

全反式维甲酸对急淋白血病骨髓基质细胞粘附能力的影响

黄 耘¹, 李树浓², 罗学群¹, 覃肇源¹

(中山医科大学 1. 附属第一医院儿科, 2. 病理生理教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨全反式维甲酸(ATRA)对急性淋巴细胞白血病(ALL)骨髓基质细胞(BMSC)粘附能力的影响。【方法】将 ATRA 加进骨髓基质细胞培养体系, 培养 18 h 后用流式细胞仪检测 6 例 ALL 骨髓基质细胞表达粘附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 阳性率, 用 MTT 方法检测 ALL 骨髓基质细胞对正常骨髓造血细胞或淋巴瘤 Raji 细胞的粘附率。【结果】药理浓度的 ATRA (1.0 μmol/L) 使 ALL 骨髓基质细胞 ICAM-1 表达明显增高 ($P < 0.05$), 使 ALL 骨髓基质细胞对正常骨髓造血细胞或肿瘤细胞的粘附率均明显增高 ($P < 0.05$)。【结论】药理浓度的 ATRA 可增强 ALL 骨髓基质细胞对正常造血细胞和肿瘤细胞的粘附能力。

关键词: 维甲酸; 白血病; 淋巴细胞; 急性; 基质细胞; 细胞粘附; 粘附分子

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)05-0369-03

The Effects of All-trans Retinoic Acid on the Adhesion of Bone Marrow Stromal Cells from Acute Lymphoblastic Leukemia

HUANG Yun¹, LI Shu-nong², LUO Xue-qun¹, QIN Zhao-yuan¹

(1. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences

2. Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on adhesion of bone marrow stromal cells derived from acute lymphoblastic leukemia. 【Method】Flow cytometry was used to detect the expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 on bone marrow stromal cells, MTT method was used to perform the adhesion assay of bone marrow stromal cells to normal hematopoietic cells or to tumor cells (Raji cells). 【Results】The expression of ICAM-1 on ALL bone marrow stromal cells was enhanced by pharmacological concentration of ATRA (1.0 μmol/L) ($P < 0.05$), the adhesion rates of bone marrow stromal cells to normal hematopoietic cells or to Raji cells were increased apparently by pharmacological concentration of ATRA (1.0 μmol/L) ($P < 0.05$). 【Conclusion】Pharmacological concentration of ATRA can enhance the adhesion capacities of ALL bone marrow stromal cells to normal hematopoietic cells and to tumor cells.

Key words: tretinoin; acute lymphoblastic leukemia; stromal cells; cell adhesion; adhesion molecules

全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是维生素 A 的衍生物, 维甲酸治疗急性早幼粒细胞性白血病, 已取得了公认的效果。维甲酸不仅对多种肿瘤细胞有诱导分化和凋亡的作用, 并对粘附分子如 ICAM-1、VCAM-1 的表达有调节作用。我们既往的实验结果表明粘附分子在骨髓基质细胞(BMSC)对造血细胞或肿瘤细胞的作用中有重要

的意义, 并可能参与了白血病骨髓造血抑制的重建和微小残留病(MRD)的形成^[1]。白血病骨髓造血抑制和 MRD 是白血病治疗中的两大难题, 目前还没有十分理想的治疗手段。我们观察维甲酸对急性淋巴细胞白血病(ALL)骨髓基质细胞粘附能力的影响, 为进一步提高白血病的疗效提供科学依据。

收稿日期: 2000-06-17

作者简介: 黄 耘(1966-)女, 江西南昌人, 博士生, 讲师, 李树浓: 教授, 导师。

1 材料和方法

1.1 ATRA 的配制

四川华邦制药厂生产, 10 mg/粒, 用 20 mL/L 吐温-80 及三蒸水配制为 100 $\mu\text{mol/L}$, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 避光保存备用。

1.2 细胞培养

1.2.1 骨髓基质细胞(成纤维细胞)的培养 骨髓取自 ALL 病儿的胸骨、髂前或髂后上棘。ALL 病儿的诊断、分型和治疗方案参照《小儿白血病诊疗常规》, 共 6 例, 年龄 1~13 岁, 男 4 例, 女 2 例。按常规方法^[1]进行骨髓基质成纤维细胞的培养和鉴定。

1.2.2 正常骨髓单个核细胞原代培养 骨髓取自我院胸外科肺部疾患病人手术中切除的肋骨。用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 以 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于培养皿中。培养体系及条件同骨髓基质细胞培养, 培养的细胞在 7 d 内备用, 此时悬浮细胞中主要是造血细胞。

1.2.3 Raji 细胞 Raji 细胞是淋巴瘤细胞株, 在含 200 mL/L 小牛血清的 1640 中培养, 每 2~3 d 换液 1 次。

1.3 骨髓基质细胞表面粘附分子的测定

当骨髓基质细胞生长成层后, 换新鲜培养液, 分为 4 组, 3 组加入 ATRA, 终浓度分别为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 10.0 $\mu\text{mol/L}$, 对照组不加 ATRA, 继续培养 18 h。将培养的 BMSC 用胰蛋白酶+EDTA 消化后, 分别加入 ICAM-1 和 VCAM-1 单克隆抗体(美国 Pharmingen 产品), 用流式细胞仪检测阳性细胞率。

1.4 骨髓基质细胞粘附率的测定

当骨髓基质细胞生长成层后, 换新鲜培养液, 加入 ATRA, 终浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 对照组不加维甲酸, 继续培养 18 h, 检测骨髓基质细胞对正常骨髓单个核细胞和 Raji 细胞的粘附率。粘附率测定参考文献^[2]。计算公式:

$$\text{粘附率}(\%) = \frac{\text{所测得 } A \text{ 值} - \text{骨髓基质细胞 } A \text{ 值}}{\text{所加入细胞的总 } A \text{ 值}}$$

1.5 统计学分析

应用 t 检验对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 ATRA 对 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

既往的临床实验表明 ATRA 的药理浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 因此我们选择了 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度来观察 ATRA 对 ALL 骨髓基质细胞表达 ICAM-1 和 VCAM-1 的影响, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 可使骨髓基质细胞表达 ICAM-1 明显增强, 且 10.0 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 对骨髓基质细胞表达 ICAM-1 的增强作用大于 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。3 个浓度的 ATRA 对骨髓基质细胞表达 VCAM-1 均无明显影响。结果见表 1。

表 1 ATRA 对 ALL 骨髓基质细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响

Table 1 The effects of ATRA on the expression of ICAM-1 and VCAM-1 on ALL BMSC ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups($\mu\text{mol/L}$)	<i>n</i>	ICAM-1	VCAM-1
Control	6	36.78 \pm 7.52	13.15 \pm 8.41
0.1	6	47.53 \pm 14.53	11.15 \pm 10.76
1.0	6	46.25 \pm 8.47 ¹⁾	13.68 \pm 12.34
10.0	6	51.83 \pm 10.90 ^{1), 2)}	12.66 \pm 4.07

1) Compared with control group $P < 0.05$; 2) compared with 1.0 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$

2.2 ATRA 对基质细胞粘附正常造血细胞和 Raji 细胞的影响

根据上述结果, 我们选择 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATRA 来观察其对 ALL 骨髓基质细胞粘附正常骨髓单个核细胞和 Raji 细胞的粘附率在培养基中加入维甲酸后, 骨髓基质细胞对正常骨髓单个核细胞和 Raji 细胞的粘附率均明显增高。结果见表 2。

表 2 ATRA 对 ALL 骨髓基质细胞粘附正常造血细胞和 Raji 细胞的影响

Table 2 The effects of ATRA on the adhesion of ALL BMSC to normal BMMC and Raji cells ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	<i>n</i>	Normal BMMC	Raji cells
Control	6	30.07 \pm 7.77	54.36 \pm 10.99
1.0 $\mu\text{mol/L}$	6	64.69 \pm 11.89 ¹⁾	76.44 \pm 6.16 ¹⁾

1) Compared with control group, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 ATRA 对 ALL 造血抑制的重建作用

文献报道 ATRA 可以上调一些肿瘤细胞如宫

颈癌细胞、乳腺癌细胞和黑色素瘤细胞表面ICAM-1的表达^[3],可能是通过维甲酸和细胞核内的维甲酸受体结合,激活转录因子NF- κ B而引起。维甲酸可以抑制TNF- α 诱导的VCAM-1在微血管内皮细胞上表达,但不能抑制ICAM-1的表达^[4]。维甲酸影响骨髓基质细胞粘附分子的表达尚未见报道。我们的实验结果表明药理浓度的全反式维甲酸也可以使骨髓基质细胞表达ICAM-1增高,随着维甲酸的浓度增高,对骨髓基质细胞表达ICAM-1的上调作用更强,而对骨髓基质细胞表达VCAM-1没有明显的作用,因此维甲酸对细胞粘附分子表达的影响是有选择性的。

在本实验中,我们观察到药理浓度的维甲酸可以使ALL骨髓基质细胞对正常造血细胞和肿瘤细胞的粘附率均明显增高,根据我们既往的实验结果,ICAM-1和VCAM-1参与了ALL骨髓基质细胞对正常造血细胞的粘附,但与骨髓基质细胞对Raji细胞的粘附关系不密切^[1],因此提示维甲酸不仅可以使骨髓基质细胞表达ICAM-1增强,而且可以增强其他粘附分子的表达,使骨髓基质细胞对肿瘤细胞的粘附增强。

维甲酸不仅广泛应用于急性早幼粒细胞性白血病和其他一些癌症及皮肤病的治疗,对其他一些恶性血液病如骨髓异常增生综合征也有一定的治疗效果,维甲酸和细胞因子联合应用可以促进血红蛋白和血小板的上升,减少病人对输血的要求,提示维甲酸有促进骨髓造血的作用^[3],但其机制尚不明确。本实验结果表明药理剂量的维甲酸对骨髓基质细胞粘附正常造血细胞的能力有一定的增强作用。骨髓基质细胞对造血细胞的直接粘附在造血细胞的增殖和分化中有非常重要的作用,因此维甲酸有可能通过增强白血病骨髓基质细胞对正常造血细胞的粘附能力而促进造血,因而有可能帮助由于化疗造成的白血病骨髓造血抑制的重建。

3.2 维甲酸与MRD形成的可能关系

MRD的形成机制还不明确,文献报道骨髓基质细胞对白血病细胞有一定的保护作用,可以支持白血病细胞的增殖迁移,阻滞其分化,并使白血病细胞凋亡减少、抗药性增强,在上述作用中,骨髓基质细胞对白血病细胞的粘附起重要作用。在本实

验中,药理剂量的维甲酸可以使骨髓基质细胞对肿瘤细胞的粘附能力增强,因此维甲酸的使用有可能促使MRD的形成。这是临床上应用ATRA治疗白血病值得警惕的问题。如何使维甲酸发挥其促进造血的作用,而避免其加强基质细胞对肿瘤细胞的粘附是我们需要继续研究的课题。

参考文献:

- [1] 黄耘,李树浓,李晓瑜,等.急性淋巴细胞性白血病骨髓基质细胞的粘附行为[J].中国病理生理杂志,2000,16(8):713.
- [2] 王江方,张学光,张毅,等.急性淋巴细胞性白血病及其骨髓基质细胞粘附分子表达和粘附行为的探讨[J].中国免疫学杂志,1996,12(5):290.
- [3] Santin A D, Hermonat P L, Ravaggi A, *et al.* Retinoic acid up-regulates the expression of major histocompatibility complex molecules and adhesion/constimulation molecules (specifically, intercellular adhesion molecule ICAM-1) in human cervical cancer[J]. Am J Obstet Gynecol, 1998, 179(4): 1020.
- [4] Gille J, Parton L L, Lawley T J. Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1997, 99(3): 492.
- [5] Ganser A, Maurer A, Contzen C, *et al.* Improved multilineage response of hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes to a combination therapy with all-trans retinoic acid, granulocyte colony-stimulating factor, erythropoietin and alpha-tocopherol[J]. Ann Hematol, 1996, 72(4): 237.
- [6] Josefson D, Blomhoff H K, Loma J, *et al.* Retinoic acid induces apoptosis of human CD34+ hematopoietic progenitor cells; involvement of retinoic acid receptors and retinoic X receptors depends on lineage commitment of the hematopoietic progenitor cells[J]. Exp Hematol, 1999, 27(4): 642.
- [7] Visnini G, Ottaviani E, Zauli G, *et al.* All-trans retinoic acid at low concentration directly stimulates normal adult megakaryocytopoiesis in the presence of thrombopoietin or combined cytokines[J]. Eur J Haematol, 1999, 63(3): 149.

(编辑 关淡庄)