·论著·

CXCR4/STAT3在骨髓基质细胞介导的急性髓系白血病耐药中的作用研究

汤颖俊 郭青 智亚琴 晋鑫 夏冰 郭姗琦 田晨 张翼鹭

【摘要】 **目的** 探讨CXCR4/STAT3在骨髓基质细胞介导的急性髓系白血病(AML)细胞耐药中的作用。**方法** 将AML细胞系U937、KG1a和原代AML细胞与健康供者来源的骨髓基质细胞共培养,单独培养的细胞作为对照组。通过膜联蛋白Ⅴ(Annexin Ⅴ)/碘化丙锭(PI)双染色法比较共培养前后AML细胞对米托蒽醌诱导的凋亡的差异,并通过流式细胞术、实时定量PCR及Western blot法检测共培养前后AML细胞CXCR4、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白的表达;在培养体系中加入STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ或CXCR4拮抗剂AMD3100,检测AML细胞对米托蒽醌诱导的凋亡的变化,并观察AMD3100对p-STAT3表达的影响。**结果** U937、KG1a细胞与骨髓基质细胞共培养后,对米托蒽醌诱导的凋亡率均低于对照组[U937:(20.08±1.53)%对(45.33±1.03)%,*P*=0.004;KG1a:(25.60±1.82)%对(40.33±3.29)%,*P*=0.003]。共培养后,Western blot方法检测发现AML细胞p-STAT3的蛋白表达明显上调,流式细胞术和Western blot检测结果显示CXCR4蛋白表达显著上调,实时定量PCR检测显示CXCR4 mRNA水平明显增高;STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ或CXCR4拮抗剂AMD3100加入共培养体系后,原代AML细胞对米托蒽醌诱导的凋亡率较对照组显著升高,差异均有统计学意义(*P*值均<0.05),且加入AMD3100后AML细胞p-STAT3蛋白的表达显著下降。**结论** AML细胞与骨髓基质细胞共培养可导致p-STAT3、CXCR4蛋白表达的上调,从而导致AML细胞对化疗药物的耐药;针对STAT3、CXCR4的联合靶向治疗可能为AML的治疗提供新思路。

【关键词】 白血病,髓样,急性; CXCR4; STAT3; 间充质干细胞; 耐药

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划(13JCYBJC22800);国家自然科学基金(30672208、81270603、31301161)

Role of CXCR4/STAT3 in mesenchymal stromal cell-mediated drug resistance of acute leukemia cells

Tang Yingjun, Guo Qing, Zhi Yaqin, Jin Xin, Xia Bing, Guo Shanqi, Tian Chen, Zhang Yizhuo. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center For Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

Corresponding author: Zhang Yizhuo, Email: yizhuozhang111@163.com

【**Abstract**】 **Objective** To explore the role of CXCR4/STAT3 in mesenchymal stromal cell (MSC)-mediated drug resistance of AML cells. **Methods** AML cell lines U937 and KG1a and primary AML cells were co-cultured with MSC from bone marrow of healthy donors. The AML cell lines cultured alone were used as control. Apoptosis induced by mitoxantrone was measured by flow cytometry. Expression of CXCR4 and STAT3 protein were detected by Western blot. After incubated with STAT3 inhibitor Cucurbitacin Ⅰ or CXCR4 antagonist AMD3100, the apoptosis of AML cells induced by mitoxantrone was evaluated. **Results** Apoptosis of AML cells (U937 and KG1a) and primary AML cells induced by mitoxantrone significantly decreasedin cocultured group than that of control group [U937 cells: (20.08±1.53)% *vs* (45.33±1.03)%, *P*=0.004; KG1a cells: (25.60±1.82)% *vs* (40.33±3.29)%, *P*=0.020]. Expression of phosphorylated STAT3 and CXCR4 protein in AML cells were upregulated in cocultured group. After addition of Cucurbitacin Ⅰ into the co-culture system, the apoptosis rate of primary AML cells significantly increased. Similar results of the apoptosis rates were also detected when the inhibitor of CXCR4 AMD3100 was added to overcome the stromal cell-mediated drug resistance. Besides, the expression of p-STAT3 in AML cells after incubated with AMD3100 decreased significantly. **Conclusions** AML cells cocultured with MSC leads to the up-regulation of phosphorylated STAT3 and CXCR4 proteins,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.007

作者单位:300060 天津医科大学肿瘤医院血液科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市"肿瘤防治"重点实验室

通信作者:张翼鹭,Email:yizhuozhang111@163.com

which resulted in AML cells resistance to chemotherapeutic drugs. Therefore targeting STAT3 or CXCR4 could be a new therapeutic strategy of AML.

【**Key words**】 Leukemia, myeloid, acute; CXCR4; STAT3; Mesenchymal stromal cell; Drug resistance

Fund program:Tianjin Municipal Science and Technology Commission(13JCYBJC22800); National Natural Science Foundation of China(30672208、81270603、31301161)

急性髓系白血病(AML)是髓系原始细胞恶性增殖性疾病。虽然多数患者经诱导化疗可达到完全缓解,但大部分患者会复发或转为难治性白血病。文献报道骨髓造血微环境为AML细胞提供了“庇护所”,保护细胞免受化疗药物的杀伤[1-3]。趋化因子受体CXCR4表达于造血干细胞,与其配体基质细胞衍生因子-1[SDF-1,由骨髓基质细胞(MSC)分泌]结合,介导造血干细胞的增殖、黏附、迁移和归巢。研究发现SDF-1/CXCR4轴是介导骨髓微环境和造血细胞发育的关键枢纽[4-5]。造血肿瘤细胞同样表达CXCR4,活化后可进一步激活JAK-STAT3信号通路,并介导肿瘤细胞与骨髓微环境之间的相互作用,从而参与白血病等血液系统恶性肿瘤的发病[6-7]。我们实验室前期的研究结果证实在高危骨髓增生异常综合征(MDS)存在JAK2-STAT3信号通路的过度活化[8]。但在AML中CXCR4和STAT3与骨髓微环境关系的研究目前尚少见报道。在本研究中,我们检测AML细胞与MSC共培养后磷酸化STAT3(p-STAT3)和CXCR4蛋白表达的变化,初步探讨两者在MSC介导的AML细胞对化疗药物耐药中的作用。

材料与方法

1. MSC的分离和培养:骨髓样本取自5名健康供者,年龄20~40岁,男3名,女2名,各取骨髓3 ml,Ficoll法分离单个核细胞,培养于含10% FBS的DMEM培养基,方法参见文献[1]。本研究获我院伦理委员会批准及供者的知情同意。

2. 白血病细胞系的培养:U937和KG1a细胞培养于含10% FBS的RPMI 1640培养基,置于37 ℃、5%的CO_2培养箱中,饱和湿度下培养,取对数生长期的细胞用于实验。

3. 原代白血病细胞的培养:骨髓标本取自我院血液科23例初治AML患者,男15例,女8例;中位年龄为43(17~54)岁。患者均知情同意。用Ficoll分离液通过密度离心法从患者的骨髓液中分离单个核细胞,标记CD33抗体(德国美天尼公司产品)后通过免疫磁珠法获得$CD33^+$ AML细胞。

4. 白血病细胞与MSC共培养体系的建立:在6孔培养板中每孔加入1×10^5/ml的MSC,加入经药物处理或非药物处理的5×10^5/ml的U937或KG1a细胞或原代AML细胞,并加入含10% FBS的RPMI 1640培养液继续培养。

5. 细胞的药物处理:实验共分为4组:单独培养组、与MSC共培养组、单独培养加化疗药物组、与MSC共培养加化疗药物组。实验设3个复孔,重复3次。化疗药物为米托蒽醌,浓度为0.5 μg/ml,加入后48 h收集细胞检测凋亡率;为探讨CXCR4/STAT3对MSC介导的AML细胞耐药的影响,另外以STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ(100 nmol/L)或CXCR4拮抗剂AMD3100(美国Sigma公司产品)处理AML细胞,以未加Cucurbitacin Ⅰ或AMD3100组作为对照。

6. 流式细胞术检测CXCR4表达及细胞凋亡率:收集单独培养、共培养组细胞,采用CXCR4抗体(美国BD Pharmingen公司产品)染色,并用流式细胞仪检测细胞表面CXCR4的表达率。收集单独培养组、共培养组、单独培养加药组和共培养加药组细胞,采用膜联蛋白Ⅴ(Annexin Ⅴ)/碘化丙锭(PI)(美国BD Pharmingen公司产品)双重染色,并用流式细胞仪检测细胞凋亡率,具体方法详见文献[7-8]。

7. 实时定量RT-PCR检测CXCR4 mRNA的表达:TRIzol法抽提细胞总RNA,逆转录后行实时定量PCR检测。PCR条件为94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸,循环40次。CXCR4引物序列:上游5′-AAACTGAGAAGCATGACGGACAA-3′,下游5′-GCCAACATAGACCACCTTTTC AG-3′。以β-肌动蛋白为内参,引物序列:上游5′-GACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′,下游5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′。

8. Western blot法检测CXCR4蛋白和p-STAT3蛋白的表达水平:收集共培养前后的AML细胞,提取细胞内总蛋白,以β-肌动蛋白为内参;BCA法(试剂盒购自美国Pierce Chemical公司)测定蛋白浓度,

取50 μg总蛋白进行电泳、转膜、封闭，加入兔抗人CXCR4抗体或p-STAT3抗体（美国ABCAM公司产品），4 ℃过夜，洗涤后加辣根过氧化物酶标记的二抗，37 ℃下孵育2 h，充分洗涤后加入ECL发光试剂，在X线胶片上曝光、显影，最后进行图片扫描。

9. 统计学处理：应用SPSS17.0软件及GraphPad5.0软件进行统计学分析，两组间比较采用*t*检验，以*P*<0.05为差异有统计学意义。

结　果

1. AML细胞系U937和KG1a与MSC共培养前后对米托蒽醌诱导的凋亡率的差异：U937、KG1a细胞与MSC共培养组的细胞凋亡率为（7.02±1.53）%和（9.16%±1.82）%，明显低于单独培养组的（18.13±1.43）%和（15.24±2.24）%。加入米托蒽醌后，U937、KG1a细胞与MSC共培养组的细胞凋亡率分别为（20.08±1.53）%和（25.60±1.82）%，明显低于单独培养组的（45.33±1.03）%和（40.33±3.29）%，差异均有统计学意义（*P*值分别为0.040和0.003），表明MSC可以保护AML细胞，降低化疗药物诱导的凋亡率。

2. AML细胞与MSC共培养前后p-STAT3蛋白表达的差异：采用Western blot法检测共培养前后AML细胞p-STAT3蛋白的表达水平。结果显示，共培养组p-STAT3蛋白的表达水平高于单独培养组（图1），表明AML细胞与MSC黏附后p-STAT3的表达显著上调。

3. STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ对MSC介导的AML细胞耐药的影响：在两种培养体系中加入STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ（100 nmol/L）后，单独培养组和共培养组对米托蒽醌诱导的凋亡率均显著高于不加Cucurbitacin Ⅰ组（图2），表明STAT3的特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ通过抑制STAT3的活性克服MSC介导的耐药，增加

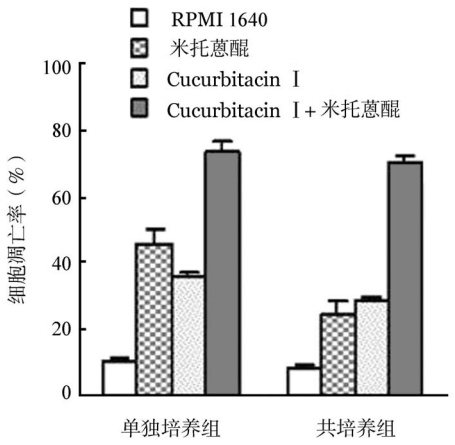


图2 流式细胞术检测加入Cucurbitacin Ⅰ后各组原代AML细胞对米托蒽醌诱导的细胞凋亡情况（实验重复3次）

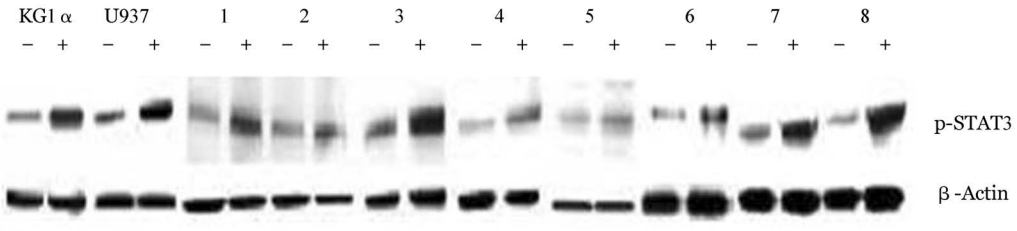
AML细胞对米托蒽醌的敏感性。

4. AML细胞与MSC共培养后CXCR4蛋白及mRNA表达的变化：采用流式细胞术、实时荧光定量PCR及Western blot法检测AML细胞CXCR4的表达水平。结果显示，共培养组CXCR4 mRNA及蛋白的表达水平高于单独培养组（图3、4）。表明AML细胞与MSC黏附后CXCR4的表达显著上调。

5. CXCR4拮抗剂AMD3100对MSC介导的AML细胞耐药的影响：原代AML细胞与MSC共培养后，对米托蒽醌诱导的凋亡率较单独培养组显著下降，证实了MSC可介导AML细胞对化疗药物米托蒽醌的耐药。而加入CXCR4拮抗剂AMD3100后，可促进AML细胞的凋亡（图5），表明以CXCR4拮抗剂AMD3100抑制CXCR4活性，可克服MSC介导的耐药，促进AML细胞的凋亡，并伴随磷酸化STAT3的下调（图6）。

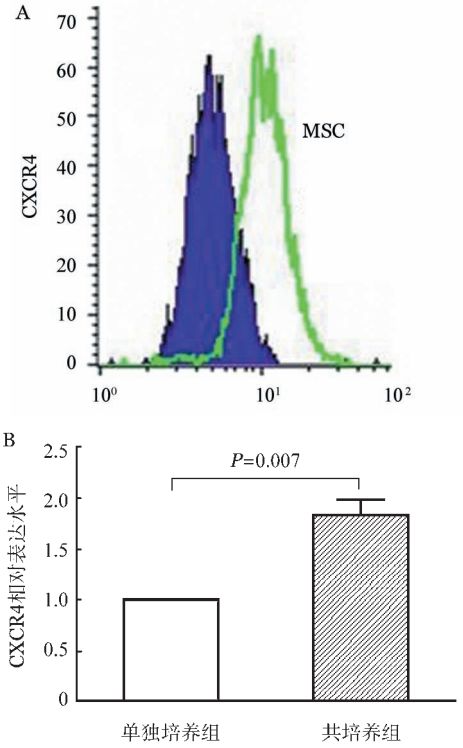
讨　论

白血病细胞与骨髓微环境之间的相互作用是AML疾病进展和治疗耐药的关键所在[2]。白血病



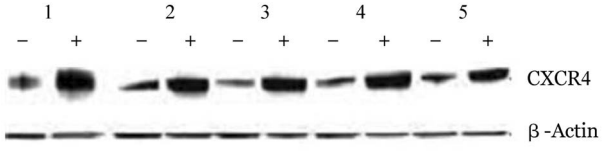
−：单独培养组；+：与MSC共培养组；1~8：8例患者的原代AML细胞

图1 Western blot法检测与骨髓基质细胞（MSC）共培养前后急性髓系白血病（AML）细胞p-STAT3蛋白表达



A：流式细胞术检测U937细胞与骨髓基质细胞（MSC）共培养组中CXCR4的表达显著高于U937细胞单独培养组（$P<0.05$）；B：实时定量PCR方法检测U937细胞与MSC共培养组CXCR4 mRNA表达显著高于U937细胞单独培养组（$P=0.007$）

图3　流式细胞术、实时定量PCR检测两种培养条件下U937细胞CXCR4表达



−：单独培养组；+：与骨髓基质细胞共培养组；1~5：5例患者的原代AML细胞

图4　Western blot法检测两种培养条件下原代急性髓系白血病（AML）细胞CXCR4蛋白表达

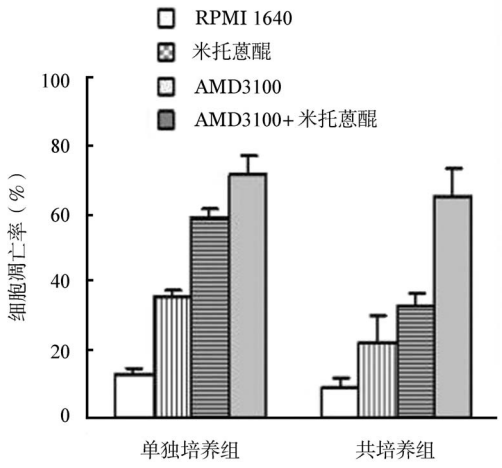
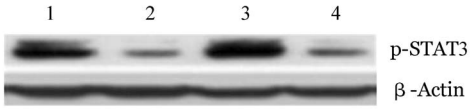


图5　流式细胞术检测两种培养体系中加入AMD3100后原代急性髓系白血病细胞对米托蒽醌诱导的凋亡情况



1：单独培养组；2：单独培养组+ AMD3100；3：共培养组；4：共培养组+ AMD3100

图6　Western blot法检测两种培养体系中加入CXCR4拮抗剂AMD3100后原代急性髓系白血病细胞p-STAT3蛋白表达

干细胞（LSC）与基质细胞共培养后，可以促进LSC的自我更新、增殖、分化停滞[3]，并“保护”白血病细胞免受化疗药物的毒性作用，这种耐药模式的形成是初始治疗后形成微小残留病（MRD）的主要原因。MRD经历了复杂的耐药机制从初始治疗中“幸存”下来，最终导致疾病进展，难以治愈。因此深入探索AML的发病机制，特别是AML细胞与骨髓微环境之间相互作用的分子机制，深化对骨髓微环境诱导的耐药机制的理解，不仅具有重要的理论意义，而且可为此类疾病的治疗提供新的思路和策略。

STAT3属于STAT蛋白家族的一员，是许多细胞因子和生长因子受体中重要的信号分子，它在许多人类的肿瘤细胞中持续激活[9-10]。CXCR4是SDF-1的特异性受体，在AML细胞中高表达，且与AML的发生、进展及预后密切相关[11-14]。SDF-1与CXCR4结合后可激活非受体酪氨酸激酶JAK2、JAK3，从而活化JAK-STAT3信号通路。JAK2-STAT3及其调控的抗凋亡蛋白BCL-2和BCL-xl在白血病细胞的存活中发挥作用。STAT3还被证实与抗凋亡和肿瘤血管生成密切相关[15-16]。

我们在研究中发现与MSC共培养后，白血病细胞系U937、KG1a和原代AML细胞对化疗药物米托蒽醌诱导的凋亡与单独培养组相比均显著下降，证实了与MSC黏附后AML细胞受到了骨髓微环境的“保护”，从而对化疗药物产生了耐药性；而同时，我们也检测到共培养后AML细胞表达p-STAT3、CXCR4蛋白的水平显著提高。加入特异性抑制剂Cucurbitacin Ⅰ阻断STAT3或AMD3100阻断CXCR4后，发现两种培养体系下AML细胞的凋亡率均升高，且AMD3100阻断CXCR4表达后还诱导

p-STAT3的下调，说明CXCR4的下调可进一步调控p-STAT3的表达，从而证实SDF-1/CXCR4轴的激活可调控下游的信号通路如JAK2/STAT3，进一步调控AML细胞的增殖、分化及凋亡[17]。当然基质细胞对AML细胞耐药的影响是复杂、多因素的，我们的结果证实CXCR4、p-STAT3蛋白在此过程中发挥了一定作用，更深入的作用机制正在进一步研究。

本研究尚存在一定局限性。实验中的MSC是正常供者来源，而非同一患者来源，并不能完全反映白血病患者体内的真实情况，主要原因如下：①现有文献报道中淋巴瘤、高危MDS中肿瘤细胞与基质细胞的相互作用，使用的基质细胞都是正常供者来源，而非患者来源[18]；②从同一患者中提取骨髓同时培养基质细胞和原代白血病细胞所需的细胞量很大，患者不能耐受；③在我们的实验中使用了白血病细胞系U937、KG1a和骨髓原代白血病细胞，在共培养体系中统一使用正常供者来源基质细胞，以避免不同患者来源基质细胞异质性大的问题。此外，在本实验中我们使用的是接触共培养体系，因我们的前期实验和文献均表明肿瘤细胞必须与基质细胞直接接触才能有相互作用[19]。

总之，我们研究发现AML细胞黏附于MSC后，可上调CXCR4的表达，活化STAT3，从而使AML对化疗药物诱导的凋亡减低。阻断CXCR4或STAT3表达可部分逆转AML对化疗药物的耐药。因此，CXCR4/STAT3在基质介导的AML耐药中发挥重要作用，可能成为AML新的治疗靶点。

参考文献

[1] Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. Stem Cells, 2005, 23(8):1105-1112.

[2] 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. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2223.

[3] Kim JA, Shim JS, Lee GY, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia [J]. Cancer Res, 2015,75(11):2222-2231. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-14-3379.

[4] Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG, et al. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia[J]. Blood, 2007,109(2): 786-791.

[5] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment[J]. Blood, 2006, 107(5):1761-1767.

[6] 林玉梅, 张桂珍, 卢振霞, 等. U937细胞与骨髓间充质干细胞黏附培养后凋亡基因表达谱的研究[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(4): 249-253.

[7] Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment[J]. Front Biosci, 2011, 16:2271-2288.

[8] Zhang Y, Zhao D, Zhao H, et al. Hypermethylation of SHP-1 promoter in patient with high-risk myelodysplastic syndrome and it predicts poor prognosis[J]. Med Oncol, 2012, 29(4): 2359-2363. doi: 10.1007/s12032-012-0163-6.

[9] Sellier H, Rébillard A, Guette C, et al. How should we define STAT3 as an oncogene and as a potential target for therapy?[J]. JAKSTAT, 2013, 2(3):e24716. doi: 10.4161/jkst.24716.

[10] Fagard R, Metelev V, Souissi I, et al. STAT3 inhibitors for cancer therapy: Have all roads been explored?[J]. JAKSTAT, 2013, 2(1):e22882. doi: 10.4161/jkst.22882.

[11] Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100[J]. Blood, 2009, 113(24): 6206-6214. doi: 10.1182/blood-2008-06-162123.

[12] Cook AM, Li L, Ho Y, et al. Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells[J]. Blood, 2014, 123 (18):2826-2837. doi: 10.1182/blood-2013-05-505735.

[13] Li X, Guo H, Yang Y, et al. A designed peptide targeting CXCR4 displays anti-acute myelocytic leukemia activity in vitro and in vivo[J]. Sci Rep, 2014, 4:6610. doi: 10.1038/srep06610.

[14] Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML[J]. Blood, 2009, 113(24):6215-6224. doi: 10.1182/blood-2008-05-158311.

[15] Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML)[J]. Blood, 2003, 101(6):2125-2131.

[16] Zhang Y, Zhao H, Zhao D, et al. SDF-1/CXCR4 axis in myelodysplastic syndromes: correlation with angiogenesis and apoptosis[J]. Leuk Res, 2012, 36(3):281-286. doi: 10.1016/j.leukres.2011.06.017.

[17] Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(1):219-230. doi: 10.1016/j.ejca.2012.05.005.

[18] Lwin T, Zhao X, Cheng F, et al. A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas[J]. J Clin Invest, 2013, 123(11): 4612-4626.

[19] Xia B, Tian C, Guo S, et al. c-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2015, 39(1):92-99. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.004.

（收稿日期：2015-07-13）
（本文编辑：王叶青）