

AMD3100 阻断 SDF-1/CXCR4 信号通路 对白血病细胞与成骨龕黏附 及耐药性的影响

沈照华 曾东风 邹仲敏 朱丽丹 马颖 张曦 张诚 李佳丽 孔佩艳

【摘要】 目的 探讨 CXCR4 阻断剂 AMD3100 对白血病细胞与成骨龕黏附的影响及逆转白血病细胞耐药的作用。方法 在生物衍生骨上接种白血病患者骨髓来源的间充质细胞,并诱导其分化为成骨细胞,构建一种仿生性的成骨龕,并用 ELISA 法检测培养上清中 SDF-1 的表达水平;然后在成骨龕中接种 FLT3-ITD 突变阳性的白血病细胞株 MV4-11 细胞,构建三维共培养体系,流式细胞术检测 CXCR4 的表达水平;在此共培养体系中加入 AMD3100 后,应用 BCECF 荧光标记测定白血病细胞的黏附率,流式细胞术分析阿糖胞苷(Ara-C)作用前后白血病细胞凋亡的变化。结果 ①白血病骨髓成骨细胞培养 7、14、21 d 上清中 SDF-1 含量分别为(304±18)、(410±28)和(396±16) pg/ml,第 14 天达高峰;MV4-11 细胞 CXCR4 表达水平为(72±16)%。②AMD3100 作用 24 h,成骨龕对 MV4-11 细胞黏附率为(40.1±8.1)%,而不加药物的对照组为(65.6±12.1)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。③加入 Ara-C 前,AMD3100 作用组细胞的凋亡率为(5.6±0.8)%,对照组为(2.5±0.5)%。加入 0.02、0.20、2.00 μg/ml Ara-C 后,AMD3100 作用组细胞凋亡率增加为(10.0±2.4)%、(17.8±2.3)%和(25.1±2.4)%,明显高于对照组[分别为(6.7±1.0)%、(10.3±1.5)%、(16.2±3.1)%](P 值均 <0.05)。结论 AMD3100 能够阻断骨髓成骨细胞龕和白血病细胞的相互作用,在逆转白血病细胞耐药中起重要作用。

【关键词】 成骨龕; SDF-1/CXCR4 信号通路; 三维培养; 抗药性

Effects of SDF-1/CXCR4 signal pathway blockade by AMD3100 on the adhesion of leukemia cells to osteoblast niche and the drug resistance of leukemia cells Shen Zhaohua*, Zeng Dongfeng, Zou Zhongmin, Zhu Lidan, Ma Ying, Zhang Xi, Zhang Cheng, Li Jiali, Kong Peiyan*. *Department of Hematology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China*
Corresponding author: Kong Peiyan, Email: peiyankong@aliyun.com

【Abstract】 Objective To study the blocking effect of CXCR4 inhibitor AMD3100 on the adhesion of leukemia cells to osteoblast niche, and the reversal of multidrug resistance in leukemia cells. **Methods** Mesenchymal stem cells (MSCs) from leukemia patients were planted on the bio-derived bone scaffolds and then induced into osteoblasts to establish the bio-osteoblast niche. The levels of SDF-1 were tested with ELISA. The leukemia cell line MV4-11 cells with FLT3-ITD mutation were inoculated into the bio-osteoblast niche to build a three-dimensional co-culture system. The expression level of CXCR4, adhesion and apoptosis rates of leukemia cells were observed by flow cytometry after incubation with AMD3100 and Ara-C for 24 h and 48 h. **Results** ① The supernatant levels of SDF-1 in cultured osteoblast were (304±18), (410±28) and (396±16) pg/ml on 7th, 14th and 21th day, respectively. It reached the highest on 14th day. The expression level of CXCR4 in cultured MV4-11 cells was (72±16)%. ② Adhesion rate of MV4-11 cells to osteoblast niche was (40.1±8.1)% after AMD3100 treatment for 24h, while that of control group was (65.6±12.1)% ($P<0.05$). ③ The apoptosis rate of MV4-11 cells incubated with AMD3100 for 24h was (5.6±0.8)%, while that of control group was (2.5±0.5)%. The apoptosis rates of AMD3100-induced MV4-11 cells were (10.0±2.4)%, (17.8±2.3)% and (25.1±2.4)% after treatment

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.05.013

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81000195)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科(沈照华、曾东风、朱丽丹、马颖、张曦、张诚、李佳丽、孔佩艳);第三军医大学预防医学毒理研究所(邹仲敏)

通信作者:孔佩艳,Email: peiyankong@aliyun.com

with Ara-C at 0.02, 0.20, 2.00mg/ml respectively and they were (6.7±1.0)%, (10.3±1.5)%, (16.2±3.1)% respectively in AMD3100- noninduced control group, the difference was significant ($P<0.05$).

Conclusion AMD3100 can block the interaction between osteoblasts niches and leukemia cells, and play an important role in the reversal of multidrug resistance in leukemia cells.

【Key words】 Endosteal niche; SDF-1 α /CXCR4 signaling pathway; Three-dimensional culture; Drug resistance

越来越多的证据表明急性髓系白血病(AML)的复发和耐药与骨髓微环境对白血病细胞的保护作用相关,但其确切的分子机制还远未阐明。白血病细胞可休眠于白血病细胞龕中^[1],躲避化疗药物的杀伤形成残留病灶,最终成为AML复发与难治的根源^[2-5]。这也是一些靶向白血病干细胞治疗疗效不佳的重要原因。因此深入研究白血病骨髓微环境黏附相关耐药的机制,可能为难治性AML的治疗提供新的思路和靶点。

近年来,研究者已开始一些通过干预白血病细胞和基质微环境相互作用以增强化疗药物杀伤,并发现基质细胞衍生因子-1及其受体CXCR4(SDF-1/CXCR4)信号通路在此过程中发挥了重要的作用。通过靶向阻断SDF-1/CXCR4信号通路,减少“成骨细胞龕”中静止期的白血病细胞,可能为清除微小残留病(MRD)、减少白血病复发提供重要思路。AMD3100作为CXCR4的特异性阻断剂,能否促进白血病细胞“失黏附”而达到增强其化疗敏感性、清除白血病MRD的目标是一个重要的研究课题。我们以往通过传统的二维培养体系的研究发现:应用小干扰RNA抑制骨髓基质细胞SDF-1表达,可使Jurkat细胞黏附减少,对阿霉素的敏感性增加^[4]。但此实验建立在二维共培养体系上,不能模拟微环境的复杂性。我们在体外以生物衍生骨为支架构建了三维培养体系来模拟成骨细胞龕^[5-6],并在建立白血病细胞-成骨细胞龕共培养体系的基础上,应用AMD3100阻断SDF-1/CXCR4轴后观察白血病细胞在基质层的黏附情况和凋亡的变化,以及白血病细胞对化疗药物敏感性的变化,以阐明阻断SDF-1/CXCR4轴对造血龕和白血病细胞生物学特性的影响,为通过改造骨髓龕功能而消除MRD和逆转白血病多药耐药的新治疗方法提供理论依据。

材料和方法

1. 主要材料、试剂和标本来源:人SDF-1 α 检测试剂盒购自上海百沃科贸有限公司,AMD3100、成人骨髓间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基(含 β -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸)为美国Sigma

公司产品,细胞凋亡检测试剂盒为美国BD Pharmingen公司产品,细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,PE标记抗人CD184(CXCR4)单克隆抗体为美国Biolegend公司产品,AML细胞株MV4-11细胞购自美国典型培养物保存中心(ATCC),流式细胞仪(FACStarplus型)为美国Becton Dickinson公司产品。生物衍生骨来源于重庆市第三军医大学附属西南医院骨科。8份初治AML患者(M₂)骨髓标本来自新桥医院血液科。标本获取均征得患者及家属的知情同意。

2. 骨髓间充质细胞分离培养:无菌条件下采集骨髓2ml,1:50肝素抗凝,用PBS液稀释后,缓慢加入Ficoll分离液(1.073 g/L),1800 r/min离心18 min(离心机半径13.5 cm),收集单个核细胞,用PBS液洗涤2次,弃上清,重悬于含10%FBS的DMEM/F12血清培养基中,按 $10^5\sim 10^6$ /ml的密度接种于25 cm²塑料培养瓶中,置于37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵育箱内培养,48 h后半量换液,以后每3~4 d全量换液。第2代细胞换用成骨细胞培养液,培养2周后,行ALP染色及茜素红染色,以鉴定成骨细胞。

3. 成骨细胞龕培养体系的建立:参考黄晓兵等^[7]的方法制作生物衍生骨。截取人长骨干髓端松质骨,劈成5 mm×5 mm×1 mm大小骨块。经过脱细胞、脱脂肪、脱蛋白等处理,环氧乙烷气体熏蒸灭菌后,分装于无菌的塑料袋中密封保存。使用前紫外线照射30 min,24孔板每孔接种一块生物衍生骨,PBS液浸泡2 d,无血清DMEM/F12培养液浸泡3 d后去培养液,加少量胎牛血清浸润骨块,37℃孵育2 h。将体外培养的成骨细胞调整为 2×10^6 /ml的细胞悬液,每块骨接种细胞悬液60 μ l,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下静置4 h,待细胞与生物衍生骨充分黏附后加成骨细胞培养基940 μ l,使培养液覆盖过骨块。用PBS液洗去未黏附细胞;以3%的戊二醛4℃条件下固定24 h;PBS液浸洗,1%锇酸室温固定,PBS液漂洗;分别用50%、70%、90%的乙醇系列梯度脱水;室温条件下用醋酸异戊酯置换2 h,液态CO₂临界点干燥,离子溅射镀膜机喷镀金属;AMARY1000B型扫描电镜观察并照相。由于骨片

是立体结构,而且同一骨片上的细胞分布不均,所以我们通过在扫描电镜下随机选取10个视野来检测细胞数目。取三维培养体系培养7、14、21 d的上清,ELISA法检测成骨细胞体系SDF-1表达。

4. 白血病细胞表面CXCR4表达水平测定:单独培养的白血病细胞采用流式细胞术检测CXCR4水平。白血病细胞用PBS液(加0.5% BSA)洗涤3次,然后用PBS液稀释至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取25 μl (细胞数为 $2.5 \times 10^4/\text{ml}$)转移至5 ml试管行抗体封闭,分别加入PE标记的抗人CXCR4单克隆抗体及阴性对照单克隆抗体各5 μl ,低温避光反应30 min,用PBS液洗涤2次后上机测定。以CXCR4表达阳性细胞百分率表示CXCR4表达水平。

5. 共培养体系的建立:成骨龛建立后,MV4-11细胞以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度接种于成骨龛支架上,扫描电镜下观察共培养细胞生长情况。

6. AMD3100对白血病细胞黏附的影响:实验设对照组及实验组,对照组只加入培养液,实验组中加入10 mmol/L AMD3100。每组实验均设3个复孔。

把预先BCECF-AM荧光标记30 min的白血病细胞接种于基质细胞中,孵育3 h后,用培养液冲洗去除未黏附的白血病细胞,用相同量的胰酶消化各组贴壁和黏附的细胞,荧光显微镜下观察细胞并用酶标仪检测标记消化细胞的荧光强度。由于贴壁的成骨细胞无荧光,所以检测消化的混合细胞的荧光强度主要是黏附的白血病细胞的荧光强度。

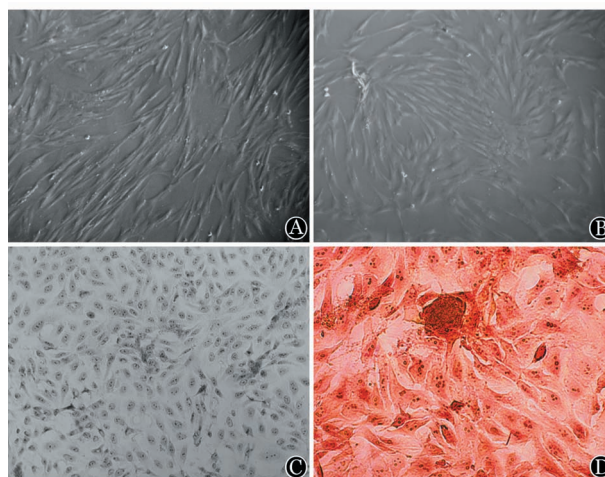
7. AMD3100对细胞凋亡的影响:实验分组同上,各组培养24 h后,加入阿糖胞苷(0.02、0.20、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用24 h。收集白血病细胞(用吸管取出三维共培养体系中未贴壁的白血病细胞,对于贴到成骨龛中的白血病细胞,用0.125%的胰酶消化后重新贴壁,3 h后收集未贴壁的细胞进行检测),调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,先后加入Annexin V-FITC和PI,避光反应5 min。上流式细胞仪进行检测,采用Cell Quest软件对检测数据进行分析

8. 统计学处理:实验结果以均数 \pm 标准差表示,以SPSS 10.0软件进行统计学分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 间充质细胞培养、成骨分化及鉴定:白血病患者骨髓间充质细胞呈成纤维细胞外观。经成骨细胞诱导液诱导后细胞逐渐变为短梭形或不规则

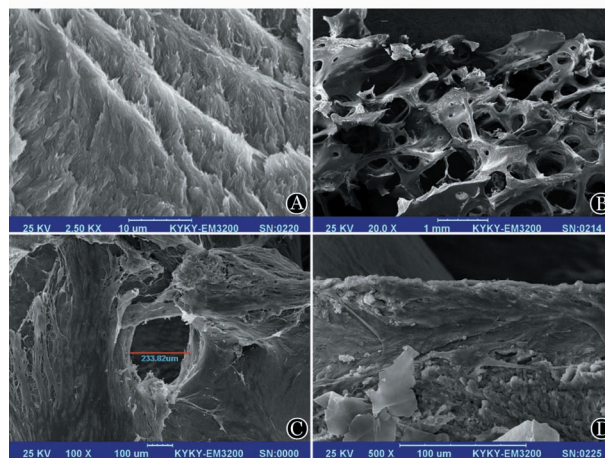
形。ALP染色阳性率90%以上,阳性细胞质呈灰黑色,茜素红染色呈现广泛的橙红色,证实了培养的细胞为成骨细胞(图1)。



A: 间充质细胞形态($\times 200$); B: 成骨细胞形态($\times 200$); C: 碱性磷酸酶染色,大部分呈阳性反应,证实为成骨细胞($\times 200$); D: 茜素红染色呈现广泛的橙红色,证实为成骨细胞($\times 400$)

图1 间充质细胞及成骨细胞培养及鉴定

2. 成骨龛的建立及SDF-1 α 表达的检测:扫描电镜下观察复合培养的情况,空支架显示了相互连接的网格(孔径200~300 μm),基质细胞在支架材料上5~6 h具有基本的伸展能力,12~24 h后细胞呈梭形。7 d后细胞呈多层生长,伸出伪足,紧密黏附在支架上,并可见到基质细胞分泌的基质(图2)。



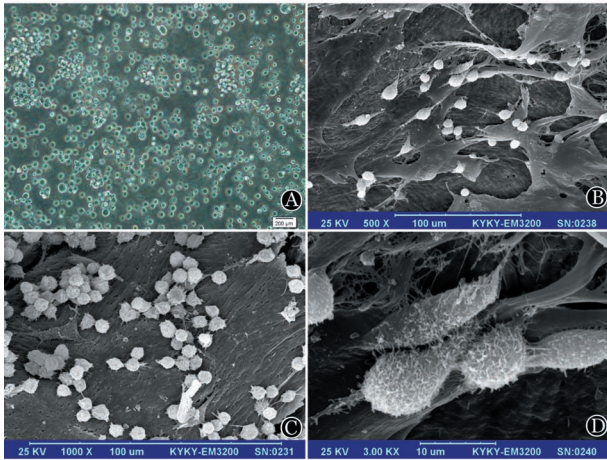
A、B: 生物衍生骨形态; C: 生物衍生骨的孔径; D: 成骨细胞接种于生物衍生骨

图2 扫描电镜下观察成骨龛形态

第7、14、21天时细胞培养上清SDF-1水平分别为(304 ± 18)、(410 ± 28)、(396 ± 16) pg/ml ,在人间充质干细胞中水平较低,在诱导的成骨细胞中表达增

强,在第 14 天达到高峰。以后 SDF-1 处于平稳水平并有下降的趋势。

3. 共培养体系的建立及 MV4-11 细胞 CXCR4 的表达:接种白血病细胞后,白血病细胞通过伪足黏附在成骨细胞上(图 3)。CXCR4 的表达水平为(72±16)%。

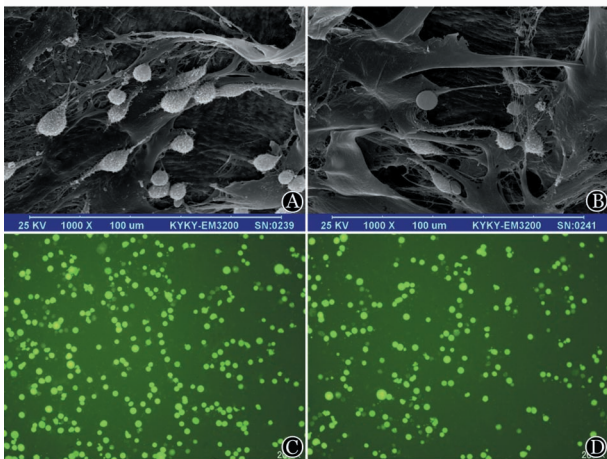


A: MV4-11 细胞的形态(×200); B~D: 成骨龕支架与白血病细胞共培养

图 3 扫描电镜下观察生物衍生骨成骨龕和白血病细胞共培养体系

4. AMD3100 对白血病细胞与成骨龕黏附的影响:扫描电镜下观察示实验组黏附细胞较对照组明显减少。BCECF-AM 荧光标记白血病细胞后检测显示,对照组黏附率为(65.6±12.1)%,实验组黏附率为(40.1±8.1)%,实验组白血病骨髓基质细胞对白血病细胞的黏附率显著降低($P<0.05$)(图 4)。

5. AMD3100 对成骨龕中白血病细胞凋亡及化



扫描电镜观察 AMD3100 作用前(A)后(B)白血病细胞黏附支架的状态;荧光显微镜观察 AMD3100 作用前(C)后(D)BCECF-AM 标记白血病细胞黏附支架的状态(×200)

图 4 AMD3100 加入前后白血病骨髓基质细胞对白血病细胞黏附的变化

表 1 AMD3100 对不同浓度的阿糖胞苷作用 24 h 后成骨龕中白血病细胞凋亡率的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	阿糖胞苷浓度(μg/ml)			
		0	0.02	0.20	2.00
对照组	4	2.5±0.5	6.7±1.0	10.3±1.5	16.2±3.1
实验组	4	5.6±0.8 ^a	10.0±2.4 ^a	17.8±2.3 ^a	25.1±2.4 ^a

注:实验组:加入 10 mmol/L AMD3100;与对照组相比,^a $P<0.05$

疗敏感性的影响:如表 1 所示,加入 AM3100 可增加成骨龕中白血病细胞的凋亡率,并明显增强化疗药物对白血病细胞的诱导凋亡作用。

讨 论

1978 年 Schofield 提出了造血龕的概念^[8]。造血龕主要由基质细胞、细胞因子和细胞外基质构成。根据其功能分为成骨龕和血管龕两种。成骨细胞及内皮细胞是造血微环境的重要组成部分。成骨细胞是由间充质干细胞分化而来的^[9],是主要的骨形成细胞,在成骨龕中起着重要的作用。成骨龕不但是造血干细胞定植的主要场所,也是白血病细胞特别是白血病干细胞定植、增殖、躲避理化因素杀伤的“避难所”,并最终导致原发耐药的形成和复发^[3],因此认为白血病微环境是一个介导耐药的关键因素。

耐药可能通过可溶性生长因子的释放或者通过细胞间和细胞与细胞外基质的相互作用介导。细胞黏附介导的耐药(CAMDR)指的是恶性细胞和基质的相互作用引起的化疗耐药。在 AML 中,骨髓微环境是化疗后 MRD 灶的主要集聚地^[10]。研究发现,CAMDR 部分是由 SDF-1/CXCR4 介导的。SDF-1/CXCR4 轴在表达 CXCR4 的白血病细胞等的迁移定位中发挥重要作用^[11]。AML 细胞表面高表达 CXCR4 可增强骨髓基质对白血病细胞的保护作用,并且预示着不良的预后^[12]。AMD3100 能够阻断 SDF-1 与 CXCR4 的结合,抑制 SDF-1 介导的钙离子动员、趋化和 GTP 的结合。既往的研究结果表明 AMD3100 能通过竞争与 CXCR4 的位点结合,阻断 SDF-1/CXCR4 轴的功能,干扰白血病细胞赖以生长的微环境,将白血病细胞动员到外周循环中,从而增加白血病细胞对化疗药物的敏感性,促进白血病细胞的凋亡^[13]。

目前对于成骨龕的研究主要集中在二维的接触或非接触共培养体系中,然而细胞在支架上的空间分布可以更好地模拟复杂的机体微环境,因此近

年三维培养体系已越来越受到人们的重视。在本研究中,我们把白血病基质细胞进行成骨诱导后接种在支架材料上构建白血病成骨细胞龕,然后接种白血病细胞进行三维模拟病态的微环境。白血病细胞能在模拟造血龕中生长增殖,均匀分布并向材料内部生长,与材料复合紧密,生长状态良好。实验所用的材料细胞毒性低,可供基质细胞黏附生长,具有良好的细胞相容性。这种支架具有高孔隙度和合适的孔隙大小,有利于细胞吸收氧气和营养物质,能够促进细胞黏附、分化和增殖。在细胞培养第 14 天时,细胞数量达到了最大值,可能是由于细胞占据了所有可利用的空间。光镜及扫描电镜观察可见白血病细胞黏附于骨髓基质生长,并逐渐嵌入骨髓基质层,基质细胞层包裹白血病细胞形成“shelter”(庇护所)样结构,促使白血病细胞滞留在静止期,从而屏蔽化疗药物的杀伤作用。而在加入 AMD3100 后,比较实验组和对照组的细胞黏附和凋亡,结果显示,实验组黏附率较对照组低,表明 AMD3100 促进了白血病细胞“失黏附”,凋亡细胞比例也高于对照组,表明阻断 SDF-1 和 CXCR4 生物活性后,静止期细胞脱离成骨龕,同时伴随细胞凋亡增加。而在含 AMD3100 的实验组中加入周期特异性化疗药物 Ara-C,可杀伤更多的白血病细胞,说明 AMD3100 的使用可增强化疗药物对白血病细胞的杀伤作用,增强化疗的敏感性。此外,成骨龕的庇护作用还有其他机制的参与,仍待进一步研究。另外,AMD3100 对于白血病细胞周期的影响也是下一步研究的重点。

总之,白血病成骨龕为白血病细胞的生存提供了一个保护性的微环境,并能屏蔽化疗药物 Ara-C 对白血病细胞的杀伤作用,而干预这种保护作用能够克服其介导的白血病耐药。AMD3100 能够通过阻断 SDF-1/CXCR4 轴的作用动员白血病细胞,改变髓内白血病细胞的生物学特性,促进凋亡,减少骨髓基质对髓内白血病细胞的屏障作用,有助于清除残留白血病和减少复发,可能在难治性白血病治疗中具有重要应用前景,需要进一步进行动物和临床试验加以证实。

参考文献

- [1] Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (11): 1315-1321.
- [2] Krause DS, Van Etten RA. Right on target: eradicating leukemic stem cells[J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(11):470-481.
- [3] Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells[J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(17):17-19.
- [4] 杨文博, 孔佩艳, 常城, 等. 特异性 RNA 干扰抑制骨髓基质细胞 SDF-1 表达对 Jurkat 细胞黏附及药物敏感性的影响[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(8):458-460.
- [5] de Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR, et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9093.
- [6] Pallotta I, Lovett M, Rice W, et al. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12):e8359.
- [7] 黄晓兵, 刘霆, 孟文彤, 等. 骨髓间充质干细胞诱导成骨细胞模拟造血龕支持造血干/祖细胞增殖[J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(12):795-800.
- [8] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell [J]. *Blood Cell*, 1978, 4(1):7-25.
- [9] Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7308):829-834.
- [10] Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9):2519-2526.
- [11] Juarez J, Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(1): 299-309.
- [12] Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG, et al. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(2):786-791.
- [13] Zhang Y, Patel S, Abdelouhab H, et al. CXCR4 inhibitors selectively eliminate CXCR4-expressing human acute myeloid leukemia cells in NOG mouse model[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3:e396.

(收稿日期:2014-10-04)

(本文编辑:王叶青)