

抗 CXCR₄ 单克隆抗体对与正常骨髓基质细胞共培养的 HL-60 细胞增殖活性的影响 *

魏 立 孔佩艳 陈幸华 彭贤贵 曾东风 常 城 杨文博 刘 红
刘 林 王庆余 张 怡
第三军医大学附属新桥医院血液科 (重庆市 400037)

摘要 目的:本文通过抗 CXCR₄ 单克隆抗体 12G5 阻断 SDF-1 活性,检测增殖相关指标,探讨 SDF-1 在维持 HL-60 细胞存活、增殖中的作用。方法:培养 HL-60 细胞并与正常骨髓基质细胞共培养,采用 12G5(10 μ g/ml)阻断 SDF-1 生物学活性。孵育 24h 后,通过流式细胞仪观察 HL-60 细胞增殖周期的变化,免疫组化染色检测其 PCNA 蛋白表达的变化,并通过台盼蓝拒染观察白血病细胞存活、增殖的变化。结果:1)实验组中 G₀/G₁ 期细胞比例为 (56.71 $\pm$ 4.9)%,S 期为 (32.42 $\pm$ 4.1)%,G₂/M 期为 (10.87 $\pm$ 5.2)%;对照组中 G₀/G₁ 期细胞比例为 (43.63 $\pm$ 2.2)%,S 期为 (45.86 $\pm$ 3.7)%,G₂/M 期为 (10.51 $\pm$ 2.6)%。2)台盼蓝拒染显示,12G5 抑制 HL-60 细胞的存活及增殖。3)免疫组化染色结果显示,实验组及对照组中 PCNA 阳性细胞率分别为 (42.1 $\pm$ 3.9)%和 (67.4 $\pm$ 8.5)%。结论:SDF-1 可在一定程度上维持 HL-60 细胞的存活及增殖进程。

关键词 SDF-1/CXCR₄ 单克隆抗体 基质细胞 骨髓 细胞增殖

中图分类号:R733.7 Q813.1+1 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2004)19-1084-04

Effects of Anti-CXCR₄ Monoclonal Antibody on Proliferation of Human Acute Myelocytic Leukemia Cell Line HL-60 Co-Cultured with Normal Bone Marrow Stromal Cells

Wei Li Kong Pei-yan Chen Xinghua et al

Department of Hematology, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing

Abstract Objective: To study the effect of SDF-1 in proliferation of acute myelocytic leukemia cells HL-60, the correlated index was analyzed when SDF-1 activity was blocked by anti-CXCR₄ monoclonal antibody 12G5. **Methods:** HL-60 cells were cultured and co-cultured with normal stromal cells. 24h after incubation with 12G5 (10 μ g/ml), cell cycle and PCNA expressions were detected with flow cytometry and immunohistochemical technique, respectively. By means of typan blue exclusion, cell survival rates were observed and growth curve was protracted. **Results:** The results were as follows: 1) cell cycle in two groups were: experiment group G₀/G₁ (56.71 $\pm$ 4.9)%, S (32.42 $\pm$ 4.1)%, G₂/M (10.87 $\pm$ 5.2)%, control group G₀/G₁ (43.63 $\pm$ 2.2)%, S (45.86 $\pm$ 3.7)%, G₂/M (10.51 $\pm$ 2.6)%, t-test analysis showed that 12G5 induced more cells entering G₀/G₁ phase. 2) survival rates of HL-60 cells decreased markedly compared to control group, and cell proliferation slow down. 3) immunohistochemical technique shown: PCNA positive rates in experiment group and control group were (42.1 $\pm$ 3.9)% and (67.4 $\pm$ 8.5)% respectively, t-test analysis showed that 12G5 down-regulated PCNA expressions. **Conclusion:** SDF-1 can keep survival and proliferation course of HL-60 cell at certain level.

Key words SDF-1/CXCR₄ Monoclonal antibody Stromal cell Marrow
Cell Proliferation

* 本文课题受国家自然科学基金资助(编号:30170396)

急性白血病理化疗诱导缓解后,少数残留白血病细胞仍可在髓内存活、增殖,成为复发的重要根源,而髓内残留白血病细胞在基质支持下,维持自身的存活并进一步增殖是影响髓内残留白血病疗效的重要因素^[1,2]。骨髓基质细胞通过多种复杂的机制影响白血病细胞恶性克隆的迁移、选择、增殖、分化、凋亡及药物抵抗。近年来研究发现,骨髓基质细胞分泌的基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及其受体 CXCR₄在白血病细胞的迁移、浸润、粘附于骨髓微环境作用等方面起着重要的作用,可能参与髓内残留病变的形成^[3]。抗 CXCR₄单克隆抗体 12G5 最初应用于 HIV 感染相关研究,能特异地与靶细胞膜上的 CXCR₄结合,有效阻抑 SDF-1 诱导产生的细胞趋化效应及细胞内钙离子的增加^[4]。因此在本实验中,我们采用 12G5 阻断 SDF-1 作用,观察与正常骨髓基质细胞共培养的 HL-60 细胞的存活、增殖情况,阐明 SDF-1 在髓内白血病细胞存活、增殖方面的作用。

1 材料与方法

1.1 主要设备、试剂及标本来源

流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,FACStar plus 型,美国)、二氧化碳培养箱(SHELD-M2300 型美国)、倒置显微镜(Olympus 相差显微镜,日本),抗 CXCR₄单克隆抗体 12G5(MAB170,IgG2a)(R&D 公司,-20℃冻存),RPMI 1640(Gibco 公司),新生小牛血清(Hyclone 公司,-20℃冻存),bFGF(晶美生物试剂公司),PCNA 鼠抗人单克隆抗体、通用型 SP 试剂盒(SP9000)、DAB 显色盒均购自北京中山生物技术有限公司。5 例骨髓标本取自本科,为无骨髓转移的淋巴瘤或实体瘤患者、异基因骨髓移植供者及骨髓象正常的非白血病患者;HL-60 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 骨髓单个核细胞的分离、培养及共培养体系的建立

基质细胞的细胞培养参照文献^[5]。

共培养体系的建立:胰酶消化上述培养的基质细胞层后,以 1×10^4 /ml 转移到 12 或 24 孔培养板,继续培养至基质细胞铺满单层时加入 1×10^6 /ml HL-60 细胞共培养,培养基为含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,总体积为 2ml,共培养时间为 4 天。

1.3 实验分组

实验设对照组及实验组,对照组不加 12G5,只加入培养液。实验组中 12G5 浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$,12G5 加入时间与共培养时间相一致。每孔均设 3 个复孔,

结果取平均值。

1.4 细胞周期分析

取共培养 24h 的 HL-60 细胞用 $0.01 \text{mol}/\text{L}$ PBS 制成 1×10^6 /ml 细胞悬液,缓慢加入 2ml 70%的冷乙醇,旋涡振荡器上混合均匀,4℃固定 30min,PBS 清洗 2 次,碘化丙啶(PI)4℃标记 30min,上机检测,资料以随机软件(System 2)收集、贮存和分析。

1.5 台盼蓝排染法活细胞计数

分别收集不同时期相的 HL-60 细胞进行台盼蓝染色,血球计数板计数活细胞数,不着色及浅染者为活细胞,着色深者为死亡细胞,活细胞与细胞总数的比值为细胞存活率。以培养时间为 X 轴,细胞总数为 Y 轴,绘制细胞生长曲线。

1.6 PCNA 蛋白表达的检测

24h 后,收集对照组及实验组 HL-60 细胞,制成细胞涂片,按试剂盒说明进行 SP 法免疫组化染色。取急性淋巴细胞白血病细胞为阴性对照细胞,用 PBS 液代替一抗。阳性结果判断:PCNA 阳性细胞为细胞核染成棕褐色颗粒。随机取 200 个细胞高倍视野观察,结果以百分率表示。

1.7 统计学分析

实验结果以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 SPSS10.0 软件分析, t 检验确定差异显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示无显著差异。

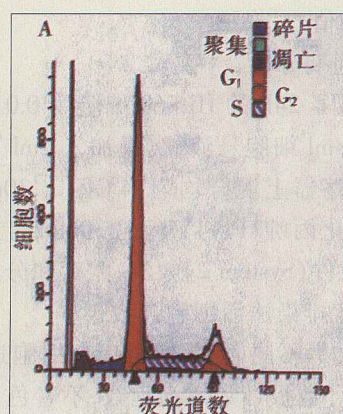
2 结果

2.1 12G5 孵育前后细胞周期的变化

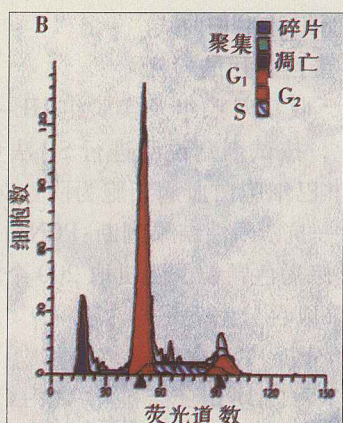
共培养 24h 后,采用流式细胞仪观察 HL-60 细胞周期及凋亡率的变化(图 1),结果显示,实验组中 G_0/G_1 期细胞比例为 $(52.71 \pm 4.9)\%$,S 期为 $(36.42 \pm 4.1)\%$, G_2/M 期为 $(10.87 \pm 5.2)\%$;对照组中 G_0/G_1 期细胞比例为 $(41.42 \pm 2.2)\%$,S 期为 $(46.05 \pm 3.7)\%$, G_2/M 期为 $(12.53 \pm 2.6)\%$ 。统计学分析显示:实验组中 G_0/G_1 期细胞明显增多,S 期细胞明显减少 ($P < 0.05$),而 G_2/M 期细胞比例两组无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 12G5 对 HL-60 细胞存活、增殖的影响

通过采用台盼蓝拒染法,比较共培养体系中 HL-60 细胞存活率的变化(表 1),结果显示:12G5 孵育 24h 后,HL-60 细胞存活率明显低于对照组,但组内比较,从 24h 后,细胞存活率无明显下降。上述结果显示,阻断 SDF-1 生物学活性后 HL-60 细胞存活率下降。同时,我们通过绘制生长曲线,比较了白血病细胞增殖活性的变化,结果显示,两条曲线上幅度明显不同,实验组曲线上平缓,而对照组较为陡直,表明 12G5 明显减弱 HL-60 细胞的增殖活性(图 2)。



A: 对照组



B: 实验组

图1 加入12G5前后HL-60细胞周期的变化

表1 12G5对共培养的HL-60细胞存活率的影响 (%)

组别	培养时间(h)				
	0	24	48	72	96
对照组	92.3±4.5	93.1±2.4	90.5±5.9	91.7±3.2	89.8±2.8
实验组	93.1±3.7	82.4±2.9*	80.7±3.4*	79.8±1.6*	75.5±2.7*

* 与对照组比较 $P < 0.05$

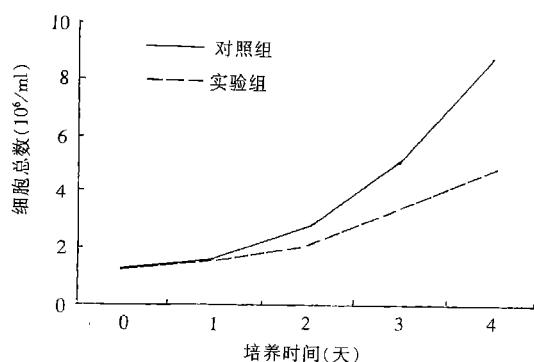
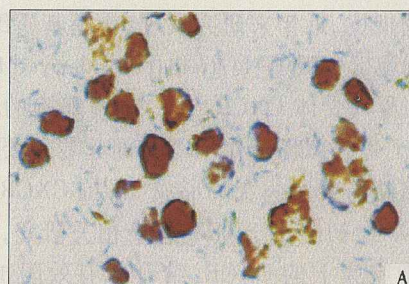


图2 HL-60细胞生长曲线

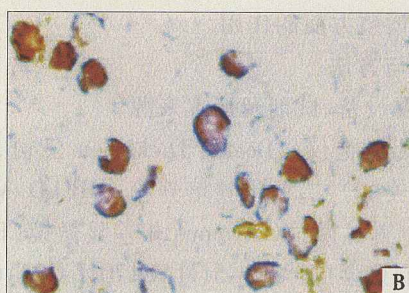
2.3 12G5 孵育后 PCNA 蛋白表达的变化

24h 后, 采用免疫组化方法检测了 HL-60 细胞

PCNA 蛋白的表达情况。PCNA 阳性细胞在实验组为 $(42.1 \pm 3.9)\%$, 而对照组为 $(67.4 \pm 8.5)\%$, 显著高于前者 ($P < 0.05$), 同时, 细胞染色显示实验组较对照组明显变浅(图3)。



A: 对照组



B: 实验组

图3 12G5 对与正常骨髓基质细胞共培养的 HL-60 细胞 PCNA 蛋白表达的影响 (SP×400)

3 讨论

化疗后, 髓内残留白血病细胞与骨髓基质之间的相互作用在残留病变的形成方面有关键作用, 骨髓微环境为残留白血病细胞继续存活、增殖提供了适宜的部位, 其中, 趋化因子、粘附分子等在这一过程中起着重要作用。SDF-1 属于趋化因子 α 或 CXC 亚家族, 主要由骨髓基质细胞分泌产生, 与其表达于白血病细胞表面的唯一受体 CXCR₄ 结合在调控骨髓微环境信号、调节髓内白血病细胞与基质细胞相互作用中起着重要作用^[6,7]。SDF-1/CXCR₄ 系统能否影响白血病细胞的存活及增殖、如何影响, 对于髓内残留病变的进一步研究有着重要的意义。因此, 本研究通过抗 CXCR₄ 单克隆抗体(12G5)阻断 SDF-1 活性, 观察与正常骨髓基质细胞共培养的 HL-60 细胞的细胞周期、增殖活性等的变化, 以探讨 SDF-1 在髓内白血病细胞存活、增殖方面的作用。

有研究表明,SDF-1与白血病细胞膜上的CXCR₄结合,可诱导白血病细胞快速转移到骨髓成纤维细胞层,并在其它粘附分子的协同作用下,选择性地定位于骨髓基质层^[8],提示SDF-1能影响白血病细胞在骨髓微环境中的定位,继而维持白血病细胞持续生长、增殖的能力。阻断SDF-1活性后,白血病细胞失去骨髓基质层的有效支持,故推测白血病细胞的生长周期及增殖活性将受到一定的影响,这在本实验中得到了证实。细胞增殖周期观察结果显示,实验组中G₀/G₁期细胞明显增多,S期细胞减少,表明阻断SDF-1生物活性后,生长静止期细胞比例增高,而处于增殖状态的细胞减少,提示12G5的作用机制之一在于SDF-1作用受抑后,骨髓微环境不能有效地维持细胞增殖周期,促使更多的HL-60细胞进入生长静止状态。这一结果表明SDF-1可维持白血病细胞的增殖周期,与既往研究相似^[9]。通过观察细胞生长曲线,实验组曲线上升平缓,而对照组较为陡直,表明12G5明显减弱HL-60细胞的增殖活性,这在细胞存活率比较中也得到证实,表明SDF-1在维持白血病细胞增殖过程中具有重要作用。

增殖细胞核抗原PCNA的出现与细胞增殖相联系,G₀期不表达,S期达最高峰,其表达和骨髓中幼稚细胞的比例有关,反映处于增殖状态的白血病细胞的多少,可以作为细胞增殖的一个指标^[10]。为了进一步证实SDF-1在HL-60细胞增殖中的作用,我们采用免疫组化方法检测了HL-60细胞PCNA的表达。结果显示,实验组中HL-60细胞PCNA阳性表达率为(42.1±3.9)%,明显低于对照组(67.4±8.5%)%,表明12G5可下调PCNA的表达,抑制白血病细胞的增殖,间接证实了SDF-1在维持白血病细胞增殖能力中具有重要作用。

总之,通过本实验证实,SDF-1在维持髓内白血病细胞存活并进一步增殖过程中具有重要的生物学作用。因此,能否通过阻抑SDF-1表达或阻断其活性来抑制髓内残留白血病细胞存活、增殖,从而达到改造骨髓微环境、治疗白血病的目的,值得进一步研究。然而,从理论上说,处于增殖状态的白血病细胞

对化疗更加敏感,如果从抑制SDF-1活性入手,改变残留白血病细胞动力学特性,可能会降低白血病细胞的化疗敏感性。因此,对于SDF-1与残留白血病增殖动力学及化疗敏感性相互之间的关系,还有待更多研究加以阐释。

参考文献

- 1 Mudry RE, Fortney JE, York T, et al. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy [J]. *Blood*, 2000, 96(15): 1926~1932
- 2 付建,王 辛,彭贤贵,等.急性白血病骨髓基质细胞对HL-60细胞增殖、分化的影响[J].*重庆医学*,2003,32(8):1016~1018
- 3 Burger JA, Bonni A, West AE, et al. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2002, 43(3): 461~466
- 4 Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, et al. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4[J]. *Cell*, 1996, 87(4): 745~756
- 5 郭朝华,罗成基,孔佩艳,等.放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响[J].*中国实验血液学杂志*,1999,7(1):65~68
- 6 Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived-nurse like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through SDF-1[J]. *Blood*, 2000, 96(8): 2655~2663
- 7 Mohle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, et al. Functional response of leukemic blasts to SDF-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukemia [J]. *Br J Haematol*, 2000, 110(3): 563~572
- 8 Bradstock KF, Makrynika V, Bianchi A, et al. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers[J]. *Leuk*, 2000, 14(5): 882~888
- 9 Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines[J]. *Blood*, 2002, 99(12): 4307~4317
- 10 Tsurusawa M, Ito M, Zha Z, et al. Cell-cycle-associated expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 reactive antigen of bone marrow blast cells in childhood acute leukemia[J]. *Leuk*, 1992, 6(7): 669~674

(2004-01-08 收稿)

(2004-05-28 修回)

(柏敏霜校对)