

- [4] 邵丽丽, 樊娟, 王蕊, 等. 急性髓系白血病TFPI-2基因表达及启动子甲基化的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 920-926. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.04.008.
- [5] Jian P, Yan WS, Chao SL, et al. Promoter of TFPI-2 is hypermethylated in Chinese pediatric acute myeloid leukemia [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2012, 34(1):43-46. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182277276.
- [6] Kim TK, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions [J]. Semin Hematol, 2015, 52(3):172-183. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2015.04.003.
- [7] Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368(22):2059-2074. DOI: 10.1056/NEJMoal301689.
- [8] Ma K, Cao B, Guo M. The detective, prognostic, and predictive value of DNA methylation in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Epigenetics, 2016, 8:43. DOI: 10.1186/s13148-016-0210-9.
- [11] Qin Y, Zhang S, Gong W, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits gallbladder carcinoma growth in vitro and in vivo [J]. Cancer Sci, 2012, 103(4): 723-730. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02218.x.
- [10] 雒雪萍, 徐泽锋, 秦铁军, 等. 地西他滨治疗难治性贫血伴有原始细胞过多的疗效和不良反应与治疗疗程数的关系[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(10):870-875. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.011.
- [11] Hamamoto J, Soejima K, Naoki K, et al. Methylation-induced downregulation of TFPI-2 causes TMRSS4 overexpression and contributes to oncogenesis in a subset of non-small-cell lung carcinoma [J]. Cancer Sci, 2015, 106(1):34-42. DOI: 10.1111/cas.12569.
- [12] Weeks RJ, Ludgate JL, LeMée G, et al. TESTIN Induces Rapid Death and Suppresses Proliferation in Childhood B Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151341. DOI: 10.1371/journal.pone.0151341.
- [13] 刘进, 黄崇媚, 程辉, 等. 地西他滨对急性T淋巴细胞白血病细胞株 Molt4 细胞的作用及其机制研究 [J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(3):230-234. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.012.

(收稿日期:2016-09-05)

(本文编辑:王叶青)

干扰素联合沙利度胺对B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY7细胞的作用及其机制研究

彭大鹏 米瑞华 范瑞华 尹青松 汪小姣 魏旭东

Influence of interferon combined with thalidomide on the proliferation of OCI-LY7 cells and its mechanism Peng Dapeng, Mi Ruihua, Fan Ruihua, Yin Qingsong, Wang Xiaojiao, Wei Xudong

Corresponding author: Wei Xudong, Department of Hematology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China. Email: weixudong63@126.com

干扰素和沙利度胺广泛应用于临床抗肿瘤治疗。干扰素有调节免疫、增强NK细胞对肿瘤细胞杀伤及诱导肿瘤细

胞凋亡等作用。沙利度胺有调节免疫、破坏肿瘤生长微环境的作用。前期,我们在临床工作中应用干扰素联合沙利度胺治疗复发/难治性非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)取得了良好的效果^[1]。在本实验中我们采用不同浓度的干扰素和沙利度胺体外单独及联合作用于B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY7细胞,观察对OCI-LY7细胞增殖及凋亡的影响并分析其相关机制,为临床治疗方案提供一定的实验依据。

材料与方

1. 细胞培养: OCI-LY7细胞于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的IMDM培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,36-48 h传代1次。取对数生长期细胞进行后续实验。

2. CCK-8法检测细胞增殖抑制率:试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司,按试剂盒说明进行操作。实验分组:①对照组:不加药物细胞组;②干扰素单药组:不同浓度干扰素

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.017

基金项目:国家自然科学基金(81170520)

作者单位:450008 郑州大学附属肿瘤医院血液科、河南省肿瘤医院

通信作者:魏旭东,Email:weixudong63@126.com

(100、500、1 000、2 000、5 000 U/ml)作用细胞组;③沙利度胺单药组:不同浓度沙利度胺(10、50、100、200、300 μg/ml)作用细胞组;④空白组:加入等量的培养基。各组均设4个复孔,实验重复3次。采用酶标仪(美国Bio-Tek公司产品)检测在450 nm波长处吸光度(A)值。去掉每组1个相对异常的数值,根据以下公式计算各组的24 h和48 h的增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}}) \times 100\%$$

应用同样的方法检测不同浓度干扰素(1000、2000 U/ml)联合沙利度胺(200 μg/ml)对OCI-LY7细胞作用48 h的增殖抑制率,并与单药作用组结果进行比较。两种药物之间的相互作用黄金公式如下:

$$Q = \frac{E(a+b)}{Ea+Eb - (Ea \times Eb)}$$

Ea、Eb为沙利度胺或干扰素单药组的抑制率,E(a+b)为联合用药组的抑制率。

当Q<0.85时,两种药物为拮抗作用;当0.85≤Q<1.15时,两种药物为单纯相加作用;当Q≥1.15时,两种药物为协同作用。

3. ELISA法检测上清液中血管内皮生长因子(VEGF)水平:试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司,按试剂盒说明进行操作。实验分组:①对照组:不加药物细胞组;②干扰素单药组:2 000 U/ml干扰素作用细胞组;③沙利度胺单药组:200 μg/ml沙利度胺作用细胞组;④联合作用组:2 000 U/ml干扰素+200 μg/ml沙利度胺联合作用细胞组。作用48 h后检测各组上清液中的VEGF含量。每组设置3个复孔,实验重复3次。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡率:实验分组:①对照组:不加药物细胞组;②干扰素单药组:不同浓度干扰素(100、500、1 000、2 000、5 000 U/ml)作用细胞组;③沙利度胺单药组:200 μg/ml沙利度胺作用细胞组;④联合作用组:不同浓度干扰素(100、500、1 000、2 000、5 000 U/ml)+200 μg/ml沙利度胺联合作用细胞组。作用48 h后,按Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司产品)说明书进行操作,双染法标记细胞。上流式细胞仪(美国Bekman公司产品)检测。激发波长Ex=488 nm,发射波长Em=530 nm,同时设立空白细胞组、单标PI组以及单标Annexin V-FITC组进行荧光信号补偿。每组设3个复孔。

5. Western blot法检测相关蛋白的表达:实验分组同方法3。应用全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司产品)提取细胞总蛋白,检测并调整蛋白浓度,-80℃保存。参考文献[2]相关实验步骤进行Bcl-2、Bax、caspase-3、p-P38、P38等蛋白表达水平的检测。

6. 统计学处理:采用SPSS17.0软件进行统计学处理,采用独立样本t检验分析,P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 沙利度胺和干扰素对OCI-LY7细胞增殖的影响:

10~200 μg/ml沙利度胺和100~2 000 U/ml干扰素分别作用OCI-LY7细胞24、48 h,均能呈浓度依赖性地抑制其增殖,且作用48 h的增殖抑制作用要明显强于作用24 h;>200 μg/ml沙利度胺或>2 000 U/ml干扰素作用于OCI-LY7细胞,其抑制作用出现平台期(表1)。

表1 CCK-8法检测不同浓度的沙利度胺或干扰素作用不同时间对OCI-LY7细胞增殖抑制率的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	作用时间		t值	P值
	24 h	48 h		
沙利度胺				
10 μg/ml组	3.87±0.63	5.03±0.82	-3.37	<0.05
50 μg/ml组	6.56±0.75	10.21±0.98	-8.87	<0.05
100 μg/ml组	8.62±0.77	15.81±1.02	-16.88	<0.05
200 μg/ml组	10.40±1.05	19.50±1.44	-15.32	<0.05
300 μg/ml组	10.53±1.23	19.30±1.36	-14.35	<0.05
干扰素				
100 U/ml组	7.62±0.89	13.21±1.18	-11.35	<0.05
500 U/ml组	12.51±1.06	21.57±2.89	-8.83	<0.05
1 000 U/ml组	18.63±2.21	31.05±2.77	-10.51	<0.05
2 000 U/ml组	25.54±2.35	43.21±2.65	-14.97	<0.05
5 000 U/ml组	26.61±2.28	45.06±3.72	-12.69	<0.05

注:每组设4个复孔,实验重复3次

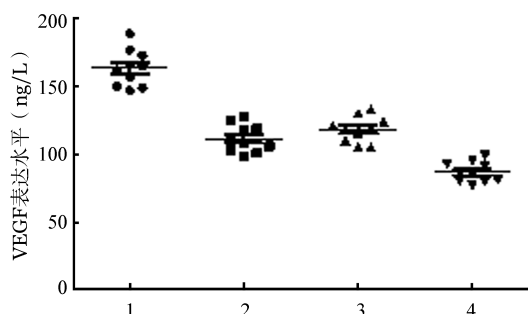
200 μg/ml沙利度胺分别联合1 000、2 000 U/ml干扰素作用OCI-LY7细胞48 h,其增殖抑制率分别为(55.46±4.61)%、(67.23±4.21)%,联合组的增殖抑制率明显高于沙利度胺单药作用组[(19.50±1.44)% , $t=22.34$ 或 32.18 , $P<0.05$]和1 000 U/ml干扰素单药作用组[(31.05±2.77)% , $t=13.62$, $P<0.05$]、2 000 U/ml干扰素单药作用组[(43.21±2.65)% , $t=14.49$, $P<0.05$],差异均有统计学意义。根据两药相互作用黄金公式计算:200 μg/ml沙利度胺+1 000 U/ml干扰素, $Q=1.245>1.15$;200 μg/ml沙利度胺+2 000 U/ml干扰素, $Q=1.238>1.15$ 。结果显示联合用药下,沙利度胺和干扰素对OCI-LY7细胞增殖具有协同抑制作用。

2. 沙利度胺和干扰素对VEGF表达水平的影响:与对照组比较,2 000 U/ml干扰素和200 μg/ml沙利度胺单药作用组、两药联合作用组OCI-LY7细胞上清液中的VEGF表达水平均降低(P值均<0.05)(图1)。

3. 干扰素和沙利度胺对OCI-LY7细胞凋亡的影响:干扰素单药作用OCI-LY7细胞48 h的凋亡率随浓度增加而增加,在浓度为2 000~5 000 U/ml范围内出现平台期。200 μg/ml沙利度胺单药作用OCI-LY7细胞48 h的凋亡率为(15.09±1.31)%。两药联合,干扰素浓度为100 U/ml时, $0.85 \leq Q < 1.15$,两药有相加作用;干扰素浓度>100 U/ml时, $Q > 1.15$,两药有协同作用。与干扰素和沙利度胺单药组比较,联合用药组的细胞凋亡率增加(表2)。

4. 干扰素和沙利度胺对OCI-LY7细胞凋亡相关蛋白表达的影响:结果显示,与对照组比较,干扰素(2 000 U/ml)、沙

利度胺(200 μg/ml)单药组及两药联合组均可不同程度下调P38、Bcl-2表达,上调Bax、caspase-3、p-P38表达;两药联合处理组下调P38、Bcl-2表达及上调Bax、caspase-3、p-P38表达的幅度均大于干扰素、沙利度胺单药处理组(图2)。



1:对照组;2:200 μg/ml 沙利度胺作用组;3:2 000 U/ml 干扰素作用组;4:200 μg/ml 沙利度胺+2 000 U/ml 干扰素作用组

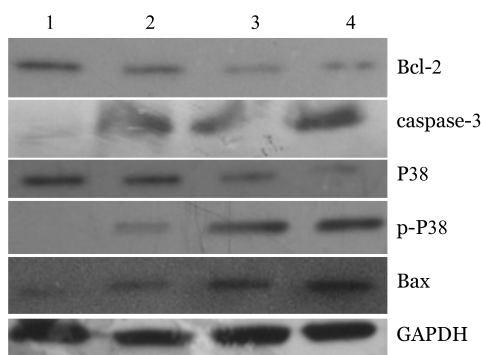
图1 ELISA法检测干扰素和沙利度胺作用48 h后对OCI-LY7细胞血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响(每组设3个复孔,实验重复3次)

讨 论

干扰素和沙利度胺均为临床中常见的抗肿瘤药物。徐皓等^[2]发现干扰素联合沙利度胺在体外实验中能协同抑制白血病细胞株 Kasumi-1 细胞的增殖,促进其凋亡,并调节相关凋亡蛋白的表达。在本实验中,我们以B细胞淋巴瘤细胞株 OCI-LY7 细胞为研究对象,采用不同浓度的干扰素和沙利度胺,单药或联合处理,发现两药均在特定的浓度范围内能够呈浓度依赖性地抑制 OCI-LY7 细胞的增殖,促进其凋亡,超过一定浓度后抑制作用出现平台期,且两药联合具有协同作用。

干扰素作为一种免疫调节因子,在淋巴瘤的治疗中应用较为广泛。它和肿瘤坏死因子(TNF-α)具有协同作用,能直接抑制肿瘤细胞的生长,还可通过调节免疫系统,增强NK细胞的活性,间接增强对肿瘤细胞的杀伤作用;可通过抑制VEGF、b-成纤维细胞生长因子(FGF)的分泌,来抑制肿瘤血管的生成,破坏肿瘤生长微环境。另外,干扰素还可以通过调节IL-2、IL-6的分泌,激活caspase依赖的凋亡通路等多种途径抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤

作用^[3]。



1:对照组;2:200 μg/ml 沙利度胺作用组;3:2 000 U/ml 干扰素作用组;4:200 μg/ml 沙利度胺+2 000 U/ml 干扰素作用组

图2 Western blot法检测沙利度胺和干扰素对OCI-LY7细胞凋亡相关蛋白表达的影响

沙利度胺可诱导T细胞和NK细胞产生干扰素-γ和IL-2,抑制肿瘤的生长;增强NK细胞和细胞毒性T细胞(CTL)的杀伤活性^[4]。VEGF对血管的生成有促进作用,能和特异性的受体结合刺激信号转导,在肿瘤的生长过程中发挥重要作用。有研究表明,侵袭性淋巴瘤的VEGF水平偏高,高水平的VEGF通常与预后差有关。沙利度胺能够抑制其分泌,从而抑制血管生成^[5]。沙利度胺还能减少整合素亚基的合成,阻止肿瘤的转移和细胞的恶变。现沙利度胺已被纳入多发性骨髓瘤的一线治疗中,新的研究还表明,沙利度胺还可通过环氧化物酶2途径,降低瘤内微血管的密度,从而抑制肿瘤的生长^[6]。

一项沙利度胺联合CHOP方案治疗弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的Ⅱ期临床试验,65例患者中32例采用沙利度胺联合CHOP方案治疗,33例为对照组(采用单独CHOP方案治疗),试验组的总反应率和完全缓解率分别为96.7%和80.6%,显著高于对照组的78.9%和57.8%,差异均有统计学意义,结果表明沙利度胺能增强DLBCL患者对CHOP方案的敏感性^[7]。易成华等^[8]应用沙利度胺联合CHOP方案或单纯的CHOP方案治疗46例DLBCL患者,结果显示联合组患者的治疗缓解率为72%,远高于对照组的30%,差异有统计学意义。张盈^[9]对1例经多周期化疗并多次复发的难治性DLBCL患者应用沙利度胺(100 mg,每日1次,口服)单药维

表2 流式细胞术检测沙利度胺(200 μg/ml)联合不同浓度干扰素作用48 h对OCI-LY7细胞凋亡率的影响(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	干扰素浓度(U/ml)					
	0	100	500	1 000	2 000	5 000
干扰素单药组	3.20±0.46	8.61±0.56	14.03±1.03	21.71±1.23	29.65±2.89	31.19±3.11
两药联合组	15.09±1.31	21.03±1.08	29.66±2.77	43.78±1.82	49.03±3.62	51.52±4.14
t值	-25.69	-30.63	-15.87	-30.14	-12.55	-11.78
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:每组设3个复孔,实验重复3次

持治疗,获得了较长时间的完全缓解,效果良好。caspase-3作为caspase家族中重要的凋亡执行分子,接受上游caspase分子的信号从而被激活,引发染色质凝集、核固缩、核碎裂等形态学变化最终导致细胞凋亡。我们的实验结果显示,干扰素联合沙利度胺使caspase-3活化量增加,说明caspase系统参与细胞的凋亡。

Bcl-2基因是与细胞的凋亡作用有关的基因,目前已经发现的Bcl-2蛋白家族功能分两类,一类像Bcl-2一样具有抑制凋亡作用,而另一类像Bax一样具有促凋亡作用。Bcl-2可增强细胞对多数DNA损伤因子的抵抗性,抑制大多数化疗药物所致的靶细胞凋亡^[10]。p53蛋白是DNA损伤的一个分子传感器,Bcl-2能抑制p53介导的凋亡,但不能抑制p53向核内转位或者p53介导的生长停滞,可能Bcl-2的作用是在DNA损伤后,阻止激活凋亡机制的信号到达其靶分子。Bax是Bcl-2家族的一种促凋亡蛋白,可以拮抗Bcl-2的细胞保护作用,在线粒体凋亡途径中发挥着重要作用。Billard等^[11]通过研究发现,40%~65%的DLBCL患者出现Bcl-2蛋白过度表达现象,与肿瘤细胞对利妥昔单抗及化疗药物耐药有关。一些新的抑制Bcl-2靶向药物,如ABT-737、ABT-199、GX15-070等在动物实验和人体实验中显示对复发/难治性DLBCL患者的肿瘤细胞有抑制增殖和促进凋亡的作用^[12]。P38是分裂原激活的蛋白激酶(MARK)家族的成员,主要存在于细胞质中,接受底物活化后转入细胞核,通过磷酸化发挥生物学效应。P38 MAPK通路在caspase上下游均能发挥作用,是调控细胞增殖、分化、凋亡等过程重要的信号通路^[13]。我们的实验结果显示干扰素联合沙利度胺可下调Bcl-2的表达,上调Bax、p-P38的表达,两药联合对OCI-LY7细胞的增殖抑制、促进凋亡作用可能是通过caspase依赖的线粒体途径、P38 MAPK通路及抑制细胞分泌VEGF完成的。

参考文献

- [1] 郝芊萌,魏旭东,尹青松,等.沙利度胺联合干扰素治疗12例复发难治性套细胞淋巴瘤[J].中华血液学杂志,2014,35(11):1013-1015. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.11.014.
- [2] 徐皓,米瑞华,范瑞华,等.沙利度胺联合干扰素对Kasumi-1细胞的增殖抑制作用及其机制研究[J].中华血液学杂志,2015,36(9):743-747. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.09.005.
- [3] Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group [J]. N Engl J Med, 1997, 337(4): 223-229. DOI: 10.1056/NEJM199707243370402.
- [4] Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide: emerging role in cancer medicine [J]. Annu Rev Med, 2002, 53: 629-657. DOI: 10.1146/annurev.med.53.082901.104043.
- [5] Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, et al. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma [J]. Eur J Haematol, 2002, 68(2): 91-100.
- [6] Haslett PA, Roche P, Butlin CR, et al. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation [J]. J Infect Dis, 2005, 192(12): 2045-2053. DOI: 10.1086/498216.
- [7] Ji D, Li Q, Cao J, et al. Thalidomide enhanced the efficacy of CHOP chemotherapy in the treatment of diffuse large B cell lymphoma: A phase II study [J]. Oncotarget, 2016, 7(22): 33331-33339. DOI: 10.18632/oncotarget.8973.
- [8] 易成华,李康保.沙利度胺联合CHOP方案治疗弥漫大B细胞淋巴瘤临床研究[J].河南医学研究,2016,(1):96-96. DOI: 10.3969/j.issn.1004-437X.2016.01.044.
- [9] 张盈.沙利度胺治疗复发或难治性弥漫大B细胞淋巴瘤1例[J].中国实用医药,2016,(2):204-205. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2016.02.151.
- [10] Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma [J]. Blood, 1997, 90(1): 244-251.
- [11] Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(9): 1691-1700. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0058.
- [12] 蔡家新,童坦君. P38^{cdc2}激酶的研究进展[J].生理科学进展,1993,24(2):118-122.
- [13] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 807-869.

(收稿日期:2016-09-04)

(本文编辑:刘志红)