

◇ 临床医学研究 ◇

## CXCR4 在急性髓系白血病骨髓间充质干细胞内的表达及分布

桂 钰,葛 健,夏瑞祥

**摘要** 目的 探讨 CXCR4 在初治急性髓系白血病(AML)患者骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)中的分布、表达及其临床意义。方法 通过提取初次诊断的 AML 患者化疗前后骨髓单个核细胞,进行 BM-MSCs 体外分离与培养;用免疫荧光共聚焦的方法观察各组 P2 代细胞中 CXCR4 的亚细胞器定位以及在细胞膜上的分布;采用 Western blot 法检测各组细胞 CXCR4 的蛋白表达量的变化。结果 在初治组 AML 患者 BM-MSCs 内,CXCR4 较缓解组及对照组分布异常,未在

高尔基体内蓄积,多分布在细胞膜上,并且 CXCR4 蛋白含量明显低于其他两组。结论 初治 AML 患者 BM-MSCs 内 CXCR4 分布和含量改变可能与骨髓造血微环境改变有关,并且对白血病细胞的髓外浸润有协同作用。

**关键词** 急性髓系白血病;骨髓间充质干细胞;高尔基体;CXCR4

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1115-05

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81200371);高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(新教师类联合资助课题,编号:20123420120011);安徽省自然科学基金(编号:1208085QH154)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:桂 钰,女,硕士研究生;

葛 健,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:gejian77@medmail.com.cn

夏瑞祥,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:xrx2041@163.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)具有多向分化潜能、支持造血,促进干细胞植入以及分泌各种细胞因子及蛋白,能够同时表达基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及其受体 CXCR4,二者特异性结合能够促进干细胞动员、迁移和归巢。研究<sup>[1]</sup>表明,在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者骨髓中,白血病细胞表面 CXCR4 的表达量增加,这与白血病细胞的增殖、浸润、化疗药物作用的形成有着重要的关系,而在

## Effects of paeoniflorin on prostaglandins E<sub>2</sub> receptor and G $\alpha$ s on fibroblast-like synoviocytes of human under the stimulation of rhIL-1 $\alpha$ and rhTNF- $\alpha$

Dai Xing, Guo Xiaorong, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunopharmacology of Education Ministry of China Anhui Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine Anhui Engineering Research Center of Anti-inflammatory and Immune Drugs Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the effects of paeoniflorin (Pae) on expression of EP<sub>2</sub> and G $\alpha$ s of human fibroblast-like synoviocytes (FLS) under the stimulation of rhIL-1 $\alpha$  and rhTNF- $\alpha$ . **Methods** FLS of human were cultured *in vitro*. The expression of EP<sub>2</sub> on human FLS under the stimulation of rhIL-1 $\alpha$  and rhTNF- $\alpha$  and the effect of Pae were observed by immunofluorescence, analyzed by confocal laser microscopy, the expression of G $\alpha$ s was detected by Western blot. **Results** rhIL-1 $\alpha$  (0.1, 1, 10  $\mu$ g/L) and rhTNF- $\alpha$  (0.2, 2, 20  $\mu$ g/L) significantly inhibited the expression of EP<sub>2</sub> and G $\alpha$ s, Pae (10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> mol/L) could improve the expression of EP<sub>2</sub> and G $\alpha$ s. **Conclusion** Improving the abnormal expression of EP<sub>2</sub> and Gas on human FLS under the stimulation of rhIL-1 $\alpha$  and rhTNF- $\alpha$  is probably one of the most important molecule mechanisms of Pae preventing RA.

**Key words** rhIL-1 $\alpha$ ; rhTNF- $\alpha$ ; fibroblast-like synoviocytes; prostaglandins E<sub>2</sub> receptor; G $\alpha$ s; paeoniflorin

BM-MSCs 中 CXCR4 在细胞内的定位、分布及蛋白定量,目前仍不明确。该研究通过免疫荧光共聚焦技术观察 CXCR4 在细胞中的细胞器定位及分布,并进一步采用 Western blot 法检测其蛋白表达量,观察 AML 骨髓环境对 BM-MSCs 中 CXCR4 表达及分布的影响,从而为指导 AML 的临床研究、治疗和预后提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 15 例骨髓标本均来自安徽医科大学第一附属医院血液内科,骨髓采集过程中患者均知情同意。经骨髓细胞学、骨髓活检、免疫分型、染色体等检查明确诊断为 AML 患者的骨髓标本 5 例,确诊后采用标准 IA (去甲氧柔红霉素 3 d + 阿糖胞苷 7 d) 方案化疗诱导缓解后 AML 患者骨髓标本 5 例 (完全缓解标准:白血病的症状和体征消失,外周中性粒细胞绝对值  $\geq 1.5 \times 10^9/L$ ,血小板  $\geq 100 \times 10^9/L$ ,白细胞分类中无白血病细胞,骨髓中原始粒 I 型 + II 型  $\leq 5\%$ , $M_3$  型原粒 + 早幼粒  $\leq 5\%$ ,无 Auer 小体,红细胞及巨核细胞系列正常,无髓外白血病),正常骨髓移植供者 5 例。

**1.2 主要试剂及仪器** 低糖 DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 GbcoBRL 公司;Percoll 淋巴细胞分离原液购自美国 Amersham Bioscience 公司;mouse anti-CXCR4 antibody IgG2b (clone44716) 购自美国 R&D 公司;mouse monoclonal IgG1 CXCR4 (SC-5353) 购自美国 Santa Cruz 公司;Rabbit polyclonal to Giantin IgG (ab24586)、Rabbit polyclonal to Calnexin IgG (ab22595)、Rabbit polyclonal to LAMP2a IgG (ab18528)、Rabbit polyclonal to EEA1 IgG (ab2900) 均购自美国 Abcam 公司;山羊抗小鼠 IgG/Alexa Fluor594 (ZF-0513)、山羊抗兔 IgG/Alexa Fluor488 (ZF-0511) 均购自北京中杉金桥;RIPA 蛋白裂解液 (P0013B) 购自碧云天公司;Leica TCS SP5 单光子激光共聚焦显微镜购自德国莱卡公司;Bioshine ChemiQ Series 显影仪购自上海欧翔科学仪器有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 BM-MSCs 的分离与培养** 髓后上棘取骨髓液 5 ml,放在肝素抗凝管中,梯度离心  $1\ 000\ r/min \times 5\ min$ ,弃脂肪层,与等量 PBS 充分吹打混匀。将上述混匀的液体 1:1 缓慢叠加到等量 Percoll 分离液上,梯度离心  $2\ 300\ r/min \times 30\ min$ ,吸取白膜层单个核细胞,PBS 洗涤 1~2 次,离心弃上清液,加入

含 10% FBS 的 LG-DMEM 培养液吹打。悬浮细胞以  $3.5 \times 10^5/cm^2$  的密度接种于含 5 ml 培养液的 T-25 培养瓶中,置于  $37\ ^\circ C$ 、5%  $CO_2$  饱和湿度条件下培养,分别标记好初治组、缓解组、对照组名称。48~72 h 后全量换液,弃去非贴壁悬浮细胞。每 3 d 全量换液,待细胞长至 90% 融合时,用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化,按 1:2 进行传代培养<sup>[2]</sup>,将细胞悬液分装到两个培养瓶中,补足培养液,标记名称、代数、时间,放入  $CO_2$  孵箱培养。

**1.3.2 细胞爬片** 将胰酶消化下来的细胞,离心弃上清液,用培养液将沉淀的细胞吹打重悬。取 12 孔板,在每孔中滴入一滴培养液可避免放入的爬片浮起。将无菌多聚赖氨酸爬片放入孔中后,每孔加 1 ml 培养液,将重悬后的细胞吹打混匀后滴在爬片上,盖好盖子,做好标记,放入培养箱中培养 24 h。

**1.3.3 免疫荧光共聚焦观察 CXCR4 在细胞内的分布和亚细胞器定位** 将初治组、缓解组、对照组已培养 24 h 的细胞爬片 (此时细胞的形态及细胞间距适宜荧光染料着色及在显微镜下观察) 各取出 4 片,分别固定在玻片上,用 PBS 漂洗 5 min 后加入 4% 多聚甲醛固定 10 min,再用 PBS 漂洗 5 min  $\times 3$  次。加 0.2% tripton + 2% BSA 混合液封闭 1 h, PBS 漂洗。每组的 4 张片上分别加入 CXCR4 和亚细胞器标志蛋白的一抗 (分别按抗体说明书配比)  $4\ ^\circ C$  孵育 1 h 后, PBS 漂洗。再在每组 4 张片上分别加入荧光二抗 (分别按抗体说明书配比),避光室温孵育 1 h, PBS 漂洗后用 95% 甘油封片,放在激光共聚焦显微镜下观察。

**1.3.4 Western blot 测定 CXCR4 在细胞中的表达**

取初治组、缓解组、对照组的 P2 代细胞,收集细胞后,加入 150  $\mu l$  蛋白裂解液,冰上反复吹打  $4\ ^\circ C$  下  $12\ 000\ r/min$ ,离心 15 min,收集上清液即为目的蛋白。各取 10  $\mu l$  蛋白样品按 1:1 比例加入上样缓冲液,  $100\ ^\circ C$  煮沸 5 min 使蛋白变性,按预定顺序加样 (1~3 孔:初治组,4~6 孔:缓解组,7~9 孔:对照组),电泳并湿转 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, PBS 洗 5 min  $\times 3$  次,将 PVDF 膜剪成所需分子量的条带 (CXCR4 条带和  $\beta$ -tubulin 条带),分别加入相应的一抗,摇床上  $4\ ^\circ C$  过夜, PBS 洗 5 min  $\times 3$  次,鼠二抗室温下孵育 2 h, PBS 洗 5 min  $\times 3$  次,最后用 ECL 化学发光法进行显影。采用 Quantity One 软件对实验结果进行分析,结果以目标条带与  $\beta$ -tubulin 条带的比值表示。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,

定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用  $q$  检验。

## 2 结果

**2.1 BM-MSCs 的分离与培养** 初治组、缓解组、对照组骨髓液经密度梯度分离最先得到的单个核细胞主要为圆形,大小不等,经过 48 h 培养后,可以看到贴壁生长的梭形细胞,3~4 d 后,细胞逐渐开始生长并形成小的细胞克隆,1 周后细胞克隆数明显增加,约 10 d 细胞克隆逐渐连成一片,细胞呈成纤维状生长,形态呈常梭形,覆盖面积较前更大,约 15 d 细胞生长可达 90% 融合,见图 1。

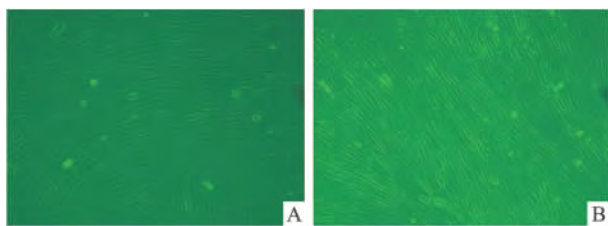


图 1 体外分离培养的 BM-MSCs 细胞形态  $\times 1000$   
A: BM-MSCs 的 P1 代细胞; B: BM-MSCs 的 P2 代细胞

**2.2 免疫荧光共聚焦** CXCR4 的荧光发光色表现为红色,细胞器高尔基体、内质网、溶酶体、内体的标志蛋白荧光发光色表现为绿色。共聚焦观察显示缓解组及对照组 CXCR4 的红色免疫荧光与高尔基体标志蛋白 Giantin 绿色免疫荧光发生了明显重叠,且在细胞内成少量弥漫性的分布;初治组未见 CXCR4 的红色荧光与这 4 种细胞器标志蛋白的绿色荧光重叠及在细胞内的弥漫分布,但在细胞表面观察到 CXCR4 的红色荧光,见图 2。

**2.3 Western blot 检测** 用 Western blot 方法对 CXCR4 在初治组、缓解组、对照组的 P2 代细胞中的表达总量进行检测,多次重复实验后显示,初治组的 CXCR4 表达水平明显低于缓解组及对照组 ( $P < 0.05$ ),而缓解组和对照组 CXCR4 的表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

## 3 讨论

BM-MSCs 作为一种原始的骨髓基质干细胞,能够同时表达 SDF-1 及 CXCR4,二者特异性的结合,参与机体的多种生理及病理过程,被称为 SDF-1/CXCR4 生物轴。CXCR4 能够广泛表达在包括单核

细胞、淋巴细胞及 BM-MSCs 等细胞表面<sup>[3]</sup>,是 7 次跨膜的 G-蛋白偶联受体<sup>[4]</sup>,在 BM-MSCs 中经内质网、高尔基体等一系列细胞器合成后,经过解折叠及在分子伴侣和信号肽等分子的协助下运输到细胞膜上。

研究<sup>[5]</sup>表明, SDF-1 与 CXCR4 的结合除了影响正常骨髓细胞的归巢外,同时与血液系统恶性疾病的发生发展密不可分。在病理情况下,白血病细胞表面 CXCR4 表达的高低与其逸出骨髓进入外周血水平呈正相关<sup>[6]</sup>,在白血病细胞增殖、髓内外迁移、浸润及抵抗化疗药物作用的形成等方面起着重要作用<sup>[7]</sup>,其机制可能是 SDF-1/CXCR4 的相互作用刺激细胞的钙离子内流及跨膜能力,从而使白血病细胞的迁移活性升高。国外学者<sup>[8]</sup>还发现 CXCR4 高表达的 AML 患者预后较差,因此 CXCR4 是急性白血病髓外浸润的重要调控因子。目前,对于 AML 患者骨髓微环境、骨髓基质细胞、趋化因子及其受体表达的研究较少,有研究<sup>[9]</sup>将骨髓基质细胞和 NB4 细胞(急性早幼粒细胞白血病细胞)共培养后,基质细胞可通过分泌某些细胞因子如 IL-6 保护白血病细胞,增强白血病细胞对化疗药物诱导细胞凋亡的抵抗作用,前期的研究<sup>[10]</sup>显示初治 AML 患者骨髓血浆中 SDF-1 缺失,这种缺失可能伴随着 CXCR4 的表达下调,以达到 SDF-1/CXCR4 生物轴在细胞及骨髓微环境中的平衡。

本研究显示,体外培养初次诊断、标准方案化疗诱导缓解后的 AML 患者及正常人的 BM-MSCs, CXCR4 蛋白表达量及在亚细胞器的定位和分布有所区别。从免疫荧光共聚焦的结果来看,初治组 BM-MSCs 的 CXCR4 分布主要在细胞膜上,而在细胞内及细胞器中几乎见不到 CXCR4 的聚集,对于缓解组及对照组而言, CXCR4 除了在细胞膜上表达,胞质内也可见其弥漫分布以及在高尔基体内的明显蓄积, Western blot 的结果也显示了初治组的 CXCR4 蛋白总量明显低于缓解组和对照组,差异有统计学意义。对于正常者及治疗缓解患者而言,细胞表达正常含量的 CXCR4 及按照跨膜蛋白转运的顺序,周期进行转运,从内质网到细胞膜,细胞内的 CXCR4 多数聚集在高尔基体进行加工,部分转移到细胞膜上,而在初治 AML 患者的 BM-MSCs 中, CXCR4 不仅表达量减少,而且多分布在细胞膜上,高尔基体内未有蛋白蓄积。这表明 AML 患者 BM-MSCs 中存在着 CXCR4 的表达下调及分布改变,经过化疗达到缓解后, CXCR4 的表达量及分布异常明显改

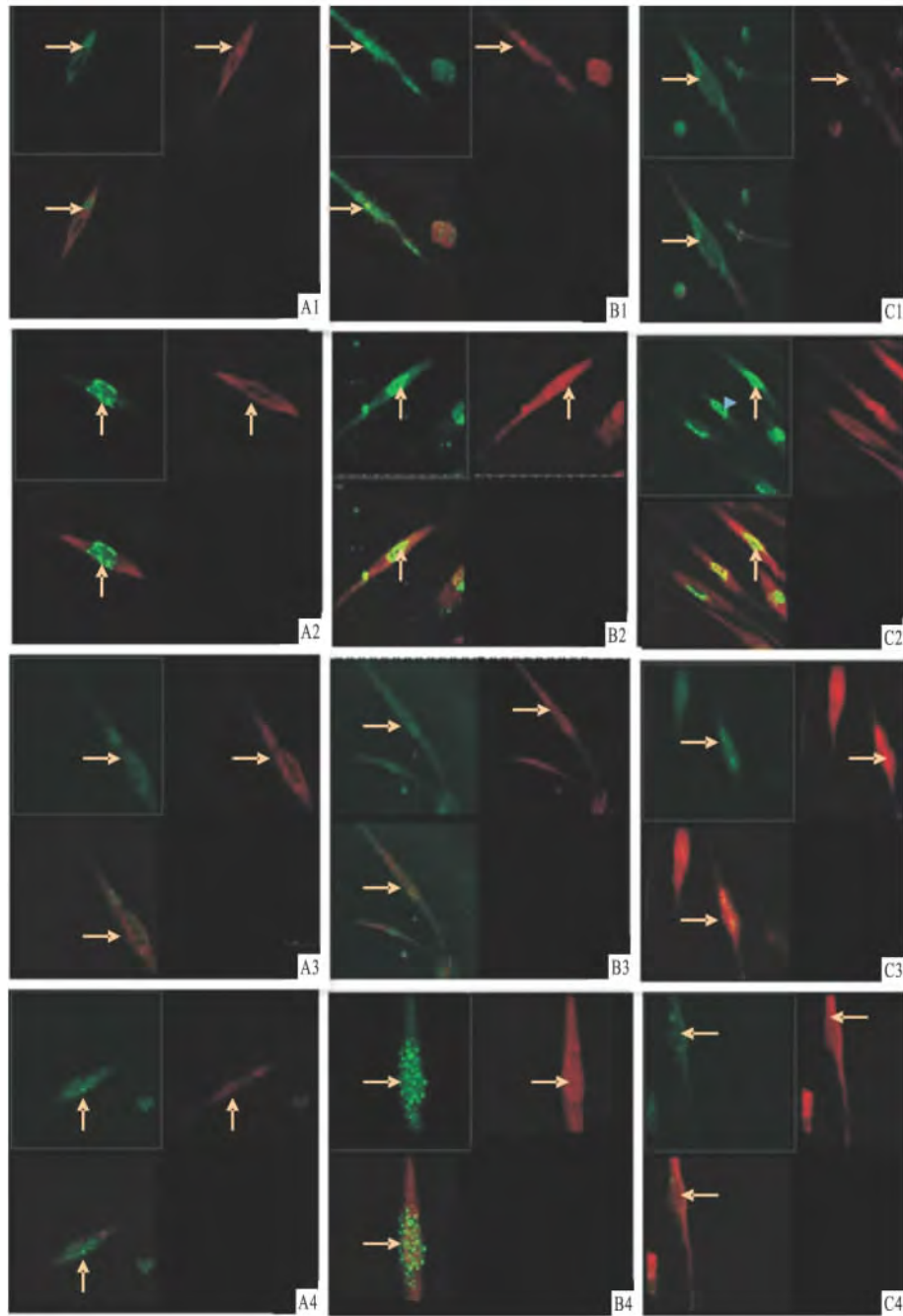


图2 CXCR4 在 BM-MSCs 内的分布及细胞器定位 免疫荧光双染 ×1 000

A:初治组;B:缓解组;C:对照组;1: CXCR4 和内质网标志蛋白 Calnexin 荧光双染;2: CXCR4 和高尔基体标志蛋白 Giantin 荧光双染;3: CXCR4 抗体与溶酶体标志蛋白 lamp2a 荧光双染;4: CXCR4 和内体标志蛋白 EEA1 荧光双染;红色为 CXCR4 蛋白,绿色为各细胞器标志蛋白

善。AML 患者的白血病细胞表面 CXCR4 的高表达,细胞增殖及髓外侵犯及均与造血微环境的改变有关,而同时骨髓造血微环境的这一改变也影响着骨髓中其他基质细胞包括 BM-MSCs 在内的相关细胞因子及受体蛋白的表达变化,如 CXCR4 的表达下调。正如实验中观察的,在 AML 患者 BM-MSCs 中 CXCR4 表达量及分布发生改变,这种改变伴随着

SDF-1 的缺失,并且同时参与了骨髓基质细胞环境庇护白血病细胞免于化疗药物的诱导凋亡,以及协同白血病细胞进行髓外迁移和浸润过程,这 3 种机制与白血病细胞耐药、增殖、抗凋亡密切相关。因而,CXCR4 在 BM-MSCs 内及细胞膜上的分布改变可以作为预测急性白血病化疗疗效的指标之一,即初治的 AML 患者 BM-MSCs 中 CXCR4 表达量减少

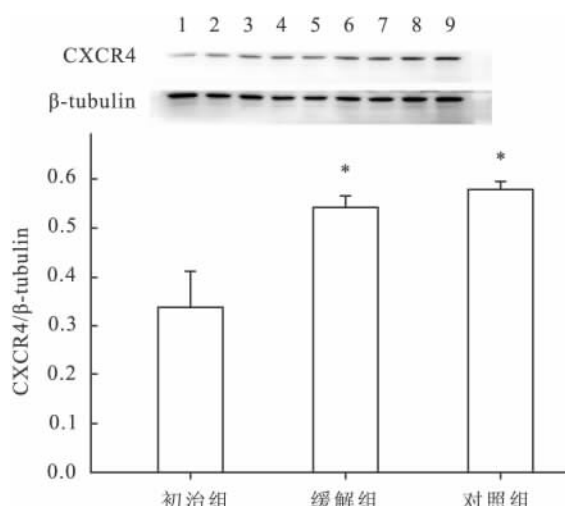


图3 Western blot 检测 CXCR4 在细胞内的表达量  
及各组表达水平变化

1~3:初治组;4~6:缓解组;7~9:对照组;与对照组比较:\* $P < 0.05$

并且分布改变,在这种情况下,白血病细胞的转移及浸润的机会较大,提示预后不良,而化疗缓解后,蛋白表达量及细胞内外的分布异常得以纠正。

综上所述,认为 CXCR4 在 AML 患者 BM-MSCs 内及细胞膜上分布异常与白血病的发病、浸润、耐药、参与体内残留病灶的形成及复发有关,对于疾病的发生发展,预后评估有着一定的意义,有助于进一步认识白血病的发病及髓外浸润机制,并为白血病的诊断和治疗诊疗提供新的思路。

## Expression and distribution of CXCR4 in bone marrow mesenchymal stem cells of acute myeloid leukemia

Gui Yu, Ge Jian, Xia Ruixiang

(Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the distribution, expression of CXCR4 in bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) of untreated acute myeloid leukemia (AML) patients and its clinical significance. **Methods** Bone marrow samples from AML patients with initial diagnosis who were treated before and after chemotherapy, then isolated and cultured BM-MSCs *in vitro*. Subcellular localization and distribution of CXCR4 on membrane in P2 cells of different groups were observed by using confocal immunofluorescence. Content changes of CXCR4 were detected by using Western blot. **Results** The distribution of CXCR4 in BM-MSCs of untreated AML group was different from others, did not accumulate in the Golgi apparatus, most of which were located on the cell membrane instead, and protein content was lower than the other two groups. **Conclusion** The distribution and content change of CXCR4 in BM-MSCs of untreated AML patients may be associated with the change of bone marrow hematopoietic microenvironment, and CXCR4 has a synergistic effect on extramedullary infiltration of leukemic cells.

**Key words** acute myeloid leukemia; bone marrow mesenchymal stem cells; Golgi apparatus; CXCR4

## 参考文献

- [1] 李 晟, 陈子兴, 王 玮, 等. CXCR4 在急性白血病细胞中的表达及其对髓外浸润的意义[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7): 405-8.
- [2] 马丽花, 赵 熠, 蔡学敏, 等. 绿色荧光蛋白标记成人骨髓间充质干细胞的超微结构特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6): 959-62.
- [3] Broxmeyer. Chemokines in hematopoiesis[J]. Curr Opin Hematol, 2008, 15(1): 49-58.
- [4] Strieter R M, Burdick M D, Mestas J, et al. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 768-78.
- [5] Mirandola L, Apicella L, Colombo M, et al. Anti-Notch treatment prevents multiple myeloma cells localization to the bone marrow via the chemokine system CXCR4/SDF-1[J]. Leukemia, 2013, 27(7): 1558-66.
- [6] Peled A, Tavor S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia[J]. Theranostics, 2013, 3(1): 34-9.
- [7] Sison E A, McIntyre E, Magoon D, et al. Dynamic chemotherapy-induced upregulation of CXCR4 expression: a mechanism of therapeutic resistance in pediatric AML[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(9): 1004-16.
- [8] Tavernier-Tardy E, Cornillon J, Campos L, et al. Prognostic value of CXCR4 and FAK expression in acute myelogenous leukemia[J]. Leuk Res, 2009, 33(6): 764-8.
- [9] 周志诚, 夏海龙. 骨髓基质细胞抵抗三氧化二砷诱导 NB4 细胞株凋亡的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(10): 1164-6.
- [10] Ge J, Hou R, Liu Q, et al. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia[J]. Int J Hematol, 2011, 93(6): 750-9.