

用 BrdU 作探针检测RA对 HL-60 细胞的诱导分化作用

李赤原* 胡有秋 陈主初

湖南医科大学肿瘤研究所

摘要 用溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)作探针标记人早幼粒白血病细胞株HL-60,并用抗BrdU的单克隆抗体(Anti-BrdU)和免疫组化法追踪观察 HL-60 细胞在全反式维甲酸(Retinoic Acid, RA)作用下走向分化成熟的可能性。实验发现,经RA处理前,BrdU标记细胞均为早幼粒细胞,经RA处理5天后,BrdU标记细胞中有21%以上分化成熟为杆状核,分叶核粒细胞。由于这些细胞已处于终末分化期,不再进行DNA合成,故细胞中的BrdU是在细胞分化早期掺入的,从而直接证明HL-60细胞可在RA作用下走向分化成熟。

关键词 免疫组化法; 维甲酸抗BrdU, 单克隆抗体; HL-60细胞

用分化诱导剂治疗急性非淋巴性白血病是近年来的一个尝试性治疗。体外实验证明:二甲亚砜(DMSO)、佛波醇二酯(TPA)、RA等有诱导白血病细胞株分化成熟的作用^[1]。体内实验方面,有报道用小剂量阿糖胞苷(LD-Ara-C), RA等药物治疗某些急性非淋巴细胞白血病患者时,患者不出现髓性再障即可达到病情的缓解^[2,3,4],提示这些药物在体内的诱导分化作用,但不能排除药物的直接杀伤作用。阐明这类药物在体内真实作用机制的研究方法有待探讨。本实验根据 R_aZ_a ^[5]的标记追踪原理,用anti-BrdU免疫组化法识别被BrdU标记的HL-60细胞,观察其在RA作用下的形态学变化,拟建立一个直观、快速的方法,进一步探讨体外分化诱导剂在白血病患者体内的真实作用机理,从而指导临床治疗。

材料和方法

1. 主要材料

1.1. 细胞株: 人早幼粒白血病细胞株 HL-60 由中科院药物研究所提供。

1.2. 试剂:

1.2.1 全反式维甲酸(RA)为上海第六制药厂产品。用95%乙醇配成 $10^{-3}M$ 溶液。微孔滤膜过滤,4℃避光保存备用,3月内有

效。

1.2.2 RPMI-1640 培养基系美国GZB-CO产品。

1.2.3 溴氧尿嘧啶(BrdU)为美国Sigma化学公司产品。

1.2.4 Anti-BrdU 单克隆抗体由Mayers教授赠送。

1.2.5. 羊抗鼠IgG-辣根过氧化物酶(GXM IgG-HRP)系美国Iymed Lab产品。

2. 主要方法

2.1. 细胞培养及分组处理

HL-60 细胞株用含20%小牛血清、青霉素100 μ l/ml和链霉素100 μ g/ml的RPMI-1640培养液在5%CO₂,培养箱中传代培养。收集生长期细胞以 $1-2 \times 10^5$ 细胞/ml密度接种,实验按表1所示进行分组处理,每种处理至少重复三次。

2.2 Anti-BrdU 免疫组化法

在HL-60细胞的培养液中加入 $10^{-6}M$ BrdU培养6小时后加入RA($10^{-6}M \sim 5 \times 10^{-6}M$)继续培养5天。收获细胞,甲醇、冰乙酸固定后制片。标本用3%H₂O₂阻断过氧化酶,PBS洗三次,用4NHCL处理后,经0.1M B₂N₄O₇作用1分钟,PBS洗三次。标本上滴以1:60稀释的Anti-BradU,室温下饭盒中孵育1小时,PBS洗三次。加GXM IgG-HRP,孵育1小时,PBS洗三次。用含

* 现在北京医科大学第一医院内科血液实验室

表 1 HL-60 细胞诱导分化实验分组及处理

实验分组		处 理	观 察 项 目
I	加药组	RA1 μ m+酒精 RA5 μ m+酒精	(1) 瑞特氏染色观察细胞一般形态学 (2) NBT还原实验观察细胞对NBT的还原能力 (3) 生长曲线观察RA对HL-60细胞增殖的影响 富台阶兰排除法检测细胞活力
	对照组	酒 精	
II	加药组	RA1 μ m+BrdU+酒精 RA5 μ m+BrdU+酒精	Anti-BrdU免疫组化法观察BrdU在各类细胞核中的分布及百分比。
	对照组	BrdU+酒精	

DAB和H₂O₂的基质液显色，苏木素复染，树脂封片，显微镜下观察。

2.3. NBT 染色

于加药前及加药后第 2、4、6 天分别收集加药组与对照组细胞各 200 μ l，加入等量含 0.2%NBT 的无钙镁磷酸缓冲液，和 20 μ l TPA 溶液(终浓度 500ng/ml)37℃、5% CO₂ 温箱中保温 4 小时，加入冷 PBS 终止反应，取细胞制片，用沙黄“O”复染。显微镜下每个样品至少计数 200 个细胞，细胞内有蓝紫色沉淀颗粒者为 NBT 反应阳性细胞，计数 NBT 细胞阳性率。

2.4. 瑞特氏染色(Wright's stain, W. S)

于加药前及加药后第 5 天分别收集加药组和对照组细胞制片，经 Wright's stain，光镜下进行细胞分类计数，每片计数 200 个细胞

3. 观察结果的统计学检验

将原始数据进行平方根反正弦变换^[6]使变换值接近正态分布。变换公式为：

$$Y = \text{Sin}^{-1}\sqrt{P}$$

式中 P 为原始数据观测百分数，Y 则为相应的变换值。将变换值作卡方检验，以观察加药组和对照组分化成熟百分率差别的显著性。

结 果

1. RA 处理后 HL-60 细胞的形态学变化

HL-60 经 RA 处理 5 天后，光镜下可见细胞按粒系发育途径趋于成熟分类观察发现(表2)RA5 $\times 10^{-6}$ M 处理组和 RA1 $\times 10^{-6}$ M 处理组中成熟细胞百分率明显高于对照组(P<0.01)，说明 RA 可诱导 HL-60 细胞按粒系途径分化成熟。

2. 免疫组化结果

HL-60 细胞经 Brdu 标记 6 小时后，其 Brdu 阳性细胞均为幼稚细胞，未见杆状核，分叶核被 Brdu 标记。Brdu 标记 5 天的对照组，其 Brdu 阳性细胞中的幼稚细胞占 97.2%，成熟细胞(杆状核 + 分叶核)占 2.8%；经 Brdu 标记并 RA5 $\times 10^{-6}$ M 或 1 $\times 10^{-6}$ M 处理 5 天，Brdu 阳性的分叶核和杆状核细胞分别增加到 21.2% 和 22.7%。经统计分析表明，RA 处理 5 天后，HL-60 细胞中 Brdu 阳性杆状核和分叶核细胞比对照组明显增加(P<0.01，表3)。

一般认为成熟粒细胞不再进行 DNA 合成，因此，这些被 Brdu 标记的细胞可能是 S 期细胞直接分化成熟的结果。从而说明 RA 确有诱导 HL-60 细胞经粒系途径分化成熟的作用。

表 2 RA处理对 HL-60 细胞形态学的影响(W·S)

处 理	HL-60 形态学分类(% \bar{X} ±SD)					* 成熟细胞百分率(%)(\bar{X} ±SD)
	早 幼	中 幼	晚 幼	杆 状	分 叶	
RA1 μ m+酒精5天	59.1±4.86	11.9±7.25	6.2±2.57	2.0±0.00	20.8±4.75	22.8±4.75
RA5 μ m+酒精5天	59.9±6.99	12.3±5.80	5.2±5.03	2.9±0.92	19.7±10.80	22.6±10.12
酒 精 5 天	99.2±0.29	0.5±0.50	0.0±0.00	0.1±0.29	0.2±0.29	0.3±0.58

注: * 成熟细胞百分率 = 杆状核 + 分叶核。统计检验证明: 二个加药组成熟细胞百分率均显著高于对照组(P<0.01); 二个加药组之间成熟细胞百分率无显著性差异(P>0.05)

表 3 Brdu 阳性细胞分类(HRP)

处 理	BrdU阳性细胞(% \bar{X} ±SD)			* 成熟细胞百分率(%)(\bar{X} ±SD)
	早、中、晚幼	杆 状	分 叶	
RA1 μ m+BrdU+酒精5天	77.3±4.01	1.5±0.00	21.2±4.01	22.7±4.01
RA5 μ m+BrdU+酒精5天	78.8±0.52	0.7±0.29	20.5±8.23	21.2±8.52
BrdU+酒精5天	97.2±1.53	0.3±0.29	2.5±1.80	2.8±1.53

注: * 成熟细胞百分率 = 杆状核 + 分叶核。统计检验证明: 二个加药组阳性成熟细胞百分率均显著高于对照组(P<0.01)二个加药组之间阳性成熟细胞百分率无显著差异(P>0.05)

3. RA对HL-60 细胞 NBT 还原能力的影响

还原 NBT 是成熟粒细胞的一个功能指标, HL-60 细胞经 RA 处理后还原 NBT 的能力有所提高(图1)进一步说明 RA 诱导分化的 HL-60 细胞具有成熟粒细胞的生理功能。

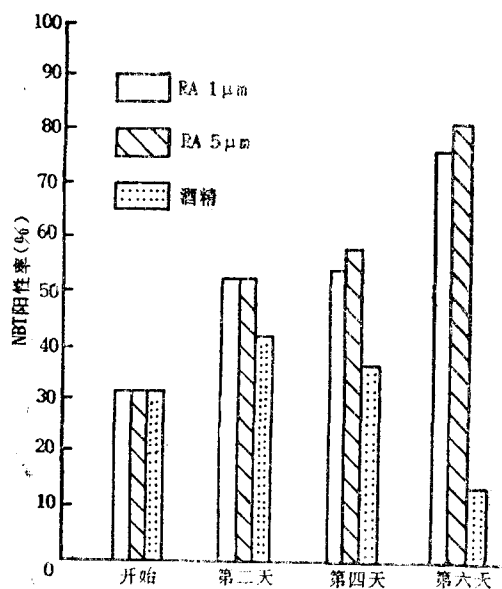


图 1 各处理组的 NBT 还原能力

讨 论

白血病的治疗, 以前主要是使用直接杀伤肿瘤细胞的药物, 这类药物的一个共同副反应是在杀伤白血病细胞的同时杀死或杀伤骨髓中分化潜能正常的造血干细胞, 从而引起“髓性再生障碍性贫血”, 导致严重后果。后来有人观察到用某些化疗药物(如: LD-Ara-C)治疗白血病病人时, 患者不经过“髓性障碍”阶段即达到完全或部分缓解, 表现为外周血中成熟粒细胞比例增加, 原始细胞比例减少^[1,2]。国内黄萌等用体外分化诱导剂 RA 和 Ara-c 联合治疗一例急性早幼粒白血病患者也获类似结果。关于这些药物的作用机制, 一般认为: 药物通过诱导患者体内幼稚白血病细胞分化成熟而发挥作用, 但尚不能排除药物的直接杀伤作用。如何排除后者? 目前尚无直接的方法。传统的瑞氏染色法可观察患者外周血中成熟细胞与幼稚细胞的比例以及给药后病情缓解的程度, 且能间接说明药物的作用。因此, 阐明体外分化诱导剂在体内的真实作用机理, 应用并推广诱

导分化治疗尚存在很大困难。

最近, Raza^[5]采用探针标记并追踪患者体内幼稚白血病细胞获得成功, 初步建立了一个能直接阐明体外分化诱导剂在体内真实作用机理的方法。Raza 的实验证明: HD-Ara-C 能够诱导慢粒急变危象白血病患者体内的白血病细胞分化成熟。

本实验采用 Raza 标记原理, 用 BrdU 作为探针标记 HL-60 细胞, 并追踪 BrdU 阳性细胞在 RA 作用下的形态学变化。实验发现, 经 RA 处理 5 天后, HL-60 细胞中 BrdU 阳性成熟细胞显著高于对照组。由于成熟细胞不再进行 DNA 合成, 故这些细胞中的 BrdU 是在该细胞处于分化早期掺入的。BrdU 阳性成熟细胞的出现充分说明 RA 对 HL-60 细胞的作用不是直接杀伤, 而是诱导其分化成熟, 这与其它报道相一致^[7]。

另外, 本实验瑞氏染色的结果也表明: RA 处理组的成熟细胞百分率显著高于对照组。由于实验所用材料 HL-60 为克隆化的人早幼粒白血病细胞, 没有其它细胞组分的存在, 故从理论上推测, 在此实验中, 瑞氏染色结果应与免疫组化结果一致。本实验结果与理论推测相符, 从而进一步说明了免疫组化法的可靠性。

测定细胞 NBT 的还原能力是判断“分化”细胞功能是否趋于成熟的一个辅助性指标, 实验发现, 经 RA 处理 6 天后, HL-60 细胞 NBT 还原能力显著高于对照组, 说明在 RA 作用下, HL-60 细胞在形态上向粒细胞途径分化成熟的同时伴有功能上的成熟。

总之, 本实验采用 BrdU 标记 S 期细胞并追踪其形态学演变过程的方法, 发现 HL-60 细胞在 RA 作用下, 其形态按粒细胞途径走向分化成熟, 同时伴有功能上的成熟及增

殖能力的下降, 与其它报道结果一致。同时, 经与瑞氏染色的比较, 说明 anti-BrdU 免疫组化法直观地研究诱导细胞分化的可行性, 对于研究体外分化诱导剂在体内的作用机理, 应用并推广诱导分化治疗具有十分重要的意义,

(致谢: 姚开泰教授对本文资料的统计分析给予了热情指导, 表示感谢)

参考文献

1. Koeffler, HP, and Golde, DW. Human myeloid leukemia cell lines: A Review. *Blood*, 1980; 56: 344-50
2. Castaigne, S., Daniel, MT, and Tilly, H. et al: Does treatment with ARA-C in low dosage cause differentiation of leukemic cells *Blood*, 1983; 62: 85-6
3. Houssot, M. Daniel, MT, and Degos, L. Small doses of ARA-C in the treatment of acute myeloid leukemia differentiation of myeloid leukaemia cells? *Br. J. Haematol*, 1982; 51: 125-9
4. 黄萌珂, 孙淑蓉, 彭森, 等. 全反式维甲酸和剂量阿糖胞苷治疗一例急性早幼粒白血病取得完全缓解. *中华血液杂志*, 1987; 8(9): 552-6.
5. Raza, A, and Preisler, H. Evidence of in vivo differentiation in myeloblasts labeled with bromodeoxyuridine, *Cancer. J.* 1986; 1: 15-8.
6. 杨树勤主编: 《中国医学百科全书, 医学统计学》, 上海科技出版社, 1985年, pp: 41
7. 宋争平, 刘友华, 韩锐. 维胺脂和维胺酸对人早幼粒白血病细胞(HL-60)的分化诱导作用, *药理学报*, 1984; 19(8), 576-81.
8. Griffin, J., Munroe, D. and Major, P. et al: Induction of differentiation of Human myeloid leukaemia cells by inhibitors of DNA Synthesis, *Exp. Haematol.* 1982; 10(9): 774-81.

DETECTION OF RETINOID ACID INDUCED DIFFERENTIATION OF HUMAN PROMYELOCYTE CELL HL-60 WITH BrdU PROBE

Li Chi-yuan, Hu You-chiu,
Cancer Research Institute, Hunan Medical University

This experiment was designed to obtain direct evidence of human promyelocyte cell line HL-60 differentiation induced by retinoid acid (RA). Exponential growing cells were exposed to BrdU for 6 hours and then were treated with RA for 5 days. As a thymidine analogue, BrdU was incorporated into S-phase cells, the distribution and percentage of BrdU in various kinds of cell nucleus were detected by immunohistochemistry with anti-BrdU monoclonal antibody.

The results showed that all the BrdU-labeled cells were promyelocyte in the RA-untreated cells. After treated with RA for 5 days, more than 21% BrdU-labeled cells were differentiated into bandshaped and polymorphonuclear cells. Since these cells were at terminal differentiation and were not able to synthesize DNA, the detected BrdU in their nuclei was derived from unmaturing labeled S-phase cells. Moreover, the nitroblue tetrazolium (NBT) reducing ability of the RA treated cells was increased when compared to that of the untreated cells.

The growth curves of the RA treated cells further suggest that RA inhibits HL-60 cell growth.

In summary, this experiment provides evidence in vitro of differentiation of BrdU labeled cells into mature granulocytes. RA not only induces differentiation, but also exerts inhibitory effect to the growth of HL-60 cells.

TOXICOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURE RESEARCH REPORT OF JIU HUA-SHAN MEDICAL STONE

She Su-Zhen, Wang Jia-ji

Dept. of Health Toxicology, Anhui Medical University, Hefei, 230032

Acute, cumulative, toxicity, teratogenic test, mutagenicity test (including Ames test in TA97, TA98, TA100, TA102 strains of *Salmonella Typhimurium*, micronucleus, sperm morphology assay) and swimming endurance test in mice were used to study the toxicities and biological activity of the extract of Jiu Hua-Shan medical stone. We also observed its ultrastructure by SEM. The result showed that the extract of Jiu Hua-Shan medical stone was a generally non-toxic material with weakly cumulation. It did not