

白细胞介素-7 对巨噬细胞分化形成破骨细胞的影响

沈作佳¹ 毛建华¹ 徐广¹ 冉强² 万锐杰^{2△}

[摘要] 目的:白细胞介素-7(IL-7)在类风湿关节炎骨破坏过程中具有重要作用,然而 IL-7 的具体作用方式不明确,因此本研究分析了 IL-7 对破骨细胞分化形成的作用及相关分子机制。方法:用 M-CSF, M-CSF+RANKL 及 IL-7 分别诱导 RAW264.7 巨噬细胞分化形成破骨细胞,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色评价 IL-7 对破骨细胞分化形成的影响。然后使用 JAK 信号通路抑制剂(AG490), AKT 信号通路抑制剂(LY294002)和 JNK 信号通路抑制剂(SP600125),采用 RT-PCR 和 ELISA 分别检测 IL-7 对破骨细胞骨溶性相关活性基因和蛋白分泌的影响。最后使用蛋白印迹检测探讨 IL-7 促进破骨细胞分化形成的相关分子机制。结果:IL-7 在核因子 κ B 配体(RANKL)不存在的情况下能够显著增加破骨细胞的数量。IL-7 能够显著诱导破骨细胞溶骨相关活性成分包括基质金属蛋白酶-9(MMP9)、组织蛋白酶(CathK)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、降钙素受体(CTR)的基因表达和蛋白分泌,JAK(AG490)和 JNK(SP600125)信号通路抑制剂能显著抑制 IL-7 诱导的上述基因表达和蛋白分泌。IL-7 显著诱导 JAK,AKT 及 JNK 信号通路信号蛋白的活化。结论:IL-7 能不依赖于 RANKL 诱导破骨细胞的分化形成,其作用可能是通过活化 JAK 和 JNK 信号通路实现的。

[关键词] 白细胞介素-7;破骨细胞;巨噬细胞;信号通路

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)07-0006-04

Effect of Interleukin-7 on the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts

SHEN Zuojia¹ MAO Jianhua¹ XU Guang¹ RAN Qiang² WAN Ruijie^{2△}

¹Department of Orthopedics, Jiangshan People's Hospital, Jiangshan 324100, Zhejiang China;

²Department of Orthopedics, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China.

Abstract Objective: Interleukin-7 (IL-7) plays an important role in the process of bone destruction in rheumatoid arthritis. However, the specific mode of action of IL-7 is not clear. Therefore, this study analyzed the effect of IL-7 on osteoclastogenesis and its related molecular mechanism. **Methods:** M-CSF, M-CSF + RANKL and IL-7 were used to induce RAW264.7 cells to differentiate into osteoclasts, respectively. The effect of IL-7 on osteoclastogenesis was evaluated by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Then, JAK signaling pathway inhibitor (AG490), AKT signaling pathway inhibitor (LY294002) and JNK signaling pathway inhibitor (SP600125) were used to evaluate the effects of IL-7 on bone solubility related active genes and protein secretion of osteoclasts by RT-PCR and ELISA, respectively. Western blot was used to explore the molecular mechanism of IL-7 promoting osteoclastogenesis. **Results:** IL-7 could significantly increase the number of osteoclasts in the absence of nuclear factor κ B ligand (RANKL). IL-7 could significantly induce the gene expression and protein secretion of osteoclast osteolytic related components, including matrix metalloproteinase-9 (MMP9), cathepsin (CathK), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and calcitonin receptor (CTR). JAK (AG490) and JNK (SP600125) signaling pathway inhibitors could significantly inhibit IL-7-induced gene expression and protein secretion.

IL-7 significantly induced the activation of JAK, AKT and JNK signaling proteins. **Conclusion:** IL-7 can induce osteoclastogenesis independent of RANKL, and its effect may be achieved by activating JAK and JNK signaling pathways.

Keywords: interleukin-7; osteoclasts; macrophages; signaling pathway

基金项目:2018年重庆市科研机构绩效激励引导专项项目
(cstc2018jxjl30011)

¹ 浙江江山市人民医院骨三科(浙江 江山,324100)

² 重庆市中医院骨科

[△]通信作者 E-mail:yellowsubmarinexj@163.com

类风湿性关节炎(RA),是一种自身免疫性疾病,破骨细胞形成与 RA 患者的关节破坏及骨和软骨吸收过程密切相关^[1]。RA 患者血清和关节滑膜液中白细胞介素-7(IL-7)的水平显著升高,且与疾病严重性呈正比^[2]。体内研究表明 IL-7 与核因子 κ B 配体(RANKL)共同诱导破骨细胞的分化形成^[3]。但 IL-7 是否直接参与破骨细胞的分化尚不清楚。因此,本研究分析了 IL-7 在 RANKL 不存在的情况下诱导破骨细胞分化的作用及机制,为探讨 IL-7 在 RA 发病的作用研究提供更多的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基(Gibco,美国),MEM 培养基(Gibco,美国);胎牛血清(FBS)(Gibco,美国);青霉素,链霉素(威士特,加拿大);巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(赛默飞,美国);核因子 κ B 配体(RANKL)(赛默飞,美国);白细胞介素-7(IL-7)(Sigma,美国);抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma,美国);基质金属蛋白酶-9(MMP9),组织蛋白酶(CathK),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP),降钙素受体(CTR)ELISA 试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司,中国);蛋白裂解液(碧云天,中国);JAK 信号通路抑制剂(AG490),AKT 信号通路抑制剂(LY294002),JNK 信号通路抑制剂(SP600125)(Sigma,美国);JAK,p-JAK,AKT,p-AKT,JNK 及 p-JNK 抗体(Abcam,英国)。

1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞(ATCC,美国)用含有 10%FBS,100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基,于 5% CO₂ 和 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱(赛默飞,美国)中培养。

1.3 TRAP 破骨细胞染色

将 RAW264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种于 24 孔细胞培养板,分为 M-CSF(20 ng/mL)、M-CSF+RANKL(50 ng/mL)及 IL-7 组(2 ng/mL),每组 3 个孔,于加药后的第 1,4 及 7 天,根据制造商的要求,用 TRAP 染色试剂盒对细胞染色,利用倒置荧光显微镜(100 \times)观察,认为 TRAP 阳性及多核(≥ 3 个)的细胞为破骨细胞,每个处理组取 3 个视野定量计数,取其平均值。

1.4 RT-PCR 检测

将 RAW264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种于 24 孔细胞培养板,分为 M-CSF,M-CSF+RANKL,IL-7 及 IL-7+信号通路抑制剂(AG490,50 μ mol/L;LY294002,10 μ mol/L;SP600125,20 μ mol/L)组,共 6 组,培养后的第 4 天收集各组细胞,加入 0.5 mL TR-IZOL(诺唯赞,中国)提取总 RNA,根据试剂盒的说明,使用 NanoDrop 2000 Spectrophotometer(赛默飞,美

国)检测总 RNA 的纯度和浓度,使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒和 gDNA Eraser(宝日医生物技术有限公司,日本)将 RNA(1 μ g)逆转录为 cDNA,RT-PCR 使用 FastStart Universal Probe Master(ROX)(诺唯赞,中国)定量且根据制造商的要求使用 CFX ConnectTM Real-Time 系统(BioRad Laboratories,美国)分析。采用两步法扩增检测 MMP9,CathK,TRAP,CTR 及 GAPDH 的基因水平,RT-PCR 引物序列见表 1。PCR 扩增程序:预变性,94 $^{\circ}$ C,5 min;随后为 94 $^{\circ}$ C,15 s 及 60 $^{\circ}$ C,30 s,分别为 40 个循环,根据制造商的要求按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算靶基因相对于 GAPDH 的表达。

表 1 RT-PCR 引物列表

靶基因	引物序列
TRAP(NM-007388)	5'-ctgctgggacctacaatcat-3'
	5'-ggtagtaagggtctggggag-3'
MMP9(NM-013599)	5'-cgctgtgatccccacttact-3'
	5'-agagtactgcttgcacagga-3'
CathK(NM-007802)	5'-aggcggctatatgacctagt-3'
	5'-ccgagccaagagagcatatc-3'
CTR(NM-007431)	5'-ccatggtagattacgctcaca-3'
	5'-atggaggattccagatacagg-3'
GAPDH(NM-007393)	5'-ttctacaatgagctgcgtgt-3'
	5'-ctcatagctcttctccagg-3'

1.5 蛋白印迹(Western Blot)检测

使用 Western Blot 分析 IL-7 对破骨细胞 JAK,p-JAK,AKT,p-AKT,JNK 及 p-JNK 的蛋白表达。将 RAW264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种于 6 孔细胞培养板,然后再加入 IL-7 刺激,在培养 4 天后的第 0,4,6 及 8 h 收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗涤一次,加入 1.0 mL 含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(赛默飞,美国)的蛋白裂解液提取总蛋白,4 $^{\circ}$ C 震荡裂解 30 min,12 000 r/min 离心,收集上清液。采用 BCA 法(碧云天,中国)对蛋白进行定量,接着加入上样缓冲液,在 100 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min,然后利用 10%的 SDS-PAGE 电泳,电泳程序:80 V,30 min;120 V,60 min。随后采用 100 V,90 min 将聚丙烯酰胺中的蛋白质转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore,美国),用 5%的 BSA 封闭 60 min,TBST 洗涤 5 min/次,5 次,用适当浓度的一抗(JAK,p-JAK,AKT,p-AKT,JNK 及 p-JNK 按 1:1 000 用 BSA 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,接着 TBST 洗涤 5 min/次,5 次,二抗孵育,TBST 洗涤 5 min/次,5 次,加化学发光底物显影检测。

1.6 ELISA 检测

使用 ELISA 检测 IL-7 对破骨细胞骨溶性相关活性蛋白分泌的影响。将 RAW264.7 细胞(1×10^5 个/mL)接种于 24 孔细胞培养板,分为 M-CSF,M-CSF+RANKL,IL-7,IL-7+信号通路抑制剂(AG490,50 μ mol/L;LY294002,10 μ mol/L;SP600125,20 μ mol/L)

组,共6组,在培养后的第4天,收集细胞上清液,分别按照MMP9,CathK,TRAP,CTR的ELISA试剂盒说明书操作,于450 nm处检测吸光度并代入标准曲线计算蛋白浓度。

1.7 统计学方法

所有数据均采用GraphPad Prism 5.0软件分析,结果表示为 $\bar{x} \pm s$, $n=3$,通过单因素方差分析和Dunnett多重比较检验比较数据。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-7体外诱导RAW264.7巨噬细胞分化为破骨细胞

首先用M-CSF,M-CSF+RANKL及IL-7分别

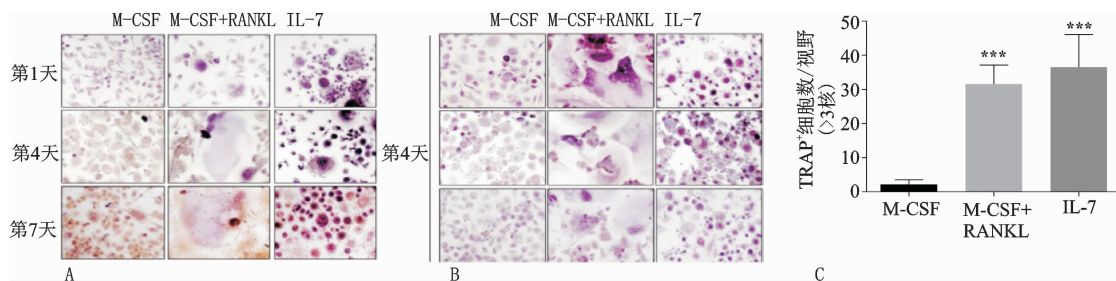


图1 IL-7对RAW264.7巨噬细胞分化形成破骨细胞的影响(与M-CSF组比较,*** $P<0.001$)

2.2 IL-7对破骨细胞溶骨相关活性基因表达的影响

通过RT-PCR检测IL-7对破骨细胞溶骨相关活性基因(包括MMP9,CathK,TRAP及CTR)表达的影响。如图2所示,与M-CSF相比,IL-7组和M-CSF+RANKL组类似,MMP9,CathK,TRAP及CTR的基因表达显著上调。JAK通路抑制剂(AG490)及

JNK通路抑制剂(SP600125)能够抑制IL-7诱导的MMP9,CathK,TRAP及CTR基因表达,而AKT通路抑制剂(LY294002)对IL-7并无拮抗效应。上述结果表明IL-7可能通过JAK和JNK信号通路诱导破骨细胞溶骨相关活性基因的表达。

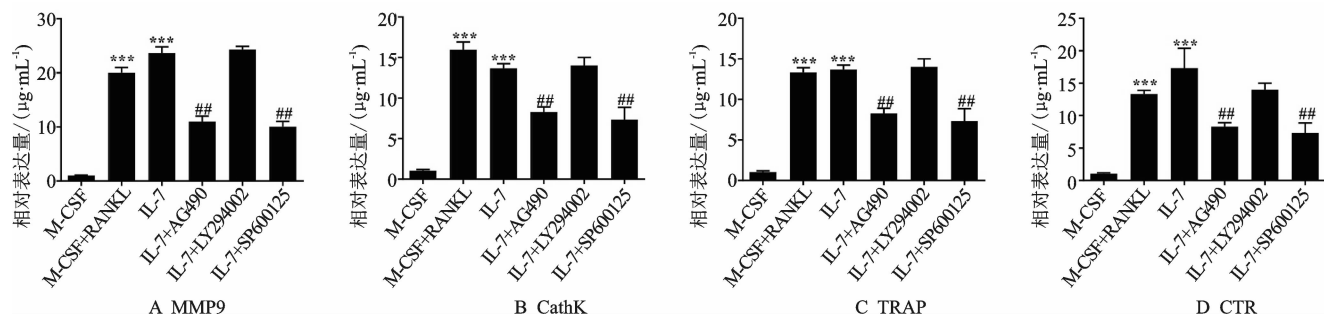


图2 IL-7对破骨细胞溶骨相关活性基因表达的影响(与M-CSF组比较,*** $P<0.001$;与IL-7组比较,## $P<0.01$)

2.3 IL-7对破骨细胞溶骨相关活性蛋白分泌的影响

通过ELISA检测IL-7对破骨细胞溶骨相关活性蛋白(包括MMP9,CathK,TRAP及CTR)分泌的影响。如图3所示,与M-CSF相比,IL-7组和M-CSF+RANKL组类似,MMP9,CathK,TRAP及CTR的蛋白分泌显著上调。JAK通路抑制剂(AG490)与JNK抑制剂(SP600125)能够显著抑制IL-7诱导的MMP9,CathK,TRAP及CTR蛋白分泌,但AKT通路抑制剂(LY294002)对IL-7并无拮抗效应。上述结果表明IL-7可能通过JAK和JNK信号通路诱导破骨细胞溶骨相关活性蛋白的分泌。

2.4 IL-7对破骨细胞JAK,AKT及JNK信号通路的影响

通过Western Blot检测IL-7对破骨细胞JAK,AKT及JNK信号通路蛋白磷酸化的影响。如图4所示,IL-7呈时间依赖性上调JAK的蛋白磷酸化,在第8 h时差异有统计学意义($P<0.01$);IL-7呈时间依赖性上调AKT的蛋白磷酸化,在第4 h时差异有统计学意义($P<0.05$);IL-7呈时间依赖性上调JNK的蛋白磷酸化,在第6 h时差异有统计学意义($P<0.01$)。结果表明IL-7单独处理能够诱导激活JAK,AKT及JNK信号通路。

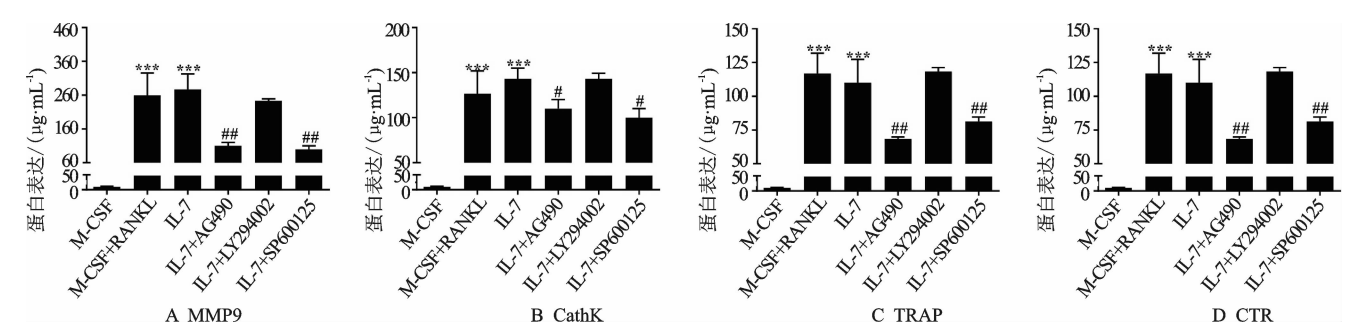


图 3 IL-7 对破骨细胞溶骨相关活性蛋白分泌的影响(与 M-CSF 组比较,*** $P<0.001$;与 IL-7 组比较,## $P<0.01$)

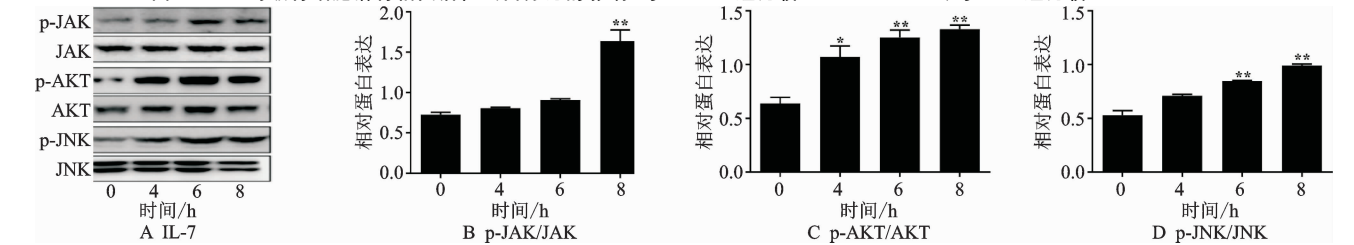


图 4 IL-7 对破骨细胞 JAK,AKT 及 JNK 信号通路的影响(与 0 h 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$)
CathK 及 CTR).

3 讨论

类风湿关节炎(RA)是一种自身免疫性和慢性炎症疾病,其最大的特点是滑膜增生、炎症反应、炎症细胞浸润及基质破坏^[4]。虽然 RA 的具体发病机制依然不清楚,但是多种炎症因子参与 RA 的发病,如肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-6(IL-6)等^[5]。白细胞介素-7(IL-7)是最近发现的一种炎症因子^[6],研究发现类风湿性关节炎患者的血清和关节滑膜液中的 IL-7 水平显著升高^[7],提示 IL-7 在 RA 的发病过程中具有重要作用。有文献研究表明 IL-7 不仅参与早期类风湿性关节炎 Th1 和 Th17 活性相关淋巴细胞的活化和滑膜炎症的形成,而且还能够和核因子- κ B 配体(RANKL)共同诱导破骨细胞的分化形成,致关节破坏和骨侵蚀^[3,8]。上述研究表明 IL-7 可能在破骨细胞的形成方面发挥重要作用,但是 IL-7 能否不依赖于 RANKL 直接促进破骨细胞的分化形成依然未知,因此本研究假设在 RANKL 不存在的情况下 IL-7 能够直接诱导 RAW264.7 巨噬细胞分化形成破骨细胞。

破骨细胞是一类能够降解骨基质的 TRAP⁺多核细胞,其主要来源于单核细胞或巨噬细胞系,在骨代谢过程中发挥着重要的作用^[9]。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 巨噬细胞在巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和 RANKL 的共同作用下分化形成多核破骨细胞^[10]。在破骨细胞的大量研究中,将 RAW 264.7 巨噬细胞作为破骨前体细胞被广泛应用^[8,11,12]。因此,本研究使用 RAW 264.7 巨噬细胞作为细胞模型,M-CSF+RANKL 处理作为阳性对照进行实验。本研究证明 IL-7 能够在 RANKL 不存在的条件下诱导 RAW 264.7 巨噬细胞分化形成破骨细胞,具体表现为 IL-7 诱导 TRAP⁺多核破骨细胞数量显著增加,且显著诱导破骨细胞溶骨相关活性蛋白分泌和基因表达(包括 TRAP, MMP9,

进一步探讨 IL-7 诱导破骨细胞分化形成的相关分子机制。IL-7 与其受体 IL-7R 结合后能够激活 Janus 激酶(JAK),继而活化信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)等相关信号蛋白^[13]。除了上述的经典通路之外,同时有研究表明 IL-7 也能够通过蛋白激酶 B (AKT)信号通路^[12]和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路发挥生物活性^[11]。有研究表明在滑膜液单核细胞中 IL-7 与 RANKL 共同作用通过 STAT3 信号通路诱导破骨细胞的形成^[14]。本研究发现在破骨细胞中 IL-7 能够激活 JAK 信号通路、AKT 信号通路及 JNK 信号通路,但是在培养液中加入信号通路抑制剂后检测破骨细胞骨溶性相关活性蛋白分泌和基因表达,发现只有 JAK 和 JNK 信号通路抑制剂能够拮抗 IL-7 的诱导效应,而 AKT 信号通路抑制剂并无拮抗效应,这表明 IL-7 可能是通过激活 JAK 和 JNK 信号通路,诱导破骨细胞的分化形成及骨溶性相关活性蛋白分泌和基因表达。

综上所述,本研究表明在无 RANKL 的情况下, IL-7 可能是通过激活 JAK 和 JNK 信号通路,诱导 TRAP, CathK, MMP-9 及 CTR 破骨细胞骨溶性相关活性蛋白分泌和基因表达,及 RAW264.7 巨噬细胞分化,形成 TRAP⁺多核破骨细胞,可为进一步研究 IL-7 在类风湿性关节炎骨破坏机制中的作用提供参考。

参考文献

- [1] BOYLE W J, SIMONET W S, LACEY D L. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423 (6937):337-340.
- [2] EL AZREQ M A, ARSENEAULT C, BOISVERT M, et al. Cooperation between IL-7 receptor and integrin α 2 β 1 (CD49b) drives Th17-mediated bone loss[J]. Journal of

- Immunology, 2015, 195(9): 4198-4209.
- [3] WEITZMANN M N, CENCI S, RIFAS L, et al. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines [J]. Blood, 2000, 96(5): 1873-1878.
- [4] SIEBERT S, TSOUKAS A, ROBERTSON J, et al. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases [J]. Pharmacological Reviews, 2015, 67(2): 280-309.
- [5] O'BRIEN W, FISSEL B M, MAEDA Y, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANK) independent osteoclast formation and bone erosion in inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(12): 2889-2900.
- [6] VAN ROON J A, HARTGRING S A, WENTING-VAN WIJK M, et al. Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2007, 66(5): 664-669.
- [7] SHAW A T, GRAVALLESE E M. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2016, 49: 2-10.
- [8] HARTGRING S A Y, WILLIS C R, DINA A, et al. Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators [J]. Arthritis & Rheumatology, 2014, 62(9): 2716-2725.
- [9] KIM J H, KIM E Y, LEE B, et al. The effects of lycii radicle cortex on RANKL-induced osteoclast differentiation and activation in RAW 264.7 cells [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 37(3): 649-658.
- [10] HARTGRING S A, WILLIS C R, BIJLSMA J W, et al. Interleukin-7-aggravated joint inflammation and tissue destruction in collagen-induced arthritis is associated with T-cell and B-cell activation [J]. Arthritis Research & Therapy, 2012, 14(3): R137.
- [11] DELGADOMARTIN C, MEYER L K, HUANG B J, et al. JAK/STAT pathway inhibition overcomes IL7-induced glucocorticoid resistance in a subset of human T-cell acute lymphoblastic leukemias [J]. Leukemia, 2017, 31(12): 2568-2576.
- [12] MALIK A, PAL R, GUPTA S K. Interdependence of JAK-STAT and MAPK signaling pathways during EGF-mediated HTR-8/SVneo cell invasion [J]. Plos One, 2017, 12(5): e0178269.
- [13] KITTIPATARIN C, KHALED A R. Interlinking interleukin-7 [J]. Cytokine, 2007, 39(1): 75-83.
- [14] KIM J H, SIM J H, LEE S, SEOL M A, et al. Interleukin-7 induces osteoclast formation via STAT5, independent of receptor activator of NF-kappaB ligand [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1376.