

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

液含 3×10^6 骨髓有核细胞, 在六孔培养板中每孔放置 2.4×2.4 cm 的消毒盖玻片, 每孔加入 2 ml 含有骨髓有核细胞的培养液(细胞数为 6×10^6)。置于 5% CO_2 孵育箱中, 33°C 恒温, 饱和湿度。每周更换半量培养液, 取非贴壁层细胞测定 CFU-GM 含量。

5. 免疫荧光检查

于培养的第 3、6、9、12 周分别取出生长有贴壁细胞的盖玻片, 用 IMDM 轻轻漂洗后, 以甲醇固定, 再用荧光黄和罗丹明标志的兔抗人 kappa 和 lambda 轻链的抗血清(Dakopatts, Denmark)染色。非粘壁层经离心涂片(cytospin)作 Wright 染色后观察细胞形态及分类, 免疫荧光检查同贴壁细胞。部分标本在更换培养液的第 2 天以 Ki-67 单克隆抗体行间接免疫荧光检查, 以观察浆细胞的增殖活性。Ki-67 是一种小鼠单克隆抗体, 能识别处于细胞增殖周期中核抗原, 荧光标记后, 定位在细胞核上。

6. 免疫球蛋白测定

每周更换半量培养液时, 将陈旧培养液以 700 g 离心 10 min, 使非贴壁细胞沉淀, 取上清液作免疫球蛋白测定。采用免疫球蛋白重链 γ 、 α 、 μ 和轻链 κ 、 λ 的抗血清, 以琼脂糖作免疫固定(immunofixation)电泳。此即将抗血清直接作用于经电泳分离的免疫球蛋白区带上, 抗体与相应的抗原区带结合, 后者在电泳位置上被免疫固定。

结 果

1. 在长期培养中浆细胞的单克隆特性的维持

由于浆细胞的形态学比较容易辨认, 因此通过显微镜检查, 可以判断浆细胞在培养体系中持续生长。此外, 还可以从这些细胞的单克隆特性中表现出来。表 1 示浆细胞的胞浆 kappa 和 lambda 的比率。其中 4 号标本特殊, $\kappa:\lambda$ 比率随着培养时间的延长呈进行性下降, 到培养的第 6 周, $\kappa:\lambda$ 比率倒转, 与培养开始的 κ 型恰正相反。这可能是正常浆细胞逐渐取代了肿瘤性浆细胞的结果。

2. 浆细胞在长期培养中数量上的变化

表 2 示在长期培养中, 浆细胞数量的动态变化。可以看出在非贴壁层细胞中, 浆细胞持续存在, 其中 2 号标本在培养前 6 周, 贴壁层

的浆细胞比培养开始时还多。1 号标本在长达 12 周的培养中, 在非贴壁层均可见浆细胞的分裂相。但 4 号标本在培养的过程中, 浆细胞急剧减少。上述现象与正常人体骨髓细胞长期培养所观察到的结果完全不同; 在正常骨髓细胞长期培养中浆细胞于 4 周后几乎完全消失。

3. 浆细胞的增殖活性

4 例标本的贴壁层中浆细胞核 Ki-67 阳性, 但此种 Ki-67 阳性的浆细胞总是比培养开始时少, 提示此培养体系对浆细胞并不是最佳的。同时 Ki-67 阳性并不意味着在培养中浆细胞的维持时间长。4 号标本在培养的第 9 周, Ki-67 阳性浆细胞产生的非病理性 IgG- λ 比培养开始时产生的 IgG- κ 多。此现象颇为有趣, 似乎提示在培养中当正常浆细胞增殖时, 肿瘤性浆细胞逐渐消亡。

4. CFU-GM 形成活性

表 3 示长期培养的非贴壁层细胞 CFU-GM 形成能力。可以看出, 非贴壁层产生 CFU-GM 的能力一直持续到培养的第 6 周或更长。此后虽产生 CFU-GM 的能力明显减少, 但浆细胞的单克隆特异性依然非常突出(表 1)。

5. 培养中浆细胞分泌的免疫球蛋白

在长期培养的前 6 周, 所有标本均检测出异常的免疫球蛋白(副蛋白 paraprotein), 提示浆细胞在此种长期培养体系中不仅能维持存活, 且能分泌克隆特异的免疫球蛋白。此外还见到贴壁细胞层的红细胞呈缗钱状排列, 此与多发性骨髓瘤患者末梢血的红细胞缗钱状排列相似, 是异常免疫球蛋白包绕红细胞致使相互凝集。

讨 论

本研究表明在人体骨髓细胞长期培养体系中, 肿瘤性浆细胞可在贴壁层长期生长, 而且这些肿瘤性浆细胞有些处于细胞分裂周期, 提示细胞的增殖活性较强。临床上治疗多发性骨髓瘤的化疗方案中, 多有肾上腺皮质激素, 而骨髓细胞长期培养的培养液中含有氢化考的

表 1 在骨髓细胞长期培养中浆细胞的变化

| 标本 | 0 周 | 3 周 | 6 周 | 9 周 | 12 周 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| MM 1 (IgG lambda) | | | | | |
| % PC | 43.2 | 46.0 | 65.5 | 67.0 | 61.0 |
| kappa/lambda | 0.002 | 0.015 | 0.005 | 0.005 | 0.008 |
| %ki-67 + 细胞 | 2.5 | | | 6.0 | 2.5 |
| MM 2 (IgG kappa) | | | | | |
| % PC | 30.0 | 76.0 | | 50.0 | |
| kappa/lambda | | 252.0 | | 211.0 | |
| MM 3 (IgG kappa) | | | | | |
| % PC | 53.2 | 42.0 | 84.0 | 89.2 | 69.0 |
| kappa/lambda | 999 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 |
| %ki-67 + 细胞 | 2.0 | 0.5 | 0 | 0 | |
| MM 4 (IgG kappa) | | | | | |
| % PC | 64.0 | 16.5 | 13.5 | 14.3 | |
| kappa/lambda | 1000 | 31.1 | 2.5 | 0.44 | |
| %ki-67 + 细胞 | | 4.0 | 2.5 | 14.3 | |
| MM 5 (IgA kappa) | | | | | |
| % PC | 64.0 | 38.0 | 38.5 | | |
| kappa/lambda | >1000 | 213.0 | 390.0 | | |
| %ki-67 + 细胞 | | 18.0 | 2.0 | | |

% PC 浆细胞占骨髓有核细胞百分比 (0 周) 及占贴壁层非巨噬细胞的造血细胞的百分比 (3.6.9.12 周)

kappa/lambda 含 κ 或 λ 的浆细胞的比率

%ki-67 + 细胞 ki-67 阳性浆细胞

表 2 骨髓细胞长期培养中贴壁层与非贴壁层的浆细胞数变化

| 标本号 | 0 周 | 3 周 | 6 周 | 9 周 | 12 周 |
|------|-----|------|------|------|------|
| MM 1 | | | | | |
| AC | | 12.9 | 10.3 | 4.1 | 3.5 |
| NAC | 100 | 27.6 | 0.9 | 0.6 | 3.4 |
| MM 2 | | | | | |
| AC | | 339 | 234 | | |
| NAC | 100 | 300 | 17.8 | | |
| MM 3 | | | | | |
| AC | | 37.4 | 38.4 | 42.1 | 12.1 |
| NAC | 100 | 11.7 | 12.0 | 5.1 | 2.9 |
| MM 4 | | | | | |
| AC | | 3.1 | 0.8 | | |
| NAC | 100 | 0.1 | 0.2 | 0 | |
| MM 5 | | | | | |
| AC | | 6.5 | | | |
| NAC | 100 | 10.5 | | | |

表中数字均以百分比表示 培养开始时浆细胞数设为 100%

AC=adherent cell = 贴壁层细胞

NAC=non-adherent cell = 非贴壁层细胞

表 3 5 例多发性骨髓瘤的骨髓长期培养中非贴壁层细胞的 CFU-GM 形成活性

| 标本号 | 0 周 | 3 周 | 6 周 | 9 周 | 12 周 |
|-------|------|------|------|-----|------|
| MM 1 | 34.0 | 19.5 | 6.5 | 0 | |
| MM 2 | 26.5 | 18.0 | 3.2 | 0 | |
| MM 3 | 65.5 | 36.5 | 11.5 | 0.5 | 0 |
| bMM 4 | 21.5 | 12.5 | 2.5 | 0 | |
| MM 5 | 37.5 | 23.0 | 18.5 | 3.5 | 2.5 |

表中数字示 10^5 骨髓有核细胞产生的 CFU-GM 数

松, 这一点似乎令人感到困惑。当然, 有的药物在高浓度对肿瘤细胞表现杀伤作用, 而在低浓度则表现对肿瘤的诱导分化作用^[6]。本研究中, 浆细胞能在氢化考的松存在的条件下长期生长, 除氢化考的松的浓度很低外, 还可能与白介素 6 (IL-6) 有关, 因为有研究结果表明 IL-6 促进浆细胞生长, 而骨髓长期培养中的基质细胞可产生 IL-6^[7]。当然这仅仅是一种推测。

本研究目的并不在于建立浆细胞株, 但从研究结果可以看出, 尽管 Dexter 培养体系可以维持浆细胞生长, 但显然不是最佳的培养条件。如若在通用的骨髓长期培养体系的基础上加以改良, 有可能使浆细胞在体外生长更为良好。浆细胞系高度分化的 B 淋巴细胞, 每株浆细胞只能合成一种化学结构和免疫特异性完全相同的球蛋白, 不同浆细胞合成不同的免疫球蛋白, 此即浆细胞的单克隆特异性。在多发性骨髓瘤, 恶性增生的浆细胞分泌大量结构均一的单克隆免疫球蛋白。本研究的骨髓浆细胞在长期培养的非贴壁层中持续存在, 而在贴壁层中这些细胞保持着原有的免疫球蛋白的单克隆特异性, 说明骨髓基质细胞能较好地支持这些肿

瘤性浆细胞。因此,浆细胞在培养体系中生长并不断地从贴壁层释放到非贴壁层来。

随着培养时间的延长,非贴壁层的CFU-GM产量很快下降,但浆细胞的单克隆特异性却持续存在,这一现象说明Dexter长期培养体系对多发性骨髓瘤的骨髓而言,无法在维持粒系祖细胞生长的同时清除肿瘤性浆细胞。更确切地说,这种培养体系维持浆细胞的生长能力比维持粒系祖细胞更强。因此可以初步认为在临床上不宜以Dexter骨髓细胞长期培养作为骨髓净化(marrow purging)的手段用于多发性骨髓瘤的自体骨髓移植,而急性粒细胞白血病和慢性粒细胞白血病用Dexter长期培养作为净化骨髓的手段来开展自体骨髓移植,已经有成功的临床报告^[8]。

摘 要

多发性骨髓瘤的骨髓细胞置于Dexter长期培养体系中,浆细胞可以长期生长。非贴壁层细胞形成CFU-GM的能力达6周以上,但随着培养时间的延长,CFU-GM的形成活性明显下降。浆细胞产生免疫球蛋白单克隆特异性在Dexter长期培养体系中仍维持不变,但Ki-67

阳性的浆细胞随着培养时间的延长而减少,以上结果说明浆细胞虽然可以在Dexter培养体系中生长并保持单克隆特异性,但此种培养体系不是浆细胞最佳的生长条件。本研究还表明Dexter长期培养不宜作为骨髓净化的手段用于多发性骨髓瘤的自体骨髓移植。

关键词: 多发性骨髓瘤 浆细胞 骨髓 长期培养 骨髓净化

参 考 文 献

- [1] Durine BGM, et al., 1985, *Blood*, 66: 548—555.
- [2] Berneman ZN, et al., 1989, *Leukemia*, 3: 548—661.
- [3] Coulombel L et al., 1983, *N Eng J Med.*, 306: 1493—1498.
- [4] Chang J et al., 1986, *Lancet*, 1: 294—295.
- [5] 陈志哲等, 1991, *细胞生物学杂志*, 13: 182—186.
- [6] Cheson BD, 1986, *J Clin Oncol.*, 4: 1857—1861.
- [7] Kishimoto T, 1989, *Blood*, 74: 1—10.
- [8] Barnett ML, 1989, *Bone Marrow Transplant* 4: 345—349.

A STUDY OF LONG-TERM BONE MARROW CULTURE IN MULTIPLE MYELOMA

LIN Xue Yi LIN Zhong Qing et al.

(Fuzhou Military Medical School, PLA, Fuzhou 350003)

ABSTRACT

Long-term survival of plasma cells from myelomatous bone marrow samples in Dexter culture system was observed. The non-adherent cells of the cultures could generate CFU-GM for more than 6 weeks with a rapid decline in its output as the cultures going on. There was a persistence of monoclonality of immunoglobulin produced by plasma cells in Dexter cultures. As the cultures going on, Ki-67 positive plasma cells diminished. This indicated that although the Dexter culture promoted the persistence of plasma cell and its monoclonality, the culture conditions were not yet optimal. We concluded that the Dexter culture system should not be considered as a purging approach in the setting of autologous bone marrow transplantation for patients with multiple myeloma.

Key words: Multiple myeloma Plasma cell Long-term culture of bone marrow
Bone marrow purging