论著

文章编号:1000-5404(2007)21-2056-04

Wnt5a与髓细胞白血病发生关系的研究

袁 媛,李招权,司维柯,潘 静,赵 宸 (第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察Wnt5a在髓细胞白血病中的表达以及外源性Wnt5a对K562细胞生长的影响。**方法** RT-PCR检测5例急性髓细胞白血病、6例慢性髓细胞白血病外周血或骨髓标本及白血病细胞系中Wnt5a的表达。用AdWnt5a和AdGFP腺病毒转染CHO细胞制备的条件培养液分别处理K562细胞1~5 d,采用细胞计数、台盼蓝染色、细胞形态等方法观察Wnt5a对K562细胞生长影响。**结果** 6例慢性髓细胞白血病均未表达Wnt5a,5例急性髓细胞白血病中4例不表达或弱表达,仅1例完全缓解的病人高表达Wnt5a。K562、HL-60细胞中Wnt5a也不表达,Jurkat细胞高表达。以GFP条件培养液处理细胞为对照,Wnt5a条件培养液处理K562细胞生长明显受到抑制,但未影响细胞的存活率。与对照相比细胞形态上出现了分化的表型。**结论** Wnt5a在急慢性髓细胞白血病外周血或骨髓中以及髓系白血病细胞株中均表达缺失或降低,并且外源性的Wnt5a可抑制K562细胞生长并有诱导其分化的现象,提示Wnt5a的表达下调可能与髓细胞白血病的发生有关。

关键词:Wnt5a;白血病;K562细胞;Wnt信号;重组腺病毒

中图法分类号:R394.3;R730.231;R733.7 **文献标识码**:A

Correlation between myeloid leukemia development and Wnt5a expression

YUAN Yuan, LI Zhao-quan, SI Wei-ke, PAN Jing, ZHAO Chen (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laborary, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe Wnt5a expression in acute and chronic myeloid leukemia and the effect of exogenous Wnt5a on the growth of K562 cell lines. Methods Peripheral blood or bone marrow samples from 5 patients of acute myeloid leukemia and 6 of chronic myeloid leukemia, as well as leukemia cell lines were analyzed for the expression of Wnt5a by RT-PCR. Wnt5a and GFP condition medium was prepared by collecting supernatant 24 – 48 h from recombinant adenovirus vector AdWnt5a and AdGFP infecting CHO cells. The effect of condition medium containing Wnt5a on the growth of K562 cells was studied by cell counting, trypan blue staining and cell morphology observation. Results Wnt5a was not expressed in all 6 cases of chronic myeloid leukemia, K562 HL-60, or CHO cell lines, and not expressed or weakly expressed in 4 cases of acute myeloid leukemia. Wnt5a was strongly expressed in Jurkat cells and only one case of acute myeloid leukemia that was in complete remission. The growth of K562 cells was inhibited after treated by Wnt5a condition medium, but their viability was not affected. K562 displayed differentiation phenotypes to some extent as compared with control cells. Conclusion Exogenous Wnt5a can inhibit K562 cells growth and induce differentiation. Down-regulated expression of Wnt5a may relate to leukemia genesis.

Key words: Wnt5a; leukemia; K562; Wnt signaling; recombinant adenovirus

Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family member 5A),属于Wnt原癌基因家族成员之一,在个体发育和肿瘤发生中有重要作用,可能起到抑癌基因的作用。但也有研究显示它可能具有癌基因的活性,如通过激活Wnt/β-catenin信号通路,过度促进细胞的增殖和分化,导致癌症的发生。Wnt5a与肿瘤发生的关系至今不明,值得深入研究。本研究观察了11例急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)、慢性髓细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者外周血或骨髓,髓系白血病细胞株中Wnt5a的表达以及它对K562细胞生长的影响,为进一步研究Wnt5a在白血病的发生、发展中的作用及其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本校新桥医院2006年9–12月收治的5例AML患者,男性3例,女性2例,年龄19~69岁,平均42岁。6例CML患者,男性4例,女性2例,年龄32~67岁,平均48岁。全部病例诊断根据FAB分类标准及免疫表型分类法,均经血象、骨髓象组织化学染色确诊。

1.2 主要试剂

RPM1640、DMEM培养基(Gibco公司),小牛血清(杭州四季青生物材料研究所),Tripure试剂(Roche公司),PCR试剂盒(Toyobo产品),蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩生物科技公司),Wnt5a抗体(Santa Cruz公司),HRP标记羊抗兔IgG(北京

作者简介:袁 媛(1980–),女,河南省周口市人,硕士,主要从事血液学方面的研究。电话:(023)68752311

通讯作者:司维柯,电话:(023)68752312,E-mail:weikesi2004@hotmail.com

收稿日期:2007-03-12;修回日期:2007-09-04

中杉生物技术公司），增强化学发光显色（GEHealthcare 公司）。

1.3　标本取材及细胞系培养条件

收集肝素钠抗凝的 7 例外周血（PB）和 4 例骨髓（BM）标本。人红白血病细胞株 K562，急性 T 淋巴细胞性白血病细胞株 Jurkat，急性早幼粒白血病细胞株 HL-60，中国仓鼠卵巢细胞株 CHO，人胚肾细胞株 HEK293 均为本实验室保存株。细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中，37 ℃，5% CO_2 条件下培养。HEK293 同样条件下于 DMEM 高糖培养基中培养。

1.4　白血病标本及细胞株中 Wnt5a 的表达

RT-PCR 方法检测 AML 和 CML 标本以及 K562、Jurkat、HL-60 细胞中 Wnt5a 基因的表达。常规方法分离单个核细胞。采用 Tripure RNA 分离试剂提取标本总 RNA，测定 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 值并计算浓度，参照 RT-PCR 试剂盒说明书加入 1 μg 总 RNA，建立 20 μl RT 反应体系，PCR 扩增建立总体积为 25 μl 的反应体系，Wnt5a 上游引物：5′-TGTGGTTTAATGGTGCCTGA-3′，下游引物：3′-TTCGTCGTGCTCAAGGTATG-5′，扩增产物大小为 253 bp。GAPDH 上游引物：5′-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3′，下游引物：5′-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3′ 产物大小为 443 bp，扩增条件为 94 ℃ 变性 5 min，94 ℃、56.5 ℃、72 ℃ 各 45 s；循环 35 次；72 ℃ 孵育 7 min，最后取 20 μl扩增产物于 1.6% 琼脂凝胶电泳。

1.5　重组腺病毒载体 AdWnt5a、AdGFP 的扩增、滴度测定及细胞转染

按文献[1]方法制备带有标记基因 GFP 的重组腺病毒 AdWnt5a 和 AdGFP，酶切质粒 pCMV-Wnt5a，获得目的基因片段，腺病毒质粒启动子 CMV 及 cDNA 未经过修饰。收集该病毒裂解液反复感染 HEK293 细胞，以扩增腺病毒载体：接种 HEK293 细胞于 250 ml 培养瓶中，在细胞汇合度达到 80% ~90% 时，加入腺病毒上清液 6 μl/每瓶感染 HEK293 细胞 24 h 后检测荧光，3 ~5 d后收集细胞，离心、反复冻融，收集细胞裂解液，测定病毒滴度。接种 CHO 细胞于 96 孔板（汇合度约 80%），每孔分别加入 1、3、5 μl AdWnt5a 和 AdGFP 细胞裂解液，24 h 后观察标记基因 GFP 荧光，比较 AdWnt5a 和 AdGFP 感染 CHO 细胞的荧光强度，以二者荧光强度相当的最小病毒用量之比为相对滴度。

1.6　Wnt5a 条件培养液的制备

接种 CHO 细胞于 24 孔板，使汇合度达 80%，分别加入 AdWnt5a 和 AdGFP 各 5 μl，培养 16 h 后检测荧光，并更换为无血清的 1640 培养液，24 ~48 h 收集培养液，-4 ℃ 保存，即为分泌 Wnt5a 蛋白的条件培养液和对照 GFP 的条件培养液。

1.7　条件培养液的浓缩及 Wnt5a 蛋白表达的检测

收集 AdWnt5a、AdGFP 条件培养液各约 4 ml，-80℃，1h 冻结后于低温冷冻干燥机中抽干浓缩至约 500 μl。BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒检测蛋白浓度。Western blot 检测：以总蛋白各为 40 μg 的浓缩样品上样于 15% SDS-PAGE 胶上，进行电泳分离，然后电转移至 PADF 膜，5% 脱脂奶粉封闭液 4 ℃ 封闭过夜，TBST 洗膜后，加 1∶500 稀释的一抗，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗去一抗后，加入 1∶7 000 稀释的二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗膜后，用增强型化学发光显色。

1.8　Wnt5a 对 K562 细胞的生长影响

用 Wnt5a 条件培养液制备 K562 细胞悬液，（0.5 ~1.0）× 10^5/ml 接种 24 孔板，2 ml/孔，另分别加 GFP 条件培养液和普通培养液为对照孔，每孔均设复孔，连续培养 1 ~5 d，用细胞计数板进行细胞计数，计算平均值，以生长时间为横坐标，细胞数量（$\times 10^5$/ml）为纵坐标绘制生长曲线。每组细胞计数的同时收集细胞进行台盼蓝染色，计算细胞存活率：细胞存活率（%）=（细胞总数 - 着色细胞数）/细胞总数 × 100%。

1.9　Wnt5a 对细胞形态的影响

分别用 Wnt5a 和 GFP 条件培养液处理 K562 细胞 1 ~6 d，每天收集细胞、离心涂片并行瑞氏染色，观察细胞形态。

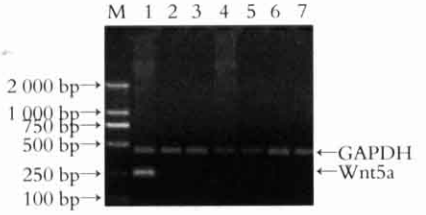
1.10　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

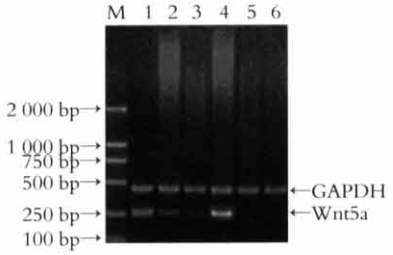
2.1　Wnt5a 在白血病标本中的表达

6 例 CML 标本中，Wnt5a 均不表达，5 例 AML 标本中，2 例 Wnt5a 未表达，2 例为弱表达，1 例完全缓解的病例 Wnt5a 表达强阳性，Jurkat 细胞也呈强阳性表达（图 1、2）。



M：标准；1：Jurkat 细胞为阳性对照；2 - 4：CML（外周血）；5 - 7：CML（骨髓）

图 1　RT-PCR 检测 6 例 CML 病例标本 Wnt5a 的表达

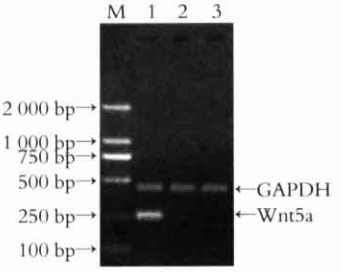


M：标准；1：Jurkat 细胞为阳性对照；2 - 5：AML（外周血）；6：AML（骨髓）

图 2　RT-PCR 检测 5 例 AML 病例标本中 Wnt5a 的表达

2.2　Wnt5a 在白血病细胞株中的表达

在 3 种细胞株中，Wnt5a 的表达情况为：Jurkat 细胞呈阳性，K562、HL-60 细胞表达均为阴性（图 3）。



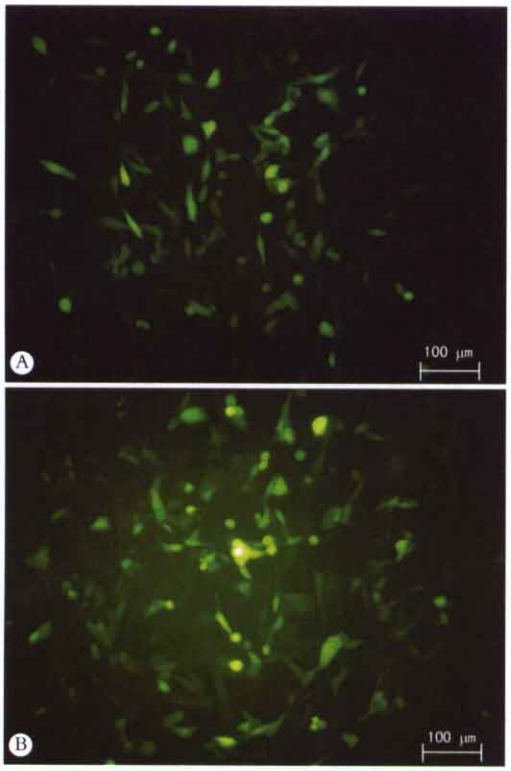
M：标准；1：Jurkat 细胞为阳性对照；2：K562；3：HL-60

图 3　RT-PCR 检测 4 种细胞株 Wnt5a 的表达

2.3　Wnt5a 条件培养液的成功制备

AdWnt5a 高效率感染 CHO 细胞 16 h 后有较强 GFP 荧光，

对照 AdGFP 感染 CHO 细胞也观察到 GFP 荧光，而未处理的 CHO 细胞无自发荧光(图4)。



A：AdGFP 感染 CHO 细胞；B：AdWnt5a 感染 CHO 细胞

图4 AdGFP 和 AdWnt5a 高效率感染 CHO 细胞的观察 (荧光显微镜)

2.4 条件培养液中 Wnt5a 蛋白表达的检测

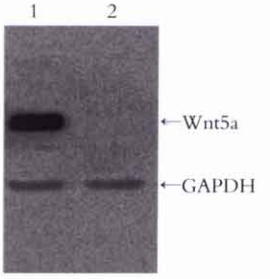
Western blot 检测结果，AdWnt5a 条件培养液浓缩后检测到 Wnt5a 蛋白的表达，出现清晰的特异性条带，而为对照的 AdGFP 条件培养液则未出现相应的条带(图5)。

2.5 Wnt5a 对细胞生长的影响

Wnt5a 条件培养液处理 K562 细胞 1～5 d，在第 4 天时，与空白组相比，出现 Wnt5a 明显抑制 K562 细胞增殖的现象($P<0.05$)，而对细胞活力的影响与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.6 Wnt5a 对细胞形态的影响

Wnt5a 条件培养液处理 K562 细胞 4～6 d，细胞形态发生了明显变化，与对照细胞比较(GFP 条件培养液处理的细胞或未处理的细胞)细胞体积缩小，核质比降低，核染色质浓缩，核仁减少或消失，有的核出现了凹陷，细胞有向成熟方向分化的趋势(图6)。



1：AdWnt5a 条件培养液；2：AdGFP 条件培养液

图5 Western blot 检测条件培养液中 Wnt5a 的表达



A：Wnt5a 条件培养液处理 K562 细胞；B：GFP 条件培养液处理 K562 细胞；C：未处理 K562 细胞

图6 Wnt5a 对 K562 细胞形态的影响 (瑞氏染色 ×1 000)

3 讨论

Wnt 蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白家族，迄今发现至少有 19 个家族成员，从果蝇到高等哺乳动物均具有高度的同源性和保守性，与胚胎发育和肿瘤的发生密切相关。Wnt5a 是 Wnt 家族成员之一，已发现多种肿瘤组织中 Wnt5a 表达上调，如原发性胃癌、食道癌和鳞状上皮癌[2-4]。而在某些肿瘤中 Wnt5a 表达下调或缺失，如乳腺癌、白血病，又认为 Wnt5a 可能有抑制肿瘤发生的作用[5,6]，Wnt5a 与肿瘤发生的关系至今不明。近来有报道推测 Wnt5a 有癌基因也有抑癌基因的作用，可能与它可开启或关闭多条信号通路有关，取决于与它与哪一种受体结合[5-7]。本研究结果显示：Wnt5a 在 90% 的急慢性粒细胞白血病和髓系白血病细胞株 K562、HL-60 中均表达缺失，而在完全缓解的病例中则有表达；用外源性的 Wnt5a 作用于 K562 时，则抑制了该细胞的增殖，并且形态上出现了分化表型，这些现象均表明 Wnt5a 的缺失可能与髓系白血病的发生有关，其可能在髓细胞白血病的发生中起到抑癌基因的作用，但确切的作用机制还有待进一步研究。该研究为探讨 Wnt5a 诱导 K562 向何系分化，以及它在髓系白血病的发生发展中的作用和机制的研究奠定了基础。

(致谢：感谢美国芝加哥大学医学中心何通川副教授的帮助！)

参考文献：

[1] 司维柯，何通川. 过表达外源性 CCN1 对人骨肉瘤细胞系 143B 生长和迁移的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2006，22(7)：565－570.

[2] Taki M，Kamata N，Yokoyama K D，*et al*. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells[J]. Cancer Sci，2003，94(7)：593－597.

[3] Saitoh T，Katoh M. Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer：up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells [J]. Int J Mol Med，2002，10(3)：345－349.

[4] Saitoh T，Mine T，Katoh M. Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer[J]. Int J Mol Med，2002，9(5)：515－519.

[5] Liang H，Chen Q，Coles A H，*et al*. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue[J]. Cancer Cell，2003，4(5)：349－360.

[6] Leris A C，Roberts T R，Jiang W G，*et al*. WNT5A expression in human breast cancer[J]. Anticancer Res，2005，25(2A)：731－734.

[7] Topol L，Jiang X，Choi H. *et al*. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation [J]. J Cell Biol，2003，162(5)：899－908.

（编辑　王小寒）

（上接 2055 页）

痛。本组患者使用的表阿霉素类、长春瑞滨新碱从表浅小静脉输注时最容易渗漏而发生静脉炎，长春瑞滨新碱与表阿霉素联用，静脉炎发生率高达 40.00%，其次为长春瑞滨新碱与紫杉醇联用，静脉炎发生率为 32.00%。如未及时处理，就会继续发展，甚至出现皮下坏死，增加患者痛苦。

2.1.4　药物浓度　　药物浓度越高，渗透压就越高，对血管内皮的损伤也就越大，血管通透性增加，引起药物渗漏。本组患者使用的表阿霉素类如吡柔比星和表柔比星，一般为 50～100 mg/m^2 加入 0.9% 氯化钠注射液 100 ml 中静滴，要求 10 min 内输完。故该药物浓度高，输注速度快，容易发生静脉炎。

2.2　防治对策

2.2.1　慎重选择血管，减少机械性损伤　　避免多次、反复、同一部位的静脉穿刺，根据药物刺激性大小、输液量多少选择血管，应选择血流速度快、走向直且粗大、远离关节和静脉瓣的血管进行穿刺，尽量不选用手背小静脉及前臂内侧静脉穿刺，禁止选用下肢静脉穿刺。对于血管条件差、不易一次穿刺成功者，采用头静脉、贵要静脉或颈外静脉留置针，必要时经外周中心静脉插管（PICC）或中心静脉插管（CVC）输液。本组患者选择颈外静脉留置针输注化疗药者占 40%，说明颈外静脉留置针在乳腺癌患者化疗药的输注途径中具有较强的优势，能有效减少静脉炎发生。

2.2.2　选择刺激性小的穿刺材料及使用精密过滤输液器　　目前用于静脉穿刺的材料有金属针和套管针（导管针）两种。浅静脉留置针或中心静脉导管以其套管（导管）柔软、不易穿破血管，不影响患者活动，在静脉内留置时间较长，避免反复穿刺带给患者痛苦等优点被广泛应用于临床，而使用精密过滤输液器可阻止大于 5 μm 的微粒进入血管。本组患者 65% 采用浅静脉留置针或中心静脉导管完成化疗，全部使用精密过滤输液器，减少了静脉炎发生。

2.2.3　降低药物浓度及血管通透性　　一方面将药物配制在等渗盐水或 5% 葡萄糖液中，以稀释药物而降低浓度，另一方面选择粗大静脉输注，药物进入血管后很快被稀释。若从远端静脉输注时，输液速度宜慢，使药物得到充分稀释，减少药物对血管壁的刺激及液体对血管壁的侧压力。化疗前后常规地塞米松 5～10 mg 加入等渗盐水 100 ml 中缓慢静滴，以降低炎症局部的毛细血管通透性，减轻渗出、肿胀。

2.2.4　神经阻滞　　静脉炎的发生与神经传导有关。可在静脉输入化疗药物前后输入利多卡因或局部外敷地卡因及局部皮下注射普鲁卡因，以防止静脉炎的发生和发展。在输液局部用 75% 酒精纱布湿敷，也可预防静脉炎的发生；酒精具有催眠和消毒防腐的作用，兼有局部麻醉及止痛功效[2]。酒精湿敷还可扩张局部血管，增强血液循环，改善血管内皮细胞功能。

2.2.5　冷湿敷　　早期使用冰袋或硫酸镁局部冷敷，一方面使血管收缩，减少药物的吸收、渗漏，减轻水肿；另一方面可抑制局部组织细胞活动，使神经末梢敏感性降低而减轻疼痛[3]。但严禁热敷，以免加重局部渗出，引起组织坏死，造成严重后果。24 h 后是否可热敷值得探讨。

2.2.6　使用解救剂　　化疗药物外渗早期采用静脉注入解救剂可阻止药物与细胞组织相结合，减少药物对组织的刺激损伤，尤其是采用静脉注射加局部或穴位封闭效果更好[4]。临床上常使用 0.25% 普鲁卡因围绕渗出部位作环形封闭，取得满意效果。

静脉化疗是乳腺癌综合治疗的重要环节之一。化疗药物具有毒性大、刺激性强等特点，输注过程中容易发生静脉炎。预防的关键在于选择合适的血管和刺激性小的穿刺材料以及降低化疗药浓度和预防渗漏。输注过程中严密观察局部反应，发现异常，立即停止输入，及时处理，主要采取冷湿敷、局部封闭，严禁热敷，避免出现严重不良后果，以确保化疗顺利进行。

关键词：乳腺癌；化疗；静脉炎

中图法分类号：R543.602　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 姜　军，唐　波. 外科医生对乳腺癌的综合治疗的理解[J]. 医学临床研究，2003，20(10)：748－751，785.

[2] 郝建红，高瑞平. 酒精湿敷预防静滴甘露醇所致静脉炎的研究[J]. 中华护理杂志，2001，36(5)：333－334.

[3] 杨伟贤. 静脉输注渗漏性损伤的防治近况[J]. 中华护理杂志，1997，32(9)：548－550.

[4] 张玉英. 静脉注射强刺激性抗癌药物渗漏的对策[J]. 实用护理杂志，1994，10(12)：22－23.

（编辑　陈聪连）