DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.030
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2158 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2158-04

阻抑正常骨髓基质SDF-1作用对HL-60细胞生物学性质的影响

魏 立,孔佩艳,陈幸华,彭贤贵,常 城,曾东风,刘 红,刘 林,王庆余,张 怡 (第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

提 要:目的 本研究通过应用抗$CXCR_4$单克隆抗体12G5抑制趋化因子SDF-1的生物活性,观察HL-60细胞生物学性质的变化,探讨SDF-1在维持HL-60细胞生存、增殖中的作用。方法 培养HL-60细胞并与正常骨髓基质细胞共培养,采用12G5阻断SDF-1生物作用,孵育2 h后观察对照组及单抗组HL-60细胞在骨髓基质层上的粘附情况,24 h后测定细胞粘附率;2、4、6、8 h应用台盼蓝排染法测定细胞存活率,MTT法检测HL-60细胞活力,流式细胞术观察HL-60细胞增殖周期变化。结果 ①12G5孵育后24 h,骨髓基质对HL-60的粘附率为(19.1±8.6)%,显著低于对照组。②单抗孵育后HL-60细胞存活率下降,且随单抗孵育时间延长而逐渐下降。③细胞活性下降。④12G5孵育2、6 h后,处于增殖周期中G_0/G_1期的细胞分别为(54.7±6.37)%,(55.1±7.04)%,而S期的细胞分别为(38.4±4.51)%,(37.1±4.08)%。结论 12G5可改变HL-60细胞的生物学特性,从而在一定程度上抑制白血病细胞的增殖,影响细胞生存。

关键词:SDF-1/$CXCR_4$;单克隆抗体;生物学性质;白血病
中图法分类号:R329.2;R392.11;R733.71 文献标识码:A

Effects of inhibition of SDF-1 activity in normal stromal cells on biological properties of human acute myelocytic leukemia cell line HL-60

WEI Li, KONG Pei-yan, CHEN Xing-hua, PENG Xian-gui, CHANG Cheng, ZENG Dong-feng, LIU Hong, LIU Lin, WANG Qing-yu, ZHANG Yi (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of chemokine SDF-1 in the maintenance of proliferation and survival of HL-60 cells and to observe the biological changes of HL-60 cells after SDF-1 activity was blocked by the monoclonal antibody (MoAb) of its receptor $CXCR_4$ (12G5). Methods HL-60 cells were cultured and co-cultured with normal marrow stromal cells. At 2 h after 12G5 incubation, the adhesiveness state was compared with that observed in the control group, and then cell adhesion rates were assayed in both groups at 24 h. At 2, 4, 6, and 8 h after incubation with 12G5, HL-60 cell survive rates and activities were detected by typan blue exclusion and MTT, respectively, while the cell cycles were observed by flow cytometry. Results ① Cell adhesion rate at 24 h was (19.1±8.6)% in the experiment group, significantly lower than that in the control group. ② Survive rate of leukemia cells decreased in a time-dependent manner. ③ Cell activity decreased, too. ④ HL-60 cells at G0/G1 phase at 2 and 6 h after 12G5 incubation were (54.7±6.37)% and (55.1±7.04)%, respectively, and cells at S phase were (38.4±4.51)% and (37.1±4.08)%, respectively. Conclusion 12G5 can change the biological properties of HL-60 cells and inhibit proliferation and survival of leukemia cells at a certain level.

Key words: SDF-1/$CXCR_4$; monoclonal antibody; biological property; leukemia

急性白血病经化疗诱导缓解后,少数残留白血病细胞仍可在髓内生存、增殖,成为复发的重要根源。骨髓基质细胞通过多种复杂的机制影响白血病细胞恶性克隆的迁移、选择、增殖、分化和凋亡。近年来研究表明,骨髓基质细胞分泌的基质衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及其受体$CXCR_4$在白血病细胞的迁移、浸润、粘附于骨髓微环境、抵抗化疗药物作用等方面起着重要的作用,可能参与髓内残留病变的形成[1]。因此,我们采用SDF-1受体$CXCR_4$的单克隆抗体12G5阻断SDF-1作用,观察急性髓细胞白血病细胞株HL-60细胞在正常骨髓基质层上的粘附情况,并对其粘附率、存活率、细胞增殖周期等相关指标进行了检测,以

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170396)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170396)
作者简介:魏 立(1975-),男,四川省泸州市人,硕士,主治医师,主要从事临床血液病方面的研究,发表论文8篇,现在西藏军区总医院内三科。电话:(023)68774668
通信作者:孔佩艳,电话:(023)68755627,E-mail:kongpeiyan@yahoo.com.cn
收稿日期:2003-10-23;修回日期:2004-05-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

探讨 SDF-1 对髓内白血病细胞生存、增殖的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本来源　　5 例骨髓标本取自本科, 为无骨髓转移的淋巴瘤或实体瘤患者、异基因骨髓移植供者及骨髓象正常的非白血病患者; HL-60 细胞由上海血液病研究所惠赠。

1.1.2　主要仪器设备　　流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, FACStar plus 型, 美国)、二氧化碳培养箱(SHELD-M2300 型 美国)、酶标仪(Biol-Tiok 公司, 美国)、倒置显微镜(Olympus 相差显微镜 日本)、超净工作台、台式低温离心机等。

1.1.3　主要试剂　　FITC 标记抗 $CXCR_4$ 单克隆抗体, 浓缩抗 $CXCR_4$ 单克隆抗体 12G5 (Ig2b447f7clone)、流式细胞仪同型对照 Ig2a(美国 R&D 公司), RPMI 1640、DMEM 培养粉(Gibco 公司), Ficoll(1.077 g/ml, 上海试剂二厂), 新生小牛血清(Hyclone 公司, -20 ℃冻存), 马血清(第三军医大学医学检验系临床检验学教研室, -20 ℃冻存), MTT、羊抗小鼠 IgG-FITC(Sigma 公司), bFGF(晶美生物试剂公司), 磷酸盐缓冲液(PBS)(北京中山生物技术公司)。

1.2　方法

1.2.1　基质细胞的分离、培养[2]　　新鲜采集骨髓 1 ml, 0.9% 生理盐水等倍稀释, 缓慢加入预先加有 2 ml 淋巴细胞分离液(Fico II)的试管内, 1 500~1 700 r/min, 15 min 密度离心, 吸取界面层细胞, 生理盐水 2 ml 洗涤、离心(2 000 r/min, 5 min), 接种于 25 ml 培养瓶内, 加入 DMEM 培养液 2~3 ml(含 10% 小牛血清、10% 马血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 mg/L), 在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养, 3 d 半量换液, 以后每周全量换液, 传代后接种于培养板。

1.2.2　HL-60 细胞培养　　培养体系为含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液, 培养方法同基质细胞培养, 传代后与融合的骨髓基质细胞共培养。

1.2.3　实验分组　　以骨髓基质细胞和 HL-60 细胞共培养体系作为基本实验体系, 分为对照组(不加 12G5)及实验组, 实验组共有 2 个浓度等级, 即 10 μg/ml 和 20 μg/ml 2 组。

1.2.4　12G5 孵育　　取接种有基质细胞的 48 孔板, 上述实验组每组 3 孔, 以初始浓度为 0.5×10^6/ml 接种 HL60 细胞悬液, 抗 $CXCR_4$ 单克隆抗体浓缩液以 10、20 μg/ml 2 种不同终浓度分别加入共培养体系, 37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育。

1.2.5　HL-60 细胞粘附情况观察及粘附率测　　HL-60 细胞(0.5×10^6/ml)接种于基质层, 实验组 20 μg/ml 12G5 共孵育, 2 h 后观察 HL-60 细胞的粘附情况。孵育 24 h 后, 用 PBS 洗去未粘附的细胞, 加入 MTT(5g/L), 37 ℃孵育 4 h, 吸去培养上清, 加入 DMSO 振荡 10 min, 酶标仪测定 A_{492} 值, 记为 A。取等量 HL-60 细胞同条件另行平行共培养, 加入 MTT 4 h 后, 离心去上清, 再加入 DMSO 测定细胞总 A_{492} 值, 记为 B。计算公式如下:

$$\text{粘附率}(\%)=\frac{A}{B}\times100\%$$

1.2.6　台盼蓝排染法活细胞计数　　分别取等量实验组和对照组的 HL-60 细胞加入等体积 0.2% 胎盼蓝染液, 血球计数板计数活细胞数, 着色者为死亡细胞。活细胞数与总细胞数的比值为细胞存活率。

1.2.7　HL-60 细胞活力测定　　采用 MTT 法检测。不同时相点共培养的 HL-60 细胞悬液加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl, 4 h 后加入 DMSO 振荡, 酶标仪检测, 每观察点重复 3 次, 取平均值。

1.2.8　细胞周期分析　　取不同时相点的共培养 HL-60 细胞制成细胞涂片, Wright 染色, PBS 清洗后, PI/AnnexinV-FITC 标记 10 min, 上机检测, 资料以随机软件(PHOENIXMulticycle3.11)收集、贮存和分析。

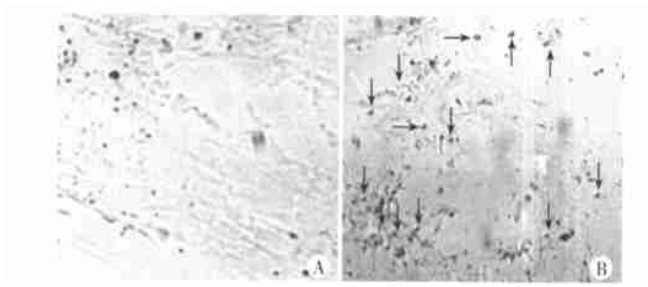
1.3　统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　12G5 对 HL-60 细胞粘附性的影响

2 h 后倒置显微镜下观察, 对照组可见散在 HL60 细胞粘附于基质层上, 而加入 20 μg/ml 12G5 孵育后, 基质层上未见细胞粘附(图 1)。24 h 测定 HL-60 细胞粘附率结果显示, 对照组中骨髓基质对 HL-60 的粘附率为(48.7±5.3)%, 而实验组仅为(19.1±8.6)%, 明显低于对照组, 二者具有显著差异($P<0.05$)。



A: HL-60 cells marked with arrows, no cells attached to normal marrow hypothallus incubated with 12G5; B: Some cells scattered on hypothallus before incubation

图 1　20 μg/ml 12G5 孵育前后 HL-60 细胞在正常骨髓基质层的粘附情况　(倒置显微镜×100)

Fig 1　Adhesion of HL-60 cells on normal marrow hypothallus before and after incubation with 12G5 (20 μg/ml)　(Inverted microscope×100)

2.2　加入 12G5 对 HL-60 细胞存活率的影响

台盼蓝排染法结果显示, 实验组 HL-60 细胞存活率均较对照组降低, 随着孵育时间延长, 存活率逐渐下降, 在孵育 6 h 后明显降低, 8 h 后达最低值。孵育 6、8 h 与对照组、孵育后 2、4 h 细胞存活率均有显著差异($P<0.05$)。此外, 结果统计显示, 20 μg/ml 组与 10 μg/ml 组在各时相点上的细胞活性无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

2.3　HL-60 细胞生长抑制曲线

不同浓度 12G5(10 μg/ml 和 20 μg/ml)作用于与正常骨髓基质细胞共培养的 HL-60 细胞, 根据 MTT 法测定细胞活性结果绘制 HL-60 细胞生长抑制曲线(图 2)。两条均曲线显示单抗孵育

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

4 h 前细胞活性下降缓慢，从 4 h 开始，细胞活性明显下降，于 8 h 降至最低。

表 1 不同浓度 12G5 对 HL-60 细胞存活率的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of anti-$CXCR_4$-MAb on survival rates of HL-60 detected with typan blue (%, $\bar{x}\pm s$)

Time after incubation	Concentration of anti-$CXCR_4$-MAb added (μg/ml)	
	10	20
Before incubation	75.5±2.9	75.5±2.9 *
2 h	71.3±3.1	68.5±4.2 *
4 h	66.5±2.5	62.7±3.6 *
6 h	49.4±4.4 #	44.1±3.4 #*
8 h	43.2±3.6 #	38.8±3.7 #*

#: $P<0.05$, *vs* value detected before and 2、4 hours after incubation;
*: $P<0.05$, *vs* 10 μg/ml group ($F=7.24$, $P=0.034$)

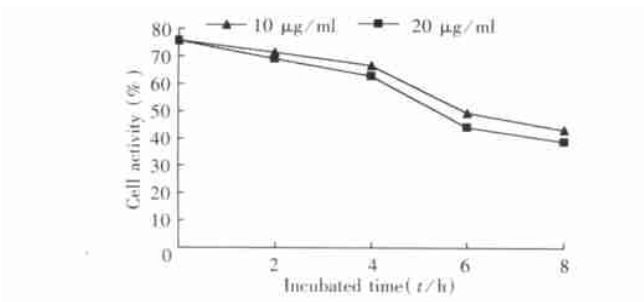


图 2 HL-60 细胞生长抑制曲线

Fig 2 Growth supression curve of HL-60 after addition of anti-$CXCR_4$-MAb

2.4 12G5 孵育后 HL-60 细胞周期变化

流式细胞仪测定结果显示（表 2），经 10 μg/ml 单抗孵育后，处于 G_0/G_1 期的 HL-60 细胞均比对照组显著增加（$P<0.05$），虽然处于 S 期、G_2/M 期的 HL-60 细胞较对照组有所下降，但无统计学意义（$P>0.05$）。

表 2 10 μg/ml 12G5 对 HL-60 细胞增殖周期的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of anti-$CXCR_4$-MAb on cell cycles of HL-60 cells (%, $\bar{x}\pm s$)

Time after incubation	G_0/G_1		S		G_2/M	
	0	10 μg/ml	0	10 μg/ml	0	10 μg/ml
Before incubation	43.5±5.98	—	43.8±3.04	—	8.97±4.58	—
2 h	—	54.7±6.37*	—	38.4±4.51	—	8.74±5.01
6 h	—	55.1±7.04*	—	37.1±4.08	—	8.55±4.98

*: $P<0.05$, *vs* value detected before incubation ($P=0.021$)

3 讨论

白血病细胞和骨髓基质之间的相互作用在残留白血病的形成方面有关键作用，骨髓微环境为残留白血病细胞继续生存提供了适宜的部位。SDF-1 属于趋化因子 CXC 亚家族，主要由骨髓基质细胞分泌产生，与其表达于白血病细胞表面的惟一受体 $CXCR_4$ 结合在调控骨髓微环境信号起着重要作用。因此，SDF-1/$CXCR_4$ 能否影响白血病细胞的生物学性质，如何影响，对于髓内残留病变的进一步研究有着重要的意义，因此，本研究着重探讨了抗 $CXCR_4$ 单克隆抗体（12G5）阻断 SDF-1 活性后对 HL-60 细胞粘附性、生物活性及增殖周期等的变化。

SDF-1 与白血病细胞膜上的 $CXCR_4$ 结合，可诱导白血病细胞快速转移到骨髓成纤维细胞层，并在其它粘附分子的协同作用下，选择性地定位于骨髓基质层，进一步增殖[3]，提示 SDF-1 能影响白血病细胞在骨髓微环境中的定位，继而维持白血病细胞生长的能力。在本实验中，我们应用浓度为 20 μg/ml 的 12G5 作用于正常骨髓基质层和 HL-60 的共培养体系，孵育 2 h 后倒置显微镜下观察结果显示，单抗组无白血病细胞粘附，24 h 后尚有极少 HL-60 细胞粘附于基质层上，其原因是虽然采用的中和抗体浓度较高，但基质层分泌其它细胞因子和粘附分子参与白血病细胞的粘附过程。比较 24 h 测定的粘附率，实验组为 19.1±8.6%，显著低于对照组，表明 12G5 能有效地阻止白血病细胞在正常骨髓基质层上的附着，从而阻断骨髓基质层对白血病细胞的生长支持作用，证实了 SDF-1 在白血病细胞向骨髓基质层迁移、粘附过程中具有重要作用。对于细胞粘附率的正确计算，应为共培养体系去除未粘附细胞后所测得的 A_{492} 值减去骨髓基质细胞的 A_{492} 值后与共培养体系细胞总 A_{492} 值的比例[4]，但在本实验中，由于单独测定骨髓基质细胞 A_{492} 值时易改变实验条件，因此我们仅采用所测得的 A_{492} 值与细胞总 A_{492} 值的比例代表细胞粘附率，虽然数值较实际粘附率偏高，但与实际粘附率具有相同的额意义，仍能有效地反映实验组与对照组之间的差别，即 12G5 对 HL-60 细胞粘附性的影响。

12G5 的作用使髓内白血病细胞失去骨髓基质层的有效支持，故推测白血病细胞的生长周期及活性将受到一定的影响，这一点在本实验中得到了证实。10、20 μg/ml 12G5 2 组在孵育 6 h 测得细胞存活率分别为（49.4±4.4）%和（44.1±3.4）%，8 h 为（43.2±3.6）%和（38.8±3.7）%，虽然两组之间无显著性差异，但明显低于对照组及孵育后 2、4 h 的测值。同样，经 10 μg/ml 单抗孵育，2 h 测定处于 G_0/G_1 期的 HL-60 细胞平均为（54.7±6.37）%，6 h 平均为（55.1±7.04）%，均比孵育前[平均为（43.5±5.98）%] 显著增加，处于增殖期的细胞减少。既往研究表明，对于克隆细胞，SDF-1 在 TPO 或 SCF 的协同下，能促进 G_0/G_1 期细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进入增殖期[5]。本实验结果显示, 12G5 阻断 SDF-1 生物活性后, 生长静止期细胞比例增高, 而处于增殖状态的细胞减少, 同时伴随细胞活力下降, 表明 12G5 的作用机制之一在于 SDF-1 作用受抑后, 骨髓微环境不能有效地维持细胞增殖周期, 促使更多的 HL-60 细胞进入生长静止状态, 抑制白血病细胞的增殖, 证实骨髓微环境中, SDF-1 在维持白血病细胞生存并进一步增殖过程中具有重要的生物学作用。对于其机制, 目前尚不清楚, 是否与白血病细胞周期相关蛋白的表达及内部信号传导的调节有关, 尚需要进一步证实。

本实验条件下, HL-60 细胞存活率在 12G5 10 μg/ml 组和 20 μg/ml 组之间并无显著的差异, 与既往研究结果相一致[6], 表明浓度为 10 μg/ml 的 12G5 即能有效地发挥中和作用, 增加浓度后其作用不再明显加强, 机制目前无相关报道, 可能是 10 μg/ml 浓度的 12G5 即能有效地封闭细胞表面的 $CXCR_4$。

从上述实验结果看出, 应用 12G5 阻抑 SDF-1 的生物学活性能显著地阻止白血病细胞在正常骨髓基质层上的粘附, 降低细胞粘附率, 促进细胞进入生长静止状态, 同时降低细胞活性。相关研究表明, 急性白血病细胞表面 $CXCR_4$ 表达较正常骨髓单个核细胞增高[7], 白血病骨髓微环境中 SDF-1 的浓度比正常骨髓基质明显增高, 与白血病细胞表面 $CXCR_4$ 表达上调及其向骨髓迁移、粘附的效应呈正相关[8], 同时 SDF-1 对白血病细胞的趋化作用与急性髓细胞白血病类型无关[9]。因此, 我们可以推测, 在白血病骨髓微环境中白血病细胞受到 SDF-1 的调节活性较正常骨髓基质为强, 抑制 SDF-1 的作用对白血病骨髓基质支持下的残留细胞生物学性质的影响应该具有与正常骨髓基质支持下的白血病细胞相似的效应, 但这一结论还需要实验证实, 也是我们下一步需要进行的工作。

总之, 通过本实验证实, 12G5 阻抑 SDF-1 活性后, 一方面残留白血病细胞粘附性下降, 失去基质层的支持, 另一方面细胞增殖周期阻止, 细胞活力下降, 从而改变了髓内白血病细胞的生物学性质, 并在一定程度上抑制白血病细胞增殖, 影响其生存。因此, 通过阻抑 SDF-1 活性, 改变白血病细胞的生物学特性, 有利于改造骨髓微环境、治疗残留病变的新的生物治疗策略的实施。

参考文献:

[1] Burger J A, Kipps T J. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(3): 461—466.

[2] 郭朝华, 罗成基, 孔佩艳, 等. 放烧复合伤小鼠骨髓基质细胞对粒-巨噬系祖细胞生长的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 1999, 7(1): 65—68.

[3] Bradstock K F, Makrynikola V, Bianchi A, *et al*. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers[J]. Leukemia, 2000, 14(5): 882—888.

[4] 王江方, 张学光, 张　毅, 等. 急性淋巴细胞性白血病及其骨髓基质细胞粘附分子表达和粘附行为的探讨[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(5): 290—294.

[5] Lee Y, Gotoh A, Kwon H J, *et al*. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines[J]. Blood, 2002, 99(12): 4307—4317.

[6] Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, *et al*. Overexpression of the chemokine receptor $CXCR_4$ in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell derived factor-1 (SDF-1)[J]. Leukemia, 1999, 13(12): 1954—1959.

[7] Mohle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, *et al*. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor $CXCR_4$ in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia[J]. Bri J Haematol, 2000, 110(7): 563—572.

[8] Voermans C, van Heese W P, de Jong I, *et al*. Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients[J]. Leukemia, 2002, 16(4): 650—657.

[9] Mohle R, Bautz F, Rafii S, *et al*. The chemokine receptor $CXCR_4$ is expressed on $CD34^+$ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell derived factor-1[J]. Blood, 1998, 91(12): 4523—4530.

（编辑　陈聪连）

欢迎订阅《预防医学情报杂志》

《预防医学情报杂志》创刊于 1985 年, 由中华预防医学会和四川省疾病预防控制中心共同主办, 是中华预防医学会系列杂志之一, 属国家级杂志。本刊主要报道疾病预防与控制、卫生监督与监测、健康教育、医学情报、临床流行病学等专业领域的新成果、新技术、新方法、新发现和新进展等。读者对象为从事疾病预防与控制、卫生监督与监测、健康教育、医学情报等专业人员和教学科研人员。主要栏目有: 论著、综述、述评、调查研究、健康教育、情报信息、实验室检测等。本刊为双月刊, 128 页, 每期 8.00 元, 全年 48.00 元。邮发代号 62—18, 欢迎广大读者积极到邮局订阅。

地　址: 四川省成都市槐树街 40 号《预防医学情报杂志》编辑部　　邮　编: 610031

联系人: 杨丹蓉　褚　斌

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net