

巨核细胞白血病发生与细胞因子网络失衡相关性研究

赵东长¹, 杨 默²

Relationship between Megakaryocytic leukemia genesis and the abnormalities of Cytokine Expression

ZHAO Dongchang¹, YANG Mo²

1. Guangdong Province Maternal and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China; 2. Department of Pediatrics, The Chinese University of Hong Kong

Abstract: Objective To study the expression of cytokine pattern in megakaryoblastic leukemia cells and the possible involvement of cytokines in megakaryoblastic leukemia genesis. **Methods** RT-PCR and Southern blot were used to detect cytokine mRNA expression in four megakaryoblastic cell lines: Meg-01, Dami, CHRF-288-11 and M-07e and also compared the differences of cytokine expression. **Results** Cytokine IL-1, IL-3, and IL-6 were universal expressed in all four megakaryoblastic cell lines. These cytokines may be involved as autocrine growth factors for megakaryocytopoiesis. Interleukin-1, inflammatory cytokine IL-1, IL-5, and IL-12p40, were only detected in Meg-01, which are more mature megakaryoblastic cells. The expression of other cytokine pattern was also showed differences in the four megakaryoblastic leukemia cell lines. **Conclusion** The data obtained suggest that megakaryocytic leukemia genesis may be related to the abnormalities of cytokine network expressed in these leukemia cells. These observations could provide a clue for further study in megakaryoblastic leukemia.

Keywords: Megakaryocyte; Leukemia; Cytokine

摘要:目的 了解巨核细胞白血病细胞因子的表达谱系。方法 用 RT-PCR 方法结合 Southern 印迹检测 4 个分化程度不同的巨核细胞株 Meg-01、Dami、CHRF-288-11、与 M-07e 的多个细胞因子表达情况, 并比较它们之间的差异性。结果 4 个巨核细胞白血病细胞株均表达自分泌生长因子 IL-1、IL-3、IL-6, 涉及免疫炎症反应的细胞因子 IL-1、IL-5 和 IL-12p40 仅在细胞分化程度高的 Meg-01 中表达, 而且 4 个巨核细胞株也存在不同的细胞因子表达谱系。结论 巨核细胞白血病的发生与细胞因子网络的失衡可能具有密切的关联性, 值得今后在巨核细胞白血病病人的临床诊疗过程中进一步关注。

关键词: 巨核细胞; 白血病; 细胞因子

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)06-0354-02

0 引言

有报道白细胞介素 1、2、3、6 及 GM-CSF、G-CSF、及 M-CSF 等细胞因子可由白血病细胞自发产生, 通过自反馈机制促进细胞本身的增殖^[1,2]。为此, 我们采用细胞分化程度不同的 4 个巨核细胞株 Meg-01、Dami、CHRF-288-11、与 M-07e 作为研究对象, 分别检测它们的细胞因子 mRNA 的组成性表达情况, 试图了解巨核细胞白血病的细胞因子表达谱系。

1 材料与方法

1.1 细胞株与培养条件

巨核细胞细胞株 (Meg-01, Dami, CHRF-288-

11 和 M-07e) 由澳大利亚新南威尔士大学 BH Chong 教授实验室赠送。该细胞株培养于 IMDM (Iscoves modified Dulbecco's medium) 加 10% FCS 及青霉素 (100U/ml)、链霉素 (50mg/ml) 中, 每 2~3 天换液 1 次, 对细胞因子依赖型细胞株 M-07e 需加入 IL-3 (20ng/ml)。培养瓶置于 37℃、100% 湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 外周血单核细胞制备

外周血单核细胞来源于一成年健康志愿者。无菌状态下应用淋巴细胞液按常规方法分离静脉血中的单个核细胞, 置于 IMDM 加 10% FCS 及青霉素 (100U/ml)、链霉素 (50mg/ml) 中培养, 并用刀豆蛋白 A (concanavalin A) (10ng/ml) 激活 6 小时, 作为细胞因子表达的阳性对照。

1.3 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

收稿日期: 2004-02-17; 修回日期: 2004-04-14
作者单位: 1. 510010 广州, 广东省妇幼保健院; 2. 香港中文大学儿科学系

使用 RT-PCR 方法^[4] 检测 IL-1 至 IL-18、TNF-、TNF- 和 IFN- 在 4 个巨核细胞株的表达。

简要的步骤如下:收集生长状态良好的细胞 5×10^6 用来抽提总 RNA, 使用 RNeasy(QIAGEN) 试剂盒, 操作步骤按说明书进行。mRNA 的逆转录反应按下列方案进行:RNA1 μg , d (N)₆ 18100n g, 200UMMLV, 0.1M DTT2 μl , 10m μ dNTPs1 μl , 总体积 20 μl , 42 孵育 50 分钟。RT-PCR 的反应体系由下列组成:1 μl cDNA, 2.5 μl 10 \times PCRbuffer, 0.5U Taq polymerase, 0.2mM dNTP 及每对引物 30pmol, 总反应体积为 20 μl 。总反应循环为 30 周期, 细胞因子 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-12p35, IL-12p40, IL-15, IL-18 和 TNF 检测的退火温度为 60, 而 IL-1, IL-3, IL-5, IL-8, IL-10, TNF 及 IFN 检测的退火温度为 58。以 GAPDH 作为内参照, 每次实验均设阳性、阴性及空白对照。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像分析仪分析。

1.4 Southern 印迹

将电泳后的琼脂糖凝胶上的 PCR 产物转移到尼龙膜上过夜, 用标有荧光色素的相应细胞因子寡核苷酸探针与尼龙膜上的 PCR 产物杂交, 通过放射性自显影法验证电泳阳性结果。

2 结果

2.1 Meg-01 的细胞因子表达 该细胞株表达大部分巨核细胞白血病细胞株的细胞因子基因表达

	Meg-01	Dami	CHRF-288-11	M-07e	PBMCS	GENOMI	WATER	RtaseNe getive
IL-1	+	--	--	--	+	--	--	--
IL-1	+	+	+	+	+	--	--	--
IL-2	--	--	+	--	+	--	--	--
IL-3	+	+	+	+	+	--	--	--
IL-4	--	--	--	+	+	--	--	--
IL-5	+	--	--	--	+	--	--	--
IL-6	+	+	+	+	+	--	--	--
IL-7	+	+	+	--	+	--	--	--
IL-8	+	+	+	+	+	--	--	--
IL-10	--	--	--	--	+	--	--	--
IL-12p35	--	--	--	--	+	--	--	--
IL-12p40	+	--	--	--	+	--	--	--
IL-13	--	--	--	--	+	--	--	--
IL-15	--	--	+	--	+	--	--	--
IL-18	+	+	+	+	+	--	--	--
IFN	--	--	--	--	+	--	--	--
TNF	+	+	+	+	+	--	--	--
TNF	--	--	--	--	+	--	--	--
GAPDH	+	+	+	+	+	--	--	--

+: 表达 ; -: 不表达

分细胞因子, 如 IL-1、IL-1、IL-3、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12p40、IL-18 和 TNF 等, 反映了 Meg-01 趋于分化成熟。

2.2 Dami 的细胞因子表达 该细胞株表达的细胞因子少于 Meg-01。

2.3 CHRF-288-11 的细胞因子表达 该细胞株表达的细胞因子相似于 Dami, 但特征性地表达 IL-2 和 IL-15, 值得关注。

2.4 M-07e 的细胞因子表达 该细胞株表达的细胞因子明显减少, 仅表达 IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-18 和 TNF, 也是这 4 株细胞株中唯一表达 IL-4 的细胞株。

以上结果均详见图 1 及表 1。

3 讨论

巨核细胞白血病发生机制的研究较其他类型的白血病而言进展缓慢, 其主要原因不仅在于本病临床少见、普通光镜和组织化学染色条件下不易做出诊断, 而且巨核细胞在正常骨髓中的数量也相当稀少、不便于采集, 给科研带来了一定的难度。我们采用细胞分化程度不同的 4 个巨核细胞株 Meg-01、Dami、CHRF-288-11、与 M-07e 作为研究对象, 探讨细胞因子的表达谱系, 初步结果显示了巨核细胞白血病存在细胞因子网络失衡状态, 表现为多个正调节的自分泌生长因子在 4 个细胞株表达, 而多个炎症免疫调节因子仅出现在分化程度好的细胞株中,

(下转第 376 页)

- of sequence-specific DNA/protein interactions. *J Biochem Biophys* [J]. *Methods*, 2003, 55 (3) : 215-232.
- [4] RBashir, R Gomez, ASarika ya, et al. Adsorption of avidin on microfabricated surfaces for protein biochip applications [J]. *Biotechnol and Bioeng*, 2001, 73 (4) : 324-328.
- [5] Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, et al. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions [J]. *Anal Biochem*, 2000, 278 (2) : 123-131.
- [6] Obeid PJ, Christopoulos TK. Continuous flow DNA and RNA amplification chip combined with laser induced fluorescence detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 494 (1) : 1-9.
- [7] Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. *Science*, 2002, 295 (5559) : 1503-1506.
- [8] Gannett PM, Powell JH, Johnson IEM, et al. Solid phase DNA binding detection by EPR spectroscopy [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43 (11) : 1931-1933.
- [9] Arlinghaus HF, Ostrop M, Friedrichs O, et al. Genomic diagnosis with TOF-SIMS analysis [J]. *Sci*, 2003, 203 (6) : 689-692.
- [10] Cloud PP, John WG, David KO, et al. Rapid protein display profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip [J]. *Drug Dev Res*, 2000, 49 (1) : 34-42.
- [11] Tarui T, Murata A, Yoshie R, et al. Alteration of the cytokine-related gene expression levels in lymphocytes observed in thermal injured patients estimated by the DNA chip technology [J]. *International Congress Series*, 2003, 1255: 79-85.
- [12] Song JH, Kim JM, Kim SH, et al. Comparison of the gene expression profiles of monocytic versus granulocytic lineage of HL-60 leukemia cell differentiation by DNA microarray analysis [J]. *Life Sci*, 2003, 73 (13) : 1705-1719.
- [13] Weidong D, Marsac C, Kruschina M, et al. Functionalized self-assembled monolayers on gold for detection of human mitochondrial tRNA gene mutations [J]. *Anal Biochem*, 2003, 322 (1) : 14-25.
- [14] Hao D, Ohme Takagi M, Yamasaki K. A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins [J]. *FEBS Lett*, 2003, 536 (1-3) : 151-156.
- [15] Robyr D, Grunstein M. Genomewide histone acetylation microarrays [J]. *Methods*, 2003, 31 (1) : 83-89.
- [16] Grubor NM, Shinar R, Jankowiak R, et al. Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low temperature fluorescence [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19 (6) : 547-556.

[编辑: 张麟; 校对: 安凤]

(上接第 355 页)

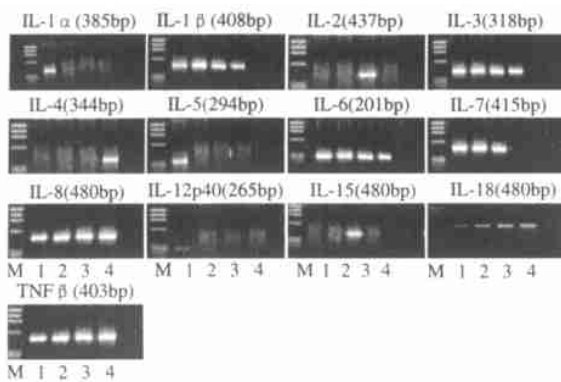


图 1 4 个巨核细胞白血病细胞株的细胞因子基因表达

较少表达在分化程度最差的 M-07e 细胞株中。

研究发现,许多实体肿瘤和白血病存在自分泌/旁分泌调节机制,涉及了大量的细胞因子^[1,3]。本研究结果与其他相关报道同样也显示了巨核细胞白血病存在多个正调节的自分泌生长因子,如 IL-1、IL-3、IL-6 等。

巨核细胞在免疫网络中的作用和地位,近年来逐步得到认识^[5]。我们与其他学者的研究显示,巨核细胞能够合成和表达黏附蛋白和细胞因子,参与免疫反应,对机体具有一定的保护作用。本实验结

果显示,涉及免疫炎症反应的细胞因子 IL-1、IL-5 和 IL-12p40 仅在细胞分化程度高的 Meg-01 中表达,而在分化程度最差的 M-07e 细胞株中则很少表达。这提示了巨核细胞白血病发生过程中,可能存在巨核细胞的免疫调节功能受损。

由此可见,巨核细胞白血病的发生与细胞因子网络的失衡可能具有密切的关联性,值得今后在巨核细胞白血病病人的临床诊疗过程中进一步关注。

参考文献:

- [1] Wickenhauser C, Lorenzen J, Thiele J, et al. Secretion of cytokines (interleukin-1, -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal bone marrow megakaryocytes [J]. *Blood*, 1995, 85 (3) : 685-691.
- [2] Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2002, 99 (12) : 4283-4297.
- [3] Yang M, Li K, Chui CM, et al. Expression of interleukin-1 type II receptor in megakaryocytic cells and enhancement of IL-1 on megakaryocytopoiesis and NF- κ B expression [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111 (1) : 371-380.
- [4] 杨默, 李桂霞, 戚其威, 等. 巨核细胞的免疫学研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2000, 8 (1) : 5-9.

[编辑: 张麟; 校对: 刘红武]