

网络出版时间: 2024-07-03 17:03:18 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1447.001>

◇基础医学研究◇

PGE2 抑制 TDO2 表达和活性调控巨噬细胞功能变化的机制

王 焱 李丝雨 王越业 董伟波 程 梦 魏 伟 常 艳

摘要 目的 探究色氨酸-2,3-双加氧酶(TDO2)在胶原诱导型关节炎(CIA)小鼠中的表达以及前列腺素E2(PGE2)抑制TDO2表达和活性调控巨噬细胞功能的机制。方法 II型胶原诱导DBA/1J小鼠制备CIA模型。X射线检测CIA小鼠踝关节损伤变化;免疫组化检测小鼠踝关节、脾脏中TDO2表达;qPCR和免疫荧光检测小鼠腹腔巨噬细胞中TDO2表达变化。通过在RAW264.7细胞中分别小干扰TDO2、给予TDO2抑制剂680C91、给予不同浓度PGE2(0.1、1、10 μmol/L)刺激和给予前列腺素受体4(EP4)激动剂CAY10598后,qPCR和Western blot检测TDO2表达;流式细胞术检测巨噬细胞吞噬和极化功能;比色法检测TDO2活性。结果 与正常组小鼠比较,CIA小鼠踝关节软组织肿胀变大,关节滑膜、脾脏及腹腔巨噬细胞中TDO2表达增加。在RAW264.7细胞中分别小干扰TDO2、给予TDO2抑制剂680C91、给予PGE2刺激、给予EP4受体激动剂CAY10598后,TDO2表达明显被抑制,巨噬细胞吞噬功能下降,M1/M2比值下降($P < 0.05$);比色法结果显示RAW264.7细胞中分别给予PGE2刺激以及EP4激动剂CAY10598后,TDO2的活性被抑制($P < 0.05$)。结论 巨噬细胞TDO2表达升高可能促进了CIA小鼠关节滑膜损伤,PGE2通过激活EP4受体抑制TDO2表达和活性从而调节巨噬细胞功能。

关键词 类风湿关节炎;胶原诱导型关节炎;色氨酸-2,3-双加氧酶;前列腺素E2;前列腺素受体4

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1107-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.001

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种

慢性全身性自身免疫病,其主要病理特征为滑膜慢性炎症、关节软骨和骨损伤等^[1]。在RA早期,滑膜衬里下层巨噬细胞数量增加,滑膜巨噬细胞浸润的程度与关节骨侵蚀的程度相关^[2]。目前为止造成RA自身免疫反应的具体生物学机制尚未完全阐明。色氨酸-2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO2)是犬尿氨酸代谢途径(kynurenine pathway, KP)关键限速酶之一。研究^[3]显示TDO2在自身免疫性脑脊髓炎小鼠肝脏和脊髓中表达升高,提示TDO2可能是治疗多发性硬化症的一个潜在靶点。课题组前期研究^[4]显示TDO2在佐剂诱导型关节炎模型(adjuvant arthritis, AA)大鼠滑膜成纤维细胞中表达升高,参与了滑膜关节炎发生发展。然而TDO2是否调控巨噬细胞功能来参与RA病理机制未见报道。该研究通过动物实验探讨TDO2在胶原诱导型关节炎(collagen induced arthritis, CIA)小鼠滑膜、脾脏、肝脏以及腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PMs)中的表达,体外细胞实验探讨前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)通过TDO2调控巨噬细胞功能的机制,为发现新的药物靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 20只DBA/1J雄性小鼠(18 ± 2)g,周龄为6~8周,SPF级别,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[证书号:SCXK(HU)2017-0005],于安徽医科大学临床药理研究所SPF级动物房饲养。环境温度(22 ± 2)℃,湿度(50 ± 10)%,每周更换2次垫料,及时添加饲料和水。本课题由安徽医科大学临床药理研究所动物研究伦理委员会批准(伦理号:PZ-2021-004),实验中相关方法均根据动物实验相关指南和法规进行。

1.1.2 细胞株 RAW264.7细胞株购自ATCC细胞库,培养在高糖DMEM(10%胎牛血清,1%青-链霉素双抗)完全培养液中,置于含5%CO₂的37℃培养箱中培养。

2024-02-22 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:2108085MH320);安徽省留学人员创新项目择优资助计划项目(编号:200LCX019)

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 安徽省抗炎免疫药物协同创新中心 安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:王 焱,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

1.1.3 试剂 Chick type II collagen 购自美国 Sigma 公司; 卡介苗购于新华群硕实验用品销售部; TDO2 抗体购于美国 Proteintech 公司; DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; anti-mouse647 荧光二抗、anti-rabbit488 荧光二抗购于艾比玛特生物医药(上海)有限公司; DMEM 培养液购于美国 HyClone 公司; 胎牛血清购自加拿大 Wisent 公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Affinity Biosciences 公司; 蛋白上样缓冲液(5×)、预染蛋白 Marker26616 购自美国 Thermo Pricce 公司; 亚甲基双丙烯酰胺溶液、分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液购自上海碧云天生物科技公司; 胞内固定破膜液和封闭液购自美国 eBioscience 公司; 多聚甲醛、冰醋酸、高氯酸和醋酸钠购自北京索莱宝科技有限公司; anti-mouseCD11b-FITC、anti-mouseF4/80-PE、anti-mouseCD206-APC、anti-mouseCD86-BV421 购自美国 Bio Legend 公司; 前列腺素受体 4(prostaglandin receptor 4 ,EP4) 激动剂 CAY10598 购自美国 Cayman 公司; TDO2 抑制剂 680C91 购自德国 Sigma-alorich 公司; TDO2、GAPDH 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.4 主要仪器 7500Real Time PCR System、SimpliAmpPCR 热循环仪购于美国应用生物系统公司; IX-71 荧光倒置显微镜购于日本 Olympus 公司; TCS SP8 激光扫描共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司; X 射线透视成像仪购自美国 Glenbrook Technologies 公司; 流式细胞仪购自美国 Biosciences 公司; LAS4000Mini 型化学发光成像分析仪购自美国 GE 公司; BIO-RADpowerpac164-5070 电泳仪购自美国 BIA-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 CIA 模型的建立 于超净台内提前 1 d 将 Chick type II collagen 溶解在冰醋酸中 4 ℃ 冰箱过夜使之充分溶解,终浓度为 2 g/L。卡介苗 80 ℃ 灭活 1 h,溶解在无菌液体石蜡中,冰上研磨 2 h,制备终浓度为 2 g/L 的完全弗氏佐剂,将溶解好的 Chick type II collagen 也放入另外一个研钵当中置于冰上研磨 2 h,二者等体积混合置于冰上再次研磨 1 h,用 1 ml 无菌注射器反复抽吸 1 h 进行充分乳化制成 II 型胶原乳剂。于小鼠尾根部多处皮内注射 0.1 ml,造模当天为第 0 天(d 0),第 21 天(d 21)后加强注射,第 26 天(d 26)开始进行小鼠关节炎整体指标评分。

1.2.2 小鼠整体指标评分 根据 CIA 模型小鼠关节炎指数评分标准进行评分,具体评分标准:0 分,

正常;1 分,踝关节出现红斑和轻微肿胀;2 分,踝关节到趾关节出现轻微红肿;3 分,踝关节到趾关节出现中度红肿;4 分,踝关节到趾关节出现重度红肿。对小鼠所有爪子进行评分,每只小鼠的最大可能关节炎指数评分为 16 分。

1.2.3 脾脏、肝脏和滑膜病理学观察 造模结束后,小鼠眼球取血后处死,用剪刀剪开小鼠的腹腔,用镊子取出小鼠的肝脏和脾脏,置于已经加入适量多聚甲醛溶液的 EP 管中,固定 24 h,固定过后进行石蜡包埋和切片。用剪刀将小鼠的两侧后腿取下后,将小鼠腿部的皮毛和肌肉剥离,此过程注意不要损伤小鼠踝关节。将小鼠踝关节置于含有适量 EDTA 脱钙液的 5 ml EP 管中进行慢脱钙,每隔 3 d 换 1 次脱钙液,直至 1 ml 注射器的针头穿过小鼠踝关节骨头时无阻力即可,然后将踝关节组织送出进行石蜡包埋和切片。将小鼠肝脏、脾脏和踝关节的白片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后,待片子晾干后,在普通光学显微镜下观察其病理学改变。

1.2.4 免疫组化检测脾脏、肝脏和关节滑膜 TDO2 表达 将各组小鼠的脾脏、肝脏和踝关节的白片放入 65 ℃ 的烘箱中烘烤 4 h,再依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中脱蜡 15 min,随后由高浓度到低浓度乙醇浸泡,最后放入双蒸水中,经内源性过氧化物酶阻断剂阻断、抗原修复、组织封闭后,滴加 TDO2 抗体(1:200),置于冰箱 4 ℃ 过夜,第 2 天将孵育抗体的湿盒取出置于室温下,用 PBS 将白片冲洗干净后,将二抗滴于白片目标组织上,使之完全覆盖住组织,盖上湿盒的盖子孵育 30 min,孵育完毕后用 PBS 将二抗冲洗干净,按照比例配制 DAB 染色液,将染色液滴于白片组织上染色 40 s 后立即放入装有自来水的烧杯中冲洗干净,然后苏木精染色 5 s 后将片子放入烧杯中冲洗干净进行脱水,脱水完毕后将白片放置于通风橱中晾干,待白片晾干后进行封片,封片 3~5 d 之后将切片置于荧光显微镜下观察 TDO2 表达情况。

1.2.5 小鼠 PMs 的分离与培养 处死小鼠后,将小鼠放入 0.1% 苯扎溴铵溶液中浸泡消毒 5 min,腹腔注射预冷的 PBS 液 5 ml,用手轻揉腹部 2 min,无菌注射器吸出腹腔液体于 15 ml 无菌离心管中,于 4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,在离心管中加入 2 ml 含 10% 血清的 DMEM 培养基,用枪头将细胞吹匀,然后将细胞悬液加到 6 孔板中,放入 37 ℃ 培养箱中培养 4 h。

1.2.6 鉴定 PMs 从培养箱中将培养 PMs 的 6 孔板取出,用移液枪将培养基弃掉,在 6 孔板中缓慢加入 1 ml PBS 洗涤细胞后弃掉,然后每个孔中加入 2 ml PBS 反复吹打细胞,注意在使用移液枪时要缓慢吹打细胞,避免产生气泡使细胞死亡。用移液枪将细胞悬液转移到 1.5 ml EP 管中,置于离心机中 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后每管加入 100 μ l PBS 重悬细胞,依次加入 CD11b-PE 和 F4/80-FITC 流式抗体后将 EP 管置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 30 min,抗体孵育完毕后每管加入 300 μ l PBS,置于离心机中 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后每管加入 100 μ l PBS 重悬,用移液枪将细胞悬液过筛网后转移到对应的流式管中,流式细胞仪上机检测,CD11b⁺F4/80⁺ 标记的细胞即鉴定为 PMs。

1.2.7 RAW264.7 细胞中转染 siRNA-TDO2 将装有 siRNA-TDO2 和 siRNA-阴性对照的 EP 管瞬时离心后,在超净台中每管加入 125 μ l 无核酶水将其溶解配置成储存液,然后用 1.5 ml 的无菌 EP 管将其分装为每管 20 μ l 的工作液,并将 EP 管用封口膜封好后置于冰箱 -20 $^{\circ}$ C 保存。将 RAW264.7 细胞按照每孔 1×10^6 个细胞铺于 6 孔板中,待细胞生长密度为 50% ~ 70% 时进行转染。用 Opti-MEM 分别稀释 Lipo3000 和 TDO2-siRNA,并用移液枪将两者分别吹打混匀,置于超净台中放置 8 ~ 10 min,然后将 siRNA 与转染试剂混合,用枪头吹打混匀,放置 20 min 后用移液枪将转染复合物加入到培养 RAW264.7 细胞的 6 孔板中,轻轻摇晃 6 孔板使之混匀,6 孔板中的 2 个孔不做任何处理作为 Control 组,加入了 siRNA-阴性对照质粒的 2 个孔为阴性对照组(NC 组),其他 2 个孔中加入 siRNA-TDO2 质粒作为实验组。将 6 孔板放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中,继续培养 48 h 后进行后续实验。

1.2.8 qPCR 检测 取出培养正常组和 CIA 模型组的 PMs,RAW264.7 细胞给予不同浓度的 PGE2 (0.1、1、10 μ mol/L) 刺激 24 h,转染 siRNA-TDO2 48 h,EP4 受体激动剂 CAY10598 刺激 24 h,6 孔板中未经任何处理的细胞为 Control 组,转染 siRNA-阴性对照质粒的细胞为 NC 组,弃去相应细胞板中培养基,每孔贴壁缓慢加入 1 ml 的 PBS,轻轻摇晃,洗掉残余的培养基,然后每孔加入 500 μ l 的 TRIzol 试剂,轻轻吹打混匀,冰上静置 10 min; 将每个孔中的液体转移到标记好的无酶 EP 管中,在每个 EP 管中加入 100 μ l 氯仿,上下颠倒充分混匀,插入冰上静置 15 min,12 000 r/min 离心 10 min; 然后吸取上清无

色水相(约 250 μ l)到 1.5 ml 无酶 EP 管中,再加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,冰上放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去 EP 管中上清液。用移液枪吸取 500 μ l 75% 乙醇加入到 EP 管中,上下颠倒洗涤 RNA 沉淀,7 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液,重复此过程 2 ~ 3 次,注意 75% 乙醇需用无核酶水配制。超净台风干沉淀 5 ~ 10 min,每个 EP 管中加入 10 μ l 的无核酶水,涡旋震荡仪上混匀,取 2 μ l 的 RNA 用微量检测器检测 RNA 浓度。按照 RNA 浓度最低的组别为基准,其余各组用无核酶水稀释到基准浓度,之后将稀释后的 RNA 原液逆转录为 cDNA,按照 RT-PCR 扩增体系说明书进行实时荧光定量检测 TDO2 的表达。TDO2 引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

引物名称	引物序列(5'-3')
TDO2	F: AGCTGCTGACCTCACTTATGGACA R: AACCTTGTACCTGTCGCTCACAGT
GAPDH	F: GGTGTCTCTCCTGCGACTTCA R: TGGTCCAGGTTTCTTACTCC
TDO2-siRNA 阴性对照	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
TDO2-mus-139	F: CCAGCAAAGGAGGACUUAUUT R: AUAAGUCCUCCUUGCUGGTT
TDO2-mus-410	F: GGUACAGCAGUUCUCGGUUT R: AACCGAGAACUCGUGUACCTT
TDO2-mus-1156	F: CCAGACACUGGGUACCAAATT R: UUUGGUACCCAGUGUCUGGTT

1.2.9 免疫荧光检测 取出培养 4 ~ 6 h 正常组和 CIA 模型组的 PMs 孔板,RAW264.7 细胞给予 10 μ mol/L PGE2 刺激 24 h,板中放入无菌细胞爬片,培养 4 h 后,固定封闭处理细胞,加入 TDO2 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗 5 min \times 3 次,吸掉 PBS 后,加入相应的荧光二抗,室温避光孵育 90 min,PBS 洗 5 min \times 3 次,吸掉 PBS 后,加入 DAPI 染核 5 min,用 PBS 洗 5 min \times 3 次,挑片,滴上防荧光淬灭剂,将玻片正面倒置放在载玻片上,用指甲油固定住,随后使用激光共聚焦荧光显微镜拍摄来观察 TDO2 的表达。

1.2.10 Western blot 检测 在培养 RAW264.7 细胞的 6 孔板中分别加入 0.01、0.1、1、10 μ mol/L 的 PGE2 刺激 24 h 后弃去培养基,每孔加入 80 μ l 蛋白裂解液提取蛋白。配制 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶,上样电泳,转膜,封闭后 4 $^{\circ}$ C 孵育 TDO2 抗体过夜,第 2 天洗去一抗,孵育二抗 37 $^{\circ}$ C 2 h 后洗去二抗,随后利用化学发光成像仪成像,ImageJ 软件分析灰

度值。

1.2.11 比色法检测犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)含量 RAW264.7 细胞给予 PGE2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h 后, EP4 受体激动剂 CAY10598 刺激 24 h, 收取细胞上清液。将收集的细胞上清液置于离心机中 3 000 r/min 离心 20 min 待用。配制 30% 的三氯乙酸溶液, 然后在每个装有细胞上清液的 EP 管中加入 50 μl 配置好的三氯乙酸溶液, 上下颠倒混匀, 置于离心机中 13 000 r/min 离心 5 min, 用移液枪吸取上清液置于标记好的 EP 管中。配制 Ehrlich's 试剂: 将 100 mg p-dimethylbenzaldehyde 加入到 5 ml 冰醋酸中配制成 Ehrlich's 试剂, 注意此试剂需现配现用。将 Kyn 标准品按照 400、200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度稀释好后待用。吸取已经用三氯乙酸处理过的细胞上清液 100 μl , 加入到 100 μl 的 Ehrlich's 溶液中, 用移液枪吹打混匀。吸取不同浓度梯度的 Kyn 标准液, 加入到同体积的 Ehrlich's 溶液中混合均匀。将细胞上清混合液和 Kyn 标准品混合液都分别加入到 96 孔板中, 在酶标仪 480 nm 处测定其吸光度值, 然后计算细胞上清液中 Kyn 含量, 此过程须在 2 h 内完成。

1.2.12 流式细胞仪检测 RAW264.7 细胞 M1/M2 比例 RAW264.7 细胞中给予 PGE2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h, 转染 siRNA-TDO2 48 h 以及给予 TDO2 抑制剂 680C91 24 h, 给予 EP4 受体激动剂 CAY10598 刺激 24 h, 收集细胞悬液后, 置于离心机 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。在每个 EP 管中加入 100 μl PBS 重悬细胞, 然后每管加入 CD86-BV421 流式抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 每管加入 200 μl PBS, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 然后每管中加入 100 μl 流式细胞固定液室温避光固定 10 min 后加入 200 μl PBS, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。将细胞破膜液配制好后, 每管加入 100 μl 的破膜液室温孵育 10 min, 再每管加入 CD206-APC 流式抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 然后加入 300 μl PBS 洗涤 1 次, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 300 μl 的 PBS 重悬, 过滤网上机检测。

1.2.13 流式细胞仪检测 RAW264.7 细胞吞噬功能 RAW264.7 细胞给予 PGE2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h 后, EP4 受体激动剂 CAY10598 刺激 24 h, 转染 siRNA-TDO2 48 h 以及给予 TDO2 抑制剂 680C91 24 h。用适量的无菌水溶解 FITC-Dextran 粉末配制 25 mg/ml 的母液, 然后根据实验所需要的样品量用含 10% 血清的 DMEM 将母液稀释成需要的工作液浓

度, 注意此试剂需要现配现用。将培养 RAW264.7 细胞的 6 孔板从培养箱中取出, 用移液枪吸出培养基弃掉, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃去 PBS, 用移液枪吸取 1 ml 的工作液加入到 6 孔板的每个孔中, 用锡纸包裹住 6 孔板, 置于培养箱中孵育 1.5 h。相同操作结束后, 将 6 孔板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光孵育 1.5 h, 即设置为阴性对照组。收集细胞悬液后 2 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入适量 PBS 重悬, 过纱网后流式细胞仪检测 FITC 通道的平均荧光强度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 每组实验至少重复 3 次, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TDO2 在 CIA 小鼠踝关节、脾脏和肝脏中的表达

2.1.1 CIA 小鼠关节炎指数变化与踝关节影像学改变 与正常组小鼠比较, CIA 模型组小鼠在第 26 天全部出现病变, 毛发脱失、暗淡无光泽、进食量减少、活动减少、关节红肿, 小鼠关节炎指数增加 (均 $P < 0.05$), 提示模型制备成功, 见图 1A。X 射线结果显示, 正常组小鼠踝关节骨质密度与周围骨质相似, 且骨皮质表面光滑, 关节骨结构整齐有规划, CIA 模型组小鼠踝关节骨密度低, 骨皮质表面粗糙, 关节骨结构无规则, 有明显的骨质流失表现, 见图 1B。

2.1.2 CIA 小鼠中踝关节、脾脏和肝脏 HE 染色和 TDO2 表达 HE 结果显示, 与正常组小鼠比较, CIA 模型组小鼠的踝关节软骨破坏较为严重, 浸润细胞数量增加, 滑膜明显增生, 血管翳生成增多, 见图 1C。CIA 模型组小鼠的脾脏白髓明显增大增多, 红髓充血, 炎性细胞浸润以及大量的生发中心形成, 见图 1D。CIA 模型组小鼠肝脏病理表现为肝索紊乱, 胞质疏松, 胆管周围存在大量淋巴细胞浸润, 见图 1E。免疫组化结果显示, 与正常组小鼠比较, CIA 模型组小鼠踝关节、脾脏以及肝脏 TDO2 的表达均升高, 见图 1C~E。

2.2 TDO2 在 CIA 小鼠 PMs 中的表达 流式结果显示 CD11b⁺F4/80⁺ 鉴定为小鼠 PMs (双阳百分比为 98.71%), 见图 2A。qPCR 结果显示, 与正常组小鼠比较, CIA 模型组小鼠 PMs 中 TDO2 表达升高 ($P < 0.05$), 见图 2B。免疫荧光结果同样显示 CIA 小鼠 PMs 中 TDO2 表达升高, 且 TDO2 主要表达在

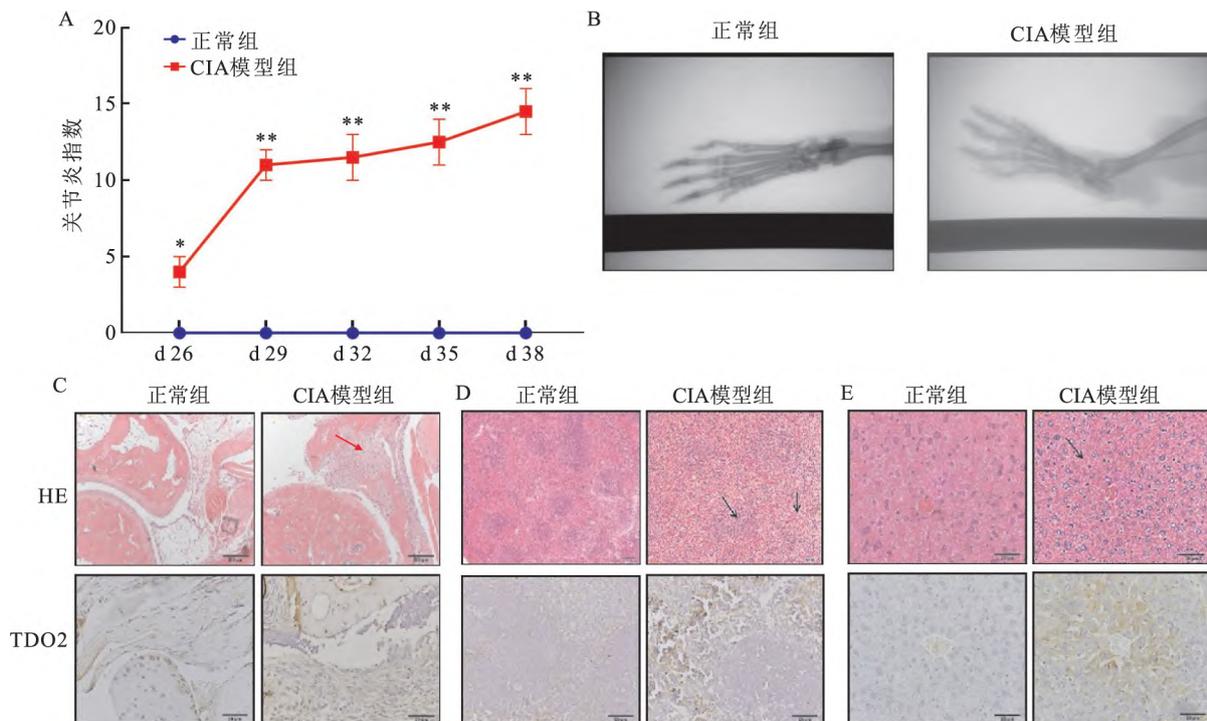


图1 CIA小鼠整体指标及踝关节、脾脏和肝脏HE染色和TDO2表达

A: 小鼠关节炎指数的比较; B: 小鼠踝关节X射线图; C: 小鼠踝关节滑膜HE和免疫组化染色 ×50, 箭头示滑膜组织增生; D: 小鼠脾脏HE和免疫组化染色 ×50, 箭头示脾脏白髓增大, 炎性细胞浸润; E: 小鼠肝脏HE和免疫组化染色 ×50, 箭头示肝索紊乱, 大量淋巴细胞浸润; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

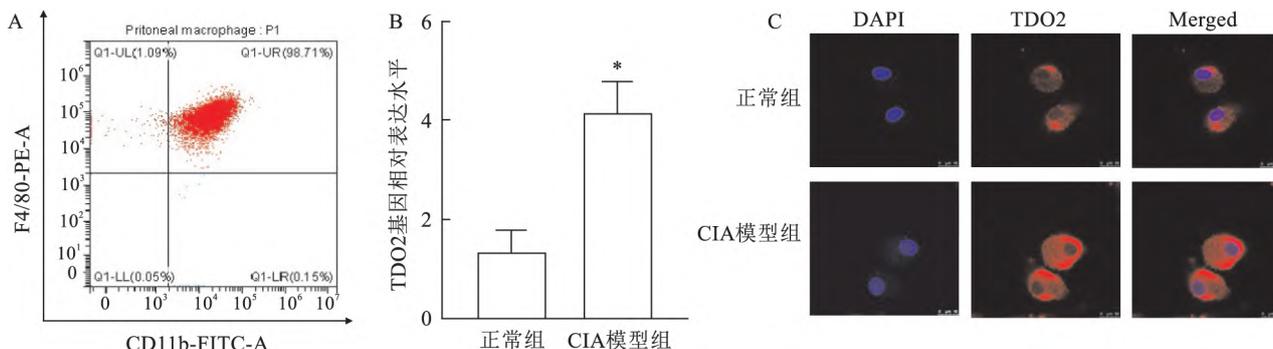


图2 CIA模型组小鼠PMs中TDO2表达

A: 小鼠PMs鉴定; B: qPCR检测小鼠PMs中TDO2基因水平; C: 免疫荧光检测小鼠PMs中TDO2的表达与定位 ×50; 与正常组比较: * $P < 0.05$

细胞质中,见图2C。

2.3 TDO2基因干扰和药理学抑制对RAW264.7细胞吞噬和极化功能的影响 在RAW264.7细胞中转染siRNA-TDO2, qPCR和Western blot法验证干扰效率。与NC组比较,三组序列都能成功干扰TDO2,其中qPCR结果和Western blot结果都显示P410序列干扰效果最佳,故后续实验均选用此种干扰序列,见图3A、B。同时体外给予TDO2抑制剂680C91,共同探讨抑制TDO2对巨噬细胞功能的影响。与Control组比较,siRNA-TDO2组和680C91组细胞吞噬功能下降($P < 0.01$),见图3C,且siRNA-

TDO2组和680C91组M1/M2比值同样降低($P < 0.05$),见图3D。

2.4 PGE2对RAW264.7细胞TDO2表达和活性及极化功能的影响 Western blot和qPCR结果显示,给予RAW264.7细胞不同浓度PGE2(0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)处理后,与Control组比较,TDO2基因水平均降低,蛋白水平也逐渐降低(均 $P < 0.05$),见图4A、B。其中10 $\mu\text{mol/L}$ 效果最明显,因此选用10 $\mu\text{mol/L}$ PGE2进行后续实验。免疫荧光结果显示给予10 $\mu\text{mol/L}$ 的PGE2刺激后,TDO2表达明显降低,见图4C。比色法结果显示,给予10 $\mu\text{mol/L}$ PGE2

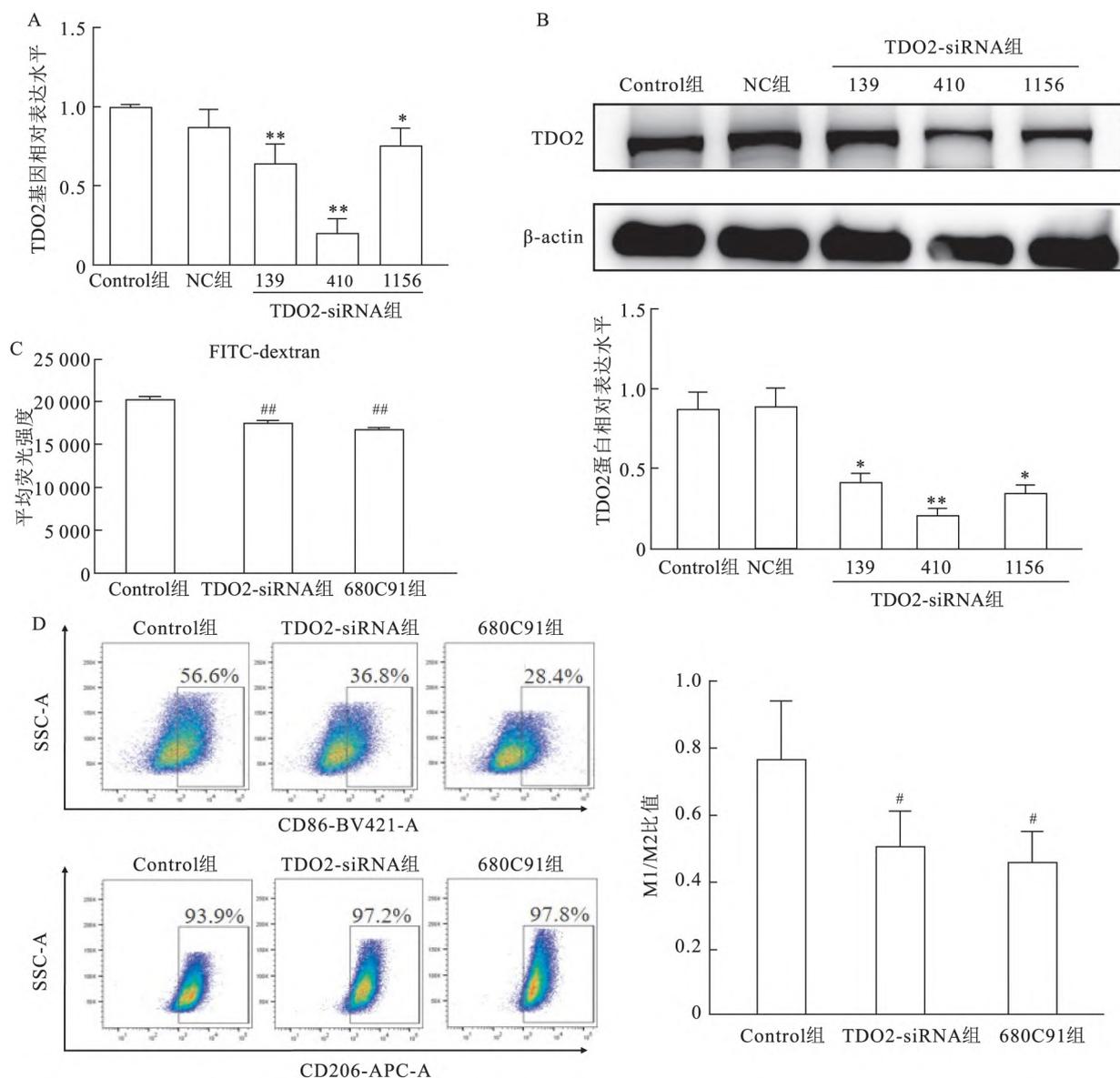


图3 TDO2 基因干扰和药理学抑制对 RAW264.7 细胞吞噬和极化功能的影响

A: qPCR 检测 RAW264.7 细胞中转染 siRNA-TDO2 后 TDO2 基因水平; B: Western blot 检测 RAW264.7 细胞中转染 siRNA-TDO2 后 TDO2 蛋白水平; C: 流式检测小干扰 TDO2 以及给予 680C91 后 RAW264.7 细胞吞噬能力; D: 流式检测小干扰 TDO2 以及给予 680C91 后 RAW264.7 细胞 M1/M2 比值; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Control 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

刺激后, RAW264.7 细胞中 TDO2 代谢物 Kyn 含量减少提示 PGE2 不仅抑制 TDO2 表达,也可以抑制其活性 ($P < 0.01$) 见图 4D。流式结果显示,与 Control 组比较, $10 \mu\text{mol/L}$ PGE2 能够降低细胞中 M1 比例,升高 M2 比例,降低 M1/M2 比值 ($P < 0.01$) 见图 4E。

2.5 PGE2 通过 EP4 受体对 RAW264.7 细胞中 TDO2 表达和对巨噬细胞极化与吞噬功能的影响

qPCR 结果显示,给予 RAW264.7 细胞 EP4 激动剂 CAY10598 后,与 Control 组比较, TDO2 表达减少 ($P < 0.01$, 图 5A), 细胞上清中 Kyn 水平也下降 ($P <$

0.01 , 图 5B)。流式结果显示,分别给予 PGE2 和 EP4 受体激动剂 CAY10598 后,与 Control 组比较,细胞吞噬功能下降 ($P_{\text{PGE2}} < 0.01$, $P_{\text{CAY10598}} < 0.05$, 图 5C), 巨噬细胞 M1/M2 比值下降 ($P_{\text{PGE2}} < 0.05$, $P_{\text{CAY10598}} < 0.05$, 图 5D)。这些结果提示 PGE2 通过激活 EP4 受体来抑制 TDO2 表达和活性,进而调控巨噬细胞吞噬和极化功能。

3 讨论

色氨酸 (tryptophan, Trp) 是一种人体必须氨基

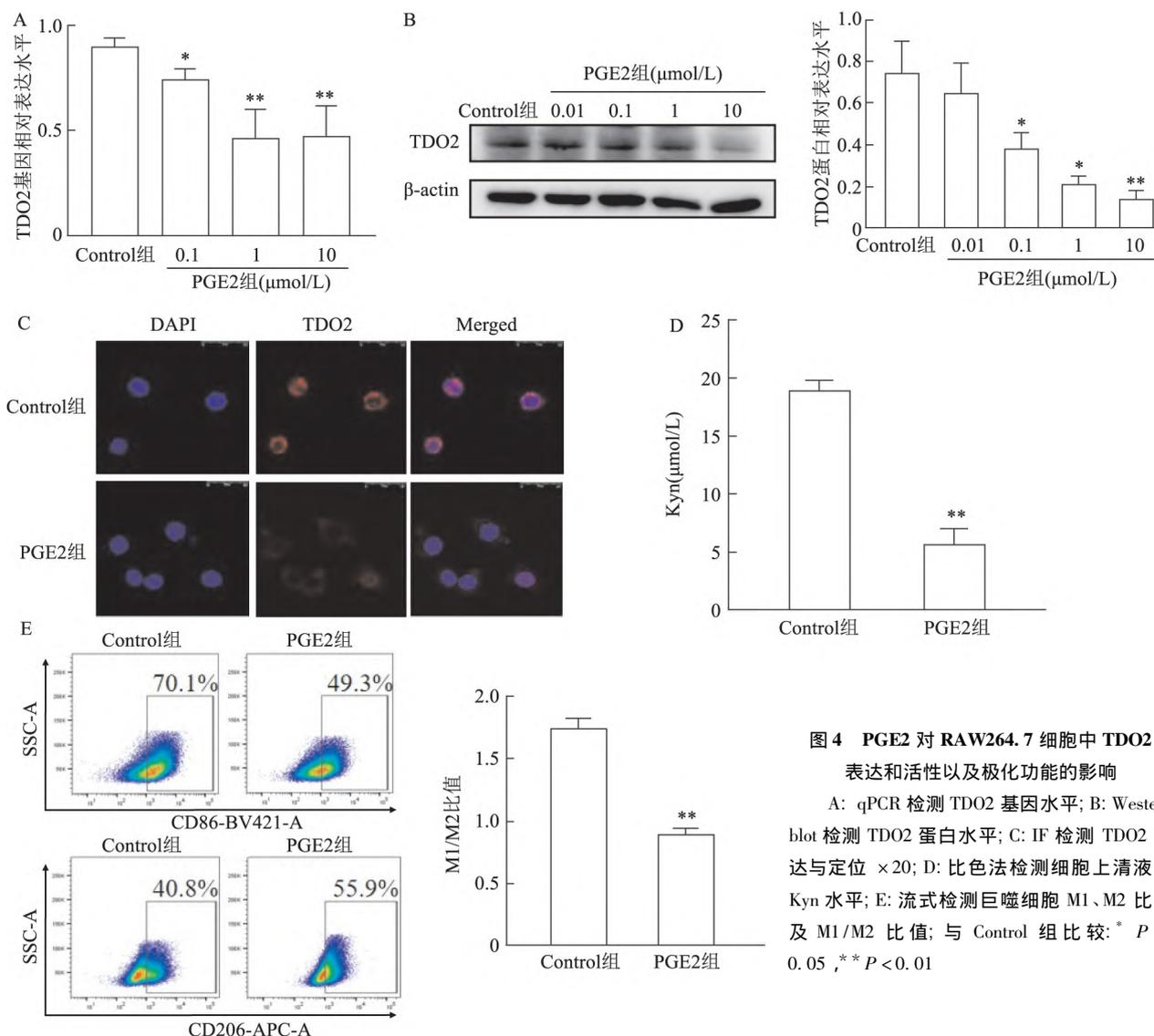


图4 PGE2对RAW264.7细胞中TDO2表达和活性以及极化功能的影响

A: qPCR检测TDO2基因水平; B: Western blot检测TDO2蛋白水平; C: IF检测TDO2表达与定位 $\times 20$; D: 比色法检测细胞上清液中Kyn水平; E: 流式检测巨噬细胞M1、M2比例及M1/M2比值; 与Control组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

酸 机体超过95%的Trp通过KP途径代谢,Trp及其代谢物失衡与神经系统疾病、自身免疫病以及肿瘤等疾病的发生发展有关^[5]。相关研究数据表明RA患者血清、尿液和关节滑膜液中Trp降低,Kyn升高^[6],提示Trp-Kyn代谢失衡参与了RA发生发展和病理机制,而催化Trp转化为Kyn的三种关键代谢酶吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)1、IDO2和TDO2可能是重要的治疗靶点。但由于三者表达、底物、功能和活性均有不同,所以在RA中的作用亦有所不同。近年来IDO1和IDO2在RA中的作用已有较多研究,而TDO2在RA等自身免疫病中的研究较少,本课题组前期首次发现TDO2在RA患者滑膜组织以及滑膜成纤维细胞中表达升高,给予TDO2抑制剂后能够缓解AA大鼠关节炎^[4],这提示靶向TDO2可能是治疗RA的一个有效潜在靶点。

本研究建立了CIA小鼠模型,模型小鼠关节炎指数评分整体指标明显改变,踝关节滑膜组织异常增生,与RA表现出相似的病理学变化,提示模型制备成功;免疫组化结果显示TDO2在CIA小鼠的踝关节、脾脏和肝脏中的表达升高,提示TDO2可能参与了RA的病理进程。RA的主要病理特征是滑膜中各种慢性炎症细胞的大量浸润。对滑膜的免疫组化结果分析表明,巨噬细胞是RA炎症性关节中肿瘤坏死因子产生的主要细胞^[2]。在RA患者和多种关节炎动物模型中,多种因素刺激下使巨噬细胞M1/M2比例升高^[2]。在本研究中,TDO2在CIA小鼠PMs中表达升高,体外细胞实验结果显示通过在RAW264.7细胞中小干扰TDO2以及给予TDO2抑制剂680C91后,巨噬细胞吞噬功能下降,M1/M2比值下降,提示TDO2可能通过介导巨噬细胞功能变化参与RA的病理过程。

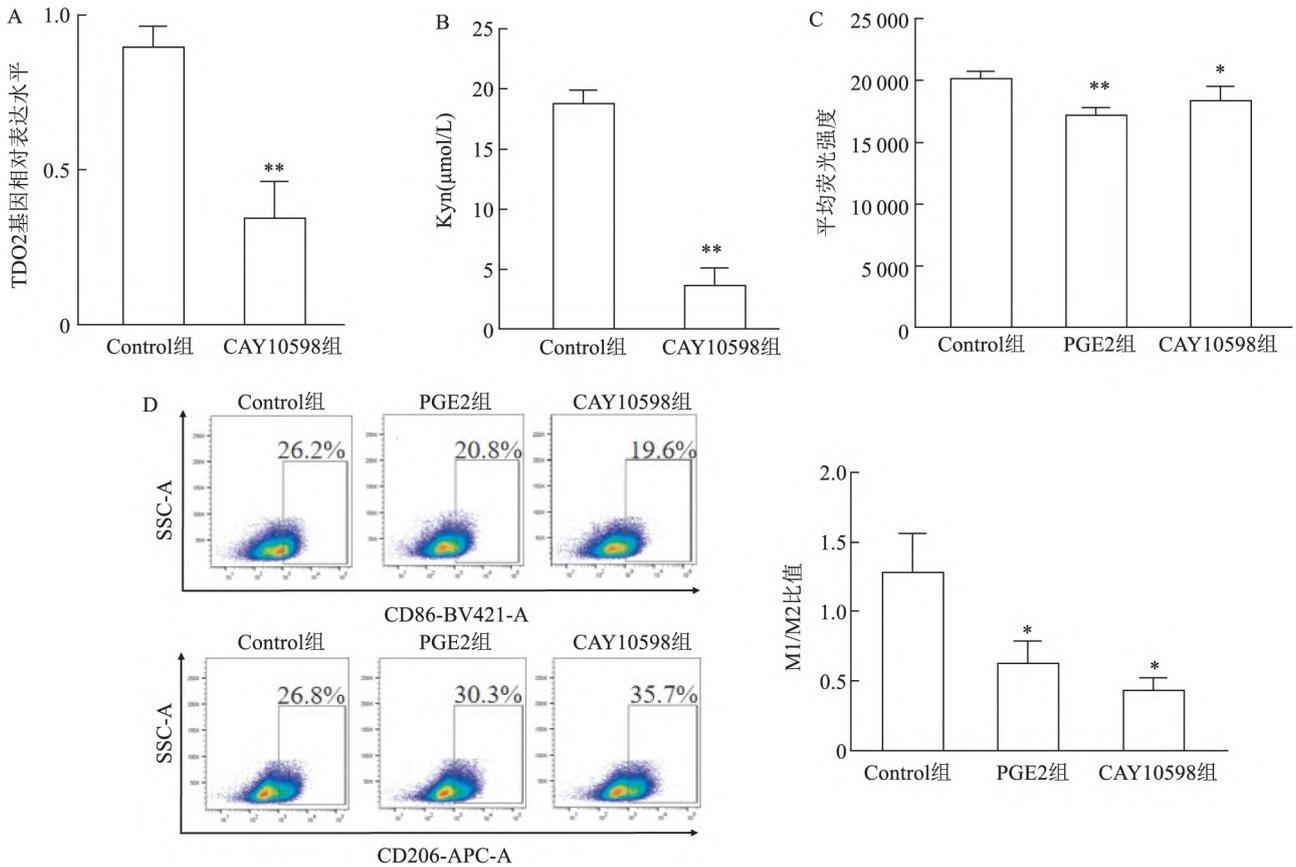


图5 PGE2 通过 EP4 受体对 RAW264. 7 细胞中 TDO2 表达和对巨噬细胞极化与吞噬功能的影响

A: qPCR 检测 RAW264. 7 细胞中给予 EP4 激动剂 CAY10598 后 TDO2 基因水平; B: 比色法检测 RAW264. 7 细胞中给予 EP4 激动剂 CAY10598 后细胞上清中 Kyn 的水平; C: 流式检测给予 PGE2 以及 EP4 受体激动剂 CAY10598 后 RAW264. 7 细胞吞噬能力; D: 流式检测给予 PGE2 以及 EP4 受体激动剂 CAY10598 后 RAW264. 7 细胞 M1/M2 比值; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

研究^[7]报道通过构建 K/BxN 血清转移关节炎小鼠模型,给予牙源性间充质干细胞(gingival-derived mesenchymal stem cells, GMSCs)治疗后发现,GMSCs 分泌的 PGE2 通过激活蛋白激酶 A 抑制细胞外信号调节激酶 ERK 通路缓解模型小鼠关节炎表现,提示 PGE2 在 RA 中有重要作用。也有研究^[8]显示,PEG2 可通过 CREB 促进 Kruppel 样因子 4 的表达从而刺激巨噬细胞向 M2 极化。而 PGE2 是否调控巨噬细胞中 TDO2 表达参与 RA 病理机制尚不明确。本研究表明,在 RAW264. 7 细胞中给予 PGE2 刺激后发现不同浓度 PGE2 能够不同程度降低 TDO2 表达和活性,其中 10 μmol/L 的 PGE2 效果最明显;给予 PEG2 刺激后,与对照组比较,RAW264. 7 细胞 M1 比例降低,M2 比例升高,M1/M2 比值降低,提示 PGE2 可通过抑制 TDO2 表达和活性介导巨噬细胞功能变化进而参与 RA 病理进程。

PGE2 的抗炎作用主要通过 EP2 和 EP4 受体介导产生。研究^[9]表明在胶质瘤模型当中,TDO2 表

达与 PGE2 受体 EP4 在转录和蛋白质水平上的表达均相关,且靶向 EP4 能够通过调控 TDO2 表达可能成为胶质瘤的免疫治疗新途径,提示 TDO2 可能通过非酶途径直接参与机体的免疫调节。研究^[10]报道在 CIA 模型小鼠 PMs 中给予 EP4 激动剂 CAY10598 后 M1/M2 比值下降,PGE2 可激活 EP4 受体促进巨噬细胞向 M2 极化。然而,PGE2 是否通过 EP4 受体来影响 TDO2 的表达从而调控巨噬细胞功能变化参与 RA 尚不明确。在本研究中,通过给予 EP4 受体激动剂 CAY10598 后发现 RAW264. 7 细胞中 TDO2 表达和活性下调,巨噬细胞吞噬能力下降,M1/M2 比值下降。这些结果提示 PGE2 通过激活 EP4 受体下调 TDO2 表达和活性进而影响巨噬细胞功能来参与 RA 的病理发展过程。

综上所述,Trp-Kyn 代谢异常参与了 RA 的病理过程,其主要限速酶之一的 TDO2 表达和活性异常与 RA 病理进程密切相关。本研究发现 PGE2 通过 EP4 受体下调 TDO2 表达和活性进而影响巨噬细胞功能,为阐明 TDO2 在 RA 中的作用和发现新的药

物靶点提供实验依据。

参考文献

- [1] Kurowska-Stolarska M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages in joint homeostasis, rheumatoid arthritis and disease remission [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(7): 384–97.
- [2] Udalova I A, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(8): 472–85.
- [3] 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, 7: 41271.
- [4] 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.
- [5] Schwarcz R, Stone T W. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112(Pt B): 237–47.
- [6] 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.
- [7] Zhao J, Liu Y, Shi X, et al. Infusion of GMSCs relieves autoimmune arthritis by suppressing the externalization of neutrophil extracellular traps via PGE2-PKA-ERK axis [J]. *J Adv Res*, 2024, 58: 79–91.
- [8] Luan B, Yoon Y S, Le Lay J, et al. CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(51): 15642–7.
- [9] Ochs K, Ott M, Rauschenbach K J, et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase is regulated by prostaglandin E2 in malignant glioma via a positive signaling loop involving prostaglandin E receptor-4 [J]. *J Neurochem*, 2016, 136(6): 1142–54.
- [10] Yang X, Li S, Zhao Y, et al. GRK2 mediated abnormal transduction of PGE2-EP4-cAMP-CREB signaling induces the imbalance of macrophages polarization in collagen-induced arthritis mice [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1596.

The specific mechanism of PGE2 inhibiting TDO2 expression and activity regulation of macrophage function changes

Wang Yi, Li Siyu, Wang Yueye, Dong Weibo, Cheng Meng, Wei Wei, Chang Yan

(Institute of Clinical Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunological Drugs of the Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Centre for Anti-inflammatory and Immunological Drugs, Rheumatoid Arthritis Research Centre of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO2) on collagen-induced arthritis, the expression of CIA in mice and the specific mechanism by which prostaglandin E2 (PGE2) inhibits the expression and activity of TDO2 and thus regulates the function of macrophages. **Methods** Type II collagen induced the CIA model in DBA/1J mice. The ankle joint injury of CIA mice was detected by X-ray. The expression of TDO2 in ankle joint and spleen was detected by immunohistochemistry. Changes of TDO2 expression in peritoneal macrophages (PMs) were detected by qPCR and immunofluorescence. TDO2 expression was detected by small interference in RAW264.7 cells, TDO2 inhibitor 680C91, PGE2 stimulation with different concentrations (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) and EP4 receptor agonist CAY10598. qPCR and Western blot were used to detect TDO2 expression. The phagocytosis and polarization of macrophages were detected by flow cytometry. The activity of TDO2 was detected by colorimetry. **Results** Compared with normal mice, CIA mice had larger soft tissue swelling in ankle, and increased TDO2 expression in synovium, spleen and PMs. In RAW264.7 cells, TDO2 expression was significantly inhibited after small interference, TDO2 inhibitor 680C91, PGE2 stimulation, and EP4 receptor agonist CAY10598, macrophage phagocytosis decreased, and M1/M2 ratio decreased ($P < 0.05$). Colorimetric results showed that the activity of TDO2 was inhibited after stimulation of PGE2 and EP4 agonist CAY10598 in RAW264.7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The increased expression of TDO2 in macrophages may promote synovial injury in CIA mice, and PGE2 regulates the function of macrophages by inhibiting the expression and activity of TDO2 by activating EP4 receptor.

Key words rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; tryptophan-2,3-dioxygenase; prostaglandin E2; prostaglandin receptor 4