维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)03-0270-03

重组人白血病抑制因子对 HL-60 细胞的作用及机制研究

杜 冰[1], 朱道银[1], 唐恩洁[2]

(1.重庆医科大学基础医学院微生物学教研室,重庆 400016;2.川北医学院微生物学教研室,南充 637000)

【摘 要】目的:观察 rh-LIF 对 HL-60 细胞生长与分化的影响及其可能的作用机制。方法:不同剂量的 rh-LIF 作用 HL-60 细胞 3-6 天,观察细胞生长,流式细胞术分析细胞周期,用免疫组化法检测 P53,P21 蛋白表达的变化,原位杂交法检测 P53mRNA 表达水平的改变。结果:rh-LIF 可诱导 HL-60 细胞向单核/巨噬细胞分化,抑制 HL-60 细胞的增殖,使细胞停滞于 G_1 期;P53,P21 蛋白和 P53mRNA 表达明显增强。结论:rh-LIF 对 HL-60 细胞具增殖抑制和诱导分化作用,其作用机制可能与 G_1 期阻滞及 P53,P21 表达增高有关。

【关键词】重组人白血病抑制因子;诱导分化;生长抑制

【中国图书分类法分类号】R392.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-07-15

The impact of rh-LIF on HL-60 cell line

DU Bing, et al

(*Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the effect and mechanism of rh-LIF on proliferation and differentiation of HL-60 cell line. *Methods*: HL-60 cells were treated with different dosage of rh-LIF for 3 to 6 days, cell cycle was analysed by flow cytometry, expression of P53 and P21 protein were observed by immunohistochemistry and P53 mRNA were assayed by in situ hybridization. *Results*: HL-60 cell line could differentiate into monocyte and macrophage cell line in the presence of rh-LIF. The proliferation of HL-60 cells were inhibited in the presence of rh-LIF, the cells stagnated at G_1 stage, while expression of P53, P21 protein and P53 mRNA were increased obviously. *Conclusion*: The effects of rh-LIF on the proliferation and differentiation of HL-60 cells may be associated with the increase of P53, P21 protein and P53mRNA.

【Key words】 rh-LIF; Differentiation; Growth inhibition

白血病抑制因子(LIF)是体内一种天然的、多功能细胞因子,对白血病细胞有诱导分化和增殖抑制作用[1,2]。但 LIF 对白血病细胞细胞周期的影响及诱导分化的机制尚不清楚。本研究以 HL-60 细胞为靶细胞,采用细胞周期分析技术、免疫组化技术、原位杂交技术等方法,分析了 rh-LIF 作用前后 HL-60 细胞周期分布,P53,P21 蛋白和 P53mRNA 表达的变化,为深入探讨 rh-LIF 诱导 HL-60 细胞分化的分子机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂来源

人急性髓系白血病细胞 HL-60 细胞株由重庆医科大学肝病研究所馈赠,重组人白血病抑制因子购自 Chemicon,新生小牛血清购自华西生物研究所,MTT、佛波酯购自 Sigma,免疫组化染色 SP 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,鼠抗人 CD14、鼠抗人 P21 和鼠抗人 P53 单克隆抗体均购自北京中山生物技术有限公司,硝基蓝四氮唑(NBT)为上海市前进农场试剂厂产品,地高辛标记与检测试剂盒选自 BM 公司,Dig-P53-SN_3cDNA 探针川北医学院免疫学与分子生物学研究室提供。

1.2 细胞培养

人白血病细胞株(HL-60)由本实验室常规传代培养。

1.3 HL-60 细胞增殖抑制的测定

实验分 rh-LIF 处理组和未处理组,处理组 rh-LIF 剂量分别取 1U/ml、10U/ml、100U/ml、1000U/ml、3000U/ml、10000U/ml。采用 MTT 法检测细胞增殖状况。以 1×10^4 细胞/孔接种于 96 孔培养板,按分组要求,加入 rh-LIF 或无血清 RPMI1640 到各孔中,使终体积为 200μl,每个浓度组

作者介绍:杜 冰(1968-),女,讲师,
主要研究方向:病毒感染与免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

设 3 个平行孔，培养 5 天进行 MTT 测定。在自动酶标仪上测各孔的 A_{570nm}。按下列公式计算相对抑制率。

$$相对抑制率 = (1 - \frac{实验组\ OD\ 值}{对照组\ OD\ 值}) \times 100\%$$

1.4 细胞分化状况检测

(1)细胞形态学观察：采用 Wright - Giemsa 染色，光镜观察。

(2)细胞表面标志的检测：采用免疫组化法，观察药物作用前后 CD14 的表达。

(3)细胞功能的检测：采用 NBT 试验，参照 Kizaki 等[3]方法进行。油镜下随机计数 200 个细胞，计算阳性细胞的百分率。

1.5 细胞周期动力学检测

实验分 rh - LIF 处理组和未处理组，处理组 rh - LIF 剂量分别取 10U/ml、100U/ml、1000U/ml。药物处理后的 HL - 60 细胞培养 72h，分别收集各组细胞(>10^6 个)，70% 冷乙醇固定后，用流式细胞仪分析。

1.6 P53 和 P21 蛋白表达水平检测

第 6 天收集 rh - LIF(800U/ml)处理组和未处理组 HL - 60 细胞，离心涂片。采用免疫组化法观察 rh - LIF 作用前后 P53 和 P21 蛋白表达的变化。高倍镜下随机计数 200 个细胞，计算阳性细胞的百分率。

1.7 用原位杂交技术检测 P53mRNA 表达的检测

参照蔡文琴等[4]方法进行。第 6 天收集 rh - LIF (800U/ml)处理组和未处理组 HL - 60 细胞，离心涂片。4% 多聚甲醛固定 30min，用 Dig - P53 - SN_3cDNA 探针进行原位杂交，以不含探针的杂交液进行杂交孵育作为阴性对照。油镜下随机计数 200 个细胞，计算阳性细胞的百分率

1.8 统计学处理

样本均数间的比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 不同浓度 rh - LIF 对 HL - 60 细胞增殖的抑制作用

rh - LIF 剂量在 1U/ml - 1000U/ml 时，对 HL - 60 细胞具弱抑制作用，在 10000U/ml 时，对 HL - 60 细胞有明显的抑制作用($P<0.05$)，相对抑制率为 0.598(图 1)。

2.2 rh - LIF 对 HL - 60 细胞诱导分化作用

2.2.1 细胞形态的变化 800U/ml rh - LIF 作用 HL - 60 细胞 6d 后，形态上趋向成熟分化，表现为：胞浆增多，核浆比降低，核仁减少或消失，细胞核形态趋向单核/巨噬细胞改变。

2.2.2 细胞表面标志的变化 rh - LIF 作用前，HL - 60 细胞 CD14 表达阴性，800U/ml rh - LIF 作用 6d 后，25.9% 的细胞 CD14 表达阳性。

2.2.3 rh - LIF 对 HL - 60 细胞 NBT 还原能力的影响 800U/ml rh - LIF 作用 6d 后，31.1% 的细胞 NBT 还原反应呈阳性，与对照组(5.3%)相比，差异具有显著性($P<0.01$)。

2.3 rh - LIF 对 HL - 60 细胞周期的影响

rh - LIF 作用后，HL - 60 细胞 G_0/G_1 期比例增高(表 1)。

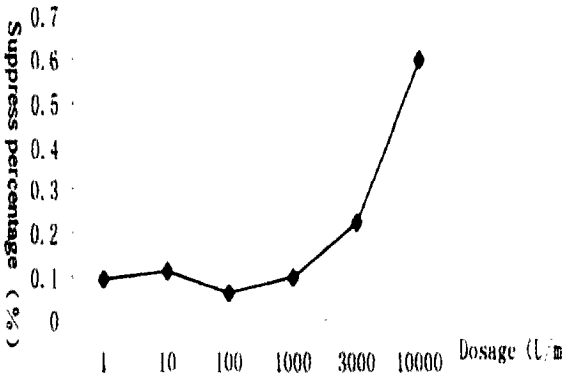


图 1 不同剂量 rh - LIF 对 HL - 60 的生长抑制作用

表 1 流式细胞仪对 HL - 60 细胞周期分析结果

组别	药物作用时间(h)	细胞周期分布(%)		
		G_0/G_1	S	G_2/M
Control	72	25.21	58.48	16.31
rh - LIF(10U/ml)	72	39.98	47.35	12.67
rh - LIF(100U/ml)	72	51.30	42.23	4.48
rh - LIF(1000U/ml)	72	54.11	42.76	3.13

2.4 P53、P21 蛋白表达

空白对照组P53 和P21 阳性细胞百分率为5.4% 和14%，rh - LIF 作用后，P53 和 P21 阳性细胞百分率分别增加至 25.4% 和 97.6%($P<0.01$)。

2.5 P53mRNA 测定

空白对照组P53mRNA 阳性细胞百分率为5.4%，rh - LIF 作用后，P53mRNA 阳性细胞百分率为 29.1%($P<0.01$)，表明 rh - LIF 作用后 P53mRNA 表达增加。

3 讨 论

1988 年，Hiton 等[5]从 kerbs 腹水瘤细胞的条件培养液中分离纯化到白血病抑制因子(LIF)后，国内外众多学者纷纷开始从分子遗传学、胚胎发生学、受体学、肿瘤学等方面展开对 LIF 的研究，发现其可调节多种细胞的生物活性。大量研究表明，LIF 是一种诱导分化或抑制白血病细胞克隆原性的糖蛋

维普资讯 http://www.cqvip.com

白调节剂和细胞增殖抑制剂，能够诱导某些白血病细胞分化、成熟，抑制人白血病细胞株 HL－60 细胞克隆生长，并诱导其向单核/巨噬细胞分化[6]。

本研究观察到经 rh－LIF 处理的 HL－60 细胞 NBT 还原反应增强，CD14 分化抗原表达增多，提示 rh－LIF 能诱导 HL－60 细胞向单核/巨噬细胞分化。MTT 法和细胞周期分析结果表明，经 rh－LIF 处理的 HL－60 细胞呈增殖抑制，细胞停滞于 G_1 期，提示 rh－LIF 抑制 HL－60 细胞分裂增殖或发生凋亡可能是由于肿瘤细胞被诱导分化为成熟的终末细胞时，停滞于 G_1 期，不能进入 S 期，细胞 DNA 合成受抑制，从而丧失增殖分裂能力。

P21 蛋白为 WAF1/CIPI 基因的编码蛋白，是目前已知的具最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白，可通过抑制 cyclin－CDK 复合物及增殖性细胞核抗原(PCNA)，导致 GI 期阻滞[7]。P53 是迄今发现的与人类肿瘤相关性最高的肿瘤抑制基因/细胞凋亡诱导基因。P53 与 P21 关系比较密切。当细胞 DNA 遭受损伤时，起 G1 期关卡作用的 P53 大量表达，继而激活 P21、GADD45 等下游靶基因转录，使细胞生长停滞于 G1 期[8]。本实验结果表示，rh－LIF 作用 HL－60 细胞后，P53，P21 蛋白和 P53mRNA 表达的阳性细胞百分率明显增加，提示 P53，P21 参与了 rh－LIF 介导的 HL－60 细胞周期阻滞。

目前认为 P21 的表达有两条途径：一是由 DNA 损伤激活的 P53 依赖途径，二是当细胞进入 G1 期时由促细胞分裂素激活的不依赖 P53 途径[7]。本研究结果显示，rh－LIF 可致 HL－60 细胞 P21 表达明显强于 P53 表达，提示 rh－LIF 不仅可通过 P53 依赖途径，亦可经 P53 非依赖途径刺激 P21 表达增加，表明 P21 是参与 rh－LIF 介导的 HL－60 细胞周期停滞的关键分子。

综上所述，rh－LIF 可通过致细胞停滞于 G1 期而抑制 HL－60 细胞分裂增殖。其作用可能与增加 HL－60 细胞的 P53 和 P21 表达密切相关，但 P21 和 P53 基因间的确切关系及相互作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Tomida M, Takenage K, Yamamoto Y, et al. Enhancement by double－stranded polyribonucleotides of production by cultured mouse peritoneal macrophages of differentiation－stimulating factors for mouse myeloid leukemic cells [J]. Biochem J, 1978; 176: 665－669.

[2] Tomida M, Yamamoto－Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic MI cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells [J]. J Biol Chem, 1984; 259(17): 10978－10982.

[3] Kizaki M, Dawson MI, Heyman R etal. Effect of novel retinoid X receptor－selective ligands on myeloid leukemic differentiation and proliferation in vitro [J]. Blood, 1996; 87: 1977－1983.

[4] 蔡文琴，王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994：406－409.

[5] Hilton D J, Nicola N A, Metcalf D. Purification and characterization of a murine leukemia inhibitory factory from kerbs ascites cells [J]. Anal Biochem, 1988; 173: 359－364.

[6] Maekawa T, Metcalf D. Clonal suppression of HL60 and U937 cells by recombinant human LIF in combination with GM－CSF or G－CSF [J]. Leukemia, 1989; 3(4): 270－276.

[7] 卓娅. 细胞周期调控基因－$P21^{CIPI-WAFI}$[J]. 国外医学. 分子生物学分册. 1998; 20(1): 6－9.

[8] Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, et al. Cell cycle expression and P53 regulation of the cyclin－dependent kinase inhibitor P21 [J]. Oncogene, 1994; 9(8): 2261－2268.