特征, 不符合本文研究范围。因此, 本研究采用小鼠脚垫注射 MSU 混悬液方法建立急性痛风性关节炎模型。在本课题组前期研究成果中, 基于 MCC950 的结构发现了一种新型的 NLRP3 炎症小体抑制剂 N14, 体外细胞实验证实了 N14 对 NLRP3 炎症小体的选择性, 体内动物实验发现 N14 在 LPS 引起的感染性休克、葡聚糖硫酸钠引起的溃疡性结肠炎和胆

碱蛋氨酸缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎模型方面均具有良好的药效<sup>[25]</sup>。本研究进一步评估 N14 在痛风性关节炎中的作用, 其有效抑制 MSU 刺激引起的 NLRP3 信号通路下游炎症因子的升高, 并且显著缓解痛风性关节炎小鼠足部肿胀、疼痛和发热, 以及减少足部组织中 pro-IL-1 $\beta$  和 caspase-1 p20 的表达。因此, 本研究在前期实验结果的基础上, 进一步揭示 NLRP3 抑制剂 N14 在痛风性关节炎中的作用和分子机制, 为后期临床治疗痛风提供一定的理论和实验基础。

**作者贡献:** 姜晓琳负责细胞和动物实验、数据分析及文章撰写; 郭凯负责尿酸钠的提取制备和部分动物实验; 贺玉伟、杜珊珊参与课题设计和指导; 陈怡铭负责化合物的合成; 江余祺、李卓悦、李长贵和秦冲负责课题设计、指导和论文审阅。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Weaver JS, Vina ER, Munk PL, et al. Gouty arthropathy: review of clinical manifestations and treatment, with emphasis on imaging [J]. *J Clin Med*, 2021, 11: 166.
- [2] Ramonda R, Oliviero F, Galozzi P, et al. Molecular mechanisms of pain in crystal-induced arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2015, 29: 98-110.
- [3] Huddleston EM, Gaffo AL. Emerging strategies for treating gout [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, 65: 102241.

- [4] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 477-489.
- [5] Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 564: 71-76.
- [6] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 397-411.
- [7] Yang Y, Wang H, Kouadir M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 128.
- [8] Yang G, Lee HE, Moon SJ, et al. Direct binding to NLRP3 pyrin domain as a novel strategy to prevent NLRP3-driven inflammation and gouty arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72: 1192-1202.
- [9] Rovira-Llopis S, Apostolova N, Bañuls C, et al. Mitochondria, the NLRP3 inflammasome, and sirtuins in type 2 diabetes: new therapeutic targets [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29: 749-791.
- [10] Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19: 610-621.
- [11] Grebe A, Hoss F, Latz E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122: 1722-1740.
- [12] Bauer C, Diewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. *Gut*, 2010, 59: 1192-1199.
- [13] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440: 237-241.
- [14] Broderick L, de Nardo D, Franklin BS, et al. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 395-424.
- [15] Liu W, Guo WJ, Xu Q, et al. Advances in mechanisms for NLRP3 inflammasomes regulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1505-1512.
- [16] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140: 821-832.
- [17] Wang ZQ, Zhang ZJ, Liu XY, et al. Research progress of anti-gout small molecules targeting the NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 543-553.
- [18] Kiser C, Gonul CP, Olcum M, et al. Inhibitory effects of sulforaphane on NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Immunol*, 2021, 140: 175-185.
- [19] Greaney AJ, Maier NK, Leppala SH, et al. Sulforaphane inhibits multiple inflammasomes through an Nrf2-independent mechanism [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99: 189-199.
- [20] Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, et al. The ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease [J]. *Nat Med*, 2015, 21: 263-269.
- [21] Marchetti C, Swartzwelder B, Gamboni F, et al. OLT1177, a  $\beta$ -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115: E1530-E1539.
- [22] Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21: 248-255.
- [23] Yang G, Yeon SH, Lee HE, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2018, 57: 727-736.
- [24] Coll RC, Hill JR, Day CJ, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 556-559.
- [25] Li Z, Chen Y, Jiang X, et al. Novel sulfonyleurea-based NLRP3 inflammasome inhibitor for efficient treatment of nonalcoholic steatohepatitis, endotoxic shock, and colitis [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 12966-12989.
- [26] Fu SB, Xu G, Gao Y, et al. Inhibitory effect and mechanism of licochalcone A on NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 2050-2056.
- [27] Jiao C, Liang H, Liu L, et al. Transcriptomic analysis of the anti-inflammatory effect of *Cordyceps militaris* extract on acute gouty arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1035101.
- [28] Liu YR, Wang JQ, Li J. Role of NLRP3 in the pathogenesis and treatment of gout arthritis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1137822.
- [29] Liu-Bryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome [J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88: 20-23.
- [30] Ragab G, Elshahaly M, Bardin T. Gout: an old disease in new perspective - a review [J]. *J Adv Res*, 2017, 8: 495-511.
- [31] Zhang X, Liu Y, Deng G, et al. A purified biflavonoid extract from *Selaginella moellendorffii* alleviates gout arthritis via NLRP3/ASC/caspase-1 axis suppression [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 676297.
- [32] Jin XM, Zhang XX, Guo L, et al. Effect and mechanism of total flavonoids from *Rhizoma smilacis glabrae* in treatment of gouty arthritis based on NLRP3 inflammasomes axis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2018, 24: 90-95.