

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.11.005

ATRA 诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺组织模型的建立 *

胡龙虎¹ 崔 喆¹ 原冬伟² 孔德胜³ 贾垂明⁴ 马琳娜⁵ 吴 闯⁶ 王雪峰¹ 韩 辉¹

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 黑龙江 哈尔滨 150001;

3 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 4 哈尔滨医科大学附属第三医院 黑龙江 哈尔滨 150081;

5 哈尔滨市第四医院 黑龙江 哈尔滨 150026; 6 南京市青龙山精神病医院 江苏 南京 210000)

摘要 目的:建立全反式维甲酸(ATRA)诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺组织模型,为探讨诱导分化综合征(DS)的发生机制、预防和治疗提供研究平台。**方法:**首先,取对数生长期的 NB4 细胞在 ATRA 诱导下、在 RPMI 1640 培养基中、在 37℃ 和 5% CO₂ 的条件下培养,72 h 后收获诱导分化后的 NB4 细胞接种裸鼠尾静脉。然后,30 天后处死裸鼠取肺组织,用 G 显带方法检测裸鼠肺组织的染色体核型,HE 染色观察裸鼠肺组织学,电子显微镜观察超微结构,RT-PCR 法和 FISH 技术检测裸鼠肺组织 PM L-RARa mRNA 转录本及 PML-RARa 基因的表达。**结果:**实验组染色体核型符合 NB4 细胞特征,在组织学和超微结构上明显见到分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺组织,检测到 PM L-RARa mRNA 转录本和 PML/RARa 融合基因;对照组未见分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺组织, PML-RARa mRNA 转录本和 PML/RARa 融合基因检测阴性。**结论:**用 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞成功的建立了浸润裸鼠肺组织模型,为探讨诱导分化综合征(DS)的发生机制、预防和治疗提供了研究平台。

关键词:全反式维甲酸;诱导分化;NB4;裸鼠;肺组织

中图分类号:Q95-3;R-33;R733 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)11-2025-07

Establishment of a Nude Mice Model with Differentiated NB4 Infiltration into the Lung Tissue*

HU Long-hu¹, CUI Zhe¹, YUAN Dong-wei², KONG De-sheng³, JIA Chui-ming⁴, MA Lin-na⁵, WU Chuang⁶,WANG Xue-feng¹, HAN Hui¹

(1 The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Harbin institute of veterinary medicine, Chinese academy of agricultural sciences, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 The Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

4 The Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

5 The Fourth Hospital of Harbin, Harbin, Heilongjiang, 150026, China;

6 Qing Longshan Psychiatric Hospital of Nanjing, Nanjing, Jiangshu, 210000, China)

ABSTRACT Objective: To establish a nude mice model of differentiated NB4 infiltration into the lung tissue, and provide approach for the study on differentiation syndrome (DS). **Methods:** Firstly, logarithmic growth NB4 cells in RPMI 1640 medium containing 0.5 μ mol/L ATRA were cultured at 37℃ in a humidified 5% CO₂ incubation and were induced differentiation by ATRA. Then the cells induced differentiation by ATRA were harvested at 72 h after incubation and were injected into the tail vein of BALB/c-nu female nude mice(SPF level, 6 weeks old). Then, after 30 days, the rats were sacrificed, the pathology, ultructure and chromosome karyotype of rats lung tissue were examined, PML-RARa mRNA and PML-RARa gene of rats lung tissue were measured by RT-PCR and by FISH. **Results:** In the trial group, the chromosome karyotype of lung tissue was the same with the NB4 cells specialized by ATRA. In the trial groups, the infiltration of NB4 cells specialized by ATRA into the lung tissue was observed by HE staining and electron microscope, but not in the control group. In the trial group, the PM L-RARa mRNA and PML-RARa gene expressed in the lung tissue, but not in the control group. **Conclusions:** A nude mice model of BN4 differentiated by ATRA infiltration into the lung tissue was established, which may contribute to the study on the pathogenesis, prevention and treatment of DS.

Key words: ATRA; Induced differentiation; NB4 cell; Nude mice; Lung tissue

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R-33; R733 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)11-2025-07

* 基金项目:黑龙江省教育厅科研基金项目(12511334);哈尔滨医科大学附属第一医院博士启动基金

作者简介:胡龙虎(1963-),男,内科学博士,硕士生导师,教授,主要研究方向:白血病的发病机制,

E-mail: hulonghu1963@163.com,电话:13030047963

(收稿日期:2019-03-08 接受日期:2019-03-31)

前言

由于蒽环类化疗药物的使用,特别是全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, ATRA)和三氧化二砷注射液(Arsenious acid)的应用,急性早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia, APL)患者的预后取得了突破性进展^[1-3,29,30],完全缓解率和长期无病生存率高达94.6%和80%^[4,31]。三氧化二砷注射液也因此成为实体肿瘤和恶性血液病的临床和基础研究热点,在肝癌、肺癌、食道癌、胃癌、骨髓增生异常综合征、骨髓瘤和慢性粒细胞白血病等领域得到了广泛的研究。但三氧化二砷注射液也是举世公认的剧毒药物,以往因误食引起的急性砷中毒和职业暴露引起的慢性砷中毒已为人们所熟知。已有研究表明在ATRA和ATO诱导分化治疗APL的过程中,约16%的患者出现以呼吸衰竭为主要表现的维甲酸综合征或分化综合征(Differentiation syndrome, DS),是导致患者早期死亡的主要原因之一^[5]。因此,进一步研究DS的发生机制以降低APL诱导治疗中的早期死亡率和进一步提高APL患者的缓解率和治愈率十分重要。本研究采用ATRA诱导分化的NB4细胞接种裸鼠建立裸鼠肺浸润模型,以期探讨诱导分化综合征(DS)的发生机制和防治提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 NB4 细胞株的培养

人急性早幼粒细胞白血病细胞株NB4由中国医学科学院血液病研究所王建祥教授回赠。用RPMI 1640培养基(美国Gibco公司),加入10%胎牛血清(杭州四季青生物有限公司)于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱(德国 heal force)中培养,将培养好的悬浮细胞轻轻吹打均匀分配至3-6个含有新鲜培养液的培养皿中,轻轻摇匀后放入培养箱中培养。每3天传代一次,实验时取体积适中、折光率强的原代细胞用于实验。

1.2 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞的制备

分为对照组(不加ATRA,仅加同体积的生理盐水)和实验组(加0.5 μmol/L的ATRA;美国Sigma公司)。取对数生长期的NB4细胞用于实验。细胞浓度调整为1×10⁵/ml,按上述三组分别加入96板孔的培养板中,每组设6个复孔,于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养,每24 h、48 h和72 h观察细胞分化的指标(如下:细胞形态学和NBT还原实验)。

1.3 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞获取和鉴定

1.3.1 细胞形态学观察 各组取1 mL细胞悬液、离心涂片、吉姆萨染色,光线显微镜下观察分化后的NB4细胞(简称分化的NB4细胞),细胞核出现分叶或凹陷的细胞为阳性细胞,计数200个细胞,计算出分化的NB4细胞的阳性百分率(%)。

1.3.2 NBT 还原实验 2 mg的NBT加热溶解后,加入10 mL无Ca²⁺、Mg²⁺的PBS制成0.2 mg/mL NBT(硝基四唑蓝)等渗溶液,与佛波酯(10 mg/mL)20 μL混合后加入等量的细胞悬液,37℃温育20分钟,在光镜下观察,胞浆内含有灰蓝色颗粒细胞为阳性细胞,计数200个细胞计算出阳性细胞百分率(%)。

1.4 裸鼠的饲养、预处理和实验分组

取16只雌性BALB/c-nu裸鼠在SFP层流柜中饲养,饮用水中加入庆大霉素,饲料为复合维生素B标准饲料。饲料、垫料

及其它与裸鼠接触的物品均经过钴60辐射消毒。预处理:环磷酰胺注射液每天、每只2.5 mg腹腔注射,连续3天。分为实验组(8只)和对照组(8只),实验组照射后经尾静脉接种诱导分化后的NB4细胞1×10⁷只,对照组只注射等体积的生理盐水。饲养30天后乙醚麻醉处死,取肺组织等进行下列检测。

1.5 裸鼠肺组织细胞的遗传学检测

取裸鼠的肺组织研磨制备单个核细胞悬液,进行G显带染色体核型分析。单个核细胞加入秋水仙碱,在37℃培养箱中培养48 h,离心10 min后弃上清液,加入0.075 μmol的氯化钾,吹打均匀,37℃培养箱中10 min,以甲醛冰醋酸固定液(3:1)固定3次,离心弃上清液后滴片,染色老化,光镜下观察是否有核分裂像,每个细胞分析20个分裂期细胞,异常核型按《人类细胞遗传国际命名体制[ISCN(1995)]》描述。将剩余的备单个核细胞悬液,储存于-200℃冰箱保存,以供于PML/RARa融合基因的FISH检测。

1.6 裸鼠肺组织学

全部裸鼠肺组织标本用10%甲醛固定,行石蜡包埋、切片(厚度2 μm)和HE染色,显微镜下观察是否有分化的NB4细胞浸润裸鼠肺组织。

1.7 裸鼠肺的电子显微镜标本的制作

1.7.1 标本的收集、固定和保存 将裸鼠肺组织块用3%戊二醛固定,4℃冰箱保存,收齐后制作电镜标本。

1.7.2 电镜标本的制作和观察 将电镜标本依次进行固定(2.5%的戊二醛2小时前固定,1.0%的四氧化锇2小时后固定)、脱水(逐级酒精脱水)、渗透和包埋(进口环氧树脂包埋)、超薄切片(半薄切片光学显微镜定位,超薄切片机切片)、染色(醋酸铀、硝酸铅、双重染色)、电镜观察(投射电镜仪观察)。

1.8 裸鼠肺组织细胞 PML/RARa 融合基因 mRNA 的 RT-PCR 检测

按文献^[6]采用RT-PCR方法检测裸鼠肺组织的PML/RARa融合基因的mRNA表达。

1.8.1 提取总 RNA 无菌取肺组织100 mg在液氮中磨碎,加入已盛放1 mL TRIzol的离心管中,12000×g离心5分钟弃沉淀,上清加入氯仿0.2 mL混匀充分震荡后,室温静置2-3分钟以沉淀DNA和蛋白质,4℃12000×g离心15分钟,取上清液加入0.5 mL异丙醇,室温静置10分钟以沉淀RNA,4℃10000×g离心10分钟,弃上清液保留白色沉淀,加入用DEPC水配制的75%乙醇1 mL震荡摇匀,充分洗涤沉淀,去除有机溶剂和盐类,4℃7000×g离心5分钟,弃上清,将RNA倒置于滤纸上,室温晾干30-60分钟,待乙醇挥发干净。用高压DEPC水10 μL溶解RNA。取上述产物2 μL稀释至200 μL,测OD值,10.0 OD值相当于40 μg/mL单链RNA。

1.8.2 引物设计 其引物序列为PML/RARa正义链5'-AAGTG-AGGTCTTCCTGCCAA-3',正义链5'-CGCTGGGCACTAT-CTCTTCAGA-3';B-Action正义链5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTTT-3'反义链5'-GGGCACGAGGGCTCATCATT-3'。

1.8.3 PML/RARa 融合基因 mRNA 的 RT-PCR 检测 RNA的逆转录体系:20 μL的反应体系,模板RNA含量-1 μg; dNTP-8 μL;5×buffer-4 μL;RNase Inhibitor-0.5 μL;引物(25pmol)-2 μL;AMV(逆转录酶)-2 μL。室温10分钟-42℃1小

时 - 冰浴 2 分钟。逆转录产物置于 4 ℃ 备用。

PCR 反应体系: 5× PCR buffer 2.5 μL, dNTP 0.75 μL, 引物各 0.5 μL, Tag DNA 聚合酶 0.15 μL, cDNA 模板 2.0 μL。

反应条件为: 变性 96 ℃ 60 s; 复性 58 ℃ 60 s; 延伸 72 ℃ 60 s, 40 个循环, 所取得样品 4 ℃ 储存备用。

1.8.4 扩增产物分析 取 10 μL PCR 产物和 2 μL 上样和缓冲液缓慢均匀后点样, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳结果排成黑白照片, 在凝胶图像扫描仪上扫描, 其扩增产物为 244 pb 大小的条带即为阳性。

1.8.5 PML/RARα 融合基因 mRNA 的 RT-PCR 检测

1.9 裸鼠肺组织细胞的 PML/RARα 融合基因的 FISH 检测

按文献^[6]采用 RT-PCR 方法检测裸鼠肺组织的 PML/RARα 融合基因的 mRNA 表达。

1.9.1 PML/RARα 融合基因探针 光谱橘红色直接标记的 PML 探针显红色, 光谱绿色直接标记的 RARα 探针显绿色, 均购买于美国的 Vysis 公司。

1.9.2 PML/RARα 融合基因的 FISH 检测 取出剩余储存于 -20 ℃ 冰箱保存的单个核细胞悬液, 更换新鲜配制的甲醇冰 / 醋酸固 (3:1) 定液, 冰片滴片, 气干, 标本在室温下静置一夜, 在 70% 的甲酰胺 / 2× SSC 的变性液中 72 ℃ 变性 2 min, 乙醇脱水

(70%、85%、100%) 室温下各 2 min 每张片子加 10 μL 探针液, 加上盖玻片, 橡胶胶水封片, 75 ℃ 变性 2 min, 37 ℃ 湿盒杂交 16-20 h 后洗片, 0.4× SSC (pH 7.0) 72 ℃ 2 min, 2× SSC/0.05, Tween-20 ℃ 室温下 30 s, 空气中晾干。杂交结果经荧光显微镜 (Olympus BX51) 下分析荧光信号, 用全自动数码照相机 (Nikon coolpix 995) 照相。

1.10 统计学分析

所以数据均采用 SPSS18.0 统计学软件处理, 计数资料用率 (%) 来表示, 两组间数据比较用 χ^2 检验; 剂量资料用均数 ($\bar{x} \pm s$) 标准差表示, 两组间数据比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞的获取和鉴定

2.1.1 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞形态学变化 经过 ATRA 诱导培养后 48 h, 实验组 NB4 细胞开始现分化 (29.10%), 72 h 后分化最为显著 (89.60%), 而对照组 NB4 细胞未见明显分化 (9.80%), 与 ATRA 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。分化的 NB4 细胞表现为细胞核及核浆比例变小, 出现明显的核凹陷、甚至出现和分叶 (见图 1 见和图 2)。

表 1 ATRA 诱导 NB4 细胞后细胞形态分化率 (%)

Table 1 The differentiation rate of NB4 induced by ATRA (%)

Groups	n	24 h	48 h	72 h
Control Group	8	7.6	7.9	9.8
ATRA Group	8	8.9	29.1	89.6

Note: Compared with the control group, * $P < 0.01$.

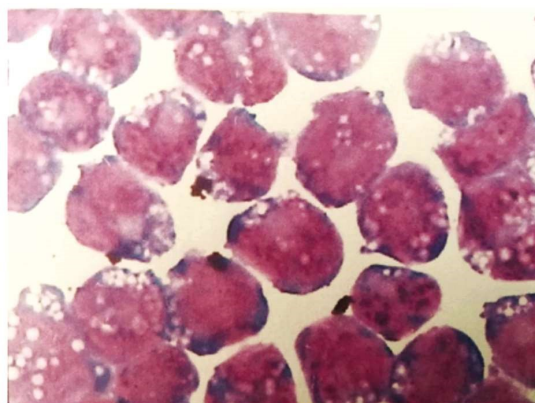


图 1 对照组 NB4 细胞形态 (未加 ATRA 诱导培养) (放大率, × 1000)

Fig.1 The morphology of NB4 in the control group (magnification, × 1000)

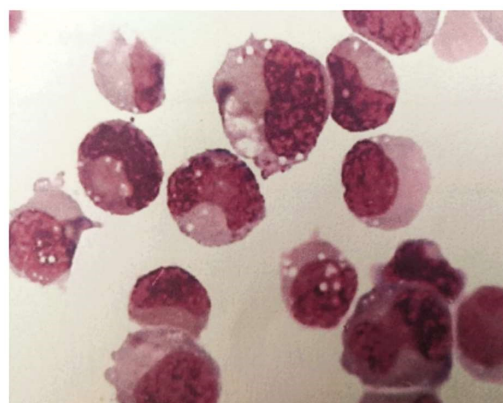


图 2 实验组 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞形态 (放大率, × 1000)

Fig.2 The morphology of NB4 induced by ATRA in the testing group (magnification, × 1000)

2.1.2 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞的 NBT 还原率 由表 2 可知, 经过 ATRA 诱导培养 48 h 后, 实验组 NB4 细胞 NBT 还原率增高 (23.10%), 72 h 后达高峰 (39.60%), 而对照组 NB4 细胞 NBT 还原率未见明显变化 (7.80%), 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.1.3 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞获取和鉴定 如表 1 和表 2、图 2 和图 3 所示, 经过 0.5 μmol/L ATRA 诱导培养 72 h 后, NB4 细胞分化最为明显。因此, 我们将 0.5 μmol/L ATRA 诱

导培养 72 h 后的 NB4 细胞作为 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞, 用于接种经过预处理的裸鼠以建立浸润裸鼠肺模型。

2.2 裸鼠肺组织学结果

实验组裸鼠肺组织可明显见到分化后的 NB4 细胞浸润, 对照组肺未见分化后的 NB4 细胞浸润 (见图 3 和图 4)。组织学水平实验结果显示 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞已经浸润到了裸鼠肺组织。

2.3 裸鼠肺的超微结构

实验组可见到分化后的 NB4 细胞浸润肺, 对照组肺未见 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞已经浸润到裸鼠肺组织。分化后的 NB4 细胞浸润 (见图 6 和图 7), 以上结果也提示

表 2 ATRA 诱导的 NB4 细胞 NBT 的还原率(%)
Table 2 The NBT rate of NB4 cell induced by ATRA(%)

Groups	n	24 h	48 h	72 h
Control Group	8	6.8	7.5	7.8
ATRA Group	8	8.3	23.1	39.6

Note: Compared with the control group, [#]P<0.05.

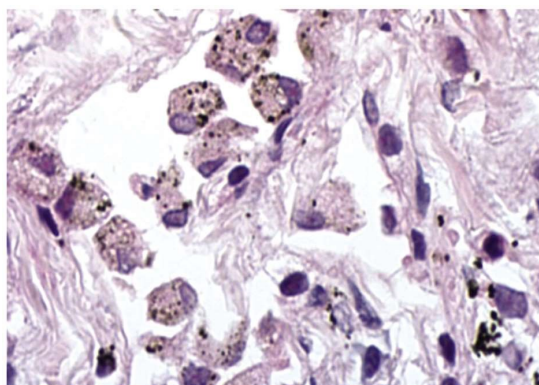


图 3 实验组 裸鼠肺组织 HE 染色(放大率, × 400)

Fig.3 The HE staining in nude mice lung tissue of the testing group (magnification, × 400)

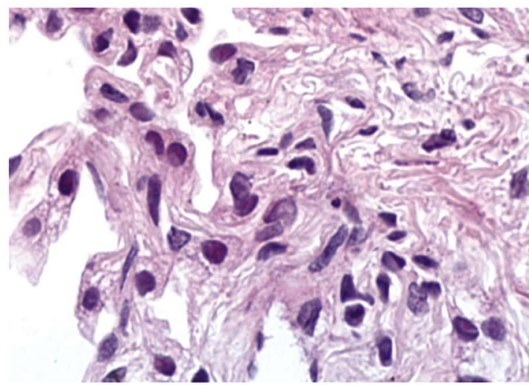


图 4 对照组 鼠肺组织 HE 染色(放大率, × 400)

Fig.4 The HE staining in nude mice lung tissue of the control group (magnification, × 1000)

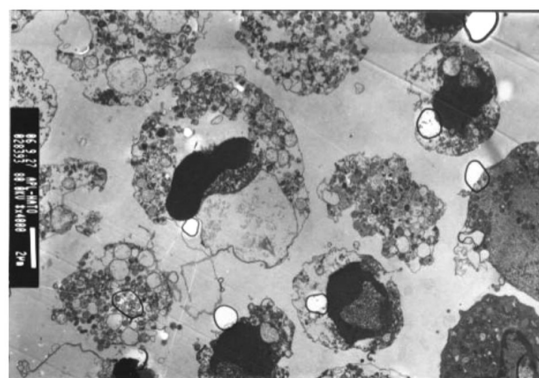


图 5 对照组 鼠肺组织投射电镜(放大率, × 2000)

Fig.5 Lung tissue of nude mice by electronic microscopy in the control group (magnification, × 2000)

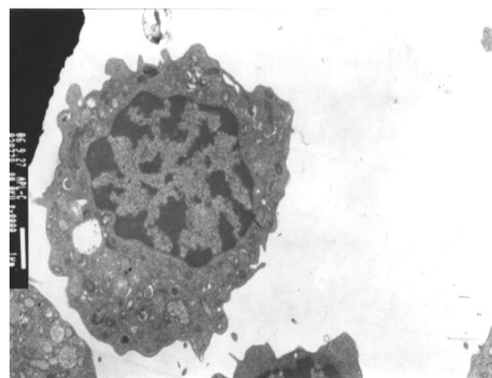


图 6 实验组 鼠肺组织投射电镜(放大率, × 2000)

Fig.6 Lung tissue of nude mice by electronic microscopy in the testing group (magnification, × 2000)

2.4 裸鼠肺组织的遗传学

将裸鼠肺组织制备的单个核细胞进行 G 显带染色体核型分析, 实验组裸鼠肺组织染色体核型分析均为亚四倍体, 均可见到特异性的 t(15;17)染色体移位, 与 NB4 细胞株特征性的核型基本一致(见图 7), 诱导分化后的 NB4 细胞仍然具有 NB4 细胞的细胞遗传学特征。结果从细胞遗传学水平说明, ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞已经浸润到了裸鼠肺组织。

2.5 裸鼠肺组织细胞 PML/RARa 融合基因 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

将裸鼠肺组织细胞用 RT-PCR 方法扩增得到的产物, 在 2.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 结果如图.8 所示, 实验组在 244pb 大小左右均出现了 DNA 条带, 与预期的片段大小一致, 说明 PML/RARa 融合基因在实验组裸鼠肺组织已经被扩增出

来, 在实验组裸鼠肺组织已经有 PML/RARa 融合基因的 mRNA 转录本的表达; 而对照组为阴性, 裸鼠肺组织未见 PML/RARa 融合基因 mRNA 转录本的表达, 从而在分子生物学水平提示模型建立成功。

2.6 裸鼠肺组织细胞 PML/RARa 融合基因 FISH 检测结果

PML 基因探针标记为橘红色荧光信号, RARa 基因探针标记为绿色荧光信号, PLM-RARa 融合基因探针标记为黄色荧光信号或橘红色和绿色重叠荧光信号。正常的间期细胞 (PLM-RARa 融合基因为阴性的) FISH 检测的结果为在同一个细胞内有 2 个橘红色的荧光杂交信号和 2 个绿色的荧光杂交信号, 而 PLM-RARa 融合基因 (为 NB4 和 APL 细胞所特有的) 阳性的异常间期细胞显示为同一个细胞内有黄色荧光杂交信号或橘红色和绿色重叠荧光杂交信号。把裸鼠肺组织细胞经过

变性、与 PML 基因探针和 RARa 基因探针杂交、封片,上荧光显微镜分析荧光杂交信号,用全自动数码照相机照相,结果(见图 9、图 10)显示实验组均检测到了黄色的荧光杂交信号或橘红色和绿色重叠荧光杂交信号,说明实验组裸鼠肺组织已经有了 PML/RARa 融合基因的表达;而在对照组未检测到了黄色的

荧光杂交信号,而检测到了 2 个橘红色的荧光杂交信号和 2 个绿色的荧光杂交信号,说明对照组裸鼠肺组织未见 PML/RARa 融合基因的表达。以上结果表明应用 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞地浸润到了裸鼠肺组织。

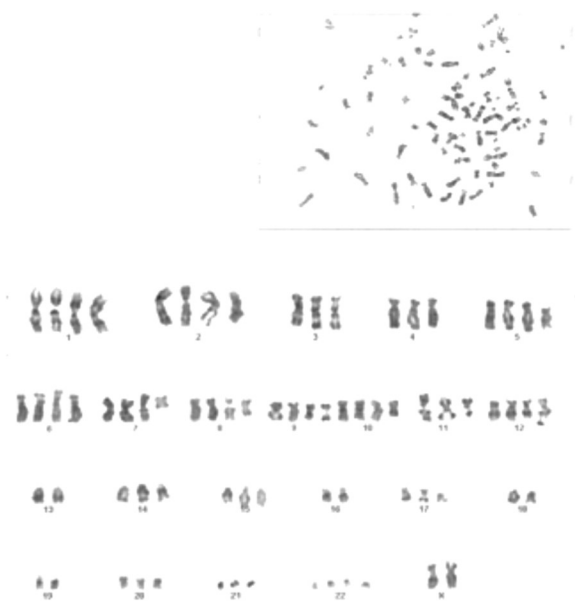


图 7 含有 t(15;17)移位的裸鼠肺组织细胞的染色体核型

Fig.7 Chromosome karyotype of lung tissue by G banding in the testing group

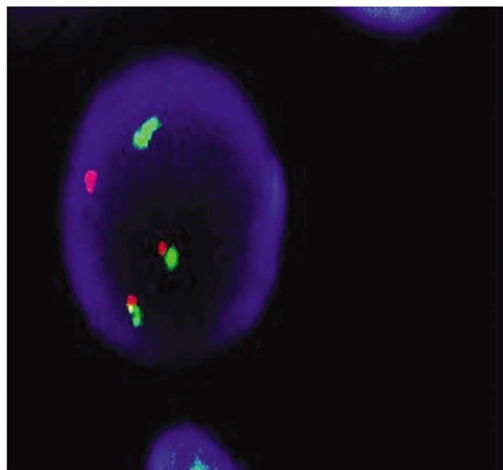


图 9 实验组裸鼠肺组织 PML/RARa 融合基因的表达

Fig.9 Expression of PML/RARa by FISH in lung tissue of testing group

3 讨论

蒽环类化疗药物联合或序贯 ATRA 和或 ATO 治疗方案的成功应用彻底改变了 APL 的临床预后,使其从预后最为凶险、死亡率最高的急性白血病类型一跃变为预后最好、治愈率最高亚型^[1-3]。ATRA 或 ATO 联合蒽环类药物的治疗方案使 APL 的完全缓解率和五年无病生存率显著提高。然而,由于 ATRA 或 ATO 诱导分化治疗过程中引起的、以呼吸衰竭为特征的诱导分化综合征(DS)导致的早期死亡和高危患者晚期髓内或髓外的复发是导致 APL 治疗失败和影响预后的两个主要



图 8 实验组 PML/RARa 融合基因 mRNA 的表达,而对照组为阴性
Fig.8 Expression of PML/RARa mRNA by TR-PCR in Lung tissue of each group

lane 1 和 lane5 为 Marker, lane3 和 lane4 为 Testing clonal gene, lane 2 为 Polyclonal control gene

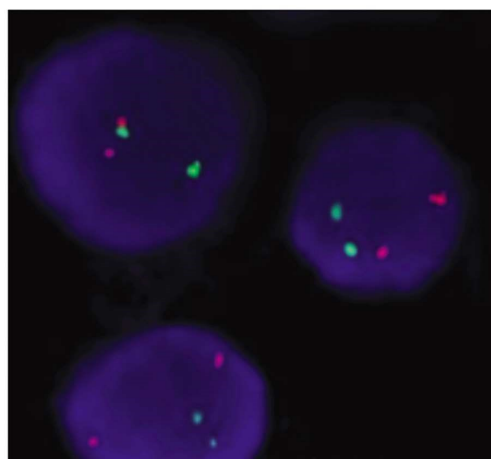


图 10 对照组裸鼠肺组织 PML/RARa 融合基因的表达

Fig.10 Expression of PML/RARa by FISH in lung tissue of control group
因素^[5,7-9]。

目前,关于 DS 发生机制的研究还不十分明确,可能与下列因素有关:1)粘附分子与 DS:中性粒细胞的抗炎作用依赖于中性粒细胞的移行、迁袭、粘附和吞噬功能,而中性粒细胞分泌的粘附分子与血管内皮细胞的相互作用又是其移行、迁袭、粘附的重要的生理基础。粘附分子受体 CD11b 主要分泌于各阶段中性粒细胞表面,它既是粒细胞分化的重要标志,同时也是粒细胞发挥其的移行、迁袭、粘附和吞噬功能基础。有研究表明 APL 患者受体 CD11b 的表达与 DS 发病有关^[10],早期的 APL 细胞受体 CD11b 表达阴性,随着诱导分化治疗后早幼粒细胞的逐渐分化、成熟,分化的早幼粒细胞 CD11b 表达逐渐上调,其分泌的速度和 DS 临床进展速度一致,最后出现了以严重通气功能障碍为主要表现的急性呼吸窘迫综合征,推测可能与诱导分化治疗过程中分泌大量的 CD11b 招致分化的早幼粒细胞阻滞于肺泡组织有关。细胞间粘附分子(ICAM-1)也是调节中性粒细胞的移行、迁袭、粘附和吞噬功能的重要分子。还有研究表

明^[1], ATRA 可以诱导 APL 和 NB4 细胞分泌 ICAM-1 分子, 导致分化的早幼粒细胞阻滞于肺泡组织, 引起分化综合征。也有研究提示^[2], ATRA 诱导 APL 细胞 ICAM-1 分子表达增加, 而 ICAM-1 分子又促使炎症细胞因子大量分泌引起肺毛细血管内皮细胞通透性增强、血细胞渗透到肺泡组织, 促进了分化综合征的发生。2) 炎症细胞因子与 DS: 有研究揭示^[3], 维甲酸综合征患者诱导治疗后患者白介素 -1、白介素 -6、白介素 -8、肿瘤坏死因子 - α 、干扰素和集落刺激因子等炎症细胞因子分泌大量增加, 与诱导分化治疗过程出现的急性呼吸窘迫综合征发生机制有关。其中, 分泌的肿瘤坏死因子、白介素 -1、白介素 -6 和干扰素等炎症细胞因子风暴, 可以引起高热、低血压和肺毛细血管渗出和急性呼吸窘迫综合征; 而大量分泌的粒细胞集落刺激因子又会加重患者分化后的早幼粒细胞阻滞、浸润于肺泡组织, 加重分化综合征。3) 趋化因子与 DS: 最新的研究显示^[4] ATRA 诱导分化治疗可以促使 APL 细胞和肺上皮细胞分泌大量的 CCL2、CCR1、CCR2、CCR3、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CXCL 8 和 CXCL12 等细胞趋化因子, 细胞趋化因子会导致 APL 细胞和分化的 APL 细胞在患者肺泡大量集聚而引起维甲酸症的发生。我们的前期体外研究表明^[5] ATRA 诱导 NB4 和 APL 细胞分泌大量的 CXCR4 与人的肺组织的 SDF- α 衍生因子相互作用, 使诱导分化后的 APL 和 NB4 细胞在人体肺组织广泛浸润。然而, 目前的文献报道多为体外研究, 缺少能更好地反映分化综合征发生机制的体内、整体动物实验研究。

由于 BALB/c-nu 裸鼠的 8 号染色体上 nu 纯合基因突变, 使其具有先天性无胸腺、先天性缺乏 T 细胞免疫功, 是目前建立实体肿瘤和白血病体内模型的理想动物之一^[16,17]。因此, 我们选择了 BALB/c-nu 裸鼠作为全反式维甲酸(ATRA)诱导分化的 NB4 细胞肺浸润模型的体内实验动物。虽然 BALB/c-nu 裸鼠具有先天性缺乏 T 细胞免疫能力, 但其仍然具有 B 细胞和 NK 细胞免疫活性^[18], 对肿瘤细胞和白血病细胞具有敏感性的和天然的杀伤活性进而影响白血病细胞株的种植和建立模型的成功性。而环磷酰胺作为一种细胞毒性化疗药物, 对 NK 细胞、B 细胞和 T 细胞均有广泛的杀伤作用, 将其作为建立诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺模型的预处理方案可能进一步抑制裸鼠的全面免疫系统, 又显著提高接种白血病细胞株建立全反式维甲酸(ATRA)诱导分化的 NB4 细胞进而建立浸润肺裸鼠体内模型的可能性、高效性。本实验通过环磷酰胺对 NK 细胞、B 细胞和 T 细胞的广泛杀伤作用, 作为建立诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺模型的预处理方案以提高建立裸鼠白血病体内模型的成功性和高效性。

1991 年, 法国圣·路易医院的 Lanotte 教授在实验室建立了 NB4 细胞株^[19], 其来源于第二次复发的一个 APL 患者的骨髓, 是体外研究急性早幼粒细胞白血病的病理机制、疗效和耐药与否的理想细胞模型。NB4 细胞株在细胞遗传学上具有特征性的 t(15;17) 的亚四倍体染色体核型和在分子生物学上具有特异性的 PML/RARa 融合基因, 是导致 APL 发病的分子基础, 也是维甲酸诱导分化和对亚神酸的诱导分化、诱导凋亡等治疗 APL 高度敏感的作用靶点^[20]。有研究表明^[21] APL 的发病的分子基础是 APL 患者机体内的 PML/RARa 融合基因表达的 PML/RARa 蛋白增多使患者骨髓的原始粒细胞分化受阻于早幼粒细胞阶

段, 导致异常的早幼粒细胞不能向下分化为中幼粒细胞、晚幼粒细胞至成熟的分叶和杆状叶粒细胞, 引起异常的早幼粒细胞在骨髓异常增生、浸润肺和中枢神经系统等髓外组织而导致急性早幼粒细胞白血病的发生。

ATRA 和 ATO 都是通过降解 PML/RARa 融合基因而发挥其诱导分化和凋亡作用。然而, 其降解的途径有所不同, ATRA 是通过 RARa 靶点而 ATO 是作用于靶点 PML 降解 PML/RARa, 从而发挥它们的诱导早幼粒细胞分化和凋亡的机制^[22]。t(15;17) 染色体核型和 PML/RARa 融合基因, 是急性早幼粒细胞白血病精准诊断、分型和判定疗效及其预后的靶向基础, 不但使 APL 的诊断精确到 WHO 要求的 MICM(细胞形态学、免疫学、细胞遗传学和分子生物学分型) 分型, 而且也是判定 APL 患者是否存在残留病的金标准。NB4 细胞株在体外同样显示出具有白血病对人体组织的浸润能力和致瘤性。以往体外研究显示^[16,17] 经过 ATO 或 ATRA 诱导分化后的异常 NB4 和 APL 细胞仍然保留着 NB4 和 APL 细胞 t(15;17) 的细胞遗传学特征, 而且其通过 CXCR-4 和 SDF-1 这一路径增强了对人体脑组织和肺等组织的粘附和侵袭能力。本实验就是采用 ATRA 诱导分化的异常 NB4 细胞接种经过环磷酰胺注射液预处理的裸鼠以建立诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺模型, 为进一步研究诱导分化综合征的发病机制、预防和治疗提供平台。

为了进一步研究 ATRA 和 ATO 诱导缓解治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)过程中出现的分化综合征(DS)发生机制, 以降低 APL 诱导治疗中的早期死亡率和进一步提高 APL 患者的缓解率和治愈率, 我们用全反式维甲酸(ATRA)诱导分化后的 NB4 细胞接种经过环磷酰胺注射液预处理的裸鼠并建立了裸鼠肺浸润模型。首先, 获取了 ATRA 诱导分化的细胞 NB4。用于对数生长期的 NB4 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 每 24 h、48 h 和 72 h 观察细胞分化的结果。结果显示经过 0.5 μ mol/L 的 ATRA 诱导培养 48 h 后 NB4 细胞开始分化, 72 h 后 NB4 细胞分化最为明显, 表现为 NB4 细胞 NBT 还原率明显增高和细胞核及核浆比例明显变小, 核凹陷明显、甚至出现核分叶。

我们前期^[23-25] 用经过 0.5 μ mol/L 的 ATRA 诱导分化培养后的 NB4 细胞和 APL 细胞已经成功地建立了分化的 NB4 细胞和分化的 APL 细胞浸润人体肺组织的体外模型。因此, 本研究把经 0.5 μ mol/L 的 ATRA 诱导培养 72 h 后的 NB4 细胞作为 ATRA 诱导分化的 NB4 细胞目标细胞, 用于接种经过预处理的裸鼠以建立浸润裸鼠肺模型。然后, 再用上述培养获取的 ATRA 诱导分化的细胞 NB4 接种经过环磷酰胺预处理的裸鼠。虽然, 由于 BALK/c-nu 裸鼠天然缺乏 T 细胞免疫功而成为建立白血病体内模型的理想动物^[16,17], 但由于仍然保留天然的 B 细胞和 NK 细胞免疫能力^[18], 可能会降低建立模型的成功性。因此, 我们用环磷酰胺作为预处理方案裸鼠以希望进一步提高建立分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺模型成功性。研究结果表明用环磷酰胺作为预处理方案建立诱导分化的 NB4 细胞浸润裸鼠肺模型确实取得了成功。首先, 把在 SFP 层流柜中饲养 30 天后的实验组和对照组裸鼠乙醚麻醉处死, 然后, 取肺组织分别进行组织学、超微结构、特异的染色体核型、标志性的融合基因检测。组织学结果显示, 实验组裸鼠肺组织可明显见到分化后

的 NB4 细胞浸润,对照组肺未见分化后的 NB4 细胞浸润。组织学水平结果表明 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞已经浸润到了裸鼠肺组织。同时,电子显微镜的检测结果显示实验组可见到分化后的 NB4 细胞浸润肺,对照组肺未见分化后的 NB4 细胞浸润,这从超微结构角度又进一步证实了 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞浸润到了裸鼠肺组织。

接下来,我们进行了裸鼠肺组织单个核细胞细胞遗传学的检测。G 显带结果显示实验组裸鼠肺组织的单个核细胞染色体核型分析均为亚四倍体,并且含有 NB4 细胞和诱导分化后的 NB4 细胞所特有的细胞遗传学特征,特异性的 t(15;17)染色体移位。这从比较特异的细胞遗传学水平证实 ATRA 诱导分化后的 NB4 细胞已经浸润到了裸鼠肺组织。最后,采用 RT-PCR 方法和目前最灵敏、最特异、最直观的 FISH 新技术分别检测了裸鼠肺组织的 PML/RARa 融合基因 mRNA 转录本和 PML/RARa 融合基因的表达。发现实验组裸鼠肺组织检测到了诱导分化的 NB4 细胞所特有的 PML/RARa 融合基因 mRNA 转录本和 PML/RARa 融合基因,而对照组均为阴性。以上结果均表明我们已经建立了比较接近 ATRA 诱导分化治疗 APL 过程并发的、引起 APL 早期死亡的 DS 的诱导分化 NB4 细胞浸润裸鼠肺的体内动物模型。

综上所述,ATRA 诱导分化的 NB4 浸润裸鼠肺体内模型的建立,可能为 APL 诱导分化治疗过程中并发的 DS 发生病理机制、临床防治,特别是对可能作为 APL 治疗新的靶点 micro RNA 的研究^[27,28]提供新的研究基础。

参考文献(References)

- [1] Zhang X, Zhang H, Chen L, et al. Arsenic trioxide and all-trans acid (ATRA) treatment for acute promyelocytic leukemia in all risk groups: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2018, 19(1): 476
- [2] 张鹏,王树叶,胡龙虎,等.三氧化二砷注射液治疗急性早幼粒细胞白血病 72 例[J].*中华血液学杂志*, 1992, 17(2): 58-60
- [3] 张鹏,王树叶,胡龙虎,等.三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病 7 年总结 - 附 242 例分析[J].*中华血液学杂志*, 2000, 02: 10-13
- [4] MI J Q, LI J M, Chen Z X, et al. How to manage acute promyelocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2012, 26(8): 1743-1751
- [5] Larson RS, Tallman MS. Retinotic acid syndrome: manifestations, pathogenesis, and treatment [J]. *Best Prac Res Clin Haematol*, 2003, 16: 453-461
- [6] Richard P, Werner B. Potentiation of retinoid-induced differentiation of HL-60 and U937 cell line by cytokines [J]. *Eur J Cancer*, 1991, 27: 53
- [7] Wang H, Cao F, Li J, et al. Arsenic trioxide and mannitol for the treatment of acute promyelocytic leukemia relapse in the central nervous system [J]. *Blood*, 2014, 124(12): 1998-2000
- [8] Stein E M, Tallman M S. Searching the central nervous system for relapsed acute promyelocytic leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54 (12): 2584-2585
- [9] Ohanian M, Rozovski U, Ravandi F, et al. Very high levels of lactate dehydrogenase at diagnosis predict central nervous system relapse in acute promyelocytic leukemia [J]. *Er J Haematol*, 2015, 169 (4): 595-597
- [10] Ninomiya M, Kiyoi H, Ito M, et al. Retinoic acid syndrome in NOD /scid mice induced by injecting an acute promyelocytic leukemia cell line [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3): 442-448
- [11] Zang C, Liu H, Ries C, et al. Enhanced migration of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 under in vitro conditions during short-term all-transretinoic acid treatment [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(1): 33-40
- [12] Dore AI, Santana-Lemos BA, Coser VM, et al. The association of ICAM-1 Exon 6 (E469K) but not of ICAM-1 Exon 4 (G241R) and PECAM-1 Exon 3 (L125V) polymorphisms with the development of differentiation syndrome in acute promyelocytic leukemia[J]. *J Leukoc Boil*, 2007, 82(5): 340-343
- [13] Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. Clinical description of 44 patients with acute promyelocytic leukemia who developed the retinoic acid syndrome[J]. *Blood*, 2000, 95(1): 90-95
- [14] Luesink M, Pennings JL, Wissink WM, et al. Chemokine induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia: triggering The differentiation syndrome [J]. *Blood*, 2009, 114(27): 5512--5521
- [15] Zhou J, Hu L H, Cui Z, et al. Interaction of SDF-1a and Cxcr4 plans an important role in pulmonary cellular infiltration in differentiation syndrome[J]. *Int J Hematol*, 2010, 91: 293-302
- [16] R Kiessling, PS Hochman, O Haller, et al. Evidence for a similar or common mechanism for reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *British J Immunol*, 1977, 7: 655-663
- [17] Romijn J C. Growth of tumor cells with different sensitivities for murine natural killer cells in young and adult athymic nude mice[J]. *Exp Cell Biol*, 1985, 53: 24-31
- [18] Federica Cavallo, Marco Forni, Carlo Riccardi, et al. Growth and Spread of Human Malignant T Lymphoblasts in Immunosuppressed Nude Mice: A Model for meningeal Leukemia [J]. *Blood*, 1992, 80: 1279-1283
- [19] Lanotte M, Martin-Thonvenin V, Najman S, et al. NB4, a maturation inducible cell line with t (15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3)[J]. *Blood*, 1991, 77: 1080
- [20] Marchwicka A, Cunningham A, Marcinkowska E, et al. Therapeutic use of selective synthetic ligands for retinoic acid receptors: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(8): 957-971
- [21] Gianni M, Koken MH, Chelbi-Alix MK, et al. Combined arsenic and retinoic acid treatment enhances differentiation and apoptosis in arsenic-resistant NB4 cells[J]. *Blood*, 1998, 91(11): 4300-4310
- [22] Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net [J]. *Blood*, 2009, 113 (9): 1875-1891
- [23] 周晋,胡龙虎,崔喆,等.微重力旋转培养法体外模拟维甲酸综合征及其与 CXCR-4/SDF-1a 表达关系 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28 (12): 810-813
- [24] Zhou J, Hu Long Hu, Cui Zhe, et al. Interaction of SDF-1a and Cxcr4 plans an important role in pulmonary cellular infiltration in differentiation syndrome[J]. *Int J Hematol*, 2010, 91: 293-302
- [25] 周晋,胡龙虎,王桂芳,等.亚砷酸诱导分化的急性早幼粒细胞白血病细胞浸润人体肺组织的体外模拟实验研究[J].*中国实用内科杂志*, 2007, 12: 950-953

- regulates inflammatory response in human monocytes through TrkA [J]. *J Immunol*, 2014, 192: 3345-3354
- [12] Nossaman BD, Gur S, Kadowitz PJ. Gene and stem cell therapy in the treatment of erectile dysfunction and pulmonary hypertension; potential treatments for the common problem of endothelial dysfunction [J]. *Curr Gene Ther*, 2007, 7: 131-153
- [13] Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. A review of current progress in gene and stem cell therapy for erectile dysfunction [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8: 1521-1538
- [14] Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015)[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 82
- [15] Pandey AC, Lancaster JJ, Harris DT, et al. Cellular Therapeutics for Heart Failure: Focus on Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 9640108
- [16] Bongso A, Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. *Stem Cell Rev*, 2013, 9: 226-240
- [17] 毛开云, 范月蕾, 王跃, 等. 间充质干细胞治疗产品开发现状与趋势[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(10): 126-135
- [18] Ramanathan R, Rupert S, Selvaraj S, et al. Role of Human Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) for Rescue of d-Galactosamine Induced Acute Liver Injury in Mice [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2017, 7: 205-214
- [19] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population[J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 591-599
- [20] Cooke JP, Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies [J]. *Circ Res*, 2015, 116: 1561-1578
- [21] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24: 339-347
- [22] Fong CY, Subramanian A, Biswas A, et al. Freezing of Fresh Wharton's Jelly From Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117: 815-827
- [23] Muheremu A, Sun JG, Wang XY, et al. Combined use of Y-tube conduits with human umbilical cord stem cells for repairing nerve bifurcation defects[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11: 664-669
- [24] Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, et al. DMSO- and Serum-Free Cryopreservation of Wharton's Jelly Tissue Isolated From Human Umbilical Cord[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117: 2397-2412
- [25] Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal stem cells as a source of Schwann cells: their anticipated use in peripheral nerve regeneration[J]. *Cells Tissues Organs*, 2014, 200: 31-41
- [26] Gupta R, Tongers J, Losordo DW. Human studies of angiogenic gene therapy[J]. *Circ Res*, 2009, 105(8): 724-736
- [27] Sun K, Guo C, Deng HJ, et al. Construction of lentivirus-based inhibitor of hsa-microRNA-338-3p with specific secondary structure[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(1): 167-175
- [28] Mitchell K E, Weiss M L, Mitchell B M, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia[J]. *Stem Cells*, 2003, 21: 50-60
- [29] 万世奇, 张太平, 王天笑. 重组腺相关病毒载体表达抗表皮生长因子受体抗体对胰腺癌细胞株抑制作用的研究[J]. *中华消化外科杂志*, 2011, 10(4): 286-289
- [30] 李运军, 马林, 隋建丽, 等. 表皮生长因子受体反义重组腺病毒联合放射线对乳腺癌细胞的作用[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2005, 14(2): 108-111

(上接第 2031 页)

- [26] Amare PS, Baisane C, Saikia T, et al. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and prediction for disease course in patients with myeloid Leukemia[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 131: 125-134
- [27] Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, et al. Inhibition of micro RNA miR-99a induces apoptosis and necrosis in human acute promyelocytic leukemia [J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 61
- [28] ShaRifi M, Salehi R, Gheisari Y, et al. Inhibition of micro RNA miR-99a induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute promyelocytic leukemia through modulation of p63 expression [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 2799-2808
- [29] Testi AM, Pession A, Diverio D, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia: results from the international Consortium for Childhood APL[J]. *Blood*, 2018, 132: 405-412
- [30] Strocchio L, Gurnari C, Santoro N, et al. Arsenious trioxide and trans retinoic acid treatment for childhood acute promyelocytic leukemia [J]. *Br J Haematol*, 2018, 126: 1200-1206
- [31] Zhu HH, Wu DP, Du X, et al. Oral arsenious plus retinoic acid versus intravenous arsenious plus retinoic acid for non-high-risk: a non-inferiority, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19: 871-879