

基础研究

HRZ三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体 对体外 BCG 感染的人巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF- β 1 表达的影响

牛宁奎¹, 吴龙云², 何进文², 王立楠², 杨宗强¹, 师志云³, 施建党¹, 王自立¹, 丁惠强¹

(1 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市; 2 宁夏医科大学临床医学院 750001 银川市;

3 宁夏医科大学总医院医学实验中心 750004 银川市)

【摘要】目的:探讨异烟肼、利福平、吡嗪酰胺(HRZ)三联抗结核药/表皮转化生长因子(TGF)- β 1 siRNA 纳米脂质体对体外 BCG 感染的人巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF- β 1 表达的影响。**方法:**体外培养人单核细胞株 THP-1 诱导分化成巨噬细胞,分为 4 组,空白组为单纯巨噬细胞培养;模型组为巨噬细胞与卡介苗(bacillus calmette-guerin, BCG)以 1:5 的比例共培养 3h,制备 BCG 感染的巨噬细胞模型;对照组为 BCG 感染的巨噬细胞与 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体共培养;实验组为 BCG 感染的巨噬细胞与三种不同浓度的 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体(C1 组为 35mg/ml, C2 组为 40mg/ml, C3 组为 50mg/ml)共培养。采用 RT-PCR 检测各组人巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF- β 1 的 mRNA 表达量, Western-blot 方法检测 Ag85A 及 TGF- β 1 的蛋白表达量。**结果:**与空白组相比,模型组 Ag85A 和 TGF- β 1 的 mRNA 及蛋白量表达明显上调($P<0.05$);对照组中 Ag85A 的 mRNA 及蛋白量和 TGF- β 1 的 mRNA 水平与模型组相比明显下调($P<0.05$);实验组 3 种不同浓度(C1 组、C2 组、C3 组)HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体处理后, Ag85A 和 TGF- β 1 的 mRNA 及蛋白表达量与模型组和对照组相比进一步下调($P<0.05$),随着纳米脂质体浓度的增加, Ag85A 和 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达量有明显下降趋势, C1 组与 C3 组相比 Ag85A mRNA 及蛋白表达量差异有统计学意义($P<0.05$); C1 组与 C2 组、C3 组相比 TGF- β 1 mRNA 及蛋白量表达差异有统计学意义($P<0.05$); C2 组与 C3 组相比 Ag85A mRNA 和 TGF- β 1 蛋白表达量差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体对体外 BCG 感染的人巨噬细胞具有明显的下调 Ag85A 基因表达作用及 TGF- β 1 基因沉默作用。

【关键词】异烟肼;利福平;吡嗪酰胺;三联抗结核药/表皮转化生长因子- β 1 siRNA 纳米脂质体;巨噬细胞;抗结核;靶向基因沉默

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.10.08

中图分类号: R453.2, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-10-0918-07

Effects of HRZ triple antituberculosis drug/TGF- β 1 siRNA nanoliposomes on the expression of Ag85A and TGF- β 1 in human BCG-infected human macrophages/NIU Ningkui, WU Longyun, HE Jinwen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(10): 918-924

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of isoniazid/rifampicin/pyrazinamide (HRZ) triple anti-tuberculosis/epidermal transforming growth factor (TGF)- β 1 siRNA nanoliposomes on the expression of Ag85A and TGF- β 1 in human macrophages in vitro. **Methods:** The human mononuclear cell strain THP-1 was induced to differentiate into macrophages in vitro. The experiment was divided into 4 groups. The blank group was cultured as macrophage alone. In the model group, macrophage and bacillus calmette-guerin (BCG)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81501903);国家自然科学基金资助项目(81860395);宁夏自然科学基金资助项目(NZ16157);宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学国内一流建设学科临床医学)资助项目(NXYLXK2017A05);2015 年宁夏留学人员资助项目;2017 年宁夏医科大学青年骨干人才培育计划项目

第一作者简介:男(1982-),副主任医师,博士,研究方向:脊柱感染与肿瘤

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

并列第一作者:吴龙云 E-mail:wu_longyun@163.com

通讯作者:丁惠强 E-mail:dinghuiqiang-nx@163.com

were cocultured at the ratio of 1:5 for 4h to prepare a BCG-infected macrophage model. In the control group, BCG-infected macrophages and HRZ triple antituberculosis nanoliposomes were cocultured. In the experimental group, BCG-infected macrophages and HRZ triple anti-tuberculosis drug/TGF- β 1 siRNA nanoliposome (C1 35mg/ml, C2 40mg/ml, and C3 50mg/ml) were cocultured. The mRNA expression levels of Ag85A and TGF- β 1 in human macrophages were detected by RT-PCR. The protein expression levels of Ag85A and TGF- β 1 were detected by western-blot method. **Results:** RT-PCR and western-blot results showed that the mRNA and protein levels of Ag85A and TGF- β 1 were significantly up-regulated in the model group (BCG-infected macrophage model) compared with the blank group (macrophage culture alone) ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of Ag85A and TGF- β 1 in the control group (cocultured with BCG-infected macrophages and HRZ triple anti-tuberculosis nano-liposomes) were significantly down-regulated compared with the model group ($P < 0.05$); Compared with the model group and the control group, the mRNAs and protein expressions of Ag85A and TGF- β 1 treated with HRZ triple antituberculosis drugs/TGF- β 1 siRNA nanoliposomes in three different concentrations (C1 group, C2 group and C3 group) in the experimental group was further down-regulated ($P < 0.05$). With the increase of nano-liposome concentration (35mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml), the expressions of TGF- β 1 mRNA and protein decreased significantly (the difference between C1 group and C2 group and C3 group was statistically significant, $P < 0.05$). **Conclusions:** The self-developed HRZ triple anti-tuberculosis drug/TGF- β 1 siRNA nano-liposome has obvious down-regulation of Ag85A gene expression and TGF- β 1 gene silencing.

[Key words] Isoniazid/rifampicin/pyrazinamide (HRZ); Triple antituberculosis drug/transforming growth factor- β 1 siRNA nanoliposomes; Macrophage; Antituberculosis; Targeted gene silencing

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

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的在全球范围内威胁人类健康的重大传染病之一。其中, 骨结核致残率极高、愈合缓慢, 约占结核总发病率的 3%~5%^[1,2], 占肺外结核发病率的 35%^[3], 且骨结核中发病率最高的是脊柱结核。MTB 为细胞内寄生菌, 它可以在巨噬细胞内潜伏下来, 并进行繁殖。研究表明巨噬细胞是机体抗 MTB 感染的第一道防线^[4,5], 一方面发挥着抵抗 MTB 的作用, 另一方面又是 MTB 滞留体内造成潜伏感染的主要场所, 巨噬细胞与 MTB 的相互作用对结核病发生和发展产生较大影响。本课题组前期成功构建了异烟肼、利福平、吡嗪酰胺 (isoniazid/rifampicin/pyrazinamide, HRZ) 三联抗结核药/表皮转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 siRNA 纳米脂质体, 并对其进行了粒径、电位、包封率和形态学观察 (中国矫形外科杂志, 待发表); 进一步研究了该纳米脂质体对人巨噬细胞体外细胞毒性及其机制, 对该纳米脂质体的安全性进行了评价 (中国感染与化疗杂志, 待发表)。本研究进一步探讨该纳米脂质体对体外 BCG 感染的人巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF- β 1 表达的影响, 以期最大程度发

挥抗结核药物的抗结核菌作用, 同时提高宿主细胞抗结核能力, 为发现新的抗结核药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

SYBR[®]Premix Ex Taq (Takara, RR820A, 即 SYBR green 溶液), PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, RR047A, 即逆转录试剂盒), RNase Plus (Takara, 9108, 即 Trizol), ECL 发光液 (Thermo), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型, 碧云天), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH); Stepone plus 荧光定量 PCR (ABI), PCR 仪 (ABI, Veriti), Nano drop 2000 (Thermo fisher), SDS-PAGE 电泳仪 (Bio-Rad), 湿法转膜仪 (Bio-Rad), Tanon5200 化学发光检测系统 (Tanon)。

1.2 细胞培养及巨噬细胞诱导

人单核细胞株为人急性单核细胞白血病细胞系 (human acute monocytic leukemia cell line, THP-1) 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。采用含 10% 胎牛血清 (FCS, GIBCO) 的 RPMI (洛斯基·帕克纪念研究所, Roswell Park

Memorial Institute)1640 培养液(GIBCO)在 37℃、5%CO₂ 条件下培养,待细胞增殖至 2×10⁸/L 时,加入 100ng/ml 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate,PMA)诱导 48h,使之贴壁即为巨噬细胞,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)洗涤 2 次,更换培养基,培养 3h 用于后续实验。

1.3 制备卡介苗(bacillus calmette guerin,BCG)感染的巨噬细胞模型

BCG 和巨噬细胞按 5:1 的比例加入培养基共培养 3h 后,去除培养基,用 PBS 洗 5 次后,加入培养基正常培养。以不含血清的培养液洗涤培养板以去除细胞间未被巨噬细胞吞噬的细菌,在培养时间结束后,去除孔板中的培养液,加入 0.5% Triton X-100 裂解细胞,将细菌释放出,使用 PBS 做 1:100 稀释,取细菌置于苏通固体培养基,用涂菌棒将细菌涂均匀后,使用封口膜将培养皿封口,置于 37℃培养箱中培养 20d 培养出巨噬细胞,BCG 与巨噬细胞共培养,即存活的巨噬细胞吞噬了 BCG,说明 BCG 感染巨噬细胞是成功的。

1.4 实验分组

实验分为空白组、模型组、对照组及实验组四组。空白组为单纯巨噬细胞培养。模型组为巨噬细胞与 BCG 以 1:5 的比例共培养 3h,制备 BCG 感染的巨噬细胞模型。去除培养基,用 PBS 洗 5 次后,加入培养基正常培养 24h 后进行后续 RT-PCR 和 Western-blot 检测。对照组为 BCG 感染的巨噬细胞与 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体(异烟肼 7.2mg、利福平 10.9mg 及吡嗪酰胺 1.8mg 包封于 50mg 纳米脂质体)共培养。实验组为 BCG 感染的巨噬细胞与 HRZ 三联抗结核药/TGF-β1 siRNA 纳米脂质体共培养,HRZ 三联抗结核药/TGF-β1 siRNA 纳米脂质体分为 3 个浓度,C1 组为 35mg/ml,C2 组为 40mg/ml,C3 组为 50mg/ml。

1.5 巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF-β1 基因 mRNA 的检测

采用 RT-PCR 方法进行空白组、模型组、对照组及实验组巨噬细胞 Ag85A 及 TGF-β1 mRNA 表达水平的检测。依据 RNA 提取试剂 Trizol 操作说明提取巨噬细胞总 RNA,加入 50μl DEPC 水溶解,核酸蛋白测定仪 Nano drop 测定 RNA 纯度和浓度,按照逆转录试剂盒说明书(takara,RR047)进行逆转录实验步骤,定量 PCR

根据 SYBR green 说明书进行配制,定量 PCR 反应:预变性 95.0℃ 10min;变性 95.0℃ 15s,退火延伸 60.0℃ 1min,40 个循环;溶解曲线(95°变性后,从 60.0℃开始荧光信号采集,每增加 0.3℃采集一次信号,一直采集到 95.0℃)。以 GAPDH 为内参,Ag85A 及 TGF-β1 mRNA 相对表达水平通过 2^{-ΔΔCt} 计算分析。PCR 引物由上海生工生物公司合成,引物序列见表 1。每个样本都重复 3 遍检测。

1.6 巨噬细胞中 Ag85A 及 TGF-β1 基因的蛋白表达检测

采用 Western-blot 方法进行空白组、模型组、对照组及实验组巨噬细胞 Ag85A 及 TGF-β1 蛋白表达水平的检测。抽提 4 组巨噬细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度后-80℃保存。调整各组总蛋白浓度使每孔上样量一致,10%十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate,SDS)-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离后通过半干电转仪将蛋白转到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2h,TBST 洗膜 3 次,每次 5min;4℃孵育一抗过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 5min;孵育二抗,37℃摇床 1h,TBST 洗膜 4 次,每次 5min;化学发光,曝光,显影,定影;凝胶成像仪进行图像处理,采用 Quantity-one 软件分析目的条带的累积光密度(OD)值,以内参 β-actin 作为参照。每个样本都重复 3 遍检测。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

THP-1 是悬浮细胞,加入 PMA 诱导 48h 后,细胞诱导成巨噬细胞,倒置相差显微镜下观察巨噬细胞贴壁,呈梭形或多边形。图 1 为空白组 100 倍显微镜下 PMA 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

引物序列/Primer sequences		
Ag85A	正向 Sense	5'-CTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCT-3'
	反向 Anti-sense	5'-GCAACCCAGGTAACCCCTTAAA-3'
TGF-β1	正向 Sense	5'-GTCCTGGTGAATGGTTATAC-3'
	反向 Anti-sense	5'-GTTGAGTGTCTTTGGCTTGAC-3'
GAPDH	正向 Sense	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3'
	反向 Anti-sense	5'-GAGTCCTTCACGATACCAAAG-3'

胞白光图(未染色);细胞在 BCG 感染后,细胞形态有所变大,伸出伪足,细胞呈梭形或多边形(图 2)。图 3 为模型组 BCG 感染巨噬细胞 20d 的细菌菌落图。BCG 感染的巨噬细胞加入 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体后,细胞形态无明显变化,细胞形态较单纯加入 BCG 稍微变小,细胞质内颗粒减少(图 4);BCG 感染的巨噬细胞加入 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体后,细胞触角

减少,细胞变圆,有些细胞已漂起死亡(图 5)。

4 组巨噬细胞 Ag85A 和 TGF- β 1 mRNA 表达结果见表 2, Ag85A 和 TGF- β 1 蛋白表达结果见表 2 和图 6。模型组、对照组、C1 组、C2 组与空白组相比, Ag85A mRNA 和蛋白表达量均有显著性上升($P<0.05$), C3 组与空白组相比差异无统计学意义($P>0.05$); 对照组与模型组相比, Ag85A mRNA 和蛋白表达量均有显著下降($P<0.05$); C1、

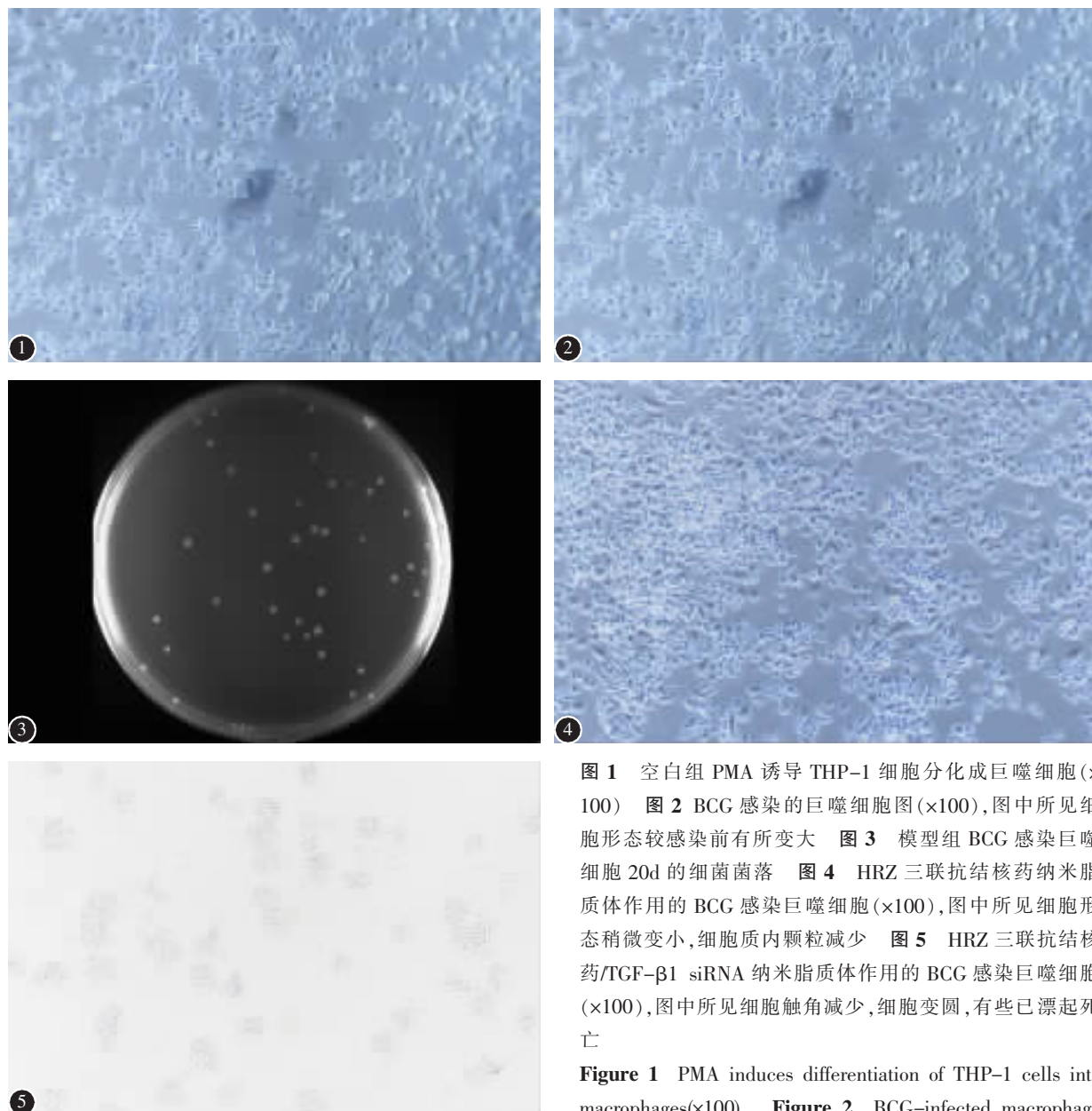


图 1 空白组 PMA 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞($\times 100$) 图 2 BCG 感染的巨噬细胞图($\times 100$), 图中所见细胞形态较感染前有所变大 图 3 模型组 BCG 感染巨噬细胞 20d 的细菌菌落 图 4 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体作用的 BCG 感染巨噬细胞($\times 100$), 图中所见细胞形态稍微变小, 细胞质内颗粒减少 图 5 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体作用的 BCG 感染巨噬细胞($\times 100$), 图中所见细胞触角减少, 细胞变圆, 有些已漂起死亡

Figure 1 PMA induces differentiation of THP-1 cells into macrophages($\times 100$) Figure 2 BCG-infected macrophage

Figure 3 Bacterial colony map of BCG infected macrophages for 20 days

Figure 4 BCG-infected macrophages and HRZ triple anti-tuberculosis drugs nano-liposomes($\times 100$), the morphol-

ogy of the cells is slightly smaller, and the cytoplasm is reduced

Figure 5 BCG-infected macrophages and HRZ triple anti-tuberculosis drugs/TGF- β 1 siRNA nano-liposomes($\times 100$), cellular antenna are reduced, the cells become round, and

some have drifted to death

表 2 4 组巨噬细胞中 Ag85A 和 TGF-β1 mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Expression of Ag85A and TGF-β1 mRNA and proteins in BCG-infected macrophages

	mRNAs		蛋白 Proteins	
	Ag85A	TGF-β1	Ag85A	TGF-β1
空白组 Blank group	1.0000±0.0476	1.0000±0.0408	0.5485±0.0048	0.5859±0.0149
模型组 Model group	1.7505±0.0707 ^①	1.8359±0.0326 ^①	0.9781±0.0118 ^①	1.0645±0.0186 ^①
对照组 Control group	1.4095±0.0297 ^{①②}	1.3152±0.0500 ^{①②}	0.7632±0.0499 ^{①②}	0.9261±0.0094 ^①
实验组 Test group				
C1(35mg/ml)	1.2995±0.0195 ^{①②③}	1.0149±0.0737 ^{②③}	0.6689±0.0119 ^{①②③}	0.5419±0.0067 ^{②③}
C2(40mg/ml)	1.2407±0.0635 ^{①②③}	0.8869±0.0620 ^{①②③④}	0.5995±0.0065 ^{①②③}	0.3774±0.0256 ^{①②③④}
C3(50mg/ml)	1.0629±0.0543 ^{②③④⑤}	0.7957±0.0606 ^{①②③④}	0.5408±0.0030 ^{②③④}	0.269 1±0.0201 ^{①②③④⑤}

注:①与空白组比较 $P<0.05$;②与模型组比较 $P<0.05$;③与对照组比较 $P<0.05$;④与 C1 组比较 $P<0.05$;⑤与 C2 组比较 $P<0.05$
Note:①Compared with blank group, $P<0.05$; ②Compared with model group, $P<0.05$; ③Compared with control group, $P<0.05$; ④Compared with C1 group, $P<0.05$; ⑤Compared with C2 group, $P<0.05$

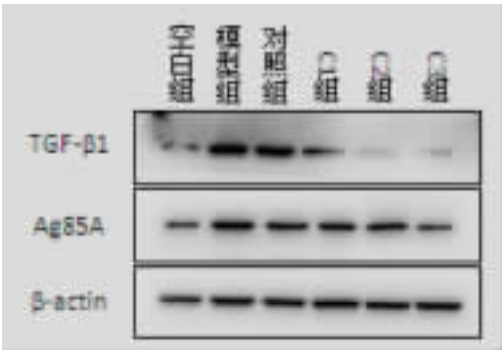


图 6 BCG 感染巨噬细胞 Ag85A、TGF-β1 蛋白表达变化
Figure 6 Expression of Ag85A and TGF-β1 protein in BCG-infected macrophages

C2、C3 组与模型组和对照组相比,Ag85A mRNA 和蛋白表达量均有显著下降($P<0.05$),其中随着纳米脂质体浓度的增加,Ag85A mRNA 和蛋白量有进一步下降趋势;C3 组与 C1 组相比,Ag85A mRNA 和蛋白表达量差异有统计学意义 ($P<0.05$),而 C2 组与 C1 组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$);C3 组与 C2 组相比,Ag85A mRNA 水平有显著性差异($P<0.05$),而 Ag85A 蛋白表达量无统计学差异($P>0.05$)。

模型组、对照组、C2 组、C3 组与空白组相比,TGF-β1 mRNA 和蛋白表达量均有显著性上升 ($P<0.05$),C1 组与空白组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 对照组与模型组相比,TGF-β1 mRNA 水平差异有统计学意义 ($P<0.05$),而 TGF-β1 蛋白表达量无统计学差异 ($P>0.05$);C1、C2、C3 组与模型组和对照组相比,TGF-β1 mRNA 和蛋白表达量均有显著下降($P<0.05$),其中随着纳米脂质

体浓度的增加,TGF-β1 mRNA 和蛋白量有进一步下降趋势;C2、C3 组与 C1 组相比,TGF-β1 mRNA 和蛋白表达量均有显著下降 ($P<0.05$);C3 组与 C2 组相比,TGF-β1 蛋白表达量均有显著下降($P<0.05$),而 TGF-β1 mRNA 水平无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

MTB 以巨噬细胞为宿主细胞引起结核病,该过程主要以 T 细胞介导的免疫反应为主。TGF-β1 主要发挥免疫调节作用,它既抑制 T 细胞的反应,又能使巨噬细胞失活,可能是结核病免疫发病中的一个关键因素^[6]。TGF-β1 可能参与结核病的发病,而且还可能与治疗效果、病程有关。Toossi 指出,造成结核病损害的细胞因子环境也包含结核杆菌及其成分,且可能是 TGF-β1 的分泌过高的原因^[6]。宿主细胞分泌的 TGF-β1 蛋白可促进 MTB 在巨噬细胞内生长与繁殖,过度表达则与 MTB 引起的组织损伤和纤维化有关。

结核性肉芽肿是 MTB 感染巨噬细胞的典型特征及消灭结核菌的结构,但过量的结核性肉芽肿会抑制巨噬细胞抗结核作用,未被宿主清除的 MTB 存在于结核性肉芽肿中、处于休眠状态,当宿主免疫力低下时,结核菌感染复发、再燃,为日后结核病的发生提供了有利条件^[7-8]。综合相关研究^[6-9]表明 TGF-β1 在结核菌感染的巨噬细胞中高表达,过量的表达不利于结核杆菌的清除,如果能将 TGF-β1 的表达降低,同时联合多种抗结核药物,则利于 MTB 的清除。本研究试图利用 RNA 干

扰(RNAi)技术沉默 TGF- β 1 基因的表达。

RNAi 技术是基因治疗中的重要技术之一,通过导入外源性双链 RNA 的加工产物、与靶基因 mRNA 序列同源的双链 siRNA,在细胞内介导 RNAi 效应,特异性识别靶基因 mRNA 并沉默靶基因,可以高效、特异地阻断体内同源基因表达,并降解靶基因的 mRNA,使特定蛋白的表达受到抑制^[10,11]。本研究团队参阅了国内外大量文献并结合研究团队以往对脊柱结核药物研究的基础,前期设计了以脂质体为载体包含异烟肼、利福平及吡嗪酰胺三种临床常用抗结核药物的纳米微粒(HRZ 三联抗结核药纳米脂质体)(《中国矫形外科杂志》待发表),同时充分考虑提高宿主免疫力、增强宿主自身抗感染能力在抗脊柱结核中的作用,选择在结核性肉芽肿形成的关键基因 TGF- β 1 为靶点,采用 siRNA 技术与 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体结合,成功合成了 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体,当 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体被巨噬细胞吞噬后,TGF- β 1 siRNA 与靶基因 mRNA 结合,导致巨噬细胞中 TGF- β 1 蛋白分泌减少,使得包裹 MTB 的结核性肉芽肿减少的同时增加抗结核药物的疗效。

本研究团队在成功构建的 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体基础上进行了粒径、电位、包封率和形态学观察,发现 HRZ 三联抗结核药阳离子脂质体,Zeta 电位值 28.13 ± 2.4 mV,异烟肼、利福平及吡嗪酰胺包封率分别为 90%、88%、37%;动态光散射技术(DLS)及透射电镜(TEM)显示,HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体呈球形,大小均匀,粒径为 152.69 ± 59.47 nm(《中国感染与化疗杂志》待发表)。研究团队进一步进行了 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体对人巨噬细胞体外细胞毒性及其机制研究,MTT 结果显示,随着 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体浓度增加,细胞增殖能力逐渐下调;各浓度 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体的细胞毒性为 1 级或 2 级,HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体对巨噬细胞具有一定的细胞毒性(《中国感染与化疗杂志》待发表)。同时,该 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体半数抑制浓度(IC50)值为 37.47 mg/ml,故选择 35 mg/ml 和 40 mg/ml

的纳米颗粒进行后续实验。流式细胞仪检测巨噬细胞周期的结果显示,巨噬细胞加入 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体后,HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体抑制细胞到 G2 期,即 G1 期、S 期细胞比例减少,G2 期细胞比例增多,表明 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体影响了巨噬细胞的细胞周期,并使细胞周期被捕获于 G2 期;细胞凋亡结果显示,巨噬细胞加入 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体 24 h 早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞的比例逐渐增加,表明凋亡在 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体诱导巨噬细胞毒性效应中起了一定作用;透射电镜结果显示,HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体处理的巨噬细胞里出现大量纳米颗粒及自噬体,其中 40 mg/ml 组内自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体,在溶酶体酶作用下降解纳米颗粒,表明 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体可引起细胞自噬从而表现出一定的细胞毒性(《中国感染与化疗杂志》待发表)。

Ag85A 是 MTB 合成的一种外分泌蛋白,分子量约为 35 kD,具有分枝杆菌酸转移酶的活性,在 MTB 细胞壁的生物合成过程中发挥着重要的作用^[12]。Osada-Oka 等^[13]发现,Ag85A 在活动性和陈旧性结核病患者血浆中的水平明显高于正常人,用于陈旧性结核的诊断敏感性为 86.7%。Senoputra 等^[14]研究同样显示 Ag85A 在结核病患者血清中表达增高,并与其他抗结核抗体水平存在相关性。由于 Ag85A 作为结核菌的一种重要的抗原,可诱导机体产生强烈的免疫反应。因此,作为 Ag85A 的抗体表型被推测在结核病患者体内表达增加,并可用于结核病诊断的标志物。

本研究对构建的 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体在体外 BCG 感染的人巨噬细胞中抗结核及靶向基因沉默作用进行了研究,结果显示,巨噬细胞经 BCG 感染后,Ag85A 和 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白表达上调;BCG 感染后经 HRZ 三联抗结核药纳米脂质体治疗后,Ag85A 和 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白表达下调;BCG 感染后,3 种不同浓度 HRZ 三联抗结核药/TGF- β 1 siRNA 纳米脂质体处理后,Ag85A 和 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白表达进一步明显下调。表明该纳米脂质体具有明显的抗结核作用及靶基因沉默作

用,且随着纳米脂质体浓度的增加,抑制巨噬细胞 Ag85A 及 TGF- β 1 的表达增强,为进一步动物实验及临床研发提供前期实验结果。

4 参考文献

1. Tuli SM. General principles of osteoarticular tuberculosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 398: 11-19.
2. Almeida A. Tuberculosis of the spine and spinal cord[J]. Eur J Radiol, 2005, 55(2): 193-201.
3. Golden MP, Vikram HR. Extrapulmonary tuberculosis: an overview[J]. Am Fam Physician, 2005, 72(9): 1761-1768.
4. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophage[J]. Microbes Infect, 2001, 3(3): 249-255.
5. Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, et al. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of My D88 [J]. J Clin Invest, 2004, 114(12): 405-412.
6. Toossi Z, Ellner JJ. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1998, 87(2): 107-114.
7. Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin mincle[J]. J Exp Med, 2009, 206(13): 2879-2888.
8. Bekierkunst A, Levij IS, Yarkoni E, et al. Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions[J]. J Bacteriol, 1969, 100(1): 95-102.
9. Hirsch CS, Yoneda T, Averill L, et al. Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growthfactor-beta 1[J]. J Infect Dis, 1994, 170(5): 1229-1237.
10. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution[J]. Nature, 2004, 430(6996): 161-164.
11. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, et al. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers[J]. AAPS J, 2010, 12(4): 492-503.
12. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, et al. Role of the major antigen of mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis [J]. Science, 1997, 276(5317): 1420-1422.
13. Osada-Oka M, Tateishi Y, Hirayama Y, et al. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein 1 are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis[J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(1): 30-37.
14. Senoputra MA, Shiratori B, Hasibuan FM, et al. Diagnostic value of antibody responses to multiple antigens from Mycobacterium tuberculosis inactive and latent tuberculosis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 83(3): 278-285.

(收稿日期:2018-07-01 修回日期:2018-08-30)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)