

色氨酸-2,3-双加氧酶 2 在类风湿关节炎患者外周血单个核细胞和滑膜组织中的表达及意义

陈阿圆,许媛,许和鹏,魏伟,常艳

摘要 目的 探讨色氨酸-2,3-双加氧酶 2(TDO2)在类风湿关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMC)和滑膜组织中的表达及临床意义。方法 选取 40 例 RA 患者作为 RA 组,另选取同期 36 例健康人作为正常对照组。流式细胞术检测 RA 组和正常对照组 PBMC 中 TDO2 表达;免疫荧光法检测 RA 组和正常对照组滑膜组织中 TDO2 表达;分析 RA 组 PBMC 中 TDO2 表达与其炎症指标之间的相关性。结果 与正常对照组相比,RA 组 PBMC 和滑膜组织中 TDO2 表达均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.001$);RA 组 PBMC 中 TDO2 表达与红细胞沉降率(ESR)呈正相关($r = 0.405$, $P = 0.045$)。结论 TDO2 在 RA 患者 PBMC 和滑膜组织中表达增加,并与炎症指标 ESR 呈正相关,提示 TDO2 可能参与了 RA 的疾病进展。

关键词 类风湿关节炎;外周血单个核细胞;滑膜组织;色氨酸-2,3-双加氧酶 2

中图分类号 R 593.22;R 329.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1099-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.007

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症性疾病,其特征是关节肿胀、压痛和滑膜关节破坏。犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)通路为色氨酸(tryptophan, Trp)代谢的主要途径,与自身免疫病发病密切相关^[1]。研究^[2-3]表明,RA 患者血清和关节滑液中 Kyn 水平升高,且与患者疾病活动性和炎症指标相关。

色氨酸 2,3-双加氧酶 2(tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2)作为 Kyn 通路的主要限速酶,对 Trp 催化具有高度专一性。TDO2 主要在肝脏和大脑中表

达,本课题组前期研究^[4]显示 TDO2 在 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞等免疫细胞中表达。近年来,TDO2 作为神经精神疾病、癌症和自身免疫病治疗的可能性潜在靶点引起了越来越多的关注^[5],但目前 TDO2 在 RA 中的表达和作用研究未见报道。本课题组前期研究表明,抑制 TDO2 可缓解佐剂性关节炎大鼠滑膜炎和关节破坏^[6],可能与 TDO2 介导成纤维样滑膜细胞异常活化有关。然而,在 RA 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)和滑膜组织中 TDO2 的表达以及临床意义尚不明确。该研究采用流式细胞术和免疫荧光法检测 TDO2 在 RA 患者和健康人 PBMC 以及滑膜组织中的表达,对 RA 患者 PBMC 中 TDO2 表达与其炎症指标之间进行相关性分析,为初步探索 TDO2 在 RA 中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2021 年 4 月—2022 年 4 月安徽医科大学第一附属医院诊治的 40 例 RA 患者,年龄 36~77(57.8 ± 9.0)岁,男 12 例,女 28 例。RA 组患者均符合 2010 年美国风湿病学会制定的 RA 诊断标准^[7],并排除其他自身免疫病、肿瘤等严重性疾病。正常对照组均为健康人,共 36 例,年龄 23~75(53.4 ± 10.9)岁,男 14 例,女 22 例,排除存在感染、肿瘤和其他免疫性疾病。正常对照组和 RA 组之间年龄和性别差异均无统计学意义。收集 RA 组相关实验室数据类风湿因子(rheumatoid factor, RF)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、抗环瓜氨酸多肽抗体(anti-cyclic citrulline peptide, anti-CCP)、红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)。本课题由安徽医科大学伦理委员会批准(批准号:20210085)。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液购于上海达科为生物技术有限公司,固定液(Fixation/Perm Diluent 和 Fixation/Permeabilization Concentrate)和破膜液(Permeabilization Buffer 10×)购

2023-05-31 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2108085MH320);安徽省高校协同创新项目(编号:GXXT-2020-065)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:陈阿圆,女,硕士研究生;

常艳,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

于美国 Invitrogen 公司;人源 TDO2-APC 流式抗体购于美国 R&D 公司;TDO2 (15880-I-AP) 抗体购于中国武汉三鹰生物技术有限公司;DAPI 溶液和抗荧光衰减封片剂购自中国北京索莱宝公司;山羊抗兔 Ig-GAF594 购于中国上海 Abmart 医药科技有限公司。

1.2.2 主要仪器 十色流式细胞仪(型号:Waters XEVO, TQ-S MS/MS)购于美国贝克曼公司;激光共聚焦显微镜(型号:Leica sp8)购于德国莱卡公司。

1.3 方法

1.3.1 人 PBMC 的标本采集与处理 用冰盒保存 EDTA 抗凝管收取的正常对照组和 RA 组外周血样本,4 h 内用 Ficoll-Hypaque 人淋巴细胞分离液分离提取正常对照组和 RA 组的 PBMC。

1.3.2 流式细胞术检测 PBMC 中 TDO2 表达 显微镜下观察提取的正常对照组和 RA 组 PBMC 细胞形态,调整细胞密度为 2×10^6 ,重悬于 100 μ l 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)中。每管加入 100 μ l 固定液,室温避光孵育 15 min。用 PBS 洗涤后,加入破膜液 95 μ l,室温避光孵育 10 min 后,加入 5 μ l 人源 TDO2-APC 流式抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤并重悬后,过 200 目纱网转移至流式管中上机检测并分析 TDO2 表达比例和平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.3.3 免疫荧光法检测滑膜组织中 TDO2 表达 将取得的正常对照组和 RA 组滑膜组织固定、包埋和切片后,进行脱蜡水化。4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 TDO2 (1:200)过夜。次日室温避光孵育荧光二抗(山羊抗兔 IgGAF594,1:200)2 h,PBS 洗涤 3 次后,室温避

光孵育 DAPI 8 min。PBS 洗涤 3 次,用抗荧光淬灭剂进行封片,激光共聚焦显微镜进行拍片。

1.3.4 Image J 分析滑膜组织中 TDO2 MFI 在免疫荧光染色中,单通道(单色)的荧光图片每个像素的灰度值代表了该点的荧光强度大小,特定区域的荧光强度公式:平均荧光强度(mean gray value, Mean) = 该区域荧光强度总和(integrated density, IntDen)/该区域面积(Area)。在 Image J 中打开拍摄好的图片,图片格式设置成 8-bit,提取单一通道,调整图片阈值,控制每张图片的阈值在统一的范围内,并选择合适的阈值算法。设定检测参数 Mean、IntDen、Area,最后分析 Mean 值,即 TDO2 MFI。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,结果均用 $Mean \pm SEM$ 表示。两组数据采用独立样本 t 检验比较组间差异,采用 Pearson 和 Spearman 进行相关性分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TDO2 在 RA 患者 PBMC 中的表达 流式细胞术检测结果表明,与正常对照组相比,RA 组 PBMC 中 TDO2 表达水平显著升高,TDO2 MFI 与正常对照组相比,差异有统计学意义($t = -3.920$, $P < 0.001$),见图 1。

2.2 TDO2 在 RA 患者滑膜组织中的表达 在 RA 疾病进程中,滑膜组织生理学功能被破坏,转化为增生性侵袭组织。此外,滑膜组织中成纤维样滑膜细胞功能异常和免疫细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤细

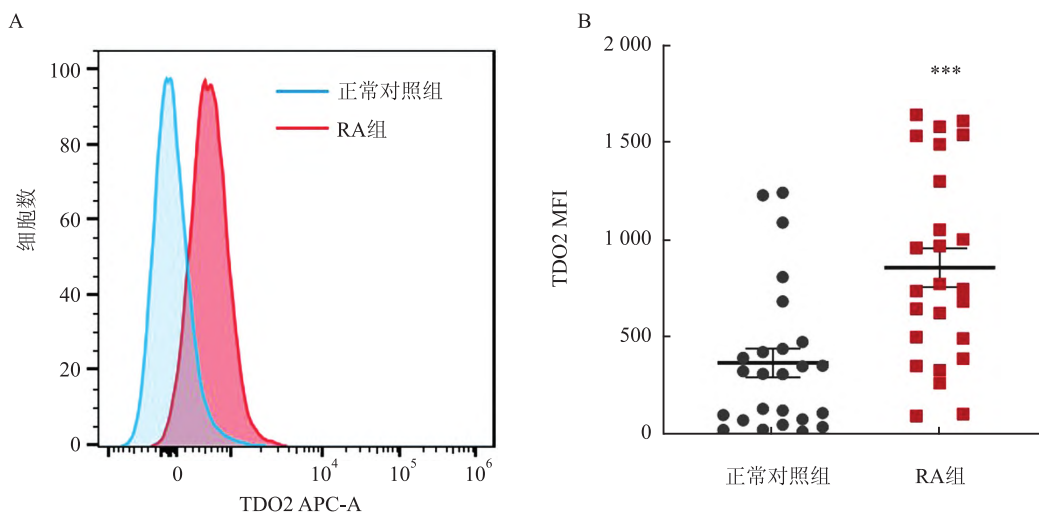


图1 RA患者PBMC中TDO2的表达

A:RA组和正常对照组PBMC中TDO2表达的流式图;B:RA组和正常对照组PBMC中TDO2 MFI;RA组: $n=25$;正常对照组: $n=25$;与正常对照组比较:*** $P < 0.001$

胞、巨噬细胞和树突状细胞)浸润,导致软骨和骨骼的破坏。免疫荧光结果显示,TDO2在RA组滑膜组织中表达增加,MFI显著高于正常对照组,差异有统计学意义($t = -3.600, P < 0.001$),见图2。

2.3 RA患者PBMC中TDO2表达与炎症指标的关系 为了研究TDO2表达与患者炎症指标之间的关系,对RA患者PBMC中TDO2表达与ESR、RF、CRP和anti-CCP之间进行了相关性分析。Pearson分析结果显示,RA组PBMC中TDO2表达与ESR呈正相关($r = 0.405, P = 0.045$),见图3A。而Spearman分析结果显示,RA组PBMC中TDO2表达与RF、CRP和anti-CCP无显著相关性($r_s = 0.359, P = 0.078; r_s = 0.093, P = 0.658; r_s = -0.289, P = 0.162$),见图3B-3D。

3 讨论

RA作为一种慢性自身免疫病,其临床表现主要为晨僵/关节痛与压痛/关节肿胀。慢性滑膜炎作为RA的主要病理特征,在晚期治疗不足的情况下,最终形成软骨破坏和骨侵蚀,从而出现关节畸形。Kyn通路作为Trp代谢的主要代谢途径,在RA

疾病进程中可能发挥重要作用。研究^[8]表明,在RA患者关节滑液和尿液中Kyn水平升高,提示Kyn通路在RA患者体内代谢异常。Kyn通路在三种同工酶吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine-2,3-dioxygenase1, IDO1)、IDO2和TDO2的催化下,将Trp转化生成Kyn。IDO1广泛表达于组织、器官和细胞中,除Trp外,IDO1还可催化多种含吲哚结构的底物。IDO2作为IDO1同源类似物(43%的同源性),主要表达于肾脏、大脑和附睾^[9]。在RA疾病进程中,IDO1的作用存在争议,它既有促炎表现^[10],也有抗炎作用^[11]。IDO2在RA中的研究较少,近年来研究^[12]显示在RA中具有促炎作用。

Lanz et al^[13]发现在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型小鼠中,肝脏TDO2表达和活性增加,从而激活脊髓神经元的兴奋性毒性受体,致使神经变性和脱髓鞘。TDO2缺失的实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠焦虑相关行为和神经变性症状减轻,表明TDO2可能参与了自身免疫病疾病进程。课题组前期研究发现,TDO2不仅在佐剂性关节炎大鼠的CD4⁺T细胞、B细胞和成纤维样滑膜细胞中表达增加,并且抑制TDO2的表达可抑制佐剂性关节炎大

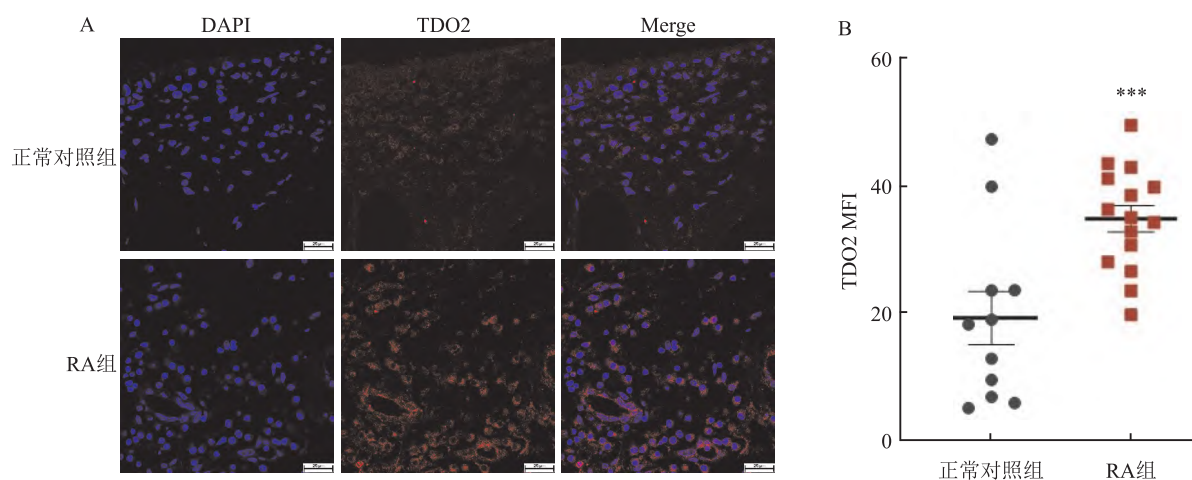


图2 两组滑膜组织中TDO2的表达 ×630

A: 两组滑膜组织中TDO2表达免疫荧光图; B: 两组滑膜组织中TDO2 MFI; RA组: $n = 15$; 正常对照组: $n = 11$; 与正常对照组比较: *** $P < 0.001$

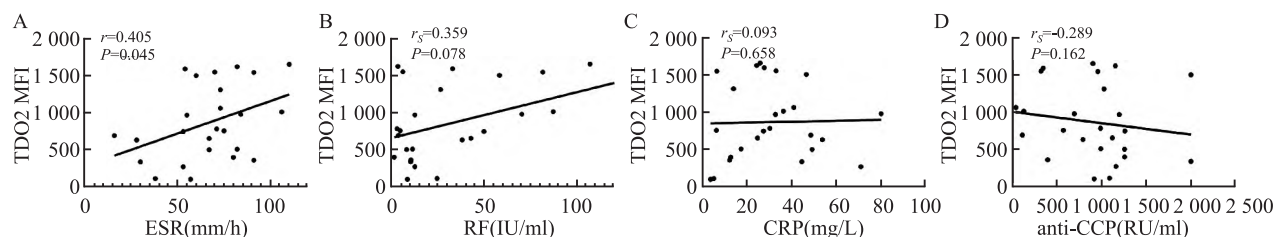


图3 RA患者PBMC中TDO2表达与炎症指标的相关性分析($n = 25$)

A: RA组PBMC中TDO2 MFI与ESR之间的相关性分析结果图; B: RA组PBMC中TDO2 MFI与RF之间的相关性分析结果图; C: RA组PBMC中TDO2 MFI与CRP之间的相关性分析结果图; D: RA组PBMC中TDO2 MFI与anti-CCP之间的相关性分析结果图

鼠成纤维样滑膜细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[6,14],改善滑膜炎症和关节破坏,提示 TDO2 在 RA 机制中可能是一个新的关键调节因子。为进一步了解 TDO2 与 RA 之间的关系,本研究探讨了 TDO2 在 RA 患者外周血和滑膜组织中的表达以及与炎症指标是否具有相关性。

本研究从临床角度出发,检测 RA 患者和健康人 PBMC 中 TDO2 的表达,结果显示 RA 患者 PBMC 中 TDO2 表达显著高于正常对照组,提示 TDO2 介导的 Kyn 代谢通路可能参与了 RA 炎症免疫反应。此外,在对 RA 患者 PBMC 中 TDO2 表达与炎症指标相关性分析结果中发现,RA 患者 PBMC 中 TDO2 表达与炎症指标 ESR 呈正相关。滑膜组织主要由衬里层和衬里下层组成。在 RA 中,成纤维样滑膜细胞功能异常致使衬里层扩张增生,大量免疫细胞如 T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和树突状细胞募集在衬里下层浸润,产生大量促炎因子,最终导致持续性滑膜炎症和软骨、骨侵蚀^[15]。免疫荧光结果显示,TDO2 在 RA 患者滑膜组织中表达增加,提示 TDO2 可能通过调控成纤维样滑膜细胞和免疫细胞异常活化,促进慢性滑膜炎症。

综上所述,在关节损伤过程中,TDO2 可能参与了 RA 的病理机制,介导持续性滑膜炎症生成。TDO2 介导的 Kyn 通路在 RA 中发生代谢失衡,并参与炎症免疫反应进而促进 RA 进展。

参考文献

- [1] Panfili E, Gerli R, Grohmann U, et al. Amino acid metabolism in rheumatoid arthritis: Friend or foe? [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (9): 1280.
- [2] Schroecksnadel K, Winkler C, Duftner C, et al. Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2006, 25(3): 334-7.
- [3] Kang K Y, Lee S H, Jung S M, et al. Downregulation of tryptophan-related metabolomic profile in rheumatoid arthritis synovial fluid [J]. *J Rheumatol*, 2015, 42(11): 2003-11.
- [4] Li S, Li S, Zhao Y, et al. A comprehensive analysis of TDO2 ex-

- pression in immune cells and characterization of immune cell phenotype in TDO2 knockout mice [J]. *Transgenic Res*, 2021, 30 (6): 781-97.
- [5] Platten M, Nollen E A A, Röhrig U F, et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 379-401.
 - [6] Chang Y, Han P, Wang Y, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase 2 plays a key role in regulating the activation of fibroblast-like synoviocytes in autoimmune arthritis [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179 (12): 3024-42.
 - [7] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-81.
 - [8] Igari T, Tsuchizawa M, Shimamura T. Alteration of tryptophan metabolism in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Tohoku J Exp Med*, 1987, 153(2): 79-86.
 - [9] Dolšák A, Gobec S, Sova M. Indoleamine and tryptophan 2,3-dioxygenases as important future therapeutic targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107746.
 - [10] Pigott E, Mandik-Nayak L. Addition of an indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor to B cell-depletion therapy blocks autoreactive B cell activation and recurrence of arthritis in K/BxN mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(7): 2169-78.
 - [11] Chen S Y, Wu C L, Lai M D, et al. Amelioration of rat collagen-induced arthritis through CD4⁺ T cells apoptosis and synovial interleukin-17 reduction by indoleamine 2,3-dioxygenase gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(2): 145-54.
 - [12] Merlo L M F, Pigott E, DuHadaway J B, et al. IDO2 is a critical mediator of autoantibody production and inflammatory pathogenesis in a mouse model of autoimmune arthritis [J]. *J Immunol*, 2014, 192(5): 2082-90.
 - [13] Lanz T V, Williams S K, Stojic A, et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) deficiency is associated with subclinical neuroprotection in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 24(7): 41271.
 - [14] 贾成艳,韩萍,王越业,等.色氨酸-2,3-双加氧酶 2 上调介导犬尿酸代谢在大鼠佐剂性关节炎中的作用研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(9): 1374-9.
 - [15] Nygaard G, Firestein G S. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(6): 316-33.

Expression and significance of tryptophan-2,3-dioxygenase 2 in peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue in rheumatoid arthritis patients

Chen Ayuan, Xu Yuan, Xu Hepeng, Wei Wei, Chang Yan

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Rheumatoid Arthritis Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of tryptophan-2,3-dioxygenase-2

网络出版时间:2023-06-27 15:40:35 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230626.1108.031.html

系统性红斑狼疮患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞上 PD1 表达及意义

罗 清¹, 张 露¹, 黄自坤¹, 符碧琪², 李俊明¹

摘要 目的 探讨程序性死亡分子 1(PD1)在系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞上的表达及临床意义。方法 流式细胞术检测 47 例 SLE 患者、35 例健康对照者(HC)外周血 PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺T 细胞百分率和 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达平均荧光强度(MFI),比较两组之间的差异,分析其与 SLE 临床、实验室指标、浆母细胞的相关性,并分析其预测 SLE 的价值。结果 ① SLE 患者 PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺T 细胞百分率高于 HC,差异有统计学意义($P=0.008\ 3$, $U=540.5$);SLE 患者 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 高于 HC,差异有统计学意义($P<0.000\ 1$, $U=187.0$)。② SLE 患者 PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺T 细胞百分率与补体 C3($r_s=-0.335\ 2$, $P=0.022\ 8$)、抗 SSA 抗体($P=0.016\ 6$, $t=2.5$)、抗组蛋白抗体($P=0.030\ 3$, $t=2.3$)、治疗($P=0.020\ 2$, $t=3.4$)、浆母细胞比例($r_s=0.387\ 1$, $P=0.007\ 2$)相关;SLE 患者 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 与系统性红斑狼疮疾病活动性评分(SLE-DAI)($r_s=0.403\ 1$,

$P=0.005\ 0$)、红细胞沉降率($r_s=0.356\ 1$, $P=0.017\ 7$)、C-反应蛋白($r_s=0.337\ 4$, $P=0.028\ 9$)、红细胞($r_s=-0.297\ 0$, $P=0.042\ 6$)、血红蛋白($r_s=-0.302\ 9$, $P=0.038\ 5$)、血细胞比容($r_s=-0.381\ 6$, $P=0.008\ 1$)、淋巴细胞计数($r_s=-0.393\ 7$, $P=0.006\ 2$)、淋巴细胞百分比($r_s=-0.391\ 2$, $P=0.006\ 5$)、中性粒细胞百分比($r_s=0.3150$, $P=0.031\ 1$)、NLR($r_s=0.373\ 0$, $P=0.009\ 8$)、LMR($r_s=-0.431\ 5$, $P=0.002\ 5$)、dNLR($r_s=0.315\ 0$, $P=0.031\ 1$)、anti-Ro52($P=0.029\ 5$, $t=63.5$)、治疗($P=0.035\ 5$, $W=21$)、浆母细胞比例($r_s=0.315\ 8$, $P=0.030\ 6$)相关。③ 逻辑回归分析显示 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 是 SLE 的危险因素。④ ROC 曲线分析显示 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 预测 SLE 的 AUC 为 0.886,构建了基于 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 和 HGB 的预测模型,预测模型的 AUC 为 0.979,预测模型与 SLEDAI 呈正相关($r_s=0.313\ 6$, $P=0.030\ 3$)。结论 SLE 患者升高的外周血 PD1⁺CXCR5⁺CD4⁺T 细胞百分率、CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 与疾病严重程度及活动性相关,且构建了基于 CXCR5⁺CD4⁺T 细胞 PD1 表达 MFI 和 HGB 的 SLE 预测模型。

关键词 系统性红斑狼疮;CXCR5⁺CD4⁺T 细胞;PD1;预测模型

中图分类号 R 593.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1103-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.008

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,

2023-05-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160308);江西省重点研发计划项目(编号:20181BBG70013);江西省卫生健康委科技计划(编号:202130158);江西省自然科学基金(编号:20171BAB205113)

作者单位:南昌大学第一附属医院¹ 检验科、² 风湿免疫科,南昌 330006

作者简介:罗 清,女,副主任技师;

李俊明,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail: lisir361@163.com

(TDO2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** A total of 40 RA patients were selected as the RA group, and 36 healthy subjects were selected as the normal control group during the same period. In RA group and control group PBMC, TDO2 expression was detected by flow cytometry. Immunofluorescence was applied to observe TDO2 expression in synovial tissue of RA groups and control group. The correlation was analyzed between TDO2 expression in PBMC and their inflammatory indicators of RA groups. **Results** Compared with control group, TDO2 expression in RA group PBMC and synovial tissue significantly increased ($P<0.001$); TDO2 expression in RA group PBMC was positively correlated with erythrocyte sedimentation rate (ESR) ($r=0.405$, $P=0.045$). **Conclusion** The expression of TDO2 is up-regulated in RA patients PBMC and synovial tissue, and positively correlates with inflammatory indicators ESR, suggesting that TDO2 may participate in RA disease progression.

Key words rheumatoid arthritis; peripheral blood mononuclear cells; synovial tissue; tryptophan-2,3-dioxygenase 2