

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0034- 05

人 α 干扰素诱导骨肉瘤细胞 Anoikis 凋亡

吕海¹, 郑燕芳², 金大地¹ (1. 第一军医大学南方医院脊柱骨科, 广州 510515; 2. 第一军医大学珠江医院肿瘤科, 广州 510282)

[摘要] **目的:** 恶性肿瘤细胞逃避 Anoikis 凋亡的特性是其原位侵袭和远处转移的一个重要原因。本文旨在研究应用人干扰素(IFN) α 2a 诱导骨肉瘤细胞出现 Anoikis 凋亡, 并深入探讨其产生机理及信号传导途径。**方法:** 采用抑制接触培养法建立细胞 Anoikis 凋亡诱导模型。观测 IFN- α 2a 诱导骨肉瘤细胞 MG- 63 产生的 Anoikis 凋亡。TUNEL 法形态学检测 MG- 63 细胞凋亡, 流式细胞仪定量检测细胞凋亡程度和细胞表面整联蛋白受体表达。特异性底物切开发检测半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶(cysteine aspartate-specific proteases, caspase)信号途径。**结果:** 人 IFN- α 2a 可明显诱导骨肉瘤细胞 MG- 63 产生 Anoikis 现象, 并诱导了 MG- 63 细胞 caspase-8 和 caspase-3 的活性, 但 IFN 对整联蛋白亚单位 α 4, α 5 及 α v 无明显影响, 上述整联蛋白封闭抗体对 IFN α -2a 诱导的 MG- 63 细胞 Anoikis 凋亡无明显影响。**结论:** 人干扰素 α 2a 可以在体外通过调节细胞 caspase 信号途径, 诱导骨肉瘤细胞 MG- 63 产生 Anoikis 现象, 从而抑制骨肉瘤的转移。

[关键词] 干扰素; 骨肉瘤; Anoikis 凋亡; 转移; 信号传导

[中图分类号] R737.33 [文献标识码] A

Induction of Osteosarcoma Anoikis Apoptosis by Human Interferon- α

LÜ Hai, ZHENG Yan-fang, JIN Da-di (Oncology Center, Zhujiang Hospital, the First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

[Abstract] **Objective:** Survived from Anoikis is one important reason for malignant tumor performing metastasis and local invasion. The present study focused on the mechanism and signal transduction of osteosarcoma anoikis induced by human interferon (IFN) α 2a. **Methods:** Interferon- α 2a induced anoikis was detected on a non-attachment culture model. The osteosarcoma anoikis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL) method. Osteosarcoma cells apoptosis and integrin receptors expression were detected by flow cytometry. The cysteine aspartate-specific proteases (caspase) signal transduction was detected by cleavage of synthetic substrates. **Results:** Human IFN- α 2a induced the anoikis apoptosis of osteosarcoma cell MG- 63, with concomitant upregulation of caspase-8 and caspase-3 activity. The expression of integrin receptor α and α v was not influenced evidently. **Conclusion:** The present results suggested that human IFN- α 2a decreased the metastasis of osteosarcoma by inducing the anoikis of osteosarcoma cell MG- 63. Our results also indicated that caspase signal transduction might regulate this anoikis apoptosis in MG- 63.

[Key words] interferon; osteosarcoma; anoikis apoptosis; metastasis; signal transduction

* 骨肉瘤是临床上最常见的一种恶性骨肿瘤, 具有较强的局部侵袭及远处转移的能力。这一特性不但提高了原发病灶手术切除的难度, 而且由于患者出现早期、多发转移而丧失了手术治疗的时机。应用 α 干扰素治疗多种恶性肿瘤已有 30 多年的历史, 最近, Todesco 等^[1] 在临床应用 α 干扰素治疗骨肉瘤患者, 取得了令人鼓舞的疗效。他们总结认为干扰素对肿瘤切除术后残余灶的复发转移具有较好的防治作用。Jia^[2] 等发现 α 干扰素可以提高体外培养的骨肉瘤细胞对化疗

药物的敏感性, 最终提高治疗效果。楼国良等^[3] 也发现重组干扰素对肿瘤有明显的抑制作用。但 α 干扰素对骨肉瘤的治疗机理至今还不很清楚^[4]。

恶性肿瘤细胞之所以有别于正常细胞, 出现局部侵袭和远处转移, 其重要原因之一是肿瘤细胞可以逃避 Anoikis 凋亡。细胞在与细胞外基质 (extracellular

[作者简介] 吕海(1971-), 男, 硕士、主治医师, 主要从事骨肉瘤治疗方面的研究。

matrix, ECM)脱离黏附接触或者是接触不完全后出现的凋亡现象,被称为 Anoikis。“Anoikis”为希腊语“无家可归者”^[5,6]。本文在体外首次证实 α 干扰素的抗肿瘤作用途径之一是通过提高骨肉瘤细胞对 Anoikis 凋亡敏感性,从而抑制了肿瘤细胞远处转移的过程。另外, α 干扰素还抑制了骨肉瘤细胞的局部侵袭能力。其作用机理与细胞 caspase-8 和 caspase-3 有关,而于细胞表面的整联蛋白受体 $\alpha 4, \alpha 5$ 和 αv 的表达无明显相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人干扰素(interferon, IFN) $\alpha 2a$ 购于深圳科兴公司,多聚 2-氢(羊+氢)乙基异丁烯(poly-HEMA)购买于 Sigma 公司。人骨肉瘤细胞系 MG-63 由本室传代培养。caspase-8 抑制剂 z-IETD-FMK、caspase-3 抑制剂 z-DEVD-FMK、caspase-8 反应底物 IETD-pNA 和 caspase-3 的反应底物 DEVD-pNA 购于 GIBCO 公司。鼠抗人整联蛋白 $\alpha 4$ (P4G9)单克隆抗体, α 单克隆抗体(NK1-SAM-1), αv 单克隆抗体(P3G8),羊抗鼠荧光素交联 IgG 购于晶美公司。

1.2 抑制接触培养模型的建立

根据已报道的 Anoikis 诱导方法^[5,6]。用 1 ml 10 mg/ml 的多聚-HEMA 95%乙醇溶液包被的 6 孔培养板 2 次,晾干保存。MG-63 细胞在含 10% 血清的 DMEM 培养基中单层培养。胰酶(5 mmol/L EDTA)消化后,重悬于无血清 DMEM 培养液中。将 3×10^5 个细胞/ cm^2 分别种植于聚-HEMA 包被及未包被的培养板上。应用 IFN- $\alpha 2a$ 诱导 Anoikis 凋亡时将 IFN (终浓度 5 000 U/ml)加入细胞悬液中继续培养 48 h。由于聚-HEMA 具有均匀的非离子特性,可以阻止细胞接触和 ECM 的沉淀,达到细胞与 ECM 非接触培养诱发 Anoikis。

1.3 免疫荧光显微镜形态学观察不同整和蛋白亚单位在 MG-63 细胞表面的表达

3.7% 多聚甲醛固定生长于载玻片上的 MG-63 细胞。鼠抗人整联蛋白 $\alpha 4$ (P4G9, 1:100)单克隆抗体, $\alpha 4$ 单克隆抗体(NK1-SAM-1, 1:50), αv 单克隆抗体(P3G8, 1:100)作为一抗,羊抗鼠荧光素交联 IgG (1:1 000)为二抗。常规细胞免疫染色标记后, Nikon Eclipse E400 荧光显微镜下观察 $\alpha 5, \alpha v$ 和 $\alpha 4$ 受体的表达。

1.4 caspase 活性的检测

采用切开 caspase 特定底物的方法检测 caspase 活性。即重新悬浮 MG-63 细胞后,细胞裂解液(50 mm

HEPES, pH7.4, 0.1% CHAPS, 1 mm DTT, 0.1 mm EDTA)37℃ 裂解 10 min。离心后取上清,取 15 μg 蛋白液分别加入 10 $\mu\text{mol/L}$ caspase-3 (DEVD-pNA)和 caspase-8(IETD-pNA),终体积为 50 μl 。37℃ 反应 1 h 后分别检测 caspase 酶切后释放出的 pNA 在 405 nm 的吸光度。

1.5 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)定量检测 MG-63 细胞表面整联蛋白受体的表达

MG-63 细胞重新再悬浮后,分别用方法 3 中一抗和二抗对细胞进行免疫荧光染色。碘化丙锭(propidium iodide, PI, 标记死亡细胞 DNA)再次染色排除死细胞后上机检测。

1.6 TUNEL 系统检测 MG-63 细胞的 Anoikis 凋亡

将含 5 000 U/ml IFN- $\alpha 2a$ 及不含 IFN- $\alpha 2a$ 的 MG-63 细胞(1×10^5 个细胞/ cm^2)分别种植于聚-HEMA 包被及未包被的培养板上。37℃ 培养 48 h。将 100 μl 细胞悬浮液(4 000 个细胞)加入覆盖有细胞加样槽的玻片上 4℃, 800 r/min 离心 2 min。3.7% 甲醛固定 30 s。余操作同 TUNEL 试剂盒。

1.7 FCM 定量检测凋亡细胞

采用 Hoechst33342/PI 双重染色流式细胞仪检测法。胰酶(5 mmol/L EDTA)消化 HSC-3 细胞后重新悬浮于含 5% 无酶细胞分离液(Gibco BRL)的 PBS 中。1 $\mu\text{g/ml}$ PI 染色后冰上孵育细胞 15 min,加入 Hoechst 33342 至终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 。染色 6 min 上机检测。

1.8 caspase 抑制剂对 IFN- $\alpha 2a$ 的抑制作用

重悬贴壁生长的 MG-63 细胞,分别用 caspase-8 抑制剂 z-IETD-FMK 和 caspase-3 抑制剂 z-DEVD-FMK (终浓度 50 μm)预处理细胞 1 h。然后将细胞加入多聚 HEMA 包被的培养皿中,如前所述,加入 IFN- $\alpha 2a$, 培养 48 h 后,采用切开特定底物法检测 caspase-3 和 caspase-8 活性。流式细胞仪定量检测细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 人骨肉瘤细胞 MG-63 表面整联蛋白的表达及人 IFN- $\alpha 2a$ 对其表达的影响

荧光纤维镜下观察整联蛋白受体在 MG-63 细胞表面的表达(图 1)。上排为相差纤维镜照片,下排为荧光显微镜照片。与阴性对照相比, $\alpha 4, \alpha 5$ 和 αv 整联蛋白在 MG-63 细胞表面表达呈阳性。以 $\alpha 4$ 表达较强。如图 2 所示, A, B, C 分别显示 $\alpha 4, \alpha 5$ 和 αv 整联蛋白在 MG-63 细胞表面表达。其中 A-1, B-1, C-1 峰值为阴性对照细胞(一抗为无免疫活性的鼠 IgG)荧光密度。A-2, B-2, C-3 分别为 MG-63 细胞表面 $\alpha 4, \alpha 5$ 和 αv 整联蛋白所交联的荧光密度。 $\alpha 4$ 的表达程度最

高 $\alpha 5$, 峰值移位最大 $\alpha 4, \alpha 5$ 的表达程度较低(A, 峰值移位最小)。IFN- $\alpha 2a$ 分别处理细胞 5 h 和 24 h 后,

FCM 定量检测未发现上述整联蛋白表达有明显改变。

图 1 荧光纤维镜下观察整联蛋白受体在 MG- 63 细胞表面的表达

Fig. 1 Expression of integrin receptor on MG- 63 cell detected by phase contrast

图 2 FCM 检测 MG- 63 细胞表面整联蛋白受体的定量表达

Fig. 2 Expression of integrin receptor on MG- 63 cell detected by FCM

A: $\alpha 4$ expression; B: $\alpha 5$ expression; C: αv expression; Peaks A-1, B-1, and C-1 represent the negative control; Peaks A-2, B-2 and C-2 represent $\alpha 4, \alpha 5$ and αv expression on the MG- 63 cells

2.2 人 IFN- $\alpha 2a$ 诱导骨肉瘤细胞 MG- 63 产生 Anoikis 现象

将经 IFN 处理悬浮培养 24 h 的 MG- 63 细胞离心到载玻片上, TUNEL 试剂盒染色, 发现经干扰素处理的 MG- 63 细胞凋亡率明显高于正常悬浮培养的细胞(图 3, 图 4A, D)。图中绿染细胞为凋亡细胞, 红染细胞为正常细胞。可发现正常细胞多黏附在一起, 而 Anoikis 凋亡细胞多呈分散状。而在贴壁培养的 MG- 63 细胞中, 人干扰素 $\alpha 2a$ 未诱发出明显的细胞凋亡现象。

2.3 整联蛋白封闭抗体对 Anoikis 的抑制作用

在本实验的脱离接触培养凋亡模型中, 发现 $\alpha 4, \alpha 5$ 和 αv 3 种整联蛋白受体在 MG- 63 细胞表面虽有不同程度表达, 但分别加入其功能封闭抗体后, 对 IFN- $\alpha 2a$ 诱导的 Anoikis 凋亡过程无明显影响。

2.4 经人干扰素 $\alpha 2a$ 诱导的 MG- 63 细胞中 caspase-3

和 caspase-8 活性

经人干扰素 $\alpha 2a$ 诱导的 MG- 63 细胞中 caspase-3 和 caspase-8 活性提高, caspase-3 尤其显著。经 IFN 处理后 caspase-3 活性由 1 上升为 5.8, caspase-8 活性由 1 上升为 2.1。

2.5 caspase 抑制剂对 IFN- $\alpha 2a$ 诱导 MG- 63 产生 Anoikis 现象的影响

如图 4 所示, 上排为未经 IFN 处理过的细胞, 下排为 IFN 处理的细胞。左列为未用 caspase 抑制剂的细胞, 中列为使用 caspase-3 抑制剂的细胞, 右列为使用 caspase-8 抑制剂的细胞。IFN- $\alpha 2a$ 可使正常 MG- 63 细胞 Anoikis 凋亡率由 6.08% (A) 提高至 21.07%。而 caspase-3 抑制剂可使凋亡率下降 25% 至 15.98% (E)。caspase-8 抑制剂可使凋亡率下降 50% 至 9.21% (F)。对未经 IFN 处理的细胞, caspase 抑制剂对其影响不明

显(B,C)。

图3 荧光显微镜下观测 MG-63 细胞的 Anoikis 凋亡

Fig.3 Anoikis apoptosis of MG-63 cells detected by phase contrast

3 讨论

IFN 是一种重要的细胞因子,它参与调节细胞的生长,抗病毒活性,免疫调节,以及抗肿瘤活性。在临床上已广泛应用于恶性肿瘤及病毒疾病的治疗。IFN 的抗肿瘤活性包括对肿瘤组织的直接和间接作用。前者指干扰素可直接抑制肿瘤细胞增生,促进细胞凋亡,后者通过调节带瘤宿主的免疫反应来抑制肿瘤^[7]。长期以来人们一直认为 IFN- α 对肿瘤的主要化学治疗作用是抑制细胞生长,但最近的研究发现其还可以直接诱导许多肿瘤细胞出现凋亡^[8]。已有大量的临床和基础报道^[1-2],认为干扰素对骨肉瘤的生长及转移有一定的抑制作用,本实验在体外细胞 Anoikis 凋亡模型上发现,IFN- α 2a 对骨肉瘤细胞 MG-63 具有直接的抗骨肉

图4 FCM 定量检测 MG-63 细胞 Anoikis 凋亡

Fig.4 Anoikis apoptosis of MG-63 cells detected by FCM

瘤细胞毒性作用。它可以诱导骨肉瘤细胞出现 Anoikis 凋亡,从而直接抑制骨肉瘤的远处转移和局部侵袭能力。

IFN 刺激细胞后可以激发细胞内多种信号传导途径。最近 Sen^[7]利用 DNA 芯片技术发现:IFN- α 可诱导细胞表达 300 多种基因。我们着重检测了 caspase 家族在 IFN- α 2a 诱导 MG-63 细胞 Anoikis 过程中的影响。研究发现 IFN- α 2a 诱导了 caspase-3 和 caspase-8 活性的提高。caspase 是一个半胱氨酸蛋白酶家族。它们在细胞凋亡的起始和发展过程中起着核心的作用。到目前为止,已发现的 caspase 有 14 种,其中任何一种的超表达都

可以导致以凋亡的形式杀死细胞^[9]。在我们的实验中发现 IFN- α 2a 诱导的 MG-63 细胞 Anoikis 凋亡过程中,caspase-3 和 caspase-8 的活性都增强了,分别是正常对照的 5.8 倍和 2.1 倍。caspase-3 和 caspase-8 抑制剂都可以降低 IFN- α 2a 诱导的 MG-63 细胞 Anoikis 凋亡,而 caspase-8 抑制剂的保护作用(凋亡率 9.21%)明显高于 caspase-3(凋亡率 15.98%),证明在 MG-63 细胞发生 Anoikis 凋亡时,caspase-8 处于 caspase-3 的上游,是连锁反应的主要起动力。caspase-8 抑制剂对 MG-63 细胞 Anoikis 凋亡的抑制效果仅有 55%,表明除了 caspase-8

及其下游的 caspase-3 以外,还有其它因素参与了 IFN- α 2a 诱导的 MG- 63 细胞 Anoikis 凋亡。实验中我们也发现在 IFN- α 2a 诱导的 MG- 63 细胞 Anoikis 凋亡的过程中,caspase-8 活性的提高(2.1 倍)相对 caspase-3(5.8 倍)要低很多。这也符合一种瀑布式连锁反应的模式。即在上游的反应程度较低,而到了下游,反应则会放大。

由于 Anoikis 凋亡是细胞与 ECM 脱离接触后诱发的^[6],通常认为细胞表面的整联蛋白受体与 ECM 的相互作用在诱导细胞出现 Anoikis 凋亡过程中起重要的作用。其中 α 4, α 5 和 α v 3 种整联蛋白受体参与了一些细胞 Anoikis 凋亡发生过程^[5]。实验中我们发现 MG- 63 虽然表达有 α 4, α 5 和 α v 整联蛋白,但它们的功能封闭抗体对 IFN 诱导的 Anoikis 凋亡无明显影响。FCM 检测并未发现 IFN- α 刺激细胞后其表面这 3 种整联蛋白的表达有明显改变,初步判定 IFN- α 2a 是通过整联蛋白受体以外的其它信号途径诱导凋亡的。本研究为进一步提高干扰素治疗骨肉瘤效果,以及改进干扰素的治疗策略提供了一定的理论基础。

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2003)01-0038-01

无血清培养基与完全培养基对体外激活的 A-NK 细胞支持作用的比较

张 彦, 王志华, 张春艳(哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 哈尔滨 150040)

A-NK 细胞由于其体外增殖和抗肿瘤能力强,对正常细胞无杀伤作用等优点,成为近年来肿瘤过继免疫疗法的研究热点。本研究多方面比较无血清培养基 AIMV 与完全培养基对体外 A-NK 细胞的支持作用,发现无血清培养基用于 A-NK 细胞的临床生物治疗,即不减少 A-NK 细胞的数量和活性,又能增加其临床应用的安全性。

制备方法力求简便快速,首先常规分离健康人外周血单个核细胞;然后,置于塑料离心管中用 PME(5 mmol/L)室温处理 40 min;再后,用完全培养基(RPMI-1640 含 10% 人 AB 血清)和无血清培养基 AIMV 在塑料培养瓶内培养,分别加 22 nmol/L IL-2(6 000 IU/ml)并调整细胞浓度为 5×10^6 /ml。培养 3 ~ 5 h,移去上清液,收集黏附于塑料表面的 A-NK 细胞,再分别重悬于各自含 50% 自体条件培养基的培养液中,调细胞浓度为 2×10^6 /ml,同时补充 IL-2 至终浓度为 6 000 IU/ml,继续培养。于培养的第 1,4,7,10 和第 14 天分别取细胞,采用改进的四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法,比较 2 种培养液培养的 A-NK 细胞的增殖能力和杀伤肿瘤细胞的能力。靶细胞为 Anip973 和 K562 肿瘤细胞,效靶比例为 100: 1。设立效应细胞和靶细胞共同孵育孔(E: T),效应细胞对照孔

[参 考 文 献]

[1] Todesco A, Carli M, Iacona I, *et al.* All-trans retinoic acid and interferon-alpha in the treatment of a patient with resistant metastatic osteosarcoma [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2661-2666.
 [2] Jia SF, An T, Worth L, *et al.* Interferon-alpha enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to etoposide [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(6): 617-624.
 [3] 楼国良, 于益芝, 陈 莉, 等. 重组人 β -干扰素在体内外对肿瘤生长的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 1: 49-51.
 [4] Thyrell L, Erickson S, Zhivotovsky B, *et al.* Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells [J]. *Oncogene*, 2002, 21(8): 1251-1262.
 [5] Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 555-562.
 [6] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(4): 619-626.
 [7] Sen GC. Novel functions of interferon-induced proteins [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(2): 93-101.
 [8] Sangfelt, Strander H. Apoptosis and cell growth inhibition as anti-tumor effector functions of interferons [J]. *Med Oncol*, 2001, 18(1): 3-14.
 [9] Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 265(1-2): 97-110.
 [收稿日期] 2002 - 09 - 23 [修回日期] 2002 - 12 - 15

(E)和靶细胞对照孔(T),公式如下:

$$\text{细胞杀伤活性}(\%) = [1 - (\text{OD}_{E+T} - \text{OD}_E) / \text{OD}_T] \times 100\%$$

在培养瓶中将 A-NK 细胞和 K562 肿瘤细胞共同培养过夜,第 2 天取出离心(4000 r/min \times 5 min)后常规制备电镜标本。

结果显示,与完全培养基培养的 A-NK 细胞相比,AIMV 培养细胞增殖能力和杀伤肿瘤细胞的能力与之相当($P > 0.05$);并且 2 种培养液培养的 A-NK 细胞增殖高峰和杀伤活性高峰均在第 7 天,这对于将来临床应用在治疗时间上有一定的指导意义。透射电镜下可见 A-NK 细胞在靶细胞周围形成花环,部分细胞变形,形成的突起或微绒毛伸向靶细胞,呈点状或斑状接触;肿瘤细胞的死亡形式为溶解坏死和凋亡两种,这说明 A-NK 细胞杀伤肿瘤细胞是通过多种机制完成的。本研究验证 AIMV 可替代完全培养基用于 A-NK 细胞的培养,并为 A-NK 细胞的进一步研究和临床的应用推广提供了一定的理论依据。

[关键词] A-NK 细胞; AIMV; 细胞培养; MTT

[中图分类号] R392.1 [文献标识码] D

[基金项目] 受黑龙江省重点攻关课题(G00C190401)资助