

基础研究

pRNA 纳米微粒对脊柱结核分枝杆菌生长影响的实验研究

樊宏杰¹, 尹虎权², 金卫东³, 马文鑫³, 施建党³, 王自立^{3,4}, 石仕元⁵

(1 宁夏医科大学 750001 银川市; 2 美国 INTELIEX 生物科技公司 33612 坦帕; 3 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市; 4 西北大学附属西安国际医学中心医院脊柱外科 710100 西安市; 5 浙江大学医学院附属杭州市胸科医院骨科 310003 杭州市)

【摘要】目的:观察 pRNA-3WJ-siLNA gapmer(Mce4)-aptamer(CD40)纳米微粒(简称 pRNA 纳米微粒)在脊柱结核细胞模型中对结核分枝杆菌生长的影响。**方法:**利用荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞建立脊柱结核细胞模型。先培养及准备人成骨细胞,人成骨细胞培养至第三代;然后构建培养荧光结核分枝杆菌;将培养良好的人成骨细胞用 1×Trypsin-EDTA 胰蛋白酶消化之后以 70%密度在 100mm 细胞培养皿种植细胞,经 24h 培养使细胞稳定之后,将 1 麦氏比浊管的对数生长期中期荧光结核分枝杆菌以感染复数(multiplicity of infection, MOI)1:10 感染培养的人成骨细胞 6h,用不加血清培养液清洗 3 次,在培养箱中培养 24h;然后将感染成功的人成骨细胞随机分为 A 组(空白对照组)及 B、C、D 组(三个实验组),三个实验组分别置入本研究团队构建的 0.1μM、1μM、10μM 浓度的脊柱结核靶向治疗 pRNA 纳米微粒溶液,共培养 36h 之后,加入细胞裂解液裂解细胞,裂解产物用 Middlebrook 7H9 培养液稀释 20 倍,之后均匀涂抹到琼脂平板,放入到 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 21d,使用 Gel Doc XR+system 凝胶成像系统观察菌落影像,使用 Bio-Rad Discovery Quantity One[®] 1-D analysis 软件对四组的所有菌落进行了测定,统计分析各组人成骨细胞中结核分枝杆菌菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。**结果:**人成骨细胞培养良好;成功构建荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP);荧光结核分枝杆菌结合并进入人成骨细胞。经统计分析 A、B、C、D 四组菌落形成单位(272.67±67.06、183.33±8.74、154.33±25.72、76.67±11.02)的差异存在统计学意义($F=14.68, P<0.05$);且 B、C、D 三组的菌落形成单位分别与 A 组相比时,均明显低于 A 组($P<0.05$),B、C、D 三组菌落形成单位依次下调,三组菌落形成单位两两比较存在差异,并且有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**pRNA 纳米微粒以浓度梯度的方式抑制结核分枝杆菌在人成骨细胞中的生长存活,甚至低浓度也具备抑制结核分枝杆菌生长的能力。

【关键词】脊柱结核;纳米微粒;成骨细胞;结核分枝杆菌;菌落形成单位

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2021.02.09

中图分类号:R529.2, R978.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2021)-02-0158-09

Experimental study of the effects of pRNA nanoparticles on the growth of mycobacterium tuberculosis in the spine/FAN Hongjie, YIN Huquan, JIN Weidong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2021, 31(2): 158-166

【Abstract】Objectives: To observe the effects of pRNA-3WJ-siLNA gapmer(Mce4)-aptamer(CD40) nanoparticles(pRNA nanoparticles) on the growth of mycobacterium tuberculosis growth in spinal tuberculosis cell model. **Methods:** Spinal tuberculosis cell model was established by infecting human osteoblasts with fluorescent mycobacterium tuberculosis. First human osteoblasts were cultivated and prepared, which were cultured to the third generation, then fluorescent mycobacterium tuberculosis was constructed and cultured, which was cultured to the mid-logarithmic growth phase to infect human osteoblasts. Good human osteoblasts cultured were digested with 1×Trypsin-EDTA trypsin at a density of 70% in a 100mm cell culture dish. After culturing the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81460336、81660370)

第一作者简介:男(1976-),医学硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0951)6743242 E-mail:13837596195@163.com

共同第一作者:尹虎权 E-mail:info@inteliex.com

通讯作者:石仕元 E-mail:ssylf@sina.com **共同通讯作者:**王自立 E-mail:wangzlnx@126.com

cells for 24h to stabilize the cells, the mycobacterium tuberculosis fluorescent medium in the logarithmic growth phase of a 1 McFarland Standard was infected with the cultured osteoblasts at a multiplicity of infection(MOI) 1:10 for 6h, washed 3 times with serum-free culture medium, and cultured in an incubator for 24h. After that, human osteoblasts infected successfully were randomly divided into group A (the blank control group) and three experimental groups(group B, C and D), four groups were placed with pRNA nanoparticles at concentrations of 0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, and 10 μ M constructed by the research team. After 36h of co-cultivation, cell lysate was added to lyse the cells. The lysate was diluted 20-fold with Middlebrook 7H9 culture solution, then evenly spread on agar plates, and placed in 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ cell incubator for 21d. The gel Doc XR+system gel imaging was adopted to observe the colony images, and Bio-Rad Discovery Quantity One[®] 1-D analysis software was used to determine all the colonies in the four groups. The colony forming units of mycobacterium tuberculosis in each group of human osteoblasts were statistically analyzed. **Results:** Human osteoblasts were cultured well and fluorescent mycobacterium tuberculosis was successfully constructed. The fluorescent mycobacterium tuberculosis combined and entered human osteoblasts. After statistical analysis, the differences in colony forming units among the four groups A, B, C and D (272.67 $\pm$ 67.06, 183.33 $\pm$ 8.74, 154.33 $\pm$ 25.72, 76.67 $\pm$ 11.02) had statistical significance($F=14.68$, $P<0.05$); and the colony forming units of groups B, C, and D were significantly lower than those of group A($P<0.05$). The colony formation units of groups B, C, and D were lowered in turn, and there were differences between the three groups, and they were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions:** pRNA nanoparticles significantly inhibit the growth and survival of mycobacterium tuberculosis in osteoblasts in a concentration gradient manner, even low concentrations have the ability to inhibit the growth of mycobacterium tuberculosis.

[Key words] Spinal tuberculosis; Nanoparticles; Osteoblasts; Mycobacterium tuberculosis; Colony forming units

[Author's address] Graduate School, Ningxia Medical University, Yinchuan, 750001, China

在许多国家,耐药结核病是主要的公共卫生问题,结核分枝杆菌感染患者中对最有效的抗结核药物(即利福平和异烟肼)耐药的人数持续增加,这些病人被称为耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis,MDR-TB),在全球范围内,有4.6%的结核病患者患有耐多药结核病^[1]。骨关节结核是常见的肺外结核,在骨关节结核中脊柱结核多见。脊柱结核的治疗面临许多困境,比如发病率越来越高、耐药病例增加、手术率高、脊柱结核硬化壁包裹的结核病灶组织抗结核药难以达到等^[2-4]。在众多影响脊柱结核治疗效果的原因中,化疗效果至关重要,但由于耐多药结核分枝杆菌的出现以及艾滋病毒(human immunodeficiency virus,HIV)与结核病的共同感染,常导致化疗失败^[5],如何提高化疗效果已成为当前脊柱结核治疗的重点。有研究^[6]发现,结核分枝杆菌在来源于间充质细胞的成骨细胞中,比在来源于骨髓的巨噬细胞中活性更强,因此成骨细胞在脊柱结核骨破坏中可能比破骨细胞占有更重要的地位;有研究^[7]表明成骨细胞可以作为脊柱结核治疗的靶细胞。纳米技术广泛应用在化学、生物学、生物物理学、材料科学和生物医学领域,RNA具有不同结

构和多功能性,是构建纳米材料的理想选择;pRNA三向连接(pRNA three-way junction, pRNA-3WJ)已被广泛用作构建多功能RNA纳米颗粒的核心,3WJ基序的分支特征允许将不同的功能模块方便地整合到三个螺旋区域中,使其成为靶向药物递送的理想支架^[8,9]。本研究团队前期已构建合成具有脊柱结核靶向治疗功能的pRNA-3WJ-siLNA gapmer(Mce4)-aptamer(CD40)纳米微粒(简称pRNA纳米微粒),本研究拟用荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞,建立脊柱结核的细胞模型,用不同浓度的pRNA纳米微粒溶液处理培养良好的被感染人成骨细胞,来对pRNA纳米微粒在脊柱结核细胞模型中对结核分枝杆菌生长的影响进行研究,从而探讨应用pRNA纳米微粒治疗脊柱结核的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及其分组

从美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection,ATCC)购买hFOB 1.19(ATCC[®] CRL-11372TM)人成骨细胞,实验中为达到最好的实验结果,人成骨细胞均培养至第3

代;实验中所用荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP)由包含结核杆菌强启动子(mycobacterium strong promoter, MSP)及增强绿色荧光(enhanced green fluorescent pprotein, EGFP)的 pGFPHYG2 表达质粒通过电穿孔结核分枝杆菌构建而成,结核分枝杆菌(H37Ra)从 ATCC 购买。在实验中,被荧光结核分枝杆菌感染的人成骨细胞随机分为 A、B、C、D 四组,其中 A 组为空白对照组,未应用 pRNA 纳米微粒溶液处理;B、C、D 三组为实验组,分别用浓度 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M 的 pRNA 纳米微粒溶液处理。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:Gel Doc XR+system 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司);超速离心机(日本日立公司);精密电子天平(北京赛多利思科学仪器有限公司);超声波震荡机(美国 Branson 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Fisher 公司);电穿孔仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);100mm 细胞培养皿(丹麦 Nunc 公司);奥林巴斯 BX53 生物荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Cell Titer-Blue® Cell Viability Assay(Cell Titer-Blue® 细胞活力检测)盒(美国 Promega 公司);SpectraMax M Series Multi-Mode Microplate 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

主要试剂:潮霉素 B(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);氨基糖苷类抗生素 G-418(美国 sigma-aldrich 公司);DMEM/F-12 培养液(美国 Gibco 公司);Middlebrook 7H9 培养基(美国 Sigma-aldrich 公司);10% 胎牛血清(美国 Invitrogen 公司);Trypsin-EDTA 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);0.5% 牛血清蛋白(美国 Sigma-aldrich 公司);Middlebrook 7H10 琼脂基(美国 Sigma-Aldrich 公司);丙三醇(美国 Sigma-Aldrich 公司);Middlebrook OADC 增菌液(美国 BD Difco 公司);DPBS 液(美国 Sigma-aldrich 公司);PBS 缓冲液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);4% 多聚甲醛(美国 Fischehr scientific 公司);Triton X-100(美国 Sigma-aldrich 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 培养人成骨细胞 复苏和培养人成骨细胞:从 ATCC 购买的冷冻保管人成骨细胞 hFOB

1.19(ATCC® CRL-11372TM),用含有 1ml 细胞悬液的冻存管在 37℃ 恒温水浴箱中不时摇晃使其尽快融化,融化后用吸管吸出加入离心管,再加入 4ml 培养基均匀混合,以 1200r/min 离心 2min,弃上清液,补加 2ml 培养基后混匀。

然后将所有细胞悬液加入 25cm² 培养瓶中并放入培养箱静置培养,培养箱设置在 34℃,相对湿度 75%,CO₂ 浓度 5%。24h 后细胞开始贴壁生长,隔天换液去除未贴壁细胞,7~9d 细胞铺满瓶壁,用 PBS 液冲洗四遍培养瓶,加入 1.5ml 质量分数为 0.25% 胰蛋白酶,消化 10min,之后加入培养液终止消化,在倒置显微镜下观察细胞的分离、脱壁,将消化所得细胞悬液收至离心管中,加入相同量培养液,以 1200r/min 离心 5min,将上清液去掉,加入培养液使细胞重新悬浮于培养液中并均匀混合,计数仪计数后,以 1.0 $\times 10^4$ /ml 接种到培养瓶,置入 CO₂ 培养箱中培养,隔天换液并使用倒置相差显微镜观察成骨细胞形态。以下步骤同第一次培养传代方法,成骨细胞培养传代至第三代冻存备用。

1.3.2 荧光结核分枝杆菌(H37Ra-GFP)构建及培养 首先构建 pGFPHYG2 质粒,它从 pMSP12-GFP 质粒衍生而来。MSP 和 EGFP 包含在 pGFPHYG2 质粒中。先将 pMSP12-GFP 质粒中的 aph 基因(其中长度为 300bp 的 NsiI 片段去掉)中断,再将潮霉素抗性基因插入 pMSP12-GFP 质粒中,从而获得 pGFPHYG2 质粒。然后将 pGFPHYG2 表达质粒接种、提取及纯化,再通过电穿孔的形式将 pGFPHYG2 质粒导入到纯净培养的结核分枝杆菌体内,这样就构建成功可以表达增强绿色荧光蛋白的结核分枝杆菌,将带荧光结核分枝杆菌移到 Middlebrooke 7H9 液体培养基中进行培养。Middlebrooke 7H9 液体培养基中添加 50 μ g/ml 的潮霉素 B、10% 的复方枸橼酸钠液及 0.4% 丙三醇。

结核分枝杆菌细胞壁的脂质含量较高,影响营养物质的吸收,故生长缓慢,在一般培养基中每分裂 1 代需时 18~24h。结核分枝杆菌在培养过程中非常容易凝集成团。为了防止凝集成团,用微超声波对培养瓶中的结核分枝杆菌每 24h 进行一次 20s 左右的震荡;同时为了防止培养时间过长造成培养液 pH 值变化,需要在 37℃,5% CO₂ 培养箱里进行结核分枝杆菌的培养。所有下述实验用

的都是培养到对数生长中期 (optical density at 600nm [OD600]=0.5) 的荧光结核分枝杆菌 (H37Ra-GFP)。

1.3.3 荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞 将培养良好的人成骨细胞用 1×Trypsin-EDTA 消化之后以 70%密度往 100mm 细胞培养皿中种植细胞,之后在 34℃的细胞培养箱中对成骨细胞进行 24h 的培养使之稳定,将 1 麦氏比浊管的对数生长中期荧光结核分枝杆菌以 MOI 1:10 感染培养的人成骨细胞。被感染后的人成骨细胞放入 34℃,5% CO₂,相对湿度 75%的细胞培养箱中培养,等培养 6h 后,用含有 0.5%牛血清蛋白、25μg/ml 卡那霉素的 1×DPBS 小心清洗 3 次,从而去除不在人成骨细胞中的荧光结核分枝杆菌,清洗后的成骨细胞在 34℃,5% CO₂,相对湿度 75%的细胞培养箱中进行 24h 的培养,24h 后使用荧光显微镜观察荧光结核分枝杆菌对人成骨细胞的感染情况以及细胞的生长状态。

1.3.4 pRNA 纳米微粒结合成骨细胞 pRNA 纳米微粒具有易于观察及成像的荧光模块 AlexaFluor647。将按 1.3.1 培养的人成骨细胞随机分为 pRNA 纳米微粒处理的实验组及无任何药品处理的空白对照组。实验组、空白对照组人成骨细胞持续处理 2h,然后用 PBS 洗涤 3 次,再用 2ml 1×Trypsin-EDTA 胰蛋白酶化之后,移至提前加入 8ml 培养液 15ml 离心管中,2000g,离心 2min,去除上清用 1×PBS 清洗两次,加入 1ml 的 1×PBS 之后用 1ml 移液管上下混匀 60 次,以防止成骨细胞成团妨碍流式细胞仪的分析,之后加入 3ml 的 4%多聚甲醛进行 15min 固定,4000g,1500r/m,离心 5min,再用 1×PBS 清洗两次,再加入 1ml 的 PBS,用移液管使之充分混匀并重新悬浮之后,立即移动到流式细胞仪分析管中,用流式细胞仪进行荧光分析;各个分析结果使用了 BD FACSDiva 6.1 分析。以上所有离心及操作过程均避光、低温。

1.3.5 pRNA 纳米微粒作用于荧光结核分枝杆菌感染的人成骨细胞 被荧光结核分枝杆菌感染的人成骨细胞随机分为 A、B、C、D 四组,A 为空白对照组,B、C、D 为实验组,将 pRNA 纳米微粒用 1:1 的 DMEM/F12 培养基分别稀释至 0.1μM、1μM、10μM 浓度。0.1μM 作用于 B 组,1μM 作用于 C 组,10μM 作用于 D 组;上述不同浓度 pRNA 纳米微粒溶液分别加入 B、C、D 三组人成骨细胞培养

18h 后,再一次以同样浓度进行 18h 的增强处理,总共 36h 的纳米微粒作用之后,小心移除细胞培养液,用 1×DBPS 清洗细胞 3 次,之后加入 2ml 的细胞裂解液进行裂解细胞,然后在室温下培养 5min,在显微镜下观察是否完全裂解。细胞裂解液配制如下所述:称取磷酸二氢钾(KH₂PO₄) 0.27g;磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)1.42g;氯化钠(NaCl)8g;氯化钾(KCl)0.2g 一并加入 1L 容量的玻璃杯,加入 800ml 的三蒸水之后,用搅拌棒搅拌溶解,之后加入 1ml 的 Triton X-100 溶液继续用搅拌棒搅拌溶解,用 pH 计测定其 pH 值,并把 pH 值调成 7.4 之后加入 200ml 的三蒸水,完成配制细胞裂解液。

1.3.6 pRNA 纳米微粒处理的人成骨细胞中结核分枝杆菌菌落形成单位的测定 首先,配制用于结核分枝杆菌分离培养的 Middlebrook 7H10 琼脂平板,具体如下:称取 19.47g 的 Middlebrook 7H10 琼脂基,用 900ml 的三蒸水使之溶解,加入 5ml 的细胞培养级别的丙三醇之后,放入到高压灭菌器,设定 121℃,15min 灭菌并使之完全溶解,之后,在室温下使温度降至 45℃之后,加入 20ml 的 Middlebrook OADC 增菌液并搅拌混合,然后将配制好的 Middlebrook 7H10 琼脂液均匀倒到替氏培养皿当中(每一个皿约 15ml),并在超净工作台中使之固化,之后用于实验。

上述纳米微粒处理之后所得到的裂解产物用 Middlebrook 7H9 培养液稀释 20 倍,之后均匀涂抹到 Middlebrook 7H10 琼脂平板,放入到 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养 21d,等 21d 培养之后,可观察到菌落。菌落的影像收集使用了 Gel Doc XR+system 凝胶成像系统,使用 Bio-Rad Discovery Quantity One® 1-D analysis 软件对四组的所有菌落进行了测定。

1.3.7 pRNA 纳米微粒的细胞毒性评价 在人胰岛 β 细胞 INS-1832/13、人成骨细胞 hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372TM)、由人白血病单核细胞 THP-1 (ATCC® TIB-202TM)分化而来的破骨细胞、人 T 淋巴细胞 Clone E6-1 (ATCC® TIB-152TM)、人肝癌细胞 HepG2 中进行了 pRNA 纳米微粒的毒性测试。

将所有类型的细胞均培养至第三代,分别在 24 孔细胞培养板中以 70%密度种植。待在细胞培养箱中稳定 24h 之后,进行 pRNA 纳米微粒的处

理。pRNA 纳米微粒用培养液稀释至生理作用浓度 $20\mu\text{M}$ 之后加入上述 5 种细胞,再放入细胞培养箱培养 18h,再次用 $20\mu\text{M}$ 的 pRNA 纳米微粒增强处理培养 18h,总共 36h 纳米微粒的处理之后进行细胞毒性测定,细胞毒性的测定使用了 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit,具体如下:经 36h 培养之后,小心移除细胞培养液,之后加入含有 10% CellTiter-Blue® Cell Viability Assay 溶液的培养液加入细胞中,在 37°C 培养 1.5h,最后使用 SpectraMax M Series Multi-Mode Microplate 酶标仪读取了荧光度 (Excitation 560nm/Emission 590nm),观察纳米微粒处理组及对照组的试卤灵荧光值变化差值,即计算 1.5h 的读值与 0h 的读值差异,如果纳米微粒处理组的荧光值变化差值小于对照组且具有统计学意义,说明纳米微粒对于所处理细胞具有细胞毒性,反之不具有细胞毒性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 (SPSS, 美国) 统计软件对结果数据分析, $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料, F 检验用于多组之间比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义, 两组之间用 LSD- t 检验比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脊柱结核细胞模型中人成骨细胞培养结果

成骨细胞原代培养 24h 开始贴壁, 2~3d 时, 出现贴壁细胞增殖, 并向不规则形、梭形、锥形等形状分化, 高倍镜下见胞浆丰富, 单个核, 核内有 1~2 个核仁, 细胞表面有多个短突起, 细胞周围有较多黑色颗粒; 传代培养的成骨细胞 4~6h 开始贴壁, 6~8h 完全贴壁, 并向梭形、锥形细胞等形状转化, 细胞表面有多个突起 (图 1)。

2.2 脊柱结核细胞模型中荧光结核分枝杆菌 (H37Ra-GFP) 构建培养结果

pGFPHYG2 表达质粒 DNA 电穿孔到纯净培养的结核杆菌中, 之后在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 20d, 荧光显微镜下观察到菌落的形成 (图 2), 说明荧光结核分枝杆菌构建培养成功。

2.3 荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞构建脊柱结核细胞模型结果

荧光显微镜下观察与荧光结核分枝杆菌共培养 30h 的人成骨细胞, 可观察到细胞显示出明亮的荧光 (图 3), 这表明大量的荧光结核分枝杆菌已与成骨细胞结合。

2.4 pRNA 纳米微粒结合人成骨细胞结果

流式细胞仪荧光分析结果见图 4, 结果中

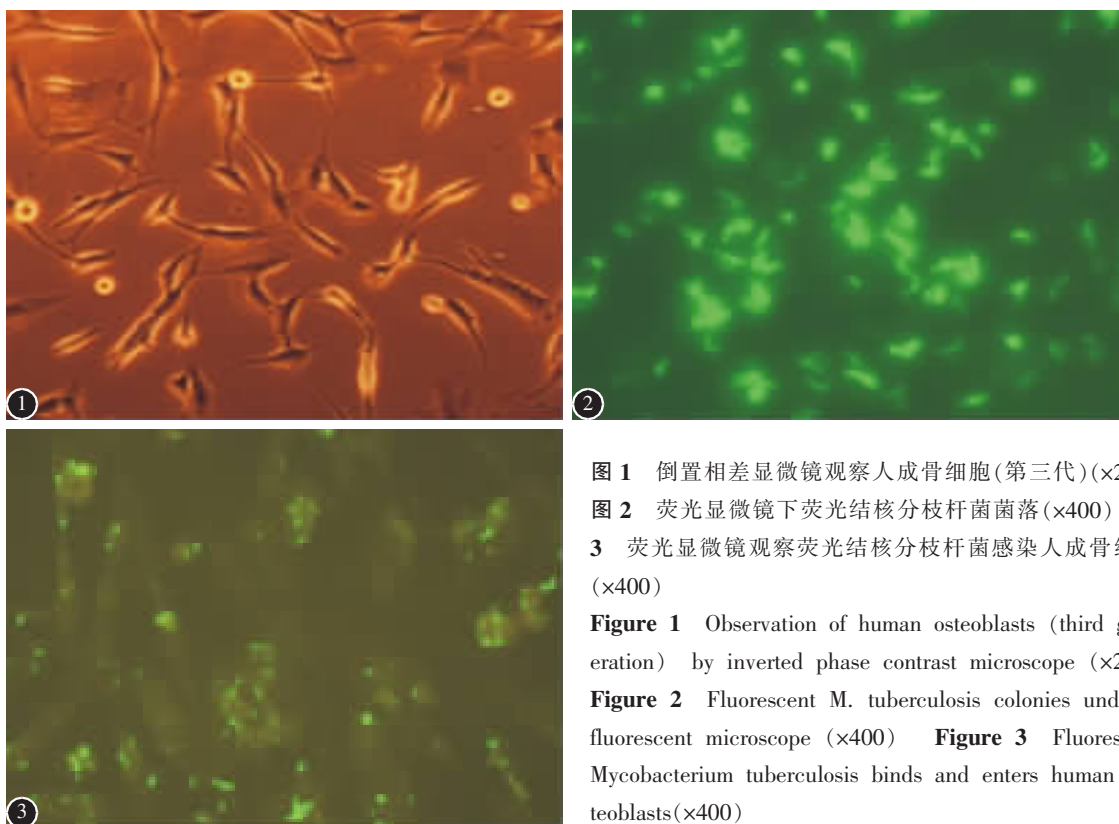


图 1 倒置相差显微镜观察人成骨细胞 (第三代) ($\times 200$)

图 2 荧光显微镜下荧光结核分枝杆菌菌落 ($\times 400$)

图 3 荧光显微镜观察荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞 ($\times 400$)

Figure 1 Observation of human osteoblasts (third generation) by inverted phase contrast microscope ($\times 200$)

Figure 2 Fluorescent *M. tuberculosis* colonies under a fluorescent microscope ($\times 400$)

Figure 3 Fluorescent *Mycobacterium tuberculosis* binds and enters human osteoblasts ($\times 400$)

Alexa647-A 中位数值是与成骨细胞结合之后所产生的荧光读数,这个值越高代表越多的纳米微粒与细胞结合。从图 4 中可看出,具有成骨细胞靶向核酸适配体(CD40 aptamer)pRNA 纳米微粒的处理使 Alexa647-A 中位数值明显增加(约 3 倍),说明 pRNA 纳米微粒可有效地与人成骨细胞结合。

2.5 pRNA 纳米微粒处理的被荧光结核分枝感染人成骨细胞中结核分枝杆菌菌落形成单位测定结果

见图 5,可以看出,pRNA 纳米微粒以浓度梯度的方式明显地抑制结核分枝杆菌在人成骨细胞中的生长存活。

应用 Bio-Rad Discovery Quantity One® 1-D analysis 软件对四组的所有菌落进行了测定,A 组为 272.67 ± 67.06 ,B 组为 183.33 ± 8.74 ,C 组为 154.33 ± 25.72 ,D 组为 76.67 ± 11.02 ,A、B、C、D 四组之间菌落形成单位比较 ($F=14.68, P<0.05$),差异具有统计学意义;且 B、C、D 三组的菌落形成单位均明显低于 A 组,B 组、C 组、D 组菌落形成单

位依次下调,B、C、D 三组两两比较均 $P<0.05$,差异有统计学意义。

2.6 pRNA 纳米微粒的细胞毒性测定结果

见表 1。Osteoblast 细胞对照组与纳米微粒处理组、Osteoclast 细胞对照组与纳米微粒处理组、T-lymphocyte 细胞对照组与纳米微粒处理组、HepG2 细胞对照组与纳米微粒处理组、INS-1832/13 细胞对照组与纳米微粒处理组试卤灵银光增加量差异均没有统计学意义,说明纳米微粒处理并不造成明显细胞毒性。

3 讨论

MDR-TB 和广泛耐药结核病(extensively drug-resistant TB,XDR-TB)的出现对全球结核病的控制造成了最大障碍^[10,11]。现在耐药结核病造成了全球近 25%的结核病死亡率,并且对医护人员构成威胁,治疗费用高昂,难以承受^[12,13]。脊柱结核是骨骼结核最常见和最严重的形式,严重危害患者的身体健康,可能导致椎体骨折、脊柱畸

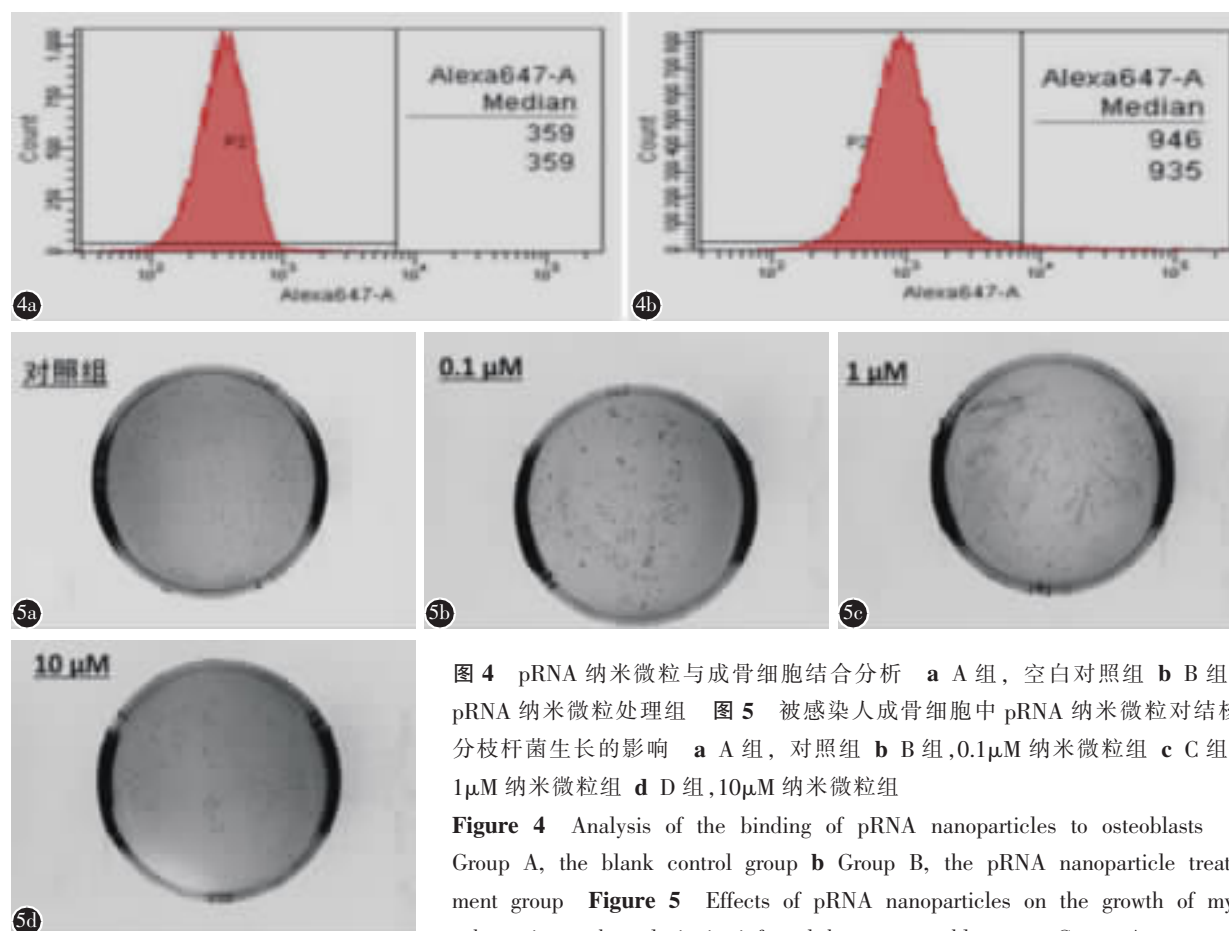


图 4 pRNA 纳米微粒与成骨细胞结合分析 a A 组,空白对照组 b B 组,pRNA 纳米微粒处理组 图 5 被感染人成骨细胞中 pRNA 纳米微粒对结核分枝杆菌生长的影响 a A 组,对照组 b B 组,0.1 μ M 纳米微粒组 c C 组,1 μ M 纳米微粒组 d D 组,10 μ M 纳米微粒组

Figure 4 Analysis of the binding of pRNA nanoparticles to osteoblasts a Group A, the blank control group b Group B, the pRNA nanoparticle treatment group Figure 5 Effects of pRNA nanoparticles on the growth of mycobacterium tuberculosis in infected human osteoblasts a Group A, control group b Group B, 0.1 μ M nanoparticles c Group C, 1 μ M nanoparticles d Group D, 10 μ M nanoparticles

group b Group B, 0.1 μ M nanoparticles c Group C, 1 μ M nanoparticles d Group D, 10 μ M nanoparticles

表 1 纳米微粒引起的试卤灵银光增加量
Table 1 Increment of halogenin silver light caused by nanoparticles

	对照组 Control group	处理组 Treatment group
Osteoblast细胞 Osteoblast cells	471.96±94.48	522.05±246.67
Osteoclast细胞 Osteoclast cells	1665.86±291.18	1690.66±245.21
T-lymphocyte 细胞 T-lymphocyte cells	2417.48±465.79	2057.88±426.86
HepG2 细胞 HepG2 cells	1901.33±299.23	1971.41±571.77
INS-1832/13 细胞 INS-1832/13 cells	2691.57±165.63	2686.23±122.65

形、截瘫甚至死亡^[14,15],治疗同样面临耐药菌的困扰,急需新型抗结核药物及制剂的研发。针对以上脊柱结核治疗困境,本研究团队首次构建了针对脊柱结核靶向治疗的 pRNA 纳米微粒。

目前研究表明基于纳米颗粒的治疗有超过常规治疗结核病的潜在优势,这有可能改变药物治疗方案并改善患者的依从性,即使在低治疗剂量下,也可以达到治疗目的,并且化疗时间也可以减少^[16]。纳米靶向治疗在近几年受到了广泛关注,高效的靶向递送系统可减少全身剂量,同时在靶部位产生相对更高或更有效的剂量,与全身用药方案相比减少了全身性副作用,同时提高了疗效^[17]。phi29 DNA 包装马达的包装 RNA (packaging RNA,pRNA)pRNA-3WJ 纳米粒子具有巨大的潜力,可用于治疗、成像和诊断应用^[9]。本研究团队以 pRNA-3WJ 纳米粒子为载体,在一个螺旋区域嵌合可以沉默结核分枝杆菌哺乳动物侵入蛋白 4A(Mammalian cell-entry proteins 4A,Mce4A)的基因特异杂合反义寡核苷酸 siRNA 序列 (LNA-DNA-LNA Gapmer antisense)^[18];在另一个螺旋区域嵌合能够靶向结合脊柱结核细胞模型成骨细胞中 CD40 分子的 CD40 核酸适配体 (aptamer)^[7],从而构建成功靶向治疗脊柱结核的 pRNA-3WJ-siRNAgapmer(Mce4)-aptamer(CD40)纳米靶向基因微粒。

在新型抗结核药物的研发中,主要有体外模型、细胞模型和动物模型三种筛选/评价模型。其中细胞模型操作方便、结果快,并且适用于大规模高通量筛选^[19,20],可以对体外筛选/评价的不足进行弥补。

研究发现脊柱结核破坏中成骨细胞和破骨

细胞之间有紧密联系,结核杆菌及其分泌物不仅能引起破骨细胞增殖,导致骨的破坏,还可以抑制成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶活性,同时对成骨细胞护骨素 mRNA 表达抑制,促进成骨细胞核因子 κ B 受体活化因子配体 mRNA 的表达,从而降低护骨素/核因子 κ B 受体活化因子配体的比率,最终促进破骨细胞的分化和成熟^[21]。本研究团队前期也在研究中发现脊柱结核病灶中 CD4+T 淋巴细胞与成骨细胞均可以吞噬结核分枝杆菌,但是 CD4+T 淋巴细胞的吞噬能力与成骨细胞相比弱于后者;根据结核分枝杆菌感染所分泌出的肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 标准物反应生成的标准曲线推算出结核分枝杆菌感染 CD4+T 淋巴细胞分泌的 TNF- α 量比成骨细胞感染后分泌的 TNF- α 的量明显减少,这表明在脊柱结核的发病过程中,成骨细胞与 CD4+T 淋巴细胞相比较,成骨细胞是主要的传播对象,可能起着更重要的作用^[22]。成骨细胞在脊柱结核病程中可能占有更重要地位,本研究通过以荧光结核分枝杆菌感染正常人成骨细胞,构建脊柱结核的细胞模型可行。用不同浓度的 pRNA 纳米微粒溶液处理被荧光结核分枝杆菌感染的人成骨细胞,观察 pRNA 纳米微粒在脊柱结核细胞模型中抑制结核分枝杆菌生长的效果,探讨把 pRNA 纳米微粒作为脊柱结核抗结核治疗的可行性,从而为脊柱结核抗结核治疗寻找一种新的药物、制剂。

目前,基于编码绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein,GFP) 基因的荧光测定法已被广泛用于原核生物中,这是由于 GFP 的几个性质,包括其有利于细菌存活和生长,低水平毒性,复制期间的连续生产,以及容易成像和定量。长久以来,分枝杆菌研究专门使用 hsp60 启动子融合到 GFP 中,用于各种实验研究;Collins 等^[23]证明携带 pFPV2(hsp60::gfp 构建体)的重组结核分枝杆菌菌株可用于评估已知抗分枝杆菌化合物的最低抑菌浓度。在本课题研究中,需要频繁测定结核分枝杆菌进入到细胞内的情况及结合能力,传统的方法是将结核分枝杆菌感染的细胞用细胞裂解液降解之后,涂抹到 7H10 琼脂板进行 2~4 周培养来确定,这种方法周期太长,实验过程繁琐,又不能保证实验的准确性,所以本研究构建基于 MSP 引发荧光的荧光结核分枝杆菌。pMSP12-GFP 质粒衍生出 pGFPHYG2 质粒,pGFPHYG2 质

粒包含 MSP 及 EGFP, 该质粒通过电穿孔到结核分枝杆菌, 在培养箱中培养 20d, 荧光显微镜下观察到菌落形成, 荧光结核分枝杆菌构建成功。然后将培养到对数生长中期的荧光结核分枝杆菌感染人成骨细胞, 荧光显微镜下观察到荧光结核分枝杆菌结合并进入到人成骨细胞, 细胞培养良好, 脊柱结核细胞模型建立成功。

有研究显示新型吸入聚合物颗粒可以靶向结核分枝杆菌感染的巨噬细胞^[24], 新型纳米颗粒可以装载抗结核药物, 并以良好的效率递送至其靶器官^[25], 抗结核药物应具有结合其主要靶细胞的能力。本研究构建的 pRNA 纳米微粒具有易于观察及成像的荧光模块 AlexaFluor647。将人成骨细胞随机分为 pRNA 纳米微粒处理组及无任何药物处理空白对照组, 用流式细胞仪分析显示该纳米微粒处理组的 Alexa647-A 中位数明显的增加(相比于空白对照组的 3 倍), 表明 pRNA 纳米微粒可以更好地与人成骨细胞结合, 具有良好靶向功能。

抗结核分枝杆菌药物作用后在靶细胞或模型中结核分枝杆菌菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)可以很好评价抗结核分枝杆菌药物作用^[26,27]。本研究用不同浓度 pRNA 纳米微粒溶液处理荧光结核分枝杆菌感染的人成骨细胞, 再将其裂解之后获得的裂解液, 用琼脂平板培养, 使用凝胶成像系统对菌落采集影像, 可以明显看出 pRNA 纳米微粒的处理以浓度梯度的方式明显抑制结核分枝杆菌在人成骨细胞中的生长存活, 为了准确量化其抑制效率, 使用分析软件对对照组及实验组的 CFU 进行了测定, 经统计分析 A、B、C、D 四组菌落形成单位的差异存在统计学意义($F=14.68, P<0.05$), B、C、D 三组之间两两相比时也存在差异, 且差异具有统计学意义($P<0.05$), B、C、D 三个实验组中菌落形成单位随着纳米微粒浓度的增高呈梯度下降, 结果表明 pRNA 纳米微粒可以有效抑制结核分枝杆菌在人成骨细胞中的生长存活。药物毒性因素在决定新药研发成败方面具有重要的作用, 该纳米微粒在细胞毒性实验中显示正常生理作用浓度($20\mu\text{M}$)下并无明显细胞毒性。

所以我们认为 pRNA 纳米微粒具有脊柱结核抗结核治疗的应用前景。利用该纳米微粒携带的 CD40 核酸适配体定位于成骨细胞的 CD40 分子,

从而靶向定位于成骨细胞; 针对在结核分枝杆菌致病性中有重要作用的 Mce4A 基因^[28-30], 有研究表明, 凭借合成的反义核苷酸沉默 Mce4A 基因, 从而达到抑制结核分枝杆菌的效果^[31,32], 而本研究在 pRNA-3WJ 纳米基因载体上嵌合能够沉默 Mce4A 基因的特异杂合反义寡核苷酸 siRNA 序列, 构建合成的 pRNA 纳米微粒在脊柱结核细胞模型中较低浓度就能达到明显地抑制结核分枝杆菌生长的效果。

综上所述, 通过本实验研究表明 pRNA 纳米微粒治疗脊柱结核具有可行性, 但尚需要在动物实验及临床研究中进行更深一步研究。本研究还将进一步对 pRNA 纳米微粒在承载与转运功能载体、靶向作用物质或基因及沉默效应基因等方面进行更深入的研究, 从而最终为抗脊柱结核治疗寻找到一种行之有效的可靠方法。

4 参考文献

1. Lange C, Dheda K, Chesov D, et al. Management of drug-resistant tuberculosis[J]. Lancet, 2019, 394(10202): 953-966.
2. 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.
3. 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): 7859-7859.
4. Ge Z, Wang Z, Wei M. Measurement of the concentration of three antituberculosis drugs in the focus of spinal tuberculosis[J]. Eur Spine J, 2008, 17(11): 1482-1487.
5. Rajasekaran S, Khandelwal G. Drug therapy in spinal tuberculosis[J]. Eur Spine J, 2013, 22(4): 587-593.
6. Rastogi N, Labrousse V, de Sousa JPC. 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.
7. 雷建, 王骞, 王自立, 等. CD40 作为脊柱结核靶向治疗靶标分子的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(9): 71-77.
8. Zhang Y, Leonard M, Shu Y, et al. Overcoming tamoxifen resistance of human breast cancer by targeted gene silencing using multifunctional pRNA nanoparticles[J]. ACS Nano, 2017, 11(1): 335-346.
9. Guo S, Piao X, Li H, et al. Methods for construction and characterization of simple or special multifunctional RNA nanoparticles based on the 3WJ of phi29 DNA packaging motor[J]. Methods, 2018, 143: 121-133.
10. Pang Y, Dong H, Tan Y, et al. Rapid diagnosis of MDR and XDR tuberculosis with the MeltPro TB assay in China[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25330.

11. Wright A, Zignol M, Van Deun A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002–07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance[J]. *Lancet*, 2009, 373(9678): 1861–1873.
12. Dheda K, Cox H, Esmail A, et al. Recent controversies about MDR and XDR-TB: Global implementation of the WHO shorter MDR-TB regimen and bedaquiline for all with MDR-TB[J]. *Respirology*, 2018, 23(1): 36–45.
13. Tiberi S, Payen MC, Sotgiu G, et al. Effectiveness and safety of meropenem/ clavulanate -containing regimens in the treatment of MDR- and XDR-TB[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(4): 1235–1243.
14. Wang LJ, Zhang HQ, Tang MX, et al. Comparison of three surgical approaches for thoracic spinal tuberculosis in adult: minimum 5-year follow-up[J]. *Spine*, 2016, 42(11): 808–817.
15. Zhang P, Peng W, Wang X, et al. Minimum 5-year follow-up outcomes for single-stage transpedicular debridement, posterior instrumentation and fusion in the management of thoracic and thoracolumbar spinal tuberculosis in adults [J]. *Brit J Neurosurg*, 2016, 30(6): 666–671.
16. Mohammad N, Kausar NM, Shilpi D. Nanotechnology-based approach in tuberculosis treatment [J]. *Tuberc Res Treat*, 2017, 2017: 4920209.
17. Phillips MA, Gran ML, Peppas NA. Targeted nanodelivery of drugs and diagnostics[J]. *Nano Today*, 2010, 5(2): 143–159.
18. 孙宇航. Mce4a 特异杂合反义寡核苷酸的设计及其对结核分枝杆菌 Mce4a 基因抑制作用的研究 [D]. 宁夏医科大学, 2017.
19. 梁镇兴, 张可, 谭耀驹, 等. 利用自主发光结核分枝杆菌快速连续检测抗结核药物的细胞内活性 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(23): 41–44.
20. 张交儿, 周向梅, 孙斌, 等. 结核分枝杆菌感染实验模型[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(5): 385–390.
21. 张元豫, 刘霞, 李坤, 等. 重组结核杆菌热休克蛋白 10 对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.
22. 雷建. CD4、CD40 分子作为脊柱结核靶向治疗靶标分子的可行性及功能分析实验研究[D]. 宁夏医科大学, 2019.
23. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against mycobacterium tuberculosis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(2): 344–347.
24. Miranda MS, Rodrigues MT, Domingues RMA, et al. Exploring inhalable polymeric dry powders for anti-tuberculosis drug delivery[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 93: 1090–1103.
25. Xu K, Liang ZC, Ding X, et al. Nanomaterials in the prevention, diagnosis, and treatment of mycobacterium tuberculosis infections [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(1). doi: 10.1002/adhm.201700509.
26. Deshpande D, Srivastava S, Bendet P, et al. Antibacterial and sterilizing effect of benzylpenicillin in tuberculosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 62(2): e02232–17.
27. Shen HB, Wang FF, Zeng GC, et al. Bis-biguanide dihydrochloride inhibits intracellular replication of mycobacterium tuberculosis and controls infection in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32725.
28. Singh P, Sinha R, Tyagi G, et al. PDIM and SLI accumulation in mycobacterium tuberculosis is associated with mce4A expression[J]. *Gene*, 2018, 642: 178–187.
29. Garciafernandez J, Papavinasasundaram KG, Galan B, et al. Molecular and functional analysis of the mce4 operon in mycobacterium smegmatis[J]. *Environ Microbiol*, 2017, 19(9): 3689–3699.
30. Sinha R, Singh P, Saini NK, et al. Methyl-accepting chemotaxis like Rv3499c (Mce4A) protein in mycobacterium tuberculosis H37Rv mediates cholesterol-dependent survival [J]. *Tuberculosis(Edinb)*, 2018, 109: 52–60.
31. George R, Cavalcante R, Carvalho C, et al. Use of siRNA molecular beacons to detect and attenuate mycobacterial infection in macrophages[J]. *World J Exp Med*, 2015, 5(3): 164–181.
32. Chandolia A, Rathor N, Sharma M, et al. Functional analysis of mce4A gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv using antisense approach[J]. *Microbiol Res*, 2014, 169(9–10): 780–787.

(收稿日期:2020-06-15 修回日期:2020-10-30)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 彭向峰)