

## IRAK-4 基因沉默对人成骨样细胞凋亡的影响

杨子波, 傅明, 张紫机, 黄保丁, 张志奇, 廖威明\*

(中山大学附属第一医院关节外科, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】研究 siRNA 沉默白细胞介素-1 受体相关激酶-4(IRAK-4)基因对人成骨样细胞株 MG63 凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响。【方法】以 Lipofectamine 2000 为载体将 IRAK-4-siRNA 转染入 MG63 细胞(CON 组:不加入任何转染试剂;SC 组:以 scrambled siRNA 序列进行转染;KD 组:以特异性 IRAK-4-siRNA 序列进行转染),应用流式细胞术及 TUNEL 法检测细胞凋亡水平,western blotting 检测 Bcl-2、Bax 基因的表达。【结果】与对照组相比,靶基因沉默组(KD 组)细胞的 IRAK-4 mRNA 及蛋白表达水平显著降低;转染 48h 后,KD 组细胞增殖变缓,凋亡增加,Bcl-2 蛋白的表达明显下调且 Bcl-2/Bax<sub>SC</sub>>Bcl-2/Bax<sub>KD</sub>;Spearman 等级相关分析显示 MG63 细胞凋亡比例与 Bcl-2/Bax 的比值间有显著的相关性。【结论】siRNA 沉默 IRAK-4 基因能够诱导人成骨样细胞株 MG63 凋亡,且靶细胞凋亡水平与 Bcl-2、Bax 基因表达水平的比值相关。

**关键词:**人成骨样细胞;IRAK-4;细胞凋亡;RNA 干扰;基因沉默

**中图分类号:**R392.11;R687.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2013)05-0672-09

### Effects of IRAK-4 Gene Silencing on Apoptosis in Human Osteoblast-like Cell

YANG Zi-bo, FU Ming, ZHANG Zi-ji, HUANG Bao-ding, ZHANG Zhi-qi, LIAO Wei-ming\*

(Department of Orthopedic & Joint Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the effects of siRNA-induced interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) gene silence on apoptosis of MG63 cells and the expression levels of related genes Bcl-2 and Bax. 【Methods】The gene transfection (control group = MG63 cells; SC group = MG63 cells transfected with scrambled IRAK-4 siRNA; KD group = MG63 cells transfected with IRAK-4-specific siRNA) was performed using Lipofectamine 2000. The apoptosis of MG63 cells were tested by FCM and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) methods. The protein level of Bcl-2 and Bax were detected by Western blotting. 【Result】The expression of IRAK-4 mRNA and protein in the KD group were significantly decreased compared with other two groups. Compared with the control groups, 48 hours after the transfection, IRAK-4 gene silencing in MG63 cells caused morphological changes, inhibited growth, increased apoptosis ( $P < 0.05$ ) and decreased protein expression of Bcl-2 and the ratio of Bcl-2/Bax ( $P < 0.05$ ). There was a significant correlation between the percentages of apoptotic MG63 cells and Bcl-2/Bax protein expression ( $P = 0.011$ ). 【Conclusion】The results indicated that IRAK-4 gene silencing in MG63 cells increase apoptosis, which may be related to the decreased Bcl-2/Bax ratio.

**Key words:** human osteoblast-like cell; IRAK-4; apoptosis; RNA interference; gene silence

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(5):672-680]

无菌性松动是导致人工关节置换术长期失效的主要原因<sup>[1]</sup>。在假体周围的骨溶解、吸收是人工关节无菌性松动的典型病理生理过程。正常情况下,体内骨组织在骨形成与骨吸收之间的形成一

种动态平衡的关系,共同维持正常骨组织的新陈代谢<sup>[2]</sup>。而这一过程又分别与成骨细胞和破骨细胞的功能密切相关。尽管骨吸收作用主要由破骨细胞介导<sup>[3]</sup>,但研究表明,相对于破骨细胞,成骨

收稿日期:2013-02-17

基金项目:国家自然科学基金(81171709);国家自然科学基金与广东省自然科学基金联合基金(u0732001)

作者简介:杨子波,医学博士,主治医师,研究方向:关节外科疾病,E-mail: dr\_youngball@hotmail.com; \*通信作者,廖威明,教授,博士生导师,E-mail: liaoweiming29@163.com

细胞表达更多与溶骨相关的细胞因子和激素表面受体<sup>[4]</sup>,提示成骨细胞在骨溶解当中为破骨细胞的活化提供了相应的信号通路,意味着在正常骨组织的代谢过程中,成骨细胞不仅仅扮演骨形成的角色,同时也在发挥着调控骨吸收的作用。目前认为与骨溶解有关的最重要炎症因子包括:白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )、核因子 $\kappa$ B受体活化因子/核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B/receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand,RANK/RANKL)系统等<sup>[5]</sup>。近期有研究表明:与人工关节相关的材料(包括聚甲基丙烯酸甲酯及钛合金颗粒)均能诱导假体植入物周围IL-1的高表达<sup>[6]</sup>。作为IL-1受体胞内信号传导通路的关键蛋白<sup>[7]</sup>,白细胞介素-1受体相关激酶-4(interleukin-1 receptor-associated kinase-4,IRAK-4)的表达改变是否会通过改变IL-1受体胞内信号通路从而影响成骨细胞的增殖与活性,并进一步影响假体周围炎症环境下的骨吸收呢。MG63细胞,因其表现多种成骨细胞的特性,被广泛用于多种代谢性骨病的研究<sup>[8-10]</sup>。本文首先通过构建特异性IRAK-4-siRNA并转染人成骨样细胞MG63,检测其细胞凋亡,了解IRAK-4表达沉默后成骨样细胞活性的改变。B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)在体外能抑制多种因素诱导的细胞凋亡,但在体内,Bcl-2蛋白的活性则被与其同源的分子质量为21 ku的蛋白质Bcl-2相关蛋白X(Bcl-2 associated protein X,Bax)调节<sup>[11]</sup>。Bax/Bcl-2异源二聚体与Bax/Bax同源二聚体的比例在调节细胞凋亡过程中起关键作用<sup>[12]</sup>。因此,本文进一步通过Western Blot检测MG63细胞在IRAK-4基因表达沉默后Bcl-2、Bax蛋白的含量,初步分析IRAK-4基因沉默对成骨样细胞MG63细胞凋亡的影响是否与凋亡基因Bcl-2、Bax相关。以增加对假体周围炎症性骨溶解分子机制的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株培养

MG63细胞株由中山大学附属第一医院骨肿瘤科沈靖南教授惠赠。目的细胞培养于含10%胎

牛血清的高糖DMEM培养液中,于体积分数为5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱中生长。

### 1.2 siRNA序列设计、合成、分组及转染

siRNA序列由本课题组在前期实验中获得,序列经BLAST分析排除其他同源编码序列,已在人软骨细胞中筛选出最有效的干扰靶点,序列的化学合成及纯化由上海吉玛制药技术有限公司完成,全长双链siRNA含量>97%。具体序列信息如下:Sense(5'-3'):GCU CAU GAC AUG CAA GAU Utt; Anti-sense(5'-3'):AAU CUU GCA UGU CAU GAG Ctt。

目的细胞分为CON组(不加入任何转染试剂,仅加入Opti-MEM培养6h后更换完全DMEM培养基)、SC组(以scrambled siRNA序列进行转染)和KD组(以75 nmol/L终浓度的IRAK-4-siRNA序列进行转染),转染当天按照上述分组进行目的细胞的转染实验。

转染siRNA前24h消化目的细胞MG63并计数,60 mm培养皿中接种 $2 \times 10^5$ 个细胞,每孔加入含100 mL/L胎牛血清(天津TBD公司)的高糖DMEM培养基(美国GIBCO公司);培养过夜,弃培养基,用无血清无抗生素的DMEM培养基洗2遍后每孔加入2.4 mL无血清无抗生素的DMEM/F12培养液;将6  $\mu$ L Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司)转染试剂加入300  $\mu$ L Opti-MEM中,混合均匀后室温孵育5 min;将IRAK-4-siRNA、scrambled siRNA(终浓度均为75 nmol/L)加入300  $\mu$ L Opti-MEM中,混合均匀后室温孵育5 min;将Lipofectamine 2000和siRNA均匀混合,室温孵育20 min,以使Lipofectamine-siRNA复合体形成;将Lipofectamine-siRNA混合液(600  $\mu$ L)加入需转染的孔中,体积分数为5%CO<sub>2</sub>、37℃环境下转染6h后弃去转染混合液,加入3 mL含100 mL/L胎牛血清高糖DMEM培养基;不同siRNA干扰48h后弃完全培养液,收集总蛋白进入后续Western Blot和提取RNA进行RT-PCR的检测实验。

### 1.3 Western blot检测IRAK-4、Bcl-2以及Bax蛋白的表达

转染48h后弃去培养液,根据产品说明书的指引加入RIPA细胞裂解液(上海申能博彩生物科技有限公司)处理10~15 min。裂解完后,在冰上将细胞碎片和裂解液移至1.5 mL EP管中,超声波

细胞破碎仪破碎细胞(200 W 共 4 次,每次 5 s,间隔 2 s),于 4 °C 下 12 000 r/min( $r = 9.8$  cm),离心 10 min,将离心后的上清转移到 0.5 mL 的 EP 管保存。应用 BCA 蛋白定量试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司)在紫外分光光度计上描绘蛋白浓度标准曲线,标定样本蛋白浓度。取 30  $\mu$ g 蛋白 100 °C 变性后以 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离。在 4 °C,110 V 恒压条件下电转移 150 min,将蛋白样品转移到 PVDF 膜上。室温下以 TBST+5%脱脂牛奶封闭 1 h。用封闭液按表 1 所示浓度分别稀释目的蛋白或者内参 GAPDH 的一抗,4 °C 摇床过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用封闭液按表 1 所示浓度稀释与一抗相对应的辣根过氧化物酶羊抗兔二抗。于室温下孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。采用 ECL 检测液(南京凯基生物公司)进行化学发光反应,曝光、显影、过水、定影。应用 Glyco BandScan 5.0 软件(ProZyme, Hayward, CA, USA)记录条带灰度值。

#### 1.4 RNA 的提取及 real-time PCR 检测 IRAK-4 mRNA 的表达

转染后 48 h 提取各组细胞的总 RNA 用以进行 real-time PCR 检测各组转染后靶基因沉默的情况。利用 Primer Premier 5.0 软件(PREMIER Biosoft international, Palo Alto, CA, USA)进行引物设计,由广州复能基因有限公司合成。所设计的 4 条引物序列为 IRAK-4 upstream:5'-TGCAGCTA ATGGCATCAATTT-3'; IRAK-4 downstream:5'-GTCATGACTGTCTGGGCAA-3'; GAPDH upstream:5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCT-3'; GAPDH downstream:5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'。继而根据 Invitrogen 公司(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)的 Trizol 操作说明书进行总 RNA 的提取操作。逆转录操作则根据 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT kit 试剂盒(FSQ-101; Toyobo,

Osaka, Japan)使用说明书进行。Real-time PCR 在 Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上进行,按 TOYOBO 公司 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 试剂盒(QPS-201; Toyobo, Osaka, Japan)使用说明书配制反应体系。20  $\mu$ L real-time PCR 反应体系配方包括:① Thunderbird SYBR qPCR mix (10  $\mu$ L); ② 上/下游引物混合物 (2  $\mu$ L); ③ 50X ROX reference dye (0.04  $\mu$ L); ④ cDNA 模板 (2  $\mu$ L); ⑤ DEPC 水 (5.96  $\mu$ L)。设定程序为两步法 Real-time PCR 检测:预变性 95 °C 60 s,之后变性 95 °C 15 s,退火延伸 60 °C 60 s,共进行 40 次循环,每次在延伸阶段读取吸光值。PCR 结束后,在 95 °C 变性 15 s,然后冷却至 60 °C,使 DNA 双链充分结合,接下来依次于 95 °C 15 s,60 °C 15 s,读取吸光值,完成融解曲线。Real-time PCR 数值分析采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析法。上述步骤均为 RNase-free 操作。

#### 1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

按  $2 \times 10^5$  个/孔浓度接种细胞于 60 mm 培养皿内;三组细胞各设 3 个复孔,完成转染操作后细胞按原有条件继续培养 48 h;各组细胞以 2.5 g/L 胰酶消化后,胰酶消化、收集细胞,1 000 r/min( $r = 12.3$  cm),离心 5 min;4 °C 预冷的 PBS 溶液洗 2 次;4 °C 预冷的 700 mL/L 乙醇固定细胞 24 h;1 500 r/min( $r = 13.2$  cm)离心 5 h 去固定液,PBS 重悬洗两遍;400 目的筛网过滤 1 次,1 200 r/min( $r = 13.2$  cm),离心 5 min,弃 PBS;300  $\mu$ L DNA 染液(内含碘化丙啶 100  $\mu$ g/mL 和 RNA 酶 20 单位/mL)染色,4 °C 避光 30 min,进行流式检测(激光波长 488 nm,功率 15 mW);上机操作:激光管预热 30 min 后用荧光微球(美国 BECKMAN-COULTER 公司)调整仪器,使各放大器接收的信号的信噪比 HCV 值 < 2%;收集分析 12 000 个细胞,细胞凋亡是用仪器自带软件处理,直接得出细胞的凋亡率。

表 1 Western blot 所用抗体情况

Table 1 Monoclonal antibodies used for Western blot analysis

Antibody	Company	Batch number	Concentrations
Anti-IRAK-4	Santa Cruz Biotechnology, USA	SC130789	1 : 500
Anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, USA	SC-492	1 : 500
Anti-Bax	KGI Biotechnology Development, China	KGA714	1 : 500
Anti-GAPDH	Jetwei Biotechnology, China	WB008	1 : 500
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Beijing Biosynthesis Biotechnology, China	bse-0295G	1 : 1 000

### 1.6 TUNEL 法染色检测细胞凋亡

三组细胞各设3个复孔,完成转染操作后细胞按原有条件继续培养48 h。到达时间后每孔细胞以0.25%消化后种板。应用TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司, KGA7024)并按照说明书操作完成细胞凋亡检测。以棕黄色细胞核作为阳性染色对象。每张玻片随机选取10个高倍镜视野计数TUNEL染色阳性的细胞核占同一视野细胞核总数的比例作为阳性率。以脱氧核糖核酸酶处理经固定及通透液处理后的细胞10 min诱导产生DNA链缺口制作阳性对照玻片。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS v18.0(SPSS, Chicago, IL, USA)软件进行统计学计算及绘图,部分统计绘图改以GraphPad Prism 5.01软件完成。所有数据均以均值 $\pm$ 标准差的形式表达,各组间差别的比较应用基于ANOVA分析的Tukey's检验,如遇到方差不齐时则改用Dunnett's T3检验。Spearman相关分析计算相关系数用于评估靶细胞凋亡水平与Bcl-2/Bax比值的关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 特异性 siRNA 基因转染 MG63 细胞后对 IRAK-4 表达的影响

所用 IRAK-4-siRNA 序列转染目的细胞 MG63 后, RNA 干扰组的 IRAK-4 蛋白表达水平( $1.25 \pm 0.21$ )与 CON 组( $6.21 \pm 0.52, P < 0.001$ )和 SC 组( $5.05 \pm 0.28, P = 0.003 < 0.05$ )相比(图 1A)显著降低, IRAK-4 mRNA(图 1B)的结果亦类似, KD 组的靶基因 mRNA 水平( $0.27 \pm 0.03$ )显著低于 CON 组( $1.00 \pm 0.08, P = 0.003$ )和 SC 组( $0.89 \pm$

$0.05, P < 0.001$ ), 差异有统计学意义。证明所用 IRAK-4-siRNA 序列在 mRNA 和蛋白水平上均能有效下调成骨样细胞 MG63 的 IRAK-4 的表达。

### 2.2 靶向 IRAK-4 基因的 siRNA 转染目的细胞 MG63 建立细胞模型

到达每个时间点时,选择细胞分布均匀,细胞形态典型的部位进行光学显微镜观察(图2)。在 CON 组中,未经 siRNA 转染、生长状态良好的 MG63 细胞贴壁生长,细胞大小较一致,形态多呈梭形或多边形,细胞核较大但不如 IRAK-4-siRNA 转染后清楚(箭头 A),生长速度较 KD 组快;SC 组的细胞在转染 scrambled-siRNA 后形态与 CON 组相比变化不大(箭头 B);而 KD 组中,特异性 siRNA 序列转染后可见细胞随时间延长逐渐变圆,增殖变缓,漂浮细胞增多,细胞核及核仁较非转染组细胞增大且清晰,核浆比进一步增大(箭头 C)。细胞接种后 48 h 上述表现最为明显。

### 2.3 细胞凋亡的检测

流式细胞术结果提示:与 CON 和 SC 组比较, KD 组凋亡细胞比例( $5.67 \pm 0.58$ )明显高于 CON 组( $3.70 \pm 0.78, P = 0.025$ )和 SC 组( $3.23 \pm 0.37, P = 0.004$ ),差别有统计学意义(图3)。TUNEL 染色(图4A)的结果显示:转染特异性 siRNA 后细胞凋亡比例为  $7.10 \pm 0.36$ , 与之相对应的是, CON 组为  $3.40 \pm 0.26$ , SC 组为  $3.90 \pm 0.44$ 。KD 组与 CON 组( $P = 0.001 < 0.05$ )及 SC 组( $P = 0.002 < 0.05$ )相比差异均有统计学意义(图4B)。两种凋亡检测结果均显示, IRAK-4 基因的下调,促进 MG63 细胞的凋亡。

### 2.4 IRAK-4-siRNA 基因转染 MG63 细胞对 Bcl-2、Bax 基因表达的影响

IRAK-4-siRNA 序列转染目的细胞 MG63 后其 Bcl-2 蛋白的表达发生明显的下调,与 CON 组

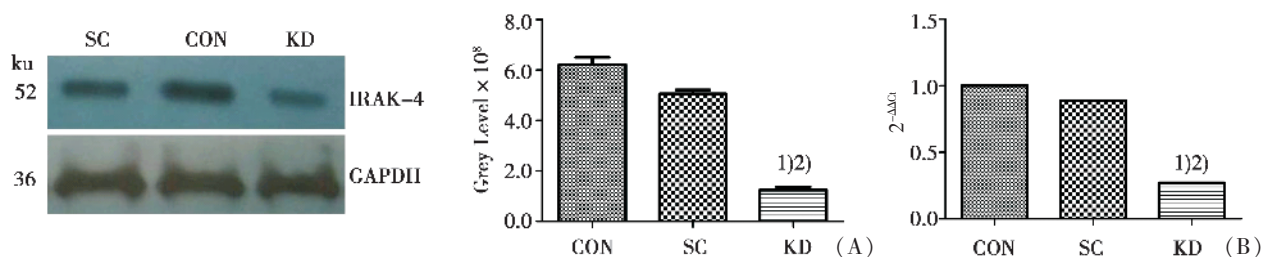


图1 IRAK-4-siRNA 转染 MG63 后各组细胞 IRAK-4 蛋白和 mRNA 水平

Fig.1 Effects of IRAK-4-siRNA transfection on IRAK-4 protein and mRNA expression in MG63 cells

(A) IRAK-4 protein expression 48 h after transfection. (B) IRAK-4 mRNA expression detected by RT-PCR. 1) Indicates significant difference between control group and KD group. 2) Indicates significant difference between SC and KD groups.

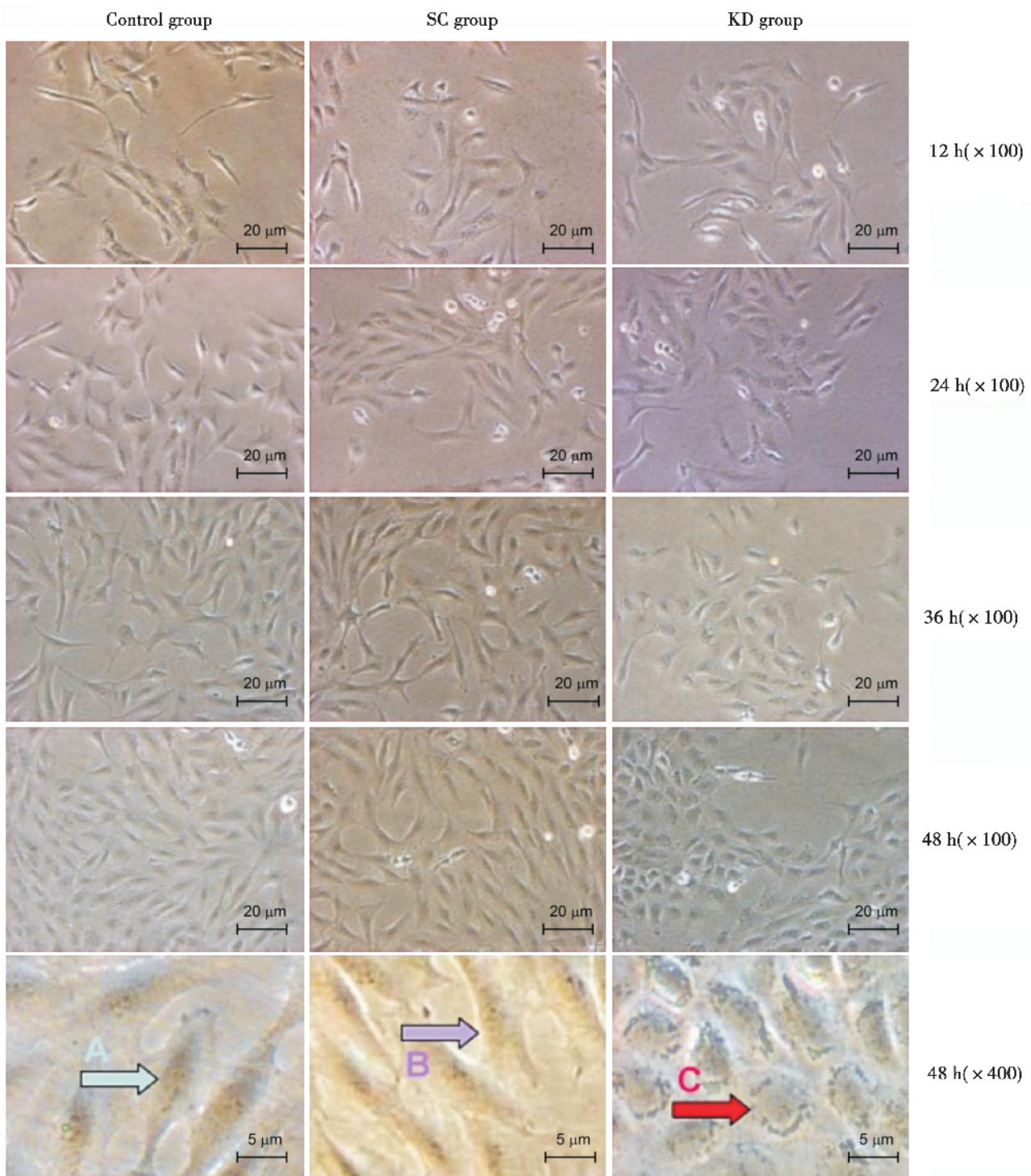


图 2 各组 MG63 细胞在转染后不同时间的光镜下形态

Fig.2 Morphology of MG63 cells in different time point after transfection under a light microscope

和 SC 组相比, RNA 干扰组的 Bcl-2 蛋白的表达量显著降低; 同时 Bax 蛋白表达与正常目的细胞比较水平相近, 明显高于 Bcl-2 蛋白的表达(表 2、图 5)。灰度值  $Bcl-2/Bax_{SC} > Bcl-2/Bax_{KD}$ 。Spearman 等级相关分析显示凋亡 MG63 细胞比例与 Bcl-2/Bax

的比值间有显著的相关性( $r = -0.798, P = 0.011$ )。

### 3 讨论

在美国, 目前估计每年均有超过 15 万例人工髋

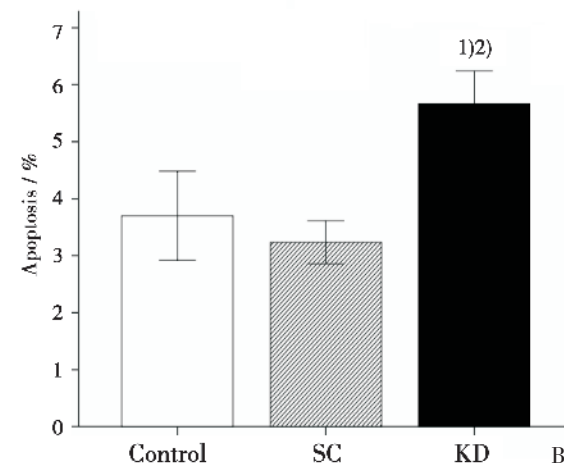
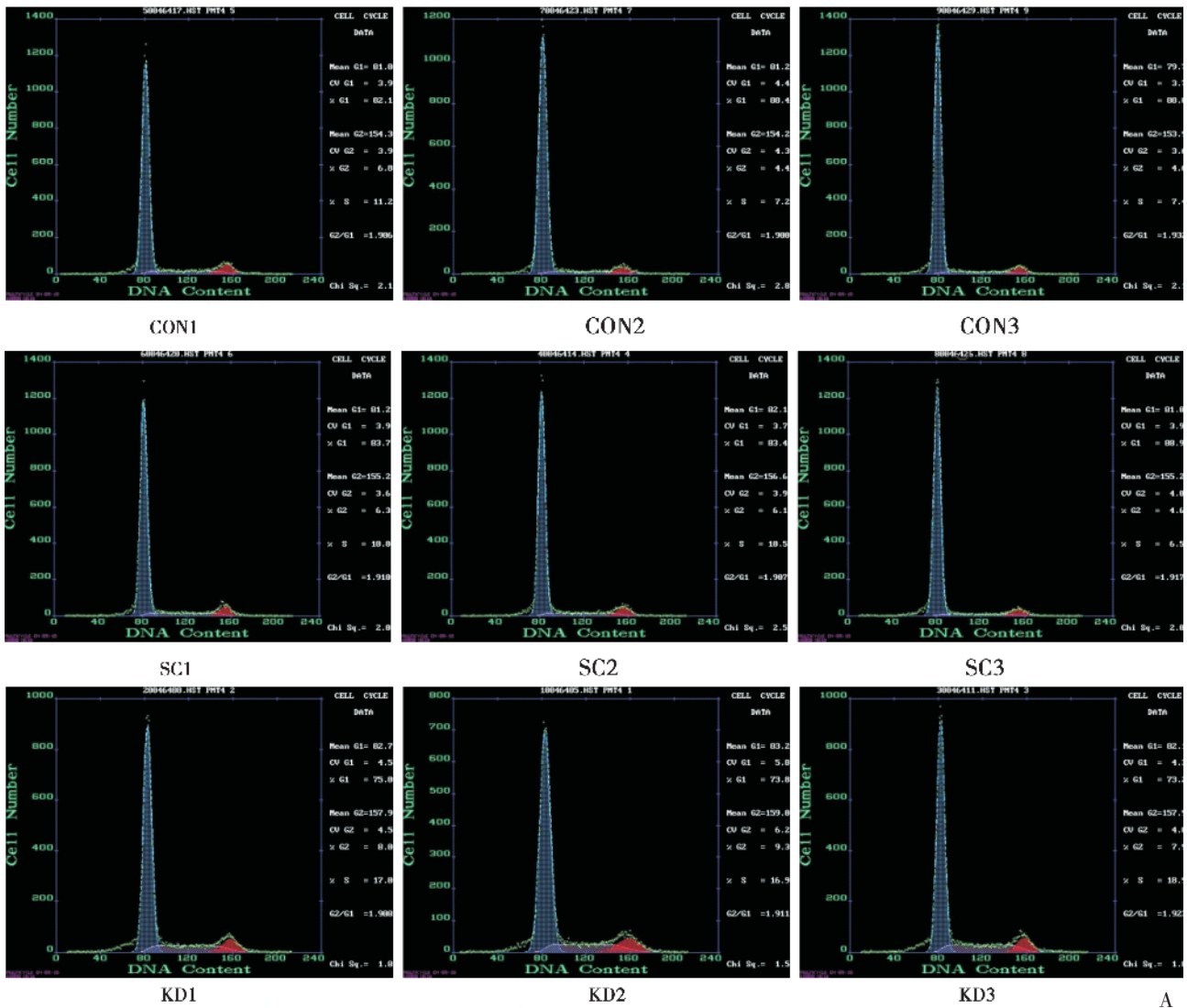


图 3 各组 MG63 细胞在转染后 FCM 检测细胞凋亡结果图 (A) 和转染 48 h 后各组细胞凋亡比较图 (B)  
 Fig.3 Effects of IRAK-4-siRNA transfection on apoptosis of MG63 cells (A) and comparison of apoptosis in different groups of MG63 cells detected by FCM (B)

1) Indicates significant difference between the control group and KD group,  $P = 0.025 < 0.05$ . 2) Indicates significant difference between the SC and KD groups,  $P = 0.004 < 0.05$ .

关节置换术和逾 50 万例人工膝关节置换术<sup>[13-14]</sup>。其中, 无菌性松动被认为是假体失效的最常见原因<sup>[1,15]</sup>。无菌性松动以假体磨损形成颗粒诱导的慢性炎症反应为特征, 导致假体周围的骨吸收(骨溶解)并使假体固定机制失效<sup>[16]</sup>。研究表明, 成骨细

胞具备调控骨吸收的作用<sup>[4]</sup>。而成骨细胞的活性除受细胞间直接接触所出现的信号调控外, 各种多肽因子以及它们的受体下游所形成的级联反应也在细胞的分化和功能激活上起到重要的作用, 在疾病局部被发现的各种高浓度的溶骨相关细胞

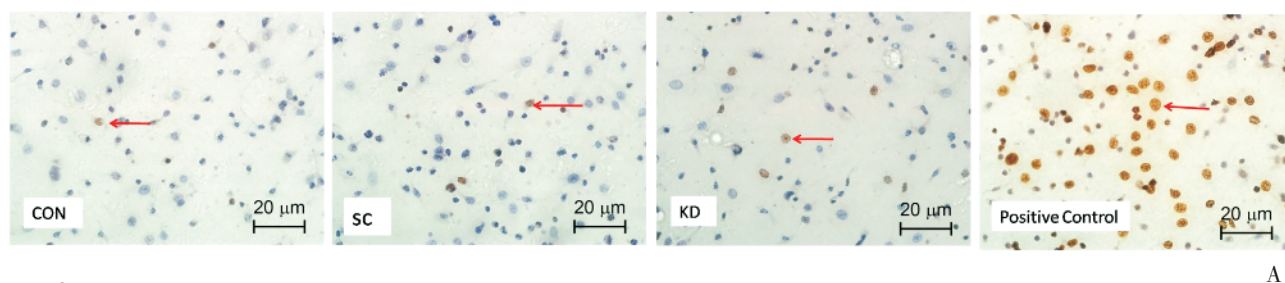


图 4 转染 48 h 后各组细胞凋亡比较

Fig.4 Comparison of apoptosis in different groups of MG63 cells

Detected by TUNEL,  $\times 100$ . 1) Indicates significant difference between the control group and KD group,  $P = 0.001$ . 2) Indicates significant difference between the SC and KD groups,  $P=0.002$ .

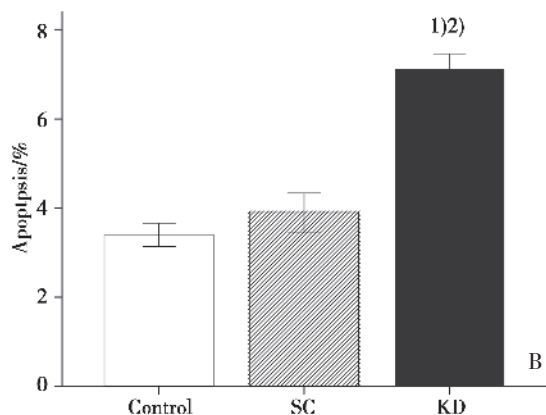


表 2 IRAK-4-siRNA 转染 MG63 后对各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Table 2 Comparison of Bcl-2 and Bax protein expression among the three groups 48 h after transfection

	Control	SC	KD	$P_{SC \text{ vs } KD}$
Bcl-2( $10^8$ )	$8.68 \pm 0.49$	$7.48 \pm 1.42$	$0.28 \pm 0.03$	$< 0.001$
Bax( $10^8$ )	$8.96 \pm 0.24$	$9.96 \pm 0.64$	$8.40 \pm 0.44$	0.315
Bcl-2/Bax	$0.97 \pm 0.08$	$0.76 \pm 0.18$	$0.03 \pm 0.002$	$< 0.001$

因子诸如 IL-1、TNF- $\alpha$  等均提示了局部炎症环境对成骨细胞的影响与上述骨溶解的病理过程有密切关系<sup>[5,17]</sup>。

IL-1 受体 (IL-1R) 与 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR)<sup>[18]</sup> 共有一段约 200 个氨基酸的同源保守序列组成胞质内结构域, 此区具有与信号转导至关重要的三个保守的结合域, 因而可诱发其下游一系列胞内信号通路的激活, 故两者被统称为 TLR/IL-1R 家族<sup>[19]</sup>。该家族能辨识病原性或内源性配体并为树突状细胞成熟和 T 细胞的抗原呈递提供必需的信号<sup>[19]</sup>。研究表明, TLR/IL-1R 通过胞内的保守结构域与下游配体骨髓源性分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)C 末端的 TLR 结构域相互结合后, 由 MyD88 通过其 N 末端典型的死亡结构域募集 IRAK-4 和 IRAK-1, 进而激活其下游的一系列磷酸化反应<sup>[20]</sup>。研究表明: IRAK-4 在 TLR/IL-1R 信号通路中具有不可或缺的地位。IRAK-4 缺失的情况下 IL-1 的作用信号

通路中断, 对细胞的诱导作用消失<sup>[7]</sup>。不同的研究均提出, 阻断 IRAK-4 活性有可能让患者在慢性炎症性疾病的治疗中获得益处<sup>[21-22]</sup>。Koziczak-Holbro 等<sup>[21]</sup>曾对 IRAK-4 基因敲除小鼠的关节进行的组织学研究, 发现由 KRNxNOD (K/BxN) 血清诱导的炎症性骨溶解减少。但 IRAK-4 的表达改变与成骨细胞凋亡之间的关系目前尚未见有研究报道。本实验着眼于细胞水平, 发现 IRAK-4 基因沉默后, 成骨细胞凋亡增加。尽管 IRAK-4 与成骨细胞之间的关系未见报道, 但已有很多文献探讨 IL-1 与成骨细胞增殖和活性之间的关系, 其中, 研究显示, 白介素 1 (IL-1) 对成骨细胞增殖有促进作用<sup>[23]</sup>。在本实验中 IRAK-4 基因沉默后继发成骨细胞生长速度减缓、凋亡增加。由于 IRAK-4 是 IL-1 受体信号通路上的关键转接蛋白, 因此该基因表达沉默可能是导致 IL-1 胞内信号传导中断, 继发成骨细胞凋亡增加的原因之一。尽管理论上成骨细胞的凋亡是骨溶解增加导致关节假体松

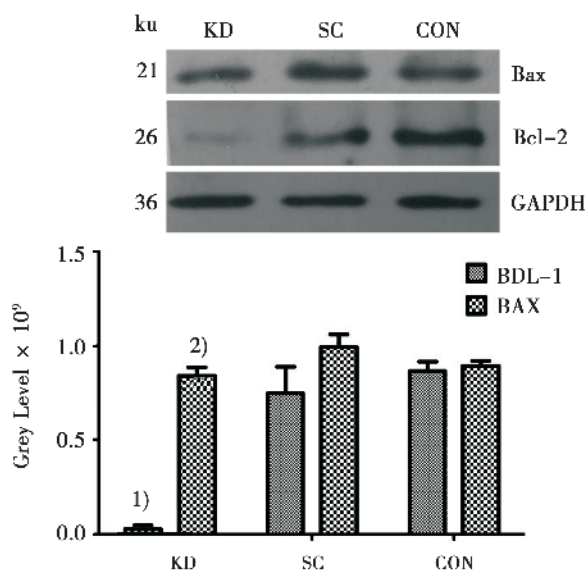


图5 IRAK-4-siRNA 转染 MG63 后各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达

Fig.5 Comparison of Bcl-2 and Bax protein expression among the three groups after transfection

1) Indicates significant difference between the SC and KD group in bcl-2 expression,  $P < 0.001$ ; 2) Fail to indicate significant difference between the SC and KD group in bax expression,  $P = 0.315$ .

动的基础,但由于炎症性骨溶解是一个复杂的过程,涉及多种不同的细胞因子参与其中,同时还受到破骨细胞活性的影响。同时本研究也并未对成骨细胞在 IRAK-4 基因沉默后接受炎症因子干预的反应进行研究。因此对 IRAK-4 在炎症性骨溶解中的角色的完整阐释需要对假体周围炎症环境有更进一步了解后才可能实现。

参与调控细胞凋亡的基因很多,例如 Bcl-2、Bax、p53、survivin 等。其中 Bcl-2、Bax 都属于 Bcl-2 基因家族,功能上 Bcl-2 为凋亡抑制基因,Bax 为凋亡诱导基因。诸多研究表明,两者可形成同源二聚体,也能相互作用形成异源二聚体。通过异源二聚体(Bcl-2-Bax)与同源二聚体(Bax-Bax)竞争 Bax 而实现抑制细胞凋亡的作用<sup>[11]</sup>。Bcl-2/Bax 比值对于决定细胞接受外界环境刺激信号后存活与否具有关键性作用<sup>[12]</sup>。为此,本研究对 IRAK-4 基因沉默后 MG63 细胞的 Bcl-2 和 Bax 基因的表达进行检测,结果显示:与正常目的细胞相比,RNA 干扰组的 Bcl-2 蛋白的表达量显著降低且 Bcl-2/BaxKD<Bcl-2/BaxSC。故考虑 siRNA 沉默 IRAK-4 表达后目的细胞 MG63 增殖受抑和凋亡增加,可能与抑制 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bcl-2/Bax 比例

有关。与本实验结果类似的是,对人类股骨颈骨折后细胞凋亡及 Bcl-2 蛋白表达的研究中发现 Bcl-2 表达可以使骨细胞存活时间延长,保持骨细胞的稳定性<sup>[24]</sup>。在其他研究中,部分 HIF-1 $\alpha$  基因缺失小鼠的成骨细胞凋亡被证实与 Bcl-2 基因表达减少有关<sup>[25]</sup>,而 VEGF 也被证实通过增加 Bcl-2 的表达延长成骨细胞的寿命<sup>[26]</sup>。其他与诱导细胞凋亡相关的基因,如细胞因子应答修饰体 A (cytokine response modifier A, crmA)<sup>[27]</sup>,则未见与骨重建或成骨细胞凋亡相关的报道。推测 Bcl-2/Bax 系统不仅仅是在 IRAK-4 基因沉默的成骨样细胞中影响细胞凋亡,也是各种因素导致成骨细胞凋亡的共有途径。但其中的具体机制,与其他影响凋亡的细胞因子之间的关系仍有待进一步探讨。此外,这些报道也提示了在假体周围炎症环境中,除了研究 IRAK-4 基因表达与成骨细胞之间的关系外,探讨通过调节 Bcl-2/Bax 系统的表达抑制成骨细胞凋亡可能也有其潜在临床应用价值。

总之,本实验利用有效沉默 IRAK-4 表达的 siRNA 序列转染人成骨样细胞,结果提示 MG63 细胞增殖减缓,凋亡增加。同样序列转染靶细胞后 Bcl-2/Bax 比例的改变可能与之相关。由于目前对于 IRAK-4 在炎症性骨溶解中的角色尚不清楚,本研究将有助于了解 IRAK-4 与成骨样细胞间的关系,完善对假体周围炎症环境中各种细胞因子间相互机制的认识。

#### 参考文献:

- [1] Levine BR, Hsu AR, Skipor AK, et al. Ten-year outcome of serum metal ion levels after primary total hip arthroplasty: A concise follow-up of a previous report [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(6): 512-518.
- [2] Rhee Y, Allen MR, Condon K, et al. PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(5): 1035-1046.
- [3] Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, et al. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption [J]. *J Immunol*, 1987, 138(5): 1464-1468.
- [4] Chen X, Zhu G, Jin T, et al. Cadmium stimulates the osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells in presence of osteoblasts [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 146(3): 349-353.
- [5] Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, et al. IL-6,

- RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(1): 49-60.
- [6] Yang SY, Zhang K, Bai L, et al. Polymethylmethacrylate and titanium alloy particles activate peripheral monocytes during periprosthetic inflammation and osteolysis [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(5): 781-786.
- [7] Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4 [J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 750-756.
- [8] Vandrovcova M, Hanus J, Drabik M, et al. Effect of different surface nanoroughness of titanium dioxide films on the growth of human osteoblast-like MG63 cells [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(4): 1016-1032.
- [9] Zhao H, Dong W, Zheng Y, et al. The structural and biological properties of hydroxyapatite-modified titanate nanowire scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(25): 5837-5846.
- [10] Schwartz Z, Bell BF, Wang L, et al. Beta-1 integrins mediate substrate dependent effects of 1 $\alpha$ , 25(OH) 2D3 on osteoblasts [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 103(3-5): 606-609.
- [11] Korbakis D, Scorilas A. Quantitative expression analysis of the apoptosis-related genes BCL2, BAX and BCL2L12 in gastric adenocarcinoma cells following treatment with the anticancer drugs cisplatin, etoposide and taxol [J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(3): 865-875.
- [12] Rossé T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [13] Hall MJ, Owings MF. 2000 National hospital discharge survey [J]. *Adv Data*, 2002, 19(329): 1-8.
- [14] Kurtz S, Ong K, Lau E, et al. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030 [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(4): 780-785.
- [15] 丁悦, Barden Bertram, 刘尚礼, 等. 聚乙烯颗粒对人单核细胞分泌促炎因子与抗炎因子的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(2): 127-130.
- Ding Y, Barden B, Liu SL, et al. The effect of polyethylene particles on secretion of pro inflammatory and anti inflammatory cytokines by human monocytes [J]. *J Sun Yat-sen Univ: Med Sci*, 2004, 25(2): 127-130.
- [16] Bauer TW. Particles and peri-implant bone resorption [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(405): 138-143.
- [17] Gordon A, Greenfield EM, Eastell R, et al. Individual susceptibility to periprosthetic osteolysis is associated with altered patterns of innate immune gene expression in response to pro-inflammatory stimuli [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(9): 1127-1135.
- [18] Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors [J]. *Immunity*, 2010, 32(3): 305-315.
- [19] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [20] Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses [J]. *J Endotoxin Res*, 2000, 6(5): 383-387.
- [21] Koziczak-Holbro M, Littlewood-Evans A, Pöllinger B, et al. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in animal models of joint inflammation [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(6): 1661-1671.
- [22] Li X. IRAK4 in TLR/IL-1R signaling: possible clinical applications [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(3): 614-618.
- [23] Olmedo ML, Landry PS, Sadasivan KK, et al. Regulation of osteoblast levels during bone healing [J]. *J Orthop Trauma*, 1999, 13(5): 356-362.
- [24] 于腾波, 赵鹏, 魏颖, 等. 股骨颈骨折后股骨头内骨细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白表达的关系及意义 [J]. *中华创伤杂志*, 2004, 20(6): 336-339.
- Yu TB, Zhao P, We Y, et al. Relationship of Bcl-2 protein expression with osteocyte apoptosis in the femoral head following femoral neck fractures [J]. *Chin J Trauma*, 2004, 20(6): 336-339.
- [25] Komatsu DE, Bosch-Marce M, Semenza GL, et al. Enhanced bone regeneration associated with decreased apoptosis in mice with partial HIF-1 $\alpha$  deficiency [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 366-374.
- [26] Street J, Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival - evidence for an autocrine feedback mechanism [J]. *J Orthop Surg Res*, 2009, 16(4): 19-25.
- [27] Bae S, Siu PM, Choudhury S, et al. Delayed activation of caspase-independent apoptosis during heart failure in transgenic mice overexpressing caspase inhibitor CrmA [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(5): H1374-H1381.