DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.009
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1720 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1720-03

K562细胞影响BMSCs生长及MIP-1α表达的实验研究

邓 均,蒲晓允,张春雷,李招权,黄 辉,陈晓莉 (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 研究K562细胞在与正常骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)接触和隔离培养条件下对BMSCs生长特性及造血负调因子MIP-1α表达的影响。方法 加入K562细胞与BMSCs直接接触与用隔离膜两种方式培养,第2、4、7、12天观察BMSCs生长增殖情况;检测培养上清的MIP-1α含量和BMSCs中MIP-1αmRNA的表达;TUNEL法检测BMSCs的凋亡。结果 加入K562细胞培养后BMSCs在第12天时数量显著减少;接触培养BMSCs的凋亡在第4天后显著高于对照组($P<0.01$);MIP-1α水平升高到4 d与对照组有显著差异($P<0.01$);BMSCs胞浆MIP-1αmRNA阳性率升高到第4天后与对照组有显著差异($P<0.01$)。结论 K562细胞可抑制正常BMSCs生长,促进其凋亡,上调其MIP-1α的表达,可能是造成正常造血的抑制和白血病细胞导致造血微环境损伤的主要原因之一。

关键词:骨髓基质细胞;K562细胞;凋亡
中图法分类号:R329.24;R392.12;R733.7 文献标识码:A

Experimental investigation of the effects of K562 on the growth characteristics and the expression of negative regulatory factor MIP-1α of BMSCs

DENG Jun, PU Xiao-yun, ZHANG Chun-lei, LI Zhao-quan, HUANG Hui, CHEN Xiao-li (Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of K562 on bone marrow stromal cells (BMSCs) by observing the changes of the growth characteristics and the expression of negative regulatory factor MIP-1α of BMSCs. Methods BMSCs were cultured with K562 in isolation culture and contact culture. At 2, 4, 7, and 12 d after culture, the growth of BMSCs was observed using an optical microscope; the level of MIP-1α was measured by ELISA; the expression of MIP-1α mRNA in BMSCs was determined by *in situ* hybridization; the apoptosis of BMSCs was detected by TUNEL. Results The quantity of normal BMSCs was significantly lower at 12 d than that of the control. The apoptosis of BMSCs in contact culture was significantly higher than that in the control at 4 d after culture ($P<0.01$). The level of MIP-1α was significantly higher than that in the control at 4 d after culture ($P<0.01$). The positive rate of MIP-1α mRNA on normal BMSCs was significantly higher than that in the control at 4 d after culture ($P<0.01$). Conclusion K562 could inhibit the growth of BMSCs, induce the apoptosis, and upregulate the expression of MIP-1α, which may be one of the main factors resulting in injury of the hematopoietic microenvironment through the inhibition of normal hemopoiesis and leukemic cells.

Key words: bone marrow stromal cell; K562; apoptosis

白血病是发源于造血系统的恶性肿瘤,白血病患者体内不仅有造血细胞的恶变,造血微环境也出现异常。如淋巴系恶性变时,可以发现成纤维细胞减少,且有某些基质成分的缺失;研究也表明白血病也可以使BMSCs异常分泌多种细胞因子[1]。这些表明白血病细胞对造血微环境有显著损伤作用,但损伤的机制目前尚不清楚。本研究以K562细胞为实验材料,通过隔离和接触两种培养模式,观察其对正常BMSCs的生长特性、凋亡、造血负调因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源与培养

9例正常骨髓标本来源于西南医院和新桥医院血液内科临床标本。K562细胞株(慢性粒细胞白血病急性变细胞株)来自第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室。

用大鼠淋巴分离液(密度1.088)分离骨髓标本单个核细

作者简介:邓 均(1974-),男,四川省雅安市人,硕士,讲师,主要从事造血微环境负调控方面的研究。电话:(023)68752312

收稿日期:2003-06-23;修回日期:2003-12-11

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

胞, 接种于已放入小玻片的 12 孔培养板中, BMSCs 培养出现细胞间融合后, 加入 K562 细胞(终浓度为 5×10^4/ml)与 BMSCs 直接接触与用隔离膜两种方式培养, 总体积为 2 ml。以此为记时点, 在培养第 2、4、7、12 天进行检测。

1.2　实验分组

实验分 3 组。对照组(control): 两种细胞分别单独培养组; 隔离培养组(separated culture group, SCG): 指 BMSCs 和 K562 细胞之间有隔离培养器培养组; 接触培养组(contact culture group, CCG): 指 BMSCs 和 K562 细胞直接接触培养组。

1.3　BMSCs 生长情况的观察

对 BMSCs 的计数, 在目镜中放入 Miller 窥盘, 在高倍视野下计数大方格内的细胞数。

1.4　上清液 MIP-1α 的检测

用 ELISA 法检测, 严格按照说明书进行。以 A 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.5　BMSCs 中 MIP-1αmRNA 检测

用原位杂交法检测, 按原位杂交检测试剂盒说明书操作。阳性结果判断: MIP-1α 的检测中细胞胞浆出现紫黑色颗粒。计数 300 个细胞, 观察其细胞阳性表达率。细胞 mRNA 杂交信号反应强度分 5 级: (－)胞浆无反应; (＋)阳性反应占胞浆 1/4 面积; (2＋)阳性反应占胞浆 1/2 面积; (3＋)阳性反应占胞浆 3/4 面积; (4＋)阳性反应布满胞浆。

1.6　BMSCs 原位凋亡检测

操作步骤按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 细胞核较固缩呈棕黑色者为凋亡细胞。镜下计数 200 个细胞, 计算凋亡细胞比例。

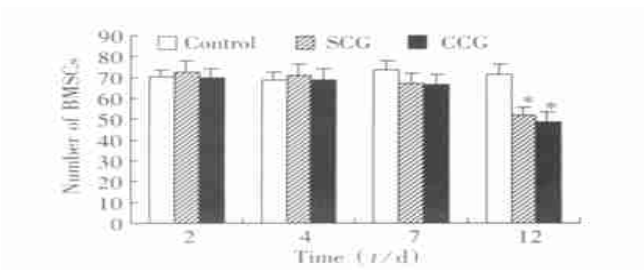
1.7　统计学处理

实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行双因素方差分析, 及组间多重比较。

2　结果

2.1　K562 细胞对 BMSCs 生长情况的影响

在加入 K562 细胞培养前正常 BMSCs 在第 7 天左右有集落形成, 在第 10 天左右集落之间融合, 加入 K562 细胞培养, 在 12 d 时相点细胞数量比对照组显著减少($P<0.01$), 见图 1。



*: $P<0.01$, *vs* control

图 1　正常 **BMSCs** 细胞计数结果

Fig 1　Count of normal BMSCs

2.2　培养上清液 MIP-1α 的表达

正常 BMSCs 与 K562 细胞培养上清液 MIP-1α 的检测结果表明, 单独培养的 K562 细胞中不能检测出 MIP-1α。正常 BMSCs 与 K562 细胞隔离和接触培养时, MIP-1α 水平都上升到第 4 天就与对照组有显著差异($P<0.01$), 见表 1。

表 1　正常 **BMSCs** 培养上清 **MIP-1α** 水平(μ**g/L**, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Level of MIP-1α in normal BMSCs supernatant

(μ**g/L**, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	2 d	4 d	7 d	12 d
Control	18.04±1.85	19.08±1.26	18.55±2.13	17.48±1.22
SCG	20.17±1.60	25.76±2.12**	26.29±2.01**	28.96±2.40**
CCG	21.56±2.09*	26.83±3.02**	30.82±1.66**##	32.69±2.01**##

$F_g=75.075$, $P=0.000$; $F_t=17.904$, $P=0.000$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* SCG

2.3　正常 BMSCs 内 MIP-1αmRNA 水平检测

检测 300 个细胞, 正常 BMSCs 与 K562 细胞培养时, MIP-1αmRNA 阳性率升高到第 4 天与对照组有显著差异($P<0.01$), 第 4 天以后各时相点间无显著差异($P>0.05$), 表达强度随阳性率的升降而变化, 见表 2。

表 2　正常 **BMSCs** 内 **MIP-1α mRNA** 水平表达(%, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of MIP-1α mRNA in normal BMSCs (%, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time of culture (d)			
	2	4	7	12
Control	29.8±2.48	31.4±1.88	30.3±2.41	32.5±2.43
SCG	33.7±2.25	40.5±3.25**	42.5±2.35**	41.5±1.16**
CCG	34.3±2.75*	42.6±1.86**	53.7±3.47**#	62.4±5.00**##

$F_g=116.576$, $P=0.000$; $F_t=36.235$, $P=0.000$; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* SCG

2.4　K562 细胞对 BMSCs 凋亡的影响

TUNEL 法检测结果显示: 凋亡阳性细胞染色细胞核呈棕黑色, 核固缩, 有的不规则、核脱出等。计数 200 个细胞中的阳性细胞, 隔离培养时 BMSCs 凋亡与对照组没有显著差异($P>0.05$), 接触培养时, 第 4 天后 BMSCs 的凋亡显著高于对照组($P<0.01$), 见表 3。

表 3　正常 **BMSCs** 凋亡率结果(%, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Results of apoptosis of normal BMSCs (%, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Group	2 d	4 d	7 d	12 d
Control	4.3±0.76	4.7±1.60	6.0±1.32	6.3±1.26
SCG	5.2±1.04	5.3±0.76	7.0±0.50	6.8±1.15
CCG	4.8±0.76	7.5±1.00**#	11.0±1.32**##	10.3±1.76**##

$F_g=22.747$, $P=0.000$; $F_t=16.426$, $P=0.000$; **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* SCG

3　讨论

造血微环境主要由基质细胞(stromal cells)、细胞

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

外基质(extracellular matrix)、造血生长因子(hematopoietic growth factor)和神经、血管4部分组成[2]。BMSCS对造血细胞的生成是十分重要的,与白血病的发生、发展有密切的关系。人们以往对白血病的研究多集中在白血病细胞的生物学特性的研究上,而白血病时BMSCs的改变研究较少,白血病细胞和BMSCs相互作用关系的研究也不多见。为了研究白血病细胞与BMSCS的相互间作用,尤其是白血病细胞对BMSCS生物学特性的影响,本研究从BMSCS的生长情况、细胞凋亡及其造血负调控因子表达等方面探讨了白血病细胞对正常BMSCS和慢粒BMSCS生物学特性的影响。

本实验中隔离培养器的作用为隔离两种细胞使其不能直接接触,但可溶性细胞因子可以自由通过,并对细胞产生作用。可见:隔离培养中只有可溶性细胞因子作用于细胞;接触培养中则有可溶性细胞因子与直接接触效应两种因素作用于细胞。

多种细胞,包括中性粒细胞、单核细胞、活化T细胞、肥大细胞、成纤维细胞及某些肿瘤细胞有分泌MIP-1α的潜能[3]。本实验中MIP-1α在肿瘤细胞K562细胞单独培养时检测不出来,可能是MIP-1α水平太低,低于ELISA检测最低限。研究表明MIP-1α无论在体外实验还是在体内对血细胞的生成都有直接影响,能抑制造血干细胞或早期的祖细胞,对晚期造血祖细胞无明显抑制作用[4]。而对白血病细胞是否有抑制作用,则说法不一,很多学者认为没有直接抑制作用,因此有学者想利用MIP-1α使造血干祖细胞处于静止期,在化疗时,白血病细胞充分被杀伤,正常造血干祖细胞得到保护,来进行临床治疗[5]。本实验证明了隔离培养时由于受白血病细胞的间接刺激,基质细胞在短期内上调MIP-1α的分泌。而在接触培养中这种上调作用是得到加强。造血负调控因子产生和分泌步调是大致相同,在白血病细胞两种影响因素(间接和直接)作用下MIP-1α处于高分泌状态,证明了这两种因素都具有上调MIP-1α表达的作用,这可能是白血病病人正常的造血受到严重抑制的一个重要原因,这样也间接促进了白血病细胞的生长[6]。

本实验中观察到在正常BMSCs加入K562细胞培养前,BMSCs在第7天左右有集落形成,在第10天左右集落间融合。正常BMSCs与K562细胞培养只在第12天时相点细胞数量显著减少,在第12天时接触培养组细胞比隔离培养组减少的更显著。本实验显示了加入K562细胞与BMSCs培养后影响了BMSCs的生长,其中细胞因子的间接因素和白血病细胞的直接接触因素都能抑制BMSCs的生长。

本实验依据凋亡的发生原理,利用末端标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡的发生,并在镜下观察和记数凋亡细胞比例。正常BMSCs与K562细胞培养时,正常BMSCs的凋亡呈上升趋势,接触培养中凋亡更明显。表明BMSCs与白血病细胞培养后受其影响,DNA断点增加,即凋亡增加,表明加入K562细胞培养,尤其是直接接触的方式培养,肿瘤细胞干扰其DNA合成。有研究证明,经GM-CSF诱导的骨髓基质细胞Fas分子呈高表达,经肿瘤抗原刺激后FasL的表达明显增高,表明抗原刺激后骨髓基质细胞的凋亡可能是通过自身Fas/FasL途径诱导发生的[7]。但基质细胞凋亡的具体原因研究比较少[8,9],本实验证明BMSCs加入白血病细胞培养后,受到白血病细胞的影响,表现在DNA断点增加,即凋亡增加,直接接触因素下,凋亡进一步加强。这可能是白血病细胞导致造血微环境损伤的主要原因之一。以上研究有助于阐明白血病细胞导致造血微环境损伤机制,为深入认识白血病的病理生理过程及临床诊治提供新的思路。

参考文献:

[1] Jiang H, Sugimoto K, Sawada H, *et al*. Mutual education between hematopoietic cells and bone marrow stromal cells through direct cell-to-cell contact: factors that determine the growth of bone marrow stroma-dependent leukemic (HB-1) cells[J]. Blood, 1998, 92(2): 834-841.

[2] Enzan H, Himeno H, Iwamura S, *et al*. Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1994, 19(4): 895-903.

[3] Scarpino S, Stoppacciaro A, Ballerini F, *et al*. Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3): 831-837.

[4] Su S, Mukaida N, Wand J, *et al*. Inhibition of Immature eryrthroid progenitor cell proliferation by macrophage inflammatory protein-1 alpha by interacting mainly with a C-C chemokine receptor, CCR1[J]. Blood, 1997, 90(2): 605-611.

[5] 陆 华, 潘 静, 李招权, 等. 小剂量MIP-1α联合IL-8体外对人骨髓造血细胞集落形成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 202-204.

[6] Nomura K, Okamoto T, Nakao M, *et al*. Multiple bone lesions after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with relapsed adult acute lymphoblastic leukemia: minimal residual disease analysis may predict extramedullary relapse[J]. Leuk Lymphoma, 2001, 42(6): 1305-1308.

[7] 张明徽, 陶 群, 曹雪涛. 骨髓基质细胞对白血病细胞的直接抑制作用及其机制探讨[J]. 中华血液学杂志, 1999, 20(6): 317-318.

[8] Lagneaux L, Delforge D, Bron D, *et al*. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells[J]. Blood, 1998, 91(7): 2387-2396.

[9] Wang J S, Shum T D, Chedrawy E, *et al*. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122(4): 699-705.

(编辑 栾 嘉)

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