

IFN- α 2b 体外对人眼葡萄膜黑色素瘤细胞端粒酶活性的影响

程浩¹, 夏阳¹, 路晓明¹, 洪海峰¹, 麦庆怡¹, 吴中耀², 郑捷樑²

基金项目:中国广东省科技计划资助项目(No. 2008B030301253)
作者单位:¹(510120)中国广东省广州市,广州医学院第一附属医院眼科;²(510060)中国广东省广州市,中山大学中山眼科中心
作者简介:程浩,副主任医师,眼科学博士,研究方向:眼眶病、眼肿瘤、斜视及小儿眼科、眼整形、眼底病方面的研究,曾获得省卫生厅科技成果三等奖1项,获得广东省自然科学基金及广东省科技计划项目资助各1项。

通讯作者:吴中耀,博士生导师,从事眼眶病、眼肿瘤临床及研究30年,获各级科研基金项目十多项,享国务院特殊津贴。
zhongyaowu@163.net

收稿日期:2008-12-30 修回日期:2009-02-16

Inhibition effects of IFN- α 2b on telomerase activity to cultured uveal melanoma of human eyes

Hao Cheng¹, Yang Xia¹, Xiao-Ming Lu¹, Hai-Feng Hong¹, Qing-Yi Mai¹, Zhong-Yao Wu², Jian-Liang Zheng²

Foundation item: Guangdong Provincial Science and Technology Project(No. 2008B030301253)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China;² the Center of Ophthalmology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zhong-Yao Wu. The Center of Ophthalmology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. zhongyaowu@163.net

Received:2008-12-30 Accepted:2009-02-16

Abstract

• **AIM:** To study the restrain effects of telomerase inhibitor IFN- α 2b (Interferon- α 2b) on the telomerase activity to uveal melanoma cells of human eyes.

• **METHODS:** Using IFN- α 2b individually with different concentration and time acted on the primary cultured uveal melanoma cells of human eyes and compared with the controls. The changes of telomerase activity were observed by PCR-ELISA and PCR-PAGE. The restrain results were compared with a one-way analysis of variance(ANOVA).

• **RESULTS:** The telomerase activity depressed as the increasing concentration and time of IFN- α 2b. Significant inhibition appear at the concentration attained 50kU/L or the time attained 24 hours. At the point which 500 kU/L or the time attained 48 hours the telomerase activity depressed very obviously.

• **CONCLUSION:** As an effective telomerase inhibitor,

IFN- α 2b can depress the telomerase activity of uveal melanoma cells effectively. And it appeared concentration and time dependency.

• **KEYWORDS:** telomerase inhibitor; uveal melanoma; IFN- α 2b

Cheng H, Xia Y, Lu XM, *et al*. Inhibition effects of IFN- α 2b on telomerase activity to cultured uveal melanoma of human eyes. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(3):466-468

摘要

目的:研究端粒酶抑制剂 IFN- α 2b 对人葡萄膜黑色素瘤细胞端粒酶活性的抑制作用。

方法:采用原代培养的人葡萄膜黑色素瘤细胞,用特定时间下不同浓度以及特定浓度下不同时间的端粒酶抑制剂 IFN- α 2b 作用于体外培养的黑色素瘤细胞,并设立空白对照组。采用 PCR-ELISA 法及 PCR-PAGE 法测定细胞中端粒酶活性的变化,采用单因素方差进行统计分析。

结果:随着 IFN- α 2b 浓度的增加及作用时间的延长,端粒酶的活性出现逐步的下降,在药物浓度达到 50kU/L 以及作用时间达到 24h 后,出现明显的抑制作用,并在 500kU/L 及 48h 达到抑制高峰。

结论: IFN- α 2b 可有效降低体外培养的人葡萄膜黑色素瘤细胞的端粒酶活性,并呈浓度和时间依赖性。

关键词:端粒酶抑制剂;葡萄膜黑色素瘤; IFN- α 2b

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.03.018

程浩,夏阳,路晓明,等. IFN- α 2b 体外对人眼葡萄膜黑色素瘤细胞端粒酶活性的影响. 国际眼科杂志 2009;9(3):466-468

0 引言

端粒酶在多数恶性肿瘤中呈现高表达,已成为恶性肿瘤的标记物之一。它因能够修补不断缩短的染色体末梢结构一端粒,使其具有无限增殖能力。抑制端粒酶的活性,可使肿瘤细胞恢复正常的凋亡过程,从而达到杀灭肿瘤细胞的作用。我们采用端粒酶抑制剂干扰素 IFN- α 2b(Interferon- α 2b),作用于体外培养的恶性黑色素瘤细胞,以观察其对眼部恶性肿瘤细胞端粒酶活性的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-07/2007-07 葡萄膜黑色素瘤患者行眼球摘除术后的新鲜标本 10 例,1 例为睫状体黑色素瘤,其余为脉络膜黑色素瘤。男 6 例,女 4 例;年龄 27.0~53.0(平均 43.4)岁;均经病理学检查证实为脉络膜黑色素瘤。DMEM/F12 1:1 干粉培养基为美国 INVITROGEN 公司产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶为美国 Sigma 公司产品;IFN- α 2b 为先灵葆雅公司生产。葡萄膜黑色素瘤组织取自局部麻醉下摘除的眼球,摘

除后 1h 内取材。在无菌条件下,沿肿瘤对侧与肿瘤最大径平行剖开眼球,取出玻璃体及表面的视网膜组织。切取部分新鲜的有光泽的肿瘤组织置入 DMEM/F12 加胎牛血清的培养液中,用眼科小剪刀将其剪碎并反复吹打,制成悬液,按 $(6 \sim 8) \times 10^7$ 个/L 的细胞数接种于 6 孔培养板中,加入 DMEM/F12 胎牛血清培养液,置于 50mL/L CO₂ 培养箱,37℃ 孵育,24h 后即可见细胞伸出伪足,贴壁良好。置换培养液,去除细胞碎片及没有活性的游离细胞。常规培养,待细胞基本融合时传代。将稳定生长的第 3 代细胞接种于载玻片上,经 PBS 液洗涤后,依次用甲醛、生理盐水及丙酮各原位固定 10min,应用黑色素细胞瘤特异性抗原 HMB 45 对固定的细胞进行免疫组织化学染色。显微镜下判定细胞的纯度。

1.2 方法 将稳定生长的第 3 代肿瘤细胞以 1×10^4 的细胞数接种于 96 孔培养板,培养 3d 后,细胞贴壁良好,置换新鲜培养液 200 μ L,加入不同浓度的 IFN- α 2b。以 50000kU/L 为最大浓度,分为 5 组,其余各组用无菌注射用水按 1/10 稀释,浓度分别为 5000,500,50,5kU/L,同时设立无菌注射水对照组。药物作用时间 72h。另以 5000kU/L 为标准浓度,按照 96,72,48,24 及 12h 分别加入不同的孔中,以上每组均设 4 个复孔。达到上述设定时间后,用胰酶 EDTA 液消化获得细胞悬液,PBS 洗涤后离心弃上清,立即加裂解液 200 μ L,冰浴 30min,4℃ 15000r/min 离心 25min,取上清液约 160 μ L 分装于 4 个 Eppendorf 管中保存于 -80℃,取稀释液 10 μ L 置于 85℃ 水浴锅中 10min,灭活端粒酶,另取稀释液及灭活端粒酶的稀释液各 2 μ L 分装于两个 PCR (聚合酶链反应)管中,各加 10 μ L TRAP (端粒重复放大测定法, telomerase repeat amplification protocol assay) 反应混合液、Taq 酶 33.34nkat 及去离子水 48 μ L,混匀后置 PCR 循环仪中进行扩增反应,30℃ 保温 30min,以完成端粒酶介导的端粒延伸过程,循环参数为 94℃ 30s,55℃ 30s,循环 34 次。加 PCR 反应产物 5 μ L 到预先包被有链霉素亲和素的微孔板中,37℃ 孵育 1h,通过生物素链霉素亲和素反应将端粒酶阳性产物固定在微孔板上,1 \times Washing Buffer 清洗 5 次后,加入含抗-DNP (二硝基苯酚) 抗体的辣根过氧化物酶使其与端粒酶阳性 PCR 产物中的 DNP 结合,室温下孵育 30min,加入 TMB 显色剂 100 μ L 显色 6min,最后加入终止液,酶标仪检测 450nm 及 690nm 的吸光度值,端粒酶活性按公式 $A = A_{\text{sample}} - A_{\text{heat treated sample}}$ 计算。同时将聚丙烯酰胺和甲叉聚丙烯酰胺 19:1 的比例及 5 \times TEB 缓冲液制备成聚丙烯酰胺凝胶,放置至少 1h 使凝胶聚合完全。然后置于垂直凝胶电泳仪预电泳 30min。常规上样、银染及显色。本实验各组标本端粒酶活性的 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测方法,均为按照 TRAPEze ELISA 端粒酶检测试剂盒的说明进行实验设计。所有检测标本均设立阳性及阴性对照。为保证实验的准确性,共设立 3 种对照组:(1) 污染控制对照组:仅加入裂解缓冲液,排除加样及操作过程中的污染造成的假阳性结果。(2) 阴性对照组:鉴于端粒酶对温度敏感,高温下可降解灭活,故每个样本在检测前均提取 10 μ L 经 80℃ 高温灭活设立自身阴性对照组。(3) 阳性对照组:同时设立端粒酶阳性细胞(1000 个)和端粒酶寡核苷酸(均为试剂盒中提供)两种阳性对照。

统计学分析:采用 SPSS 14.0 统计软件包中单因素方差分析进行处理并进行两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 IFN- α 2b 对细胞端粒酶活性的影响

IFN- α 2b (kU/L)	t/h	端粒酶活性 $\bar{x} \pm s, \Delta A$	t 值	P 值
0	72	0.896 \pm 0.093		
5	72	0.908 \pm 0.006	0.22	>0.05
50	72	0.863 \pm 0.018	0.69	>0.05
500	72	0.485 \pm 0.013	2.54	<0.01
5000	0	0.916 \pm 0.038		
	12	0.833 \pm 0.065	0.13	>0.05
	24	0.827 \pm 0.093	0.98	>0.05
	48	0.564 \pm 0.067	4.54	<0.01
	72	0.221 \pm 0.067	26.67	<0.01
	96	0.155 \pm 0.074	35.98	<0.01
50000	72	0.181 \pm 0.010	26.98	<0.01

2 结果

2.1 PCR-ELISA 用不同浓度的 IFN- α 2b 依次处理同样数量的脉络膜黑色素瘤细胞后,其端粒酶活性随着药物浓度的增大而逐渐下降,在药物浓度达到 50kU/L 时,即可看到端粒酶活性开始大幅度下降,达到 500 kU/L 时其活性与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$,表 1)。而用 5000kU/L 的相同浓度处理细胞后,可以看到随着药物作用时间的延长,细胞端粒酶的活性也逐渐降低,在 24h 即可出现端粒酶活性的抑制,48h 与对照组有显著性差异($P < 0.01$,表 1)。但 IFN- α 2b 在最大浓度及最大作用时间均不能使端粒酶活性完全消失。但与对照组相比表明,在不同浓度的 IFN- α 2b 及其不同作用时间梯度中的端粒酶活性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 PCR-PAGE 端粒酶活性按照待测组和污染控制对照组吸光度值之差 ΔA 计算。经 PCR 后电泳可产生 36bp 的内标带。此带在每条泳道中均应出现。端粒酶阳性对照和端粒酶阳性的样本 TRAP 产物行电泳后均显示为 4 条以上从 50bp 开始的,相隔 6bp 的梯形条带以及下方一条 36bp 的内标带,条带越多,端粒酶活性越强。阴性对照和端粒酶阴性的标本只见到 36bp 的内标带或梯形条带少于 4 条。结果显示,表示端粒酶活性的显色条带,随着 IFN- α 2b 的浓度增加及作用时间的延长越来越少。在浓度达到 50kU/L 后,条带数量明显下降,5000kU/L 及 50000kU/L 浓度下的条带均少于 4 条。而在时间梯度组,当作用时间达到 24h 后显色条带开始逐渐减少,48h 后活性明显下降,而 72 及 96h 显色条带均少于 4 条。表明其端粒酶活性已经很低(图 1 A,B)。

3 讨论

端粒酶作为绝大多数恶性肿瘤的标记物,已在绝大多数恶性肿瘤中检测到高度表达^[1],而大多数正常组织中缺乏,使得从抑制端粒酶活性入手,开创新的抗肿瘤疗法成为可能,并有望为恶性肿瘤的治疗寻找到新的突破口。研究表明,去除端粒酶的活性,癌细胞的端粒将逐渐缩短并失去其无限增殖能力^[2,3]。脉络膜黑色素瘤是成年人最常见的眼内恶性肿瘤,由脉络膜内黑色素细胞或色素痣恶变而来。因其恶性度高,疗效差,目前仍有 40%~50% 的死亡率^[4],故探索新的、有效的治疗方法,一直是其研究的热点。我们的研究已表明,93.3% 的葡萄膜黑色素瘤中端粒酶呈高表达,故抑制其端粒酶活性,有可能为葡萄膜黑色素瘤的治疗寻求新的方法。近年来的研究表明,IFN- α 2b 具有降低端粒酶活性的作用,成为一种新型的端粒酶

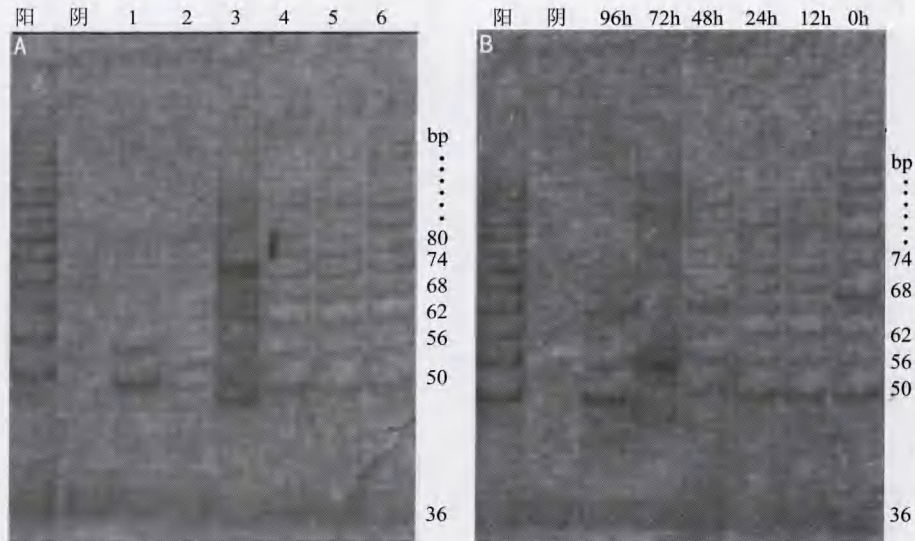


图1 IFN- α 2b对端粒酶的影响 A:干扰素浓度50000,5000,500,50,5,0kU/L;B:作用时间

抑制剂,也为其抗肿瘤作用的原理增加了新的佐证。我们发现,葡萄膜黑色素瘤细胞的端粒酶活性随着IFN- α 2b的药物浓度的增加而逐渐降低,在50kU/L的浓度之前,端粒酶活性仅略微下降,而达到500kU/L后即出现显著的下降趋势,5000kU/L之后即维持在低水平。与此同时,我们在研究中发现,细胞在IFN- α 2b浓度达到500kU/L之后即出现大量死亡,但细胞端粒酶活性的明显降低出现在50kU/L的浓度点上,表明端粒酶活性的下降先于细胞的死亡,细胞端粒酶活性的降低有可能是细胞死亡的原因。在5000kU/L的固定浓度时,随着作用时间的延长,其端粒酶活性及细胞抑制率出现与浓度梯度相似的变化,端粒酶活性在24h出现明显下降,在72h其下降趋势逐渐趋缓,其活性维持在低水平,但两种方法均未能使端粒酶活性完全消失。从凝胶电泳的图象可以看出,随着药物浓度及作用时间的增加,端粒酶的显影条带越来越少,在浓度达到50kU/L以上及时间达到24h后,端粒酶活性条带均降低到4条以下,清楚地显示出其抑制作用。降低端粒酶活性的机制,目前尚不十分清楚,但可能与其能影响端粒酶的催化亚基—端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)及*c-Myc*基因有关。研究表明,*c-Myc*基因的高表达对hTERT的表达有至关重要的影响^[5,6],而hTERT的高表达又可引起端粒酶活性的增高。Wang等^[7]用反转录病毒将*c-Myc*基因转至人上皮细胞中,结果发现其hTERT水平增高了50倍。而Akiyama等^[8]及孟志强等^[9]发现,IFN- α 2b可有效降低Daudi细胞中及肝癌细胞*c-Myc*基因的水平,因此,IFN- α 2b降低葡萄膜黑色素瘤细胞的端粒酶活性很可能是通过*c-Myc*-hTERT-端粒酶这样一个作用轴来完成。最近人hTERT的结构和hTERT基因已被识别^[10,11],发现在hTERT基因5'端的部分启动子编码中包含有数个*c-Myc*蛋白联结的位点(E-Box),转染表达*c-Myc*的质粒后,hTERT的表达大大提高,而端粒酶活性也升高,这说明hTERT基因是*c-Myc*转录的目标^[12]。但干扰素对癌细胞的作用机制很复杂,细胞表面存在着干扰素的受体,干扰素通过与受体结合,对多种细胞因子产生调节作用,包括生长因子、蛋白激酶和酪氨酸激酶、信号传递过程及诱导分化等,且有文献报道IFN- α 2b对细胞周期也有影响,因此亦可能存在另外的机制。

IFN- α 2b是由白细胞产生的具有抗增殖活性的细胞因子,是肿瘤生物治疗中重要的免疫调节剂。目前利用基因工程重组的人干扰素已广泛应用于病毒性疾病和恶性肿瘤的治疗中。近年来已陆续有研究从其降低端粒酶的角度来剖析其对全身恶性肿瘤的治疗作用及作用机制。本研究表明,IFN- α 2b作为一种端粒酶抑制剂,可有效降低脉络膜黑色素瘤细胞端粒酶活性,从而抑制肿瘤细胞的生长,有望为脉络膜黑色素瘤的临床化疗提供更多的理论依据和思路。

参考文献

- 1 张帆,吴晓梅. 眼睑皮肤恶性黑色素瘤早期检测进展. 国际眼科杂志 2007;7(2):493-495
- 2 Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, *et al*. Antisense telomerase treatment; induction of two distinct pathway apoptosis and differentiation. *FASEB* 1998;12(10):801-811
- 3 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem* 1997;43(5):708-714
- 4 吴中耀. 现代眼肿瘤眼眶病学. 北京:人民军医出版社 2002; 204-241
- 5 钱劫靖,金洁. 干扰素 α 联合高三尖杉酯碱下调K562细胞端粒酶逆转录酶及端粒酶活性诱导细胞凋亡. 中国病理生理杂志 2006;22(9):1747-1750
- 6 Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT; organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Mol Genet* 1999;8(1):137-142
- 7 Wang J, Xie LY, Allan S, *et al*. Myc activates telomerase. *Gene Dev* 1998;12(12):1769-1774
- 8 Akiyama M, Iwase S, Horiguchi-Yamada J, *et al*. Interferon-alpha repressed telomerase along with G1-accumulation of Daudi cells. *Cancer Letters* 1999; 142(1):23-30
- 9 孟志强,吴红梅,陈震. 干扰素对肝癌细胞端粒酶活性及*c-Myc*蛋白的影响. 上海医学 2001;24(3):137-139
- 10 Horikawa I, Cable PL, Afshari C, *et al*. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* 1999;59(4):826-830
- 11 Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, *et al*. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of *c-Myc* but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 1999;18(5):1219-1226
- 12 Wu KJ, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by *c-Myc*. *Nat Genet* 1999;21(2):220-224