

TNF- α -shRNA 对结核菌素诱导破骨细胞形成的影响

梁思敏¹, 马 荣¹, 马 赫², 于 洋², 殷 飞², 吴 鹏², 范凤龙², 戈朝晖¹

(1 宁夏医科大学总医院骨科 750004 银川市; 2 宁夏医科大学 750004 银川市)

【摘要】目的:构建靶向肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 基因的短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达载体, 观察其对结核菌素 (purified protein derivative, PPD) 诱导破骨细胞形成的影响。**方法:** 双酶切法构建 TNF- α -shRNA, 经脂质体转染小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7 细胞), 通过荧光显微镜观察 TNF- α -shRNA 的转染情况; 采用逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 观察转染前及转染后第 1、3、5、7 天 TNF- α 基因的表达情况; 以 RAW264.7 细胞为空白组、RAW264.7 细胞+1IU·ml⁻¹PPD 为对照组、RAW264.7 细胞+TNF- α -shRNA+1IU·ml⁻¹PPD 为转染观察组、RAW264.7 细胞+空载质粒+1IU·ml⁻¹PPD 为阴性转染组, 采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)、蛋白免疫印迹法 (Western blotting, WB) 检测各组第 3 天 TNF- α 基因和蛋白的相对表达量; 采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 计数各组第 7 天破骨细胞形成的数量。**结果:** TNF- α -shRNA 经脂质体成功转染 RAW264.7 细胞, 转染效率达 70%~80%。RT-PCR 显示转染后第 3 天 TNF- α 基因的表达最少, 第 5 天次之, 第 1 天、第 7 天和转染前比较差异不大。转染后第 3 天转染观察组 TNF- α 基因的相对表达量为 0.46 ± 0.03 , 同时间点空白组为 1.00 ± 0.00 , 对照组为 1.43 ± 0.09 , 阴性转染组为 1.38 ± 0.06 。转染后第 3 天转染观察组 TNF- α 蛋白的相对表达量为 55.34 ± 0.82 , 同时间点空白组为 59.13 ± 1.43 , 对照组为 82.72 ± 1.84 , 阴性转染组为 84.62 ± 0.97 。转染后第 7 天转染观察组破骨细胞形成的数量为 19.33 ± 1.53 个, 同时间点空白组为 5.67 ± 1.53 个, 对照组为 56.67 ± 3.79 个, 阴性转染组为 59.67 ± 3.51 个。转染观察组的 TNF- α 基因和蛋白的相对表达量及破骨细胞数量与空白组、对照组、阴性转染组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空白组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组与阴性转染组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** TNF- α -shRNA 可以特异性地沉默 RAW264.7 细胞内 TNF- α 基因的表达, 使 TNF- α 的产生减少, 抑制 PPD 诱导的破骨细胞形成。

【关键词】 基因敲除技术; 肿瘤坏死因子; 结核菌素; 破骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.08.11

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-08-0741-07

Effect of TNF- α -shRNA on osteoclast formation induced by tuberculin/LIANG Simin, MA Rong, MA He, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(8): 741-747

【Abstract】Objectives: By constructing a short hairpin RNA (shRNA) vector for targeted tumor necrosis factor α (TNF- α) gene, to observe its effects on osteoclast formation induced by tuberculin. **Methods:** TNF- α -shRNA was constructed by double enzyme digestion and transfected with liposome to mouse mononuclear macrophages (RAW264.7 cells). The transfection of TNF- α -shRNA was observed by fluorescence microscopy. The expression of TNF- α gene before transfection and at the first, third, fifth and seventh day after transfection was observed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The RAW264.7 cells were regarded as the blank group, the RAW264.7 cells+1IU·ml⁻¹ PPD as the control group, the RAW264.7 cells+TNF- α -shRNA +1IU·ml⁻¹ PPD as the transfection group and the RAW264.7 cells+empty plasmid+1IU·ml⁻¹ PPD as the negative transfection group, real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blotting (WB)

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (编号: 81460335), 宁夏自然科学基金项目 (编号: NZ17147)

第一作者简介: 男 (1982-), 主治医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱骨科

电话: (0951) 6746122 E-mail: 148376463@qq.com

通讯作者: 戈朝晖 E-mail: myovid@126.com

were used to detect the relative expressions of TNF- α gene and protein on the third day of each group. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) was used to count the number of osteoclasts on the seventh day of each group. **Results:** TNF- α -shRNA was successfully transfected into RAW264.7 cells via liposomes, the transfection efficiency was 70%-80%. The results of RT-PCR showed that the expression of TNF- α gene was the least on the third day after transfection, was less on the fifth day, but presented no significant difference on the first day and seventh day compared with that before transfection. The relative expression of TNF- α gene on the third day was 1.00 ± 0.00 in the blank group, 1.43 ± 0.09 in the control group, 0.46 ± 0.03 in the transfected observation group, and 1.38 ± 0.06 in the negative transfection group, respectively. The relative expression of TNF- α protein on the third day was 59.13 ± 1.43 in the blank group, 82.72 ± 1.84 in the control group, 55.34 ± 0.82 in the transfected observation group, and 84.62 ± 0.97 in the negative transfection group. The number of osteoclast formation on the seventh day was 5.67 ± 1.53 in the blank group, 56.67 ± 3.79 in the control group, 19.33 ± 1.53 in the transfection group, and 59.67 ± 3.51 in the negative transfection group. The relative expression of TNF- α gene and protein and the number of osteoclasts in the observation group were compared with those in the blank group, the control group and the negative transfection group ($P < 0.05$), and the differences were statistically significant. The difference between the blank group and the control group was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference between the control group and the negative transfection group in $P > 0.05$. **Conclusions:** TNF- α -shRNA can specifically silent the expression of TNF- α gene in RAW264.7 cells, thereby reduce the production of TNF- α and inhibit the formation of osteoclasts induced by tuberculin.

[Key words] Gene knockout technique; Tumor necrosis factor; Tuberculin; Osteoclast

[Author's address] Department of Orthopedics, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

脊柱结核是由结核分枝杆菌感染引起的、以进行性椎骨破坏为主要病理特征的一种慢性疾病。破骨细胞的异常活化和增殖是脊柱结核骨质破坏发生发展的始动因素。破骨细胞是一种终末分化细胞,由破骨细胞前体细胞(单核巨噬细胞)分化而来,执行骨吸收功能。结核菌素(purified protein derivative, PPD)、结核杆菌菌体裂解物以及结核菌分泌物均可激活或诱导单核巨噬细胞分化为破骨细胞。但是对于结核杆菌诱导破骨细胞形成的分子机制迄今并不完全清楚。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)是体内最主要的促炎细胞因子,由单核巨噬细胞分泌产生。破骨细胞的形成是否与 TNF- α 的诱导作用有关,目前尚无定论^[1]。在前期研究中,我们用 PPD 来模拟脊柱结核的病理状态,刺激破骨细胞前体细胞——小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7 细胞),结果发现 PPD 能诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞^[2];同时我们还检测了细胞中 TNF- α 的表达情况,发现 PPD 诱导破骨细胞的形成与 TNF- α 的高表达关系密切^[3]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是真核生物中普遍存在的一种自然现象,其最大的特点就是能够特异性地抑制靶基

因的表达,实现转录后的基因沉默效应。RNAi 不仅被用于基因功能的研究,而且在疾病的临床治疗方面也显示出了巨大的潜能^[4]。假设 RNAi 技术能够特异性地抑制 TNF- α 基因的表达,就可以使 TNF- α 的产生减少,达到抑制破骨细胞形成的作用。本研究拟在前期研究的基础上,构建靶向 TNF- α -shRNA,并转染 RAW264.7 细胞,通过观察其基因沉默效应以及对破骨细胞形成的影响,进一步验证 TNF- α 与破骨细胞形成之间的关系,为破骨细胞的基因治疗确定分子靶标,为后期脊柱结核骨质破坏的干预研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

RAW264.7 细胞(中国科学院上海细胞库)、PPD($50 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 成都生物制品有限公司)、DMEM 培养基(Gibco, 美国)、载体 SD1211(Western Biotechnology, 中国)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒(南京建成, 中国)、逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)试剂(Western Biotechnology, 中国)、实时荧光定量 PCR(real-time

quantitative PCR, qPCR) 试剂 (Western Biotechnology, 中国)、sybr green I (Western Biotechnology, 中国)、胶回收试剂盒 (Qiagen, 美国)、质粒小量抽提试剂盒 (Promega, 美国)、BamH I (TaKaRa, 日本)、Hind III (TaKaRa, 日本)、引物 (上海生工, 中国)、制备感受态试剂盒 (Biosciences, 美国)、TNF- α 一抗 (Abcam, 英国)、内参一抗 (Abcam, 英国)、IgG 二抗 (Sigma, 美国)、图像分析系统 Labworks™ Analysis (Softwar, 美国)、qPCR 仪 (Eppendorf, 德国)、测序仪 (Invitrogen, 美国)、稳压 DNA 电泳仪 (Bio-Rad, 美国)、微量 DNA/RNA 定量仪 (GeneGuent Pro, 美国)。

1.2 TNF- α -shRNA 的构建

①双酶切反应: TNF- α 基因片段和载体 SD1211 经 BamH I 和 Hand III 37℃ 水浴双酶切 30min。双酶切反应体系为 BamH I 1 μ l、Hand III 1 μ l、10 $\times$ Buffer 2 μ l、SD1211 或 TNF- α 5 μ l、ddH₂O 11 μ l。②双酶切后行琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收。③将回收产物进行连接反应。反应体系为 TNF- α 双酶切回收产物 2.5 μ l, SD1211 双酶切回收产物 2.5 μ l, T4 连接酶 5 μ l。将连接混合液转入 Trans5 α 感受态细胞中, LB 培养液培养扩增。④收集菌液进行测序。TNF- α -shRNA 序列为: GGATCCCGCAAAGA CAACCAACTAGTGGTTTCAAGAGAACCACTAGT TGGTTGTCTTTGTTTTTCCAAAAGCTT。

1.3 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞

①6 孔板每孔接种 2×10^5 个细胞, 加 2ml 无抗生素培养基, 放入 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养 48h, 弃去完全培养基, PBS 清洗, 加 Opti-MEM 1ml, 37℃ 培养箱中孵育 1h。②按照 5 μ l/孔取脂质体 (Lipofectamine) 2000, 用 Opti-MEM 培养基稀释至终体积为 250 μ l, 轻轻混合, 室温孵育 5min。③按照每孔中取 TNF- α shRNA 2.5 μ l, 用 Opti-MEM 培养基稀释至终体积为 250 μ l, 轻轻混匀, 室温孵育 5min。④将配备好的脂质体 2000 稀释液和 shRNA 稀释液轻轻混匀, 室温孵育 20min 形成 shRNA-脂质体 2000 混合物。⑤将 FITC-shRNA-脂质体 2000 混合物加入各孔中轻轻摇晃, 使其均匀分布, 置于 37℃ 培养箱中培养。转染 6h, 更换完全培养基。转染 48h, 拍照。在荧光显微镜下计数绿色荧光细胞和总细胞的个数, 计算转染率, 转染率=绿色荧光细胞数/总细胞数。

1.4 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞后 TNF- α 基因表达的检测

采用 RT-PCR 方法检测。选取正常 RAW264.7 细胞以及 TNF- α -shRNA 转染后第 1、3、5、7 天的细胞。①细胞裂解, 提取总 mRNA。②将总 mRNA 作为模板, 合成 cDNA。③PCR: 反应体系为 EX Taq premix 10 μ l、Primer forward 1 μ l、Primer reverse 1 μ l、cDNA 模板 2 μ l、无核酶水 6 μ l。④电泳: 配制 1% 的琼脂糖凝胶, 取 5 μ l PCR 产物, 100V 电泳 20min。⑤曝光。根据电泳结果定性观察不同转染时间 TNF- α 基因的表达情况。

1.5 qPCR 检测转染后第 3 天 TNF- α 基因的表达情况

将 RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/ml 的细胞密度均匀地铺在 4 个 25cm² 的细胞培养瓶中, 待细胞贴壁后, 按照分组情况给予不同的处理。空白组为 RAW264.7 细胞、不予任何处理; 对照组为 RAW264.7 细胞+1IU $\cdot$ ml⁻¹PPD; 转染观察组为 RAW264.7 细胞+TNF- α -shRNA+1IU $\cdot$ ml⁻¹PPD、阴性转染组为 RAW264.7 细胞+空载质粒+1IU $\cdot$ ml⁻¹PPD。3d 后收集各组细胞。①提取各组细胞的总 RNA。②反转录: 反应体系为 2 $\times$ RT buffer 10 μ l、随机引物 (100pmol/ μ l) 1 μ l、RT-mix 1 μ l、模板 (RNA) 5 μ l、DEPC 水 3 μ l; 反应条件为 25℃ 10min、42℃ 50min、85℃ 5min。③qPCR: 反应体系为 2 $\times$ PCR buffer 25 μ l、引物 (25pmol/ μ l) 1 μ l $\times$ 2 (表 1)、sybr green I 0.5 μ l、模板 (cDNA) 2 μ l、DEPC 水 20.5 μ l; qPCR 扩增条件为 94℃ 4min、94℃ 20s、60℃ 30s、72℃ 30s, 循环 35 次, 72℃ 检测信号。TNF- α 基因的相对表达量=2^{- $\Delta\Delta C_t$} 。

1.6 蛋白免疫印迹法 (Western blotting, WB) 检测转染后第 3 天 TNF- α 蛋白的表达情况

分组情况同 1.5, 收集各组细胞。①细胞裂解, 提取全蛋白。②BSA 法测定各组细胞中蛋白的浓度。③SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳: 配胶 (12% 分离胶、5% 浓缩胶)、上样 (等量)、跑胶;

表 1 qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qPCR

引物名称 Primer name	产物大小 Product size(bp)	基因序列 5'-3' Sequence
TNF- α	183	F: CCCTCCAGAAAAGACACCATG R: CACCCCGAAGTTCAGTAGACAG
GAPDH	263	F: GAGACCTTCAACACCCACG R: ATGTCACGCACGATTTC

300mA 电流转膜 90min;5%脱脂牛奶室温封闭 2h;孵育一抗,4℃过夜;孵育二抗,室温 2h;TBST 清洗;曝光仪检测。TNF- α 蛋白的相对表达量=TNF- α 条带的灰度值/内参条带的灰度值。

1.7 TRAP 染色计数破骨细胞形成的数量

以 1×10^4 个/孔的细胞密度将 RAW264.7 细胞均匀地铺在 6 孔细胞培养板上,待细胞贴壁后,按照分组情况给予不同的处理(同 1.5),继续培养 7d;7d 后弃去培养液,PBS 清洗;4%多聚甲醛固定 10min;配制染色液,37℃恒温箱内避光孵育 2h;PBS 清洗后,苏木素复染 3min;自来水冲洗 5min 后烘干;倒置荧光生物显微镜观察,将细胞核 ≥ 2 个且胞浆出现紫蓝色颗粒的细胞视为破骨细胞。显微镜下(20 倍镜)合计每孔的中心点、3 点、6 点、9 点和 12 点 5 个视野的破骨细胞数,每组重复计数 3 孔,取其平均值,记作该组的破骨细胞数。

1.8 统计分析

所有数据均使用 SPSS 17.0 软件处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析比较各组间的总体差异,采用 LSD 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞

TNF- α -shRNA 经脂质体 2000 转染

RAW264.7 细胞,荧光显微镜下观察转染效率可达 70%~80%(图 1)。

2.2 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞后不同时间 TNF- α 基因的表达情况

正常 RAW264.7 细胞和 TNF- α -shRNA 转染后第 1、3、5、7 天的样本,经 PCR 扩增,TNF- α 基因的大小为 305bp。从图 2 中 PCR 条带亮度可以看出:转染后第 3 天的 PCR 条带亮度最弱,其次为转染后第 5 天,而其他 PCR 条带较亮,说明转染后第 3 天 TNF- α 基因的表达最少,故后续 qPCR 和 WB 实验检测转染后第 3 天的样本。

2.3 转染后第 3 天 TNF- α 基因的相对表达量

TNF- α -shRNA 转染后第 3 天,TNF- α 基因的相对表达量见表 2。转染观察组与空白组、对照组和阴性转染组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组与阴性转染组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);空白组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 TNF- α 蛋白的检测

2.4.1 蛋白条带 TNF- α -shRNA 转染后第 3 天,各组的 TNF- α 蛋白条带如图 3 所示。从图中条带可以看出,对照组和阴性转染组的 TNF- α 蛋白表达最多,转染观察组的 TNF- α 蛋白表达最少,说明 PPD 干预可以使细胞内的 TNF- α 蛋白表达上调,而转染后细胞内的 TNF- α 蛋白表达则下调。

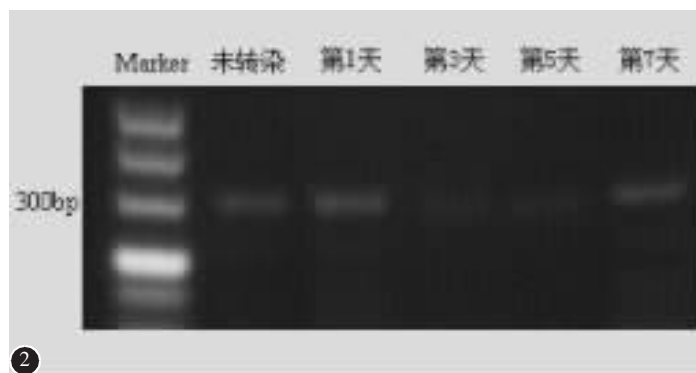
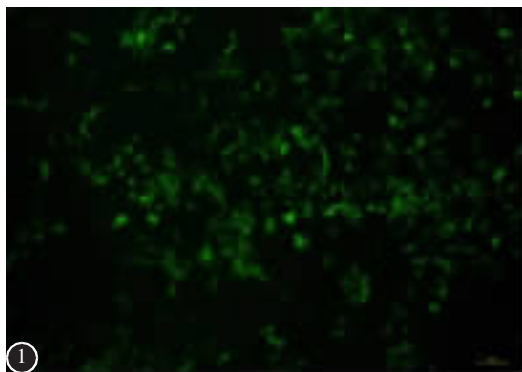


图 1 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞 ($\times 100$): 荧光显微镜下细胞呈现绿色荧光, 转染效率达 70%~80% 图 2 TNF- α -shRNA 转染 RAW264.7 细胞后不同时间 TNF- α 基因的表达情况: 转染后第 3 天 TNF- α 基因的表达最少, 第 5 天次之, 第 1 天、第 7 天和转染前比较差异不大

Figure 1 TNF- α -shRNA transfected RAW264.7 cells: the cells showed green fluorescence under fluorescence microscope, the transfection efficiency reached 70%~80% **Figure 2** The expression of TNF-alpha gene at different time after transfection of RAW264.7 cells by TNF-alpha-shRNA: the expression of TNF-alpha gene was the least on the third day of transfection, less on the fifth day, no significant difference on first day and seventh day compared with before transfection though

2.4.2 TNF- α 蛋白的相对表达量
TNF- α -shRNA 转染后第 3 天, TNF- α 蛋白的相对表达量如表 2 所示, 转染观察组与空白组、对照组和阴性转染组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 对照组与阴性转染组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 空白组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.5 破骨细胞形成的数量

转染第 7 天, 各组 TRAP 染色结果如图 4 所示, 破骨细胞形成的数量如表 2 所示, 转染观察组与空白组、对照组和阴性转染组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 对照组与阴性转染组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 空白组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

RNAi 最早是在秀丽线虫^[9]中被发现的, 它是所有真核生物中高度保守、普遍存在的一种正常现象, 能特异地抑制目的基因的表达, 实现转录后的基因沉默作用。RNAi 的核心部分是 siRNA, 但 siRNA 的稳定性差, 持续作用时间短, 使它的应用受到了限制^[9]。shRNA 是 siRNA 的前体, 是由一段长 4nt 的单链环结构和一段长度为 21~25bp 的双链配对区组成, 由 RNA 聚合酶 III 启动子在细胞核内驱动转录产生, 后被核质转运蛋白识别并运出胞核, 然后在胞质内被 Dicer 内切酶识别切割, 形成成熟的 siRNA, 发挥基因调控功能^[7]。shRNA 克服了 siRNA 本身固有的缺点, 实现了在

细胞内的长期稳定表达。RNAi 不仅是研究基因功能的一种手段, 而且逐渐被应用于临床, 有可能成为治疗疾病的一种有力工具^[8]。

外源性基因转染细胞的方法^[9]有病毒感染、阳离子脂质体介导和电穿孔三种, 目前最常用的是病毒感染和阳离子脂质体介导, 这两种方法各有优劣, 脂质体的转染率较病毒载体低, 表达时间短, 但是生物安全性好^[10,11]。阳离子脂质体是由磷脂和类固醇组成的微球, 类似于细胞膜的脂质双分子层结构, 通过与细胞膜融合的方式将外源性基因转移到细胞内^[12]。本研究构建的 TNF- α -shRNA 经阳离子脂质体介导成功转染 RAW264.7 细胞, 绿色荧光显像和 RT-PCR 结果均证实, 脂质体能将 TNF- α -shRNA 转至靶细胞内, 而且在细胞内至少可以持续表达 7d。张立英等^[13]也采用了脂质体介导的方法转染 TNF- α -shRNA, 结果证明此方法能有效沉默 TNF- α 基因, 抑制 TNF- α 的表达。本研究 qPCR 和 WB 实验结果均显示, PPD 可以使 RAW264.7 细胞内 TNF- α 的表达上调; 转染观察组与对照组相比, TNF- α 的表达显著下降, 说明 TNF- α -shRNA 确实发挥了 RNA 干扰的作用, 使 TNF- α 的表达下调。而阴性转染组与对照组相比, TNF- α 的表达差异没有统计学意义, 进一步验证了 TNF- α -shRNA 的靶向基因沉默效应。分析 TRAP 染色结果, 对照组破骨细胞形成的数量显著增加, 而转染观察组破骨细胞形成的数量明显下降, 说明 TNF- α -shRNA 通过 RNAi 有效地

表 2 不同组 TNF- α 基因、蛋白的相对表达量及破骨细胞形成的数量 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 The relative expression of TNF- α gene and protein and the number of osteoclast formation in different groups

	空白组 Blank	对照组 Control	转染观察组 Transfection	阴性转染组 Negative Transfection
基因表达量 Relative expression of gene	1.00 $\pm$ 0.00 ^①	1.43 $\pm$ 0.09 ^②	0.46 $\pm$ 0.03 ^③	1.38 $\pm$ 0.06
蛋白表达量 Relative expression of protein	59.13 $\pm$ 1.43 ^①	82.72 $\pm$ 1.84 ^②	55.34 $\pm$ 0.82 ^③	84.62 $\pm$ 0.97
破骨细胞(个) Osteoclasts	5.67 $\pm$ 1.53 ^①	56.67 $\pm$ 3.79 ^②	19.33 $\pm$ 1.53 ^③	59.67 $\pm$ 3.51

注: ①与对照组比较, $P<0.05$; ②与阴性转染组比较, $P>0.05$; ③与空白组、对照组和阴性转染组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with negative transfection group, $P>0.05$; ③Compared with blank group, control group and negative transfection group, $P<0.05$

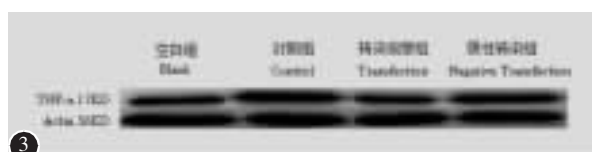


图 3 TNF- α 蛋白条带: 转染观察组 TNF- α 蛋白的表达最少
Figure 3 TNF- α protein band: The expression of TNF- α protein in the transfected observation group was the least

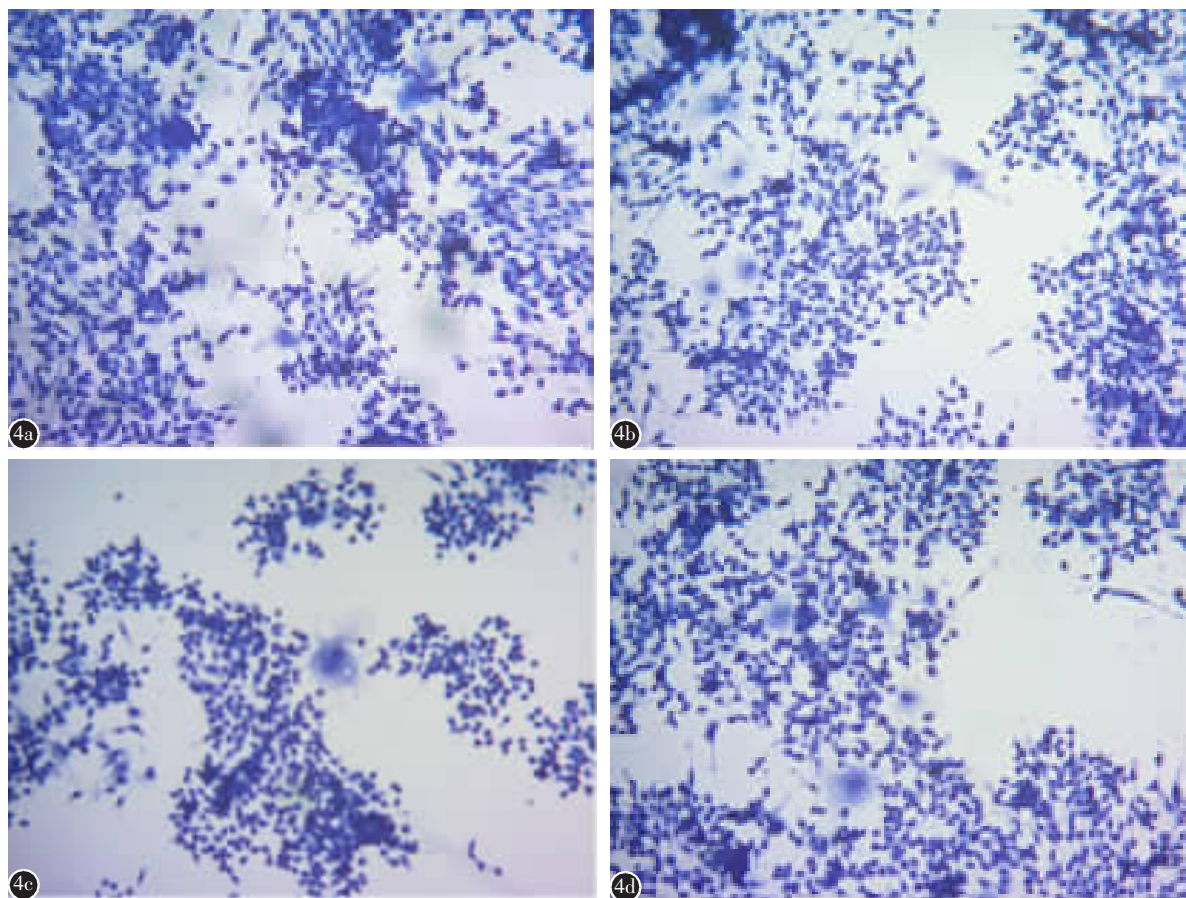


图 4 各组细胞的 TRAP 染色结果(a 为空白组, b 为对照组, c 为转染观察组, d 为阴性转染组, 倒置显微镜下 $\times 20$): 破骨细胞的细胞核 ≥ 2 个且胞浆出现紫蓝色颗粒, 对照组破骨细胞形成的数量最多, 转染观察组破骨细胞形成的数量减少

Figure 4 TRAP staining results of cells in each group(blank group, control group, transfection group, negative transfection group respectively a-d, Inverted microscope $\times 20$): the nucleus of osteoclasts were greater than or equal to 2 and the cytoplasm was stained into purple blue, the number of osteoclasts was the largest in the control group, and the number of osteoclasts decreased in the transfection group

抑制了 TNF- α 的表达,使破骨细胞形成的数量减少。余博等^[14]采用腺病毒感染的方法转染 TNF- α -siRNA,发现 TNF- α -siRNA 能够减少破骨细胞的形成,抑制骨溶解。

脊柱结核是由结核分枝杆菌感染引起的以进行性骨质破坏和椎旁脓肿形成为主要特点的慢性感染性疾病,其病变范围广,破坏程度大,主要累及椎体、椎间盘及肌肉韧带等软组织,晚期因椎体塌陷和脊髓压迫而出现脊柱后凸畸形或截瘫,致残率较高,严重危害人类的身体健康^[15]。脊柱结核椎骨破坏的病理改变与结核杆菌引起破骨细胞的异常活化和增殖有着密切的关系^[16]。破骨细胞是体内唯一一种行使骨吸收功能的细胞,与正常的骨代谢及多种疾病密切相关。破骨细胞作为一种终末分化细胞,只能由其前体细胞分化而来,正常

情况下在骨组织中的含量非常少^[17]。体内破骨细胞的形成是一个非常复杂的过程,涉及细胞因子、激素、免疫调节、细胞通讯等多种因素^[18]。TNF- α 作为体内最主要的促炎细胞因子,与细胞表面的受体结合而发挥其生物学效应^[19]。研究显示,结核病灶中的 TNF- α 水平增高^[20],结核杆菌所致的破骨细胞形成是否与 TNF- α 有关,目前尚无统一意见。我们前期的研究结果显示,脊柱结核破骨细胞的形成与 TNF- α 呈正相关,可能机制为结核分枝杆菌侵入机体后,其菌体、菌体裂解物及结核杆菌分泌物能够激活单核巨噬细胞^[21],活化的单核巨噬细胞能够分泌 TNF- α ,TNF- α 诱导破骨细胞形成,促进骨吸收,加速骨质破坏^[22]。本研究通过构建靶向 TNF- α -shRNA,经脂质体转染 RAW264.7 细胞,结果进一步证实了 TNF- α 在破骨细胞形成

中的关键作用,同时将 RNA 干扰技术与破骨细胞形成紧密联系了起来,不仅为后续将要进行的脊柱结核骨质破坏的干预性研究奠定了基础,而且为骨质破坏的基因治疗提供了参考依据。

综上所述,TNF- α 与破骨细胞的形成关系密切,TNF- α -shRNA 可以靶向沉默单核巨噬细胞中 TNF- α 基因,使 TNF- α 基因的表达下调、TNF- α 的产生减少,从而达到抑制破骨细胞形成的作用。对于脊柱结核骨质破坏的研究有一定的指导意义。

4 参考文献

- 梁思敏,蔡则成,马赫,等.肿瘤坏死因子- α 在骨关节结核中的研究进展[J]. 宁夏医科大学学报, 2018, 40(1): 115-121.
- 梁思敏,马赫,潘希安,等. PPD 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2016, 38(12): 1352-1355.
- 马赫,张建群,梁思敏,等. TNF- α 与破骨细胞形成的关系初探[J]. 宁夏医科大学学报, 2018, 40(1): 17-20.
- Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference: a silent but an efficient therapeutic tool[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169(6): 1774-1789.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- 尚仁福,吴立刚. RNA 干扰的机制及其应用[J]. 生命科学, 2016, 28(5): 576-583.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(8): 948-958.
- Pereira TC, Lopes-Cendes I. Medical applications of RNA interference(RNAi)[J]. BMC Proc, 2013, 7(Suppl 2): K21.
- 王月丽,魏继楼,程红蕾,等. 外源基因转染细胞技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1382-1384.
- 孙宁,陈剑秋,孙晋津,等. 转染内皮祖细胞的脂质体与腺病毒载体的比较[J]. 天津医药, 2012, 40(1): 46-49.
- 刘彭若峰. 阳离子脂质体和慢病毒载体转染 MSCs 的比较研究[D]. 浙江大学, 2015.
- 黄柯鑫,赵斌. 阳离子脂质体转染效率影响因素的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(14): 1704-1705.
- 张立英,刘绍霞,赵国强,等. TNF- α 基因 siRNA 真核表达载体的构建及其对 A549 细胞 TNF- α 和 TGF- β 1 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2012, 47(5): 629-632.
- 余博,郝绍文,孙首选,等. 小干扰 RNA 沉默 TNF- α 表达并抑制骨溶解的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(8): 994-999.
- Garg RK, Somvanshi DS. Spinal tuberculosis: a review[J]. J Spinal Cord Med, 2011, 34(5): 440-454.
- Hoshino A, Hanada S, Yamada H, et al. Mycobacterium tuberculosis escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines[J]. Pathog Dis, 2014, 70(1): 28-39.
- Li X, He L, Hu Y, et al. Sinomenine suppresses osteoclast formation and Mycobacterium tuberculosis H37Ra-induced bone loss by modulating RANKL signaling pathways[J]. PLoS One, 2013, 8(9): 74274-74280.
- Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis [J]. J Biochem, 2016, 159(1): 1-8.
- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(1): 49-62.
- Chen H, Cheng C, Li M, et al. Expression of TNF- α , IFN- γ , TGF- β , and IL-4 in the spinal tuberculous focus and its impact on the disease [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(3): 1759-1764.
- Korb VC, Chuturgoon AA, Moodley D. Mycobacterium tuberculosis: manipulator of protective immunity[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 131-145.
- Mootoo A, Stylianou E, Arias MA, et al. TNF- α in tuberculosis: a cytokine with a split personality[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(1): 53-62.

(收稿日期:2018-04-07 修回日期:2018-07-28)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)