

HFCL 细胞对 U937 细胞的诱导分化作用

梁 蓉^{1*} 黄高昇² 王 哲² 杨国嵘² 郭 英² 张伟平² 董宝侠¹ 王娟红²

(第四军医大学,¹ 西京医院血液科;² 基础部病理教研室, 西安 710033)

摘要 为了观察正常人骨髓成纤维样细胞系 HFCL 对急性单核细胞白血病 U937 细胞促分化作用, 及其对经典诱导分化剂 TPA 诱导分化作用的影响, 先建立 U937 细胞和 HFCL 细胞共培养体系, 以细胞形态学改变、硝基四氮唑蓝 (NBT)、流式细胞仪检测细胞周期和 CD11b、CD13、CD14、CD33 细胞表面抗原作为诱导分化指标; Western 印迹检测 P38 蛋白的表达变化。结果发现, 与 HFCL 细胞共培养后, U937 细胞出现分化成熟的形态学改变, 且与 HFCL 细胞直接接触组的诱导分化作用大于用 transwell 组。同时发现 U937 细胞与 HFCL 细胞共培养后, G₁ 期细胞增高, S 期细胞减少; CD11b、CD13、CD14 和 CD33 表达增高; 且 NBT 阳性细胞增高至 46.3%。Western 印迹检测结果显示, 直接接触组总 P38 蛋白表达增加。而且 HFCL 细胞还能增强 TPA 对 U937 的诱导分化作用。

关键词 骨髓成纤维样细胞; 白血病; 分化; P38

骨髓成纤维样基质细胞约占骨髓基质细胞的 60%~70%, 是造血微环境的主要成分。除了具有造血调控作用之外, 研究发现它在白血病细胞增殖、分化、迁移和凋亡中起重要作用^[1]。我们的研究发现, 正常人骨髓成纤维样细胞 HFCL 能抑制白血病细胞 U937 的增殖, 阻止 U937 细胞细胞周期的运行, 出现 G₁ 期阻滞^[2]。由于肿瘤细胞在分化过程中, 大多伴有 G₁ 期阻滞^[3], 因此, 本研究仍以急性单核细胞白血病 U937 细胞为靶细胞, 研究 HFCL 细胞对其是否有促分化作用, 以及对经典诱导分化剂 TPA 作用的影响, 并初步探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人骨髓成纤维样基质细胞系 HFCL 由中国医学科学院血液学研究所姜学英建立, 军事医学科学院基础医学研究所张毅提供; 人急性髓细胞白血病细胞株系 U937 由本校免疫教研室惠赠, 本室保存。培养体系: 含 10% 灭活新生牛血清 (HyClone 公司) 的 RPMI1640 (Gibco 公司) 培养液, 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱 (NAPCO Precision Scientific) 中培养, 实验用细胞均处于对数生长期, 台盼蓝拒染率 > 95%。

Transwell 购自 Millipore 公司, 孔径 0.4 μm; FITC 标记 CD11b、CD13、CD14 和 CD33 小鼠抗

人单克隆抗体购自 Immunotech 公司; P38 丝裂素活化蛋白激酶 (P38, mitogen-activated protein kinase, P38 MAPK) 多克隆抗体购自 Biolabs 公司; PVDF 膜购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; SABC 免疫组化检测试剂盒购自武汉博士德公司; 硝基四氮唑蓝 (NBT) 购自华美生物工程公司; 佛波酯 (TPA) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 ①对照组: 单独培养 U937 细胞; ②直接接触组: 先种 HFCL 细胞 48 h 后, 再在已贴壁的 HFCL 细胞上直接加入悬浮生长的 U937 细胞; ③transwell 组: 先种 HFCL 细胞 48 h 后, 按 Millipore transwell 的说明, 放入 transwell (孔径 0.4 μm) 装置, 以保证培养液和可溶性因子能上下相通, 而装置内外的细胞被隔开, 在 transwell 中加入 U937 细胞。

1.2.2 细胞形态学改变 离心收集单独培养的对照组及与 HFCL 细胞共培养 96 h 的 U937 细胞, PBS 洗涤 1 次, 离心收集细胞涂片, 进行 Wright-Giemsa 染色。

1.2.3 NBT 还原阳性率测定^[4] 离心收集单独培

收稿日期: 2004-01-29 接受日期: 2004-03-26

国家自然科学基金资助项目 (No. 30300141)

* 通讯作者。Tel: 029-83375203, Fax: 029-83375199, E-mail:

Bettyliang9845@hotmail.com

养的对照组及与 HFCL 细胞共培养 96 h 的 U937 细胞, PBS 洗涤 1 次, 重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中(细胞密度 1×10^6 个/L), 加入终浓度为 0.1% NBT 及 100 $\mu\text{g/L}$ TPA, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中温育 30 min, 离心收集细胞涂片, 进行 Wright-Giemsa 染色, 油镜下观察 200 个细胞, 胞内有蓝紫色颗粒的细胞为 NBT 阳性细胞, 计算阳性细胞率。

1.2.4 流式细胞仪测定细胞周期 U937 细胞与 HFCL 细胞共培养 96 h 后, 分别收集各组细胞(1×10^6 个), 用预冷的 PBS 洗 2 次, 离心去上清液, 加入 1 ml PBS 和 2 ml 无水乙醇固定过夜, 加入 DNA-Prepstain 染液染色后, 用 EPICSXL-MCL 流式细胞仪(Coulter 公司)检测各组细胞的荧光强度, 每份样品检测约 5000 个细胞, 用 DNA Multi Cycle 软件进行统计学拟合分析, 得到各个组细胞周期时相, 每组样品重复 3 次, 取均数。

1.2.5 免疫荧光检测细胞膜表面抗原 制备各实验组及对照组活细胞悬液 100 μl (1×10^6 个/ml), 各加入小鼠抗人 CD11b 和 CD13、CD14、CD33-FITC 荧光标记的单克隆抗体 10 μl 或 20 μl , 再加入稀释的正常兔血清(1:20), 室温避光放置 30 min, DPBS(NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4)洗 2 次, 2% 多聚甲醛固定后上流式细胞仪检测。

1.2.6 Western 印迹法 按分子克隆方法^[5], 分别提取各组细胞总蛋白质, 经紫外分光光度法定量后, 各组取等量总蛋白质进行 10% SDS-PAGE 电泳并转移到 PVDF 膜上, 膜用 1% BSA 和 0.05% Tween20 封闭 1 h, 加入 P38 多克隆抗体(1:1000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜, 生物素化的羊抗兔 IgG 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, SABC 室温温育 1 h, TBST 洗

膜后 DAB 显色。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包进行 χ^2 检验和方差分析。

2 结果

2.1 与 HFCL 细胞共培养后 U937 细胞形态改变

与 HFCL 细胞共培养后, 尤其是直接接触组, U937 细胞体积明显增大, 核仁变得模糊甚至消失, 核浆比例减低, 染色质由疏松倾向致密, 胞质趋向成熟, 呈现灰蓝色(图 1)。

2.2 NBT 还原率的变化

U937 细胞与 HFCL 细胞直接接触共培养 96 h 后, NBT 阳性细胞率增至 46.3%, 而 U937 细胞单独培养对照组仅为 5.3%, 有明显的统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 共培养后 U937 细胞周期的变化

FCM 检测与 HFCL 共培养前后 U937 细胞, 与单独 HL-60/VCR 对照组相比, 与 HFCL 细胞共培养后 96 h 后, G_1 期细胞比例增加, S 期细胞比例减少, 差别显著(表 1)。

2.4 U937 细胞表面抗原表达变化

对照组 U937 细胞 CD11b 和 CD14 的表达均 $< 1\%$, 经与 HFCL 细胞共培养 96 h 后, 分别增至 transwell 组 1.6% 和 11.7%; 直接接触组 64.6% 和

Table 1 The change of cell cycle of U937 cells cocultured with HFCL cells

Cells	G_1	S	G_2
U937	27.1 $\pm$ 8.7	58.0 $\pm$ 22.0	14.9 $\pm$ 8.6
U937 on HFCL	43.7 $\pm$ 10.6*	44.3 $\pm$ 11.7*	12.0 $\pm$ 4.3
U937 in transwell	38.8 $\pm$ 9.6*	50.6 $\pm$ 14.9*	10.7 $\pm$ 3.7

* $P < 0.01$ 。

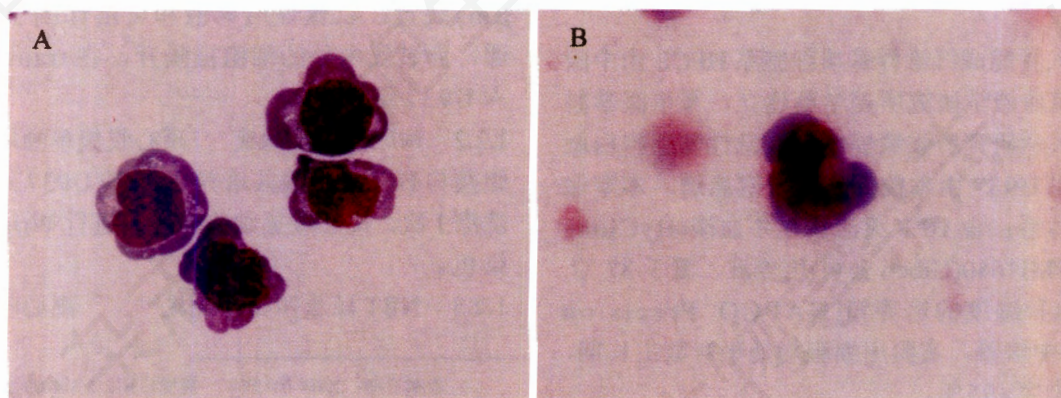


Fig.1 The change of morphology of U937 cells cocultured with HFCL cells

(A) U937 cells; (B) U937 cells on HFCL cells.

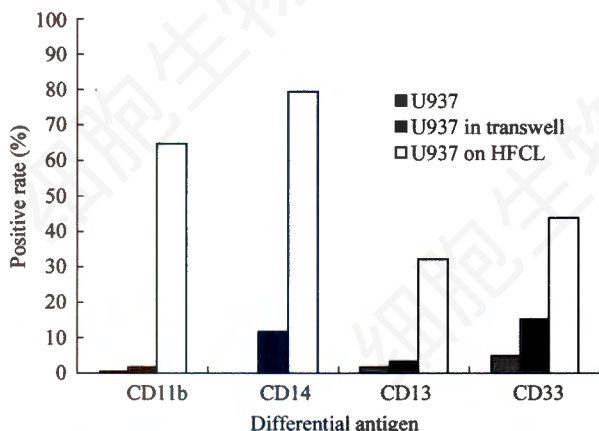


Fig.2 The change of differential antigens of U937 cells with HFCL cells

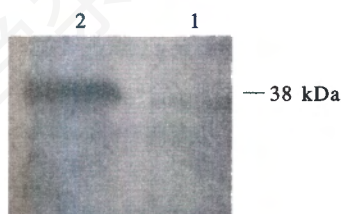


Fig.3 The change of expression of total P38 in U937 cells with HFCL

1: U937 cells; 2: U937 cells in direct contact with HFCL cells.

79.4%; CD13 的表达由对照组的 1.6% 增至 transwell 组 3.3%、直接接触组 32.1%; CD33 的表达由对照组的 4.9% 增至 transwell 组 15.3%、直接接触组 43.9%。总之, 与 HFCL 细胞直接接触共培养 96h 后, 使 CD11b、CD14、CD13 和 CD33 表达明显增高($P < 0.01$)(图 2)。U937 细胞单独用 20 nM TPA 72 h 后 CD14 表达增至 41.2%, 而同时与 HFCL 细胞共培养后表达率增至 62.6%($P < 0.01$)。

2.5 共培养后 U937 细胞 P38 蛋白表达的改变

Western 印迹显示, 与 HFCL 细胞共培养 96 h 后, 直接接触组的 U937 细胞总 P38 蛋白表达上调(图 3)。

3 讨论

以往对白血病的研究多集中在白血病肿瘤细胞上, 对与造血微环境关系的研究甚少, 近年来国内外研究表明, 骨髓基质细胞与白血病的发生和发展密切相关^[1,6]。从形态学上发现正常人骨髓基质细胞对 HL60 细胞具有逆转分化作用, 表现在促分化和抑制增殖作用。但研究采用的是人体外长期培养的骨髓基质细胞, 即多种细胞的混合体。我们知道,

骨髓基质细胞是由多种细胞群体组成, 不同的细胞具有不同的生物学特性, 所以究竟是那一种基质细胞起作用, 以及到底是直接接触, 还是通过分泌细胞因子起作用, 这个问题还未阐明^[7]。我们最新研究发现, 正常人骨髓成纤维样细胞系 HFCL 能抑制白血病细胞 U937 的增殖, 出现 G_1 期阻滞^[2], 提示 HFCL 细胞可能具有诱导 U937 细胞向成熟分化。

本研究发现, 与 HFCL 细胞共培养后, U937 细胞出现分化成熟的形态学改变, 且与 HFCL 细胞直接接触组的诱导分化作用大于用 transwell 组。同时发现 U937 细胞与 HFCL 细胞共培养后, G_1 期细胞增高, S 期细胞减少; 同时 CD11b、CD13、CD14 和 CD33 表达明显增高; 且 NBT 阳性细胞增高至 46.3%。我们知道, 中性粒细胞及单核细胞具有过氧化物酶可接受来自 NADPH 的氢, 将 NBT 还原变成难溶性蓝黑紫色颗粒沉着于有酶活性的部位, 未成熟的白细胞则缺乏这种能力, NBT 还原反应是判断急性髓系白血病细胞分化的常用标准^[4]。而 CD11b、CD13、CD14 和 CD33 均属于髓系特有的分化抗原, CD11b 增高表明细胞向粒或者单核细胞方向分化, CD14 属单核细胞较特异的抗原。NBT 还原实验和表面分化抗原的检测两个实验相结合作为白血病诱导分化最常用的判断标准, 广泛用于白血病诱导分化实验研究^[8]。本实验结果显示 HFCL 细胞能诱导部分 U937 向成熟分化。这样 HFCL 正常骨髓成纤维样基质细胞既具有促进正常造血的功能, 还具有诱导白血病细胞 U937 分化成熟作用, 而且主要通过 HFCL 细胞与 U937 细胞直接接触产生的。换句话说, U937 细胞与 HFCL 细胞之间的黏附在 U937 分化成熟过程中起着关键作用。文献报道 MAPK 信号转导途径在白血病细胞的分化成熟过程中起着重要作用, 包括 P38、JUN 和 ERK 三个途径, 在细胞分化中, 伴有不同程度的表达或磷酸化活性增强^[9-11]。本研究 Western 印迹检测结果显示, 共培养直接接触组总 P38 蛋白表达增加, 推测与 HFCL 细胞共培养能促进总 P38 蛋白的表达, 也表明 P38 MAPK 途径参与 HFCL 细胞诱导 U937 细胞分化成熟过程。另外, 随着联合培养技术被引入血液学研究中, 为体外模拟体内微环境来研究诱导分化作用提供依据。本实验发现, 在与 HFCL 细胞共培养时, 经典诱导分化剂 TPA 对 U937 的诱导分化作用增强。总之, 本研究发现了正常人骨髓成纤维样基质细胞 HFCL 能部分诱导白血病 U937 细胞分化成

熟, 且主要通过两种细胞直接接触产生的, 并可能有 P38 MAPK 途径的参与, 同时与 HFCL 细胞共培养能增强 TPA 的诱导分化作用。

参考文献 (References)

- [1] Gibson LF. *Leuk lymphoma*, 2002, **43**: 19
- [2] 梁 蓉等. *第四军医大学学报*, 2003, **24**: 1560
- [3] Mata-Greenwood E *et al. Leukemia*, 2002, **16**: 2275
- [4] Catino JJ *et al. J Natl Cancer Inst*, 1988, **80**: 962
- [5] Sambrook J 等著. *分子克隆实验指南*, 第3版, 北京: 科学出版社, 2002, 1713
- [6] Duhresen U *et al. Ann Hematol*, 1996, **73**: 53
- [7] 傅 勤等. *白求恩医科大学学报*, 1997, **23**: 463
- [8] Kim SH *et al. Biochem Pharmacol*, 2002, **64**: 1233
- [9] Miranda MB *et al. Leukemia*, 2002, **16**: 683
- [10] Okuma E *et al. Exp Hematol*, 2002, **30**: 571
- [11] Wang Q *et al. J Cell Biochem*, 2003, **89**: 1087

The Differentiation of U937 Cells Induced by Normal Human Bone Marrow Fibroblastoid Stromal Cell Line

Rong Liang^{1*}, Gao-Sheng Huang², Zhe Wang², Guo-Yong Yang², Ying Guo²,
Wei-Ping Zhang², Bao-Xia Dong¹, Juan-Hong Wang²

(¹Department of Hematology, Xijing hospital, ²Department of Pathology, Faculty of Preclinical Medicine,
Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract To investigated the effects of normal human bone marrow fibroblastoid stromal cell line (HFCL) on the differentiation of acute myeloid leukemia cell line U937, the coculture system of leukemia cell line U937 and HFCL cells was established at first. Growth curves were detected by cell counting. Cell differentiation was determined by morphologic observation, ability of NBT cells and flow cytometric detection of the expression of CD11b, CD14, CD13 and CD33. Flow cytometry and Western blot were performed to test the changes of cell cycle and expression of P38, respectively. Compared with U937 cells without HFCL cells, the proliferation of U937 cells in direct contact with HFCL cells and with HFCL cells separated by transwell was inhibited, and NBT positive cells increased to 46.3%. The percentage of G₁ phase cells of U937 cells with HFCL cells was higher than that without HFCL cells, and the percentage of S phase cells was lower. Meanwhile the expression of CD11b and CD14 increased, however, the expression of CD13 and CD33 didn't change. The expression of P38 in U937 cells with HFCL cells was higher than that in U937 cells without HFCL cells. Meanwhile, HFCL cells could enhance the differentiation of U937 cells induced by TPA. In a word, the normal bone marrow fibroblastoid stromal cells HFCL could induce the differentiation of part of U937 cells into monocyte with the increasing expression of P38 and also enhance the differentiation of U937 cells induced by TPA.

Key words bone marrow fibroblastoid stromal cell; leukemia; differentiation; P38

Received: January 29, 2004 Accepted: March 26, 2004

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30300141)

*Corresponding author. Tel: 86-29-83375203, Fax: 86-29-83375199, E-mail: Bettyliang9845@hotmail.com