

研究论文

破骨细胞胞外陷阱在类风湿性关节炎致病机制中的作用

周宏 安雅男 倪丽慧 徐红月 马方雪 王超 李媛 梁俊超 于录*

(吉林大学动物医学学院, 人兽共患病研究所, 长春 130062)

摘要 该文主要分析了破骨细胞(osteoclasts, OCs)释放胞外陷阱(extracellular traps, ETs)的机制。利用免疫荧光、扫描电镜及免疫印迹等技术探究经II型胶原(type II collagen, CII)和佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(phorbolmyristate 13-acetate, PMA)分别处理的破骨细胞导致胞外陷阱形成机理。结果表明, CII和PMA均能够引起破骨细胞胞外陷阱的形成, PMA诱导产生的是NOX依赖性胞外陷阱, 而CII诱导产生的是NOX非依赖性胞外陷阱; 结果还表明, II型胶原和PMA均通过AKT激活调控胞外陷阱的形成。总之, CII和PMA均可诱导破骨细胞形成胞外陷阱, 探究其产生机制可以为类风湿性关节炎的有效治疗奠定基础。

关键词 类风湿性关节炎; 破骨细胞; 胞外陷阱; 致病机制; HMGB1

The Role of Osteoclast Extracellular Traps in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis

ZHOU Hong, AN Yanan, NI Lihui, XU Hongyue, MA Fangxue, WANG Chao, LI Yuan, LIANG Junchao, YU Lu*

(Institute of Zoonosis, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract This paper mainly analyzes the mechanism of ETs (extracellular traps) released by OCs (osteoclasts). Immunofluorescence, scanning electron microscopy and immunoblotting techniques were used to investigate the mechanism of ETs formation caused by treatment of osteoblasts with CII (type II collagen) and PMA (phorbolmyristate 13-acetate), respectively. The results showed that both CII and PMA were able to induce the formation of OETs (osteoclast ETs). PMA induced the production of NOX-dependent ETs, while CII induced the production of NOX non-dependent ETs. The results also suggested that CII and PMA regulated the production of ETs through AKT activation. In conclusion, CII and PMA can induce the formation of ETs by osteoblasts. Investigating the mechanism of ETs production can lay the foundation for effective treatment of rheumatoid arthritis.

Keywords rheumatoid arthritis; osteoblasts; extracellular traps; pathogenesis; HMGB1

类风湿性关节炎(rheumatic arthritis, RA)是一种慢性、系统性的自身免疫性疾病。RA的影响范围很广, 发生在全世界约1%的人口[1-3]。RA发病的

主要原因是滑膜组织及滑膜液内聚集大量免疫细胞(如T细胞、B细胞、巨噬细胞等)及其释放的多种免疫分子(如细胞因子、自身抗体等), 从而诱导破骨细

收稿日期: 2021-04-01 接受日期: 2021-05-07

国家重点研发计划项目(批准号: 2016YFD0501302、2017YFD0502200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 19910769153, E-mail: yu_lu@jlu.edu.cn

Received: April 1, 2021 Accepted: May 7, 2021

This work was supported by National Key Research and Development Program (Grant No.2016YFD0501302, 2017YFD0502200)

*Corresponding author. Tel: +86-19910769153, E-mail: yu_lu@jlu.edu.cn

胞活化,进而侵蚀关节软骨及软骨下骨,最终导致患者关节的炎症和关节功能丧失,造成残疾,并引发相关的心理困扰、经济和社会负担^[4-5]。目前,大多数新药和新的治疗策略侧重于抑制滑膜炎^[6],然而,这样的治疗并不能充分修复受损的骨质,也不能完全解决疼痛的困扰、减少残疾的发生或降低心血管疾病的风险^[7-9]。因此,了解破骨细胞发展的基本机制对治愈RA具有重要意义。

破骨细胞(osteoclasts, OCs)是主要的骨吸收细胞,来源于骨髓特定的破骨细胞前体(osteoclast precursors, OCPs)的活化。OCPs通常存在于血液和骨髓腔中,在多种细胞因子的作用下,OCPs聚集并分化形成破骨细胞^[10-11]。RANKL是肿瘤坏死因子家族成员之一,由成骨细胞系、T细胞、B细胞以及RA患者滑膜细胞分泌。OCPs通过经典途径RANK与RANKL结合后导致转录因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)释放入核,启动一系列信号通路,最终诱导分化成功能齐全的OCs^[12-13]。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)是多效性的造血细胞生长因子,与其受体c-Fms均分布于RA患者的血浆及关节滑液中^[14-16]。由于免疫系统紊乱,T细胞识别关节组织中的特异性抗原而分泌M-CSF。M-CSF结合前体破骨细胞受体,为其增殖提供必要的信号,同时还可增强RANK在破骨细胞前体细胞膜上的表达,激活RANKL下游的胞内信号转导途径,在RA的发病机制中发挥重要作用^[17-18]。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box1, HMGB1)是一种促炎性细胞因子,存在于所有哺乳动物真核细胞中。HMGB1是一种保守的单多肽,通过调节RANKL的表达进而影响破骨细胞的生成^[19]。HMGB1在RA的发病机制中发挥关键作用^[20],所以血清或关节滑液中的HMGB1异常增多可作为RA发生的标志^[21]。因此,OCs的异常活化与增生在RA病变中有重要作用^[22]。

先天性免疫细胞胞外陷阱(extracellular traps, ETs)也叫胞外诱捕网,是一种利用自身DNA和多种分泌的颗粒蛋白组成的纤维状结构^[3,23-24],其组成成分为细胞外DNA(extracellular DNA, eDNA)、弹性酶、组蛋白H3和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)^[25-26]。ETs广泛存在于脊椎动物甚至是无脊椎动物的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞和单核细胞/巨噬细胞中,由细菌、真菌、病毒和

原虫等病原微生物刺激产生,用于限制病原微生物在体内扩散,并通过高浓度毒性蛋白将其杀伤,目前也有研究表明,诱导剂如佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(phorbolmyristate 13-acetate, PMA)也可刺激ETs的产生^[27-28]。ETs的形成是一种ETosis的细胞死亡程序,不同于其他种类的细胞死亡^[29]。ETs是一种非吞噬依赖的先天性免疫胞外防御机制,最早被报道为中性粒细胞中的一种新型抗菌机制^[3,23-24]。有报道指出,活性氧族(reactive oxygen species, ROS)的产生和AKT、ERK的磷酸化诱导是ETs形成的最重要途径^[30]。此外,ETs也参与了诸多自身免疫疾病如血管疾病、肾小球肾炎、慢性肺病^[28],以及类风湿性关节炎等^[29,31]的产生。因此,本研究旨在阐明II型胶原(type II collagen, CII)和PMA能否诱导破骨细胞产生胞外陷阱,以及其发生的主要途径,同时也对诱导OETs(osteoclast extracellular traps)产生的相关机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6小鼠,6~8周龄,雄性,购于长春亿斯实验动物有限公司。所有动物实验均获得吉林大学伦理委员会审查批准。

1.2 主要试剂

TRAP染色试剂盒、CII、PMA均由美国Sigma-Aldrich公司提供;硫酸链霉素、青霉素、 α -MEM培养基均由美国Gibco公司提供;Ac-YVAD-cmk、DPI均由美国MCE公司提供;胎牛血清由以色列BI公司提供;用于Western blot和免疫荧光的主要抗体(抗HMGB1抗体、抗TNF- α 抗体、抗IL-1 β 抗体、抗IL-6抗体)均由美国Cell Signaling Technology公司提供;HRP标记山羊抗兔/抗鼠IgG、BCA蛋白浓度测定试剂盒均由北京碧云天科技有限公司提供;骨组织提取蛋白试剂盒由上海贝博生物科技有限公司提供;免疫荧光二抗由美国Biolegend公司提供;PVDF膜由美国Millipore公司提供;Hoechst 33342、20 μ mol/L Sytox green、Sytox orange均由美国Invitrogen公司提供;M-CSF、RANKL均由美国Perprotech公司提供;其他化学试剂均由北京索莱宝科技有限公司提供。

1.3 主要仪器

恒温培养箱由美国Thermo Fisher Scientific公司提供;全自动酶标仪由奥地利TECAN公司提供;低

温高速离心机由德国Beckman公司提供; 垂直电泳槽、湿法转膜仪均由北京君意东方电泳设备有限公司提供; 电泳仪由美国Bio-Rad公司提供; 水平摇床由北京鼎国昌盛公司提供; 化学发光成像系统由美国DNR公司提供; 激光共聚焦显微镜、倒置显微镜均由日本OLYMPUS公司提供。

1.4 破骨细胞的分离培养

1.4.1 骨髓巨噬细胞的分离和纯化 取2个烧杯分别装入不同量75%乙醇。对小鼠实施安乐死, 并放入放入有75%乙醇的大烧杯中浸泡杀菌10 min后, 放入超净工作台中备用, 在超净工作台中, 剪下小鼠的腿骨, 并用剪刀镊子剔除小鼠腿骨上的肌肉, 将已经剥离的大腿骨放入含有PBS的平皿中, 然后去除腿骨上的肌肉和软骨组织, 并将小鼠的股骨和胫骨进行分离, 在分离的过程中必须保证骨髓腔是完整的, 之后将分离好的股骨和胫骨放入另一个含有PBS的平皿中。然后用剪刀剪掉分离的股骨和胫骨的两端, 将骨髓腔完全暴露出来, 用1 mL注射器吸入含有10% FBS的 α -MEM培养基将骨髓腔充分冲洗, 直至骨髓腔变为白色。将所得细胞悬液反复吹打混匀后, 放入离心管中, 置于离心机中1 500 r/min离心5 min, 将上清弃掉后收集细胞沉淀。然后用适量 α -MEM完全培养基将细胞重悬, 放入到平皿中, 放于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中孵育24 h。将未贴壁的细胞进行收集并离心, 收集细胞沉淀, 所得细胞即骨髓巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMMs)。将所得的细胞团块沉淀用添加有20 ng/mL小鼠重组M-CSF的 α -MEM完全培养基进行重悬, 对细胞进行计数并放入到6孔细胞培养板中, 置于5% CO₂、37 °C细胞培养箱中培养48 h。最后去掉悬浮细胞, 得到进一步纯化的BMMs。

1.4.2 破骨细胞的诱导分化 将分离纯化后的BMMs放入含有10% FBS、额外加入20 ng/mL重组小鼠M-CSF和100 ng/mL重组小鼠RANKL的 α -MEM培养基于6孔板中, 在37 °C、5% CO₂细胞培养箱中孵育。培养过程中进行隔天半数换液, 在培养的第7天观察小鼠破骨细胞(多核的、大的、铺展的细胞)的形成情况, 并准备进行鉴定。

1.5 破骨细胞的鉴定——TRAP染色

取培养后的一部分细胞用胰酶进行消化后, 收集离心得到的细胞, 将适量的细胞加入预先加有小玻片的24孔板中, 待细胞完全贴壁后, 弃掉上清, 使

用PBS清洗细胞3次, 用2.5%戊二醛固定细胞10 min, 接下来用蒸馏水清洗细胞3次后, 根据TRAP试剂盒说明书进行溶液配制并染色, 用荧光显微镜进行观察并拍照。

1.6 免疫印迹分析

将稳定生长的OCs以 1×10^6 细胞/孔的密度接种于6孔细胞板中, 待细胞贴壁并且生长良好时, 设空白组, 不做任何处理; 实验组, 40 mg/mL CII或PMA对细胞进行37 °C孵育6 h; 10 μ mol/L ERK抑制剂U0126、AKT抑制剂LY294002、NOX抑制剂DPI处理1 h后, 再用40 mg/mL CII或PMA处理, 均于37 °C孵育6 h后, 收集细胞总蛋白。经BCA法测定总蛋白浓度后, 将相等量的蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 通过湿转法将蛋白转移到PVDF膜上。用TBST配制封闭液(5%脱脂奶粉、0.1% Tween-20和TBST), 将PVDF膜置于其中, 水平摇床摇晃常温封闭2 h。一抗(1:1 000稀释)4 °C孵育过夜, TBST洗3次, 每次10 min, 常温孵育二抗(1:2 000稀释)2 h, 再用TBST洗3次, 每次10 min。洗净之后的膜用ECL化学发光液常温孵育2~3 min后, 放入化学发光成像系统中进行图像采集。

1.7 免疫荧光染色

将破骨细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度铺板在24孔板里。设空白组, 不做任何处理; 实验组, NOX抑制剂DPI处理1 h后用40 mg/mL CII或PMA对细胞进行37 °C孵育6 h, 4%多聚甲醛在室温固定载玻片30 min, 2% BSAPBS溶液在室温下阻断30 min。使用PBS洗涤3次后, 将载玻片与单克隆一抗(1:200稀释)4 °C孵育过夜。使用PBS洗涤3次后, 用二抗(1:500稀释)在室温下孵育1 h。使用5 mg/mL Hoechst 33342和Sytox orange在室温下染色10 min; 使用激光共聚焦显微镜(CLSM, Olympus FluoView FV1000)观察结果。

1.8 eDNA定量检测

将铺板完成的细胞进行分组处理。分组情况及药物处理同免疫印迹分析所述。然后加入1 μ mol/L Sytox green室温避光染色15 min, 用荧光酶标仪在激发波长485 nm、吸收波长535 nm处测其吸光度值。

1.9 扫描电子显微镜(SEM)

将BMMs接种到铺有爬片的24孔板中, 在M-CSF和RANKL的诱导下培养4天, 使用CII(RA的诱导剂)、PMA(ETs生产的强效诱导剂)分别处理破骨细胞,

37 °C 孵育 6 h 后, 经 2.5% 戊二醛固定 2 h, 乙醇逐级脱水, 临界点干燥, 最后镀金膜, 并使用 JEOLJSM-7000F (Jeol, 日本 Akishima) 进行检测。

1.10 采用荧光酶标仪检测 ROS

取生长状态良好的细胞, 以 2×10^5 细胞/孔的密度接种于放有盖玻片的 24 孔板内, 细胞于培养箱中培养过夜。分组情况及药物处理同免疫印迹分析所述。之后所有细胞用 $1 \mu\text{mol/L}$ DHR123 于 37 °C 避光孵育 20 min。放入荧光酶标仪中检测激发波长在 488 nm、发射波长在 525 nm 处的吸光度值。

1.11 数据分析

使用 ImageJ 软件对免疫印迹结果灰度进行分析, Graph Pad Prism 5.0 对数据进行统计学分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CII 和 PMA 在体外诱导 OETs 形成

为了研究 OCs 是否可以释放 OETs, 我们首先用

M-CSF 刺激骨髓细胞与 RANKL 一起产生 OCs, 由于 TRAP 染色结果通常作为鉴定破骨细胞的重要指标, 因此使用 TRAP 染色鉴定 OCs。TRAP 染色结果显示, 破骨细胞酶活性部位呈红色, 分布于胞质内, 细胞核呈阴性 (图 1); 通过 SEM 对 OETs 观察并分析, 发现与未处理的细胞相比, CII 或 PMA 处理的 OCs 释放出更多的 eDNA 网 (即 OETs) (图 2)。

2.2 CII 和 PMA 诱导 OCs 形成 OETs 的机理

我们根据 DNA 染料 Hoechst 33342、Sytox orange 对细胞膜穿透性的不同, 将细胞内 DNA 与 eDNA 分别进行检测^[32]。实验结果表明, 相对于未使用抑制剂组, NOX 抑制剂 DPI 处理细胞可显著减少 PMA 诱导的 eDNA 的释放量 (图 3), 但 DPI 对 CII 诱导的 eDNA 释放影响不显著 (图 3)。这表明, PMA 诱导的是 NOX 依赖性 OETs, 而 CII 诱导的是 NOX 非依赖性 OETs。然后, 我们利用荧光指示剂二氢罗丹明 123 (DHR123) 来检测细胞质 ROS, 结果显示, 相比于对照组、DPI 处理组, PMA 处理过的

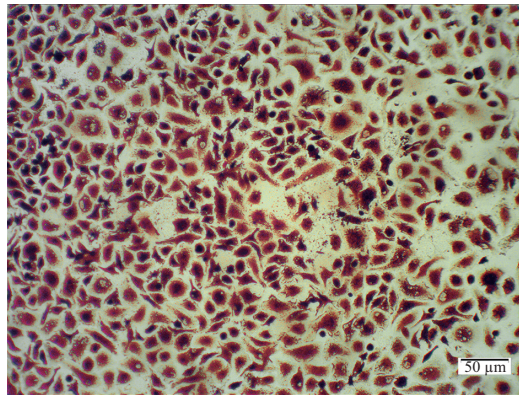
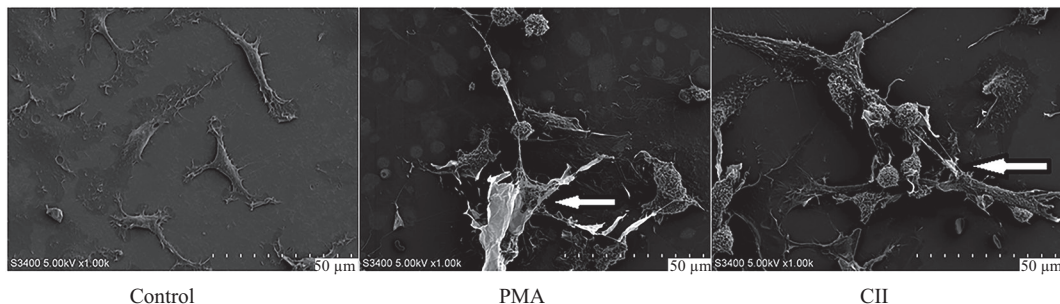


图1 破骨细胞的鉴定 (TRAP 染色)

Fig.1 Identification of osteoblasts (TRAP staining)



白色箭头所指处为破骨细胞产生的胞外陷阱。

The white arrows point to the extracellular traps produced by osteoblasts.

图2 扫描电镜下 CII 和 PMA 在体外诱导 OETs 形成的情况观察

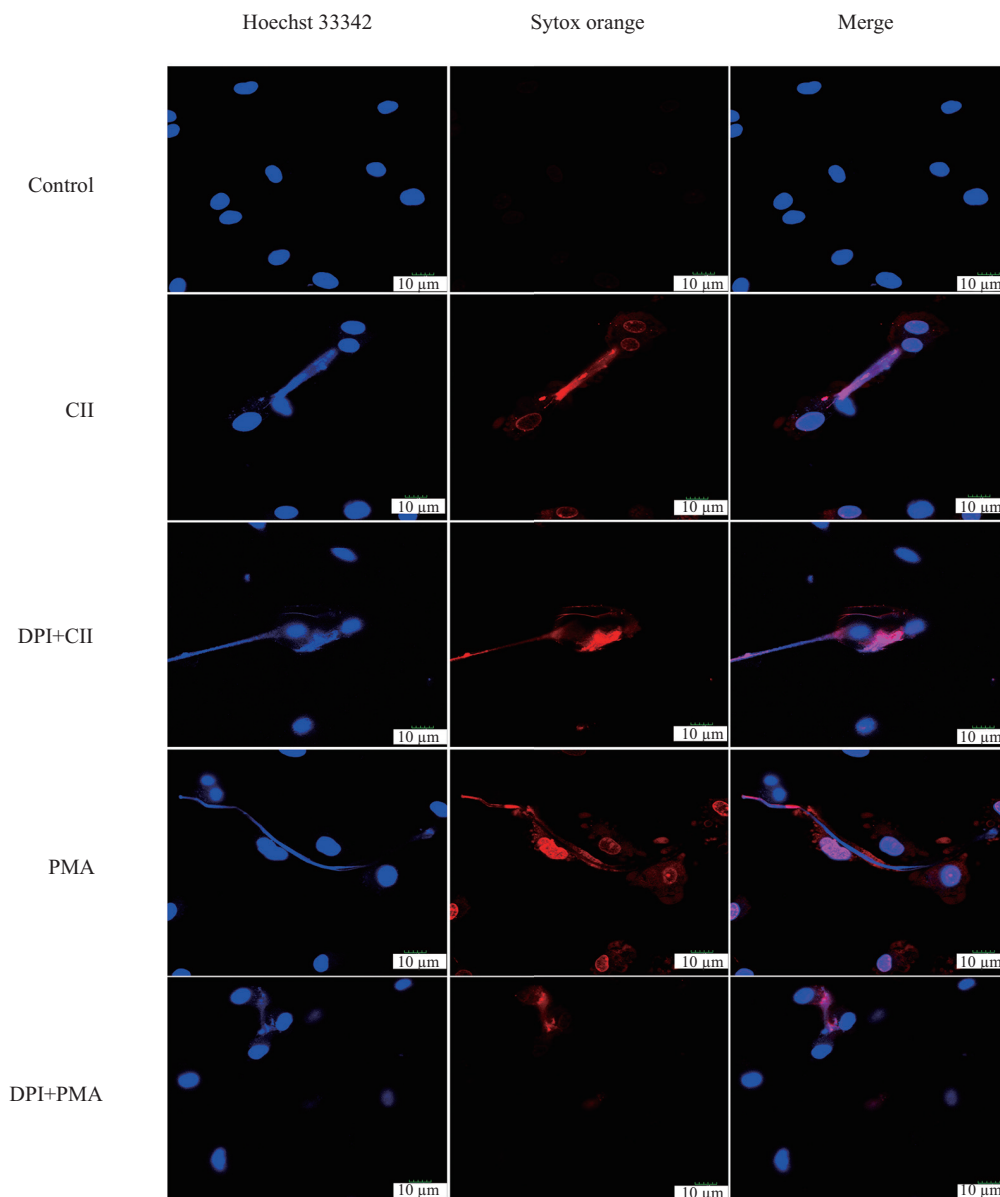
Fig.2 Scanning electron microscopic observation of CII- and PMA-induced OETs formation *in vitro*

OCs细胞质中产生大量的ROS($P<0.01$)(图4B), 而CII处理过的OCs相比于对照组、DPI处理组的细胞质中产生的ROS的含量几乎没有变化($P>0.05$)(图4A)。这些结果表明, PMA诱导产生的是NOX依赖性OETs, 而CII诱导产生的是NOX非依赖性OETs。

2.3 CII和PMA诱导OCs形成OETs的可能信号通路

我们通过使用多种抑制剂探究OETs形成的可能信号通路, 其中包括10 $\mu\text{mol/L}$ ERK抑制剂U0126、

AKT抑制剂LY294002、NOX抑制剂DPI。利用荧光酶标仪检测eDNA和ROS产生情况发现, PMA处理过的OCs相比于使用U0126、LY294002处理组的细胞质中产生的ROS几乎没有变化($P>0.05$)(图4B), 但PMA处理过的OCs相比于使用U0126、LY294002、DPI处理组产生大量eDNA($P<0.001$)(图5B)。这表明, 在PMA诱导OCs生成NOX依赖性OETs的过程中, 细胞质ROS的产生不受ERK和AKT抑制剂的影响, 证明AKT、ERK在细胞质ROS形成的下游, 并且表明NOX依赖性OETs是由AKT、ERK介导的。另外,



红色为eDNA, 蓝色为DNA。
Red is eDNA, and blue is DNA.

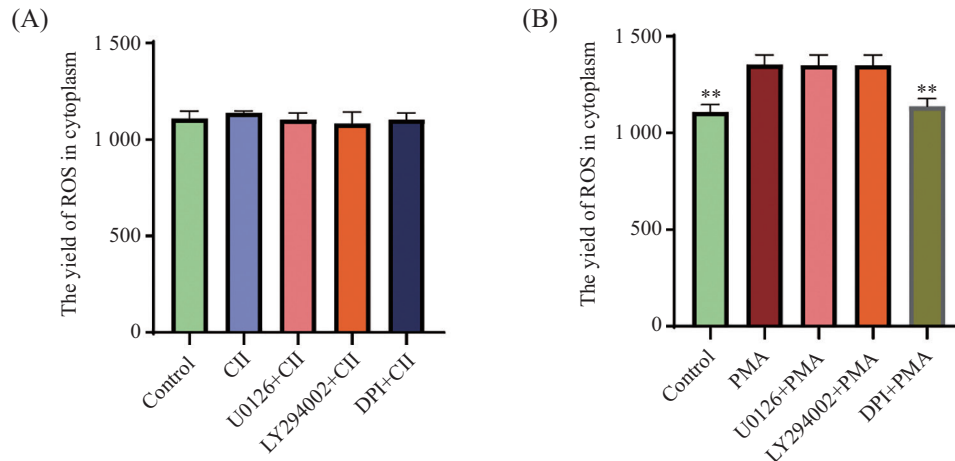
图3 激光共聚焦下观察CII和PMA分别诱导OCs产生eDNA的情况

Fig.3 Laser confocal observation of CII- and PMA-induced eDNA production by OCs respectively

CII处理过的OCs相比于使用LY294002处理组产生大量eDNA($P<0.001$)(图5A), 这表明NOX非依赖性OETs是由AKT介导的。

免疫印迹分析表明, PMA处理过的OCs相比于实验组ERK磷酸化水平极高($P<0.001$)(图6B和图6D), 这表明ERK激活是PMA诱导的OETs所必需的; DPI处理明显阻断了PMA诱导的ERK磷酸化(图6B和图

6D), 这再次表明, ERK的激活是在ROS生成的下游。PMA处理的OCs相比于实验组AKT磷酸化水平极高($P<0.001$)(图6B和图6F), 这再次表明, NOX依赖性信号通路需要AKT的激活。但CII处理的OCs相比于对照组和DPI处理组ERK磷酸化没有明显变化($P>0.05$), 而LY294002和U0126处理组均相比于CII处理组ERK磷酸化水平较低($P<0.01$, $P<0.001$)(图6A和图6C);

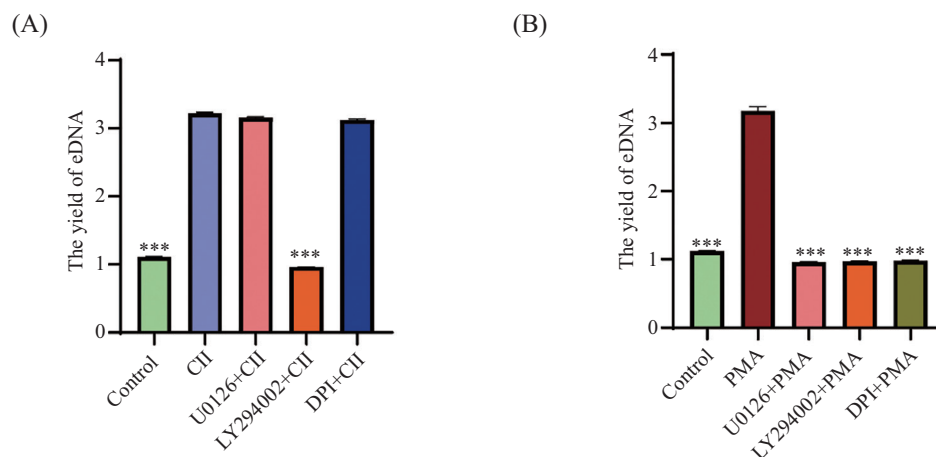


A: 荧光酶标仪检测CII、U0126+CII、LY294002+CII、DPI+CII处理的OCs中的ROS产量; B: 荧光酶标仪检测PMA、U0126+PMA、LY294002+PMA、DPI+PMA处理的OCs中的ROS产量。*** $P<0.01$, 与PMA组相比。

A: fluorescence detection of ROS yield of OCs with CII, U0126+CII, LY294002+CII, DPI+CII treatment; B: fluorescence detection of ROS yield of OCs with PMA, U0126+PMA, LY294002+PMA, DPI+PMA treatment. *** $P<0.01$ compared with the PMA group.

图4 荧光指示剂二氢罗丹明123(DHR123)检测细胞质中ROS的产量

Fig.4 Detection of the yield of ROS in cytoplasm by the fluorescent indicator dihydrorhodamine 123 (DHR123)

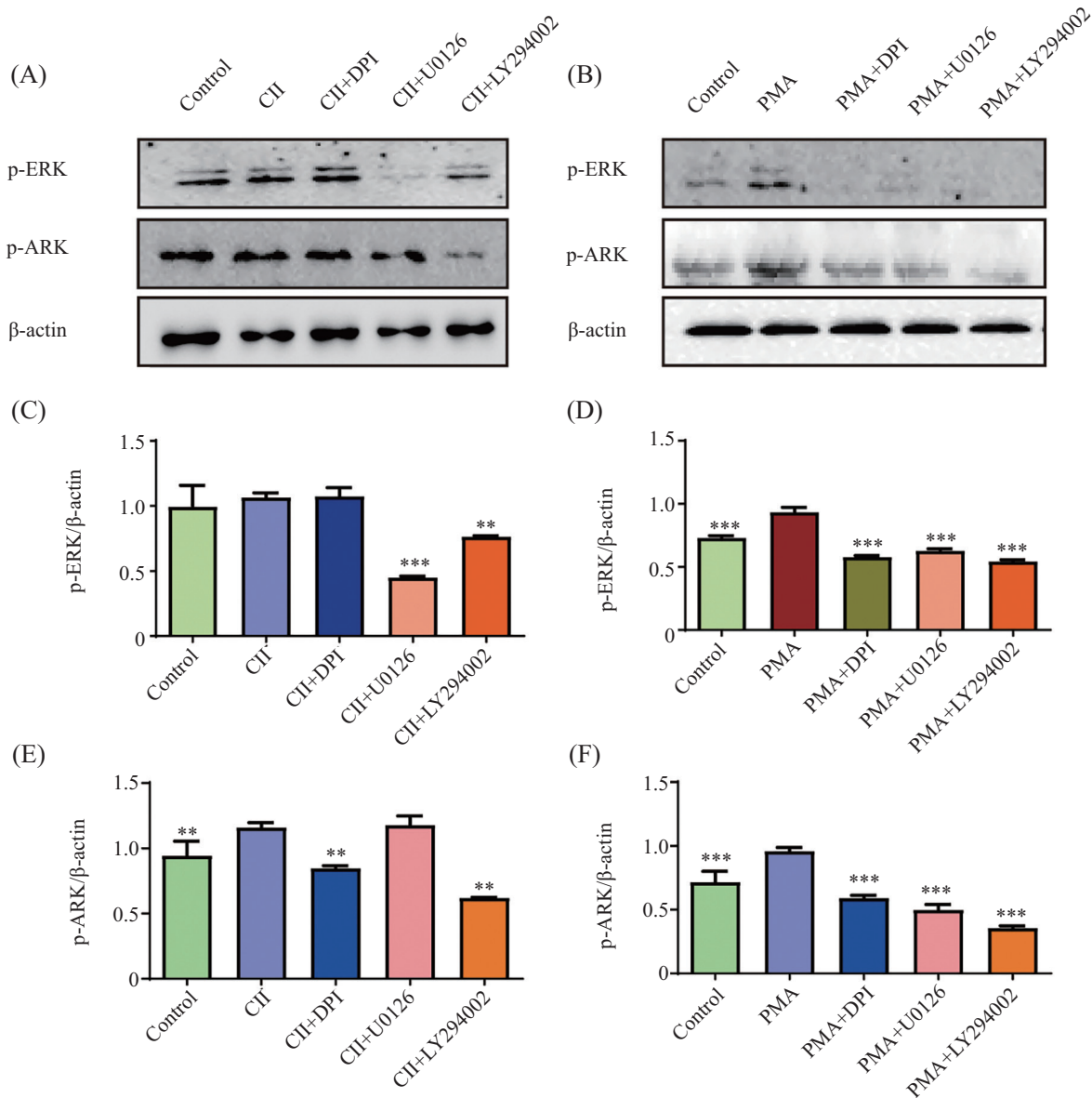


A: 荧光酶标仪检测CII、U0126+CII、LY294002+CII、DPI+CII处理的OCs中的eDNA产量; *** $P<0.001$, 与CII组相比; B: 荧光酶标仪检测PMA、U0126+PMA、LY294002+PMA、DPI+PMA处理的OCs的eDNA产量; *** $P<0.001$, 与PMA组相比。

A: fluorescence detection of eDNA yield of OCs with CII, U0126+CII, LY294002+CII, DPI+CII treatment; *** $P<0.001$ compared with the CII group; B: fluorescence detection of eDNA yield of OCs with PMA, U0126+PMA, LY294002+PMA, DPI+PMA treatment; *** $P<0.001$ compared with the PMA group.

图5 OCs中产生的eDNA量的检测

Fig.5 Detection of the yield of eDNA produced in OCs



A: Western blot测定CII刺激OCs后, ERK、AKT磷酸化条带; B: Western blot测定PMA刺激OCs后, ERK、AKT磷酸化条带; C: Western blot测定CII刺激OCs后, ERK磷酸化水平; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与CII组相比; D: Western blot测定PMA刺激OCs后, ERK磷酸化水平; *** $P < 0.001$, 与PMA组相比; E: Western blot测定CII刺激OCs后, AKT磷酸化水平; ** $P < 0.01$, 与CII组相比; F: Western blot测定PMA刺激OCs后, AKT磷酸化水平; *** $P < 0.001$, 与PMA组相比。

A: Western blot detected ERK and AKT phosphorylation bands in CII-stimulated OCs; B: Western blot detected ERK and AKT phosphorylation bands in PMA-stimulated OCs; C: Western blot detected ERK phosphorylation levels in CII-stimulated OCs; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with CII group; D: Western blot detected ERK phosphorylation levels in PMA-stimulated OCs; *** $P < 0.001$ compared to PMA group; E: Western blot detected AKT phosphorylation levels in CII-stimulated OCs; ** $P < 0.01$ compared with CII group; F: Western blot detected AKT phosphorylation levels in PMA-stimulated OCs; *** $P < 0.001$ compared with PMA group.

图6 免疫印迹法测定分析CII和PMA分别刺激OCs后的ERK、AKT磷酸化情况

Fig.6 Levels of ERK and AKT phosphorylation in CII- and PMA-stimulated OCs detected by Western blot

CII处理过的OCs相比于空白组、LY294002处理组、DPI处理组AKT磷酸化水平较高($P < 0.01$), 相比于U0126处理组磷酸化无差异($P > 0.05$)(图6A和图6E)。这些实验共同表明, 在OETs形成过程中, NOX依赖性和NOX非依赖性信号通路都需要AKT的激活, 但

是NOX依赖性途径额外需要ERK的激活。

3 讨论

破骨细胞的形成和异常活化可以引起诸如骨质疏松、类风湿关节炎等许多疾病的发生^[33]。已有

研究显示,在类风湿性关节炎患者的关节滑液中有大量的破骨细胞存在^[34],这些破骨细胞破坏了骨骼的动态平衡。破骨细胞与成骨细胞的动态平衡使骨组织不断更新,从而维持骨骼的硬度和弹性。骨动态平衡被破坏,不仅会引起骨质丢失、骨质疏松,而且会导致骨量的增加和骨结构的改变,如骨硬化^[35]。破骨细胞是唯一具有溶解骨组织能力的细胞,在骨重塑中有重要作用^[36]。因此,破骨细胞的异常增生与活化在RA的病理过程中起着不可小觑的作用,是治疗这些疾病的靶点之一。目前,关于破骨细胞的骨侵蚀的影响研究较多^[37-38],但关于破骨细胞如何通过形成ETs诱发RA发生方面的研究较少。

破骨细胞分化成熟的过程主要由两种细胞因子调控: M-CSF和RANKL^[38]。破骨细胞前体细胞的生存和增殖离不开M-CSF,而RANKL的功能是促进破骨细胞的分化及形成骨吸收^[38]。本研究通过使用细胞因子M-CSF和RANKL在体外诱导培养出了OCs,并通过TRAP染色实验对培养成熟的OCs进行了鉴定。

在本研究中,我们首先发现,在CII或ETs诱导剂PMA的刺激下,OCs和其他吞噬细胞一样,可以产生ETs^[39]。通过荧光染色可以发现,OETs含有eDNA。eDNA已被证实是中性粒细胞和巨噬细胞中ETs的组成成分^[25-26]。

此外,我们用Sytox Green染色荧光酶标仪检测eDNA水平,用免疫印迹分析检测ERK、p-ERK、AKT和p-AKT表达水平,用DHR123检测细胞质中ROS的含量,解释了OETs形成的可能机制。到目前为止,已经报道了两种主要类型的ETs,即NOX依赖性ETs和NOX非依赖性ETs^[40],NOX依赖性途径主要与细胞质ROS有关,而NOX非依赖性途径则与线粒体ROS有关^[40]。我们的结果与YOST等^[41]报道的一致,PMA诱导的OETs是NOX依赖性的,而CII诱导的OETs是NOX非依赖性的。此外,ERK和AKT的免疫印迹分析表明,NOX依赖性和NOX非依赖性信号通路均有AKT的激活,而ERK激活只与NOX依赖性信号通路有关。最近的研究表明,在中性粒细胞中,ERK与NOX依赖性ETs相关^[42],相比之下,ERK在NOX非依赖性ETs中激活程度很低^[40]。这些结论与我们的实验结果相似。此外,在NOX依赖性的OETs中,ERK激活发生在ROS生成的下游。

4 结论

CII或PMA均可诱导小鼠OEs产生OETs,进而可能引起RA的发生;PMA诱导产生的是NOX依赖性OETs,而CII诱导产生的是NOX非依赖性OETs;在OETs形成过程中,NOX依赖性和NOX非依赖性信号通路均有AKT的激活,而ERK激活只与NOX依赖性信号通路有关。

参考文献 (References)

- [1] NEMTSOVA M V, ZALETAEV D V, BURE I V, et al. Epigenetic changes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 570.
- [2] NGUYEN H V, LUDWIG S C, SILBER J, et al. Rheumatoid arthritis of the cervical spine [J]. *Spine J*, 2004, 4(3): 329-34.
- [3] NEUBERT E, SENGER-SANDER S N, MANZKE V S, et al. Serum and serum albumin inhibit *in vitro* formation of neutrophil extracellular traps (NETs) [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 12.
- [4] WANG S, CHEN R, YU Q, et al. Near-Infrared plasmon-booster heat/oxygen enrichment for reversing rheumatoid arthritis with metal/semiconductor composites [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(41): 45796-806.
- [5] LIN Y J, ANZAGHE M, SCHÜLKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880.
- [6] CHOI Y, ARRON J R, TOWNSEND M J. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(10): 543-8.
- [7] NORDGREN B, FRIDÉN C, DEMMELMAIER I, et al. An outsourced health-enhancing physical activity programme for people with rheumatoid arthritis: exploration of adherence and response [J]. *Rheumatology*, 2015, 54(6): 1065-73.
- [8] KRISHNAN E, LINGALA B, BRUCE B, et al. Disability in rheumatoid arthritis in the era of biological treatments [J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(2): 213-8.
- [9] TAYLOR P, MANGER B, ALVARO-GRACIA J, et al. Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *J Int Med Res*, 2010, 38(4): 1213-24.
- [10] MATSUURA T, ICHINOSE S, AKIYAMA M, et al. Involvement of CX3CL1 in the migration of osteoclast precursors across osteoblast layer stimulated by interleukin-1 β [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(7): 1739-45.
- [11] DAI Q, HAN Y, XIE F, et al. A RANKL-based osteoclast culture assay of mouse bone marrow to investigate the role of mTORC1 in osteoclast formation [J]. *J Vis Exp*, 2018, 133: 56468.
- [12] BRODETSKA L, NATRUS L, LISAKOVSKA O, et al. The regulatory role of the RANKL/RANK/OPG signaling pathway in the mechanisms of tooth eruption in patients with impacted teeth [J]. *BMC Oral Health*, 2020, 20(1): 261.
- [13] WU L, LUO Z, LIU Y, et al. Aspirin inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in dendritic cells by suppressing NF- κ B and NFATc1 activation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 375.
- [14] MINTER R, COHEN E, WANG B, et al. Protein engineering and preclinical development of a GM-CSF receptor antibody for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Brit J Pharmacol*, 2013,

- 168(1): 200-11.
- [15] YANG X, PANDE S, SCOTT C, et al. Macrophage colony-stimulating factor pretreatment of bone marrow progenitor cells regulates osteoclast differentiation based upon the stage of myeloid development [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12450-60.
- [16] ZHAO J, HUANG M, ZHANG X, et al. MiR-146a deletion protects from bone loss in OVX mice by suppressing RANKL/OPG and M-CSF in bone microenvironment [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(11): 2149-61.
- [17] GUO X, HIGGS B W, BAY-JENSEN A C, et al. Blockade of GM-CSF pathway induced sustained suppression of myeloid and T cell activities in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2018, 57(1): 175-84.
- [18] 赵晴潇, 何爱民. 破骨细胞分化发育中的信号转导及转录因子研究进展[J]. *山东医药*(ZHAO Q X, HE A M. Research progress of signal transduction and transcription factors in osteoclast differentiation and development [J]. *Shandong Medical Journal*), 2009, 49(19): 111-3.
- [19] HE F, BAI J, WANG J, et al. Irradiation-induced osteocyte damage promotes HMGB1-mediated osteoclastogenesis *in vitro* [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17314-25.
- [20] BOSSALLER L, ROTHE A. Monoclonal antibody treatments for rheumatoid arthritis [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(9): 1257-72.
- [21] CHEN Y, SUN W, GAO R, et al. The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2013, 52(10): 1739-47.
- [22] 徐子涵, 商玮, 蔡辉. 破骨细胞在类风湿关节炎骨侵蚀中的研究进展[J]. *现代医学*(XU Z H, SHANG W, CHAI H. Research progress of osteoclasts in bone erosion of rheumatoid arthritis [J]. *Modern Medical Journal*), 2017, 45(3): 446-50.
- [23] 周剑涛, 何香, 夏瑾燕. 细胞外诱捕网介导的抗微生物途径[J]. *生物学通报*(ZHOU J T, HE X, XIA J Y. Antimicrobial pathway mediated by extracellular traps [J]. *Bulletin of Biology*), 2009, 44(6): 17-8.
- [24] STACY N I, FREDHOLM D V, RODRIGUEZ C, et al. Whip-like heterophil projections in consecutive blood films from an injured gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) with systemic inflammation [J]. *Vet Q*, 2017, 37(1): 162-5.
- [25] LIU P, WU X, LIAO C, et al. *Escherichia coli* and *Candida albicans* induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90042.
- [26] CHOW O A, VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE M, BRIGHT A T, et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(5): 445-54.
- [27] MORSHED M, HLUSHCHUK R, SIMON D, et al. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils [J]. *J Immunol*, 2014, 192(11): 5314-23.
- [28] KAPLAN M J, RADIC M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity [J]. *J Immunol*, 2012, 189(6): 2689-95.
- [29] 张慧, 沈海丽. 中性粒细胞胞外网状陷阱在类风湿关节炎中的研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*(ZHANG H, SHEN H L. Research progress of neutrophil extracellular reticular traps in rheumatoid arthritis [J]. *Chinese Journal of Rheumatology*), 2018, 3(22): 212-3.
- [30] HERMOSILLA C, CARO T M, SILVA L, et al. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps [J]. *Parasitology*, 2014, 141(11): 1489-98.
- [31] 商安全, 孙祖俊, 李冬. 中性粒细胞胞外陷阱及其在炎性损伤中的作用[J]. *现代免疫学*(SHANG A Q, SUN Z J, LI D. Neutrophil extracellular trap and its role in inflammatory injury [J]. *Current Immunology*), 2020, 40(5): 419-23.
- [32] 安雅男. 黄曲霉毒素B1诱导巨噬细胞自噬及胞外陷阱产生的机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [33] SUZUKI S, MORIMOTO S, FUJISHIRO M, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor system is a potential therapy for rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmunity*, 2015, 48(4): 251-8.
- [34] ZHAO S, WANG Y, HOU L, et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2 induced osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110628.
- [35] MOSEKILDE L. Mechanisms of age-related bone loss [J]. *Novartis Found Symp*, 2001, 235: 150-71.
- [36] LUTTER A H, HEMPEL U, ANDERER U, et al. Biphasic influence of PGE2 on the resorption activity of osteoclast-like cells derived from human peripheral blood monocytes and mouse RAW264.7 cells [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2016, 111: 1-7.
- [37] DOSS H M, SAMARPITA S, GANESAN R, et al. Ferulic acid, a dietary polyphenol suppresses osteoclast differentiation and bone erosion via the inhibition of RANKL dependent NF- κ B signalling pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 207: 284-95.
- [38] IMAI R, SATO T, IWAMOTO Y, et al. Osteoclasts modulate bone erosion in cholesteatoma via RANKL signaling [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2019, 20(5): 449-59.
- [39] PERTIWI K R, DE BOER O J, MACKAAIJ C, et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(4): 505-12.
- [40] DOUDA D N, KHAN M A, GRASEMANN H, et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(9): 2817-22.
- [41] YOST C C, CODY M J, HARRIS E S, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates [J]. *Blood*, 2009, 113(25): 6419-27.
- [42] HAKKIM A, FUCHS T A, MARTINEZ N E, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(2): 75-7.