

· 论 著 ·

## 上调白血病骨髓基质细胞 GJIC 功能对 Jurkat 细胞药物敏感性的影响\*

刘 耀<sup>1</sup>, 张 曦<sup>1△</sup>, 陈幸华<sup>1</sup>, 蔡定波<sup>2</sup>, 李忠俊<sup>3</sup>, 司英健<sup>1</sup>, 彭贤贵<sup>1</sup>, 高 蕾<sup>1</sup>, 张 诚<sup>1</sup>, 曾东风<sup>1</sup>, 高 力<sup>1</sup>  
(第三军医大学新桥医院:1. 血液科;3. 输血科, 重庆 400037;2. 河南省内乡县人民医院急诊科, 南阳 474350)

**摘要:**目的 观察上调白血病骨髓基质细胞间隙连接细胞间通讯(GJIC)功能对共培养的人急性淋巴细胞白血病细胞株(Jurkat)细胞药物敏感性的影响。方法 体外培养白血病骨髓基质细胞, 转染 Cx43 基因, 罗氏黄染料传输法检测转染后骨髓基质细胞的 GJIC 功能变化;将 Jurkat 细胞与转染 Cx43 基因的骨髓基质细胞共培养, 观察共培养的 Jurkat 细胞对化疗药物甲氨蝶呤(MTX)药物敏感性的改变。结果 转染 Cx43 基因的白血病骨髓基质细胞的 GJIC 功能明显增加;与转染 Cx43 基因的骨髓基质细胞共培养的 Jurkat 细胞在 MTX 作用下的存活率(61.3±3.24)%较未转染 Cx43 基因的骨髓基质细胞共培养的 Jurkat 细胞(82.4±3.12)%明显下降;与转染 Cx43 基因的骨髓基质细胞共培养的 Jurkat 细胞在 MTX 作用下的凋亡率(48.1±3.78)%较与未转染 Cx43 基因的骨髓基质细胞共培养的 Jurkat 细胞(18.5±3.43)%明显增加, 差异有统计学意义(P<0.01)。结论 上调白血病骨髓基质细胞 GJIC 功能能够增加共培养的 Jurkat 细胞对化疗药物的敏感性。

**关键词:**骨髓基质细胞;间隙连接细胞间通讯;Jurkat 细胞

中图分类号:R446.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)14-1836-03

Effect of up-regulation of GJIC function between leukemic bone marrow stromal cells  
on the sensitivity to chemotherapeutics of Jurkat cells\*

LIU Yao<sup>1</sup>, ZHANG Xi<sup>1△</sup>, CHEN Xing-hua<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of Hematology;3. Blood transfusion, Department Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;2. Department of Emergency, Neixiang Hospital, Nanyang 474350 China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of up-regulation of GJIC function between leukemic bone marrow stromal cells (BMSCs) on the sensitivity to chemotherapeutics of co-cultured Jurkat cells. **Methods** Cultured leukemic BMSCs in vitro, transfected Cx43 on BMSCs, and detected the GJIC function between BMSCs by using LY transmission assay. We then observed the sensitivity to MTX of co-cultured Jurkat cells. **Results** The GJIC function of leukemic BMSCs which was transfected Cx43 were significant increased. The survival rate of Jurkat cells co-cultured with leukemic BMSCs transfected Cx43 was(61.3±3.24)%, which was significant decreased compared with Jurkat cell co-cultured with un-transfected Cx43 BMSCs(82.4±3.12)%. Meanwhile, the apoptotic rate of Jurkat cells co-cultured with leukemic BMSCs transfected Cx43 was(48.1±3.78)%, which was significant increased compared with Jurkat cell co-cultured with un-transfected Cx43 BMSCs(18.5±3.43)%, P<0.01. **Conclusion** Up-regulation of GJIC function between leukemic BMSCs increased the sensitivity to chemotherapeutics of co-cultured Jurkat cells.

**Key words:** bone marrow stromal cells; gap junction intercellular communication; Jurkat cells

微环境诱导耐药是影响血液系统恶性肿瘤和发生骨转移的实体肿瘤如肺癌、乳腺癌和前列腺癌化疗效果的重要因素<sup>[1]</sup>。连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)所构成的间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)是造血微环境的主要成分—骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)之间进行交流和小分子信号传递的主要方式<sup>[2]</sup>。GJIC 功能缺失是包括白血病在内的多种肿瘤发生中的重要事件。国外学者在对其他实体肿瘤的研究中发现, 上调肿瘤 GJIC 功能, 可以有效逆转肿瘤细胞的恶性表型, 抑制肿瘤细胞增殖, 增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[3]</sup>。但是, 在造血系统肿瘤中 GJIC 功能缺失和肿瘤细胞药敏性之间的关系目前还不清楚。为了研究 GJIC 功能对微环境诱导耐药的影响, 本实验通过转染外源性 Cx43 基因, 上调白血病 BMSCs 的 GJIC 功能, 并与人急性淋巴细胞白血病细胞株(Jurkat)共培养, 观

察 Jurkat 细胞在化疗药物甲氨蝶呤(MTX)作用下存活率和凋亡率的改变。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞来源** Jurkat 细胞购自美国 ATCC 公司。人急性白血病骨髓标本取自本院血液科, 采集前告知患者用途并取得患者同意。

**1.2 主要试剂** DMEM/F12 培养粉(Gibco 公司), Ficoll(上海试剂二厂), 新生胎牛血清、马血清(Hy-clone 公司), 罗氏黄(LY, Sigma 公司), AnnexinV 凋亡试剂盒(Coulter 公司), MTX(哈尔滨伊达药业, 使用前用 PBS 液稀释成 10 mg/L), 噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司)。

**1.3 实验分组** 实验分为 3 组, 即 Jurkat 细胞单独培养组(Jurkat-stroma free); Jurkat 细胞与 BMSCs 共培养组(Jurkat-BMSCs)和 Jurkat 细胞与转染 Cx43 基因的 BMSCs 培养组

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500220, 30971109);重庆市自然科学基金重点项目资助(2009BA5011, 2009BA5056)。

△ 通讯作者, 电话:(023)68774330; E-mail: zhangxxi@sina.com。

(Jurkat-Cx43-BMSCs)。

1.4 BMSCs 的分离、培养 参照文献[4]进行。

1.5 Cx43 基因转染 参照文献[5]进行。

1.6 LY 染料传输实验 参照文献[6]进行。

1.7 MTT 比色法测定药物敏感性 待 BMSCs 生长至 80% 融合时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化 BMSCs,以  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  接种于 24 孔培养板,贴壁培养 24 h 后吸去上清液,加入对数生长期的 Jurkat 细胞至  $1 \times 10^5 / \text{mL}$  (Jurkat-stroma free 组细胞接种于无基质细胞培养层的培养板中),加入新鲜 RPMI-1640 培养基,置于恒温  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱中培养,24 h 后弃原培养液,加入浓度为 10 mg/L 的 MTX。置于恒温  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱中培养 24 h 后,吸管吹打使 Jurkat 细胞悬浮,转移到 96 孔培养板,每组每个药物浓度设 3 个复孔,并加 3 孔空白培养液,每孔加入 5 mg/mL MTT  $20 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h,离心弃上清液,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,振荡培养板,在酶标仪上读取  $\text{OD}_{490\text{nm}}$  值,取平行孔均值,以空白培养液孔校正调零,计算经不同浓度化疗药物在同一时间作用后各组 Jurkat 细胞存活率,绘制细胞存活曲线。细胞存活率 = (各浓度药物作用后细胞 OD 值  $\div$  0 nmol/L 药物作用后细胞 OD 值)  $\times 100\%$ 。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡率 各组 Jurkat 细胞分别于药物作用后 24 h 吸管吹打使黏附于基质层 Jurkat 细胞悬浮,收集 Jurkat 细胞,  $0^\circ\text{C}$  PBS 液洗涤细胞 2 次,  $0^\circ\text{C}$  结合缓冲液调整细胞浓度为  $5 \times 10^5 / \text{mL}$ ,加入 5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC 和 2.5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)避光染色 10 min,加 150  $\mu\text{L}$   $0^\circ\text{C}$  结合缓冲液,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 统计学方法 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS13.0 软件分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 Cx43 转染前后 BMSCs 上 GJIC 功能 实验结果显示,LY 染料通过转染前的 BMSCs 之间需 8 min 以上,而 LY 在转染 Cx43 以后的 BMSCs 之间通过的时间缩短,约需 3~4 min;转染前 BMSCs 的 LY 荧光大部分局限于标记细胞,仅有少许通过间隙连接传输至较近细胞,而转染后白血病 BMSCs 荧光传递强度可达 10 个细胞以上。转染后 BMSCs 的荧光传递强度高于转染前,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 LY 染料传输法检测转染 Cx43 前、后白血病 BMSCs GJIC 功能 ( $n=3$ )

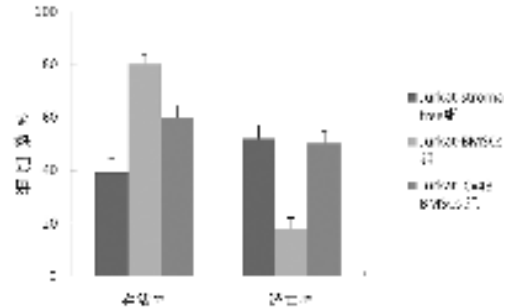
时间	荧光传递强度					
	-	+	++	+++	++++	+++++
转染前	6	2	4	22	13	1
转染后*	0	0	0	4	8	39

与转染前相比较, \* :  $P < 0.01$ 。

2.2 不同培养条件下 Jurkat 细胞在 MTX 作用下的存活率 经 10 mg/L MTX 处理后各组 Jurkat 细胞存活率(图 1)。Jurkat-stroma free 组 Jurkat 细胞存活率最低,显著低于其他两组 ( $P < 0.01$ );而 Jurkat-Cx43-BMSCs 组 Jurkat 细胞存活率显著低于 Jurkat-BMSCs 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),3 组细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为 31 mg/L、63 mg/L 和 81 mg/L。

2.3 不同培养条件下 Jurkat 细胞在 MTX 作用下的凋亡率

经 10 mg/L MTX 处理后各组 Jurkat 细胞凋亡率(图 1)。Jurkat-Cx43-BMSCs 组和 Jurkat-stroma free 组 Jurkat 细胞凋亡率显著高于 Jurkat-BMSCs 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而 Jurkat-Cx43-BMSCs 组和 Jurkat-stroma free 组细胞凋亡率差异无统计学意义。



Jurkat-BMSCs 组与其他两组比较,  $P < 0.01$ 。

图 1 不同培养条件下 Jurkat 细胞的存活率和凋亡率

3 讨 论

前期研究发现,白血病 BMSCs 上 Cx43 的表达和 GJIC 功能较正常骨髓明显下降;化疗后完全缓解的白血病 BMSCs 上 Cx43 的表达较治疗前明显增加,GJIC 功能恢复[6]。说明 BMSCs 之间 Cx43 介导的 GJIC 功能缺陷是白血病发病过程中的一个关键点,对其进行调控,有可能影响白血病 BMSCs 的生物学特性和造血支持能力,从而进一步对定植于其中的白血病细胞产生一定的调控作用。为验证这一假说,本实验首先通过基因转染技术将外源性 Cx43 基因转染到 Cx43 表达缺陷的白血病 BMSCs 上,通过 LY 染料传输技术证实其上调了 BMSCs 之间的 GJIC 功能。该模型的建立为进一步研究与增强 GJIC 功能的白血病 BMSCs 共培养后白血病细胞的增殖、分化、凋亡及药物敏感性变化提供了有效的工具载体。

MTX 是一种常用的化疗药物,现在认为其作用的分子机制是抑制对细胞增殖和 DNA 合成起重要作用的二氢叶酸还原酶的活性[7]。在本实验条件下,和白血病 BMSCs 共培养的 Jurkat 细胞在 MTX 作用下的存活率较单独培养的 Jurkat 细胞明显上升,而凋亡率却显著下降。说明 BMSCs 在与白血病细胞共培养后能庇护白血病细胞免于药物诱导的凋亡,学者们称骨髓基质微环境为白血病细胞逃避常规化疗的“庇护所”[8]。BMSCs 对白血病细胞的保护效应也是目前认为的微环境诱导耐药的主要作用机制[1]。李忠俊等[9]研究发现白血病 BMSCs 在与 Jurkat 细胞共培养后,明显降低了化疗药物柔红霉素(DNR)诱导的白血病细胞凋亡率,且较正常 BMSCs 的屏蔽效应更强。

本文通过转入 Cx43 基因上调白血病 BMSCs 之间 GJIC 功能逆转了上述骨髓微环境对白血病细胞的保护效应,具体表现在共培养的 Jurkat 细胞存活率下降和凋亡率提高。国外学者近期在对恶性间皮瘤的研究中发现,肿瘤细胞之间 GJIC 功能下降,导致肿瘤生长的接触抑制丧失,并可增加肿瘤细胞对顺铂的耐药;而通过转染间隙连接蛋白,上调肿瘤细胞之间的 GJIC 功能可有效逆转间皮瘤细胞对顺铂的耐药[10]。其他学者在对肾脏肿瘤和肺癌的研究中也发现了类似的现象。上述研究结果提示 GJIC 作为相邻细胞之间惟一的直接信号传递方式,在微环境诱导耐药的产生过程中可能发挥重要的调节作

用。对上调 GJIC 功能逆转白血病骨髓对白血病细胞的保护效应的相关机制目前还不清楚,作者推测恢复白血病 BMSCs 之间 GJIC 功能,促进了 BMSCs 之间的物质交换和信号传递,使参与调控 BMSCs 新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程的小分子信使(如 cAMP、ATP、Ca<sup>2+</sup> 等)传递增加,并同时增加了白血病 BMSCs 于白血病细胞之间的信号传递。该信号可能作为一种启动因素,通过作用与白血病细胞相关耐药基因如 p53、bcl-2 和 bax 等的上游调控蛋白,增强或抑制上述耐药基因的表达,从而进一步影响白血病细胞的化疗敏感性。

总之,本研究结果说明 GJIC 是白血病 BMSCs 对定植于其中的白血病细胞药物敏感性发挥调节作用的影响因素之一,重建白血病骨髓基质 GJIC 功能逆转了白血病骨髓对白血病细胞的屏蔽作用,增强化疗药物的杀伤效应,从而更有利于白血病的临床药物治疗。

#### 参考文献:

- [1] Mark B, Meads LA, Hazlehurst WS, et al. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2519.
- [2] Dobrowolski R, Willecke K. Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2): 283.
- [3] Hampson L, He XT, Oliver AW, et al. Analogues of Y27632 increase gap junction communication and suppress the formation of transformed HIH3T3 colonies[J]. *Br J Cancer*, 2009,

101(5):829.

- [4] 刘耀,张曦,司英健,等. 急性白血病骨髓基质细胞 Connexin43 的表达及细胞间通讯功能研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(4): 679.
- [5] 司英健,张曦,陈幸华,等. Cx43 和 GFP 双基因共表达重组腺病毒载体的构建和鉴定[J]. *重庆医学*, 2007, 36(10): 927.
- [6] Liu Y, Zhang X, Li ZJ, et al. Up-regulation of Cx43 expression and GJIC function in acute leukemia bone marrow stromal cells post-chemotherapy[J]. *Leuk Res*, 2010, 34: 631.
- [7] Paraguassu-Braga FH, Borojevic R, Bouzas LF, et al. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2003, 10: 1101.
- [8] Spengeman JD, Green TD, McCubrey JA, et al. Activated EGFR promotes the survival of B-lineage acute leukemia in the absence of stromal cells[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(3): 322.
- [9] 李忠俊,滕本秀,陈幸华,等. 白血病骨髓基质细胞对白血病细胞屏蔽效应的体外实验研究[J]. *癌症*, 2005, 24(6): 672.
- [10] Sato H, Iwata H, Takano Y, et al. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(4): 466.

(收稿日期:2010-03-25 修回日期:2010-06-12)

(上接第 1835 页)

上<sup>[5]</sup>。因此,早期监测 CMV 感染和采取积极有效的预防措施非常重要。包括更昔洛韦十种球蛋白输注,并定期(每周 1 次)进行 TORCH、CMVpp65、CMV-DNA 等病原学检查,4 例患者出现 CMV 感染;有研究报道 VOD 的发生率为 4%~43%<sup>[6]</sup>,是导致移植早期死亡的主要并发症之一。低分子肝素钙 0.3~0.4 mL 皮下注射,12 h 1 次;PGE<sub>1</sub>: 40 μg/d,静脉滴注,至移植后 45 d 进行预防收到良好效果,保障了移植过程的安全性。

就移植远期疗效而言,目前患者正在进一步随访中,41 例(83.7%)患者无病存活,8 例死于本病复发和移植并发症;孟凡义<sup>[7]</sup>报道慢性粒细胞白血病患者远期疗效较理想,5 年生存率可达 60%~80%。本文 21 例患者的融合基因检测持续阴性,最长时间已 60 个月,预计预后良好。由此可见,URD-HSCT 是急、慢性白血病治疗的有效手段,对于目前 HLA 同胞间全相合供者日益减少的情况是有益的补充。由于开展非亲缘间异基因造血干细胞时间较短,对于白血病的治疗尚需进一步积累病例数,延长临床观察时间,总结经验,使更多的患者受益。

#### 参考文献:

- [1] 陈幸华,刘林,孔配艳,等. 非血缘异基因外周血干细胞移

植治疗慢性粒细胞白血病的临床研究[J]. *重庆医学*, 2005, 34(9): 1283.

- [2] 陈幸华,孔配艳. 血液肿瘤的生物治疗[M]. 汕头:汕头大学出版社,2005:218.
- [3] Dini G, Cancedda R, Locatelli F, et al. Unrelated donor marrow transplantation: an update of the experience of the Italian Bone Marrow Group (GITMO)[J]. *Haematologica*, 2001, 86(5): 451.
- [4] Carreras E, Tomas JF, Sanz G, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation as treatment for chronic myeloid leukemia: the Spanish experience [J]. *Haematologica*, 2000, 85(5): 530.
- [5] 黄晓军,许兰平,任汉云,等. 异基因造血干细胞移植后巨细胞病毒病及其危险因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(9): 766.
- [6] 海涛,黄河,林茂芳,等. 低剂量肝素联合前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质微球预防和治疗非亲缘异基因骨髓移植后肝静脉阻塞病[J]. *中华血液学杂志*, 2001, 22(8): 444.
- [7] 孟凡义. 异基因造血干细胞移植治疗慢性粒细胞白血病的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(11): 1052.

(收稿日期:2010-03-25 修回日期:2010-06-12)