DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.001

IFN-α 逆转白血病细胞耐药性的实验研究

论著

张 勇* 张翼军 夏顺中 周成康 (第三军医大学附属西南医院血液科) 重庆, 400038

提 要 目的: 了解干扰素-α(IFN-α)逆转白血病细胞多药耐药性(MDR)的作用和可能机制。方法: 采用链亲和素-胶体金原位杂交(SAG-ISH)检测了 IFN-α 孵育前后的 52例白血病患者骨髓细胞的多药耐药基因(MDR_1)表达,用荧光分光光度法测定了 IFN-α 孵育前后的 52例骨髓细胞内柔红霉素(DNR)浓度。结果: 全部 52例患者中 24例(46.2%) MDR_1 阳性,初治组与复发难治组相比相差显著。MDR_1 阳性者骨髓细胞内柔红霉素浓度与阴性者相差显著。IFN-α 孵育后的 MDR_1 阳性率与孵育前相差不显著,但经 IFN-α 孵育前后的 MDR_1 阳性者的骨髓细胞内 DNR浓度相差显著,阴性者亦然。结论: IFN-α 能增加白血病细胞内 DNR浓度,其逆转 MDR环节不在 MDR_1 基因水平上,而在其他耐药途径上。

关键词 白血病;干扰素类I 型;药物耐受性
中图法分类号 R733.7

目前治疗急性白血病(Acute leukemia, AL)的主要方法为化疗,而化疗成功的主要障碍之一是白血病细胞对化疗药物的多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)。国内外不少学者用 RT-PCR Northern杂交、Slot杂交等方法检测白血病多药耐药基因(MDR_1),并用不同的逆转剂研究其逆转 MDR的效果和机制,但选择 SAG-ISH检测 MDR_1 和 IFN-α 为逆转剂的报道不多。本实验采用光敏生物素(Ag)标记 MDR_1 cDNA探针,以链亲和素(Ab)-胶体金为检测系统行白血病单个核细胞原位杂交,用荧光分光光度法测定其胞内柔红霉素(Daunorubicin, DNR),体外研究了 52例白血病患者 MDR_1 mRNA的表达,用 IFN-α 作逆转剂对其逆转 MDR的可能性和机制进行了实验探讨。

1 材料与方法

1.1 病例

1995年 5月至 1997年 2月我院住院治疗的急性白血病 50例和慢性粒细胞白血病急变 2例。其中急性髓细胞白血病(Actue myeloid leukemia, AML) 30例,急性淋巴细胞白血病(Acute lymphoblast leukemia, ALL) 20例,初治组(入院前未治者) 17例,复发难治组(正规化疗 2疗程不缓解,慢性急变,MDS转化的 AL为难治者,复发者标准参照文献[1]) 19例。男性 33例,女性 17例,年龄 8~73岁,中位数 42岁。全部病例采用国内的白血病诊断和疗效标准[1]。

1.2 主要试剂

MDR_1 cDNA(157 bp)探针,光敏生物素及链亲和素-胶体金(均由军科院附属 307医院提供); IFN-α(8×10^5 U/支,深圳科兴生物制品有限公司提供); DNR(20 mg/支,意大利爱宝大药厂生产); 10× PBA; 1× PBS-DEPC液;洗I 液;洗II 液;显影液 A;显影液 B;对苯二酚;固定液;打孔液;封闭液; RPMI 1640液;小牛血清(20%);三氯乙酸(30%);淋巴细胞分离液。

1.3 主要仪器

离心涂片机; CO_2 孵箱;超声破碎仪;荧光分光光度仪。

1.4 原位杂交

参照文献[2]的方法。INF-α 对 MDR_1 的逆转: ① 标本选择: 抽取 52例患者骨髓 1 ml置于无菌肝素抗凝瓶中,淋巴细胞分离液密度梯度离心,制备单个核细胞,孵育 24 h后,再用淋巴细胞分离液离心,将单个核细胞经 1640漂洗离心 2次,然后甩片置于 -20℃密闭保存备用。② 选择 ISH-SAG所测 MDR_1(+)的 24例患者的标本,用前述相同方法再行原位杂交。

1.5 胞内 DNR浓度测定[3]

1.5.1 MDR阳性及阴性的细胞胞内 DNR浓度测定 将 52例骨髓细胞制备成单个核细胞,加入等量 RPMI 1640稀释,37℃水浴振荡后加入 DNR,使终浓度为 2 μg/ml,孵育 150 min,冰浴或冷 PBS 1 ml终止代谢,离心弃上清,细胞重复用冷 PBS洗 2遍,然后用 PBS重新悬浮,细胞液置 -30℃冰冻保存至测定。测前先溶化,然后用超声破碎仪(100 W, 30 s)破碎细胞,上清在 475/590 nm(狭缝各 15 nm)条件下测荧光强度。

1.5.2 IFN-α 作用后细胞胞内 DNR浓度测定 将 52例骨髓细胞制备成单个核细胞,加入等量 RPMI 1640稀释,加入 IFN-α 500 U/ml孵育 24 h,方法同前再测定其荧光强度。

1.5.3 空白设置 以不含 DNR的相同成分为空白。

1.6 统计学处理

采用 χ^2 检验(四格表确切概率法)和 t 检验。

2 结果

2.1 白血病 MDR_1 基因表达

2.1.1 白血病骨髓单个核细胞 MDR_1 基因表达 52例白血病中有 24例 MDR_1(+), 24/52= 46.2%,其中初治组 8/17

* 张 勇,男,31岁,主治医师,讲师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

= 47.1% ,复发难治组 15/19= 78.9% ,复发难治组与初治组相比相差显著($P < 0.05$)。AML和 ALL两组 MDR_1阳性检出率差异无显著性($P > 0.05$)。

2.1.2 IFN-α作用后白血病骨髓单个核细胞 MDR_1基因表达 IFN-α 500 U/ml与白血病患者骨髓单个核细胞孵育 24 h后, MDR_1阳性 24例中有 19例仍为阳性,5例转阴,阴转率 5/24= 20.8% ,孵育后 MDR_1阳性率下降为 19/52= 36.5% ,与孵育前相比差异无显著性($P > 0.05$)。初治组和复发难治组孵育前后分别比较差异也不显著($P > 0.05$), IFN-α孵育前后 SAG-ISH检测白血病 MDR_1表达,见表 1。

表 1 IFN-α 孵育前后用 SAG-ISH检测的白血病 MDR_1基因的表达

Tab 1 The expression of MDR_1 of leukemia by SAG-ISH before and after IFN-α incubation

Group	n	Initial diagnosed		Relapse or refractory		Complete remission	
		Before incubation	After incubation	Before incubation	After incubation	Before incubation	After incubation
ALL	20	6/10	6/10	6/8	4/8	0/2	0/2
AML	30	2/7	2/7	8/9	5/9	1/14	1/14
CGL-BP	2			1/2	1/2		
Total	52	8/17(47.1%)	8/17(47.1%)	15/19(78.9%)	10/19(52.6%)	1/16(6.3%)	1/16(6.3%)

2.2 白血病骨髓细胞胞内 DNR浓度测定

2.2.1 原理 柔红霉素具有发天然荧光的特点;体外培养条件下不引起 DNR的转化及代谢物产生。

2.2.2 标准曲线 制备含 DNR 0.1~ 400.0 ng/ml系列浓度梯度,加入 RPMI 1640和 30%三氯乙酸后测荧光强度,以不含 DNR的相同溶液为空白,发现从 10.0~ 400.0 ng/ml显示良好线性。

回归方程: $y = 2.1705 + 0.0540x$

$r = 0.9980$, $P < 0.01$,检测低限为 2.0 ng/ml

2.3 MDR阴性与阳性的骨髓单个核细胞胞内 DNR浓度,见表 2。

表 2 MDR_1阴性与阳性的骨髓单个核细胞胞内 DNR浓度(ρ_B/ng·ml^{-1})

Tab 2 DNR concentration of MDR_1 in positive and negative bone marrow mononuclear cell(ρ_B/ng·ml^{-1})

MDR_1	n	Before incubation	After incubation
Positive	24	153.1389	436.4722
Negative	28	460.1759	885.8333

3 讨论

多药耐药性指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时,对其他结构不同,作用靶位不同的抗肿瘤药物亦具有抗药性。1970年 Biedler和 Riehm首次描述了肿瘤细胞多药耐药性(MDR)[4],现已证明 MDR家族是由 MDR_1和 MDR_3组成,但仅 MDR_1及其基因产物起着多药耐药性的作用,而 P-glycoprotein(Pgp或 P-170)是 MDR_1基因的编码产物。它从分解 ATP获得能量,将细胞药物"泵"出体外,使其胞内药物浓度下降,从而使细胞在低药物环境中存活,即产生 MDR。近年来的研究表明, MDR除与 MDR_1基因过度表达有关外,多药耐药相关蛋白的异常表达,拓扑异构酶Ⅱ活性下降,谷胱甘肽 S-转移酶活性增高等多种因素均可能参与 MDR的产生。国内外多应用检测 MDR_1来研究 MDR及其逆转,检测 MDR_1的主要方法包括免疫组化、Northern印迹杂交、Slot印迹杂交,用非同位素 SAG-IST检测 MDR_1目前仅见于国内杜跃斌等人[2]。关于逆转到抑制 MDR的机制,国内外学者进行了不少研究。

Beksac等[5]用单抗 C129,通过免疫过氧化酶法证明异搏定(Verapamil, VRP)和环孢菌素 A(Cyclosporine A, CSA)能降低 Pgp阳性率, Paietta等[6]以 VRP及 CSA为逆转剂,用流式细胞仪检测 Rh-123溢出与 Pgp单抗 4E-16显示相同,但用定量 PCR检测 MDR_1则不被抑制,表明抑制机制可能在 Pgp活性上。Solary[7]和 Dhainau等均分别认为三氮杂苯和 VRP一样,主要是通过抑制 Pgp而具有 MDR的调制作用的。Bennis等[8]则证实 VRP能增加 azidopine与 Pgp结合,从而使化疗药物在细胞内蓄积而起逆转作用的。Wigfer等[9]认为 amiodarone、CSA、DMDP、奎尼丁是 MDR泵—— Pgp的抑制剂,而奎尼丁的环氧代谢物则是有效的泵抑制剂[10]。Sato等[11]证实金鸡纳衍生物—— MS 209与 VRP一样,并通过与 PgD的相互作用而逆转 MDR的。Gollapudi等[12]用 HL 60/AR及 HL60细胞分别作阴阳性对照,用 Cationic染色法证明 CSA作用于 Pgp,引起耐药细胞膜的去极化而产生逆转效能。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

我们的实验结果表明,MDR_1阳性与 MDR_1阴性的细胞内 DNR浓度相差显著($P < 0.05$),支持 MDR_1是通过降低细胞内 DNR浓度而最终起作用的观点,这已经得到大家的公认[5~12]。MDR_1阳性的细胞在 IFN-α作用后,其阳性率与作用前相比相差不显著($P > 0.05$),说明 IFN-α并不能逆转 MDR_1 mRNA本身,但 IFN-α作用前后的 MDR_1阳性的细胞内 DNR浓度相差显著($P < 0.05$),证明 IFN-α又具有增加耐药白血病细胞内 DNR浓度的作用,其作用的环节可能是 MDR_1以外的其它途径,有待进一步研究。IFN-α作用后的 MDR_1阴性细胞内 DNR浓度也较前明显增加,证明 IFN-α具有增加 MDR_1阴性白血病细胞内 DNR浓度的作用,从而增加白血病细胞对化疗的敏感性,因此用 IFN-α逆转白血病 MDR的机制,有进一步研究的价值及临床应用前景。

参考文献

1 张之南.血液病诊断及疗效标准.天津:天津科学技术出版社,1991. 152, 163, 190, 195

2 杜跃斌,艾辉胜,王桂林,等.链亲和素-胶体金原位杂交检测白血病多药耐药基因表达.实验血液杂志,1996, 4(3): 299

3 马建国,杨纯正,李　中,等.白血病内柔红霉素的测定.药物分析杂志,1992, 12(1): 9

4 Kaye S B. The multidrug resistance phenotype. Br J Cancer, 1988, 58(6): 691

5 Beksac M, Akan H, Koc H, *et al*. P-glycoprotein expression in refractory hematological neoplasms and circumvention of resisitance with verapamil or cyclosporine A containing protocols. Med Oncol Tumor Pharmacother, 1992, 9(2): 101

6 Paietta E, Andersen J, Racevskis J, *et al*. Modulation of multidrug resistance in de novo adult acute myeloid leukemia: Veriable efficacy of reverting agents *in vitro*. Blood Rev, 1995, 9(1): 47

7 Solary E, Velay I, Chanffert B, *et al*. Sufficient levels of quinine is the serum circumvent the multidrug resistance of the human leukemic cell line K502/ADM. J Med Chem, 1992, 35(13): 2481

8 Bennis S, Ichas F, Robert J. Differential effects of verapamil and quinine on the reversal of doxorubicin resistance in a human leukemia cell line. Int J Cancer, 1995, 62(3): 283

9 Wigfer P W, Patterson F K. Reversal agent inhibition of the multidrug resistance pump in human leukemic lymphoblasts. Biochim Biophys Acta, 1994, 1189(1): 1

10 Wigfer P W. Lyon K L, Patterson F K, *et al*. Epoxide metabolite of quinine and inhibition of the multidrug resistance pump in human leukemic lymphoblasts. Mol Pharmacol, 1994, 46(3): 562

11 Sato W, Fukazawa N, Nakanishi O, *et al*. Reversal of multidrug resistance by a novel quinoline derivative MS-209. Cancer Chemother Pharmacol, 1995, 34(4): 271

12 Gollapudi S, Gupta S. Lake of reversal of daunorubicin resistace in HL60/AR cell by cyclosporin A. Anticancer Res, 1992, 12(13): 2127

(收稿: 1998-06-27;修回: 1998-12-10)

(编辑　汪勤俭)

Reversing effects of interferon-α on drug resistance of bone marrow cells in leukemia

Zhang Yong, Zhang Yijun, Xia Shunzhong, Zhou Chengkang (Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the reversing effects of interferon α (IFN-α) on drug resistance of bone marrow cells in leukemia and its possible mechanism. Methods: Before and after the bone marrow cells extracted from 50 cases of acute leukemia and 2 of chronic leukemia were incubated in the media with the addition of IFN-α, MDR_1 mRNA expression and concentration of daunorubicin (DNR) in the cells were determined respectively with SGA-ISH and respectrofluorimetry. Results: Twenty-four (46.2%) out of all the 52 cases presented MDR_1 mRNA expression. There was significant difference in the concentration of DNR between MDR_1-positive and MDR_1-negative cases before and after incubation. In all the 52 cases, no significant difference was found between the concentration of DNR before the incubation and that after the incubation. Conclusion: IFN-α can increase the concentration of DNR in the bone marrow cells in leukemia. The occurrence of MDR reversal is not on the level of MDR_1 but on other levels.

Key words leukemia; interferon-type I ; drug resistance

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net