

干扰素- γ 对喉癌Hep-2细胞增殖和凋亡的影响

陈建明* 赵 菁 葛莉伟

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州310036)

摘要 体外培养的人喉癌细胞系Hep-2细胞用10 ng/ml干扰素- γ 处理不同时间后, 利用细胞计数、细胞凋亡-DNA Ladder分析及半定量RT-PCR方法, 探讨干扰素- γ 对Hep-2细胞增殖及凋亡的影响并初步分析其作用分子机制。结果显示, 与不处理对照细胞相比, 干扰素- γ 处理后第2天起Hep-2细胞增殖明显变慢; 细胞凋亡分析显示, 干扰素- γ 处理后Hep-2细胞基因组DNA电泳图谱呈梯状分布; 半定量RT-PCR分析显示, 干扰素- γ 处理诱导Hep-2细胞*IFI16*基因表达。结果表明, 干扰素- γ 抑制Hep-2细胞增殖诱导Hep-2细胞凋亡, 其机制可能与干扰素- γ 诱导*IFI16*基因表达有关。

关键词 喉癌; 干扰素- γ ; Hep-2细胞; 增殖; 凋亡; *IFI16*基因

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤, 约占全身恶性肿瘤的5.7%~7.6%, 近年来发病率有逐渐上升的趋势, 其主要病理类型为鳞状细胞癌, 目前主要治疗手段为手术、放疗和化疗, 但对于中晚期喉癌患者, 预后仍不够理想且副作用太大, 病人往往难以忍受。为提高喉癌患者的治愈率和生存率, 近年来人们正致力于用干扰素(interferon, IFN)抑制喉癌细胞的生长^[1-4]。干扰素是一种具有广泛生物活性的细胞因子, 具有抗病毒、免疫调节、抗细胞增殖以及诱导细胞分化等功能。干扰素可分为三大类: 白细胞干扰素(IFN- α)、成纤维干扰素(IFN- β)和免疫干扰素(IFN- γ), 其中IFN- γ 来自淋巴细胞。近年来发现干扰素有抗肿瘤作用, 干扰素的抗肿瘤作用以IFN- γ 为最强^[3,4]。IFN- γ 能够诱导人IFI-200(又称HIN-200或p200)蛋白家族成员IFI16蛋白表达, 意大利研究小组最近发现IFI16蛋白能抑制喉癌细胞生长^[5-8]。由此我们推测, IFN- γ 能抑制喉癌细胞生长, IFN- γ 可能是通过诱导*IFI16*基因表达而抑制喉癌细胞生长的。本文以人喉癌细胞系Hep-2细胞作为研究材料, 探讨IFN- γ 对喉癌细胞增殖和凋亡的影响, 并初步分析其作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

重组人IFN- γ 购自PeproTech公司, 分装保存于-80℃冰箱中。RPMI-1640培养基购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司, 超级无支原体新生

小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 胰蛋白酶购自碧云天公司, 细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒购自碧云天公司, 琼脂糖购自BIO Basic公司, DNA分子量参照物购自碧云天公司, Trizol试剂购自BIO Basic公司, BeyoRT cDNA第一链合成试剂盒(RNase H)购自碧云天公司, Taq DNA聚合酶购自上海鼎国生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人喉癌细胞系Hep-2细胞及人皮肤成纤维细胞HSF分别购自中科院上海细胞库, 分别贴壁培养于含10%新生小牛血清及1%青、链霉素的RPMI-1640培养基及 α -MEM培养基中, 于37℃、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 每隔2~3 d换一次液。

1.3 细胞增殖分析

将指数生长的Hep-2细胞及HSF细胞分别接种于12孔细胞培养板中, 每孔接种 2.5×10^4 个细胞于1 ml RPMI-1640完全培养基(Hep-2细胞)或1 ml α -MEM完全培养基(HSF细胞)中, 37℃、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜。第2 d开始, Hep-2细胞或HSF细胞分别用IFN- γ 处理或不处理作为对照, 本研究参照文献报道及作者的研究经验用10 ng/ml IFN- γ 对细胞进行处理^[9,10]。从第3 d起每天

收稿日期: 2010-08-13 接受日期: 2010-12-23

浙江省自然科学基金(No. Y2090698)、浙江省钱江人才计划(No. 2010R10062)和杭州师范大学实验室开放立项(No. 2010012)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-28933086, Fax: 0571-28865333, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn

收集3个复孔的细胞进行细胞计数, 共计数4 d(第3 d命名为day 1, 依此类推直到day 4), 实验独立重复3次, 求出day 1~day 4每天处理或不处理细胞的细胞数平均值及标准差, 然后以计数天数作为横坐标(即day 0~day 4), 以对应每天的细胞数平均值作为纵坐标, 绘制细胞生长曲线图, 分析探讨IFN- γ 对Hep-2细胞及HSF细胞增殖的影响。

1.4 细胞凋亡检测

将指数生长的Hep-2细胞分别接种于四只6 cm细胞培养皿中, 每只培养皿接种 1×10^5 个细胞于4 ml RPMI-1640完全培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜。第2 d开始, 用10 ng/ml IFN- γ 对四只培养皿中细胞分别处理培养0 h、24 h、48 h和72 h。处理结束后胰酶消化收集细胞, 分别用细胞凋亡-DNA Ladder抽提试剂盒按其描述方法抽提细胞基因组DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测来自每个培养皿中细胞基因组DNA的片段化情况, 分析探讨IFN- γ 对Hep-2细胞凋亡的影响。

1.5 半定量RT-PCR分析

将指数生长的Hep-2细胞分别接种于四只6 cm细胞培养皿中, 每只培养皿接种 1×10^5 个细胞于4 ml RPMI-1640完全培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱中培养过夜。第2 d开始, 用10 ng/ml IFN- γ 分别对培养皿中细胞处理培养0 h、12 h、24 h和48 h。处理结束后消化收集细胞, 用Trizol试剂分别提取细胞总RNA并进行定量。每个处理时间点各取2 μg 细胞总RNA, 用cDNA第一链合成试剂盒分别逆转录合成cDNA, 各取2 μl cDNA用PCR技术分别扩增*IFI16*基因及*MNDA*基因, 同时各取2 μl cDNA用PCR技术扩增 β -*actin*基因作为内对照。*IFI16*基因引物序列上游引物: 5'-CCA AGA CTG AAG ACT GAA-3', 下游引物: 5'-TAG AAG AAA AAG TCT GGT GAA GTT TCC ATA CTT G-3'; *MNDA*基因引物序列上游引物: 5'-GTC AAC TTT ACA AGC AAG CAT CT-3', 下游引物: 5'-TCC ACT CCC CAC TAC ATC CA-3'; β -*actin*基因引物序列上游引物: 5'-GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T-3', 下游引物: 5'-GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG-3'。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察结果并拍照, 分析探讨IFN- γ 对Hep-2细胞*IFI16*基因及*MNDA*基因表达的影响。

2 结果

2.1 IFN- γ 抑制Hep-2细胞增殖

细胞生长曲线显示, 在人皮肤成纤维细胞HSF中, IFN- γ 处理与不处理的细胞在增殖速度上没有明显差异(图1)。但在人喉癌细胞系Hep-2细胞中, 第1 d时IFN- γ 处理与不处理的细胞在增殖速度上没有明显差异; 但从第2天起IFN- γ 处理细胞其增殖速度明显变慢, 与相应不处理细胞相比差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 至第4 d时IFN- γ 处理细胞其增殖明显受到抑制, 推测第4 d时IFN- γ 诱导大部分Hep-2细胞发生了凋亡(图2)。图1和图2分别代表三次独立重复实验的平均值和标准差, 每次实验每天收集3个复孔细胞进行细胞计数, 最后求出三次独立实验每天的细胞数平均值和标准差并作图。由此可见, IFN- γ 能抑制Hep-2细胞的增殖但对HSF细胞增殖没有影响。

2.2 IFN- γ 诱导Hep-2细胞凋亡

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 0 h IFN- γ 处理的Hep-2细胞其基因组DNA在凝胶电泳中没有呈现DNA片段化, 但24 h IFN- γ 处理的Hep-2细胞其基因组DNA在凝胶电泳时出现梯状条带, 并且随着IFN- γ 处理时间的延长, Hep-2细胞其基因组DNA在凝胶电泳时梯状条带愈来愈明显(图3)。凋亡细胞基因组DNA会在核小体间发生断裂而呈DNA片段化, 琼脂

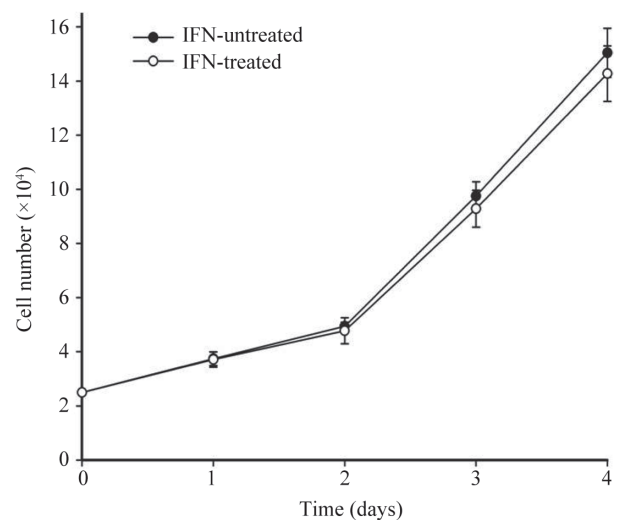


图1 IFN- γ 不抑制HSF细胞的增殖

图中每个数据表示来自三次独立实验的细胞数平均值和标准差。

Fig. 1 The proliferation of HSF cells was not inhibited by IFN- γ . Each data was expressed as cell number mean values (means \pm S.D.) obtained from three independent experiments.

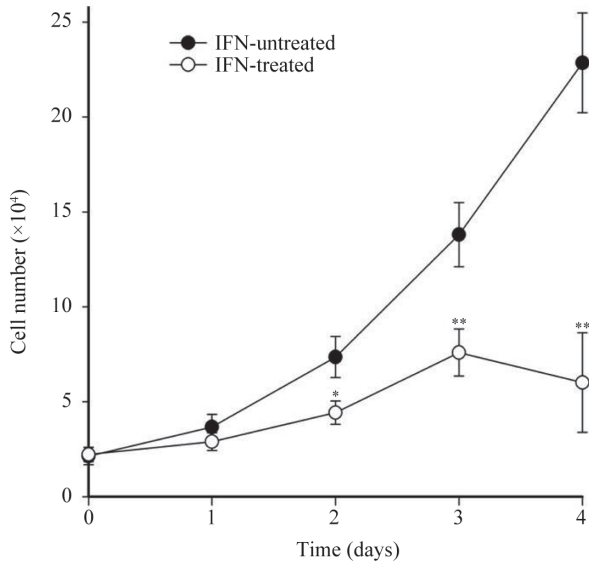


图2 IFN- γ 抑制Hep-2细胞的增殖

图中每个数据表示来自三次独立实验的细胞数平均值和标准差。* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$ 分别表示与相应的不处理对照细胞相比具有统计意义。

Fig. 2 IFN- γ inhibited the proliferation of Hep-2 cells

Each data was expressed as cell number mean values (means \pm S.D.) obtained from three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicated statistical significance as compared to the corresponding untreated control cells, respectively.

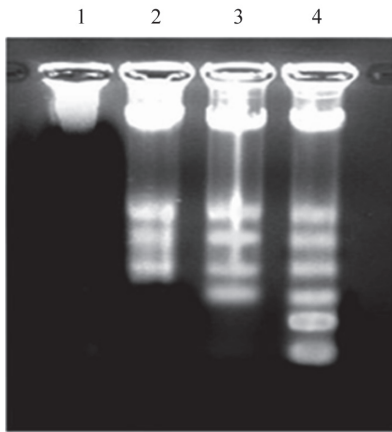


图3 IFN- γ 诱导Hep-2细胞凋亡

泳道1: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理0小时; 泳道2: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理24小时; 泳道3: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理48小时; 泳道4: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理72小时。

Fig. 3 IFN- γ induced the apoptosis of Hep-2 cells

Lane 1: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 0 h; Lane 2: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 24 h; Lane 3: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 48 h; Lane 4: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 72 h.

糖凝胶电泳时凋亡细胞其基因组DNA呈现梯状条带, 我们的实验结果说明IFN- γ 能诱导Hep-2细胞发

生凋亡。

2.3 IFN- γ 诱导Hep-2细胞*IFI16*基因表达

半定量RT-PCR结果显示, IFN- γ 处理后Hep-2细胞*MNDA*基因表达没有明显变化(图4); 而Hep-2细胞*IFI16*基因最初则处于低水平表达状态, 但IFN- γ 处理12 h后*IFI16*基因表达明显升高了, 其后随着IFN- γ 处理时间延长*IFI16*基因表达则愈来愈高(图5)。图4和图5中, 管家基因 β -actin是半定量RT-PCR分析Hep-2细胞*IFI16*基因和*MNDA*基因表达时的内对照。*MNDA*基因与*IFI16*基因同属于人HIN-200蛋白家族成员^[5], 本研究发现喉癌Hep-2细胞中*MNDA*基因与*IFI16*基因都处于低水平表达状态, IFN- γ 处理对Hep-2细胞*MNDA*基因表达没有影响, 但IFN- γ 处

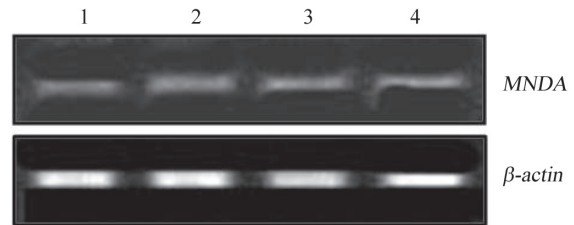


图4 IFN- γ 处理后Hep-2细胞*MNDA*基因表达没有变化

泳道1: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理0小时; 泳道2: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理12小时; 泳道3: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理24小时; 泳道4: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理48小时。

Fig. 4 *MNDA* gene expression was not changed in IFN- γ -treated Hep-2 cells

Lane 1: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 0 h; Lane 2: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 12 h; Lane 3: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 24 h; Lane 4: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 48 h.

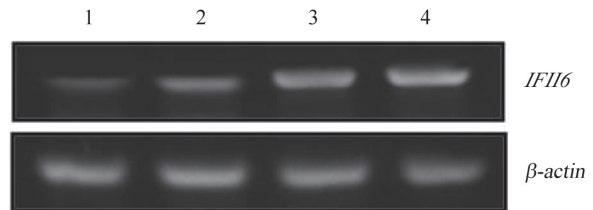


图5 IFN- γ 诱导Hep-2细胞*IFI16*基因表达

泳道1: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理0小时; 泳道2: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理12小时; 泳道3: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理24小时; 泳道4: Hep-2细胞用10 ng/ml IFN- γ 处理48小时。

Fig. 5 IFN- γ induced the *IFI16* gene expression in Hep-2 cells

Lane 1: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 0 h; Lane 2: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 12 h; Lane 3: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 24 h; Lane 4: Hep-2 cells treated with 10 ng/ml IFN- γ for 48 h.

理后Hep-2细胞*IFI16*基因表达则明显升高了, 说明IFN- γ 能特异性诱导Hep-2细胞*IFI16*基因的表达。

3 讨论

恶性肿瘤的治疗传统上分为手术、放疗和化疗三种方法。前两种方法只对局限性肿瘤有效, 而化学疗法则副作用太大, 病人往往难以忍受。因此, 近年来兴起的综合疗法倍受关注, 干扰素治疗肿瘤就是其中最重要的一种。干扰素抗肿瘤的作用机理可能有: (1)抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡; (2)抑制癌基因表达; (3)免疫调节作用; (4)抑制肿瘤病毒繁殖; (5)抑制肿瘤血管生成等^[3,4]。对中晚期喉癌患者, 由于传统治疗方法其疗效并不理想, 为提高喉癌患者的治愈率和生存率, 目前人们正尝试用干扰素来抑制喉癌细胞的生长^[11]。IFN- γ 是三类干扰素中抗肿瘤作用最强的一类, 但目前关于IFN- γ 是否能抑制喉癌细胞的生长还不清楚。最近, 意大利研究小组发现, 干扰素诱导的IFI16蛋白能抑制喉癌细胞的生长^[6-8]。已知IFI16蛋白能被IFN- γ 诱导表达, IFI16蛋白在许多肿瘤细胞中表达低下^[5,12]。因此, 我们推测, IFN- γ 能抑制喉癌细胞的生长, IFN- γ 可能是通过诱导*IFI16*基因蛋白表达而抑制喉癌细胞生长的。

本文以人喉癌细胞系Hep-2细胞作为研究材料, 根据文献报道使用10 ng/ml重组人IFN- γ 对Hep-2细胞进行处理。细胞增殖研究结果发现, 人皮肤成纤维细胞HSF其增殖不受IFN- γ 的影响, 但喉癌Hep-2细胞在IFN- γ 处理48 h后其增殖速度明显变慢, 说明IFN- γ 对喉癌细胞增殖有特异性抑制作用; Hep-2细胞在IFN- γ 处理至96 h时其增殖明显受到抑制, 推测可能是IFN- γ 诱导大部分Hep-2细胞发生了凋亡; 凋亡研究结果发现, IFN- γ 处理24 h时Hep-2细胞基因组DNA在凝胶电泳时出现梯状条带, 随着IFN- γ 处理时间延长Hep-2细胞基因组DNA梯状条带愈来愈明显, 说明IFN- γ 能诱导喉癌细胞发生凋亡; *MNDA*基因与*IFI16*基因同属于人HIN-200蛋白家族成员^[5], 半定量RT-PCR研究结果发现, Hep-2细胞中*MNDA*基因与*IFI16*基因都处于低水平表达状态, IFN- γ 不影响Hep-2细胞*MNDA*基因表达但能特异性诱导*IFI16*基因表达。*IFI16*基因是系统性红斑狼疮的易感基因^[12]。但近年来有研究证据表明, *IFI16*基因还能对多种肿瘤细胞的生长起抑制作用, 目前发现*IFI16*基

因能抑制前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、骨肉瘤细胞及喉癌细胞的生长^[6-8,13-15]。

本研究结果发现, IFN- γ 能特异性抑制喉癌细胞增殖并诱导喉癌细胞发生凋亡, 喉癌细胞中*IFI16*基因本身表达低下, 但IFN- γ 能诱导喉癌细胞*IFI16*基因表达。由于文献报道*IFI16*基因能抑制喉癌细胞生长^[6-8], 由此, 我们推测IFN- γ 可能通过诱导*IFI16*基因表达来抑制喉癌细胞增殖并诱导喉癌细胞凋亡, 至于该途径中是否还有其它蛋白参与? 它们的变化又如何? 这些问题我们将在今后的研究中作进一步探索。本研究结果为IFN- γ 运用于临床中晚期喉癌治疗提供了实验依据及理论基础, 为IFN- γ 广泛运用于喉癌临床治疗奠定了基础。

参考文献(References)

- 1 Gil Z, Fliss DM. Contemporary management of head and neck cancers. *Isr Med Assoc J* 2009; 11(5): 296-300.
- 2 Chow CW, Tabrizi SN, Tiedemann K, Waters KD. Squamous cell carcinomas in children and young adults: a new wave of a very rare tumor? *J Pediatr Surg* 2007; 42(12): 2035-9.
- 3 曾洁萍, 余勤, 梁茂植, 段俊国. 干扰素抗肿瘤作用研究进展. *现代预防医学* 2008; 35(18): 3650-2.
- 4 朱颖慧, 朱兰才, 刘然义, 黄文林. 干扰素- γ 治疗肿瘤的研究进展. *肿瘤学杂志* 2008; 14(1): 4-9.
- 5 赵菁, 陈建明, 邱明, 应奇才. 干扰素诱导的IFI-200蛋白家族研究进展. *杭州师范大学学报(自然科学版)* 2009; 8(5): 375-80.
- 6 Azzimonti B, Pagano M, Mondini M, De Andrea M, Valente G, Monga G, *et al.* Altered patterns of the interferon-inducible gene IFI16 expression in head and neck squamous cell carcinoma: immunohistochemical study including correlation with retinoblastoma protein, human papillomavirus infection and proliferation index. *Histopathology* 2004; 45(6): 560-72.
- 7 De Andrea M, Gioia D, Mondini M, Azzimonti B, Renò F, Pecorari G, *et al.* Effects of IFI16 overexpression on the growth and doxorubicin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma-derived cell lines. *Head Neck* 2007; 29(9): 835-44.
- 8 Mazibrada J, De Andrea M, Rittà M, Borgogna C, Dell'eva R, Pfeiffer U, *et al.* *In vivo* growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma by the Interferon-inducible gene *IFI16*. *Cancer Lett* 2010; 287(1): 33-43.
- 9 Kim EJ, Park JI, Nelkin BD. IFI16 is an essential mediator of growth inhibition, but not differentiation, induced by the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway in medullary thyroid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280(6): 4913-20.
- 10 Xin H, Pereira-Smith OM, Choubey D. Role of IFI 16 in cellular senescence of human fibroblasts. *Oncogene* 2004; 23(37): 6209-17.

- 11 周立辉, 李湘平, 刘 雄. 干扰素抗肿瘤机制及其在头颈部肿瘤中的应用. 中国医学文摘耳鼻咽喉科学 2006; 21(5): 296-8.
- 12 Choubey D, Deka R, Ho SM. Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. Front Biosci 2008; 13: 598-608.
- 13 Alimirah F, Chen JM, Davis FJ, Choubey D. IFI16 in human prostate cancer. Mol Cancer Res 2007; 5: 251-9.
- 14 Aglipay JA, Lee SW, Okada S, Fujiuchi N, Ohtsuka T, Kwak JC, *et al.* A member of the Pypin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. Oncogene 2003; 22(55): 8931-8.
- 15 Zhang Y, Howell RD, Alfonso DT, Yu J, Kong L, Wittig JC, *et al.* IFI16 inhibits tumorigenicity and cell proliferation of bone and cartilage tumor cells. Front Biosci 2007; 12: 4855-63.

Influences of IFN- γ on the Proliferation and Apoptosis of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cells

Jian-Ming Chen*, Jing Zhao, Li-Wei Ge

(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract human laryngeal cell line Hep-2 cells were cultured and treated with 10 ng/ml IFN- γ for different time. After IFN- γ treatment, cell counting, cell apoptosis-DNA ladder analysis and semi-quantitative RT-PCR methods were used to explore the influences of IFN- γ on the proliferation and apoptosis of Hep-2 cells and its preliminary molecular mechanism was analyzed simultaneously. The cell growth assay result showed that from the second day on Hep-2 cells treated with IFN- γ proliferated obviously slower than the untreated control cells. Cell apoptosis analysis showed that the genomic DNA of Hep-2 cells displayed as the DNA ladder pattern in gel electrophoresis when the Hep-2 cells were treated with IFN- γ . Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that the expression of *IFI16* gene was induced in Hep-2 cells after treated with IFN- γ . Based on the above results, it was concluded that IFN- γ could inhibit Hep-2 cells proliferation and induce Hep-2 cells apoptosis, and the mechanism for IFN- γ inhibiting Hep-2 cells proliferation and inducing Hep-2 cells apoptosis is probably related to the IFN- γ -induced *IFI16* gene expression.

Key words laryngeal carcinoma; IFN- γ ; Hep-2 cells; proliferation; apoptosis; *IFI16* gene

Received: August 13, 2010 Accepted: December 23, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090698), the Qianjiang Talented Person Project of Zhejiang Province (No.2010R10062) and the Approved Laboratory-opening Project of Hangzhou Normal University (No.2010012)

*Corresponding author. Tel: 86-571-28933086, Fax: 86-571-28865333, E-mail: jianmingchen@hznu.edu.cn