

## $\alpha$ 干扰素联合全反式维甲酸对急性早幼粒细胞白血病细胞系NB4、NB4-R1增殖和分化的影响

王共爱 王海英 王占聚 薛克伟 马传香 冯安华 田玉青

**Study of IFN- $\alpha$  in combination with all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of acute promyelocytic leukemia cell lines NB4 and NB4-R1 cells**

Wang Gong'ai, Wang Haiying, Wang Zhanju, Xue Kewei, Ma Chuanxiang, Feng Anhua, Tian Yuqing

Corresponding author: Wang Haiying, The Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Shandong Weifang 261031, China. Email: wanghaiying1121@sina.com

急性早幼粒细胞白血病(APL)是临床常见的一种急性白血病,全反式维甲酸(ATRA)是诱导APL缓解的主要药物,90%的APL患者通过ATRA治疗可获得完全缓解,但APL复发和ATRA耐药仍是困扰临床医师的主要难题,也是目前APL治疗方面研究的热点之一。有研究发现APL患者ATRA耐药与缺乏干扰素合成的一些蛋白质有关<sup>[1]</sup>,我们通过探讨IFN- $\alpha$ 联合ATRA对APL细胞系NB4及ATRA耐药APL细胞系NB4-R1增殖和分化的影响,为治疗ATRA耐药的APL提供理论依据。

### 材料和方法

1. 细胞系及主要试剂:NB4、NB4-R1细胞系购自北京正四柏生物科技有限公司,ATRA及IFN- $\alpha$ 由上海罗氏制药有限公司提供,CD11b/Mac-1-PE(50次检测)抗体购自美国BD公司。

2. 细胞培养:NB4、NB4-R1细胞均用含10%灭活的胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,每3 d传代1次,取对数生长期细胞作为实验细胞。

3. MTT法检测细胞增殖抑制率:细胞以 $5 \times 10^4$ /ml的密度接种于96孔板,每孔100  $\mu$ l。实验分为IFN- $\alpha$ 组、ATRA组、IFN- $\alpha$ +ATRA组(调整NB4、NB4-R1细胞密度)、对照组,ATRA浓度为 $1 \times 10^{-6}$  mol/ml,IFN- $\alpha$ 浓度为 $1 \times 10^{-6}$  U/ml,对照组加入100  $\mu$ l培养基。加入适量培养基使每个实验孔容积为200  $\mu$ l,每次实验设3个复孔,实验重复3次。分别在培养2、4、6、8、10 d加入MTT溶液(5 mg/ml),孵育4 h。在酶联免

疫检测仪波长490 nm处测量各孔的吸光度(A)值。

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

4. 流式细胞术检测细胞分化:细胞处理同细胞增殖检测实验,收集处理不同时间的细胞,以 $1 \times 10^5$ /ml细胞密度放置培养基中,加入PE-CD11b室温孵育15 min, PBS液清洗2遍, PBS缓冲液重悬,用流式细胞术检测。

5. 细胞形态学观察:细胞处理同细胞增殖检测实验,电镜下观察细胞形态变化,并收集处理不同时间的细胞,弃去上清液,用胎牛血清重悬细胞,涂片,晾干,瑞氏染色后放置倒置显微镜下观察细胞核的变化、细胞质含量、核质比及核仁的变化。

6. 统计学处理:数据用SPSS20.0软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个相关样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 细胞形态学:培养4 d后,NB4、NB4-R1细胞IFN- $\alpha$ 组和NB4-R1细胞ATRA组无明显形态改变,NB4、NB4-R1细胞IFN- $\alpha$ +ATRA组和NB4细胞ATRA组细胞形态变化明显,电镜下表现为细胞大小不一,明显畸形,瑞氏染色后表现为胞核减小、胞质增多,核质比减小,核仁消失。

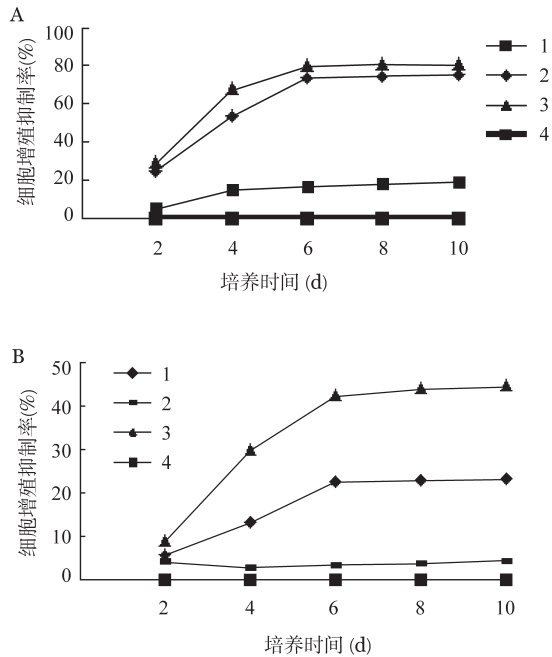
2. 细胞增殖:各用药组细胞增殖抑制率随培养时间延长逐渐升高,到第6天时接近平台期。第6天时,NB4细胞IFN- $\alpha$ 、ATRA、IFN- $\alpha$ +ATRA用药组及对照组细胞增殖抑制率均数分别为25.4%、75.1%、80.1%和0,显示IFN- $\alpha$ 、ATRA、IFN- $\alpha$ +ATRA对NB4细胞有明显的增殖抑制作用( $P < 0.05$ ),IFN- $\alpha$ +ATRA抑制作用最强,ATRA其次,IFN- $\alpha$ 最弱( $P < 0.05$ )(图1A)。NB4-R1细胞各用药组细胞增殖抑制率分别为22.4%、3.5%、50.6%,对照组为0。经IFN- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ +ATRA处理的NB4-R1细胞较对照组出现明显的增殖抑制( $P < 0.05$ ),IFN- $\alpha$ +ATRA组抑制作用强于IFN- $\alpha$ 组( $P < 0.05$ ),ATRA组和对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),IFN- $\alpha$ +ATRA抑制作用最强,IFN- $\alpha$ 其次,ATRA最弱( $P < 0.05$ )(图1B)。

3. CD11b表达:随着细胞培养时间延长,CD11b表达率逐渐增加,第4天接近平台期。细胞培养第4天时,NB4细胞IFN- $\alpha$ 、ATRA、IFN- $\alpha$ +ATRA用药组及对照组CD11b表达率分别为(15.6 $\pm$ 0.1)%、(78.5 $\pm$ 1.3)%、(93.7 $\pm$ 0.9)%和(1.2 $\pm$ 0.2)%。各用药组CD11b表达较对照组明显增高( $P <$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.02.019

作者单位:261031 潍坊医学院(王共爱、薛克伟、田玉青);潍坊医学院附属医院血液科(王海英、王占聚、冯安华),病理科(马传香)

通信作者:王海英,Email: wanghaiying1121@sina.com



1: IFN- $\alpha$   $1 \times 10^{-6}$  U/ml; 2: ATRA  $1 \times 10^{-6}$  mol/ml; 3: IFN- $\alpha$   $1 \times 10^{-6}$  U/ml 联合 ATRA  $1 \times 10^{-6}$  mol/ml; 4: 对照组

图1 IFN- $\alpha$  联合全反式维甲酸(ATRA)对NB4细胞(A)和NB4-R1细胞(B)的增殖抑制作用

0.05), IFN- $\alpha$ +ATRA 组 CD11b 表达最强, ATRA 组其次, IFN- $\alpha$  组最低 ( $P < 0.05$ )。NB4-R1 细胞各用药组 CD11b 表达率分别为 (13.8 $\pm$ 1.1)%、(5.2 $\pm$ 0.8)%、(42.8 $\pm$ 2.3)%, 对照组为 (3.2 $\pm$ 0.6)%, ATRA 组和对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), IFN- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ +ATRA 组 CD11b 表达明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); IFN- $\alpha$ +ATRA 组 CD11b 表达明显高于 IFN- $\alpha$  组 ( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

从19世纪80年代, ATRA开始单药应用于APL治疗, 随后联合多种化疗药物使APL患者治愈率高达80%~90%<sup>[2]</sup>。95%的APL患者15号染色体PML(早幼粒白血病基因)与17号染色体上RAR $\alpha$ (维甲酸受体基因)形成PML-RAR $\alpha$ 融合基因, 该基因抑制细胞分化基因的转录, ATRA可以与RAR $\alpha$ 结合, 诱导APL细胞向成熟分化, 从而使疾病得到缓解。但是有一部分APL患者对ATRA治疗不敏感或很快产生耐药。对于这些患者的治疗, 一直是临床上比较棘手的问题。

研究发现, 诱导免疫细胞分泌的IFN- $\alpha$ , 与细胞内转录子和转录激活子(STAT)2共同干扰肿瘤细胞存活, 抑制血管形

成, 增加细胞毒性T淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、树突细胞活性<sup>[3]</sup>。IFN- $\alpha$ 尚能增加肿瘤相关抗原产生, 引起特异性T淋巴细胞反应<sup>[4]</sup>。IFN- $\alpha$ 抑制肿瘤细胞生长, 一方面直接发生在细胞生命活动中, 抑制细胞周期、促进凋亡和分化; 另一方面激活免疫系统的T淋巴细胞或自然杀伤细胞, 抑制血管生成或诱导细胞因子产生<sup>[5]</sup>。我们的研究结果显示, IFN- $\alpha$ 对NB4、NB4-R1细胞产生明显的增殖抑制作用, 而且与ATRA具有协同作用。

有学者发现, ATRA诱导APL细胞分化时, 首先诱导IFN调节因子(IRF)1表达<sup>[6]</sup>, IRF1提高细胞内转录子和STAT2及IRF9蛋白水平, STAT2和IRF9复合物是调控维甲酸诱导基因G(RIG-G)表达的关键因子<sup>[7]</sup>, IFN- $\alpha$ 诱导STAT2酪氨酸磷酸化, 增加RIG-G基因表达, IFN- $\alpha$ 与ATRA对RIG-G基因抗肿瘤发挥协同作用<sup>[6]</sup>。CD11b抗原是成熟髓细胞表面标志, 我们通过流式细胞术检测发现, IFN- $\alpha$ 不仅增强ATRA诱导NB4细胞分化, 而且能诱导ATRA耐药的NB4-R1细胞发生分化, IFN- $\alpha$ 与ATRA对APL细胞分化表现出明显的协同作用。

## 参 考 文 献

- [1] Pelicano L, Brumpt C, Pitha PM, et al. Retinoic acid resistance in NB4 APL cells is associated with lack of interferon alpha synthesis Stat1 and p48 induction [J]. *Oncogene*, 2010, 18(1): 3944-3953.
- [2] Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(2):111-121.
- [3] Hertzog P, Forster S, Samarajiwa S. Systems biology of interferon responses [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(1): 5-11.
- [4] Hance KW, Rogers CJ, Zaharoff DA, et al. The antitumor and immunoadjuvant effects of IFN- $\alpha$  in combination with recombinant poxvirus vaccines [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7):2387-2396.
- [5] Kotredes KP, Gamero AM. Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2013, 33(4): 162-170.
- [6] 楼叶江, 潘晓蓉, 许桂平, 等. 自分泌干扰素 $\alpha$ 在全反式维甲酸诱导RIG-G基因表达中的作用 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(2):124-127.
- [7] 潘晓蓉, 楼叶江, 张长林, 等. 全反式维甲酸诱导Rig-g基因表达的调控机制研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(5): 31-35.

(收稿日期:2014-08-05)

(本文编辑:董文革)