

伴 CSF1R-Y571D 突变的急性髓系白血病细胞系 GDM-1 的增殖机制

曹 琼¹, 徐凝馨¹, 李小文¹, 吴 昊¹, 郝建卿¹, 覃艳红², 李 莉^{1*}

(1. 山西医科大学 基础医学院, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第二临床医学院 血液科, 山西 太原 030001)

摘要:目的 通过蛋白激酶抑制方法研究伴集落刺激因子-1受体(CSF1R)突变的急性髓系白血病细胞系 GDM-1 的增殖机制。方法 按照处理方式不同将 GDM-1 细胞分为实验组和对照组,将 10 种不同的蛋白激酶抑制剂作用于实验组,对照组仅做 DMSO 处理;CCK8 法检测细胞增殖抑制情况;Western blot 检测蛋白激酶抑制剂作用于 GDM-1 后,关键激酶的磷酸化水平的改变;细胞因子 M-CSF 单独或与蛋白激酶抑制剂共同作用于 GDM-1 细胞,采用 CCK8 法进行检测细胞增殖水平。结果 蛋白激酶抑制分析显示明显抑制 GDM-1 细胞增殖的药物有 dasatinib ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{mol/L}$)、bosutinib ($IC_{50} = 0.07 \mu\text{mol/L}$)、linifanib ($IC_{50} = 0.13 \mu\text{mol/L}$) 及 sorafenib ($IC_{50} = 0.12 \mu\text{mol/L}$)。Western blot 显示,与对照组相比,linifanib 作用于 GDM-1 后,Src,ERK 磷酸化水平明显降低($P < 0.01$)。在低浓度 FBS 培养时,细胞因子 M-CSF 能够刺激伴 CSF1R 突变型细胞系 GDM-1 的增殖,其增殖水平为对照组的 11.3 倍;M-CSF 联合 bosutinib 作用于 GDM-1,细胞增殖明显被抑制($P < 0.001$),而 M-CSF 联合 HG6-64-1 作用于 GDM-1,与仅用 M-CSF 组相比细胞增殖不受影响。结论 GDM-1 细胞中 CSF1R-Y571D 突变使 CSF1R 活性增高,并主要通过激活 Src 及 MAPK 信号通路来促进细胞增殖。

关键词: 蛋白激酶抑制剂;GDM-1;集落刺激因子 1 受体;linifanib;bosutinib

中图分类号:R733.71 文献标志码:A

Proliferation mechanism of acute myeloid leukemia cell line GDM-1 with CSF1R-Y571D mutation

CAO Qiong¹, XU Ning-xin¹, LI Xiao-wen¹, WU Hao¹, HAO Jian-qing¹, QIN Yan-hong², LI Li^{1*}

(1. School of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;

2. Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To explore the proliferation mechanism of acute myeloid leukemia cell line GDM-1 by the method of protein kinase inhibition. **Methods** GDM-1 cells were divided into experimental group and control group according to different treatment. Experimental group was treated with 10 different protein kinase inhibitors, the control group was treated with DMSO, and the inhibition of cell proliferation was detected by CCK8 method. The phosphorylation level of key protein kinases in GDM-1 after treatment with linifanib, bosutinib, sorafenib were detected by Western blot. GDM-1 cells were treated with cytokine M-CSF alone or combined with protein kinase inhibitors, cell proliferation was detected by CCK8 method. **Results** Protein kinase inhibition analysis showed that dasatinib ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{mol/L}$), bosutinib ($IC_{50} = 0.07 \mu\text{mol/L}$), linifanib ($IC_{50} = 0.13 \mu\text{mol/L}$) and sorafenib ($IC_{50} =$

收稿日期:2019-12-16 修回日期:2020-04-28

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81400139);山西省自然科学基金(2014011039-2)

* 通信作者 (corresponding author):lili_5076@sxmu.edu.cn

0.12 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation of GDM-1 cells. Western blot analysis showed that the phosphorylation level of Src and ERK in GDM-1 was decreased ($P < 0.01$) when treated with linifanib. The proliferation of GDM-1 was 11.3 times as much as that of control group when stimulated with M-CSF. The proliferation of GDM-1 was dramatically inhibited when incubated with the combination of M-CSF and bosutinib ($P < 0.001$), but it was not significantly inhibited when incubated with M-CSF plus HG6-64-1. **Conclusions** CSF1R-Y571D mutation of GDM-1 cells increases the activity of CSF1R, and promotes cell proliferation by activating Src and MAPK signaling pathways.

Key words: protein kinase inhibitor; GDM-1; colony stimulating factor-1 receptor; linifanib; bosutinib

急性髓性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是由于髓系造血干/祖细胞发生累积性获得性基因改变, 导致细胞增殖、分化和凋亡途径发生改变的一种恶性疾病^[1]。基因突变是诱发 AML 的重要机制之一, 现已证实导致 AML 发生的突变主要有 AML1/ETO^[2]、PML-RARa^[3]、MLL 基因重排^[4-5]等。伴随这些突变使处于正常分化的骨髓造血祖细胞分化发生停滞, 细胞持续恶性增殖。近年来, 针对特定基因突变而导致肿瘤发生的小分子抑制剂也逐渐用于临床, 如 imatinib^[6]、gefitinib^[7]等。

集落刺激因子-1 受体 (colony stimulating factor-1 receptor, CSF1R) 是一种 III 型受体酪氨酸激酶, 在巨噬细胞中表达, 激活 CSF1R 的配体有两个: M-CSF (CSF-1) 和 IL-34^[8]。作为受体酪氨酸激酶家族 (receptor tyrosine kinases, RTK), CSF1R 磷酸化位点可作为多种激酶的停靠位点, 其中包括 Src 家族激酶 (Src family kinase, SFK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 的 p85 亚基等^[9]。CSF1R 异常表达在多种肿瘤细胞的分化和增殖中起着关键作用^[10], 如乳腺癌^[11]、胃癌^[12]和肺癌^[13]。急性髓系白血病细胞系 GDM-1 伴有 CSF1R 基因突变, 本研究主要通过蛋白激酶抑制方法来研究急性髓系白血病细胞系 GDM-1 的增殖机制, 并探讨促进 GDM-1 增殖的主要信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: 人急性髓性白血病细胞系 GDM-1、人单核巨噬细胞系 THP-1 (ATCC 公司); 细胞培养所用培养基含有 10% 的胎牛血清的 RPMI Medium 1640, 细胞培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中。

1.1.2 主要试剂: 蛋白激酶抑制剂 (protein kinase inhibitors, PKIs) 见表 1 (Selleckchem 公司); 将抑制

剂粉末溶于 DMSO, 配置浓度为 20 mmol/L 的储备液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。细胞培养基 RPMI Medium 1640 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (赛澳美细胞技术有限公司); 细胞因子 M-CSF (Bio-technique 公司); CCK8、抗兔二抗 (博士德生物工程有限公司); DMSO (北京索莱宝科技有限公司); GAPDH (Proteintech 公司); p-Src、ERK、p-ERK (Cell Signaling Technology 公司); Src (上海生工生物工程有限公司)。

表 1 蛋白激酶抑制剂

Table 1 Proteinkinase inhibitors

inhibitor	targets
dasatinib	SFK
bosutinib	SFK
sorafenib	RAF-1, B-raf, c-KIT, FLT3
BMS-754807	IR/IGFR
gefitinib	EGFR
linifanib	CSF1R, FLT3, KIT
WH-4-023	Lck/Src
NVP-TAE-684	ALK
nilotinib	Bcr-Abl
lapatinib	EGFR, ErbB2
HG6-64-1	B-raf

1.2 方法

1.2.1 蛋白激酶抑制实验: 以 8 000 个/孔的细胞数接种 GDM-1 细胞于 96 孔板, 设置药物实验组、对照组、空白组, 每组设置 3 个重复孔, 其中药物实验组设置 8 个药物浓度, 最高药物浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ (药物浓度梯度为 20、5、1.25、0.312 5、0.078 125、0.019 531、0.004 883、0.001 22 $\mu\text{mol/L}$)。72 h 之后 CCK8 法计算细胞在不同药物浓度作用下 GDM-1 的抑制率。

1.2.2 细胞因子促增殖实验: 于 96 孔板以 5 000

个/孔的细胞数接种 GDM-1、THP-1 细胞, 设置 M-CSF 细胞因子实验组、对照组, 每组设置 3 个重复孔, 其中细胞因子实验组为 2% FBS-RPMI-1640 培养基下加入细胞因子浓度为 20 ng/mL, 以及相对应的对照组。72 h 之后 CCK8 法分析在生长因子作用下 GDM-1 的增殖情况。

1.2.3 蛋白激酶抑制剂联合细胞因子实验: 以 5 000 个/孔的细胞数接种 GDM-1 细胞于 96 孔板中, 设置对照组, 10% FBS-RPMI1640; 细胞因子组: 10% FBS-RPMI1640 + CSF; 药物组: 10% FBS-RPMI1640+PKIs; 细胞因子联合药物实验组: 10% FBS-RPMI 1640 + CSF + PKIs, 其中 CSF1 终浓度为 20 ng/mL; bosutinib 终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, HG6-64-1 终浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。72 h 后 CCK 法检测 4 组细胞的增殖情况。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达: 将 GDM-1 在不同的蛋白激酶抑制剂作用 1 h, 药物组有 linifanib (0.1 $\mu\text{mol/L}$)、bosutinib (0.1 $\mu\text{mol/L}$)、sorafenib (0.1 $\mu\text{mol/L}$) 对照组仅添加 DMSO 处理相同时间。2 h 后提取细胞蛋白质, 测定蛋白质浓度后 SDS-PAGE 电泳分离, 半干转法将凝胶中的蛋白质转至 PVDF 膜, 0.5% BSA 室温振荡封闭 2 h; 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 相对应二抗室温振荡孵育 1.5 h 后采用化学发光法检测。

1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 17.0 进行数据分析, 两组均值显著性差异的统计方法采用

独立样本 t 检验, 多重比较采用 one-way ANOVA 检验。

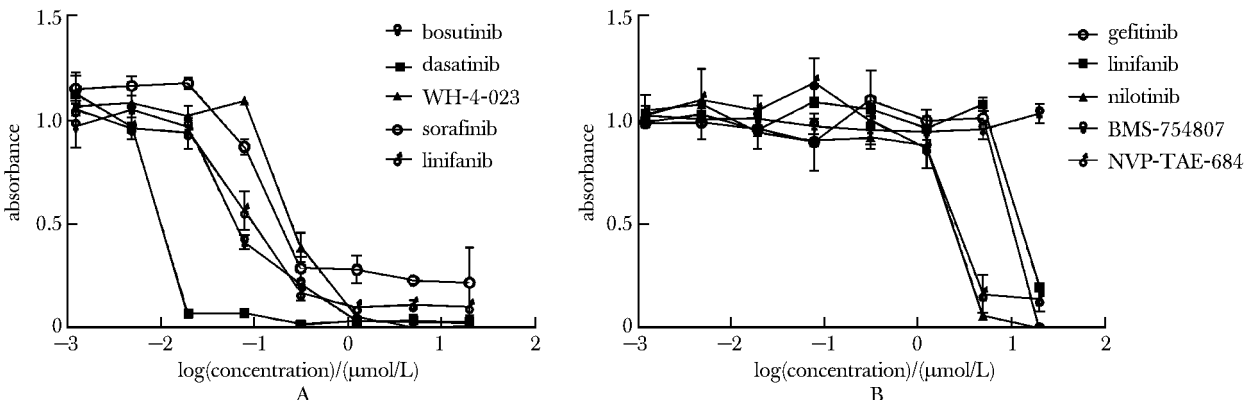
2 结果

2.1 酪氨酸激酶抑制实验分析 GDM-1 细胞增殖机制

选择 10 种蛋白激酶抑制剂作用于 GDM-1 细胞, 将药物对细胞的作用分为两类: 敏感以及不敏感。计算这 10 种药物作用于细胞的半抑制浓度 IC_{50} (表 2), 分析结果将 IC_{50} 低于 1 $\mu\text{mol/L}$ 能够抑制细胞增殖的蛋白激酶抑制剂定为敏感, 能够抑制细胞增殖的药物主要有 linifanib (CSF1R), bosutinib (SFK), WH-4-023 (Lck/Src)、dasatinib (SFK) 以及 sorafenib (B-raf, ERK) (图 1)。

表 2 10 种 PKIs 作用靶点及抑制 GDM-1 细胞的 IC_{50} 值
Table 2 Targets and IC_{50} values for GDM-1 cells of 10 PKIs

inhibitor	target	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$
dasatinib	SFK	0.01
bosutinib	SFK	0.07
linifanib	CSF1R, FLT3, KIT	0.13
WH-4-023	Lck/Src	0.25
sorafenib	B-raf, RAF-1, c-KIT, FLT3, ERK/MEK	0.12
BMS-754807	IR/IGFR	>20.00
NVP-TAE-684	ALK	3.41
nilotinib	Bcr-Abl	2.97
lapatinib	EGFR, ErbB2	14.91
gefitinib	EGFR	12.69



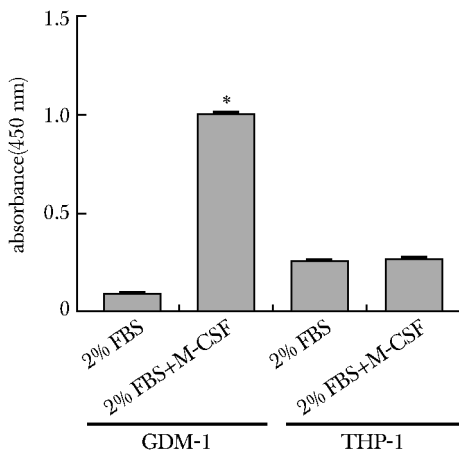
A. five kinds of PKIs sensitive to GDM-1 cells after incubation 72 hours; B. five kinds of PKIs insensitive to GDM-1 cells after incubation 72 hours

图 1 10 种 PKIs 对 GDM-1 细胞增殖的抑制作用

Fig 1 Inhibition effect of 10 kinds of PKIs on the proliferation of GDM-1 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.2 M-CSF 细胞因子促 GDM-1 细胞增殖

在低浓度胎牛血清(2% FBS) RPMI-1640 培养基中加入 M-CSF 20 ng/mL 作用 72 h, CSF1R 突变型 GDM-1 细胞增殖明显增加(图 2), 增长率为对照组的 11.3 倍; 而 CSF1R 野生型 THP-1 细胞在细胞因子作用下增殖效果与对照组相比差异无统计学意义。



* $P < 0.001$ compared with 2% FBS

图 2 M-CSF 对 GDM-1 及 THP-1 细胞增殖的影响

Fig 2 Effects of M-CSF on proliferation of GDM-1 and THP-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

2.3 Western blot 检测信号通路中蛋白激酶磷酸化水平

Western blot 分析激酶抑制剂 linifanib、bosutinib、dasatinib、sorafenib 作用下细胞下游信号通路中蛋白激酶磷酸化水平的改变(图 3A), 结果表明: linifanib

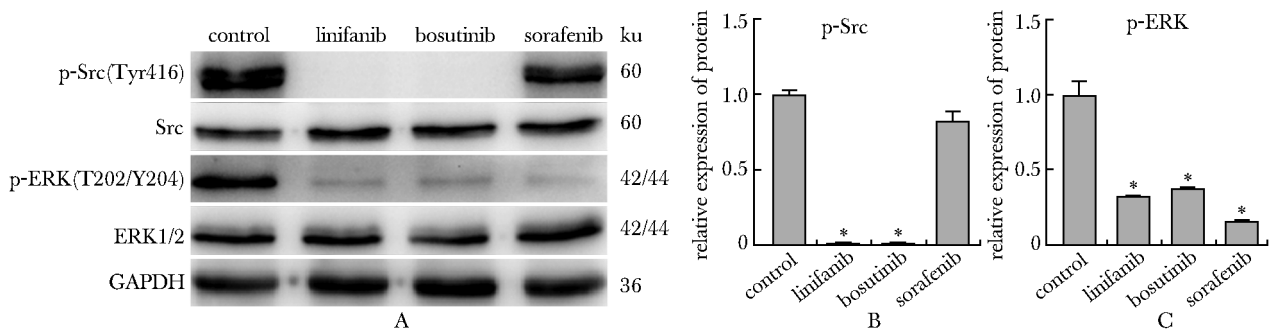
作用下 Src 磷酸化水平显著下降($P < 0.01$)(图 3B), 同时 ERK 的磷酸化水平也下降(图 3C); bosutinib 也能够抑制 ERK 的磷酸化水平($P < 0.01$); 当应用 ERK 抑制剂 sorafenib 作用于 GDM-1 细胞, 结果显示: Src 磷酸水平未见明显改变, ERK 磷酸化水平明显下降($P < 0.01$)。

2.4 蛋白激酶抑制剂联合 M-CSF 细胞因子对 GDM-1 细胞增殖的影响

酪氨酸激酶抑制实验得到 SFK 抑制剂 bosutinib、braf 的抑制剂 sorafenib 对 GDM-1 敏感, sorafenib 的作用靶点众多, 而 HG6-64-1 是 braf 高选择性的激酶抑制剂。单独应用 bosutinib 或联合应用 bosutinib 与 M-CSF, GDM-1 细胞增殖与对照组相比都处于完全抑制状态(图 4A); 而单独使用 HG6-64-1, GDM-1 细胞增殖与对照组相比受到抑制, 联合 HG6-64-1 与 M-CSF 时 GDM-1 细胞增殖能够恢复(图 4B)。

3 讨论

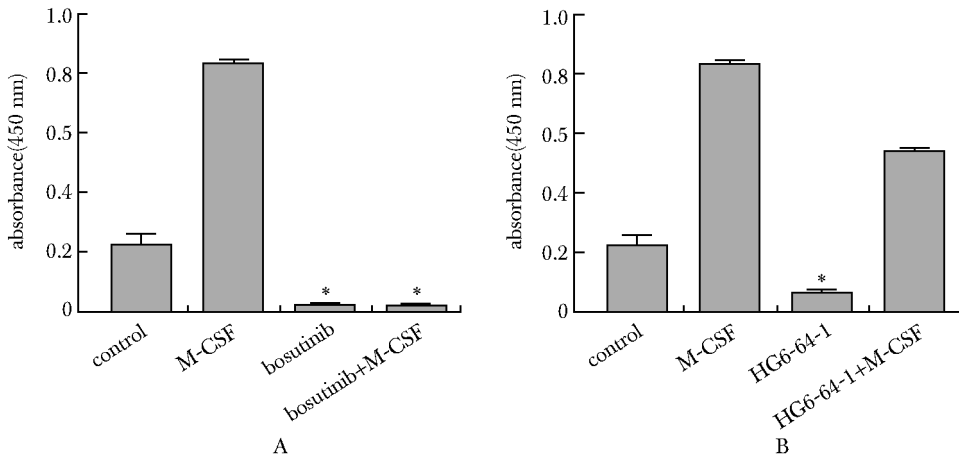
本研究通过 PKIs 研究急性髓系白血病细胞系 GDM-1 的增殖机制, 蛋白激酶抑制实验筛选出能够抑制 GDM-1 细胞增殖的靶向药物有 linifanib, bosutinib, WH-4-023、dasatinib 以及 sorafenib。dasatinib、bosutinib 抑制效果最佳, 是 SFK 选择性较高的激酶抑制剂^[14], 说明 Src 信号通路在 GDM-1 的增殖中有重要作用。通过查询 COSMIC 数据库^[15](https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/sample/overview?id=906870), GDM-1 细胞 Src 激酶家族中各成员均



A. Western blot from whole GDM-1 cell lysates treated with linifanib, bosutinib, sorafenib for 24 hours; B. normalized to GAPDH loading control and to the level of Src, the expression levels of phosphorylation Src, * $P < 0.01$ compared with control group; C. normalized to GAPDH loading control and to the level of ERK1/2, the expression levels of phosphorylation ERK, * $P < 0.01$ compared with control group

图 3 激酶抑制剂作用于 GDM-1 细胞时内激酶磷酸化水平的变化

Fig 3 Phosphorylation levels of key protein kinases in GDM-1 cells treated with kinase inhibitors ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A. bosutinib inhibited cell proliferation compared with control and simulating by M-CSF, $^*P < 0.001$ compared with control group; B. HG6-64-1 inhibited cell proliferation compared with control, it did not inhibit cell proliferation when combined with simulating by M-CSF, $^*P < 0.001$ compared with control group

图4 PKIs及细胞因子M-CSF联合作用于GDM-1细胞

Fig 4 GDM-1 cell proliferation treated with bosutinib, HG6-64-1 and M-CSF ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

未存在突变^[16]。

Chase等^[17]的研究中发现GDM-1细胞在激酶抑制剂imatinib作用下能够通过抑制CSF1R的磷酸化水平来抑制细胞增殖。Makishima等^[18]的研究结果证明dasatinib能够抑制GDM-1细胞的增殖,原因在于其能够抑制众多激酶包括SFK和CSF1R的活性,本实验结果与文献报道相一致。在CSF1R的激酶抑制剂linifanib^[19-20]作用下Western blot实验结果证明在GDM-1细胞中CSF1R通过调控Src及MAPK信号通路的活性来促进细胞增殖。

GDM-1细胞能够在M-CSF激活CSF1R作用下刺激细胞增殖,也证明CSF1R在GDM-1细胞增殖中的重要作用。Chase等^[17]的研究中对细胞系GDM-1 CSF1R进行测序得到在第12外显子中存在2003T>G错义突变,该突变会导致的氨基酸变化为Y571D。伴随该突变使得CSF1R处于一个持续高活性状态,尤其是在细胞因子M-CSF刺激下。本实验结果也显示在GDM-1细胞中加入细胞因子M-CSF,细胞增殖明显升高,因此,伴CSF1R-Y571D突变使CSF1R增高对细胞因子M-CSF敏感性且受体处于持续高活性状态。

在蛋白激酶抑制实验中也观察到sorafenib同样

可以抑制GDM-1细胞的增殖,说明MAPK信号通路在GDM-1细胞的增殖中也发挥重要作用。由于sorafenib能够抑制的激酶靶点众多^[21],HG6-64-1作为Braf的高选择性抑制剂来验证GDM-1细胞中MAPK信号通路的重要性。本研究发现当bosutinib联合细胞因子M-CSF,GDM-1细胞的增殖被抑制,而HG6-64-1联合M-CSF对细胞增殖作用不能被抑制,说明当Src信号通路被抑制后CSF1R不能够通过激活MAPK信号通路来促进细胞的增殖;而当MAPK信号通路被抑制,CSF1R仍可通过激活Src信号通路的活性来促进细胞增殖。因此,Src信号通路是GDM-1细胞增殖的关键通路,而MAPK信号通路是GDM-1细胞增殖可替代的通路。

综上,GDM-1细胞存在CSF1R-Y571D突变,该突变使得CSF1R自身活性提高,并招募下游信号分子,尤其是Src家族激酶,通过激活Src信号通路及MAPK信号通路,促进细胞增殖。本文通过寻找在白血病细胞增殖中能够引起下游信号通路活性增高的突变,为急性髓系白血病的增殖机制研究提供研究思路,也为急性髓系白血病的治疗提供新的靶标。

参考文献:

- [1] Kayser S, Levis MJ. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia[J]. *Br J Haematol*, 2018, 180: 484-500.
- [2] Tian Y, Wang G, Hu Q, *et al.* AML1/ETO trans-activates c-KIT expression through the long range interaction between promoter and intronic enhancer[J]. *J Cell Biochem*. 2018, 119:3706-3715.
- [3] Ronchini C, Brozzi A, Riva L, *et al.* PML-RARA-associated cooperating mutations belong to a transcriptional network that is deregulated in myeloid leukemias[J]. *Leukemia*, 2017, 31:1975-1986.
- [4] Marschalek. MLL leukemia and future treatment strategies [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2015, 348:221-228.
- [5] 弓晓媛, 刘凯奇, 魏述宁, 等. MLL 基因重排成人急性髓系白血病的特征和预后分析[J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39:9-14.
- [6] Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, *et al.* Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36:231-237.
- [7] Zhong WZ, Wang Q, Mao WM, *et al.* Gefitinib versus vinorelbine plus cisplatin as adjuvant treatment for stage II-III A (N1-N2) EGFR-mutant NSCLC (ADJUVANT/CTONG1104): a randomised, open-label, phase 3 study [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19:139-148.
- [8] Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5:53-53.
- [9] Achkova D, Maher J. Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44:333-341.
- [10] Niehus SE, Tran DDH, Mischak M, *et al.* Colony-stimulating factor-1 receptor provides a growth advantage in epithelial cancer cell line A431 in the presence of epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib[J]. *Cell Signal*, 2018, 51:191-198.
- [11] Patsialou A, Wang Y, Pignatelli J, *et al.* Autocrine CSF1R signaling mediates switching between invasion and proliferation downstream of TGF β in claudin-low breast tumor cells[J]. *Oncogene*, 2015, 34:2721-2731.
- [12] Okugawa Y, Toiyama Y, Ichikawa T, *et al.* Colony-stimulating factor-1 and colony stimulating factor-1 receptor co-expression is associated with disease progression in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53: 737-749.
- [13] Inamura K, Shigematsu Y, Ninomiya H, *et al.* CSF1R-expressing tumor-associated macrophages, smoking and survival in lung adenocarcinoma: analyses using quantitative phosphor-integrated dot staining [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10:1-15.
- [14] Rensing Rix LL, Rix U, Colinge J, *et al.* Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2009, 23: 477-485.
- [15] Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, *et al.* COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: D777-D783.
- [16] Sondka Z, Bamford S, Cole CG, *et al.* The COSMIC cancer gene census: describing genetic dysfunction across all human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 696-705.
- [17] Chase A, Schultheis B, Kreil S, *et al.* Imatinib sensitivity as a consequence of a CSF1R-Y571D mutation and CSF1/CSF1R signaling abnormalities in the cell line GDM1[J]. *Leukemia*, 2009, 23: 358-364.
- [18] Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, *et al.* CBL mutation-related patterns of phosphorylation and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors [J]. *Leukemia*, 2012, 26: 1547-1554.
- [19] Chen J, Guo J, Chen Z, *et al.* Linifanib (ABT-869) potentiates the efficacy of chemotherapeutic agents through the suppression of receptor tyrosine Kinase-mediated AKT/mTOR signaling pathways in gastric cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29382.doi:10.1038/srep29382.
- [20] Albert DH, Tapang P, Magoc TJ, *et al.* Preclinical activity of ABT-869, amultitargeted receptor tyrosine kinaseinhibitor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5:995-1006.
- [21] Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, *et al.* New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 8: 614-622.