

三氧化二砷对慢性粒细胞白血病患者骨髓间质干细胞整合素- β_1 表达的影响研究*

庄 琴, 余先球, 陆益龙[△], 巴 荣, 朱 彦(1. 江苏大学附属医院血液科, 江苏镇江 212001)

【摘要】 目的 体外观察不同浓度三氧化二砷(ATO)对慢性粒细胞白血病(CML)患者骨髓间质干细胞(BMSCs)整合素- β_1 表达水平及生长的影响,探讨 ATO 对 CML 患者 BMSCs 可能发生的及相关机制。**方法** 抽取慢性期 CML 患者骨髓液,分离单个核细胞行 BMSCs 体外培养,取第 3、4 代 BMSCs,用不同浓度 ATO 处理,48 h 后提取总 RNA,逆转录-聚合酶链反应法检测整合素- β_1 mRNA 表达水平,72 h 后观察 BMSCs 形态。**结果** ATO 可抑制 CML 患者 BMSCs 体外生长,并呈浓度依赖性;对照组 BMSCs 整合素- β_1 基因表达水平为 0.123 ± 0.041 , BMSCs 在 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 及 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 浓度 ATO 作用下整合素- β_1 表达升高,分别为 0.658 ± 0.129 和 0.426 ± 0.090 , $5.0 \mu\text{mol/L}$ 浓度 ATO 可明显抑制整合素- β_1 表达(0.041 ± 0.020)。**结论** 不同浓度 ATO 对 BMSCs 整合素- β_1 表达存在不同影响,对整合素- β_1 表达变化的干预有可能成为该类疾病新的治疗靶向。

【关键词】 慢性粒细胞白血病; 间质干细胞; 三氧化二砷; 整合素- β_1

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.24.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)24-2956-03

The research on the effects of arsenic trioxide on the expression of integrin- β_1 in bone marrow stromal cells derived from patients with chronic myeloid leukemia* ZHUANG Qin¹, YU Xian-qiu², LU Yi-long^{2△}, BA Rong², ZHU Yan² (Department of Hematology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

【Abstract】 Objective To observe the bionomics and the expression of integrin- β_1 mRNA of the cultured bone marrow stromal cells (BMSCs) from chronic myeloid leukemia (CML) in myeloid crisis effected by arsenic trioxide (ATO). **Methods** BMSCs were cultured in vitro. The morphology of the BMSCs cultured with different concentrations of ATO for 72 h was observed. Total RNA was extracted from the BMSCs cultured with different concentrations of ATO for 48 h, then the expression of integrin- β_1 gene by real-time PCR was tested. **Results** The expression of integrin- β_1 mRNA of the BMSCs in the concentrations of ATO at $1.0 \mu\text{mol/L}$ and $2.5 \mu\text{mol/L}$ was higher than that in the control group. But $5.0 \mu\text{mol/L}$ ATO inhibited the integrin- β_1 expression. **Conclusion** Different concentrations of ATO have different effects on the integrin- β_1 expression in BMSCs. The intervention of the expression of integrin- β_1 may be the new therapeutic target to CML.

【Key words】 chronic myeloid leukemia; bone marrow stromal cell; arsenic trioxide; integrin- β_1

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是以常见获得性粒细胞恶性增殖为特征的骨髓增殖性疾病,其增殖过程受骨髓造血微环境的调控,而骨髓间质干细胞(BMSCs)是骨髓造血微环境的重要组成部分,已有研究证实 CML 患者 BMSCs 存在质的异常,这种异常是否受药物等其他因素影响是目前研究的热点。本研究着重观察三氧化二砷(ATO)体外对 CML 患者 BMSCs 的生长特性及整合素- β_1 表达水平的影响,进一步探讨 BMSCs 在 CML 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 江苏大学附属医院血液科 2006 年 12 月至 2007 年 8 月门诊及住院 CML 患者 5 例,参照 FAB 诊断标准及世界卫生组织分型,均经骨髓细胞形态学、免疫表型、分子生物学、染色体等检测确诊,其中男 3 例,女 2 例,中位年龄 53.6 岁。

1.2 主要试剂与仪器 L-DMEM(Gibco BRL 公司产品)、RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司产品)、逆转录试剂盒(TOYOBO 公司产品)、聚合酶链反应(PCR)试剂盒(TaKaRa 公司产品)、逆转录-PCR(RT-PCR)试剂盒(TOYOBO)、倒置

式生物显微镜 TE300(NIKON 公司产品)、PCR 分析仪(Eppendorf 公司产品)、凝胶成像分析系统(SYNGENE BIO IMAGING SYSTEMS 公司产品)、Eppendorf Biophotometer (Eppendorf 公司产品)、荧光定量 PCR 分析仪(Corbett Research 公司产品)。

1.3 标本处理与 BMSCs 培养 参照国内学者试验方法^[1],无菌抽取患者骨髓 4 mL,肝素抗凝,1:2 稀释后缓慢转入 1.077 g/mL Ficoll 泛影葡胺细胞分离液上层进行密度梯度离心,取中间单个核细胞层。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后按每平方厘米 5×10^5 单个核细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中,每瓶含 5 mL 完全 DMEM 培养液(完全 DMEM 培养液为 DMEM 培养液中含青、链霉素各 100 U/mL , 100 mL/L 胎牛血清, 50 mL/L 马血清, $0.25 \mu\text{g/mL}$ 两性霉素)。置 $5\% \text{ CO}_2$ 、饱和湿度、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养。间质干细胞贴壁生长,于 3 d 后换液,去非贴壁细胞,以后每 3 天换液 1 次,并在倒置式生物显微镜下观察细胞形态。培养 10 d 左右,贴壁细胞形成融合层,用 0.25% 胰蛋白酶(用 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐配制)消化,按 1:2 比例接种传代。

1.4 ATO 处理细胞 待 CML 患者第 3 代 BMSCs 铺满瓶底时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 以每培养瓶细胞数为 5×10^5 传代, BMSCs 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h 后加入终浓度分别为 1.0、2.5、5.0 μmol/L 的 ATO, 对照组不加 ATO。37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下继续培养 48 h 后终止培养过程, 裂解细胞进行细胞 RNA 提取, RT-PCR 法检测整合素-β₁ 表达水平。另取 CML 患者传代的第 3 代 BMSCs (5×10^5 /瓶), BMSCs 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h 后加入终浓度分别为 1、2.5、5 μmol/L 的 ATO, 对照组不加 ATO, 培养 72 h, 观察细胞形态。

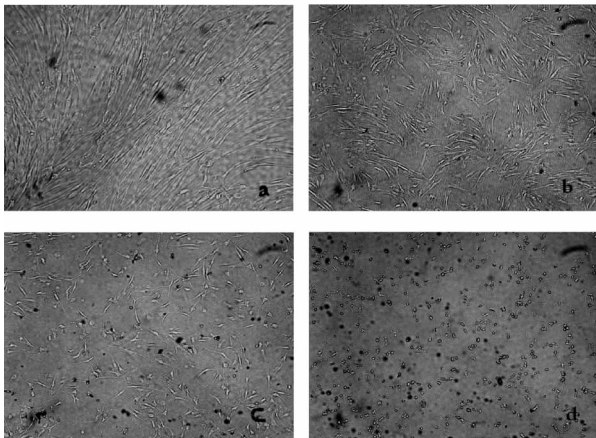
1.5 BMSCs 中整合素-β₁ 基因表达水平检测 应用 PRIMER 5.0 软件辅助设计整合素-β₁ 引物, 上海生工生物工程技术有限公司合成, 整合素-β₁ 扩增片段长度 221 bp, 内参照 β-肌动蛋白的扩增片段长度 262 bp。引物序列见表 1。

表 1 β-肌动蛋白和整合素-β₁ 的 PCR 引物序列

基因	引物	片段长度(bp)
β-肌动蛋白	正义: 5'-CACGAACTACCTTCACTCC- 3'	262
	反义: 5'-CATACTCTGCTTGCTGATC- 3'	
整合素-β ₁	正义: 5'-CAAGTCATTGTTGGATAAGCG- 3'	221
	反义: 5'-GGAGTAAAGAGCCTGGGTTC- 3'	

取上述培养后的 BMSCs, 加 Trizol (Invitrogen) 裂解细胞, 氯仿、异丙醇提取总 mRNA, 并根据逆转录试剂盒操作说明按 20 μL 体系合成 cDNA 并进行扩增, PCR 反应体系为 20 μL, 包括: Realtime Master Mix 10 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 引物各 0.4 μL (10 pmol/μL), 去离子水补足至 20 μL。扩增条件: 94 °C 30 s, 94 °C 4 s, 56 °C 5, 72 °C 15 s, 共循环 40 次; 70 °C 10 min。融解曲线分析, 为了避免引物二聚体的干扰, 使用 4 步法, β-肌动蛋白在 88 °C 读取荧光, 整合素-β₁ 在 82 °C 读取荧光。与内参照比较, 计算整合素-β₁ 基因表达量, 实时定量型 RT-PCR 仪购自 Corbett Research 公司。

1.6 统计学处理 实验组与对照组之间 BMSCs 的整合素-β₁ 表达水平通过 SPSS13.0 统计软件行两独立样本 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。



A. 对照组; B. 1.0 μmol/L ATO 培养 72 h 组; C. 2.5 μmol/L ATO 培养 72 h 组; D. 5.0 μmol/L ATO 培养 72 h 组

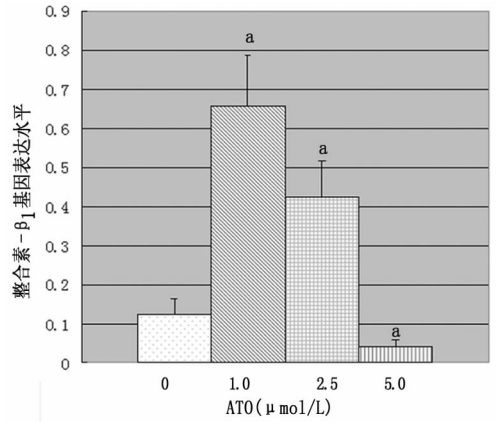
图 1 ATO 对 BMSCs 生长的影响 (×100)

2 结 果

2.1 ATO 对 BMSCs 生长的影响 在 BMSCs 培养体系中直

接加入不同浓度 ATO 共培养 72 h, 取出培养瓶, 倒置显微镜观察细胞形态, 加入 ATO 培养 72 h 后, 随着 ATO 浓度升高, BMSCs 生长抑制程度明显增加, 结果见图 1。

2.2 ATO 对 BMSCs 中整合素-β₁ 基因表达水平的影响 ATO 共培养 48 h 后, 对照组 BMSCs 整合素-β₁ 基因表达水平为 0.123 ± 0.041。1.0、2.5、5.0 μmol/L ATO 浓度组整合素-β₁ 基因表达水平分别为 0.658 ± 0.129、0.426 ± 0.090、0.041 ± 0.020。具体比较结果见图 2。



注: 与对照组比较, *P < 0.01

图 2 不同浓度 ATO 作用 48 h 后整合素-β₁ 基因表达水平

3 讨 论

造血细胞的生长受多方面因素的调控, BMSCs 是参与造血调控的重要方面。有文献报道, 健康人 BMSCs 可表达多种细胞因子, 其中细胞因子 SCF、整合素 α_vβ₃、粒-巨噬细胞集落刺激因子等与造血细胞的生成密切相关^[2]。而 CML 以大量白血病细胞增殖、聚集为特征^[3-4], 该类患者 BMSCs 的 SCF 高表达是 CML 患者白血病细胞高增殖的因素之一^[5]。整合素是一类由两条跨膜多肽链 α 和 β 以非共价方式结合而成的异二聚体跨膜黏蛋白, 介导了胞内信号外传和胞外信号内传, 与细胞增生、变形、迁移、生物活性物质分泌密切相关^[6], 这种作用是通过 VLA-5 (α₅β₁) 和 VLA-4 (α₄β₁) 对造血干细胞归巢、定位、释放等多方面的作用来实现的, 其中整合素-β₁ 起着关键作用^[7]。有研究表明, 实体外 CML 患者 BMSCs 存在整合素高表达^[8]。高水平整合素-β₁ 可连接到正常 CD34⁺ 细胞并使周期依赖性蛋白激酶抑制剂 p27 (Kip) 浓度升高, 降低 cdk2 的活性而促进细胞 G(1)/S 细胞周期转化^[9], 且细胞增殖的调节基因 PYK2 活化完全依赖于整合素介导细胞信号传导^[10], 这些均说明整合素-β₁ 与 CML 患者病情发展密切相关。

ATO 是治疗急性早幼粒细胞白血病的有效药物之一, 目前也试用于其他恶性肿瘤。本研究发现, ATO 对 CML 患者 BMSCs 体外生长具有明显的抑制作用, 其抑制作用与 ATO 浓度密切相关。有文献报道, ATO 对细胞的生长抑制作用与 ATO 激活 JNK1/2 而发生的促凋亡作用有关^[11]。对 HL60 细胞研究发现, PI3K/Akt 抑制剂可明显加强 ATO 对 HL60 细胞促凋亡作用, 与 ATO 上调 PI3K 的负调控因子 Cbl-b 的表达有关^[12]。以上说明 ATO 对细胞活性的影响多是通过 ATO 对相关细胞生长调控的因子来实现的。本研究还发现, 体外 ATO 对 CML 患者 BMSCs 的活性同样存在影响, 低浓度时可促进 BMSCs 的整合素-β₁ 高表达, 当浓度升高到 5.0 μmol/L 时表现出抑制作用。有研究发现, BMSCs 不同于造血干细胞、脐血干细胞, BMSCs 的整合素-β₁ 等基因表达水平的变化直接

影响到细胞的运动,细胞与细胞间的信号传导及相互作用和细胞的增殖与分化^[13]。由此可以推测,不同浓度的 ATO 在患者体内有可能会出现不同的生物学作用,而这些不同作用在患者体内可产生不同的生物学效应。

综上所述,ATO 对 BMSCs 整合素-β₁ 的表达具有明显干预作用,而整合素-β₁ 及其相关的细胞信号传导对细胞的增殖分化具有重要调节作用,与肿瘤等恶性疾病的发生、发展有着一定的联系。因此,对整合素-β₁ 表达变化的干预有可能成为该类疾病治疗的靶点,ATO 对 BMSCs 整合素-β₁ 表达水平的影响是否可用于临床相关疾病的治疗等尚有待于临床进一步研究。

参考文献

[1] 许文荣,张锡然,钱晖,等. 人骨髓间质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究[J]. 临床检验杂志,2003,21(2):193-195.

[2] Francis J,Giles H,Armsnd K,et al. Acute myeloid leukemia[J]. Hematology,2002,20(1):73-110.

[3] Moore S,McDiarmid LA,Hughes TP,et al. Stem cell factor and chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells[J]. Leuk Lymphoma. 2000,38(3-4):211-220.

[4] Moore S,Haylock DN,Levesque JP,et al. Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells[J]. Blood,1998,92(7):2461-2470.

[5] 余先球,陆益龙,巴荣,等. CML 患者骨髓间质干细胞的干细胞因子 mRNA 表达水平检测[J]. 临床检验杂志,2008,26(1):16-19.

[6] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. Cell,2002,110(6):673-687.

[7] Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis[J]. Cancer Met Rev,1996,15(2):187-194.

[8] 陆益龙,余先球,朱彦,等. 慢性髓系白血病骨髓间充质干细胞整联蛋白表达变化研究[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(4):755-758.

[9] Jiang Y,Zhao RC,Verfaillie CM,et al. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34⁺ cell proliferation;BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(19):10538-10543.

[10] Dylla SJ,Deyle DR,Theunissen K,et al. Integrin engagement-induced inhibition of human myelopoiesis is mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 gene products[J]. Exp Hematol,2004,32(4):365-374.

[11] Eguchi R,Fujimori Y,Takeda H,et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells[J]. J Cell Physiol,2011,226(3):762-768.

[12] Li YC,Qin XJ,Qian JL,et al. E3 ubiquitin ligase Cbl-b potentiates the apoptotic action of arsenic trioxide by inhibiting the PI3K/Akt pathway[J]. Braz J Med Biol Res,2011,44(2):105-111.

[13] Ren J,Jin P,Sabatino M,et al. Global transcriptome analysis of human bone marrow stromal cells (BMSC) reveals proliferative, mobile and interactive cells that produce abundant extracellular matrix proteins, some of which may affect BMSC potency[J]. Cytotherapy,2011,13(6):661-674.

(收稿日期:2011-09-16)

(上接第 2955 页)

[J]. Cancer Cell,2003,3(6):589-601.

[5] 李子博,周江,周琳,等. 携带人肿瘤抑素 Tumstatin 基因的重组腺相关病毒载体的构建及其在乳腺癌细胞中的表达研究[J]. 实用预防医学,2010,17(12):2362-2364.

[6] Boosani CS,Mannam AP,Cosgrove D,et al. Regulation of COX-2 mediated signaling by alpha 3 type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis[J]. Blood,2007,110(4):1168-1177.

[7] Pedchenko V,Zent R,Hudson BG. Alpha(V) and alpha(V) beta5 integrins bind both the proximal RGD site and

non-RGD motifs within noncollagenous(NCI) domain of the alpha3 chain of type IV collagen; implication for the mechanism of endothelia cell adhesion[J]. J Biol Chem,2004,279(4):2772-2780.

[8] Wright JF,Qu G,Tang C,et al. Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector[J]. Curt Opin Drug Discov Devel,2003,6(2):174-178.

(收稿日期:2011-08-25)

