

干扰素- α 对人肝癌细胞增殖及侵袭的抑制作用

乔世峰, 王季堃

乔世峰, 北京世纪坛医院普外科 北京市 100038
王季堃, 锦州医学院附属第一医院肿瘤诊治中心 辽宁省锦州市 121000
通讯作者: 乔世峰, 100038, 北京市海淀区羊坊店 10 号, 北京世纪坛医院.
qiaoshf@tom.com
电话: 010-80647613
收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 研究人干扰素- α 对人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞增殖及侵袭的抑制作用。

方法: 常规培养的 BEL-7402 细胞加入人干扰素- α (1×10^6 U/L) 共同孵育 24 h 后, 以 MTT 法检测干扰素- α 对肿瘤细胞增殖的影响; Boyden 小室法检测肝癌细胞侵袭能力的变化; 明胶酶谱法检测肝癌细胞基质金属蛋白酶的变化; 免疫组化法检测肿瘤细胞增殖核抗原的表达; TUNEL 法检测肿瘤细胞的凋亡。

结果: 人干扰素- α 可以明显抑制体外 BEL-7402 细胞的增殖(抑制率为 20.2%); 干扰素- α 作用后在 Boyden 小室穿膜的肿瘤细胞数明显减少(抑制率为 23.9%); 肝癌细胞基质金属蛋白酶的分泌没有明显变化。干扰素- α 组肿瘤细胞增殖核抗原的表达明显下降, 凋亡细胞数明显增加。

结论: 低剂量的干扰素- α 可以直接抑制肝癌细胞株 BEL-7402 的增殖, 对 BEL-7402 细胞的侵袭有明显的抑制作用; 可以抑制肿瘤细胞增殖核抗原的表达并诱导细胞凋亡。

乔世峰, 王季堃. 干扰素- α 对人肝癌细胞增殖及侵袭的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1021-1023
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1021.asp>

0 引言

干扰素(interferon, IFN) 是一类具有抗病毒、抗增殖及免疫调节作用的细胞因子。根据 IFN 产生的来源、理化性质及结构的不同分为 I、II 型干扰素。I 型干扰素包括干扰素- α 、 α 和 ω , 他们共用相同的细胞表面受体, I 型干扰素之间分子的同源性很高, 但抗原性完全不同。自干扰素被发现以来, 大量的临床研究表明, 干扰素对抗病毒性疾病和恶性肿瘤以及增强机体免疫调节能力有明显效果, 作为一种肿瘤的治疗佐剂国内外已有相关报道^[1-2]。肝细胞癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 而干扰素- α 对实验性大鼠肝癌及临床在肝细胞癌根治性切除术后转移复发有抑制作用^[3-4], 但干扰素抗肿瘤的机制还不十分清楚。我们利用人肝癌细胞株 BEL-7402 研究干扰素- α 对肝癌细胞的增殖及侵袭的影响, 并初步探讨了其

抗肿瘤的机制, 为干扰素- α 对于肝癌的临床治疗应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 BEL-7402 购自北京大学肿瘤研究所; 干扰素- $\alpha 2\beta$ 购自北京远策药业有限责任公司; Boyden 小室及人工基膜(Matrigel) 由北京大学医学部细胞学系提供; 细胞增殖核抗原(PCNA) 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 BEL-7402 细胞经消化后计数, 以 1.5×10^8 /L 接种 96 孔板, 每孔 200 μ L, 50 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 实验组加入 IFN- α 10^6 U/L, 对照组加入相同体积的 PBS, 50 mL/L CO₂、37°C 孵箱中培养 24 h。

1.2.2 MTT 法检测 BEL-7402 细胞的增殖 培养细胞加入 MTT (5 g/L) 50 μ L/孔, 继续孵育 4 h, 加入 DMSO 100 μ L/孔, 轻摇 10 min 后检测波长 490 nm 的吸光度, 每组设 3 复孔。细胞增殖的抑制率按照以下公式计算: $(1 - \text{IFN-}\alpha \text{ 培养孔细胞上清的 } A_{490} / \text{对照组培养孔细胞上清的 } A_{490}) \times 100\%$

1.2.3 Boyden 小室检测细胞侵袭实验 参照 Albini *et al*^[5] 的体外侵袭实验方法。每张膜随机选取 5 个高倍视野, 计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 每组细胞设 3 个复孔。穿膜的肿瘤细胞数目多少作为评价肿瘤细胞迁徙、浸润能力强弱的指标。

1.2.4 明胶酶谱分析(zymography) 正常传代培养的细胞, 以无血清培养液培养 24 h 后细胞计数并收集培养液, 离心取上清, PBS 透析按细胞数调整体积后进行 SDS-PAGE 电泳, 其中分离胶含 0.1% 明胶, 将蛋白样品与 $2 \times$ zymography 上样缓冲液(0.16 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 20 mL/L SDS, 80 mL/L 甘油, 0.3 g/L 溴酚蓝)等量混合后上样, 10 mA 恒流电泳。电泳结束后, 将胶置于 2.5% Triton X-100 液中室温摇动 1 h, 将胶取出浸于酶孵育液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂)中, 37°C 摇 18 h。再将胶置于考马斯亮蓝染色液中摇动染色 3 h; 脱色液 I (300 mL/L 甲醇, 100 mL/L 冰乙酸)脱色至蓝色背景下的透明条带显出。将胶浸泡于脱色液 II (40 g/L 甲醇, 50 mL/L 冰乙酸)中, 拍照记录。

1.2.5 免疫细胞化学法检测BEL-7402细胞PCNA的表达参照文献[6]进行。

1.2.6 TUNEL法检测肿瘤组织细胞的凋亡 具体实验步骤按说明书进行. 光镜下($\times 400$)观察结果. 所见细胞核有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 每个样品至少计数100个细胞中的阳性细胞数, 重复计数3次, 取平均值。

统计学处理 所有数值均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间差异比较采用 *t* 检验. $P < 0.05$ 为具有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 细胞增殖 IFN- α 组与 PBS 组比较 BEL-7402 细胞的生长明显受到抑制 ($P < 0.01$), 细胞生长的抑制率为 20.2% (图 1)。

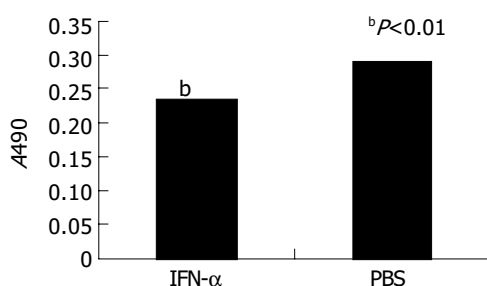


图1 MTT法检测IFN- α 对BEL-7402细胞增殖的影响。

2.2 Boyden 小室检测的细胞体外侵袭的结果表明, 作用 24 h 后 IFN- α 组 BEL-7402 细胞穿过 Matrigel 发生侵袭的细胞数分别为每高倍视野 101.2 ± 5.8 个, PBS 组为 131.8 ± 9.5 个, 抑制率为 23.9%, 二者比较有显著性差异 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 IFN- α 对 BEL-7402 细胞 MMPs 分泌的影响 经 IFN- α 作用后, BEL-7402 细胞分泌的 MMPs 种类和数量都没有变化。

2.4 BEL-7402 细胞 PCNA 的表达 人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞与 PCNA 单抗染色后, 阳性细胞染色为棕色, 染色部位在细胞核; 同一反应条件下 IFN- α 组 PCNA 染色与对照组比较显色明显减弱。

2.5 肿瘤组织细胞的凋亡 细胞核呈棕褐色着染者即为凋亡细

胞, IFN- α 组每 100 个细胞中阳性细胞数为 19.53 ± 3.18 个, 对照组阳性细胞数为 11.36 ± 0.55 , IFN- α 组与对照组比较凋亡细胞明显增多 ($P < 0.01$)。

3 讨论

IFN- α 是一种糖蛋白, 属于 I 型干扰素, 具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多种生物学功能, 许多体内和体外试验都充分证明, IFN 不仅可以抑制肿瘤病毒诱发的肿瘤的生长, 而且可以抑制移植性肿瘤和由化学致癌物诱发的肿瘤的生长, 已经被广泛应用在多种领域及多种疾病的治疗中^[7]. 但 IFN 的抗肿瘤机制尚不十分清楚。

肝细胞肝癌是我国常见恶性肿瘤之一, 死亡率较高. 手术切除仍是首选的治疗方案, 但常有复发的危险. 有报道在肝细胞癌切除术后应用 IFN- α 治疗可以降低肝细胞癌的复发^[4], 我们利用肝癌细胞系 BEL-7402 进行实验, 以不同剂量 (10^5 - 10^7 U/L) 的 IFN- $\alpha 2\beta$ 进行增殖的抑制作用筛选, 发现低剂量 IFN- $\alpha 2\beta$ (5×10^5 U/mL) 既有抗肝癌细胞增殖的效果, IFN- α 对 BEL-7402 细胞的增殖有明显的抑制作用, 也证明了 IFN- α 对肿瘤细胞可能有直接的抑制作用。

转移是引起癌症死亡的主要原因, 在研究 IFN 对肿瘤细胞转移作用的细胞侵袭实验中我们利用了 Boyden chambers 的实验模型, 结果发现 IFN- α 作用后 BEL-7402 细胞的侵袭能力明显受到抑制, 穿膜细胞数明显减少, 说明 IFN- α 可以抑制细胞对 Matrigel 胶的侵袭. 在转移的过程中, 肿瘤细胞的侵袭依赖于细胞的迁移和细胞外基质蛋白的水解. 基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一种存在于人类许多组织并发挥重要功能的金属蛋白酶, 是降解细胞外基质的主要酶类, 为 Zn^{2+} 依赖性内切酶, 参与了肿瘤转移过程中的多个步骤^[8]. 通过明胶酶谱法检测 MMPs 的分泌发现, IFN- α 作用的 BEL-7402 细胞培养上清中分泌 MMPs 的质和量都没有发生变化, 分析 IFN- α 在体外不能阻止 BEL-7402 细胞 MMPs 的分泌, IFN- α 对细胞侵袭的抑制作用可能是通过其他渠道实现的。

增殖细胞核抗原 (PCNA) 是一种无种属和组织特异性的、广泛存在于增殖活跃细胞中的细胞周期蛋白^[9]. 作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, PCNA 直接参与 DNA 合成. 在细胞周期 G1 晚期开始增加, S 期达高峰, G2 期明显下

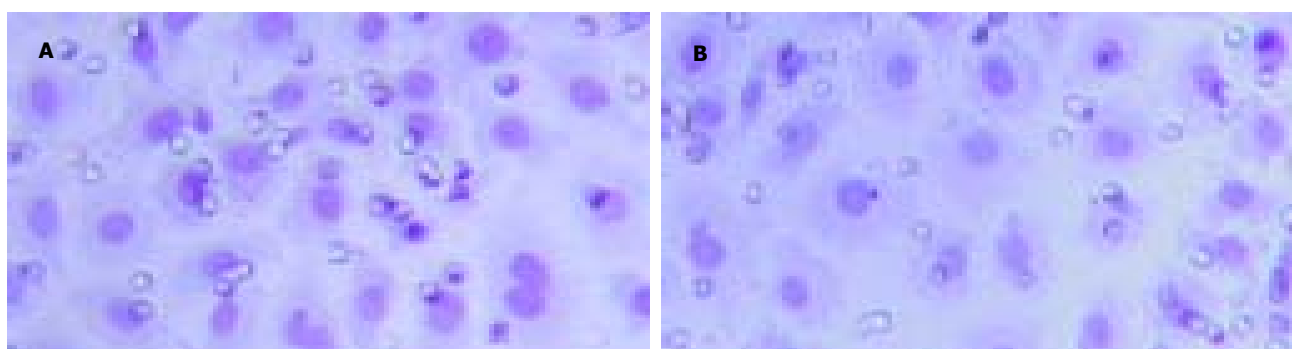


图2 Boyden小室检测BEL-7402穿膜细胞. A: PBS; B: INF- α 组.