

寡核苷酸的摄取与血液肿瘤细胞种类和增殖活性的关系

朱元贵^{1*}, 卓光生², 陈志哲², 陈晓春¹

(福建医科大学 附属协和医院 1. 福建省老年医学研究所, 2. 福建省血液病研究所, 福建 福州 350001)

摘要: 目的 探讨血液肿瘤细胞摄取寡核苷酸与其种类和活性的关系。方法 流式细胞仪测定细胞内的平均荧光强度。结果 经过 $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光素 FITC 标记的 G3139 作用 4 h 后, 血液系统肿瘤患者外周血及骨髓单个核细胞对 G3139 的摄取能力明显高于正常人; 不同来源的血液肿瘤细胞株摄取 G3139 的能力不同, 单核细胞、B 淋巴细胞和髓系粒细胞来源的白血病细胞的摄取能力明显高于 T 淋巴细胞来源的白血病细胞; 经过全反式维甲酸作用的 HL60 细胞的增殖活性明显受到抑制, 同时细胞摄取 G3139 的能力明显下降。结论 血液肿瘤细胞具有摄取寡核苷酸的能力, 这种摄取能力与其细胞种类和细胞增殖活性有关。

关键词: 反义寡核苷酸; 白血病; 淋巴瘤; bcl-2 基因

中图分类号: R322; R329.25; R342.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)06-0401-04

Oligonucleotide uptake in hematological tumor cells is related to cellular species and proliferation

ZHU Yuan-gui^{1*}, ZHUO Guang-sheng², CHEN Zhi-zhe², CHEN Xiao-chun¹

(1. Institute of Geriatrics of Fujian Province, 2. Institute of Hematology of Fujian Province, The Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Aim** To explore whether the oligonucleotide uptake in hematological tumor cells is related to cellular species and proliferation. **Methods** Intracellular mean fluorescence intensity was measured by flow cytometry. **Results** After treatment with FITC-labeled G3139 at the concentration of $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 4 h, the G3139 uptake into peripheral blood mononuclear cell and bone marrow mononuclear cell in hematological tumor patients was significantly higher than that in normal control. There was different uptake of G3139 among the malignant hematological tumor cell strains, and the uptake in cells derived from monocyte, B lymphocyte and myeloid cell was much higher than that in cells derived from T lymphocyte. After treatment with all-*trans* retinoic acid (ATRA), HL60 cell proliferation was markedly inhibited and the uptake of G3139 decreased significantly. **Conclusion** Hematological tumor cells were capable of taking up oligonucleotide, and the oligonucleotide uptake in hematological tumor cells is related to its cellular species and its activation.

Key words: antisense oligonucleotide; leukemia; lymphoma; bcl-2 gene

反义寡核苷酸是人工合成的 DNA 或 RNA 小片段, 是一种具有潜在应用前景的基因药物。目前, 在临床前或临床研究过程中, 反义寡核苷酸已充分显示出在炎症、癌症、病毒感染中的应用潜力^[1]。血液细胞是寡核苷酸的靶细胞之一, 不同种类的血液细胞摄取寡核苷酸的能力可能不同。本研究应用流式

细胞技术, 观察血液肿瘤细胞对 bcl-2 反义寡核苷酸 G3139 的摄取, 探讨寡核苷酸的摄取同细胞状态的关系, 为反义治疗血液肿瘤的研究提供必要的实验依据。

材料与amp;方法

药物及试剂 G3139 为针对 bcl-2 mRNA 开放阅读框架前 18 个碱基的互补序列, 序列为 5'-

收稿日期: 2002-07-01

* 通讯作者 Tel: 86-591-3357896-8525, E-mail: ygzhu92@sina.com

TCTCCCAGCGTGCGCCAT3'^[2], 全部硫代磷酸化修饰, 5' 端荧光素 FITC 标记, 由美国 Genened Synthesis Inc 合成、标记和纯化。全反式维甲酸 (all-*trans* retinoic acid, ATRA) 由上海第六制药厂提供。胎牛血清和 RPMI-1640 购自 Gibco BRL 公司。Ficoll 细胞分离液和碘化丙啶购自北京华美生物工程有限公司。³H TdR 购自上海原子能研究所。

细胞及培养 利用 Ficoll 分离液分离 5 例正常人和初诊未经治疗的 7 例慢性期慢性髓性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML)、7 例急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 和 5 例非何杰金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL) 患者外周血和骨髓单个核细胞。HL60, K562, U937, CEM 和 CA46 细胞分别为人急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、单核细胞白血病、T 淋巴细胞白血病和伯基特淋巴瘤 B 淋巴细胞株, 由福建省血液病研究所提供。细胞在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 中。

G3139 处理细胞 参照前期的实验^[3], 在各细胞培养物中加入 0.60 μmol·L⁻¹ FITC 标记的 G3139, 继续培养 4 h 后进行细胞内荧光强度的测定。每份细胞测定 3 次。

ATRA 抑制 HL60 细胞增殖 在 96 孔培养板中接种 HL60 细胞 5 × 10⁵/孔 (100 μL), 每孔 6 个平行对照, 依次加入浓度为 1 × 10⁻⁸ ~ 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 ATRA, 培养 70 h 后进行细胞增殖活性的检测或继续用 0.60 μmol·L⁻¹ G3139 处理 4 h 后测定细胞内荧光强度。

流式细胞仪测定细胞内平均荧光强度 培养细胞去上清液, 用预冷的含 10% 小牛白蛋白的 0.05 mol·L⁻¹ PBS 洗涤 2 遍, 再用酸盐法洗脱结合在细胞膜上的 G3139^[4], 并用 0.05 mol·L⁻¹ PBS 调成 2 × 10⁸·L⁻¹ 的细胞悬液, 每管加入终浓度为 15 μmol·L⁻¹ 的碘化丙啶, 避光 30 min 后, 流式细胞仪 (FACScan, BD 公司) 检测细胞内平均荧光强度。每份标本收集 10 000 个细胞, 根据活细胞数用 CellQuest (BD 公司) 软件处理数据, 用平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 间接表示细胞摄取 FITC 标记的 G3139 的量。

HL60 细胞增殖活性的检测 经过 ATRA 处理后的 HL60 细胞, 每孔加入 0.5 μCi ³H TdR, 继续培养 4 h 后, 收集细胞于滤纸上, 用液体闪烁仪 (Beckman 公司) 测定各标本的放射强度。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 *t* 检验

和 *q* 检验判断差异的显著性。

结果

1 正常人和血液肿瘤患者血液细胞对 G3139 的摄取

体外培养正常人和血液肿瘤患者外周血及骨髓单个核细胞, 经过 0.60 μmol·L⁻¹ FITC 标记的 G3139 作用 4 h 后, 流式细胞仪检测可见血液肿瘤患者外周血及骨髓单个核细胞内平均荧光强度显著高于正常人 (*P* < 0.01), 尤以外周血单个核细胞的荧光强度增加更加明显, 如 AML 患者可达正常人的 3 倍。同时可见正常人骨髓单个核细胞荧光强度高于外周血单个核细胞 (*P* < 0.01), 见表 1。以上结果提示血液肿瘤患者外周血及骨髓单个核细胞具备摄取 G3139 的能力, 而正常人外周血单个核细胞的摄取能力相对较低。

Table 1 Intracellular mean fluorescence intensity (MFI) in PBMNC and BMMNC from patients after treatment with FITC-labeled G3139 at the concentration of 0.60 μmol·L⁻¹ for 4 h

Group	<i>n</i>	PBMNC (MFI)	BMMNC (MFI)
Normal	5	8.2 ± 2.3	22 ± 4 ^{##}
CML	7	24 ± 4 ^{**}	32 ± 6 ^{**}
AML	7	30 ± 5 ^{**}	39 ± 6 ^{**}
NHL	5	20 ± 4 ^{**}	29 ± 4 ^{**}

PBMNC: Peripheral blood mononuclear cell; BMMNC: Bone marrow mononuclear cell; CML: Chronic myelogenous leukemia; AML: Acute myeloid leukemia; NHL: Non-Hodgkin lymphoma. $\bar{x} \pm s$. ^{**} *P* < 0.01 vs normal group; ^{##} *P* < 0.01 vs PBMNC

2 不同血液系统肿瘤细胞株对 G3139 的摄取

选择人急性髓系粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、单核细胞白血病、T 淋巴细胞白血病和伯基特淋巴瘤 B 淋巴细胞株, 经过 0.60 μmol·L⁻¹ G3139 作用 4 h 后, 用正常人外周血单个核细胞作对照, 由表 2 可见各种肿瘤细胞内的平均荧光强度明显高于对照组 (*P* < 0.01), 其中 U937 > HL60 > CA46 > K562 > CEM。以上结果提示, 血液系统恶性肿瘤细胞株具有较高的摄取 G3139 的能力, 单核细胞、髓系粒细胞和 B 淋巴细胞来源的血液肿瘤细胞的摄取能力明显高于 T 淋巴细胞来源的肿瘤细胞。

3 不同增殖活性的 HL60 细胞对 G3139 的摄取

选择人急性髓系粒白血病细胞株 HL60 细胞, 经不同浓度的 ATRA 作用 70 h 后, 由表 3 可见, 随着 ATRA 作用浓度的增加, HL60 细胞的增殖活性较正

常对照组明显下降,相应此时细胞经 $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ G3139 作用 4 h 后,细胞内的平均荧光强度也较正常对照明显下降 ($P < 0.01$)。以上结果提示 HL60 细胞的增殖活性明显影响细胞对寡核苷酸的摄取。

Table 2 Intracellular mean fluorescence intensity (MFI) in cell strains after treatment with FITC-labeled G3139 at the concentration of $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 4 h

	Normal	HL60	K562	U937	CEM	CA46
MFI	8.2 ± 2.3	$56 \pm 4^{**}$	$36 \pm 4^{**}$	$69 \pm 4^{**}$	$27 \pm 3^{**}$	$46.3 \pm 2.9^{**}$

MFI in each cell strain was measured in triplicate and the significance was compared with q test and t test. $\bar{x} \pm s$. $^{**} P < 0.01$ vs normal group

Table 3 Inhibition of cell proliferation and G3139 uptake in HL60 cells after treatment with all-trans retinoic acid (ATRA) for 70 h and FITC-labeled G3139 at the concentration of $0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 4 h

ATRA/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	^3H thymidine incorporation/ min^{-1}	Fluorescence intensity (MFI)
0	7.025 ± 41.2	53 ± 7
1×10^{-4}	$1.002 \pm 98^{**}$	$24.5 \pm 2.5^{**}$
1×10^{-5}	$3.325 \pm 180^{**}$	$38 \pm 4^{**}$
1×10^{-6}	$6.320 \pm 314^{*}$	50 ± 6
1×10^{-7}	6.525 ± 462	53 ± 4
1×10^{-8}	6.726 ± 338	54 ± 7

The experiments were done in triplicate. $\bar{x} \pm s$. $^{*} P < 0.05$,

$^{**} P < 0.01$ vs without ATRA treatment

讨论

Bcl-2 基因是重要的原癌基因之一,在血液系统各种恶性肿瘤中有不同程度的表达,是血液肿瘤反义治疗重要的靶位点。G3139 是针对 bcl-2 设计的治疗滤泡型淋巴瘤的反义药物,在美国已进入 II A 期临床试验^[1]。

研究指出,靶细胞对反义寡核苷酸的摄取能力是保证其生物活性最主要的影响因素^[1,5]。现阶段,反义药物研究应用的范围主要是血液系统恶性肿瘤和病毒感染等疾病,血液细胞作为靶细胞之一,能否有效摄取反义药物,具有重要的意义。本研究发现,正常人外周血单个核细胞对 G3139 的摄取能力很低,而骨髓单个核细胞对 G3139 有一定的摄取能力。同时,CML,AML 及 NHL 患者外周血和骨髓单个核细胞内 G3139 水平显著高于正常人。因此推测,血液细胞对寡核苷酸的摄取与细胞的增殖活性有关。正常人外周血单个核细胞由于处于相对静止状态而

骨髓单个核细胞具有一定的增殖活性,其摄取寡核苷酸的能力明显低于骨髓单个核细胞,同时由于白血细胞具备很高的增殖活性,其摄取寡核苷酸的能力大大提高。因此以上结果为血液系统恶性肿瘤的反义药物应用提供了必要的依据。

血液细胞对寡核苷酸的摄取是个复杂的过程,不同细胞组分由于细胞表面标志和细胞活性的不同,对寡核苷酸的摄取能力也可能不同。Zhao 等^[6]指出,白血细胞对寡核苷酸的摄取能力明显高于正常细胞,同时寡核苷酸的摄取与细胞类型和细胞活化状态有关,其原因可能跟细胞表面表达某些与核酸物质摄取有关的蛋白质如“核酸受体”有关。本研究也发现体外培养的恶性肿瘤细胞株对 G3139 具有较高的摄取能力,且与细胞类型有明显的关系,单核细胞、髓系粒细胞和 B 淋巴细胞来源的肿瘤细胞的摄取能力明显高于 T 淋巴细胞来源的白血细胞。另外,经过 ATRA 作用后低增殖活性的 HL60 细胞对 G3139 的摄取能力也明显下降。以上结果进一步提示血液细胞对寡核苷酸的摄取与细胞的种类和增殖活性有关,同时提示促进细胞增殖的细胞因子有望提高肿瘤细胞对反义药物的摄取,这为进一步考虑反义治疗血液系统恶性肿瘤时合理联合应用细胞因子提供了一定的依据。

但是,反义药物的剂量与药效学的关系是个很复杂的过程。Calabretta 等^[7]指出,在一定的剂量范围内,c-myc 反义寡核苷酸对正常造血细胞克隆生长没有明显的抑制作用,而对白血病患者骨髓细胞克隆生长有明显的抑制作用,在骨髓净化时增加寡核苷酸剂量的同时也增加其对正常造血细胞克隆的毒副作用。因此,合理掌握反义寡核苷酸的量是使用反义药物必须考虑的问题。前期的研究已对 HL60 细胞对 G3139 的摄取以及 G3139 在细胞内的分布等细胞动力学模式以及生物药效效应作了研究^[3,8],发现在一定的剂量范围内,HL60 细胞对 G3139 的摄取可达到饱和状态,单纯增加 G3139 的量并不能增加细胞的摄入量,提示在应用反义药物时,单纯增加反义药物的量并不能提高靶细胞的摄取量,应该考虑借助阳离子脂质体等基因转染的方式提高靶细胞对反义药物的细胞摄取。

References:

- [1] Hogrefe RI. An oligonucleotide primer [J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1999, 9(2): 351 - 357.
- [2] Raynaud FI, Orr RM, Goddard PM, et al. Pharmacokinetics

- of G3139 , a phosphorothioate oligodeoxynucleotides antisense to bcl2 , after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther* , 1997 ,**281**(2) :420 - 427 .
- [3] Zhu YG , Zhuo GS , Chen ZZ , *et al* . Kinetics of cellular uptake and distribution of 5'-FITC labeled bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide G3139 transfected by cationic liposome in HL60 cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报) , 2000 ,**16**(5) :547 - 550 .
- [4] Gao WY , Jaroszewski JW , Cohen JS , *et al* . Mechanisms of inhibition of herpes simplex virus type 2 growth by 28-merphosphorothioate oligodeoxycytidine [J]. *J Biol Chem* , 1990 ,**265**(33) :20172 - 20178 .
- [5] Kronenwett R , Steidl U , Kirsch M , *et al* . Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset [J]. *Blood* , 1998 ,**91**(3) :852 - 862 .
- [6] Zhao Q , Song X , Waldschmidt T , *et al* . Oligonucleotide uptake in human hematopoietic cells is increased in leukemia and is related to cellular activation [J]. *Blood* , 1996 ,**88**(5) : 1788 - 1795 .
- [7] Calabretta B , Sims RB , Valtieri M , *et al* . Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc oligodeoxynucleotides : an *in vitro* study relevant to bone marrow purging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 ,**88**(15) :2351 - 2358 .
- [8] Zhu YG , Zhuo GS , Chen ZZ , *et al* . Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide G3139 in HL60 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin* , 2001 ,**22**(11) :1007 - 1012 .