

· 临床研究报道 ·

白血病患者细胞凋亡状况的探讨

陆勤 程宝智

(南京医科大学附属儿童医院血液科,江苏*南京 210008)

[摘要] 目的 探讨白血病患者细胞的凋亡以及白血病化疗前后细胞凋亡的关系。方法 TUNEL法检测细胞凋亡。结果 小儿白血病细胞凋亡总积分范围0~11分显著低于正常组30~342分($P < 0.01$),化疗后白血病的细胞凋亡总积分范围3~32分高于化疗前。结论 小儿白血病发生和发展与细胞凋亡密切相关,化疗的目的之一是诱导细胞凋亡。

[关键词] 细胞凋亡;白血病;小儿

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] B [文章编号] 1008-8830(2001)05-0587-02

细胞凋亡(apoptosis)也称程序性细胞死亡(programmed cell death),是细胞死亡的两种途径之一。本质上区别于细胞坏死,具有特征性的形态和生化学改变^[1]。它不仅对胚胎发生、体格发育和保持机体稳定等过程至关重要,而且在调控细胞的增殖、肿瘤的发生和生长中起重要作用。近几年的研究表明:多种化学结构不同,作用靶点各异的抗肿瘤药物均可能诱导细胞凋亡^[2]。本文用TUNEL^[3]法检测36例次白血病患者和24例次非肿瘤性疾病骨髓细胞凋亡情况,对白血病患者初诊时,化疗前后细胞凋亡的状况作初步探讨。

1 对象和方法

1.1 对象

26例白血病患者均为1997年8月至1998年10月本院血液科住院病人,均符合急性白血病诊断标准^[4],对26例初诊患儿以及其中10例白血病患者经联合化疗后骨髓形态学检查提示完全缓解(CR)者,检测骨髓细胞凋亡数。24例对照组标本来自于本院其他病区,骨髓细胞形态学检查提示骨髓正常。

1.2 方法

试剂由Sigma公司提供,每例骨髓标本均采用细胞涂片法。

1.2.1 TUNEL法检测细胞凋亡数 将骨髓涂片干燥后用新配4%多聚甲醛(PBS,pH 7.4)室温中固定30 min。PBS洗片后在冰上于0.1% Triton X-100,0.1%柠檬酸钠中保温2 min以增加细胞通透性。

用PBS洗2次,将末端脱氢核糖核酸转移酶(TdT)与TdT缓冲液混合,样品上加入50 μ l TUNEL反应混合液。温箱中37 $^{\circ}$ C保温60 min,然后PBS洗片2次。加封闭液各100 μ l室温30 min,然后PBS洗片2次。用抗体稀释液稀释抗-DIG-AP复合物,混匀后,各样品上加入50 μ l,温箱中37 $^{\circ}$ C保温30~60 min。PBS洗片3次,加新配底物液各100 μ l室温放置30~60 min(或更长时间)。用PBS洗片2次后,用甲基绿复染,干燥,封片。

1.2.2 凋亡细胞镜检 在光镜下观察,凋亡细胞被染成蓝色。

1.3 统计学方法

采用成组 t 检验。

2 结果

普通光镜下观察:凋亡细胞内有明显的不同程度的灰黑色颗粒沉淀,将其分为4个等级。I级:胞浆1/2以下的区域出现灰黑色沉淀(颗粒状或片块状);II级:胞浆1/2~3/4的区域出现灰黑色沉淀;III级:胞浆全部区域出现灰黑色或黑色沉淀,但密度较低,致密的团块较少;IV级:胞浆全部皆被涂黑色团块沉淀所充满,密度甚高。1个等级为1个积分,观察100个有核细胞,将每个细胞的积分相加,即得出总积分的范围。

本文用TUNEL法总共检测了60例次骨髓标本细胞凋亡情况,结果表明急性白血病患者化疗前26例的细胞凋亡总积分范围0~11分,较之正常组24例

细胞凋亡总积分范围 30 ~ 586 分显著降低($P < 0.01$),提示在急性白血病时,细胞凋亡明显减少。另外,对 10 例经联合化疗后达到 CR 的白血病患者再次检测其细胞凋亡状况,结果显示 CR 病人较初诊病人的细胞凋亡总积分范围有所升高,但统计学上无明显的差异($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 60例细胞凋亡检测结果

组别	例数	总积分范围(分)
正常对照	24	30 ~ 342
急性白血病化疗前	26	0 ~ 11
化疗后 CR	10	3 ~ 32

3 讨论

在一个多细胞机体,凋亡与细胞分裂是对立统一的,共同协调决定着组织器官的形态发生发展方面,即维持、增长抑制或退化,这是机体维持正常生理所必需,又是机体清除生理上不需要的细胞的一种形式。

严格地讲细胞凋亡只是细胞死亡的一形式,其在机体内的性质,可以是生理的,也可以是病理的。细胞凋亡在体内有其固定的特征。形态学特征:初期表现为细胞核固缩、染色质凝固,胞质浓缩,细胞体积缩小,但细胞结构完整;中期细胞核浓缩和片断化,细胞表面起泡,最终形成具有完整细胞膜包被的凋亡小体;后期凋亡小体被吞噬细胞吞噬,凋亡细胞在机体内消失。本研究发现凋亡可相对的分为四个等级,为凋亡的不同阶段所致。生物学特征:凋亡通过自身内部死亡机制而启动发生,特点为核酸内切酶活化,将 DNA 最终分段为 180 bp 大小的片段 DNA,众多基因活化并合并成相应的基因产物调节全过程。因此,凋亡受有关基因的严格控制,目前已经发现有一些基因与细胞凋亡密切相关,如诱导细胞凋亡的基因:c-myc 基因、野生型 P53 基因、Fas 基因及线虫的 Ced-3 和 Ced-4 基因^[5];抑制细胞凋亡的基因:bcl-2 基因、突变型 P53 基因及线虫的 Ced-9 基因等。

白血病是造血干、祖细胞分化受阻于不同阶段的结果,过去对白血病发病机制的研究多集中在其“细胞增殖”方面,本研究认为细胞凋亡抑制是白血病发生和发展的一个重要因素。白血病发生凋亡抑制机制可能是 bcl-2 基因、bol-x 基因失控,抑制了白血病细胞凋亡,加速了白血病细胞的快速积蓄;白血病的融合基因如 bcr-abl、PML-RAR α 的过度表达,通过下调凋亡抑制基因使白血病细胞保持持续生长、增殖优势。

以往普遍认为肿瘤化疗和放疗的目的是杀死肿瘤细胞,本研究发现化疗能够诱导白血病细胞凋亡,故认为肿瘤放疗和化疗的目的之一是诱导肿瘤细胞凋亡,与文献报告相符^[6]。既然已经了解到诱导肿瘤细胞凋亡可能是许多化疗药物抑制肿瘤生长的机制之一,并且肿瘤细胞比正常细胞对药物诱导的细胞凋亡更敏感的特性后,就可研究设计一些特异的作用于细胞凋亡的不同阶段不同靶点或者作用于与细胞凋亡抑制剂发挥作用高度相关的蛋白的抗肿瘤药物(包括化学制剂和生物制剂),以增加肿瘤细胞对化疗的敏感性,克服肿瘤细胞的耐药性,提高化疗的缓解率。

[参 考 文 献]

- [1] Wyllie AH. Apoptosis(the 1992 Frank Rose Memorial Lecture) [J]. Br J Cancer, 1993, 67(2): 205 - 208.
- [2] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs [J]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11(2): 121 - 139.
- [3] Frankfurt OS, Seckinger D, Sugarbaker EV. Pleiotropic drug resistance and survival advantage in leukemic cells with diminished apoptotic response [J]. Int J Cancer, 1994, 59(2): 217 - 224.
- [4] 张之南. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998, 171 - 179.
- [5] Yonish - rouach E, Resnitzky D, Lotem J, et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin - 6 [J]. Nature, 1991, 352(6333): 345 - 347.
- [6] McDonnell LTJ, Meyn RE, Robertson LE. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy [J]. Semin Cancer Biol, 1995, 6(1): 53 - 60.

(本文编辑: 吉耕中)