

IL-12诱导急性单核细胞白血病细胞分化及凋亡的机制研究

吴碧涛 马婷婷 林艳 熊海玉 王秦 成凤 李紫薇 涂植光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)具有明显的抗肿瘤作用,但其作用机制较复杂。前期形态学和功能的研究发现,IL-12可诱导单核细胞白血病细胞分化。该研究从巨噬细胞表面分化标志、细胞增殖能力、周期以及凋亡四个方面探讨了IL-12诱导急性单核细胞白血病细胞分化和凋亡的相关作用机理。结果发现,以人源性重组IL-12 p70处理的THP-1细胞,巨噬细胞表面标志CD68和CD11b的表达量明显增加并呈时间依赖性,CD68⁺和CD11b⁺阳性细胞数也显著增多;IL-12诱导分化过程中伴有THP-1细胞生长缓慢、G₁期或G₁/S期细胞周期阻滞现象;IL-12处理后的THP-1细胞凋亡率也明显增加,以早期凋亡细胞为主,并伴有抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调及促凋亡蛋白Fas表达增加。上述实验结果提示,IL-12对于急性单核细胞白血病可通过诱导肿瘤细胞向成熟巨噬细胞分化,抑制细胞增殖以及增加细胞凋亡来发挥抗肿瘤作用。

关键词 白细胞介素-12;急性单核细胞白血病;分化治疗

The Mechanism of IL-12 for the Differentiation and Apoptosis of Acute Mononuclear Leukemia Cells

Wu Bitao, Ma Tingting, Lin Yan, Xiong Haiyu, Wang Qin, Cheng Feng, Li Ziwei, Tu Zhiguang*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Education Ministry, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract As we all know, interleukin-12 (IL-12) plays a critical role in anti-tumor responses. Our previous morphological and functional study has revealed that over-expression of IL-12 would induce monocytic leukemia cell differentiation. In this study, we examined the differentiation markers, changes of cell proliferation, cell cycle and apoptosis in THP-1 cells after IL-12 treatment to investigate its likely mechanism for the differentiation and apoptosis of acute mononuclear leukemia cells. It was found that the macrophage surface marker CD68 and CD11b mRNA and protein expression increased in a time-dependent manner, and CD68⁺ and CD11b⁺ positive cells significantly increased. Furthermore, IL-12-induced THP-1 cell differentiation was accompanied by the G₁ or G₁/S phase growth arrest with G₁ phase cells accumulation and S phase cells reduction. Cell apoptosis rate increased significantly, especially the early apoptosis cells; anti-apoptosis protein Bcl-2 was down-expressed, and pro-apoptosis protein Fas was up-regulated. These findings have revealed that IL-12 is likely to play a role of anti-tumor on acute mononuclear leukemia through inducing monocytic tumor cells

收稿日期: 2014-12-27 接受日期: 2015-02-27

国家自然科学基金(批准号: 81172016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com

Received: December 27, 2014 Accepted: February 27, 2015

This work was supported by the National Natural Foundation of China (Grant No.81172016)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com

网络出版时间: 2015-05-04 17:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150504.1715.005.html>

differentiation to mature macrophages, suppressing tumor cells malignant proliferation and increasing tumor cells apoptosis.

Keywords interleukin-12; acute monocytic leukemia; differentiation therapy

作为参与机体免疫应答的重要细胞因子, 白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)在抗肿瘤免疫过程中扮演着重要的生物学角色, 也是最早被应用于临床抗肿瘤治疗的细胞因子。但是, IL-12的抑癌机制较复杂, 针对不同的肿瘤细胞其作用机理可能不同。有文献指出, IL-12对于黑色素瘤的抗肿瘤效应可能主要是通过抑制其血管生成而发挥作用^[1-2]; 而发生在肾脏以及结肠等部位的肿瘤, IL-12则可能主要是通过增强CD8⁺ T细胞的细胞毒作用发挥抗肿瘤效应的^[3]。急性单核细胞白血病是人急性髓系白血病的一种特殊亚型[法国(France)、美国(America)和英国(Britain)三国协作组, 即FAB, 临床分型为M5型], 其缓解率低、预后较差, 并且容易复发^[4]。我们前期的研究从形态学和吞噬功能上证实, 过表达IL-12可通过促进单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化, 发挥抗肿瘤效应^[5]。为此, 本研究利用人源性重组IL-12 p70细胞因子诱导THP-1细胞, 探讨IL-12对于单核细胞白血病的抗肿瘤作用机理, 为IL-12抑癌机制的研究进一步提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人急性单核细胞白血病细胞株THP-1购自中国科学院上海生命研究科学院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 人源性重组IL-12 p70细胞因子购自Pepro Tech公司; CCK-8试剂盒、蛋白裂解液和BCA试剂盒购自碧云天生物技术研究所; RNAiso plus、RT-PCR逆转录试剂盒、实时定量

PCR酶及SYBR GREEN II购自TaKaRa公司; PCR引物由美国Invitrogen公司合成; 除抗CD11b抗体购自Abcam公司外, 其他抗体均购于Santa Cruz公司。

CO₂细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 流式检测仪购自美国BD公司; 荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 在37 °C、5% CO₂的培养环境中, 用含10%胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)和20 ng/mL IL-12(经预实验确定该浓度诱导细胞分化明显而又不致细胞过多死亡)的1640培养基(GIBCO BRL公司)培养THP-1细胞0~120 h, 每24 h换液一次, IL-12诱导细胞分化及凋亡采用相同的浓度(20 ng/mL)。

1.2.2 实时定量PCR检测 将THP-1细胞以1×10⁶/孔的浓度接种于6孔板, 分别提取IL-12处理0~72 h细胞的总RNA, 并逆转录为cDNA。以逆转录的cDNA为模板, 检测巨噬细胞表面分化标志CD11b和CD68的mRNA表达量变化情况。相关基因PCR引物序列见表1。

1.2.3 Western blot检测 将THP-1细胞以1×10⁶/孔的浓度接种于6孔板, 分别提取IL-12处理0~72 h的细胞总蛋白。按照BCA试剂盒说明书操作, 测定提取蛋白的浓度, 并将各组蛋白定量上样至10%浓度的SDS-PAGE凝胶上进行电泳。电泳结束后, 转膜、封闭并孵育相应的特异性抗体, 检测巨噬细胞表面分化标志CD11b和CD68, 以及抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Fas的表达情况。

1.2.4 流式细胞检测技术 外源性加入人源性重组IL-12 p70细胞因子处理THP-1细胞, 利用流式细胞技术做如下检测: (1)75%酒精固定细胞, 利用荧光

表1 PCR引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

编码基因 Genes	引物序列(5'→3') Sequences (5'→3')	正、反义链 Orientation	产物长度(bp) Amplification size (bp)
<i>β-actin</i> (NM_0011101.3)	CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA	Sense	564
	AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC	Anti-sense	
<i>CD68</i> (NM_001040059.1)	CGC AGC ACA GTG GAC ATT	Sense	246
	AGG CCA AGA AGG ATC AGG	Anti-sense	
<i>CD11b</i> (NM_001145808.1)	GCT GCC GCC ATC ATC TTA C	Sense	108
	CCA CAT GCC AGT GTT CTG C	Anti-sense	

染料结合法分析各处理组的细胞周期变化情况; (2) 利用Annexin V/PI染色方法检测各处理组的细胞凋亡情况; (3)用流式抗体孵育各处理组细胞后检测巨噬细胞表面膜分化标志CD11b和CD68。以上各处理组细胞数均需大于 1×10^6 。

1.2.5 细胞增殖实验 将THP-1细胞以 2×10^3 /孔的浓度接种于96孔板, 用100 μ L的含10%胎牛血清和20 ng/mL IL-12的1640培养基培养THP-1细胞24~120 h。按照CCK-8试剂盒说明书操作, 在酶标仪450 nm波长处检测各孔的光密度值(D), 分析IL-12处理120 h后THP-1细胞增殖能力的变化情况。

1.3 统计学方法

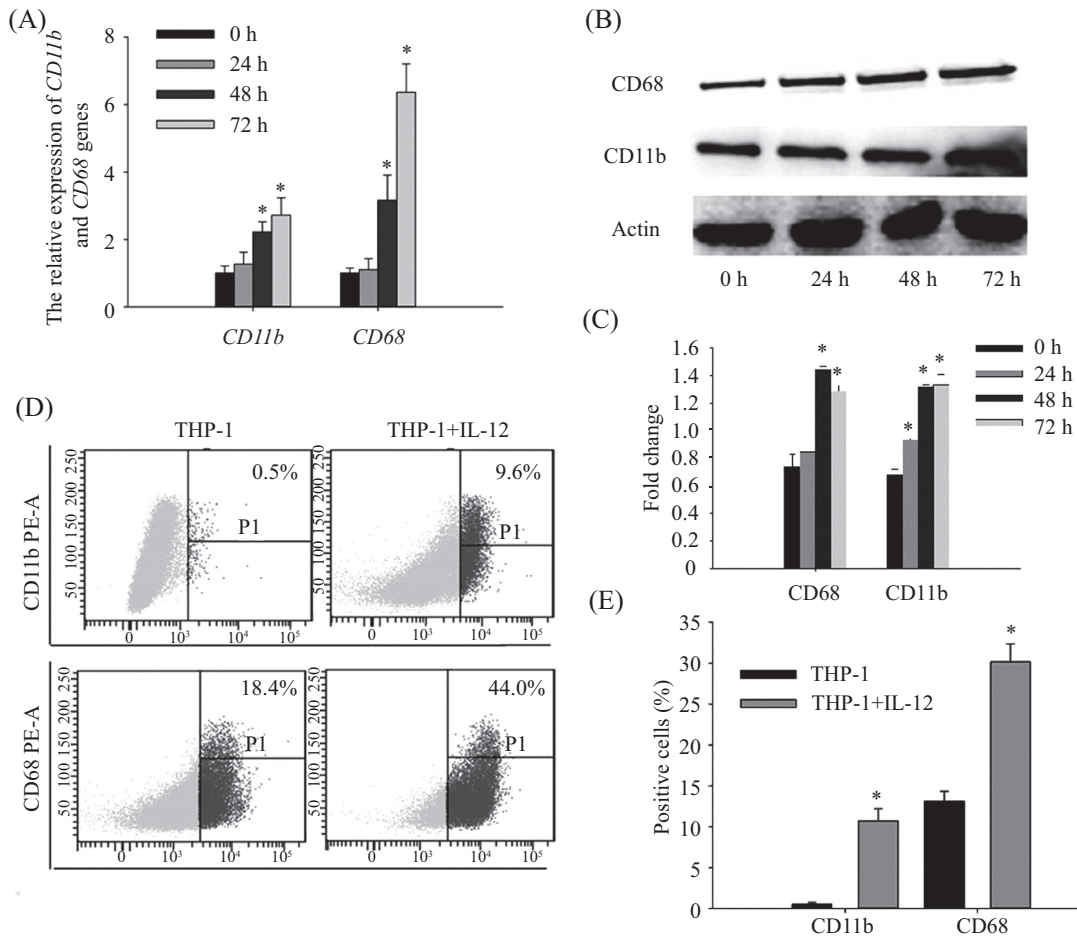
利用SPSS 17.0统计学软件进行统计学分析, 两组间比较用Student's *t*检验, 多组间比较用One-Way

ANOVA方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-12诱导后THP-1细胞巨噬细胞表面分化标志的表达情况

利用人源性重组IL-12 p70细胞因子外源性处理THP-1细胞0~72 h, 检测其巨噬细胞表面分化标志CD68和CD11b的表达水平。结果发现, IL-12诱导后的THP-1细胞CD68和CD11b的mRNA和蛋白表达量均呈时间依赖性增加。随着IL-12作用时间的延长, CD68和CD11b mRNA水平均在48, 72 h明显升高, 72 h更为显著, CD68升高幅度更大(图1A); CD68蛋白表达量72 h达到峰值, CD11b蛋白表达在48, 72 h均明显升高(图1B和图1C); 流式细胞术检测发现,



A: IL-12诱导THP-1细胞0~72 h后CD68和CD11b mRNA表达水平, $*P < 0.05$, 与0 h处理组比较; B、C: IL-12诱导THP-1细胞0~72 h后CD68和CD11b蛋白表达水平, $*P < 0.05$, 与0 h处理组比较; D、E: IL-12诱导THP-1细胞48 h后流式细胞术检测CD68⁺和CD11b⁺阳性细胞, $*P < 0.05$, 与THP-1组比较。A: CD68 and CD11b mRNA expressions in THP-1 cell treated with IL-12 for 0~72 h, $*P < 0.05$ vs 0 h group; B,C: CD68 and CD11b protein expressions in THP-1 cell treated with IL-12 for 0~72 h, $*P < 0.05$ vs 0 h group; D,E: CD68⁺ and CD11b⁺ cells in THP-1 cell treated with IL-12 for 48 h by flow cytometry, $*P < 0.05$ vs THP-1 group.

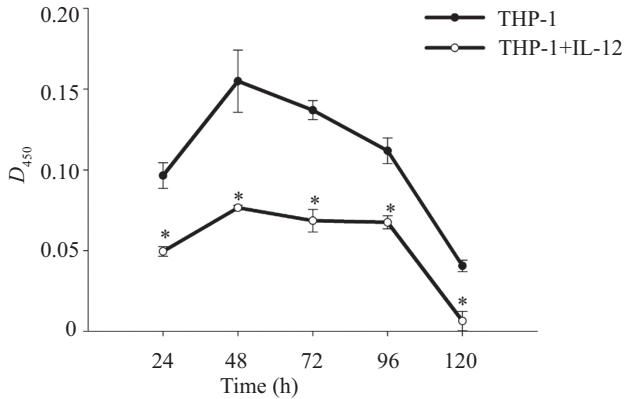
图1 IL-12诱导后THP-1细胞巨噬细胞表面分化标志的表达情况

Fig.1 The expressions of macrophage specific surface antigens in THP-1 induced by IL-12

IL-12处理48 h后, CD68⁺和CD11b⁺阳性细胞数也显著增多(图1D和图1E)。

2.2 IL-12诱导后THP-1细胞增殖能力的变化情况

按CCK-8试剂盒说明书操作, 检测IL-12诱导



* $P < 0.05$, 与同一时间点的THP-1培养组比较。

* $P < 0.05$ compared with THP-1 group at the same time point.

图2 IL-12诱导120 h THP-1细胞的生长曲线

Fig.2 The growth curve of THP-1 cells treated with IL-12 for 120 h

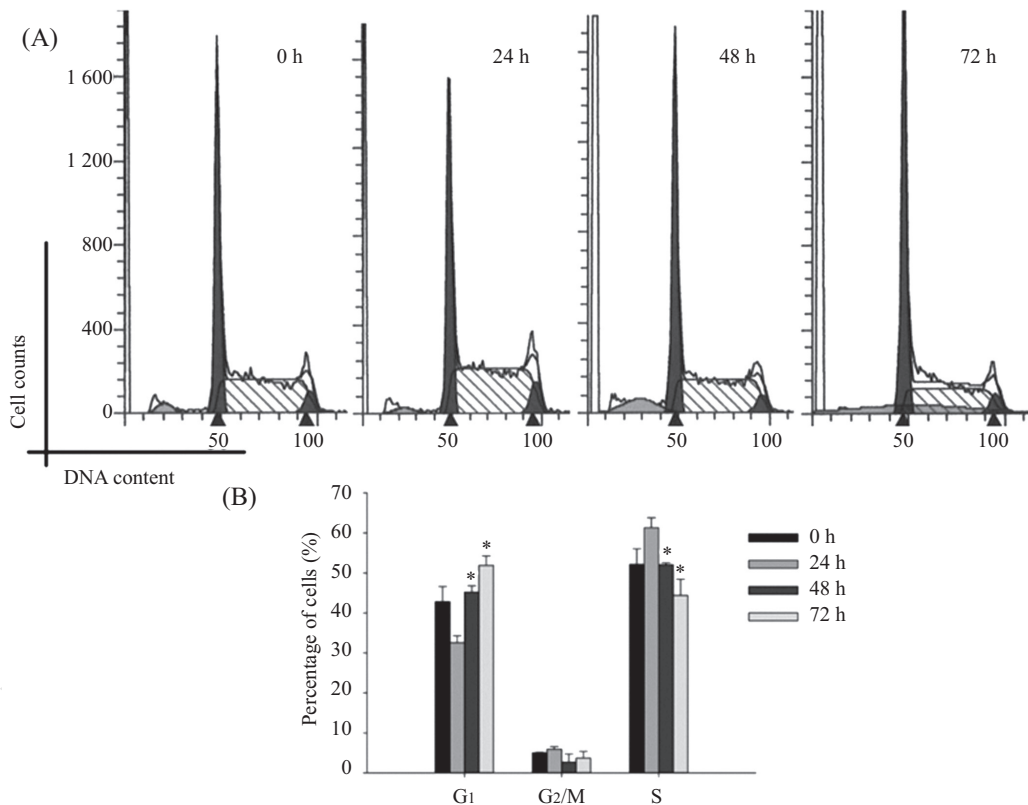
THP-1细胞24~120 h后细胞增殖能力的变化情况。在37 °C、5% CO₂培养条件下, THP-1细胞快速增殖, 48 h达到峰值, 但是随着细胞数量的逐渐增加, 营养消耗增大, 酸性代谢产物堆积, 使得培养液pH值降低, 细胞数量逐渐减少。与未处理的THP-1细胞相比, IL-12处理后的细胞增殖能力明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图2)。

2.3 IL-12诱导后THP-1细胞周期的变化情况

THP-1细胞与20 ng/mL IL-12共同孵育0~72 h后, 利用流式细胞技术检测其细胞周期的变化。结果如图3所示, IL-12诱导THP-1细胞24 h后, G₁期细胞开始逐渐累积增多, 而S期细胞明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示IL-12可致THP-1细胞发生G₁期或者G₁/S期细胞周期阻滞(图3)。

2.4 IL-12诱导后THP-1细胞的凋亡情况

如图4A和图4B所示, 与单独培养的THP-1细胞相比, IL-12诱导后的细胞凋亡率明显增加, 且以早期凋亡细胞为主, 比例达11.25%±1.86%。Western blot检测凋亡相关蛋白表达发现, 抗凋亡蛋白Bcl-2

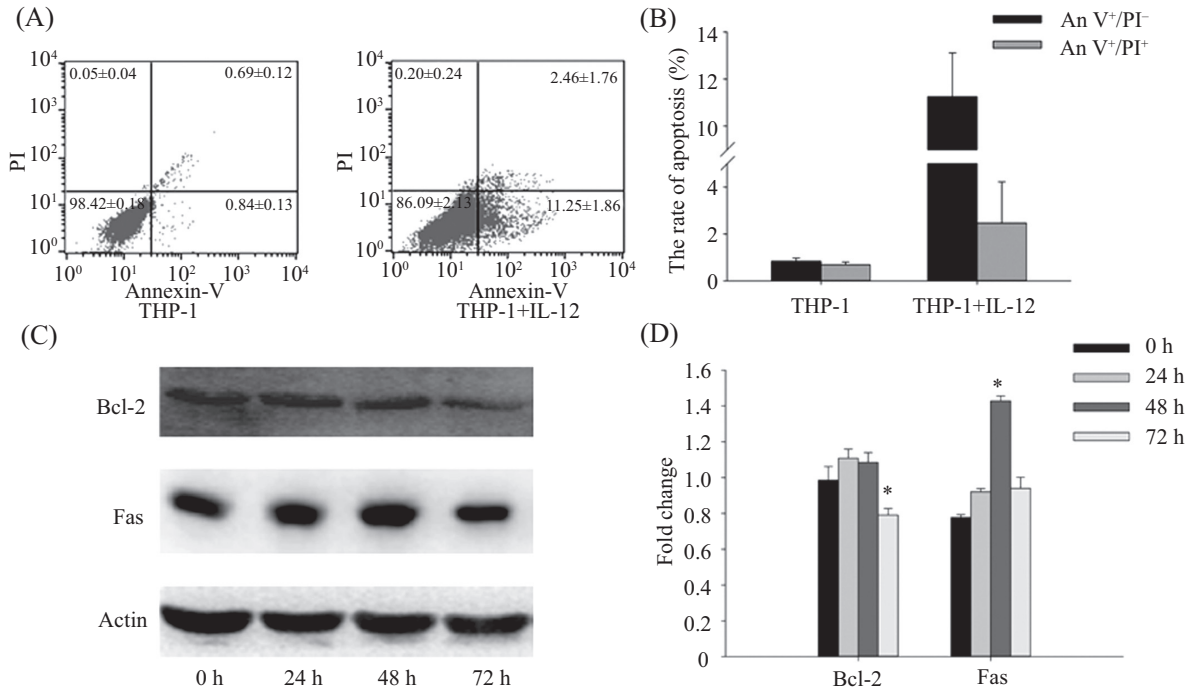


A: IL-12诱导后THP-1细胞周期分析; B: IL-12诱导后各周期时相THP-1细胞所占比例的柱状统计图。* $P < 0.05$, 与24 h处理组比较。

A: cell cycle analysis of THP-1 cells after being treated with IL-12; B: percentage of THP-1 cells in different cell cycle phases treated with IL-12 were calculated to draft histograms. * $P < 0.05$ compared with 24 h group.

图3 IL-12对THP-1细胞周期的影响

Fig.3 Effect of IL-12 on cell cycle of THP-1 cells



A、B: 流式细胞技术检测IL-12诱导THP-1细胞72 h后的细胞凋亡率。An V⁺/PI⁻组代表早期凋亡细胞(或者有活性的凋亡细胞); An V⁺/PI⁺组代表晚期凋亡细胞(或者无活性的凋亡细胞); C、D: Western blot检测IL-12诱导THP-1细胞72 h后Bcl-2和Fas蛋白的表达情况。**P*<0.05, 与0 h处理组比较。

A,B: FCM analysis of cells apoptosis rate after treatment with IL-12 for 72 h, Histogram sum up the effects of IL-12 on THP-1 cells apoptosis. An V⁺/PI⁻ population stands for the early apoptosis cells (or viable apoptosis cells), and An V⁺/PI⁺ population stands for the late apoptosis cells (or non-viable apoptosis cells); C,D: Western blot analysis of Bcl-2 and Fas protein expressions after treatment with IL-12 for 72 h. **P*<0.05 vs 0 h group.

图4 IL-12对THP-1细胞凋亡的影响

Fig.4 Impact of IL-12 on cell apoptosis of THP-1 cells

在IL-12处理24 h后表达逐渐减少, 而促凋亡蛋白Fas总体上表达呈上升趋势, 在48 h达到峰值; IL-12处理后的THP-1细胞上述两种蛋白表达具有时间依赖性(图4C和图4D)。

3 讨论

我们在前期的研究中发现, 过表达IL-12可诱导单核系肿瘤细胞在形态学和吞噬功能上, 出现向巨噬细胞分化的改变。为此, 本实验利用人源性重组IL-12 p70细胞因子诱导存在IL-12受体的THP-1细胞^[6], 进一步探讨了IL-12对于单核系肿瘤的可能抑癌机理。在mRNA和蛋白水平上检测巨噬细胞表面分化标志的表达, 发现重组IL-12 p70细胞因子诱导后CD68和CD11b的mRNA和蛋白水平表达均有不同程度的升高, 且具有时间依赖性, 并与重组IL-12腺病毒感染THP-1细胞结果类似^[5]。流式细胞术检测也发现, IL-12处理THP-1细胞后, 细胞膜表面CD68⁺和CD11b⁺细胞数明显增多。上述结果再次证明, IL-12能诱导单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化。

有文献指出, 在肿瘤细胞分化过程中, 常常会伴有生长缓慢和细胞周期阻滞的生物学特性^[7-8]。本实验将THP-1细胞与IL-12共同孵育后发现, THP-1细胞生长缓慢, 无明显的生长峰; G₁期细胞累积增多, 而S期细胞逐渐减少, 细胞存在G₁期或者G₁/S期阻滞。细胞凋亡, 作为细胞诱导分化过程中的另一个生物学特性^[9-10], 在IL-12诱导的单核系肿瘤细胞分化过程中也存在着明显的改变。与单独培养的THP-1细胞相比, IL-12诱导后的细胞凋亡率增加, 并以早期凋亡细胞为主, 同时伴有抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调和促凋亡蛋白Fas表达上调。综上所述, 细胞因子IL-12能够诱导单核肿瘤细胞THP-1分化, 并伴有生长缓慢、G₁期或G₁/S期细胞周期阻滞以及细胞凋亡增加等功能性改变。实验中THP-1经IL-12诱导后发生分化与凋亡的可能是同一群细胞, 也可能是两群不同的细胞。前者是因为同一群细胞通过分化停止增殖, 向成熟细胞转化, 成熟细胞再最终走向凋亡; 后者是因为的确存在两群不同的细胞。

与正常细胞相比, 肿瘤细胞具恶性增殖和分化

程度低的病理学特点,且其恶性程度与分化程度呈负相关。早在20世纪70年代, Sachs^[11]发现,在一些化学物质作用下,白血病细胞的异常分化是可逆的,由此提出了“分化治疗(differentiation therapy)”的概念。肿瘤的诱导分化即利用诱导分化剂诱导不成熟的恶性细胞,使其逆转向正常细胞分化^[11],而采用诱导分化这一方法对肿瘤进行治疗就称为分化治疗。与肿瘤细胞分化相关并且在肿瘤治疗作用上起诱导分化作用的细胞因子主要包括:集落刺激因子(colony-stimulating factor, CSF)、干扰素(interferon, IFN)等^[13]。而作为诱导抗原递呈细胞大量分泌IFN- γ 的免疫调节因子^[14-15]的IL-12,我们证实,它同样能够诱导单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化。因此,我们认为,IL-12作为一种分化诱导剂,通过“分化治疗”诱导人单核系肿瘤细胞向较成熟的巨噬细胞方向分化,可在一定程度上降低该肿瘤细胞恶性程度,并通过细胞G₁期或G₁/S期阻滞以及凋亡增加来抑制肿瘤细胞增殖。以上结果为临床治疗单核细胞白血病提供了新思路。

参考文献 (References)

- 1 Asselin-Paturel C, Lassau N, Guinebretière JM, Zhang J, Gay F, Bex F, *et al.* Transfer of the murine interleukin-12 gene *in vivo* by a Semliki Forest virus vector induces B16 tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography. *Gene Ther* 1999; 6(4): 606-15.
- 2 Imagawa Y, Satake K, Kato Y, Tahara H, Tsukuda M. Antitumor and antiangiogenic effects of interleukin-12 gene therapy in murine head and neck carcinoma model. *Auris Nasus Larynx* 2004; 31(3): 239-45
- 3 Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, Wang J, Hebel HL, Long S, *et al.* Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity. *Gene Ther* 1999; 6(5): 833-9.
- 4 陈为民, 廖丽升, 林芸, 陈碧云, 宋团月, 李丽英. 急性单核细胞白血病8年诊治回顾. *福建医药杂志*(Chen Weimin, Liao Lisheng, Lin Yun, Chen Biyun, Song Tuanyue, Li Liying. Review of diagnosis and treatment of acute monocytic leukemia in lately eight years: Report of 68 cases. *Fujian Medical Journal*) 2005; 27(5): 8-10.
- 5 马婷婷, 熊海玉, 王秦, 成凤, 李紫薇, 吴碧涛, 等. 过表达IL-12调节单核系肿瘤细胞向巨噬细胞分化. *中国细胞生物学学报*(Ma Tingting, Xiong Haiyu, Wang Qin, Cheng Feng, Li Ziwei, Wu Bitao, *et al.* IL-12 overexpression regulate the differentiation of monocytic tumor cell to macrophagocyte. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(4): 455-60.
- 6 Ferretti E, Di Carlo E, Cocco C, Ribatti D, Sorrentino C, Ognio E, *et al.* Direct inhibition of human acute myeloid leukemia cell growth by IL-12. *Immunol Lett* 2010; 133(2): 99-105.
- 7 Luo J, Yuan Y, Chang P, Li D, Liu Z, Qu Y. Combination of aloe-emodin with radiation enhances radiation effects and improves differentiation in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 2014; 10(2): 731-6.
- 8 Milewska M, Grabiec K, Grzelkowska-Kowalczyk K. Interactions of proliferation and differentiation signaling pathways in myogenesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014; 68: 516-26.
- 9 Heo SK, Noh EK, Yoon DJ, Jo JC, Park JH, Kim H. Dasatinib accelerates valproic acid-induced acute myeloid leukemia cell death by regulation of differentiation capacity. *PLoS One* 2014; 9(2): e98859.
- 10 Wael H, Yoshida R, Kudoh S, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T. Notch1 signaling controls cell proliferation, apoptosis and differentiation in lung carcinoma. *Lung Cancer* 2014; 85(2): 131-40.
- 11 Sachs L. The differentiation of myeloid leukaemia cells: New possibilities for therapy. *Br J Haematol* 1978; 40(4): 509-17.
- 12 Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: Basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* 2001; 90(2/3): 105-56.
- 13 董倩, 姜达. 实体瘤诱导分化治疗研究现状. *中国肿瘤学杂志*(Dong Qian, Jiang Da. Current status situation of induction differentiation therapy for solid tumor. *Chinese Journal of Oncology*) 2004; 10(6): 443-6.
- 14 Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992; 143(1): 127-42.
- 15 Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: Mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; 22(10): 556-60.