

MNP- hTR 复合物对 K562 细胞增殖影响的实验研究^{*}

马 燕 牛小娟 李 静 高 霞 李兴玉

(上海师范大学生命与环境科学学院 上海 200234)

摘要:探讨 MNP- 端粒酶反义寡核苷酸复合物,对K562 细胞凋亡和增殖的影响。应用荧光显微镜检测法和集落形成法,分别观察了凋亡细胞的形态学变化和细胞增殖能力。MNP- 端粒酶反义核酸复合物可诱导 K562 细胞凋亡和抑制细胞增殖,两实验组数值经统计学处理,具有非常显著性差异(p 分别 < 0.001)。由此认为,MNP- 端粒酶反义核酸复合物对 K562 白血病细胞具有促进凋亡的作用,此效果与剂量呈依赖性关系($r = 0.992$)。

关键词:MNP- 端粒酶反义核酸复合物;K562 细胞凋亡;荧光检测;集落形成

中图分类号:Q814 **文献标识码:**A

The study on the effect of the MNP- hTR compound on the Apoptosis and proliferation of K562 Cells

MA Yan, NIU Xiao-juan, LI Jing, GAO Xia, LI Xing-yu

College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234

ABSTRACT: To investigate the influence of the magnetic nanoparticles (MNP) - telomerase antisense oligonucleotide compound to the K562 cells, especially about the apoptosis and proliferation. Fluorescence microscope was used to watch the changing morphological characters of K562 cells, and we also used the clonally forming unit to detect the proliferation. The apoptosis and inhibit the proliferation of K562 cells might was induced by the MNP- telomerase antisense oligonucleotide compound. According to the statistical analysis of the experimental data, the difference is significantly ($p < 0.01-0.001$) compared with the control groups, respectively. The MNP- telomerase antisense oligonucleotide compound can promote cell apoptosis, besides, the effect depends on the dosage of the compound strictly ($r = 0.998$).

Key words: Antisense oligonucleotide with hTR; K562 cells; Fluorescence detection; Cloning formation unit

前言

近年研究表明,羧基磷灰石的纳米材料可杀死癌细胞,对肺癌、肝癌、食道癌等多种癌细胞都有疗效,并认为纳米材料具备杀死癌细胞且不伤害正常细胞的奇特功效。磁性纳米微粒作为生物活性物质的载体,导入动物体内,在外加磁场下,通过纳米粒子的引导,移向病变区,从而达到治疗目的。在使用纳米粒子时,必须具备两个条件:(1)纳米粒子具备一定的超微尺度,一般在 20~100nm 之间;(2)纳米粒子要呈均匀分布^[1],才具药效。当物质加工到纳米尺寸 0.1~100nm 时,即纳米材料,便表现出小尺寸效应、表面效应、量子效应和量子隧道效应^[2,3],因而展现出许多特有的性质,在催化、光吸收、生物医药、磁介质及新材料等方面有广阔的应用前景。

利用 γ - 三氧化二铁制成的磁性纳米微粒,及将该纳米粒子表面通过化学键^[4]与端粒酶反义寡核苷酸相连接而制成的 MNP-端粒酶反义核酸复合物,作用于 K562 细胞后,用荧光显微镜检测和集落形成法分别研究了对靶细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 MNP- 端粒酶反义核酸复合物的制备:

修饰巯基的磁性粒子 10mg,与 50pmol/L 反义核酸和 2mL PBS (pH7.4)混匀,在 25℃ 的恒温水浴中反应 24 小时,即 MNP- 端粒酶反义核酸复合物。

1.2 靶细胞的培养及传代:

K562 肿瘤细胞:采用常规细胞培养法传代保种。培养体系为含 10% 的新生牛血清 (FCS),青霉素、链霉素各 100U/mL 的 RPMI 1×1640,37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。肿瘤细胞培养至对数增殖期,用于实验。

1.3 凋亡细胞的诱导:

培养体系为 20% FCS RPMI1640 培养液和 1×10^5 /mL K562 细胞,不同浓度 (2pmol/mL、4pmol/mL、6pmol/mL、8pmol/mL) 的 MNP-端粒酶反义核酸复合物、反义寡核苷酸、无关寡核苷酸和平行量的磁性纳米微粒 (MNP) 4 个组 (时效实验中,分别为 MNP- 端粒酶反义核酸复合物、反义寡核苷酸和磁性纳米材料的半数促进浓度),总体积为 1mL。培养体系制好后,混匀,接种于 96 孔培养板中,置饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4 荧光显微镜检测凋亡细胞:

从各实验孔中分别取出细胞悬液 50μL、吖啶橙 10μL (5μg/mL) 分别加于载玻片,混匀,覆一盖玻片,荧光显微镜下计凋亡

* 基金项目:上海市教育委员会高校发展基金 (No.05DC21)

作者简介:马燕,上海师范大学生命与环境科学院 2006 届毕业生

通讯作者:李兴玉 (1949-) 教授、硕士研究生导师;E-mail: xingyu_li@126.com

(收稿日期:2006-04-26 接受日期:2006-05-11)

细胞百分率。每个实验点计 3 个平行样本。

1.5 集落形成法:

培养体系为: 20% FBS, 1×10^3 /mL K562 细胞, 药物浓度和各平行对照组同上(凋亡细胞的诱导时效实验) 及终浓度为 0.3% 琼脂。半固体培养体系制好后, 充分混匀, 迅速浇注于 24 孔培养板中, 每孔 0.5mL。置饱和湿度、37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5 天、6 天、7 天。终止培养后, 倒置光显微镜下计 ≥ 50 个以上 K562 细胞组成的集落数。

1.6 统计学处理:

数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 采用 t 检验和 F 检验处理数据。

2 结果

2.1 反义核酸对 K562 细胞影响的量效曲线

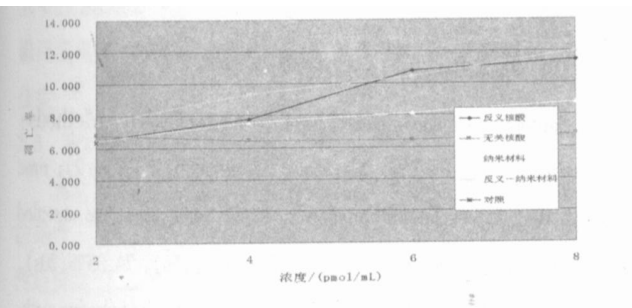


图 1 各种影响因素对 K562 细胞诱导凋亡百分率(n= 4)
Picture 1 Percentage of K562 cells apoptosis induced by different factors(n= 4)

图 1 可知, 在各种影响因素的作用下, K562 细胞的生长状况均有一定的变化。无关核酸对肿瘤细胞的生长基本没有影响, 其它三组实验均表现出 K562 细胞出现不同程度的凋亡, 而且这种变化与剂量呈依赖性关系。相关系数在反义核、纳米材料和端粒酶反义核酸—MNP 复合物中分别为 0.992492, 0.933201, 0.984106。对各实验组做 t 检验, 结果显示在相同条件下无关核酸对 K562 细胞的凋亡无显著影响, 而反义核酸、纳米材料及端粒酶反义核酸—MNP 复合物均对 K562 细胞的凋亡有显著的促进作用, 且端粒酶反义核酸—MNP 复合物的作用大于纳米材料。

2.2 各影响因素对 K562 细胞凋亡作用的时效关系

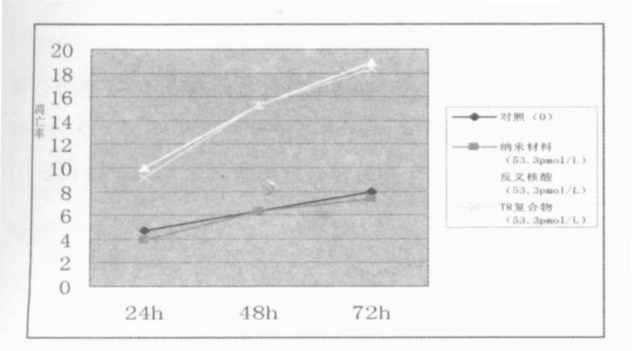


图 2 各影响因素对 K562 细胞凋亡的时效关系
Picture 2 Time- effect of different factors on K562 apoptosis

根据时效实验所得数据, 对各实验组做 F 检验, 结果显示 (图 2), 在半数促进浓度时, 反义核酸、MNP- 端粒酶反义核酸复合物对 K562 细胞的凋亡均有显著的促进作用, 且随着时间的增加而增大。

2.3 各影响因素对 K562 细胞集落形成的时效关系

附表 集落记数(n= 3)

Attached table: Clonoly forming unit

培养时间	5 天	6 天	7 天
对照	118±4. 041	120±4. 163	124±2. 517
反义核酸	50±1. 732 ★	41±1. 000 ★	36±2. 887 ★
MNP	87±2. 082 ★	97±3. 055 ▲	107±2. 887 ▲
MNP- 端粒酶反义核酸复合物	54±3. 605 ★	51±3. 055 ★	47±2. 646 ★

与对照组比较, ★表示 $p < 0.001$, ▲表示 $p < 0.01$

各实验组与对照组比较, 在 MNP- 反义核酸和端粒酶反义核酸复合物均对 K562 细胞集落形成明显减少, 经 t 检验具有非常显著性差异 ($p < 0.001$), MNP 在第 6 天和第 7 天时, K562 细胞的增殖能力仍然受抑, 还可发现 MNP 对集落的形成也有相对较小的抑制作用, 经 t 检验, 仍具有显著性差异 ($p < 0.01$)。

3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡是一种不同于细胞坏死的生理方式, 其细胞形态和生化方面的变化主要包括 DNA 断裂、染色质凝聚、膜结构肿胀、细胞皱缩、凋亡小体形成等^[5], 上世纪 90 年代以后随着分子生物学技术的发展, 细胞凋亡成为肿瘤学研究的一个热点, 在肿瘤的治疗上细胞凋亡的增强被认为是化疗药物杀伤肿瘤的重要机制。

荧光检测是基于单个细胞凋亡区别与细胞坏死的形态学特征, 即膜起泡、凋亡小体、新月形成、核碎裂等特征。常用荧光色素有吖啶橙 (AO)、Hoechst 33258 或 Hoechst 33342、碘化丙啶 (PI)、溴乙锭 (EB)^[6]。本实验中采用吖啶橙作为染色剂, 既能进入活细胞也能进入死细胞, 正常细胞呈均匀荧光染色, 而凋亡细胞呈致密浓染的颗粒状或块状荧光。对药物作用后的凋亡细胞在荧光显微镜下计数, 经过统计学分析得到药物作用的效果。

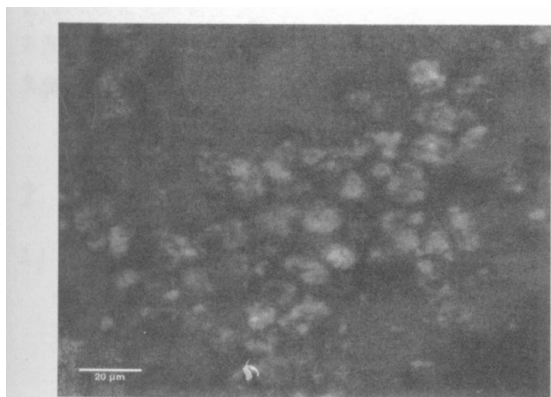
集落形成法是测定单个细胞增殖能力的有效方法之一。单个细胞在体外半固体培养基中增殖持续 6 代以上, 其后代所组成的细胞群落称为集落^[7]。每个集落可含有 50 个以上细胞, 大小在 0.3– 1.0mm 之间, 通过计数集落形成率, 可对单个细胞的增殖潜力作定量分析, 了解细胞的增殖能力和对生存环境的适应性, 用此法来确定抗癌药物对肿瘤的杀伤作用, 也是体外检测抗癌药物敏感性方法之一。

许多药物具有诱导细胞凋亡和抗肿瘤的作用, 例如多糖可通过提高机体免疫力或直接作用于肿瘤细胞, 诱导其分化、凋亡。本实验中采用端粒酶反义核酸—MNP 复合物作为对 K562 细胞凋亡的影响因素进行研究, 取得了一定的成果。纳米级材料若能作为抗肿瘤药物应用到临床将具有很大的优越性, 其极小的空间尺寸和简单经济的制备工艺都向我们展示了其广泛的应用前景。希望本实验能为进一步的研究端粒酶反义核酸—MNP 复合物促进肿瘤细胞凋亡的机理及开发其药用价值提供更多的实验依据。

(下转第 21 页)

2.4 荧光显微镜下,迁移至缺血侧大脑皮质和海马处的 GFP 阳性的 MSC,图中比例尺为 20 μ m。

The appearance of GFP positive MSC cells home at the ischemic cortex and hippocampus damaged region under fluorescence microscopy. Scale bar= 20 μ m in picture.



3 讨论

骨髓间充质干细胞(MSC)是骨髓中非造血实质细胞的干细胞,能够分化成多种细胞。实验证实^[1,2],MSC 可分化为神经元样细胞和胶质样细胞。在本实验中,我们应用 MSC 经尾静脉移植治疗大鼠脑缺血再灌注损伤,大鼠的神经功能恢复明显优于对照组,提示 MSC 具有肯定的神经保护作用,这为 MSC 治疗缺血性脑血管病提供了证据。

bFGF 是一种具有多种生物活性的神经营养因子,在大鼠局灶性缺血再灌注损伤中表达明显升高。bFGF 可缩小梗死体积,促进神经功能恢复^[3]。在本实验中,bFGF 免疫组化单染发现,MSC 移植治疗组脑组织中 bFGF 的表达明显高于对照组。因此,MSC 可通过提高 bFGF 的表达减轻神经功能缺损,发挥脑保护作用。bFGF 的具体保护机制可能在于以下几点。首先,bFGF 能够促进神经元存活和突起生长,是神经胶质细胞和血管内皮细胞的促有丝分裂原^[4,5]。

胶质细胞产生并释放各种营养因子,有助于神经元和其他细胞存活和增殖。内皮细胞分化、毛细血管增生使侧支循环形成,从而改善局部血供,促进缺血病灶恢复^[6]。其次,bFGF 可调节血管舒缩状态和局部脑血流量^[7,8]。再次,bFGF 与受体特异性结合后,激活酪氨酸激酶降低谷氨酸受体蛋白和 Ca²⁺ 结合蛋白等的表达而减少 Ca²⁺ 内流,拮抗缺氧、兴奋性氨基酸、自由基等的损害而保护神经元^[9]。最后,bFGF 还可阻止迟发性神经细胞死亡和(或)促进新的神经元芽生和突触

形成^[10,11]。国内外的实验证实,脑缺血再灌注损伤发生时 bFGF 还具有抗凋亡作用。

总之,MSC 作为一种新型的干细胞对大鼠脑缺血再灌注损伤具有切实可靠的保护作用。根据本试验,我们考虑其脑保护作用与促进神经细胞分泌 bFGF,进而减少神经细胞凋亡有关。

参考文献

- [1] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10711-10716
- [2] Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. *Exp Neurol*, 2000, 164: 247-256
- [3] Martinez G, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor- β immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion[J]. *J Neurosci Res*, 2001, 63: 136-142
- [4] Eckenstein FP. Fibroblast growth factors in the neuron system[J]. *J Neurobiol*, 1994, 25: 1467-1480
- [5] Powell PP, Finklestein SP, Dionne CA, et al. Temporal, differential and regional expression of mRNA for basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat brain[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991, 11: 71-77
- [6] Huang Z, Chen K, Huang PL, et al. bFGF ameliorates focal ischemic injury by blood flow-independent mechanisms in eNOS mutant mice[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272: H1401-H1405
- [7] Tanaka R, Miyasaka Y, Yada K, et al. Basic fibroblast growth factor increases regional cerebral blood flow and reduces infarct size after experimental ischemia in a rat model[J]. *Stroke*, 1995, 26: 2154-2158
- [8] Rosenblatt S, Irikura K, Caday CG, et al. Basic fibroblast growth factor dilates rat pial arterioles[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14: 70-74
- [9] Mattson MP, Cheng B. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis[J]. *Stroke*, 1993, 24(12 suppl): 1136-1140
- [10] Yamada K, Kinoshita A, Kohmura E, et al. Basic fibroblast growth factor prevents thalamic degeneration after cortical infarction[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1991, 11: 472-478
- [11] Kawamata T, Yamaguchi T, Shin-ya K, et al. Time courses of increased expression of signaling transduction molecules induced by basic fibroblast growth factor in PC12 cells[J]. *Neurol Res*, 2001, 23: 327-330

(上接第 23 页)

参考文献

- [1] 李基文. 21 世纪纳米技术在医学应用中的展望[J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(8): 717-718
- [2] 张立德, 牟季美. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 3, 46, 72, 112-160
- [3] 赵强, 庞小峰, 胡云霞. 磁性纳米生物材料研究及其用[J]. *原子与分子物理学报*, 2005, 22(2): 222-5
- [4] 沈鹤柏, 汪学友, 杨海峰, 等. DNA 在磁性纳米粒子表面的键合及

表面增强拉曼光谱研究[J]. *科学通报*, 48(21): 2252-6

- [5] 欧阳高亮, 李祺福. 细胞凋亡与肿瘤的发生发展和治疗[J]. *国外医学肿瘤分册*, 2000, 27(5): 266-268
- [6] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 2392-243
- [7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 第一版. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 137