DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.022
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0455-04

论著

IL-6及其与其他细胞因子联合应用对白血病细胞体外增殖的影响

胡 波[1],孔祥英[1],杨 科[2],王 鑫[2],巩伟丽[2] ([1]第三军医大学附属西南医院儿科,重庆 400038;[2]北京军区总医院血液内科,北京 100700)

提 要:目的 观察IL-6对急性白血病原代细胞体外生长的作用。方法 应用MTT、CFU-L及间接免疫荧光法以IL-6及其与其他细胞因子联合应用对18例急性白血病患者骨髓细胞的作用进行观察。结果 IL-6体外单独应用对急性白血病原代细胞无明显促增殖及诱导分化作用,但与G-CSF联合应用则常可抑制原代白血病细胞增殖。结论 IL-6与G-CSF联合用于化疗、放疗后的骨髓抑制可能更为安全。

关键词:白细胞介素-6;急性白血病;骨髓细胞
中图法分类号:R730.51;R733.71 文献标识码:A

Effects of interleukin-6 and its combination with other cytokines on the primary leukemic cells *in vitro*

HU Bo, KONG Xiang-ying, YANG Ke, WANG Xing, GONG Wei-li (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of recombinant interleukin-6 (rIL-6) and its combination with other factors on the growth of primary leukemic cells *in vitro*. Methods The effects of rIL-6 and its combination with G-CSF on the growth of primary leukemic cells collected from 18 cases of acute leukemia were observed with MTT, CFU-L and indirect immunoflorescent technique. Results rIL-6 exerted no obvious effects on the proliferation or differentiation of the primary leukemic cells *in vitro* but the combination of rIL-6 and G-CSF was able to inhibit those leukemic cells. Conclusion The co-administration of IL-6 and G-CSF might be more safe to inhibit bone marrow after the patients with acute leukemia are treated with chemotherapy and radiotherapy.

Key words: interleukin-6; acute; leukemia; primary cell

研究发现,白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)可抑制人或小鼠髓系白血病细胞系(如U_{937}、M_1和WEHI-3B细胞)的增殖,并诱导其向巨噬细胞、粒细胞方向分化[1],但亦有不同意见,Hoang和Takanashi等均发现IL-6可促进部分白血病细胞增殖[2]。我们观察了IL-6对急性白血病原代细胞体外增殖、分化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

IL-6:活性1×10^6 U/mg蛋白(军事医学科学院提供),白细胞介素-3(IL-3):50μg/ml(北京医科大学),粒细胞集落刺激因子(G-CSF)150 μg/mg(日本麒麟公司),粒—单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)150 μg/mg(军事医学科学院)。噻唑蓝(MTT)和羊抗鼠IgG荧光抗体购自邦定公司,鼠抗人CD抗体购自中国医学科学院血液研究所。

1.2 研究对象

18例患者,其中急性淋巴细胞白血病(ALL)2例,急性非淋巴细胞白血病(ANLL)13例,慢性粒细胞白血病(CML)急性变2例,骨髓增生异常综合症(MDS)转为急性白血病1例,诊断按1986年全国白血病诊断分型标准[3],FAB分型,见表1。

1.3 IL-6及其与其它细胞因子联合应用对白血病细胞集落(CFU-L)形成的作用

取白血病患者骨髓,参照文献[4],常规法分离白血病细胞,按2×10^5/ml细胞浓度于6孔培养板(Costar)中做琼脂半固体培养,阴性对照不加细胞因子,阳性对照加白细胞条件培养液(PHA-LCM),终浓度10%;其余各组分别加入单独或IL-6与不同细胞因子的组合,培养10 d,计集落数。

作者简介:胡 波(1960—),女,北京市人,硕士,主治医师,主要从事IL-6对白血病原代细胞体外生长作用方面的研究,现在北京军区总医院血液内科。电话:(010)66721629-88067

收稿日期:1999-02-26;修回日期:1999-12-22

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

表 1 IL-6 对白血病细胞体外增殖的作用

Tab 1 The effect of IL-6 on proliferation of leukemic cells *in vitro*

CFU-L Patient No.	FAB[1]	Phenotype[2]	D_{λ}					
			IL-6 10 ng/ml	Control	IL-6 50 ng/ml	Control	IL-6 10 ng/ml	Control(%)
1	ALL-L_2	CD_5 25, CD_{10} 95	0.337	0.317			1.33	1.33
2	ALL-L_2	CD_2 90, CD_9 88, CD_{10} 85	0.454	0.450	0.483	0.450	6.33	6
3	CML-C[3]		0.327	0.236	0.228	0.236	0	0
4	CML-C	CD_9 90	0.366	0.391			0	0
5	LT-MDS[4]		0.327	0.311			0	0
6	AML-M_1	CD_{15} 23, CD_{33} 57	0.190	0.202	0.191	0.202	38.5	35.33
7	AML-M_1	CD_{34} 37	0.500	0.522	0.475	0.522	38.67	37
8	AML-M_2	CD_{13} 88, CD_{33} 95, CD_{34} 57, HLA-DR 77	0.341	0.366			37	38.67
9	AML-M_2	CD_{13} 87, CD_{15} 37, CD_{33} 49, CD_{34} 64	0.354	0.406			24	35.33
10	AML-M_2	CD_{15} 40, CD_{34} 24	0.373	0.388	0.376	0.388	85	84
11	AML-M_2	CD_{13} 32, HLA-DR 24	0.355	0.276	0.248	0.276	27	24
12	AML-M_2	CD_{13} 92, CD_{33} 90, CD_{13} 71			0.508	0.371	33.67	30
13	AML-M_3	CD_{13} 71			0.287	0.215	18.33	18.67
14	AML-M_4	CD_{13} 52, CD_{14} 57, CD_{15} 34	0.234	0.251	0.267	0.251	21.67	33.33
15	AML-M_5	CD_{38} 96, HLA-DR 97, CD_{13} 99, CD_{33} 62, CD_{15} 37, CD_{34} 44	0.300	0.289	0.280	0.289	27.33	43
16	AML-M_5	CD_{13} 37, CD_{14} 44	0.297	0.289	0.284	0.289	37	39.5
17	AML-M_5 R[5]		0.447	0.431			0	0
18	AML-M_6	CD_{15} 32	0.431	0.448	0.434	0.448	22.5	18.33
$\bar{x}\pm s$ (n)			0.352±0.080 (16)	0.348±0.090 (16)	0.338±0.111 (12)	0.328±0.105 (12)	23.241±21.362 (18)	24.694±21.908 (18)

Abbreviation: 1. FAB: French-American-British; 2. Date are shown as the positive markers≥20%; 3. CML-C: Chronic myeloid leukemia crisis; 4. LT-MDS: Leukemia transformation from myelodysplstic symdrome; 5. AML-M_5 R: AML-M_5 relapse

1.4 MTT 法测定细胞增殖情况

常规法分离白血病细胞，参照文献[4]，按 5×10^5/ml 细胞浓度，接种于 24 孔培养板(Costar)，分别加 IL-6 及其与不同细胞因子组合，对照组不加细胞因子，培养 72 h，用 MTT 法[5]，测 D_{570} 值。

1.5 IL-6 对白血病细胞的分化诱导作用

将与 IL-6 共同培养 72 h 后的细胞进行常规瑞氏染色和免疫分型(间接免疫荧光法)[6]，观察细胞形态、细胞表面抗原表达的变化。

1.6 统计学处理

采用配对计量资料 t 检验。

2 结果

2.1 IL-6 对急性白血病细胞体外增殖的影响

MTT 法检测 D_{570} 值，IL-6 10 ng/ml 组或 50 ng/ml 组与对照组相比，均无统计学意义，见表 1。IL-6+GM-CSF 组、IL-6+IL-3 组及各单因子组分别与对照组相比，无统计学差异；但 IL-6+G-CSF 组与对照组相比，D_{570} 值降低，有统计学意义($P<0.05$)，见表 2。

IL-6 对 CFU-L 集落形成的作用：IL-6(10 ng/ml)+PHA-LCM 组与阳性对照组相比，CFU-L 集落数目及大小均无明显差异，见表 1。IL-6 与其它生长因子组合时，因实验例数少，各组集落数呈非正态分布，故未做统计学处理。

表 2 IL-6 及其与其它细胞因子合用对白血病细胞的作用(D_{570})

Tab 2 Effect of IL-6 or combination with other cytokines on leukemic cells(D_{570})

Patient No.	IL-6	G-CSF	G-CSF+IL-6	GM-CSF	GM-CSF+IL-6	IL-3	IL-3+IL-6	Control
9	0.354	0.396	0.338	0.403	0.401	0.421	0.431	0.406
4	0.366	0.393	0.332	0.387	0.370	0.423	0.459	0.391
7	0.500	0.504	0.502	0.530	0.497	0.414	0.483	0.522
10	0.373	0.367	0.370	0.456	0.417	0.474	0.468	0.388
18	0.431	0.485	0.410	0.532	0.470	0.462	0.520	0.448
$\bar{x}\pm s$ (n)	0.405±0.061 (5)	0.429±0.061 (5)	0.390±0.070* (5)	0.462±0.068 (5)	0.431±0.052 (5)	0.439±0.027 (5)	0.472±0.033 (5)	0.431±0.056 (5)

*: $P<0.05$ *vs* control cultures

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

2.2　IL-6 对白血病细胞的诱导分化作用

加 IL-6 培养 72 h 的原代白血病细胞形态及表面抗原表达较对照组无明显变化, 见图 1、2, 提示 IL-6 无诱导分化作用。但有 3 例可见细胞核变小, 染色质变粗, 胞浆内出现颗粒, 见图 3、4, 似有向成熟分化的趋势。

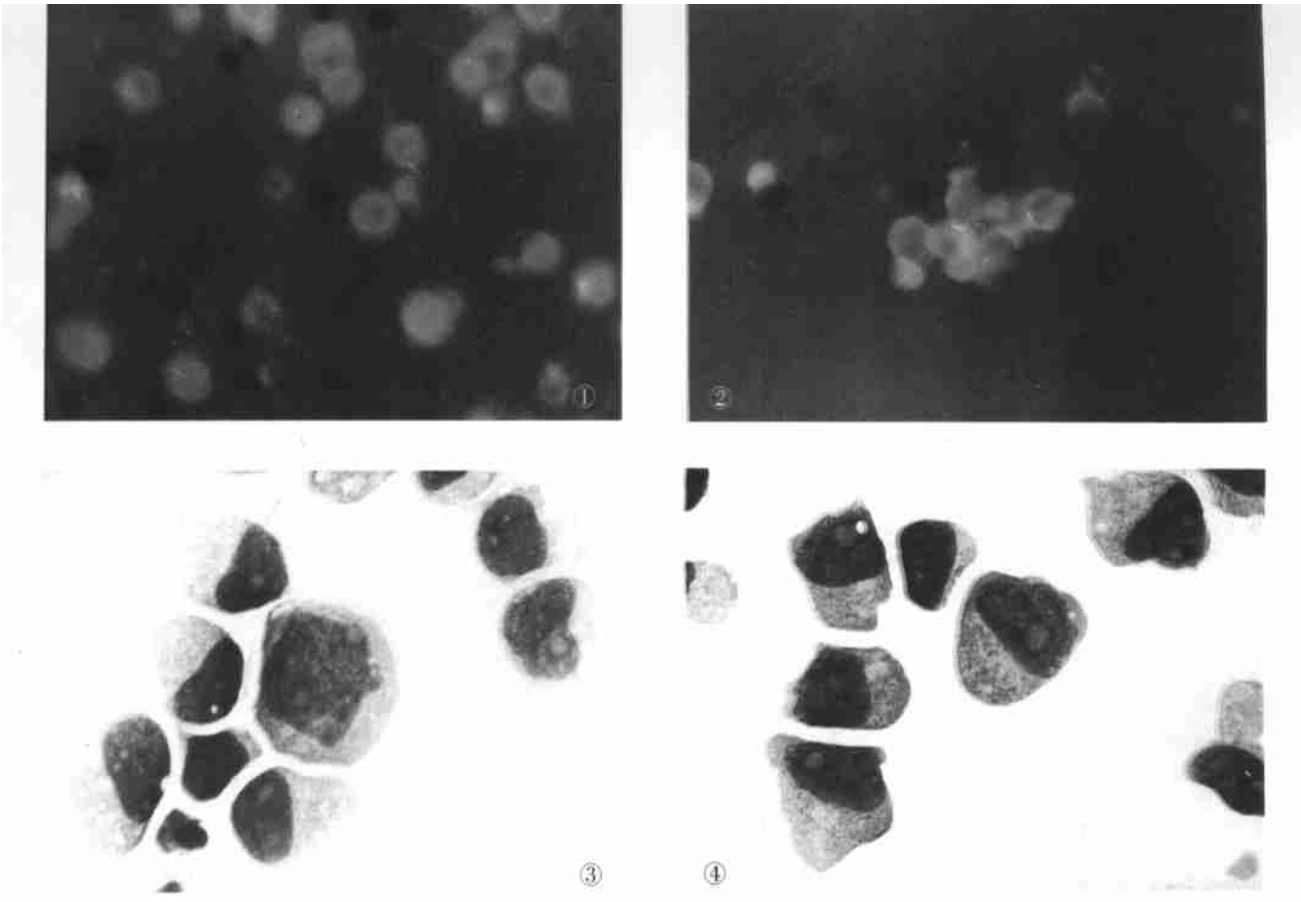


图 1　培养后对照组白血病原代细胞, CD 表面抗原表达阳性　(FITC 显色, × 400)
Fig 1　Cultured blast leukemic cells without IL-6　CD antigens positive　(FITC stain, × 400)
图 2　培养后 IL-6 组白血病原代细胞, CD 表面抗原表达阳性　(FITC 显色, × 400)
Fig 2　Cultured blast leukemic cells with IL-6 (10 ng/ml)　CD antigens positive　(FITC stain, × 400)
图 3　培养后对照组 ANLL-M_2 骨髓细胞　(瑞氏-姬姆萨染色, × 1 000)
Fig 3　Cultured ANLL-M_2 bone marrow cells without IL-6　(Wright-Giemsa stain, × 1 000)
图 4　培养后 IL-6 组 ANLL-M_2 骨髓细胞　(瑞氏-姬姆萨染色, × 1 000)
Fig 4　Cultured ANLL-M_2 bone marrow cells with IL-6　(Wright-Giemsa stain, × 1 000)

3　讨论

国外文献中关于 IL-6 对原代白血病细胞的作用报道不一[2,7]: 促进增殖、抑制增殖或无明显作用。造成这种差异的原因可能是: ①与 AML 细胞表面 IL-6 的受体(IL-6R)表达有关, 文献报道 AML 和 AMML 细胞均表达 IL-6 R mRNA, 而 ALL 仅一半病人的细胞检测到较低的 IL-6R 表达[7]。最近还有资料表明细胞表面只有 IL-6R α 链与 β 链同时表达, 且二者有合适的比例时, 才对一定浓度的 IL-6 刺激产生明显的生物学效应[8]。②培养体系中血清成分和细胞因子的浓度: 有人认为 IL-6 可调节 IL-1、TNF-α 的表达, 后者直接或间接地影响白血病细胞的增殖[9]。③白血病细胞的异质性所致。我们发现 IL-6 单独使用对大部分原代白血病细胞增殖的作用极微弱; 经 IL-6 作用 3 d 的白血病细胞多无形态学及细胞表面抗原的变化, 这与 Takanashi 等[2] 的结果基本一致, 提示 IL-6 对原代白血病细胞无诱导分化作用。本研究还观察到 IL-6 与 G-CSF 联合应用时常对原代白血病细胞体外增殖有抑制效应, 这一结果与 Koistinen[4] 的相似, 提示 IL-6 与 G-CSF 联合用于化疗或放疗后的骨髓抑制可能比使用本研究中的其它因子组合更安全。IL-6 与 G-CSF 联合应用可使抑制 AML 细胞的作用增强的机制尚未明确, 可能系 G-CSF 受体和 IL-6 受体结构极相似, AML 细胞 G-CSF

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

和 IL-6 在信号蛋白水平有共同作用之处; 也可能是改变了其它细胞因子的受体表达, 从而使细胞对其它细胞因子的反应性改变; 或假设 AML 细胞中 IL-6 和 G-CSF 信号传导存在着强烈的调节作用, 使一些其它的信号传导通道"关闭"[4]。

在白血病治疗过程中, 使用造血生长因子(GFs)的趋势有所增加。IL-6 可增加机体的免疫功能, 促进正常骨髓造血, 还可能有抑制白血病原始细胞生长的作用, 与其它 GFs 联合使用时, 使照射后动物外周血白细胞和血小板的恢复比使用单因子时效果好[10]。因此, 深入研究 IL-6 在白血病细胞中的调节作用对白血病的发生和防治有重要意义。

参考文献:

[1] 张纪岩, 任蕴芳, 沈倍奋. 白细胞介素 6 与急性髓系白血病[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 1997, 20(4): 213—215.

[2] 姜道滋, 张茂宏. 白细胞介素-6 与急性髓系白血病相互关系的研究[J]. 国外医学: 输血与血液学分册, 1996, 19(1): 11—13.

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 171—184.

[4] Koistinen P, Sailyet M, Poroman N, *et al*. Complex effects of interlukin 6 on clonogenic blast cell growth in acute myeloblastic leukemia[J]. Acta Haematol, 1997, 98(1): 14—21.

[5] Sladowski D, Steer S J, Clothier R H, *et al*. An improved MTT assay[J]. J Immunol Methods, 1993, 157(1—2): 203—207.

[6] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990. 26—27, 400—401.

[7] Inoue K, Sugiyama N, Ogawa H, *et al*. Expression of the interleukin-6(IL-6), IL-6 receptor, and gp-130 genes in acute leukemia[J]. Blood, 1994, 84(8): 2 672—2 680.

[8] 赖春宁, 黎 燕, 倪长源, 等. 肿瘤细胞系 IL-6R 与 IL-6R 基因表达的生物学效应[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13(4): 17—20.

[9] Lopez M, Maroc N, Kerangueven F, *et al*. Coexpression of the genes for interleukin 6 and its receptor without apparent invovement in the proliferation of acute myeloid leukemia cells[J]. Exp Hematol, 1991, 19(8): 797—803.

[10] 邱丽玲, 孙连生. 白细胞介素 6 促血小板生成的实验及临床研究进展[J]. 实验血液学杂志, 1996, 4(3): 236—241.

(编辑 王 红)

(上接 451 页)

加苦参碱使终浓度为 0.5、0.8、1.0、1.5 g/L, 并加培养液至总体积 4.0 ml。共培养 4 d, 每天取出一瓶, 胰酶消化, 制成细胞悬液, 在改良 Neubauor 型计数板上计数细胞, 每浓度计数 3 次, 取平均结果。

2 结果

2.1 MTT 试验

2.1.1 苦参碱作用时间与肝癌细胞存活率的关系 苦参碱在 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 作用细胞 1~4 d 随作用时间延长, 细胞存活率降低, 到第 4 天, 除 0.5 g/L 外, 其余浓度下的细胞存活率均<50%。

2.1.2 苦参碱剂量与肝癌细胞的关系 苦参碱对肝癌细胞的抑制, 分为几个浓度段: ≤0.2 g/L 时, 存活率≥80%; 0.3~0.6 g/L, 存活率> 50%; 0.7~0.8 g/L, 存活率< 50%, > 30%; 1.0~2.5 g/L, 存活率< 30%。按抗肿瘤药物判断标准, 苦参碱>1.0 g/L, 为抗肝癌细胞敏感的药物浓度。0.7~0.8 g/L 为中度敏感, <0.6 g/L 为不敏感, <0.2 g/L 几乎无抑制作用。

2.2 苦参碱对肝癌细胞 DNA 合成的抑制

在 MTT 试验的基础上, 确定以 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 浓度作用细胞 3 d, 观察 DNA 合成情况。结果: 随药物浓度增加, DNA 合成降低, 大于 1.0 g/L 时, DNA 合成率小于 30%, 表明苦参碱可抑制肝癌细胞 DNA 的合成, 并有剂量依赖性。

2.3 苦参碱对肝癌细胞生长曲线的影响

苦参碱在 0.3、0.5、0.8、1.5 g/L 作用细胞 1~4 d, 细胞总数逐渐减少, 说明苦参碱可抑制肝癌细胞增殖, 并呈时间和剂量依赖性。

3 讨论

本结果表明苦参碱在一定浓度范围能有效抑制肝癌细胞的增殖, 并且抑制作用有时间、剂量依赖性。其中> 1.0 g/L 为有效抑制浓度, < 0.2 g/L 抑制作用很小。我们也研究了苦参碱作用于肝癌细胞 $HepG_2$ 后其形态和超微结构的变化(见另篇报道), 发现苦参碱浓度≥0.3 g/L 时细胞形态开始出现明显变化, 特别是细胞浆内充满圆形、透明、折光强的颗粒, 苏丹 III 染色阳性。电镜观察发现, 细胞浆内有脂肪空泡和扩张的滑面内质网。胞浆有部分溶解并出现自噬体。细胞表面微绒毛减少, 所有这些均说明苦参碱对 $HepG_2$ 细胞有细胞毒作用, 从而干扰细胞代谢, 抑制细胞增殖。

关键词: 苦参碱; 肝癌细胞; 增殖
中图法分类号: R282.07 文献标识码: B

参考文献:

[1] 司维柯, 韩 凤, 秦建平, 等. 苦参提取液诱导 K_{562} 细胞分化的细胞化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, 6(2): 200—205.

[2] 秦建平, 蒋纪恺, 张 彦, 等. 苦参对 K_{562} 红白血病细胞系的诱导分化作用[J]. 重庆医科大学学报, 1994, 19(2): 151.

[3] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, *et al*. Differentiation and Apoptosis in K_{562} Erythroleukemia cells Induced by Matrine[J]. Natural Medicine, 1998, 52(4): 295—299.

(编辑 王 红)

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