

Anti c-myc mRNA oligomers 抑制 HL-60 細胞增殖並誘發其分化之研究

葉珍珍* 林志生**

一、前言

利用反密碼 (antisense) DNA或RNA來阻止致癌基因的表現是近年來很熱門的研究方向。其原理是源於互補DNA或RNA配對而抑制了基因或mRNA轉錄、轉譯作用。在醫藥的研究上、反密碼技術的確提供了無限發展的前途。

影響白血球進行分化 (differentiation) 或增殖 (proliferation) 的選擇因子在於細胞膜上特種的接受器 (receptors), 此接受器對原致癌基因 (proto-oncogene) 所產生的核蛋白很敏感而行增殖作用, 所以在體內的原致癌基因(包括c-myc, n-myc, c-myb, p-53, c-fos, c-ski) 若表現則白血球作用減弱一即所謂血癌, 其中又以c-myc最為重要。我們已知一些化學藥品可刺激白血球分化, 列如DMSO (dimethyl sulfoxide), retinoic acid, phorbol ester 和vitamin D analogs。如今, 一些研究者已確知一些原致癌基因的反密碼寡核 苷 酸 (antisense oligomers) 亦可刺激白血球進行分化路線。

Hypergranular promyelocytic leukemia 病人就是體內的前骨髓細胞 (promyelocyte) 無法分化成顆粒性細胞 (granulocyte) 所致。此種病人由於前骨髓細胞不斷增生, 所以在血液中可測得不正常的此種細胞的提昇, 為診察的一種指標。一般白血病研究者為探討白血球在各種實驗狀況下增殖、分化的情形, 就建立了很著名的HL-60細胞品系 (promyelocytic leukemia cells), 由於HL-60 具有即下四種特質所以常被引用進行研究: (1)對藥品測試的敏感度高, 易定出促使細胞分化的效果; (2)自然分化率低, 低於5%; (3)c-myc 基用的表現比下常細胞高出8-30 倍; (4)正常一次細胞分裂時間為21小時。

由上述HL-60 特質可知, HL-60 的增殖作用和原致癌基因c-myc 有很大的相關: c-myc 表現強烈, 核蛋白增加, HL-60 進行分化的比例就會增加。

本文主要在探討利用一段與c-myc mRNA 序列互補之反密碼寡核 苷 酸對於HL-60 分化或增殖之作用的影響, 提供未來可能針對白血病的治療模式參考。

二、反c-myc 密碼寡核 苷 酸、c-myc 與HL-60間相互關係

Holt 等人合成一段與c-myc 引導肽鏈序列 (leader peptide sequenced) mRNA 的15 個鹼基對 (15 bases) 之反密碼寡核 苷 酸, 一段則與mRNA 鹼基對相吻合之寡核 苷 酸稱為MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5。圖1 所列出就是此七段合成之核 苷 酸序列與c-myc 基因, mRNA 序列的關係圖。Holt等人的實驗基本方式為: 將這些合成的寡核 苷 酸分別與HL-60 細胞混在一起培養, 然後測試c-myc 表現程度, HL-60 生長性况及細胞增殖、分化之比例。本文將逐項來介紹:

(一)寡核 苷 酸在培養液中之穩定性及在HL-60細胞中形成配對之測試: 將5' 端標定有放射性質32p 的寡核 苷 酸以4 μ M/mL 濃度的量放入含10% 已經65° C, 30 分鐘處理的胎牛血清及成長中HL-60 細胞之培養液中。依不同時間取出部分的細胞粹取出已標定的寡核 苷 酸, 然後置於聚丙烯 醯 胺 膠體中電泳觀察寡核 苷 酸在細胞培養液中被降解之速率。結果見圖2。另外測試反密碼寡核 苷 酸是否能順利通過細胞膜而和c-myc mRNA 進行配對

* 國立中興大學畜牧系

** 國立中興大學畜牧研究所二年級

實驗見圖3。將已標定32p的反密碼寡核糖核酸和HL-60細胞混在一起4小時後，再加入大量未標定的反密碼寡核糖核酸而後，以S1核酸酶處理，如此可降解所有單股DNA和RNA，留下來就是形成配對型態之反密碼寡核糖核酸與c-myc mRNA雜合體。「add back」及sense的處理見圖3。

由以上兩個實驗結果可以歸納以下幾點結論：

1.反密碼寡核糖核酸能穩定的存在HL-60細胞培養中直至24-48小時才開始降解，但是至第5天仍能在培養液中存在完整序列的寡核糖核酸。

2.寡核糖核酸能經由細胞膜進入細胞質中與其互補的mRNA呈配對之作用。正常的HL-60細胞的c-myc mRNA約200分子，而如圖3實驗mRNA反密碼寡核糖核酸與HL-60細胞作用4小時後，約有30%（即70分子）mRNA會與之配對形成雙股雜合體。

3.在細胞質中影響轉譯作用的核糖體（ribosome）及起始因子蛋白質（initiation factor proteins）並不與寡核糖核酸起競爭作用。

□c-myc反密碼寡核糖核酸對c-myc基因表現之影響：

在HL-60中c-myc基因表現經由轉譯為65Kd（kilo dalton）的c-myc蛋白質，所以由免疫沈澱法測得處理後HL-60細胞培養液中c-myc蛋白質產量即可知c-myc表現之程度。圖4a是由反密碼、同密碼寡核糖核酸及1.25%DMSO與HL-60細胞一起培養不同時間後所測得c-myc蛋白質之結果。由此可知反密碼寡核糖核酸一旦與HL-60細胞接觸，很快的（4小時以內）就能進入HL-60細胞內和c-myc mRNA配對以制止c-myc mRNA轉譯作用形成蛋白質，同時1.25%DMSO也有極佳抑制c-myc基因表現之作用。圖4a與圖4b是同一塊電泳膠體做西方吸漬後以兩種不同探針作用之結果；圖4a探針為anti-c-myc antibody，其主要目的是證實每個處理所取的蛋白質總量一樣的，以召信圖4a的結果。由實驗的結果可知，若以4μM的c-myc反密碼寡核糖核酸處理HL-60細胞，可以降低c-myc蛋白質的合成及其產量。

□c-myc反密碼寡核糖核酸對HL-60細胞生長之影響：

將濃度4μM的寡核糖核酸加入HL-60細胞培養液中，每日測HL-60細胞數。結果發現加入c-myc反密碼寡核糖核酸及1.25%DMSO處理組無論在single dose或daily dose中經歷五天後，HL-60細胞都僅為未處理的50%，如圖5。另一個實驗是測反密碼寡核糖核酸濃度在4μM以內和抑制增殖比例有正相關，但超過4μM則影響不大。

□c-myc anti-sense oligomer促使HL-60細胞行分化功能之測定：

由於NBT（nitroblue tetrazolium）可與顆粒性細胞作用形成藍黑色顆粒細胞（formazan granule），而HL-60細胞行分化後就是形成顆粒性細胞，所以以NBT試驗所觀察到藍黑色細胞之比例即是HL-60細胞分化之效率，如圖7。以c-myc反密碼寡核糖核酸處理5天後，有60~80%的HL-60細胞在形態上呈現明顯變化，例如：核與細胞質比值降低，染巴質鬆散，無明顯核仁及較少嗜鹼性細胞質等。而在處理的3-5天中，有17~32%的HL-60細胞真正分化成NBT的細胞（即顆粒性細胞），控制組則少於5%。

□其他有關之現象檢討：

既然anti-sense oligomers可以在HL-60細胞中與互補的c-myc序列相配對，那麼應該是可以和sense oligomers也相配對，也就是anti-sense, sense的oligomers同時存在於HL-60細胞中，sense oligomers與c-myc mRNA會互相競爭與anti-sense oligomers配對形成雙鏈。圖8的結果就是證實了這種推理。

在前文提及曾合成五段分別與反密碼寡核糖核酸有5~12個鹼基對不同的oligomers MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5，結果此五種oligomers對於HL-60細胞與c-myc表現之影響全部與sense oligomers不同，但其實驗結果卻無一點點影響，可知在

15 鹼基對的寡核糖酸對於配對之互補序列要求是非常嚴苛的。

三、結論

在本實驗中證實了反c-myc 密碼的寡核糖酸的確可以透過HL-60細胞膜，進而與互補序列的c-myc mRNA 配對，雜交為雙股核糖酸以致c-myc mRNA 無法行轉譯作用產生蛋白質，如此HL-60細胞膜上的核蛋白接受器停止被刺激，於是所謂增殖作用停止，分化作用受到鼓勵，HL-60 細胞分裂時間增長，生長減慢，外型也起變化。這一連串的演變，完全是由分子作用而起，所以在以往分子生物觀念未建立起時的一些生理、生化變化大都可獲得合理的解釋，當然這些生命現象之謎也逐漸被解開，而即然我們找到了根本的原因，所以從最根本、最原始的出發點解決問題才是最有效的，於是基因治療法已成為未來醫學研究上最重要途徑，尤其針對原致癌基因引起目前乃令人束手無策的癌症治療而言，反密碼核糖酸藥劑或許可輕易為人類帶來福音。

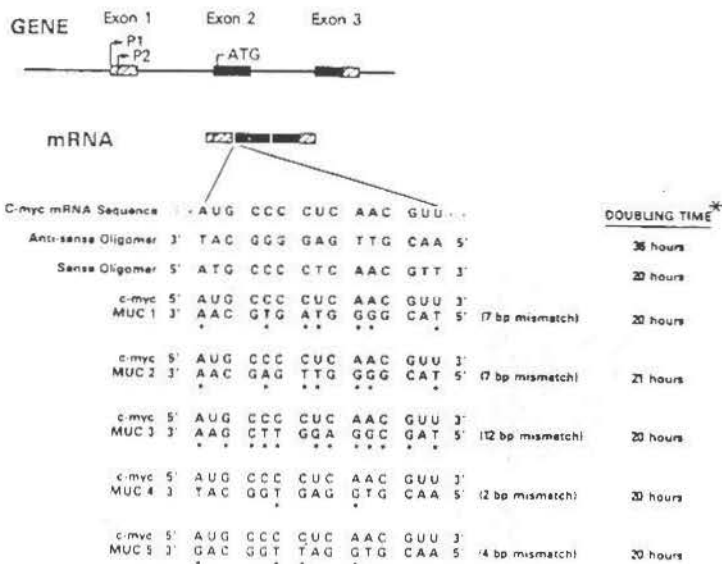


Fig. 1 合成之寡核糖酸序列與c-myc 基因和 mRNA 序列之關係圖。

*: Doubling time 為寡核糖酸影響 HL-60 增殖之時間。詳見本文。



Fig. 2 寡核糖酸於培養液中穩定性之測定。寡核糖酸與HL-60 細胞一起培養不同時日之自影放射圖像。

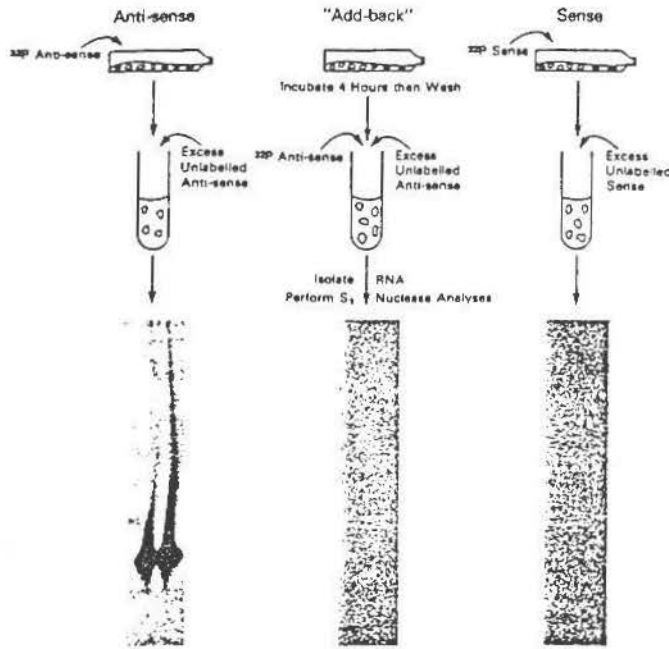


Fig. 3 測試寡核苷酸與HL-60 細胞內m-RNA 配對 (形成雙鏈) 之實驗策略及自動放射照像圖, 由左圖可知自HL-60 細胞萃取出之 anti-sense oligonucleotides 與³²p 標定之 anti-sense oligonucleotides 具相同之分子量。

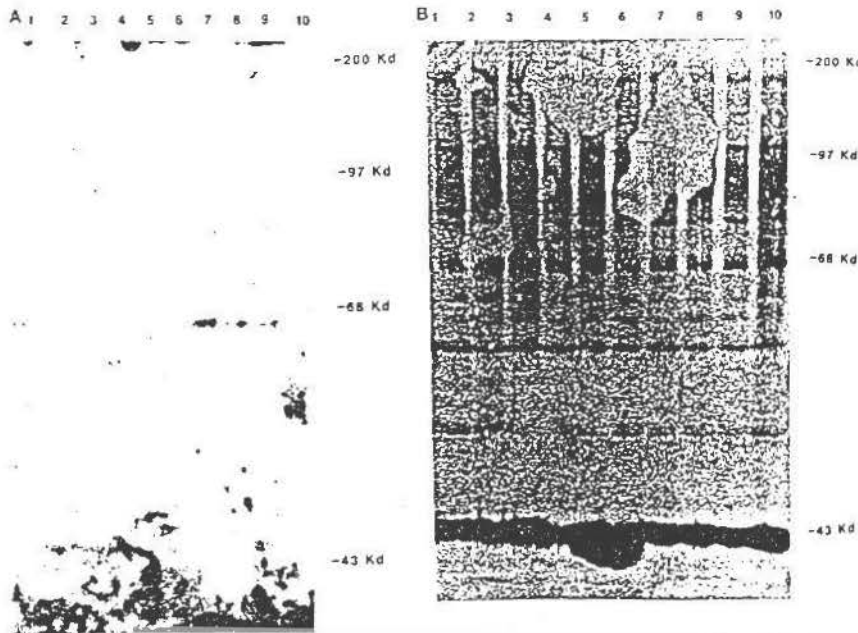


Fig. 4 c-myc 反密碼寡核苷酸影響 c-myc 表現之蛋白質免疫沈澱偵測。

1. 1-6 為 anti-sense oligonucleotide 處理, 時間分別為 4、8、12、24、48、及 72 小時。7-9 為 sense oligonucleotide 處理, 時間分別為: 8、24、72 小時。10 為 125% DMSO 處理 10 小時。

2. a. probe 為 anti-c-myc antibody.
b. probe 為 anti-c-myc antibody.

Fig. 5 *c-myc* anti-sense oligomer 對 HL-60 細胞生長之影響。

A. Single dose: 細胞培養於同一培養液 5 天。
 b. Daily dose: 培養液每日換新, oligomer 濃度維持 4 μ M。
 ○: HL-60 cells
 □: Sense oligomers
 △: Aantisense oligomers
 ◇: 1.25% DMSO

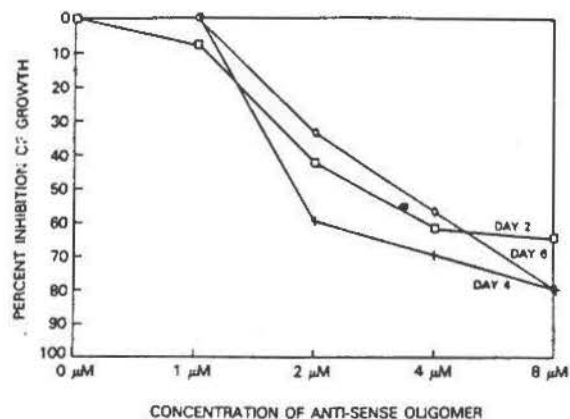
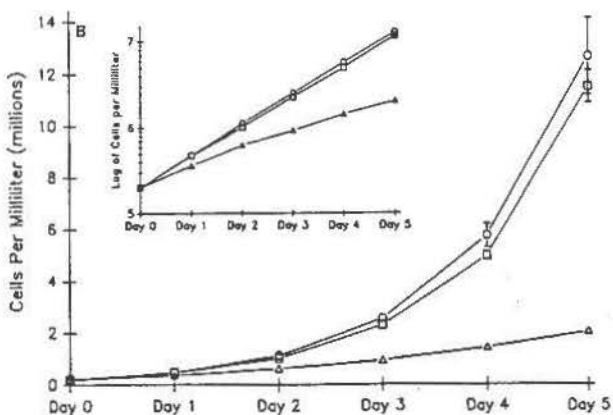
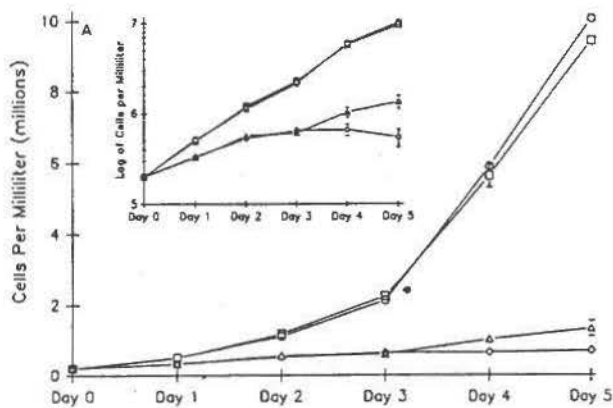


Fig. 6 不同 anti-sense oligomers 濃度對 HL-60 細胞生長之影響。

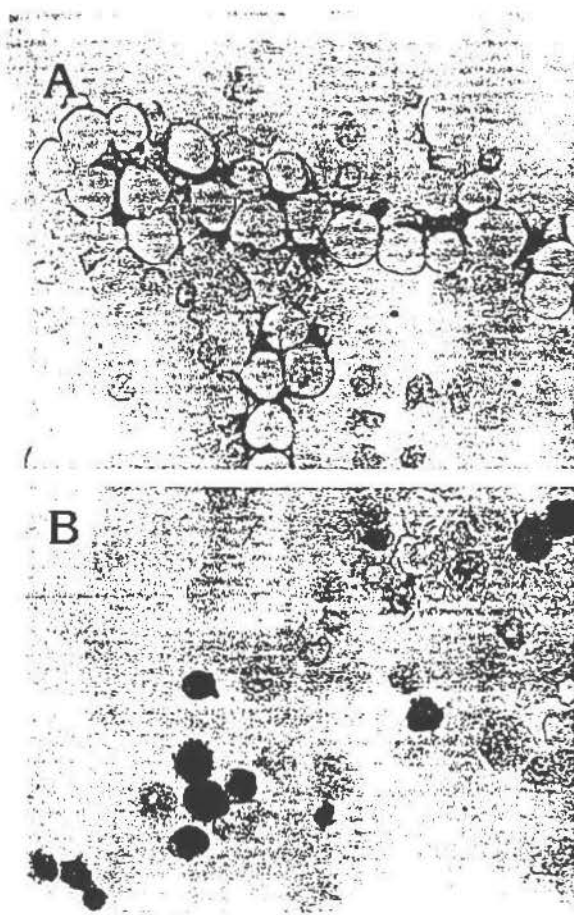


圖 7 NBT 測試後之 HL-60 細胞。
 A. sense oligomers 處理
 B. anti-sense oligomers 處理
 圖中黑點表 NBT+ cells

Anti-myc oligomer concn (μ M)	Sense oligomer concn (μ M)	Doubling time (h) ^b	% NBT positive ^b
4	0	29	20-32
4	4	27	11-17
4	40	21	4-6
0	40	21	1-5
0	0	21	1-2

Table 1 anti-*c-myc* oligomers, sense oligomers 及其兩者間交互作用對於 HL-60 細胞增殖與分化之影響。

參考文獻

1. Daugerty, B.L., K.Hotta, C.kumar, Y.H.Ahn, J.Zhu, and S.Pestka. 1989. Anal.Techn.6:1-16.
2. Heikkila, R., G.Schwab, E.Wickstrom, S.L.Loke, D.H.Pluznik, R.WATT, and L.M.Neckers. 1988. Nature 328:445-449.
3. Helene, C., and J.J.Tolume. 1990. Biochimica et Biophysica Acta. 1049:99-125.
4. Holt, J.T., R.L.Redner, and A.W.Niehuis. 1988. Molecular and Cellular Biology 8:963-973.
5. Kimelmin, D. AND M.W.Kirschner. 1989. Cell 59:687-696.
6. Wickstrom, E.L., T.A.Bacon, A.Gonzalez, D.L.Freeman, G.H.Lyman, and E.Wickstrom. 1988. Proc. Natl. Acad.Sci.USA 85:1028-1032.

國立中興大學 

National Chung Hsing University