文章编号:1000-5404(2008)23-2229-04

论著

不同来源骨髓基质细胞微环境对 Jurkat 细胞生物学特性的影响

梁 雪,陈幸华,张 曦,孔佩艳,彭贤贵,高 蕾,王庆余 (第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

摘 要:目的 观察正常及急性淋巴细胞白血病骨髓基质细胞微环境对 Jurkat 细胞生物学特性的影响。**方法** 收集与正常及急性淋巴细胞白血病骨髓基质细胞微环境共培养 10 d 的 Jurkat 细胞,观测 Jurkat 细胞增殖、细胞周期分布、凋亡、分化及 DNR 摄药量的改变。**结果** 白血病骨髓基质细胞微环境对 Jurkat 细胞黏附、趋化及降低摄药量的作用强于正常骨髓基质细胞微环境;抑制增殖及促分化作用弱于正常骨髓基质细胞微环境。白血病骨髓基质细胞微环境抑制 Jurkat 细胞凋亡,而正常骨髓基质细胞微环境促进其凋亡。**结论** 正常骨髓源基质细胞微环境较白血病源骨髓基质细胞微环境对 Jurkat 细胞具有更强的促进凋亡、分化及抑制增殖的作用,增加 Jurkat 细胞对 DNR 的敏感性。

关键词: 骨髓基质细胞微环境;Jurkat 细胞;增殖;凋亡
中图法分类号: R73-351; R730.2; R733.71 **文献标识码:** A

Biological characteristics of Jurkat cells under microenvironment of normal or acute lymphoblastic leukemia bone marrow stromal cells

LIANG Xue, CHEN Xing-hua, ZHANG Xi, KONG Pei-yan, Peng Xian-gui, GAO Lei, WANG Qing-yu (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the influence of the bone marrow microenvironment of normal or acute lymphoblastic leukemia on biological characteristics of Jurkat cells. Methods We collected the Jurkat cells which had been co-cultured with bone marrow stromal cells from 6 cases of acute lymphoblastic leukemia, 2 cases of iron deficiency anemia, or 2 cases of idiopathic thrombocytopenic purpura for 10 d, and then observe the changes of Jurkat cells' proliferation, cell cycle, apoptosis, differentiation and daunorubicin (DNR) intake dose. Results Leukemia bone marrow stromal cells promoted Jurkat cells' adhesion, chemotaxis and reduction of intake dose than normal bone marrow stromal cells; but were weaker in inhibition of proliferation and promotion of differentiation. Leukemia bone marrow stromal cells inhibited Jurkat cells' apoptosis, and the normal bone marrow stromal cells promoted apoptosis. Conclusion The micro-environment of normal bone marrow stromal cells promote the apoptosis and differentiation, and inhibit the proliferation of Jurkat cells, in comparison with leukemia bone marrow stromal cells, and increase Jurkat cells' sensitivity to the DNR.

Key words: bone marrow stromal cells microenvironment; Jurkat cells; proliferate; apoptosis

骨髓基质由骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)及其分泌的细胞因子和细胞外基质构成,是支持和调节造血干细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的微环境。白血病发生时,不仅细胞外基质发生改变,骨髓基质细胞及其功能也发生改变,与白血病细胞耐药残留关系密切,是微小残留白血病(minimal residual disease,MRD)形成的重要因素[1,2]。而 MRD 是白血病难治和复发的主要根源,严重影响白血病的预后。本研究选取急性淋巴细胞白血病和非血液肿瘤(IDA、ITP)患者 BMSCs 模拟白血病患者及正常人体内骨髓微环境的功能,从而研究正常及白血病骨髓基质对 Jurkat 细胞生物学特性影响的差异,为进一步探讨通过改善造血微环境达到清除 MRD,减少白血病复发的可行性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10 份骨髓标本取自新桥医院血液科:初治急性淋巴细胞白血病患者 6 例;非血液肿瘤对照组 4 例,为缺铁性贫血(IDA)2

作者简介:梁 雪,女,河南省洛阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事造血微环境与血液系统疾病方面的研究。电话:(023)68755609,E-mail:liangxue77@yahoo.com.cn
通信作者:陈幸华,电话:(023)68755609
收稿日期:2008-05-23;修回日期:2008-07-25

例,特发性血小板减少性紫癜(ITP)2 例。主要试剂与仪器:RPMI1640 培养基、胎牛血清(Gibco 公司),马血清、1.077g/ml Ficoll(TBD),Annexin V 凋亡试剂盒(Coulter 公司),NBT、MTT、BSA(Sigma 公司)。人急性淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞购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 实验分组 实验分 3 组:Jurkat 细胞悬浮培养组,Jurkat 细胞与非血液肿瘤患者骨髓基质细胞共培养组,Jurkat 细胞与急性淋巴细胞白血病骨髓基质细胞共培养组。

1.2.2 BMSCs 分离培养及其与 Jurkat 细胞体外共培养 无菌条件下采集骨髓 1 ~2 ml,按常规方法用密度为 1.077 g/L 的 Percoll 分离液分离单个核细胞(mononuclear cell,MNC),0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后接种于含 12.5% FBS、12.5% 马血清及 1×10^6 mol/L 氢化可的松的 RPMI1640 培养基中。接种 48 h 后首次全量换液,之后 3 d 半量换液,细胞局部融合或全部融合达 80% ~90% 时用 0.25% 胰酶消化、吹打后按 1∶2 传代,约 80% 融合时采用 20 Gy ^{60}Co 照射以去除内源性造血细胞,消化、接种于预先置入盖玻片的 6 孔板内,约 80% 融合时接种对数生长期的 Jurkat 细胞。分别于共培养 24 h 及 10 d 时送检扫描电镜以观察二者间位相关系。

1.2.3 BMSCs 对 Jurkat 细胞黏附率及迁移率的测定

1.2.3.1 MTT 法检测细胞黏附率 0.25% 胰酶消化收集培养的正常和白血病 BMSCs,调整细胞数为 $1\times10^5\,ml^{-1}$,接种于 96 孔板,100 μl/孔,设定 3 个复孔,37℃、5% CO_2 孵育 24 h。接种 $1\times10^6\,ml^{-1}$ 的 Jurkat 细胞,100 μl/孔,继续孵育 24 h 后用 PBS 洗去未黏附的细胞,加入 5 g/L MTT 20 μl/孔,37℃ 孵育 4 h,吸去上清,加入 DMSO 150 μl/孔,震荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 处吸光度值[D(490)]。对照组仅加入 BMSCs,以 100 μl 培养基代替 Jurkat 细胞悬液。同时,取等量 Jurkat 细胞在上述培养条件下单独培养,加入 MTT 孵育 4 h 后离心去除上清,加入 DMSO 测定细胞总吸光度值[D(490)]。计算黏附率。

黏附率(%) = [测得 D(490) - 对照孔 D(490)/细胞总 D(490)] ×100%

1.2.3.2 transwell 法检测细胞迁移率 0.25% 胰酶消化收集培养的 BMSCs,调整细胞数 $1\times10^5\,ml^{-1}$,接种于 24 孔培养板,设定 3 个复孔,待细胞贴壁伸展铺满底壁 70% ~80% 时弃培养基,加入新鲜培养基 800 μl/孔,将预先水化 2 h 的 transwell insert 移入孔内。按 $1\times10^6\,ml^{-1}$ 接种 Jurkat 细胞,400 μl/孔,继续孵育 24 h 后取出 insert,用棉签蘸无血清的 1640 培养基擦拭除去 insert 内侧的 matrigel 及其表面的细胞,瑞氏染色后在 200 倍视野下观察,随机选取 5 个视野计数穿膜细胞数(numbers of cell permeating septum,NCS)。以穿膜细胞的数目表示 Jurkat 细胞的迁移率。

1.2.4 BMSCs 对 Jurkat 细胞增殖特性的影响 MTT 法绘制 Jurkat 细胞增殖曲线:将 Jurkat 细胞按 $1\times10^4\,ml^{-1}$ 接种于有或无 BMSCs($1\times10^4\,ml^{-1}$,培养 24 h)的 96 孔板内,200 μl/孔,设定 3 个复孔。对照组仅接种 BMSCs。每日固定时相点取 1 个 96 孔板,加入 5 g/L MTT,20 μl/孔,37 ℃孵育 4 h 后离心弃上清,加入 DMSO 150 μl/孔,震荡 10 min,酶标仪测定 D(490)值,绘制 Jurkat 细胞的增殖曲线。

Real-time Q-PCR 法检测 PCNA mRNA 表达:收集与 BMSCs 共培养 10 d 的 Jurkat 细胞及悬浮培养的 Jurkat 细胞,常规方法抽提总 RNA,逆转录为 cDNA 后,以 GAPDH 为内参,采用荧光 PCR 仪进行相对定量检测各组 Jurkat 细胞 PCNA mRNA 的表达。实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$,Ct 是检测到的荧光信号强度值[3]。

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{实验组目的基因} - Ct_{实验组管家基因}) - (Ct_{对照组目的基因} - Ct_{对照组管家基因})$

PCNA 上游 5′-TCATTACACTAAGGGCCGAAG-3′,下游 5′-TTCACCAGAAGGCATCTTTAC-3′; GAPDH 上游 5′-AGCCACATCGCTCAGACAC-3′, 下游 5′-GCCCAATACGACCAAATCC-3′。扩增条件:94 °C 5 min→94°C 30 s→65°C 30 s(后两步 40 个循环)→72°C 45 s(收集荧光信号)。

1.2.5 BMSCs 对 Jurkat 细胞周期的影响 收集悬浮培养及与 BMSCs 共培养 10 d 的 Jurkat 细胞,75% 乙醇固定后送检流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 BMSCs 对 Jurkat 细胞凋亡相关指标的影响 收集与 BMSCs 共培养 10 d 的 Jurkat 细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。bcl-2 及 bax mRNA 的表达:Bcl-2 上游 5′-CTGGTGGGAGCTTGCATCAC-3′,下游 5′-ACAGCCTGCAGCTTTGTTTC-3′;Bax 上游 5′-GCTGTTGGGCTGGATCCAAG-3′,下游 5′-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3′。内参、扩增条件及方法同前。

1.2.7 NBT 还原法检测 BMSCs 对 Jurkat 细胞分化的影响 收集各组 Jurkat 细胞,制悬、调整细胞数为 $1\times10^6\,ml^{-1}$,接种于 96 孔板内(100 μl/孔),设 5 个复孔,加入含 NBT 1.25 mg/ml 及 BSA 17 mg/ml 的 PBS 混合液(100 μl/孔),37 ℃孵育 2 h 离心去上清,加入 DMSO 150 μl/孔,震荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 处吸光度值[D(490)]以反映细胞分化程度,二者呈正相关。

1.2.8 BMSCs 对 Jurkat 细胞摄药量的影响 收集悬浮培养及与 BMSCs 共培养 10 d 的 Jurkat 细胞,制成 $10^6\,ml^{-1}$ 的细胞悬液,加入 DNR 1 μg/ml,37 ℃孵育 1 h,PBS 洗涤 2 次后流式细胞仪检测单个细胞内 DNR 含量,用相对荧光强度反映细胞的 DNR 摄药量。

1.3 统计学处理

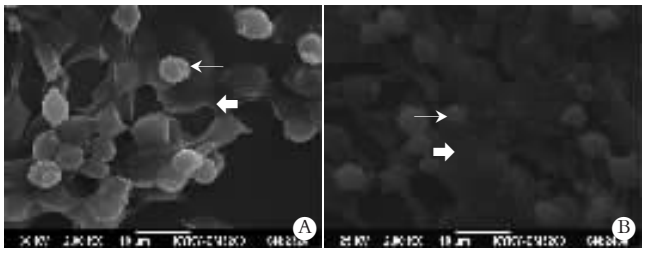
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 倒置显微镜 单独培养组 Jurkat 细胞呈悬浮生长,呈团分布;Jurkat 细胞接种于 BMSCs 细胞层后迅速黏附其上,在基质层细胞上呈集落样或团巢样生长,随着共培养时间延长 Jurkat 细胞逐渐嵌入 BMSCs 细胞间隙生长。

2.1.2 扫描电镜 共培养 24 h,Jurkat 细胞开始嵌入 BMSCs 细胞间隙,随着培养时间延长,Jurkat 细胞逐渐潜入 BMSCs 细胞层深部;共培养 10 d 时显示 Jurkat 细胞已完全潜入基质细胞层并呈团巢样生长(图 1)。



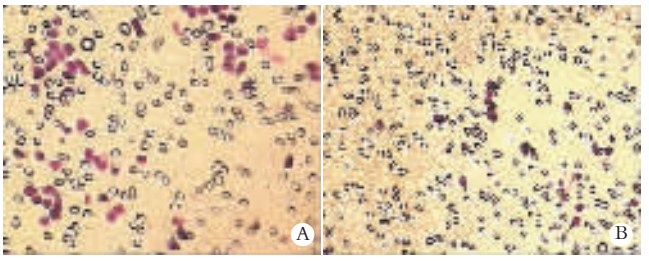
A:共培养 24 h;B:共培养 10 d
↑:Jurkat 细胞;⬆:BMSCs 细胞

图 1　扫描电镜观察 Jurkat 细胞与骨髓基质细胞共培养后的位相关系　(×2 000)

2.2　BMSCs 对 Jurkat 细胞的黏附率和迁移率

2.2.1　黏附率　　共培养 24 h,白血病 BMSCs 对 Jurkat 细胞的黏附率为(68.6 ±8.2)%,正常 BMSCs 对其黏附率为(53.4 ±7.8)%,两组间有显著差异($P<0.05$)。

2.2.2　迁移率　　白血病 BMSCs 共培养组 Jurkat 细胞 Transwell 穿膜细胞数(41 ±7),显著高于正常 BMSCs 共培养组(28 ±9)($P<0.05$)。提示白血病 BMSCs 对 Jurkat 细胞的迁移作用明显强于正常 BMSCs,两组间有显著差异(图 2)。



A:白血病骨髓基质细胞共培养组;B:正常骨髓基质细胞共培养组

图 2　共培养组 Jurkat 细胞 Transwell 迁移侵袭观察结果　(光镜×100)

2.3　Jurkat 细胞的增殖特性

2.3.1　Jurkat 细胞增殖曲线　　正常及白血病 BMSCs 与 Jurkat 细胞共培养,对其增殖具有抑制作用。正常 BMSCs 对其增殖的抑制作用强于白血病 BMSCs(图 3)。

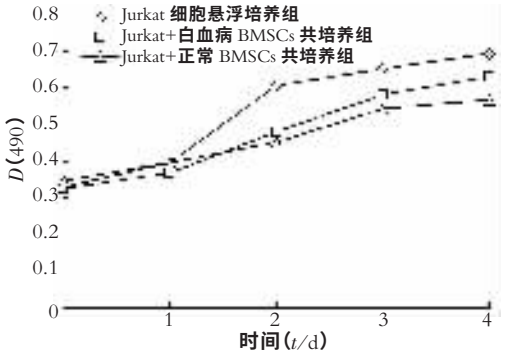


图 3　不同培养组 Jurkat 细胞增殖曲线

2.3.2　Jurkat 细胞 PCNA mRNA 的表达　　悬浮培养组 Jurkat 细胞 PCNA mRNA 表达水平是白血病 BMSCs 共培养组 Jurkat 细胞的 1.254 倍,是正常 BMSCs 共培养组的 1.629 倍。

2.4　Jurkat 细胞周期分析

各组 Jurkat 细胞周期情况见表 1。正常 BMSCs 可促 Jurkat 细胞进入细胞周期,G_0/G_1 期细胞比例降低($P<0.05$),S、G_2/M 期细胞比例增高($P<0.05$);白血病 BMSCs 使处于 G_0/G_1 及 G_2/M 期的 Jurkat 细胞比例增高($P<0.05$),S 期细胞比例降低($P<0.05$)。正常及白血病 BMSCs 共培养组处于 G_2/M 期的 Jurkat 细胞比例无显著差异($P>0.05$)。在各组细胞 G_0/G_1 期前均可见一亚二倍体凋亡峰。各组 Jurkat 细胞均出现超二倍体细胞,白血病 BMSCs 共培养组中超二倍体细胞比例(69.66 ±0.44)高于悬浮培养组(61.31 ±0.67);正常 BMSCs 共培养组中超二倍体细胞比例(49.16 ±0.82)最低($P<0.05$)。

表 1　各组 Jurkat 细胞周期中各阶段细胞百分比(%,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
悬浮培养组	54.41 ±0.11	44.72 ±0.25	0.87 ±0.36
白血病骨髓基质细胞共培养组	59.69 ±0.57[a]	33.39 ±1.12[a]	6.92 ±0.55[a]
正常骨髓基质细胞共培养组	42.17 ±0.58	49.82 ±1.92	8.01 ±1.34

a:$P<0.05$,与正常骨髓基质细胞共培养组比较

2.5　BMSCs 对 Jurkat 细胞凋亡相关指标的影响

2.5.1　凋亡率和死亡率　　经流式细胞仪检测发现各组均存在凋亡和死亡的 Jurkat 细胞。结果显示正常 BMSCs 可促使 Jurkat 细胞发生凋亡、死亡,白血病 BMSCs 使 Jurkat 细胞的死亡率、凋亡率降低($P<0.05$)(表 2)。

表 2　各组 Jurkat 细胞凋亡率和死亡率(%,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率	死亡率
悬浮培养组	4.27 ±0.63	3.57 ±0.49
白血病骨髓基质细胞共培养组	1.99 ±0.78[a]	2.04 ±0.38[a]
正常骨髓基质细胞共培养组	7.64 ±0.29	6.98 ±0.47

a:$P<0.05$,与正常骨髓基质细胞共培养组比较

2.5.2　Bcl-2 及 bax mRNA 的表达　　各组 Jurkat 细胞的 bax mRNA 表达无差异;悬浮培养组 Jurkat 细胞 bcl-2 mRNA 的表达高于与正常 BMSCs 共培养组(1.658 倍),而与白血病 BMSCs 共培养组高于悬浮培养组(1.291 倍)。

2.6　BMSCs 对 Jurkat 细胞分化的影响

正常及白血病 BMSCs 对共培养的 Jurkat 细胞均具有促分化作用,而正常 BMSCs 的诱导分化作用强于白血病 BMSCs。正常骨髓基质细胞共培养组、白血病骨髓基质细胞共培养组、悬浮培养组 Jurkat 细胞 D(490)值分别为 0.379、0.236、0.159。

2.7　BMSCs 对 Jurkat 细胞摄药量的影响

黏附 Jurkat 细胞的 DNR 摄药量明显低于悬浮培养的 Jurkat 细胞(129.49),其中,与白血病 BMSCs 共培养组 Jurkat 细胞的摄药量(98.56)低于正常 BMSCs 共培养组(115.47)($P<0.05$)。

3 讨论

骨髓造血微环境的异常是白血病发生和发展的重要原因,有助于庇护白血病细胞,使其异常增殖、分化和迁移,影响其对化疗药物的敏感性,在 MRD 的形成过程中发挥重要作用。因此,深入研究白血病骨髓微环境与正常骨髓微环境对白血病细胞生物学特性的影响,探索骨髓微环境与白血病细胞相互作用的机制,将有助于推动白血病的治疗。

白血病细胞与 BMSCs 共培养为研究白血病细胞与基质细胞、细胞外基质的复杂关系提供了良好的体外模型。体外分离培养非血液肿瘤(来自 IDA、ITP 患者)及急性淋巴细胞白血病患者 BMSCs 可以较真实的模拟正常人及白血病患者体内骨髓微环境的功能[4,5]。本实验将分离培养的 BMSCs 与人急性淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞共培养模拟骨髓微环境功能进行实验,光镜及扫描电镜观察可见 Jurkat 细胞黏附于 BMSCs 生长,并逐渐嵌入 BMSCs 层,BMSCs 层包裹 Jurkat 细胞形成"shelter"(庇护所)样结构,而白血病 BMSCs 对 Jurkat 细胞的黏附及迁移作用显著强于正常人 BMSCs。

本实验结果显示正常 BMSCs 较白血病 BMSCs 具有更强的抑制 Jurkat 细胞增殖和促进其分化的作用。相对于悬浮培养的 Jurkat 细胞,白血病 BMSCs 使共培养的 Jurkat 细胞出现 G_0/G_1 期阻滞现象[6,7],抑制其自发凋亡、死亡,同时其屏蔽作用降低了 Jurkat 细胞对 DNR 的摄药量,从而降低对化疗药物的敏感性,可对白血病细胞耐药及微小残留白血病的形成进行解释。既往研究也显示非直接接触共培养时 BMSCs 抑制白血病细胞的生长,出现 G_0/G_1 期阻滞现象[8];而正常 BMSCs 使更多的 Jurkat 细胞进入 S 期,促进其自发凋亡、死亡,较白血病 BMSCs 组 Jurkat 细胞对 DNR 的摄药量增多,增高对化疗药物的敏感性。

DNA 倍体改变在白血病细胞中很常见,超二倍体的检出率可高于 50%[9],急性白血病时 DNA 倍体改变在完全缓解后消失,复发时再现,对判断白血病细胞恶性程度、监测残留白血病、提示预后均具有重要价值,本实验研究显示,相对于白血病 BMSCs,正常 BMSCs 使 Jurkat 细胞超二倍体比例显著降低,使 Jurkat 细胞恶性程度降低。

Bcl-2 是细胞凋亡抑制基因,其表达可以阻断化疗药物等诱导的白血病细胞凋亡,其作用机制与阻断细胞凋亡最后共同途径有关;bax 是细胞凋亡活化基因,其发生突变、失活或明显减少有助于白血病的发生,bax 单独表达并不影响细胞凋亡,可调节 bcl-2 对细胞凋亡的作用,二者协调参与调节细胞的凋亡。本实验研究显示,与正常 BMSCs 共培养后的 Jurkat 细胞的 bcl-2 mRNA 表达水平明显低于与白血病 BMSCs 共培养后的 Jurkat 细胞;而其 bax mRNA 表达水平高于白血病 BMSCs 共培养组 Jurkat 细胞。

总之,白血病骨髓基质细胞微环境有助于白血病细胞的庇护、生长和逃避化疗药物的杀伤,而正常人骨髓基质细胞微环境可抑制白血病细胞增殖,促进其凋亡和分化和增加对化疗药物的敏感性。提示,通过改善造血微环境入手探索清除 MRD 的方法是值得尝试的方法,为白血病的治疗提供了一个新思路。

参考文献:

[1] Direkze N C, Jeffery R, Hodivala-Dilke K, *et al*. Bone marrow-derived stromal cells express lineage-related messenger RNA species [J]. Cancer Res, 2006, 66(3):1265 - 1269.

[2] Ge Y, Zhan F, Barlogie B, *et al*. Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival [J]. Br J Haematol, 2006, 133(1):83 - 92.

[3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[4] Wu S, Korte A, Kebelmann-Betzing C, *et al*. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of predinsolone on cytokine expression [J]. Leuk Res, 2005, 29(1): 63 - 72.

[5] Epperly M W, Cao S, Goff J, *et al*. Increased longevity of hematopoiesis in continuous bone marrow cultures and adipocytogenesis in marrow stromal cells derived from Smad3(-/-) mice [J]. Exp Hematol 2005,33(3): 353 - 362.

[6] Konopleva M, Konoplev S, Hu W, *et al*. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins [J]. Leukemia, 2002, 16(9): 1713 - 1724.

[7] 李忠俊, 陈幸华, 滕本秀, 等. 白血病骨髓基质细胞促进 Jurkat 细胞抗药物诱导凋亡研究[J]. 第三军医大学学报, 2005,27(21): 2121 - 2124.

[8] Firkin F C, Birner R, Farag S. Differential action of diffusible molecules in long-term marrow culture on proliferation of leukaemic and normal haemopoietic cells[J]. Br J Haematol, 1993,84(1): 8 - 15.

[9] Pui C H, Crist W M, Look A T. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 1990, 76(8): 1449 - 1463.

(编辑 龙 亮)