[文章编号] 1007-385X(2006)04-0277-04

· 论 著 ·

γ-干扰素对白血病细胞 Fas/FasL 系统的调控及凋亡的影响

卢 琳[1], 李绪彤[1], 张婷[1], 杨金平[2], 崔为发[2](1. 青岛大学医学院第二附属医院肿瘤科, 青岛 266042; 2. 潍坊医学院附属医院血液科, 潍坊 261042)

[摘 要] **目的**: 探讨 γ-干扰素(IFN-γ)对白血病细胞 Fas/FasL 表达的调控及凋亡的影响。**方法**: 应用免疫组织化学方法、TUNEL 测凋亡法、细胞培养技术,检测人髓系白血病细胞株 HL-60 及临床髓系白血病患者单个核细胞的 Fas 的表达及相关功能,并研究 γ-干扰素对之的影响。**结果**: 白血病细胞表达 Fas 蛋白较正常骨髓细胞低,并能致共同培养的 Jurkat 细胞发生凋亡;而 IFN-γ 能提高其 Fas 蛋白的表达($P<0.01$),且调节作用具有时间、剂量依赖性,并有下调白血病细胞致 Jurkat 细胞凋亡的能力,且能够增强白血病细胞对 Fas 途径介导的凋亡敏感性及增强对化疗药物阿糖胞苷的敏感性。**结论**: IFN-γ 能通过对白血病细胞 Fas/FasL 系统的调控以防止其逃避免疫监视,并能增强白血病细胞对以 Fas/FasL 为靶标的化疗药物的敏感性。

[关键词] IFN-γ; 白血病细胞; Fas/FasL; 免疫逃避; 凋亡
[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A

Regulatory effect of interferon-γ on Fas/FasL system and apoptosis of leukemic cells

LU Lin[1], LI Xu-tong[1], ZHANG Ting[1], YANG Jin-ping[2], CUI Wei-fa[2](1. Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266042, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, China)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the regulatory effect of interferon-γ on the expression of Fas/FasL and the apoptosis of leukemic cells. **Methods**: The expression of Fas and its function in human acute leukemic cell line HL-60 and in bone marrow mononuclear cells (BMMNC) of patients with acute myeloid leukemia (AML) were studied by immunohistochemical method, TUNEL method, and cell culture technique. The regulatory effect of interferon-γ on them was also investigated. **Results**: Compared with BMMNC of normal human, leukemic cells had an obviously decreased expression of Fas and induced apoptosis of Jurkat cells. It was found that interferon-γ up-regulated the expression of Fas in a time- and dose-dependent manner($P<0.01$). Meanwhile, interferon-γ inhibited Jurkat cells apoptosis induced by leukemic cells, increased the Fas-mediated apoptosis of leukemic cells, and increased the sensitivity of leukemic cells to chemotherapy agents. **Conclusion**: Interferon-γ can prevent the immune escape of leukemic cells *via* regulating the Fas/FasL system and increase the sensitivity of leukemic cells to the chemotherapy drugs targeting Fas/FasL system.

[**Key words**] interferon-γ; leukemic cells; Fas/FasL; immune escape; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 277-280]

急性白血病的特点是体内有大量白血病细胞无控制地增生,并出现于骨髓和许多其他器官和组织,进入外周血液。而白血病细胞能在炎性细胞(包括 T 淋巴细胞)浸润下发生、进展,提示其具有逃避机体免疫监视的能力[1]。有资料表明,Fas/FasL 系统在传递细胞凋亡信号、发挥免疫监控中起着重要作用[2]。但有些类型的肿瘤细胞 Fas 的表达下降或无功能性表达,而 FasL 的表达增强[3]。当肿瘤细胞 Fas 水平下调至低于 Fas/FasL 途径诱导凋亡的阈值时,肿瘤细胞凋亡受到抑制,而肿瘤细胞表面 FasL 表达使 Fas 高表达的激活 T 淋巴细胞发生凋亡,从而导致肿瘤细胞逃避机体免疫系统监视[4],在体内得以生存及发展。

本实验以白血病细胞和人 T 淋巴细胞系(Jurkat)为模型,通过检测白血病细胞 Fas 的表达及人 T 淋巴细胞(Jurkat)的凋亡,观察 IFN-γ 的相关调节作用和白

[作者简介] 卢 琳(1979-), 女, 山东平度人,住院医师, 主要从事临床肿瘤方面的研究,E-mail: lucy1227@126.com
[通讯作者] 崔为发, E-mail: fanjin615@126.com

血病细胞 Fas/FasL 系统途径的免疫逃避机制的关系，初步探讨 IFN-γ 在白血病免疫治疗中的应用前景。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

IFN-γ 购自上海克隆生物高技术有限公司；Fas 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司；抗 Fas 抗体 DX2 购自达科为生物技术有限公司；细胞凋亡原位标记（TUNEL）试剂盒购自南京建成生物工程研究所；1640 培养液购自美国 Gibco 公司；淋巴细胞分离液购自上海荣盛生物试剂厂。

1.2　细胞系

人急性髓性白血病细胞株 HL-60、人 T 淋巴细胞系细胞株 Jurkat 均由上海第二医科大学血研所惠赠。

1.3　病例资料

急性髓性白血病（AML）20 例，其中 M_2 9 例，M_3 5 例，M_4 2 例，M_5 4 例，均为初发期，外周血白细胞增高，骨髓均增生极度活跃。对照组 10 例，均为非血液系统疾病患者，骨髓象正常。标本均采集自潍坊市人民医院血液科。

1.4　细胞收集及培养

无菌采集患者骨髓 1 ml，肝素抗凝，Ficoll 液分离单个核细胞（BMMNC），PBS 洗涤 3 次，少量红细胞用 ACK 液（NH_4Cl 155 mmol/L、$KHCO_3$ 10 mmol/L、EDTA 二钠 110 mmol/L、pH 7.3）裂解，再洗涤 3 次，37℃、5% CO_2 条件下以含 10% 小牛血清、青霉素（100 U/ml）、链霉素（100 μg/ml）的 RPMI 1640 培养液中分别进行培养，直至 30 例标本细胞均达对数生长期。

1.5　检测 Fas 蛋白的表达

培养至对数生长期的白血病细胞株 HL-60 及骨髓单个核细胞调整细胞密度 2×10^5 细胞/ml 后接种于 24 孔板，每孔 1 ml，分别加入 IFN-γ，使其最终浓度达到 10、100、1 000 U/ml。对照组不加 IFN-γ，以此为 0 时相点，分别收集第 1、2、3 天细胞，1 000 r/min 离心 5 min 后制备细胞涂片。应用 S-P 免疫组化法检测 Fas 蛋白的表达，阴性对照一抗以 PBS 代替，阳性对照用已知阳性片。

1.6　检测 T 淋巴细胞的凋亡

将 Jurkat 细胞调整细胞密度至 2×10^5/ml，接种于 24 孔板中，每孔 0.5 ml，对照组为单纯 Jurkat 细胞，实验组每孔均加入密度为 2×10^5/ml 的白血病细胞 0.5 ml，加或不加 IFN-γ（最终浓度为 100 U/ml），共同培养 48 h 后收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min 后制备细胞涂片。根据显微镜下细胞形态大小剔除白血病细胞，细胞凋亡原位标记（TUNEL）法检测 Jurkat 细胞凋亡率。

1.7　检测 IFN-γ 对白血病细胞凋亡敏感性的影响

白血病细胞加或不加 IFN-γ（100 U/ml）孵育 48 h 后彻底漂洗，加或不加抗 Fas 抗体 DX2（2.5 μg/ml）孵育 24 h，加或不加化疗药物阿糖胞苷（10 μg/ml）孵育 6 h，收集细胞 1 000 r/min 离心 5 min 后涂片。细胞凋亡原位标记（TUNEL）法染色后每例标本随机选取一张涂片，在光学显微镜下（×400）分别选取 3 个视野，分别计数各视野中凋亡细胞数及未凋亡细胞数，凋亡率 = 凋亡细胞数/（凋亡细胞数 + 未凋亡细胞数）。

1.8　统计学处理

用 SPSS13.0 统计软件包进行数据分析，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 t 检验及 SNK-q 检验。

2　结　果

2.1　IFN-γ 对白血病细胞 Fas 表达的影响

Fas 表达的阳性信号为棕黄色，呈颗粒状弥散分布，主要在细胞膜，部分在细胞质（图 1）。正常骨髓细胞经过图像分析处理 D 值为（154.32 ± 12.74），未经 IFN-γ 诱导的白血病细胞 D 值分别为（121.74 ± 9.56）、（119.93 ± 10.22），两者比较白血病细胞的 Fas 表达明显降低（$P<0.05$），而经 IFN-γ 诱导的白血病细胞 Fas 表达的 D 值与诱导前相比差异显著，且经 SNK-q 检验不同浓度、不同时间处理组间均有显著性差异（$P<0.05$），而 HL-60 细胞株与 AML 患者 BMMNC 之间无显著性差异（$P>0.05$）（表 1、2）。

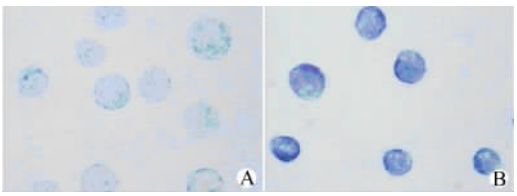

图 1　IFN-γ 对白血病细胞 Fas 表达的影响（S-P，×1 000）

Fig. 1　Effect of IFN-γ on Fas expression in leukemic cells

A：NS treated gruop；B：IFN-γ（1 000 U/ml）treated group

2.2　IFN-γ 对 T 淋巴细胞凋亡的影响

为证实培养中的白血病细胞表达的 FasL 是否具有诱导细胞凋亡的能力，本实验将白血病细胞与高表达 Fas 的 T 淋巴细胞（Jurkat）共同培养，发现白血病细胞可诱使 T 淋巴细胞凋亡，较 Jurkat 单独培养对照组凋亡率有显著性差异（$P<0.05$）。而在 IFN-γ 刺激下，与白血病细胞共同培养的 Jurkat 细胞的凋亡率显著下降（$P<0.05$）。而 HL-60 细胞株与 AML 患者 BMMNC 所诱导 Jurkat 细胞的凋亡率无显著性差异（$P>0.05$）（表 3）。

表 1　不同浓度 IFN-γ 作用 48 h 对白血病细胞 Fas 表达的影响

Tab. 1　Effects of IFN-γ at different concetrations on expression of Fas in leukemic cells treated for 48 h

Groups	HL-60(D)	BMMNC(D)
NS	120.47 ± 11.81	121.97 ± 9.54
IFN-γ		
10 U/ml	129.75 ± 9.24*	130.83 ± 10.07*
100 U/ml	144.87 ± 12.64**	147.97 ± 11.53**
1 000 U/ml	159.26 ± 10.47**	162.36 ± 9.76**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* NS group

表 2　IFN-γ(100 U/ml)作用不同时间对白血病细胞 Fas 表达的影响

Tab. 2　Effects of IFN-γ (100 U/ml) at different time on expression of Fas in leukemic cells

Groups	HL-60(D)	BMMNC(D)
NS	120.47 ± 11.81	121.97 ± 9.54
IFN-γ		
24 h	131.72 ± 10.17*	129.76 ± 11.23*
48 h	150.16 ± 11.35**	148.58 ± 12.04**
72 h	162.43 ± 11.58**	164.72 ± 12.59**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* NS group

表 3　IFN-γ 对 T 淋巴细胞(Jurkat)凋亡的影响($\bar{x}\pm s$, %)

Tab. 3　Effects of IFN-γ on apoptosis of Jurkat cell(%)

Groups	Apoptosis rate (%)
HL-60 group	
Jurkat	3.67 ± 0.59
Jurkat + HL-60	34.67 ± 3.25**
Jurkat + HL-60 + IFN-γ	22.17 ± 1.76△
BMMNC group	
Jurkat	3.92 ± 0.93
Jurkat + BMMNC	34.53 ± 3.32**
Jurkat + BMMNC + IFN-γ	22.36 ± 2.50△

** $P<0.01$ *vs* Jurkat; △ $P<0.05$ *vs* Jurkat + HL-60 or Jurkat + BMMNC

2.3　IFN-γ 对白血病细胞凋亡敏感性的影响

IFN-γ 单独致细胞凋亡并不明显，与对照组相比无统计学差异($P>0.05$)，而白血病细胞经 IFN-γ 处理后对 DX2 及阿糖胞苷的敏感性均显著增加($P<0.05$)(表 4、5)。

表 4　IFN-γ 对 Fas 抗体 DX2 诱导白血病细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$, %)

Tab. 4　Effect of IFN-γ on apptosis of leukemic cells induced by anti-Fas antibody DX2 ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	Apoptosis rate (%)
HL-60	4.67 ± 0.62
HL-60 + IFN-γ (100 U/ml)	10.50 ± 1.54
HL-60 + DX2 (2.5 μg/ml)	15.50 ± 2.18
HL-60 + IFN-γ + DX2	36.67 ± 7.82**
BMMNC	4.38 ± 0.71
BMMNC + IFN-γ (100 U/ml)	11.29 ± 2.06
BMMNC + DX2 (2.5 μg/ml)	14.36 ± 2.57
BMMNC + IFN-γ + DX2	37.21 ± 9.24**

** $P<0.01$ *vs* HL-60 or BMMNC group

表 5　IFN-γ 对阿糖胞苷诱导白血病细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$, %)

Tab. 5　Effects of IFN-γ on apoptosis of HL-60 induced by Ara-c ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	Apoptosis rate (%)
HL-60	3.50 ± 0.43
HL-60 + IFN-γ (100 U/ml)	12.17 ± 2.19
HL-60 + Ara-c (1.0 μg/ml)	24.50 ± 4.13
HL-60 + IFN-γ + Ara-c	46.17 ± 10.14**
BMMNC	4.12 ± 0.76
BMMNC + IFN-γ (100 U/ml)	11.67 ± 2.77
BMMNC + Ara-c (2.5 μg/ml)	25.93 ± 5.38
BMMNC + IFN-γ + Ara-c	45.72 ± 11.86**

** $P<0.01$ *vs* HL-60 or BMMNC group

3　讨　论

Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡机制在肿瘤免疫逃避的过程中发挥着重要作用。肿瘤细胞可通过降低表面 Fas 的表达使其对 T 淋巴细胞毒性作用的敏感性下降，而躲避机体免疫系统的攻击。有报道指出，某些肿瘤细胞包括白血病细胞可分泌 FasL，杀伤具有 Fas 受体的免疫活性细胞[1]。此外，白血病细胞还可以降低对 Fas 介导凋亡机制的敏感性[5]，这是其逃避宿主免疫攻击的另一个机制。

IFN-γ 是临床常用的一种具有广泛生物活性的调

节因子,在细胞凋亡过程中可能有重要的调节作用,主要通过对凋亡相关基因的作用而调控凋亡[6]。在本实验中发现,白血病细胞与高表达 Fas 的 T 淋巴细胞株共培养时可通过 Fas/FasL 途径使 T 淋巴细胞凋亡明显增加,从而逃避机体免疫系统的监视。这提示白血病细胞可表达 FasL,并且其表达的 FasL 是有功能的。研究证实,IFN-γ 可上调多种肿瘤细胞的 FasL 表达[7-8]。从理论上讲,这种上调作用会增强肿瘤细胞对表达 Fas 的免疫活性细胞的杀伤,从而更有助于其免疫逃避。但近年来的研究结果却并非如此。本实验中,在 IFN-γ 的干预下,白血病细胞致使共同培养的 T 淋巴细胞凋亡的能力明显下降,这表明与 T 淋巴细胞结合的 FasL 明显减少。同时研究发现,IFN-γ 作用后白血病细胞 Fas 表达增强。由此可以推测,白血病细胞的 FasL 可能与自身表达上调的 Fas 受体相结合,从而使其无法作用于 T 淋巴细胞,其实是降低了有助于其免疫逃逸的有效 FasL 的表达,使免疫活性细胞得到保护[7]。但具体机制还有待于进一步的研究。

多项研究证实,肿瘤细胞对 Fas 介导的凋亡表现为抵抗[9-10]。而上调 Fas 表达是 IFN-γ 增强细胞对 Fas 介导凋亡敏感性的重要途径。但肿瘤细胞的 Fas 表达上调却并不是一定会介导凋亡发生,与此相关的其他基因的缺失或突变可导致凋亡途径传导障碍,从而使细胞对 Fas 介导的凋亡不敏感。目前已知可以通过对 Bcl-2 家族、Caspases 家族、p53 等的调控增加肿瘤细胞对 Fas 介导凋亡的敏感性[11-13]。本实验中,我们采用抗 Fas 抗体-DX2 作为诱导白血病细胞经 Fas 途径凋亡的诱导剂。研究结果显示, IFN-γ 单独作用 48h 后仅能发现细胞的一些早期凋亡改变,未见到典型的凋亡小体及凋亡细胞,TUNEL 法测凋亡率无明显影响($P > 0.05$)。而 DX2 单独可诱导白血病细胞的凋亡($P < 0.05$),但凋亡率较低,证明白血病细胞确实存在着凋亡抵抗。而经 IFN-γ 诱导后加 DX2 组白血病细胞的凋亡率较未经 IFN-γ 诱导组明显增高,证明 IFN-γ 可显著提高白血病细胞对 Fas 途径凋亡的敏感性。

Hassan HT[14]等发现,阿糖胞苷主要通过 Fas 途径诱导白血病细胞的凋亡,是以白血病细胞 Fas/FasL 系统为靶标的化疗药物。因此本实验采用此种药物研究其与 IFN-γ 的相互作用。实验结果显示,经 IFN-γ 诱导后加阿糖胞苷组白血病细胞的凋亡率均较未经 IFN-γ 诱导组明显增高,证明 IFN-γ 与以 Fas/FasL 为靶标的化疗药物有协同作用,这为应用 IFN-γ 与以 Fas/FasL 为靶标的化疗药物的联合用药提供了一定的实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Hu ZB, Zou P, Li AX, *et al*. Study on blocking the leukemia immune escape after BMT by Fas-Fas ligand pathway[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(3): 419-424.

[2] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995, 267(5203): 1449-1456.

[3] Linkermann A, Qian J, Janssen O. Slowly getting a clue on CD95 ligand biology[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(8): 1417-1426.

[4] Lickliter JD, Kratzke RA, Nguyen PL, *et al*. Fas ligand is highly expressed in acute leukemia and during the transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis[J]. Exp Hematol, 1999, 27(10):1519-1527.

[5] Horie T, Dobashi K, Iizuka K, *et al*. Interferon-gamma rescues TNF-alpha-induced apoptosis mediated by up-regulation of TNFR2 on EoL-1 cells[J]. Exp Hematol, 1999, 27(3): 512-519.

[6] Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, *et al*. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis[J]. Apoptosis, 2003, 8(3): 237-249.

[7] 李子禹, 王剑明, 汤 聪, 等. γ-干扰素对胆管癌细胞 Fas/FasL 系统调控作用的研究[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(7): 495-498.

[8] Lee TB, Min YD, Lim SC, *et al*. Fas (Apo-1/CD95) and Fas ligand interaction between gastric cancer cells and immune cells [J]. Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(1): 32-38.

[9] Shin EC, Shin WC, Choi Y, *et al*. Effect of interferon-gamma on the susceptibility to Fas (CD95/APO-1)-mediated cell death in human hepatoma cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 50(1): 23-30.

[10] Selleck WA, Canfield SE, Hassen WA, *et al*. IFN-gamma sensitization of prostate cancer cells to Fas-mediated death: A gene therapy approach[J]. Mol Ther, 2003, 7(2): 185-192.

[11] Varela N, Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, *et al*. Interferon-gamma sensitizes human myeloid leukemia cells to death receptor-mediated apoptosis by a pleiotropic mechanism[J]. Biol Chem, 2001, 276(21): 17779-17787.

[12] Tomita Y, Bilim V, Hara N, *et al*. Role of IRF-1 and caspase-7 in IFN-gamma enhancement of Fas-mediated apoptosis in ACHN renal cell carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2003, 104(4): 400-408.

[13] Ossina NK, CannasA, Powers VS, *et al*. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression[J]. Biol Chem, 1997, 272(26): 16351-16357.

[14] Akiyama H, Ino T, Tokunaga E, *et al*. A synergistic increase of apoptosis utilizing Fas antigen expression induced by low doses of anticancer drug[J]. Rinsho Byori, 2003, 51(8): 733-739

[收稿日期] 2006-06-05 [修回日期] 2006-07-30
[本文编辑] 郁晓路