



## 中性粒细胞微囊泡调控人滑膜成纤维细胞LINE1基因甲基化\*

赵志杰<sup>1,2</sup>, 唐茂丹<sup>3</sup>, 梁艳<sup>1</sup>, 张天健<sup>1</sup>, 任秋羽<sup>1</sup>, 程庆<sup>1</sup>, 熊瑜<sup>1</sup>, 马珂<sup>4</sup>, 詹东<sup>1,5,Δ</sup>

1. 昆明医科大学基础医学院(昆明 650500); 2. 许昌市人民医院急诊外科(许昌 461000); 3. 昆明理工大学医学部(昆明 650031);  
4. 昆明医科大学第一附属医院骨科(昆明 650032); 5. 云南省干细胞和再生医学重点实验室(昆明 650500)

**【摘要】目的** 研究中性粒细胞微囊泡(neutrophil-derived microvesicles, NDMV)通过调控DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)促进成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS, 或称滑膜成纤维细胞)LINE1基因高甲基化。**方法** 分离健康志愿者外周静脉血中的中性粒细胞并用肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ )刺激其产生NDMV。原代培养FLS至第4代备用。MTT实验检测NDMV处理FLS适宜比和时间。实验分为对照组、TNF $\alpha$ 组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组,采用硫酸氢钠联合限制性内切酶分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)检测整体和两个位点LINE1基因甲基化程度,运用RT-qPCR和Western blot检测各组磷酸化和非磷酸化DNA甲基转移酶1(DNMT1)的表达水平。**结果** NDMV: FLS $\leq$ 100:1时无明显细胞毒性( $P>0.05$ )。NDMV处理FLS 24 h内对细胞活性无明显影响( $P>0.05$ )。TNF $\alpha$ 组LINE1基因整体甲基化程度为(37.62 $\pm$ 2.38)%,与对照组(58.97 $\pm$ 1.50)%、NDMV组(59.59 $\pm$ 1.15)%和TNF $\alpha$ +NDMV组(59.11 $\pm$ 0.85)%间差异均有统计学意义( $P<0.001$ );对照组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组LINE1基因位点1和2甲基化程度分别与TNF $\alpha$ 组比较差异亦均有统计学意义( $P<0.01$ )。对照组、TNF $\alpha$ 组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组磷酸化DNMT1蛋白相对表达量分别为1.00 $\pm$ 0.01、0.40 $\pm$ 0.01、2.18 $\pm$ 0.02和1.58 $\pm$ 0.05( $P<0.001$ )。**结论** NDMV通过调控FLS的磷酸化DNMT1表达提高LINE1基因甲基化程度。

**【关键词】** 类风湿关节炎 中性粒细胞微囊泡 滑膜成纤维细胞 DNA甲基转移酶

## Neutrophil-derived Microvesicles Regulate DNA Methylation of the LINE1 Gene in Human Fibroblast-like Synoviocytes

ZHAO Zhijie<sup>1,2</sup>, TANG Maodan<sup>3</sup>, LIANG Yan<sup>1</sup>, ZHANG Tianjian<sup>1</sup>, REN Qiuyu<sup>1</sup>, CHENG Qing<sup>1</sup>, XIONG Yu<sup>1</sup>, MA Ke<sup>4</sup>, ZHAN Dong<sup>1,5,Δ</sup>. 1. School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Department of Emergency, People Hospital of Xuchang, Xuchang 461000, China; 3. Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650031, China; 4. Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 5. Yunnan Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Kunming 650500, China

Δ Corresponding author, E-mail: zhandong@kmmu.edu.cn

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82560697), Yunnan Revitalization Talent Support Program (No. XDYC-QNRC-2022-0293), and the Innovative Experimental Project for Undergraduates in Yunnan Province (No. S202310678082, S202310678098).

**[Abstract] Objective** To investigate how neutrophil-derived microvesicles (NDMV) promote LINE1 gene hypermethylation in fibroblast-like synoviocytes (FLS) by regulating DNA methyltransferases (DNMT). **Methods** Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy volunteers and stimulated with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) to produce NDMV. Primary FLS were cultured to the fourth passage for use. MTT assays determined the optimal NDMV treatment ratios and durations for FLS. Experiments groups included control, TNF $\alpha$ , NDMV, and TNF $\alpha$  + NDMV. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) assessed global LINE1 methylation levels and methylation at two specific sites. RT-qPCR and Western blot analyzed phosphorylated and non-phosphorylated DNA methyltransferase 1 (DNMT1) expression in each group. **Results** No significant cytotoxicity was observed at NDMV: FLS ratios  $\leq$  100:1 ( $P>0.05$ ). NDMV treatment for 24 hours had no significant effect on FLS cell viability ( $P>0.05$ ). The overall methylation level of the LINE1 gene in the TNF $\alpha$  group was (37.62 $\pm$ 2.38)%, which differed significantly from the control group (58.97 $\pm$ 1.50)%, NDMV group (59.59 $\pm$ 1.15)%, and TNF $\alpha$  + NDMV group (59.11 $\pm$ 0.85)%,  $P<0.001$ . Compared with the TNF $\alpha$  group, methylation levels at LINE1 sites 1 and 2 in the control, NDMV, and TNF $\alpha$  + NDMV groups also showed statistically significant differences ( $P<0.01$ ). The relative expression levels of phosphorylated DNMT1 protein in

\* 国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 82560697)、云南“兴滇英才支持计划”青年人才项目(No. XDYC-QNRC-2022-0293)和云南省大学生创新性实验项目(No. S202310678082、No.S202310678098)资助

Δ 通信作者, E-mail: zhandong@kmmu.edu.cn

出版日期: 2026-01-20

the control group, TNF $\alpha$  group, NDMV group, and TNF $\alpha$  + NDMV group were  $1.00 \pm 0.01$ ,  $0.40 \pm 0.01$ ,  $2.18 \pm 0.02$ , and  $1.58 \pm 0.05$ , respectively ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** NDMV enhances *LINE1* gene methylation by regulating phosphorylated DNMT1 expression in FLS.

**[Key words]** Rheumatoid arthritis Neutrophil-derived microvesicles Fibroblast-like synoviocytes  
DNA methyltransferases

滑膜炎是类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的典型病理特征,表现为关节疼痛、肿胀、软骨下骨质疏松等,伴关节外病变及类风湿因子阳性,终末致关节畸形与功能丧失,给患者家庭带来经济与精神负担<sup>[1]</sup>。目前RA无法治愈,诊治需早发现、早诊断、早治疗,控制滑膜炎以缓解症状、防治关节损伤<sup>[2]</sup>。成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)或称滑膜成纤维细胞(synovial fibroblast)是滑膜层主要细胞成分,其不仅分泌透明质酸、移除代谢产物,还合成炎症因子至滑液,影响关节修复<sup>[3]</sup>。DNA甲基化是重要表观遗传机制,指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)催化下,甲基转移至DNA碱基,影响基因复制、转录与翻译,其中DNMT1保持与稳定已有甲基化基因,也可甲基化DNA单链<sup>[4]</sup>。RA患者FLS和滑膜组织DNMT1水平低、整体DNA甲基化程度小<sup>[5]</sup>。*LINE1*是自主性反转座子即长散布核元件(long interspersed nuclear elements, LINE)重复非编码序列,约占人类基因组的17%<sup>[6]</sup>。40%DNA甲基化发生在这些重复序列中,*LINE1*基因甲基化间接反映了整体DNA甲基化。正常细胞*LINE1*基因高甲基化,相关基因转录受抑制;反之,则导致基因组不稳定、转录异常活化及DNA修复缺失。微囊泡(microvesicle, MV)属于细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)的一类,具有完整细胞膜结构的小囊泡,可运载蛋白质、RNA、脂质等至目标细胞<sup>[7]</sup>。MV以外生出芽方式快速产生,具有更大体积,能携带更多物质。中性粒细胞体外培养存活时间短,而中性粒细胞微囊泡(neutrophils-derived microvesicles, NDMV)在炎症反应时含量快速增加,尤其在炎症局部<sup>[8]</sup>。本研究拟通过硫酸氢钠联合限制性内切酶分析法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)、RT-qPCR和Western blot等方法,检测NDMV处理滑膜细胞后*LINE1*基因甲基化程度及*DNMT1*转录和翻译水平,旨在提高FLS整体甲基化水平、稳定基因组、减少炎症因子表达,缓解RA滑膜炎。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

中性粒细胞:抽取健康成人50 mL静脉血( $n=10$ )至同

体积Polymorphprep溶液上,室温下500 $\times$ g离心30 min,收集多核白细胞层(polymorphonuclear, PMN)并悬浮于RPMI1640培养液中;400 $\times$ g离心15 min,弃上清,重悬PMN;加入RPMI1640培养液1 mL和红细胞破碎缓冲液9 mL,避光静置3 min后400 $\times$ g离心3 min,重悬细胞沉淀于3 mL RPMI1640(含5%AB血型血浆)。FLS:收集类风湿关节炎患者滑膜组织( $n=5$ ),生理盐水冲洗后切成2~3 mm组织块并种植于25 T培养瓶底,加入5滴DMEM/10%FBS培养液,避免组织块悬浮于培养液,置含体积分数为5%CO<sub>2</sub>的37 $^{\circ}$ C培养箱培养14 d至形成单细胞层。常规培养并传至第4代,将5例患者FLS建立细胞池备用。研究方案通过昆明医科大学医学伦理委员会审查(批件号:KMMU2024MEC086),所有患者和健康志愿者签署知情同意书;操作者行为符合规范,遵守赫尔辛基伦理宣言。

#### 1.1.2 主要试剂

Polymorphprep溶液购自Axis-Shield Diagnostics; DMEM高糖和RPMI1640培养液购自赛默飞世尔; FBS购自全式金生物;红细胞破碎缓冲液、MTT购自生工生物; AB血型血浆购自诺为生物; PKH26红色荧光试剂盒购自Sigma-Aldrich; *Taq I*和*Tas I*酶购自New England Biolabs; 重亚硫酸钠处理试剂盒购自Zymo Research; *Taq DNA polymerase*购自Qiagen公司; *Taq qPCR SuperMix*购于全式金生物; Phospho-DNMT1-Ser714抗体购自ABclonal公司, DNMT1和 $\beta$ -actin抗体购自Abcam公司; qPCR引物由生工生物合成。

#### 1.1.3 主要设备

透射电镜JEM-1400Flash购自电子株式会社; 扫描电镜SU8200购自日立科学仪器; 纳米颗粒跟踪分析仪(NTA)NanoSight NS300购自Malvern Panalytical; 流式细胞仪购自Beckman; 凝胶成像系统购自Bio-Rad; 电泳仪购自鸿涛基业公司; 细胞培养箱购自赛默飞世尔。BioTek Synergy HTX酶标仪购自Agilent; AX/AX R with NSPARC共聚焦显微镜购自尼康; QuantStudio qPCR仪购自赛默飞世尔。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 提取NDMV

加入RPMI1640(含5%AB血型血浆)稀释中性粒细胞至 $2 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup>, 采用50 ng/mL肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor

necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 在 37 °C 水浴中刺激 20 min。然后 4 °C 温度下 4 400 $\times$ g 离心 15 min 移除细胞沉淀, 取上清, 13 000 $\times$ g 离心 2 min, 弃血小板沉淀。上清液移入超速离心管中, 4 °C 条件下 100 000 $\times$ g 离心 60 min<sup>[9]</sup>。沉淀重悬于 100  $\mu$ L PBS 后移至 -80 °C 保存备用。

### 1.2.2 电镜观察 NDMV 形态

10  $\mu$ L NDMV 悬液置铜网上 10 min 后 PBS 洗涤, 使用 10  $\mu$ L 2% 醋酸双氧铀和 3% 柠檬酸铅染色 1 min; 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 在 80 ~ 100 kV 下观察铜网。对于扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察, 将 5  $\mu$ L NDMV 悬液置于硅芯片上干燥后, 安装在 SEM 样品台上镀 40 nm 金钯合金, 使用 SEM 在 25 ~ 50 kV 下观察。

### 1.2.3 纳米颗粒跟踪分析检测 NDMV

无细胞外囊泡 (EV) PBS 中稀释 10  $\mu$ L NDMV 1 000 倍置注射器内, 使用注射器泵 (spring pump flow=50) 保持恒定流速, 将相机级别设置为 15, 录制视频, 记录 NDMV 的布朗运动。视频使用 Nanosight NTA 3.1 软件自动分析。

### 1.2.4 NDMV 对 FLS 活性影响

取第 4 代对数生长期 FLS 300 个接种于 96 孔板, PBS 洗 3 次后加入 NDMV 和/或 10 ng/mL TNF $\alpha$ , 微囊泡/细胞 (vesicles/cells, V/C) 比分别为 10 : 1、20 : 1、30 : 1、50 : 1、100 : 1、200 : 1、300 : 1 和 400 : 1, 温箱孵育 0、6、12、24 和 48 h。PBS 清洗 3 次, 再加入 100  $\mu$ L 培养液 (含 0.5 mg/mL MTT) 温箱孵育 4 h 后移除, 加入 100  $\mu$ L DMSO 至水平摇床 37 °C 摇晃 30 min。上机检测。实验设置空白对照孔和 5 个复孔。

### 1.2.5 FLS 摄取 NDMV 观察

将超离心后得到的 NDMV 重悬于 100  $\mu$ L 稀释剂 C 中。然后, 加入等量的 2 $\times$ 染料溶液 (PKH26 溶液: 稀释剂 C=4  $\mu$ L : 1 000  $\mu$ L), 室温下孵育 5 min。再加入 200  $\mu$ L 无 EV 血清, 在室温下孵育 1 min。加入 5 mL RPMI1640 培养基/10% 无 EV 血清, 用于洗涤 PKH26 染色的 NDMV 并稀释残留的 PKH26。通过超离心 (100 000 $\times$ g, 4 °C, 30 min) 收集 PKH26 染色的 NDMV 沉淀并将其重悬于 100  $\mu$ L 无 EV 的 RPMI1640 培养基中。实验分为对照组、TNF $\alpha$  组、NDMV 组和 TNF $\alpha$ +NDMV 组。TNF $\alpha$  组的 FLS 细胞采用 10 ng/mL TNF $\alpha$  处理 24 h; NDMV 组以 V/C=100 : 1 比例处理 FLS 24 h; TNF $\alpha$ +NDMV 组的 FLS 细胞先用 10 ng/mL TNF $\alpha$  处理 24 h, 再以 V/C=100 : 1 比例处理 24 h; 最后使用共聚焦显微镜观察摄取情况。对照组未处理。

### 1.2.6 COBRA 检测 LINE1 基因甲基化

对照组、TNF $\alpha$  组、NDMV 组和 TNF $\alpha$ +NDMV 组分别

使用 Trizol 提取 FLS DNA, 然后用 0.1 mol/L 柠檬酸钠洗涤 2 次, 75% 乙醇重悬再置室温 10 min, 以 2 000 $\times$ g 离心 5 min。空气干燥后溶于 8 mmol/L NaOH。取 50 ng DNA 重亚硫酸钠处理后行 PCR。LINE1 基因引物见表 1。反应条件: 95 °C 持续 15 min, 以 95 °C 解链 45 s、55 °C 退火 45 s、72 °C 延长 45 s 为一个循环进行 40 次, 72 °C 持续 7 min。65 °C 下, 产物用含 2 单位 Taq I 和 8 单位 Tas I 的 NEBuffer3 消化过夜。消化产物行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后溴化乙锭染色分析<sup>[10-11]</sup>。据两个 LINE1 基因 CpG 位点甲基化情况分为 4 种类型: 双位点高甲基化 (mCmC), 单位点部分甲基化 (mCuC、uCmC) 和双位点低甲基化 (uCuC)。酶消化后各片段 92 bp=A、60 bp=B、50 bp=C、42 bp=D 和 32 bp=E,  $F = [(D+E) - (B-C)]/2$ 。LINE1 甲基化百分数计算公式如下: 整体甲基化 %mC =  $100 \times (A+2C+F)/(2A+2B+2C+2F)$ , 双位点高甲基化 %mCmC =  $100 \times (C/2)/[(C/2)+A+B+F]$ , 单位点部分甲基化 %mCuC =  $100A/[(C/2)+A+B+F]$  和 %uCmC =  $100F/[(C/2)+A+B+F]$ , 双位点低甲基化 %uCuC =  $100 \times B/[(C/2)+A+B+F]$ 。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR amplification primers

Gene	Primer	Sequence
LINE1	Forward	5'-GTTAAAGAAAGGGGTGATGGT-3'
	Reverse	5'-AATACGCCGTTTCTTAAACCRATCTA-3'
DNMT1	Forward	5'-AGGCGGCTCAAAGATTGGAA-3'
	Reverse	5'-GCAGAAATTCGTGCAAGAGATTC-3'
$\beta$ -actin	Forward	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	Reverse	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

LINE1: long interspersed nuclear elements 1; DNMT1: DNA methyltransferase.

### 1.2.7 qPCR 检测 DNMT1 基因表达

采用 Trizol 法提取 FLS 总 RNA 并检测浓度和纯度, 按逆转录试剂盒逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 反应。反应条件: 95 °C 持续 15 min, 以 95 °C 解链 45 s、60 °C 退火 45 s、72 °C 延长 45 s 为一个循环进行 30 次, 72 °C 持续 7 min。每组设置 3 个复孔, 并进行了 3 次独立实验。以  $\beta$ -actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法检测 DNMT1 基因表达相对量, 引物序列见表 1。

### 1.2.8 Western blot 检测 DNMT1 蛋白

RIPA 裂解液制备 Western blot 样品。经 SDS-PAGE 电泳分离后转移至 PVDF 膜上。TBST 洗涤 3 次, 加入 DNMT1 抗体在 4 °C 下孵育过夜。再次用 TBST 漂洗 3 次, 然后加入 1 : 8 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG, 于室温下孵育 60 min。漂洗后, 向 PVDF 膜上加入 ECL 发光液, 并在凝胶

成像系统中采集图像,使用ImageJ获取条带灰度值并比较目标蛋白与内参蛋白灰度相对值。内参蛋白为 $\beta$ -actin并进行了3次独立实验。

### 1.3 统计学方法

采用Graphpad Prism 6软件对数据进行统计分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准误表示,若符合正态分布且方差齐的两组间比较采用Student's *t*检验,多组间比较先采用ANOVA检验,再采用Tukey's多重比较检验;若不符合正态分布或方差不齐,则两组间采用Mann-Whitney *U*检验,多组间比较先采用Kruskal-Willis *H*检验,再采用Dunn's多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NDMV形态学观察

TEM显示NDMV形似无柄杯子,直径范围为200~500 nm,平均为 $(213.19 \pm 10.72)$  nm(图1A);SEM下NDMV呈现不规则的球形,表面凹凸不平,其平均直径为 $(198.64 \pm 8.97)$  nm(图1B)。NTA记录NDMV的布朗运动(图1C),其直径为64.50~694.50 nm,平均值为 $(379.50 \pm 182.30)$  nm,NDMV直径 $< 100$  nm约占总体数量的3.24%,浓度为 $2.61 \times 10^7$  particles/mL(图1D)。

### 2.2 NDMV处理FLS最适比和时间

10 ng/mL TNF $\alpha$ 处理24 h后FLS的活性与对照组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。NDMV以200:1、300:1和400:1的V/C比处理FLS后,细胞活性分别降低至63%、58%和69%( $P < 0.01$ )。NDMV以10:1、30:1、50:1和100:1的V/C比例处理后,细胞活性与对照组比较无明显差异( $P > 0.05$ ),见图2A。NDMV以100:1的V/C比处理FLS,24 h内细胞活性无明显变化( $P > 0.05$ ),但处理

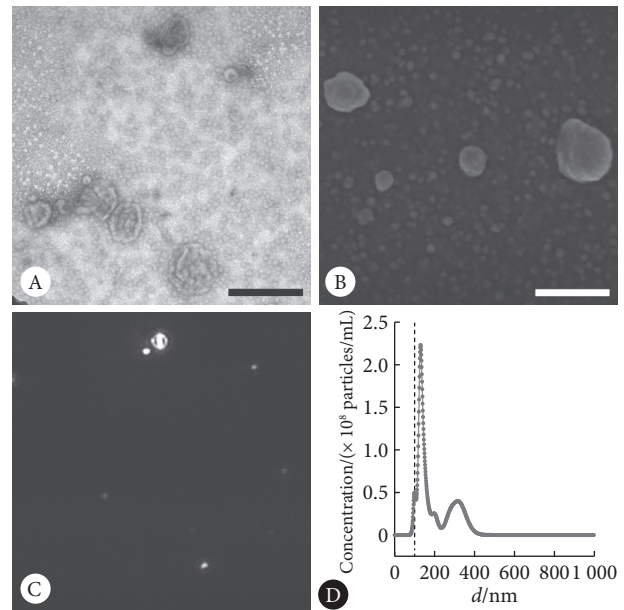


图1 NDMV形态和粒径分布

Fig 1 NDMV morphology and particle size distribution

A, NDMV features by TEM; B, NDMV characteristics by SEM; C, bright dots represent NDMV by NTA; D, particle size distribution and concentration by NTA. Scale bar = 500 nm.

48 h后,FLS活性降低( $P = 0.008$ ),见图2B。鉴于此,后续实验选择NDMV处理FLS时间为24 h,并以V/C比为100:1处理细胞。

### 2.3 FLS摄取NDMV

在NDMV和TNF $\alpha$ +NDMV组,采用PKH26标记的NDMV处理FLS 24 h后可见NDMV被FLS摄取进入胞质;未用NDMV处理的对照组和TNF $\alpha$ 组无NDMV摄取。见图3。

### 2.4 NDMV上调*LINE1*基因甲基化程度

*LINE1*基因限制性核酸内切酶谱显示5个片段,为

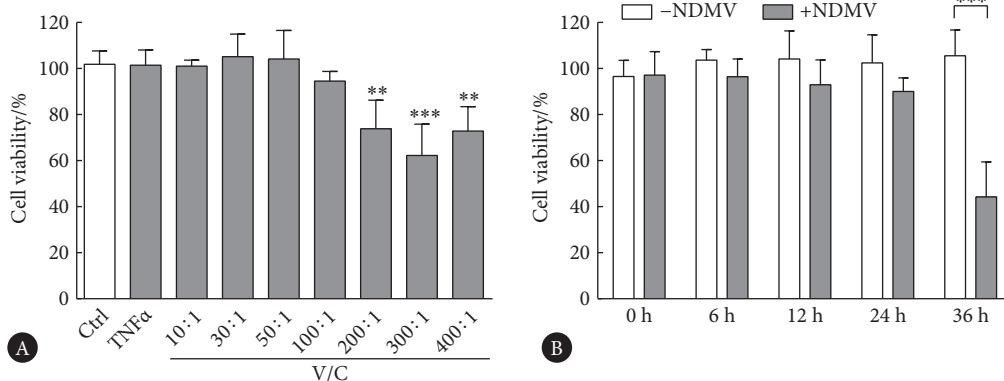


图2 FLS活性检测

Fig 2 FLS activity assay

Ctrl: control; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; NDMV: neutrophil-derived microvesicles; V/C: vesicles/cells. A, FLS viability after different ratios of NDMV/FLS treatment (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , vs. ctrl); B, FLS viability after various times with NDMV/FLS = 100:1 (\*\*  $P < 0.001$ ).  $n = 5$ .

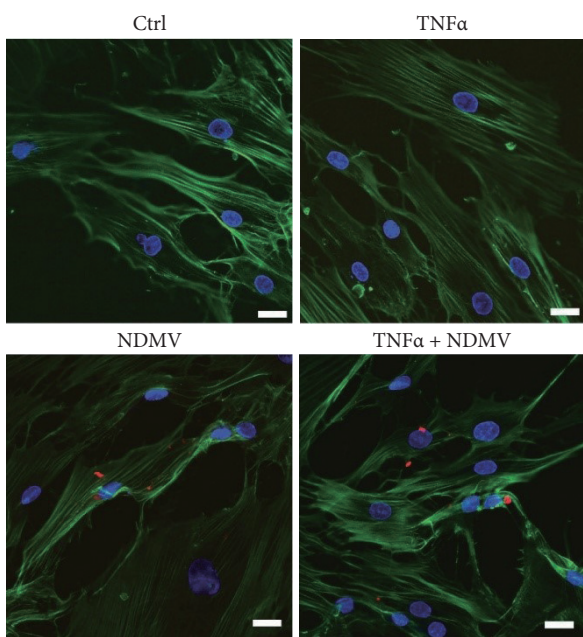


图 3 FLS内化NDMV

Fig 3 Internalization of NDMV in FLS

Ctrl: control; TNFα: tumor necrosis factor α; NDMV: neutrophil-derived microvesicles. PKH-26-labeled NDMVs (red) are internalized by FLS. Nuclei and F-actin cytoskeleton are counterstained with DAPI (blue) and phalloidin (green), respectively. Scale bar = 20 μm.

92 bp、60 bp、50 bp、42 bp和32 bp(图4A)。图4B显示 *LINE1* 基因整体甲基化程度。对照组、NDMV组和 TNFα + NDMV 组 *LINE1* 整体甲基化程度分别为

(bp) Marker #1 #2 #3 #4 #5 #6 (bp)

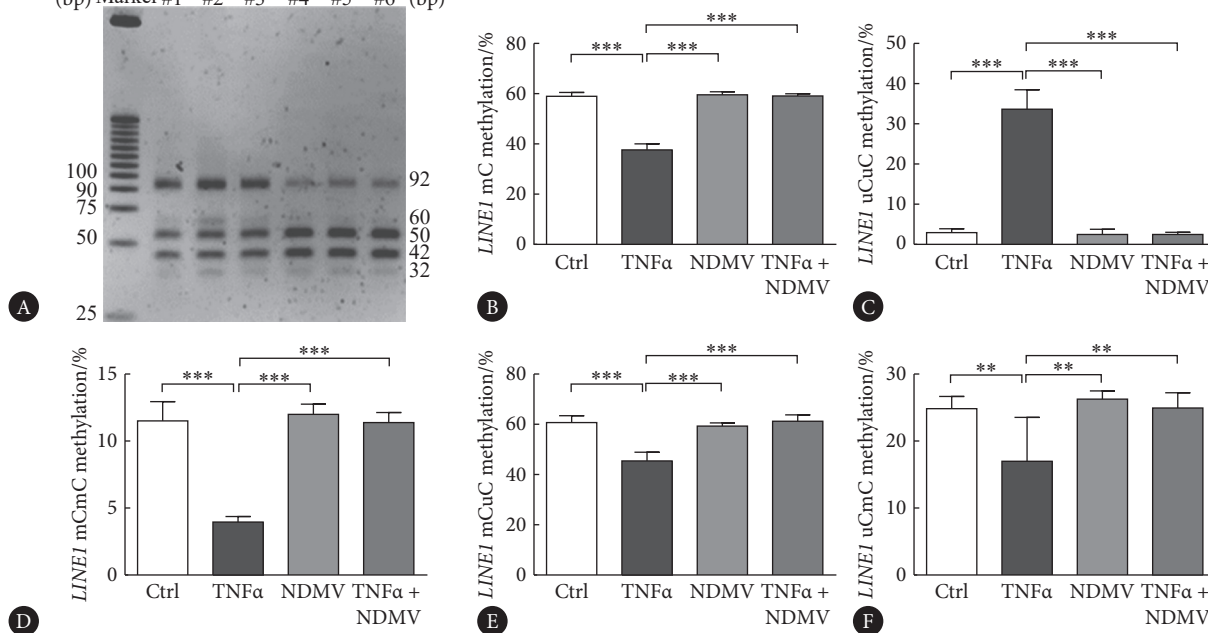


图 4 *LINE1* 基因甲基化程度

Fig 4 Methylation Levels of the *LINE1* gene

Ctrl: control; TNFα: tumor necrosis factor α; NDMV: neutrophil-derived microvesicles. A, Restriction endonuclease map after amplification of the *LINE1* gene and digestion with *Taq I* and *Tas I* enzymes, five bands are observed. B, General methylation level of the *LINE1* gene. C, Hypo-methylation level at two loci. D, Hyper-methylation level at two loci. E and F, Partial methylation level at two loci. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 5$ .

(58.97±1.50)%、(59.59±1.15)%和(59.11±0.85)%，组间差异无统计学意义；TNFα组[(37.62±2.38)%]低于另外3组的整体甲基化程度( $P < 0.001$ )。双位点低甲基化百分比见图4C。TNFα组双位点低甲基化百分比为(33.63±4.85)%，高于对照组[(2.96±0.93)%]、NDMV组[(2.48±1.28)%]和TNFα+NDMV组[(2.46±0.57)%] ( $P < 0.001$ )；对照组、NDMV组和TNFα+NDMV组间则无明显差异( $P > 0.05$ )。*LINE1* 基因双位点高甲基化百分比见图4D。与对照组[(11.51±1.43)%]相比，NDMV组和TNFα+NDMV组双位点高甲基化百分比[分别为(11.19±0.76)%和(11.38±0.75)%]无明显差异( $P > 0.05$ )；但TNFα组[(3.95±0.42)%]低于另外3组双位点高甲基化百分比( $P < 0.001$ )。单位点甲基化程度包括位点1-mCuC和位点2-uCmC，见图2E和2F。对照组、TNFα组、NDMV组和TNFα+NDMV组在位点1-mCuC甲基化程度分别为(60.71±2.69)%、(45.44±3.43)%、(59.27±1.31)%和(61.23±2.52)%，TNFα组低于另外3组( $P < 0.001$ )，另外3组间差异无统计学意义。TNFα组位点2-uCmC甲基化程度为(16.98±6.56)%，亦低于对照组[(24.83±1.83)%]、NDMV组[(26.25±1.22)%]和TNFα+NDMV组[(24.94±2.28)%] ( $P = 0.001$ )，另外3组间差异亦无统计学意义。

### 2.5 NDMV上调FLS的磷酸化DNMT1表达

TNF $\alpha$ 组*DNMT1* mRNA的表达量为 $2.23 \pm 0.55$ , 而对照组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组分别为 $1.01 \pm 0.11$ 、 $1.79 \pm 0.24$ 和 $0.81 \pm 0.24$ , 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图5A。图5B示各组间非磷酸化和磷酸化DNMT1蛋白浓度相对变化。对照组、TNF $\alpha$ 组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组非磷酸化DNMT1蛋白相对表达量分别为 $1.00 \pm 0.01$ 、 $1.78 \pm 0.01$ 、

$1.47 \pm 0.02$ 和 $0.70 \pm 0.02$ , 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ), TNF $\alpha$ +NDMV组明显低于另外3组非磷酸化DNMT1蛋白水平, 见图5C。对照组、TNF $\alpha$ 组、NDMV组和TNF $\alpha$ +NDMV组磷酸化DNMT1蛋白相对表达量分别为 $1.00 \pm 0.01$ 、 $0.40 \pm 0.01$ 、 $2.18 \pm 0.02$ 和 $1.58 \pm 0.05$ , 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ), NDMV组明显高于另外3组磷酸化DNMT1蛋白水平, 见图5D。

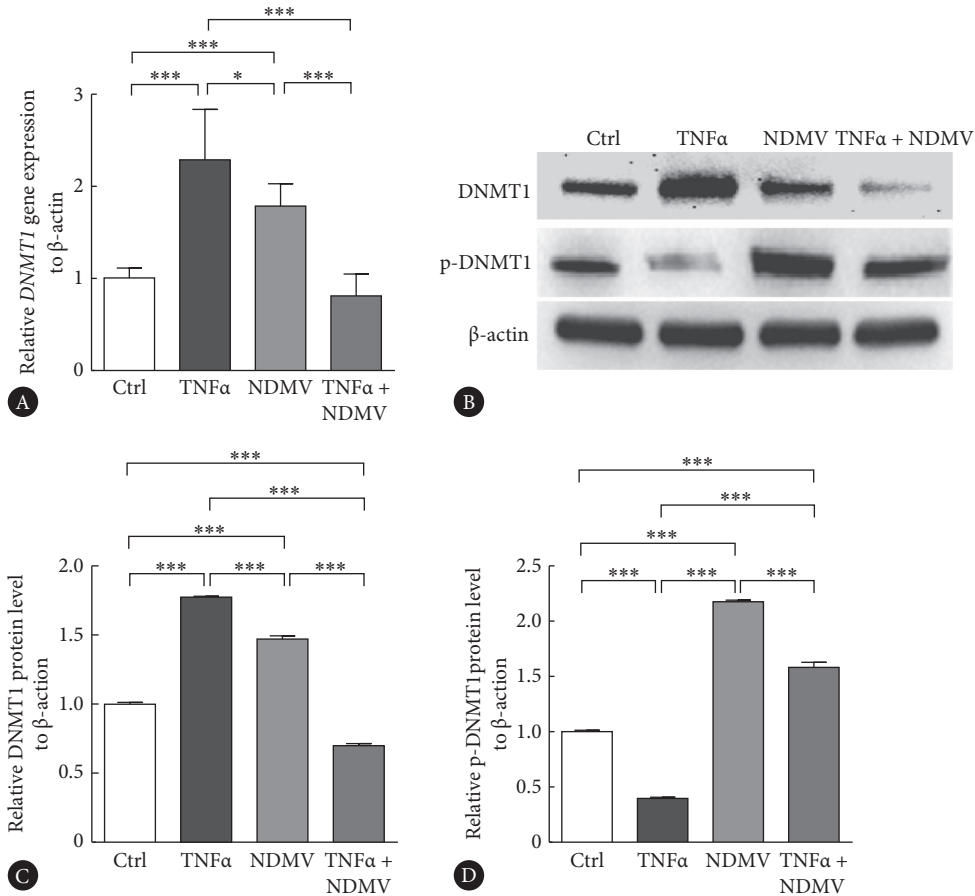


图 5 *DNMT1* mRNA和 DNMT1蛋白表达水平

Fig 5 *DNMT1* mRNA and DNMT1 protein expression levels

Ctrl: control; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; NDMV: neutrophil-derived microvesicles. A, relative mRNA levels of *DNMT1*; B, Western blot bands showing non-phosphorylated DNMT1, phosphorylated DNMT1-Ser714, and  $\beta$ -actin; C, comparison of DNMT1 protein concentrations among groups; D, comparison of phosphorylated DNMT1 protein concentrations among groups. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ .

### 3 讨论

RA滑膜炎呈慢性、高程度、全关节滑膜炎性反应, 促炎因子和炎性细胞异常合成和浸润, 抑制软骨细胞增殖和软骨修复, 加剧滑膜关节功能障碍。研究控制RA滑膜炎, 有利于恢复关节滑膜稳态, 对治疗RA、促进软骨再生和改善关节功能具有一定意义。本研究探索了NDMV具有调控滑膜细胞DNMT1磷酸化, 上调*LINE1*基因甲基化程度的功能, 为进一步研究其机制奠定了一定实验基础。

作为滑膜层主要细胞类型, FLS表型和功能的改变在RA的进展中起到关键作用<sup>[12-13]</sup>。SMITH等<sup>[14]</sup>发现FLS具有显著的异质性, 在炎症微环境中, FLS亚群可通过分泌细胞因子和趋化因子, 招募并激活免疫细胞, 从而加剧局部炎症反应。本研究发现TNF $\alpha$ 刺激FLS后*LINE1*基因甲基化程度显著降低, 与NAKANO等<sup>[15-16]</sup>采用焦磷酸测序发现RA患者FLS的*LINE1*基因甲基化程度低于骨关节炎患者一致。此外RA患者除整体DNA甲基化程度较低外, 局部位点如*CHI3L*、*CASP1*、*STAT3*、*CXCL12*启动子和

*TBX5*等也呈低甲基化,涉及炎症信号通路、细胞迁移分化、细胞因子合成等多项细胞生理功能;实验也表明IL-1刺激RA-FLS可快速抑制*DNMT1*表达,使*CHI3L*基因去甲基化,表明促炎因子通过抑制*DNMT1*表达改变DNA甲基化程度<sup>[16-17]</sup>。DNA低甲基化状态导致FLS的增殖和迁移能力异常,推动RA的病理进程<sup>[18]</sup>。此外,DI MATTEO等<sup>[19]</sup>发现RA患者的滑膜组织存在显著的DNA甲基化改变,从而影响基因表达、免疫细胞分化和功能。然而,本研究采用TNF $\alpha$ 刺激FLS,却能升高*DNMT1*基因表达和非磷酸化DNMT1蛋白水平,出现*LINE1*基因甲基化变化与其调控的酶DNMT1变化不一致的现象。DNMT1修饰后能够改变其结合到半甲基化DNA上的有效性,从而改变DNA甲基化模式的传递<sup>[20]</sup>。以往研究报道,DNMT1蛋白的Ser515、Ser717和Ser154等多个位点丝氨酸存在磷酸化现象,改变调控与催化之间的相互作用,影响DNMT1募集和DNA锚定<sup>[21-23]</sup>。SHARMA等<sup>[24]</sup>鉴定出DNMT1磷酸化位点Ser714属于自抑制连接子(autoinhibitory linker),可阻止DNA进入DNMT1活性位点,防止未甲基化DNA的甲基化;而此位点磷酸化稳定了自抑制连接区,使其阻断未甲基化DNA甲基化的能力失活,增加DNMT1的活性。本研究结果也证实TNF $\alpha$ 刺激FLS后Ser714位点磷酸化DNMT1蛋白水平降低,抑制DNMT1活性位点与DNA结合,则减少*LINE1*基因甲基化程度。

NDMV作为细胞间物质转运的载体,参与炎症反应、免疫调节和组织修复等,能稳定内容物并被细胞摄取,展现出广泛的生物学功能和应用潜力<sup>[25-26]</sup>。研究表明,NDMV依赖特定RhoA外生出芽产生并含CD55分子,免受巨噬细胞的吞噬;NDMV可抑制补体C3转化酶的活性,显著减少中性粒细胞的募集和组织损伤,从而发挥强大的抗炎效果<sup>[27]</sup>。NDMV在调控细胞增殖分化、增加抗炎细胞因子分泌、减少促炎细胞因子释放等方面也都发挥重要作用<sup>[28-30]</sup>。NDMV携带多种分子,除其膜表达Annexin A1和磷脂酰丝氨酸,其内运载大量微小RNA,如miR-155、miR-146a和miR-1290等<sup>[31-34]</sup>。本研究表明NDMV虽然抑制*DNMT1*表达,但Ser714位点磷酸化的DNMT1增加,自抑制连接区能力失活,增强DNMT1的活性,进而提高*LINE1*基因甲基化程度。微囊泡携带microRNA转录后调控磷酸酶的mRNA,抑制其翻译过程,从而降低磷酸酶的表达水平,蛋白磷酸化程度升高<sup>[35]</sup>。故提高RA-FLS的*DNMT1*表达和合成、促进*LINE1*基因高甲基化,可能成为新的治疗方向和手段,将有助于RA患者缓解滑膜炎、改善关节功能。

本研究尚存局限性。首先,仅从体外实验验证笔

者的推论,未收集RA患者滑膜组织进行观察。其次,调控具体机制有待深入研究,NDMV通过携带何种生物分子发挥调控DNMT1氨基酸位点磷酸化作用。然后,缺乏体内动物实验验证科学假说。最后,本研究运用了流程稍复杂但经济实用的*LINE1*基因甲基化检测方法——COBRA,其可实现整体范围内DNA甲基化量化即整体基因组甲基化检测,通过酶切位点设计,可精准定位特定CpG岛区域的甲基化状态,但对DNA样本纯度和完整性要求高且实验流程稍复杂<sup>[36]</sup>;甲基化特异性聚合酶链反应的引物设计对实验结果影响较大<sup>[37]</sup>;亚硫酸盐测序在检测低丰度甲基化DNA时表现较好,且其处理过程可导致DNA降解,并成本较高<sup>[38]</sup>。

综上所述,NDMV通过调控FLS的DNMT1-Ser714磷酸化水平,增强DNMT1活性,使*LINE1*基因处于高甲基化状态。有助于进一步阐明NDMV调控细胞DNA甲基化的作用机制,为NDMV用于临床治疗RA所致的滑膜炎奠定实验基础。

\* \* \*

**作者贡献声明** 赵志杰负责论文构思、调查研究、研究方法和初稿写作,唐茂丹负责数据审编、正式分析和可视化,梁艳、张天健、任秋羽和程庆负责验证,熊瑜负责软件,马珂负责提供资源,詹东负责论文构思、经费获取、研究项目管理、提供资源、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

**Author Contribution** ZHAO Zhijie is responsible for conceptualization, investigation, methodology, and writing--original draft. TANG Maodan is responsible for data curation, formal analysis, and visualization. LIANG Yan, ZHANG Tianjian, REN Qiuyu, and CHENG Qing are responsible for validation. XIONG Yu is responsible for software. MA Ke is responsible for resources. ZHAN Dong is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, resources, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Declaration of Conflicting Interests** All authors declare no competing interests.

## 参 考 文 献

- [1] 雷雪兰,邱邈,杜方雪.仿酶制剂ZIF-8@Pt用于清除活性氧治疗类风湿关节炎的研究. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(4): 826-837. doi: 10.12182/20240760201.
- LEI X L, QIU L, DU F X. ZIF-8@Pt nanozyme used for scavenging reactive oxygen species in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2024, 55(4): 826-837. doi: 10.12182/20240760201.
- [2] GIRASE R, GUJARATHI N A, SUKHIA A, et al. Targeted nanoliposomes for precision rheumatoid arthritis therapy: a review on mechanisms and *in vivo* potential. *Drug Deliv*, 2025, 32(1): 2459772. doi: 10.1080/10717544.2025.2459772.
- [3] CHU C Q. Highlights of strategies targeting fibroblasts for novel therapies for rheumatoid arthritis. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 846300. doi: 10.

- 3389/fmed.2022.846300.
- [4] VARJAS T. The impact of tartrazine on DNA methylation, histone deacetylation, and genomic stability in human cell lines. *Nutrients*, 2025, 17(5): 913. doi: 10.3390/nu17050913.
- [5] PAYET M, DARGAI F, GASQUE P, *et al.* Epigenetic regulation (including micro-RNAs, DNA methylation and histone modifications) of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12170. doi: 10.3390/ijms222212170.
- [6] LIBERA L, VANOLI A, SAHNANE N, *et al.* LINE-1 hypomethylation characterizes the inflammatory response in coeliac disease associated-intestinal mucosa and small bowel adenocarcinomas. *J Pathol*, 2025, 265(1): 99-109. doi: 10.1002/path.6371.
- [7] ITSKOVICH S Z, SOVA M, ABU-HAMAD R, *et al.* Effects of small extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells on acute kidney injury: a rat ischemia-reperfusion model. *Cureus*, 2025, 17(5): e84411. doi: 10.7759/cureus.84411.
- [8] DALLI J, MONTERO-MELENDEZ T, NORLING L V, *et al.* Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(8): 2205-2219. doi: 10.1074/mcp.M113.028589.
- [9] ZHAN D, MCCONACHIE E, EDWARDS S W, *et al.* Isolation of microvesicles from human circulating neutrophils. *Bio Protoc*, 2021, 11(19): e3119. doi: 10.21769/BioProtoc.3119.
- [10] UDOMSINPRASERT W, KITKUMTHORN N, MUTIRANGURA A, *et al.* Global methylation, oxidative stress, and relative telomere length in biliary atresia patients. *Sci Rep*, 2016, 6: 26969. doi: 10.1038/srep26969.
- [11] PRUCKSAKORN T, MUTIRANGURA A, PAVASANT P, *et al.* Altered methylation levels in LINE-1 in dental pulp stem cell-derived osteoblasts. *Int Dent J*, 2025, 75(2): 1269-1276. doi: 10.1016/j.identj.2024.09.009.
- [12] ZHANG Y, HE X, YIN D, *et al.* Redefinition of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Aging Dis*, 2024, 16(4): 2054-2072. doi: 10.14336/ad.2024.0514.
- [13] 李峰, 万磊, 闫大伟, 等. 白介素6, 白介素12P70, 血清淀粉样蛋白A和降钙素原对类风湿关节炎的诊断价值及与疾病活动度的关系. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(4): 995-1000. doi: 10.12182/20240760107.
- LI F, WAN L, YAN D W, *et al.* Diagnostic value of interleukin 6, interleukin 12P70, serum amyloid A, and procalcitonin for rheumatoid arthritis and their relationship with the disease activity. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2024, 55(4): 995-1000. doi: 10.12182/20240760107.
- [14] SMITH M H, GAO V R, PERIYAKOIL P K, *et al.* Drivers of heterogeneity in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Nat Immunol*, 2023, 24(7): 1200-1210. doi: 10.1038/s41590-023-01527-9.
- [15] NAKANO K, WHITAKER J W, BOYLE D L, *et al.* DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(1): 110-117. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201526.
- [16] NAKANO K, BOYLE D L, FIRESTEIN G S. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol*, 2013, 190(3): 1297-1303. doi: 10.4049/jimmunol.1202572.
- [17] KAROUZAKIS E, TRENKMANN M, GAY R E, *et al.* Epigenome analysis reveals TBX5 as a novel transcription factor involved in the activation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol*, 2014, 193(10): 4945-4951. doi: 10.4049/jimmunol.1400066.
- [18] ZHENG L, GU M, LI X, *et al.* ITGA5(+) synovial fibroblasts orchestrate proinflammatory niche formation by remodelling the local immune microenvironment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2025, 84(2): 232-252. doi: 10.1136/ard-2024-225778.
- [19] DI MATTEO A, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01525-8.
- [20] HU Q, BOTUYAN M V, MER G. Identification of a conserved  $\alpha$ -helical domain at the N terminus of human DNA methyltransferase 1. *J Biol Chem*, 2024, 300(3): 105775. doi: 10.1016/j.jbc.2024.105775.
- [21] GOYAL R, RATHER P, LASER H, *et al.* Phosphorylation of serine-515 activates the Mammalian maintenance methyltransferase Dnmt1. *Epigenetics*, 2007, 2(3): 155-160. doi: 10.4161/epi.2.3.4768.
- [22] FLORES P C, AHMED T, PODGORSKI J, *et al.* Phosphoproteomic profiling identifies DNMT1 as a key substrate of beta IV spectrin-dependent ERK/MAPK signaling in suppressing angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 711: 149916. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149916.
- [23] HUANG S, SHAO T, LIU H, *et al.* SIRT6 mediates MRTF-A deacetylation in vascular endothelial cells to antagonize oxLDL-induced ICAM-1 transcription. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 96. doi: 10.1038/s41420-022-00903-y.
- [24] SHARMA V, JOSHI J, YEH I J, *et al.* Re-expression of ER $\alpha$  and AR in receptor negative endocrine cancers via GSK3 inhibition. *Front Oncol*, 2022, 12: 824594. doi: 10.3389/fonc.2022.824594.
- [25] MARKI A, LEY K. The expanding family of neutrophil-derived extracellular vesicles. *Immunol Rev*, 2022, 312(1): 52-60. doi: 10.1111/imr.13103.
- [26] 刘澈, 马源, 董旭鹏, 等. 微囊泡在脓毒症中的研究现状. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(6): 933-936. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2024.06.031.
- LIU C, MA Y, DONG X P, *et al.* Research status on the role of microbubbles in sepsis. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2024, 40(6): 933-936. doi: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2024.06.031.
- [27] HSU A Y, HUANG Q, PI X, *et al.* Neutrophil-derived vesicles control complement activation to facilitate inflammation resolution. *Cell*, 2025, 188(6): 1623-1641.e26. doi: 10.1016/j.cell.2025.01.021.
- [28] TSAI C Y, HSIEH S C, LIU C W, *et al.* Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils, Immune, and Non-Immune Cells via Released Cytokines, Granule Proteins, Microvesicles, and Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3119. doi: 10.3390/ijms22063119.
- [29] HIGASHI Y, YAMAKUCHI M, IBUSUKI A, *et al.* Neutrophil-derived microRNA-1290 promotes keratinocyte proliferation in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(7): 1471-1478.e6. doi: 10.1016/j.jid.2023.10.042.
- [30] ZHAN D, CROSS A, WRIGHT H L, *et al.* Internalization of neutrophil-derived microvesicles modulates TNF $\alpha$ -stimulated proinflammatory cytokine production in human fibroblast-like synoviocytes. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7409. doi: 10.3390/ijms22147409.
- [31] RHYS H I, DELL'ACCIO F, PITZALIS C, *et al.* Neutrophil microvesicles from healthy control and rheumatoid arthritis patients prevent the inflammatory activation of macrophages. *EBioMedicine*, 2018, 29: 60-69. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.003.
- [32] HEADLAND S E, JONES H R, NORLING L V, *et al.* Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*, 2015, 7(315): 315ra190. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5608.
- [33] ALEXANDER M, HU R, RUNTSCH M C, *et al.* Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun*, 2015, 6: 7321. doi: 10.1038/ncomms8321.
- [34] GOMEZ I, WARD B, SOUILHOL C, *et al.* Neutrophil microvesicles drive atherosclerosis by delivering miR-155 to atheroprone endothelium. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 214. doi: 10.1038/s41467-019-14043-y.
- [35] CHATTERJEE M, ÖZDEMİR S, FRITZ C, *et al.* Plasma extracellular vesicle tau and TDP-43 as diagnostic biomarkers in FTD and ALS. *Nat Med*, 2024, 30(6): 1771-1783. doi: 10.1038/s41591-024-02937-4.
- [36] JELINEK J, LEE J T, CESARONI M, *et al.* Digital restriction enzyme analysis of methylation (DREAM). *Methods Mol Biol*, 2018, 1708: 247-265. doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8\_13.
- [37] MINCIU R, DUMACHE R, GHEORGHE P, *et al.* Molecular diagnostic of prostate cancer from body fluids using methylation-specific PCR (MS-PCR) method. *Clin Lab*, 2016, 62(6): 1183-1186. doi: 10.7754/clin.lab.2015.151019.
- [38] TEOH Y B, ISHIZAKI T, KAGAWA Y, *et al.* Use of genome-wide DNA methylation analysis to identify prognostic CpG site markers associated with longer survival time in dogs with multicentric high-grade B-cell lymphoma. *J Vet Intern Med*, 2024, 38(1): 316-325. doi: 10.1111/jvim.16931.

(2025-03-11 收稿, 2025-07-30 修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2026 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*