

· 临床研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.08.007

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240227.1744.028\(2024-02-28\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240227.1744.028(2024-02-28))

痛风石组织中巨噬细胞 BCAS3 和 RFX3 蛋白表达及意义*

董淑慧,徐瑾[△]

(天津市天津医院病理科,天津 300211)

[摘要] 目的 分析痛风石组织中巨噬细胞人类乳腺癌扩增序列 3(BCAS3)和调节因子 X3(RFX3)蛋白表达及意义。方法 收集 2019 年 4 月至 2022 年 12 月该院痛风石切除标本 30 例作为试验组,同期切除的关节置换术后滑膜增生伴有异物巨细胞反应的标本 25 例、脂肪坏死伴有巨噬细胞增生的标本 5 例作为对照组,对照组血尿酸均为正常水平。应用免疫组织化学法对所有标本行 CD68、CD163、BCAS3 和 RFX3 抗体染色,CD68 和 CD163 用于组织中巨噬细胞的定位,检测巨噬细胞中 BCAS3 和 RFX3 蛋白表达,分析两种抗体蛋白表达情况与年龄、性别、血尿酸的相关性,受试者工作特征(ROC)曲线评估二者对于痛风的诊断价值。结果 试验组 BCAS3、RFX3 蛋白表达明显高于对照组($P < 0.05$),对照组不同性别 BCAS3、RFX3 蛋白表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。试验组 BCAS3 蛋白表达与 RFX3 蛋白表达呈正相关($P < 0.05$)。试验组血尿酸与 BCAS3、RFX3 蛋白表达均呈正相关($P < 0.05$),对照组血尿酸与 BCAS3、RFX3 蛋白表达均不相关($P > 0.05$)。两组年龄与 BCAS3、RFX3 蛋白表达不相关($P > 0.05$)。RFX3 的曲线下面积(AUC)、灵敏度、特异度分别为 0.935、96.55%、86.67%,均高于 BCAS3 的 0.742、70.00%和 80.00%,RFX3 对于痛风有更高的诊断价值。结论 巨噬细胞高表达 BCAS3 和 RFX3 可能参与痛风的发病,二者可能存在某种协同促进作用,RFX3 对于痛风的诊断价值高于 BCAS3。

[关键词] 痛风;巨噬细胞;人类乳腺癌扩增序列 3;调节因子 X3

[中图分类号] R365

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2024)08-1157-05

Expression and significance of BCAS3 and RFX3 protein in macrophages of gout stone tissue*

DONG Shuhui, XU Jin[△]

(Department of Pathology, Tianjin Municipal Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the expression and significance of BCAS3 and RFX3 proteins in macrophages from gout stone tissues. **Methods** Thirty gout stone excision specimens in this hospital from April 2019 to December 2022 were collected as the experimental group, and during the same period 25 specimens of synovial hyperplasia accompanied by foreign body giant cell reaction after joint replacement and 5 specimens of fat necrosis accompanied by macrophage hyperplasia served as the control group. The blood uric acid level of the control group was normal. Immunohistochemical staining was applied to conduct CD68, CD163, BCAS3 and RFX3 antibodies staining in all specimens. CD68 and CD163 were used to locate macrophages in tissues. The expression levels of BCAS3 and RFX3 in macrophages were detected. The expressions of the two antibodies and their correlation with age, sex and blood uric acid level were analyzed. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of the both on gout. **Results** The expression levels of BCAS3 and RFX3 in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The BCAS3 and RFX3 protein expression levels in the control group had no statistical difference between the different sexes ($P > 0.05$). The expression level of BCAS3 protein in the experimental group was positively correlated with the RFX3 protein expression ($P < 0.05$); the uric acid level in the experimental group was positively correlated with the expression level of BCAS3 and RFX3 protein ($P < 0.05$). The blood uric acid level in the control group had no correlation with BCAS3 and RFX3 protein ($P > 0.05$). The age in the two groups had no correlation with the BCAS3 and RFX3 protein ($P > 0.05$). The area under the curve (AUC), sensitivity and specificity of RFX3 were 0.935, 96.55% and 86.67% respectively, which were higher

than 0.742, 70.00% and 80.00% of BCAS3. RFX3 had the higher diagnostic value for gout. **Conclusion** High expression of BCAS3 and RFX3 proteins in macrophages may participate in the pathogenesis of gout. There may be some synergistic promoting effect between the two. The diagnostic value of RFX3 for gout is higher than that of BCAS3.

[Key words] gout; macrophages; breast carcinoma amplified sequence 3; regulatory factor X3

痛风是一组由于长期嘌呤代谢紊乱导致的以单钠尿酸盐晶体沉积为特征的疾病,以痛风性关节炎最为常见,其特征是血尿酸升高导致尿酸盐晶体沉积在关节腔、软骨、滑膜及周围组织,引起局部关节突发疼痛、红肿,反复发作可引起关节僵硬、变形,严重影响生活质量。痛风还可诱发痛风石、痛风性眼病、痛风性心脏病。临床资料显示,痛风还与脑血管疾病、代谢综合征、糖尿病、肾脏疾病等有着密不可分的联系,与其他合并症一起,可以使患者的预期寿命总体下降^[1-3]。近年来,由于我国经济水平的提高和人们饮食结构的改变,痛风的发病率明显升高,患病率为 0.03%~10.47%^[4];高尿酸血症的发病还有明显年轻化的趋势^[5]。目前高尿酸血症和痛风在我国已成为一种常见的代谢性疾病。

目前认为遗传、炎症及免疫因素参与了痛风的发病^[6],遗传因素是主要因素。我国汉族人群的首个大样本量全基因组关联分析(GWAS)显示,人类乳腺癌扩增序列 3(BCAS3)和调节因子 X3(RFX3)是我国人群特有的痛风易感基因^[7]。单核巨噬细胞是参与痛风发病的主要炎症细胞^[8],是痛风石中数量最多的细胞。因此,本研究选择手术切除的痛风石标本,应用免疫组织化学方法检测痛风石中巨噬细胞的 BCAS3 和 RFX3 蛋白表达情况,分析两种蛋白参与痛风的发病机制和对于痛风的诊断价值,以期为临床预防、诊断和治疗痛风筛选靶向药物提供相关依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2019 年 4 月至 2022 年 12 月本院痛风石切除标本 30 例为试验组,均为男性,年龄(45.73±17.63)岁,血尿酸(577.04±145.89)μmol/L。同期切除的关节置换术后滑膜增生伴有异物巨细胞反应的标本 25 例、脂肪坏死伴有巨噬细胞增生的标本 5 例作为对照组,其中男 16 例,年龄(57.44±17.60)岁,血尿酸(343.92±104.93)μmol/L,女 14 例,年龄(60.86±15.41)岁,血尿酸(273.15±75.68)μmol/L。纳入标准:(1)依据 2013 年中华医学会内分泌学分会《高尿酸血症和痛风治疗的专家共识》标准^[9],试验组患者空腹血尿酸均>420 μmol/L;(2)痛风石标本均经组织印片偏光显微镜检确认尿酸盐晶体的存在,见图 1。排除标准:(1)具有类似表现的假痛风、类风湿关节炎等;(2)对照组患高尿酸血症(男性空腹血尿酸>420 μmol/L,女性>360 μmol/L)、高血压、冠心病、糖尿病、肿瘤等。

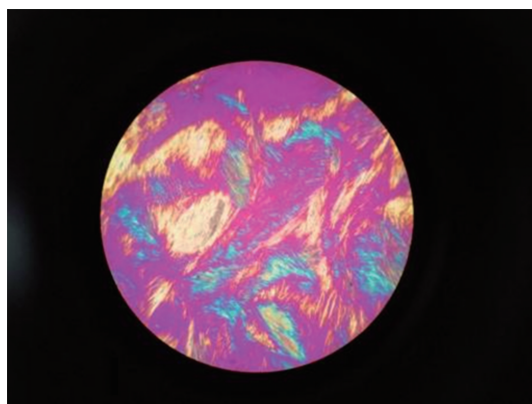


图 1 偏光显微镜下尿酸盐晶体(100×)

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂

LEICA 全自动免疫组织化学染色机,BCAS3 单克隆抗体(克隆号 DF9291)、RFX3 多克隆抗体(克隆号 ZC-4066)浓缩液购自上海茁叶生物科技有限公司;CD68、CD163 抗体工作液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组织化学染色

将标本行 3 μm 挂胶切片,60℃烤箱烘烤 2 h,在 LEICA 全自动免疫组织化学染色机上进行染色,常规脱水、透明、封片后镜检。CD68、CD163 抗体为工作液;浓缩液按照使用说明书适度稀释,BCAS3 抗体稀释浓度为 1:100,RFX3 抗体稀释浓度为 1:150。人肾脏组织和脑组织作为阳性对照,同时采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 评分判断标准

CD68、CD163 定位于巨噬细胞的细胞质,对二者定位的细胞进行 BCAS3 和 RFX3 的染色结果判读,阳性的标准定为棕褐色、棕黄色与黄色颗粒状着色。根据巨噬细胞的染色强度和阳性细胞所占比例进行评分。颜色越深则分数越高,棕褐色、棕黄色、黄色分别记为 3、2、1 分,没有着色记 0 分;在巨噬细胞密集区随机观察 5 个高倍视野(400×),在每个视野中计数 100 个巨噬细胞,一共计数 500 个巨噬细胞,阳性细胞所占比例≤5%、>5%~25%、>25%~50%、>50%~75%和>75%分别记为 0、1、2、3 和 4 分。两种评分结果相加为最终得分。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。Pearson 进行相关性分析,受试者工作特征(ROC)曲线分析相关参数的诊断效能。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各个抗体的细胞定位情况

CD68、CD163 均定位于巨噬细胞的细胞质,多核巨噬细胞多表达 CD68(图 2),单核巨噬细胞多表达 CD163(图 3),二者相互补充标示出组织中的巨噬细胞。BCAS3 定位于巨噬细胞的细胞核和细胞质(图 4),而 RFX3 主要定位于细胞质(图 5)。

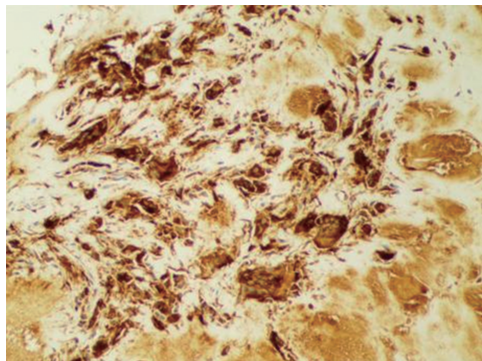


图 2 痛风石中巨噬细胞表达 CD68(200×)

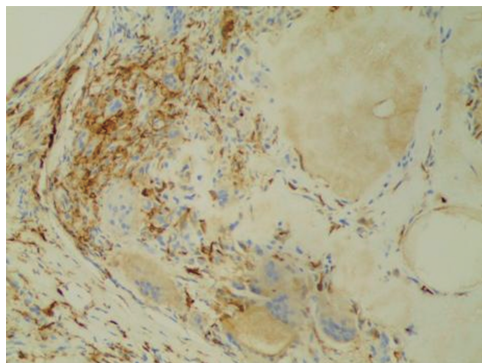


图 3 痛风石中巨噬细胞表达 CD163(200×)

2.2 BCAS3、RFX3 蛋白表达情况及相关性分析

试验组 BCAS3、RFX3 蛋白表达明显高于对照组 ($t=3.036, 8.617, P=0.004, 0.001$),对照组不同性别 BCAS3、RFX3 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($t=0.158, 0.882, P=0.876, 0.386$),见表 1。

试验组 BCAS3 蛋白表达与 RFX3 蛋白表达呈正相关 ($r=0.539, P=0.002$)。试验组血尿酸与 BCAS3、RFX3 蛋白表达均呈正相关 ($P<0.05$),对照组血尿酸与 BCAS3、RFX3 蛋白表达不相关 ($P>0.05$)。两组年龄与 BCAS3、RFX3 蛋白表达不相关 ($P>0.05$),见表 2。

表 1 两组 BCAS3、RFX3 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BCAS3	RFX3
对照组(男性)	16	4.71±0.86	0.74±0.80
对照组(女性)	14	4.76±0.92	1.02±0.95
试验组	30	5.43±0.92	2.73±0.79

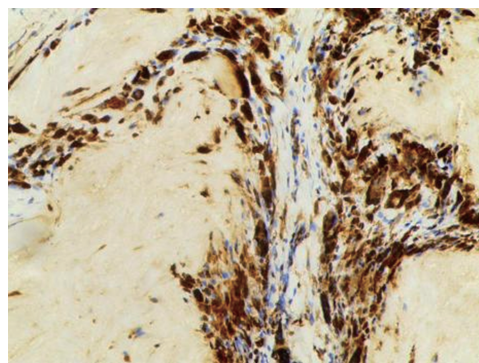


图 4 痛风石中巨噬细胞表达 BCAS3(200×)

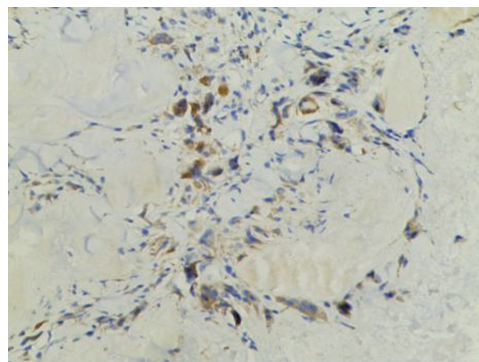


图 5 痛风石中巨噬细胞表达 RFX3(200×)

表 2 血尿酸、年龄与 BCAS3 和 RFX3 的相关性分析

项目	试验组血尿酸		对照组血尿酸		试验组年龄		对照组年龄	
	r	P	r	P	r	P	r	P
BCAS3	0.417	0.034	-0.199	0.329	0.122	0.522	0.205	0.277
RFX3	0.524	0.001	-0.116	0.574	-0.129	0.504	0.103	0.589

2.3 BCAS3、RFX3 对痛风的诊断效能

RFX3 的曲线下面积(AUC)、灵敏度、特异度分别为 0.935、96.55%、86.67%,均高于 BCAS3 的

0.742、70.00%和 80.00%,说明 RFX3 对于痛风有更高的诊断价值,见表 3、图 6。

表 3 BCAS3 和 RFX3 对痛风的诊断效能

项目	AUC	95%CI	P	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数	截断值
BCAS3	0.742	0.612~0.846	<0.001	70.00	80.00	0.500	5.30
RFX3	0.935	0.839~0.983	<0.001	96.55	86.67	0.832	1.80

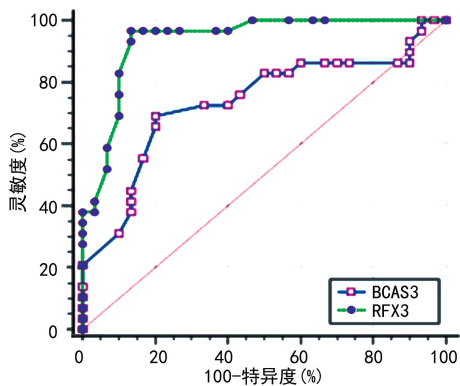


图6 ROC曲线分析

3 讨论

BCAS3 位于染色体 17q23, 全长 600 kb, 含有 24 个外显子, 能够编码 913 个氨基酸, 是一种细胞骨架蛋白, 最早在乳腺癌组织中被发现过表达^[10]。随着研究的深入, BCAS3 被认为和多种疾病相关, 如脑肿瘤、肾脏疾病和原发性开角型青光眼等。LI 等^[11]发现, BCAS3 的 3 个单核苷酸基因位点 (rs9895661、rs9905274 和 rs11653176) 的多态性与我国汉族男性人群的痛风相关联。赵会文^[12]研究发现, BCAS3 单核苷酸基因多态性可能与我国沿海地区汉族男性人群的痛风易感性相关。痛风急性期和缓解期患者的外周血单个核细胞中 BCAS3 mRNA 表达均较健康人群明显升高 ($P < 0.05$), 推测 rs9905274 和 rs11653176 两个位点的单核苷酸多态性可能会影响 BCAS3 的表达从而调节单核细胞的功能, 进而促进白细胞介素 (IL)-1 β 等炎症因子的释放, 导致痛风的发生。

本研究发现, 试验组 BCAS3 蛋白表达明显高于对照组, 说明 BCAS3 蛋白表达上调能够调节巨噬细胞的功能来参与痛风的发病。JOSHI 等^[13]研究发现, BCAS3 作为一种细胞骨架蛋白, 通过偶联微管、中间丝, 能够促进血管发育过程中内皮细胞的迁移。据此, 推测 BCAS3 也可能通过调节巨噬细胞的迁移能力来参与痛风的发病。作为一种炎症性疾病, 痛风的发病过程涉及巨噬细胞的极化和焦亡现象。在痛风的急性期巨噬细胞倾向于向 M1 型极化, 释放促炎因子, 导致剧烈的炎症反应; 而在痛风的缓解期, 巨噬细胞倾向于向 M2 型极化, 抑制炎症的发展和促进炎症的消退, 这可部分解释痛风发作的“自限性”^[14]。细胞焦亡是一种细胞程序性死亡方式, 通过细胞肿胀并破坏细胞膜的完整性, 造成细胞穿孔, 细胞内代谢产物和炎症因子释放, 产生并扩大炎症反应, 是一种促炎程序性死亡。研究表明, 抑制巨噬细胞焦亡可以减少活化的 IL-1 β 释放, 从而缓解痛风的炎症反应^[15]。巨噬细胞的极化和焦亡过程均涉及很多细胞因子和传导通路, 细胞骨架蛋白也必不可少地参与其中。作为一种细胞骨架蛋白的 BCAS3 是否在痛风发生的不同阶段通过调节巨噬细胞的极化和焦亡来参与痛风

的发病还有待进一步的研究。

RFX3 是纤毛形成和功能调节的关键性转录因子之一。纤毛是存在于大多数脊椎动物细胞表面的保守细胞器, 能够感知对于细胞增殖、分化、极性调节和组织动态平衡至关重要的各种细胞外信号^[16-17]。本研究发现, 试验组 RFX3 蛋白表达高于对照组 ($P < 0.05$), 说明巨噬细胞通过高表达 RFX3 参与痛风的发病。巨噬细胞在免疫系统中发挥着重要作用, 包括感知和吞噬异物、提呈抗原、释放促炎因子、招募炎症细胞等^[18]。这些功能的实现很大程度上依赖于对肌动蛋白的调控^[19]。肌动蛋白细胞骨架是一个高度平衡的动态网络系统, 参与如细胞迁移和膜运输等重要的生物学过程, 其基本功能是通过聚合作用来改变脂膜的结构^[20]。其中重要的一员是生长的肌动蛋白细丝 (F-actin), 其有助于维持细胞形状, 建立和维持与细胞运动相关的膜突起, 促进囊泡的运输^[21]。这些复杂的细胞功能的实现需要对 F-actin 的产生、稳定和周转进行精密的时间和空间调节。有研究表明, 分枝的 F-actin 对纤毛的形成有抑制作用^[22]。

李脉超^[23]发现巨噬细胞特异性 RFX3 基因敲除小鼠的巨噬细胞黏着斑增大, 足小体增多, F-actin 荧光强度增加, 迁移能力增强, 提示 RFX3 基因可能是通过促进 F-actin 的产生从而抑制纤毛形成, 改变巨噬细胞的迁移能力。同时, 尿酸盐介导的腹膜炎模型中条件性敲除 RFX3 小鼠腹腔灌洗液中 IL-1 β 水平较对照组有明显下降, 表明敲除 RFX3 基因后, 炎症情况有所改善, RFX3 在痛风的发病过程中具有促炎的作用^[23]。这一研究部分解释了 RFX3 参与痛风的发病机制。

本研究发现, 试验组 BCAS3 蛋白表达与 RFX3 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.539, P = 0.002$), 说明二者在痛风的发病过程中可能具有一定的协同作用。虽然是比较弱的正相关, 但二者都具有明确的促炎作用, 均促进了痛风的发病。二者具体的相互关系和作用机制, 需待相关通路研究清晰后确定。同时, 试验组血尿酸与 BCAS3、RFX3 蛋白表达均呈正相关 ($P < 0.05$), 且 RFX3 的相关系数更高。由此推测, 从遗传因素方面, 对于高尿酸血症和痛风的发生, RFX3 可能起到比 BCAS3 更为重要的作用。

ROC 曲线分析显示, RFX3 对于痛风具有较高的诊断价值 (AUC、灵敏度和特异度分别为 0.935、96.55% 和 86.67%), 说明巨噬细胞中 RFX3 在痛风发生过程中所起的作用较 BCAS3 更明显。对于缺乏临床症状而组织中发现可疑结晶沉积的患者, BCAS3 和 RFX3 在巨噬细胞中的高表达 (> 5.30 和 > 1.80) 提示痛风的可能, 为临床诊断不典型痛风提供了新的途径。

综上所述, 痛风石中巨噬细胞通过高表达 BCAS3 和 RFX3 参与痛风的发生。BCAS3 可能是通过促进

IL-1 β 等炎性因子的表达和释放等方面参与痛风的发生,而 RFX3 可能是通过改变巨噬细胞的迁移能力并通过促炎作用参与痛风的发病,在痛风的发生过程中二者可能具有一定的协同促进作用。RFX3 可能起到比 BCAS3 更为重要的作用,并且二者在巨噬细胞中的高表达对于痛风具有较高的诊断价值,为临床诊断不典型的痛风 and 开发治疗痛风的靶向药物提供了理论依据。其中涉及的具体通路和相关蛋白还需要进一步的研究证实。

参考文献

- [1] CHOI H K, FORD E S, LI C, et al. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout; the Third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 57(1):109-115.
- [2] KRISHNAN E, BAKER J F, FURST D E, et al. Gout and the risk of acute myocardial infarction[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8):2688-2696.
- [3] CHOI H K, CURHAN G. Independent impact of gout on mortality and risk for coronary heart disease[J]. *Circulation*, 2007, 116(8):894-900.
- [4] 杨丽华, 刘晓丽, 蒋雅琼, 等. 我国痛风的患病率及危险因素[J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(12):4-6, 10.
- [5] 王靖宇, 常宝成. 高尿酸血症/痛风流行病学特点及危险因素[J]. *内分泌代谢杂志*, 2016, 36(2):78-81.
- [6] SULEM P, GUDBJARTSSON D F, WALTERS G B, et al. Identification of low-frequency variants associated with gout and serum uric acid levels[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(11):1127-1130.
- [7] LI C, LI Z, LIU S, et al. Genome-wide association analysis identifies three new risk loci for gout arthritis in Han Chinese [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7041.
- [8] EA H K. Mechanisms of gout inflammation[J]. *Presse Med*, 2011, 40(9 Pt 1):836-843.
- [9] 中华医学会内分泌学分会. 高尿酸血症和痛风治疗的中国专家共识[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29(11):913-920.
- [10] BARLUND M, MONNI O, WEAVER J D, et al. Cloning of BCAS3 (17q23) and BCAS4 (20q13) genes that undergo amplification, overexpression, and fusion in breast cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002, 35(4):311-317.
- [11] LI Z, ZHOU Z, HOU X, et al. Replication of gout/urate concentrations GWAS susceptibility loci associated with gout in a Han Chinese population[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):4094.
- [12] 赵会文. 原发性痛风易感基因 BCAS3 的单核苷酸多态性功能研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
- [13] JOSHI D, INAMDAR M S. Rudhira/BCAS3 couples microtubules and intermediate filaments to promote cell migration for angiogenic remodeling[J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(12):1437-1450.
- [14] ARDURA J A, RACKOV G, IZQUIERDO E, et al. Targeting macrophages: friends or foes in disease? [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1255.
- [15] HE W T, WAN H, HU L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 secretion [J]. *Cell Res*, 2015, 25(12):1285-1298.
- [16] EZRATTY E J, STOKES N, CHAI S, et al. A role for the primary cilium in Notch signaling and epidermal differentiation during skin development[J]. *Cell*, 2011, 145(7):1129-1141.
- [17] PHUA S C, CHIBA S, SUZUKI M, et al. Dynamic remodeling of membrane composition drives cell cycle through primary cilia excision [J]. *Cell*, 2017, 168(1/2):264-279.
- [18] PRICE J V, VANCE R E. The macrophage paradox[J]. *Immunity*, 2014, 41(5):685-693.
- [19] ROUGERIE P, MISKOLCI V, COX D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton[J]. *Immunol Rev*, 2013, 256(1):222-239.
- [20] LEMIÈRE J, VALENTINO F, CAMPILLO C, et al. How cellular membrane properties are affected by the actin cytoskeleton[J]. *Biochimie*, 2016, 130:33-40.
- [21] SVITKINA T M. Ultrastructure of protrusive actin filament arrays[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(5):574-581.
- [22] YAN X, ZHU X. Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(2):147-151.
- [23] 李脉超. 痛风易感基因 RFX3 条件性敲除小鼠构建及其调控炎症机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.