

研究论文

超级干扰素抑制A549增殖诱导其衰老

李慧玲^{1,2} 杨冬琴² 曹欣² 黄宏龄² 丁苗² 徐海能² 刘新垣² 李名扬^{1*}¹西南大学园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400715; ²中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 该研究利用MTT和结晶紫的方法证明sIFN α 对肺癌细胞A549增殖有很强的抑制作用, 而同样剂量的普通干扰素IFN α 2b抑制作用要小很多。与对照组相比, sIFN α 处理后, 细胞形态发生改变, 细胞体积变大, 形态呈扁平状; Hoechst33258染色发现, 细胞核形态无变化并且未检测到凋亡; SA- β -gal染色发现大多数细胞呈现阳性, 同时, 衰老相关蛋白p53和p21表达量明显上调。而IFN α 2b处理组细胞形态基本没有变化, SA- β -gal染色也只有少部分的细胞呈现弱阳性。由此说明, sIFN α 比IFN α 2b能更好地抑制癌细胞增殖, 其机制可能为诱导癌细胞发生衰老。

关键词 干扰素; 衰老; 抗癌; 肺癌; 增殖

肺癌是近年来WHO报道的所有癌症中致死率最高的^[1], 并且随着环境的不断恶化, 肺癌的发生率呈逐年上升的趋势。人们迫切需要找到一种疗效好而副作用小的治疗肺癌的方法。超级干扰素(super interferon alpha, sIFN α)就有很好的抗肺癌作用(超级干扰素原名冻干重组高效复合干扰素, 后因其抗癌和抗病毒效果均很好, 故论文中常用sIFN α)。

细胞衰老(cellular senescence)是指细胞不可逆地发生细胞周期阻滞、丧失增殖能力后进入一种相对稳定的状态。导致细胞发生衰老的原因有很多, 如原癌基因的激活、端粒的缩短、氧压、基因损伤等。最新研究表明, 除了可以抑制癌症发生以外, 诱导癌细胞发生衰老已经成为治疗癌症的一种新策略^[2-4]。

细胞衰老现象是1961年Hayflick等^[5]在正常成纤维细胞的体外培养中首先发现的, 正常细胞在体外条件下增殖分裂50-70代即进入一种衰老的状态, 细胞丧失继续增殖的能力, 无法进一步传代培养, 但仍然存活, 这种现象被称为“Hayflick极限”。衰老的细胞呈现大而扁平的形态, 细胞内颗粒增加, 溶酶体数量增多以及pH依赖的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)表达活性增强^[6]。由于正常细胞每分裂一次, 就会丢失端粒的一段序列, 所以走向衰老是正常细胞的必然归宿, 也是机体发生衰老的潜在原因之一。后来的研究发现除了端粒的缩短, 很多

因素均可以诱导正常细胞很快发生衰老^[7], 如原癌基因的激活会刺激绝大部分的正常细胞启动衰老通路, 而正常细胞转变为肿瘤细胞的必要条件就是必须绕过细胞的衰老体系, 也就是说细胞衰老是机体内非常重要的抑制肿瘤发生的机制, 是机体防御肿瘤形成的主要屏障之一^[8]。无论何种原因导致的细胞衰老, 现象都是一致的。检测细胞衰老最常用的方法就是细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色, 这种方法也被称为检测细胞衰老的金标准^[6]。

由于辉阳公司的超级干扰素具有很强的抗癌能力, 本研究着重研究了它是否也会有诱导衰老作用, 并通过诱导衰老而达到治疗癌症的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

超级干扰素(sIFN α)和辛化诺(IFN α 2b)由四川辉阳公司提供。MTT和DMSO购自Sigma公司。细胞

收稿日期: 2010-11-18 接受日期: 2011-01-26

国家自然科学基金(No.30623003)、国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2010CB529901)、国家科技重大专项(重大新药创制)(No.2009ZX09102-246)、国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2007AA021006和2007AA02Z156)、国家科技重大专项(No.2008ZX10002-023)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(No.KSCX2-YW-R-219)和国家自然科学基金(No.30772521)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68250086, E-mail: limy@swu.edu.cn

培液和胎牛血清(FBS)购于GIBCO-BRL公司(Grand Island, NY, USA)。TACS TdT Kit *in situ* Apoptosis Detection Kit 购于R&D公司 (Minneapolis, MN, USA)。Rabbit or mouse ABC Staining System购于Santa Cruz公司。Anti-p53和anti-p21购于Cell Signaling Technology。细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(Senescence β -Galactosidase Staining Kit)购自碧云天生物技术研究所在。

1.2 细胞株及细胞培养

人肺腺癌细胞系A549购于美国标准菌种收藏所(American Type Culture Collection, 简称ATCC, Rockvill, Maryland, USA), 所用的培液为含有10% FBS的RPMI-1640, 培养条件为37 °C, 5% CO₂的恒温培养箱。

1.3 结晶紫实验

将细胞铺于24孔板, 次日, 分别用0 μ g/ml、0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理, 放入培箱继续培养3 d, 然后取出培养板, 倒掉培液, 在每孔中加入200 μ l结晶紫染液(2%结晶紫溶于20%甲醇溶液)染色15 min, 小心洗去染液, 晾干后拍照保存。

1.4 MTT法测定细胞存活率

细胞接种于96孔板, 次日, 分别用7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理细胞, 不处理组为对照。在不同的时间点(12 h、24 h、36 h、48 h、60 h和72 h)每孔加入20 μ l MTT溶液(5 mg/ml), 放入37 °C继续培养3 h以上, 然后去除含MTT的培液, 每孔加入100 μ l DMSO, 置于摇床上震荡10 min至底部紫色物质全部溶解, 在酶标仪上测定570 nm处的吸光值(D值)。细胞存活率 = D_{570} (样品)/ D_{570} (对照)×100%。

1.5 细胞形态学观察

将细胞铺于6孔板上, 次日, 分别用sIFN α 或IFN α 2b处理, 使其终浓度为7 μ g/ml, 对照组不处理。3 d后, 置于倒置显微镜下, 仔细观察其形态变化并拍照。

1.6 Hoechst 33258染色

将细胞接种在放有盖玻片的24孔板中, 次日, 分别用终浓度为7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理, 对照组不做处理, 继续培养3 d。除去培液, 用PBS洗涤2次, 4%多聚甲醛(PFA)固定10 min, 然后加入Hoechst 33258染液, 5 min后, 洗去染液, 取出玻片, 用防止荧光淬灭的封片剂封在载玻片上。置于荧光

显微镜下观察, 拍照。

1.7 Western blot

将细胞铺在10 cm培养板中, 次日, 分别用0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理, 不处理组作为对照, 放入培箱继续培养。3 d后收集细胞, 用碧云天的裂解液裂解后, BCA法测定蛋白浓度, 用裂解液平衡到相同浓度, 然后加入6×loading buffer, 沸水中煮10 min, -80 °C保存或立即用于电泳。

上样时每孔加40 μ g蛋白, 在标准电泳缓冲液中80 V至染料到达胶的底部, 然后150 mA恒流150 min将蛋白转移到PVDF膜。用相应的抗体检测相关蛋白表达。

1.8 TUNEL染色

将细胞接种在放置有盖玻片的24孔板中, 次日, 分别用终浓度为7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理, 对照组不做处理。3 d后, 将长有细胞的盖玻片取出, 4%PFA室温固定10 min, 然后按照TACS TdT Kit *in situ* Apoptosis Detection Kit的说明做以下的步骤。

1.9 SA- β -Gal染色

用细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测在A549细胞有没有发生衰老。首先将细胞铺在六孔板上, 细胞密度为10 000个/孔。次日, 分别用终浓度为7 μ g/ml的sIFN α 或IFN α 2b处理, 对照组不做处理。3 d后, 吸除细胞培养液, 用PBS洗涤1次, 加入1 ml β -半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定15 min, 然后吸除细胞固定液, 用PBS洗涤细胞3次, 每次3 min。吸除PBS, 每孔加入1 ml染色工作液, 37 °C孵育过夜, 然后置于显微镜下观察, 拍照。

1.10 免疫细胞染色

细胞免疫染色用Rabbit or Mouse ABC Staining System试剂盒, 按照厂家的说明书进行。

2 结果

2.1 sIFN α 对A549的增殖有明显抑制作用。

首先, 我们用结晶紫染色的方法初步检测了sIFN α 对A549细胞的影响, 发现与空白对照组和临床常用的普通干扰素IFN α 2b处理组相比, sIFN α 处理组细胞数目明显要少(图1)。随后, 我们又用MTT实验的方法验证了sIFN α 对A549细胞的增殖抑制作用, 结果同样表明sIFN α 处理后细胞活性受到明显抑制, 也就是说sIFN α 可以更强的抑制肺癌细胞A549的增

殖(图2)。

2.2 sIFN α 对A549形态的影响

我们进一步研究了sIFN α 处理后A549细胞的形态变化。如图3所示, 与对照组相比, sIFN α 处理组细胞体积明显变大, 形状变为扁平无规则状态, 平摊在细胞板上。我们又进一步用Hoechst33258染色的方法检测细胞核的形态, 结果发现与对照组相比, sIFN α 处理组的细胞数目要少得多, 显示了其较强的抗增殖能力, 但是细胞核并没有形态改变(图4)。

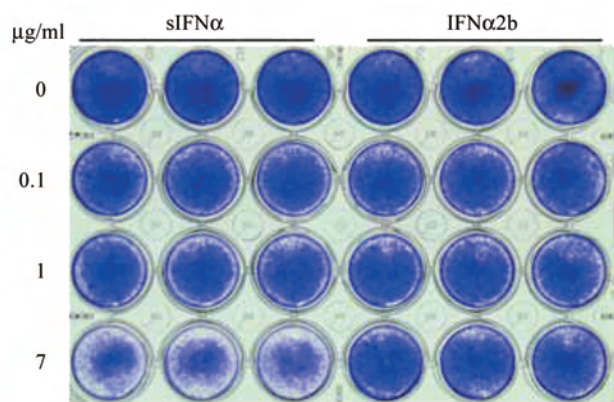


图1 结晶紫染色观察sIFN α 的细胞毒性

Fig.1 The cytopathic effect of sIFN α was measured by crystal violet staining

2.3 sIFN α 不引起A549细胞发生凋亡

用Western blot的方法检测了凋亡相关蛋白caspase 3和caspase 8的表达。结果发现在A549细胞中sIFN α 处理对这两种蛋白的表达量没有影响(图5)。然后进一步用Tunel染色的方法检测凋亡。结果显示细胞均呈Tunel阴性(图6)。至此, 我们基本可以确

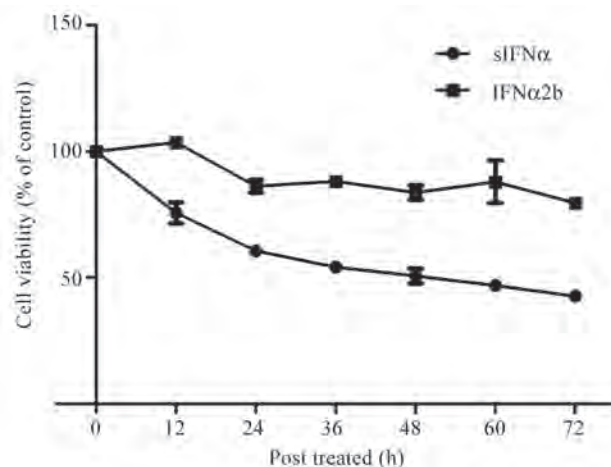


图2 MTT检测细胞活性变化

每组4个复孔, 重复3次独立实验, 结果按照平均值 \pm SD处理。

Fig.2 A549 cells were analysed for cell viability by MTT assay

The results were displayed as mean \pm SD values from four replicate wells of three separated experiments.

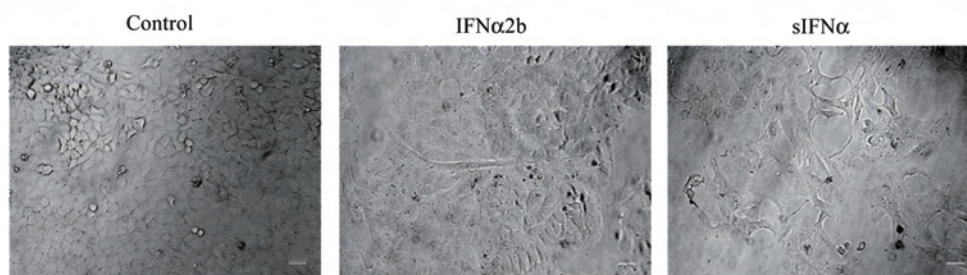


图3 药物处理3 d后细胞的形态(标尺=50 μ m)

Fig.3 Cell morphology at day 3 (Scale bar=50 μ m)

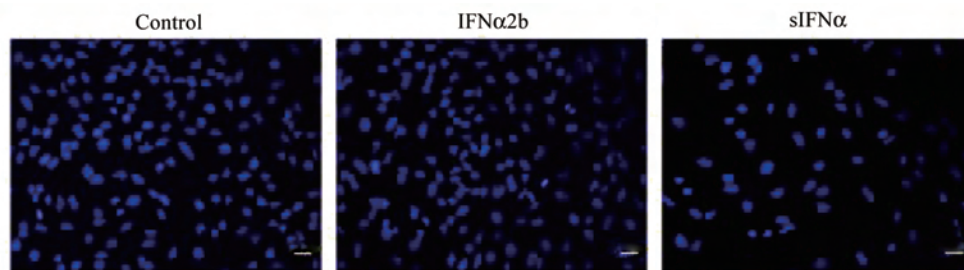


图4 Hoechst 33258染色观察细胞核的形态(标尺=10 μ m)

Fig.4 Hoechst 33258 staining (Scale bar=10 μ m)

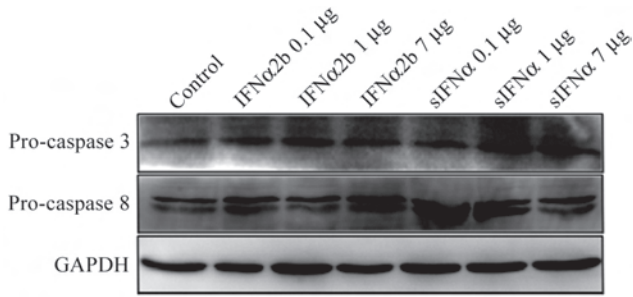


图5 Western blot检测凋亡相关蛋白表达

Fig.5 Western blot analysis of apoptosis-related proteins

定, sIFN α 不会引起A549细胞发生凋亡。

2.4 sIFN α 诱导A549细胞发生衰老

基于以上的实验结果, 我们推测在sIFN α 的处理下肺癌细胞A549可能发生了衰老, 而检测衰老最常用的标志就是SA- β -Gal染色。统计结果发现, 在sIFN α 处理组约有80%的细胞呈SA- β -Gal阳性, 在IFN α 2b处理组只有20%左右, 而在对照组不到1%的细胞着色(图7, 表1)。也就是说sIFN α 极有可能是通过诱导肺癌细胞A549衰老来抑制癌症生长。然后

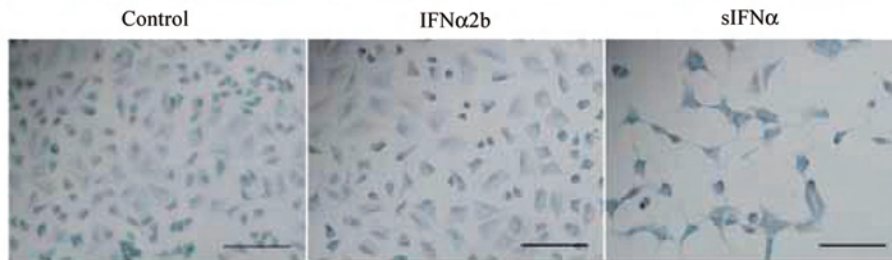


图6 Tunel染色(标尺=100 μ m)

Fig.6 Tunel staining (Scale bar=100 μ m)

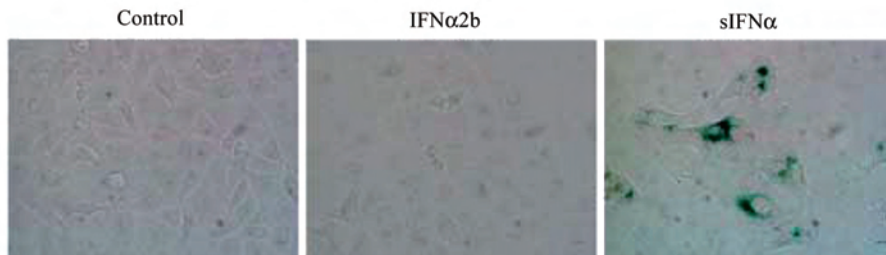


图7 SA- β -gal染色检测细胞衰老(标尺=20 μ m)

Fig.7 Senescence-associated β -galactosidase staining at day 3 (Scale bar=20 μ m)

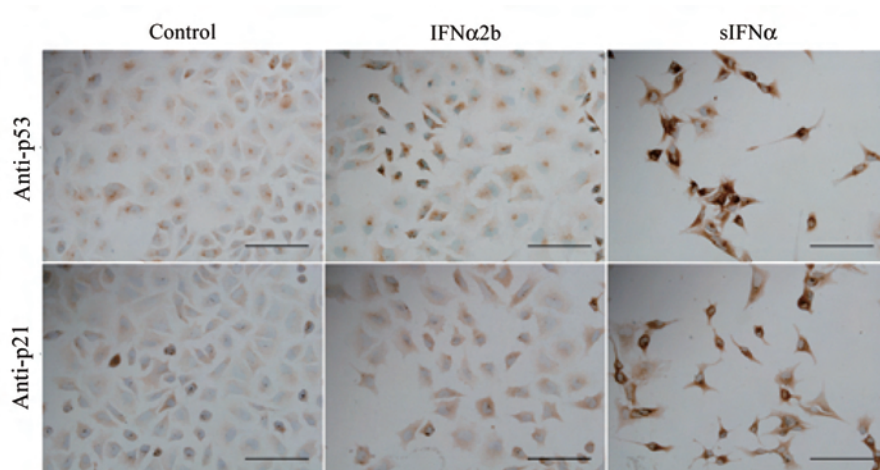


图8 p53和p21免疫染色(标尺=100 μ m)

Fig.8 Immunostaining of p53 and p21 (Scale bar=100 μ m)

表1 SA- β -gal阳性细胞统计结果

组别	SA- β -gal阳性率 (%)	P值
Group	SA- β -gal positive (%)	P value
Control	0.715 \pm 0.721	$P < 0.0001$
IFN α 2b	15.526 \pm 4.145	$P < 0.0001$
sIFN α	75.458 \pm 5.363	—

注: 数据以平均值 \pm SD表示, 重复3次独立实验; 组间的显著性差异用P值表示。

Note: values are means \pm SD of three independent experiments; the statistical significances of the differences between sIFN α and IFN α 2b or PBS were shown by P values.

我们进一步做了免疫细胞染色, 检测了衰老相关蛋白的表达。发现在sIFN α 处理的细胞中, p53和p21均有上调(图8)。进一步验证了A549细胞在sIFN α 的诱导下发生了衰老。

3 讨论

干扰素自1957年发现以来^[9], 就引起了人们极大的兴趣, 但由于来源限制, 无法得到广泛应用。直到1986年, 基因工程干扰素的出现, 才使得干扰素能够大量应用于临床。为了增强干扰素的活性, 减小其副作用, 人们对它们进行了很多改造^[10,11]。刘新垣院士与四川辉阳公司合作发现了这种sIFN α 有很好的抗癌作用^[12]。目前的研究表明sIFN α 对多种肿瘤细胞具有诱导凋亡作用^[13,14]。

干扰素(interferon, 简称IFN)是一类由受病毒感染或经抗原、有丝分裂原刺激的细胞分泌的蛋白质。最初将干扰素分为IFN α 、 β 、 γ 三种, 现在干扰素按照受体不同可分为三大类: I型、II型、III型, 其中I型最为复杂, 包括IFN- α 、 β 、 ω 、 ϵ 、 κ 、 δ 、 τ 、 ξ , IFN α 最复杂并且应用最广, 又可分为IFN α -1a、1b、1c、1d, IFN α -2a、2b、2c等。目前已经确认IFN α 具有抗病毒、抗癌和免疫调节等作用^[15]。近年来的研究表明IFN α 对许多血液中的恶性肿瘤如慢性粒细胞白血病等有很好的疗效^[16], 但对实体肿瘤的治疗有一定的局限。

通过诱导癌细胞发生衰老作为一种治疗癌症的策略是一个很新的领域。2002年, Schmitt等^[17,18]率先提出通过诱导肿瘤细胞衰老可以治疗癌症。近年来, 已陆续发现多种因子可以诱导癌细胞衰老^[19-22], 诱导肿瘤细胞衰老不仅可以减少药物的用量, 有效地降低药物毒性, 而且对于克服肿瘤的耐药

性具有重要意义^[23,24]。目前的化疗药物大都是通过诱导癌细胞凋亡达到治疗癌症的目的。然而癌细胞一般都具有凋亡障碍, 所以如何克服癌细胞凋亡的障碍是治疗癌症的一个重大难题。而采用诱导细胞衰老的方法有望成为解决这一难题的突破口。

本工作用MTT和结晶紫染色的方法均证明sIFN α 对肺癌细胞A549有很强的抑制作用, 同时与衰老相关的SA- β -Gal活性也显著增加, 而IFN α 2b却没有或只有极弱的抗癌作用, 其SA- β -Gal活性也增加极少, 故我们可初步推断sIFN α 是通过诱导A549细胞衰老而治疗这种癌症的。

参考文献(References)

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2): 71-96.
- Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 2007; 152(7): 1003-11.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130(2): 223-33.
- Hornsby PJ. Senescence as an anticancer mechanism. *J Clin Oncol* 2007; 25(14): 1852-7.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: The senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 2007; 371: 21-31.
- Lloyd AC. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 2002; 4(2): E25-7.
- Serrano M. Cancer: A lower bar for senescence. *Nature* 2010; 464(7287): 363-4.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; 147(927): 258-67.
- Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20047-51.
- Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, *et al.* Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(12): 975-90.
- United States Patent Application Publication. 2005; US 2005/0079579 A1.
- 郑洁, 吕青. 重组复合高效干扰素抗人乳腺癌细胞的体外实验研究. *四川大学学报(医学版)* 2010; 41(1): 29-34.
- 陈妍, 欧阳运薇. 新型重组高效复合干扰素对宫颈癌细胞的生长抑制及促凋亡作用. *实用妇产科杂志* 2009; 25(4): 216-9.
- Leclerc S, Myers RP, Moussalli J, Herson S, Poynard T, Benveniste O. Sarcoidosis and interferon therapy: report of five cases and review of the literature. *Eur J Intern Med* 2003; 14(4): 237-43.
- Liedtke C, Groger N, Manns MP, Trautwein C. Interferon-alpha enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8

- transcription in human hepatoma cells. *J Hepatol* 2006; 44(2): 342-9.
- 17 Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775(1): 5-20.
- 18 Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, *et al*. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; 109(3): 335-46.
- 19 Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, *et al*. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* 2010; 464(7287): 374-9.
- 20 Elmore LW, Rehder CW, Di X, McChesney PA, Jackson-Cook CK, Gewirtz DA, *et al*. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* 2002; 277(38): 35509-15.
- 21 Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003; 63(11): 2705-15.
- 22 te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1876-83.
- 23 Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; 23(16): 2919-33.
- 24 Blagosklonny MV. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. *Oncogene* 2004; 23(16): 2967-75.

Super Interferon alpha Suppress the Proliferation of A549 Cells and Induce Cellular Senescence

Hui-Ling Li^{1,2}, Dong-Qin Yang², Xin Cao², Hong-Ling Huang², Miao Ding², Hai-Neng Xu², Xin-Yuan Liu², Ming-Yang Li^{1*}

(¹Department of Horticulture and Garden, the Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Southwestern University, Chongqing 400715, China; ²Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract In this study, the anti-proliferation effect of sIFN α was tested via the MTT assay and crystal violet staining assay. The results showed that sIFN α had a strong anticancer effect while IFN α 2b had a limited effect. After treated with sIFN α , cells possessed enlarged cell size and flatted morphologic and without nucleus morphologic alteration by Hoechst 33258 staining, and there was no detection of apoptosis. At the same time, most of sIFN α -treated cells exhibited SA- β -gal positive and with the up-expression of p53 and p21. However, cells treated with IFN α 2b had little or no changes and few of them were SA- β -gal positive. In conclusion, compared with IFN α 2b, sIFN α exerted a potent antineoplastic effect and the mechanism might be related to its induction of cellular senescence.

Key words interferon; senescence; anti-tumor; lung carcinoma; proliferation

Received: November 18, 2010 Accepted: January 26, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30623003), the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2010CB529901), Important National Science & Technology Specific Project (No.2009ZX09102-246, No.2008ZX10002-023), National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No.2007AA021006, No.2007AA02Z156), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-YW-R-219) and the National Natural Science Foundation of China (No.30772521)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68250086, E-mail: limy@swu.edu.cn