

受体介导的 *c-myc* 反义核酸抑制肝癌 Bel-7402 细胞增殖的机制

蒋建伟, 张 洹

Mechanism of *c-myc* Antisense Oligodeoxynucleotide Mediated by Receptor on the Proliferative Inhibition of Bel-7402 Cells

JIANG Jian-wei, ZHANG Yuan

Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Corresponding Author: ZHANG Yuan

Abstract: **Objective** To observe the mechanism of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide mediated by galactose receptor on the proliferative inhibition of hepatocarcinoma Bel-7402 cells. **Methods** *c-myc* ASODN mixed with Galactose (Gal)- polyethyleneimine (PEI) reagent forming Gal-PEFASODN complex, then incubated with Bel-7402 cells for 48h, using Propidium Iodide (PI) dyeing, AnnexinV-FITC and PI double staining, DNA gel electrophoresis to detected the proliferative inhibition mechanism of Gal-PEFASODN on Bel-7402 cells. **Results** Cell cycle was determined by flow cytometry. In the control group, Gal-PEI group and ASODN group, cell proliferative index was found to be 35.04%, 33.95%, 32.90%, respectively. However, cell proliferative index for Gal-PEFASODN group was found to be 23.65%, decreased by 11.39% compared to the control group ($P < 0.01$). Necrotic cell percentage was determined using AnnexinV-FITC/PI double staining test. The results showed cell apoptotic rate of 2.77%, cell necrotic rate of 3.06% and the normal cell percentage was detected as 94.13% in the control group; cell apoptotic rate below 4%, cell necrotic rate below 6.8% were detected in both ASODN group and Gal-PEI group; cell apoptotic rate of 6.5%, cell necrotic rate of 15.9% and the normal cell percentage of 76% were determined in Gal-PEFASODN group. There was no DNA ladder morphology, on the contrary, there was DNA smear morphology using DNA gel electrophoresis in Gal-PEFASODN group. **Conclusion** The mechanism by which Gal-PEFASODN inhibits cell proliferation maybe that it can restrain the change from G_0/G_1 period to S period in cell cycle and induces cell necrosis.

Key words: *c-myc*; Antisense oligodeoxynucleotide; Hepatocellular carcinoma; Necrosis; Apoptosis

摘 要: **目的** 探讨半乳糖受体介导的 *c-myc* 反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN) 抑制肝癌 Bel-7402 细胞增殖的机制。 **方法** *c-myc* ASODN 与半乳糖 (galactose, Gal)-聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 相作用形成 Gal-PEFASODN 复合物, 作用于人肝癌 Bel-7402 细胞, 通过流式细胞仪检测细胞周期、AnnexinV-FITC 和碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 双染色、DNA 电泳实验观察 Gal-PEFASODN 对 Bel-7402 细胞的作用。 **结果** 采用流式细胞仪检测细胞周期, 细胞对照组、Gal-PEI 对照组、ASODN 对照组, 细胞增殖指数分别为 35.04%、33.95%、32.90%, Gal-PEFASODN 组细胞增殖指数为 23.65%, 与细胞对照组相比, $sub-G_1$ 期 + G_0/G_1 期细胞总数从 64.03% 增加到 76.74%, S 期 + G_2/M 期的细胞从 35.04% 减少为 23.65%, Gal-PEFASODN 组细胞增殖指数下降 11.39%, 差异显著 ($P < 0.01$)。采用细胞凋亡检测试剂 AnnexinV-FITC/PI 双染检测细胞坏死情况, 细胞对照组细胞凋亡率 2.77%, 坏死率 3.06%, 正常细胞率 94.13%; ASODN 对照组、Gal-PEI 对照组细胞凋亡率均在 4% 以下, 坏死率均在 6.8% 以下; Gal-PEFASODN 组细胞凋亡率 6.5%, 坏死率 15.9%, 正常细胞率下降为 76%。DNA 电泳实验中, Gal-PEFASODN 组未发现细胞凋亡的 DNA 梯形条带, 相反出现了弥散条带。 **结论** 半乳糖受体介导的 *c-myc* 反义核酸通过阻止细胞从 G_0/G_1 期细胞向 S 期的转变, 诱导细胞坏死, 达到抑制细胞 Bel-7402 增殖的作用。

关键词: *c-myc*; 反义核酸; 肝癌; 细胞坏死; 细胞周期

中图分类号: R73-36⁺2; R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-8578 (2006) 10-0729-04

收稿日期: 2005-10-18; 修回日期: 2006-04-06

基金项目: 广东省自然科学基金重点资助项目 (021195); 广东省自然科学基金资助项目 (04010487)

作者单位: 510632 广州, 暨南大学医学院血液病研究所

通讯作者: 张洹

作者简介: 蒋建伟 (1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤分子生物学的研究

0 引言

c-myc 基因是人们发现较早的一种原癌基因, c-myc 蛋白是一种具有 DNA 结合功能的转录因子, 启动细胞增殖, 抑制细胞分化, 参与细胞凋亡。人类许多肿瘤可检测到 c-myc 基因的异常表达, 如白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、肝癌、头颈部肿瘤、食管癌、胃癌、结肠癌等。在正常肝组织, c-myc 基因低表达或不表达, 在原发性肝癌的癌组织及癌周组织中, c-myc 蛋白表达水平显著性升高; c-myc 蛋白表达与肝癌的发生、发展密切相关, 而且与肝癌的分期、预后有关^[1,2]。c-myc 反义核酸能抑制人肝癌细胞生长^[3]。

单纯反义寡核苷酸 (Antisense oligodeoxynucleotide, ASODN) 导入细胞的效率不高, 而受体介导的反义核酸投递系统则具有高效、靶向的特点^[4]。肝细胞表面具有脱唾液酸糖蛋白受体等 5 种专一性受体, 能识别末端带有半乳糖残基的糖蛋白或人工合成的配体并与其结合, 这种配体-受体的结合是非常高效的。前期实验采用半乳糖 (Galactose, Gal)-聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 交联载体与 c-myc ASODN 形成 Gal-PEFASODN 复合物, 构成以肝细胞膜半乳糖受体为靶向的反义核酸投递系统, 作用于人肝癌 Bel-7402 细胞, 证明半乳糖受体介导的 c-myc 反义核酸对人肝癌 Bel-7402 细胞具有靶向投递作用并能高效抑制该细胞的增殖^[5], 本实验旨在探讨 c-myc 反义核酸抑制 Bel-7402 细胞增殖的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

半乳糖-聚乙烯亚胺 (Gal-PEI) 转染试剂 (法国 Polyplus Transfection 公司)。c-myc 反义核酸的合成: 针对 c-myc 基因核苷酸序列 162~179 设计反义寡脱氧核苷酸并进行全程硫代修饰, 上海生物工程公司合成, 设计序列如下: 5'-CTT CTC GAG GCA GGA GGG-3', AnnexinV-FITC / 碘化丙锭 (Propidium Iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Bender Medsystems 公司和北京宝塞生物技术公司)。CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司), 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司), Quantimet 970 凝胶图像分析仪 (英国剑桥仪器公司)。

1.2 细胞培养

Bel-7402 肝癌细胞由中山大学北校区生化教研室惠赠。细胞培养体系: RPMI1640 培养液, 含 10% 灭活小牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素, 置 37、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔 3d 传代, Bel-7402

细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验选用对数生长期、台盼兰拒染率 > 95% 的 Bel-7402 细胞。

1.3 Gal-PEFASODN 复合物的制备

c-myc ASODN 用不含血清的 RPMI1640 液溶解, 配 150μmol/L 溶液备用。实验前用不含血清的 RPMI1640 液分别溶解 Gal-PEI 转染试剂和 c-myc ASODN, 混匀, 并使两者氮磷比为 5.0, 得 Gal-PEFASODN 交联复合物。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

取 Bel-7402 细胞, 调浓度 1.5×10^5 cells/ml, 接种于 24 孔板, 设 2 复孔, 待细胞贴壁达 40%~50% 时加入药物, 设 4 组: 细胞对照组; Gal-PEI 对照组 (加入 Gal-PEI 转染试剂 5μl, 同第 1 组); ASODN 对照组 (0.375μmol/L); Gal-PEFASODN 组 (含 ASODN 0.375μmol/L)。37、5% CO₂ 培养 48h。消化收集细胞, 乙醇固定, 碘化丙锭染色, 流式细胞术测定各组细胞周期, 并计算细胞增殖指数 (Proliferatory Index, PI), 每个样本随机分析 10 000 个细胞。细胞增殖指数^[6] = (S 期细胞数 + G₂/M 期细胞数) / 总的细胞数 × 100%。

1.5 AnnexinV-FITC 及碘化丙锭 (PI) 双染色测定

取 Bel-7402 细胞, 设 4 组: 细胞对照组; Gal-PEFASODN 组 (含 c-myc ASODN 25nmol/L, 50nmol/L, 100nmol/L, 150nmol/L, 250nmol/L, 375nmol/L); ASODN 对照组 (浓度同组); Gal-PEI 对照组 (加入 Gal-PEI 转染试剂 0.33μl, 0.67μl, 1.34μl, 2.0μl, 3.34μl, 5.0μl, 与 1 组的加入量一致)。培养 48h, 消化收集细胞, PBS 和 binding buffer 洗涤, 离心 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色, 流式细胞术测定凋亡和坏死细胞的百分率, 每个样本随机分析 10 000 个细胞, 实验重复 3 次。

1.6 DNA 电泳检测

调 Bel-7402 细胞, 设 4 组: 细胞对照组; Gal-PEI 对照组 (加入 Gal-PEI 转染试剂 6.67μl, 同第 1 组); ASODN 对照组 (0.500μmol/L); Gal-PEFASODN 组 (含 ASODN 0.500μmol/L)。培养 48h。消化收集细胞, 提取 DNA, 1% 的琼脂糖电泳, 80V 电泳 1h, 凝胶图像分析仪观察电泳结果, 实验重复 2 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件分析数据, 采用 Poisson 分布检验比较差异的显著性。

2 结果

2.1 细胞周期检测结果

流式细胞仪可检测出不同细胞周期的百分率,

如 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 期分别对应于细胞的 M_1 (Sub- G_1) 期, G_0/G_1 期, S 期, G_2/M 期。在流式细胞仪的散点图上, 细胞对照组、Gal-PEI 对照组、ASODN 对照组细胞形态均正常, 细胞碎片和细胞粘连较少, 而 Gal-PEFASODN 组的散点图上出现了较多的细胞碎片。从细胞周期分布来看, 细胞对照组、Gal-PEI 对照组、ASODN 对照组, 细胞增殖指数分别为 35.04%、33.95%、32.90%; Gal-PEFASODN 组细胞增殖指数为 23.65%, 与细胞对照组相比, S 期和 G_2/M 期细胞均不同程度地减少, sub- G_1 期 + G_0/G_1 期细胞总数从 64.03% 增加到 76.74%, S 期 + G_2/M 期的细胞从 35.04% 减少为 23.65%, 经 Poisson 分布检验, 差异显著 ($P < 0.01$); 细胞增殖指数

下降 11.39%, 见表 1。

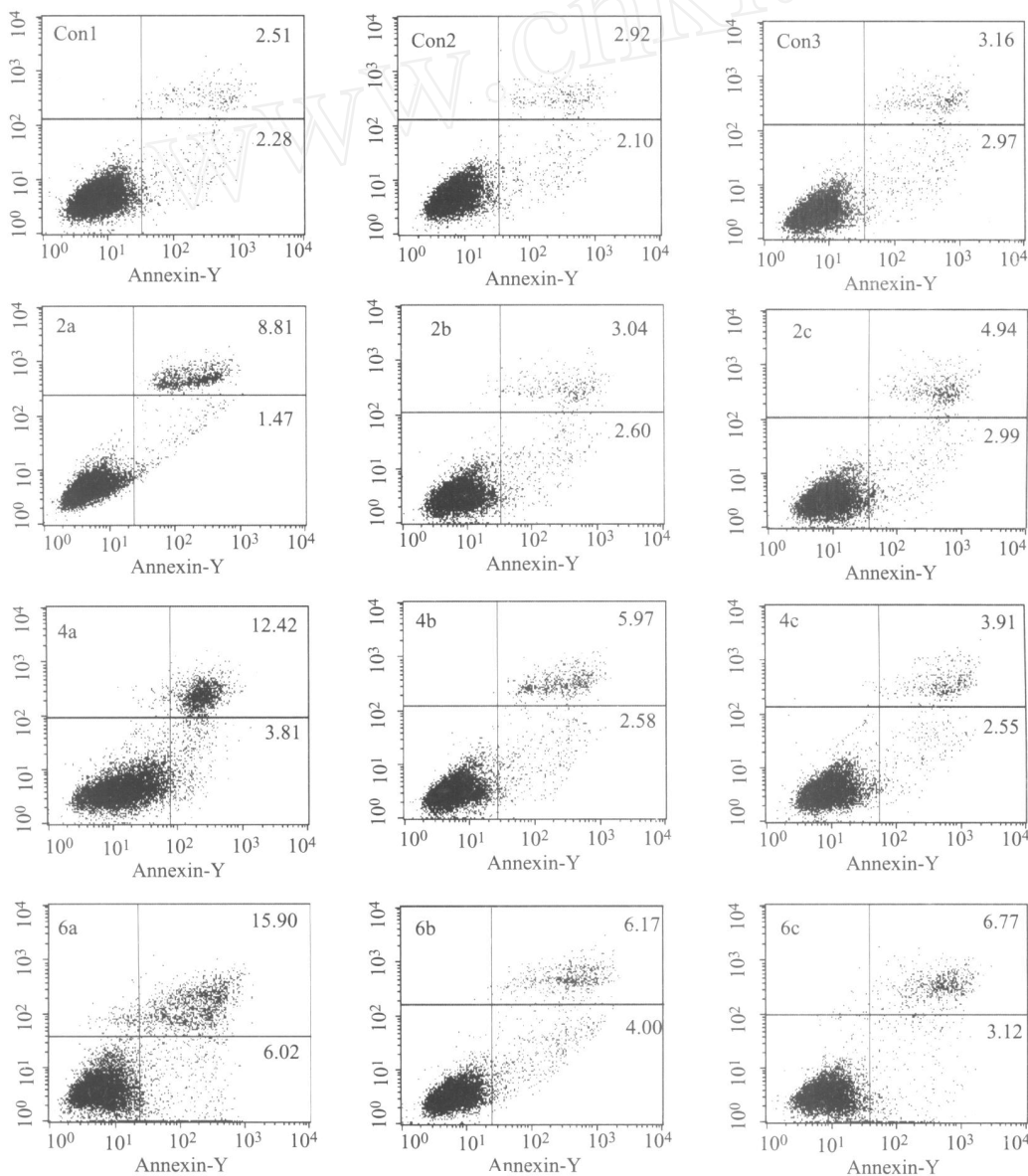
表 1 Gal-PEFASODN、ASODN、Gal-PEI 组代表性细胞周期检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

	M_1 % (sub- G_1)	M_2 % (G_0/G_1)	M_3 % (S)	M_4 % (G_2/M)	Sub- G_1 + (G_0/G_1)	S + G_2/M (PI %)
细胞对照组	1.92	62.11	15.87	19.17	64.03	35.04
ASODN 对照组	2.82	62.81	17.40	15.50	65.63	32.90 *
Gal-PEI 对照组	3.32	60.56	16.68	17.27	63.88	33.95
Gal-PEFASODN 组	18.98	57.76	13.32	10.33	76.74	23.65 **

注: 与细胞对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$

2.2 Annexin V-FITC 及 PI 双染色测定

在凋亡初期细胞膜是完好的, 在细胞坏死的早期阶段, 细胞膜的完整性就破坏了。胞膜磷脂酰丝氨酸去极性外翻是细胞凋亡的一个重要标志, 磷脂



Con1、Con2、Con3 均为细胞对照组
 2a、4a、6a: Gal-PEFASODN 组 (ASODN 浓度: 50nmol/L、150nmol/L、375nmol/L);
 2b、4b、6b: ASODN 组 (ASODN 浓度: 50nmol/L、150nmol/L、375nmol/L);
 2c、4c、6c: Gal-PEI 组 (Gal-PEI 体积: 0.66 μ l、2.0 μ l、5.0 μ l)

图 1 不同浓度的 Gal-PEFASODN、ASODN、Gal-PEI 组代表性 Annexin V-FITC/PI 双染检测结果

酰丝氨酸外翻也可发生在细胞坏死过程中,两者差别是细胞膜是否完整。Annexin V 可以特异性结合磷脂酰丝氨酸;碘化丙啶(PI)不能进入活细胞,但可以进入坏死细胞并与胞内 DNA 结合,故 PI 染色可以判断膜的完整性。流式细胞仪双变量散点图上,左下象限显示活细胞群(AnnexinV⁻ / PI⁻),右下象限显示凋亡细胞群(AnnexinV⁺ / PI⁻),右上象限显示坏死细胞群(AnnexinV⁺ / PI⁺),左上象限显示非特异性染色细胞群(AnnexinV⁻ / PI⁺)。

结果显示细胞对照组的凋亡率 2.77%,坏死率 3.06%,正常细胞 94.13%。ASODN 对照组细胞凋亡率在 4%以下,坏死率在 6.2%以下;Gal-PEI 对照组细胞凋亡率在 3.5%以下,坏死率在 6.8%以下。Gal-PEFASODN 实验组细胞凋亡率为 6.5%,坏死率为 15.9%,正常细胞率下降为 76%。与早期凋亡细胞相比,坏死细胞百分率的增加更为显著,见图 1。

2.3 DNA 电泳结果

药物作用于 Bel-7402 细胞 48h,提取 DNA,电泳检测, Gal-PEFASODN 组细胞未出现典型的 DNA 梯形条带,相反出现 DNA 弥散条带;细胞对照组、Gal-PEI 对照组及 ASODN 对照组均未出现 DNA 梯形条带。

3 讨论

Gal-PEFASODN 组与细胞对照组相比,S 期和 G₂/M 期细胞均不同程度地减少;细胞增殖指数下降 11.39%。采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法可检测早期凋亡细胞和坏死细胞,实验发现 Gal-PEFASODN 组的细胞凋亡率最高为 6.5%,细胞坏死率最高为 15.9%;ASODN 对照组、Gal-PEI 对照组的细胞凋亡率最高为 4%,细胞坏死率最高为 6.8%。实验提示,受体介导的 c-myc 反义核酸对肝癌 Bel-7402 细胞的致凋亡作用不显著,但对肝癌细胞具有一定的致坏死作用。DNA 电泳发现,DNA 呈不规则断裂,出现弥散状(smear)条带,未发现细胞凋亡的典型 DNA 梯形条带(Ladder)。

c-myc 蛋白属于具有 DNA 结合域的转录因子,c-myc 基因激活导致大量 G₀/G₁ 期细胞提前进入细胞周期,推动 G₀/G₁ 期细胞向 S 期转变。c-myc ASODN 抑制肝癌细胞的增殖,使 S 期、G₂/M 期细

胞百分率均下降,细胞增殖指数下降,这是由于 c-myc ASODN 抑制了 c-myc 的表达,阻断了 G₀/G₁ 期细胞向 S 期的转变,实验结果与理论相一致。

c-myc 分子中具有促进细胞增殖和介导细胞凋亡的结构域,两域互相重叠,具有介导细胞增殖和诱导细胞凋亡的双重作用。当 c-myc 蛋白表达上升且血清生长因子存在时,细胞进入增殖状态;当缺乏血清生长因子时,c-myc 蛋白高表达可导致细胞凋亡^[1]。Supino 等^[7]、Castele 等^[8] 分别提出细胞转染 c-myc 反义核酸,可抑制细胞凋亡的产生。刘颖格等^[9] 提出 c-myc 反义寡核苷酸抑制大鼠气道平滑肌增殖,但未发现平滑肌细胞凋亡。本实验通过 AnnexinV-FITC/PI 试剂进行双参数检测,发现 c-myc 反义核酸通过诱导细胞坏死而抑制细胞增殖,DNA 电泳实验进一步发现 DNA 的弥散状(smear)条带,与刘颖格报道相一致。

本实验证明,半乳糖受体介导的 c-myc 反义核酸通过阻断肝癌 bel-7402 细胞从 G₀/G₁ 期向 S 期的转变,诱导细胞坏死,达到抑制 Bel-7402 细胞增殖的作用。

参考文献:

- [1] Hermeking H. The MYC oncogene as a cancer drug target[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3(3):163-175.
- [2] Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-myc [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 416(2):129-137.
- [3] 党双锁, 李林瑞, 刘效恭, 等. 脂质体介导 c-myc 基因反义寡核苷酸对入肝癌细胞的生物学影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(6):533-534.
- [4] Gust TC, Zenke M. Receptor-mediated gene delivery[J]. *Scientific World Journal*, 2002, 2(1):224-229.
- [5] 蒋建伟, 张涓. 半乳糖受体介导的 c-myc 反义核酸对入肝癌细胞的靶向作用[J]. *癌症*, 2004, 23(11):1288-1293.
- [6] 王颖, 王家陇. 生存素反义寡核苷酸诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(1):11-14.
- [7] Supino R, Perego P, Gatti L, et al. A role for c-myc in DNA damage-induced apoptosis in a human TP53-mutant small-cell lung cancer cell line[J]. *European Journal of Cancer*, 2001, 37(17):2247-2256.
- [8] Castele MV, Kefas BA, Cai Y, et al. Prolonged culture in low glucose induces apoptosis of rat pancreatic β -cells through induced of c-myc[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(4):937-944.
- [9] 刘颖格, 戚好文, 李焕章, 等. c-myc 反义寡核苷酸抑制大鼠气道平滑肌增殖与细胞凋亡无关[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(1):4-7.

[编辑:周永红]