DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.008
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
1812 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)20-1812-03

反义 *c-myc* 寡核苷酸对半乳糖诱导的晶体上皮细胞生长的抑制作用

范 芳[1],葛正龙[1],李长福[1],李海祥[2],曾小平[2] (遵义医学院:[1]生物化学教研室,[2]附属医院眼科,遵义 563003)

提 要:目的 探讨反义 *c-myc* 寡核苷酸(ASODN)对半乳糖诱导的兔晶体上皮细胞(LEC)生长的影响。方法 人工合成与 *c-myc* 基因第二外显子翻译起始区序列互补的寡核苷酸,用半乳糖和反义寡核苷酸处理培养的晶体上皮细胞,应用细胞计数法和MTT法观察反义 *c-myc* 寡核苷酸对半乳糖诱导的晶体上皮细胞增殖的影响。结果 2.5~10.0 μmol/L反义 *c-myc* 寡核苷酸能抑制半乳糖诱导的晶体上皮细胞的增殖,10.0 μmol/L时作用较显著。结论 反义 *c-myc* 寡核苷酸对半乳糖诱导的白内障晶体上皮细胞的生长增殖有抑制作用。

关键词:反义 *c-myc* 寡核苷酸;半乳糖;晶体上皮细胞
中图法分类号:Q524; R322.91; R329.24 文献标识码:A

Inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotide *c-myc* on the growth of lens epithelial cells induced by galactose

FAN Fang[1], GE Zheng-long[1], LI Chang-fu[1], LI Hai-xiang[2], ZENG Xiao-ping[2]([1]Department of Biochemistry, [2]Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of antisense oligodeoxynucleotide *c-myc* (*c-myc* ASODN) on the growth of rabbit lens epithelial cells (LECs) induced by galactose. Methods Based on the translation initiation region of the second extron of *c-myc* gene, oligonucleotides were synthesized and modified with phosphorothioate. Lens epithelial cells were treated with galactose and *c-myc* ASODN. The effects of *c-myc* ASODN on the growth of LECs, cultured in high concentration of galactose, were observed by cytometry and MTT. Results The results demonstrated that *c-myc* ASODN at the doses of 2.5—10.0 μmol/L inhibited the growth of LECs induced by galactose in a dose-dependent manner. Conclusion These results indicate that *c-myc* ASODN can inhibit the growth of LEC induced by galactose.

Key words: *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide; galactose; lens epithelial cell

近年的研究表明,一些癌基因的异常表达与晶体上皮细胞(lens epithelial cells, LEC)的增殖和分化密切相关[1],*c-myc* 基因是一种与细胞增殖、分化和凋亡密切相关的原癌基因,已表明在半乳糖诱导大鼠半乳糖性白内障形成过程中有 *c-myc* 基因的高表达[2]。为了探讨反义 *c-myc* 寡核苷酸片段对半乳糖性白内障治疗的可行性,我们通过导入 *c-myc* ASODN,观察其对半乳糖诱导的晶体上皮细胞增殖的影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 反义寡核苷酸的制备

根据 *c-myc* 基因第二外显子翻译起始区序列设计 ASODN,碱基序列如下[3]:5′-AACGTTGAGGGGCAT-3′(由上海 Sangong 公司合成,两端各硫代修饰3个碱基)。使用前加消毒双蒸水溶解,配成浓度为71.2 μmol/L的原液,于95 ℃水浴变性5 min,冰上骤冷备用。临用前用 DMEM 培养液稀释成相应浓度使用。

1.2 细胞培养

采用植块贴壁法进行晶体上皮细胞培养:取新鲜兔眼,剪去眼球周围组织及结膜,75%乙醇浸泡两次,各10 min。于超净台中沿角膜缘剪开,取出晶状体,撕下前囊,剪碎后均匀分种于25 ml培养瓶中,将培养瓶底朝上,在瓶内加入2~3 ml DMEM培养液(pH 7.2~7.4,含20%FCS),置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中,静置4 h待植块贴壁后,翻转培养瓶使贴壁的组织块浸于

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39460077);贵州省科委基金资助项目[(2000)3041]
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39460077) and the Sci &Tech Research Project Foundation of Scientific Committee of Guizhou Province [(2000)3041]
作者简介:范 芳(1970—),女,贵州省毕节市人,硕士,讲师,主要从事癌基因与生长因子方面的研究。电话:(0852)8204473,E-mail:fanf1970@hotmail.com
通信作者:葛正龙,电话:(0852)8204473;E-mail:zlongge@hotmail.com
收稿日期:2004-02-29;修回日期:2004-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

培养基中继续培养。1 周后根据细胞生长情况更换培养液, 每 3 d 换液 1 次。

1.3　细胞计数法

取对数生长期细胞, 计数后以 1×10^5 个/ml 细胞密度接种于 24 孔培养板(1 ml/孔), 放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱。细胞分为正常对照组(不作特殊处理)、半乳糖组(加入含 30 mmol/L 半乳糖的 DMEM 培养基)、ASODN 组(在半乳糖组基础上分别加入 2.5、5.0、10.0 μmol/L 的 *c-myc* ASODN), 每组 6 例。作用 24 h 后取出, 胰酶消化, 制成细胞悬液, 细胞计数板上计数, 计算各孔的细胞数, 各组取平均值。

1.4　MTT 法

细胞培养及分组及例数同上, 培养 72 h 后取出培养板, 弃上清, 加入 20 μl MTT 和 100 μl 无血清培养基, 放入培养箱再培养 4 h, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每孔加 200 μl 二甲亚砜, 室温下振荡 5 min, 用酶标仪进行比色, 波长 570 nm, 测定各组光密度值(*A* 值), 并计算增殖抑制率(%): 用(1－实验组 *A*/正常对照组 *A*)×100% 表示。

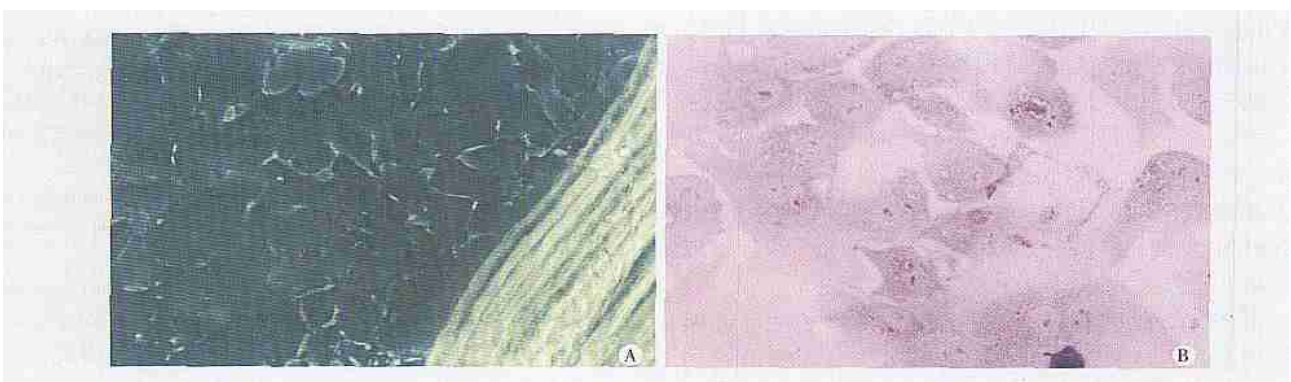
1.5　统计方法

实验结果以($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验、方差分析, 相关分析。

2　结果

2.1　细胞培养及鉴定

原代培养接种 72 h 即可见植块边缘爬出细胞, 在植块周围形成贴壁生长的单层细胞, 随时间延长逐渐生长为六边形、大小均匀的细胞, 胞质透明, 胞膜清晰, 并连片形成"拉网现象", 同时呈铺砌型向外生长。原代细胞在接种 3 周左右基本铺满瓶底, 可进行传代培养。晶体上皮细胞经胰酶消化后收缩成圆形, 传代 6~8 h 后细胞基本贴壁, 24 h 时后呈多种形态生长, 1 周左右基本融合(图 1A)。晶体上皮细胞爬片经 Gimsa 染色后, 在倒置显微镜下观察, 可见晶体上皮细胞呈上皮样外观, 不规则, 胞体边界清楚, 胞浆呈均匀粉红色, 内有粉红色"晶状体小体", 有紫红色的单核或双核, "晶状体小体"的形成可作为确定晶体上皮细胞株的一项特征性依据[4](图 1B)。



A: Cultured for 7 d　(×200); B: Gimsa staining　(×400)

图 1　原代培养的晶体上皮细胞

Fig 1　Primary cultured LECs

2.2　细胞计数法

半乳糖组与对照组比较细胞数明显增加($P<0.01$), 加入不同浓度 *c-myc* AS ODN 后细胞增殖有所下降, 随浓度增加抑制作用增强, 尤其在 10.0 μmol/L 时, 细胞数已接近正常水平, 抑制作用显著, 抑制率达到 30.98%(表 1)。二者有剂量依赖性($r=-0.975$, $P<0.05$)。

2.3　MTT 法

c-myc ASODN 对半乳糖诱导的晶体上皮细胞增殖的作用见表 2。MTT 法显色深浅随板孔中细胞数增加而加深, 其吸光度值(*A*)也随之升高。半乳糖组与对照组比较 *A* 值明显增加, 是对照组的 1.35 倍($P<0.01$), 表明半乳糖对 LEC 有诱导增殖的作用。加入不同浓度 *c-myc* AS ODN 后 *A* 值有所下降, 随浓度增加增殖抑制率增大, 浓度在 10.0 μmol/L 时 *c-myc* ASODN 的抑制率为 32.81%, 与半乳糖组相比均有显著差异($P<0.01$)(表 2), 二者有剂量依赖性($r=-0.976$, $P<0.05$)。

表 1　*c-myc* AS ODN 对晶体上皮细胞增殖的抑制作用
($\times 10^5$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Inhibitory effect of *c-myc* AS ODN on LEC proliferation
($\times 10^5$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Cell count	Inhibition rate(%)
Control	1.263±0.056	
Galactose group	1.982±0.041△△	
c-myc AS ODN group		
2.5 μmol/L	1.750±0.079 *	11.71
5.0 μmol/L	1.559±0.082 *	21.34
10.0 μmol/L	1.368±0.079 **	30.98

$F=6.386$　$P=0.030$;　△△: $P<0.01$, *vs* control;　*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* galactose group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 *c-myc* AS ODN对晶体上皮细胞增殖的影响（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of *c-myc* AS ODN on LEC proliferation ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	D_{570}	Inhibition rate(%)
Control	0.187±0.006	
Galactose group	0.253±0.006△△	
c-myc AS ODN group		
2.5 μmol/L	0.220±0.017 *	13.04
5.0 μmol/L	0.197±0.015 *	22.13
10.0 μmol/L	0.170±0.010 **	32.81

$F=3.967$, $P=0.048$; △△: $P<0.01$, *vs* control; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* galactose group

3 讨论

白内障是由于晶体透明度发生局限性或弥漫性浑浊而引起视力障碍的一种疾病，白内障形成时晶体所表现的病理变化主要是退行性变和晶体上皮细胞的增殖，细胞数目异常增多，晶体发生局限性或弥漫性浑浊，引起透明度改变而导致白内障。随着细胞生物学、分子生物学的蓬勃发展，对白内障发病机制的研究已深入到分子水平。

作为一种新的可能的治疗手段，基因治疗日益受到关注。反义寡核苷酸（ASODN）是能与特异的mRNA或DNA互补结合并抑制其转录和翻译的一段寡核苷酸链，具有封闭（抑制）特定基因表达的作用，ASODN治疗已成为近年发展起来的基因治疗的一项重要技术。

本研究合成了与*c-myc*基因第二外显子翻译起始区序列互补的反义寡核苷酸，观察其对半乳糖诱导的晶体上皮细胞增殖的影响。细胞计数及MTT实验结果显示，在培养基中加入30 mmol/L半乳糖后，细胞增殖明显，提示半乳糖可作为有丝分裂原诱导LEC增殖，这可能与高糖能促进晶体上皮细胞DNA和RNA的合成有关[5]。而不同浓度*c-myc* ASODN（2.5～10.0 μmol/L）对半乳糖诱导的LEC的增殖均有抑制作用，二者有剂量依赖性，尤其在10.0 μmol/L时抑制作用较显著，抑制率分别为30.98%和32.81%，细胞数及*A*值已接近或达到正常水平。其作用机制有可能是通过封闭*c-myc*基因，阻断高糖诱导的LEC内的异常信号传递，使LEC进入正常分化轨道。这对阻断半乳糖性白内障的发生发展及逆转白内障具有重要意义。

参考文献：

[1] Lau L F, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or *c-myc*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(5): 1182－1186.

[2] 马卫列，葛正龙，欧钢卫，等. *c-myc*原癌基因在半乳糖性白内障晶状体中的表达[J]. 中华眼科杂志，2003，39(5)：308－309.

[3] 徐莉莉，陈建斌，曾水清. 脂质体介导的*c-myc*反义寡核苷酸在视网膜色素上皮细胞中分布和稳定性的观察[J]. 眼科研究，2002，20(1)：46－48.

[4] Olivero D K, Furcht L T. Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells *in vitro*[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(10): 2825－2834.

[5] 朱 茜，祝寿荣，康凤英. 高浓度葡萄糖对晶状体上皮细胞形态及细胞周期的影响[J]. 同济大学学报（医学版），2003，24(1)：14－17.

（编辑 薛国文）

欢迎订阅《西南国防医药》杂志

《西南国防医药》杂志是面向国内外公开发行的综合性医学学术和技术刊物，双月刊，刊号：CN 51－1361/R，ISSN 1004－0188。本刊为中国科技论文统计源期刊，被中国学术期刊群综合评价数据库 中国“万方数据－数字化期刊群”、中文科技期刊数据库中国科学论文引文数据库、生物医学文献光盘数据库、中文生物医学期刊文献数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库等9种数据库收录，在2004年全军第四次医学期刊质量评比中，又获优秀期刊奖。本刊以传递医学科技信息，加强学术交流，促进医学科学技术发展为宗旨；以各类医务人员为主要读者对象。辟有专家论坛、论著、临床研究、高原医学、中医·中西医结合、护理园地、医院管理、卫勤研究、基层卫生、综述·讲座等栏目。欢迎广大作者与读者踊跃投稿积极征订。每册定价10.00元，全年60.00元，款项邮汇或信汇均可。

地 址：成都市天仙桥北路12号《西南国防医药》编辑部 邮 编：510021

电 话：(028)86679082, 88089196 军 线：(0821)598515, 598525

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net