

不同保存时间去白红细胞上清对急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞增殖和凋亡的影响

陈伟^{1,2}, 肖扬², 戴小辉¹, 刘金菊¹

1. 湖南省娄底市中心医院输血科, 湖南 娄底 417000; 2. 娄底市中心医院院士工作站, 湖南 娄底 417000

摘要: **目的** 采用体外实验研究不同保存时间去白细胞(去白)红细胞上清对人 T 淋巴细胞株 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 设含 10% 灭活胎牛血清的 1640 培养液为空白组, 单纯 Jurkat 细胞培养为对照组, 保存 7 d 去白细胞悬浮红细胞上清与 Jurkat 细胞共培养为实验 A 组, 保存 30 d 去白细胞悬浮红细胞上清与 Jurkat 细胞共培养为实验 B 组。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测各组培养 24、48 h 后对 Jurkat 细胞增殖的影响。流式细胞术检测红细胞上清作用于 Jurkat 细胞 48 h 后对细胞凋亡的影响。**结果** 在开始培养时各组生长抑制率无明显差异($P > 0.05$); 培养 24、48 h 后, 实验 B 组生长抑制率明显低于对照组[(5.72 ± 0.76)% vs (8.42 ± 0.73)% ; (4.71 ± 0.54)% vs (9.16 ± 0.86)% ; P 均 < 0.05]。实验 A 组与对照组生长抑制率相当($P > 0.05$)。在培养开始时各组 Jurkat 细胞凋亡率无明显差异($P > 0.05$); 培养 48 h 后实验 B 组凋亡率明显低于对照组[(6.71 ± 1.14)% vs (10.12 ± 1.67)% , $P < 0.05$], 而实验 A 组与对照组细胞凋亡率相当($P > 0.05$)。**结论** 新鲜去白红细胞上清对 Jurkat 细胞增殖和凋亡无明显影响, 陈旧的去白红细胞上清对 Jurkat 细胞的增殖有促进作用, 对其凋亡有抑制作用, 且这种作用存在一定的时间依赖性。

关键词: 去白细胞红细胞上清; Jurkat 细胞; 增殖; 凋亡; 急性 T 淋巴细胞白血病

中图分类号: R 457.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)03-0347-04

Effect of supernatants of leukoreduced red blood cells of different storage time on proliferation and apoptosis of acute T-lymphocyte leukemia Jurkat cells in vitro

CHEN Wei*, XIAO Yang, DAI Xiao-hui, LIU Jin-ju

* Department of Blood Transfusion, Loudi Center Hospital of Hunan, Loudi, Hunan 417000, China

Corresponding author: LIU Jin-ju, E-mail: 77141275@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of supernatants of red blood cells of different storage time on proliferation and apoptosis of acute T-lymphocyte leukemia cell strain Jurkat cells in vitro. **Methods** The 1640 medium containing 10% inactivated fetal calf serum was served as blank group, The Jurkat cells of pure culture were served as control group. The supernate of leukoreduced suspended erythrocytes stored for 7 days co-cultured with Jurkat cells was served as experiment group A. The supernate of leukoreduced suspended erythrocytes stored for 30 days co-cultured with Jurkat cells was served as experiment group B. The cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the effects on proliferation of Jurkat cells in each group 24 and 48 hours after culture. Flow cytometry was used to detect the effect on apoptosis of Jurkat cells after supernate of leukoreduced erythrocytes acting on Jurkat cells for 48 hours. **Results** There were no significant differences in cell growth inhibition rates for all groups at the beginning of culture ($P > 0.05$). After cultures of 24 and 48 hours, cell growth inhibition rates in experiment group B were significantly lower than those in control group [(5.72 ± 0.76)% vs (8.42 ± 0.73)% ; (4.71 ± 0.54)% vs (9.16 ± 0.86)% ; all $P < 0.05$], and this showed that the erythrocytes supernate stored for 30 days had a certain promoting effect on the proliferation of Jurkat cells with a certain time dependence. There were no significant differences in cell growth inhibition rates after cultures of 24 and 48 hours between experiment group A and control group (all $P > 0.05$). There was no significant difference in apoptosis rates of Jurkat cells at the beginning of culture between experiment group A and experiment group B ($P > 0.05$), and the cell apoptosis rates of Jurkat cells in

experiment group B was significantly lower than that in control group after cultures of 48 hours $[(6.71 \pm 1.14)\% \text{ vs } (9.16 \pm 0.86)\%, P < 0.05]$, while there was no significant difference between experiment group and control group ($P > 0.05$). This showed that the erythrocytes supernate stored for 30 days had inhibiting effect on cell apoptosis. **Conclusion** The fresh erythrocytes supernate has no obvious effect on the proliferation and apoptosis of Jurkat cells, while the old erythrocyte supernate might have the effect of promoting proliferation and inhibiting apoptosis on Jurkat cells.

Key words: Leukoreduced erythrocytes supernate; Jurkat cells; Proliferation; Apoptosis; Acute T-lymphocyte leukemia

急性 T 淋巴细胞性白血病是临床常见的血液系统恶性肿瘤,常导致正常造血功能障碍而引起贫血,同时由于化疗药物对骨髓的抑制作用,往往需要通过输血来纠正贫血。去白细胞(去白)红细胞目前是临床输血治疗中使用最广、用量最多的血液制品,国内外许多研究发现同种异体输血导致部分肿瘤患者术后免疫抑制及肿瘤复发^[1-4],推测可能与红细胞保存时间延长导致的代谢产物堆积、红细胞本身及其保存液成分发生变化有关^[5],因此研究不同保存时间红细胞上清对受血者的影响,对于临床安全有效输血具有积极意义。本研究拟通过体外实验来观察不同保存时间去白红细胞上清对人急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞增殖、凋亡可能存在的影响,为临床白血病的输血治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 急性人 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat 细胞购自天津血液病研究所,红细胞来源于娄底市中心血站,由健康成年男性无偿捐献。

1.2 主要试剂与仪器 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;胎牛血清、RPMI 1640 细胞培养液、细胞 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物科技公司;逆转-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒购自宝生物工程(大连)公司;超低温冰箱:日本 SANYO(MDF-382 型);流式细胞仪:美国 BD 公司;高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司

1.3 实验方法 (1)将 Jurkat 细胞冻存管从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴复苏。在超净台内,用吸管将 Jurkat 细胞悬液吸出,转移至离心管中,加入 RPMI 1640 培养液 20 ml。 $1\ 000\text{ rpm}$ 离心 10 min 后弃上清,细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 1640 培养液重悬,调整浓度为 10^6 个/ml,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,培养条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度 5%,每 2 天换培养液 1 次。(2)去白细胞悬浮红细胞加入红细胞保存液枸橼酸盐-磷酸盐-葡萄糖-腺嘌呤(CPDA)混匀,调整红细胞浓度为 10^6 个/ml, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d 和 30 d 后离心取上清

备用。(3)实验分为空白组(含 10% 灭活胎牛血清的 1640 培养液),对照组(Jurkat 细胞培养组),实验 A 组(Jurkat 细胞 + 保存 7 d 去白细胞悬浮红细胞上清液共培养组),实验 B 组(Jurkat 细胞 + 保存 30 d 去白细胞悬浮红细胞上清液共培养组)。取对数生长期的 Jurkat 细胞,接种于 96 孔板中,分别加入 7 d 和 30 d 保存红细胞的上清液,各设 5 个平行孔,每孔总体积为 $100\ \mu\text{l}$,培养 24、48 h 后检测,每孔避光加入 $10\ \mu\text{l}$ CCK-8,继续孵育 2 h 后用酶标仪检测各孔光密度(OD)值,检测波长为 450 nm。按下列公式计算生长抑制率:生长抑制率 = $[(\text{对照组} - \text{空白组}) - (\text{实验组} - \text{空白组}) / (\text{对照组} - \text{空白组})] \times 100\%$ 。(4)流式细胞仪检测,将 Jurkat 细胞株置于 10% 胎牛血清培养基中培养过夜,调节细胞密度至 1×10^6 个/ml,分别加入 7 d 和 30 d 保存红细胞的上清液共同培养 48 h 后,室温 $2\ 000\text{ rpm}$ 离心 10 min,收集细胞;洗涤细胞两次,用预冷 $1 \times \text{PBS}$ 缓冲液($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)重悬细胞,加入 $5\ \mu\text{l}$ 的膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 Annexin (V-FITC)混匀后,室温避光孵育 45 min, $1\ 000\text{ g}$ 离心 5 min 收集细胞,加入 $190\ \mu\text{l}$ 的 Annexin V-FITC 混匀后再加入 $10\ \mu\text{l}$ 的碘化丙啶(PI)染色,避光冰浴后用流式细胞仪检测 Jurkat 细胞凋亡情况。实验平行检测 3 次,取均值。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时间不同实验组的比较采用重复测量多因素方差分析及多重比较的 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与实验 B 组细胞形态学比较 对照组在含有 10% 胎牛血清的 RPMI164 培养基中,细胞体积缩小,大小不一致,折光性变强,细胞碎片增多,并且细胞核出现凋亡的形态学改变(图 1a)。实验 B 组细胞大小较均一,胞膜完整且有一定折光性,胞核较大,偶见细胞核小或染色质浓缩(图 1b)。

2.2 各组生长抑制率比较 在开始培养时各组生长抑制率无明显差异($P > 0.05$);培养 24、48 h 后,实验 B 组生长抑制率明显低于对照组和实验 A 组(P 均 <

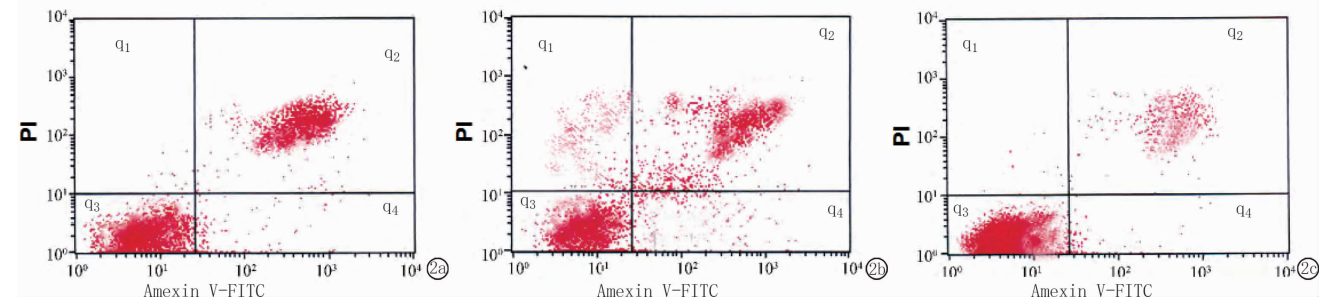
0.05), 说明保存 30 d 的红细胞上清对 Jurkat 细胞的增殖有一定促进作用, 且这种作用存在一定的时间依赖性。实验 A 组与对照组间生长抑制率相当 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 各组 Jurkat 细胞凋亡率比较 对照组、实验 A 组和实验 B 组在培养开始时 Jurkat 细胞凋亡率无明显差异 ($P > 0.05$); 培养 48 h 后实验 B 组凋亡率明显低于对照组 ($P < 0.05$), 而实验 A 组与对照组之间无显著性差异。说明保存时间为 30 d 的红细胞上清对 Jurkat 细胞的凋亡有抑制作用。见图 2、表 2。

表 1 不同保存时间红细胞上清对 Jurkat 细胞生长抑制率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h
对照组	3.28 ± 0.41	8.42 ± 0.73	9.16 ± 0.86
实验 A 组	3.15 ± 0.34	8.92 ± 0.88	9.81 ± 0.84
实验 B 组	3.32 ± 0.28	5.72 ± 0.76*	4.71 ± 0.54*
P 值	>0.05	<0.05	<0.05

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。



注: 2a: 对照组; 2b: 实验 A 组; 2c: 实验 B 组。q1 象限为坏死细胞, q2 为早期凋亡细胞, q3 为正常细胞, q4 为晚期凋亡细胞

图 2 不同保存时间红细胞上清对 Jurkat 细胞凋亡的影响

3 讨论

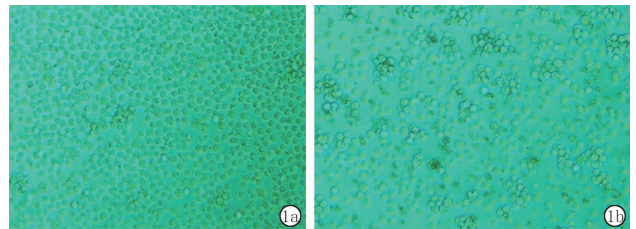
红细胞随着保存时间延长不可避免的会发生一系列细胞形态学改变和保存液中化学成分的变化, 细胞形态的变化主要是细胞膜结构的改变及部分红细胞变形能力下降^[6]。化学成分的变化主要有: ATP 和 2,3-二磷酸甘油酸 (2,3-DPG) 含量减少、乳酸堆积, K^+ 和 Na^+ 浓度增加, 一氧化氮 (NO) 减少及出现多种生物活性分子 (组胺、泛素、前列腺素 E 等), 各种细胞因子, 白介素 (IL)-6、IL-12、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 等^[7]。并且有学者研究证实保存末期的去白红细胞上清由于血小板衍生生长因子 (PDGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 浓度的蓄积可促进肿瘤细胞增殖^[8]。本研究发现陈旧去白红细胞上清对 Jurkat 细胞的增殖有促进作用, 对 Jurkat 细胞的凋亡有抑制作用, 具体是由红细胞上清中哪种成分引起这种现象有待进一步研究。

各种血液制品的输注是恶性血液病患者临床的

表 2 不同保存时间红细胞上清对 Jurkat 细胞凋亡率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	48 h
对照组	3.28 ± 0.41	10.12 ± 1.67
实验 A 组	3.15 ± 0.34	10.41 ± 1.45
实验 B 组	3.32 ± 0.38	6.71 ± 1.14*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。



注: 1a: 对照组; 1b: 实验 B 组。

图 1 Jurkat 细胞培养 48 h 的镜下形态 (20 ×)

重要辅助治疗措施, 无论是通过患者体内某些检测指标或者肿瘤模型的体外实验观察, 大量研究都证实了输注血液制品及其代谢产物可以直接导致恶性肿瘤复发、转移、进展、多器官衰竭甚至死亡等不良事件的发生^[9-14]。输血对恶性血液病患者体液及细胞免疫均有明显的抑制作用, 研究表明输血患者的自然杀伤 (NK) 细胞、T 细胞及 T 细胞亚群辅助性 T 细胞 (Th) 数量均有明显下降^[15], 此外长期多次同种异体输血后, 受血者体内往往会产生同种抗体, 导致免疫相关性溶血及红细胞输注无效, 达不到预期的治疗目的^[16-17]。对于肿瘤患者的输血治疗, 除应关注输血不良反应、无效输血、感染等, 目前已有学者开始注意这些血液制品所具有的生物酶活性和代谢产物对肿瘤微环境的影响。白血病是由于造血微环境的改变导致正常造血干祖细胞癌变为白血病干细胞而发病, 通过试验已经验证了人体组织微环境、造血微环境的改变是恶性肿瘤细胞发生、发展的基础。微环境的变化主要体现在局部的低氧分压、低 pH、铁离子超负

荷、硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 活性增加等, 并有可能导致基因结构改变、基因序列突变、表观遗传学改变和细胞信号通道的调节异常^[18-19]。基于以上所述结合本研究的结果, 建议对于恶性血液系统肿瘤患者进行限制性输血且尽量选择新鲜血液制品。

参考文献

[1] 庄远, 魏超, 张婷, 等. 悬浮红细胞上清中与肿瘤相关非细胞成分蓄积规律研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3): 812-816.

[2] 李丽玮, 李志强. 恶性肿瘤患者围术期输血与术后肿瘤复发机制研究新进展[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(9): 758-759.

[3] Vamvakas EC. Allogeneic blood transfusion and cancer recurrence: 20 years later[J]. Transfusion, 2014, 54(9): 2149-2153.

[4] Bloch EM, Busch MP, Lee TH, et al. Microchimerism in the transfused obstetric population[J]. Vox Sang, 2014, 107(4): 428-430.

[5] 魏超, 庄远, 汪德清. 红细胞保存时间与功能变化的研究进展[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(11): 1152-1155.

[6] Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(43): 17063-17068.

[7] Park HR, Jo SK, Paik SG. Factors effecting the Th2-like immune response after gamma-irradiation: low production of IL-12 heterodimer in antigen-presenting cells and small expression of the IL-12 receptor in T cells[J]. Int J Radiat Biol, 2005, 81(3): 221-231.

[8] 庄远, 张婷, 魏超, 等. 白细胞去除对悬浮红细胞上清中肿瘤相关因子蓄积改变及其对肿瘤细胞体外增殖影响的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(1): 217-221.

[9] Linder BJ, Frank I, Chevillie JC, et al. The impact of perioperative blood transfusion on cancer recurrence and survival following radical cystectomy[J]. Eur Urol, 2013, 63(5): 839-845.

[10] Edwards SL, Beesley J, French JD, et al. Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function[J]. Am J Hum Genet, 2013, 93(5): 779-797.

[11] Cozzi GD, Levinson RT, Toole H, et al. Blood type, ABO genetic variants, and ovarian cancer survival [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175119.

[12] Tang Q, Li J, Zhu H, et al. Hmgb1-IL-23-IL-17-IL-6-Stat3 axis promotes tumor growth in murine models of melanoma[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 713859.

[13] Amid A, Barrowman N, Vijenthira A, et al. Risk factors for hyperferitinemia secondary to red blood cell transfusions in pediatric cancer patients[J]. Pediatr Blood Cancer, 2013, 60(10): 1671-1675.

[14] Xue FS, Sun C, Li RP, et al. Regarding "The association of perioperative transfusion with 30-day morbidity and mortality in patients undergoing major vascular surgery" [J]. J Vasc Surg, 2016, 63(1): 298.

[15] 叶芳, 张莉萍. 输注红细胞对恶性血液病患者 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(5): 1577-1582.

[16] El Jellas K, Hoem D, Hagen KG, et al. Associations between ABO blood groups and pancreatic ductal adenocarcinoma: influence on resection status and survival [J]. Cancer Med, 2017, 6(7): 1531-1540.

[17] 唐求, 尹建平. 恶性肿瘤输血研究新进展[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(7): 850-855.

[18] Jawa RS, Young DH, Stothert JC, et al. Transfusion-associated graft versus host disease in the immunocompetent patient: an ongoing problem[J]. J Intensive Care Med, 2015, 30(3): 123-130.

[19] Reitman AJ, Coates TD, Freyer DR. Early cardiac iron overload in a child on treatment of acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatrics, 2015, 136(3): e697-e700.

收稿日期: 2017-10-16 编辑: 王国品