

干扰素对人 Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 增殖的影响及机制*

谭大为¹, 郑丹², 陈秀萍³

(1. 贵州医科大学附属白云医院 血液内科, 贵州 贵阳 550014; 2. 贵阳护理职业学院, 贵州 贵阳 550081; 3. 毕节市七星关区人民医院, 贵州 毕节 551700)

[摘要] 目的: 探讨干扰素对人 Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji 增殖的影响及机制。方法: 采用 100、500、1 000、2 000 及 5 000 U/mL 干扰素分别处理 Raji 细胞 12、24 及 48 h, 采用 CCK-8 法检测 Raji 细胞的增殖活性, 实时荧光定量 PCR 扩增(QPCR)检测各浓度干扰素处理 Raji 细胞 48 h 时 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 表达水平。结果: 各浓度干扰素对 Raji 细胞的增殖均有一定的抑制作用, 且随着干扰素浓度的增加, 其抑制作用逐渐增强, 各浓度组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 各浓度干扰素均能上调 Raji 细胞 *BZLF1* 及 *BRLF1* mRNA 表达, 且随着干扰素浓度增加, 基因的表达量增多, 各浓度组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 干扰素能抑制 Raji 细胞增殖, 且呈浓度依赖性, 其机制可能是通过上调 *BZLF1* 及 *BRLF1* 基因的表达来抑制 Raji 细胞的增殖。

[关键词] 淋巴瘤; EB 病毒; Raji 细胞; 干扰素; 增殖; 抑制; *BZLF1* 基因; *BRLF1* 基因

[中图分类号] R551.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)09-1029-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.09.008

Effect of Interferon on Proliferation of Raji Cells and Its Mechanism

TAN Dawei¹, ZHENG Dan², CHEN Xiuping³

(1. Department of Hematology, the Affiliated Baiyun Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550014, Guizhou, China; 2. Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, Guizhou, China; 3. Qixingguan Hospital, Bijie 551700, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of interferon on the proliferation and expression of *BZLF1* mRNA, *BRLF1* mRNA in Raji cells and its mechanism. **Methods:** Raji cells were cultured and treated with 100, 500, 1 000, 2 000, 5 000 U/mL interferon for 12, 24, 48 h respectively. Then the cell proliferation was tested with CCK 8 assay. The expression of *BZLF1* and *BRLF1* mRNA in Raji cells treated with interferon at various concentrations for 48 h was detected by QPCR. **Results:** At the different concentrations of 100 ~ 5 000 U/mL, interferon effectively inhibited Raji cells proliferation and its inhibitory effect was gradually enhanced with the increase of interferon concentration, the difference between groups with different concentrations was statistically significant ($P < 0.05$). All the selected interferon concentrations increased the expression of *BZLF1* mRNA, *BRLF1* mRNA in a dose-dependent manner. The expression of genes increased with the increasing of interferon concentration, and the difference between the groups with different concentrations was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Interferon can inhibit proliferation by upregulating the expression of *BZLF1* mRNA and *BRLF1* mRNA in Raji cells.

[Key words] lymphoma; EB virus; Raji cells; interferon; proliferation; inhibition; *BZLF1* gene; *BRLF1* gene

*[基金项目] 贵州省科学技术厅基金[黔科合 LH 字(2015)7398]

网络出版时间: 2019-09-16 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190916.2137.008.html>

淋巴瘤是起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤,发病原因不明,通常认为与病毒感染有直接关系,最为常见是 EB 病毒(EBV)感染^[1]。研究表明,EBV 感染与淋巴瘤的关系密切^[1-2],EBV 感染相关淋巴瘤主要包括 Burkitt 淋巴瘤、B 细胞增殖性疾病、霍奇金淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤等^[3-5]。现行淋巴瘤的治疗方案仍然以化疗为主^[4]。临床上 EBV 阳性与 EBV 阴性淋巴瘤的治疗和预后有较大的区别^[5],研究发现,通过常规化疗,85% 的 EBV 阴性淋巴瘤病例可达到 5 年无病生存,EBV 阳性淋巴瘤病例中可达到 5 年无病生存的病例仅为 60%^[6-9],提示 EBV 阳性淋巴瘤患者的治疗较为困难。在常规化疗过程中联合抗病毒治疗 EBV,以期达到更好的疗效及预后,是探寻 EBV 阳性淋巴瘤治疗方案的一个研究方向。干扰素是广谱抗病毒药,对 EBV 感染有一定的治疗作用^[10-11]。本研究采用干扰素处理 EBV 阳性人 Burkitt's 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞,观察其对 Raji 细胞增殖的影响及可能机制,为 EBV 阳性淋巴瘤的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人 Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji(编号 TCHu 44)购于上海中国科学院细胞库,RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司产品,CCK8 试剂盒购自美国 Sigma 公司产品,干扰素购自北京三元基因工程有限公司生产(母液为 3 000 000 U/mL);反转录试剂盒购自日本 takara 公司产品,RT 试剂、QPCR 试剂、sybr green I 购自重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司,*BRLF1*、*BZLF1* 引物由重庆威斯腾生物医药科技有限责任公司合成。*BRLF1* 引物序列:上游为 GAAGAAACCAGTCAGGCCGT,下游为 TGTTGTGGTCAGTTCGTCCA,产物大小为 141 bp。*BZLF1* 引物序列:上游为 GGGGCTAACCAAGGA-CAACA,下游为 ATTCCTCCAGCGATTCTGGC,产物大小为 112 bp。内对照 *GAPDH* 引物序列:上游为 AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG,下游为 GGCAGAGATGATGACCCTTTT,产物大小为 130 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Raji 细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养,1~2 d 换液 1 次,取对数生长期细胞用于后续

研究。

1.2.2 细胞处理 取对数生长期 Raji 细胞,分别用 100、500、1 000、2 000 及 5 000 U/mL 干扰素处理 12、24 及 48 h,分别检测细胞增殖活性。根据结果选择最佳检测时间,收集细胞,提取 DNA,检测其 *BZLF1*、*BRLF1* 基因的表达水平。研究设立对照,Raji 细胞不用干扰素处理。

1.2.3 细胞增殖活性 采用 CCK-8 法,分别取不同浓度干扰素处理 12、24 及 48 h 的 Raji 细胞,加入 CCK-8 溶液 10 μL,继续孵育 4 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值(*OD*₄₅₀)。计算细胞活力及抑制率:细胞活力(%)=[(实验组 *OD*₄₅₀ - 空白组 *OD*₄₅₀)/(对照组 *OD*₄₅₀ - 空白组 *OD*₄₅₀)]×100%,细胞抑制率(%)=(对照组 *OD*₄₅₀ - 实验组 *OD*₄₅₀)/(对照组 *OD*₄₅₀)。

1.2.4 *BZLF1* 及 *BRLF1* mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR (QPCR)检测,(1)cDNA 合成:收集不同浓度干扰素处理 48 h 的 Raji 细胞,Trizol 提取总 RNA,配制 10 μL 反应液[包括 Random 6mers (50 μmol/L) 1 μL、dNTP mixture (10 mmol/L) 1 μL、总 RNA 5 μL 及 ddH₂O 3 μL]进行反转录,先将反应液在 65 ℃ 保温 5 min 后冰上迅速冷却,配制反转录体系,包括变性后反应液 10 μL、5×PrimeScript 2 Buffer 4 μL、40 U/μL RNase Inhibitor 0.5 μL、200 U/μL PrimeScript 2 RTase 1 μL、ddH₂O 补足体积至 20 μL;反应条件为 30 ℃ 10 min、42 ℃ 60 min、95 ℃ 5 min,冰上冷却。(2)QPCR 扩增反应体系:2×PowerUp SYBR Green Master Mix 5 μL、*BZLF1* 或 *BRLF1* 基因上下游引物各 0.5 μL、反转率产物 1 μL、ddH₂O 补足体积至 10 μL,反应条件为 50 ℃ 预变性 2 min、95 ℃ 变性 2 min、60 ℃ 退火 1 min、95 ℃ 延伸 15 s、40 次循环。

1.3 统计学方法

数据用 SPSS 17.0 软件处理,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用配对 *t* 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Raji 细胞增殖活性

CCK-8 法结果显示,100、500、1 000、2 000 及 5 000 U/mL 干扰素分别处理 Raji 细胞 12、24 及 48 h 后,5 个浓度的干扰素对 Raji 细胞增殖均有

一定抑制作用,且随着浓度增加及作用时间延长,抑制作用增强,各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

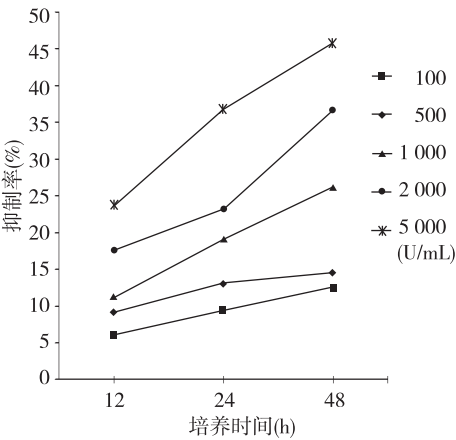


图 1 不同浓度干扰素对 Raji 细胞增殖的影响
Fig. 1 Interferon inhibit proliferation of Raji cells

2.2 Raji 细胞 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 的表达
根据 CCK-8 的实验结果,选择干扰素处理 Raji

细胞 48 h 后检测细胞 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 表达水平。*BZLF1*、*BRLF1* QPCR 结果显示,其 CT 值为单一曲线,其溶解曲线为单一峰值,说明结果可信;统计结果显示,不同浓度干扰素分别处理 Raji 细胞 48 h 后,Raji 细胞 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 的表达水平均显著上调,且随着药物浓度的增加而增加,各组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

表 1 干扰素抑制 Raji 细胞增殖
Tab. 1 Interferon inhibit proliferation of Raji cells

组别	抑制率(%)		
	12 h	24 h	48 h
对照组	0.00 ⁽¹⁾	0.00 ⁽¹⁾	0.00 ⁽¹⁾
干扰素组(U/mL)			
100	6.06 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽²⁾	9.39 ± 0.16 ⁽¹⁾⁽²⁾	12.49 ± 0.23 ⁽¹⁾⁽²⁾
500	9.21 ± 0.56 ⁽¹⁾⁽²⁾	13.10 ± 0.53 ⁽¹⁾⁽²⁾	14.52 ± 0.20 ⁽¹⁾⁽²⁾
1 000	11.24 ± 0.95 ⁽¹⁾⁽²⁾	19.12 ± 0.44 ⁽¹⁾⁽²⁾	26.24 ± 0.58 ⁽¹⁾⁽²⁾
2 000	17.64 ± 0.04 ⁽¹⁾⁽²⁾	23.29 ± 0.49 ⁽¹⁾⁽²⁾	36.76 ± 0.20 ⁽¹⁾⁽²⁾
5 000	23.78 ± 0.91 ⁽¹⁾⁽²⁾	36.78 ± 0.54 ⁽¹⁾⁽²⁾	45.83 ± 0.52 ⁽¹⁾⁽²⁾

注: ⁽¹⁾ 与对应时间点其他浓度组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与相同浓度其他时间点比较, $P < 0.05$ 。

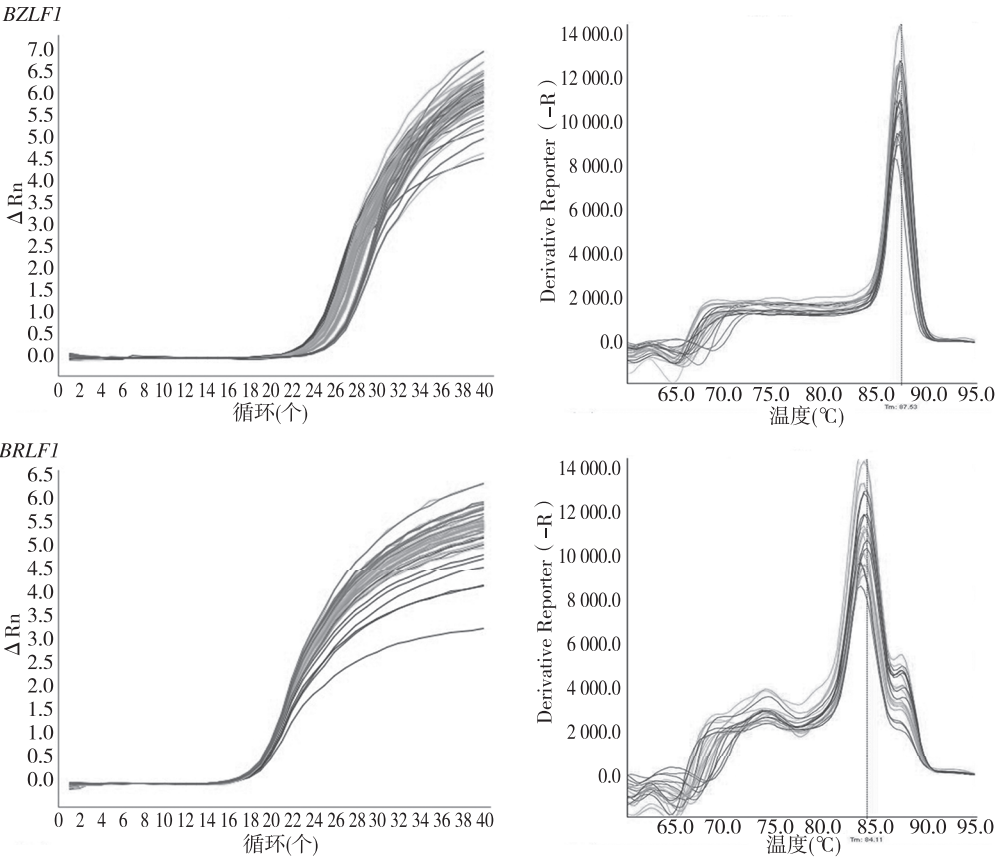


图 2 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 表达 QPCR 结果及溶解曲线
Fig. 2 QPCR results and dissolution curves of *BZLF1* and *BRLF1* mRNA expression

表2 干扰素上调 Raji 细胞 *BZLF1* 及 *BRLF1* mRNA 表达

Tab.2 Interferon upregulate the expression of *BZLF1* mRNA and *BRLF1* mRNA in Raji cells

组别	<i>BZLF1</i> mRNA	<i>BRLF1</i> mRNA
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
干扰素组 (U/mL)		
100	1.28 ± 0.13 ⁽¹⁾	1.26 ± 0.12 ⁽¹⁾⁽²⁾
500	1.49 ± 0.03 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.42 ± 0.06 ⁽¹⁾⁽²⁾
1 000	1.81 ± 0.10 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	1.62 ± 0.09 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
2 000	2.08 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾	2.03 ± 0.11 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾
5 000	2.76 ± 0.06 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾	2.57 ± 0.17 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

注: ⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 100 U/mL 干扰素组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾ 与 500 U/mL 干扰素组比较, $P < 0.05$; ⁽⁴⁾ 与 1 000 U/mL 干扰素组比较, $P < 0.05$; ⁽⁵⁾ 与 2 000 U/mL 干扰素组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

大量研究结果表明,EBV 与多种人类肿瘤疾病有关,如传染性单核细胞增多症、淋巴瘤、鼻咽癌等^[12-15]。有文献报道,EBV 阳性的淋巴瘤患者较 EBV 阴性的淋巴瘤患者预后差^[16-19],因此,去除 EBV 感染的 B 细胞是目前预防和治疗 EBV 相关淋巴瘤的一大策略。EBV 感染人体包括潜伏感染或增殖感染两种形式,其中以潜伏感染最为常见,EBV 感染者中 90% 以上的人终身潜伏感染^[20-22]。EBV 感染首选的治疗方法是抗病毒治疗。目前常用的抗病毒药物主要是阿昔洛韦和更昔洛韦等嘌呤核苷类似物。这些药物进入细胞后需要在病毒编码的激酶作用下三磷酸化,形成有活性的形式。但是,EBV 潜伏感染的淋巴瘤细胞不表达病毒编码的激酶,因此这类抗病毒药物不能取得很好的治疗效果。所以治疗 EBV 阳性淋巴瘤中的 EBV 需要诱导 EBV 从潜伏感染转化为增殖感染^[23-24]。EBV 潜伏感染时,基因组环化成游离体并持续存在于细胞内,宿主细胞基因复制时,病毒基因也随之复制,病毒此时只表达一部分基因。EBV 增殖感染时,基因组是线性的,表达大量的病毒结构基因和调节基因,如 *BZLF1*、*BRLF1* 等,复制出新的病毒,并感染新的宿主细胞。*BZLF1*、*BRLF1* 是 EBV 的即早基因,EBV 进入增殖感染的起始很大程度上依赖于 *BZLF1*、*BRLF1* 两个基因的表达。干扰素具有抗病毒、抑制细胞增殖、调节免疫及抗肿瘤作用,广泛用于治疗恶性肿瘤、急慢性丙型病毒性肝

1032

炎、慢性活动性乙型肝炎、肝纤维化(早期肝硬化)、感染与损伤性疾病、骨髓增生异常综合症、病毒性疾病、系统性硬皮病、异位性皮炎、风湿性关节炎等;在 EBV 感染中,亦有较好的治疗效果^[25-28]。但干扰素临床用于淋巴瘤的治疗目前存在争议。本研究采用不同浓度干扰素作用 Raji 细胞,于不同时间点观测其对 Raji 细胞增殖的影响,结果表明干扰素 100 U/mL 作用 12 h 即可抑制 Raji 细胞的增殖,且随着干扰素浓度的增加及作用时间延长,抑制作用增强,干扰素作用 12、24、48 h 的 IC_{50} 分别为 10 346.6、6 726.2、4 991.7 U/mL。另外,干扰素 100 ~ 5 000 U/mL 的浓度均能上调 Raji 细胞 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 的表达。而 *BZLF1*、*BRLF1* 是诱导 EBV 进入增殖感染的始动基因,EBV 进入增殖感染,能够激发宿主免疫系统来杀伤 EBV 和被感染的细胞。

综上所述,本研究发现干扰素能够有效地抑制 Raji 细胞增殖,并且通过上调 *BZLF1*、*BRLF1* mRNA 的表达诱导其进入增殖感染,这为干扰素临床应用于淋巴瘤的治疗,特别是 EBV 阳性淋巴瘤的治疗提供了实验依据,从而为淋巴瘤临床治疗提供了新的治疗方案。

4 参考文献

[1] 周静,肖毅. EB 病毒与其相关淋巴瘤的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2018,26(1):292-295.

[2] 巴音,韩艳秋. EB 病毒感染相关淋巴瘤的研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2018,31(2):240-244.

[3] 郭丹,陈兵. EB 病毒感染相关血液病发病机制的研究进展[J]. 临床血液学杂志, 2018,31(2):231-235.

[4] WU L, EHLIN-HENRIKSSON B, ZHOU X, et al. Epstein-Barr virus (EBV) provides survival factors to EBV⁺ diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) lines and modulates cytokine induced specific chemotaxis in EBV⁺ DLBCL[J]. Immunology, 2017, 152(4):562-573.

[5] CHEN Z H, LIU W P, ZHAO S. Systemic EBV-positive T-cell lymphoma of childhood mimicking anaplastic large cell lymphoma[J]. British Journal of Haematology, 2019,185(6):1016.

[6] KAYMAZ Y, ODUOR CI, YU H, et al. Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic Burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences[J]. Mol Cancer Res, 2017,15(5):563-576.

[7] CROMBIE J L, LACASCE A S. Epstein barr virus associ-

- ated B-Cell lymphomas and iatrogenic lymphoproliferative disorders[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019,9 :109.
- [8] 魏华萍. EB 病毒感染对 R-CHOP 治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤影响的 Meta 分析[J]. *中国临床新医学*, 2018,11(9):884-888.
- [9] 魏天南,尚晋. 初诊时 EB 病毒阳性淋巴瘤 46 例临床分析[J]. *中国现代医生*, 2018,56(33):87-90.
- [10] 李海峰. 干扰素治疗小儿 EB 病毒感染分子水平研究[J]. *吉林医学*, 2016,37(6):1370-1372.
- [11] 戴欣,黄文祥. 原发 EB 病毒感染诊治进展[J]. *现代临床医学*, 2015,41(2):103-106.
- [12] 孙畅,路顺,郎锦义. EB 病毒感染与鼻咽癌诊治的研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2018,31(5):352-357.
- [13] 赵凌丽. 传染性单核细胞增多症异型淋巴细胞数量与 EB 病毒浓度的关系[J]. *中国医药指南*, 2019,17(11):153-154.
- [14] 吴文蓉. EB 病毒抗体检测对传染性单核细胞增多症的临床诊断意义[J]. *当代医学*, 2019,25(1):52-54.
- [15] 曾艳,刘瑜. 不同类型淋巴瘤患者的外周血 EB 病毒检测价值[J]. *中国当代医药*, 2019,26(8):81-83.
- [16] 王巧合,胡鹏. 29 例成人 EB 病毒感染不同预后的临床特征分析比较[J]. *重庆医科大学学报*, 2017,42(7):803-807.
- [17] 刘琳,高子芬,李敏,等. EB 病毒阳性的胃弥漫大 B 细胞淋巴瘤特点及预后[J]. *中国肿瘤临床*, 2016,43(6):255-259.
- [18] 刘文硕,南飞飞,贾思思,等. 结外 NK/T 细胞淋巴瘤检测 EB 病毒与疗效关系的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2015,42(2):105-108.
- [19] 叶云霞,张文燕,李甘地,等. 中国西南地区老年人 EB 病毒阳性弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床病理特点及预后分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014,45(4):652-657.
- [20] 陈少红,叶子茵,杨静,等. EB 病毒在老年性 EBV 阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的潜伏感染类型[J]. *热带医学杂志*, 2016,16(6):725-727;748.
- [21] 林建生,赖辉添,黄安清,等. 间接免疫荧光方法研究 EB 病毒感染类型与免疫功能关系[J]. *当代医学*, 2019,25(14):26-28.
- [22] 周志平,陈威巍,汤勃,等. EB 病毒感染及其相关性疾病[J]. *传染病信息*, 2013,26(1):57-60.
- [23] 李蒲,李源,肖承京,等. 小白菊内酯对人淋巴瘤 Raji 细胞增殖的影响及机制探讨[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017,17(54):3-5.
- [24] 李崑,罗湘建,胡哲煜,等. EBV 裂解复制周期调控机制研究新进展[J]. *病毒学报*, 2011,27(6):619-623.
- [25] 唐凌. 重组人干扰素 $\alpha 1b$ 雾化治疗新生儿病毒性肺炎的疗效观察[J]. *检验医学与临床*, 2017,14(2):239-242.
- [26] 张萍萍,刘钢. 干扰素在中枢神经系统感染疾病中的应用研究进展[J]. *医学综述*, 2016,22(13):2530-2533.
- [27] 王坤,朱传龙. 干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效预测因素的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2015,35(6):1157-1163.
- [28] 李海峰. 干扰素治疗小儿 EB 病毒感染分子水平研究[J]. *吉林医学*, 2016,37(6):1370-1372.

(2019-06-08 收稿,2019-08-19 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 冉海勇