

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0198-04

α 干扰素联合阿糖胞苷对白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及其机制

刘加军¹, 伍新尧¹, 潘祥林², 蔡贵庆¹(1. 中山大学中山医学院法医物证学实验室, 广州 510080; 2. 山东大学第二医院血液肿瘤中心, 济南 250033)

[摘要] 目的: 研究 α 干扰素联合阿糖胞苷对白血病 K562 细胞的诱导凋亡作用及其作用机制。方法: 以浓度 2 000 U/ml 的 α 干扰素与不同浓度的阿糖胞苷作用于体外培养的 K562 细胞, 观察细胞生长状态的变化, 检测细胞生长抑制率及细胞凋亡率的变化, 并对细胞端粒酶活性及 P53 蛋白的表达水平进行检测。结果: α 干扰素与阿糖胞苷联合应用可显著抑制 K562 细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡。并降低 K562 细胞端粒酶活性, 升高 P53 蛋白的表达水平, 其作用呈现出明显的量-效与时-效关系。结论: α 干扰素与阿糖胞苷联合应用对白血病 K562 细胞具有明显的生长抑制及诱导凋亡作用, 降低细胞端粒酶活性及升高 P53 蛋白的表达水平是其重要作用机制之一。

[关键词] 干扰素-α; 阿糖胞苷; 端粒酶; 细胞凋亡

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A

Apoptotic Effects and Its Mechanisms on Leukemic K562 Cells Caused by Interferon-alpha Combined with Cytarabine

LIU Jia-jun¹, WU Xin-yao¹, PAN Xiang-ling², CAI Gui-qing¹(1. Lab of Forensic and Biological Science, Medical College of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Central Department of Hematology and Oncology, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptotic effects and its mechanisms on K562 cells caused by Interferon-alpha (INF-α) and Cytarabine (Ara-C). **Methods:** The variation of both morphology and inhibitory rate of K562 cells was observed in culture medium with IFN-α and various concentrations of Ara-C at different time *in vitro*. The variation of telomerase activity and P53 protein expression were detected before and after apoptosis occurred. **Results:** INF-α and Ara-C used concurrently could cause apoptosis and inhibit the growth of K562 cells as well as decrease the telomerase activity and increase P53 protein expression significantly. All these processes showed both in time- and dose-dependent manner. **Conclusions:** INF-α and Ara-C used concurrently can inhibit the growth of K562 cells and induce apoptosis, inhibiting the telomerase activity and increasing the expression of P53 protein may be one of the most important mechanisms.

[Key words] interferon-alpha; cytarabine; telomerase; apoptosis

* 干扰素(interferon-α, IFN)是临床上常用的生物制剂,其对慢性粒细胞性白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)的疗效肯定,目前已广泛的应用于 CML 的治疗。阿糖胞苷(cytarabine, Ara-C)是临床上常用的化疗药物,临床资料表明小剂量的 Ara-C 对 CML 具有一定的疗效,IFN-α 与小剂量的 Ara-C 联合应用具有相互促进的作用;但二者联合应用治疗 CML 的详细作用机制尚未完全阐明。端粒酶是一种新型的肿瘤标志物,在造血系统的恶性肿瘤中端粒酶活性均显著增高,其中以急性白血病细胞活性最高,端粒酶的活化是肿

瘤发生发展的重要机制之一。p53 是重要的凋亡调节基因,其表达水平的变化与凋亡的发生发展密切相关。为了探讨 IFN-α 与小剂量的 Ara-C 联合应用对 CML 的作用机制,我们以 CML 急变后的细胞株 K562 细胞为研究对象,观察了 IFN-α 与 Ara-C 联合应用对体外培

[作者简介] 刘加军(1966-), 男, 山东人, 博士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤的研究。现工作单位广东省中山大学法医物证学基因实验室从事博士后研究工作
E-mail: liujj@gzsums.edu.cn

养的 K562 细胞的生长抑制及其诱导凋亡作用,以期探讨二者连用对白血病细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂及仪器

急性白血病 K562 细胞株由山东大学肿瘤中心实验室提供。IFN- α 为罗氏公司产品, Ara-C 为齐鲁制药厂产品。RPMI-1640 为美国 GIBCO 公司产品。小牛血清为杭州四季青生物制品厂产品。端粒酶活性检测试剂盒由山东大学遗传学教研室提供。瑞氏染液、台盼蓝染液。流式细胞仪免疫学方法检测试剂盒: P53 单克隆抗体(P53-FITC Mc Ab),法国国际免疫公司产品。主要仪器及设备:超净工作台(杭州产)、CO₂ 细胞培养箱、普通及倒置显微镜(美国 Olympus 产品)、平板离心机(国产)、96 孔培养板(Deta, 美国)、FACScan 型流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)、普通及超低温冰箱、电热恒温干燥箱、微量移液器等。

1.2 细胞培养

将 K562 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37°C, 5% CO₂, 饱和湿度下培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞生长抑制率的测定

采用噻唑蓝(MTT)还原法进行检测。取对数生长期的 K562 细胞 1×10^3 /L, 分装于数个 25 ml 的培养瓶中,每瓶为 3 ml, 分别加入一定量的 Ara-C, 使其终浓度分别为 0, 5, 10, 15, 20 mg/L; 然后加入 IFN- α , 调整其浓度为 2 000 U/ml(以上药物剂量均经多次试验筛选后设计, 单独使用相同剂量的 IFN- α 或 Ara-C 对 K562 细胞的生长均无明显的诱导凋亡作用)。取 96 孔板数个, 每孔加入上述细胞悬液 100 μ l, 每种药物浓度为一组, 每组设 6 个平行孔, 根据实验设计培养不同的时间后每孔加入 MTT(5 g/L) 10 μ l, 再继续培养 4 ~ 6 h 后离心吸去上清液, 每孔加入 DMSO 100 μ l, 再将培养板震荡均匀 5 min 左右, 显微镜下观察着色颗粒消失后, 在 20 min 内以 570 nm 为测试波长, 630 nm 为参考波长, 读取吸光度 A 值, 根据如下公式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 A 值} - \text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.4 流式细胞仪检测

流式细胞仪检测细胞凋亡比例: 收集 K562 细胞, 以 PBS 缓冲液清洗及 70% 的冷乙醇 4°C 固定后加入去 DNA 酶的 RNA 酶, 流式细胞仪分析不同 DNA 含量的细胞分布。应用 ModifitL TL 1.00(MAC) 分析系统进

行数据处理, 低于 G₁ 期的细胞(亚 G₁ 期) 为凋亡细胞, 其占细胞总数的比例为凋亡细胞比例。

流式细胞仪检测 P53 蛋白的表达(按试剂盒说明操作)。收集经不同浓度的药物处理的 K562 细胞, 经 70% 甲醇固定并 4°C 过夜, 然后 PBS 洗去固定液, 加入 P53 单抗 4°C 孵育 30 min 后, 洗去多余单抗, 用流式细胞仪检测, 并分析结果。

1.5 端粒酶活性的检测

严格按试剂盒说明进行操作。具体步骤为: (1) 提取端粒酶: 收集 10^6 个不同浓度药物处理后的细胞, 用 PBS 洗涤离心后弃上清, 加入 CHAPS 裂解液, 离心后取上清液检测。(2) RT-PCR 扩增: 按试剂盒说明书进行。(3) 检测扩增产物: 取扩增产物 5 μ l 分别加入变性液及杂交混合液后, 加入亲和素包被的酶标板内, 加入抗 DIG POD 的抗体与之作用后加入 POD 的底物 TMB 显色, 加入中止液中中止反应, 在自动酶标仪上测定 450 nm 和 690 nm 的吸光度(A) 值。按 $A \text{ 值} = A_{450} - A_{690}$ 计算。

2 结果

2.1 K562 细胞的生长抑制率(见图 1)。生长抑制率随作用时间延长而逐渐升高。5 mg/L 以上的 Ara-C 作用 12 h 后, 细胞的生长逐渐受到抑制, 作用 72 h 后生长抑制率均达到高峰, 其中 20 mg/L 的 Ara-C 对细胞的生长抑制作用最为显著, 均高于其他浓度的细胞生长抑制率($P < 0.05$) (见图 1)。

图 1 α 干扰素联合阿糖胞苷对 K562 细胞的生长抑制率

Fig. 1 K562 cell inhibitory rate caused by IFN- α and Ara-C

2.2 流式细胞仪检测结果

2.2.1 细胞凋亡率检测

随药物浓度的增加及作用时间的延长, 细胞凋亡率逐渐升高。5 mg/L 的 Ara-C 所引起的凋亡细胞比率较低, 10 mg/L 以上的 Ara-C 能明显的诱导细胞凋亡, 其中以 20 mg/L 的 Ara-C 最为显著(见图 2)。

2.2.2 P53 表达水平的变化

不同浓度的药物作用一定时间后, P53 的表达水平逐渐升高。10 mg/L 以上的 Ara-C 作用 24 h 后均能不同程度的升高 P53 蛋白的表达水平, 20 mg/L 的 Ara-C 作用 72 h 后, P53 蛋白的表达水平可达 30% 左右, 明显高于其他浓度的 Ara-C ($P < 0.05$) (见图 3)。

图 2 α 干扰素联合阿糖胞苷对 K562 细胞凋亡率的影响
Fig. 2 K562 cell apoptosis ratio caused by IFN- α and Ara-C

图 3 α 干扰素联合阿糖胞苷对 K562 细胞 P53 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 P53 expression of K562 cells caused by IFN- α and Ara-C

2.3 细胞端粒酶活性的变化

由(图 4)可以看出, 随药物浓度的增加和作用时间的延长, 细胞端粒酶活性逐渐下降, 并呈现出剂量-效应与时间-效应关系。

3 讨论

干扰素具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫反应等多种生物学功能, 资料证明, 干扰素 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临床各种肿瘤的辅助治疗; 而在慢性粒细胞性白血病

(CML), IFN- α 是目前主要的治疗手段之一, 使用 IFN-

图 4 α 干扰素联合阿糖胞苷对 K562 细胞端粒酶活性的影响
Fig. 4 Telomerase activity of K562 cells caused by IFN- α and Ara-C

α 可以使 Ph 染色体阳性的 CML 患者 60% 以上获得血液学及细胞遗传学的缓解, 延长无病生存时间^[1]。阿糖胞苷(Ara-C)是临床上常用的抗肿瘤药物, 其主要作用机理是杀死肿瘤细胞, 减少体内肿瘤细胞的负荷量等; 近来资料表明小剂量的阿糖胞苷对 CML 患者同样具有明显的临床疗效, 而且小剂量的 Ara-C 可以避免常规化疗所引起的各种毒副反应, 防止化疗导致的 CML 急变, 提高病人的生活质量等^[2]。因此, 小剂量的 Ara-C 与 IFN- α 的联合使用是一种较为理想和有效的治疗方法, 二者联合使用可以使病人获得较长时间的缓解并能避免大剂量或常规剂量联合化疗所导致的骨髓抑制等各种毒副作用, 同时小剂量的 Ara-C 与 IFN- α 具有相互促进、相互协调等作用, 而且对 Ph 染色体阳性的 CML 细胞具有调节及转化等功能^[3]。为了探讨二者联合使用时的作用机制, 我们以 CML 来源的细胞株 K562 细胞为研究对象, 观察了细胞生长的状态、细胞端粒酶活性以及凋亡调节基因 p53 表达水平的变化, 结果发现二者联合使用可显著抑制细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡。同时, 降低细胞端粒酶活性、升高凋亡调节基因 P53 蛋白的表达水平。p53 基因是重要的促凋亡基因, 其表达水平与凋亡的发生率呈正相关, P53 表达水平的高低与急性白血病的发生、发展及临床疗效、预后等均密切相关^[4]。Ara-C 与 IFN- α 作用于 K562 细胞后, 由于 P53 的表达水平升高, 凋亡细胞数量增加, 从而发挥出较强的抗肿瘤作用; 另外, 降低 K562 细胞的端粒酶活性, 可能是 Ara-C 与 IFN- α 联合抗肿瘤的另一重要作用机制。

端粒酶(telomerase)是一种特殊的核糖核蛋白多聚酶, 由 RNA 和蛋白质构成, 其中的 RNA 成分是端粒合成的模板, 其蛋白质成分是一种逆转录酶, 因此, 端

粒酶的活化可以弥补复制造成的端粒缩短^[5]。端粒-端粒酶学说认为,大多数的肿瘤细胞均有端粒酶活性的显著升高,肿瘤细胞在其复制过程中,尽管其端粒不断缩短,甚至比相应的正常组织更短,但由于细胞在恶变过程中发生了端粒酶的再激活,因此仍表达端粒酶活性。由于持续存在高水平的端粒酶活性,细胞的端粒长度随着细胞的不断分裂仍保持相对的稳定,使得细胞成为一种“永生”状态,因此,端粒酶活性的增加与肿瘤的发生、发展密切相关;造血系统的恶性肿瘤普遍表现出端粒酶活性,其中以急性白血病端粒酶活性最强,在白血病的不同阶段其端粒酶水平也不完全一样,端粒酶活性水平的高低与白血病的进展程度相一致,复发及难治性急性白血病的端粒酶水平明显高于缓解及恶性程度较低的急性白血病,端粒酶活性越高的急性白血病患者其化疗效果及预后越差,存活率也越低。因此,端粒酶活性的高低对于判断急性白血病的疗效、恶性程度、预后及复发等均具有重要的临床意义^[5]。

端粒酶活性的变化与白血病细胞凋亡的关系尚不十分明确,是细胞发生凋亡后导致细胞端粒酶活性降低,还是端粒酶活性低下导致了细胞凋亡的发生?最近的资料^[6]表明,在细胞的凋亡过程中,端粒酶可能起重要的调节机制,端粒酶活性增加可以抑制细胞凋亡的发生,而降低端粒酶活性可以诱导细胞发生凋亡。干扰素能够通过多种调节机制降低细胞端粒酶活性^[7],这可能是干扰素诱导肿瘤细胞发生凋亡,发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。另有资料^[8]显示 K562 细胞表达高水平的端粒酶活性,这是 K562 细胞不断增殖分裂所必须的,同时也是 K562 细胞拮抗凋亡的重要原因之一,我们的检测结果也表明了这一点。因此,降低端粒酶活性可以增加急性白血病细胞的凋亡率,“抗端粒酶疗法”有可能成为一种广泛的白血病治疗方法,而

且也是筛选新型抗肿瘤药物的重要指标之一^[6]。

我们的研究表明,干扰素联合阿糖胞苷可显著的降低 K562 细胞端粒酶活性,上调 P53 蛋白的表达水平,这可能是其抑制 K562 细胞生长及诱导细胞发生凋亡的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Goldman JM. Therapeutic strategies for chronic myeloid leukemia in the chronic (stable) phase[J]. *Semin Hematol*, 2003, 40(1 Suppl 2): 10-17.
- [2] Silver RT, Peterson BL, Szatrowski TP, et al. Treatment of the chronic phase of chronic myeloid leukemia with an intermittent schedule of recombinant interferon alpha-2b and cytarabine: Results from CALGB study 9013[J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(1): 39-48.
- [3] Lindauer M, Fischer T. Interferon-alpha combined with cytarabine in chronic myelogenous leukemia-clinical benefits[J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 41(5): 523-533.
- [4] Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: Low incidence of mutations with significant clinical relevance[J]. *Hum Mutat*, 2003, 21(3): 277-288.
- [5] Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, et al. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia[J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 680-687.
- [6] Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, et al. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: Possibility of antitelomerase therapy[J]. *Leukemia*, 2003, 17(3): 560-567.
- [7] Lee SH, Kim JW, Lee HW, et al. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) is a mediator for interferon-gamma induced attenuation of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression[J]. *Oncogene*, 2003, 22(3): 381-389.
- [8] Akiyama M, Yamada O, Kanda N, et al. Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors[J]. *Cancer Lett*, 2002, 178(2): 187-197.

[收稿日期] 2003-04-25

[修回日期] 2003-07-20

2003 年全国肿瘤化疗学术会议通知

会议将邀请国内外肿瘤化疗专家及肿瘤药理学专家进行专题学术报告,并欢迎全国各地广大肿瘤化疗医师及研究人员交流经验和成果。

一、会议时间:2003 年 11 月 14 日至 16 日

二、会议地点:广州华泰宾馆 广州市先烈南路 23 号

三、咨询电话:020-87343152 传真:020-87343535

四、投稿邮箱:SCC-CHINA@163.COM

五、详情请查询以下网址:<http://www.sysucc.com>