doi:10.11659/jjssx.03E024159

·基础研究·

白细胞介素-9诱导破骨细胞分化在包虫病骨侵蚀中的机制研究

吾路汗·马汗,谢增如 (新疆医科大学第一附属医院创伤骨科,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘 要] **目的** 探讨白细胞介素-9(IL-9)在骨包虫病骨囊性组织浸润性生长中的作用及其分子机制。**方法** 收集8例骨包虫病患者累及骨囊性组织的石蜡切片,选择8例骨关节炎患者患病膝关节组织石蜡切片作为对照。qPCR测定骨囊性组织和骨关节炎骨组织中IL-9 mRNA表达水平。将RAW264.7细胞分为Undifferentiation组(Group 1)、MCSF组(Group 2)、MCSF+RANKL组(Group 3)、MCSF+RANKL+包虫抗原B组(Group 4)、MCSF+RANKL+IL-9组(Group 5)。qPCR法测定各组细胞中TRAP和cathepsin K mRNA表达水平。Western blot法测定各组细胞中p-p65、p65、活化T-细胞核因子1(NFATc1)、磷酸化-信号转导与转录激活因子3(p-STAT3)、信号转导与转录激活因子3(STAT3)、磷酸化-细胞外调节蛋白激酶1/2(p-ERK1/2)、细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)的表达水平。**结果** 与骨关节炎骨组织相比,骨囊性组织中IL-9 mRNA表达水平更高($P<0.05$)。与Group 1相比,Group 2、Group 3、Group 4、Group 5细胞中TRAP和cathepsin K mRNA表达水平均升高($P<0.05$),p-p65、p-STAT3和p-ERK1/2水平以及NFATc1的表达水平均升高($P<0.05$);与Group 3相比,Group 5上述检测指标均升高($P<0.05$)。**结论** IL-9在骨囊性组织中表达升高,并通过上调核因子-κB(NF-κB)/STAT3/ERK1/2信号通路增强诱导破骨细胞分化,可能在骨包虫病的骨侵蚀中发挥重要作用。

[关键词] 骨包虫病;白细胞介素-9;破骨细胞;NF-κB/NFATc1/RANKL/RANK;STAT3/ERK1/2

[中图分类号] R329.28;R532.32 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-03-28

Mechanism of interleukin-9-induced osteoclast differentiation in bone erosion of cystic echinococcosis

Wuluhan·Mahan, XIE Zeng-ru (Department of Traumatic Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the role of interleukin-9 (IL-9) in the invasive growth of bone cystic tissue with cystic echinococcosis and its molecular mechanisms. **Methods** Paraffin sections of bone cystic tissues from 8 patients with cystic echinococcosis were collected, and paraffin sections of affected knee joint tissues from 8 patients with osteoarthritis were selected as controls. qPCR was used to detect the expression levels of IL-9 mRNA in bone cystic tissues and osteoarthritis bone tissues. RAW264.7 cells were divided into the Undifferentiation group (Group 1), the MCSF group (Group 2), the MCSF+RANKL group (Group 3), the MCSF+RANKL+ echinococcosis antigen B group(Group 4), and the MCSF+RANKL+IL-9 group (Group 5). qPCR was used to detect the expression levels of TRAP and cathepsin K mRNA in cells of each group. Western blot was used to detect the expression levels of p-p65, p65, nuclear factor of activated T-cells 1 (NFATc1), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3(p-STAT3), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2(p-ERK1/2) and extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2) in cells of each group. **Results** The expression level of IL-9 mRNA was higher in bone cystic tissues than that in osteoarthritis bone tissues ($P<0.05$). Compared with Group 1, the expression levels of TRAP and cathepsin K mRNA in Group 2, Group 3, Group 4 and Group 5 were significantly increased ($P<0.05$), as well as the levels of p-p65, p-STAT3 and p-ERK1/2, and the expression levels of NFATc1 ($P<0.05$); Compared with Group 3, the above indexes in Group 5 were all increased ($P<0.05$). **Conclusion** The expression level of IL-9 is up-regulated in bone cystic tissues, and it enhances the induction of osteoclast differentiation by up-regulating the nuclear factor-κB (NF-κB)/STAT3/ERK1/2 signaling pathway, which may play an important role in bone erosion of bone echinococcosis.

Keywords: cystic echinococcosis of the bone; interleukin-9; osteoclast; NF-κB/NFATc1/RANKL/RANK; STAT3/ERK1/2

囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis,CE),通常称为包虫病,是由细粒棘球绦虫的幼虫引起的一种全球范围内广泛存在的地方性寄生虫病[1]。在CE患者中,肌肉骨骼受累,称为骨囊型包虫病,简称骨包虫病,发病率为0.5%~4.0%,其中半数患者发生在脊柱[1-2]。脊柱CE见于所有年龄组,男女均可发病,常导致脊柱、骨盆变形、下肢瘫痪等,甚至死亡。骨包虫病的临床治疗首选根治性手术切除联合化疗,但术后复发率高达40%[3]。

CE的原头节侵入机体后,通常通过血液循环寄生

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2021D01D19)

[通信作者] 谢增如,E-mail:xiezengru@163.com

于肝、肺、脾、脑、骨骼、淋巴结和肌肉中的多个位置。骨包虫病形成的骨囊肿多见于松质骨,其沿松质骨的骨道等阻力较小的微结构向多个方向侵犯、侵蚀并取代骨小梁,然后破坏并突破骨皮质。增大的CE包囊阻塞滋养骨骼的血管,引起骨骼缺血性坏死。CE包囊还可直接激活破骨细胞,引起生理性骨溶解。这种囊肿导致的骨破坏还伴随神经和关节感染、软组织浸润及瘘管形成[4]。其中破骨细胞被高度活化并介导病理性骨溶解,是CE包囊侵犯骨组织的重要病理生理过程。而核因子-κB受体配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand,RANKL)/核因子-κB受体(receptor activator of nuclear factor-κB,RANK)是介导单核/巨噬细胞系细胞向破骨细胞分化、激活破骨细胞所必需的[5]。白细胞介素-9(interluekin-9,IL-9)在过敏反应、寄生虫免疫中起着重要的作用[6-7]。研究发现,IL-9在类风湿性关节炎和银屑病关节炎等自身免疫性疾病中也起着重要的作用[6,8]。本研究首先以骨关节炎患者骨组织作对照,检测骨包虫病累及骨囊性组织样本中IL-9 mRNA的表达水平;再通过体外诱导单核/巨噬细胞,探讨IL-9在包虫感染引起的炎症、骨侵蚀和骨溶解过程中所起的作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠单核/巨噬细胞RAW264.7细胞购自武汉普诺赛生物。RNAprep Pure石蜡包埋组织切片总RNA提取试剂盒(批号:D4390751)、FastKing一步法RT-PCR试剂盒(批号:K1232563)、FastKing一步法反转录荧光定量试剂盒(SYBR Green;批号:F3134308)购自北京天根生化。引物委托上海生工生物代为设计和合成。兔抗小鼠p-p65单抗(批号:A15354627)、p65多抗(批号:A05153614)、活化T-细胞核因子1(nuclear factor of activated T-cells 1,NFATc1)单抗(批号:A32648687)、磷酸化-信号转导与转录激活因子3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3,p-STAT3)单抗(批号:A90324150)、信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)单抗(批号:A42013052)、磷酸化-细胞外调节蛋白激酶1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2,p-ERK1/2)单抗(批号:A19082345)、细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)单抗(批号:A13145256)、GAPDH单抗(批号:A31940536)、HRP-标记山羊抗兔IgG二抗(批号:G17456325)购自美国Thermo Fisher。重组人巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor,MCSF;批号:H35476)、重组人RANKL(批号:T13257)、重组人IL-9(批号:S25264)购自美国Sigma-Aldrich。

1.2 患者临床信息

8例骨包虫病患者累及骨囊性组织样本来自我院组织病理科,经组织病理学和血清学(血清ELISA检测包虫抗原阳性)确诊为骨包虫病,对经手术切除的累及骨部位的囊性组织进行石蜡切片。选择8例骨关节炎患者膝关节置换手术摘除的患膝关节组织进行石蜡切片作为对照。患者临床信息见表1。所有临床样本用于探索性实验,均通过我院临床伦理委员会批准(批准号:20220117032)。

表1 患者临床信息

项目	骨包虫病患者	骨关节炎患者
男性(%)	87.5	25.0
年龄(岁)	60.0	55.5
症状持续时间(月)	55.5	44.5
累及软组织(%)	100	
复发(%)	100	

1.3 qPCR

使用RNAprep Pure石蜡包埋组织切片总RNA提取试剂盒提取总RNA。使用FastKing一步法RT-PCR试剂盒反转录合成cDNA。使用FastKing一步法反转录荧光定量试剂盒(SYBR Green)进行qPCR扩增。IL-9正向引物5′-GCGAGCTCCAGTCCGCTGTC-3′,反向引物5′-TGATGAGGAAGTTGATGTC-3′;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase,TRAP)正向引物5′-CTCCCCGATCTGCGGCCAC-3′,反向引物5′-CTGACCCAATCATCTGGGTG-3′;cathepsin K正向引物5′-GAAACGAAGCCAGACAACAG-3′,反向引物5′-CTTCCATAGCTCCCAGTGG-3′;GAPDH正向引物5′-GGTAGAGCGGCCGCCATGT-3′,反向引物5′-CAGCTAGCCTCGCTCCACCT-3′。

1.4 细胞培养

RAW264.7细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM完全培养液中,置于含5%CO_2的37 ℃恒温、湿润的细胞孵育箱中维持培养。2~3 d传代1次,每次以1∶20的比例传代。

1.5 细胞实验分组和处理方式

细胞实验分组:①Undifferentiation组(Group 1),细胞不做任何处理;②MCSF组(Group 2),加入25 ng/mL MCSF;③MCSF+RANKL组(Group 3),加入25 ng/mL MCSF和50 ng/mL可溶性RANKL;④MCSF+RANKL+

包虫抗原B组(Group 4),加入25 ng/mL MCSF、50 ng/mL可溶性RANKL和50 ng/mL包虫抗原B;⑤MCSF+RANKL+IL-9组(Group 5),加入25 ng/mL MCSF、50 ng/mL可溶性RANKL和50 ng/mL重组人IL-9。上述②~⑤组连续处理6 d,每隔72 h换液一半,分别补充含MCSF、可溶性RANKL、包虫抗原B或重组人IL-9的新鲜培养液[9-10]。处理结束后,采用qPCR法测定破骨细胞分化标志物TRAP和cathepsin K mRNA的表达水平。

1.6 重组包虫抗原B的制备

参考文献[11]采用大肠杆菌原核表达系统人工表达制备重组包虫抗原B。制备方法:使用pMal-c2x载体表达融合蛋白rHA-B-MBP;加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导大肠杆菌过夜表达重组蛋白;使用直链淀粉树脂层析柱制备rHA-B蛋白纯化产物,经SDS-PAGE凝胶电泳检测蛋白纯度后,于4 ℃冷藏备用,或置于-20 ℃长期保存。

1.7 Western blot

于6孔板细胞培养物中加入1 mL含磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞。提取总蛋白后,按照标准流程跑SDS-PAGE凝胶电泳和半干转印法将PAGE凝胶中的蛋白电转印至PVDF膜上。加入5%脱脂奶粉常温封闭PVDF膜1 h。加入一抗工作液,于4 ℃与膜共同孵育过夜;次日,加入二抗工作液,室温下与膜共同孵育1 h。使用超敏ECL化学发光底物对目的条带进行显影。采用Image J v1.8.0软件分析目的蛋白条带灰度值。靶蛋白条带相对定量灰度值=靶蛋白条带灰度值÷内参GAPDH条带灰度值。磷酸化的靶蛋白条带相对定量灰度值=磷酸化的靶蛋白条带灰度值÷未磷酸化的靶蛋白条带灰度值。抗体工作液稀释度如下:兔抗小鼠p-p65(1∶1 000)、p65(1∶1 500)、NFATc1(1∶2 000)、p-STAT3(1∶1 000)、STAT3(1∶1 500)、p-ERK1/2(1∶1 000)、ERK1/2(1∶2 000)、GAPDH(1∶1 500)、HRP-标记山羊抗兔IgG二抗(1∶5 000)。

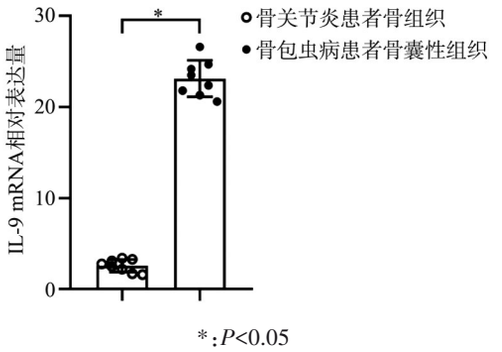
1.8 统计学方法

使用GraphPad Prism v8统计学软件对数据进行处理。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨包虫病累及骨囊性组织IL-9水平上调

骨包虫病患者骨囊性组织中IL-9 mRNA表达水平高于骨关节炎患者骨组织,差异有统计学意义(P<0.05),见图1。

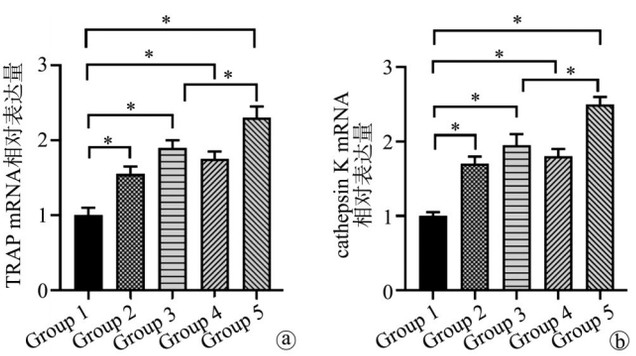


*:P<0.05

图1 qPCR法测定骨关节炎患者骨组织和骨包虫病患者骨囊性组织中IL-9 mRNA水平

2.2 包虫抗原B和IL-9均能诱导单核/巨噬细胞向破骨细胞分化

与Group 1比,Group 2、Group 3、Group 4、Group 5细胞中TRAP和cathepsin K mRNA的表达水平均升高(P<0.05)。与Group 3相比,Group 5细胞中TRAP和cathepsin K mRNA的表达水平均升高(P<0.05),见图2。



a:TRAP mRNA表达水平;b:cathepsin K mRNA表达水平

*:P<0.05

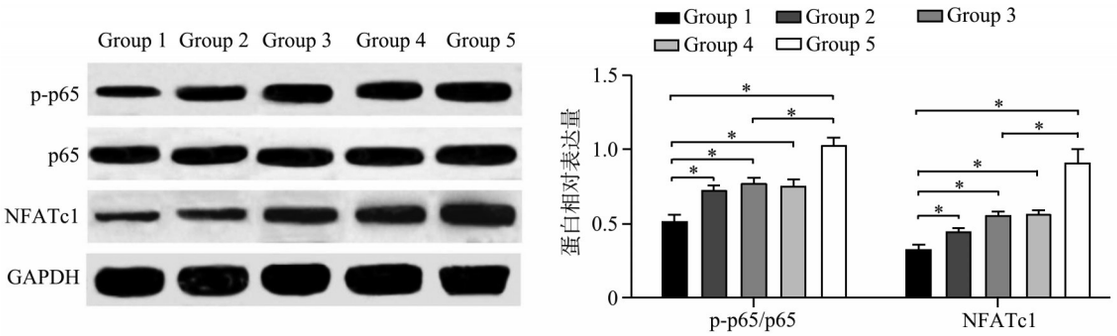
图2 单核/巨噬细胞向破骨细胞分化标志物mRNA水平

2.3 包虫抗原B和IL-9均能上调破骨细胞内NF-κB/NFATc1信号

与Group 1相比,Group 2、Group 3、Group 4、Group 5细胞中NF-κB亚基p-p65水平和NFATc1的表达水平均升高(P<0.05);与Group 3相比,Group 5细胞中p-p65水平和NFATc1的表达水平均升高(P<0.05),见图3。

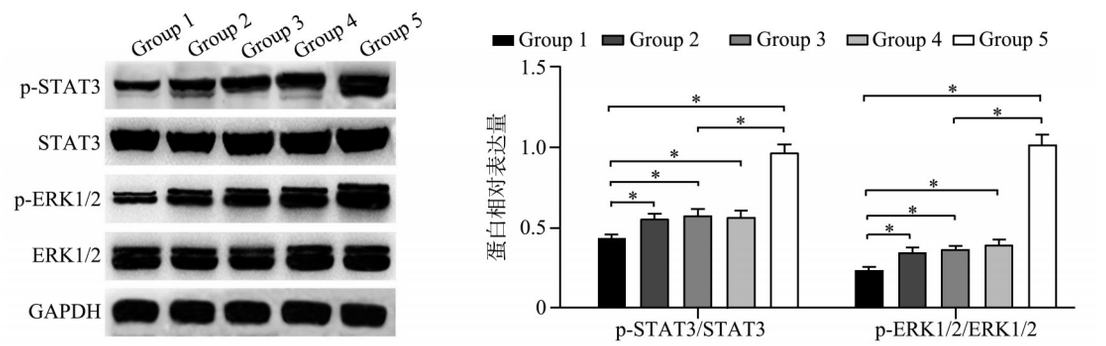
2.4 包虫抗原B和IL-9均能上调破骨细胞内STAT3/ERK1/2信号通路

与Group 1相比,Group 2、Group 3、Group 4、Group 5细胞中p-STAT3和p-ERK1/2水平均升高(P<0.05);与Group 3相比,Group 5细胞中p-STAT3和p-ERK1/2水平均升高(P<0.05),见图4。



*:$P<0.05$

图3 各组破骨细胞内NF-κB/NFATc1信号水平



*:$P<0.05$

图4 各组破骨细胞内STAT3/ERK1/2信号通路水平

3 讨论

骨包虫病最常用的诊断成像技术是X射线、CT和MRI。骨包虫病感染在影像学上通常表现为骨破坏和囊性病变,在囊性病变的边缘,破骨细胞的骨吸收活性和溶骨性病变活跃[12]。

IL-9是一种多效性细胞因子,最初发现其由辅助性T2细胞分泌,近年来发现其具有多种细胞来源,并在炎症性疾病、病原体感染和免疫性疾病的发病机制中起关键作用[13]。在类风湿性关节炎滑膜组织中,IL-9和IL-9受体的表达水平增加,与组织炎症程度相关,且IL-9可促进辅助性T17细胞分化,增强基质金属蛋白酶-9的生成,促进类风湿性关节炎疾病进展[14];而且IL-9介导激活巨噬细胞AKT/FoxO1信号通路,增强其炎症性极化和炎症级联[15]。研究显示,阻断IL-9可减轻耐甲氧西林金黄色葡萄球菌肺炎小鼠模型的炎症水平[16]。IL-9通过促进炎症和增加氧化应激参与恶化慢性阻塞性肺病[17]。上述研究结果表明,IL-9广泛参与炎症反应和炎症介导的多种疾病的进展。本研究检测了骨包虫病患者骨囊性组织和骨关节炎患者骨组织中的IL-9 mRNA水平,发现在骨囊性组织中IL-9 mRNA水平明显增高,说明IL-9可能通过介导骨包虫感染引起的骨组织炎症在骨侵蚀和骨溶解过程中发挥作用。

对于IL-9是否参与介导囊性组织对周围骨组织的侵蚀,本研究随后对单核/巨噬细胞以MCSF单独诱导(Group 2)、MCSF+RANKL联合诱导(Group 3)和MCSF+RANKL+包虫抗原B联合诱导(Group 4)或MCSF+RANKL+IL-9联合诱导(Group 5)处理,并检测破骨细胞分化标志物TRAP和cathepsin K mRNA的表达情况。破骨细胞通过分泌酸性物质和溶解酶TRAP和cathepsin K介导骨吸收。因此,TRAP和cathepsin K的表达是破骨细胞分化的阳性标志物[18]。本研究发现,Group 4和Group 5均能联合MCSF+RANKL诱导单核/巨噬细胞向破骨细胞分化,TRAP和cathepsin K mRNA水平均升高,且与Group 3相比,Group 5的诱导能力更强,TRAP和cathepsin K mRNA水平更高。说明包虫抗原B不仅可增强MCSF+RANKL诱导的单核/巨噬细胞向破骨细胞分化,IL-9也能发挥类似包虫抗原B的炎症性激活破骨细胞分化的作用。

破骨细胞和破骨细胞前体表达RANK。RANKL主要由成骨细胞谱系细胞、骨髓基质细胞和免疫细胞等表达。RANKL与RANK结合后介导破骨细胞的分化和破骨细胞的骨吸收活性[19]。RANKL的表达对免疫系统也至关重要,是T细胞激活的重要分子[20]。在破骨细胞分化过程中,RANKL激活NF-κB亚基(如p65),使其向细胞核转运并介导转录和激活NFATc1。而NFATc1是介导破骨细胞分化相关基因表达的主转录因子,可转录和激活破骨细胞分化关键信号通路

STAT3/ERK1/2,转录和激活介导破骨细胞前体融合和多核形成的相关因子以及骨吸收相关降解酶[21]。ERK1/2信号激活增强RANK的表达和其介导的破骨细胞分化级联[22]。抑制ERK1/2/AKT信号通路的活性可抑制RANKL-或MCSF-诱导的破骨细胞分化[23]。STAT3的磷酸化激活主要介导单核/巨噬细胞的炎症性活化和向破骨细胞的分化[24]。STAT3是维持骨稳态的关键信号通路[25]。本研究结果中,Group 4中包虫抗原B联合MCSF+RANKL处理能够诱导上调p-p65、p-STAT3和p-ERK1/2的水平和NFATc1的表达水平;Group 5中IL-9联合MCSF+RANKL处理也能达到上述效果,而且与Group 3相比,Group 5的诱导能力更强,NFATc1的表达水平以及p-p65、p-STAT3和p-ERK1/2的水平更高。说明IL-9介导的炎症反应是协同增强包虫感染致破骨细胞过度激活和病理性骨溶解的重要因子。

综上所述,IL-9在骨囊性组织中表达上调,并能够在体外通过上调NF-κB/STAT3/ERK1/2信号通路增强诱导破骨细胞分化,可能在骨包虫病的骨侵蚀中发挥重要作用。

[参考文献]

[1] Lopez-Bernus A, Belhassen-Garcia M, Carpio-Perez A, et al. Is cystic echinoccocosis re-emerging in western Spain? [J] Epidemiol Infect, 2017,143(15):3351-3357. doi: 10.1017/S0950268815000618.

[2] 孟庆玲,乔 军. 新疆包虫病流行病学及防控策略[J]. 动物医学进展, 2023, 44(11): 112-116. doi: 10.3969/j.issn.1007-5038.2023.11.020.

[3] Salman F, Khan MI, Hussain I, et al. Pathological fracture of femoral neck in a middle-aged woman: a rare presentation of primary hydatid cyst disease in humans [J]. BMJ Case Rep, 2018, 2018: bcr2017222980. doi: 10.1136/bcr-2017-222980.

[4] 常玉山,杨来红,何 雄,等. 骨包虫病的影像学表现[J]. 中国CT和MRI杂志, 2023, 21(12): 172-174. doi: 10.3969/j.issn.1672-5131.2023.12.053.

[5] Ono T, Hayashi M, Sasaki F, et al. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond [J]. Inflamm Regen, 2020, 40: 2. doi: 10.1186/s41232-019-0111-3.

[6] Chakraborty S, Kubatzky KF, Mitra DK, et al. An update on interleukin-9: from its cellular source and signal transduction to its role in immunopathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2113. doi: 10.3390/ijms20092113.

[7] Licona-Limón P, Arias-Rojas A, Olguín-Martínez E. IL-9 and Th9 in parasite immunity [J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(1): 29-38. doi: 10.1007/s00281-016-0606-9.

[8] Chakraborty S, Schneider J, Mitra DK, et al. Mechanistic insight of interleukin-9 induced osteoclastogenesis [J]. Immunology, 2023, 169(3): 309-322. doi: 10.1111/imm.13630.

[9] Kim SY, Oh Y, Jo S, et al. Inhibition of human osteoclast differentiation by kynurenine through the aryl-hydrocarbon receptor pathway [J]. Cells, 2021, 10(12): 3498. doi: 10.3390/cells10123498.

[10] Mariki A, Barzin Z, Fasihi Harandi M, et al. Antigen B modulates anti-inflammatory cytokines in the EAE model of multiple sclerosis [J]. Brain Behav, 2023, 13(2): e2874. doi: 10.1002/brb3.2874.

[11] 陈新华,温 浩,卢晓梅,等. 细粒棘球蚴重组抗原B的制备、纯化及鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 296-299. doi: 10.3969/j.issn.1000-7423.2005.05.010.

[12] Sun H, Wang S, Tan W, et al. Echinococcus granulosus promotes bone resorption by increasing osteoclasts differentiation [J]. Acta Trop, 2023, 248: 107027. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.107027.

[13] Chakraborty S, Kubatzky KF, Mitra DK, et al. An update on interleukin-9: from its cellular source and signal transduction to its role in immunopathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2113. doi: 10.3390/ijms20092113.

[14] Chowdhury K, Kumar U, Das S, et al. Synovial IL-9 facilitates neutrophil survival, function and differentiation of Th17 cells in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 18. doi: 10.1186/s13075-017-1505-8.

[15] Wang YH, Peng YJ, Liu FC, et al. Interleukin 26 induces macrophage IL-9 expression in rheumatoid arthritis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7526. doi: 10.3390/ijms24087526.

[16] Xu W, Tian K, Li X, et al. IL-9 blockade attenuates inflammation in a murine model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(2): 133-140. doi: 10.1093/abbs/gmz149.

[17] Zou SC, Pang LL, Mao QS, et al. IL-9 exacerbates the development of chronic obstructive pulmonary disease through oxidative stress [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(24): 8877-8884. doi: 10.26355/eurrev_201812_16656.

[18] Ethiraj LP, Fong ELS, Liu R, et al. Colorimetric and fluorescent TRAP assays for visualising and quantifying fish osteoclast activity [J]. Eur J Histochem, 2022, 66(2): 3369. doi: 10.4081/ejh.2022.3369.

[19] Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 2-11. doi: 10.1007/s00774-020-01175-1.

[20] Walsh MC, Choi Y. Regulation of T cell-associated tissues and T cell activation by RANKL-RANK-OPG [J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(1): 54-63. doi: 10.1007/s00774-020-01178-y.

[21] Li Y, Zhuang Q, Tao L, et al. Urolithin B suppressed osteoclast activation and reduced bone loss of osteoporosis via inhibiting ERK/NF-κB pathway [J]. Cell Prolif, 2022, 55(10): e13291. doi: 10.1111/cpr.13291.

[22] Oh JH, Lee NK. Up-regulation of RANK expression via ERK1/2 by insulin contributes to the enhancement of osteoclast differentiation [J]. Mol Cells, 2017, 40(5): 371-377. doi: 10.14348/molcells.2017.0025.

[23] Pennanen P, Kallionpää RA, Peltonen S, et al. Signaling pathways in human osteoclasts differentiation: ERK1/2 as a key player [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(2): 1243-1254. doi: 10.1007/s11033-020-06128-5.

[24] Zhu L, Wang Z, Sun X, et al. STAT3/mitophagy axis coordinates macrophage NLRP3 inflammasome activation and inflammatory bone loss [J]. J Bone Miner Res, 2023, 38(2): 335-353. doi: 10.1002/jbmr.4756.

[25] Zhou S, Dai Q, Huang X, et al. STAT3 is critical for skeletal development and bone homeostasis by regulating osteogenesis [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6891. doi: 10.1038/s41467-021-27273-w.

(编辑:杨 颖)