

[文章编号] 1000-4718(2007)07-1343-04

反义 *c-myc* 寡核苷酸诱导骨肉瘤细胞 MG-63 凋亡的实验研究*

胡 军¹, 王桂龙^{2Δ}, 向 阳², 刘 义², 陈一升², 丁茹虎²
(贵阳医学院附属医院¹ 病理科, ² 骨科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究反义 *c-myc* 寡核苷酸诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡的作用。方法: 设计反义 *c-myc* 寡核苷酸片段, 转染入人骨肉瘤 MG-63 细胞, 通过 MTT 法、流式细胞仪、HE 染色及透射电镜方法, 观察和分析其对人骨肉瘤 MG-63 细胞作用的效果。结果: MTT 法示反义 *c-myc* 寡核苷酸可抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖, 10.0 μmol/L、作用 48 h 效果最明显; 流式细胞仪检测证实反义 *c-myc* 寡核苷酸(终浓度 10.0 μmol/L)诱导瘤细胞的凋亡率达 37.92%, 出现明显的凋亡峰, 并可抑制 *c-myc* 基因蛋白的表达; 细胞呈典型凋亡特征。结论: 反义 *c-myc* 寡核苷酸能有效诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞的凋亡。

[关键词] 基因, *c-myc*; 寡核苷酸类, 反义; 骨肉瘤; 细胞凋亡

[中图分类号] R738.1

[文献标识码] A

Induction of apoptosis by *c-myc* antisense oligonucleotide in osteosarcoma cell MG-63

HU Jun¹, WANG Gui-long², XIANG Yang², LIU Yi², CHEN Yi-sheng², DING Ru-hu²

(¹ Department of Pathology, ² Department of Orthopedics, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China. E-mail: xiaolongwangzi6666@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the induction of apoptosis by *c-myc* antisense oligonucleotide in osteosarcoma cell (MG-63). **METHODS:** The designed *c-myc* antisense oligonucleotide fragment was transfected into human osteosarcoma MG-63 cells. The cell growth and apoptosis were measured by the methods of MTT, FCM, HE staining and transmission electron microscopy. **RESULTS:** The results showed that the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells was inhibited and apoptotic rate was 37.92% when treated with *c-myc* antisense oligonucleotide at the dose of 10.0 μmol/L for 48 h. *c-myc* antisense oligonucleotide (10.0 μmol/L) also inhibited the expression of *c-myc* protein. **CONCLUSION:** *c-myc* antisense oligonucleotide is able to induce apoptosis in human osteosarcoma MG-63 cells.

[KEY WORDS] Genes, *c-myc*; Oligonucleotides, antisense; Osteosarcoma; Apoptosis

骨肉瘤(osteosarcoma)是一种常见的恶性骨肿瘤,多发于儿童和青壮年,恶性程度高,给患者的肢体和生命造成了巨大的威胁。目前骨肉瘤的临床治疗效果仍不能令人满意,基因治疗的优势在于通过改变肿瘤细胞的分子基础而从根本上抑制肿瘤的发生和发展,且对正常细胞的伤害不大,有望可以使肿瘤达到根治。基因治疗的研究报道较少,多处于实验研究阶段。我们以人骨肉瘤 MG-63 细胞为研究对象,设计了反义 *c-myc* 寡核苷酸(*c-myc* ASODN)片段,在体外将其转染入人骨肉瘤 MG-63 细胞,观察和分析其对人骨肉瘤 MG-63 细胞的凋亡诱导作用,以探讨骨肉瘤反义基因治疗的可行性,

为进一步临床应用提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 反义寡核苷酸的制备 根据 *c-myc* 基因第 2 外显子翻译起始区序列设计 *c-myc* 反义寡核苷酸(*c-myc* ASODN)片段,碱基序列^[1]为:5'-AACGTT-GAGGGGCAT-3'(由上海 Sangong 公司合成,两端各硫代修饰 3 个碱基)。使用前加消毒 3 蒸水溶解,配成浓度为 100.0 μmol/L 的原液,于 95 °C 水浴变性 5 min,冰上聚冷备用。临用前用 MEM 细胞培养液稀释成相应浓度使用。

[收稿日期] 2006-09-21 [修回日期] 2006-11-27

* [基金项目] 贵州省教育厅自然科学研究资助项目(No. F2004-5)

Δ 通讯作者 E-mail: xiaolongwangzi6666@163.com

1.2 主要试剂 大鼠抗人 *c-myc* 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品; FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (II 抗) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞与细胞培养 人骨肉瘤 MG-63 细胞株购自武汉大学保藏中心, 用含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 非必需氨基酸的 MEM 细胞培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 2-3 d 传代 1 次, 倒置显微镜下观察细胞形态, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞转染 细胞以 1×10^8 cells/L 接种于 96 孔培养板中, 150 μ L/well, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 18-24 h, 使细胞达到 30% - 50% 融合。用无血清无抗生素的 MEM 培养液洗驯化细胞, 加含相应浓度 *c-myc* ASODN 的实验用 MEM 细胞培养液, 培养相应时间, 而后收集细胞, 用以下方法检测细胞转染效果。

2.3 MTT 法测定 将细胞分为对照组 (A 组) 和 5 个实验组 (B、C、D、E、F 组), 进行量效实验, A-F 各组 *c-myc* ASODN 浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、15.0 和 20.0 μ mol/L, 每组 4 孔, 基因转染后每孔加入 12.07 mmol/L 的 MTT 15 μ L, 放入培养箱再培养 4 h, 倾去培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 室温下振荡 5 min, 用酶标仪进行比色, 波长为 570 nm, 测定各组吸光度值 (A_{570}), 并计算增殖抑制率 (%) = (对照组 A 值 - 试验组 A 值 / 对照组 A 值) \times 100%。时效实验时, 选择量效实验最佳浓度作为实验浓度, 选用 8、12、24、48 和 72 h 5 个作用时点。

2.4 流式细胞仪测定瘤细胞凋亡情况 实验分为实验组 (I) 和对照组 (II), I 组用 25 mL 培养瓶培养人骨肉瘤 MG-63 细胞, 取对数期细胞用无血清无抗生素的 MEM 培养液驯化 18-24 h, 加入 *c-myc* ASODN (终浓度为 10.0 μ mol/L) 培养 48 h; II 组以无血清无抗生素的 MEM 培养液代替 *c-myc* ASODN, 胰酶消化细胞, PBS 洗 2 遍, 加碘化丙锭 (PI, 终浓度为 50.0 mg/L), 于 4 °C 避光放置 45 min, 流式细胞仪检测。

2.5 流式细胞仪测定 *c-myc* 基因蛋白的表达 分组及细胞处理同 2.4, 胰酶消化、制成细胞悬液, 1 500 r/min 离心 5 min (以下离心条件及时间相同), PBS 洗 2 遍, 加 70% 乙醇室温下固定 30 min, PBS 洗 2 遍, 离心弃固定液, 细胞重悬于 0.01% 的 Triton X-100, 室温下放置 30 min, 以增加细胞膜的通透性, 离心去上清, 分别加 100 μ L I 抗 (*c-myc* 单克隆抗体), I、II 组均另设 1 组以 100 μ L PBS 代替 I 抗作为上机时的空白对照组, 室温放置 30 min 后, 冷 PBS 洗 2 遍, 加 FITC 标记的 II 抗 100 μ L, 避光放

置 30 min 后, 冷 PBS 洗 2 遍, 除去未结合的多余荧光抗体, 离心后加 500 mL PBS 上机检测, 每份样品采集细胞 2×10^5 个, 以平均荧光强度表示蛋白质含量。

2.6 形态学观察 ①光镜观察: 细胞爬片后, *c-myc* ASODN (终浓度为 10.0 μ mol/L) 培养 48 h, 另设 1 对照组, 以无血清无抗生素的 MEM 培养液代替 *c-myc* ASODN, 取出盖玻片, 固定晾干, 常规 HE 染色, 显微镜下观察。②透射电镜观察: 分组及细胞处理同 2.4, 收集冲洗细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 沿管壁缓慢加入 2.5% 戊二醛固定, 四氧化锇固定, 常规电镜脱水、包埋、超薄切片、染色, 电镜观察。

3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 9.0 统计软件组间行 *t* 检验。

结 果

1 MTT 法测定不同浓度的 *c-myc* ASODN 对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的抑制作用

不同浓度的 *c-myc* ASODN 对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖有抑制作用: 这种抑制作用有浓度相关性 ($P < 0.05$), 从 2.5 - 10.0 μ mol/L 随浓度增加而增加, 超过 10.0 μ mol/L 后稍降低, 10.0 μ mol/L 为抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的最佳浓度 ($P < 0.01$), 抑制率达到 32.77% (表 1)。

表 1 不同浓度 *c-myc* ASODN 对 MG-63 细胞增殖的影响
Tab 1 Effects of *c-myc* ASODN of different concentration on MG-63 proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Group	A_{570}	Inhibitionrate (%)
Control	0.774 \pm 0.015	
<i>c-myc</i> ASODN group		
2.5 μ mol/L	0.674 \pm 0.071 *	12.948
5.0 μ mol/L	0.640 \pm 0.086 *	17.243
10.0 μ mol/L	0.520 \pm 0.118 **	32.774
15.0 μ mol/L	0.613 \pm 0.090 *	20.794
20.0 μ mol/L	0.614 \pm 0.057 **	20.697

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2 MTT 法测定不同作用时间 *c-myc* ASODN 对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的抑制作用

c-myc ASODN 作用时间小于 48 h 时, 随作用时间增长, 抑制率渐增, 在 48h 时抑制作用达到高峰, 抑制率达 32.55%, 而后随时间延长抑制率趋减。

3 流式细胞仪测定 *c-myc* ASODN 对人骨肉瘤 MG-63 凋亡的影响

实验组出现明显的凋亡峰 (图 1), 凋亡率达 (37.917 \pm 2.562)%, 明显高于对照组的 (2.680 \pm 0.836)%, $P < 0.01$ 。

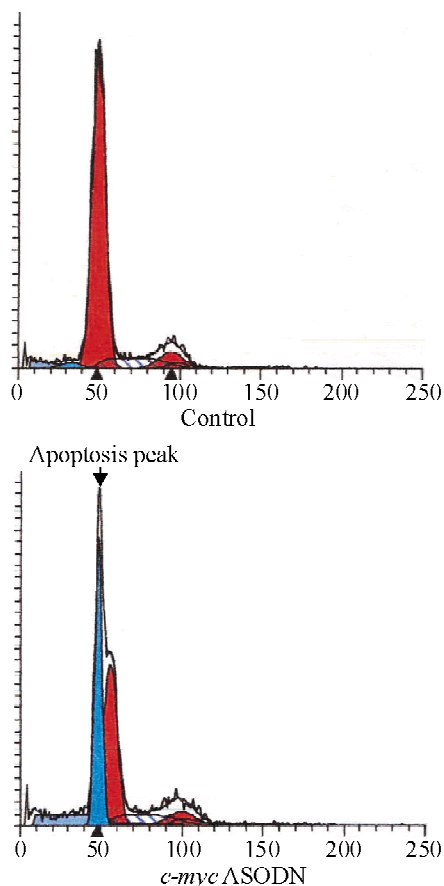


Fig 1 *c-myc* ASODN induce apoptosis of MG-63 cells.

图1 *c-myc* ASODN 诱导 MG-63 细胞的凋亡

4 流式细胞仪测定 *c-myc* ASODN 对人骨肉瘤 MG-63 细胞中 *c-myc* 基因蛋白表达的影响

以平均荧光强度表示蛋白质含量,结果显示实验组平均荧光强度(6.358 ± 0.361)明显低于对照组(8.253 ± 0.474) ($P < 0.01$)。

5 形态学观察结果

光镜下对照组见肿瘤细胞,呈梭形或多角形,有较多的细胞突起,细胞核圆形、卵圆形,有单核或多核的,染色质细、可见 1-2 个核仁(图 2A);实验组观察到典型的凋亡细胞(图 2B):凋亡的细胞变圆、体积变小,细胞突起减少,细胞核固缩浓染,呈深蓝色或蓝黑色,细胞质呈强嗜酸性;电镜下亦观察到细胞凋亡特征性变化(图 3B):细胞核固缩,或崩解为数块而弥散在细胞质内,染色质浓缩并边缘化,细胞质明显空泡化;而对照组透射电镜下显示瘤细胞细胞膜结构完整,细胞核较大,位于细胞中央,细胞器丰富(图 3A)。

讨 论

c-myc 基因能诱导或抑制相关靶基因的转录表达,进而促进细胞增殖、去分化、转化或诱导凋亡。在骨肉瘤的研究中,*c-myc* 基因高表达的小鼠模型诱导产生了骨肉瘤,随后降低*c-myc* 基因的表达,

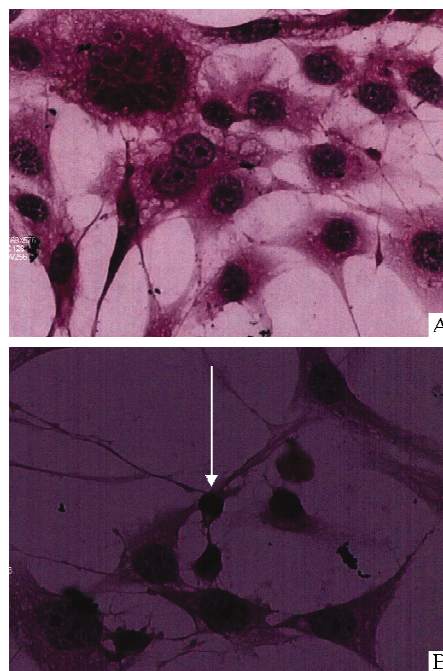


Fig 2 Morphology of human osteosarcoma MG-63 cells (HE staining, $\times 400$).

图2 人骨肉瘤 MG-63 细胞形态

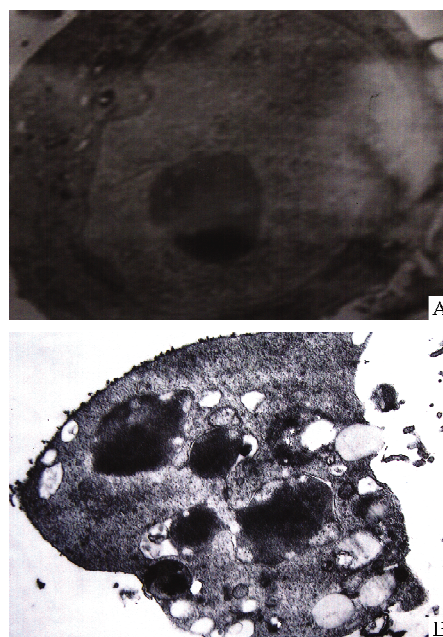


Fig 3 Morphology of human osteosarcoma MG-63 cells were shown by electron microscope. A: control group ($\times 10\ 000$); B: *c-myc* ASODN group ($\times 7\ 000$).

图3 透射电镜下人骨肉瘤 MG-63 细胞形态

可明显引起骨肉瘤细胞的凋亡,诱导骨肉瘤细胞向成熟骨细胞的分化,并且明显抑制了肿瘤的生长^[2]。由此可见,以 *c-myc* 基因作为骨肉瘤的治疗靶点具有重要意义。

反义基因用于治疗恶性肿瘤是近 10 年来基因治疗的研究热点。许多研究者用不同的途径(基因质粒途径、反义寡核苷酸途径、重组腺病毒途径)证

实了反义 *c-myc* 对人肝癌细胞系、白血病细胞系及胃癌细胞系等各种恶性肿瘤细胞的增殖都有较为明显的抑制作用^[3-5]。但将反义 *c-myc* 应用于骨肉瘤的研究报道极少,解先宽等^[6]以重组腺病毒的途径将反义 *c-myc* 转染入人骨肉瘤 MG-63、U2OS 细胞系,初步观察到其对瘤细胞的增殖有较为明显的抑制作用。

刘颖格等^[7]在荧光显微镜下观察到 15 个碱基的反义 *c-myc* 寡核苷酸片段能够进入细胞内与特定基因杂交,在基因水平干扰致病蛋白的生产。本实验根据 *c-myc* 基因第 2 外显子翻译起始区序列设计了同为 15 个碱基的 *c-myc* 反义寡核苷酸(*c-myc* ASODN)片段,在体外转染入人骨肉瘤 MG-63 细胞,同样观察和检测到典型的瘤细胞凋亡的现象,间接证实了足够小的反义 *c-myc* 寡核苷酸片段能够进入细胞内诱导肿瘤细胞凋亡。本实验观察到应用 *c-myc* ASODN 后人骨肉瘤 MG-63 凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$)。此种凋亡反应也表现在形态学上,本实验用 HE 染色方法光镜下观察到凋亡的细胞胞突明显减少,细胞核固缩浓染,细胞质呈强嗜酸性,透射电镜下观察到细胞核固缩,或崩解为数块而弥散在细胞质内,细胞质明显空泡化;从分子机制上讲,Cain 等^[8]提出 *c-myc* ASODN 明显抑制 *c-myc* 基因蛋白表达而引发一系列与线粒体依赖的细胞凋亡途径密切相关的基因信号反应而诱发肿瘤细胞凋亡。本实验通过流式细胞仪检测到实验组 *c-myc* 基因蛋白表达的平均荧光强度明显低于对照组($P < 0.05$),表明应用 *c-myc* ASODN 后 *c-myc* 基因

蛋白的表达明显降低,得到了与 Cain 等^[8]相同的结论。

[参 考 文 献]

- [1] Xu LL, Chen JB, Zeng SQ. Observation on distribution and stability of *c-myc* antisense oligonucleotides mediated by liposome on retinal pigment epithelium cell [J]. *China Ophthal Res*, 2002, 20(1): 46-48.
- [2] Jain M, Arvanitis C, Chu K, et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC [J]. *Science*, 2002, 297(5578): 102-104.
- [3] 张海增, 林 晨, 邵永孚, 等. 反义 *c-myc* 重组腺病毒对人肝癌细胞的实验性治疗 [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(11): 673-676.
- [4] 赵新永, 殷莲华, 孔宪寿, 等. 逆转录病毒载体介导的反义 *c-myc* 抗白血病作用的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(11): 1043-1047.
- [5] 陈洁平, 林 晨, 徐采朴, 等. 腺病毒介导反义 *c-myc* RNA 对人胃癌细胞系作用的分子机制研究 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(1): 46-47.
- [6] 解先宽, 杨迪生, 叶招明, 等. 反义 *c-myc* 重组腺病毒的构建及其抗骨肉瘤细胞的作用 [J]. *癌症*, 2005, 24(3): 292-297.
- [7] 刘颖格, 戚好文, 李焕章, 等. 反义 *c-myc* 寡核苷酸抑制大鼠气道平滑肌细胞增殖 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(13): 1191-1194.
- [8] Cain K, Bratton SB, Langlais C, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700 kD and inactive ap2 proximately 114 MD apoptosome complexes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6067-6070.

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办,安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文,辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003、2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖,第 1、第 2 届国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖,第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖,第 1 届华东地区优秀期刊一等奖,第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项奖金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊;被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版,2004 版均选定为药理学类核心期刊;被国际核心期刊研究会确定为核心期刊;被国家科委科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《PJK》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international (CAB international, 英国)等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理,药师药研人员要更懂药理。中国药学报,医师药师都需要

本刊为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至我刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮资费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:0551-5161221、5161222,电子邮箱:cpb@ahmu.edu.cn