

體外利用誘導劑使急性前髓白血病細胞株(HL-60) 之分化作用

陳健民

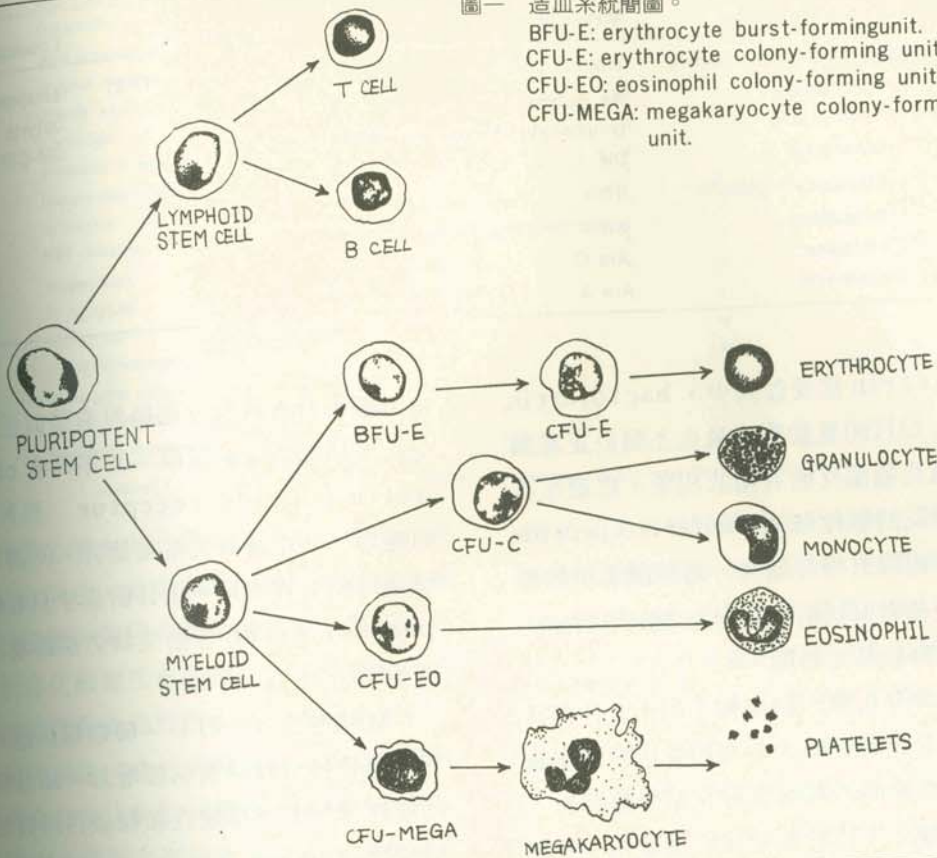
由於醫學科技的發達，血液學的發展也跟著邁更深層之研究，早期血球分化的母細胞(stem cell)是那種？是每種血球各自有母細胞？或由單一母細胞而分化成各種血球？等等很受當時專家學者的爭論，然而至今則較定論，血球的演化原來是由一多源化的母細胞先分化為淋巴系統與骨髓系統，淋巴系統則再分類為T和B細胞，而骨髓性系統則較複雜有紅血球系列，血小板系列及白血球系列等(參考圖一)從上述我們知道身體上的一些防禦系統就是由它們二大血球所來控制，因此若這二大系統的起源有受到某些因素的侵襲時，則體內的造血就可能產生變化，較嚴重者則是白血病，白血病目前依FAB的分類可從 $M_1 \sim M_7$ ，在臨床上的治療有化學療法，骨髓移植和目前尚在實驗階段的誘導劑促使白血病細胞分化與基因療法。

何謂分化？即在正常狀況下由母細胞分化為正常成熟的子細胞，白血病人則沒有這種能力，因此體內血球多半是未成熟的芽細胞，為了使這些芽細胞也能像正常血球一樣成熟分化，因此就利用體外誘導劑誘導的實驗，以證明這種分化能力。白血病細胞的分化於淋巴系與骨髓系都有體外試驗報告。以下簡介骨髓性白血病細胞分化，體外利用誘導劑促使白血病細胞之分化，大半是以培養成功的細胞株為模式，目前已知的骨髓性細胞株有KG-1a, KG-1, HL-60, ML-1æ3, U-937, THP-1, K562, HEL等，這些細胞株的分化情形可由表一加以瞭解：

為何骨髓芽細胞除了分化為顆粒球外尚可分化為吞噬球，由圖1，知道有相同的分化路徑，單核芽細胞則分化為單核球，至於這些體外分化的確實原因目前尚未很清楚，仍在研究中。

圖一 造血系統簡圖。

BFU-E: erythrocyte burst-forming unit.
CFU-E: erythrocyte colony-forming unit.
CFU-EO: eosinophil colony-forming unit.
CFU-MEGA: megakaryocyte colony-forming unit.



急性前髓白血病細胞株 (HL - 60) 是由一白人女性病人的血球分離成功的，由於這細胞株具有特異性，因此常被用為研究白血病因和細胞分化機轉之模型。因專家學者不斷的研究探討，目前已知體外誘導劑誘導HL - 60細胞株可分化為四種細胞形態，當與極化物，放線菌素，維生素A酸，L - 乙硫氨基酸等誘導反應後即能分化為成熟之顆粒球，另與維生素D₃，淋巴球條件培養液，分化誘導因子，r - 干擾素及細胞激素等誘導分化為單核球，phorbol-ester誘導為巨噬細胞，鹼性培養液與丁酸等誘導為嗜酸性球，丁酸鹽鈉和T淋巴球分化誘導因子，則誘導分化為嗜鹼性球（參考表1）。

經分化後的細胞與正常血球的形態、功能、酵素含量、細胞表面抗原大致相似：

(1)顆粒球：未誘導分化的HL - 60細胞主要是前髓細胞，與CMSO或維生素A酸等誘導劑反應後分化為顆粒球，基本上由實驗室測定與正常血球類似，但血球功能上仍有些缺

失，如分化後的血球多偏向matmyelocyte和band，segment反而較少，insulin

表一

種類	分化後的細胞	誘導劑
KG - 1	骨髓芽細胞 吞噬球	phorbol diesters
HL - 60	前髓細胞 顆粒球 吞噬球 嗜酸性球	許多種
ML - 1æ3	骨髓單核性芽細胞 吞噬球	phorbol diesters
u - ρ67	單核芽細胞 吞噬球	phorbol diesters
THP - 1	單核芽細胞 吞噬球	phorbol diesters
K - 562	前母紅血球 前母紅血球	butyrate
HEL	前母紅血球 前母紅血球	Hemin

表二

Induced Cell Type Monocyte				
	Granulocyte	Monocyte	Macrophagelike	Eosinophil
Inducing agents	polar-planer compounds retinoic acid actinomycin D hypoxanthine antithymocyte globulin 6-thioguanine L-ethionine tunicamycin	vitamin D ₃ Na Butyrate lymphocyte-conditioned media DIF IFN- γ tumor necrosis factor Ara C Ara A	phorbol esters (TPA) teleocidin	alkaline media butyric acid GM-CSF

和 transferrin 接受器減少，hactoferrin 不含有，LDH 的異狀酶含量也不同於正常顆粒球，過氧化氫酶反應有偏低現象，經維生素 A 酸誘導分化的顆粒球 chemotactic peptide receptor 也沒有增加趨勢，這些誘導後的顆粒球多具有參考與抗菌功能但在細胞增殖能力上則不能維持較長久時間。

雖然確實分化原因仍未知，但不管任何誘導劑在誘導分化時，至少要有約 12 小時的培養反應時間，然後隨時間增長分化結果愈好。

(2)單核球：不同於顆粒球的誘導劑，所誘導分化的單核球形態功能上也是與正常血液單核球一樣，雖然與顆粒球同樣有許多功能上的特徵，但形態上，特異性，NS 巨噬素，特異性細胞表面抗原及依賴抗體對細胞毒殺活性 (ADCC) 等實驗室檢查很快就可辨別是否為單核球。維生素 D₃ 和淋巴球條件培養液 (LCM) 是誘導為單核球的誘導劑，分化誘導因子 (DIF) 是從 LCM 和 T cell 條件培養液所純化出的也具有誘導分化為單核球的功能，干擾素、腫瘤壞死因子、淋巴毒素同樣是從淋巴條件培養液所純化成的，這些生物激素也都能促使 HL-60 細胞分化為單核球。單核球與顆粒球誘導分化間的一點差異是顆粒球須要再最後分化為更成熟細胞因此增殖能力時間長短就很重要，但單核球則否。

(3)巨噬細胞：HL-60 細胞與 phorbol ester 腫瘤促進物 (TPA) 反應後能產生類似巨噬細胞，這巨噬細胞與單核球經常是被混在一起，因在酵素作用、組織化學與功能測定上幾乎相同，但要區分是否巨噬細胞我們仍可由下述要點辨別出來(a)有強化的附著培養能力

。(b)經 TPA 誘導分化後沒有類似正常或誘導分化單核球的表面抗原。(c)不具有 chemotactic peptide receptor 與 NBT 還原能力。(d)迅速喪失增殖能力。(e)誘導分化的培養時間不須太長。(f)目前幾乎只有類似 phorbol ester 等衍生物方能誘導巨噬細胞產生。

(4)嗜酸性球：HL-60 細胞反應於酸性培養液內則嗜酸性球有明顯增加，這些被誘導的嗜酸性球皆具有嗜酸性顆粒蛋白的特性，包括嗜酸性球 major basic protein (MBP)，charcot-leyden crystal protein (CLC)，peroxidase acid phosphatase and arylsulfatase，雖然與正常嗜酸性球類似但仍有些組成稍微不同，如 chloroacetate esterase 和 PAS 染色，正常嗜酸性球都陰性而誘導分化的細胞則都陽性，CLC 和 arylsulfatase 較正常嗜酸性球來得低 (參考表 2)。

以上所敘述的是有關白血病細胞在各個不同誘導劑所誘導出的不同形態血球及功能上與正常血球間的差別，筆者也曾利用維生素 A 酸和淋巴條件培養嘗試對 HL-60 細胞的分化試驗，結果是有初步印證 HL-60 細胞的誘導分化作用，除了上述各種不同種類的合成誘導劑外，是否沒有其它相關的材料可取代？傳統中藥只是因無科學化，所以多不被醫界所接受，故為了使之科學化，因此由北醫藥科楊教授鼎力相助，供給了數百種中藥從中努力的測試，希望能有所突破。傳統中醫藥對治療白血病也是有它的療效，其法有 1. 針對邪毒所引起之解毒抗癌藥。2. 邪毒侵入臟腑經絡而產生氣

表三

Characteristic	Granulocyte				
	Uninduced		Monocyte	Macrophagelike	Eosinophil
Myeloperoxidase	+	↓	↓	↓	+
Eosinophil peroxidase	-				+
ASD chloroacetate esterase	+	+	±	↓	+
Nonspecific esterase	-	-	+	+	-
Acid phosphatase	+	↑	↑	↑↑	+
Biebrich scarlet	-	-		±	+
Plastic adherence	-	-	-	+	
Chemotaxis	-	+	+	-	
Chemotactic receptors	+	↑	↑	-	
Complement receptors	+	↑	↑	↑	
Lysozyme	+	↑		↑↑	
NBT reduction	-	+	+	-	
phagocytosis	-	+	+	+	
Fc receptors	+	↑	↑	↑	
Microbicidal	-	+		+	
Monocyte/macrophage surface antigens	±	±	+	+	
Granulocyte surface antigens	±	+	-	-	
Insulin receptors	+	↓	↑		
Transferrin receptors	+	↓		↓	

increase(↑) decrease(↓) preseat(+) absout(-) discrepant or equivocal literature findings(±)

滯血瘀所用之活血化瘀藥。3.一般慢性白血病常見之氣血兩虛，免疫力降低者則用益氣，補血劑之扶正療法即現今免疫增強劑，與現在治療白血病的化療療法有些相似。中國醫藥所謂之白血病認為係由毒邪所引起，而當毒邪侵入人體之臟腑經絡，會造成種種之氣滯血瘀即臨床所見白血病之症狀、發熱、骨痛、肝脾腫大、骨髓中未成熟之細胞急速增加，以及氣滯血瘀所造血液於經脈中不能循行而有出血現象，這種症狀描述與白血病人之臨床特徵幾乎一樣，只不過中藥在臨床上的療效較不被承認，有了症狀敘述和治療方法在理論上的一致，更可將我國傳統的中藥科學化使之走上正軌，也因此在這批中藥的實驗測試發現了一至二種以上的中藥具有對AL-60細胞誘導的功能，與本文內所提及的衆多誘導劑有同樣的分化作用產生，在這實驗我們是初步的利用中藥在不同濃度下與HL-60細胞經過了不同時間的培養後以血球功能上的特性有吞噬作用，NBT還原反應，細胞化學染色、細胞數、細胞存活率、補體反應和細胞表面抗原等試驗來測試，測試結果顯示中藥對HL-60細胞有明顯的分化成熟細胞形成，而證實了我們測試中藥之實驗成果，對於分化後成熟細胞與正常血球是否有各種不同的差異，則有待我們更深入的探討，由上述這實驗我們也可證明傳統中藥在實驗醫學的價值，確實是有必要將之科學化，由研究實驗數據，使它的理論有科學根據。

HL-60細胞除了供做誘導分化外，它也

提供了學者有關腫瘤基因，對正常血球與白血病細胞增殖和分化的探討，在誘導分化後有許多特異性細胞基因的突變都可由HL-60細胞上注意到。惡性細胞的演進是多階段式的，因此HL-60細胞對造血系統特異性腫瘤基因，分化顯示，提供了一個重要的研究目標，HL-60細胞誘導分化後特異性基因突變主要包括C-myc，N-ras和P53等，細胞性腫瘤基因。正常造血前驅細胞的分化與HL-60細胞分化雖然有些未明之處，但實際上二者間分化機制的差別是存在的，誠如上述的腫瘤基因於二者間分化後的細胞就有不同的變化存在，因此HL-60細胞將持續的被用做研究有關細胞腫瘤基因和這些基因在正常單核球、巨噬細胞、顆粒球上所扮演的生理角色。

參考資料：

1. The HL-60 Promyelocytic Penkemia cell Line :Proliferation , Differentiation , and Cellvln Oncogene Expression. Bood 70:5 P 1233-44 .

2. 體外利用誘導劑使白血病細胞分化的研究。 中華醫學 40:417-24.

3. 五靈脂誘導急性前髓白血病 (HL-60) 之分化作用。 癌症醫學 44,1 (正出版中)