

the role of phenytoin sodium (PS) were studied. Wound M $\Phi$  were collected by polyvinyl alcohol sponges which were implanted in a rat dorsum incision. The expressions of platelet-derived growth factor-B(PDGF-B) mRNA and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) mRNA in wound M $\Phi$  was determined by in situ hybridization. It were found that the percentages of positive M $\Phi$  expressed PDGF-B mRNA and TGF- $\beta_1$  mRNA were decreased after 6 Gy systemic irradiation, not after 20 Gy local irradiation, PS significantly increased the percentages of positive M $\Phi$  expressed PDGF-B mRNA and TGF- $\beta_1$  mRNA in both radiated wound and non-radiated wound. It suggested that the decrease of expressions of growth factors in wound M $\Phi$  play an important role in the impairment of wound healing by systemic irradiation and PS enhanced the expressions of growth factors in wound M $\Phi$  and helped improve wound healing.

**Key words:** Irradiation    Macrophages    Growth factor    Gene expression    Phenyton sodium

## Bcl-2 反义硫代磷酸寡核苷酸对 HL60 细胞生长的影响

林艳娟 吕联煌

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

目前发现 Bcl-2 癌基因的高表达,能抑制细胞的凋亡(Apoptosis),而凋亡障碍是某些肿瘤发生发展的原因之一。反义技术是基因治疗方法之一,其策略是将癌基因互补的反义核苷酸导入肿瘤细胞,使之与肿瘤细胞内 DNA 或 RNA 结合,阻断相应基因转录和表达<sup>[1]</sup>。但天然的寡脱氧核苷酸(ODN),进入细胞困难,易被胞内核酸酶降解,若核苷之间的磷酸二酯键被硫代磷酸取代修饰后,则对核酸酶的敏感性远较原来为低<sup>[1]</sup>。本文选用 Bcl-2 癌基因的反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides, AS-PS-ODN, ASPO)作用于高表达 Bcl-2 癌基因的 HL60 细胞株,旨在了解作为药物的 ASPO 对 HL60 细胞生长的生物特性的影响。

### 材料和方法

#### 1. 细胞及培养体系

HL60 细胞是急性早幼粒白血病细胞株(由福建省医学科学研究所提供)。复苏后用含 10% 胎牛血清(Gibco-BRL)的 RPMI 1640 培养液。细胞初始浓度为

$1 \times 10^5$ /ml, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱(日本),2 天传代一次。实验用的细胞均保持在 0.1-0.5  $\times 10^6$ /ml 密度,处于对数生长期。

#### 2. PS-ODN 合成

反义 PS-ODN(ASPO)序列可读框:5'-CAGCGT-GCGCCATCCTTCCC-3' 为 Bcl-2 mRNA 可读框的头 13 个碱基及其前端的 7 个碱基,共 20nt<sup>[2]</sup>,并以 20nt 正义 PS-ODN(SPO)为反义序列特异性对照,序列为 5'-GGGAAGGATGGCGCAGCTG-3'。均由美国 ABI 公司 392 型 DNA/RNA 合成仪合成,用 OPC 柱纯化,紫外分光光度分析仪(DU640 型,BECKMAN)定量,分装冻干后保存于-40 $^{\circ}$ C。

#### 3. 细胞与 PS-ODN 共培养分组

PS-ODN 用不含血清的 1640 培养液溶解,HL60 细胞分为空白组(只含胎牛血清的 1640 培养基的细胞悬液),正义组、反义组。细胞终浓度为  $1 \times 10^5$ /ml,AS-PO 终浓度分别为 5 $\mu$ mol/L、10 $\mu$ mol/L、20 $\mu$ mol/L, SPO 终浓度为 20 $\mu$ mol/L,种于 96 孔板(Costar),每孔 200 $\mu$ l,每次均同时做 3 个平行孔。正义、反义药物作用培养过程中不换液。分别于培养的 24h、48h、72h、96h 倒置显微镜下活体观察,并取细胞悬液 6 $\mu$ l 用 2% 台盼蓝 6 $\mu$ l 染色 3 分钟,在血球计数板上冲池、静置 5-10 分钟待细胞完全下沉后计数 4 大格的拒染细胞总数(R),再换算为每毫升活细胞数(换算公式:活细胞数

$=R/4 \times 10 \times 2/ml$ ),同时观察 200 个细胞,依据台盼蓝着色与否计算出平均 100 个细胞中拒染细胞数,即为拒染率。根据活细胞数和拒染率可推算出死亡细胞数。取活细胞做 HL60 细胞集落(CFU-HL60)培养,部分标本做粒单细胞集落(CFU-GM)培养。

#### 4. 克隆培养

(1) CFU-HL60,培养体系含 10% 胎牛血清的 1640 培养液,细胞终浓度  $1 \times 10^3/ml$ ,加终浓度为 0.8% 的甲基纤维素。CFU-GM 培养体系:含 30% 新生小牛血清(华美)的 1640 培养液,细胞终浓度为  $1 \times 10^5/ml$ ,GM-CSF(KIRIN)终浓度为 5ng/ml,加终浓度 0.8% 的甲基纤维素。

(2) 上述两种克隆培养每组同时做 3 个平行孔,种于直径 35mm 平皿,置  $37^\circ C$ ,5%  $CO_2$ ,饱和湿度培养箱培养 7 天。计 CFU-HL60 细胞数大于 20 个为一个集落,CFU-GM 细胞数大于 40 个为一个集落。并取克隆细胞做涂片进行瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态。

5. 数据以均数形式表示,显著性检验用方差分析,q 检验。

## 结 果

### 1. 不同浓度 ASPO 对 HL60 细胞生长数的影响

(1) 培养的 24h 至 72h 各组活细胞数均随时间延长而逐渐增加,72h 以后空白组、SPO 20  $\mu mol/L$  组、ASPO 5  $\mu mol/L$  组均显著下降

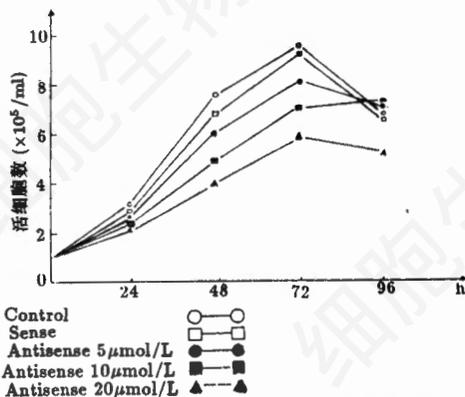


图 1A PS-ODN 作用后各组活细胞数变化

( $P < 0.01$ ),ASPO 5  $\mu mol/L$  组于 48h-72h 活细胞数低于空白组( $P < 0.05$ ),ASPO 10  $\mu mol/L$ ,20  $\mu mol/L$  组于 24h-72h 活细胞数均低于空白组( $P < 0.01$ ),且随浓度的增加更为明显,SPO 20  $\mu mol/L$  组各时间活细胞数与空白组无显著差别( $P > 0.05$ )(图 1A)。

(2) 若计算细胞增殖率= $[(\text{第二日细胞数} - \text{第一日细胞数}) / \text{第一日细胞数}] \times 100\%$ (图 1B),发现各组细胞增殖率均随时间推移而下降;在 24h 反义组显著低于空白组( $P < 0.01$ ),正义组与空白组无差别( $P > 0.01$ ),但到 48h 至 72h,反义组增殖率逐渐与空白组增殖率接近,至 72h 则无显著差异( $P > 0.05$ )。零时的增殖率以 HL60 细胞处于对数生长期时,细胞 24h 增加数,依上式计算而得)。

### 2. HL 60 细胞受不同浓度 PS-ODN 作用后台盼蓝拒染率的变化

(1) 随培养时间的延长,空白组和正义组台盼蓝拒染率无差别且渐降低,72h 均显著低于 24 至 48h。反义组于 24 至 72h 均显著低于空白组( $P < 0.01$ ),且随浓度增加而显著,但同一浓度反义组里,24h 与 48h 无显著差别( $P > 0.05$ ),72h 显著低于 24 至 48h( $P < 0.01$ )。72h 以后各组拒染率均急剧下降至 50%—60%,且各组间无显著差别( $P > 0.05$ ,见图 2A)。

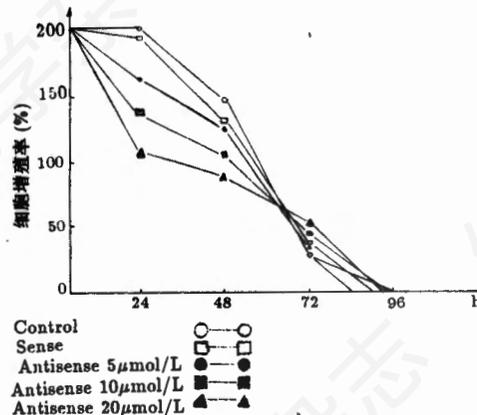


图 1B PS-ODN 作用后各组细胞增殖率的变化

(2) 若从细胞死亡绝对数看, 各组随培养时间的延长、死亡细胞渐增加, 此时发现各反义组虽然于培养 24h 的台盼蓝拒染率与培养 48h

无显著差别, 但 48h 的死亡细胞绝对值显著高于 24h ( $P < 0.01$ )。(见图 2B)

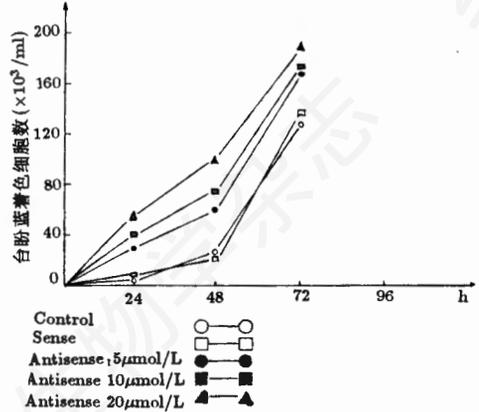
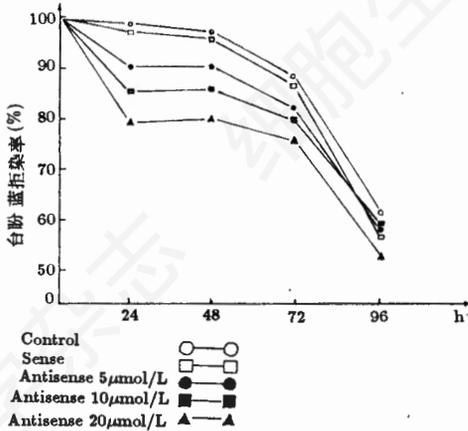


图 2A PS-ODN 作用后各组细胞台盼蓝拒染率变化

图 2B PS-ODN 作用后各组死亡细胞数变化

### 3. 反义 PS-ODN 作用后 HL60 细胞株生长的变化 (图 3)

(1) 随培养时间的延长, 空白组和正义组 CFU-HL60 形成率渐下降且无显著差别, 反义各浓度组均显著低于空白组 ( $P < 0.01$ ), 以 20 μmol/L 组最为显著, 且于共培养 24h 后即显著降低。48h 反义 5 μmol/L 至 20 μmol/L 组的 CFU-HL60 形成率较 24h 稍有回升, 但无显著差别 ( $P > 0.01$ ), 72h 反义 10 μmol/L, 20 μmol/L 组显著低于空白组 ( $P < 0.01$ , 见图 3)。

(2) 与空白组比较倒置显微镜下发现正义组、空白组细胞生长呈细胞团致密生长 (图 4A), ASPO 组细胞生长分散、平铺 (见图 4B)。

(3) 于培养 24h 后各组分别做 CFU-GM 培养, 结果均无 CFU-GM 生长。

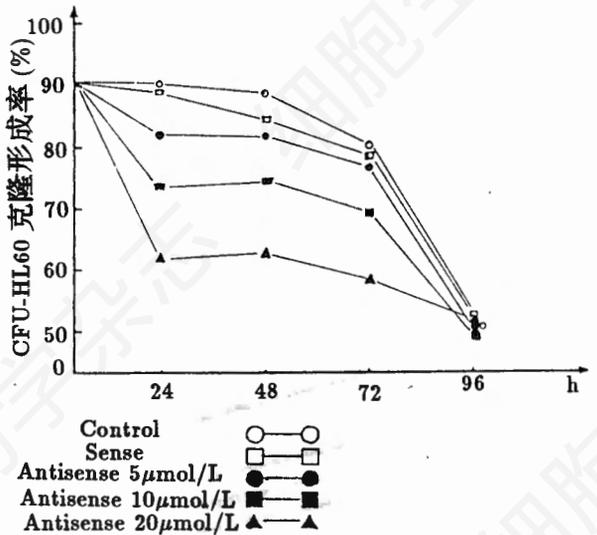


图 3 PS-ODN 作用后各组 CFU-HL60 克隆形成率的变化

究结果提示:

1. Bc1-2 反义 PS-ODN 在 24h 即表现出对 HL60 细胞的生长有抑制作用

Iversen 用同位素  $^{35}\text{S}$  标记研究培养细胞摄入 PS-ODN 速度表明在 37°C, 1 小时, 细胞内反义 PS-ODN 浓度即达到饱和<sup>[5]</sup>。为我们观察

## 讨 论

ODN 以其高度特异性、低毒性, 生产快捷, 作用机制明确不需要载体等优点, 近 10 年来而被广为研究应用<sup>[3,4]</sup>。关于 ASPO 对细胞生长特性影响方面的详细研究报告为数不多, 对是否抑制细胞生长作用尚有争议。本文研

到的反义 PS-ODN 在短时期内起作用提供了药物动力学上的证据。正义组同空白组比较结果无差别反映了 Bcl-2 反义 PS-ODN 作用的特异性。

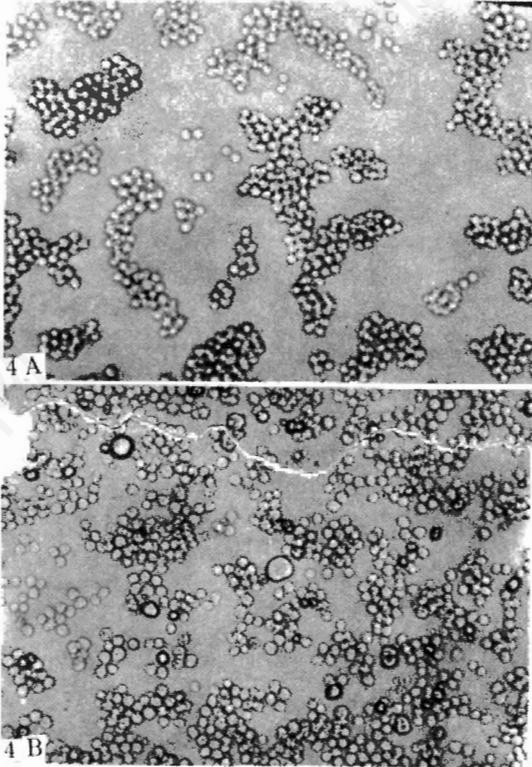


图 4A 倒置显微镜下:HL60 细胞

4B 倒置显微镜下:Aspo 作用后 HL60 细胞

2. 在培养 72h、反义组细胞增殖率与对照组无差别,台盼兰拒染率和 CFU-HL60 的形成率于培养 48h 时出现稍有回升现象

其可能原因:(1) Stein 提出 PS-ODN 的反义抑制作用是序列专一性抑制和非序列专一性抑制的共同作用结果。且在低浓度下表现出序列专一性抑制,在较高浓度下表现出非序列专一性<sup>[6]</sup>。推测 ASPO 初始作用可能是以非序列专一性为主,即抑制细胞增殖;后期则是序列专一性作用为主。48h 的变化可能处于前者作用减弱,后者尚未起明显效果。(2) Iversen 研究表明,在一个非同步化培养中,各细胞摄入 PS-ODN 的量是不均衡的<sup>[5]</sup>。这就有可能存在

部分 HL60 细胞尚未受 ASPO 的作用而继续生长。

3. 在培养 72h 以后即(96h),各组细胞数迅速减少,呈负增殖状态

拒染率,CFU-HL60 形成率进一步下降,空白对照和正义组也显著下降,但 72h 时仍显著高于同期的反义 10 $\mu$ mol/L 组和 20 $\mu$ mol/L 组,说明此期反义组细胞生长的抑制不仅因 Bcl-2 蛋白含量的减少(另文报告),还由于培养持续 4 天未换液,生长因子耗尽的结果。

因此我们认为 Bcl-2 反义 PS-ODN 具有抑制 HL60 细胞生长,且在培养的第 1 天即可出现,并呈浓度依赖性(以 10 $\mu$ mol/L 浓度以上作用为显著);对细胞生长的抑制可能是反义序列专一性和反义非序列专一性共同作用的结果。Bcl-2 癌基因 ASPO 的最佳有效剂量和最小毒性剂量尚待进一步探讨。

## 摘 要

应用 Bcl-2 反义硫代磷酸寡核苷酸(ASPO)与 HL60 细胞共培养,旨在观察不同浓度 ASPO 对 HL60 细胞生长和克隆形成的影响。结果发现,与 Bcl-2 正义寡核苷酸(SPO)及空白组比较,不同浓度的 ASPO(A5 $\mu$ mol/L,A10 $\mu$ mol/L,A20 $\mu$ mol/L)培养 24 小时即可降低 HL60 细胞生长数和 CFU-HL60 克隆形成率。并随浓度的增大而显著( $P < 0.01$ )。72 小时以后,ASPO 组则与 SPO 组和空白组无显著差别( $P > 0.05$ )。因此认为 Bcl-2 的 ASPO 具有抑制 HL60 细胞生长,并呈浓度依赖性和序列特异性。

关键词:反义寡核苷酸 Bcl-2 癌基因  
HL60 细胞系

## 参 考 文 献

- [1] 彭朝晖等主编,1994,基因治疗——基础与临床,P143-159.
- [2] Keith, FJ. et al., 1995, *Leukemia*, 9:131-138.

- [3] Stein, CA. et al., 1993, *Science*, **261**:1004-1012.  
[4] Milligar, JF. et al., 1993, *J. Med. Chem.*, **36**:1923-1937.

- [5] Iversen, PL. et al., 1992, *Antisense Res. Devel.*, **2**:211-222.  
[6] Stein, CA., 1996, *Trends in Biotechnology*, **14**:147-149.

## GROWTH OF HL-60 CELLS AFFECTED BY THE BCL-2 ANTISENSE PHOSPHOROTHIOATE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

LIN Yan Juan LU Lian Huang

(Fujian Institute of Hematology, Union Hospital Affiliated Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

### ABSTRACT

To observe the effect of the BCL-2 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ASPO) inhibition on HL60 cells growing, we investigated the cell viability determined by trypan blue exclusion and the colony forming activity (CFU-HL60) after incubation of HL60 cells with ASPO at different concentration (5 $\mu$ mol/L, 10 $\mu$ mol/L, 20 $\mu$ mol/L) or with sense-PO(SPO) at 20 $\mu$ mol/L or with none of them. The result demonstrated that in the presence of ASPO, the inhibition of HL60 cells viability could occur in 24 hours and became more prominent as the concentration increasing ( $P < 0.01$ ). That was not found in the presence of SPO. There was no significant differences among ASPO, SPO and the control after 72 hours. These findings indicated that BCL-2 ASPO could inhibit the HL60 cells proliferation and this effect was sequences-specific and concentration-dependent.

**Key words:** Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides BCL-2 oncogene HL60 cell line

## 细胞外基质对培养咽癌细胞增殖及 p53、PCNA 基因表达的影响

张桂茹 \* 王小明 郭晓峰

(白求恩医科大学第一临床学院耳鼻喉科 \* 预防医学院毒理教研室 长春 130021)

随着近年来细胞生物学研究工作的进步,人们对细胞外基质(extracellular matrix ECM)的功能有了新的认识。ECM 作为细胞的自然环境物质,在细胞的分化、增殖、发育、基因的表达、癌细胞的浸润、转移等多方面起着重要的调节作用<sup>[1-3]</sup>。

I 型胶原蛋白(type I collagen)是 ECM 的主要成分,并且在体外能够重新聚合形成三维立体结构的 ECM 构造,将细胞在这种物质上进行体外培养,可使细胞处于近似于体内环境生长,能真实地反映细胞在体内具有的功能状态。

我们将两种咽癌细胞在 I 型胶原胶表面

进行培养,对细胞的增殖及 p53、PCNA 蛋白表达情况运用免疫荧光染色,激光扫描共焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope LSCM 410)以及 Western 印迹杂交定量方法进行了研究。

### 材料和方法

#### 1. 细胞系

FaDu 下咽癌细胞系,是 S. R. S. Rangan 于 1968 年建立的,取自于人下咽鳞癌活检组织。购自美国。

Detroit 562 鼻咽癌细胞系。是由 W. D. Peterson 等于 1971 年建立的,取自成人鼻咽鳞癌胸腔转移