文章编号:1000-5404(2007)10-0879-03

论著

急性白血病化疗前后与正常人骨髓基质细胞间通讯的改变

刘 耀*,张 曦*,陈幸华,李忠俊,司英健,高 蕾 (第三军医大学新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要:目的 观察急性白血病化疗前后与正常人骨髓基质细胞间隙连接蛋白43(connexin43, Cx43)表达的变化及通讯功能的改变。**方法** 体外培养初发急性白血病化疗前及化疗后完全缓解的与正常人的骨髓基质细胞,采用免疫细胞化学方法观察三者之间Cx43表达的变化;采用细胞划痕染料传输技术比较三者之间间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)功能的差异。**结果** 正常人、急性白血病化疗前及化疗后完全缓解的骨髓基质细胞上Cx43表达的阳性率分别为(88.0±3.5)%、(12.0±2.4)%和(52.0±3.1)%;基质细胞上Cx43蛋白的光密度值分别为(175.08±8.34)、(45.42±3.71)及(94.33±7.20);染料传输的细胞数分别为(9.20±0.35)、(1.84±0.33)和(4.07±0.53)。**结论** 急性白血病骨髓基质细胞间通讯功能较正常人及化疗后完全缓解急性白血病骨髓基质细胞明显减弱。

关键词: 急性白血病;骨髓基质细胞;Connexin43;GJIC;化疗

中图法分类号: R329.25;R331.22;R733.705 **文献标识码:** A

Intercellular communicating function in BMSCs of acute leukemia before and after chemotherapy and normal BMSCs

LIU Yao, ZHANG Xi, CHEN Xing-hua, LI Zhong-jun, SI Ying-jian, GAO Lei (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the connexin protein 43 (Cx43) expression levels in BMSCs of acute leukemia before and after chemotherapy and normal BMSCs and study the communication function between cells. **Methods** In *in vitro* cultured BMSCs of acute leukemia before and after chemotherapy and normal BMSCs, the Cx43 expression levels were detected by immunochemistry and the difference of gap junction intercellular communication (GJIC) were examined by using dye transfer technique. **Results** In the BMSCs of acute leukemia before and after chemotherapy and normal BMSCs, the positive rate of Cx43 expression was (88.0±3.5)%, (12.0±2.4)% and (52.0±3.1)% respectively, average optical density value of stromal cells were (175.08±8.34), (45.42±3.71) and (94.33±7.20) and the cell number through dye transmission of stromal cells were (9.20±0.35), (1.84±0.33) and (4.07±0.53). **Conclusion** Cell-cell communication function of BMSCs of acute leukemia before chemotherapy is significantly lower than that of normal BMSCs and BMSCs of acute leukemia after chemotherapy.

Key words: acute leukemia; bone marrow stromal cell; Connexin43; gap junction intercellular communication; chemotherapy

间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication,GJIC)是相邻细胞间普遍存在的直接通讯方式,通过传递小分子递质(如cAMP、ATP、Ca^{2+}等)直接调控组织细胞生长、分化、凋亡[1]。GJIC的物质基础是相邻细胞膜上连接子耦联形成的通讯通道,每个连接子含6个连接蛋白(connexon, Cx)。Cx是一个较保守的蛋白家族,在造血组织中主要为Cx43[2]。GJIC功能降低或缺失是肿瘤发生中的重要事件,但在白血病中的研究报道较少。白血病造血微环境具有庇护恶性细胞生长的作用,由连接蛋白Cx43介导的GJIC在造血系统恶性疾病中的变化尚不清楚。为了研究细胞通讯在血液系统恶性肿瘤造血微环境中的变化,我们采用Cx43抗体免疫荧光染色和划痕标记染料传输的方法对急性白血病化疗前、后与正常人的

基金项目:国家自然科学基金(30500220)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500220)

作者简介:刘 耀(1979-),男,河南省焦作市人,博士研究生,医师,主要从事造血微环境损伤及其救治措施方面的研究。电话:(023)68755609, E-mail: shapan@56.com
张 曦(1972-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事血液系统恶性肿瘤基础与临床方面的研究
*:同等贡献者

收稿日期:2006-12-25;修回日期:2007-01-18

骨髓基质细胞 Cx43 蛋白表达及 GJIC 功能的差异进行观察。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器及标本来源

DMEM/F12 培养粉(Gibco 公司),Ficoll(1.077 mg/L,上海试剂二厂),新生胎牛血清、马血清(Hy2clone 公司,-20 ℃冻存),鼠抗人 Cx43mAb(Zymed 公司),正常山羊血清(中山生物技术公司),S-P 免疫组化染色试剂盒(中山生物技术公司),DAB 染色试剂盒(武汉博士德公司),二氧化碳培养箱(SHELD2M2300 型,美国),倒置显微镜(Olympus 相差显微镜,日本),正常骨髓,初发急性白血病骨髓及其化疗后完全缓解的骨髓穿刺抽吸标本均取自我院血液科。

1.2 骨髓基质细胞的分离、培养

参照文献[3]进行。

1.3 实验分组

实验所需的基质细胞标本分 3 组,即正常骨髓基质细胞组、急性白血病化疗前、急性白血病化疗后完全缓解的骨髓基质细胞组,每组 10 份。

1.4 罗氏黄(lucifer yellow, LY)划痕标记荧光传输实验

参照文献[4]进行。

1.5 Cx43 免疫组织化学染色

将单层细胞爬片经 PBS 洗涤,40 mg/L 多聚甲醛固定 20 min,一抗为鼠抗人 Cx43 相关抗原单克隆抗体,二抗采用生物素化羊抗兔 IgG,实验步骤按试剂盒说明书进行,采用免疫组化 SABC 法染色,DAB 显色。实验中用 0.01 mg/L 的 PBS 取代一抗孵育,作为阴性对照。结果判断:Cx43 蛋白阳性表达见细胞质和细胞膜棕黄色染色颗粒或斑片。判断标准:选择 10 个高倍视野,计数 1 000 个细胞,计数阳性细胞百分率。

1.6 图像分析

免疫组化结果在显微镜下经图像分析系统进行灰度扫描,每组 3 个样本,每个样本选择 30 个细胞,测定每组平均光密度值,再进行比较。正常及化疗前、后急性白血病骨髓基质细胞组在相同的条件下进行,具有可比性。图像分析软件为 Media Cyberneties USA 公司的 IMAGE PROPLUS 软件。

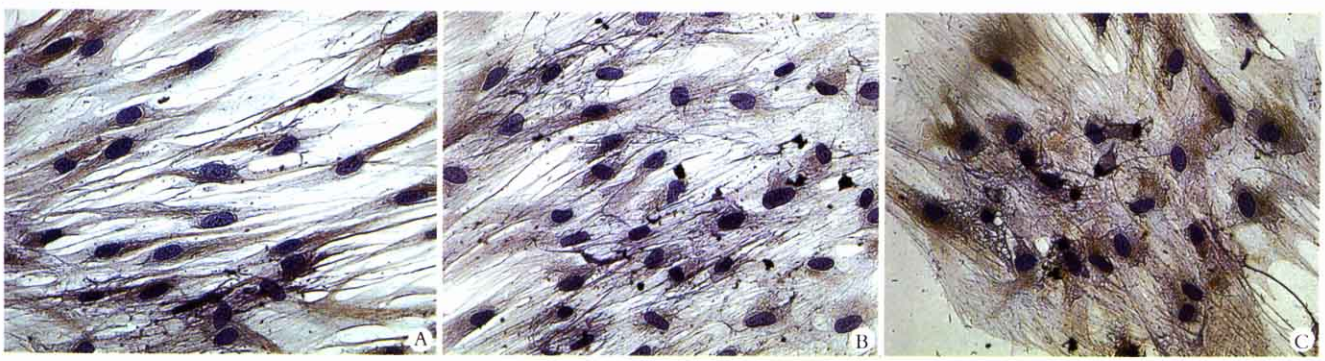
1.7 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 软件分析,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Cx43 蛋白在正常、化疗前及化疗后完全缓解的急性白血病骨髓基质细胞上的表达

体外培养的正常和化疗前后急性白血病骨髓基质细胞上均可见 Cx43 表达,但各组表达的强弱不同,在正常和急性白血病化疗后完全缓解的骨髓基质细胞上可见 Cx43 在细胞膜上呈大片状棕色粘着斑,胞质中也可见其表达;而在初发组仅在少数细胞的细胞质上表达(图 1)。急性白血病化疗前、后骨髓与正常人基质细胞上 Cx43 表达的阳性率分别为(12.0 ± 2.4)%和(52.0 ± 3.1)%、(88.0 ± 3.5)%,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:正常人骨髓;B:初发白血病化疗前;C:化疗后完全缓解的白血病

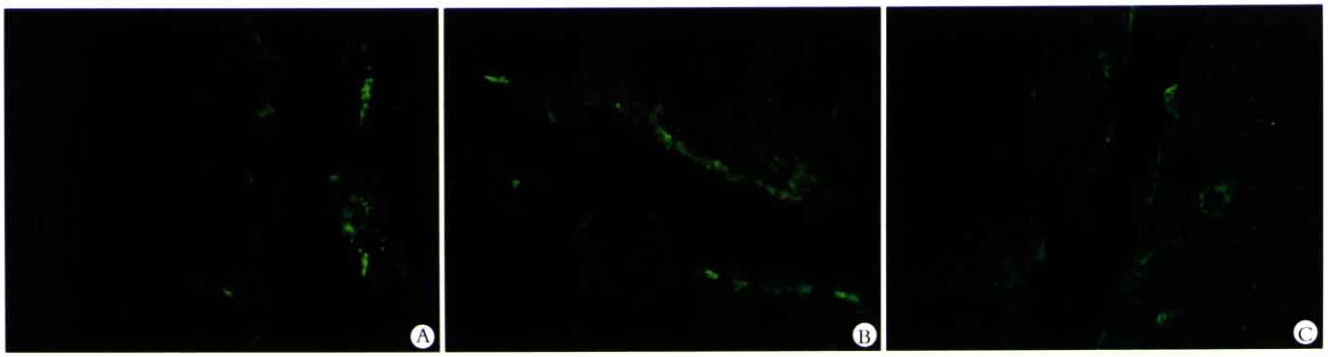
图 1 Cx43 蛋白在骨髓基质细胞上的表达 (SABC × 200)

2.2 计算机灰度扫描

使用图像分析软件在显微镜下将免疫组化结果进行密度扫描,急性白血病化疗前、后与正常人骨髓基质细胞上 Cx43 蛋白的平均光密度值分别为(45.42 ± 3.71)及(94.33 ± 7.20)、(175.08 ± 8.34),各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 LY 染料传输实验

LY 划痕标记荧光传输实验显示,初发的急性白血病骨髓基质细胞,其 LY 荧光大部分局限于标记细胞,仅有少许通过间隙连接传输至较近细胞(1.84 ± 0.33)(图 2A)。化疗后完全缓解的骨髓基质细胞的细胞间通讯功能较化疗前明显增强,LY 荧光染色弥散 4 ~ 5 个细胞(4.07 ± 0.53)(图 2B),而正常骨髓基质细胞的荧光弥散级数可达 10 个细胞以上(9.20 ± 0.35)(图 2C)。经统计学分析各组间有显著性差异($P < 0.05$)。同时,染料通过正常人和完全缓解的骨髓基质细胞之间仅需 1 ~ 2 min,而在初发白血病骨髓基质细胞之间通过的时间明显延长至 8 min以上。



A：初发白血病；B：化疗后完全缓解的白血病；C：正常人骨髓

图 2　骨髓基质细胞 LY 染料传输实验结果　（免疫荧光显微镜 ×200）

3　讨论

在血液系统恶性肿瘤发生的过程中，不仅有造血实质细胞的恶性变，基质细胞及其组成的造血微环境功能的异常也参与其中。造血微环境通过直接与造血细胞接触或释放多种细胞因子，影响或诱导造血细胞的生理活动，保持机体造血功能的稳定性和应激反应性。在此过程中，Cx43 介导的细胞通讯是各种信号物质在细胞间传递的主要通道，基质细胞上 Cx43 表达的增加与血细胞分化延迟有关，致使造血祖细胞的量升高，Cx43 表达量的下降则引起骨髓造血细胞分化的加速[5]。然而，关于急性白血病骨髓基质细胞上细胞通讯的改变及其机制目前还不完全明了。

我们通过细胞免疫组织化学方法检测了体外培养的正常人和急性白血病骨髓基质细胞上 Cx43 的表达，结果显示急性白血病骨髓基质细胞上 Cx43 的表达量较正常骨髓基质细胞明显下降（$P<0.05$）；染料传输实验显示其细胞通讯功能也明显减弱（$P<0.05$）。在对其他实质肿瘤的研究中也得出相似的结论[6,7]。产生这一现象的机制目前还不清楚，可能与 Cx43 蛋白的转录后过程（如磷酸化）和一些调节 Cx43 蛋白在细胞内转运的因子在人类肿瘤组织中存在着缺陷有关[8]。同时，在对化疗后完全缓解的急性白血病细胞通讯功能的研究中显示，急性白血病患者经过治疗后随着骨髓造血能力的恢复，其 Cx43 的表达量及由其介导的细胞通讯功能也得到加强。以上结果表明在急性白血病的发病过程中，不仅存在造血细胞的异常，骨髓基质细胞间信号转导障碍也参与其中，而随着对急性白血病患者的有效治疗，其细胞通讯功能也得到明显的恢复。

间隙连接蛋白是一类肿瘤抑制基因的表达产物，其表达的数量与细胞的恶性程度密切相关[9]。Cx 基因的表达对绝大多数肿瘤细胞的生长起负调控作用，GJIC 功能的恢复表现出肿瘤生长控制和转化表型抑制。其产生的机制可能是由于间隙连接蛋白介导的旁观者效应，导致周围细胞发生凋亡。Cx43 及其介导的细胞通讯功能的下降很可能直接影响造血微环境对机体造血的正常调控，推动肿瘤的发生。而诱导和上调 Cx 基因的表达，并恢复它所介导的细胞间隙连接通讯功能可能为包括白血病在内的多种肿瘤的治疗提供一种新的途径。

参考文献：

[1] Wong R C, Pebay A, Nguyen L T, *et al*. Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(6): 883-889.

[2] Moore K A, Lemischka I R. Stem cells and their niches[J]. Science, 2006, 311(5769): 1880-1885.

[3] 刘　耀，陈幸华，张　曦，等. 人脐血基质细胞自发分泌多种造血生长因子的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：643-645.

[4] el-Fouly M H, Trosko J E, Chang C C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junction intercellular communication[J]. Exp Cell Res, 1987, 168(2): 422-430.

[5] Bodi E, Hurtado S P, Carvalho M A, *et al*. Gap junctions in hematopoietic stroma control proliferation and differentiation of blood cell precursors[J]. An Acad Bras Cienc, 2004, 76(4): 743-756.

[6] Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, *et al*. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis[J]. C R Acad Sci Ⅲ, 1999, 322(2-3): 151-159.

[7] King T J, Fukushima L H, Donlon T A, *et al*. Correlation between growth control, neoplastic potential and endogenous connexin43 expression in HeLa cell lines: implications for tumor progression[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(2): 311-315.

[8] Sanchez-Alvarez R, Paino T, Herrero-Gonzalez S, *et al*. Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation[J]. Glia, 2006, 54(2): 125-134.

[9] Saito T, Nishimura M, Kudo R, *et al*. Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium[J]. Int J Cancer, 2001, 93(3): 317-323.

（编辑　栗　嘉）