

[文章编号] 1000-2200(2005)03-0189-04

# 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞分化的判定

许培权<sup>1</sup>, 龚建平<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 建立一种可靠的肿瘤细胞分化模型, 确立一套简便、准确判定肿瘤细胞是否分化的方法。方法: 以分化诱导剂全反式维 A 酸(ATRA) 影响下不同时间点的 HL-60 细胞为检测对象, 流式细胞术分析细胞大小及细胞表面的分化标志物; 经碘化丙锭染色后, 用激光共聚焦显微镜观察对已分化细胞进行形态学确认。结果: 随着药物诱导时间的延长, 被诱导的 HL-60 细胞体积逐渐增大; 72 h 后, 被 ATRA 诱导细胞开始表达分化标志物 CD11b 并出现细胞核型的变化。结论: ATRA 能诱导 HL-60 细胞分化; 流式细胞术分析细胞大小及细胞表面的分化标志物, 再用激光共聚焦显微镜观察已分化细胞核的形态变化, 是判定肿瘤细胞分化简便、准确的方法。

[关键词] 全反式维 A 酸; 流式细胞术; 细胞分化; 激光共聚焦显微镜

[中国图书资料分类法分类号] R 986 [文献标识码] A

## Establishment and identification of HL-60 cell differentiation induced by all trans retinoic acid

XU Pei-quan<sup>1</sup>, GONG Jian-ping<sup>2</sup>

(1. Department of Oncology Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; 2. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a constant model of malignant tumor cell differentiation and to set up a set of methods that the differentiated cells can be identified. **Methods:** HL-60 cells influenced by all-trans retinoic acid (ATRA) capable of inducing differentiation at different time were used as subjects. The differentiation marker on the cell surface and the cell volume were analyzed by using flow cytometry. The differentiated cells were identified by confocal microscope after having been stained with PI. **Results:** With the drug-inducing time increasing, the volume of differentiated cells was enlarged gradually. After 72 hours, the differentiated cells induced by ATRA began to express differentiating marker CD11b and the differentiated cells, nuclei was changed into the nucleus morph differentiation just like neutrophil nuclei. **Conclusions:** The differentiation of HL-60 cells can be induced by ATRA. HL-60 cells, differentiation can be conveniently judged by combining the cell volume, and the cells differentiating marker, analyzed by flow cytometry with morphodifferentiation observed by confocal microscope after having been stained with propidium iodide.

[Key words] all-trans retinoic acid; flow cytometry; cell differentiation; confocal microscope

细胞分化(cell differentiation)是指同源细胞逐渐发育为具备稳定形态结构、生理功能和生化特征的另一类型细胞的过程。在高等生物体, 细胞分化的一个显著特点是分化状态一旦确立将十分稳定。但是, 在体外培养系统中, 某些已经分化甚至不再分裂的细胞不仅能重新分化, 而且失去原有的结构和功能特点。这种被称为“永生”细胞株的去分化细胞很可能转化为癌细胞。实际上, 与细胞恶性增殖和细胞凋亡受阻一样, 细胞分化异常在恶性肿瘤发病学上占有重要的地位。为研究细胞分化及恶性肿瘤分化异常的机制, 需要建立一种可靠的恶性肿瘤细

胞分化模型和一套判定细胞分化简便、准确的方法。为此, 我们在这方面作一尝试性研究。

### 1 材料与方法

1.1 细胞培养 人类早幼粒白血病细胞 HL-60(武汉大学生命科学院惠赠)置入含 10% 胎牛血清、抗生素(100 u/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素)和谷氨酰胺(2 mmol/L)的 RPMI 1640 培养液中, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养。于细胞对数生长期加全反式维 A 酸(购自 Sigma 公司, 以药物的终浓度 10 μmol/L 诱导), 处理后于 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 收获细胞, 收集对数生长期的 HL-60 细胞作为相应的实验对照组。

1.2 细胞大小的分析法 收集细胞培养液每管 3 ml(约 2×10<sup>6</sup> 个细胞), 以 PBS 液洗涤 1 次, 用冰 80% 的乙醇固定, 在 -20 °C 下放置 24~48 h, 检测时用 PBS 洗涤 1 次, 再用 PC 缓冲液洗涤 1 次(室温下 15 min), 后再用 PBS 洗涤 1 次, 加入碘化丙锭(propidium iodide, PI) (100 μg/ml, Sigma) 10 μl,

[收稿日期] 2004-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 39730270), 国家杰出青年基金(No. 39725027), 973 肿瘤计划(G1998051213), 卫生部临床重点学科基金资助项目(No. 20012537)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院 肿瘤外科, 安徽 蚌埠 233004;  
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 普外科, 湖北 武汉 430030

[作者简介] 许培权(1965-), 男, 安徽定远县人, 博士, 主治医师。

[通讯作者] 龚建平, 教授, E-mail: jpgong@tjh.tjmu.edu.cn

RNase A( 5 μg/ml, Sigma) 10 μl, 并加 PBS 液以至总反应体积达 500 μl, 在室温下放在暗处 30 min, 然后应用流式细胞仪进行检测和分析。

1.3 细胞分化抗原的检测 应用直接免疫荧光染色技术分析髓系细胞分化标志。收集被检测的细胞约 10<sup>6</sup>个, 用 PBS 液洗涤 1 次, 然后加入鼠抗人 PE 标记 CD11b 抗体(购自 DAKO 公司) 10 μl 并加 PBS 液至 100 μl, 在 4℃下避光孵育 30 min, 再用 2% BSA 洗涤 2 次, 用 1%多聚甲醛 300 μl 固定后用流式细胞仪进行检测和分析, 以对数生长期的 HL-60 细胞作为实验对照组。

1.4 细胞的形态学观察 分别取诱导和未诱导的处于非拥挤状态的细胞 5×10<sup>5</sup> 个, 用 PBS 液洗涤 1 次, 用冰 80%的乙醇固定, 在-20℃下放置 24~48 h, 检测前用 PBS 洗涤 1 次, 加入 PI 10 μl 染色 10 min, 再取 8 μl 细胞悬液置于载玻片上, 加盖玻片后在激光共聚焦显微镜下观察并摄像。

### 2 结果

2.1 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞体积增大 从图 1 可见: 随着诱导时间的延长, X 轴和 Y 轴的荧光强度都逐渐增大。说明被诱导的细胞体积在逐渐增大。

2.2 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞分化标志物的表达 随着诱导时间的延长, 在诱导 72 h 后, CD11b 表达阳性, 而对照的 HL-60 细胞并未显示有 CD11b 的表达。由于 CD11b 是髓系细胞分化表型标志, 说明全反式维 A 酸可诱导 HL-60 的细胞表型向成熟粒细胞方向分化(见图 2)。

2.3 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞分化 从激光共聚焦显微镜下可见, 随着诱导时间的延长, 72 h 后 HL-60 细胞的核由均匀大小圆形逐渐变成大小不等不规则形的核, 并出现肾形核、分叶核、蚕豆核。这说明全反式维 A 酸可诱导 HL-60 细胞株向成熟粒细胞方向分化(见图 3)。

### 3 讨论

众所周知, 恶性实体瘤的治疗原则是以手术治疗为主的多学科综合治疗, 而血液系统的恶性肿瘤的治疗则主要依靠抗癌药物。显而易见, 药物治疗在恶性肿瘤综合治疗中占有重要的地位。其实, 药物治疗在恶性肿瘤的历史可以追溯到 19 世纪<sup>[1]</sup>, 此后许多抗癌新药不断问世, 极大地促进了恶性肿瘤药物治疗的发展, 并取得较好的疗效, 延长了患者的生存期, 改善了患者的生活质量。但是, 由于化疗药物具有对人体巨大的副作用, 阻碍了恶性肿瘤的化

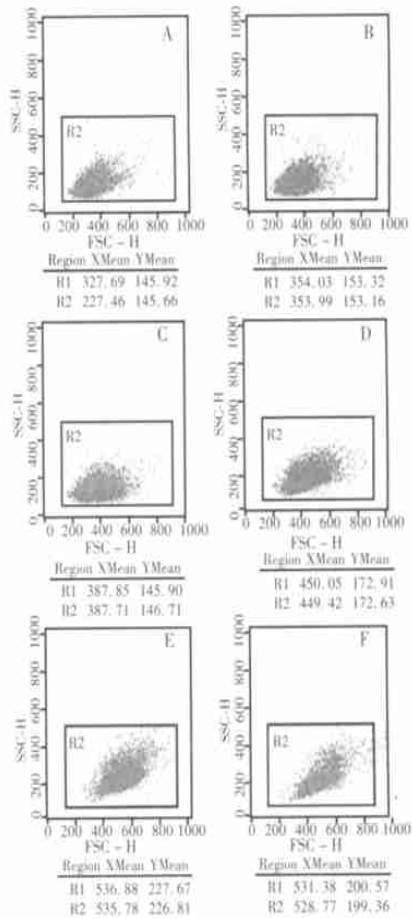


图 1 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞分化的散点图 (A. 对照组, B. 诱导 24h, C. 诱导 48h, D. 诱导 72h, E. 诱导 96h, F. 诱导 120h)

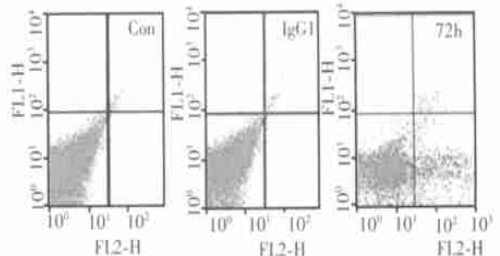


图 2 全反式维 A 酸诱导 HL-60 细胞分化的 CD11b 表达水平

疗的发展。直到 20 世纪 80 年代, 中国科学家在国际上率先开展了全反式维 A 酸治疗急性早幼粒白血病的工作, 才给人们带来新的希望。这项工作的成功代表了一个崭新的恶性肿瘤治疗策略——恶性肿瘤分化治疗的成功。上海血液所在 1987 年首次报道接受全反式维 A 酸治疗的 6 例急性早幼粒白血病患者全部取得了完全缓解<sup>[2]</sup>。本试验模型正是在这一分化治疗的成功模型基础上结合现代细胞组学技术而创建的。

3.1 细胞株和诱导剂的选择 本实验选择 HL-60 细胞株作为研究对象, 是因为作为分化模型的细胞株必须是容易被诱导分化的同时又是容易被判定是否分化的细胞株。HL-60 是一种人类早幼粒白血病

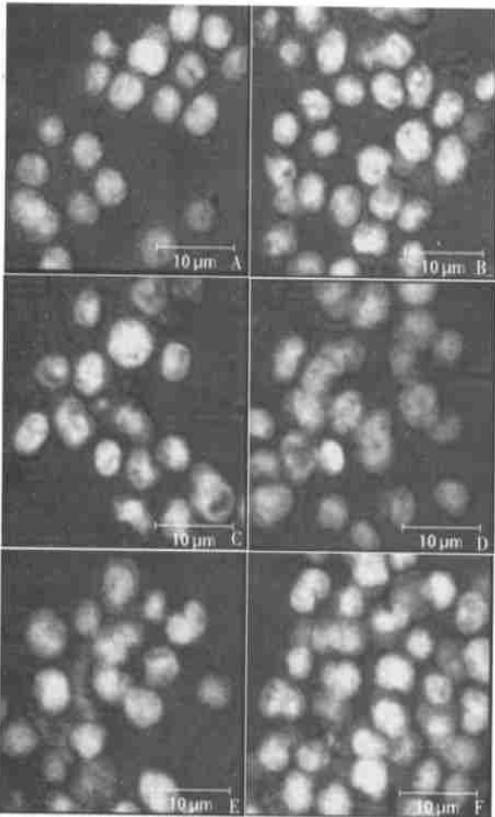


图3 全反式维A酸诱导HL-60细胞分化的激光共聚焦  
(A. Con, B. 24h, C. 48h, D. 72h, E. 96h, F. 120h)

细胞的癌株,是未成熟分化的永生细胞株。临床和实验资料均证实全反式维A酸都可以诱导HL-60细胞株向成熟方向分化<sup>[3~5]</sup>。本实验结果从细胞的大小、细胞核的形态、细胞表面的分化标志物三个方面证实了全反式维A酸都可以诱导HL-60细胞向成熟方向分化的结论。

**3.2 对细胞分化判定标准的选择** 由于不同类型的细胞具有不同的生物特点,因此,判定细胞分化的标准也不相同。目前,人们对实体瘤细胞分化的判定却较为困难,一方面是大多数实体瘤细胞分化的形态学并不明显,另一方面人们对实体瘤细胞分化的生物学标志知之较少。而当今,在血液肿瘤尤其是白血病细胞分化方面之所以能取得巨大进展,在一定程度上取决于人们对血细胞分化标准的认识。目前判定血细胞分化程度主要依据细胞形态学、细胞组织化学和细胞表面分化抗原的分析等。其中,在细胞分化过程中,血液肿瘤细胞常常出现成熟细胞核形态特点,如细胞缩小、核浓缩、甚至核分叶等<sup>[6]</sup>。但是,细胞形态变化多端,有时单从细胞形态学方面来判定细胞分化所处的阶段是非常不利的。在这种情况下,通常是辅以细胞组织化学的方法。目前为多数所接受的常用组织化学方法是四唑氮蓝(NBT)还原试验<sup>[7]</sup>。它的基本原理是成熟的中性粒细胞在代谢过程中会产生较多的具有生理功

能的过氧化物,过氧化物会将可溶的NBT还原为不溶性的蓝色甲臞颗粒,沉积于细胞浆内。但是,我们的研究<sup>[8]</sup>表明,诱导分化的恶性肿瘤细胞并不能完成细胞的终端分化,细胞仍处在细胞周期中,而有生理功能的细胞只能是G<sub>0</sub>的细胞。所以,我们并不认为细胞组化可以作为评判恶性肿瘤细胞分化的一种标准。此外,在白细胞分化过程中,细胞表面抗原,即分化抗原也相应发生改变。因此,应用单克隆抗体测定细胞分化抗原的表达可精确地判断实验细胞所处的分化阶段。如CD11b是人类成熟白细胞抗原,其本质是补体C<sub>3b</sub>受体(CR3),人们把它作为白细胞成熟分化的标志物<sup>[9]</sup>。所以,本实验把细胞大小改变、细胞核的形态学变化、细胞表面分化抗原是否出现作为评判我们的实验模型成功与否的标准。

**3.3 细胞组学技术在评判恶性肿瘤细胞分化模型中的地位** 主持Cytomics网站的Paul Robinson认为,阐明细胞(组)功能与蛋白质组关系的科学,就是Cytomics(细胞组学)。他明确提出,Cytomics的研究需要细胞分析设备(如流式细胞仪、图像分析仪、激光共聚焦显微镜等单细胞分析技术)和特殊的细胞分析技术,将细胞按Cytome分开,然后再进行进一步的分析。显然,应用细胞组学技术来评判恶性肿瘤细胞分化与否具有其他技术无法比拟的优势。应用流式细胞术评判肿瘤细胞大小时,我们发现随着诱导时间的延长,已分化的肿瘤细胞体积是逐渐增大的且细胞内的颗粒逐渐增多。应用流式细胞术评判的优点在于它更符合实验所要求的大样本、双盲、随机、对照原则、精确、直观。用流式细胞术评判肿瘤细胞是否表达分化抗原时,我们发现全反式维A酸可以诱导HL-60细胞向成熟粒细胞方向分化,被诱导HL-60细胞开始有CD11b阳性表达。应用激光共聚焦显微镜评判肿瘤细胞是否有核型分化时,我们发现全反式维A酸可诱导HL-60沿着成熟粒细胞方向分化,HL-60细胞由圆形核向肾形核、分叶核、蚕豆核分化。进一步证实应用流式细胞术对肿瘤细胞是否表达分化抗原的评判。应用细胞组学技术评判的优点在于为我们提供了更为清晰的高质量细胞形态学图像依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 李 振,徐德顺主编.恶性肿瘤的化学治疗与免疫治疗[M].北京:人民卫生出版社,1990:1.
- [2] Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. *Blood*, 1988, 72(2): 567~572.
- [3] Drayson MT, Michell RH, Durham J, et al. Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL-60 cell differentiation initiated by 1, 25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans retinoic acid[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 266(1): 126~134.
- [4] Zhou P, Yao Y, Soh JW, et al. Overexpression of p21<sup>Cip1</sup> or p27<sup>Kip1</sup>

# MtbAg 体外激活扩增的人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞表面 L-选择素的动态变化

武文娟<sup>1,2</sup>, 沈继龙<sup>1</sup>, 李柏青<sup>3</sup>

[摘要] 目的: 研究结核杆菌抗原(MtbAg) 激活扩增的人外周血  $\gamma\delta\text{T}$  细胞表面 L-选择素(CD62L) 的表达。方法: 用 MtbAg 和 rIL-2 刺激人外周血单个核细胞(PBMC) 促使  $\gamma\delta\text{T}$  细胞增殖, 用 CD3 单克隆抗体(CD3mAb) 和 rIL-2 刺激人 PBMC 促使  $\alpha\beta\text{T}$  细胞增殖。取新鲜 PBMC 和刺激后培养 3~21 天的  $\gamma\delta\text{T}$  细胞和  $\alpha\beta\text{T}$  细胞, 用多色荧光抗体标记, 在流式细胞仪上检测  $\gamma\delta\text{T}$  细胞表面 CD62L 的表达, 并与  $\alpha\beta\text{T}$  细胞作比较。结果: 新鲜未刺激 PBMC 中  $\gamma\delta\text{T}$  细胞 CD62L 表达率为 43.9%, 明显低于  $\alpha\beta\text{T}$  细胞的 76.6%; 用 MtbAg 或 CD3Ab 激活后培养第 6 天时 CD62L 在  $\gamma\delta\text{T}$  细胞的表达(90.7%) 和在  $\alpha\beta\text{T}$  细胞表达(87.2%) 均达到高峰; 以后 CD62L 表达逐渐下降, 15~21 天  $\gamma\delta\text{T}$  细胞 CD62L 的表达在低水平(16.2%~10.6%) 维持,  $\alpha\beta\text{T}$  细胞表面的 CD62L 表达(23.6%~17.5%) 亦在低水平维持。结论: 新鲜 PBMC 中  $\gamma\delta\text{T}$  细胞 CD62L 表达明显低于  $\alpha\beta\text{T}$  细胞, 但在激活后增殖过程中 CD62L 在  $\gamma\delta\text{T}$  细胞的表达, 与  $\alpha\beta\text{T}$  细胞相似, 呈现先上升再下降的趋势, 最后稳定在低水平。

[关键词] 结核杆菌;  $\gamma\delta\text{T}$  细胞; L-选择素; 流式细胞术

[中国图书资料分类法分类号] R 378.911 [文献标识码] A

## The dynamics of L-selectin expression on activated human $\gamma\delta\text{T}$ cells by *Mycobacterium tuberculosis* antigen during *in vitro* proliferation

WU Wen-juan<sup>1,2</sup>, SHEN Ji-long<sup>1</sup>, LI Bai-qing<sup>3</sup>

(1. Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, 3. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To study dynamic expression of L-selectin(CD62L) in human peripheral  $\gamma\delta\text{T}$  cells activated with *Mycobacterium tuberculosis* antigen(MtbAg) and cultured for proliferation. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were stimulated with MtbAg to generate MtbAg activated T cells(MtbAT), or with CD3mAb activated  $\alpha\beta\text{T}$  cells(CD3AT). Fresh isolation PBMC and cultured MtbAT or CD3AT for 3 to 21 days were stained with multicolor fluorescence mAbs. The percentage of CD62L<sup>+</sup> cells among fresh PBMC, MtbAT or CD3AT were measured by flow cytometry. **Results:** The percentage of CD62L<sup>+</sup> cells of  $\gamma\delta\text{T}$  cells(43.9%) in fresh PBMC has significant lower than that of  $\alpha\beta\text{T}$  cells(76.6%), the expression of CD62L arrived at climax on day 6 of culture in  $\gamma\delta\text{T}$  cells(90.7%) and  $\alpha\beta\text{T}$  cells(87.2%), after then the expression of CD62L decreased and maintained low level, the percentages of CD62L<sup>+</sup> cells of  $\gamma\delta\text{T}$  cells and  $\alpha\beta\text{T}$  cells were 16.2% to 10.6% and 23.6% to 17.5%, respectively, from day 15 to day 21 of culture. **Conclusions:** The CD62L expression of  $\gamma\delta\text{T}$  cells in fresh PBMC was lower than that of  $\alpha\beta\text{T}$  cells, but after activated by stimulation of MtbAg or CD3Ab, the expression of CD62L in human peripheral  $\gamma\delta\text{T}$  cells, like  $\alpha\beta\text{T}$  cells, rose in first and then decreased, and maintained low level later.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*;  $\gamma\delta\text{T}$  lymphocytes; L-selectin; flow cytometry

[收稿日期] 2004-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30070721)

[作者单位] 1. 安徽医科大学病原生物学教研室, 安徽合肥 230032; 蚌埠医学院 2. 生物化学与分子生物学教研室, 3. 免疫学教研室, 安徽省感染与免疫重点实验室, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 武文娟(1973-), 女, 安徽砀山县人, 讲师。

[通讯作者] 李柏青, 教授, 硕士生导师, E-mail: bb\_bqli@yahoo.com

L-选择素(L-selectin) 又名 CD62L, 是白细胞表面黏附分子之一, 对白细胞在炎症部位的募集及初始淋巴细胞归巢到外周淋巴结起着重要的作用。在流体切应力的影响下, L-选择素通过连接血管内皮细胞上的配体介导着白细胞的再次锚定(secondary tethering) 和滚动(rolling)。只有 CD62L<sup>+</sup> 的淋巴细胞能识别特异的高内皮小静脉内皮并转移到淋巴

in the promyelocytic leukemia cell line HL-60 accelerates its lineage-specific differentiation [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(6B): 4 935~4 945.

[5] Sham RL, Phatak PD, Belonger KA, et al. Functional properties of HL60 cells matured with all-trans-retinoic acid and DMSO: Differences in response to interleukin-8 and fMLP [J]. *Leuk Res*, 1995, 19(1): 1~6.

[6] Dimberg A, Bahram F, Karlberg I, et al. Retinoic acid-induced cell

cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27<sup>Kip1</sup> [J]. *Blood*, 2002, 99(6): 2 199~2 206.

[7] 吴雄文, 梁智辉主编. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 162.

[8] 许培权, 龚建平. 全反式维甲酸对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响 [J]. *癌症*, 2004, 23(2): 118~123.