

复发性急性白血病患者血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的变化*★

李学刚, 侯丽君

Changes of vascular cell adhesion molecule-1 in serum and marrow stroma cell supernatant of patients with relapsed acute leukemia

Li Xue-gang, Hou Li-jun

Abstract

BACKGROUND: Relapse of acute leukemia is possibly correlated with abnormal expression of cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1).

OBJECTIVE: To observe the level of VCAM-1 in serum and bone marrow stromal cell (MSC) supernatant of patients with relapsed acute leukemia.

METHODS: Samples of serum and MSC supernatant were collected from 17 patients with remission-phase and relapse-phase acute leukemia hospitalized in the Department of Hematology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University between June 2006 and March 2008. The levels of VCAM-1 were measured with ELISA in remission and relapse phases.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the remission phase, the VCAM-1 level of serum was significantly increased in the relapse phase ($P < 0.05$). At 1 and 3 weeks after *in vitro* culture, the VCAM-1 level in the MSC supernatant was not changed ($P > 0.05$), but it was significantly increased on the fourth week ($P < 0.05$). The results demonstrated that VCAM-1 expression of serum and MSC supernatant in the relapse phase was greater than that in the remission phase, suggesting that abnormal expression of VCAM-1 was possibly correlated with relapse of acute leukemia.

Department of Hematology, Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Li Xue-gang★, Master, Physician, Department of Hematology, Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China 03451660@163.com

Li XG, Hou LJ. Changes of vascular cell adhesion molecule-1 in serum and marrow stroma cell supernatant of patients with relapsed acute leukemia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 1101-1104. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Correspondence to: Hou Li-jun, Doctor, Professor, Chief physician, Department of Hematology, Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Supported by: Scientific and Technological Research Foundation of Zhuhai Health Bureau, No. 2007041*

Received: 2009-10-16 Accepted: 2009-12-25

摘要

背景: 研究认为急性白血病的复发可能与细胞黏附分子的异常表达密切相关。

目的: 探讨复发性急性白血病患者血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平变化。

方法: 收集2006-06/2008-03在中山大学附属第五医院血液科住院期间同时具有缓解期和复发期的17例急性白血病患者血清标本、骨髓基质细胞培养上清液标本。采用酶联免疫吸附双抗体夹心法测定处于缓解期和复发期的血清、骨髓基质细胞培养上清液标本中的血管细胞黏附分子1的水平。

结果与结论: 与缓解期比较,急性白血病患者复发期血清中血管细胞黏附分子1的水平明显升高($P < 0.05$);体外培养1,3周的骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平无明显变化($P > 0.05$),第4周骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平明显升高($P < 0.05$)。结果证实急性白血病患者复发期血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1表达水平均高于缓解期,推测血管细胞黏附分子1的异常表达可能与急性白血病的复发具有一定的相关性。

关键词: 急性白血病;血管细胞黏附分子1;骨髓基质细胞;干细胞;复发期;缓解期

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.032

李学刚,侯丽君.复发性急性白血病患者血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):1101-1104. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在急性白血病的治疗过程中,缓解后复发仍是重要难题,其具体的复发机制尚未完全明确,目前认为骨髓造血微环境中的主要成分骨髓基质细胞表达黏附分子的异常可能与急性白血病的复发有一定的相关性。

血管细胞黏附分子1是一种属于免疫球蛋白超家族成员的重要细胞黏附分子,主要由血管内皮细胞和骨髓造血微环境中的骨髓基质

细胞表达,具有刺激调节功能^[1-3]。血管细胞黏附分子1可以通过以下途径影响居住在骨髓造血微环境内白血病细胞的生存:①促进白血病细胞的增殖和分化^[4-13]。②诱导耐药和抑制凋亡^[14-15]。③促进迁徙和髓外浸润^[16-18]。检测血管细胞黏附分子1的水平可判断骨髓基质细胞和血管内皮细胞的功能。

实验检测急性白血病患者复发期和缓解期血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平,探讨血管细胞黏附分子1的水平变化与急性白血病复发的关系。

中山大学附属第五医院血液科, 广东省珠海市 519000

李学刚★, 男, 1984年生, 广东省珠海市人, 汉族, 2008年中山大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事血液病方面的研究。03451660@163.com

通讯作者: 侯丽君, 博士, 教授, 主任医师, 中山大学附属第五医院血液科, 广东省珠海市 519000

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)06-01101-04

收稿日期: 2009-10-16
修回日期: 2009-12-25
(20091016017/ZS-H)

0 引言

在急性白血病的治疗过程中, 缓解后复发仍是重要难题, 其具体的复发机制尚未完全明确, 目前认为骨髓造血微环境中的主要成分骨髓基质细胞表达黏附分子的异常可能与急性白血病的复发有一定的相关性。

血管细胞黏附分子1是一种属于免疫球蛋白超家族成员的重要细胞黏附分子, 主要由血管内皮细胞和骨髓造血微环境中的骨髓基质细胞表达, 具有刺激调节功能^[1-3]。血管细胞黏附分子1可以通过以下途径影响居住在骨髓造血微环境内白血病细胞的生存: ①促进白血病细胞的增殖和分化^[4-13]。②诱导耐药和抑制凋亡^[14-15]。③促进迁徙和髓外浸润^[16-18]。检测血管细胞黏附分子1的水平可判断骨髓基质细胞和血管内皮细胞的功能。

实验检测急性白血病患者复发期和缓解期血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平, 探讨血管细胞黏附分子1的水平变化与急性白血病复发的关系。

1 对象和方法

设计: 病例自身前后对比。

对象: 2006-06/2008-03在中山大学附属第五医院血液科住院期间同时具有缓解期和复发期的17例急性白血病患者, 其中血清标本17例, 能完整做骨髓基质细胞培养的标本11例, 急性白血病的诊断标准以及缓解和复发的诊断标准均符合2007年张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》^[4], 患者对治疗及实验均签署知情同意书。

干预方法:

缓解期和复发期血清标本的制备: 每例急性白血病患者分别取处于缓解期和复发期的外周静脉血3 mL, 于6 h内分离血清, -20 °C冻存待用。

缓解期和复发期骨髓基质细胞培养上清液标本的制备: 每例急性白血病患者再分别取处于缓解期和复发期的骨髓液3 mL, 20 U/mL肝素抗凝, 于6 h内用密度离心法分离单个核细胞, 并应用骨髓基质细胞培养法连续培养4周, 倒置相差显微镜下观察细胞生长的情况, 分别于第1, 3, 4周取其上清液, -20 °C冻存待用。并在培养第4周时行瑞氏染色, 观察骨髓基质细胞的形态变化。

血清与骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的表达检测: 采用酶联免疫吸附双抗体夹心法测定处于缓解期和复发期的血清、骨髓基质细胞培养上清液标本中的血管细胞黏附分子1的水平。具体步骤为取血清标本和骨髓基质细胞培养上清液标本, 用标准稀释缓冲液稀释20倍后, 按试剂盒说明书进行检测, 建立标准曲线, 加样, 弃去液体, 温浴, 如此反复, 依次加底物和终止液, 用酶联仪测吸光度值。

主要观察指标: ①骨髓基质细胞的形态及生长状况。②血清与骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的表达。

设计、实施、评估者: 干预实施为第一作者, 实验设计与结果评估为第二作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

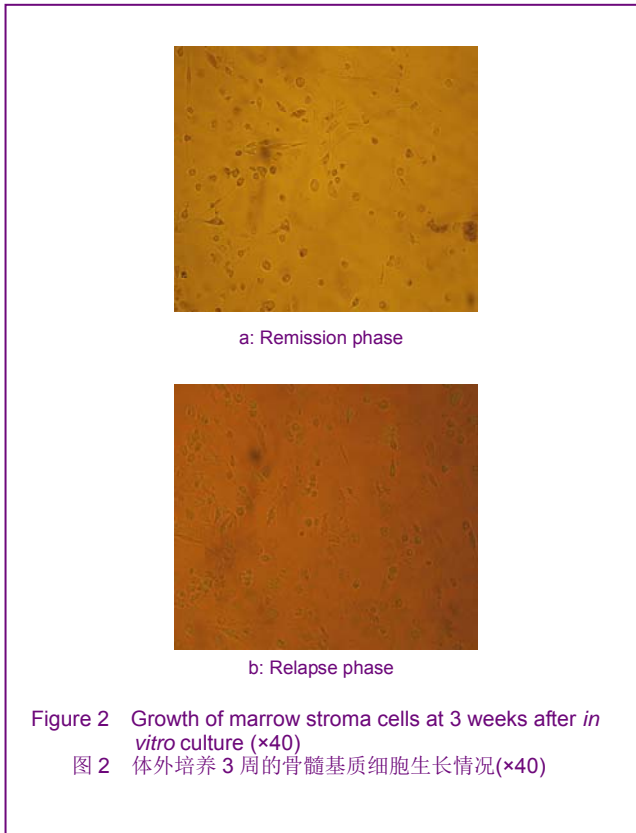
统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0软件包进行统计处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用随机化配对设计的 t 检验和随机区组设计的方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

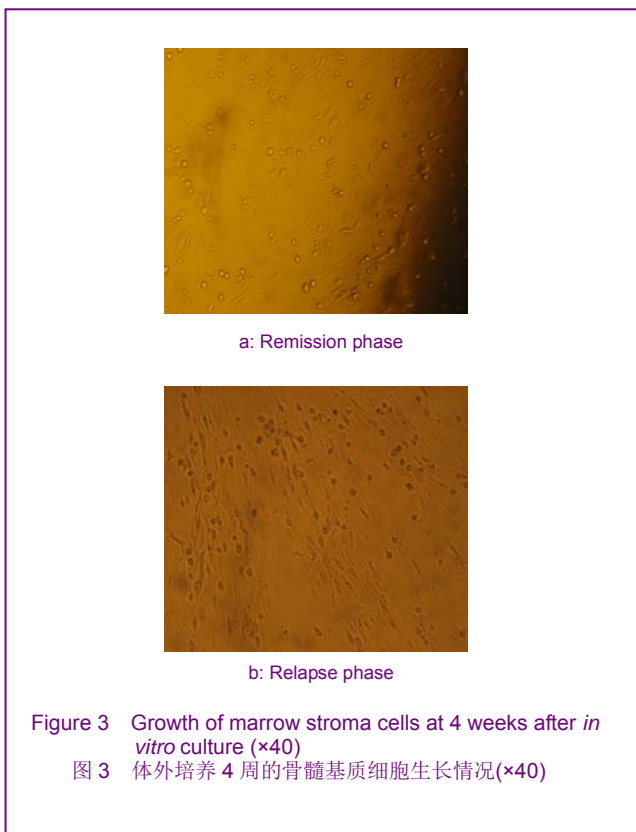
2.1 骨髓基质细胞的形态及生长状况 处于缓解期和复发期的骨髓基质细胞体外培养1周后出现贴壁现象, 见图1。



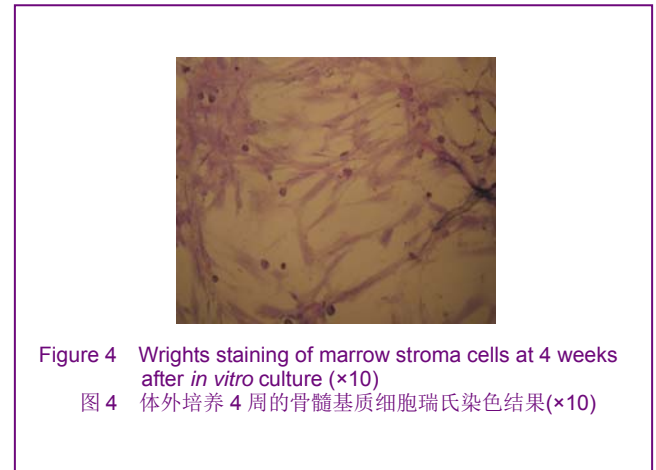
体外培养第2~3周时, 骨髓基质细胞逐渐增多, 见图2。



体外培养第4周时骨髓基质细胞生长旺盛, 培养瓶底铺满90%以上, 部分融合成片, 见图3。



体外培养第4周瑞氏染色结果显示, 骨髓基质细胞主要以长梭形为主, 其间可见胞体呈圆形或三角形的基质细胞, 胞浆丰富, 呈淡红色, 并可见红色细沙样均匀颗粒, 大部分细胞有长短不一、粗细不均的突起, 胞核多呈圆形或类圆形, 多居于细胞的正中或稍偏, 依稀可见1个核仁, 偏于胞核的一侧, 染色质浅染, 粗细均匀, 细胞之间彼此融合, 多形成网格状或片状结构, 见图4。



2.2 血清中血管细胞黏附分子1的表达 与缓解期比较, 急性白血病患者复发期血清中血管细胞黏附分子1的水平明显升高, 差异有非常显著性意义[(12.66±3.07)μg/L, (14.19±3.44)μg/L, P=0.004]。

2.3 骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的表达 与缓解期比较, 急性白血病患者复发期体外培养1, 3周的骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平无明显变化(P > 0.05), 体外培养4周的骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的水平明显升高(P < 0.05), 见表1。

表1 不同时期骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1的表达

Table 1 Expression of cellular adhesion molecule-1 of serum and marrow stroma cell supernatant in remission and relapse phases (x̄±s, μg/L)

Phase	1 wk	3 wk	4 wk
Remission	14.63±4.46	15.05±4.57	59.69±23.53
Relapse	15.36±1.68	17.75±1.35	76.15±14.60
P	0.592	0.078	0.022

3 讨论

急性白血病复发是白血病治疗过程中较为常见的难题之一, 目前认为其复发的发病机制可能与细胞黏附

分子的表达异常有关。实验结果发现：随着培养时间的增加，无论是复发期还是缓解期，骨髓基质细胞培养上清液血管细胞黏附分子1水平均逐渐增加，在培养第4周时达到最高峰，这可能与培养第4周时骨髓基质细胞生长旺盛，持续大量分泌血管细胞黏附分子1有关。但复发期和缓解期培养第1, 3周时骨髓基质细胞培养上清液血管细胞黏附分子1水平无明显差异，可能与两组骨髓基质细胞生长均呈零星分布，表达的血管细胞黏附分子1水平低下有关。另外复发期培养第4周骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1水平较缓解期明显升高，在观察骨髓基质细胞的动态生长变化过程时，发现和同一时间缓解期相比，复发期骨髓基质细胞生长情况更加旺盛，由此推测急性白血病复发时骨髓基质细胞数量的异常可能是导致血管细胞黏附分子1升高的重要原因之一。

急性白血病患者复发期血清中血管细胞黏附分子1水平较缓解期升高，考虑有以下两种原因：一是血管细胞黏附分子1也可由血管内皮细胞产生，复发时白血病细胞与血管内皮细胞血行迁移、浸润组织可能都可以促进血管细胞黏附分子1的表达；二是血管细胞黏附分子1在骨髓中的含量也较丰富，主要为骨髓基质细胞所分泌，这在一定程度上也解释了在复发期急性白血病患者血清中血管细胞黏附分子1水平上升的原因。

实验结果表明急性白血病患者复发期血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子1表达水平高于缓解期，推测血管细胞黏附分子1的异常表达可能与急性白血病的复发存在一定的相关性。

4 参考文献

[1] Mudry RE, Fortney JE, York T, et al. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood*.2000;96(5):1926-1932.

[2] Bell EB, Sparshott SM, Ager A, et al. Migration pathways of CD4 T cell subsets in vivo: the CD45RC- subset enters the thymus via alpha 4 integrin-VCAM-1 interaction. *Int Immunol*.1995;7(11):1861.

[3] Chuluyan HE, Osborn L, Lobb R, et al. Domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) both support very late activation antigen-4 (CD49d/CD29)-dependent monocyte transendothelial migration. *J Immunol*.1995;155(6):3135.

[4] Zhang ZN, Yang TY, Hao YS, et al. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 2003:1-30. 张之南, 杨天楹, 郝玉书, 等. 血液病学[M].北京:人民卫生出版社, 2003:1-30.

[5] Hall BM, Fortney JE, Taylor L, et al. Stromal cell expressing elevated VCAM-1 enhance the survival of B lineage tumor cells. *Cancer Lett*.2004; 207(2):229-239.

[6] Fukuda T, Fukushima Y, Numao T, et al. Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Bio*.1996;14(1):84.

[7] Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, et al. Interaction between leukemic cell VLA4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*.2003;9(9):1158-1165.

[8] Paraguassu-braga FH, Borojevic R, Bouzas LF, et al. Bone marrow stromal inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. *Cell Death Differ*.2003;10(9):1101-1108.

[9] Asosingh K, Gunther U, Bakkus MH, et al. In vivo induction of insulin-like growth factor-1 receptor and CD44v6 confers homing and adhesion to murine multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2000;60(11):3096-3104.

[10] Shimakura Y, Kawada H, Ando K, et al. Murine stromal cell line HESS-5 maintains reconstituting ability of ex vivo-generated hematopoietic stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood. *Stem cells*.2000;18(3):183-189.

[11] Chen XH, Zhang X, Liu L, et al. *Chongqing Yixue*. 2002;31(12):1172-1184. 陈幸华, 张曦, 刘林, 等. 造血微环境异常与白血病研究进展[J]. *重庆医学*, 2002, 31(12): 1172-1184.

[12] Zhang X, Wang P, Chen XH, et al. *Zhongguo Shiyang Xueyexue Zazhi*. 2004;12(2): 163-165. 张曦, 王苹, 陈幸华, 等. 白血病骨髓基质增强HL-60细胞抵抗IDA化疗药物研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2004, 12(2): 163-165.

[13] Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, et al. Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. *Br J haematol*.2001;115 (4) :862-871.

[14] Jenkinson SR, Williams AA, Morgan DJ, The role of intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 interactions in the generation of tumor-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol*.2005;174(6):3401-3407.

[15] Konopleva M, Konoplev S, Hu W, et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptosis proteins. *Leukemia*.2002;16(9):1713-1724.

[16] Liu K, Caldwell SA, Abrams SI, et al. Cooperative disengagement of Fas and intercellular adhesion molecule-1 function in neoplastic cells confers enhanced colonization efficiency. *Cancer Res*.2005; 65(3):1045-1054.

[17] Stucki A, River AS, Gikic M, et al. Endothelial cell activation by myeloblasts: molecular mechanisms of leukostasis and leukemic cell dissemination. *Blood*.2001;97(7):2121-2129.

[18] Ju XP, Peng M, Xu XP, et al. *Zhonghua Xueyexue Zazhi*. 2002; 23(11): 581-584. 居小萍, 彭敏, 许小平, 等. 急性白血病细胞黏附分子的表达[J]. *中华血液学杂志*, 2002,23(11):581-584.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 2007 年广东省珠海市卫生局科研基金资助项目 (2007041), 课题名称“血管细胞黏附分子 1 在复发性急性白血病骨髓基质细胞中表达的研究”。

文章的倚倚或不足: 由于实验收集标本时间的局限性导致样本数较少, 故需要在以后的研究中扩大样本量, 以进一步证实血管细胞黏附分子 1 在急性白血病复发中的作用。

提供临床借鉴的意义: 充分了解并证实血管细胞黏附分子 1 在急性白血病复发中的作用, 可能会为复发性急性白血病的治疗开辟新途径, 并成为急性白血病复发的靶向治疗的一个方向。