

bcr/abl 反义 RNA 片段对 Ph+ 人白血病 细胞系分化的影响

郝秀娟 王波* 李秀森 奚永志
江飞子 毛宁 杜德林 唐佩弦

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850 *军事医学科学院附属医院)

Ph 染色体是 t(9, 22) 易位形成的异常染色体, Ph+ 细胞中存在 bcr/abl 融合基因, 已证明 bcr/abl 的表达产物 p 210 增强的蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 活性, 是细胞向恶性转化的根本原因^[1-3]。一般来说, 增殖潜能大的细胞分化程度低, 增殖潜能小的细胞分化程度高, 许多被诱导发生分化的细胞其增殖和存活能力降低^[4, 5]。那么, 增殖受到抑制的细胞是否一定伴随成熟分化? 本文将就此问题进行研究探讨。

材料和方法

1. pDAB 3 为表达 0.81 kb 的 bcr/abl 反义 RNA 片段的重组质粒, 其构建参见文献^[6], 该质粒是 bcr/abl 融合区 DNA 片段反向克隆入逆转录病毒表达载体 pDORneo (长 6.5 kb, 由 5'LTR 启动外源基因表达, SV 40 启动 neo 基因表达)。过氧化物酶 (POX) 和 α -醋酸萘酯酶 (α -NAE) 染色试剂盒购自中山公司。邻联大茴香胺 (o-dianisidine) 购自 Sigma 公司。抗 CD 13、CD 33、CD 10、CD 34 单克隆抗体为 DAKO 产品。

2. 细胞系 K 562 系 Ph+ 人髓系白血病细胞系 (b 3/a 2 型)。HL-60 为人早幼粒白血病细胞系。上述细胞均为本室冻存。BV 173 系 Ph+ 人髓系白血病细胞系 (b 2/a 2 型), 由荷兰 St. Radboud 大学医学院提供。

3. DNA 转染 采用 lipofectin 进行转染, 在 3×10^7 细胞中加入 30 μ g DNA 与 60 μ l lipofectin, 形成 DNA-lipofectin 复合物溶液, 转染 9 小时。

4. 分子杂交 按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取 RNA, 进行甲醛变性电泳。培养细胞的基因组 DNA 的提取按常规方法进行, DNA 用 XbaI 酶切过

夜, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳。RNA 和 DNA 电泳凝胶均以吸印法转移至尼龙膜上, 以 1.1 kb bcr/abl 片段为探针, 探针的标记、杂交、检测均按 Amersham 公司化学发光检测试剂盒指定方法进行。

5. 筑巢式逆转录酶-聚合酶链反应 (RT-PCR)^[7] 提取 pDAB 3 转染前后 K 562 和 BV 173 细胞总 RNA, 50 μ l 体系中含 RNA 0.6—2.0 μ g, 加 1% BSA 0.5 μ l, 1.25 mmol/L dNTP 8 μ l, 引物 C (bcr 外侧引物), D (abl 外侧引物) 各 66 ng, 逆转录酶 8 U, 42 $^{\circ}$ C, 30 分钟完成逆转录, 95 $^{\circ}$ C 灭活逆转录酶后加 TaqDNA 聚合酶 2.5 U, 以 94 $^{\circ}$ C 变性, 45 $^{\circ}$ C 复性, 72 $^{\circ}$ C 延伸各 1 分钟, 30 个循环完成第一次 PCR。取产物 5 μ l, 加引物 A (bcr 内侧引物), B (abl 内侧引物) 各 66 ng, 按第一次条件进行第二次 PCR。取 10 μ l 产物电泳鉴定。

6. 有关粒单系及红系分化的细胞化学染色① NBT 反应 1×10^6 细胞悬浮于 0.5 ml 含 20% 牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 加入 1.1 mg/ml NBT 0.5 ml 和 3.24 μ mol/L TPA 0.1 ml, 培养 25 分钟后, 立即放入冰浴终止反应, 离心涂片, 瑞氏姬姆萨染色, 胞浆出现蓝黑色颗粒的是 NBT 阳性细胞。② 血红蛋白染色和瑞氏-姬姆萨染色按文献^[8]进行。 α -NAE、POX 染色按试剂盒指定方法进行。

7. 白细胞分化抗原检测: 细胞悬浮于抗 CD 13、CD 33、CD 34、CD 10 单抗的 PBS 中混匀, 4 $^{\circ}$ C, 40 分钟; 洗 2 次, 加 FITC-F(ab')₂, 4 $^{\circ}$ C, 30 分钟, 洗 2 次, FACScan 检测。

结果与讨论

Southern 和 Northern 印迹杂交结果显示, 外源 DNA 片段已在靶细胞内整合并表达相应长度的反义 RNA 片段。在进行 DNA 和 RNA 电泳时, 均以 λ DNA 的 Hind III 酶切片段作为

分子量大小的标志, EB 染色后记录各带的位置。在以 *bcr/abl* 为探针的分子杂交中, 分子量标志无法显示出来, 但是通过放射自显影前后结果的比较中, 可推知放射自显影各带的大小, 如图 1 中所示。在 Southern 印迹杂交中, 由于 pDORneo 载体中两个 *Xba*I 位点之间约 3.4 kb, 所以插入 0.81 kb 后, 用 *Xba*I 从 pDAB 3-K 562(B 3 K) 细胞基因组 DNA 中可切下约 4.21 kb 的片段, 该片段可与 *bcr/abl* 探针结合, 表明外源 DNA 已整合入靶细胞基因组中, 而未转基因的 K 562 细胞无此 4.21 kb 的杂交带。其他阳性带的出现提示细胞内可能存在与 *bcr/abl* 探针有同源性的 DNA 片段, 尚不能肯定是哪种基因或片段。Northern 印迹杂交结果表明, K 562 细胞内仅有一条约 8.5 kb 的可与 *bcr/abl* 探针结合的 RNA 带, 而在 B 3 K 细胞中, 除了内源性的 8.5 kb RNA 带以外, 尚存在一条约 0.81 kb 的外源性杂交带。说明 pDAB 3 中的外源基因已在 K 562 细胞内表达, 外源性 DNA 片段在载体 5'LTR 内启动子作用下开始转录出反义 RNA 片段, 即此 0.81 kb RNA 带。

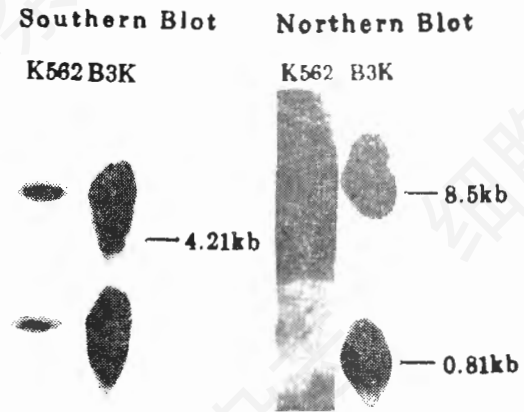


图 1 B3K 细胞的 Southern 和 Northern 印迹杂交

根据设计, 用引物 A、B、C 和 D 进行筑巢式 RT-PCR, 在 K 562 细胞中可扩增出 165 bp DNA 片段, 在 BV 173 细胞中可扩增出 90 bp DNA 片段, 如图 2 所示, B3K 细胞中只扩增出 165 bp 带, 而在 pDAB 3-BV173 (B 3BV) 细胞中, 不仅扩增出 90 bp DNA 片段而且扩增出了 165 bp DNA 片段, 该 165 bp 带来源于外源质粒 pDAB 3 在 B3BV 细胞中表达

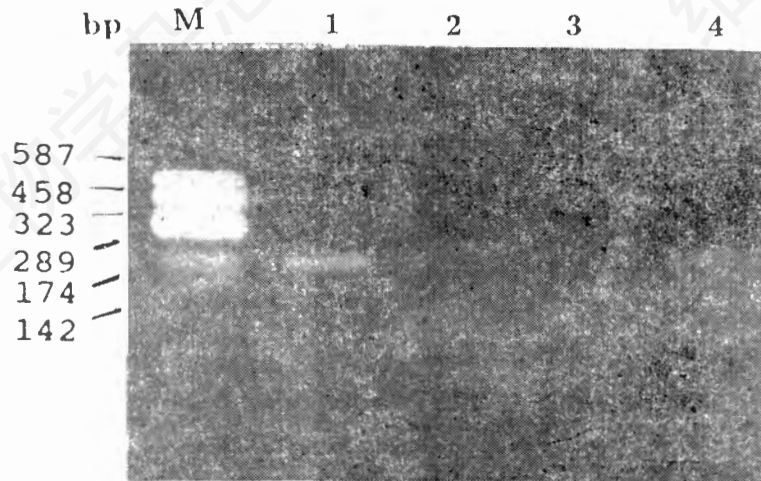


图 2 筑巢式 RT-PCR 电泳结果

M: pGEM-3 zf(+)/Hae III

Lane 1: B₃K 细胞 Lane 2: B₃BV 细胞

Lane 3: BV 173 细胞 Lane 4: K 562 细胞

的相应 RNA 片段,表明 pDAB 3 能够在 B 3 BV 细胞中表达。

转染后 4—8 天的 B3K 细胞的 NBT 反应、POX 和 α -NAE 及血红蛋白染色均为阴性,同时以有 c-myc 反义 RNA 片段表达的 HL-60 细胞(CH 细胞)为阳性对照,其 NBT、POX 和 α -NAE 染色均为阳性,见表 1。表中阳性率的计算为转染 5 天后,在高倍镜下计数 200 个细胞中阳性细胞的百分数。由于 BV 173 细胞系是 CML 急淋变的外周血细胞建系^[9],有关粒单系的细胞化学染色为阴性。结果表明, B 3 K 细胞未出现粒单系或红系分化。

表 1 不同细胞的细胞化学染色结果(阳性率%)

细胞	NBT	POX	α -NAE	Hb
HL-60	<1	<20	<2	ND
DH	<1	<20	<2	ND
CH	>20	>60	>20	ND
K 562	<0.5	<2	<1	0
B 3 K	0	0	0	0

ND:未测定 DH:pDOR/HL-60

CH: HL-60 expressing antisense transcripts to c-myc.

在转染后 5 天, G 4 18 筛选 3 天的 B 3 K 细胞, CD 13 和 CD 33 抗原表达与转染前无明显改变,见图 3。转染前后反映 CD 33 和 CD 13 表达的 FITC 荧光强度与 pDOR-K 562 (DK) 细胞相比无明显改变。转染后 5 天的 B3BV 细胞 CD 10 和 CD 34 抗原表达与 pDOR-BV 173 细胞相应抗原表达也无明显差别。表明 B 3 K 和 B 3 BV 细胞的有关分化抗原并未表达,即未观察到分化现象。

外源 bcr/abl 反义 RNA 片段在 B 3 K 和 B 3 BV 细胞表达后,在增殖抑制的同时并未导致该细胞发生相应的分化成熟,即成熟粒细胞应该具有吞噬功能及相应的酶系、红细胞应具有合成血红蛋白的能力,成熟细胞表面应该出现相应表型抗原的表达等等。在 Ph+ 白血病细胞中, bcr/abl 反义 RNA 片段在降低内源性高表达的 bcr/abl mRNA 时,抑制细胞增殖的信

号传递,但是并未开启分化途径,而极有可能使无法完成增殖过程的细胞走向凋亡。提示增殖受阻尽管有可能,但不一定导致分化。如果进一步的研究表明这些细胞出现了凋亡改变,本研究也会为凋亡与分化关系的阐明奠定基础。

摘 要

为探讨 Ph+ 白血病细胞中 bcr/abl 表达的降低对细胞分化的影响,本文利用脂质体介导的方法将表达 bcr/abl 融合区反义 RNA 片段的重组质粒导入 K562 和 BV 173 细胞系,以 Southern 和 Northern 杂交以及筑巢式逆转录酶-聚合酶链反应技术证实外源 DNA 已在靶细胞内整合与表达,且 bcr/abl 反义 RNA 片段的表达使内源性 bcr/abl mRNA 表达水平降低。未观察到表达 bcr/abl 反义 RNA 片段的 K 562 细胞出现粒单系或红系分化,重组质粒转染前后 BV 173 细胞表面的 CD 10 和 CD 34 抗原以及 K 562 细胞表面的 CD 13 和 CD 33 抗原表达无明显变化,提示 bcr/abl 反义 RNA 片段抑制增殖的同时未引发分化与成熟。

关键词: bcr/abl 融合基因 反义 RNA 分化 Ph+ 白血病细胞系

参 考 文 献

- [1] Koch, C. A., et al., 1991, *Science*, 252: 688—675.
- [2] Drucker, B., et al., 1992, *Blood*, 78: 2215—2220.
- [3] Frackelton, A. K., et al., 1993, *Leuk. Lymph.*, 11(suppl): 125—129.
- [4] Solary, E., Bertrand, R., Pommler, Y., 1994, *Leukemia*, 8: 792—797.
- [5] Martin, S. J., Bradley, J. G., Cotter, T. G., 1990, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 448—453.
- [6] 郝秀娟等, 1996, 军事医学科学院院刊, 20: 107.
- [7] 王波等, 1993, 中华血液学杂志, 14: 355—358.
- [8] 杨景山主编, 医学细胞化学和细胞生物学技术, 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1989, 4—70.
- [9] Pegoraro, L., et al., 1983, *J. Natl Cancer Inst.*, 70: 447—451.

THE EFFECT OF ANTISENSE TRANSCRIPTS TO BCR/ABL FUSION GENE ON DIFFERENTIATION OF PHILADELPHIA CHROMOSOME-POSITIVE LEUKEMIA CELL LINES

HAO Xiu Juan WANG Bo LI Xiu Sen XI Yong Zhi JIANG Fei Zi MAO Ning
DU De Lin TANG Pei Xian

(Institute of Basic Medical Sciences, Bei Jing, 100850)

ABSTRACT

To investigate whether Ph chromosome-positive leukemia cell lines would undergo differentiation after the expression of endogenous bcr/abl fusion gene was inhibited, The recombinant plasmids expressing antisense transcripts to bcr/abl fusion gene were transfected into K 562 and BV 173 cell lines by lipofectin reagent. Southern and Northern blot hybridizations as well as nested RT-PCR analysis proved the integration and expression of exogenous DNA in target cells. Antisense transcripts to bcr/abl reduced the level of endogenous bcr/abl mRNA. No myelomonocytic and erythroid differentiations were observed in cells with antisense transcripts to bcr/abl. Also no obvious alterations occurred in the expression levels of CD 10 and CD 34 antigens in BV 173 cells and as well as CD 13 and CD 33 antigens in K 562 cells before and after transfection. It was suggested that proliferative inhibition did not always accompanying terminal differentiation.

Key words: bcr/abl fusion gene Antisense RNA Differentiation Ph-chromosome-positive leukemia cell line

多发性骨髓瘤的骨髓细胞长期培养的研究

林雪怡 林忠清

魏一生

陈志哲

(解放军福州医学高等专科学校 350003) (福建省医学科学研究所) (福建省血液病研究所)

浆细胞体外的长期培养比较困难^[1]。我们曾在人体骨髓细胞长期培养中,观察到贴壁层的浆细胞可持续生长数周^[2],由此引发我们进一步研究多发性骨髓瘤骨髓在 Dexter 长期培养体系中的变化。Dexter 长期培养是一种液体培养,人体的骨髓细胞在此种培养体系中,造血活性可维持数月之久^[2]。有研究结果表明,某些恶性血液病的骨髓在 Dexter 长期培养体系中,肿瘤细胞逐渐为正常的造血细胞所取代^[3]。基于这一研究结果,临床上已经将 Dexter 长期培养作为骨髓净化的一个手段用于自体骨髓移植^[4]。此种治疗手段对多发性骨髓瘤是否适用?本文报告多发性骨髓瘤患者的骨髓在 Dexter 长期培养体系中,其克隆性浆细胞的动态变化。

材料与方 法

1. 骨髓标本来源

5例多发性骨髓瘤患者,均经临床、血液学和免疫学检查确诊,其中例1为 IgG-λ,例2、3、4为 IgG-κ,例5为 IgA-κ。治疗前自髂后上嵴采取骨髓。

2. 骨髓细胞的制备

10 ml 针筒预先吸入 1 ml RPMI-1640 和 5% 小牛血清及不含防腐剂的肝素 166 u/ml, 采髓 9 ml, 混和。以 10 ml RPMI-1640 与骨髓液作 1:1 稀释, 然后加入预先 37℃ 温浴的 2.25% 甲基纤维素。每 10 ml RPMI 稀释的髓液加入 0.45 ml 甲基纤维素, 充分混和后, 置室温 30 min。吸取上层髓液以 RPMI-1640 洗涤 2 次后加入小牛血清制备骨髓细胞悬液, 计数。

3. 培养体系

Iscove'Modified Dulbecco's Medium,

IMDM 80%

小牛血清 10%

马血清 10%

氢化考的松 5×10^{-7} mol/L

4. 培养方法^[5]

以上述培养液制备骨髓细胞悬液, 使每 ml 培养