

## 研究论文

# 全反式维甲酸通过激活BMP2的表达抑制中性粒细胞胞外诱捕网的形成

王金丽<sup>1,2</sup> 刘志丹<sup>3</sup> 王晓敏<sup>1</sup> 仲经亚<sup>1</sup> 程树群<sup>1,4</sup> 潘巍巍<sup>1</sup> 詹淑玉<sup>1\*</sup> 郑永霞<sup>1\*</sup><sup>1</sup>嘉兴学院医学院, 嘉兴 314001; <sup>2</sup>浙江工业大学药学院, 杭州 310014;<sup>3</sup>浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053, <sup>4</sup>东方肝胆外科医院肝外六科, 上海 200433)

**摘要** 该研究探讨了全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)释放的调节作用及其可能的机制。体外提取C57BL/6小鼠的中性粒细胞, 给予ATRA处理, 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导NETs产生, 免疫荧光检测NETs的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)的共定位, Sytox Green荧光定量细胞外DNA的数量, 蛋白质印迹法检测MPO蛋白表达, ELISA检测细胞上清中瓜氨酸化组蛋白(citrullinated histone 3, H3Cit)含量。该研究利用RNA-seq筛选了对ATRA易感的基因, 并通过qRT-PCR验证相关差异基因(*Arg1*、*Camkk1*、*BMP2*等)的mRNA表达情况。为了研究ATRA的靶基因BMP2对NETs发生的影响, 该研究用BMP2的抑制剂(LDN193189)处理中性粒细胞, 再通过Sytox Green荧光实验验证BMP2对NETs形成的作用。结果显示: ATRA处理后的NETs的MPO和DNA共定位减少, MPO蛋白表达水平降低, 细胞上清中H3Cit含量显著低于PMA组( $P < 0.0001$ ), Sytox Green定量NETs荧光值显著低于PMA组( $P < 0.01$ ), ATRA以剂量依赖性方式抑制NETs生成; RNA-seq结果显示456个基因的表达发生了变化, 其中274个基因上调, 182个基因下调, qRT-PCR结果表明, 与PMA组相比, ATRA预处理组中的*BMP2*、*Arg1*、*Camkk1*、*Abca1*、*GSS*等基因发生上调, 与RNA-seq结果一致; LDN193189处理后, Sytox Green定量NETs荧光值显著高于PMA组( $P < 0.0001$ )。综上, ATRA能够抑制NETs的释放, 其机制可能是通过激活BMP2的表达从而抑制NETs形成的。

**关键词** 中性粒细胞胞外诱捕网; 全反式维甲酸; 感染性疾病

## All-Trans Retinoic Acid Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps by Activating BMP2

WANG Jinli<sup>1,2</sup>, LIU Zhidan<sup>3</sup>, WANG Xiaomin<sup>1</sup>, ZHONG Jingya<sup>1</sup>, CHENG Shuqun<sup>1,4</sup>, PAN Weiwei<sup>1</sup>, ZHAN Shuyu<sup>1\*</sup>, ZHENG Yongxia<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>School of Medicine, Jiaxing University, Jiaying 314001, China; <sup>2</sup>School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; <sup>3</sup>School of Basic Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;<sup>4</sup>Six Departments of Hepatology, Oriental Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200433, China)

收稿日期: 2022-08-22 接受日期: 2022-10-19

浙江省公益应用技术研究项目(批准号: GD22H163452)和中国博士后科学基金(批准号: 2018M633092)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0573-83643865, E-mail: zhansy2000@163.com; Tel: 0573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

Received: August 22, 2022 Accepted: October 19, 2022

This work was supported by Zhejiang Public Welfare Applied Technology Research Project (Grant No.GD22H163452), and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2018M633092)

\*Corresponding authors. Tel: +86-573-83643865, E-mail: zhansy2000@163.com; Tel: +86-573-83643819, E-mail: zhengyongxia@163.com

**Abstract** This study investigated the regulatory effect of ATRA (all-trans retinoic acid) on the release of NETs (neutrophil extracellular traps) and its possible mechanism. *In vitro*, neutrophils were extracted from C57BL/6 mice and pretreated with ATRA. Then, NETs were induced by PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Afterwards, colocalization of MPO (myeloperoxidase) and DNA (deoxyribonucleotide) levels of NETs was detected by immunofluorescence, extracellular DNA was quantified by Sytox Green fluorescence, and MPO protein expression was determined by Western blot, and the level of H3Cit (citrullinated histone 3) in the supernatant was evaluated by ELISA. For the mechanism study, RNA-seq was used to screen the genes susceptible to ATRA, and qRT-PCR was used to verify the mRNA expression of ATRA related-genes (*Arg1*, *Camkk1*, *BMP2*, etc.). In order to study the effect of BMP2, the target gene of ATRA, on the formation of NETs, neutrophils were treated with BMP2 inhibitor (LDN193189), and Sytox Green fluorescence assay was used to verify the effect of LDN193189 on NETs. The results showed that all of detected values, including the colocalization of MPO and DNA, extracellular DNA, the expression of MPO protein, the H3Cit level in the supernatant of NETs, treated with ATRA were significantly lower than those in PMA group ( $P < 0.0001$ ), indicating that ATRA inhibited the production of NETs in a dose-dependent manner; RNA-seq results showed that the expression of 456 genes changed, of which 274 genes were up-regulated and 182 genes were down-regulated. qRT-PCR results showed that *BMP2*, *Arg1*, *Camkk1*, *Abca1* and *GSS* were up-regulated in ATRA pretreated group compared with the PMA group, which was consistent with the RNA-seq results. After LDN193189 treatment, the fluorescence value of Sytox Green quantitative NETs was significantly higher in ATRA pretreated group than that in PMA group ( $P < 0.0001$ ). In summary, ATRA can inhibit the release of NETs, and its mechanism may be through the activation of BMP2 expression.

**Keywords** neutrophil extracellular traps net; all-trans retinoic acid; infectious diseases

中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞受到活化后释放的一种胞外网状结构,以DNA为骨架,其间镶嵌有多种抗菌蛋白,如组蛋白、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)<sup>[1]</sup>。NETs可以诱捕细菌、病毒等病原体,从而在机体抵御外界感染的过程中发挥着重要的作用<sup>[2]</sup>。但在COVID-19(coronavirus disease 2019)和败血症等感染性疾病中NETs的过度释放与组织损伤有关(如对血管内皮细胞和上皮细胞具有高毒性)<sup>[3]</sup>。此外,NETs的异常形成可能还会激活炎症反应,导致全身性凝血障碍、局部微血管形成<sup>[4-6]</sup>。因此,调节NETs的形成对于控制炎症反应的强度具有潜在的意义。

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素A最活跃的代谢产物,在细胞生长、分化和增殖中发挥着重要的作用<sup>[7]</sup>。此外,ATRA作为免疫细胞的多效调节剂在控制炎症性疾病和维持免疫稳态方面也发挥着关键的作用<sup>[8]</sup>。例如,在传染性肠胃炎病毒(transmissible gastro enteritis virus, TGEV)感染引发的传染性肠胃炎(infectious gastro enteritis, IGE)中,ATRA通过抑制促炎细胞因子,包括白介

素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )的释放来减弱TGEV诱导的炎症反应<sup>[9]</sup>。在盲肠结扎和穿刺(cecal ligation and puncture, CLP)模型中,研究人员发现ATRA通过调节髓源性抑制细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSCs)精氨酸酶-1(arginase-1, ARG-1)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的产生和活性,以及免疫抑制细胞因子的分泌,降低了CLP存活小鼠继发感染的风险<sup>[10]</sup>。另有研究显示:炎症期间ATRA的减少会削弱宿主的防御能力,尤其在病毒感染期间,ATRA的水平会进一步下降<sup>[11]</sup>。因此,ATRA对于感染性疾病的治疗是非常必要的。

ATRA对炎性细胞的作用研究对于阐明ATRA抗感染的机制至关重要。已有研究表明,ATRA对于多种免疫细胞,如巨噬细胞、T-细胞、B细胞、MDSCs等具有调节作用<sup>[12]</sup>。其中MDSCs起源于造血干细胞,代表了在感染或肿瘤等各种病理条件刺激下中性粒细胞和单核细胞持续异常激活的一种相对稳定形式<sup>[13]</sup>。在脓毒症模型中,ATRA可以通过调

节白细胞数量和MDSCs的存活来恢复免疫能力<sup>[14]</sup>。在黑色素瘤中, ATRA的体外治疗能够降低MDSCs在混合淋巴细胞反应中的免疫抑制功能。此外, ATRA可降低MDSCs中免疫抑制基因(如细胞程序性死亡-配体1, 白介素-10等)及产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)相关基因(如尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶, NOX2)的表达<sup>[15]</sup>。然而, ATRA对于中性粒细胞及NETs生成的作用少有报道。

因此, 在本研究中, 我们检测了ATRA对NETs形成的作用, 并初步探索了其作用机制。我们以小鼠的中性粒细胞为材料诱导NETs生成, 并观察ATRA对NETs形成的影响。此外, 我们通过RNA-seq和qRT-PCR发现了ATRA抑制NETs释放的多个潜在调节基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Histopaque-1077、Histopaque-1119试剂购自美国Sigma Aldrich公司; ATAR购自上海安耐吉化学有限公司; PMA、Rabbit anti-MPO、Goat anti-Rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup>488、SYBR Green、Beyozol试剂购自上海碧云天生物有限公司; Sytox Green购自天津阿尔法生物科技有限公司; RT-PCR试剂盒购自大连宝生物工程公司; H3Cit ELISA试剂盒购自泉州睿信生物科技有限公司; 引物序列购自上海铂尚生物技术有限公司, 序列见表1。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠中性粒细胞分离 C57BL/6小鼠脱颈处死, 酒精消毒, 以下操作均在无菌环境下进行: 剪开小鼠皮肤, 剥离组织取股骨和胫骨, PBS冲洗干净后将股骨和胫骨置于RPMI-1640培养基中; 弯头剪剪去骨头两端, 用1 mL无菌注射器吸取RPMI-1640培养基冲洗骨髓腔; 收集富含骨髓细胞的RPMI-1640并将其置于15 mL离心管中, 1 400 r/min室温离心7 min, 加入1 mL PBS重悬骨髓细胞; 将细胞悬液轻轻置于6 mL分离液上(3 mL Histopaque-1119在下, 3 mL Histopaque-1077在上), 2 000 r/min室温离心30 min, 可见两层白色环状细胞层, 小心吸取下层细胞将其置于新的15 mL离心管中, 加入3 mL RPMI-1640, 1 400 r/min室温离心5 min, 弃上清再加入适量RPMI-1640培养基重悬细胞; 使用吉姆萨染色检测中性粒细胞纯度。研究符合《赫尔辛基宣言》原则, 并经嘉兴学院医学伦理委员会批准(批准号: JUMC-2021-152)。

1.2.2 免疫荧光共定位MPO观察NETs形成 将中性粒细胞( $2 \times 10^6$ 个)接种于24孔板中, 加入500  $\mu$ L不含血清和双抗的RPMI-1640培养液, 置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养30 min。实验分为4组, Control组: 加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 14.1 mmol/L); NETs诱导组: 加入PMA(50 nmol/L); NETs抑制剂单药组: 加入ATRA(1  $\mu$ mol/L); NETs抑制组: 先加入ATRA(1  $\mu$ mol/L), 再加入PMA(50 nmol/L)。其中, ATRA与PMA均用DMSO溶解。NETs抑制剂单药组和NETs抑制组先加入ATRA(1  $\mu$ mol/L) 37  $^{\circ}$ C条件下孵育3 h, Control组和NETs诱导组加入DMSO 37  $^{\circ}$ C孵育3 h。3 h后向NETs诱导组和NETs抑制组分别加入PMA(20 nmol/L) 37  $^{\circ}$ C孵育3 h, Control组和NETs抑制剂单药组加入DMSO 37  $^{\circ}$ C孵育3 h。小心吸取上清, PBS洗涤3次, 每次5 min; 4%多聚甲醛室温固定20 min, PBS洗涤3次, 每次5 min; 5% BSA-PBST室温封闭1 h, 每孔加入200  $\mu$ L Rabbit Anti-MPO (1:100), 4  $^{\circ}$ C孵育过夜; 次日回收一抗, PBS洗涤3次, 每次5 min, 加入200  $\mu$ L二抗Goat anti-Rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup>488(1:500), 室温避光孵育1 h, PBS洗涤3次, 每次5 min; 加入DAPI染液室温避光染色5 min, PBS洗涤3次, 每次5 min, 封片剂封片, 荧光显微镜观察NETs MPO和DNA共定位情况。

1.2.3 Sytox Green定性定量观察NETs生成 将中性粒细胞( $2 \times 10^5$ 个)接种于96孔板中, 按照以上分组, 先加入不同浓度梯度的ATRA(0.1  $\mu$ mol/L、0.5  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L) 37  $^{\circ}$ C孵育3 h, PMA(20 nmol/L) 37  $^{\circ}$ C孵育3 h, 小心取出96孔板, 加入Sytox Green(0.2  $\mu$ mol/L) 室温避光孵育10 min, 使用荧光酶标仪测定激发/发射波长为488/520 nm处的荧光值(15 min内测完)。此外, 将孔板置于荧光显微镜下观察中性粒细胞形态变化和NETs的形成情况。

1.2.4 ELISA检测中性粒细胞培养上清H3Cit释放情况 将中性粒细胞( $2 \times 10^6$ 个)接种于24孔板中, 按以上分组处理。先加入ATRA(1  $\mu$ mol/L) 37  $^{\circ}$ C孵育3 h, 再加入PMA(20 nmol/L)孵育3 h, 收集细胞培养上清, 按ELISA试剂盒说明书操作。

1.2.5 Western blot检测细胞中MPO蛋白表达变化 将中性粒细胞( $5 \times 10^7$ 个)接种于6孔板中, 按以上分组处理。加入60  $\mu$ L RIPA裂解液提取全蛋白。BCA蛋白质测定试剂盒用于量化全蛋白质浓度。使用SDS-PAGE分离煮沸的样品蛋白质(20  $\mu$ g), 并将其转移到



表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>β-actin</i> F	TTG TGA TGG ACT CCG GAG AC
<i>β-actin</i> R	TGA TGT CAC GCA CGA TTT CC
<i>NOX2</i> F	GCA GGA AAG GAA CAA TGC CA
<i>NOX2</i> R	GGG TGT TCA CTT GCA ATG GT
<i>TNF-α</i> F	CCA CCA TCA AGG ACT CAA
<i>TNF-α</i> R	CAG GGA AGA ATC TGG AAA GG
<i>IL-1β</i> F	GAA GTA TGC TTA GCC AGT AAG
<i>IL-1β</i> R	GAG CGT CGC AAT TGT TGT GG
<i>Arg1</i> F	ACA TTG GCT TGC GAG ACG TA
<i>Arg1</i> R	ATC ACC TTG CCA ATC CCC AG
<i>Camkk1</i> F	ACT ACA TCC TGA CCC TGC AC
<i>Camkk1</i> R	TTC ACC TCT TCC TCG GTC AC
<i>BMP2</i> F	GAA TGA CTG GAT CGT GGC AC
<i>BMP2</i> R	CAA CAT GGA GAT TGC GCT GA
<i>GSS</i> F	ATC TTC AGT GGC TCG TGC AA
<i>GSS</i> R	GTA GCT GGT TCC TGG CAT GT

PVDF膜上。1× TBST洗涤3次,每次5 min。PVDF膜用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,1× TBST洗涤3次,每次5 min。抗MPO抗体(1:1 000)和抗肌动蛋白抗体(1:1 000)在4 °C下孵育过夜。第二天回收一抗,洗膜后,用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗(1:1 000)在室温下孵育1 h,洗膜后显影。

**1.2.6 qRT-PCR检测mRNA表达** 将中性粒细胞( $5 \times 10^7$ 个)接种于6孔板中,按1.2.2中的分组和处理。利用RNA提取试剂盒获得细胞中总RNA。将获取的RNA利用RNA逆转录试剂盒逆转录为cDNA, RT-PCR反应程序: 37 °C逆转录15 min; 85 °C逆转录酶灭活5 s; 4 °C保存。然后进行PCR反应, q-PCR反应程序: 95 °C变性5 s, 60 °C退火延伸45 s,共40个循环,首次循环前95 °C预变性30 s。引物序列见表1。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析结果。

### 1.3 统计学分析

采用Excel软件进行数据分析,实验数据用平均值±标准误(mean±SD)表示。使用Graphpad 9.0软件进行绘图分析,采用单因素方差分析(ANOVA),两组间的均数比较用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 中性粒细胞提取及纯度

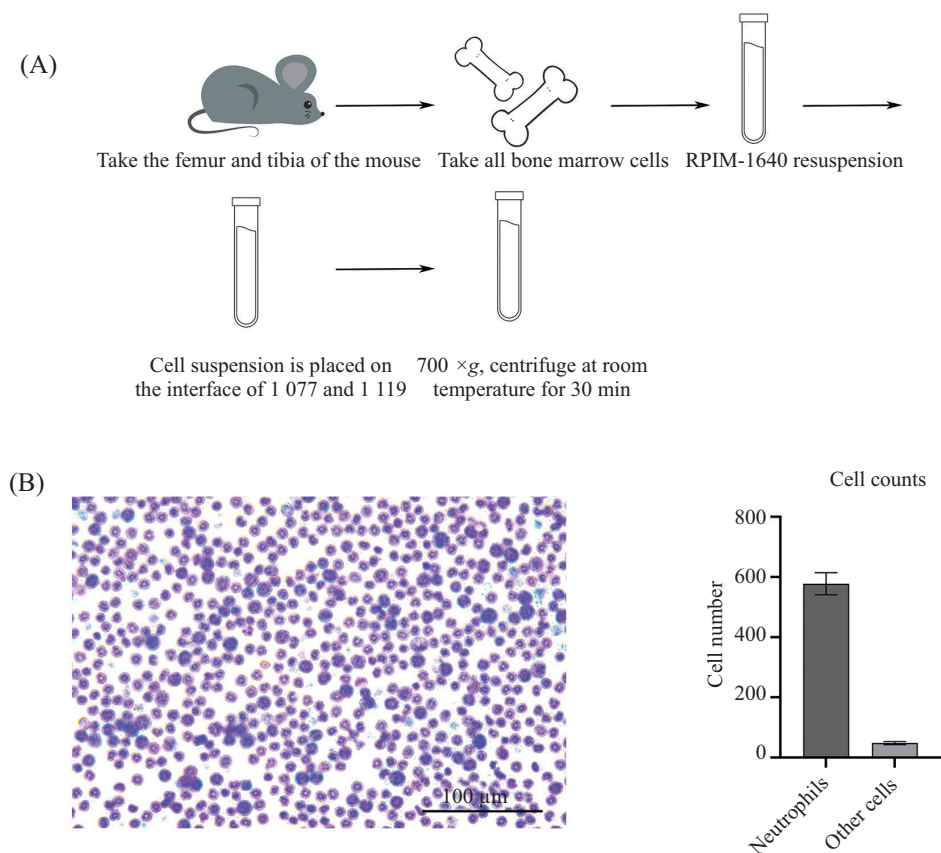
为了体外诱导NETs,从小鼠骨髓中分离中性粒

细胞(图1A),进行瑞氏-吉姆萨染色后,镜下观察并分类计数细胞(图1B),发现大部分提取的细胞具有分叶核结构,表明成功提取了中性粒细胞。显微镜下随机选取3个视野,计数其中的全部细胞数和非中性粒细胞数,计算中性粒细胞的百分率为 $(0.920 \pm 0.0033)\%$ ,通过该方法可以得到较纯的中性粒细胞,这为后续实验开展奠定了基础。

### 2.2 ATRA抑制NETs形成

为了检测ATRA能否抑制中性粒细胞产生NETs,将中性粒细胞用ATRA( $1 \mu\text{mol/L}$ )预处理3 h后,再用NETs诱导剂PMA( $20 \text{ nmol/L}$ )诱导3 h,于荧光显微镜下观察MPO(绿色)和DNA(蓝色)共定位情况来判断NETs的产生。结果发现,Control组和ATRA组无明显MPO和DNA的共定位(图2),而PMA组具有明显的MPO和DNA共定位(图2)。与PMA组相比,ATRA+PMA组MPO和DNA的共定位表达水平降低(图2)。结果表明:中性粒细胞在没有NETs诱导剂的刺激下较难形成NETs;当加入NETs诱导剂PMA后,NETs在体外能够成功被诱导;当使用ATRA预处理后再使用PMA,NETs的生成降低,ATRA在一定程度上能够抑制NETs的生成。

为进一步检测NETs的生成情况,将中性粒细胞按上述处理后,使用非渗透荧光染料Sytox Green( $0.2 \text{ nmol/L}$ )染色,用荧光显微镜定性观察NETs



A: C57BL/6小鼠骨髓中性粒细胞提取流程图; B: 吉姆萨染色鉴定中性粒细胞。

A: C57BL/6 mouse bone marrow neutrophil extraction flow chart; B: identification of neutrophils by Giemsa staining.

图1 小鼠骨髓中性粒细胞提取

Fig.1 Extraction of neutrophils from mouse bone marrow

生成情况(图3A), NETs被鉴定为扩散的网状结构, 而正常的中性粒细胞具有圆形形态, 周围未出现扩散的网状结构。通过对各组三个视图中的NETs进行手动计数, 计算NETs生成的相对百分率, 其中, Control组为(1.00±0.25)%, PMA组为(10.86±1.08)%, ATRA(1 μmol/L)组为(1.14±0.25)%, ATRA(0.1 μmol/L)+PMA组为(6.14±1.08)%, ATRA(0.5 μmol/L)+PMA组为(4.29±0.43)%, ATRA(1 μmol/L)+PMA组为(3.29±0.65)%。ATRA+PMA组与PMA组相比, NETs生成显著降低( $P<0.0001$ ), 并且ATRA浓度的升高与NETs的生成呈负相关(图3A)。我们的数据表明, ATRA能够以剂量依赖性方式抑制NETs生成, 当ATRA浓度为1 μmol/L时, 抑制NETs生成的效果最好。接着使用荧光酶标仪检测荧光值定量分析NETs的生成情况(图3B), PMA组的荧光强度为(46 704.00±1 152.64) RFU, 荧光强度显著高于Control组(29 704.33±800.84) RFU, 而ATRA(0.1 μmol/L)+PMA组(42 833.67±1 317.58) RFU荧光值低于PMA组( $P<0.01$ ), 随着ATRA的浓度升高, 各组的荧光值逐渐降低。这一

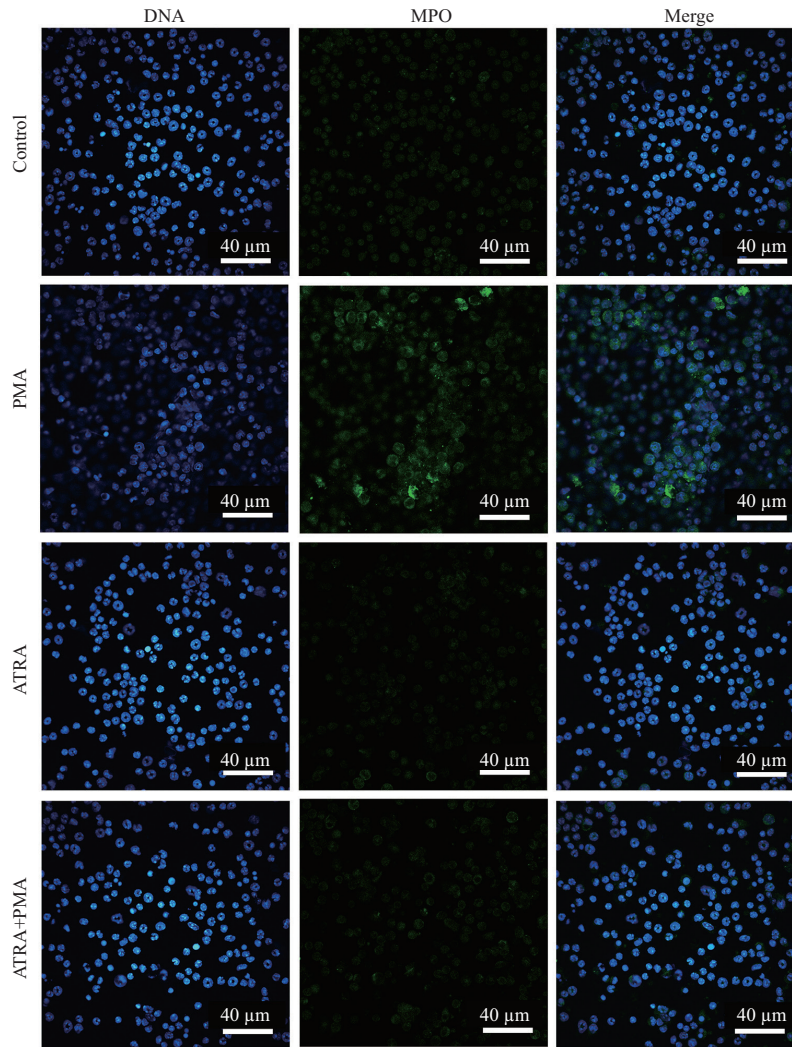
结果与上述一致, PMA成功在体外诱导了NETs, 而加入ATRA预处理中性粒细胞后再使用PMA处理后NETs生成降低, 且ATRA能够以剂量依赖性方式抑制NETs生成。

采用ELISA法检测细胞上清H3Cit含量(图3C), H3Cit正常情况存在于细胞核中, 当细胞损伤时(如细胞坏死和NETs形成)其会从细胞中释放到上清中, PMA组H3Cit水平(8.58±0.04) ng/mL显著高于ATRA组(1.96±0.11) ng/mL( $P<0.001$ ), 这一结果进一步证实ATRA能抑制NETs形成。

MPO是NETs形成的标志性蛋白, 通过Western blot测定MPO蛋白水平来检测NETs生成情况(图3D), 我们的数据表明, ATRA+PMA组MPO蛋白水平低于PMA组。因此, Western blot的结果表明, ATRA能够抑制NETs的产生。

### 2.3 ATRA对炎症因子和NOX2 mRNA相对表达的影响

炎症因子, 如TNF-α、IL-1β、IL-8、IL-6等



荧光显微镜检测DNA和MPO的共定位情况,观察NETs形成,DAPI标记DNA;Alexa 488标记MPO。

Colocalization of DNA and MPO was detected by fluorescence microscopy to observe the formation of NETs. DNA was labeled with DAPI; MPO was labeled with Alexa 488.

图2 MPO与DNA共定位

Fig.2 Colocalization of MPO with DNA

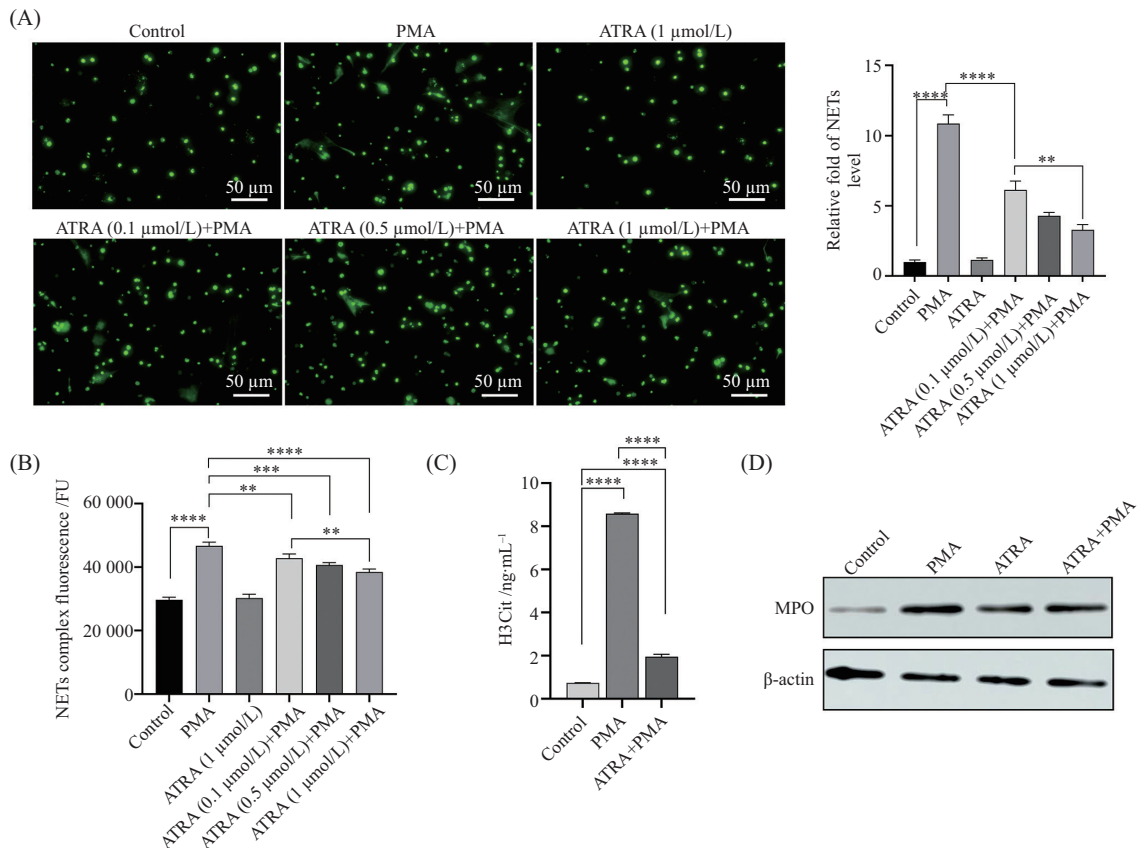
的释放能够促进NETs的形成,NETs形成也能够加重炎症反应,两者具有相关性。为探究NETs释放对炎性因子的影响,通过qRT-PCR检测各组*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 的mRNA相对表达水平。其中*TNF- $\alpha$* 在Control组和PMA组之间的表达差异至少为6倍( $6.00 \pm 2.16$ )( $P < 0.01$ ); ATRA+PMA组*TNF- $\alpha$* 相对表达量为 $3.31 \pm 1.24$ ,低于PMA组,但是没有显著性差异( $P > 0.5$ )。 *IL-1 $\beta$* 在Control组和PMA组之间的表达差异至少为2倍( $2.23 \pm 0.18$ )( $P < 0.001$ ), ATRA+PMA组*IL-1 $\beta$* 相对表达量为 $1.38 \pm 0.27$ ,低于PMA组( $P < 0.01$ )。由此,我们得出,NETs的释放可以促进炎性因子*TNF- $\alpha$* 和*IL-1 $\beta$* 的相对表达,而用ATRA预处理后再用PMA刺激中性粒细胞可以下调*TNF- $\alpha$* 和*IL-1 $\beta$*

的相对表达。

PMA诱导NETs通过激活NADPH氧化酶(NOX)发挥作用,其中关键的酶是NOX2,为探究ATRA抑制NETs形成的机制,采用qRT-PCR检测了*NOX2* mRNA相对表达水平(图4C)。结果显示:PMA组*NOX2* mRNA的相对表达量为 $1.50 \pm 0.42$ ,显著高于Control组( $P < 0.05$ ), ATRA+PMA组*NOX2* mRNA的相对表达水平为 $0.64 \pm 0.19$ ,显著低于PMA组( $P < 0.05$ )。此结果表明:ATRA可能直接或者间接地降低*NOX2*的表达水平从而抑制NETs的产生。

#### 2.4 ATRA抑制NETs形成相关的基因转录组分析

为了了解ATRA抑制NETs形成所涉及的机制,我们通过RNA-seq分析了ATRA预处理对NETs形

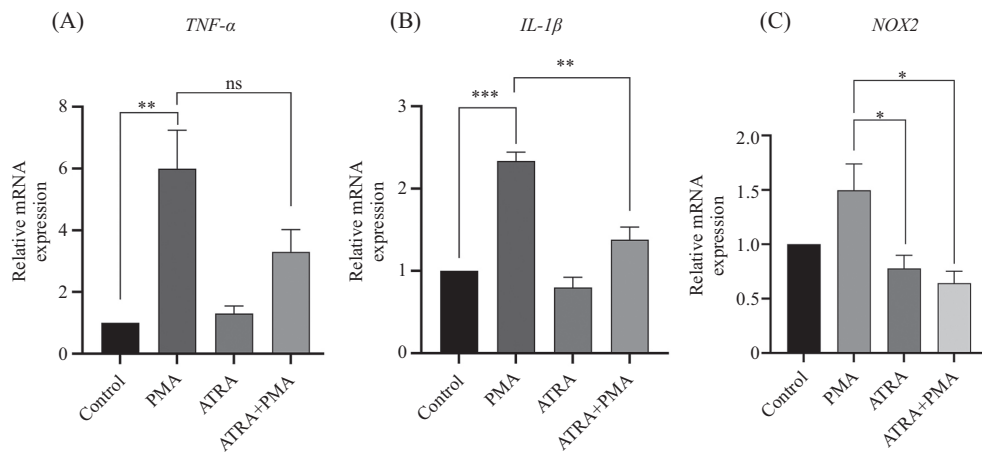


A: Sytox Green 荧光法镜下观察 NETs 的生成情况,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ,  $****P<0.0001$ ; B: 荧光酶标仪检测 Sytox Green 的荧光值以定量分析 NETs 的生成情况,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ ; C: ELISA 检测中性粒细胞上清中 H3Cit 水平,  $n=3$ ,  $****P<0.0001$ ; D: Western blot 检测 MPO 蛋白表达水平。

A: the formation of NETs was observed by Sytox Green fluorescence quantitative method,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ,  $****P<0.0001$ ; B: fluorescence value of Sytox Green was detected by fluorescence microplate reader to quantitatively analyze the formation of NETs,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ ; C: the H3Cit level in the neutrophil cell supernatant was detected by ELISA,  $n=3$ ,  $****P<0.0001$ ; D: Western blot was used to detect the expression of MPO protein.

图3 NETs生成检测

Fig.3 NETs generation detection



A: *TNF-α* mRNA 相对表达水平; B: *IL-1β* mRNA 相对表达水平; C: *NOX2* mRNA 相对表达水平。  $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ , ns 代表两组差异没有统计学意义。

A: relative expression level of *TNF-α* mRNA; B: relative expression level of *IL-1β* mRNA; C: relative expression level of *NOX2* mRNA.  $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ , ns represents no statistically significant difference between the two groups.

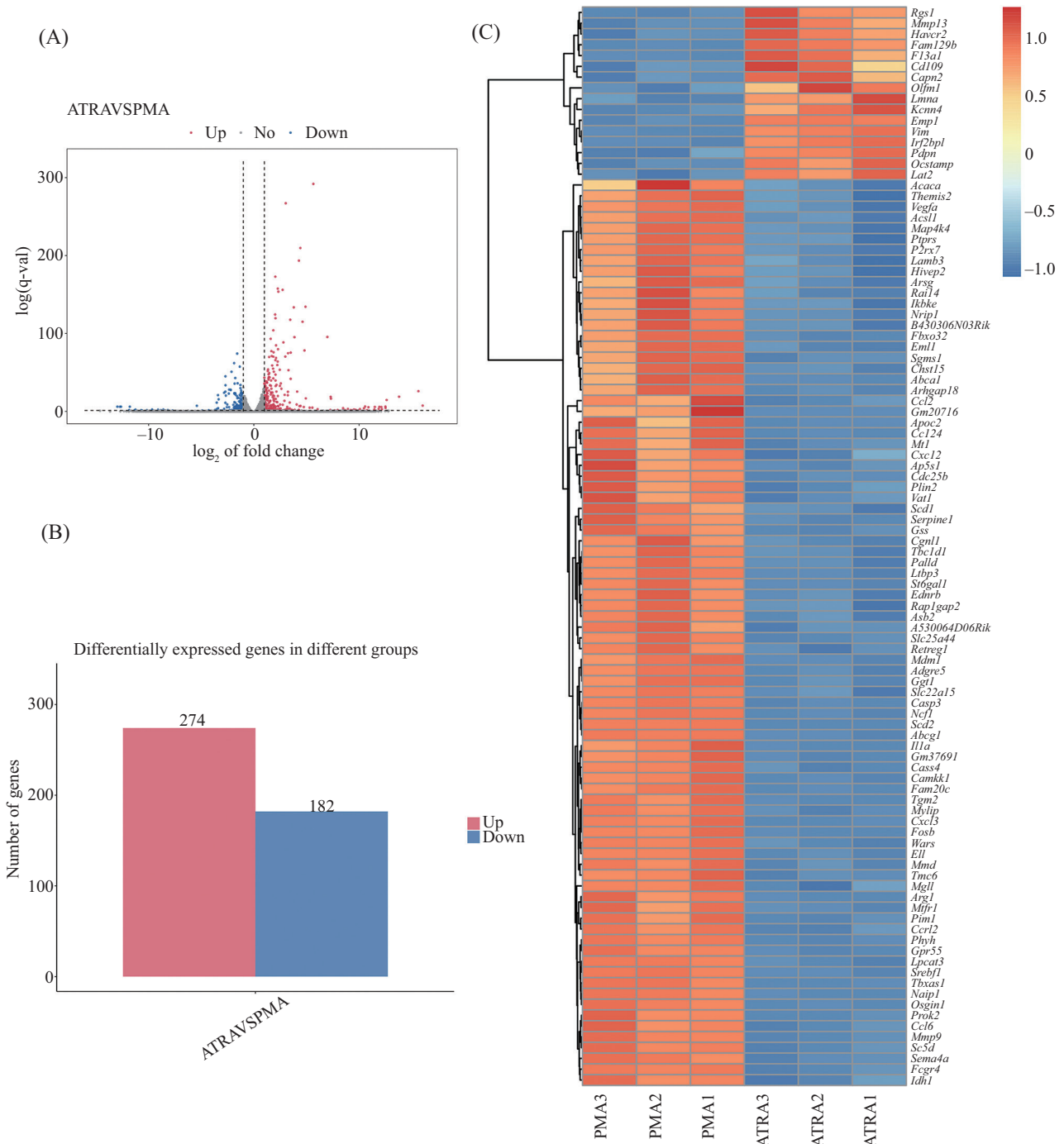
图4 *TNF-α*、*IL-1β*和*NOX2* mRNA的相对表达水平

Fig.4 Relative expression levels of *TNF-α*, *IL-1β* and *NOX2* mRNA



成的表达谱的影响。我们以差异倍数 (fold change, FC) $>2$ 或 $FC<0.5$ ,  $q$ 值 $<0.05$ 作为筛选差异基因的标准 (图 5A)。结果显示: 相比于对照组, ATRA 预处理组的 NETs 共有 456 个基因的表达发生了变化, 其中 274 个基因上调, 182 个基因下调 (图 5B)。我们对差异基因进行聚类分析, 绘制差异基因聚类热图 (图 5C)。

GO 分析结果 (图 6A 和表 2) 显示: 这些改变的基因富集于趋化因子介导的信号通路、炎症反应、细胞趋化性、免疫反应等。KEGG 分析结果 (图 6B 和表 3) 显示: 这些改变的基因富集于趋化因子信号通路、白介素 -17 信号通路、铁死亡、胆固醇代谢、脂肪酸合成、TNF 信号通路等。



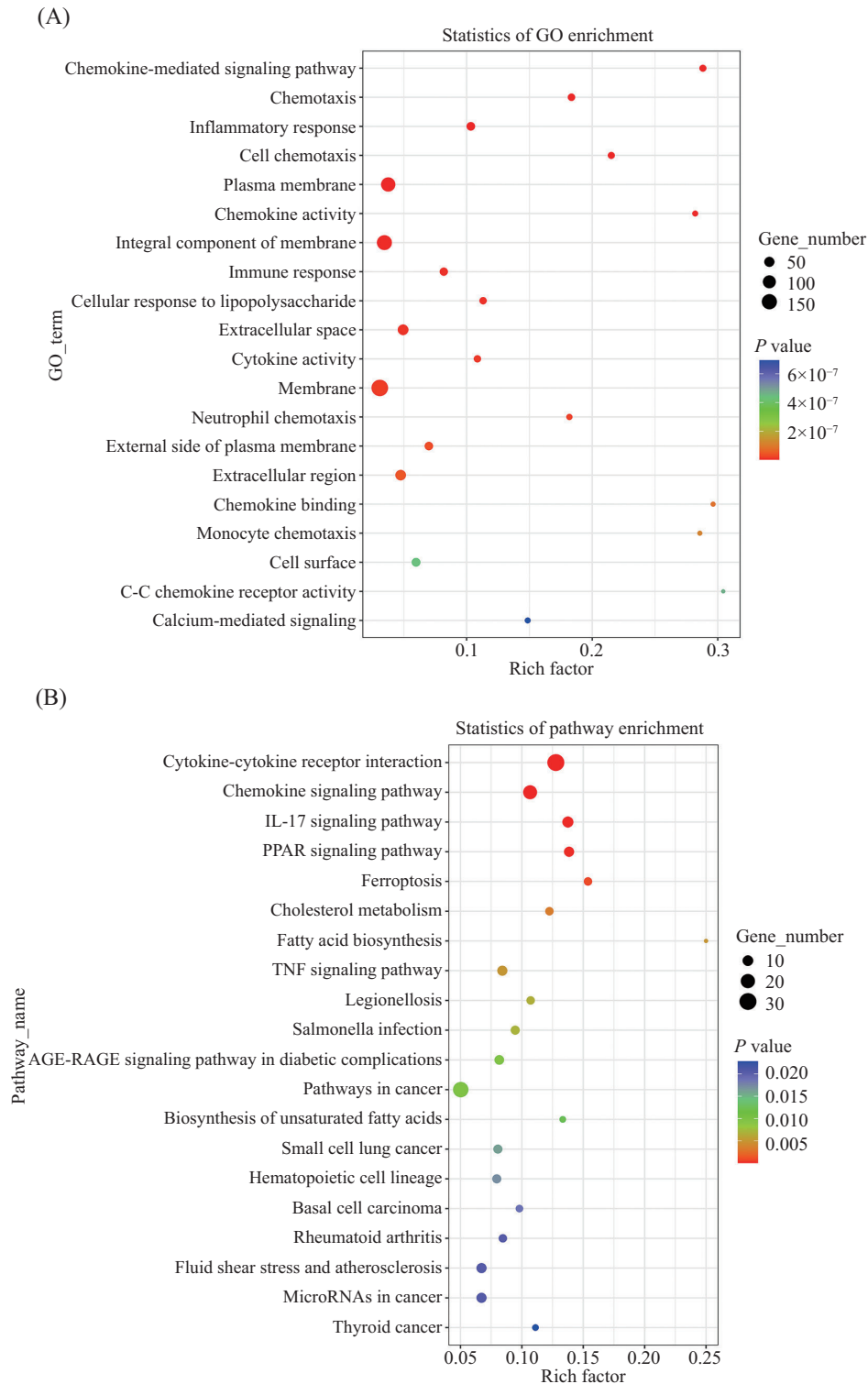
A: 差异基因火山图; B: 差异表达基因上下调频数统计; C: 差异基因聚类热图。

A: differential gene volcano plot; B: up-down frequency statistics of differentially expressed genes; C: differential gene clustering heat map.

图5 差异基因表达

Fig.5 Differential gene expression





A: GO富集气泡图; B: KEGG富集气泡图。

A: GO enrichment bubble chart; B: KEGG enrichment bubble chart.

图6 GO分析和KEGG分析结果

Fig.6 GO analysis and KEGG analysis results

## 2.5 qRT-PCR验证RNA-seq相关基因表达

为了验证RNA-seq的结果, 我们通过qRT-PCR对ATRA处理前后表达变化大于2倍的基因, 同时又

是GO分析或者KEGG分析富集通路中的基因(*Arg1*、*Camkk1*、*BMP2*和*GSS*)进行了验证。结果如图7所示: *Arg1*、*Camkk1*、*BMP2*和*GSS*等基因的表达, 与

表2 GO分析差异基因表达

Table 2 GO analysis of differential gene expression

GO分析通路 GO analysis pathway	表达上调基因 Up-regulated genes	表达下调基因 Down-regulated genes
Chemokine-mediated signaling pathways	<i>Ccl24, Ccl6, Ccl2, Ccr3, Akr3, Cxcr1</i>	<i>Ccl4, Ccl22, Ccr2, Cx3cr1</i>
Chemotaxis	<i>Ccl24, Ccl6, Cxcl15, Cxcl3, Cxcl1, Prok2, Ccl2, Ccr3</i>	<i>Ccl4, Ccl22</i>
Inflammatory response	<i>Nefl, Ccl6, Naip1, Cfh, Selp, BMP2</i>	<i>Ccl4, Haver2, Nos2, Il1r1</i>
Cell chemotaxis	<i>Ccl6, Cxcl14, Vegfa, Lef1, Cxcl1, Ccr3</i>	<i>Ccl4, Ccl22, Dock4, Itga1</i>
Plasma membrane	<i>Cav2, Hpn, Rnd2, Adgre5, Apoe, Grk5, Ggt1</i>	<i>Fcgrt, Il7r, Eno2</i>

表3 KEGG分析差异基因表达

Table 3 KEGG analysis of differential gene expression

通路名称 Pathway name	表达上调基因 Up-regulated genes	表达下调基因 Down-regulated genes
Cytokine-cytokine receptor interactions	<i>Ccl24, Ccl6, Cxcl14, BMP2, Il1a</i>	<i>Il7r, Il5ra, Il13ra1, Ccl4, Il1r1</i>
Chemokine signaling pathway	<i>Grk5, Ccl24, Nefl, Ccl6, Cxcl14, Cxcl15, Cxcl3, Cxcl1</i>	<i>Ccl4, Cxcl9</i>
Interleukin-17 signaling pathway	<i>Fosb, Mmp9, Cxcl3, Cxcl1, Il17rc, Casp3, Ccl2, Ikbke</i>	<i>Csf3, Mmp13</i>
PPAR signaling pathway	<i>Pltp, Scd3, Scd2, Plin2, Acs14, Acs13, Scd1</i>	<i>Slc27a1, Fabp4</i>
Ferroptosis	<i>Lpcat3, Slc39a14, Acs14, Acs13</i>	<i>Steap3, GSS</i>
Cholesterol metabolism	<i>Apoe, Apoc2, Abca1, Pltp, Lipc, Abcg1</i>	
Fatty acid biosynthesis	<i>Acaca, Acs14, Acs13</i>	
TNF signaling pathway	<i>Mmp9, Cxcl3, Cxcl1, Casp3, Lif, Ccl2, Cxcl2</i>	<i>Jag1, Il15</i>
Legionnaires	<i>Naip1, Cxcl3, Cxcl1, Casp3, Cxcl2</i>	<i>Il18</i>

RNA-seq结果一致;与PMA组相比, ATRA+PMA组中 *Arg1*、*Camkk1*、*BMP2*、*Abca1*、*GSS*、*Ggt1*和*Abcg1*表达都上调。由此, ATRA可能通过上调这些基因, 激活这些基因的相关通路从而抑制NETs的生成。ATRA的作用方式是通过与维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)结合, 作为转录因子调控靶基因的表达<sup>[16]</sup>。已有研究报道, 骨形态发生蛋白2型(bone morphogenetic protein type 2, *BMP2*)是ATRA受体调控的靶基因, ATRA可以激活*BMP2*从而发挥其生物学作用<sup>[17]</sup>。因此, 我们探究*BMP2*是否介导了ATRA对NETs生成的抑制作用。

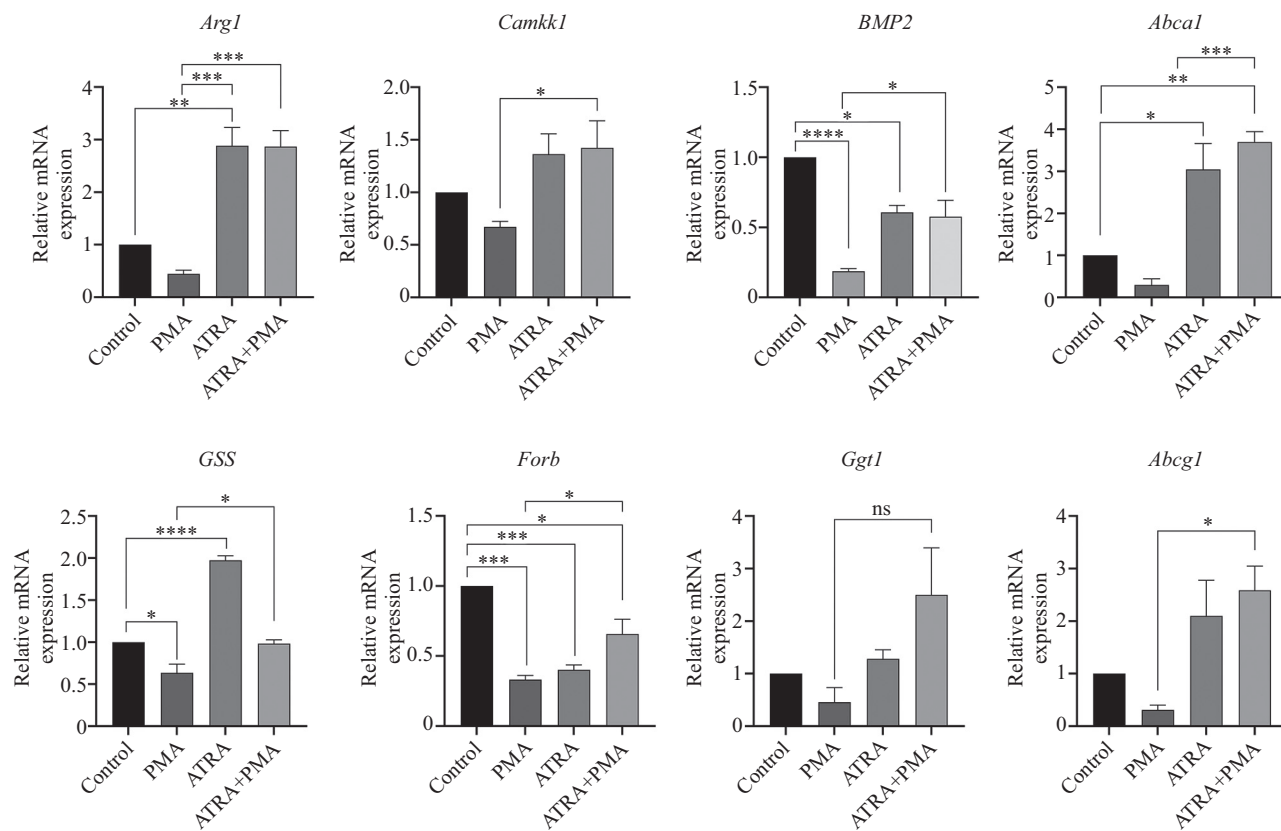
## 2.6 ATRA通过激活*BMP2*抑制NETs生成

为了探究ATRA在中性粒细胞中能否通过激活*BMP2*的表达抑制NETs生成, 我们首先使用不同浓度的*BMP2*抑制剂LDN193189对中性粒细胞预处理3 h, 再使用PMA诱导NETs 3 h后, 通过Sytox Green定性定量检测NETs生成情况。结果显示: LDN193189单独使用不能诱导NETs生成; 当LDN193189浓度在10 nmol/L~10  $\mu$ mol/L时, LDN193189的预处理对NETs的生成没有影响(图8A), 当LDN193189浓度增

加到100  $\mu$ mol/L时, NETs生成增加。接着联用ATRA和*BMP2*抑制剂LDN193189检测对NETs生成的作用(图8A)。结果显示: PMA+LDN193189组的荧光值(58 715.00 $\pm$ 5 514.05)高于ATRA+PMA+LDN193189组(49 652.00 $\pm$ 6 543.91), 表明ATRA在一定程度上拮抗了LDN193189对*BMP2*的抑制作用, 降低了NETs的生成。另外, 我们利用免疫荧光的方法检测了LDN193189(100  $\mu$ mol/L)预处理对NETs生成的影响(图8B)。结果显示: 当使用高浓度的*BMP2*抑制剂—LDN193189(100  $\mu$ mol/L)预处理中性粒细胞, 未加入PMA时, 中性粒细胞形态未见异常。单独加入PMA时, 中性粒细胞形态比正常形态扩大, 呈扩散不规则的点云状结构。LDN193189+PMA组的中性粒细胞形态未见正常的圆状, 呈现出类似蛛网状结构; LDN193189+PMA+ATRA组中性粒细胞结构也呈现出蛛网状结构, 但是网状结构中具有更多的点状结构。综上所述, *BMP2*可能介导了ATRA抑制NETs形成的作用。

## 3 讨论

在本研究中, 我们发现ATRA抑制PMA诱导



qRT-PCR法验证*Arg1*、*Camk1*、*BMP2*、*Abca1*、*GSS*、*Ggt1*和*Abcg1* mRNA相对表达情况,  $n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ns代表两组差异没有统计学意义。

qRT-PCR was performed to verify the relative expression of *Arg1*, *Camk1*, *BMP2*, *Abca1*, *GSS*, *GSS*, *Ggt1* and *Abcg1* mRNA,  $n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ns represents no statistically significant difference between the two groups.

图7 qRT-PCR验证差异基因表达

Fig.7 qRT-PCR verification of differential gene expression

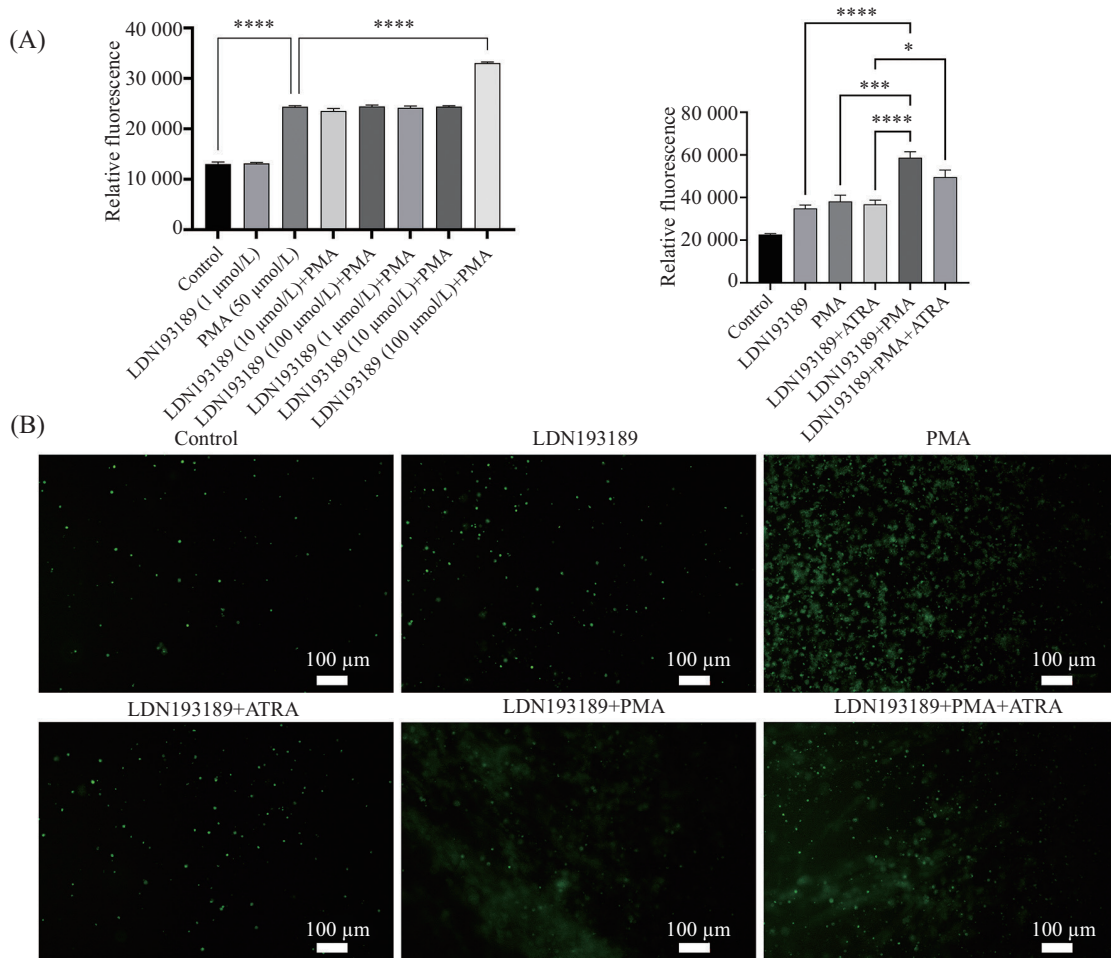
的小鼠中性粒细胞NETs的形成和释放。我们是以PMA诱导NETs的生成为模型,这是体外诱导NETs生成的经典模型,PMA是诱导中性粒细胞释放NETs的经典诱导剂,其诱导机制主要是通过激活NOX2并进一步引起ROS的产生<sup>[18-19]</sup>。NETs一旦被触发,难以逆转,因此,预防NETs的发生对于降低炎症反应引起的组织损伤程度有重要意义,故ATRA有望成为NETs的预防用药。

对于ATRA和NETs关系的研究尚有争议。一方面有研究显示:ATRA用于缺血性中风的治疗,其机制与调节信号传导转录激活因子1(signal transducer activator of transcription 1, STAT1)信号抑制NETs形成相关<sup>[20]</sup>。该研究与我们的结果一定程度上是一致的,我们通过RNA Seq数据筛选了ATRA调控的基因发现:STAT1的靶基因一氧化氮合酶2(nitric oxide synthase 2, NOS2)的表达被ATRA抑制了。值得注意的是,NOS2不仅是STAT1的靶基因,NOS2也是

STAT1的激活剂<sup>[21]</sup>:在人视网膜微血管内皮细胞中,NOS2可以激活Janus激酶(janus kinase, JAK)/STAT通路,两者是相互激活的关系<sup>[22]</sup>。因此本研究中,ATRA对NOS2的抑制会导致JAK/STAT通路的抑制,与CAI等<sup>[20]</sup>的发现一致。另一方面,文献报道ATRA可以诱导人早幼粒细胞HL-60分化释放NETs<sup>[23]</sup>:鉴于中性粒细胞的寿命短的弊端,使用ATRA或者DMSO诱导HL-60分化形成的粒细胞样细胞取代中性粒细胞;使用PMA诱导NETs后,ATRA的HL-60细胞NETs释放率最高,可能是因为ATRA所诱导的HL-60细胞的分化效率高,其NETs生成也高。而本文中采用的是小鼠的原代中性粒细胞,因此与该文献中的细胞模型不同,从而得到了相对的结论。

我们的研究表明,ATRA通过激活BMP2抑制了NETs的形成和释放。本研究中,RNA-seq测序结果和qRT-PCR的结果都表明ATRA能够上调BMP2的表达。LDN193189是BMP2特异性抑制剂,低浓度





A: 荧光酶标仪定量检测不同浓度的LDN193189预处理NETs生成水平,  $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ ; B: 使用Sytox Green荧光显微镜下观察NETs生成的代表性图像。

A: the production of NETs after pretreatment with different concentrations of LDN193189 was detected by fluorescence microplate reader,  $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ ; B: the formation of NETs was observed by Sytox Green fluorescence quantitative method.

图8 抑制BMP2的活性在一定程度上抑制NETs生成

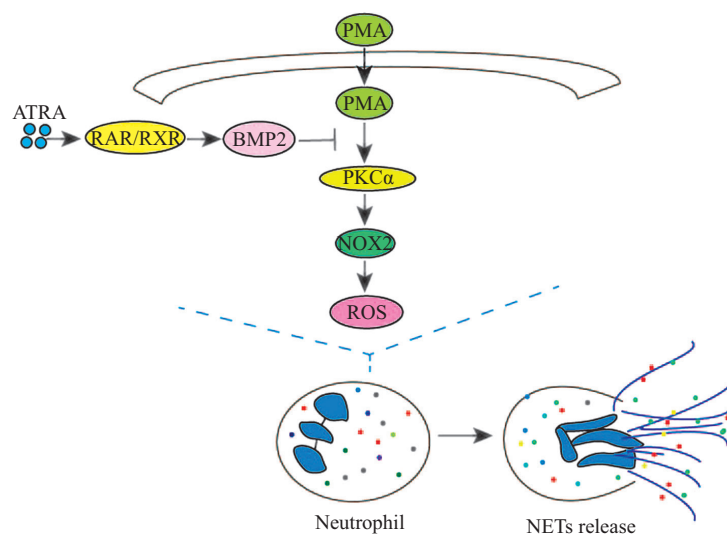
Fig.8 Inhibiting the activity of BMP2 inhibits the generation of NETs to a certain extent

的LDN193189未增加PMA诱导的NETs的形成, 高浓度的LDN193189能够诱导NETs的生成(图7A)。因此, ATRA可以通过激活 *BMP2* 的表达从而抑制NETs的释放。

*BMP2*属于生长转化因子- $\beta$ (growth transformation factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )家族的多功能生长因子<sup>[24]</sup>, 有助于脂肪生成、软骨形成、心脏分化和细胞程序性死亡的调节<sup>[25-28]</sup>。已有大量文献表明, *BMP2*的过表达能够抑制ROS的产生并保护细胞免受氧化应激的毒害<sup>[29-32]</sup>, 从而维持机体的平衡。此外, *BMP2*也是ATRA的下游靶基因, 能够受到ATRA的调控<sup>[33-35]</sup>。ATRA调节的基因表达由其核受体介导, 核受体包括RAR和RXR, 它们分别形成同源二聚体和异源二聚体, 结合了ATRA的RAR和RXR协同激活*BMP2*启动

子, 即*BMP2*是ATRA直接调控的靶基因<sup>[36-37]</sup>。PMA诱导中性粒细胞释放NETs的关键机制是激活蛋白激酶C $\alpha$ (protein kinase C alpha, *PKC $\alpha$* )引起细胞内的ROS升高, 从而进一步引起NETs的释放<sup>[38]</sup>。已有文献报道, *BMP2*能够抑制*PKC $\alpha$* 的活性, 由此, 我们提出ATRA抑制NETs生成的机制假说: ATRA激活*BMP2*, *BMP2*的进一步激活抑制了*PKC $\alpha$* 活性<sup>[39]</sup>, 拮抗了PMA的诱导作用, 从而抑制了NETs的释放(图9)。

此外, 对RNA-seq筛选的差异表达基因的GO分析和KEGG分析结果表明, ATRA能够影响中性粒细胞的趋化性, 表明ATRA及其活性类似物是中性粒细胞趋化性的潜在抑制剂, 以缓解机体产生过度炎症反应引起的炎症损伤。然而ATRA抑制中性粒细胞



ATRA激活BMP2抑制NETs生成的机制图。

ATRA activates the mechanism diagram of BMP2 to inhibit the generation of NETs.

图9 ATRA抑制NETs生成的机制图

Fig.9 Mechanism of ATRA inhibiting the generation of NETs

趋化性的作用机制目前仍不清楚。因此,探究ATRA抑制中性粒细胞趋化性的作用机制可能为开发新型抗感染药物提供实验数据参考。

我们的研究仍存在许多不足,首先,我们发现ATRA能够通过上调BMP2抑制NETs形成,然而未提供ROS变化相关数据。我们在体外也没有将ATRA与其他NETs抑制剂进行比较,不清楚ATRA与其他NETs抑制剂相比抑制NETs的能力。

#### 4 结论

在这项研究中,我们证明ATRA在体外抑制PMA刺激诱导的小鼠中性粒细胞NETs的形成和释放。关键机制是ATRA通过激活BMP2抑制ROS生成来抑制NETs的释放。ATRA在脓毒症或COVID-19等感染病相关的中性粒细胞过度活化和NETs释放中具有潜在的作用。

#### 参考文献 (References)

- [1] THIAM H R, WONG S L, WAGNER D D, et al. Cellular mechanisms of NETosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020, 36: 191-218.
- [2] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5663): 1532-5.
- [3] VERAS F P, PONTELLI M C, SILVA C M, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(12): e20201129.
- [4] KUMAR S, PAYAL N, SRIVASTAVA V K, et al. Neutrophil extracellular traps and organ dysfunction in sepsis [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523: 152-62.
- [5] MIDDLETON E A, HE X Y, DENORME F, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome [J]. *Blood*, 2020, 136(10): 1169-79.
- [6] AL-KURAIISHY H M, AL-GAREEB A I, AL-HUSSANIY H A, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) and COVID-19: a new frontiers for therapeutic modality [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 104: 108516.
- [7] HALL J A, GRAINGER J R, SPENCER S P, et al. The role of retinoic acid in tolerance and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 35(1): 13-22.
- [8] ABDELHAMID L, LUO X M. Retinoic acid, leaky gut, and autoimmune diseases [J]. *Nutrients*, 2018, 10(8): 1016.
- [9] PU J, CHEN D, TIAN G, et al. All-trans retinoic acid attenuates transmissible gastroenteritis virus-induced inflammation in IPEC-J2 cells via suppressing the RLRs/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 734171.
- [10] LIU T, YANG F, XIE J, et al. All-trans-retinoic acid restores CD4<sup>+</sup> T cell response after sepsis by inhibiting the expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Mol Immunol*, 2021, 136: 8-15.
- [11] HUANG Z, LIU Y, QI G, et al. Role of vitamin A in the immune system [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(9): 258.
- [12] NI X, HU G, CAI X. The success and the challenge of all-trans retinoic acid in the treatment of cancer [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1): 71-80.
- [13] BI G, LIANG J, BIAN Y, et al. The immunomodulatory role of all-trans retinoic acid in tumor microenvironment [J]. *Clin Exp Med*, 2020: doi: 10.1007/s10238-022-00860-x.
- [14] MARTIRE-GRECO D, LANDONI V I, CHIARELLA P, et al. All-trans-retinoic acid improves immunocompetence in a murine model of lipopolysaccharide-induced immunosuppression [J]. *Clin Sci*, 2014, 126(5): 355-65.
- [15] TOBIN R P, JORDAN K R, ROBINSON W A, et al. Targeting

- myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 282-91.
- [16] CHEN Z, CHEN S J, WANG Z Y. Retinoic acid and acute promyelocytic leukemia: a model of targetting treatment for human cancer [J]. *C R Acad Sci III*, 1994, 317(12): 1135-41.
- [17] ZHANG H L, GUO B, YANG Z Q, et al. ATRA signaling regulates the expression of COL9A1 through BMP2-WNT4-RUNX1 pathway in antler chondrocytes [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2017, 328(6): 575-86.
- [18] KHAN M A, PALANIYAR N. Transcriptional firing helps to drive NETosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41749.
- [19] PAPAYANNOPOULOS V, METZLER K D, HAKKIM A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(3): 677-91.
- [20] CAI W, WANG J, HU M, et al. All trans-retinoic acid protects against acute ischemic stroke by modulating neutrophil functions through STAT1 signaling [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 1-14.
- [21] XU W, COMHAIR S A, ZHENG S, et al. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(1): 137-48.
- [22] LIU Y, XIAO J, ZHAO Y, et al. MicroRNA-216a protects against human retinal microvascular endothelial cell injury in diabetic retinopathy by suppressing the NOS2/JAK/STAT axis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104445.
- [23] GUO Y, GAO F, WANG Q, et al. Differentiation of HL-60 cells in serum-free hematopoietic cell media enhances the production of neutrophil extracellular traps [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 353.
- [24] MASSAGUE J, WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system [J]. *EMBO J*, 2000, 19(8): 1745-54.
- [25] CAPULLI M, PAONE R, RUCCI N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 561: 3-12.
- [26] MA L, LU M F, SCHWARTZ R J, et al. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning [J]. *Development*, 2005, 132(24): 5601-11.
- [27] PAJANI-UNDERWOOD S, WILSON C P, ELDER C, et al. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling [J]. *Development*, 2007, 134(12): 2359-68.
- [28] ZHOU N, LI Q, LIN X, et al. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(1): 101-11.
- [29] DING L Z, TENG X, ZHANG Z B, et al. Mangiferin inhibits apoptosis and oxidative stress via BMP2/Smad-1 signaling in dexamethasone-induced MC3T3-E1 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2517-26.
- [30] KIM K M, KIM D Y, LEE D S, et al. Peroxiredoxin II negatively regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation via PP2A Calpha-mediated Smad1/5/9 dephosphorylation [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(6): 1-11.
- [31] LIANG Q, CHEN Y, LI C, et al. Quercetin attenuates Ox-LDL-induced calcification in vascular smooth muscle cells by regulating ROS-TLR4 signaling pathway [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2018, 38(8): 980-5.
- [32] YU H F, YANG Z Q, XU M Y, et al. Yap is essential for uterine decidualization through Rrm2/GSH/ROS pathway in response to Bmp2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(6): 2261-76.
- [33] CHEN Y, CAO J, ZHANG N, et al. Advances in differentiation therapy for osteosarcoma [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25(3): 497-504.
- [34] HE X, LIAO Y, LIU J, et al. Research progress of natural small-molecule compounds related to tumor differentiation [J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2128.
- [35] AMJADI-MOHEB F, AKHAVAN-NIAKI H. Wnt signaling pathway in osteoporosis: epigenetic regulation, interaction with other signaling pathways, and therapeutic promises [J]. *J Cell Physiol*, 2019, doi: 10.1002/jcp.28207.
- [36] HELLER L C, LI Y, ABRAMS K L, et al. Transcriptional regulation of the Bmp2 gene. Retinoic acid induction in F9 embryonal carcinoma cells and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(3): 1394-400.
- [37] ZHANG H L, YANG Z Q, DUAN C C, et al. WNT4 acts downstream of BMP2 to mediate the regulation of ATRA signaling on RUNX1 expression: implications for terminal differentiation of antler chondrocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1129-45.
- [38] DAMASCENA H L, SILVEIRA W A A, CASTRO M S, et al. Neutrophil activated by the famous and potent PMA (phorbol myristate acetate) [J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2889.
- [39] PIELES O, REICHERT T E, MORSCZEK C. Classical isoforms of protein kinase C (PKC) and Akt regulate the osteogenic differentiation of human dental follicle cells via both beta-catenin and NF-kappaB [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 242.