

网络出版时间:2024-12-05 14:24:29 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.024

# 微生物组学联合代谢组学揭示类风湿关节炎、痛风性关节炎和骨关节炎患者关节腔积液微生物和代谢谱的变化

易寒知<sup>1</sup>, 马武开<sup>1,2</sup>, 王敏慧<sup>1</sup>, 黄春霞<sup>1</sup>, 顾光照<sup>1,2</sup>, 朱丹<sup>1</sup>, 李湖帆<sup>1</sup>,刘灿<sup>1,2</sup>, 唐芳<sup>1,2</sup>, 姚血明<sup>1,2</sup>, 孙李萍<sup>1,2</sup>, 王楠<sup>1,2</sup>, 陈昌明<sup>1,2</sup>( <sup>1</sup>贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550002;<sup>2</sup>贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科, 贵阳 550001)

**摘要** 目的 探讨类风湿关节炎(RA)、骨关节炎(OA)及痛风性关节炎(UA)患者关节腔积液微生物和代谢物的变化,以期  
为菌群影响关节炎发病机制的研究提供新思路。**方法** 收集 RA、OA、UA 患者关节腔积液各 20 例。采用 16S rRNA 基因测序  
和非靶向超高效液相色谱-质谱(LC-MS)探讨 3 组患者微生物、代谢物之间的差异,并采用 Pearson 相关性分析探究关节腔  
微生物群与代谢物的相关性。**结果** 3 组患者关节腔积液微生物多样性、菌群组成存在差异,以正交偏最小二乘法分析(OPLS-  
DA)的变量权重值 VIP > 1 和 P < 0.05 为标准,两两比较共鉴定出 45 种差异代谢物(RA 与 OA 组)、38 种差异代谢物(UA 与  
OA 组)和 16 种差异代谢物(RA 与 UA 组)。GO 分析与 KEGG 通路分析显示 3 组之间差异代谢途径主要集中在柠檬酸循环、  
核苷酸代谢、氨基酸代谢和糖酵解通路。关节腔积液微生物群和代谢物的相关性分析提示,富集在 3 组关节腔积液中的细菌  
如普氏菌属、瘤胃梭菌、Prevotellaceae\_UCG-001 等与许多关键代谢物如溶菌酶、尿酸、葡萄糖、L-谷氨酰胺存在相关性。**结论**  
研究发现 RA、OA、UA 患者关节腔积液中存在多种菌群,其产生的差异代谢物通过影响多种代谢途径参与 3 类关节炎的发病。

**关键词** 类风湿关节炎;骨关节炎;痛风性关节炎;关节腔积液;微生物;代谢组学

**中图分类号** R 372

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2237-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.024

关节炎是一种致残性疾病,最常见的关节炎形式是骨关节炎(osteoarthritis, OA),类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)和痛风性关节炎(urarthritis, UA),这些疾病会导致滑膜产生过多的滑液,引起关节内的液体增多即关节腔积液的产生。关节腔最初被认为是无菌的,而目前越来越多研究<sup>[1]</sup>发现滑液和滑膜组织中微生物失调会产生促炎表型导致关节内发生炎症。关节炎的发病机制可能与“肠-关节轴”假说以及来源于肠道的关节腔积液菌群有关。已有证据<sup>[2]</sup>表明,在 RA、OA 滑膜或滑液的 183

个样本中检测到卍单胞菌和拟杆菌 DNA,说明 DNA 微生物群体向关节迁移是常态,但尚不清楚这些细菌 DNA 是否来源于黏膜的免疫细胞。有学者认为肠道菌群和短链脂肪酸能调节尿酸盐结晶诱导的 UA 炎症反应,基于肠-关节轴机制可能通过操纵肠道微生物群和饮食摄入来治疗 UA<sup>[3]</sup>。对此采用 16S rRNA 和代谢组学技术探讨关节腔积液菌群是否能影响关节炎的发病及其与肠道菌群的关系,为研究免疫、代谢相关疾病的发病机制提供新思路。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 甲醇、甲酸、水、乙腈均购自德国杜塞尔多夫科技有限公司, L-2-氯苯丙氨酸购自上海恒创生物科技有限公司。

**1.2 研究对象、关节腔积液收集及储存** 收集 2020 年 1 月—12 月临床诊断符合 ACR/EULAR 2010 RA 分类标准的 20 例 RA 患者关节腔积液、20 例 EULAR 2010 临床诊断标准的 OA 患者关节腔积液和 20 例 ACR/EULAR 2015 临床诊断标准的 UA 患者关节腔积液<sup>[4-6]</sup>。本试验经贵州中医药大学第二附属医院医学伦理委员会批准(伦理批号:

2024-10-21 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82260894);贵州中医药大学第二附属医院院内博士科研项目(GZEYK-B[2021]2号);贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2020]2202号);贵州省高等学校重点实验室建设任务项目(编号:黔教技[2023]017号);贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(贵中医 TD 合字[2022]004号);省部共建中医证国家重点实验室项目(编号:SZ2021ZZ0202)

作者简介:易寒知,女,硕士研究生;

陈昌明,女,副主任技师,硕士生导师,通信作者, E-mail: dychangming\_chen@163.com

Lw20210715),研究对象均已签署知情同意书。所有患者采样均由统一人员在无菌采样室采样,并在0.5 h内将采样管置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰柜储存。

**1.3 16S rRNA 基因测序** 使用 QIAamp 96 PowerFecal QIAcube HT kit(德国凯杰公司)按照制造商的方案对关节腔积液的基因组 DNA 进行提取。利用 NanoDrop2000 分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)和琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 的浓度。将 DNA 稀释至  $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ ,作为 16S rRNA 基因 PCR 模板。采用通用引物(343F-5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'和 798R-5'-AGGGTATCTAATCCT-3')PCR 扩增 16S V3-V4 区。PCR 条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s,26 个循环,最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延长 5 min。根据制造商的说明,从琼脂糖凝胶中提取 PCR 扩增子。PCR 产物使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化,纯化后进行第二轮 PCR 扩增,并再次使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化,纯化后对 PCR 产物进行 Qubit 定量。使用 MiSeq 平台(Illumina,美国因美纳生物科技公司)对纯化的 PCR 扩增子上机测序。

**1.4 代谢组学分析** 本次实验的分析仪器为 Dionex U3000 UHPLC 超高效液相串联 QE plus 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)组成的液质联用系统。将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存的样本取出,在室温下解冻,移取样本  $100\text{ }\mu\text{l}$ ,加入内标(L-2-氯苯丙氨酸, $0.3\text{ mg}/\text{ml}$ ;甲醇配置) $10\text{ }\mu\text{l}$  涡旋振荡 10 s;加入  $300\text{ }\mu\text{l}$  蛋白沉淀剂甲醇-乙腈(V:V=2:1),涡旋振荡 1 min;冰水浴超声提取 10 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 30 min;离心 10 min( $13\text{ }000\text{ r}/\text{min}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),取  $30\text{ }\mu\text{l}$  上清液装入 LC-MS 进样小瓶中挥干;用  $400\text{ }\mu\text{l}$  甲醇-水(V:V=1:4)复溶(涡旋 30 s,超声 3 min); $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 2 h;离心 10 min( $13\text{ }000\text{ r}/\text{min}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),用注射器吸取  $150\text{ }\mu\text{l}$  上清液,使用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  的有机相针孔过滤器过滤后,转移到进样小瓶, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,直到进行 LC-MS 分析。质控样本(QC)由所有样本的提取液等体积混合制备而成,QC 的体积与样本相同。所有提取试剂使用前均在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行预冷。所有样品均以正离子和负离子模式进行分析。色谱柱[美国沃特世公司 ACQUITY UPLC HSS T3 柱( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ , $1.8\text{ }\mu\text{m}$ )]在  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  柱温下使用。进样体积为  $2\text{ }\mu\text{l}$ 。流动相:A-水(含 0.1% 甲酸),B-乙腈(含 0.1% 甲酸)。梯度洗脱模式为: $0\sim 2\text{ min}$ ,95% A; $2\sim 4\text{ min}$ ,95%~70% A; $4\sim 8\text{ min}$ ,70%~50% A; $8\sim 10\text{ min}$ ,50%~20% A; $10\sim$

$15\text{ min}$ ,20%~0% A;流速为  $0.35\text{ ml}/\text{min}$ 。

**1.5 统计学处理** 采用方差分析检测 3 组或 3 组以上的统计学显著性, $P<0.05$  为差异有统计学意义。采用 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis,PLS-DA)和正交 PLS-DA(orthogonal partial least squares discriminant analysis,OPLS-DA)分析。基于 OPLS-DA 模型将变量权重值(variable importance of projection,VIP) $>1.0$ , $t$  检验双侧  $P<0.05$  的代谢物视为差异代谢物。选取排名前 20 的微生物属与代谢物进行关联分析,采用 Pearson 相关分析检测 3 组间微生物群与代谢物的相关性。

## 2 结果

**2.1 16S rRNA 测序结果质控** 在本研究中,60 个关节腔积液样本被用来评估代谢谱在 RA,OA 和 UA 患者中的变化。测序共获得 4 423 781 个去除低质量的序列,其中 383 560 个为有效序列。可操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs)和物种多样性 Shannon 指数的简要总结和估计值如图 1A、1B 所示。共享的 OTU 一共有 28 个,这些 OTU 可视为 RA、OA、UA 患者关节腔积液菌群所固有的细菌类型。本实验对 3 组进行 alpha 多样性分析,曲线趋于平坦(图 1B),表明样本的测序深度足够,可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。Shannon 指数越高表明样品的物种多样性越高,图 1B 结果可以看出各组间没有明显的区分。

**2.2 关节腔积液微生物多样性分析结果** 采用 PCoA 分析(图 1C)和 NMDS 分析(图 1D)探究 RA、UA 和 OA 组微生物之间的差异。与上述结果一致,3 组关节腔液细菌未表现出独特的差异特点。表明难以通过关节腔液内微生物对不同类型关节炎进行区分。在对 4 个 alpha 多样性指数(chao1、good coverage、observed species 和 shannon)分析中观察到,RA、UA 和 OA 类群的细菌多样性存在统计学差异(图 1E)。其中,RA 在 chao1、observed species 中的多样性指数较 UA 组更高,差异均有统计学意义(组间: $Z=-2.462$ 、 $-2.407$ ,均  $P<0.05$ ),而在 shannon 指数中差异无统计学意义(组间: $Z=-1.082$ , $P>0.05$ )。在 good coverage 指数中,观察到 3 组数值接近于 1,说明测序深度基本覆盖到样品中的所有物种。根据分类水平,门、属水平的细菌相对丰度前

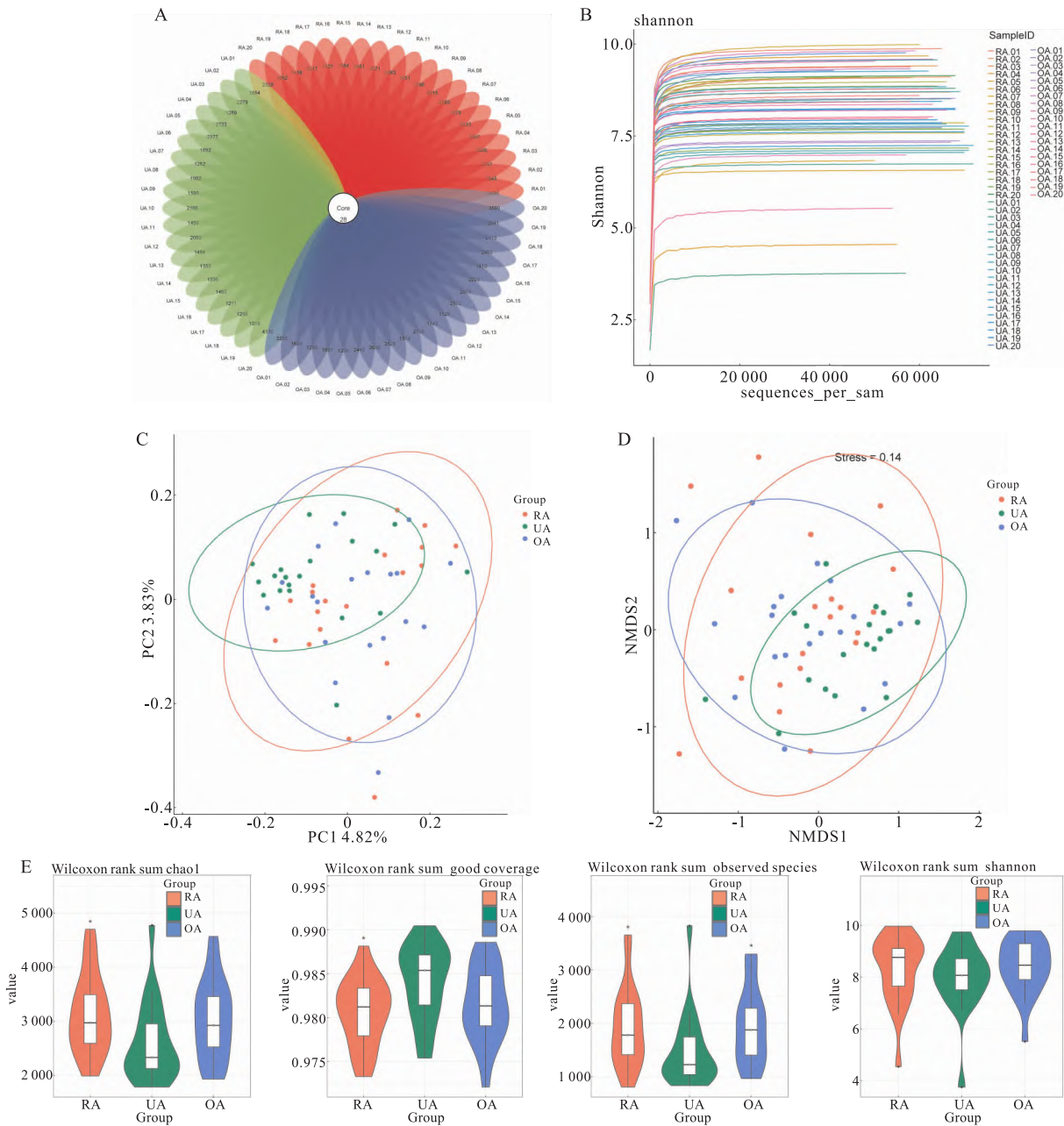


图 1 关节腔积液微生物群的 OTUs 和 alpha、beta 多样性分析

Fig. 1 OTUs, alpha and beta diversity analysis of the microbiome of joint effusion

A: OTU—flower plot; B: Shannon analysis; C, D: PCoA plots and NMDS plots; E: Violin plot of OTU diversity index was compared between groups; \*  $P < 0.05$  vs UA group.

15 位如图 2A、2B 所示。在门水平,约 90% 的序列位于拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和 *Epsilonbacteraeota*, 3 组之间没有差异。在属水平,观察到 *Prevotellaceae\_UCG-001* 在 UA 组中丰度最高(5.3%),在 OA 组中最低(2.9%);*Prevotella\_9* 在 OA 组中丰度最高(4.7%),在 RA 组中最低(1.2%);毛螺菌科 *\_NK4A136\_group* 是一种有

益菌,属于厚壁菌门,在 3 组中无显著差异(分别占 RA 组 3.7%、UA 组 3.6%、OA 组 3.6%);此外观察到拟杆菌属在 3 组中都存在,且在 RA(3.4%) 和 OA(4.1%) 中丰度较 UA(2.9%) 高;乳酸菌属在 RA(2.2%)、UA(2.4%) 中的丰度要高于 OA(1.8%)。在其他水平细菌分类有分散趋势,在属、种水平挑选丰度排名靠前的差异物种做相对丰度箱式图分析,排名前 10 的属为 *Prevotellaceae\_UCG-*

001、普氏菌属\_9、假单胞菌、鞘氨醇单胞菌、[真杆菌属]\_xylanophilum\_group、瘤胃梭菌\_5、粪球菌属\_2、瘤胃球菌\_UCG-011、Saccharofermentans、Chryseolinea(组间:  $F = 4.503, 3.688, 4.161, 3.297, 4.348, 5.370, 4.430, 3.738, 6.733, 3.281$ , 均  $P < 0.05$ ); 排名前8的种为茄科茄属、支原体\_hyosynoviae、Alistipes\_finegoldii、小杆菌属\_pneumosintes、假白喉杆菌、消化乳杆菌、短螺旋体属\_andersonii、拟杆菌\_genomosp\_p1(组间:  $F = 3.515, 4.480, 4.225, 8.150, 8.014, 4.509, 4.931, 3.290$ , 均  $P < 0.05$ ), 3组间差异显著(图2C、2D)。

**2.3 关节腔积液代谢物分析结果** 根据PCA评分图中的QC样本,LC-MS方法具有良好的重现性(图3A)。采用PCA和PLS-DA探讨RA、UA和OA组之间的代谢差异。PCA评分图有明显的分离趋势(图3B-3D),PLS-DA模型分离效果较好(图4A-4C),说明RA、UA和OA组之间关节腔积液代谢物存在显著性差异。进行OPLS-DA,如(图4D-4F)所示。采用200次置换检验验证OPLS-DA模型的可靠性(图4G-4I),Q2截距值 $< 0$ ,表明模型未过

拟合。

结合OPLS-DA的VIP $> 1$ 和双尾检验的 $P < 0.05$ , $\text{Log}_2(\text{FC})$ 正值表示上调,负值表示下调,共鉴定出RA与OA组45种差异代谢物(28个上调,17个下调)、UA与OA组38种差异代谢物(32个上调,6个下调)和RA与UA组16种差异代谢物(7个上调,9个下调),根据 $P < 0.05$ 且VIP $> 1$ 对FC值做排序,FC $> 2$ ,越大越有意义,FC $< 0.5$ ,越小越有意义,按FC值找排名靠前的差异代谢物。RA与OA组排名靠前的有N-Acetyl-glucosamine 1-phosphate、3'-AMP、单磷酸腺苷、5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide、柠檬酸等。UA与OA组排名靠前的有5-羟色胺、3'-AMP、单磷酸腺苷等。RA与UA排名靠前的有表儿茶素、生物素、甘醇酸、硫酸脱氢表雄酮等。为了显示代谢物表达的差异,对所有改变的代谢物进行了聚类分析(图5A-5C),横坐标表示样本名称,纵坐标表示差异代谢物,颜色从蓝到红表示代谢物的表达丰度从低到高。并对差异代谢物进行KEGG通路分析,找出3组之间差异的代谢途径。在气泡图(图5D-5F)中,圆点的大小代表

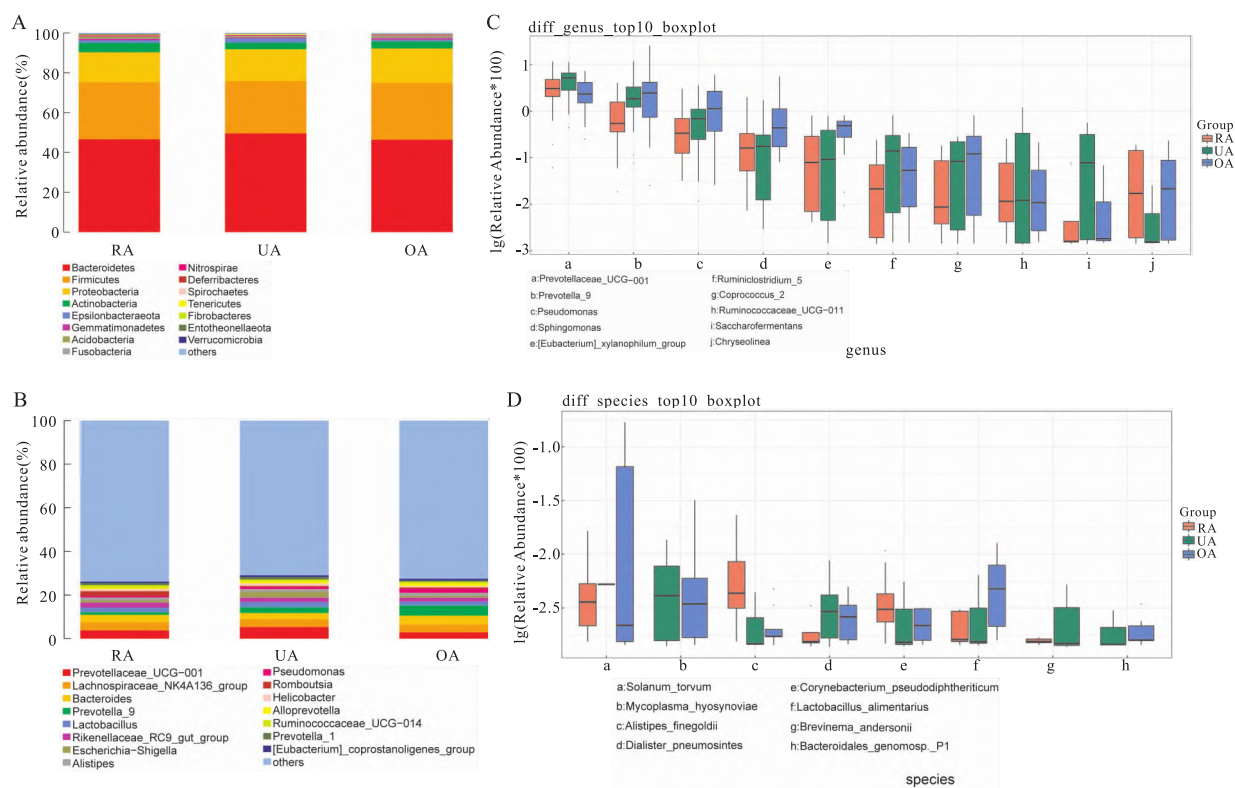


图2 不同分类水平下3组关节腔细菌的丰度比较 (n = 60)

Fig. 2 Comparison of the abundance of bacteria in joint effusion of the three groups at different taxonomic levels (n = 60)

A, B: Composition and abundance of bacteria in joint effusion at the level of phylum and genus (Top 15); C, D: Boxplot of differential species abundance at the level of genus and species.

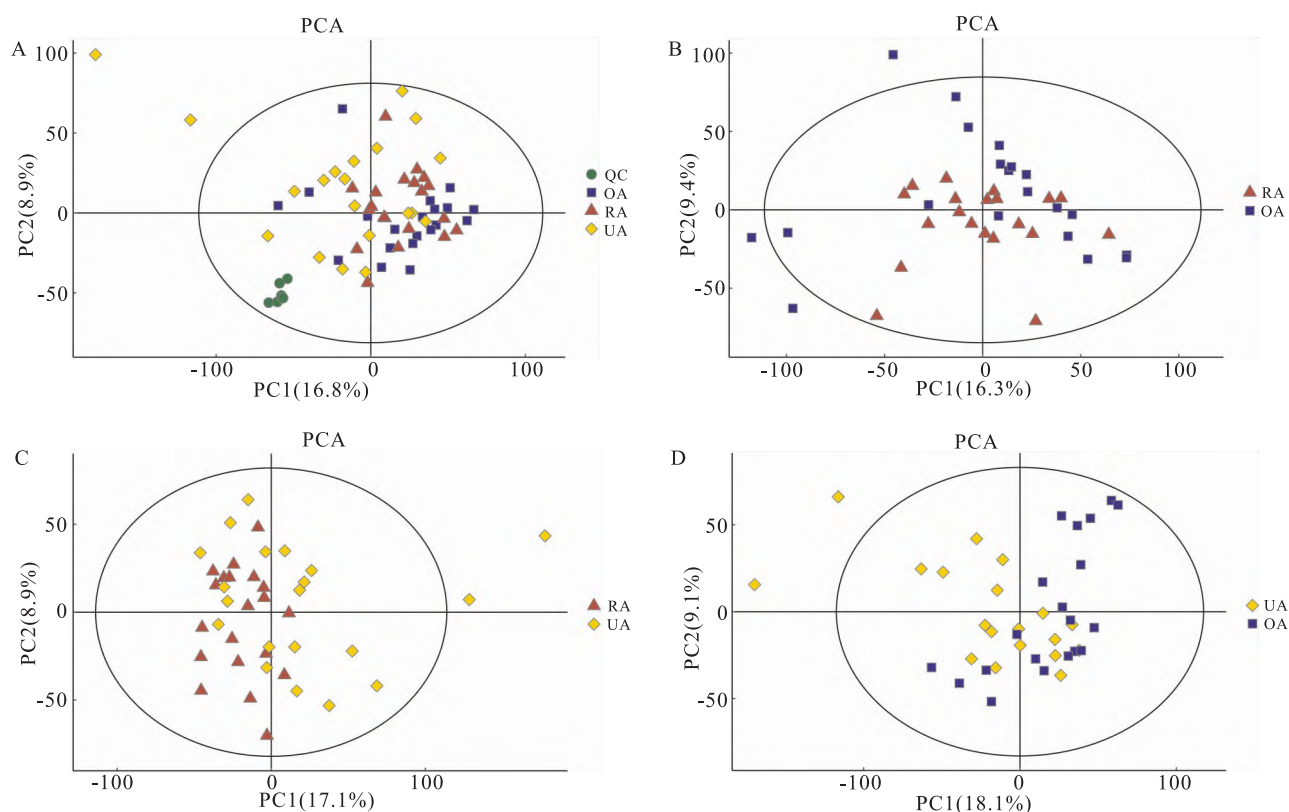


图3 RA、UA 和 OA 组间 PCA 模型评分图

Fig. 3 Score plots of the PCA model among the RA, UA and OA groups

代谢物的数量,横坐标 RichFactor 值越大,代表富集程度越大。RA 组和 OA 组间显著富集的前 10 条通路分别是嘌呤代谢、抗坏血酸和醛酸代谢、味觉转导、嗅觉转导、cGMP-PKG 信号通路、柠檬酸循环、胰岛素抵抗、乙醛酸和二羧酸代谢、嘧啶代谢和胰高血糖素信号通路 ( $P < 0.05$ )。UA 组和 OA 组间显著富集的前 10 条通路分别是:味觉转导、ABC 转运蛋白、FoxO 信号通路、嘌呤代谢、嗅觉转导、谷氨酸能突触、gaba 能突触、cGMP-PKG 信号通路、间隙连接和胆碱代谢。RA 组和 UA 组间显著富集的通路为谷氨酸能突触、gaba 能突触、ABC 转运蛋白、嘌呤代谢、胆碱代谢以及 d-谷氨酰胺和 d-谷氨酸代谢。

**2.4 关节腔积液微生物多样性与代谢物的关联分析** 采用 Pearson 相关分析检测 3 组间微生物群与代谢物的相关性。在属水平,3 组间微生物与代谢物谱之间的相关性如图 6A-6C 所示,观察到在 RA 与 OA 组(图 6A)中,溶菌酶 LysoPC (17:0) 与普氏菌属呈负相关、与分节丝状菌 (*Candidatus\_Arthromitus*) 呈正相关;尿酸、葡萄糖与普氏菌属呈正相关;异亮氨酸 (Isoleucyl-Isoleucine) 与普氏菌属呈负相关、与分节丝状菌呈正相关。在 UA 与 OA 组(图

6B)中,棕榈酸与未培养的瘤胃细菌 (*Uncultured rumen bacterium*) 呈正相关;硫酸脱氢表雄酮 (Dehydroepiandrosterone sulfate) 与 *Prevotellaceae\_UCG-001* 呈正相关;L-谷氨酰胺与 *Prevotellaceae\_UCG-001*、幽门螺杆菌呈正相关。在 RA 与 UA 组(图 6C)中,尿酸与普氏菌属\_9、*Prevotellaceae\_UCG-003* 呈正相关;肌酸 (Creatine) 与瘤胃梭菌\_5 呈负相关;L-谷氨酰胺 (l-glutamine) 与普氏菌属\_9、瘤胃梭菌\_5 呈正相关。

### 3 讨论

RA、OA、UA 是非感染性的骨关节病,三者都会造成关节疼痛、肿胀和活动受限。滑膜炎、过度劳损、感染是引起关节腔积液产生的常见病因。近年来,越来越多的研究<sup>[7]</sup>将肠道微生物群与关节炎发病联系起来,提出菌群失调可能导致肠黏膜通透性增加,从而使肠内微生物通过血液循环到达关节腔。肠道微生物群是导致关节炎发生的重要环境因素,目前尚未有研究验证关节腔积液的菌群是否由肠道迁移而来。本研究收集了 60 例患者的关节腔积液,在 3 组患者的关节腔积液中发现排名前五的优势菌

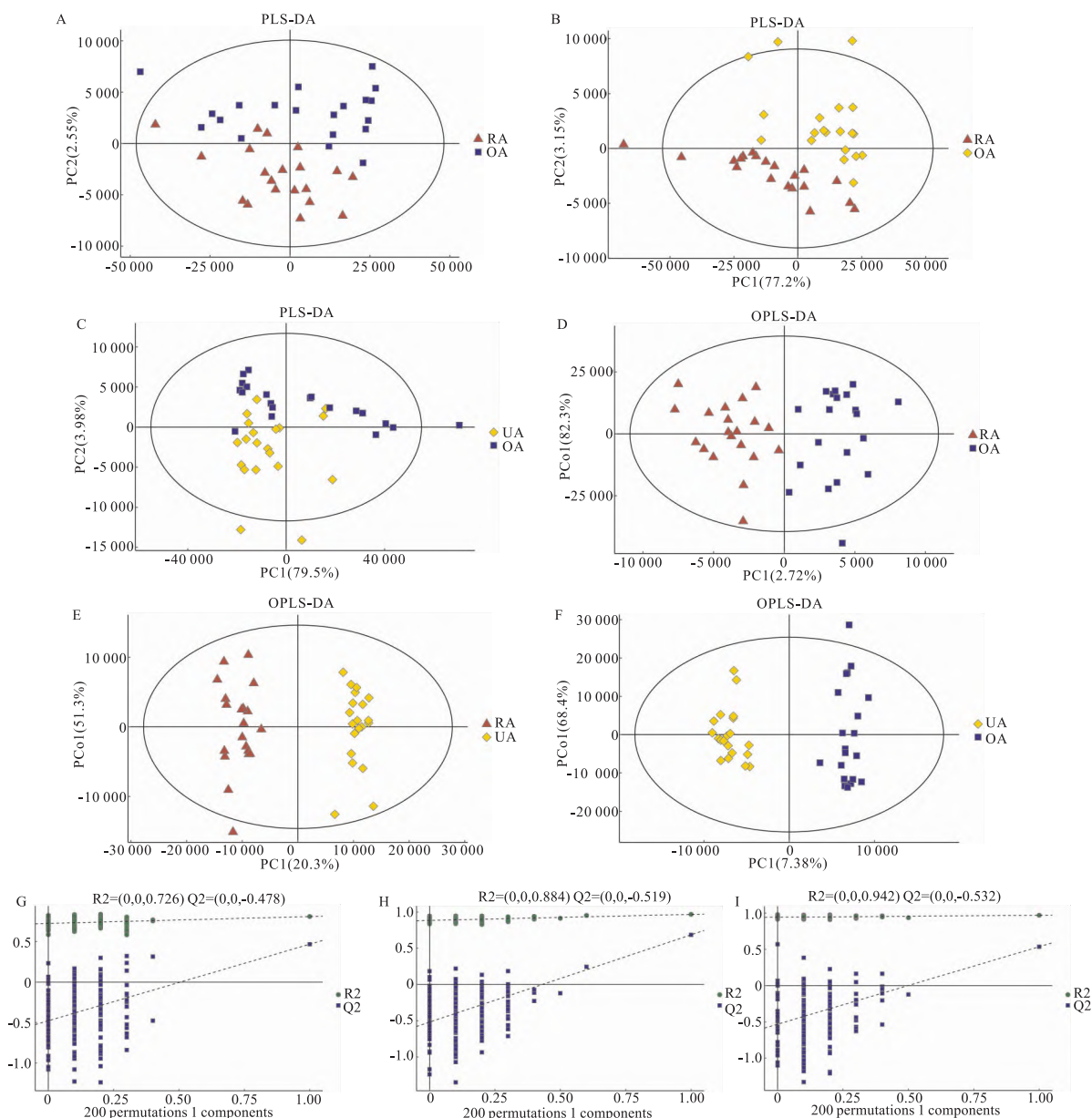


图4 RA、UA 和 OA 组的代谢分析

Fig. 4 Metabolic profiling among the RA, UA and OA groups

A - C: Score plots of the PLS-DA model; D - F: Scores plot of the OPLS-DA model; G - I: Plot of the permutation test (200 times) of the PLS-DA model.

门为拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和 *Epsilonbacteraeota*。而厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门被称为肠道菌群的四大门类,至少有 500 ~ 1 000 种不同的细菌物种已被鉴定为存在于人类胃肠道中<sup>[8]</sup>。说明在关节腔积液找到的菌群在肠道中也存在着相同的菌落。在此基础上,初步探讨了关节腔积液菌群与肠道菌群存在联系,以及微生物群与关节炎发病机制的相关性。

根据物种注释结果,在门水平上观察到 3 组间关节腔积液菌群组成相似,其中厚壁菌门、拟杆菌

门、变形菌门丰度最高。同时在属水平上挑选了排名前十的差异物种进行相对丰度分析,包括普氏菌属、瘤胃梭菌属、粪球菌属等,其中瘤胃梭菌属在 UA 中的丰度明显高于其他两组。已有研究<sup>[9]</sup>表明瘤胃梭菌是一种常见的肠道厌氧细菌,能降解多糖和产生短链脂肪酸,从而影响调节免疫反应和抑制炎症,以及抑制其他有害细菌的生长,维持肠道微生物群平衡。说明在三种疾病的发病机制中,是由多种细菌共同参与的结果,菌群失调在关节炎的发病中占据重要地位,关节炎中也存在着益生菌,当有害

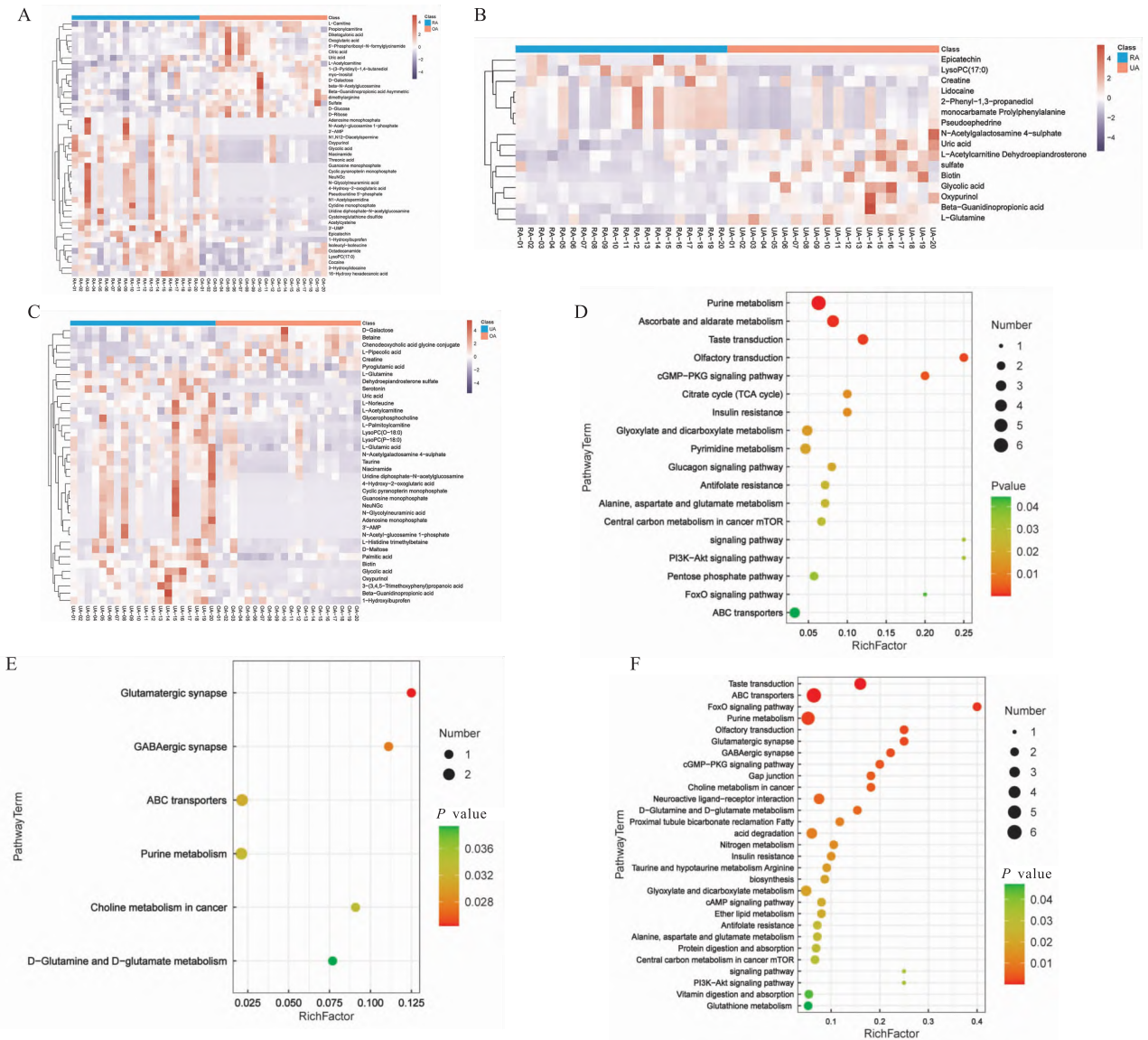


图 5 RA,UA 和 OA 组差异代谢物显著富集的 KEGG 通路的热图和气泡图

Fig. 5 Heat maps and bubble plots of KEGG pathways significantly enriched for differential metabolites in RA, UA, and OA groups

A: Clustering heat maps of 45 differential metabolites expression in RA and OA groups; B: Clustering heat maps of 16 differential metabolites expression in RA and UA groups; C: Clustering heat maps of 38 differential metabolites expression in UA and OA groups; D – E: Bubble plots of metabolic pathways significantly enriched in RA, UA, and OA groups (D: RA and OA groups; E: RA and UA groups; F: UA and OA groups).

菌比例高于益生菌时会发病。

在 RA 与 OA 组之间鉴定出 45 种差异代谢物 (28 个上调,17 个下调),UA 与 OA 组之间鉴定出差异常代谢物 38 个(32 个上调,6 个下调),RA 与 UA 组之间鉴定出差异常代谢物 16 个(7 个上调,9 个下调)。这些代谢物大多可归纳为核苷酸代谢、氨基酸代谢,核苷酸代谢分为嘌呤和嘧啶代谢。根据 FC 值,观察到 5-羟色胺(5-HT)在 UA 与 OA 中排名靠前,而 5-HT 由色氨酸合成,参与氨基酸的代谢途径。已有研究<sup>[10-11]</sup>证实了 5-HT 与炎症之间的关联不仅存在于肠道中,也与血清阳性的 RA、骨关节

炎存在直接联系,关节内 5-HT 水平升高会引起关节炎和疼痛。

KEGG 富集分析标记到几个较为重要的代谢途径,包括嘌呤代谢、cGMP-PKG 信号通路、柠檬酸循环、嘧啶代谢、谷氨酸代谢等。微生物群通过不同的代谢途径产生多种代谢产物,这些差异代谢物在宿主体内选择性与靶细胞膜上相应受体结合,然后作用于特定靶点,直接或间接导致靶细胞功能异常或损伤,从而影响代谢通路,使基因上调或下调,导致疾病的发生。

无论从本研究还是近期国外研究<sup>[12-14]</sup>都表明

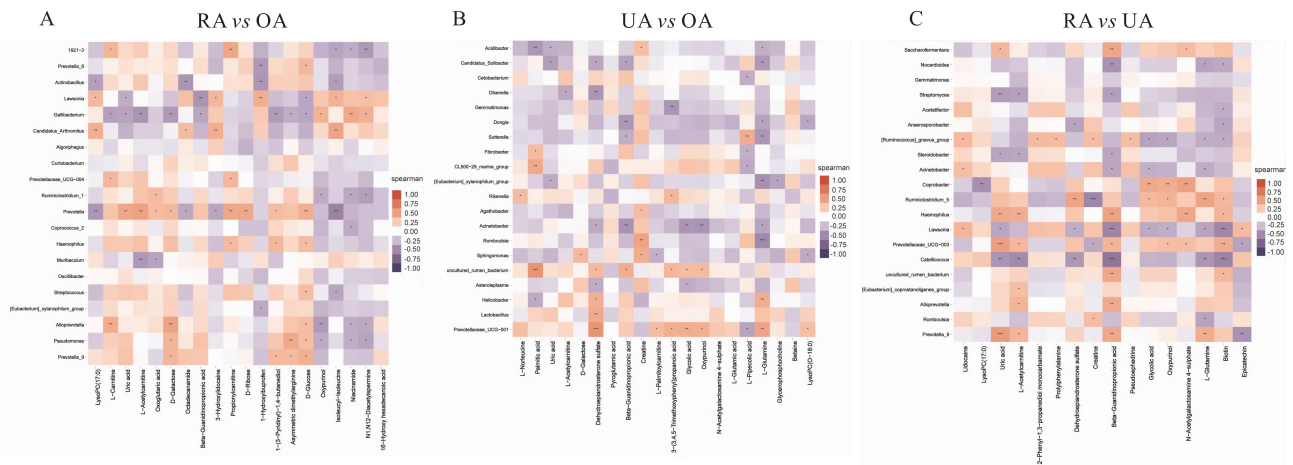


图6 属水平上排名前20的微生物属与代谢物的关联分析相关性热图,颜色深浅代表相关性大小  
 Fig. 6 Correlation heat map of association analysis between the top 20 microbial genera and metabolites at the genus level, with color shades representing the magnitude of correlation

RA、OA、UA 患者体内存在差异代谢物。本研究对差异代谢物进行 KEGG 通路分析,RA 与 OA 组中显著富集的通路包括嘌呤代谢、柠檬酸循环、胰岛素抵抗和胰高血糖素信号通路等。已有研究<sup>[12]</sup>对 RA 和 OA 的滑液进行比较,发现两种关节炎之间差异最大的代谢途径是糖酵解、氨基酸生物合成,糖酵解和柠檬酸循环的代谢物在 OA 中水平较高,在 RA 中较低,说明 RA 炎症水平及滑膜增生情况与低氧存在很大联系。Kim et al<sup>[13]</sup>在 RA 和 OA 的滑液中鉴定出的关键代谢物与嘌呤和氨基酸代谢有关。进一步验证柠檬酸循环、糖酵解通路、嘌呤代谢会影响 RA、OA 的发病。此外,本研究结果显示 RA 与 UA 组、UA 与 OA 组显著富集的有嘌呤代谢、胆碱代谢以及谷氨酸代谢等通路。UA 能诱导氨基酸代谢紊乱,加速糖酵解,上调血浆中谷氨酰胺水平。一项研究<sup>[14]</sup>表明,与 UA 相比,RA 患者滑液的谷氨酰胺水平显著升高。Li et al<sup>[15]</sup>使用气相色谱-质谱法对 UA 患者和对照组的尿液代谢组学进行研究发现有 30 种特征代谢物存在显著差异,与氨基酸代谢、嘌呤代谢、脂质代谢和三羧酸循环中的扰动密切相关。这些研究均表明氨基酸代谢、TCA 循环、嘌呤代谢、糖酵解参与了 3 类关节炎的发病机制,与本实验得出的结论相符。

参考文献

[1] Tsai J C, Casteneda G, Lee A, et al. Identification and characterization of the intra-articular microbiome in the osteoarthritic knee [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (22): 8618. doi: 10.3390/ijms21228618.  
 [2] Berthelot J M, Sellam J, Maugars Y, et al. Cartilage-gut-microbiome axis: a new paradigm for novel therapeutic opportunities in osteoarthritis[J]. *RMD Open*, 2019, 5 (2): e001037. doi: 10.1136/rmdopen-2019-001037.  
 [3] Park H K, Lee S J. Treatment of gouty arthritis is associated with restoring the gut microbiota and promoting the production of short-chain fatty acids[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 51. doi: 10.1186/s13075-022-02742-9.  
 [4] 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]. *Arthri-*

*tis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-81. doi:10.1002/art.27584.  
 [5] Zhang W, Doherty M, Peat G, et al. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(3): 483-9. doi:10.1136/ard.2009.113100.  
 [6] Neogi T, Jansen T L, Dalbeth N, et al. 2015 Gout classification criteria: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(10): 1789-98. doi:10.1136/annrheumdis-2015-208237.  
 [7] Catrina A I, Deane K D, Scher J U. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55(3): 391-402. doi: 10.1093/rheumatology/keu469.  
 [8] Lin S, Wang Z, Lam K L, et al. Role of intestinal microecology in the regulation of energy metabolism by dietary polyphenols and their metabolites[J]. *Food Nutr Res*, 2019, 63. doi:10.29219/fnr.v63.1518.  
 [9] Zhao J, Hou Y, Xie T, et al. Genome-wide Mendelian randomization identifies putatively causal gut microbiota for multiple peptic ulcer diseases[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1260780. doi:10.3389/fimmu.2023.1260780.  
 [10] Löfdahl A, Tormling G, Wigén J, et al. Pathological insight into 5-HT2B receptor activation in fibrosing interstitial lung diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 225. doi:10.3390/ijms22010225.  
 [11] Chen Y, Wang X, Zhang C, et al. Gut microbiota and bone diseases: a growing partnership [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 877776. doi:10.3389/fmicb.2022.877776.  
 [12] Southan J, McHugh E, Walker H, et al. Metabolic signature of articular cartilage following mechanical injury: an integrated transcriptomics and metabolomics analysis [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 592905. doi:10.3389/fmolb.2020.592905.  
 [13] Kim S, Hwang J, Kim J, et al. Metabolic discrimination of synovial fluid between rheumatoid arthritis and osteoarthritis using gas



- chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Metabolomics*, 2022, 18(7): 48. doi:10.1007/s11306-022-01893-9.
- [14] Clayton S A, MacDonald L, Kurowska-Stolarska M, et al. Mitochondria as key players in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 673916. doi:10.3389/fimmu.2021.673916.
- [15] Li Q, Wei S, Wu D, et al. Urinary metabolomics study of patients with gout using gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3461572. doi:10.1155/2018/3461572.

## Microbiomes combined with metabolomics reveals the changes of microbial and metabolic profile of articular cavity effusion in rheumatoid arthritis, urarthritis and osteoarthritis patients

Yi Hanzhi<sup>1</sup>, Ma Wukai<sup>1,2</sup>, Wang Minhui<sup>1</sup>, Huang Chunxia<sup>1</sup>, Gu Guangzhao<sup>1,2</sup>, Zhu Dan<sup>1</sup>, Li Hufan<sup>1</sup>, Liu Can<sup>1,2</sup>, Tang Fang<sup>1,2</sup>, Yao Xueming<sup>1,2</sup>, Sun Liping<sup>1,2</sup>, Wang Nan<sup>1,2</sup>, Chen Changming<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550002;

<sup>2</sup>Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550001)

**Abstract Objective** To investigate the changes of microorganisms and metabolites in joint effusion of patients with Rheumatoid arthritis (RA), Osteoarthritis (OA) and Urarthritis (UA). To provide new ideas for the study of the effect of microbiota on the pathogenesis of arthritis. **Methods** Joint effusion samples were collected from 20 patients with RA, 20 patients with OA, and 20 patients with UA. 16S rRNA gene sequencing and untargeted ultra-high performance Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) were used to explore the differences in microorganisms and metabolites among the three groups. Pearson correlation analysis was used to detect the correlation between effusion microbiota and metabolites. **Results** There were differences in microbial diversity and microbiota composition among the three groups. Combined with VIP >1 from OPLS-DA and  $P < 0.05$  from two-tailed Students t-test, 45 differential metabolites (Between RA and OA groups), 38 differential metabolites (Between UA and OA groups) and 16 differential metabolites (Between RA and UA groups), were identified. GO analysis and KEGG pathway analysis showed that the differential metabolic pathways among the three groups were mainly concentrated in citric acid cycle (TCA cycle), nucleotide metabolism, amino acid metabolism and glycolysis pathway. Correlation analysis of joint effusion microbiota and metabolites suggested that bacteria enriched in the three groups of joint effusion, such as *Prevotella*, *Clostridium ruminosus*, *Prevotellaceae\_UCG-001*, were related to many key metabolites such as lysozyme, uric acid, glucose, and L-glutamine. **Conclusion** This study shows that there are a variety of bacterial flora in joint cavity effusion of RA, OA, and UA patients, and the differential metabolites produced by them are involved in the pathogenesis of the three types of arthritis by affecting a variety of metabolic pathways.

**Key words** rheumatoid arthritis; osteoarthritis; urarthritis; joint cavity effusion; microorganism; metabolomics

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82260894); PhD research project of the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (No. GZEYK-B[2021] No. 2); Scientific and Technological Project of Guizhou Province (No. Guizhou Provincial Platform and Talent Program [2020] No. 2202); Key Laboratory Project in Universities of Guizhou Province (No. Qianjiaoji [2023] No. 017); National and Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Cultivation Project of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (No. Guizhou University of Traditional Chinese Innovative talent team cultivation project [2022] No. 004); Special Project of the State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine Co-built by the Ministry and Province (No. SZ2021ZZ0202)

**Corresponding author** Chen Changming, E-mail: dychangming\_chen@163.com