

基础论著

CD40 作为脊柱结核靶向治疗靶标分子的实验研究

雷建¹, 石仕元², 金卫东³, 耿广起³, 梁强¹, 郭龙⁴, 孙宇航⁵, 袁虎成¹, 尹虎权⁶, 王自立^{3,4}

(1 宁夏医科大学 750001 银川市; 2 浙江中医药大学附属中西医结合医院骨科 310003 杭州市;

3 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市; 4 上海国龙医院 201318 上海市;

5 山东省聊城市中医医院骨科 252000 聊城市; 6 美国 INTELIX 生物科技公司 33612 坦帕)

【摘要】 目的:通过对不同感染复数结核分枝杆菌侵染的正常人成骨细胞表面 CD40 分子差异表达的实验研究,探讨 CD40 作为脊柱结核分子靶向治疗的靶标分子的可行性。**方法:**将冷冻保存的正常人成骨细胞按照美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)的说明进行复苏和培养,传代至 3 代冻存备用;之后选择 Middlebrooke 7H9 液体培养基对荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP)进行培养,培养至对数中期备用。把传代后的人成骨细胞随机分为 A、B、C、D 四组, A 组为对照组, 是未被结核分枝杆菌侵染的人成骨细胞组; B、C、D 三组均为实验组, 分别是被感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1:1000、1:100、1:10 浓度的结核分枝杆菌侵染的人成骨细胞组。然后采用实时定量 PCR 与蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)的方法, 分别检测不同感染复数结核分枝杆菌诱导人成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达变化及成骨细胞表面 CD40 分子的表达变化。**结果:**传代后的人成骨细胞经荧光结核分枝杆菌侵染后, 观察发现各组细胞感染程度良好。A 组实时定量 PCR 反应结果表现为成人成骨细胞中存在 CD40 mRNA 的表达; A (1.0337±0.0715)、B (1.4083±0.1145)、C (1.7172±0.1294)、D (2.0378±0.1573)四组之间的表达存在差异($F=74.005, P<0.05$); B、C、D 三组分别与 A 组相比时, 均存在差异($P<0.05$), 表现为结核分枝杆菌侵染组 B、C、D 三组成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达均高于未侵染组 A 组; B、C、D 三组, 两两比较时, 均存在差异($P<0.05$), 表现为从 B 组到 D 组成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达依次上调。而通过蛋白免疫印迹法分析成骨细胞表面 CD40 分子的表达结果发现与上述 mRNA 表达上调的结果完全吻合。**结论:**结核分枝杆菌侵染人成骨细胞后可诱导成骨细胞中 CD40 mRNA 以及成骨细胞表面 CD40 分子的表达增多, 并且感染复数越高, 细胞表面 CD40 分子的表达越多。而 CD40 分子可与其所对应的核酸适体特异结合, 这就为使用 CD40 分子作为靶标分子, 对脊柱结核进行靶向治疗提供了理论基础。

【关键词】成骨细胞; CD40; 靶标分子; 结核分枝杆菌

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.09.10

中图分类号: R529.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-09-0832-07

Experimental study of CD40 as a target molecule for targeted treatment of spinal tuberculosis/LEI Jian, SHI Shiyuan, JIN Weidong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(9): 832-838

【Abstract】 Objectives: To explore the possibility of CD40 as a target molecule for targeted therapy of spinal tuberculosis, and to investigate the differential expression of CD40 molecules on the surface of normal human osteoblasts infected by different multiplicity of mycobacterium tuberculosis. **Methods:** Normal human osteoblasts from American Type Culture Collection (ATCC) were used in this study and logarithmic phase culture of mycobacterium tuberculosis(H37Ra-GFP) was used for infection experiment. The human osteoblasts were randomly divided into four groups: A, B, C and D. Group A was the control group, which was not infected by H37Ra-GFP. The other groups were all treatment groups, these groups were infected by Mycobacterium tuberculosis with the different multiplicity of infection (MOI) 1:1000, 1:100, 1:10. The expressions of CD40 mRNA in the human osteoblasts induced by Mycobacterium tuberculosis with different

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460336);宁夏回族自治区重点研发计划项目(NO.2016-25)

第一作者简介:男(1991-),医学硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0951)6743242 E-mail:sc_yutian1991@163.com

共同第一作者:石仕元 E-mail:ssylf@sina.com

通讯作者:王自立 E-mail:wangzlnx@126.com; 共同通讯作者:尹虎权 E-mail:info@intelix.com

infections were detected by real-time quantitative PCR. Western blot was used to analyze the changes of CD40 protein levels on the surface of osteoblasts. **Results:** The analysis of mycobacterium tuberculosis uptake by osteoblast showed different MOI of bacterial infection caused dose-dependently increasing the uptake. Real-time quantitative PCR results showed that the up-regulated expression levels of CD40 mRNA in human osteoblasts had been observed. There were significant differences ($F=74.005$, $P<0.05$) in the expressions of CD40 mRNA in group A(1.0337 ± 0.0715), B(1.4083 ± 0.1145), C(1.7172 ± 0.1294) and D(2.0378 ± 0.1573). Compared with group A, the expression of CD40 mRNA in mycobacterium tuberculosis infection group B, C, D was higher than that in non-infection group A, and there were significant differences($P<0.05$). There were differences in group B, C and D when comparing with each other($P<0.05$), and the expression of CD40 mRNA from group B to group D was up-regulated. The Western Blot results showed that the expression of CD40 on osteoblast surface was correlated well with the CD40 mRNA expression. **Conclusions:** The CD40 mRNA levels were dose-dependently up-regulated by different dose of mycobacterium tuberculosis infection. And the CD40 protein levels were correlated well with the mRNA levels, that showed the higher the multiplicity of infection, the more expression of CD40 molecules. Considering CD40 molecules can specifically bind to their corresponding aptamers, this study provides a theoretical basis for targeted treatment of spinal tuberculosis using CD40 molecules as targeting molecules.

【Key words】 Osteoblasts; CD40; Target molecule; Mycobacterium tuberculosis

【Author's address】 Graduate School, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750001, China

脊柱结核是结核分枝杆菌感染脊柱骨引起的慢性炎症性疾病,是一种常见的肺外结核^[1]。随着人口流动的增加、耐药结核病的不断增多、获得性免疫缺乏综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)的流行等原因,使得脊柱结核的治疗困难重重^[2-4]。而在影响脊柱结核疗效的诸多因素中,化疗失效是其中最重要的原因^[5],如何提高化疗效果是当务之急。传统的药物传递是通过自身血液循环的方式使药物到达病灶组织,但对于绝大多数治疗药物而言,由于人体各种天然或后天屏障的存在,使得其中只有一小部分药物能到达患病组织区域。有效的靶向药物传递是指利用细胞表面受体介导的细胞内药物传递,而携带有相应配体或适配体的药物载体可通过与细胞表面受体特异结合而达到对药物的靶向传递^[6]。研究发现,纳米微粒 pRNA-3WJ 的“三路结”结构与其他基因载体比较,在人体生理环境中相对的更加稳定且最大优势是可以在三个不同部位分别承载具有不同功能的靶向基因、沉默基因、治疗药物分子^[7],从而提高药物的治疗效果。本研究是根据上述理论对脊柱结核药物治疗系列研究中针对靶向基因的研究。虽然破骨细胞在脊柱结核的骨组织病理破坏过程中起着重要的作用,但是成骨细胞在其中所起的作用显得更为重要,表现为成骨细胞所分泌的 Class III Semaphorin (Sema3e)因子可抑制破骨细胞的形成^[8]。另有学者发现,分枝

杆菌在源自间充质细胞的成骨细胞中比在源自骨髓的巨噬细胞中生长更活跃^[9]。有研究表明成骨细胞也具有吞噬能力,但程度比巨噬细胞低^[10]。上述研究表明,成骨细胞很可能是一种潜在的靶细胞。根据人类蛋白质图谱可知,人体中主要表达 CD40 分子的组织器官是骨髓和免疫系统。在正常生理状态下,CD40 分子的表达通常较低^[11-13],而在疾病状态下其表达发生变化;研究表明,金黄色葡萄球菌和血清型肠道沙门氏菌感染可使老鼠及人的成骨细胞 CD40 分子的表达增多^[14]。且有文献研究显示 CD40 分子可与其本身所对应的配体特异结合^[15]。以上研究表明,CD40 分子很可能是一种潜在的靶标分子。本研究拟以不同感染复数(multiplicity of infection, MOI;其含义为感染时细菌与细胞的数量比值)的结核分枝杆菌感染人成骨细胞,通过观察不同 MOI 结核分枝杆菌对成骨细胞表面 CD40 分子表达的影响,以此来探讨把 CD40 作为靶标分子,从而对脊柱结核进行靶向药物治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象及其分组

实验所用人成骨细胞 hFOB 1.19 (ATCC^R CRL-11372TM)从美国模式菌种收集中心购买。本实验研究将人成骨细胞随机分为 A、B、C、D 四组。A 组为对照组,是未被结核分枝杆菌侵染的正

常人成骨细胞组;B、C、D 三组均为实验组,按照人成骨细胞分别被 MOI 为 1:1000、1:100、1:10 浓度的结核分枝杆菌侵染而分为 B 组、C 组、D 组。为达到最佳的实验效果,各组中所使用的六份人成骨细胞都选择了传代至 3 代的细胞。实验组所用培养到对数中期的荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP),是使用美国 OriGene 公司提供的 pGFPHYG2 质粒构建而成。本实验研究由宁夏医科大学总医院伦理审查委员会审核批准。

1.2 主要仪器及试剂

主要仪器:超速离心机(日本日立公司),超声波震荡机(美国 Branson 公司),CO₂ 细胞培养箱(美国 Fisher 公司),721 型分光光度计(上海佑科公司),24 孔荧光细胞培养板(美国 Corning 公司),icycler 荧光光谱热循环仪(美国 Bio-Rad 公司),SpectraMax Gemini EM Microplate Fluorescence Reader(美国 Molecular Device 公司)。

主要试剂:DMEM-F12(美国 Gibco 公司),胎牛血清(上海研谨生物科技有限公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),总 RNA 的提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),superscript III 反转录酶(美国 Invitrogen 公司),CD40 寡聚核苷酸引物(美国新英格兰生物公司),RT2 SYBR Green qPCR 人工混合物(包括热启动的 DNA 聚合酶, dNTPs, Mg²⁺ 和荧光染料 SYBR Green I)(德国 Qiagen 公司),CD40 特异抗体(英国 Abcam 公司)。

1.3 人成骨细胞的培养

人成骨细胞的复苏和培养:(1)将含有 1ml 人成骨细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴锅中迅速摇晃解冻,并往一离心管中加入上述细胞悬液,之后加入 4ml 培养液混合均匀。(2)在 1200r/min 的条件下离心 2min,弃上清液,并补加 1~2ml 培养液后吹打均匀。将所有的细胞悬液加入培养瓶中培养过夜,培养箱条件设置为温度 34℃,CO₂ 浓度为 5%,相对湿度为 75%,隔天换液并检查细胞密度。(3)培养至第 4 天,当培养瓶中细胞密度达到 90%时,使用胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化,之后加入培养液终止消化。收集消化所得的细胞悬液至离心管中,以 1200r/min 为条件离心 5min,弃上清液,并加入培养液将细胞重新悬浮且混合均匀。通过计数仪对细胞进行计数,以 1×10⁴/ml 分别接种于两个培养瓶中,每瓶 5ml 培养液(含体积分数

为 10% 的胎牛血清,DMEM-F12),然后在之前设置好条件的细胞培养箱中进行第 1 次传代培养,隔天换液并观察细胞形态。直至细胞传代至第 3 代时,将其置于-80℃冰箱中冻存备用。

1.4 荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP)的构建与培养

构建包含结核分枝杆菌强启动子(Mycobacterium strong promoter, MSP)以及表达增强绿色荧光蛋白(EGFP)的 pGFPHYG2 质粒,该质粒衍生自 pMSP12-GFP 质粒,首先通过中断 pMSP12-GFP 质粒中的 aph 基因(除去其中长度为 300bp 的 NsiI 片段),最后通过往 pMSP12-GFP 质粒中插入抗潮霉素基因而获得 pGFPHYG2 质粒。将 pGFPHYG2 质粒通过电穿孔的形式导入到结核分枝杆菌体内,使得结核分枝杆菌可以表达增强的绿色荧光蛋白,并通过使用倒置显微镜对结核分枝杆菌进入到成骨细胞的情况进行观察。选择添加 50μg/ml 潮霉素 B, 10% ACD 抗凝剂以及 0.4% 丙三醇的 Middlebrooke 7H9 液体培养基,对荧光结核分枝杆菌进行培养。对培养瓶中的结核分枝杆菌每 24h 进行一次 20s 左右的微超声波震荡,以防止细菌凝聚成团。将结核分枝杆菌置于温度为 37℃、含体积分数为 5% CO₂ 湿化空气的培养箱中进行培养,以保持培养液 pH 值稳定。待结核分枝杆菌培养到对数中期(optical density at 600nm[OD₆₀₀]=0.5)后,对人成骨细胞进行侵染。

1.5 荧光结核分枝杆菌对人成骨细胞的侵染

在 24 孔荧光细胞培养板中,以 3×10³/cm² 的细胞浓度种植人成骨细胞。将人成骨细胞随机分为 A、B、C 和 D 四组,A 组作为空白对照组,B、C、D 三组作为实验组,并在 37℃ 的培养箱中对成骨细胞进行 24h 的培养。然后分别使用 MOI 为 1:1000、1:100、1:10 浓度的荧光结核分枝杆菌悬液,以相同的体积加入 B、C、D 三组中,使其对正常的人成骨细胞进行侵染。之后在 37℃ 的细胞培养箱中,对侵染后的人成骨细胞进行培养。等培养到 6h 后,使用未加入血清的培养液清洗成骨细胞 3 次,以除去未进入到细胞中的荧光结核分枝杆菌。然后在 37℃ 的细胞培养箱中,对清洗后的成骨细胞进行 24h 的培养。最后使用 Molecular Device 公司的 SpectraMax Gemini EM Microplate Fluorescence Reader 读取荧光值定量结核分枝杆菌对成骨细胞的感染程度。

1.6 实时定量 PCR 分析

按照上述方法再次对成骨细胞进行感染,之后使用总 RNA 提取试剂盒分别提取以上四组(每组含六份的人成骨细胞)中总 RNA,并逆转录为单链 cDNA。CD40 引物设计为:CD40,正义链:5'-AAGAAGGCTGGCACTGTA-3',反义链:5'-GATGACACATTGGAGAAGAAG-3';GAPDH,正义链:5'-TATGACAACAGCCTCAAGAT-3',反义链:5'-AGTCCTTCCACGATACCA-3'。实时定量聚合酶链式反应采用了两步法,反应条件如下:95℃ 3min,1 个循环;95℃ 10s,60℃ 30s,重复 40 个循环;55℃~95℃,0.5℃增量,10s,1 个循环。

实时定量分析采用 Bio-rad 公司的 Iqcyler 荧光光谱热循环仪,CD40 mRNA 的测量使用 Ct 值相对定量的方法,并使用 GAPDH 作为内参进行校正。

1.7 蛋白免疫印迹分析

选取上述各组中经结核分枝杆菌侵染的成骨细胞,使用 PBS 清洗细胞 3 次,之后加入细胞裂解液,并离心弃沉淀;紧接着煮沸 5min,冰上冷却后,以 12000r/min 的条件离心 5min,取上清;然后上样 20~30μl 至 SDS-PAGE 胶(10cm×10cm)进行电泳,同时以 β-actin 作为内参;电泳分离转膜包括切胶、备膜、装膜、转膜等;免疫杂交与显色包括封闭、加一抗[抗-CD40 一抗(ab58391)稀释条件为 1:1000]、加二抗[抗兔 IgG 二抗(cell signaling 公司)稀释条件为 1:5000]、显影与定影,最后分析凝胶图像。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0(SPSS,美国)统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较使用单因素方差分析,组间两两比较使用 LSD-*t* 检验,检验水准 α 为 0.05。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌感染成骨细胞的程度分析

按照上述实验方法,将各组所得的荧光值,进行 $\bar{x} \pm s$ 处理(表 1)。经统计分析 A、B、C、D 四组之间两两比较时,有统计学意义($P < 0.05$)。从表中可以看出,不同感染复数结核分枝杆菌对人成骨细胞的感染程度呈剂量依赖型的表现形式,具体为感染复数越高,细胞中含有的结核分枝杆菌越多。

表 1 不同感染复数结核分枝杆菌对成骨细胞感染程度及 CD40 mRNA 表达的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Severity of infection of osteoblasts in different MOI of Mycobacterium tuberculosis

组别 Group	感染数值 Infection value	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ value
A	100.00±13.86	1.0337±0.0715
B	433.46±42.72 ^①	1.4083±0.1145 ^①
C	850.52±88.94 ^{①②}	1.7172±0.1294 ^{①②}
D	1360.31±128.17 ^{①②③}	2.0378±0.1573 ^{①②③}

注:①与 A 组比较 $P < 0.05$;②与 B 组比较 $P < 0.05$;③与 C 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with group A, $P < 0.05$; ②Compared with group B, $P < 0.05$; ③Compared with group C, $P < 0.05$

这就表明结核分枝杆菌对成骨细胞的感染程度良好,同时也表明该菌能有效地进入到成骨细胞中。

2.2 实时定量 PCR 结果

针对实时定量 PCR 反应,使用 Iqcyler 荧光光谱热循环仪测量 CD40 mRNA 的 Ct 值。CD40mRNA 相对表达量的分析使用 Ct 法进行计算。经统计分析 A、B、C、D 四组之间 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值的差异存在统计学意义($F=45.042, P < 0.05$)(表 1)。B、C、D 三组的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值分别与 A 组相比时,均明显高于 A 组($P < 0.05$),表现为 A 组与 B 组相比时, $P < 0.05$;A 组与 C 组相比时, $P < 0.05$;A 组与 D 组相比时, $P < 0.05$ 。B、C、D 三组间两两相比时的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值也存在差异,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),表现为 B 组与 C 组相比时, $P < 0.05$;B 组与 D 组相比时, $P < 0.05$ 。C 组与 D 组相比时, $P < 0.05$ 。实时定量 PCR 结果表现为感染复数越高,成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达越多。

2.3 不同感染复数结核分枝杆菌对成骨细胞表面 CD40 分子表达的影响

通过蛋白免疫印迹的方法,分析不同感染复数结核分枝杆菌对成骨细胞表面 CD40 分子表达的影响时,我们发现成骨细胞表面 CD40 分子的表达呈剂量依赖型的表现形式,具体为感染复数越高,CD40 分子表达越多(图 1),而这与上述对成骨细胞中 CD40 mRNA 表达的检测结果一致。

3 讨论

研究发现,在影响脊柱结核疗效的诸多因素中,抗结核失效是其最主要原因^[16-18]。而导致化疗失效的机制包括脊柱结核病灶壁硬化致密的屏障

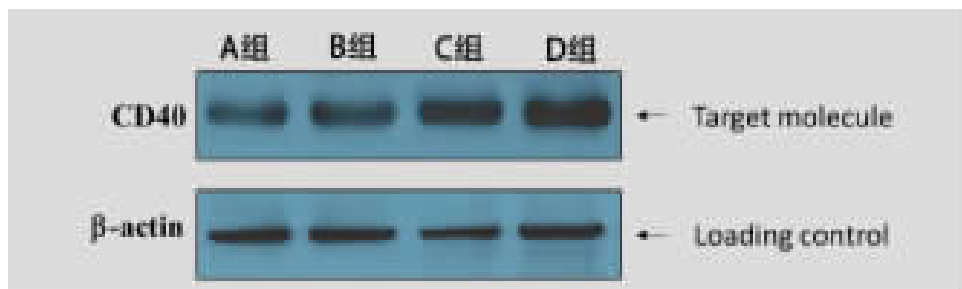


图 1 不同感染复数结核分枝杆菌对人成骨细胞表面 CD40 分子表达的影响

Figure 1 The effects of different MOI of *Mycobacterium tuberculosis* on CD40 molecule expression in Osteoblast cells

结构、耐药/耐多药结核病的出现、HIV/AIDS 的流行、单纯化学药物治疗的局限、病灶局部靶点药物浓度过低等等^[19-21]。针对以上抗结核治疗失效的机制,利用基因靶向作用的原理,本研究拟通过观察结核分枝杆菌对正常人成骨细胞表面 CD40 分子表达的影响,探讨把 CD40 分子作为靶标分子对脊柱结核进行靶向治疗的可行性。从而为下一步构建纳米靶向基因微粒、研制骨关节结核治疗新的给药方式、为解决脊柱结核抗结核无效的困境奠定基础。

纳米靶向基因微粒一般包含承载与转运功能的载体、干扰作用的沉默基因或药物、靶向作用的大分子物质或基因等组成部分。最新研究表明 pRNA-3WJ 基因具有承载与转运的功能,是理想的基因载体^[22,23];与其他基因载体相比较,pRNA-3WJ 基因具有十分突出的优点,例如它体积微小、承载量大、稳定性高、安全高效等^[24,25],因而是构建纳米靶向基因微粒的良好载体。虽说破骨细胞在脊柱结核骨组织破坏过程中起着重要的作用,但是有研究表明破骨细胞的分化或激活主要受成骨细胞的诱导^[26,27];而且也有研究显示成骨细胞在这一破坏过程中起着更为重要的作用,表现为当结核分枝杆菌侵染人成骨细胞时,该菌会影响成骨细胞的正常代谢过程,并且会使骨的形成发生障碍^[28-30]。根据上述机制,本研究中将人成骨细胞作为靶细胞,让纳米靶向基因微粒与成骨细胞特异结合,以达到对成骨细胞中含结核分枝杆菌区域进行靶向治疗的目的,而在此之前尚无该领域的研究报道,故寻找合适的靶标分子具有重要的学术价值。

本研究选择 CD40 分子作为靶标分子,从理论上讲是可行的。纳米靶向基因微粒的靶向作用是通过承载于纳米微粒中的特异核酸适配体针对

位于病变部位的与之相对应的靶细胞、靶分子、靶基因而产生“靶向”作用的。选择合适的靶标分子,从而产生靶向作用,这显得尤为重要。作为纳米微粒目标模块中针对特异核酸适配体的靶标分子需满足以下条件:第一,靶细胞位于机体受感染部位,在靶细胞表面有靶标分子表达;第二,结核分枝杆菌的侵染会促使其靶标分子表达增多;第三,与靶标分子产生靶向作用的,承载于载体的核酸适配体长度不能过长,一般以 25~60bp 长度为宜,否则会加大 pRNA-3WJ 纳米微粒的合成难度及影响基因纳米微粒的稳定性^[31-33]。与此同时承载于 pRNA-3WJ 纳米微粒上的核酸适配体,需要对其胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)进行 2-F' 修饰^[34-36],以增强核酸适配体的稳定性。通过查阅美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 可得 CD40 分子相对应的合适的核酸适配体序列为:5'-CCAACGAG-TAGGCGATAGCGCGTGG-3', 25bp, 其长度在合理范围之内,不至于因复杂寡核苷酸二级结构的形成而影响纳米微粒的合成。而且有研究表明当人成骨细胞被细菌感染时,可以诱导细胞表面 CD40 分子表达增加^[4]。虽然,目前尚无以骨结核成骨细胞表面 CD40 分子作为靶标分子的研究,但根据以上研究证据,将 CD40 分子作为纳米靶向基因微粒中针对特异核酸适配体的靶标分子是完全可行的。

本研究使用实时定量 PCR 的方法,来检测正常人成骨细胞被不同感染复数结核分枝杆菌侵染并经培养后细胞中 CD40 mRNA 的表达变化。而且我们通过 mRNA 基因翻译为蛋白分子的原理,利用蛋白免疫印迹技术来分析各组成骨细胞经结核分枝杆菌侵染后,细胞表面 CD40 分子的表达变化情况。上述研究结果显示,结核分枝杆菌对成

骨细胞的感染程度良好;当未使用结核分枝杆菌侵染时,对照组人成骨细胞中已有 CD40 mRNA 的表达;而当使用不同感染复数的结核分枝杆菌侵染人成骨细胞时,成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达与对照组相比明显上调;并且在实验组中的成骨细胞内 CD40 mRNA 的表达还与感染复数的高低有关,表现为随着感染复数的增高,成骨细胞中 CD40 mRNA 的表达逐渐上调,而蛋白免疫印迹法所得结果与上述 mRNA 表达上调的结果相一致。有研究表明细菌对成骨细胞的侵染可以诱导细胞表面 CD40 分子的表达增多,而本研究的结果也证实这点,即当结核分枝杆菌侵染人成骨细胞时,细胞表面的 CD40 分子表达增多。故将 CD40 分子作为 pRNA-3WJ 纳米微粒中针对特异核酸适配体的靶标分子是可行的,满足了设计的要求。

所以我们可以将人成骨细胞表面表达的 CD40 分子作为 pRNA-3WJ 纳米微粒上,针对特异核酸适配体的靶标分子。通过纳米微粒中特异核酸适配体与靶标分子 CD40 两者的结合,使 pRNA-3WJ 纳米微粒特异性的定位于成骨细胞表面;之后 pRNA-3WJ 基因纳米微粒穿透细胞膜屏障进入到成骨细胞中;待纳米微粒进入成骨细胞以后,凭借其上结合的沉默基因靶向沉默结核分枝杆菌上的 Mce4a 基因^[37,38],完成对靶基因的沉默效应,进而达到对脊柱结核的治疗目的,而与之相关的后续研究正在进行中。加之,沉默基因模块是针对结核分枝杆菌内的目的基因而产生作用,其并不会影响正常细胞的功能,具有一定的安全性。

综上所述,通过此次实验研究证实可以将 CD40 分子作为脊柱结核靶向治疗的靶标分子。但由于国内外对此的研究并不多,尚需要在细胞水平和分子水平去进一步验证 CD40 分子的靶向性能;并且本研究将进一步对 Mce4a 基因所对应的沉默基因、CD40 分子所对应的核酸适配体、抗结核分枝杆菌的化学药物分子承载于 pRNA-3WJ 纳米微粒“3WJ 结构域”上进行深入的研究,从而为脊柱结核抗结核失效寻找到一种行之有效的方法。

4 参考文献

1. Jain AK. Tuberculosis of the spine: a fresh look at an old

disease[J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(7): 905-913.

2. Okada Y, Miyamoto H, Uno K, et al. Clinical and radiological outcome of surgery for pyogenic and tuberculous spondylitis: comparisons of surgical techniques and disease types[J]. J Neurosurg Spine, 2009, 11(5): 620-627.
3. Jin W, Wang Q, Wang Z, et al. Complete debridement for treatment of thoracolumbar spinal tuberculosis: a clinical curative effect observation[J]. Spine J, 2014, 14(6): 964-970.
4. 王骞, 马文鑫. 骨关节结核: 骨病灶药物分布特点及缓释材料[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(48): 7859.
5. Tsuyuguchi K. Diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. Topics: III. Various problems in antimicrobial agents; 3. Advances in antituberculosis drugs[J]. Nihon Naika Gakkai Zasshi, 2013, 102(11): 2922-2927.
6. Galvin P, Thompson D, Ryan KB, et al. Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(3): 389-404.
7. Shu D, Shu Y, Haque F, et al. Thermodynamically stable RNA threeway junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics[J]. Nature Nanotechnology, 2011, 6(10): 658-667.
8. Hughes A, Helfrich MH, Rogers MJ. A class III semaphorin (Sema3e) inhibits mouse osteoblast migration and decreases osteoclast formation in vitro[J]. Calcif Tissue Int, 2012, 90(2): 151-162.
9. Rastogi N, Labrousse V, de Sousa JP. Mycobacterial growth and ultrastructure in mouse L-929 fibroblasts and bone marrow-derived macrophages: evidence that infected fibroblasts secrete mediators capable of modulating bacterial growth in macrophages[J]. Curr Microbiol, 1992, 25(4): 203-213.
10. Saad B, Matter S, Ciardelli G, et al. Interactions of osteoblasts and macrophages with biodegradable and highly porous polyesterurethane foam and its degradation products [J]. J Biomed Mater Res, 1996, 32(3): 355-366.
11. Chen J, Li JH, Zhao SJ, et al. Clinical significance of costimulatory molecules CD40/CD40L and CD134/CD134L in coronary heart disease: a case-control study [J]. Medicine, 2017, 96(32): e7634.
12. Bourcier T, De SM, Brignole F, et al. Expression of CD40 and CD40 ligand in the human conjunctival epithelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(1): 120-126.
13. Wang HM, Yan Q, Yang T, et al. Scaffold protein JLP is critical for CD40 signaling in B lymphocytes [J]. J Biol Chem, 2015, 290(9): 525-666.
14. Schrum LW, Marriott I, Butler BR, et al. Functional CD40 expression induced following bacterial infection of mouse and human osteoblasts. [J]. Infect Immun, 2003, 71(3): 1209-1216.
15. 胡如西. CD40 配体及其应用的研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2014, 37(5): 244-247.
16. Shi J, Wang Q, Wang Z. Primary issues in the selection of

- surgical procedures for thoracic and lumbar spinal tuberculosis[J]. *Orthop Surg*, 2014, 6(4): 259–268.
17. Diacon AH, Donald PR. The early bactericidal activity of antituberculosis drugs[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12(2): 223–237.
 18. 王自立, 王骞. 脊柱结核的手术策略 [J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(7): 717–723.
 19. Geng G, Wang Q, Shi J, et al. Establishment of a New Zealand rabbit model of spinal tuberculosis[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2015, 28(3): E140–E145.
 20. 宋向伟, 王骞, 施建党, 等. 脊柱结核彻底病灶清除术后 3~4.5 个月超短程化疗方案的疗效观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2017, 27(4): 326–332.
 21. Gray J, Cohn D. Tuberculosis and HIV coinfection[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2013, 34(1): 32–43.
 22. Guo PX, Erickson S, Anderson D. A small viral RNA is required for in vitro packaging of bacteriophage phi 29 DNA [J]. *Science*, 1987, 236(4802): 690–694.
 23. Haque F, Xu C, Jasinski DL, et al. Using Planar Phi29 pRNA Three-Way Junction to Control Size and Shape of RNA Nanoparticles for Biodistribution Profiling in Mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1632: 359–380.
 24. Shu Y, Shu D, Haque F, et al. Fabrication of pRNA nanoparticles to deliver therapeutic RNAs and bioactive compounds into tumor cells[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(9): 1635–1659.
 25. Liu J, Guo S, Cinier M, et al. Fabrication of Stable and RNase-Resistant RNA Nanoparticles Active in Gearing the Nanomotors for Viral DNA Packaging[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(1): 237–246.
 26. 田虹, 樊瑜波. OPG、RANK、RANKL 的结构、作用机制和在骨疾病中的作用[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(20): 3963–3966.
 27. 吴修团, 李文良, 谢柳蓉, 等. Hedgehog 信号通路调节成骨细胞 RANKL 表达的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(8): 1294–1300.
 28. Sarkar S, Dlamini MG, Bhattacharya D, et al. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in affinity for human osteoblasts and alveolar cells in vitro[J]. *Springer Plus*, 2016, 5(1): 163–170.
 29. Wright KM, Friedland JS. Differential regulation of chemokine secretion in tuberculous and staphylococcal osteomyelitis[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(9): 1680–1690.
 30. 张元豫, 刘霞, 李坤, 等. 重组结核杆菌热休克蛋白 10 对成人成骨细胞增殖及骨代谢的调节[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(11): 1665–1671.
 31. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818–822.
 32. Tseng CY, Ashrafuzzaman M, Mane JY, et al. Entropic fragment-based approach to aptamer design[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 78(1): 1–13.
 33. Tabarza M, Jafari M. Trends in the Design and Development of Specific Aptamers Against Peptides and Proteins [J]. *Protein J*, 2016, 35(2): 81–99.
 34. Maas S. Base modification RNA Editing: Information recoding on the fly[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(3): 243.
 35. Liao J, Liu B, Liu J, et al. Cell-specific aptamers and their conjugation with nanomaterials for targeted drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12(3): 493–506.
 36. Zhou J, Rossi JJ. The therapeutic potential of cell-internalizing aptamers[J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9(12): 1144–1157.
 37. Senaratne RH, Sidders B, Sequeira P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in *mce3* and *mce4* operons are attenuated in mice[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 2): 164–170.
 38. Shu Y, Pi F, Sharma A, et al. Stable RNA nanoparticles as potential new generation drugs for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 66: 74–89.

(收稿日期:2018-04-06 修回日期:2018-07-20)

(英文编审 郑国权/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)