

重组高效复合干扰素对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的作用*

阚奇伟^{1#}, 刘伦旭^{1△}, 魏光文², 蒲强¹, 诸葛雪朋¹, 马林¹, 马军亮¹

1. 四川大学华西医院 胸外科(成都 610041); 2. 四川辉阳生命工程股份有限公司(成都 610041)

【摘要】 目的 研究重组高效复合干扰素(rSIFN-co)对肺腺癌细胞株 A549 增殖和凋亡的影响。方法 筛选 rSIFN-co 对 A549 细胞的有效浓度,及与顺铂联合用药的最佳浓度和作用时间。分为 rSIFN-co(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、传统重组集成干扰素 α (干复津,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、rSIFN-co(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 顺铂(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、干复津(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 顺铂(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、顺铂(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组和 RPMI-1640 液空白组,分别干预 A549 细胞。MTT 法检测各组 7 d 活细胞数并作生存曲线,流式细胞仪检测 48 h 各组细胞凋亡率,免疫荧光法检测 48 h 各组凋亡相关蛋白 Fas、Bcl-2 表达。结果 rSIFN-co 的有效浓度为 1 ~ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,顺铂的最低有效浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂联合用药时 rSIFN-co 的最佳浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最佳作用时间为 48 h。生存曲线示 rSIFN-co 对 A549 的抑制作用强于干复津,rSIFN-co + 顺铂的抑制作用强于干复津 + 顺铂。rSIFN-co 可诱导 A549 细胞凋亡,rSIFN-co 组凋亡率高于干复津组($P=0.000$),rSIFN-co + 顺铂组凋亡率高于 rSIFN-co 组($P=0.004$)及顺铂组($P=0.023$)。rSIFN-co 能增强 A549 中 Fas 的表达,并抑制 Bcl-2 的表达,其中 rSIFN-co 组 Bcl-2 表达低于干复津组($P<0.05$)。结论 rSIFN-co 能抑制 A549 增殖,且作用强于干复津,与顺铂联合应用的抑制作用增强,其对 A549 的抑制作用与调节凋亡相关基因表达有关。

【关键词】 重组高效复合干扰素 肺腺癌 增殖 凋亡

Effect of Recombinant Super-compound Interferon (rSIFN-co) on Proliferation and Apoptosis of Human Pulmonary Adenocarcinoma Cell A549 KAN Qi-wei¹, LIU Lun-xu^{1△}, WEI Guang-wen², PU Qiang¹, ZHUGE Xue-peng¹, MA Lin¹, MA Jun-liang¹. 1. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Hui Yang Life Engineering Co. Ltd., Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lunxu_liu@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of recombinant super-compound interferon (rSIFN-co) on the proliferation and apoptosis of pulmonary adenocarcinoma cell line A549. **Methods** Screening tests were conducted to determine the concentrations of rSIFN-co that have a significant impact on A549 and the optimal concentration and duration for the test of rSIFN-co combined with Cisplatin. A549 cells were treated with rSIFN-co, Infergen, rSIFN-co + Cisplatin, Infergen + Cisplatin, and Cisplatin, respectively, and compared with those cultured in normal medium. The viable A549 cells from Day 1 to Day 7 were detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM). Apoptosis-associated proteins, Fas and Bcl-2 were detected by immunofluorescence at 48 h. **Results** Effective concentrations of rSIFN-co ranged from 1 to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and a minimal of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cisplatin was needed. The optimal test condition was set at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rSIFN-co combined with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cisplatin for a duration of 48 h. rSIFN-co demonstrated a stronger inhibiting effect on cell proliferation than Infergen. The inhibiting efficiency of rSIFN-co + Cisplatin was also stronger than that of Infergen + Cisplatin. Apoptosis of A549 cells induced by rSIFN-co was also more significant than that of Infergen ($P=0.000$). Cells treated with rSIFN-co + Cisplatin has a higher apoptosis rate than those treated with rSIFN-co ($P=0.004$) or Cisplatin ($P=0.023$). rSIFN-co increased the expression of Fas and decreased the expression of Bcl-2. Cells treated with rSIFN-co showed lower fluorescence intensity of Bcl-2 than those treated with Infergen ($P<0.05$). **Conclusion** rSIFN-co inhibits the proliferation of A549 and its effect is stronger than that of Infergen. Cisplatin can further enhance the inhibiting effect of rSIFN-co. The inhibiting efficiency may be associated with the expression of apoptosis-related genes.

【Key words】 Recombinant super-compound interferon (rSIFN-co) Pulmonary adenocarcinoma Proliferation Apoptosis

* 国家科技重大专项-重大新药创制(No. 2009ZX09102-246)资助和四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2009SZ0152, No. 2011SZ0111)资助

现在眉山市人民医院胸外科

△ 通讯作者, E-mail: lunxu_liu@aliyun.com

干扰素 (IFN) 曾用于多种肿瘤的治疗, 但由于传统 IFN 具有较明显的副作用, 以及在一些肿瘤的治疗方面疗效欠佳^[1,2], 所以应用受到限制。新近研发的重组高效复合干扰素 (rSIFN-co) 与传统重组集成干扰素 α (干复津) 氨基酸序列一致但空间构向结构不同, 前者在生物学效应上具有高活性、强功能、低副作用等特点, 是一种颇具潜力的新型干扰素。目前已有 rSIFN-co 体外作用于卵巢癌^[3]、宫颈癌^[4] 细胞的研究报道, 结果表明 rSIFN-co 对卵巢癌、宫颈癌细胞具有较好的诱导凋亡或生长抑制的作用。但关于 rSIFN-co 作用于其他恶性肿瘤细胞的研究较少。随着环境污染加剧, 肺癌的发病率已经成为众多恶性肿瘤中增长最快者, 尤其是肺腺癌的发病呈现明显增加, 而目前鲜见 rSIFN-co 对肺癌细胞尤其是对肺腺癌细胞体外作用的研究报道。本研究探讨 rSIFN-co 体外抗肺腺癌细胞株 A549 的作用, 并对其抗肿瘤作用的机理作初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

肺腺癌细胞株 A549 由我院移植免疫实验室提供。rSIFN-co 及干复津由四川省辉阳生命工程股份有限公司提供。顺铂为云南生物谷灯盏花药业有限公司生产。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基公司。Fas 购自中杉公司。Bcl-2 购自基因科技(上海)有限公司。荧光标记的二抗购自中杉公司 (ZF-0312, 山羊抗小鼠 IgG/FITC, 1:50)。小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司。MTT 自备 (0.4% 即 0.4 g/100 mL 生理盐水, 0.22 μ m 过滤器除菌, -20 $^{\circ}$ C 冻存)。二甲亚砜 (DMSO) 购自成都科龙化工试剂厂。Bio-Tek Kcjunior™ 多波长酶标仪。Elite Esp 型流式细胞仪 (美国 Coulter 公司)。OLYMPUS DP70 荧光显微镜。

1.2 方 法

1.2.1 A549 培养 肺腺癌细胞株 A549 培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养, 视生长情况 2~4 d 传代。

1.2.2 药物浓度筛选 从一较低浓度开始逐渐增大药物浓度作用于细胞, 并与对照组比较, 当浓度达到某一值时细胞数量减少至与对照组比较差异有统计学意义, 这一浓度即为该药物对该细胞作用的最低有效浓度。当药物浓度高达一定值时, 继续增大浓度其对细胞作用不再增强, 此时浓度即该药物对该细胞作用的最高有效浓度。

从 (1/2)¹² μ g/mL 至 (1/2)⁻² μ g/mL 设置不同浓度的 rSIFN-co, 以 RPMI-1640 液作为对照, 作用于 A549, 在 24 h、48 h 和 72 h 3 个时间点上检测每一组的细胞吸光度 (A) 值并与对照组比较。同理设置 1、2、4、6 μ g/mL 的顺铂及 RPMI-1640 液作为对照, 作用于 A549 细胞, 在 24 h、48 h 和 72 h 3 个时间点上检测每一组的细胞 A 值并与对照组比较。设置 16、32、64、128 μ g/mL 的 rSIFN-co 作用于 A549, 在 24 h、48 h、72 h 共 3 个时间点观察随着药物浓度增大对细胞作用的趋势。

根据上述实验结果, 选择不同浓度的 rSIFN-co, 与顺铂联合作用于 A549 细胞, 顺铂取最低有效浓度 2 μ g/mL。分组: ① rSIFN-co (1、5、10、20、32、64 μ g/mL); ② rSIFN-co (1、5、10、20、32、64 μ g/mL) + 顺铂 (2 μ g/mL); ③ 顺铂 (2 μ g/mL); ④ RPMI-1640 液对照。在 24 h、48 h 和 72 h 3 个时间点上 MTT 法检测 A 值。每一时间点上每个浓度设置 2 个复孔, 3 个孔的平均值作为该孔的 A 值, 按下列公式计算药物对细胞生长的抑制率: 增殖抑制率 (%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 \times 100%。实验重复 3 次, 筛选与顺铂联合用药时 rSIFN-co 的最佳浓度和作用时间。

1.2.3 rSIFN-co 对 A549 生长增殖的影响 观察实验组与对照组细胞的形态学变化, 选择最佳协同浓度观察 rSIFN-co 对 A549 生长曲线的影响。分组: ① rSIFN-co (5 μ g/mL); ② 干复津 (5 μ g/mL); ③ rSIFN-co (5 μ g/mL) + 顺铂 (2 μ g/mL); ④ 干复津 (5 μ g/mL) + 顺铂 (2 μ g/mL); ⑤ 顺铂 (2 μ g/mL); ⑥ RPMI-1640 液对照。MTT 法连续检测头 7 d 的 A 值, 绘制各组的生长曲线。

1.2.4 rSIFN-co 对 A549 凋亡的影响 分组同前, 选药物最佳协同浓度 (同前), 作用 48 h 后用磷脂酰丝氨酸外翻分析法 (Annexin V 法) 标记凋亡细胞, 严格按照说明书操作, 最后流式细胞仪检测凋亡。

1.2.5 rSIFN-co 对 A549 凋亡相关蛋白 Fas 和 Bcl-2 表达的影响 分组同前, 选药物最佳协同浓度, 作用 48 h 后严格按照 EnVision 二步法制作免疫荧光片。荧光显微镜照相, 每张片选 5 个不同视野照相 (倒置相差显微镜 200 倍), 用 Image Pro Plus 图像处理软件检测积分光密度 (IOD) 值, 代表蛋白表达量。

1.2.6 统计学方法 每个药物浓度及对照组均在 96 孔板上设计 2 个复孔, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验,

采用 SigmaPlot12.5 软件绘图。

2 结果

2.1 药物浓度

在 24 h、48 h、72 h 3 个时间点上 rSIFN-co 均有效的最小浓度为 $(1/2)^4 \mu\text{g/mL}$ 即 $0.063 \mu\text{g/mL}$ ，但是在 24 h、 $(1/2)^2 \mu\text{g/mL}$ 浓度作用下 A 值与对照组差异无统计学意义，即此时点药效不稳定，当浓度达到 $1 \mu\text{g/mL}$ 及更高浓度时，3 个时间点下 A 值与对照组差异均有统计学意义。为确保药物起效，在下一步实验中 rSIFN-co 的最小浓度取 $1 \mu\text{g/mL}$ 。当浓度超过 $64 \mu\text{g/mL}$ 后随着 rSIFN-co 浓度的增加药物对细胞的抑制作用不再明显增加，反而减弱，所以 rSIFN-co 的有效浓度取 $1 \sim 64 \mu\text{g/mL}$ 。顺铂在 24 h、48 h、72 h 起效的最低浓度分别为 2、1、 $1 \mu\text{g/mL}$ ，同样顺铂的最低有效浓度取 3 组均有效的最低浓度 $2 \mu\text{g/mL}$ 。

见图 1。rSIFN-co 对 A549 细胞具有抑制增殖的作用，随着药物浓度的增大和作用时间的延长抑制作用更明显。rSIFN-co 和顺铂联合应用比单用对 A549 细胞生长的抑制作用更强，尤其当 rSIFN-co 为 $5 \mu\text{g/mL}$ 、作用至 48 h，对细胞的抑制最明显。所以二者联合用药 rSIFN-co 的最佳浓度取 $5 \mu\text{g/mL}$ ，作用时间 48 h。

2.2 对 A549 生长增殖的影响

2.2.1 细胞形态学观察结果 对照组细胞数量较多，贴壁生长且均匀，状态良好。各实验组细胞数量减少，培养液内细胞碎片增多，且随着药物浓度的增大和干预时间的延长更明显。

2.2.2 对 A549 细胞生长曲线的影响 见图 2。与对照组相比，实验组生存曲线明显向右下移，高峰出现延迟甚至无高峰。联合用药的抑制作用强于单独用药，且 rSIFN-co+顺铂的抑制作用强于干复津+顺铂，rSIFN-co 的抑制作用强于干复津。

2.3 对 A549 细胞凋亡的影响

2.3.1 细胞凋亡率检测 对照组、干复津、rSIFN-co、顺铂、干复津+顺铂、rSIFN-co+顺铂各组细胞凋亡率分别为 $(15.6 \pm 4.3)\%$ 、 $(35.3 \pm 5.5)\%$ 、 $(58.9 \pm 5.1)\%$ 、 $(63.2 \pm 6.5)\%$ 、 $(67.9 \pm 5.0)\%$ 、 $(74.4 \pm 5.0)\%$ 。实验组凋亡率均高于对照组 ($P < 0.001$)；rSIFN-co 组的凋亡率高于干复津组 ($P = 0.000$)；rSIFN-co+顺铂组的凋亡率高于 rSIFN-co 组 ($P = 0.004$) 及顺铂组 ($P = 0.023$)。

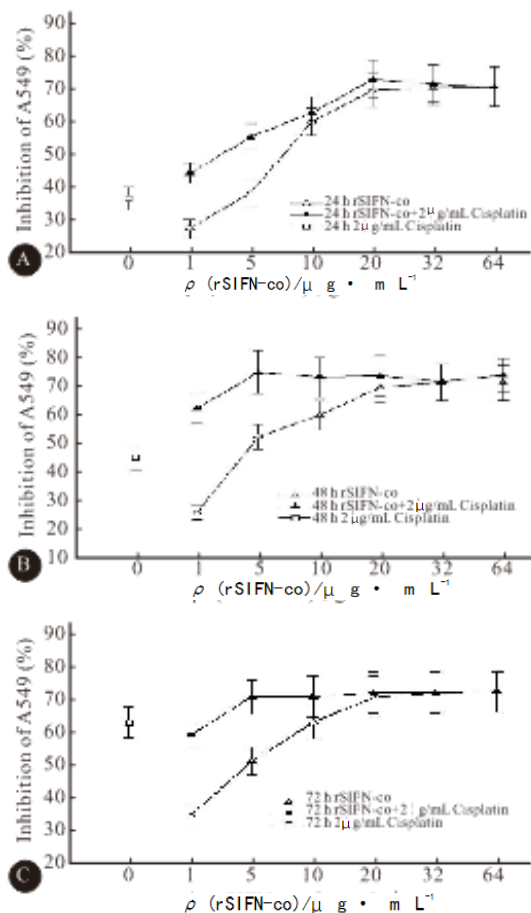


图 1 rSIFN-co、顺铂单用或联合应用对 A549 细胞体外生长 24 h (A)、48 h (B)、72 h (C) 的抑制率

Fig 1 Inhibition of A549 cells as a result of treatment with rSIFN-co, Cisplatin or rSIFN-co+Cisplatin at 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C)

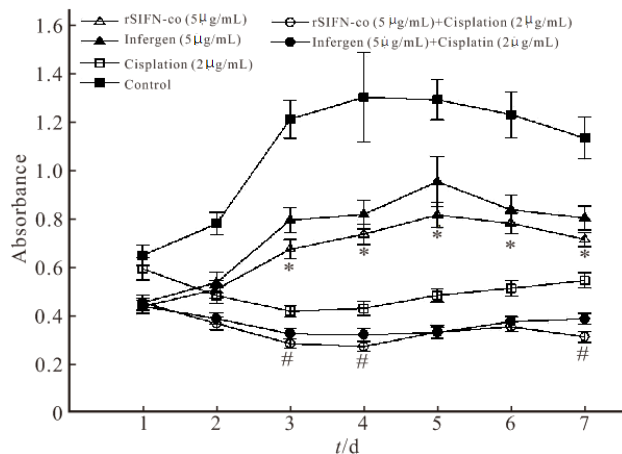


图 2 不同组细胞生长曲线

Fig 2 Cell growth curves

* $P < 0.05$, vs. Infefergen group; # $P < 0.05$, vs. Infefergen + Cisplatin

2.3.2 Fas 表达 与对照组相比，各实验组的 IOD 值升高 ($P < 0.001$)。各实验组间差异尚无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3，附表。

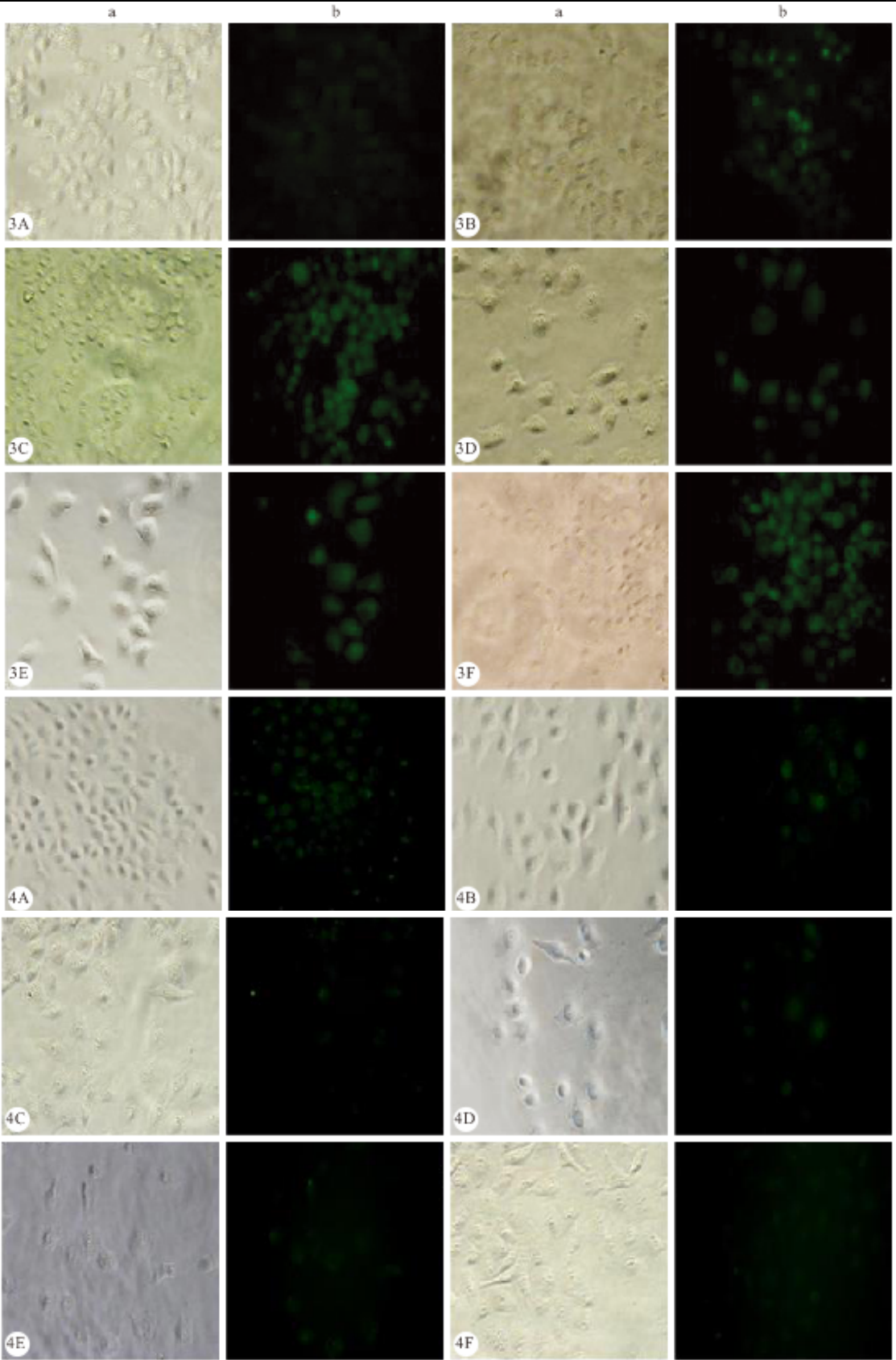


图 3 各组 Fas 在倒置相差视野(a)和荧光视野(b)下的表达。×200

图 4 各组 Bcl-2 在倒置相差视野(a)和荧光视野(b)下的表达。×200

Fig 3 The expression of Fas under inverted phase contrast microscope (a) and fluorescence microscope (b). ×200 Fig 4 The expression of Bcl-2 under inverted phase contrast microscope (a) and fluorescence microscope (b). ×200

A: Control group; B: Infergen group; C: rSIFN-co group; D: Infergen + Cisplatin group; E: rSIFN-co + Cisplatin group; F: Cisplatin group

2.3.3 Bcl-2 表达 IOD 值由高到低依次为:对照组、干复津、rSIFN-co、干复津+顺铂、rSIFN-co+顺铂、顺铂。与对照组相比,各实验组的 IOD 值均降低,其中 rSIFN-co、干复津+顺铂、rSIFN-co+顺铂及顺铂组与对照组差异有统计学意义($P < 0.01$), rSIFN-co 组低于干复津组($P < 0.05$)。见图 4,附表。

附表 不同组 Fas、Bcl-2 表达的积分光密度值($n=3$)

Table IOD value of Fas and Bcl-2 ($n=3$)

	Group	
	Fas	Bcl-2
Infergen	149 308.6±21 681.4*	114 609.2±14 709.4
rSIFN-co	157 183.2±20 527.6*	84 534.6±13 737.4△,☆
Infergen+Cisplatin	156 346.0±17 629.0*	83 948.6±17 251.8△
rSIFN-co+Cisplatin	160 269.4±20 244.2*	68 990.8±20 752.0△
Cisplatin	161 199.8±14 497.9*	60 694.6±16 746.6△
Control	103 691.4±14 385.6	117 441.6±24 769.6

* $P < 0.001$, △ $P < 0.01$, vs. control group; ☆ $P < 0.05$, vs. Infergen group

3 讨论

rSIFN-co 是一种新型基因工程干扰素,这种非天然干扰素采用蛋白质空间构向调控技术生产。因为抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是抗癌药物的主要作用机制,所以研究 rSIFN-co 对 A549 细胞增殖和凋亡的影响,可以探讨其抗肺癌方面的作用。

在影响细胞增殖方面本实验表明,rSIFN-co 和干复津都对 A549 细胞具有抑制增殖的作用,随着药物浓度的增大和作用时间的延长抑制作用更明显,但在有效浓度范围内在相同条件下 rSIFN-co 较干复津具有更强的抑制作用,此结果类似于曾洁萍等^[5]的报道。不仅如此,rSIFN-co 与顺铂联合用药还可以明显增强对 A549 的抑制作用;并且,在相同条件下 rSIFN-co 与顺铂的联合用药效果明显强于干复津与顺铂的联合用药效果。利用 rSIFN-co 这一作用,可以将它与传统抗癌药物联合应用,适当减少传统抗癌药物的剂量,不仅可以提高疗效,而且可以减轻毒副作用。

在影响细胞凋亡方面本实验提示,rSIFN-co 明显提高了 A549 的凋亡率,且活性强于干复津,与传统抗癌药顺铂联合应用时抗癌作用明显增强,这可能与干扰素本身具有调节肿瘤细胞对其它抗癌药的反应从而促进凋亡^[6]有关。并且在这一作用上也表现为 rSIFN-co 和顺铂联合应用强于干复津与顺铂联合应用。

进一步对凋亡相关蛋白 Fas 和 Bcl-2 的检测,我们发现 rSIFN-co 能够促进 Fas 的表达,而抑制 Bcl-2 的表达,并且 rSIFN-co 抑制 Bcl-2 表达的活性

强于干复津。Fas 是肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族成员,在细胞凋亡的信号传导中起着重要的作用,通过它可以激活细胞凋亡过程中的核心成分半胱氨酸蛋白酶家族(Caspase),一旦 Caspase 尤其是 Caspase-3 被激活便诱发不可逆转的细胞凋亡。所以 Fas 表达的上调可以促进肿瘤细胞的凋亡^[7,8]。Bcl-2 蛋白是 *bcl-2* 原癌基因的编码产物,*bcl-2* 是重要的抗细胞凋亡基因,在细胞凋亡调控机制中扮演着十分重要的角色,Bcl-2 的过度表达不但会抑制肿瘤细胞凋亡,同时还会增加肿瘤细胞对许多化疗药物及 γ 射线的耐受性^[9]。因此,抑制 Bcl-2 的过度表达,不但可以恢复肿瘤细胞正常的凋亡通路,还可以增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性,是治疗肿瘤的很好途径。rSIFN-co 促进 A549 细胞的凋亡可能与它调节 Fas 和 Bcl-2 的表达有关。

由此可见,rSIFN-co 能抑制 A549 增殖,且作用强于干复津,与顺铂联合应用时抑制作用增强。其抗 A549 的作用可能与其调节凋亡相关基因的表达有关。但本实验仅仅初步研究了 rSIFN-co 抗 A549 的作用和机理,所研究的凋亡相关蛋白也有限,有待更全面和更深入的基因水平的研究。

参 考 文 献

- 1 Yang X, Wu Y, Wang S, *et al.* A randomized clinical trial on adjuvant interferon-alpha for completely resected stage I-II non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*,2003;6(5):339-343.
- 2 Ardizzoni A, Salvati F, Rosso R, *et al.* Combination of chemotherapy and recombinant alpha-interferon in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*,1993;72(10):2929-2935.
- 3 谭秀梅,何凯,高德红等.新型重组高效复合干扰素对卵巢癌细胞的生长抑制及促凋亡作用. *中国性科学*,2011;20(8):5-9.
- 4 陈妍,何跃东,潘小玲等.重组高效复合干扰素增强宫颈癌 CaSki 细胞对 CTL 杀伤作用敏感性及其机制的研究. *四川大学学报(医学版)*,2008;39(5):715-718.
- 5 曾洁萍,余勤,梁茂植等.高效复合干扰素人体药动学及生物等效性的研究. *现代预防医学*,2008;35(5):982-984.
- 6 Kito M, Akao Y, Ohishi N, *et al.* Induction of apoptosis in cultured colon cancer cells by transfection with human interferon β gene. *Biochem Biophys Res Commun*,1999;257(3):771-776.
- 7 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*,1997;88(3):355-365.
- 8 Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem*,2004;279(7):6017-6026.
- 9 Reed JC, Miyashita T, Takayama S, *et al.* Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem*,1996;60(1):23-32.

(2014-11-15 收稿,2015-03-17 修回)

编辑 吕熙