文章编号:1000-5404(2005)21-2121-04

论著

白血病骨髓基质细胞促进 Jurkat 细胞抗药物诱导凋亡研究

李忠俊[1],陈幸华[1],滕本秀[2],孔佩艳[1],王吉刚[1],彭贤贵[1],杨镇洲[1] (第三军医大学新桥医院:[1]血液内科,[2]输血科,重庆 400037)

提 要:目的 探索骨髓基质细胞增强白血病细胞抗凋亡、抗药特性的可能机制。**方法** 体外分离培养骨髓基质细胞模拟骨髓微环境功能,与白血病细胞 Jurkat 体外共培养。0.5 μmol/L DNR 处理 Jurkat 细胞诱导凋亡,应用 Annexin V/PI 双标法流式细胞仪检测白血病细胞凋亡率。PI 染色流式细胞仪检测细胞周期分布。**结果** 0.1~2.0 μmol/L 浓度范围 DNR 作用一定时间后,Jurkat 细胞发生的凋亡率随药物浓度的增加与作用时间的延长而升高。共培养后骨髓基质细胞抑制药物诱导的白血病细胞凋亡,白血病细胞凋亡率明显低于单独悬浮培养组($P<0.05$)。白血病骨髓基质对白血病细胞的屏蔽效应强于正常骨髓基质细胞[白血病细胞凋亡率分别是(5.73±1.78)%,(8.39±4.08)%,($P<0.05$)]。DNR 处理共培养组 Jurkat 细胞 G_0/G_1 期阻滞,而正常与白血病骨髓基质细胞屏蔽的白血病细胞 G_0/G_1 期阻滞现象无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 一定浓度的 DNR 在体外可诱导 Jurkat 细胞凋亡。骨髓基质细胞抑制化疗药物诱导的白血病细胞凋亡,这种保护作用可能部分通过阻滞白血病细胞于 G_0/G_1 期实现。白血病骨髓基质细胞对白血病细胞的屏蔽效应可能存在较细胞周期阻滞更复杂的机制。

关键词:白血病;骨髓基质细胞;凋亡;骨髓微环境
中图法分类号:R329.28;R733.7 **文献标识码**:A

Leukemic bone marrow stromal cells inhibit apoptosis of leukemic cell line Jurkat by DNR *in vitro*

LI Zhong-jun[1], CHEN Xing-hua[1], TENG Ben-xiu[2], KONG Pei-yan[1], WANG Ji-gang[1], PENG Xian-gui[1], YANG Zhen-zhou[1]([1]Department of Hematology, [2]Department of Blood Transfusion, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the protection of bone microenvironment on leukemic cells against chemotherapy and the mechanism of the bone marrow stromal cells promoting the drug-resistance and anti-apoptosis of leukemic cells *in vitro*. **Methods** The human leukemic cell line Jurkat was cocultured with 0, 0.1, 0.5, 2.0, 5.0 μmol/L daunorubicin (DNR) for 6, 12, 24, 48 h, and then the morphology of Jurkat was observed under light microscope and apoptosis percentage of Jurkat cells stained with Annexin V/PI was detected by flow cytometry. Normal and leukemic bone marrow stromal cells (BMSCs) were isolated using Percoll and the second generation cells were irradiated with 20 Gy ^{60}Co for use. The irradiated BMSCs were cultured for 24 h, and then cocultured with Jurkat cells of log phase for 24 h, then added with 0.5 μmol/L DNR. 24 h later, Jurkat cells were collected, and the apoptosis percentage and cell cycle distribution was detected by flow cytometry. **Results** Treated with 0.1 – 2.0 μmol/L DNR, the apoptosis percentage of Jurkat cells increased with the ascending of DNR concentration and the prolonging of time. Apoptosis percentage of Jurkat cells cocultured with normal BMSCs for 24 h by DNR was lower than that of Jurkat cells without BMSCs coculture ($P<0.05$). Apoptosis percentage of Jurkat cells cocultured with leukemic BMSCs by DNR was lower than that of Jurkat cells cocultured with normal BMSCs [(5.73±1.78)% *vs* (8.39±4.08)%, ($P<0.05$)]. Jurkat cells cocultured

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070327, 39770335),第三军医大学科研基金资助项目(2004D110)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070327, 39770335) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2004D110)

作者简介:李忠俊(1974-),男,湖南省隆回县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事白血病耐药抗凋亡与骨髓微环境的关系及其分子机制方面的研究。现在新桥医院输血科,电话:(023)68774684
通讯作者:陈幸华,电话:(023)68755609, E-mail: xhchen888@yahoo.com.cn.

收稿日期:2004-12-02;**修回日期**:2005-05-15

with normal BMSCs increased on G_0/G_1 phase, which was similar to that cocultured with leukemic BMSCs ($P>0.05$). **Conclusion** Our results suggested that the low dose of DNR could efficiently induce apoptosis of Jurkat cell line *in vitro*. Bone marrow stromal cells inhibit leukemic cells apoptosis induced by daunorubicin and protect leukemic cells against chemotherapy partly through cell cycle arrest. The complex mechanisms more than cell cycle arrest should be further studied.

Key words: leukemia; bone marrow stromal cell; apoptosis; bone marrow microenvironment

肿瘤微环境严重影响肿瘤细胞的生存、药物敏感性以及肿瘤患者预后。骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)与其分泌的细胞因子、细胞外基质构成的骨髓微环境在机体造血发育、血液病发生、恶性血液病细胞凋亡等病理生理过程中发挥重要作用。研究表明骨髓微环境作为白血病细胞在骨髓内生存的"土壤"对白血病细胞在化、放疗后的转归有重要影响,推测白血病骨髓微环境在化疗后患者骨髓内微小白血病的形成过程中起着重要作用。基于这种推测,我们在体外分离培养初诊白血病患者的骨髓原代基质细胞模拟白血病患者骨髓微环境,研究白血病细胞抗药、抗凋亡特性与骨髓微环境的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

1.1.1 材料 用于分离培养骨髓基质细胞的骨髓标本来自第三军医大学新桥医院血液内科,2004年1-12月骨髓象正常的骨髓标本17份,其中男性10例,女性7例。初治急性白血病患者骨髓标本20份,急性淋巴细胞白血病10例,急性非淋巴细胞白血病9例(M_2 4例,M_3 2例,M_4 1例,M_5 2例),急性混合性白血病1例。其中男性15例,女性5例,年龄5~78岁。采集肝素抗凝骨髓1~2 ml/份。

1.1.2 试剂 Percoll为Sigma产品。RPMI1640,胎牛血清为Hyclone产品。Annexin Ⅴ凋亡试剂盒为Coulter产品。柔红霉素(daunorubicin, DNR)为Pharmacia&Upjohn公司产品。Beckon Dickonsin流式细胞仪为BECKMAN公司产品。

1.1.3 细胞来源 人急性淋巴细胞白血病细胞株Jurkat来自美国典型培养物保存中心(American type culture collection, ATCC)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNR体外诱导Jurkat细胞凋亡 Jurkat细胞浓度调整至1×10^6/ml,入DNR终浓度分别为0.1、0.5、2.0、5.0 μmol/L,作用6、12、24、48 h,光镜观察细胞形态;同时收集各处理组细胞,PBS洗涤后,Annexin V/PI双标行流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率。

1.2.2 骨髓基质细胞(BMSC)分离培养及其与Jurkat细胞体外共培养[1] 1~2 ml骨髓,2倍体积的1.077 g/L Percoll,1 800 r/min离心15 min,吸取中间白膜层,0.01 mol/L pH 7.4 PBS洗涤2次,在含12.5% FCS,12.5% HS的75% RPMI-1640培养基中,1×10^{-6} mol/L氢化可的松,37 ℃ 5% CO_2饱和湿度条件下培养,接种密度每毫升1×10^7单个核细胞。培养3 d半量换液体,5 d全量换液体。细胞局部融合或全部融合达80%以上时传代培养,取第2代培养达80%以上融合的BMSC采用^{60}Co照射20 Gy后用于下一步实验。

照射后BMSC以2×10^4 BMSC/cm^{2}接种于24孔培养板,贴壁培养24 h后加入对数生长期的Jurkat细胞2×10^5/ml,共培养24 h后加入0.5 μmol/L的DNR,作用24 h后收集Jurkat细胞,并以0.01 mol/L pH 7.4 PBS洗涤2次,用于下一步实验。

1.2.3 细胞凋亡率的检测 收集Jurkat细胞,0 ℃ PBS洗涤细胞2次,0 ℃结合缓冲液调整细胞浓度为5×10^5/ml,加5 μl Annexin Ⅴ-FITC和2.5 μl PI避光染色10 min,加150 μl 0 ℃结合缓冲液采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 细胞周期分布的检测 收集Jurkat细胞,PBS洗涤2次,75%乙醇固定24 h以上,加入50 μg/ml碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪测定并分析细胞周期分布。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,应用Microsoft Excel软件进行t检验。

2 结果

2.1 DNR体外诱导Jurkat细胞凋亡及骨髓基质细胞共培养屏蔽效应

Jurkat细胞悬浮培养自发凋亡率为(2.84±0.16)%(Annexin V^+ PI细胞百分率),凋亡和死亡细胞率为(6.05±2.56)%(Annexin V^+PI^-和Annexin V^+PI^+细胞百分率)。体外实验中0.1~2.0 μmol/LDNR作用于Jurkat细胞后,发生的凋亡率一定范围内随DNR浓度的增高和作用时间的延长而升高。0.5 μmol/L的DNR作用Jurkat细胞6、12、24 h的凋亡率分别为(4.66±0.69)%,(9.68±2.72)%,(16.02±1.00)%。2.0 μmol/LDNR作用Jurkat细胞24 h后的凋亡率达峰值(56.03±3.53)%,但5.0 μmol/LDNR作用24 h、2.0 μmol/LDNR作用48 h后,Jurkat细胞凋亡率反而下降[分别为(4.67±3.47)%、(10.31±9.56)%],而死亡细胞数明显增多[分别为(65.28±12.25)%,(25.54±13.49)%]。悬浮培养Jurkat细胞体外经DNR诱导凋亡情况以及BMSC的屏蔽效应结果见表1。悬浮培养的Jurkat细胞经0.5 μmol/L的DNR作用24 h后凋亡率为(16.02±1.00)%(Annexin V^+/PI细胞百分率),明显高于Jurkat细胞自发凋亡率(2.84±1.60)%($P<0.05$);凋亡和死亡细胞率为(20.63±2.52)%(Annexin V^+细胞百分率),与自发对照组比较有显著增加(6.05±2.26)%($P<0.01$)。与原代培养正常BMSC共培养24 h后,0.5 μmol/L的DNR作用Jurkat细胞24 h后的细胞凋亡率(Annexin V^+/PI细胞百分率)、凋亡和死亡细胞率(Annexin V^+细胞百分率),与悬浮培养DNR诱导凋亡实验组比较均明显下降($P<0.01$)。

Jurkat 细胞与原代培养白血病 BMSC 共培养 24 h 后，0.5 μmol/L 的 DNR 作用 Jurkat 细胞 24 h 后细胞凋亡率、凋亡和死亡细胞率较正常 BMSC 组进一步降低（$P<0.05$）。但实验组细胞死亡细胞百分率与对照组比较无显著性差异。

表 1　DNR 诱导 Jurkat 细胞凋亡与骨髓基质细胞的抑制效应［$(\bar{x}\pm s)\%$］

Tab 1　Apoptosis percentage of Jurkat cells with or without coculturing with normal or leukemia bone marrow stromal cells induced by 0.5 μmol/L DNR［$(\bar{x}\pm s)\%$］

Groups of Jurkat cells	Annexin V^+PI^-	Annexin V^+/PI^+ and Annexin V^+/PI^-	Annexin V^+/PI^+ and Annexin V^+/PI^-
Spontaneous apoptosis	2.84 ±0.16	3.18 ±2.38	6.05 ±2.26
Suspended culturing with 0.5 μmol/L DNR	18.28 ±3.61	4.50 ±2.9	22.79 ±4.89 *
Coculturing with normal BMSCs and 0.5 μmol/L DNR	9.21 ±3.97 **	4.48 ±3.78	13.73 ±3.83
Coculturing with leukemic BMSCs and 0.5 μmol/L DNR	6.33 ±1.68 *	2.26 ±0.02	8.44 ±2.68 **

*：$P<0.05$，*vs* coculturing with normal BMSCs group；**：$P<0.01$，*vs* suspended culturing with 0.5 μmol/L DNR group and spontaneous apoptosis

2.2　DNR 作用后细胞周期分布变化

DNR 处理后各组 Jurkat 细胞周期分布情况见表 2。悬浮培养的 Jurkat 细胞经 DNR 处理后较悬浮培养组 G_0/G_1 期细胞明显减少，G_2/M 期细胞明显增加（$P<0.05$）。而骨髓基质细胞共培养组 Jurkat 细胞经相同剂量 DNR 处理后较悬浮培养加药组 G_0/G_1 期细胞数显著增多，出现 G_0/G_1 期聚集现象（$P<0.01$）。白血病 BMSC 与正常 BMSC 两组之间无显著差别。

表 2　DNR 作用后 Jurkat 细胞周期分布的变化［$(\bar{x}\pm s)\%$］

Tab 2　Cell cycle distribution of Jurkat cells treated with 0.5 μmol/L DNR［$(\bar{x}\pm s)\%$］

Groups of Jurkat cells	G_0/G_1	G_2/M	S
Suspended culturing	31.31 ±5.58 *	9.31 ±10.74 *	59.38 ±8.74 *
Suspended culturing with DNR	15.02 ±10.95	35.62 ±17.56	49.37 ±9.49
Coculturing with normal BMSCs and DNR	47.96 ±5.88 *	7.29 ±4.56 *	44.75 ±9.91
Coculturing with leukemic BMSCs and DNR	39.25 ±3.04 *	6.00 ±4.96 *	54.75 ±4.48

*：$P<0.05$，*vs* suspended culturing with DNR group

3　讨论

正常骨髓基质细胞在机体正常造血发生过程中起重要作用，通过分泌可溶性细胞因子、细胞表面粘附分子、直接粘附等影响造血干细胞的增殖、分化、存活。研究结果提示，骨髓基质细胞参与了白血病的发生、发展过程以及白血病细胞的抗药、抗凋亡等特性的形成过程。同时对 B 淋巴细胞祖细胞和 B 淋巴细胞白血病细胞的增殖、分化、存活均有重要影响[2,3]。在髓系白血病的研究中发现，骨髓基质细胞降低白血病细胞对化疗药物的敏感性，从而发挥其对白血病细胞的保护作用[4,5]。基于骨髓基质细胞能庇护白血病细胞免于药物诱导的凋亡，学者们称骨髓基质微环境为白血病细胞逃避常规化疗的“避难所”。但目前大多数研究集中在正常骨髓基质细胞和已建系基质细胞株[6-8]，而白血病患者在发生造血实质细胞恶性克隆变的同时也有骨髓基质细胞恶性变化的出现。恶变的白血病骨髓基质在骨髓白血病细胞获得耐药、抗凋亡特性过程中有什么作用？如何发挥？目前少见相关文献报道。

我们在分离培养白血病患者骨髓原代基质细胞的基础上，研究了正常人和白血病患者骨髓基质细胞屏蔽白血病细胞逃避化疗药物诱导的凋亡及可能机制。我们在本实验中采用 Annexin V/PI 标记后经流式细胞仪测定证实 DNR 能诱导 Jurkat 细胞发生凋亡。在一定的剂量范围内随 DNR 浓度、作用时间的延长 Jurkat 细胞凋亡率升高，呈现剂量-效应、时间-效应关系。实验结果显示，正常和白血病骨髓基质细胞明显降低了化疗药物 DNR 诱导的白血病细胞凋亡率，发挥了一定的屏蔽效应，其中白血病骨髓基质细胞的屏蔽效应更强。与体外研究基质细胞株保护髓系白血病、骨髓瘤、淋巴瘤的相关报道相似[10]。但实验中显示，与骨髓基质细胞共培养后，0.5 μmol/L DNR 诱导细胞死亡百分率无显著性变化，且均低于 5%。提示 DNR 对 Jurkat 细胞的杀伤效应（诱导凋亡或死亡）可能与药物剂量存在密切联系，值得进一步深入研究。

细胞周期分布研究表明，正常和白血病骨髓基质细胞屏蔽的白血病细胞经 0.5 μmol/L DNR 处理后更多的细胞处于 G_0/G_1 期，均出现 G_0/G_1 期阻滞现象，但两组无明显差异。基质细胞对白血病细胞生长的抑制现象可能与白血病细胞被阻滞于 G_0/G_1 期有关；细胞外基质与骨髓瘤细胞粘附实验中，实验结果提示 CKIs 蛋白水平变化、细胞周期调控失调导致细胞生长停滞于 G_0/G_1 期是 Fn 粘附介导骨髓瘤细胞耐药的关键环节[10]。本实验结果与文献报道一致。但是正常和白血病骨髓基质细胞对白血病细胞抵抗化疗的屏蔽效应存在差异，而二者屏蔽的白血病细胞 G_0/G_1 期停滞比例无明显差异。提示阻滞白血病细胞于 G_0/G_1 期抑制增殖可能是骨髓基质细胞屏蔽白血病细胞的途径之一。白血病骨髓基质细胞较正常骨髓基质细胞发挥更有效地保护作用，而细胞周期分布实验结果相近的结果提示，骨髓基质细胞屏蔽白血病细胞可能存在较抑制细胞增殖更复杂的机制，值得进一步深入研究。分离培养白血病患者骨髓原代基质细胞较基质细胞株更能真实地模拟骨髓微环境，其影响白血病细胞化疗药物敏感性、促进白血病细胞抗药、抗凋亡及其机制研究将有助于阐明骨髓内微小白血病灶形成的机理，推

动白血病治疗研究进展。

参考文献：

[1] Jin H J, Chen J, Karageorgiou V, *et al*. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats [J]. Biomaterials, 2004, 25(6): 1039-1047.

[2] Gibson L F. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment[J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(1): 19-27.

[3] Granziero L, Circosta P, Scielzo C, *et al*. CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5$^+$ B lymphocytes[J]. Blood, 2003, 101(5): 1962-1969.

[4] Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, *et al*. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia[J]. Nat Med, 2003, 9(9): 1158-1165.

[5] Paraguassu Braga F H, Borojevic R, Bouzas L F, *et al*. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(9): 1101-1108.

[6] Nefedova Y, Landowski T H, Dalton W S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms[J]. Leukemia, 2003, 17(6): 1175-1182.

[7] Garrido S M, Appelbaum F R, Willman C L, *et al*. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5)[J]. Exp Hematol, 2001, 29(2): 448-457.

[8] Koller M R, Oxender M, Jensen T C, *et al*. Direct contact between CD34$^+$lin$^-$ cells and stroma induces a soluble activity that specifically increases primitive hematopoietic cell production[J]. Exp Hematol, 1999, 27(2): 734-741.

[9] Fortney J E, Zhao W, Wenger S L, *et al*. Bone marrow stromal cells regulate caspase 3 activity in leukemic cells during chemotherapy[J]. Leuk Res, 2001, 25(10): 901-907.

[10] Hazlehurst L A, Damiano J S, Buyuksal I, *et al*. Adhesion to fibronectin *via* beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) [J]. Oncogene, 2000, 19(38): 4319-4327.

（编辑　陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)21-2124-01

大鼠前庭内侧核γ-氨基丁酸受体mRNA的表达

Expression of gamma-aminobutyric acid receptor mRNA in rat medial vestibular nucleus by RT-PCR

汪绪武[1]，孔维佳[2]　（[1]解放军第456医院耳鼻咽喉科，济南 250031；[2]华中科技大学同济医学院附属协和医院耳鼻咽喉科，武汉 430022）

γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid，GABA)是前庭传入神经系统的抑制性神经递质，GABA的A受体或B受体的拮抗剂都能改变前庭神经元的放电[1]，提示前庭神经核内存在着GABA的两种受体。然而，前庭中枢究竟存在着哪些GABA受体的亚基/亚型，目前少见报道。本研究旨在探明前庭核内GABA的受体亚基/亚型，以进一步明确其神经化学基础。

1　材料与方法

1.1　总RNA的提取

正常雄性Wistar大12只鼠(第二军医大学野战外科研究所提供)，体质量200～250 g，每次实验取2只，重复6次实验。快速断头并分离出双侧前庭内侧核(medial vestibular nucleus，MVN)。异硫氰酸胍一步法提取总RNA，紫外分光光度仪测得$D(260)/D(280)$比值为1.8～2.0，表示RNA纯度满意。

1.2　PCR反应

按二步法逆转录将mRNA转变成cDNA，GABAA受体13种亚基的引物设计见文献[2]报道。GABAB受体的GABABR1a和GABABR1b的引物设计按Durgam等[3]设计的3条引物，其中引物A和B合成209 bp的PCR产物，引物A和C合成159 bp的PCR产物，若这3条引物在同一个反应体系中能扩增出上述两条PCR产物，说明组织中GABAB的两种受体。

PCR反应体系：cDNA终产物10 μl，5 U/μl *Taq*酶0.25 μl，2.5 mmol/L dNTP 4 μl，0.2 μmol/L的上游引物和下游引物各0.5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 8 μl。反应条件为：95 ℃ 10 min，94 ℃ 1 min，58 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，共35个循环，72 ℃ 10 min。实验设阳性对照和阴性对照，阳性对照的RNA及其引物由试剂盒提供，阴性对照将上、下游引物换成等体积的双蒸水。常规琼脂糖凝胶电泳，电泳情况以凝胶扫描分析系统测定。

2　结果

GABAA和GABAB受体PCR产物的大小与所设计的相应

（下转2138页）

基金项目：国家杰出青年基金资助项目(39925035)，国家自然科学基金资助项目(30070809)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (39925035) and the National Natural Science Foundation (30070809)

作者简介：汪绪武(1964-)，男，湖北省红安县人，博士，副主任医师，主要从事内耳的生理及病理方面的研究，发表论文10余篇。电话：(0531)86353542

收稿日期：2005-04-05；修回日期：2005-08-27