

· 论著 ·

C-myc反义寡脱氧核苷酸抑制 类风湿滑膜细胞增生诱导滑膜细胞凋亡

赵欣欣 赵丽娟 肖卫国 鲁静 杨聘婷 于清宏

【摘要】目的 研究硫代磷酸化修饰的 c-myc反义寡脱氧核苷酸 (antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides, ASP-ODN) 在血清存在条件下对培养的人类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 滑膜 B型细胞增生的影响及诱导凋亡的作用。方法 培养 RA滑膜 B型细胞,合成 c-mycASP-ODN,以阳离子脂质体 lipofectin 为载体转染滑膜 B型细胞,用显微镜观察和四唑盐 (MTT) 法检测对细胞增生的抑制作用,用荧光染色、荧光显微镜、流式细胞仪检测诱导细胞凋亡和 c-myc蛋白表达的变化。结果 c-myc ASP-ODN 呈序列特异性抑制滑膜 B型细胞增生并下调 c-myc蛋白表达,诱导滑膜 B型细胞凋亡。结论 c-mycASP-ODN 可能对 RA的滑膜增生性炎症具有潜在的治疗作用,c-myc原癌基因可能成为反义核酸技术治疗 RA的靶基因。

【关键词】关节炎,类风湿; 滑膜; 细胞; DNA,反义; 基因,myc

C-myc antisense oligodeoxynucleotides inhibit synoviocytes proliferation and induce synoviocytes apoptosis ZHAO Xin-xin*, ZHAO Li-juan, XIAO Wei-guo, LU Jing, YANG Pin-ting, YU Qing-hong. *Department of Rheumatology and Immunology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective The c-myc proto-oncogene was over-expressed in synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). This study investigated the effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (AS P-ODN) on cultured synoviocytes from patients with RA. Methods AS P-ODN was transfected into cultured human synoviocytes from patients with RA by lipofectin. Inhibition of cell proliferation was assessed by MTT assay and microscopy. Apoptosis was examined by fluorescence staining, fluorescence microscopy and flow cytometry. C-myc protein expression was tested by flow cytometry too. Results C-myc AS P-ODN inhibited synoviocytes proliferation and induced synoviocytes apoptosis, along with down-regulation of c-myc protein. Conclusion C-myc AS P-ODN may be a useful therapeutic option in treating hyperplasia of the synovial lining cells of RA.

【Key words】Arthritis, rheumatoid; Synovial membrane; Cells; DNA, antisense; Genes, myc

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的以关节组织慢性炎症性病变为主要表现的全身性疾病。其主要病理变化特点为持续性反复性关节滑膜炎、细胞浸润、滑膜翳形成, 渐进性软骨、骨组织的破坏, 导致关节结构的破坏, 功能丧失。在应用传统的镇痛抗炎治疗和现在作为标准的一线使用的改善病情药物如: 甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、羟氯喹时, 许多患者在尚未达到理想疗效时, 常因副作用难以耐受而终止治疗。其中的一个重要原因是药物对靶位的选择性差。反义核酸技术是一种靶向性的治疗方

式, 它利用序列特异性反义寡核苷酸在细胞内部与靶 mRNA 结合, 干扰其翻译过程, 或结合在靶基因上, 干扰靶基因的转录。目前, 由于反义核酸技术对特定基因的转录、翻译的专一性干扰, 已成为在病毒感染、肿瘤和自身免疫病治疗方面重要的研究方向^[1]。类风湿滑膜有许多方面类似于局限性侵袭性生长的肿瘤, RA滑膜成纤维样细胞 (B型细胞) 表达的增生细胞核抗原、c-myc原癌基因和核仁组织者区是细胞增生的标志^[2]。其中 c-myc原癌基因在控制细胞增生、凋亡和分化过程中起重要作用, 控制着几种生长和分化相关基因转录的活化或抑制, 因此, 成为重要的治疗靶位^[3]。Hashiramto 进行的细胞培养研究显示 c-myc反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN) 能诱导人 RA滑膜 B

基金项目: 辽宁省科技攻关计划资助项目 (00225001)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属一院风湿免疫科 (赵欣欣、赵丽娟、肖卫国、鲁静、杨聘婷); 解放军第 202 医院风湿免疫科 (于清宏)

型细胞凋亡。此项研究所选择的是目前比较常用的一段针对 *c-myc* 基因第二外显子转录起始密码的一段 15 个核苷酸的寡聚脱氧核苷酸, 未进行修饰, 也无载体, 转染时细胞培养在无血清的培养液中^[4]。这一研究初步证明了应用 *c-myc* AS ODN 治疗 RA 的可能性, 但其培养条件较体内环境相距甚远。本实验将进一步研究硫代磷酸化修饰的相同序列 15 聚体的 *c-myc* AS ODN 在以脂质体 (liposome) —— lipofectin 作为载体和血清存在的条件下, 转染人类风湿关节滑膜 B 型细胞抑制其增生的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 RA 滑膜 B 型细胞培养: RA 滑膜 B 型细胞来源于一年轻女性活动期 RA 患者 (符合美国风湿病学院 1987 年诊断标准) 的膝关节液。分离细胞方法如下: 无菌抽取膝关节液, 离心后弃上清, 加入 0.01 ml/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 液, 清洗 3 次, 每次 1000 r/min, 5 min。用含体积分数为 10% 的小牛血清 (NBS) (郑州佰安生物工程有限公司)、1% N-2-羟甲基哌嗪乙烷硫酸 (HEPES) 的 DMEM 高糖培养液 (Gibco) 重悬细胞, 1×10^6 /ml 细胞数加入 25 cm² 培养瓶 (Costar) 中培养, 换液时将悬浮的淋巴细胞等换掉, 换液后 2 h 去除贴壁细胞, 将尚未贴壁的滑膜细胞与巨噬细胞分离出来。0.25% 胰酶 (Sigma 分装) 消化传代, 37 °C 5% CO₂ 湿化培养。这样传至 3 代以后为纯化的滑膜 B 型细胞。实验中应用的是第 10~16 代 RA 滑膜 B 型细胞。

1.1.2 C-myc ASP-ODN、有义硫代磷酸化寡脱氧核苷酸 (sense phosphothioate oligodeoxynucleotides, S P-ODN) 的设计、合成: C-myc AS ODN: 5'-AACGTTGAGGGGCAT-3', 这是目前最常使用的一段 *c-myc* 反义寡脱氧核苷酸序列, 用它的有义序列 *c-myc* S ODN: 5'-ATGCCCTCAACGTT-3' 作为对照检测反义序列作用的特异性。有义、反义序列的磷酸二酯键全部进行硫代磷酸化修饰 (ODN 转变为 P-ODN)。ODN 的合成与修饰由上海生工生物工程技术有限公司完成, 使用美国 PE 公司 391 型 DNA 自动合成仪合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 纯化、冻干, -20 °C 以下保存。

1.1.3 阳离子脂质体: Lipofectin (MK1211, Invitrogen)。

1.1.4 P-ODN-阳离子脂质体复合物培养液的配制: 溶液 A: A1: 用无血清 DMEM 培养液将 AS

P-ODN 配制成浓度分别为 125、25、50、100 μmol/L 的系列浓度溶液。A2: 用无血清 DMEM 培养液将 S P-ODN 配制成浓度分别为 200、100 μmol/L 的系列浓度溶液。溶液 B: 用无血清 DMEM 培养液将 lipofectin 配制成浓度为 100 mg/L 的溶液。室温下静置 30~45 min 后分别取 2 种 P-ODN 的各浓度溶液一份 (溶液 A) 各加入溶液 B 1 份, 轻轻混合, 孵育 10~15 min。再于每管溶液中加入 8 份 10% NBS-DMEM 培养液 (ASP-ODN 终浓度分别为 1.25、25、5、10 μmol/L, S P-ODN 终浓度分别为 10、20 μmol/L, Lipofectin 终浓度为 10 mg/L, 培养液含血清的终浓度为 8%), 轻轻混合后成为 P-ODN-lipofectin 复合物培养液。

1.2 方法

1.2.1 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法测定对细胞增生抑制效果

细胞生长曲线用比色法测定, 原理为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 能被活细胞还原。培养细胞在接种 96 孔板前 48 h 换用无血清 DMEM 培养液, 使细胞周期同步于 G₀~G₁ 期, 培养 48 h 后胰酶消化, 用 10% NBS-DMEM 培养液吹打、重悬浮为单细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^4 /ml, 取平底型 96 孔板 (IWAKI, Japan) 3 个 (设为 0、24、48 h 板), 按预先设计每孔接种细胞悬液 200 μl, 调零孔单加 10% NBS-DMEM, 放入培养箱内培养。24 h 后取出, 此时记为零时 (0h)。0h 板各孔加 MTT (Sigma) 20 μl, 放回培养箱, 4 h 后取出, 吸净孔内培养液, 加入二甲亚砷 (DMSO) 150 μl, 震荡 10 min, 放酶标仪中 490 nm 检测。24 h 板和 48 h 板每板吸净孔内培养液, 换用预先配制好的 P-ODN-lipofectin 复合物培养液各 200 μl, 调零孔和正常细胞对照孔加入 8% NBS-DMEM 培养液 200 μl。分别于 24 h 和 48 h 后按 0h 板程序检测。重复实验 1 次。

统计学处理: 各组间比较采用 t 检验, 数据由 Excel 软件处理。

1.2.2 凋亡检测

1.2.2.1 凋亡的流式细胞仪分析: 正常活细胞的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidyl serine, PS) 位于细胞膜的胞质面, 而在凋亡诱导过程中, 磷脂组成的变化导致 PS 外翻至细胞表面, 磷脂结合蛋白 Annexin V 与 PS 具有高亲和性。因此异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的 Annexin V 能通过流式细胞仪对凋亡进行检测。因坏死细胞的胞膜通透性增加, 也能结合 Annexin V-FITC, 加入碘化丙啶 (propidium

iodide, PI) 后可将细胞区分为活细胞、早期凋亡、坏死或晚期凋亡细胞。正常活细胞既不结合 Annexin V - FITC, 也不被 PI 染色; 早期凋亡细胞只结合 Annexin V - FITC, 为 FITC 阳性; 坏死和晚期凋亡细胞为 Annexin V - FITC 和 PI 双阳性⁵。操作按试剂盒 (Becton Dickinson) 内说明书进行, 简述如下: 3 个 75 cm² 培养瓶 (Costar), 接种滑膜细胞数为 1×10^6 , 培养液为 10% NBS DMEM 15 ml, 48 h 后更换为无血清 DMEM 15 ml, 孵育 30 h 使细胞周期同步, 然后再更换为 10% NBS DMEM 培养 48 h, 使细胞进入增生期, 然后 1 培养瓶更换培养液为 8% NBS DMEM 继续培养 48 h, 另 2 瓶更换为含 5 μ mol/L ASP-ODN 的 ASP-ODN-Lipofectin 培养液, 其中一瓶继续培养 24 h, 另一瓶继续培养 48 h。培养结束后每瓶细胞用相差显微镜照相。然后每瓶细胞经 0.25% 胰酶消化后用冷 PBS 洗 2 次, 然后重悬浮于 $1 \times$ 结合缓冲液中, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 取 100 μ l 细胞悬液加入 5 ml 培养试管中, 然后加入 5 μ l Annexin V - FITC 和 5 μ l PI, 轻轻混匀, 于室温 (25 $^{\circ}$ C) 黑暗处孵育 15 min, 每管中再加入 400 μ l $1 \times$ 结合缓冲液, 然后使用 FACScan 流式细胞仪和 Cellquest 程序 (Becton Dickinson) 分析。

1.2.2.2 DNA 荧光色素染色检测凋亡: 取洁净无菌盖玻片放于 2 个 60 mm 培养皿 (IWAKI, Japan) 中, 每个培养皿中放 3 片, 接种滑膜细胞数为 5×10^6 , 培养液为 10% NBS DMEM 5 ml, 48 h 后更换为无血清 DMEM 5 ml, 孵育 30 h 使细胞周期同步, 然后再更换为 10% NBS DMEM 培养 48 h, 使细胞进入增生期, 然后一培养皿更换培养液为 8% NBS DMEM 继续培养 60 h, 另一个培养皿更换为含 5 μ mol/L ASP-ODN 的 ASP-ODN-Lipofectin 培养液, 继续培养 60 h。DNA 荧光染色按 Hoechst 染色试剂盒 (碧云天试剂公司) 内说明书操作, 简述如下: 上述培养结束后吸净培养液, 加入 0.5 ml 固定液, 固定 10 min; 去除固定液, 用 PBS 洗 2 次; 吸尽液体, 加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min; 滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片。荧光显微镜下观察。

1.2.3 C-myc 阳性细胞百分率测定

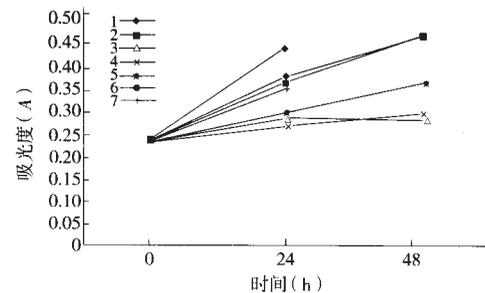
用藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 直接标记的 α -myc 单抗 (9E10) 经流式细胞仪测定 α -myc 阳性细胞百分率 3 个 75 cm² 培养瓶接种滑膜细胞的前期处理同凋亡的流式细胞仪分析中的程序, 各组细胞经胰酶消化完毕后, 转移入试管中, 冷 PBS 洗 2 次, 1

ml 多聚甲醛 (4 g/L) 室温下固定 15 min, 然后离心 1000 r/min 5 min, 弃上清, 加 70% 甲醇 300 μ l, 4 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 然后加入 PE 直接标记的 α -myc 单抗 10 μ l, 4 $^{\circ}$ C 于暗处作用 60 min。然后使用 FACScan 流式细胞仪和 Cellquest 程序分析。

2 结 果

2.1 相差显微镜观察细胞的生长情况: 见图 1a, b。经 ASP-ODN 5.0 μ mol/L 作用 24 h 的滑膜 B 型细胞增生较正常对照组明显受到抑制, 出现明显增多的小圆形死亡细胞。

2.2 C-myc ASP-ODN 抑制滑膜 B 型细胞增生: α -myc ASP-ODN 抑制滑膜 B 型细胞增生的效果用细胞生长曲线表示, 见图 2。未经 P-ODN 处理的正



1: 细胞正常对照; 2: ASP-ODN 1.25 μ mol/L; 3: ASP-ODN 2.5 μ mol/L; 4: ASP-ODN 5.0 μ mol/L; 5: ASP-ODN 10 μ mol/L; 6: SP-ODN 10 μ mol/L; 7: SP-ODN 20 μ mol/L。24h $P \geq 0.05$ 包括: 2: 1.6: 1.7: 1; $P < 0.01$ 包括: 3: 1.4: 1.5: 1。48h $P \geq 0.05$ 包括: 2: 1; $P < 0.05$ 包括: 5: 1; $P < 0.01$ 包括: 3: 1.4: 1。24h 和 48h 的 3, 4, 5 组之间相互比较 P 均 > 0.05

图 2 C-myc ASP-ODN 抑制滑膜 B 型细胞增生

常对照组细胞增生活跃, 经 ASP-ODN 1.25 μ mol/L 处理组的细胞在 24 h 和 48 h 均未受显著影响, 增生活跃; ASP-ODN 2.5, 5.0, 10 μ mol/L 处理的 3 组细胞的增生在作用 24 h 时就受到显著抑制, 并能持续至 48 h, 3 个浓度的 ASP-ODN 对细胞增生的抑制差异无显著性, 这 3 组细胞与正常对照组相比的百分率分别为 24 h: 76.15%, 71%, 78.05%; 48 h: 60.18%, 63.89%, 78.12%, 说明在以 10 mg/L 的 Lipofectin 阳离子脂质体为载体时 α -myc ASP-ODN 在 25 μ mol/L 的浓度对细胞增生的抑制作用已经达到饱和。10 μ mol/L SP-ODN 和 20 μ mol/L SP-ODN 在 24 h 对滑膜细胞的增生无显著影响 (流式细胞仪对凋亡的分析显示 ASP-ODN 对滑膜细胞增生的抑制作用在 24 h 附近, 故未对 SP-ODN 的作用进行 48 h 观测), 说明 α -myc ASP-ODN 对 RA 滑膜 B 型细胞的作用是序列特异性的。实验还检测了无 Lipofectin 时 P-ODN 对细胞增生的影响, 以及 Lipofectin 对细胞增生的影响。见表 1。在 48 h 时 Lipofectin (10 mg/L) 单独与细胞作用和 10

μ md/L ASP-ODN 单独与细胞作用对细胞增生均无显著影响。

表 1 Lipofectin ASP-ODN 48 h 分别对细胞增生的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	A 值	P 值
正常对照组	12	0.46 ± 0.09	
Lipofectin	5	0.42 ± 0.04	> 0.05
ASP-ODN	5	0.48 ± 0.12	> 0.05

注: P 值均为与正常对照组比较

2.3 流式细胞仪凋亡分析: 见图 3 和表 2 为流式细胞仪对正常对照组细胞、5 μ md/L c-myc ASP-ODN 作用于滑膜细胞 24 h、5 μ md/L c-myc ASP-ODN 作用于滑膜细胞 48 h 的分析结果。正常对照组细胞的凋亡及坏死不足 10%，而经 5 μ md/L c-myc ASP-ODN 作用 24 h 及 48 h 后凋亡及坏死细胞显著增加，分别达到 42.84% 和 32.3%。48 h 细胞凋亡的比例低于 24 h 细胞凋亡的比例，说明 c-myc ASP-ODN 抑制增生的高峰在 48 h 之前，从 24 h 和 48 h 处于凋亡早期细胞和凋亡晚期细胞所占的比例也可得出相同的结论。

表 2 ASP-ODN 诱导滑膜细胞凋亡分析 (%)

项目	正常细胞	凋亡早期	凋亡晚期及坏死
正常对照组	91.1	2.8	6.1
5 μ md/L ASP-ODN 24 h	57.2	22.2	20.7
5 μ md/L ASP-ODN 48 h	67.7	6.2	26.1

2.4 DNA 荧光色素染色结果: 见图 4, 部分细胞的细胞核内染色质浓聚, 荧光染色增强, 为凋亡细胞。进一步证实了 c-myc ASP-ODN 诱导细胞凋亡的结果。

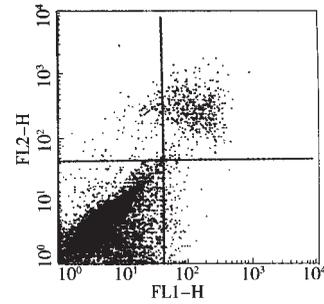
2.5 流式细胞仪分析 c-myc 阳性细胞结果: 见表 3, 5 μ md/L ASP-ODN 作用于 RA 滑膜细胞 24 h 时, 表达 c-myc 蛋白细胞的百分率已显著减少, c-myc 阳性细胞平均荧光强度亦显著下降, 并能持续至 48 h 以上。

表 3 流式细胞仪分析 c-myc 阳性细胞结果

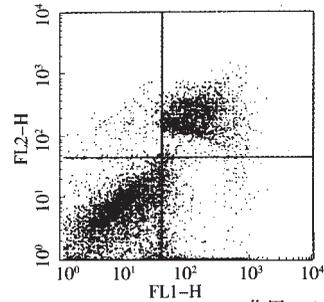
组别	c-myc 阳性细胞 %	c-myc 阳性细胞平均荧光强度
正常对照组	39.34	23.10
5 μ md/L ASP-ODN 24 h	4.09	11.58
5 μ md/L ASP-ODN 48 h	7.67	10.86

3 讨 论

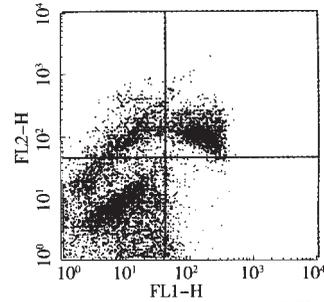
已有许多实验证实反义 c-myc 脱氧寡核苷酸或化学修饰的反义 c-myc 脱氧寡核苷酸能够抑制细胞增生, 并引起细胞凋亡, 而且大多采用针对 c-myc 基因第二外显子转录起始密码的一段序列 [4, 6, 7]。外源性反义寡核苷酸在体内很容易被核酸酶降解, 因此作为药物合成的反义寡核苷酸必须进行一定的改



a 正常对照组



b 5.0 μ mol/L c-myc ASP-ODN 作用 24 h



c 5.0 μ mol/L c-myc ASP-ODN 作用 48 h

图 3 RA 滑膜 B 型细胞 Annexin V/PI 染色后流式细胞

性, 才能对核酸酶有较强的抵抗, 以期在靶位点达到有效浓度, 同时又不增加其毒性。在多种改性方法中, 以硫代磷酸修饰寡核苷酸的磷酸二酯键最为常用, 它保留了原有的电子结构, 其物化和生化性质与正常 DNA 片段很相似, 由于修饰的原子的亲脂性比氧原子强, 所以增大了寡核苷酸的亲脂性, 它可通过受体作用完整地进入细胞内, 其抗细胞内核酸酶的能力很强, 同时它还能激活核酸酶 Rnase H, Rnase H 的作用是当 DNA 和互补的 RNA 杂交成 DNA·RNA 双螺旋后, Rnase H 能切断双链中的 RNA 链, 但它不切断 RNA·RNA 双螺旋或单链 RNA 分子。不足之处: 存在序列非特异性作用 (主要是在高浓度时, > 500 nmd/L) 和细胞摄取相对较差 [8, 9]。应用脂质体作为载体既可防止寡核苷酸 (ODN) 被核酶降解又可增加细胞膜对 ODN 的通透性, 使转染率提高并降低 ODN 的使用浓度。脂质体已被美国癌症协会批准为临床基因治疗的首选载体。脂质体是人工制备的由

磷脂双分子定向排列而成的类脂小体, 主要成分是天然磷脂和类固醇, 具有制备简单、适合生物体内降解、无毒和免疫源性, 各种水溶性和脂溶性分子都可以很容易被包入脂质体, 十分利于用来传递反义制剂。实验表明, FITC 标记的寡核苷酸主要分布在细胞表面和呈点状分布在胞质中, 当与阳离子脂质体形成复合物后, 细胞吸收寡核苷酸显著增加, 荧光主要分布在细胞核内^[10,11]。本实验在有血清的条件下进行, **c-myc ASP-ODN** 在没有载体的情况下, 对滑膜细胞的增生未产生抑制作用, 加入阳离子脂质体 **Lipofectin** 后 **2.5 μmol/L c-myc ASP-ODN** 作用于滑膜细胞 **24 h** 就已产生了明显的抑制增生作用, 说明硫代磷酸化寡脱氧核苷酸的细胞摄取差, 阳离子脂质体能够促进硫代磷酸化寡脱氧核苷酸的细胞摄取。与 **Hashiramto** 在无血清条件下 **c-myc ASODN** 对滑膜 **B** 型细胞有抑制作用对照, 说明血清对 **ODN** 具有破坏作用。

静止期细胞在丝裂原诱导下转变为增生期细胞的过程中, **c-myc** 属极早期快速反应基因, **c-myc** 可上调周期素 **D1A** 和 **E** 并且在增生细胞的整个细胞周期中均有一定程度的表达。而且成纤维细胞的 **c-myc mRNA** 和蛋白质的半寿期极短, **c-myc** 蛋白的持续存在源于持续基因表达^[12,13], 因此抑制 **c-myc** 合成(包括转录和翻译)应能影响处于细胞增生周期中各时期的增生期细胞。虽然有些实验证明 **c-myc** 反义寡核苷酸抑制 **c-myc** 表达能抑制周期素活性, 使细胞周期阻滞^[14]。然而, 本实验及其他一些实验^[4,15,16] 表明 **c-myc** 反义寡核苷酸对细胞的作用是以诱导凋亡为主, 而不是以细胞周期阻滞为主。有研究结果表明 **c-myc** 对凋亡和有丝分裂的调节是独立的下游事件, 相互并不依赖^[17]。研究表明 **c-myc ASODN** 诱导 **RA** 滑膜细胞凋亡不是通过 **Fas** 的作用途径^[4]。凋亡的另一条触发途径由线粒体释放细胞色素 **c** 介导^[14], **c-myc** 对线粒体的某些蛋白合成具有调节作用^[18], 但是否可直接或间接影响其释放细胞色素 **C** 尚待实验证明。本实验是在细胞培养水平进行的抑制 **RA** 滑膜 **B** 型细胞增生的研究, 其体内治疗 **RA** 的有效性虽尚无报道, 但 **c-myc** 反义寡核苷酸体内治疗其他疾病已有实验报道^[19,20], 因此这种反义核酸技术可能成为治疗 **RA** 的一种新手段。

(本文图 1,4 见插页第 2-1 页)

参考文献

1 Putnam DA. Antisense strategies and therapeutic applications. *Am J*

Health Syst Pharm, 1996, 53: 151-160.

- 2 Zhenhong QU, Garcia CH, O'Rourke LM, et al. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia: results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin-*c-myc* and nudc/ar organizer region staining. *Arthritis Rheum*, 1994, 37: 212-220.
- 3 Catapano CV, McGuffie EM, Pacheco D, et al. Inhibition of gene expression and cell proliferation by triple helix-forming digynucleotides directed to the *c-myc* gene. *Biochemistry*, 2000, 39: 5126-5138.
- 4 Hashiramto A, Sano H, Maekawa H, et al. *C-myc* antisense digynucleotides can induce apoptosis and down-regulate *fas* expression in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum*, 1999, 42: 954-962.
- 5 Span LFR, Pennings AHM, Vierwinden G, et al. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry*, 2002, 47: 24-31.
- 6 Coutis CM, Lee C, Nardone V, et al. Inhibition of *c-myc* expression in cells by targeting an RNA-protein interaction using antisense digynucleotides. *Molecular Pharmacology*, 2000, 57: 485-494.
- 7 边杰芳, 张柏根, 陈诗书, 等. 反义 *c-myc* 增殖细胞核抗原基因片段抑制血管平滑肌细胞相关基因表达. *中华医学杂志*, 1999, 79: 10-14.
- 8 Morita BP. First- and second-generation antisense inhibitors targeted to human *c-raf* kinase: *in vitro* and *in vivo* studies. *Anticancer Drug Des*, 1997, 12: 327.
- 9 白春礼, 方晔, 唐有祺. 三链核酸的结构与生物化学. 北京: 科学出版社, 1996, 171-265.
- 10 平其能, 郭建新. 脂质体在基因治疗中的应用. *药学进展*, 1998, 22: 69-73.
- 11 Kanamaru T, Takagi T, Takakura Y, et al. Biological effects and cellular uptake of *c-myc* antisense digynucleotides and their cationic liposome complexes. *J Drug Target*, 1998, 5: 235-246.
- 12 Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell*, 1992, 69: 119-128.
- 13 Dang CV. *C-myc* target genes involved cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 1-11.
- 14 Cardoll JS, Swarbrick A, Musgrove EA, et al. Mechanisms of growth arrest by *c-myc* antisense digynucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens. *Cancer Res*, 2002, 62: 3126-3131.
- 15 Kimura S, Maekawa T, Hirakawa K, et al. Alteration of *c-myc* expression by antisense digynucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells. *Cancer Res*, 1995, 55: 1379-1384.
- 16 党双锁, 李林瑞, 刘效恭, 等. 脂质体介导 *c-myc* 基因反义寡核苷酸对人肝癌细胞的生物学影响. *中华实验外科学杂志*, 2000, 17: 533-534.
- 17 Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, et al. Activation of cyclin-dependent kinases by *myc* mediates induction of cyclin *a*, but not apoptosis. *EMBO J*, 1996, 15: 3065-3076.
- 18 Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*, 2002, 40: 275-284.
- 19 Kipshidze N, Keane E, Stein D, et al. Local delivery of *c-myc* neutrally

charged antisense digonucleotides with transport catheter inhibits myocardial hyperplasia and positively affects vascular remodeling in the rabbit balloon injury model. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2001, 54: 247- 256.

phosphorothioate digonucleotide against the c-myc oncogene in cynomolgus monkeys. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001, 11: 155- 163.

(收稿日期: 2003- 09- 30)

(本文编辑: 董海原)

20 Webb MS, Tortora N, Crenese M, et al. Toxicity and toxicokinetics of a

• 病例报告 •

尼美舒利致严重肝损害一例

陈丹丹 杨岫岩 梁柳琴 刘时荣 尹培达 叶玉津

根据欧洲药物不良事件报道的资料, 尼美舒利致严重肝损害的发生率大约为 **0.1/100 000**¹。国外报道的病例中, 最早的患者在用药第 **7** 天发生肝损害。而我们发现 **1** 例在用药第 **4** 天即出现严重肝损害, 现报告如下。

患者: 男性, **24** 岁。因反复发热、皮疹、关节痛 **4** 个月入院。在当地诊断为“成人斯蒂尔病”, 曾用大剂量激素治疗有效。停药后复发, 而收入我院进一步诊治。入院查体, 体温 **39.6** °C, 全身各关节无红肿热痛及皮疹, 肝脾肋下未及。血白细胞 **10.79** × **10⁹/L**, 中性粒细胞 **9.29** × **10⁹/L**, 血红蛋白 **94 g/L**; 血沉 **64 mm/h**, C 反应蛋白 **112 ng/L**; 肝功能正常; 血清铁蛋白 **2819.20** μg/L (正常值 **16.4-323** μg/L); 腹部 **B** 超示脾脏增大, **14 cm** × **5.4 cm**, 肝未见异常。诊断: 成人斯蒂尔病。入院后给予口服尼美舒利 **100 ng** (海南中瑞康芝制药有限公司), 每 **12 h 1** 次。当日起体温恢复正常, 关节肌肉疼痛基本消失。第 **4** 天出现上腹不适, 伴厌食、恶心呕吐, 用吗叮啉对症治疗无效, 第 **6** 天检查丙氨酸转氨酶 (**ALT**)、天冬氨酸转氨酶 (**AST**) 显著升高, 胆红素轻度升高, 白蛋白下降。即停尼美舒利, 改用罗非昔布控制原发病, 并积极护肝治疗。**2 d** 后复查肝功能开始好转, **2** 周后基本恢复正常(见表 1)。

讨论: 与其他的非甾体抗炎药相比, 尼美舒利具有较强的退热与抗炎作用, 胃肠道副作用较少。但近年陆续有尼美舒利肝毒性的报道, 其中芬兰和西班牙两国于 **2002** 年宣布停止尼美舒利在市场上的销售。在芬兰尼美舒利的副反应发生率为 **100/100 000** 病人年²; 西班牙资料显示, 平均每销售 **100** 万盒尼美舒利发生 **9.37** 例相关的肝损害³。然而最近在意大利进行的一项以 **835 000** 例长期服用非甾体抗炎药的病人为观察对象的回顾性队列研究则表明, 尼美舒利的肝毒性仅略高于其他的非甾体抗炎药²。虽然尼美舒利的肝毒性发生率甚低, 但已被世界各国注意。至今为止, 全球尼美舒利导致严重肝损害的报道有 **30** 多例。除印度有较多儿童病例的报道外,

表 1 口服尼美舒利治疗前后肝功能的变化的变化

项目	AST		ALT		总胆红素	直接胆红素	白蛋白	球蛋白
	U/L	U/L	μmol/L	μmol/L	g/L	g/L	g/L	g/L
治疗前	43	26	14.3	5.2	33	40		
治疗后 第 6 天	1263	1351	29.5	20.8	26	44		
第 8 天	840	1078	26.5	18.6	26	41		
第 10 天	260	656	22.2	13.9	32	43		
第 12 天	56	270	18.9	10.1	34	40		
第 16 天	60	54	16.2	6.4	36	46		
第 24 天	47	47	10.1	4.6	36	38		

其余大部分是 **50** 岁以上患者, 以女性居多。尼美舒利疗程最短为 **7 d**, 最长 **180 d**, 平均 **62 d**⁴。虽然国外所报道的病例中, 有过半数的死亡或需要肝脏移植者, 但监测密切和及时停药者也有得以恢复。本例为 **24** 岁的年轻男性, 用药第 **4** 天即有肝功能损害的临床表现, 第 **6** 天查肝功能已出现严重的肝酶增高, 是目前国际上报道的尼美舒利严重肝损害者中, 疗程最短的病例。由于及时停药和护肝治疗, 病人的肝损害迅速恢复。

通过本例的经验和国外相关报道, 我们建议, 应慎用尼美舒利治疗关节炎, 而在用于治疗成人斯蒂尔病或其他非感染、非肿瘤性炎症和 / 或发热者, 应注意监测肝功能。

参考文献

- 1 Boelsterli UA. Mechanisms of NSAID- induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Saf*, 2002, 25: 633- 648.
- 2 Traversa G, Bianchi C, DeCas R, et al. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non- steroidal anti- inflammatory drugs. *Br Med J* 2003, 327: 18- 22.
- 3 Macia MA, Carvajal A, del Pozo JG, et al. Hepatotoxicity associated with nimesulide: data from the Spanish pharmacovigilance system. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72: 596- 597.
- 4 Mariani G, Fox M, Oshen HP, et al. Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. *Eur J Clin Pharmacol*, 2001, 57: 321- 326.

(收稿日期: 2003- 08- 08)

(本文编辑: 郝慧琴)

作者单位: 510080 广州, 中山大学附属第一医院风湿免疫内科 (陈丹丹、杨岫岩、梁柳琴、尹培达、叶玉津); 河南省栾川县人民医院风湿科 (刘时荣)

C-myc 反义寡脱氧核苷酸抑制类风湿滑膜细胞增生诱导滑膜细胞凋亡

(正文见第 67 页)

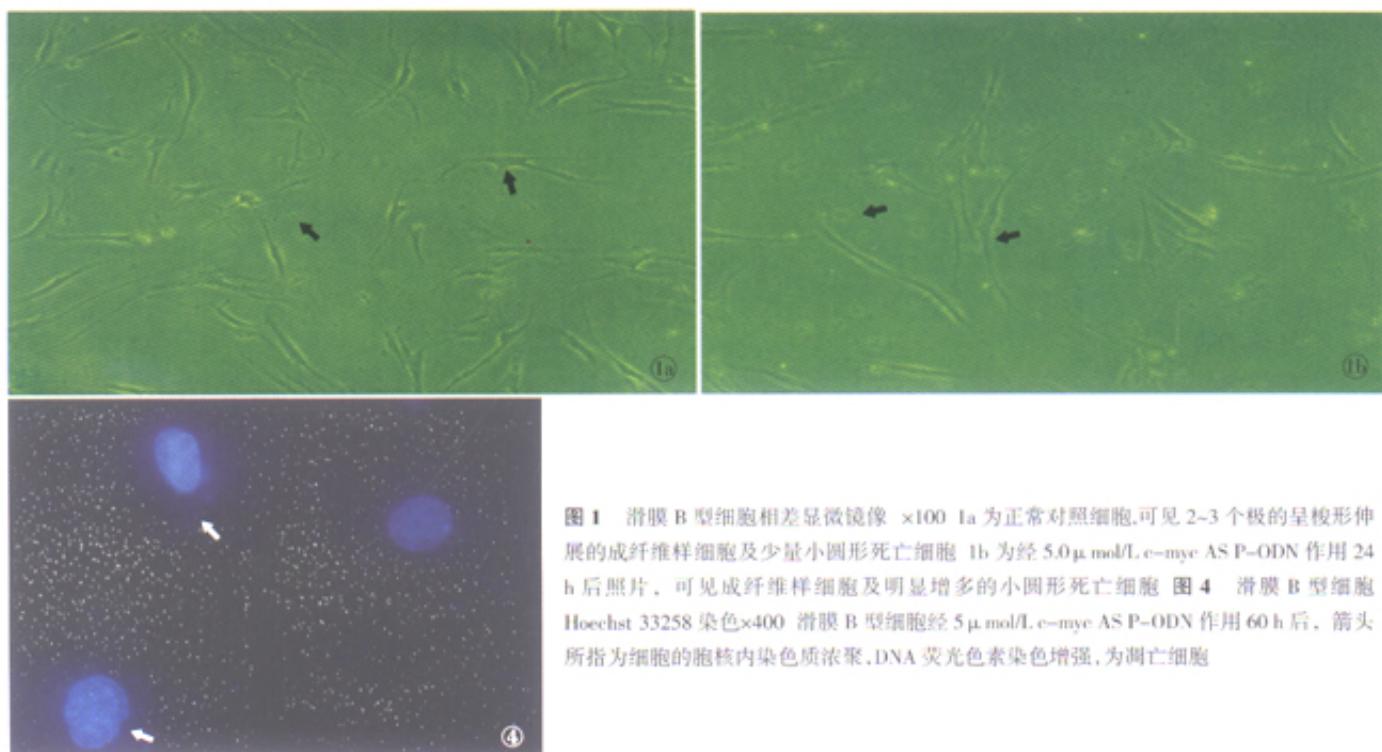


图 1 滑膜 B 型细胞相差显微镜像 $\times 100$ 1a 为正常对照细胞,可见 2-3 个极的呈梭形伸展的成纤维样细胞及少量小圆形死亡细胞 1b 为经 $5.0 \mu\text{mol/L}$ c-myc AS P-ODN 作用 24 h 后照片,可见成纤维样细胞及明显增多的小圆形死亡细胞 图 4 滑膜 B 型细胞 Hoechst 33258 染色 $\times 400$ 滑膜 B 型细胞经 $5 \mu\text{mol/L}$ c-myc AS P-ODN 作用 60 h 后,箭头所指为细胞的胞核内染色质浓聚, DNA 荧光色素染色增强,为凋亡细胞

甲状旁腺素相关肽对骨髓基质细胞中 RANKL 及 OPG 基因的影响

(正文见第 77 页)

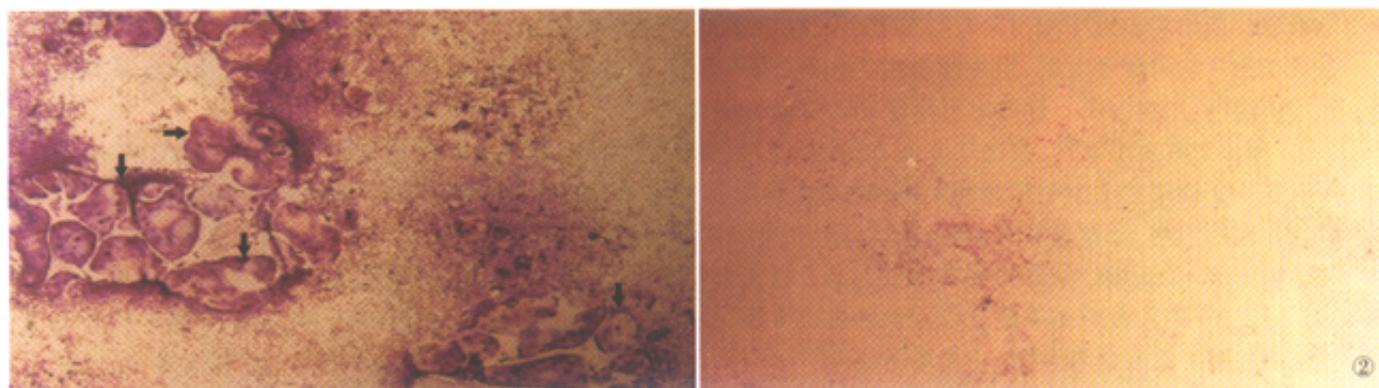


图 1 在 45 ng/ml 的 PTHrP 刺激下大量破骨细胞生成 抗酒石酸染色 $\times 200$ 图 2 无 PTHrP 的刺激,骨髓细胞培养未见破骨细胞生成 抗酒石酸染色 $\times 200$

^{99}Tc -亚甲基二膦酸盐治疗股骨头坏死动物研究及初步临床应用

(正文见第 80 页)

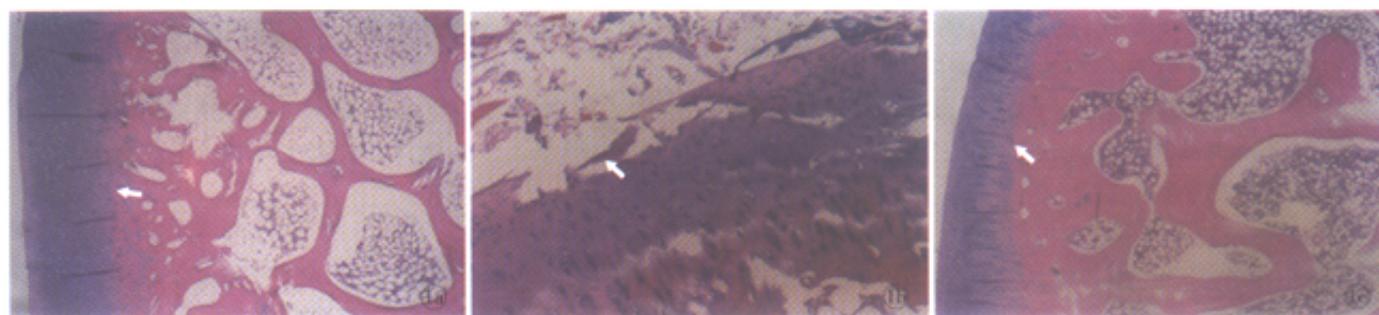


图 1a 正常兔股骨头病理切片 HE $\times 400$ 图 1b 兔股骨头坏死模型病理切片 HE $\times 400$ 图 1c 兔股骨头坏死模型经 ^{99}Tc -亚甲基二膦酸盐治疗后病理切片 HE $\times 400$