

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.003

阿仑膦酸钠联合脂多糖引发巨噬细胞炎症反应的机制研究*

杨晓洁 王 晴 王广妃 钮晓勇 艾学民 潘劲松[△]

(上海交通大学附属第一人民医院口腔科 上海 200080)

摘要 目的: 阐明阿仑膦酸钠以及阿仑膦酸钠联合脂多糖引发巨噬细胞炎症反应的分子机制,进一步探究双膦酸盐类药物相关性颌骨坏死发生的相关机制。**方法:** 选取小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 Raw264.7 和小鼠骨髓来源的巨噬细胞 BMDM 作为细胞模型,分为对照组、脂多糖组、阿仑膦酸钠组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组,分别检测 Caspase1、IL-1 β 及 IL-18 的表达水平,用 Western blot 检测 Raw264.7 细胞中 Caspase1 的蛋白水平变化,用流式观察 BMDM 细胞中 Caspase1 荧光强度变化。**结果:** 除了 BMDM 细胞中阿仑膦酸钠联合脂多糖组 IL-1 β 的表达水平相比阿仑膦酸钠组没有增加外($P>0.05$),Raw264.7 和 BMDM 细胞中阿仑膦酸钠联合脂多糖组 Caspase1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均高于对照组($P<0.05$)和阿仑膦酸钠组($P<0.05$)。Raw264.7 细胞中阿仑膦酸钠联合脂多糖组 cleaved Caspase 1 蛋白表达水平最高。BMDM 细胞中阿仑膦酸钠联合脂多糖组 Caspase 1 荧光强度最高。然而加入组蛋白去甲基化酶抑制剂 GSK-J4 后,在 Raw264.7 和 BMDM 细胞中,阿仑膦酸钠联合脂多糖组 Caspase1、IL-1 β 及 IL-18 的 mRNA 表达水平均有下降($P<0.05$)。**结论:** 阿仑膦酸钠联合脂多糖可以加剧阿仑膦酸钠的炎症反应,促进 Caspase1、IL-1 β 及 IL-18 的表达,并在一定程度受到表观遗传的调控,提示感染及炎症因素可能对双膦酸盐类药物相关性颌骨坏死(BRONJ)的发生发展具有促进作用,同时提示我们可以在表观遗传方向寻找治疗 BRONJ 的新靶点。

关键词: 阿仑膦酸钠;脂多糖;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1;白介素 1 β ;双膦酸盐类药物相关性颌骨坏死

中图分类号: R-33;R782.3;R394 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)09-1613-06

Mechanism of Alendronate Sodium Combined with LPS Induced Inflammatory Responses in Macrophages*

YANG Xiao-jie, WANG Qing, WANG Guang-fei, NIU Xiao-yong, AI Xue-min, PAN Jin-song[△]

(Department of Stomatology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of alendronate sodium combined with LPS induced inflammatory responses in macrophages and to further elaborate the mechanism of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws (BRONJ). **Methods:** Select Raw264.7 and bone marrow-derived macrophage (BMDM) as the cell models, which were divided into control group, LPS group, alendronate sodium group and alendronate sodium combined with LPS group respectively. Then we investigated the expressions of Caspase1, IL-1 β and IL-18 in mRNA level. Caspase1 changes were detected with Western blot in Raw264.7, and Caspase1 fluorescence intensity changes were observed through flow cytometry in the BMDM. **Results:** The expressions of Caspase1, IL-1 β and IL-18 in alendronate sodium combined with LPS group were higher than those in control group ($P<0.05$) and alendronate sodium group ($P<0.05$) in mRNA levels except IL-1 β in BMDM cells. The expression of cleaved Caspase 1 in alendronate sodium combined with LPS group was highest in protein level in Raw264.7. Caspase1 fluorescence intensity in alendronate sodium combined with LPS group was highest in BMDM cells. In alendronate sodium combined with LPS group, however the transcription levels of Caspase1, IL-1 β and IL-18 were decreased when exposed to histone demethylase inhibitor GSK-J4 ($P<0.05$). **Conclusions:** Alendronate sodium combined with LPS can aggravate the inflammatory response of alendronate sodium and promote the expressions of Caspase1, IL-1 β and IL-18, which can be regulated by epigenetic alterations. These data suggested that infection and inflammatory factors may play a role in promoting the development of BRONJ and there may be a therapeutic target in epigenetics for BRONJ.

Key words: Alendronate sodium; LPS; Caspase1; IL-1 β ; BRONJ

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R782.3; R394 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)09-1613-06

前言

双膦酸盐类药物(bisphosphonates, BPs)是一种焦磷酸盐非代谢类似物,它能与羟基磷灰石晶体强烈结合并抑制它们的形

* 基金项目:国家自然科学基金项目(11872252)

作者简介:杨晓洁(1992-),女,硕士研究生,研究方向:双膦酸盐类药物性颌骨坏死,E-mail: yxj1432@163.com

[△] 通讯作者:潘劲松(1970-),男,博士生导师,研究方向:正畸相关的力学生物学研究/双膦酸盐类药物性颌骨坏死,

E-mail: pip0003@163.com

(收稿日期:2019-09-30 接受日期:2019-11-04)

成和溶解^[1]。临床上一般用于治疗与骨吸收增加有关的各种疾病,如佩吉特病,多发性骨髓瘤,恶性肿瘤引起的高钙血症,骨质疏松症和肿瘤转移性溶骨性骨病变等,BPs的应用可以减轻患者的疼痛,减少骨折的发生以及新的溶骨性病变的发展,从而改善患者的生活质量^[2]。BPs分为含氮类双膦酸盐类药物(Nitrogen-containing bisphosphonates,NBPs)和非含氮类双膦酸盐类药物(NON-Nitrogen-containing bisphosphonates,NON-NBPs)^[1]。NBPs抑制骨吸收能力更强,但却伴有不良炎症反应,比如发热,急性期蛋白增加,淋巴细胞减少或白细胞减少,胃肠道紊乱,眼炎等^[3,4]。自2003年报道的首例BRONJ病例以来,BRONJ的病例报道逐年增多,国内外学者也进行了相关的研究。其易感因素与NBPs种类,累积的双膦酸盐剂量,治疗持续时间,牙科疾病和侵入性牙科手术、年龄、吸烟、全身系统性疾病等相关^[5]。BRONJ是双膦酸盐类药物临床应用过程中一种严重的并发症,对患者的生存质量有很大的影响^[6]。目前我们对于BRONJ的诊断,分期,危险因素,预防与治疗等都有了进一步深刻的认识,但其确切发病机制仍不明,可能为多因素协同作用,包括正常骨转换率失衡、微血管栓塞、微生物感染、免疫功能障碍、基因多态性等^[7]。

相关研究表明双膦酸盐类药物可对巨噬细胞产生影响,引发其炎症反应^[1],提示BRONJ的发生可能与巨噬细胞相关^[8]。巨噬细胞可对各种炎症刺激和免疫反应产生应答。多种疾病的发生与巨噬细胞密切相关。巨噬细胞中Caspase 1的表达可能与NBPs引发的炎症反应以及BRONJ的发生发展相关^[9]Caspase-1是第一个在哺乳动物细胞中发现的Caspase,它与炎症反应密切相关^[10-12]。巨噬细胞中通过激活Caspase-1释放的蛋白质除前炎症因子IL-1 β 和IL-18外,还包括IL-1 α 、HMGB1(能够招募中性粒细胞引发炎症反应)等。活化Caspase-1后释放的蛋白主要参与炎症、细胞保护和组织修复^[13,14]。此外,Caspase-1还能介导一种炎性细胞死亡(Pyroptosis),当宿主细胞受到外界病原微生物或者内源危险信号刺激时,细胞内的模式受体可识别这些信号,并通过接头蛋白ASC或者直接与pro-caspase-1结合^[15],Caspase-1自剪切激活后可切割GasderminD蛋白,细胞会发生不同于凋亡的程序性细胞死亡,表现为细胞膜穿孔破裂,细胞完整性丧失,释放炎性细胞因子IL-1 β 、IL-18,招募炎症细胞聚集,诱发炎症反应,引起细胞焦亡^[13,16,17]。Caspase 1的表达与活性异常则与多种疾病密切相关^[18,19]。已经报道Caspase 1表达与活性异常与脑梗死、阿尔兹海默症,肌萎缩侧索硬化、心肌梗死、肾脏疾病等有关。因此Caspase-1对于炎症反应至关重要^[20]。

组蛋白修饰作为表观遗传研究的核心热点,已得有不少研究表明组蛋白修饰尤其是甲基化修饰与巨噬细胞的炎症反应密切相关,其中H3K27组蛋白去甲基化酶抑制剂GSK-J4作用于人类原代巨噬细胞可抑制脂多糖诱导的细胞因子的产生,例如致炎的肿瘤坏死因子(TNF)^[21]。然而现今很少有人研究BRONJ中Caspase 1的表达是否与表观遗传的调控相关。因此在本研究中我们除了研究阿仑膦酸钠以及感染因素对巨噬细胞Caspase 1表达及炎症反应的影响外,还将进一步探讨表观遗传因素中组蛋白的甲基化修饰对巨噬细胞Caspase 1表达及

炎症反应的初步调控机制,为治疗BRONJ提出一个新的设想。

1 材料和方法

1.1 材料

RAW264.7小鼠单核巨噬细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司);4周雌性C57BL/6小鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司); α -MEM培养基、DMEM培养基(上海源培);巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(杭州联科生物技术股份有限公司);脂多糖(LPS)(杭州联科生物技术股份有限公司);Alendronate sodium(美国Selleck公司);兔单抗Caspase1(美国CST公司);兔二抗(美国CST公司);cDNA反转录试剂盒(日本Takara公司);Real time PCR试剂盒(日本Takara公司);APC标记的抗小鼠CD11b抗体(美国BD Biosciences公司);PE标记的抗小鼠F4/80抗体(美国BD Biosciences公司);Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)FITC标记兔抗荧光二抗(中国ABclonal Technology公司);GSK-J4(美国Selleck公司)。

1.2 方法

1.2.1 鼠RAW264.7细胞的培养 用含10% FBS的DMEM培养基培养细胞,37℃在CO₂培养箱中进行贴壁培养。等到细胞增殖至70%~80%融合后,弃掉原培养基,加入预冷的磷酸盐缓冲液(PBS),1 mL移液器轻轻吹打培养皿并将细胞悬液转移至15 mL离心管中,放入离心机中1000 r/min离心5 min,弃上清,再用10 mL含10% FBS的DMEM培养基重悬细胞,并接种于培养皿中。

1.2.2 鼠BMDM的提取、培养与鉴定 小鼠麻醉后脱颈处死,用75%乙醇浸泡5 min,对小鼠进行体表消毒杀菌。将小鼠放于已紫外线杀菌的超净台中,用消毒后的手术剪将小鼠两侧大腿取下,剥离其皮肤和肌肉组织,取出股骨与胫骨置于细胞培养皿中,用无菌手术剪剪开股骨上下两侧,用5 mL注射器抽取 α -MEM培养基冲洗骨髓腔,动作轻柔,直到骨髓腔发白为止。对悬液进行离心,离心条件为4℃,1000 rpm,5 min。弃去上清液,向离心管中加入适量红细胞裂解液,吸打混匀后,室温静置1 min,迅速加入PBS中和,4℃ 1000 rpm离心5 min,弃上清。用10 mL α -MEM完全培养液重悬细胞,将细胞均匀接种至细胞培养皿中,加入M-CSF使其终质量浓度为50 ng/mL,37℃在CO₂培养箱条件下培养3天后加入含50 ng/mL M-CSF的 α -MEM完全培养液5 mL,再继续培养至7天后更换新鲜培养基,得到分化完全的小鼠骨髓来源的巨噬细胞。

将上步所得贴壁细胞弃掉原培养基,PBS清洗两次后,加入预热的0.25%胰酶消化液,待消化完全加入等体积 α -MEM完全培养液终止消化,将吹打混匀后的细胞悬液转移至15 mL离心管中并放入离心机中以4℃ 1000 rpm 5 min的条件进行离心,弃上清,用 α -MEM完全培养液重悬细胞并用血细胞计数板计数。加入PE标记的抗小鼠F4/80抗体,APC标记的抗小鼠CD11b抗体,在4℃下孵育30 min,避光,4%多聚甲醛固定20 min,PBS漂洗2遍,用流式细胞仪鉴定所诱导的F4/80阳性以及CD11b阳性的巨噬细胞占总细胞的百分比。

1.2.3 蛋白免疫印迹检测(Western blot) 采用Western blot检测RAW264.7细胞不同处理组中Caspase1蛋白的表达,阿仑膦酸钠组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组先用100 μ M阿仑

磷酸钠处理 48 h, 脂多糖组及阿仑膦酸钠联合脂多糖组用 200 ng/mL LPS 后续处理 6 h。用全细胞裂解液提取总蛋白, 105℃加热 15 min 使蛋白变性; 使用 BCA 法进行蛋白浓度测定, 取 50 μg 蛋白上样进行电泳, 电转, 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, 4℃下一抗孵育过夜, 次日, TBST 洗膜后, 二抗孵育 1 h, 洗后显色, 底物与辣根过氧化物酶作用后显影。

1.2.4 Real Time-PCR 将细胞接种于 24 孔板, 阿仑膦酸钠

组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组先用 100 μM 阿仑膦酸钠处理 24 h, 脂多糖组及阿仑膦酸钠联合脂多糖组用 200 ng/mL LPS 后续处理 6 h 收获细胞, 使用 Trizol, 氯仿, 异丙醇, 乙醇等提取总信使核糖核酸(mRNA), 接着逆转成与 mRNA 链呈互补的碱基序列的单链 DNA(cDNA)并进行 real time PCR, 所用引物由上海生工生物工程公司进行设计与合成, 序列见表 1。PCR 的产物按计算公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequences

Genes	Sequences
β actin	F CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	R CTCCTTAATGTCACGCACGAT
Caspase 1	F AATACAACCACTCGTAC
	R AGCTCCAACCCTCGGAG
IL-1β	F GCAACTGTTCTGAACTCAACT
	R ATCTTTTGGGGTCCGTCACCT
IL-18	F GACTCTTGCGTCAACTTCAAGG
	R CAGGCTGTCTTTTGTCACGA

1.2.5 Caspase-1 活性测定 阿仑膦酸钠组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组先用 100 μM 阿仑膦酸钠处理 48 h, 脂多糖组及阿仑膦酸钠联合脂多糖组用 200 ng/mL LPS 后续处理 6 h。消化细胞后收集细胞, 加入 Caspase-1 一抗稀释液冰浴 15 min。为了通过流式细胞术定量 BMDM 中 Caspase-1 的活性, 加入 PE 标记的抗小鼠 F4/80 抗体, APC 标记的抗小鼠 CD11b 抗体, FITC 标记的 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 在 4℃下孵育 30 min, 避光, 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗 2 遍, 用流式细胞仪检测 Caspase-1 荧光强度。

1.3 统计学分析

统计学处理采用 GraphPad Prism7.0 统计学软件进行统计学处理。计量资料以 mean±SEM 表示, 组间比较采用单因素方差分析以及双因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用对 RAW264.7 细胞中 Caspase1, IL-1β 及 IL-18 表达的影响

在本研究中, 与对照组相比, 脂多糖组 Caspase1 表达没有增加 ($P > 0.05$), 阿仑膦酸钠组 Caspase1 表达增加 ($P < 0.001$), 脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 Caspase1 表达最高 ($P < 0.0001$) (图 1A); 与对照组相比, 脂多糖组 IL-1β 表达没有增加 ($P > 0.05$), 阿仑膦酸钠组 IL-1β 表达增加 ($P < 0.05$), 脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 IL-1β 表达最高 ($P < 0.001$) (图 1B); 与对照组相比, 脂多糖组 IL-18 表达没有增加 ($P > 0.05$), 阿仑膦酸钠组 IL-18 表达增加 ($P < 0.01$), 脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 IL-18 表达最高 ($P < 0.0001$) (图 1C)。

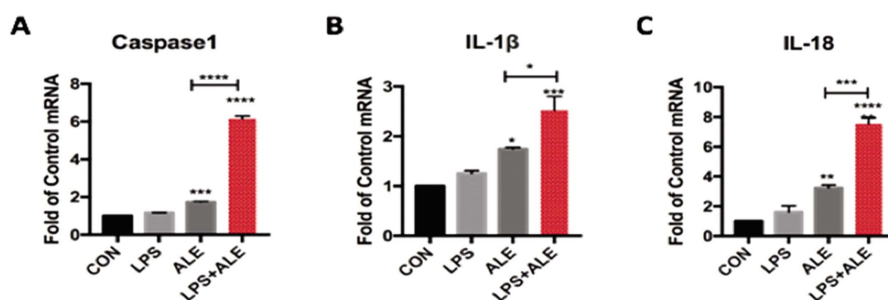


图 1 RAW264.7 细胞各处理组中 Caspase1, IL-1β 及 IL-18 的表达水平

Fig.1 The expression levels of Caspase1, IL-1β and IL-18 in RAW264.7 cells in different treatment groups

Note: Data are expressed as mean±SD, n=3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with CON group.

2.2 脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用对 RAW264.7 细胞中 Caspase1 蛋白表达的影响

Caspase 1 被激活后会发生一个自我剪切, 其中 cleaved Caspase 1 为 Caspase 1 发挥活性功能部分。在本实验中, 脂多糖组、阿仑膦酸钠组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组 cleaved Caspase 1 表达都有增加, 其中脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用

组 cleaved Caspase1 表达最高(图 2)。

2.3 GSK-J4 对于 RAW264.7 细胞中脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用组中 Caspase1, IL-1β 及 IL-18 表达的影响

在本研究中, 对照组中加入 GSK-J4 后 Caspase 1 表达下降 ($P < 0.0001$), IL-1β 和 IL-18 表达没有下降 ($P > 0.05$); 脂多糖组加入 GSK-J4 后 Caspase 1 和 IL-1β 表达下降 ($P < 0.0001$), IL-18

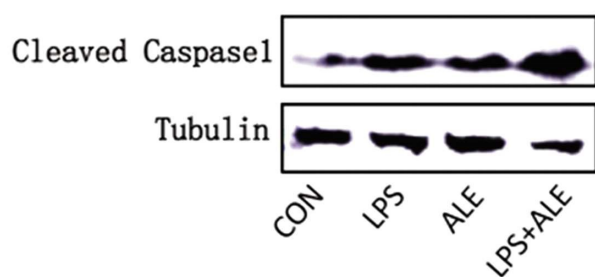


图2 Western Blot 检测 RAW264.7 细胞各处理组中 Caspase1 蛋白水平变化

Fig.2 Changes in Caspase1 protein levels in in different treatment groups by Western Blot

表达没有下降($P>0.05$);阿仑膦酸钠组加入 GSK-J4 后 Caspase 1 表达下降($P<0.0001$),IL-18 表达下降($P<0.001$),IL-1 β 表达没有下降($P>0.05$);脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组加入 GSK-J4

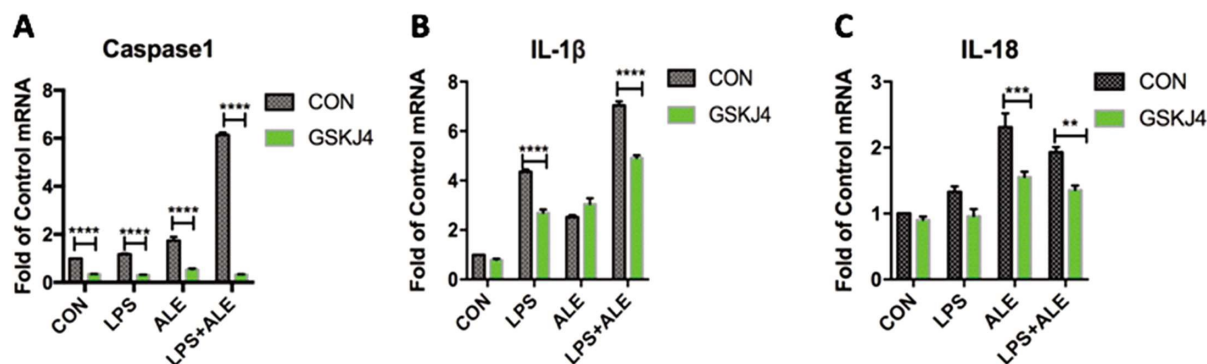


图3 GSK-J4 对 RAW264.7 细胞各处理组中 Caspase1,IL-1 β 及 IL-18 表达水平的影响

Fig.3 The influence of GSK-J4 on the expression levels of Caspase1, IL-1 β and IL-18 in RAW264.7 cells in different treatment groups

Note: Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n=3. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

2.5 脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用对 BMDM 细胞中 Caspase1 荧光表达的影响

在本研究中,与对照组相比,脂多糖组、阿仑膦酸钠组以及阿仑膦酸钠联合脂多糖组 Caspase-1 荧光强度都有增加。对照组 Caspase1 平均荧光强度为 141, 脂多糖组 Caspase1 平均荧光强度为 204, 阿仑膦酸钠组 Caspase1 平均荧光强度为 362, 脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组平均荧光强度最高为 449(图 5)。

2.6 GSK-J4 对 BMDM 细胞中脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用组中 Caspase1,IL-1 β 及 IL-18 表达的影响

在本研究中,对照组中加入 GSK-J4 后 Caspase 1,IL-1 β 和 IL-18 表达没有下降($P>0.05$);脂多糖组加入 GSK-J4 后 Caspase 1 和 IL-1 β 表达没有下降 ($P>0.05$),IL-18 表达下降($P<0.0001$);阿仑膦酸钠组加入 GSK-J4 后 Caspase 1 表达没有下降($P>0.05$),IL-1 β 表达下降($P<0.01$) IL-18 表达下降($P<0.001$);脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组加入 GSK-J4 后 Caspase 1 和 IL-18 表达下降($P<0.0001$),IL-1 β 表达下降($P<0.05$)(图 6ABC)。

3 讨论

BRONJ 作为双膦酸盐类药物的严重并发症,许多学者都对其发病机制进行了不同的探讨。目前关于 BRONJ 的细菌感

后 Caspase 1,IL-1 β 和 IL-18 表达都下降 ($P<0.0001$)(图 3ABC)。

2.4 脂多糖、阿仑膦酸钠以及两者联合应用对 BMDM 中 Caspase1,IL-1 β 及 IL-18 表达的影响

从小鼠中提取培养 BMDM 并用流式细胞仪鉴定所诱导的 F4/80 阳性以及 CD11b 阳性的巨噬细胞占总细胞的百分比为 63.35%(图 4A)。在本研究中,与对照组相比,脂多糖组以及阿仑膦酸钠组 Caspase1 表达增加($P<0.05$),脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 Caspase1 表达最高($P<0.001$)(图 4B);与对照组相比,脂多糖组 IL-1 β 表达没有增加($P>0.05$),阿仑膦酸钠组以及脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 IL-1 β 表达增加 ($P<0.01$)(图 4C);与对照组相比,脂多糖组表达没有增加($P>0.05$),阿仑膦酸钠组 IL-18 表达增加($P<0.0001$),脂多糖及阿仑膦酸钠联合应用组 IL-18 表达最高($P<0.0001$)(图 4D)。

染学说越来越受到学者们的重视。Tetsuya Ikeda 等研究表明,临床上处于 stage 2 和 stage 3 的 BRONJ 患者在接受西他沙星抗生素治疗后 95%的病人达到了缓解或者治愈^[2]。Toyosawa 医生^[23]在一 BRONJ 患者坏死骨切片中发现有放线菌聚集,猜测放线菌可能与 BRONJ 的发生有一定关系。早期报导的 BRONJ 病例通常伴有牙齿的拔除,但这些牙齿往往伴有牙周或者根尖周疾病^[24]。这些都证明细菌感染可能是引起 BRONJ 的因素之一。在临床上,根据 2014 年 AAOMS 对 MRONJ 的风险分期以及治疗策略,局部抗菌漱口水以及系统性抗生素已经应用于治疗之中,这也证实致病微生物在 BRONJ 中起一定的作用。

为了进一步探讨双膦酸盐类药物以及感染因素对巨噬细胞诱发炎症反应的影响,在本实验中我们用阿仑膦酸钠以及脂多糖对 RAW264.7 巨噬细胞以及小鼠原代 BMDM 分别进行刺激,我们发现阿仑膦酸钠刺激巨噬细胞能够促进 Caspase 1 表达的上调,IL-1 β 和 IL-18 的表达也有增加,同时我们发现当我们联合阿仑膦酸钠以及脂多糖去刺激巨噬细胞后,RAW264.7 巨噬细胞中 Caspase 1,IL-1 β 和 IL-18 的表达水平以及小鼠原代 BMDM 中 Caspase 1 和 IL-18 的表达水平都高于阿仑膦酸钠单独用药组。这些研究结果提示感染及炎症因素可能对 BRONJ 的形成和发展具有促进作用。临床上 BRONJ 单独发生于颌骨可能也与口腔独特的微生物环境有关。

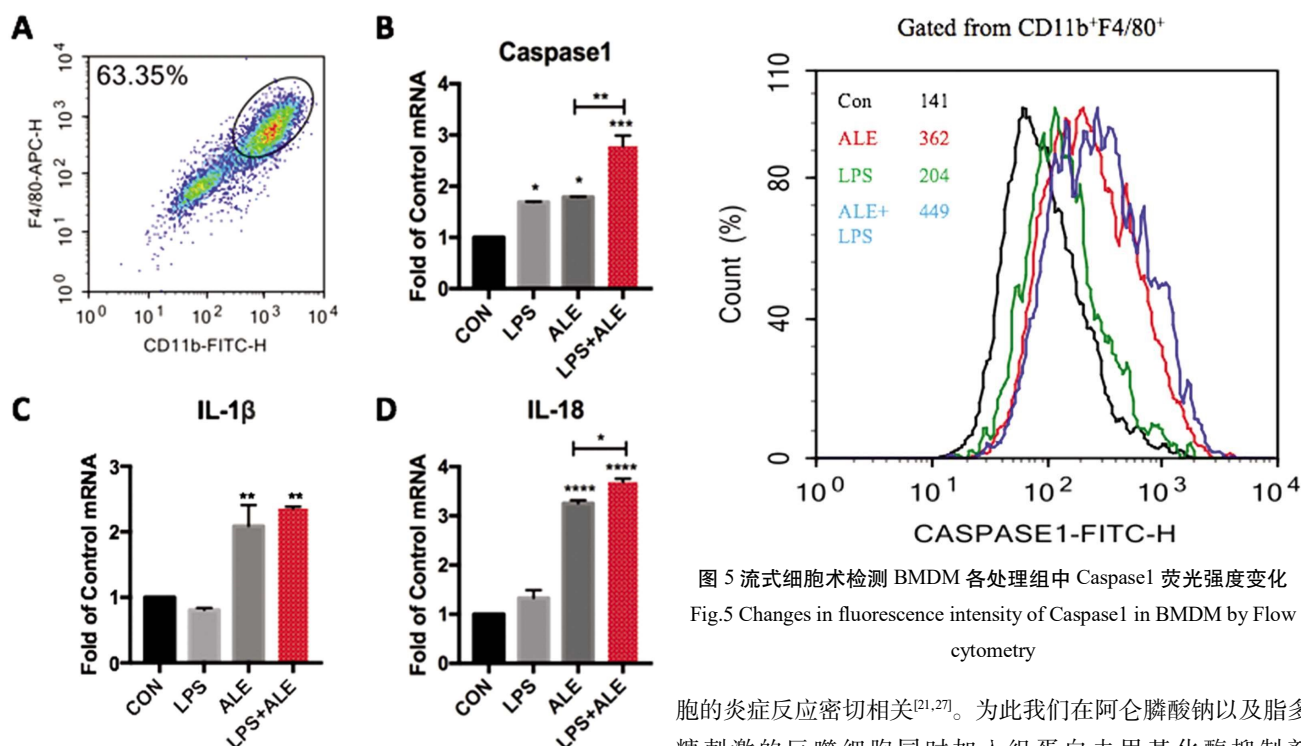


图5 流式细胞术检测 BMDM 各处理组中 Caspase1 荧光强度变化
Fig.5 Changes in fluorescence intensity of Caspase1 in BMDM by Flow cytometry

图4 BMDM 各处理组中 Caspase1, IL-1β 及 IL-18 的表达水平
Fig.4 The expression levels of Caspase1, IL-1β and IL-18 in BMDM in different treatment groups

Note: Data are expressed as mean±SD, n=3. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, compared with CON group.

阿仑膦酸钠联合脂多糖可促进 Caspase 1 表达上调, Caspase 1 作为一种炎性 Caspase,不仅可以剪切 IL-1β 和 IL-18 使其成熟发挥生物学功能,还能参与经典焦亡途径,剪切 GasderminD 蛋白,促进炎症因子释放,诱发炎症反应^[19]。IL-1β 作为一种内源性热原,是发热反应的关键参与者,同时在应对感染,损伤和免疫时会产生局部和全身反应,并参与急性和慢性炎症过程^[25]。IL-18 可参与抗感染、炎症反应等多种过程^[26]。寻找调控 Caspase 1 等炎症因子的机制或许可以为治疗 BRONJ 提供新的思路。相关研究表明组蛋白的去甲基化修饰与免疫细

胞的炎症反应密切相关^[21,27]。为此我们在阿仑膦酸钠以及脂多糖刺激的巨噬细胞同时加入组蛋白去甲基化酶抑制剂 GSK-J4,探究表观遗传是否可以参与调控阿仑膦酸钠引发的炎症反应。根据我们的研究结果我们发现 GSK-J4 仅降低了阿仑膦酸钠、脂多糖单独用药组部分炎症因子的表达水平,但是对于阿仑膦酸钠联合脂多糖组, GSK-J4 加入后,所有 Caspase 1, IL-1β 和 IL-18 的表达水平都有不同程度的下降。这些提示我们组蛋白的去甲基化修饰可以调控阿仑膦酸钠联合脂多糖刺激巨噬细胞引发的炎症反应,为我们研究治疗 BRONJ 的方向提供一个新思路。

综上所述,阿仑膦酸钠联合脂多糖刺激巨噬细胞引起 Caspase 1 上调及炎症因子表达增高,表观遗传学中组蛋白的甲基化修饰参与调控了这一炎症过程。这在一定程度上阐明了 BRONJ 的形成和发展的可能原因。但 BRONJ 为何仅发生于颌骨以及如何有效预防及治疗 BRONJ 仍存在诸多未知,其具体机制仍需进一步探讨。

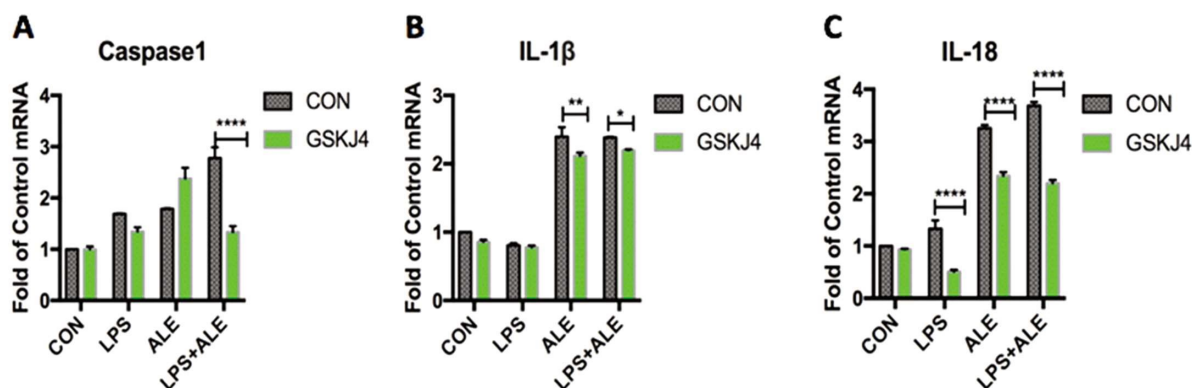


图6 GSK-J4 对 BMDM 细胞各处理组中 Caspase1, IL-1β 及 IL-18 表达水平的影响
Fig.6 The influence of GSK-J4 on the expression levels of Caspase1, IL-1β and IL-18 in BMDM in different treatment groups

Note: Data are expressed as mean±SEM, n=3. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

参考文献(References)

[1] Endo Y, Kumamoto H, Nakamura, et al. Underlying mechanisms and

therapeutic strategies for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(6): 739-750

- [2] Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases [J]. *J of Oral Maxillofac Surg*, 2004, 62(5): 527-534
- [3] Deng X, Tamai R, Endo Y, et al. Alendronate augments interleukin-1 β release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 235(1): 97-104
- [4] Kim S, Williams DW, Lee C, et al. IL-36 induces bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like lesions in mice by inhibiting TGF- β -mediated collagen expression[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(2): 309-318
- [5] Mucke T, Krestan CR, Mitchell DA, et al. Bisphosphonate and medication-related osteonecrosis of the jaw: A Review [J]. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2016, 20(3): 305-314
- [6] Soundia A, Hadaya D, Esfandi N, et al. Osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice after extraction of teeth with periradicular disease[J]. *Bone*, 2016, 90: 133-141
- [7] Li MY, Wang SY. Mechanism and risk assessment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw[J]. *Stomatology*, 2017, 37(9): 849-853
- [8] Hoefert S, Schmitz I, Weichert F, et al. Macrophages and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): evidence of local immunosuppression of macrophages in contrast to other infectious jaw diseases[J]. *Clin Oral Investig*, 2015, 19(2): 497-508
- [9] Zhang Q, Yu W, Lee S, et al. Bisphosphonate induces osteonecrosis of the jaw in diabetic mice via NLRP3/Caspase-1-dependent IL-1 β mechanism[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(12): 2300-12
- [10] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1312-6
- [11] Zhu Y, Jiang J, Said-Sadier N, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by vault nanoparticles expressing a chlamydial epitope [J]. *Vaccine*, 2015, 33(2): 298-306
- [12] Russo HM, Rathkey J, Boyd-Tressier A, et al. Active Caspase-1 induces plasma membrane pores that precede pyroptotic lysis and are blocked by lanthanides[J]. *J Immunol*, 2016, 197(4): 1353-1367
- [13] Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, et al. Caspase-1: the inflammasome and beyond[J]. *Innate Immun*, 2014, 20(2): 115-25
- [14] Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia [J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 4385-92
- [15] Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2091
- [16] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-8
- [17] Gutierrez KD, Davis MA, Daniels BP, et al. MLKL activation triggers NLRP3-mediated processing and release of IL-1 β independently of Gasdermin-D[J]. *J Immunol*, 2017, 198(5): 2156-2164
- [18] Guo H, Callaway JB, Ting JP, et al. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics[J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-687
- [19] Shi J, Gao W, Shao F, et al. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254
- [20] Man SM, Karki R, Briard B, et al. Differential roles of caspase-1 and caspase-11 in infection and inflammation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45126
- [21] Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 404-8
- [22] Ikeda T, Kuraguchi J, Kogashiwa Y, et al. Successful treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) patients with sitafloxacin: new strategies for the treatment of BRONJ[J]. *Bone*, 2015, 73: 217-22
- [23] Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, et al. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: position paper 2017 of the Japanese Allied Committee on osteonecrosis of the jaw[J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(1): 6-19
- [24] Kishimoto H, Noguchi K, Takaoka K. Novel insight into the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2019, 55(1): 95-102
- [25] Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, et al. Role for NLRP3 Inflammasome-mediated, IL-1 β -dependent responses in severe, steroid-resistant asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(3): 283-297
- [26] Liu C, Chen J, Liu B, et al. Role of IL-18 in transplant biology[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2018, 29(2): 48-51
- [27] Cribbs A, Hookway ES, Wells G, et al. Inhibition of histone H3K27 demethylases selectively modulates inflammatory phenotypes of natural killer cells[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(7): 2422-2437

(上接第 1612 页)

- [28] Lai H, Jia X, Yu Q, et al. High-fat diet induces significant metabolic disorders in a mouse model of polycystic ovary syndrome [J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(5): 127
- [29] Divyashree S, Janhavi P, Ravindra PV, et al. Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update[J]. *Life Sci*, 2019, 237: 116911
- [30] Ryu Y, Kim SW, Kim YY, et al. Animal Models for Human Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Focused on the Use of Indirect Hormonal Perturbations: A Review of the Literature [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): pii: E2720
- [31] Lim SS, Davies MJ, Norman RJ, et al. Overweight, obesity and central obesity in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Hum Reprod Update*, 2012, 18(6): 618-37