

CNIC-00978

SMC-0119

CN9700157



CN9700157

# 中国核科技报告

## CHINA NUCLEAR SCIENCE AND TECHNOLOGY REPORT

骨髓瘤细胞与内皮细胞<sup>51</sup>Cr 粘附效应的研究

STUDY OF THE ADHESION INTERACTION USING <sup>51</sup>Cr  
LABELLING METHOD BETWEEN THE MYELOMA  
CELL LINES AND THE ENDOTHELIAL CELLS

*(In Chinese)*



中国核情报中心  
原子能出版社

China Nuclear Information Centre  
Atomic Energy Press



张学光：教授，苏州医学院医学生物技术研究所所长、免疫研究室主任。1982年毕业于苏州医学院并获硕士学位。1986年赴法国蒙彼利埃大学从事多发性骨髓病发病机制的研究，1990年获免疫学和分子生物学博士学位。1992年赴法国南特大学工作，并于1993年获分子生物学博士后学位。

Zhang Xueguang, Professor, head of Medical Biotechnology Institute in Suzhou Medical College and director of Immunology Research Division. Graduated from Suzhou Medical College and received MS degree in 1982. Went to Montpellier University in France and was engaged in the study about pathogenesis of multiple myeloma in 1986 and received Ph. D. degree in immunology and molecule biology in 1990. Went to work at Nante's University in France in 1992 and received post-doctor's degree in molecule biology in 1993.

# 骨髓瘤细胞与内皮细胞<sup>51</sup>Cr 粘附效应的研究

张学光 王江方 茅子均

(苏州医学院)

## 摘 要

应用<sup>51</sup>Cr 标记人的多发性骨髓瘤 (MM) 细胞系 U266、XG-7, 着重研究了细胞因子对人 MM 系 U266、XG-7——内皮细胞间粘附的调控作用及其对细胞表面粘附分子表达、细胞因子分泌的影响。主要结果表明: (1) IL-6 及其 IL-6Rgp130 相关性生长因子 (GM-CSF 等) 不仅是人 MM 细胞体内、外的生长因子, 而且可以提高 MM 细胞——内皮细胞间的粘附能力, 有助于 MM 的扩散。(2) 细胞因子不仅可以诱导内皮细胞表面 CD54、CD44 表达的增加, 而且可以诱导其分泌 IL-6、TNF 等可溶性因子; 粘附亦能引起肿瘤细胞 XG-7 表面 CD11a, CD54, CD44, VLA-4 的异常改变; 同时 MM 细胞——基质细胞的相互作用可以诱导 MM 细胞迅速自分泌 IL-6。(3) 由细胞因子和粘附分子调控的“基质细胞——肿瘤细胞”相互作用是人 MM 发生发展的重要环节。其中, VLA-4 及其配体的相互作用可能参与了 MM 细胞与内皮细胞的粘附过程。

# STUDY OF THE ADHESION INTERACTION USING $^{51}\text{Cr}$ LABELLING METHOD BETWEEN THE MYELOMA CELL LINES AND THE ENDOTHELIAL CELLS

*(In Chinese)*

Zhang Xueguang Wang Jiangfang Mao Zijun

(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

## ABSTRACT

Using  $^{51}\text{Cr}$  labelled multiple myeloma (MM) cell lines U266/XG-7, the regulatory effect of cytokines on the adhesive interaction between myeloma-cell lines U266/XG-7 and the endothelial cells, and the effects of these cytokines on expression of adhesion molecules and secretion of other cytokines were studied. The experimental results were as follows: (1) IL-6 and IL-6Rgp130-associated growth factors (such as GM-CSF) are not only myeloma cell growth factors, but also can enhanced the adhesion between MM cells and endothelial cells and thus facilitated the metastasis of tumor cells. (2) Cytokines could induce increase in the expression of CD54 and CD44 on the endothelial cells and the secretion of IL-6 and TNF by the endothelial cells. On the other hand, the adhesion could also cause the change of CD11a, CD54, CD44 and VLA-4 on surface of myeloma cells XG-7. Finally, the interaction between MM cells and stromal cells from murine bone marrow could rapidly induce autocrine of IL-6 in human IL-6-dependent MM cells. (3) The interaction between stromal cells and tumor cells regulated by the cytokines and adhesion molecules was a key element in the pathogenesis and development of human MM. Among these factors, VLA-4 might be one of the molecules involved in U266/XG-7-EC interaction.

# 前 言

人多发性骨髓瘤 (MM) 是浆细胞性恶性肿瘤。我们以及日本学者业已证实, 人 MM 是 IL-6/IL-6Rgp130 相关性疾病<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞表面粘附分子有明显异常改变<sup>[2]</sup>。因此, 进一步研究可溶性因子和粘附分子之间的调控以及它们和肿瘤细胞、基质细胞四者的关系无疑将有助于进一步阐明人 MM 发生、发展的机理, 也将为寻找新的治疗途径提供实验参数和理论依据。本研究探讨了细胞因子 (IL-6、GM-CSF 等) 对人 MM 细胞、血管内皮细胞 (EC) 粘附分子表达和粘附行为的影响, 以及粘附对肿瘤细胞膜表面粘附分子表达改变及对一些细胞因子诱导分泌的作用。结果表明: IL-6、GM-CSF 等生物因子不仅是人 MM 肿瘤细胞的生长因子, 而且可以影响 MM 细胞和 EC 粘附行为, 有助于 MM 细胞的扩散; 粘附分子的表达、肿瘤性生物因子的分泌具有密切的相关性, 在促使肿瘤细胞增殖、扩散中起着极其重要的作用。

## 1 实验部分

### 1.1 细胞株

IL-6 依赖细胞株 B<sub>h</sub> 细胞 (荷兰 L. A. Aarden 博士赠送) 用含 5% 人 IL-6 粗制上清的培养基维持培养。IL-6 依赖细胞株 XG-1, XG-2, XG-7 是本室建立的人多发性骨髓瘤细胞株, 用含 10 ng/ml rIL-6 的培养基维持培养。G-CSF 依赖细胞株 NFS-60 和 IL-3 依赖细胞株 BAF-1 (法国 B. Klein 博士赠送) 分别用含 5 ng/ml rG-CSF 和含 5% WEHI 上清的培养基维持培养。TNF 依赖细胞株 L929 和 WEHI 细胞株用普通全培养基维持培养。MF-L 是本室建立的小鼠骨髓基质细胞株, 用普通培养基维持培养, 用 0.05% 胰酶——0.01% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 消化后传代。

### 1.2 人脐带静脉内皮细胞 (EC) 培养

取酶消化法收集脐带静脉内皮细胞<sup>[3]</sup>, 用含 5% 胎牛血清、5% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为  $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ , 加入 96 孔板 (100  $\mu\text{l}$ /孔) 或 24 孔板, 在一周内用于粘附试验。

### 1.3 几种上清的制备

SN<sub>1</sub>: 将 XG-1 细胞 ( $0.5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) 在不含 rIL-6 的全培养基中培养 72 小时后收集上清。SN<sub>2</sub>: 将 MF-L 细胞在不含 rIL-6 的全培养基中培养 72 小时后收集上清。SN<sub>3</sub>: 将 MF-L 细胞 ( $0.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) 加入培养瓶中培养, 待其完全贴壁后再加入  $0.5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  的 XG-1 细胞株, 继续培养 72 小时后收集上清。SN<sub>4</sub>: 在 25% MF-L 细胞培养上清中加入  $0.5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  的 XG-1 细胞株培养 72 小时后收集上清。

### 1.4 间接免疫荧光检测法 (IIFA)

按常规法检测分离获得的单个核细胞表面抗原<sup>[4]</sup>。在单个核细胞中先加入各种鼠抗人单克隆抗体, 在 4℃ 下放置半小时; 然后用 PBS 洗两遍 (1500 r/min, 10 分钟); 加入荧光标记的羊抗鼠 IgG, 放置 4℃ 冰箱, 半小时后用 PBS 洗三遍, 即可在荧光显微镜下计数阳性细胞率, 一般计数 300 个细胞。

### 1.5 粘附率检测

<sup>51</sup>Cr 标记法: 参照文献<sup>[5]</sup>, 将台盼蓝染色有 95% 活力的 U266, XG-7 细胞或用 IL-6

(40 ng/ml)、GM-CSF (10 ng/ml) 作用 24 小时后的 U266, XG-7 细胞 ( $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) 用  $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$  在  $37^\circ\text{C}$  水浴中标记 1 小时, 然后用含 10% 牛血清的 RPMI1640 将细胞洗三遍, 重悬于完全培养基中, 调整浓度为  $4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  并加到已铺满 EC 或细胞因子作用 24 小时后的 EC (TNF10 ng/ml, IL-4 10 ng/ml,  $\gamma$ IFN 10 ng/ml,  $\alpha$ IFN10 ng/ml) 的 96 孔培养板上 ( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ ), 并置  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养。根据实验要求的相应时间, 用  $37^\circ\text{C}$  温育的 PBS 将未粘附细胞洗去, 最后加入 1% Triton X-100 ( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ ), 在  $\beta$  计数仪上检测, 按下式计算粘附率。

$$\text{粘附率} = \frac{\text{粘附细胞的 CPM 数}/\text{OD 值}/\text{细胞数}}{\text{粘附细胞和未粘附细胞的 CPM 数}/\text{OD 值}/\text{细胞数的总和}} \times 100\%$$

### 1.6 粘附抑制试验

先将 VLA-4 单抗 ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 与 U266, XG-7 细胞室温共育 1 小时, 然后按 1.5 所述步骤, 最终检测 CPM 数或 OD 值。同时设置单抗 CD<sub>3</sub> ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 组作对照。按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 100 - \frac{\text{VLA-4 单抗处理组的粘附值 (CPM 数}/\text{OD 值)}}{\text{VLA-4 单抗未处理组的粘附值 (CPM 数}/\text{OD 值)}} \times 100$$

### 1.7 细胞因子检测

IL-6, G-CSF, IL-3 及 TNF 检测均用相应的依赖细胞株, 按本室方法<sup>[4~6]</sup>进行。

### 1.8 XG-2 细胞增殖反应的检测

该检测按常规  $^3\text{H-TDR}$  法进行。将 XG-2 细胞用 RPMI1640 洗两遍, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ , 加入 96 孔培养板 ( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ )。然后将几种不同上清 (SN<sub>1~4</sub>) 按不同稀释度加入 96 孔培养板上 ( $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ )。同时设置阳性对照 ( $\gamma$ IL-6)、阴性对照 (RPMI1640) 及 BE-8 单抗 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 阻断试验组。将上述样品置  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中培养一周左右, 待阴性对照组细胞全部死亡时, 加入  $^3\text{H-TDR}$  ( $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), 再培养 8~10 小时, 最后在  $\beta$  液闪仪上测定 CPM 数。

### 1.9 统计学处理

实验所得数据按不同条件进行直线回归方程或  $t$  检验处理。

## 2 结果和讨论

随着人们对粘附分子生物学特性研究的深入, 越来越认识到粘附分子及其粘附行为在骨髓正常造血过程中起着重要作用, 它们和骨髓微环境中产生的可溶性因子形成一个造血调控网络。本研究选择了 MM 细胞系 XG-7, U266, 具体分析了它们与内皮细胞间的粘附行为以及参与粘附的粘附分子和细胞因子。主要做了下面五方面工作。

### 2.1 细胞对诱导内皮细胞粘附分子表达及其分泌可溶性因子的影响

我们分析了各种细胞因子 (TNF, IL-4,  $\gamma$ IFN,  $\alpha$ IFN) 刺激内皮细胞 24 小时后诱导其表面粘附分子表达的变化, 并与对照组进行比较。结果发现, 在各种因子作用下内皮细胞表面 CD<sub>31</sub> 的表达明显增加, 其中 IL-4+TNF,  $\gamma$ IFN+TNF,  $\gamma$ IFN+IL-4 联合作用于内皮细胞, 可使其表面 CD<sub>31</sub> 荧光阳性率高达 80% 以上。CD<sub>31</sub> 的表达在细胞因子作用下也有明显的提高 (见表 1)。另外, 我们用生物学方法还检测了各种细胞因子作用于内皮细胞 24 小时后收集的上清。发现用 TNF、IL-4 和  $\gamma$ IFN 单独刺激内皮细胞时, 诱导内皮细胞分泌 IL-6

轻度增加, 分别为 21 u/ml、10 u/ml 和 11 u/ml, 它们不能诱导内皮细胞分泌 TNF; 而 IL-4+TNF 或  $\gamma$ IFN+TNF 协同作用却可以明显提高内皮细胞分泌的 IL-6 含量 (见图 1, 2 和表 2), 可高达 57 u/ml 和 62 u/ml; IL-4 还可协同 TNF 明显地增加内皮细胞分泌 TNF 的含量。 $\alpha$ IFN 诱导内皮细胞分泌 IL-6 和 TNF 的作用不明显。除此以外, IL-4 可以诱导内皮细胞分泌 G-CSF (达 17.4  $\mu$ /ml), 其他各种因子不能诱导内皮细胞分泌 G-CSF 或 IL-3。

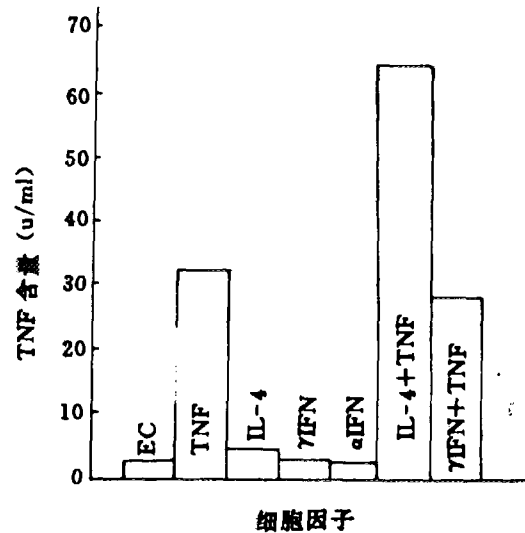
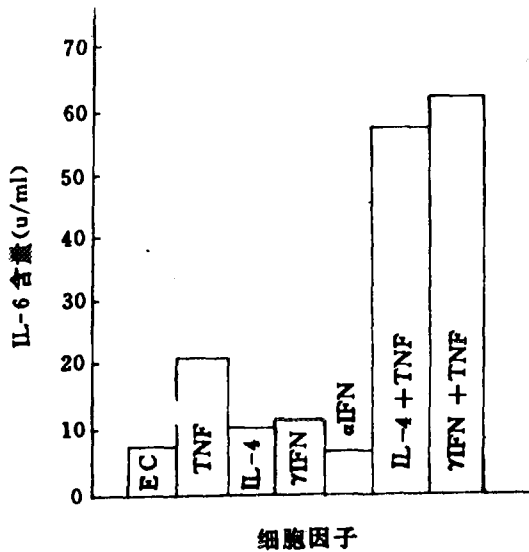


图 1 细胞因子诱导内皮细胞分泌 IL-6

图 2 细胞因子诱导内皮细胞分泌 TNF

表 1 细胞因子诱导内皮细胞粘附分子的表达

细胞因子处理组	CD <sub>64</sub>	CD <sub>11b</sub>
	荧光阳性率, %	
内皮细胞 (对照组)	37.50 ± 2.00 (+)	25.00 ± 2.00 (+)
TNF	58.20 ± 4.10 * (++)	33.20 ± 1.94 (++)
IL-4	66.50 ± 2.25 * (++)	37.50 ± 2.11 * (++)
$\gamma$ IFN	60.00 ± 4.08 * (++)	46.50 ± 2.86 * (++)
IL-4+TNF	91.20 ± 2.98 * * (+++)	90.60 ± 2.48 * * (+++)
$\gamma$ IFN+TNF	83.40 ± 2.77 * * (+++)	88.30 ± 4.05 * * (+++)
IL-4+ $\gamma$ IFN	86.50 ± 2.75 * * (+++)	72.30 ± 2.14 * * (+++)

荧光强度由强到弱: +++ → ++ → +

与对照组比较差别有显著性, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

表 2 细胞因子诱导内皮细胞分泌的可溶性因子

细胞因子处理组	IL-6	TNF	G-CSF	IL-3
	活性单位, u/ml			
内皮细胞 (对照组)	7.70	2.52	1.88	1.00
TNF	20.80	32.00	1.76	0.02
IL-4	10.50	4.00	17.40	0.63
$\gamma$ IFN	11.20	2.38	2.09	0.85
$\alpha$ IFN	5.70	1.87	1.59	0.08
IL-4+TNF	57.00	64.00	2.82	0.07
$\gamma$ IFN+TNF	61.90	27.40	0.99	0.06

因此, TNF, IL-4 和  $\gamma$ IFN 作用于内皮细胞, 可以使内皮细胞产生两个方面改变: (1) 内皮细胞表达的粘附分子增加 (包括 CD<sub>54</sub>、CD<sub>62</sub>等); (2) 促进内皮细胞分泌另一些细胞因子如 IL-6、TNF 等。众所周知, TNF 是一个炎症因子, 它主要由单核——巨噬细胞系统产生。炎症过程中, TNF 可以调节中性粒细胞与内皮细胞间的粘附作用, 从而有助于中性粒细胞穿越内皮在炎症部位聚集<sup>[9]</sup>。IL-4 和  $\gamma$ IFN 主要来自 T 淋巴细胞, 它们可作用于内皮细胞, 选择性地促进内皮细胞与淋巴细胞以及嗜酸、嗜碱性粒细胞的粘附<sup>[10,11]</sup>。这些作用产生的机理可能都是由于这些细胞因子选择性地活化了内皮细胞表面的一些粘附分子, 后者进一步加强了粘附作用。在这一过程中, 细胞因子还可以通过促进内皮细胞产生另一些可溶性因子 (如 IL-6) 或增加原细胞因子分泌量 (如 TNF), 从而进一步促进内皮细胞表面粘附分子的表达及其他细胞因子的分泌, 这样就形成一个多因子参与的“细胞因子-粘附分子”调控网络, 调节内皮细胞的生物学功能。

## 2.2 细胞因子对 MM 细胞与内皮细胞粘附效应的作用

用<sup>51</sup>Cr 标记 MM 细胞, 我们同时做了两组试验: (1) 观察了 MM 细胞系和经 IL-6 或 GM-CSF 刺激后的 MM 细胞与内皮细胞的粘附效应; (2) 观察了 MM 细胞与内皮细胞或经各种因子诱导后内皮细胞的粘附效应。结果提示: (1) 正常情况下, U266 和 XG-7 细胞粘附于内皮细胞在 2 小时达到最大饱和粘附率, 分别为 22% 和 20%; (2) IL-6 和 GM-CSF 可以增加 U266 和 XG-7 细胞粘附于内皮细胞的能力。一方面使最大粘附率提高, U266 和 XG-7 可以分别达到 60%~70% 和 30%~40%; 另一方面, 使到达最大粘附率的时间提前到 1 小时左右 (见图 3, 4); (3) IL-4+TNF 和  $\gamma$ IFN+TNF 协同作用于内皮细胞, 可使内皮细胞与 U266 和 XG-7 到达最大粘附率的时间提前到半小时左右, 并且可以提高它们之间的最大粘附率。在 U266-EC 作用中, IL-4+TNF 或  $\gamma$ IFN+TNF 可以使 U266 细胞达到的最大粘附率分别提高到 29.5% 和 25.2%; 而在 XG-7-EC 作用中, 它们使 XG-7 细胞达到的最大粘附率分别为 33.5% 和 39.5%。另外, IL-4、 $\gamma$ IFN 单独作用于内皮细胞时, 对 U266, XG-7 细胞的粘附率亦有影响, 但是, TNF 单独作用于内皮细胞时, 对 U266 和 XG-7 细胞的粘附率没有影响 (见图 5, 6)。



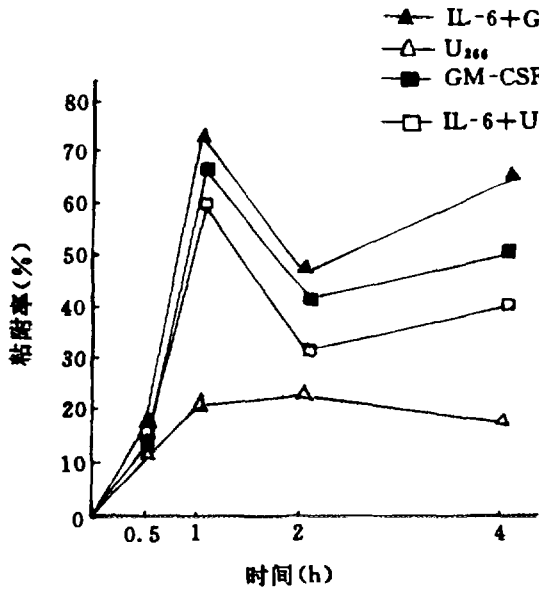


图 3 IL-6/GM-CSF 对 U266-EC 粘附的调控

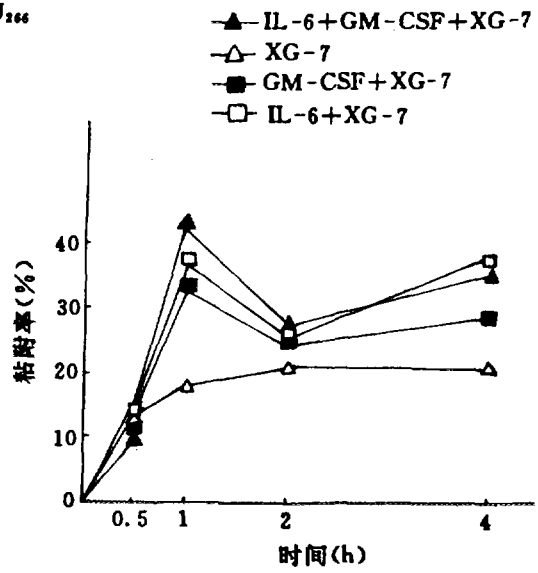


图 4 IL-6/GM-CSF 对 XG-7-EC 粘附的调控

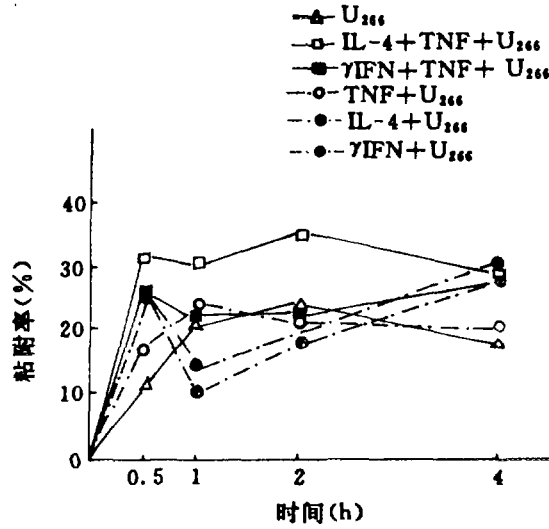


图 5 IL-4、TNF、γIFN 对 U266-EC 粘附的调控

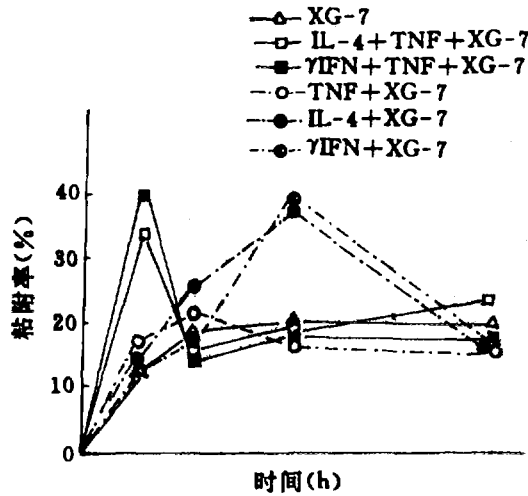


图 6 IL-4、TNF、γIFN 对 XG-7-EC 粘附的调控

MM 是一种恶性浆细胞性病变,原发病灶在骨髓,当恶性肿瘤细胞释放入外周血后就形成浆细胞性白血病。现已证明,有许多细胞因子参与了肿瘤细胞的生长,IL-6 是人 MM 细胞体内、外的中心生长因子<sup>[12]</sup>。GM-CSF 可以通过增加 MM 细胞对 IL-6 的敏感性促进肿瘤细胞生长,G-CSF 可以协助 IL-6 直接作用于 MM 细胞<sup>[13]</sup>,IFN 也可通过诱导 MM 细胞形成自分泌 IL-6 环路促进肿瘤细胞生长,等等<sup>[14]</sup>。根据我们的结果,IL-6/GM-CSF 可以增加 MM 细胞与内皮细胞的粘附,进而有助于肿瘤细胞穿越内皮的扩散。因此,我们首次提出 IL-6 及其 IL-6Rgp130 相关性生长因子不仅可以促进 MM 细胞的生长,而且有助于 MM 细胞的转移和扩散。IL-4、 $\gamma$ IFN 和 TNF 这些细胞因子一方面可以通过内皮细胞释放 IL-6, TNF, G-CSF 等 MM 细胞的的生长因子,另一方面也可以通过上调内皮细胞表达的粘附分子间接地促进了 MM 细胞与内皮细胞的粘附。另外,本实验结果亦说明粘附是 MM 细胞扩散转移必不可少的环节。各种因子最终都是通过提高 MM 细胞与内皮细胞粘附来促进 MM 细胞转移到外周血。

### 2.3 粘附对人 MM 细胞系 XG-7 粘附分子表达的影响

我们发现与内皮细胞粘附的 XG-7 细胞表面 CD<sub>11a</sub>、CD<sub>54</sub>的表达增加,CD<sub>44</sub>和 VLA-4 的荧光阳性率虽没有变化,但荧光强度显著增强;与之相反,未粘附的 XG-7 细胞表面 CD<sub>11a</sub>, CD<sub>54</sub>及 VLA-4 的荧光阳性率却显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

表 3 粘附 XG-7/未粘附 XG-7 细胞粘附分子的表达

实 验 组	CD <sub>11a</sub>	CD <sub>54</sub>	CD <sub>44</sub>	VLA-4
	荧光阳性率, %			
XG-7 (对照组)	62.00±2.00 (+)	43.30±3.02 (+)	100.00±0.00 (++)	81.80±2.26 (++)
XG-7 (与 EC 未粘附组)	20.00±3.10** (+)	20.70±1.55* (+)	100.00±0.00 (++)	81.50±1.66 (++)
XG-7 (与 EC 粘附组)	92.14±2.08** (+/++)	80.15±4.07* (+/++)	100.00±0.00 (+++)	90.50±1.31 (+++)

荧光强度由强到弱, +++→++→+→-

与对照组比较差别有显著性: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

XG-7, U266 是人 MM 细胞株,通过细胞膜表面抗原的研究发现,这些细胞株也是不均一的群体<sup>[2]</sup>。上述结果表明,根据细胞膜粘附分子的表达,也可将其分为两个群体,一个群体(20%~30%)能直接和内皮细胞接触,这些细胞膜高表达与内皮细胞粘附相关的粘附分子;另一个群体不能与内皮细胞接触,相关的粘附分子呈低水平表达。这两个群体是由于细胞处于的分化阶段不同,还是由于增值周期不同所致,值得进一步探讨。另外,上述结果还表明,粘附作用可以调控肿瘤细胞膜粘附分子的表达。

### 2.4 VLA-4 单抗对 MM 细胞与内皮细胞粘附的抑制作用

为了探讨是何种粘附分子参与了 MM 细胞与内皮细胞之间的粘附作用,我们用 VLA-4 单抗作了功能抑制试验。结果发现 VLA-4 单抗可以抑制 XG-7 细胞(或 IL-6 刺激 24 小时后的 XG-7 细胞)粘附于内皮细胞(或经 IL-4 (10 ng/ml) 刺激 24 小时后的内皮细胞),抑制率为 15%~35%不等;同样, VLA-4 单抗也能够抑制 U266 细胞(或 IL-6 刺激 24 小时后的 U266 细胞,粘附于内皮细胞(或经 IL-4 (10 ng/ml) 刺激 24 小时后的内皮细胞),

其抑制率为 7%~17%不等 (见表 4, 5)。

表 4 VLA-4 单抗 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 抑制 XG-7 细胞/XG-7 细胞+IL-6 对 EC 的粘附

实 验 组	XG-7+ VLA-4 抗体	XG-7+IL-6 +VLA-4 抗体	XG-7+ CD <sub>3</sub> 抗体
	抑 制 率, %		
EC	16.04 $\pm$ 0.63	35.15 $\pm$ 5.75	0
EC+IL-4	30.00 $\pm$ 5.00	26.03 $\pm$ 7.28	0

CD<sub>3</sub> 抗体用量 20  $\mu\text{g/ml}$

表 5 VLA-4 单抗 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 抑制 U266 细胞/U266 细胞+IL-6 对 EC 的粘附

实 验 组	U266+ VLA-4 抗体	U266+IL-6 +VLA-4 抗体	U266+ CD <sub>3</sub> 抗体
	抑 制 率, %		
EC	14.85 $\pm$ 1.85	17.90 $\pm$ 0.20	0
EC+IL-4	7.9 $\pm$ 1.80	11.70 $\pm$ 8.30	0

CD<sub>3</sub> 抗体用量 20  $\mu\text{g/ml}$

实际上, 造血细胞与内皮细胞之间的粘附是一个在多水平上调控的动态过程, 根据造血祖细胞发育分化阶段的不同, 涉及许多不同的粘附分子及粘附机制。例如, 已经证实, 中性粒细胞和淋巴细胞穿越内皮向炎症部位聚集至少涉及 3~4 对粘附分子, 分级逐步完成迁移行为<sup>[9,10]</sup>, 因此我们认为肿瘤细胞或成熟造血细胞通过内皮迁移或向外周血释放, 也必须经过多水平分子的介异。在这里我们所证实的 VLA-4 及其与相应配体的识别、接触参与了 MM 细胞与内皮细胞的相互作用, 但这只是其中一个环节, 肯定还有其他粘附分子参与这一过程。

## 2.5 基质细胞对人 MM 细胞自分泌 IL-6 的诱导作用

实验结果表明, IL-6/IL-6Rgp130 相关性细胞因子不仅可以促使肿瘤细胞的生长, 还可以改变其与基质细胞的粘附行为。反之, 粘附能否促进肿瘤细胞生长, 这种促进作用是通过何种环节实现? 为了阐明这个问题, 我们选择了本室建立的小鼠基质细胞株 MF-L 和人 IL-6 依赖性 MM 细胞株 XG-1 (XG-1 细胞是完全依赖外源性 IL-6 生长的人 MM 细胞株, 本身不分泌可检测水平的 IL-6), 将该细胞与 MF-L 细胞或 MF-L 上清共培养后, 分析 MM 细胞和 MF-L 细胞直接接触和 MF-L 分泌的可溶性因子诱导 MM 细胞自分泌 IL-6 的作用。结果表明 (见图 7): (1) MM 细胞 (XG-1) 培养 72 小时上清 (SN<sub>1</sub>) 没有可检测水平的 IL-6 活性; (2) MF-L 细胞培养 72 小时上清 (SN<sub>2</sub>) 仅有低水平的 IL-6 活性 (100 u/ml); (3) MF-L 细胞与 XG-1 细胞共培养上清 (SN<sub>3</sub>) 和 MF-L 细胞上清与 XG-1 细胞共培养上清 (SN<sub>4</sub>) 均含有极高的 IL-6 活性 (1050 u/ml), 而且这种 IL-6 活性能被鼠抗人的 IL-6 单抗 (BE-8) 特异性中和。为了证实上清中所含的 IL-6 属性, 我们用本室建立的人 IL-6 依赖性 MM 细胞株 XG-2 (该细胞株只对人 IL-6 起反应, 对鼠源性 IL-6 不反应), 分析上述不同上清中 IL-6 活性, 结果如图 8 所示, 不同浓度的 SN<sub>3</sub> 和 SN<sub>4</sub> 可以促进 XG-2 细胞的增殖。

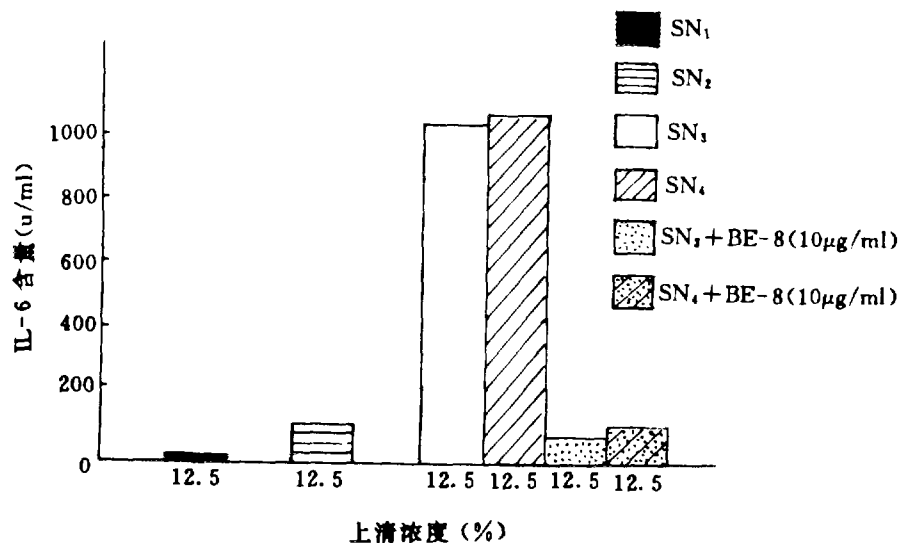


图7 几种不同上清中白细胞介素6 (IL-6) 含量

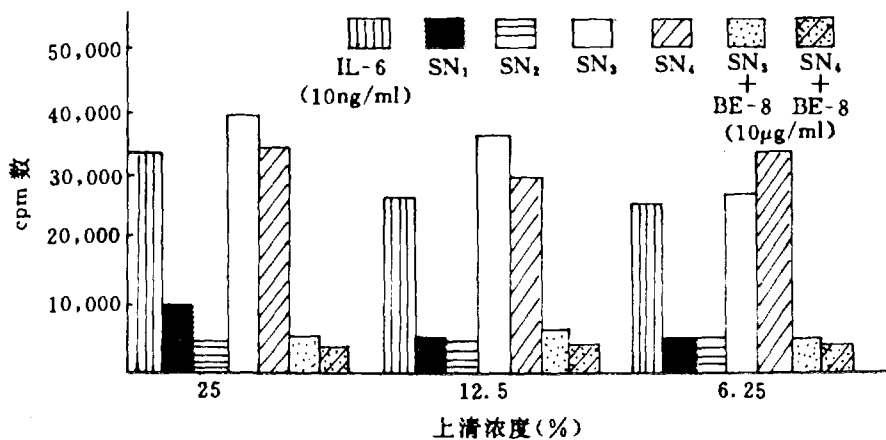


图8 几种不同上清对XG-2的增殖作用

许多学者的研究结果都证明,人MM细胞体内、外的中心生长因子IL-6主要由BM微环境大量产生<sup>[12]</sup>,但在一些因素诱导下(如TNF、 $\alpha$ IFN等)可以使MM细胞形成自分泌IL-6环路<sup>[14,15]</sup>,如Helena等发现长期培养后(14年)的U266与初建系U266相比有了很大变化,即前者形成了IL-6的自分泌环路,从而不再依赖外源性IL-6生长<sup>[14]</sup>。因此,我们所证实的骨髓基质细胞通过与MM细胞系的直接接触或由基质细胞分泌一些可溶性因子/粘附分子同样也可以诱导MM细胞形成自分泌IL-6环路,这一环路可能在MM发病早期或某些条件下作为一个替代机制,使MM细胞能够逃避机体的监视功能而大量增殖。

综上所述,在MM的发病过程中,粘附分子及其粘附作用和可溶性因子这两个因素形成一个调控网络调节肿瘤细胞与微环境成分之间的相互作用;细胞因子可以改变肿瘤细胞/基质细胞表面粘附分子的表达或诱导另一些细胞因子产生,而粘附作用也同样可以诱导

MM 细胞分泌生长因子及其表面粘附分子的变化。因此, MM 的发生同样也是由多因素异常所致。根据我们的实验结果, 认为 MM 的发病至少有三个因素:

(1) IL-6 及其 IL-6Rgp130 相关性生长因子 (GM-CSF 等) 既是人 MM 细胞的生长因子, 也是与其转移扩散有关的因子;

(2) 粘附作用是 MM 细胞转移扩散的关键环节, 它可以通过调节肿瘤细胞上粘附分子的表达或诱导肿瘤细胞分泌生长因子促进肿瘤细胞的转移扩散。在这一过程中, 许多细胞因子 (如 IL-4, TNF, IL-6 等) 可以增强粘附作用, 从而形成“细胞因子——粘附分子”的调控网络。

(3) VLA-4 与其配体的相互作用可能参与了 MM 细胞经内皮的扩散, 但这只是其中一个环节。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang X G, et al. Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transduces gp130. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 1337~1342
- [2] Zhang X G, et al. Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*, 1994, 83 (12)
- [3] 张宝庚等. 人脐带静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养. *中华心血管病杂志*, 1985, 13 (1), 52~54
- [4] 张毅等. 抗人白血病细胞单克隆抗体 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 的产生及初步鉴定. *苏州医学院学报*, 1989, 9 (2), 100
- [5] 曹雷涛. 白细胞介素 2 的基础与临床. 第一版. 北京: 北京科学技术出版社, 1990, 183
- [6] 冯树一等. 白细胞介素 6 生物学检测方法的比较研究. *苏州医学院学报*, 1993, 13 (增刊), 425
- [7] 陈荣珍等. 慢性肾炎患者外周血 IL-6、TNF 水平变化研究. *苏州医学院学报*, 1993, 13 (增刊), 528
- [8] Shirafuji N, et al. A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders. *Exp. Hematol.*, 1989, 17, 116
- [9] Cuy A Z, et al. Endothelial cell interactions with granulocytes; tethering and signaling molecules. *Immunology Today*, 1992, 13 (3), 93~98
- [10] Yoji S, et al. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today*, 1992, 13 (3), 106~112
- [11] 刘鉴. 炎症过程中血管内皮细胞与白细胞粘附作用研究进展. *国外医学免疫学分册*, 1993, 4, 180~183
- [12] Klein B, Zhang X G, et al. Paracrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989, 73, 517~526
- [13] Zhang X G, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood*, 1990, 76, 2599~2605
- [14] Michel J, et al. IFN<sub>α</sub> induces autocrine production of IL-6 in myeloma cell lines. *J. Immunol.*, 1991, 147, 4402~4407
- [15] Helena J W, et al. Increase in interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor expression in a human multiple myeloma cell line, U266, during longterm in vitro culture and the development of a possible autocrine IL-6 loop *Leukemia* 1992, 6 (4), 310~318

(京)新登字 077 号

图书在版编目(CIP)数据

骨髓瘤细胞与内皮细胞<sup>51</sup>Cr 粘附效应的研究 =  
STUDY OF THE ADHESION INTERACTION USING  
<sup>51</sup>Cr LABELLING METHOD BETWEEN THE MYELO-  
MA CELL LINES AND THE ENDOTHELIAL CELLS/  
张学光等著. —北京:原子能出版社,1995.6

I. 骨… I. 张… III. ①骨髓瘤细胞-内皮细胞-粘附分  
子②标记法-研究 IV. ①Q25②R730.21



原子能出版社出版发行

责任编辑:武洁

社址:北京市海淀区阜成路43号 邮政编码:100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷



开本 787×1092 1/16·印张 1·字数 13 千字

1995年6月北京第一版·1995年6月北京第一次印刷

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.