

· 论 著 ·

α -干扰素联合脂多糖在体外抑制急性髓系白血病细胞株 U937 和 HL60 增殖的效应*

陈蓓莉, 王晓桃[△], 林文远, 刘 健, 莫东华
(桂林医学院附属医院血液内科, 广西 541001)

摘要:目的 探讨 α -干扰素联合脂多糖在体外对髓系白血病(AML)细胞系 U937、HL60 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响。方法 用四甲基偶氮唑蓝法检测 α -干扰素和(或)脂多糖对 U937、HL60 细胞增殖作用的影响;流式细胞仪检测 α -干扰素和(或)脂多糖对 U937、HL60 细胞的凋亡率和细胞周期的影响。结果 (1)单用 α -干扰素或脂多糖组较对照组能显著地抑制 U937、HL60 细胞的增殖、增加细胞的凋亡率和增加 G₁ 期细胞($P < 0.05$)。(2) α -干扰素联合脂多糖组较单用 α -干扰素或脂多糖组及对照组均能显著地抑制 U937、HL60 细胞的增殖、增加细胞的凋亡率和增加 G₁ 期细胞($P < 0.05$)。结论 α -干扰素联合脂多糖对白血病细胞增殖抑制及凋亡促进有协同增强作用。

关键词:髓系白血病; α -干扰素; 脂多糖; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.005

中图分类号:R733.7;R73-362

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3162-03

Inhibitory effects of IFN- α and lipopolysaccharide on proliferation of acute myeloma leukemia cell lines U937 and UL60 in vitro*

CHEN Bei-li, WANG Xiao-tao[△], LIN Wen-yuan, et al.

(Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of IFN- α in combination with lipopolysaccharide on the cellular proliferation, apoptosis and cell cycle of acute myelogenous leukemia(AML) cell lines U937 and HL60 in vitro. Methods The effects of IFN- α and lipopolysaccharide on AML cell lines U937 and HL60 proliferation were detected by MTT. Cells apoptotic rate and cell cycle were evaluated by using annexin-V FITC/PI apoptotic kit and flow cytometry, respectively. Results (1) We found that IFN- α or lipopolysaccharide alone could inhibit leukemic proliferation, increase cellular apoptotic rate and percentage of cells at G₁ phase significantly, comparing with the control group($P < 0.05$). (2) IFN- α in combination with lipopolysaccharide could inhibit leukemic proliferation, increase the cellular apoptotic rate and percentage of cells at G₁ phase significantly, comparing with IFN- α or lipopolysaccharide alone and the control group, respectively($P < 0.05$). Conclusion IFN- α in combination with lipopolysaccharide has synergistic effect on the proliferation inhibition and cellular apoptotic induction of AML cells.

Key words: acute myelogenous leukemia; IFN- α ; lipopolysaccharide; apoptosis

α -干扰素(interferon- α , IFN- α)能够抑制肿瘤细胞的生长,增加 NK 细胞以及其他免疫活性细胞的功能,具有广谱的抗肿瘤活性,目前已被广泛应用于血液系统肿瘤的治疗^[1]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类介导天然免疫反应并桥接或触发适应性免疫模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)^[2]。熊芳等^[3]首次在国内报道 TLR1~9 都在 U937 细胞表达,而内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为 Toll 样受体的主要外源性配体, LPS 须与其受体 TLR4 结合后通过信号转导的级联反应方能产生效应^[4]。因此, α -干扰素与 LPS 联合能否增强 U937 细胞的凋亡需要进一步研究。Manfred 等^[4]报道 α -干扰素联合 Toll 样受体激动剂如 LPS 可增强外周血单核细胞的凋亡; Huang 等^[5]报道通过激活 TLR 信号转导途径可增强多种肿瘤细胞的凋亡。而 α -干扰素联合 LPS 能否增强白血病细胞的凋亡国内未见报道。本研究旨在体外研究 α -干扰素联合脂多糖对白血病细胞增殖及凋亡有无

协同作用,为 TLR 配体作为佐剂的使用及协同 α -干扰素在免疫治疗白血病中开拓出一条新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人急性髓系白血病(AML)细胞株 U937、HL60 购自上海细胞所。

1.2 实验材料与仪器 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂); 24 孔、96 孔培养板(美国 Corning 公司); RPMI-Medium1640 干粉、胎牛血清(FBS, 天津血液病研究所); 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、DMSO 溶液(北京 SABC 公司产品); AnnexinV/PI(碘化丙锭)试剂盒(德国 Bender 公司); RT-PCR 试剂盒(南京博泰生物技术有限公司); 引物合成(北京赛百盛生物公司); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); 各种引物序列(上海博亚生物技术有限公司); 自动酶标读数仪(国产 DG-3022); Fluor ChemTM8900 凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司)等。

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(Z0848017)。 [△] 通讯作者,电话:18977322362; E-mail: wxtjtl@126.com。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞传代培养 急性髓系白血病细胞株 U937、HL60 从外室引进后,常规离心弃上清液,复苏后的细胞在含体积分数 10% 的加热灭活的胎牛血清(10% FBS)及 100 M/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37 °C、饱和湿度、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中培养,每 3 天更换培养基并传代 1 次。本实验用的细胞均处于对数生长期。

1.3.2 MTT 法检测 α-干扰素联合脂多糖抑制白血病细胞增殖的作用 根据处理细胞药物的不同将实验组分为单用 1 000 u/mL α-干扰素组、单用 100 ng/mL 脂多糖组,按上述剂量 1 : 1 组成 α-干扰素联合脂多糖组共 3 组;对照组则为不加任何药物处理细胞组。将实验组中的 U937、HL60 细胞株 0.1 mL 加入 96 孔平底培养板中,使细胞浓度为 5 × 10⁵ /mL,每组重复 8 孔,对照组加入等体积培养液,每孔最终体积为 200 μL。给药后置 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养,每 3 天更换 1 次培养液。在终止培养前 4 h 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,每孔加 150 μL DMSO 终止培养,使结晶溶解。置酶联免疫检测仪下测吸光度内值,计算其细胞生长抑制率(%) = (1 - A 处理组 / A 对照组) × 100%,如为对照组,则以第 1 孔为参照值,其余孔与其对照即可。

1.3.3 AnnexinV-FITC/PI 双染色流式细胞仪检测 α-干扰素联合脂多糖对白血病细胞凋亡的影响 实验分组同上,将人 U937、HL60 细胞株 0.1 mL 置于 10% FCS 培养基中培养过夜,调节细胞密度至 5 × 10⁶ /mL,按实验分组再在含 10% FBS 的 RPMI1640 的培养基中共同培育 24 h 后,收集细胞约 5 × 10⁵ 个,用 Binding Buffer 洗 1 次,100 μL Binding Buffer 重悬,加 5 μL AnnexinV-FITC,避光孵育 20 min,再加 10 μL PI(浓度为 1 mg/mL)避光室温下孵育 15 min,Binding Buffer 洗涤、重悬,立即用 FCM 检测,每个样品至少检测 1 × 10⁵ 个细胞。对照组为不含任何药物的等体积培养液。利用 Cell Quest 功能软件进行参数获取和数据分析。每组样品重复 3 次,取均数。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期 实验分组同上,将人 U937、HL60 细胞株在无血清培养液培养 24 h,使细胞生长周期同步化,调节细胞密度至 1 × 10⁶ /mL,按实验分组再在含 10% FBS 的 RPMI1640 的培养基中共同培育 48 h 后,600 ~ 800 r/min 离心收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,DNA-Prepstain 染液染色,用 FCM 检测,每份样品约 5 000 细胞,用 DNA Multi Cycle 软件进行统计学拟合分析各组细胞周期时相。对照组为不含任何药物的等体积培养液。每组样品重复 3 次,取均数。

1.4 统计学处理 应用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析,参数检验的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多均数比较用单因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组对 U937、HL60 细胞抑制率和凋亡率 不同药物与白血病细胞株 U937、HL60 作用 48 h 后的抑制率和凋亡率见表 1。从表 1 可知,实验组与对照组之间抑制率相比差异有统计学意义($F = 204.67, P = 0$)。对照组中的 AML 原代细胞凋亡率为(6.53 ± 1.32)%,实验组与对照组之间凋亡率差异有统

计学意义($F = 42.11, P < 0.05$)。事后经 LSD 分析:实验组中各组的抑制率和凋亡率较对照组均明显提高($P = 0$);实验组中 α-干扰素联合脂多糖组与 α-干扰素、脂多糖组两组之间差异均有统计学意义($P = 0$),而 α-干扰素组与脂多糖组之间差异无统计学意义($P > 0.1$)。

表 1 各组 U937、HL60 细胞的抑制率和凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率	凋亡率
对照组	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.04
α-干扰素组	0.37 ± 0.05*#	0.31 ± 0.04*△#
脂多糖组	0.30 ± 0.07*#	0.25 ± 0.05△#
α-干扰素联合脂多糖组	0.69 ± 0.04*	0.51 ± 0.13△

* : $P = 0$, △ : $P < 0.05$, 与对照组比较; # : $P = 0$, 与 α-干扰素联合脂多糖组比较。

2.2 各组对 U937、HL60 细胞周期的变化 各实验组中 U937、HL60 细胞 G₁ 期比例增加,S 期和 G₂ 期比例减少,而对对照组中 AML 原代细胞 S 期比例偏高,G₁ 期和 G₂ 期比例偏低,见表 2。各实验组中 G₁ 期细胞与对照组之间差异有统计学意义。事后经 LSD 分析发现实验组中各组的凋亡率较对照组均明显提高($P < 0.05$);实验组中 α-干扰素联合脂多糖组与 α-干扰素、脂多糖组两组差异均有统计学意义($P = 0$),α-干扰素组与脂多糖组差异有统计学意义($P = 0.03$)。

表 2 各组对 U937、HL60 细胞周期的改变($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₁	S	G ₂
对照组	0.23 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.22 ± 0.03
α-干扰素组	0.34 ± 0.03*	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03
脂多糖组	0.29 ± 0.05*	0.37 ± 0.05	0.21 ± 0.03
α-干扰素联合脂多糖组	0.49 ± 0.05*	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.01

* : $P = 0$, 与对照组比较。

3 讨 论

急性白血病的发生、发展是一个多基因、多步骤、多阶段的复杂过程。细胞凋亡异常对白血病耐药性的产生至关重要。因此,通过研究白血病凋亡机制、促进白血病细胞凋亡,可为白血病的治疗提供新的方法。

α-干扰素已经广泛用于恶性血液病的治疗并均有显著效果^[6]。其治疗急性白血病的机制主要是通过调节宿主免疫学反应的活性作用或通过对肿瘤细胞增殖的直接抑制作用发挥抗白血病效应^[7]。还可以通过调节凋亡调控因子的变化,如提高肿瘤坏死因子的活性、激活 Caspase 系统、调节白细胞介素活性及改变凋亡调控基因的表达等多种途径诱导白血病细胞凋亡^[8-9]。本研究也证实了 α-干扰素组较对照组而言,能显著地抑制白血病细胞株 U937、HL60 的增殖,增加 G₁ 期细胞的比率,阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,S 期细胞比例减少,诱导白血病细胞凋亡率增加。

而 TLRs 是介导天然免疫反应并桥接或触发适应性免疫^[10-11],有研究报道 TLR1~8 在急性髓系白血病(AML)细胞株 U937 细胞均有表达,且运用 TLR8 受体激动剂 ssRNA40/LyoVec 能显著抑制 U937 细胞增殖,阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,但

无明显的促凋亡作用^[12-13]。本研究发现 100 ng/mL 脂多糖较对照组而言,能显著地抑制白血病细胞株 U937、HL60 的增殖,增加 G₁ 期细胞的比率,阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,S 期细胞比例减少、细胞凋亡率增加。

α-干扰素与脂多糖均能抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,本研究中将两者以 1:1 处理白血病细胞株 U937、HL60,发现两者联合后较单用其中一种,其白血病细胞的增殖抑制率、细胞凋亡率及阻滞细胞周期均有显著提高($P < 0.05$)。这与 Manfred 等^[4]报道 α-干扰素联合脂多糖能明显增强白血病细胞的凋亡相一致。其机制可能在脂多糖处理白血病细胞后启动 Toll 样受体发生级连反应,促发机体的免疫反应,增强 α-干扰素的协同抗白血病效应。也可能是两者联合处理细胞后,激活细胞内外多条信号通路,导致 Caspase-8 等活化进一步加强,促进细胞外凋亡途径加强,并释放一些凋亡相关蛋白如 Fas 等促发线粒体介导的细胞凋亡,从而进一步增强细胞凋亡^[14-15]。

综上所述,α-干扰素与脂多糖联合使用可协同增强抗白血病作用,将为 IFN-α 协同 TLR 激动剂或 TLR 配体佐剂的使用为临床免疫治疗白血病提供坚实的理论依据。

参考文献:

[1] Fraser CK, Lousberg EL, Kumar R, et al. Dasatinib inhibits the secretion of TNF-α following TLR stimulation in vitro and in vivo[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1435.

[2] 叶燕, 夏大静. Toll 样受体与树突状细胞介导的天然免疫和获得性免疫[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 15(5): 637.

[3] 熊芳, 王兴兵, 张佳华, 等. Toll 样受体在 U937 细胞的表达及其作用研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(3): 449.

[4] Manfred L, Marco B, Daniel S, et al. Caspase-8 dependent apoptosis induction in malignant myeloid cells by TLR stimulation in the presence of IFN-α[J]. *Leukemia Research*, 2008, 31(12): 1729.

[5] Huang B, Zhao J, Unkeless JC, et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double edged sword[J]. *Oncogene*, 2008, 27(2): 218.

[6] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. Acute myeloid leu-

kemic cell lines loaded with synthetic dsRNA trigger IFN-γ secretion by human NK cells[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(4): 539.

[7] Lee WH, Liu FH, Lee YL, et al. Interferon-α induces the growth inhibition of human T-cell leukaemia line Jurkat through p38 α and p38 β[J]. *J Biochem*, 2010, 147(5): 645.

[8] Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon stimulated genes as mediators apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2003, 8: 237.

[9] Keating A. Chronic myeloid leukemia: current therapies and the potential role of farnesyltransferase inhibitors[J]. *Semin Hematol*, 2002, 39(3 Suppl 12): S11.

[10] 杨清武, 李敬诚, 曹参祥, 等. 急性脑梗死患者外周血单核细胞 TLR4 表达及其与 TNF-α、IL-6 的相关性[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1239.

[11] Schmitt A, Li L, Giannopoulos K, et al. Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Transfusion*, 2008, 48(5): 861.

[12] Srivastava MD, Srivastava BI. Expression of mRNA and proteins for toll-like receptors, associated molecules, defensins and LL-37 by SRIK-NKL, a CD8+ NK/T cell line[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(7): 813.

[13] 刘建仓, 周荣, 刘良明, 等. 细菌脂多糖诱导人单核细胞株对细菌脂蛋白的耐受性及其与肌动蛋白骨架关系[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 15(5): 747.

[14] 陈建清, 吴晓安, 骆锦忠, 等. 胸腺肽 α1 对成人急性非淋巴细胞性白血病诱导化疗免疫功能的影响[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2009, 12(6): 495.

[15] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. Acute myeloid leukemic cell lines loaded with synthetic dsRNA trigger IFN-γ secretion by human NK cells[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(4): 539.

(收稿日期: 2010-06-31 修回日期: 2010-08-05)

(上接第 3161 页)

metal cations[J]. *J dent Res*, 1995, 74(8): 1513.

[12] 周序珑, 沈丽佳, 谢立群. 口腔增生性病变 PCNA 和微血管密度的定量研究及其意义[J]. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(4): 345.

[13] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1129.

[14] Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, et al. Apoptosis-associated markers in oral LP[J]. *J orol Pathol Med*, 1997, 85(1): 26.

[15] 苏俭生, 郭凌云, 俞懿强, 等. 铸造合金全冠戴用后对外周静脉血淋巴细胞凋亡的影响[J]. *复旦学报: 医学版*, 2006, 33(3): 315.

(收稿日期: 2010-06-03 修回日期: 2010-07-23)