

## • 论著-实验研究 •

干扰素联合全反式维 A 酸逆转 NB4-R1  
细胞的耐药机制研究李美芳<sup>1</sup> 王海英<sup>2</sup> 冯安华<sup>2</sup> 马晓环<sup>1</sup> 杨敏<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的:探讨干扰素(IFN)联合全反式维 A 酸(ATRA)逆转维甲酸耐药急性早幼粒细胞白血病(APL)的机制。方法:取指数生长期的 NB4-R1 细胞分为 6 组,分别加入 ATRA、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ +ATRA、IFN- $\gamma$ +ATRA(其中 ATRA 终浓度为 2  $\mu$ mol/L,IFN- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  终浓度均为 1000 IU/ml),以及不加药组的空白对照组,用 MTT 法检测细胞的增殖状况;蛋白免疫印迹试验测定各组 NB4-R1 细胞 2 h IRF-1 蛋白表达,以及 IFN- $\alpha$ +ATRA 组、IFN- $\gamma$ +ATRA 组诱导 NB4-R1 细胞观察 8 h IRF-1 蛋白表达的差异。结果:除 ATRA 组外,另外 4 个实验组均对 NB4-R1 细胞增殖有抑制作用,且联合用药的效果明显高于单独用药;5 个实验组 IRF-1 蛋白均有表达,IFN- $\alpha$ +ATRA 组、IFN- $\gamma$ +ATRA 组明显高于其他 3 组;IFN- $\alpha$ +ATRA 组和 IFN- $\gamma$ +ATRA 组比较,2 h 内前者 IRF-1 蛋白表达量逐渐下降,而后者则无明显变化;至用药 8 h 后,IFN- $\alpha$ +ATRA 组 IRF-1 蛋白表达基本消失,而 IFN- $\gamma$ +ATRA 组的表达量仍较前无明显变化。结论:ATRA 联合 2 种干扰素诱导 NB4-R1 细胞分化均有作用,但 ATRA+IFN- $\gamma$  效果更加显著;而 IFN- $\alpha$ +ATRA 组与 IFN- $\gamma$ +ATRA 组比较,前者作用维持时间更长,可能与 IRF-1 蛋白持续表达有关。

**【关键词】** 全反式维 A 酸;干扰素;白血病,早幼粒细胞,急性;IRF-1 蛋白;NB4-R1 细胞株

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2017.07.011

[中图分类号] R773.71 [文献标志码] A

Effect of interferon combined with ATRA on differentiation  
of ATRA resistant NB4-R1 cellsLI Meifang<sup>1</sup> WANG Haiying<sup>2</sup> FENG Anhua<sup>2</sup> MA Xiaohuan<sup>1</sup> YANG Min<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Clinical Medicine College, Weifang Medical University, Weifang, 261000, China; <sup>2</sup>Department of Hematology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University; <sup>3</sup>Clinical Medicine College, Affiliated Hospital of Taishan Medical University)

Corresponding author: WANG Haiying, E-mail: weiyifuyuan@sina.com

**Abstract Objective:** To investigate the mechanism of interferon (IFN) combined with all-trans retinoic acid (ATRA) in reversing retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia (APL). **Method:** The experiment was divided into 6 groups, respectively ATRA, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ +ATRA and IFN- $\gamma$ +ATRA (the final concentration of ATRA was 2  $\mu$ mol/L, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  concentration was 1000 IU/ml) and the blank control group without any drugs, cell proliferation was tested with MTT assay, Western Blot was used to determine the IRF-1 protein expression of NB4-R1 cells in 2 hours, IRF-1 protein expression of NB4-R1 cells in IFN- $\alpha$ +ATRA group, IFN- $\gamma$ +ATRA group in 8 hours. **Result:** Except ATRA group, the other 4 experimental groups could inhibit the proliferation of NB4-R1 cells, and the combined treatment effect was significantly higher than that of single drug. The IRF-1 protein expressed in 5 experimental groups, and IFN- $\alpha$ +ATRA group, IFN- $\gamma$ +ATRA group was significantly higher than those of the other 3 groups. The expression of IRF-1 protein in IFN- $\alpha$ +ATRA group decreased gradually within 2 hours, while IFN- $\gamma$ +ATRA group had no obvious change. Eight hours after the treatment, expression of IRF-1 protein in IFN- $\alpha$ +ATRA group disappeared, whereas IFN- $\gamma$ +ATRA group still had no obvious change. **Conclusion:** ATRA combined with either kind of interferon plays a role in inducing NB4-R1 cell differentiation, but ATRA+IFN- $\gamma$  has more significant effects. The effect of IFN- $\alpha$ +ATRA group has longer duration when compared with IFN- $\gamma$ +ATRA group, and the expression of IRF-1 protein may be sustained.

**Key words** all-trans retinoic acid; interferon; acute promyelocytic leukemia; IRF-1 protein; NB4-R1 cell

<sup>1</sup>潍坊医学院临床医学院(山东潍坊,261000)

<sup>2</sup>潍坊医学院附属医院血液内科

<sup>3</sup>泰山医学院临床医学院

通信作者:王海英, E-mail: weiyifuyuan@sina.com

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)占同期白血病的3.3%~17.4%<sup>[1]</sup>。尽管目前APL使用全反式维A酸(ATRA)与化疗药物合理组合治疗,完全缓解率可提高到90%~95%<sup>[2]</sup>,但APL复发和ATRA耐药或难治性仍是困扰临床的主要难题。干扰素(IFN)作为一种细胞因子,具有广泛的生物学活性,不仅有抗病毒、调节细胞的增殖和分化等作用,而且证实有逆转化疗药物耐药的作用,ATRA耐药与缺乏IFN合成的某些蛋白有一定的关系<sup>[3]</sup>。而IFN可诱导的基因如OAS、PKR及IFN调节因子-1和-2(IRF-1和IRF-2)与细胞增殖有密切关系<sup>[4]</sup>。IRF-1基因作为一种转录激活因子,可以不断删除患有白血病或骨髓增生异常综合征且基因组区域为5q-的患者体内的白血病细胞。换句话说,IRF的缺失可导致某种肿瘤的产生。为探究ATRA联合IFN逆转耐药的机制,本实验从细胞、分子水平,探究ATRA及IFN对NB4-R1细胞(维A酸耐药的APL细胞株)IRF-1表达的影响及相关调控机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系及主要试剂

NB4-R1细胞株购自北京正四柏生物科技有限公司,ATRA购自Sigma公司,IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 购自上海克隆生物高技术有限公司,RPMI-1640培养液购自Gibico公司,胎牛血清购自杭州四季青有限公司,兔抗人IRF-1、碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG试剂盒购自美国Abcam公司。

### 1.2 细胞培养

将NB4-R1细胞以 $1 \times 10^9$ 的密度接种于含10%灭活的胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的RPMI-1640培养液中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中静置培养,3天传代1次。取指数生长长期的细胞进行实验。

实验共分为6组:对照组(control组)、ATRA组、IFN- $\alpha$ 组、IFN- $\gamma$ 组、IFN- $\alpha$ +ATRA组、IFN- $\gamma$ +ATRA组。其中ATRA终浓度为2  $\mu$ mol/L,IFN- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 终浓度均为1000 IU/ml,空白对照组仅加入RPMI-1640培养液。

### 1.3 MTT法检测细胞增殖状况

收集各组NB4-R1细胞,调整细胞浓度为 $10^5$ /ml,以100  $\mu$ l/孔接种于96孔板中,分别在培养1 h,2 h,4 h,8 h后MTT法检测细胞增殖状况。在490 nm处测定A值。各组均设3个复孔。重复3次,取平均值。

细胞生长抑制率=[(对照组平均A值-实验组平均A值)/对照组平均A值] $\times$ 100%。

### 1.4 Western Blot法检测IRF-1蛋白表达

于培养第2小时收集各组(2~4) $\times 10^6$  NB4-

R1细胞,提取蛋白备用。配制100 g/L凝胶,经电泳、转膜后杂交,分别加入一抗(兔抗人IRF-1)及二抗(碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG),孵育2 h。以GAPDH做内参照(一抗为兔抗人GAPDH多克隆抗体,二抗为碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG),ECL发光显色。用Image J软件分析条带灰度,IRF-1蛋白与GAPDH蛋白条带的灰度比值表示IRF-1蛋白的相对表达水平。

继续将ATRA+IFN- $\gamma$ 组及ATRA+IFN- $\alpha$ 组延迟培养至8 h,同样方法进行IRF-1蛋白测定。

### 1.5 统计学处理

使用SPSS20.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用F检验;MTT比色法A值与Western Blot试验2 h蛋白表达量用线性回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTT比色法检测药物对NB4-R1细胞增殖的影响

除ATRA组外,另外4个实验组均对NB4-R1细胞增殖有抑制作用,且联合用药的效果明显高于单独用药。各实验组对NB4-R1细胞增殖抑制作用的效果依次为:IFN- $\gamma$ +ATRA组>IFN- $\alpha$ +ATRA组>IFN- $\gamma$ 组>IFN- $\alpha$ 组( $P < 0.05$ )(图1)。

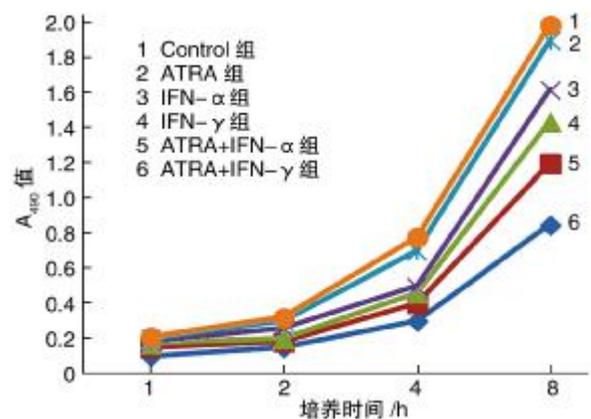


图1 药物对NB4-R1细胞增殖的影响

### 2.2 Western Blot法检测IRF-1蛋白的表达情况

ATRA及IFN单药或联合用药诱导NB4-R1细胞2 h后,5个实验组对NB4-R1细胞IRF-1水平均有上调作用。对照组、IFN- $\alpha$ 组、ATRA组、IFN- $\gamma$ 组、ATRA+IFN- $\alpha$ 组、ATRA+IFN- $\gamma$ 组IRF-1蛋白表达量分别为:0、0.14 $\pm$ 0.02、0.06 $\pm$ 0.05、0.28 $\pm$ 0.02、0.41 $\pm$ 0.05、0.58 $\pm$ 0.03。统计分析结果显示,与ATRA组比较,其他4组表达IRF-1蛋白均有增加( $P < 0.05$ ),ATRA+IFN- $\gamma$ 组较IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 及ATRA+IFN- $\alpha$ 组表达量增加( $P < 0.05$ ),ATRA+IFN- $\gamma$ 组较ATRA+

IFN- $\alpha$ 组明显增加( $P < 0.05$ )。

### 2.3 Western Blot 法检测 ATRA 联合 IFN 诱导 NB4-R1 细胞的 IRF-1 蛋白水平

ATRA 联合 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  均可引起 IRF-1 的表达,然而 2 组诱导的情况不完全相同。药物处理 2 h 后,NB4-R1 细胞中 IRF-1 蛋白表达量无显

著差异;用药 4 h 后,ATRA+IFN- $\alpha$  组 IRF-1 表达量较前下降,而 ATRA+IFN- $\gamma$  组则无明显变化;用药 8 h 后,ATRA+IFN- $\alpha$  组 IRF-1 蛋白表达基本消失,而 ATRA+IFN- $\gamma$  组的表达量仍较前无明显变化。详见表 1。

表 1 ATRA 联合 IFN 诱导 NB4 细胞的 IRF-1 蛋白水平

组别	2 h 后 IRF-1 蛋白表达量	4 h 后 IRF-1 蛋白表达量	8 h 后 IRF-1 蛋白表达量
ATRA 组	0.06±0.05	0.01±0.03	—
ATRA+IFN- $\alpha$ 组	0.41±0.05	0.12±0.05	0.08±0.02
ATRA+IFN- $\gamma$ 组	0.58±0.03	0.60±0.01	0.52±0.04

### 2.4 线性回归分析

MTT 比色法 A 值与 Western Blot 试验 2 h 蛋白表达量存在直线回归关系,两者呈负相关关系( $r = -0.967, P < 0.05$ )。统计数据表明经 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 ATRA 单独或联合诱导后,随着 IRF-1 蛋白表达增加,NB4-R1 细胞增殖受抑,A 值下降。反之,当 IRF-1 蛋白表达逐渐下降时,NB4-R1 细胞增殖速度加快。

### 3 讨论

ATRA 是目前临床上诱导 APL 缓解的主要药物,90% 的 APL 患者通过 ATRA 治疗可获得完全缓解,但 APL 复发和 ATRA 耐药或难治性仍是困扰临床的主要难题。有研究发现 APL 患者维甲酸耐药或难治性与缺乏 IFN 合成的一些蛋白质有关。多个研究报道称 IFN 与 ATRA 有协同抗肿瘤及促进细胞分化的作用<sup>[5]</sup>。

应用 MTT 法检测表明,IFN- $\gamma$  和 IFN- $\alpha$  分别与 ATRA 联合均能增强对 NB4-R1 细胞增殖的抑制作用。Western Blot 法显示,IFN- $\alpha$ +ATRA 组、IFN- $\gamma$ +ATRA 组对 NB4-R1 细胞 IRF-1 水平均有上调作用,说明 2 种 IFN 分别与 ATRA 联合应用时,均可以促进 NB4-R1 细胞分化,但以 ATRA 联合 IFN- $\gamma$  的效果最强。

有报道称 ATRA 和 IFNs 通过 IRF-1 蛋白表达上调诱导 NB4-R1 细胞分化,IRF-1 作为转录激活因子,可直接参与调控细胞增殖分化。IRF-1 mRNA 在细胞周期中水平上下波动,在细胞分裂期 IRF-1 水平达到最低值,而在细胞抑制期达到最高值。从基因敲除小鼠获得 IRF-1 细胞实验表明,IRF-1 是个抑癌基因,同时也是诱导细胞凋亡所必需的<sup>[6]</sup>。

ATRA 联合 IFN- $\gamma$  逆转 ATRA 耐药的效果,强于 ATRA+IFN- $\alpha$ ,其机制尚不完全清楚。试验表明当 ATRA 分别联合 IFN- $\gamma$  和 IFN- $\alpha$  诱导 NB4-R1 细胞后,2 组均可引起 IRF-1 蛋白的表达。然而随着时间的推移,2 组诱导的情况开始发生变

化。ATRA+IFN- $\alpha$  组 IRF-1 蛋白表达量逐渐下降,而 ATRA+IFN- $\gamma$  则无明显变化;至用药 8 h 后,ATRA+IFN- $\alpha$  组 IRF-1 蛋白表达基本消失,而 ATRA+IFN- $\gamma$  组的表达量仍较前无明显变化。表明 ATRA+IFN- $\alpha$  诱导 IRF-1 蛋白短暂表达,而 ATRA+IFN- $\gamma$  诱导的 IRF-1 蛋白则可以维持在恒定的水平至 8 h。线性回归分析统计数据表明,随着 IRF-1 蛋白表达增加,NB4-R1 细胞增殖受抑,A 值下降。MTT 比色法 A 值与 Western Blot 试验 2 h 蛋白表达量之间存在直线回归关系。有研究报道 IRF-1 是 ATRA 发挥作用的一个主要靶基因,ATRA 和 IFN- $\gamma$  均能通过 IFN- $\gamma$  的激活位点结合而有效地刺激 IRF-1 基因的表达<sup>[7]</sup>。这有可能是 ATRA 联合 IFN- $\gamma$  诱导 NB4-R1 细胞分化的作用强于 ATRA 联合 IFN- $\alpha$  的重要原因之一。

### 参考文献

- [1] 姜国胜,唐天华,毕可红. 急性早幼粒细胞白血病对全反式维甲酸耐药的机制及其逆转[J]. 中华肿瘤杂志, 2010,22(2):154-157.
- [2] 楼叶江,潘晓蓉,许桂平,等. 自分泌干扰素  $\alpha$  在全反式维甲酸诱导 RIG-G 基因表达中的作用[J]. 中华医学杂志, 2012,92(2):124-127.
- [3] He P, Liu Y, Zhang M. Interferon- $\gamma$  enhances promyelocytic leukemia protein expression in acute promyelocytic cells and cooperates with all-trans retinoic acid to induce maturation of NB4 and NB4-R1 cells[J]. Exp Ther Med, 2012,3:776-780.
- [4] 潘晓蓉,楼叶江,张长林,等. 全反式维甲酸诱导 RIG-g 基因表达的调控机制研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2010,18(1):31-35.
- [5] 柴晔,张连生,张玉芳. 环孢素 A 与干扰素联合逆转复发难治性急性白血病多药耐药或难治性的临床研究[J]. 临床血液学杂志, 2013,16(5):211-213.
- [6] Tanaka N, Ishihara M, Kitagawa M. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1[J]. Cell, 2011,37:1825-1829.
- [7] 刘宏涌,蒋敏,彭荷玲. 柔红霉素对人急性早幼粒细胞白血病细胞株 HL-60 细胞及干扰素调节因子 1、8、9 表达的影响[J]. 内科, 2014,9(2):124-127.