DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.018
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1553-04

论著

重组反义 *c-myc* 腺病毒诱导 HL-60 细胞分化的作用

陈 龙[1],陈洁平[1],林 晨[2] ([1]第三军医大学西南医院血液科,重庆 400038;[2]中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室,北京 100021)

提 要:目的 研究重组反义 *c-myc* 腺病毒(Ad-AS-c-myc)对人急性早幼粒 HL-60 细胞系的诱导分化作用及分子机制,探讨 Ad-AS-c-myc 用于急性早幼粒白血病基因治疗的可能性。方法 采用重组腺病毒 Lac-Z(Ad-LacZ)及 Ad-AS-c-myc 联合多聚阳离子转染 HL-60 细胞,X-gal 染色判断转染效率。采用形态学、MTT 试验、RT-PCR、流式细胞仪及免疫细胞化学等方法进行研究。结果 多聚阳离子可提高腺病毒对 HL-60 细胞的转染,Ad-LacZ+protamine sulfate 转染率达 79.8%。Ad-AS-c-myc 能抑制 HL-60 细胞 *c-myc* 基因在转录及蛋白水平的表达。Ad-AS-c-myc 抑制 HL-60 细胞生长及活力(抑制率 51%),降低其核浆比例,增加其过氧化酶活性,引起其 G_0/G_1 阻滞及分化相关基因 *c-fos* 基因表达增强。结论 Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞具有抑制生长及诱导分化作用。其生物学作用与 HL-60 细胞过氧化酶活性及 *c-fos* 的表达有关。Ad-AS-c-myc 在急性早幼粒白血病基因治疗中具有潜在的临床价值。

关键词:Ad-AS-c-myc;Ad-LacZ;*c-myc* 基因;分化;HL-60 细胞
中图法分类号:R373.1;R394-33;R73-354 文献标识码:A

Effects of recombinant antisense *c-myc* adenovirus in induction of differentiation of HL-60 cells

CHEN Long[1], CHEN Jie-ping[1], LIN Chen[2] ([1]Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Cell Biology, Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Objectives To evaluate the potential of antisense *c-myc* gene therapy for acute promyelocytic leukemia by investigating the biological effects and molecular mechanisms in induction of differentiation of HL-60 cell line using recombinant antisense *c-myc* adenovirus (Ad-AS-c-myc). Methods Cultured HL-60 cells treated with Ad-AS-c-myc or Ad-LacZ with polybrene and protamine sulfate were analyzed by X-gal staining, morphology, MTT, flow cytometric analysis, RT-PCR, and immunocytochemical techniques *in vitro*. Results HL-60 cells could be transfected effectively by Ad-LacZ+protamine sulfate (79.8%). The level of *c-myc* transcription and the version could be strongly inhibited by Ad-AS-c-myc in the transfected HL-60 cells. Ad-AS-c-myc could strongly inhibit the cell growth in HL-60 cells (51%). Ad-AS-c-myc could reduce the ratio of nuclear/cytoplasm, and increase the activity of peroxidase in HL-60 cells. Ad-AS-c-myc could lead to the blocking of G_0/G_1 phase in HL-60 cells. Ad-AS-c-myc could also increase the expression of *c-fos* in HL-60 cells. Conclusion The expression of Ad-AS-c-myc can inhibit the growth and induce differentiation of HL-60 cells *in vitro*. The biological effects of Ad-AS-c-myc may be closely associated with the activity of peroxidase and *c-fos* gene in HL-60 cells. Ad-AS-c-myc is of clinical potential in gene thera-py for acute promyelocytic leukemia.

Key words: Ad-As-c-myc; Ad-LacZ, *c-myc* gene; differentiation; HL-60 cell

在人急性早幼粒白血病 HL-60 细胞中,*c-myc* 基因的高表达是肿瘤细胞维持生长的主要原因,与细胞增殖、分化关系密切[1]。反义核酸技术为抑制早幼粒白血病细胞 *c-myc* 的异常高表达提供了一个良好途径[2]。利用重组腺病毒载体具有宿主范围广、无致癌致畸等优点。本研究通过构建 Ad-AS-c-myc 作用于 HL-60 细胞,了解 Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞 *c-myc* 基因转录、翻译的影响,研究其诱导分化作用及分子机制。探讨反义 *c-myc* 腺病毒载体用于急性白血病基因治疗中的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞系

HEK293 细胞为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系,培养条件为高糖 DMEM 培养液,含 10%胎牛血清;HL-60 细胞为人

作者简介:陈 龙(1966-),男,四川省射洪县人,硕士研究生,主治医师,主要从事血液肿瘤的基因治疗方面的研究,发表论文5篇,现在兰州军区总医院肿瘤科。电话:(0931)8975260
通信作者:陈洁平,电话:(023)68754129
收稿日期:2004-04-28;修回日期:2004-06-11

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

髓系急性早幼粒白血病细胞系，培养条件为 RPMI1640 培养液，含 10%胎牛血清，37 ℃，5%CO_2 饱和湿度环境孵育。

1.2 重组腺病毒的制备、扩增、滴度测定及鉴定

反义重组 *c-myc* 腺病毒(Ad-AS-c-myc)及 Lac-Z 重组体腺病毒(Ad-LacZ)为 E1 和 E3 区缺失的复制缺陷型腺病毒载体，由中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室构建。在 293 细胞中进行扩增及滴度测定。酚-氯仿法提取病毒 DNA，用反义 *c-myc* 基因引物及腺病毒基因 E2b 区引物进行 PCR 鉴定。

1.3 病毒转染及效率的测定

按感染复数(multiplicity of infection，MOI)100，50 μl 无血清培养液中加入病毒液及鱼精蛋白硫酸盐(protamine sulfate) 300 mg·L^{-1} 混合，室温下放置 15 min 后，加入 HL-60 细胞中，37 ℃，5%CO_2 培养 1 h，加入含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液继续培养。转染效率检测采用重组腺病毒 Ad-LacZ(含报告基因 LacZ)按 MOI：100 感染细胞，转染方法同上。48 h 后用 1%多聚甲醛固定转染细胞。加入 X-gal 染液置于 37 ℃孵箱 2～4 h，弃去上清，用 PBS 洗 2 次，显微镜下随机选 6 个高倍视野，每视野计数细胞，蓝染的细胞即 LacZ 基因阳性细胞。分别计算蓝染细胞的百分率。

1.4 细胞形态学观察

按 MOI：100 Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 分别转染 HL-60 细胞，Ad-LacZ 组为对照组。72 h 后将细胞离心，PBS 清洗 2 遍，涂片，Wright's 染色，光学显微镜下观察形态变化。

1.5 细胞生长曲线(MTT 法)

采用圆底 96 孔板，每孔接种细胞 5 000 个，Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 按 MOI：100 混合 protamine sulfate 300 mg·L^{-1} 转染细胞。于不同时间点每孔加入噻唑蓝(MTT)溶液，4 h 后离心弃之，另加入二甲基亚砜(DMSO)振荡数分钟后酶标仪检测波长 540 nm 每孔光密度值(D_{540})。根据时间及 D_{540} 值绘制生长曲线。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

碘化丙啶(PI)染色法：Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 分别转染细胞，分别取转染后 2、4、6 d 细胞，PBS 清洗，70%乙醇固定，离心弃乙醇后 PBS 清洗，加入 RNA 酶 37 ℃作用 2 h，加入 PI(100 mg·L^{-1})100 μl 混匀置冰上 30 min 后流式细胞仪检测。

1.7 NBT 还原实验

Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 转染细胞 72 h 后，经 NBT 液孵育后制备涂片，Wright's 染色，细胞内有蓝紫色沉淀为阳性细胞，光镜下取多视野计数细胞，求阳性率。

1.8 逆转录 PCR(RT-PCR)分析

取 Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 转染后 1、3、5 d 的细胞，提取并纯化细胞的总 RNA，RNA 提取按 Tripure(罗氏公司)试剂说明。RT-PCR 按 Promega 公司 Access RT-PCR M-MLV 逆转录试剂盒说明。RT-PCR 条件：48 ℃、45 min 一个循环；94 ℃、2 min 一个循环；94 ℃、30 s，56 ℃、1 min，68 ℃、2 min 40 个循环；68 ℃、7 min 一个循环。1.4%琼脂糖凝胶电泳。采用 α-tubulin 为内参照。

PCR 引物序列：

c-myc(250 bp)：上游：5′-CTCTCAACGACAGCAGCCCG-3′

下游：5′-CCAGTCTCAGACCTAGTGGA-3′

α-tubulin(410 bp)：上游：5′-CTCATCACAGGCAAGGAAGAT-3′

下游：5′- TTAAGGTAAGTGTAGGTTGGG-3′

1.9 *c-fos* 免疫细胞化学染色

Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 转染后 36 h 细胞涂片，用丙酮固定。*c-fos* 单抗的稀释度 1/100，一抗、二抗为北京中山公司产品，阳性判断采用常规标准。

1.10 统计学分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 8.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒滴度及鉴定

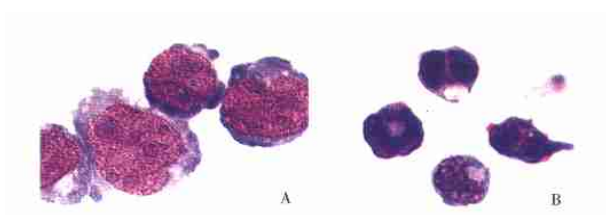
Ad-AS-c-myc、Ad-LacZ 重组腺病毒，经 293 细胞繁殖后制备成病毒储存液。倍比稀释后转染 293 细胞，取 293 细胞完全病变时稀释度代入公式，测定重组腺病毒滴度分别为 Ad-AS-c-myc：2.3×10^{12} pfu·L^{-1}、Ad-LacZ：1.3×10^{13} pfu·L^{-1}。提取各重组腺病毒 DNA，分别以腺病毒及反义 *c-myc* 引物进行 PCR 鉴定，Ad-AS-c-myc 可见腺病毒 800 bp 及反义 *c-myc* 608 bp 扩增条带，Ad-LacZ 可见腺病毒 800 bp 扩增条带。

2.2 重组腺病毒的转染效率

采用插入 LacZ 报告基因 Ad-LacZ 加入 protamine sulfate 辅助转染，以 Ad-LacZ MOI：100 分别转染 HL-60 细胞。48 h 后进行 X-gal 染色，分别取 6 个镜下视野计数阳性细胞率。单独使用 Ad-LacZ 转染效率为(35.9±3.3)%，Ad-LacZ＋protamine sulfate 在 MOI：100 时，重组体腺病毒对 HL-60 细胞的转染效率(79.8±5.7)%，protamine sulfate 辅助转染后转染效率得到显著提高(t=34.74，$P<0.01$)。

2.3 细胞形态学改变

对照组经 Ad-LacZ 转染 HL-60 细胞，呈圆形或椭圆形，体积大，核浆比例大，染色质疏松，经 Ad-AS-c-myc 处理后 72 h，部分细胞体积缩小，核浆比例减小，胞浆中空泡增多，染色质致密，出现肾形核、杆状核或分叶核(图 1)。



A：HL-60 cells infected with Ad-LacZ；B：HL-60 cells infected with Ad-AS-c-myc

图 1 HL-60 细胞形态变化 (Wright's×1 000)

Fig 1 Morphological changes of HL-60 cells (Wright's×1 000)

2.4 细胞生长

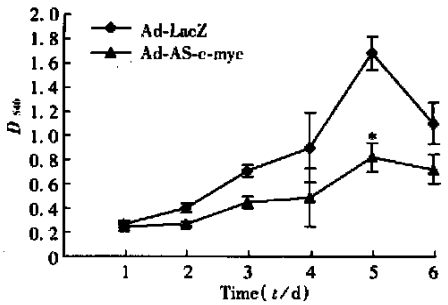
MMT 法对 Ad-LacZ、Ad-AS-c-myc 感染 HL-60 细胞生长情况进行检测，Ad-LacZ、Ad-AS-c-myc 在 MOI：100 下转染 HL-60 细胞第 2～6 天，第 5 天 Ad-LacZ 与 Ad-AS-c-myc 组 D_{540} 值相差显著(t=10.08，$P<0.01$)，细胞生长抑制率约为 51%(图 2)。

2.5 细胞周期变化

分为 Ad-LacZ、Ad-AS-c-myc 组，以 MOI：100 转染 HL-60 细

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

胞，分别于 2、4、6 d 收集各组细胞，70%乙醇固定、PI 染色后流式细胞仪检测 Ad-AS-c-myc 组与 Ad-LacZ 组相比，出现 G_1 期阻滞，S 期减少、凋亡率逐渐增加（图 3）。



*：$P<0.01$，*vs* Ad-LacZ

图 2　**Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞的生长抑制曲线**

Fig 2　Growth inhibition curve of Ad-AS-c-myc on HL-60 cells

2.6　NBT 还原实验

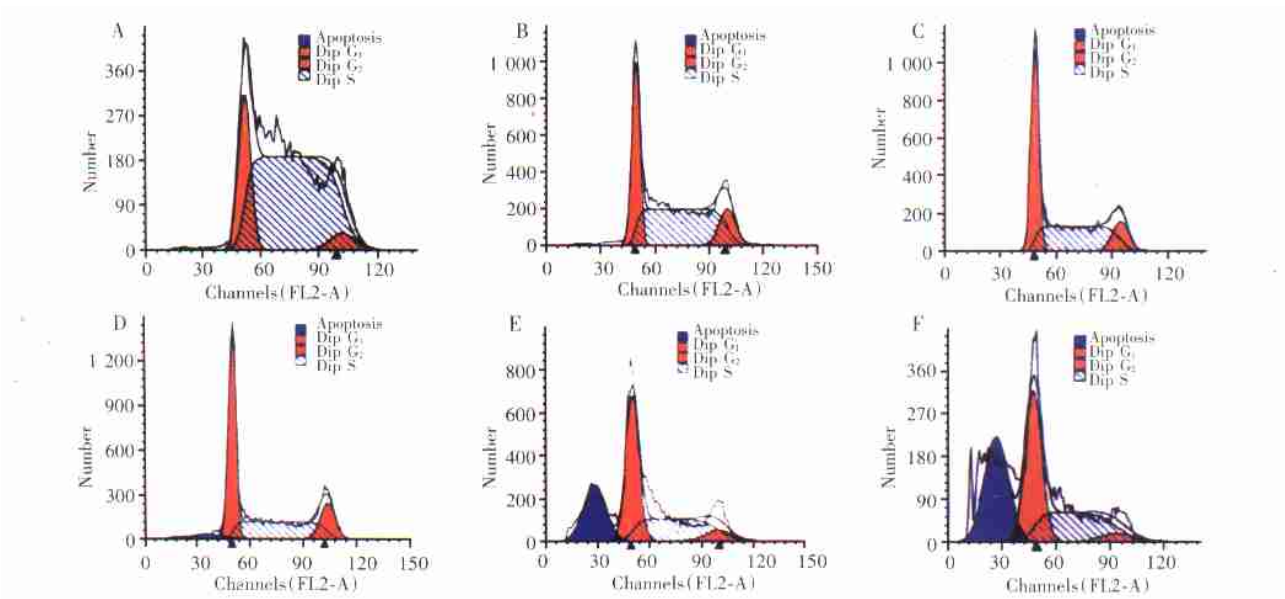
Ad-LacZ 、Ad-AS-c-myc 组细胞阳性率分别为（9.29±2.75）%、（57.57±7.72）%，两组比较相差显著（$t=18.94$，$P<0.01$）。Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞具有诱导分化的作用。

2.7　Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞 *c-myc* 基因转录的影响

分别提取 Ad-AS-c-myc（MOI：100）处理组 1、3、5 d 及对照组的细胞的总 RNA，进行 RT-PCR 分析，结果显示，在对照组 HL-60 细胞中 *c-myc* 基因 mRNA 转录水平表达较高，经 Ad-AS-c-myc 处理后 *c-myc* 基因 RT-PCR 扩增产物（250 bp）随时间延长逐渐下降（图 4）。

2.8　Ad-AS-c-myc 对 HL-60 细胞 c-fos 蛋白表达的影响

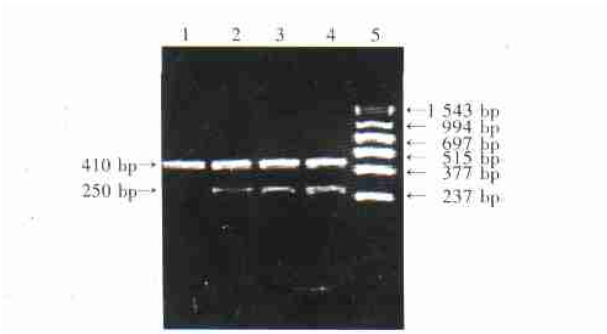
免疫细胞化学染色处理 Ad-AS-c-myc（MOI：100）组及对照组转染 3 d 的细胞，可见对照组胞核及胞浆内少量棕黄色颗粒。多数细胞呈阴性或弱阳性反应。Ad-AS-c-myc 处理的 HL-60 细胞胞核、胞浆内棕黄色颗粒较对照组明显增多。阳性细胞数增加，强阳性细胞多见（图 5）。



A：Control 2 d；B：Control 4 d；C：Control 6 d；D：Ad-AS-c-myc 2 d；E：Ad-AS-c-myc 4 d；F：Ad-AS-c-myc 6 d

图 3　**Ad-AS-c-myc 转染 HL-60 细胞后流式细胞仪分析细胞周期变化**

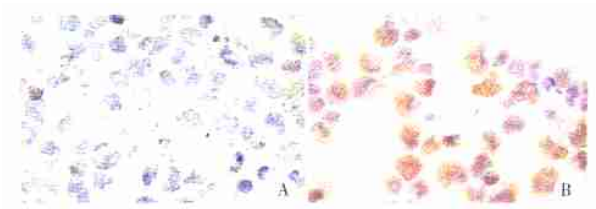
Fig 3　Flow cytometric analysis of cell cycle of HL-60 cells infected with Ad-AS-c-myc



1—3：5，3，and 1 d；4：Control；5：DNA marker

图 4　**RT-PCR 分析 Ad-AS-c-myc 转染 HL-60 细胞后 *c-myc* 基因表达**

Fig 4　RT-PCR analysis of the expression of *c-myc* gene in the HL-60 cells infected with Ad-AS-c-myc



A：HL-60 cells infected with Ad-LacZ；B：HL-60 cells infected with Ad-AS-c-myc

图 5　**HL-60 细胞 c-fos 蛋白表达**　（DAB×1 000）

Fig 5　Expression of c-fos protein in HL-60　（DAB×1 000）

3　讨论

急性早幼粒白血病是造血干细胞的克隆性恶性疾

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

病,为干细胞分化过程异常,其克隆的早幼粒细胞失去进一步分化成熟的能力而停滞在细胞发育的较早阶段。在急性早幼粒白血病HL-60细胞中,*c-myc*基因表达异常可以阻断体外造血细胞进行分化的过程。对于*c-myc*基因进行系统缺失突变分析证实,阻断细胞分化功能的位点与*c-myc*蛋白恶性转化的作用位点几乎一样[3]。研究表明将*c-myc*部分基因以反向建立表达载体,表达特异*c-myc* mRNA反义分子,能有效阻断*c-myc*癌基因的表达活性。本实验采用含有部分第一内含子,第二外显子及第二内含子的前8个核苷酸共1.53 kb的*c-myc*片断构建构建反义*c-myc*重组腺病毒。Ad-AS-c-myc能明显降低*c-myc*基因的表达,抑制细胞生长[4]。

腺病毒载体具有遗传毒性低,滴度高,装载容量大等优势,已成为最有应用前景的病毒载体[5]。2001年1月美国临床肿瘤基因治疗实验使用腺病毒载体为77例,逆转录病毒为65例[6]。本实验通过将反义*c-myc*与V型复制缺陷性腺病毒载体构建Ad-AS-c-myc系统,为克服白血病细胞缺少腺病毒纤维蛋白受体造成的转染效率较低,将Ad-AS-c-myc与鱼精蛋白硫酸盐混合形成带正电荷复合物,与细胞表面带负电荷糖蛋白结合,提高转染效率[7]。实验结果在MOI为100时,腺病毒载体对HL-60的转染效率为79.8%。符合基因治疗对载体的要求。为腺病毒载体转染白血病细胞提供了一个良好的途径。

*c-myc*是肿瘤细胞调控中非常重要的转录因子,它通过作用于细胞增殖及促细胞周期等靶基因使肿瘤细胞无限增殖。本实验利用对Ad-AS-c-myc转染HL-60细胞,有效的抑制了*c-myc*基因的表达。HL-60细胞在形态、功能上向成熟髓系分化。细胞生长受抑,细胞周期G_1期阻滞,S期下降,随着作用时间延长凋亡细胞逐渐增多。表明细胞失去无限增殖能力。分化相关基因*c-fos*表达增加是常用来判断细胞分化成熟的重要指标[8,9],它的表达增加说明Ad-AS-c-myc可通过调控*c-myc*基因影响分化相关基因的表达,促使细胞转入正常分化途径,促进细胞分化及凋亡。本研究表明Ad-AS-c-myc对HL-60细胞具有抑制生长及诱导分化作用。其生物学作用与HL-60细胞过氧化酶活性及*c-fos*的表达有关。Ad-AS-c-myc在白血病的基因治疗方面有良好的应用前景。

参考文献:

[1] Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, *et al*. The proto oncogene *c-myc* in hematopoietic development and leukemogenesis[J]. Oncogene, 2002, 21(21): 3414-3421.

[2] Lee K L, Roth C M. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering[J]. Curr Opin Biotechnol, 2003, 14(5): 505-511.

[3] 成 军. 肿瘤相关基因[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2000. 122-127.

[4] Chen J P, Lin C, Xu C P, *et al*. Molecular therapy with recombinant antisense *c-myc* adenovirus for human gastric carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(1): 22-28.

[5] Pfeifer A, Verma I M. Gene therapy: promises and problems[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001, 2: 177-211.

[6] Hemminki A, Alvarez R D. Adenoviruses in oncology: a viable option[J]? Bio Drugs, 2002, 16(2): 77-87.

[7] Matsuura M, Yamazaki Y, Sugiyama M, *et al*. Polycation liposome-mediated gene transfer *in vivo*[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1612(2): 136-143.

[8] Bestilny L J, Riabowol K T. A role for serine proteases in mediating phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 264-271.

[9] Okada Y, Saika S, Shirai K, *et al*. Expression of AP-1 (*c-fos*/*c-jun*) in developing mouse corneal epithelium[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 241(4): 330-333.

(编辑 薛国文)

(上接1552页)

卧位,在东方国家却为仰卧位[2]。支持俯卧位的依据是采取俯卧位时,肺脏不易淤血,换气好,血中含氧量高,心脏在俯卧位时也不受肺脏压迫,可以使心脏功能充分发挥,从而改善窒息新生儿的缺氧状态;更重要的是仰卧位时,新生儿口鼻的分泌物、奶水自然流向咽部,新生儿的吞咽反射不够灵敏,分泌物有可能流入气管内,引起或加重吸入性肺炎;还有文献[3]报道,溢奶水呛入气管发生生命危险可能与新生儿猝死综合征密切相关。然而,也有研究显示俯卧位可能使胃食道返流加重,不仅也可能引起或加重新生儿吸入性肺炎,还可能影响新生儿胃肠道功能的发育和完善[4]。此外,也有报道提出新生儿应采取左侧卧位或右侧卧位,以及不同程度的头低脚高或头高脚低卧位。

本研究通过窒息新生儿在不同体位情况下的舒适度评价、心脏功能、呼吸功能的变化等,初步的结果表明,在仰卧位、头低脚高15°俯卧位、头高脚低15°俯卧位情况下,上述指标均无显著差异,提示在围产期窒息新生儿,采取何种体位问题尚需进一步研究。

关键词:窒息,新生儿;体位;护理
中图法分类号:R473.71 文献标识码:B

参考文献:

[1] Ewer A K, James M E, Tobin J M. Prone and left lateral positioning reduce gastro-oesophageal reflux in preterm infants[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1999, 81(3): F201-F205.

[2] Bagucka B, De Schepper J, Peelman M, *et al*. Acid gastro-esophageal reflux in the 10 degrees-reversed-Trendelenburg position in supine sleeping infants[J]. Acta Paediatr Taiwan, 1999, 40(5): 298-301.

[3] Phillips G E, Pike S E, Rosenthal M, *et al*. Holding the baby: head downwards positioning for physiotherapy does not cause gastro-oesophageal reflux[J]. Eur Respir J, 1998, 12(4): 954-957.

[4] Friesen C A, Hodge C, Roberts C C. Accuracy and reproducibility of 12 h esophageal pH monitoring[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1991, 12(2): 166-168.

(编辑 陈聪连)

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