

# 13-顺式维甲酸联合干扰素 $\alpha$ 2b对套细胞淋巴瘤细胞株Jeko-1细胞作用及其机制的体外研究

刘志彬 文菁菁 徐才刚

**【摘要】** 目的 探讨13-顺式维甲酸/异维甲酸(13cRA)、干扰素 $\alpha$ 2b(IFN- $\alpha$ 2b)单独及联合应用对套细胞淋巴瘤(MCL)细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用及其机制。方法 13cRA、IFN- $\alpha$ 2b单独及其联合应用于MCL细胞株Jeko-1细胞,应用CCK-8法检测不同药物处理方案对细胞增殖的影响,Annexin V/PI双重染色法检测其对细胞凋亡的影响,流式细胞术(FCM)检测其对细胞周期的影响,Western blot法检测细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)及凋亡途径相关蛋白caspase-9、Rb的表达。结果 ①单用13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及联合应用均对Jeko-1细胞增殖有抑制和诱导凋亡作用( $P$ 值均 $<0.05$ );13cRA(100  $\mu$ mol/L)+IFN- $\alpha$ 2b(10 000 IU/ml)联合组对细胞的增殖抑制率在第1天为(69.37 $\pm$ 8.31)%,细胞凋亡率在第5天为(99.87 $\pm$ 0.12)%(联合用药协同系数为0.735),均高于阳性对照组的(63.34 $\pm$ 4.22)%和(87.80 $\pm$ 3.22)%,差异均有统计学意义( $P$ 值均 $<0.05$ );抑制增殖与促凋亡作用均呈药物浓度和时间依赖性,并引起G<sub>1</sub>期+G<sub>2</sub>期细胞比例的明显增加( $P$  $<0.05$ ),S期细胞明显减低( $P$  $<0.05$ )。②单用13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及联合应用均能下调Jeko-1细胞Cyclin D1及Rb蛋白的表达水平,促进caspase-9裂解。结论 单用13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及联合应用均对Jeko-1细胞有抑制增殖和诱导凋亡效应,可降低S期细胞比例,使细胞停滞于G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>期,两药联合应用有协同作用;其作用可能与下调Cyclin D1、Rb蛋白的表达水平及激活caspase-9有关。

**【关键词】** Jeko-1细胞; 淋巴瘤,B细胞; 维甲酸; 干扰素 $\alpha$

**Effects of 13- cis- retinoic acid combined with interferon-  $\alpha$ 2b in mantle cell lymphoma cell lines (Jeko-1) *in vitro*** Liu Zhibin, Wen Jingjing, Xu Caigang\*. \*Department of Hematology and Research Laboratory of Hematology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China Corresponding author: Xu Caigang, Email: xucg@cd120.com

**【Abstract】 Objectives** To explore the effects of 13- cis- retinoic acid (13cRA) alone or combined with interferon- $\alpha$ -2b (IFN $\alpha$ -2b) for the inhibition of cell growth and apoptosis induction of mantle cell lymphoma cell lines Jeko-1 cells. **Methods** Jeko-1 cells were treated by different concentrations of 13cRA alone or combined with IFN- $\alpha$ 2b. CCK-8 was used to measure the inhibition effects by different treatments. Cell cycles were analyzed by flow cytometry. Effects on apoptosis were assessed by staining of Annexin V/PI. And the levels of Cyclin D1, caspase-9 and Rb proteins were measured by Western blot method. **Results** 13cRA alone at different doses and its combination with IFN $\alpha$ -2b inhibited Jeko-1 cells growth and induced apoptosis, but the combination had higher inhibition potential and significant apoptosis rate ( $P$  $<0.05$ ). The growth inhibition and apoptosis induction in Jeko-1 cells increased significantly with the elevation of drugs concentration and treating duration ( $P$  $<0.05$ ). As well as the percentage of Jeko-1 cells at G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> phases increased ( $P$  $<0.05$ ) and cells at S phase decreased ( $P$  $<0.05$ ), the levels of Cyclin D1 and Rb decreased with elimination caspase-9. **Conclusion** 13cRA, IFN-  $\alpha$ 2b and their combined administration inhibited cells growth and induced apoptosis, decreased the cell populations at S phase and blocked the cells at G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> phase. Combination of the drugs may have a cooperated action. The therapeutic synergistic effects of 13cRA and IFN- $\alpha$ 2b were assumed to lower the expression of Cyclin D1 and Rb proteins, and induce apoptosis by activating caspase-9 pathway.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.011

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院血液科、血液病研究室[刘志彬(现在华北理工大学附属医院血液科,063000)、文菁菁(现在四川省绵阳市中心医院血液科,621000)、徐才刚]

通信作者:徐才刚,Email:xucg@cd120.com

**【Key words】** Jeko-1 cell; Lymphoma, B-cell; Tretinoin; Interferon-alpha

套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)是起源于生发中心周围套细胞区的B淋巴细胞淋巴瘤,占非霍奇金淋巴瘤的3%~8%<sup>[1]</sup>。其分子遗传学特点为染色体t(11;14)(q13;q32)易位,导致Cyclin D1的过量表达<sup>[2]</sup>。Cyclin D1与CDK4/DK6结合形成复合体调节细胞由G<sub>1</sub>期向S期转化,正常细胞由G<sub>1</sub>期向S期转化时受周期调控蛋白的控制,限制细胞由G<sub>1</sub>期向S期转化的速度。由于MCL患者中Cyclin D1的上述作用能加速细胞通过G<sub>1</sub>期向S期转化的调控,从而促使肿瘤细胞快速增殖。新型药物的研发给患者带来了更多的选择,但是这些药物价格昂贵,且MCL仍被认为是一种难治的恶性淋巴瘤。维甲酸(RA)类存在多种异构体,该类药物具有影响细胞增殖,促进细胞凋亡和分化的作用,具有一定的抗肿瘤活性<sup>[3-4]</sup>,如治疗青少年慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征和皮肤T细胞淋巴瘤等,但RA治疗B细胞淋巴瘤组织增殖性疾病报道甚少<sup>[5]</sup>。干扰素(IFN)是一种细胞因子,具有抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>。IFN和RA药物相互作用能增强疗效,二者联合抗肿瘤亦有报道<sup>[7]</sup>。在本研究中我们将两药单用及联合应用,观察其对MCL细胞增殖和凋亡的影响,并探索其作用机制。

## 材料与方 法

1. 材料:MCL细胞株Jeko-1购自美国细胞菌种库(ATCC),培养于含10%胎牛血清、100 μg/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的RPMI 1640完全培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度孵箱内培养。IFN-α2b(甘乐能)购自美国先灵葆雅公司。13-顺式维甲酸(13cRA)购自大连美仑生物技术有限公司。硼替佐米为西安杨森制药有限公司产品。利妥昔单抗购自上海罗氏制药有限公司。注射用环磷酰胺为通化茂祥药业股份有限公司产品。CCK-8试剂盒、凋亡及全蛋白提取试剂盒、细胞周期检测试剂盒、蛋白含量检测试剂盒等均购自成都精博生物技术研究公司。抗Cyclin D1、caspase-9、Rb抗体均为美国Cell Signaling Technology公司产品。

2. 采用CCK-8法检测13cRA、IFN-α2b对Jeko-1细胞增殖的影响:将对数生长期的Jeko-1细胞置于96孔培养板中,每孔4×10<sup>4</sup>个细胞。实验分组:①空白对照组为不含有细胞及药物的完全培养基;②阴性对照组:不加药物干预的细胞悬液;③阳性对照

组:硼替佐米(20 nmol/L)+利妥昔单抗(10 μg/ml)+环磷酰胺(10 mmol/L);④13cRA实验组:预实验结果显示13cRA浓度在0.01~1.00 μmol/L,抑制率随药物浓度的增加而变化较小,抑制率差异无统计学意义(P值均>0.05),故在后续实验选择10、100 μmol/L 13cRA处理细胞;⑤IFN-α2b实验组:加入10 000 IU/ml IFN-α2b处理细胞;⑥两药联合应用组:分别加入不同浓度13cRA(10、100 μmol/L)联合10 000 IU/ml IFN-α2b处理细胞。各组培养1、3、5 d,到检测点后,每孔加入10 μl CCK-8试剂,振荡,孵育2~3 h后显色,用酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(A)值。按公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=[1-(A<sub>处理组</sub>-A<sub>空白对照组</sub>)/(A<sub>阴性对照组</sub>-A<sub>空白对照组</sub>)]×100%。每组设3个复孔,实验重复3次。

3. 采用Annexin V/PI双染法流式细胞术检测细胞凋亡率:将对数生长期的Jeko-1细胞置于6孔板中,每孔8×10<sup>5</sup>个细胞,实验分组同上。培养1、3、5 d后,将收集的细胞离心、PBS洗涤2次,用500 μl Binding Buffer重悬细胞,加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,避光反应15 min,上流式细胞仪(美国BD生物科学公司产品,型号BD FACS Aria™ III)进行检测,用Flowjo分析软件计算细胞的凋亡率。细胞凋亡率(%)=早期凋亡率(Q2)+晚期凋亡率(Q4)。每组设3个复孔,实验重复3次。

4. 采用PI单染法流式细胞术进行细胞周期分析:将对数生长期的Jeko-1细胞置于6孔板中,每孔8×10<sup>5</sup>个细胞,实验分组同上。培养1、3 d后收集并用70%冰乙醇固定细胞,每管样品加入PI染液,避光于37℃水浴箱孵育30 min。上流式细胞仪在激发波长488 nm波长处检测红色波长。用Modfit2软件进行细胞周期分析。每组设3个复孔,实验重复3次。

5. 采用Western blot法检测凋亡途径的相关蛋白:收集终浓度分别为10、100 μmol/L 13cRA、10 000 IU/ml IFN-α2b及两药联合应用处理12 h的细胞,按试剂盒说明进行操作,提取细胞全蛋白,上等量的蛋白进行SDS-PAGE电泳,选用PVDF膜转膜,加入相应的一抗,4℃过夜,用辣根过氧化物酶标记的二抗室温温育30 min,最后通过显影、定影曝光出所测蛋白;以GAPDH(武汉博士德生物工程有限公司产品)为内参。

6. 统计学处理:应用SPSS16.0软件进行统计学分析。实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及两药联合对Jeko-1细胞增殖的影响:结果显示13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及两药联合对Jeko-1细胞增殖均有不同程度的抑制作用。不同药物浓度(10、100  $\mu\text{mol/L}$ )的13cRA作用后,Jeko-1细胞增殖抑制率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),13cRA浓度在10~100  $\mu\text{mol/L}$ 范围内,抑制率呈药物剂量和时间依赖性。100  $\mu\text{mol/L}$  13cRA对Jeko-1细胞增殖的抑制作用与阳性对照组接近(表1)。

采用回归分析-probit法计算半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )值。第3天单药13cRA的 $\text{IC}_{50}$ 值为18.63  $\mu\text{mol/L}$ 、IFN- $\alpha$ 2b的 $\text{IC}_{50}$ 值为3 850 000 IU/ml;联合用药时13cRA的 $\text{IC}_{50}$ 值为16.13  $\mu\text{mol/L}$ 。在研究中我们发现第3天IFN- $\alpha$ 2b对细胞增殖的抑制作用极弱,采用协同系数(combination index, CI)判断10 000 IU/ml IFN- $\alpha$ 2b联合不同浓度13cRA的协同作用,  $0.9\leq CI\leq 1.0$ 为叠加作用,  $0.8\leq CI<0.9$ 为轻度协同作用;  $0.6\leq CI<0.8$ 为中度协同作用;  $0.4\leq CI<0.6$ 为高协同作用;  $0.2\leq CI<0.4$ 为强协同作用。通过公式计算,第3天联合用药 $CI=0.866$ ,表明两药有轻度协同作用;第5天 $CI=0.735$ ,表明两药联合第5天有中度协同作用。

与阴性对照组比较,第5天单药10 000 IU/ml IFN- $\alpha$ 2b组对细胞增殖抑制作用明显( $P<0.05$ ),抑制率为(14.48 $\pm$ 10.21)%。

13cRA和IFN- $\alpha$ 2b联合应用组较单药组抑制率更高( $P<0.05$ ),100  $\mu\text{mol/L}$  13cRA+10 000 IU/ml IFN

联合用药组对细胞增殖抑制作用在第1天高于阳性对照组[(69.37 $\pm$ 8.31)%对(63.34 $\pm$ 4.22)%, $P<0.05$ ],而在第3、5天差异无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )(表1)。

2. 13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及两药联合对Jeko-1细胞凋亡的影响:单独10、100  $\mu\text{mol/L}$  13cRA作用于Jeko-1细胞24 h即产生明显的促凋亡效应( $P<0.05$ ),且作用呈剂量和时间依赖性,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。10 000 IU/ml IFN- $\alpha$ 2b对Jeko-1细胞有促凋亡作用( $P<0.05$ )。13cRA联合IFN- $\alpha$ 2b组,细胞凋亡比例随药物浓度的增加和干预时间的延长而增高,且组内(相同时间不同药物浓度)差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与相应浓度的单药13cRA相比,联合用药组的Jeko-1细胞凋亡率更高(表1)。

3. 13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及两药联合对Jeko-1细胞周期的影响:结果显示不同浓度组13cRA及10 000 IU/ml IFN- $\alpha$ 2b组均能降低S期细胞比例、提高 $G_1$ 期+ $G_2$ 期细胞比例。其中,100  $\mu\text{mol/L}$ 的13cRA浓度组在作用于细胞24 h后S期细胞比例降低、 $G_1$ 期细胞比例升高,与阴性对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与相应浓度的单药13cRA相比,联合用药组能显著降低S期细胞比例、提高 $G_1$ 期+ $G_2$ 期细胞比例( $P<0.05$ )(表2)。

4. 13cRA、IFN- $\alpha$ 2b及两药联合对Jeko-1细胞Rb、Cyclin D1、caspase-9蛋白表达的影响:Western blot法检测结果显示:单用13cRA组及联合用药组细胞的Rb蛋白表达较阴性对照组明显降低,而单用IFN- $\alpha$ 2b组无明显降低;单用不同浓度的13cRA组、单用IFN- $\alpha$ 2b组及联合组细胞的Cyclin D1表达均较阴性对照组降低,联合用药组较单用13cRA组细胞降低更明显;与阴性对照组相比较,pro-caspase-9

表1 13-顺式维甲酸(13cRA)、干扰素(IFN)作用不同时间对Jeko-1细胞增殖和凋亡的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	细胞增殖抑制率(%)			细胞凋亡率(%)		
	第1天	第3天	第5天	第1天	第3天	第5天
阴性对照组	0.00 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	4.80 $\pm$ 0.10	5.00 $\pm$ 0.20	59.87 $\pm$ 0.21
10 $\mu\text{mol/L}$ 13cRA处理组	16.11 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	35.10 $\pm$ 5.05 <sup>a</sup>	75.32 $\pm$ 3.16 <sup>a</sup>	12.37 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	12.50 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	71.17 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>
100 $\mu\text{mol/L}$ 13cRA处理组	40.14 $\pm$ 6.08 <sup>a</sup>	80.41 $\pm$ 6.33 <sup>a</sup>	89.50 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	30.33 $\pm$ 3.01 <sup>ab</sup>	33.77 $\pm$ 5.49 <sup>a</sup>	85.43 $\pm$ 4.30 <sup>a</sup>
10 000 IU/ml IFN处理组	0.00 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.06	14.48 $\pm$ 10.21 <sup>a</sup>	11.50 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	28.47 $\pm$ 4.81 <sup>a</sup>	64.03 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup>
联合处理1组	8.26 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	53.44 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	82.46 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	16.87 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	36.60 $\pm$ 3.25 <sup>a</sup>	75.90 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>
联合处理2组	69.37 $\pm$ 8.31 <sup>ab</sup>	83.28 $\pm$ 4.35 <sup>a</sup>	92.37 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	54.80 $\pm$ 2.17 <sup>ab</sup>	99.27 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	99.87 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>
阳性对照组	63.34 $\pm$ 4.22 <sup>a</sup>	82.36 $\pm$ 7.21 <sup>a</sup>	91.38 $\pm$ 4.21 <sup>a</sup>	23.63 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	67.20 $\pm$ 3.94 <sup>a</sup>	87.80 $\pm$ 3.22 <sup>a</sup>

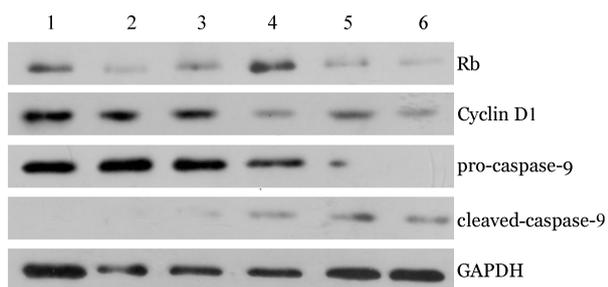
注:阴性对照组:不加药物处理的细胞悬液;阳性对照组:20 nmol/L 硼替佐米+10  $\mu\text{g/ml}$  利妥昔单抗+10 mmol/L 环磷酰胺处理组;联合处理1组:10  $\mu\text{mol/L}$  13cRA+10 000 IU/ml IFN处理组;联合处理2组:100  $\mu\text{mol/L}$  13cRA+10 000 IU/ml IFN处理组;<sup>a</sup>相同时间点与阴性对照组比较, $P<0.05$ ;<sup>b</sup>相同时间点与阳性对照组比较, $P<0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

表2 流式细胞术检测13-顺式维甲酸(13cRA)、干扰素(IFN)作用不同时间对Jeko-1细胞周期分布的影响[细胞比例(%), $\bar{x}\pm s$ ]

组别	第1天		第3天	
	G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> 期	S期	G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> 期	S期
阴性对照组	63.55±2.64	36.45±2.48	67.21±2.71	32.80±2.71
10 μmol/L 13cRA 处理组	60.02±0.64	39.99±0.64	78.10±1.52 <sup>a</sup>	21.41±2.30 <sup>a</sup>
100 μmol/L 13cRA 处理组	84.13±0.38 <sup>ab</sup>	15.87±0.37 <sup>ab</sup>	81.41±1.97 <sup>ab</sup>	19.00±1.37 <sup>ab</sup>
10 000 IU/ml IFN 处理组	70.85±2.98 <sup>a</sup>	29.15±2.96 <sup>a</sup>	80.06±0.45 <sup>a</sup>	19.34±0.44 <sup>a</sup>
联合处理1组	73.03±1.38 <sup>a</sup>	26.97±1.38 <sup>a</sup>	82.12±0.67 <sup>ab</sup>	17.88±0.66 <sup>ab</sup>
联合处理2组	88.86±1.27 <sup>ab</sup>	11.14±0.81 <sup>ab</sup>	90.35±0.56 <sup>ab</sup>	9.66±0.56 <sup>ab</sup>
阳性对照组	74.75±2.32	25.25±2.35	78.90±8.05	21.61±3.06

注:阴性对照组:不加药物处理的细胞悬液;阳性对照组:20 nmol/L 硼替佐米+10 μg/ml 利妥昔单抗+10 mmol/L 环磷酰胺处理组;联合处理1组:10 μmol/L 13cRA+10 000 IU/ml IFN 处理组;联合处理2组:100 μmol/L 13cRA+10 000 IU/ml IFN 处理组;<sup>a</sup> 相同时间点与阴性对照组比较, $P<0.05$ ;<sup>b</sup> 相同时间点与阳性对照组比较, $P<0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

的表达因不同的药物处理方案有不同程度的降低,但 cleaved-caspase-9 表达呈不同程度的升高(图1)。



1: 阴性对照组; 2: 10 μmol/L 13cRA 处理组; 3: 100 μmol/L 13cRA 处理组; 4: 10 000 IU/ml IFN-α2b 处理组; 5: 10 μmol/L 13cRA + 10 000 IU/ml IFN-α2b 处理组; 6: 100 μmol/L 13cRA + 10 000 IU/ml IFN-α2b 处理组

图1 Western blot法检测13cRA、IFN-α2b及两药联合对Jeko-1细胞 Cyclin D1、caspase-9及Rb蛋白表达的影响

## 讨 论

13cRA 通过与 RAR 受体结合,降低 Cyclin D1 的表达和影响 Bcl-2 的功能,从而抑制细胞的增殖<sup>[8]</sup>。已有研究结果证明全反式 RA、9cRA 对 MCL 细胞株 Granta519 和 SP53 细胞有明显的抑制作用,同时证明 9cRA 能通过 caspase-9 依赖的凋亡途径使细胞发生凋亡<sup>[9]</sup>。

Wang 等<sup>[10]</sup>的研究结果表明硼替佐米+利妥昔单抗+环磷酰胺联合用药在 MCL 体内外试验中均显示出明显的抑制增殖和诱导凋亡作用,故我们参考该文献的方案并将其设为阳性对照组。我们的结果显示 0.01~100 μmol/L 浓度范围的 13cRA 对 Jeko-1 细胞产生了明显的抑制作用,且与药物浓度和时间呈明显的依赖性。单药 13cRA 浓度在 0.01~1.00 μmol/L 范围时,随着时间的延长显示了对

Jeko-1 细胞的抑制作用,但各组之间的抑制率差异无统计学意义,可能与在该药物浓度范围内时药物浓度梯度差较小有关,相反当药物浓度从 10 μmol/L 增加至 100 μmol/L 时,由于药物浓度差增大,该两组药物浓度的抑制率差异有统计学意义,提示 13cRA 的有效药物浓度范围在 10~100 μmol/L。两药联合在作用第 3、5 天均具有协同作用,随作用时间的延长。两药联合的协同效果越明显;Guidoboni 等<sup>[11]</sup>的体外实验结果表明,9cRA 联合 IFN-α2b 通过靶向作用于 MCL 细胞株的 Cyclin D1、p27Kip1、Akt 和 Noxa 等蛋白,从而发挥抗肿瘤细胞增殖的作用。在本研究中我们发现单药 13cRA 能降低 Jeko-1 细胞的 Cyclin D1 水平。同样,细胞周期检测结果显示,单药 13cRA 能使 Jeko-1 细胞 S 期比例降低,G<sub>1</sub> 期细胞比例增高,与 Guidoboni 等<sup>[11]</sup>所报道的 RA 药物抗 MCL 细胞株的机制相似,使肿瘤细胞停滞在 DNA 合成前期,抑制细胞增殖。同时我们采用流式细胞术检测细胞凋亡,发现单药 13cRA 对 Jeko-1 细胞有促凋亡作用,Western blot 法检测结果显示,100 μmol/L 13cRA 促 Jeko-1 细胞凋亡作用伴有 pro-caspase-9 的裂解。我们推测 13cRA 的促 Jeko-1 细胞发生凋亡的机制可能为:①大剂量的 13cRA 可能通过诱导细胞核受体 RXR 的上调并与之结合发挥促细胞凋亡功能;②MCL 的发生与 Bcl-2 的抗凋亡作用增强有关,而 13cRA 能下调其表达而降低抗细胞凋亡的功能。13cRA 促 Jeko-1 细胞凋亡的作用机制仍需进一步深入研究进行探索。

在我们的实验中,单独 IFN 组在观察的第 5 天显现出对 Jeko-1 细胞生长的轻度抑制作用,而在采用流式细胞术进行凋亡及周期检测中发现 IFN-α2b 发挥作用的时间较早。分析可能原因为:CCK-8 增

殖抑制实验仅能检测活细胞的数量,即使IFN- $\alpha$ 2b在早期对Jeko-1细胞的凋亡和细胞周期有影响,但此时的细胞可能尚未死亡。现已证明IFN- $\alpha$ 2b能通过上调CDKI、p19Ink4和p21Cip,从而使细胞停滞于G<sub>1</sub>期<sup>[6]</sup>。因MCL的发生与细胞周期调控蛋白如CDKI、p21等相关,IFN- $\alpha$ 2b可能通过此途径发挥抗Jeko-1细胞增殖的作用。本研究结果显示IFN- $\alpha$ 2b作用于Jeko-1细胞后,能降低Cyclin D1蛋白水平,使G<sub>1</sub>期细胞比例明显升高,S期细胞比例明显降低,从而抑制细胞增殖。但在本研究中,Cyclin D1表达降低是否与CDKI、p19Ink4和p21Cip有关有待进一步研究证实。我们的实验结果同时表明,IFN- $\alpha$ 2b联合13cRA治疗MCL,不仅能起到增强13cRA疗效的作用,本身亦能抑制Jeko-1细胞的增殖。

13cRA和IFN- $\alpha$ 2b均能通过调节细胞周期相关蛋白Rb、Cyclin D1、E2F、CDK及c-Myc等的表达而发挥抑制肿瘤增殖的作用<sup>[7]</sup>。RA与IFN具有相互促进的作用,研究表明IFN通过上调RA受体RAR和RXR的表达,增强细胞对RA类药物的敏感性<sup>[12-13]</sup>,RA可以降低STAT的磷酸化水平和诱导IFN调节因子-1(IFN regulatory factor-1,IRF-1)的产生,继而增强IFN的生物学功能<sup>[14-15]</sup>。在本研究中我们发现,在药物作用的第1、3天,相同时间点联合用药组与对应浓度的单药13cRA相比,对细胞增殖抑制、凋亡和细胞周期的影响差异有统计学意义( $P$ 值均 $<0.05$ )。Western blot法检测结果显示联合用药组与单药13cRA组能明显降低Jeko-1细胞Cyclin D1的表达水平和促进caspase-9的裂解。在药物作用的第5天,联合用药组与对应浓度的单药13cRA相比对细胞的增殖抑制作用和促凋亡作用差异无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。分析其可能原因与观察的第5天,培养基中的营养成分耗竭代谢产物增加或药物的最大效应有关。值得一提的是本研究中较高浓度的实验药物组表现出与阳性对照相似或更强的抗Jeko-1细胞增殖作用。

#### 参考文献

- [1] Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project[J]. Ann Oncol, 1998, 9(7): 717-720.
- [2] Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma [J]. Cancer Cell, 2003, 3(2): 185-197.
- [3] Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 80(3 Pt 2): S52-62.
- [4] Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention [J]. FASEB J, 1996, 10(9): 1031-1039.
- [5] Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1(3):181-193.DOI: 10.1038/35106036.
- [6] Matsuoka M, Tani K, Asano S. Interferon- $\alpha$ -induced G<sub>1</sub> phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages [J]. Oncogene, 1998, 16(16): 2075-2086. DOI: 10.1038/sj.onc.1201745.
- [7] Benthin M, Dallmann I, Atzpodien J. 13cis- and all-trans retinoic acid have antiproliferative effects on CML cells and render IFN  $\alpha$  antiproliferative potency after combined treatment in vitro [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2001, 16(4): 323-331. DOI: 10.1089/108497801753131408.
- [8] Vuletic A, Konjevic G, Milanovic D, et al. Antiproliferative effect of 13- cis- retinoic acid is associated with granulocyte differentiation and decrease in cyclin B1 and Bcl- 2 protein levels in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrested HL- 60 cells [J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(3): 393-401. DOI: 10.1007/s12253-009-9241-2.
- [9] Dal Col J, Mastorci K, Faè DA, et al. Retinoic acid/ $\alpha$ -interferon combination inhibits growth and promotes apoptosis in mantle cell lymphoma through Akt-dependent modulation of critical targets [J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1825-1835. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2505.
- [10] Wang M, Han XH, Zhang L, et al. Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo [J]. Leukemia, 2008, 22(1): 179-185. DOI: 10.1038/sj.leu.2404959.
- [11] Guidoboni M, Zancai P, Cariati R, et al. Retinoic acid inhibits the proliferative response induced by CD40 activation and interleukin-4 in mantle cell lymphoma [J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 587-595.
- [12] Marth C, Daxenbichler G, Dapunt O. Synergistic antiproliferative effect of human recombinant interferons and retinoic acid in cultured breast cancer cells [J]. J Natl Cancer Inst, 1986, 77(6): 1197-1202.
- [13] Widschwendter M, Daxenbichler G, Dapunt O, et al. Effects of retinoic acid and gamma- interferon on expression of retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein in breast cancer cells [J]. Cancer Res, 1995, 55(10): 2135-2139.
- [14] Kolla V, Lindner DJ, Xiao W, et al. Modulation of interferon (IFN)-inducible gene expression by retinoic acid. Up-regulation of STAT1 protein in IFN-unresponsive cells [J]. J Biol Chem, 1996, 271(18): 10508-10514.
- [15] Gianni M, Terao M, Fortino I, et al. Stat1 is induced and activated by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells [J]. Blood, 1997, 89(3): 1001-1012.

(收稿日期:2016-06-01)

(本文编辑:刘志红)