维奈克拉联合泽布替尼克服急性髓系白血病细胞基质黏附介导的耐药机制

林凯婷，李晓静，王匡非，肖启荣，林晓斌，陈萍

摘要： **目的**　探讨维奈克拉联合泽布替尼对骨髓微环境中急性髓系白血病(AML)细胞的杀伤作用及相关分子机制。　**方法**　建立 HS-5 基质细胞与 AML 细胞(KG-1/THP-1)共培养模型，模拟骨髓微环境。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和 Annexin V-APC/7-AAD 双染法检测药物对细胞增殖和凋亡的影响。通过翻译后修饰(TMT)标记定量磷酸化蛋白质组学分析差异表达的蛋白，并进行生物信息学分析；Western-blot 分析关键信号通路蛋白的磷酸化水平。　**结果**　维奈克拉联合泽布替尼对共培养后的 AML 细胞表现出协同抗肿瘤效应，显著抑制增殖并诱导凋亡。磷酸化蛋白质组学鉴定出的关键差异蛋白主要富集于 PI3K/AKT、BCL-2 及 BTK 通路。Western-blot 证实，联合用药协同下调 p-BTK、p-AKT/p-GSK3β、p-STAT3、p-CDK1 及 p-ERK 等的磷酸化水平。　**结论**　维奈克拉协同泽布替尼杀伤骨髓微环境的 AML 细胞，可能与抑制 p-BTK、p-AKT/p-GSK3β、p-STAT3、p-CDK1、p-ERK 等信号通路分子有关。

关键词： 维奈克拉；泽布替尼；骨髓基质细胞；急性髓系白血病

文献标志码： A　　**文章编号：** 1672-4194(2025)06-0361-10

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia，AML)是最常见的成人造血系统恶性肿瘤。随着化疗方案的优化及靶向新药的涌现，AML 患者的缓解率不断提高，无病生存期也得以延长，但远期复发仍是棘手问题[1]。近年来，靶向药物(如 BCL-2 抑制剂维奈克拉)的应用显著改善了 AML 的治疗格局，但其疗效常因耐药而受限[2-3]。骨髓微环境为白血病细胞提供的“庇护所”效应——即细胞黏附介导的耐药，是导致靶向治疗失败的关键非遗传机制。AML 细胞通过与基质细胞的黏附，激活一系列细胞内生存信号通路，使其进入休眠状态并逃避药物诱发的细胞凋亡[4-5]。维奈克拉作为强效的促凋亡剂，其单一作用易被微环境激活的替代信号[如髓样细胞白血病因子-1(myeloid cell leukemia-1，MCL-1)上调、布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase，BTK)通路激活等]所抵消[2,6-7]。泽布替尼作为一种高选择性的 BTK 抑制剂，已被证实在 AML 中介导细胞黏附与生存[8-9]。因此推测，维奈克拉与泽布替尼联合用药可能产生协同效应[10]，通过同时攻击细胞内凋亡通路和微环境外生存信号，实现对“基质庇护”下 AML 细胞的彻底清除。然而，目前对联合方案克服基质细胞耐药的有效性及深层分子机制尚缺乏系统研究。本研究旨在明确维奈克拉联合泽布替尼在体外 AML 基质共培养模型中的协同抗白血病效应，并深入阐释其逆转黏附耐药的作用机制，为克服 AML 的临床耐药提供创新的联合治疗策略和坚实的理论基础。

收稿日期： 2025-08-27
资助项目： 国家自然科学基金项目(81800136)；国家临床重点专科建设项目(闽卫医政 2021-76 号)；福建省恶性血液病临床医学研究中心项目(2020Y2006)；福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2021GGA019)；福建省科技创新联合资金攀登项目(2020Y9097)
作者单位： 福建医科大学 附属协和医院，福建省血液病研究所，福建省血液病学重点实验室，福州　350001
作者简介： 林凯婷，女，医学硕士
通信作者： 陈萍. Email：lycp428@163.com

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞株　AML 细胞系 KG-1 和 THP-1(上海中国科学院细胞库)，在含 10%胎牛血清(美国 Gemini 公司)、100 U/mL 青/链霉素(天津灏洋生物有限公司)的 RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司)中培养。人基质细胞系 HS-5(美国 ATCC 公司)，在含 10%胎牛血清、100 U/mL 青/链霉素的 DMEM 培养基(高糖，美国 Hyclone 公司)中培养。细胞均严格按照细胞库的要求进行培养，培养条件均为 37 ℃、体积分数为 0.05 的 CO_2、饱和湿度。

1.1.2　药物试剂　维奈克拉(Venetoclax，目录号 S1188，美国 Selleck Chemicals 公司，原药)与泽布替尼(Zanubrutinib，目录号 BGB-3111，北京百济神州，商品药)均溶于二甲基亚砜(dimethyl surfoxide，DMSO)中，分别配制成 10、20 mmol/L 的储备液，分装后于 −80 ℃保存。进行细胞实验时，使用完全培养基将储备液稀释至所需工作浓度。

1.2　方法

1.2.1　构建共培养体系　在共培养实验前，将状态良好的 HS-5 基质细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种

于 6 孔板中，于 37 ℃、体积分数为 0.05 的 CO_2 中培养过夜至细胞贴壁率达 70%。随后按 1∶2 的比例将 AML 细胞（1×10^5 个/mL）加入已贴壁的基质层，共培养 48 h。共培养结束后，使用 CD45 微珠（德国 Miltenyi Biotec 公司）通过阳性选择法分离 AML 细胞，用于后续功能检测。

1.2.2 细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）法检测细胞活力 将 AML 细胞（5×10^5 个/孔，单培养或共培养）置于 96 孔板中，给予泽布替尼（50、100、150 μmol/L）和维奈克拉（2、4、6 μmol/L）培养 48 h，终止培养前加入 10 μL CCK-8 工作液（上海碧云天生物科技有限公司）继续孵育 2 h。采用酶标仪（Bio-Tek Epoch，美国安捷伦科技有限公司）检测 450 nm 和 630 nm 处的吸光度。

1.2.3 Annexin V-APC/7-AAD 检测细胞凋亡 细胞凋亡采用 Annexin V-APC/7-AAD 双染色试剂盒（上海碧云天生物科技有限公司）按说明书进行定量检测。流式细胞术使用 BD Accuri C6 Plus 系统（美国 BD Biosciences 公司）完成，数据分析通过 FlowJo 软件（v10.8.1，美国 Tree Star 公司）进行。

1.2.4 翻译后修饰（post-translational modification，TMT）标记定量磷酸化蛋白质组学分析 收集单培养或共培养的 KG-1 细胞，裂解后进行二喹啉甲酸法定量。取等量蛋白质（400 μg）进行丙酮沉淀，经还原、烷基化处理后，进行 TMT 标记。标记后的肽段经脱氧胆酸钠去除、脱盐及反相-反相色谱分级，继而富集磷酸化肽段，以备液相色谱-质谱联用分析。质谱原始数据使用 MaxQuant（v1.6.7.0，德国马克斯·普朗克生物化学研究所）进行搜库与定量。对获得的定量结果进行标准化处理以校正系统误差。随后，基于 2 组生物学重复，采用 t 检验进行差异分析。将满足表达倍数变化≥1.2 且 $P_{校正}<0.5$ 的磷酸化位点定义为显著差异磷酸化位点，并用于后续的基因本体论功能富集分析与蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络构建。

1.2.5 免疫印迹技术（Western-blot）检测各信号分子蛋白水平 Western-blot 实验按照标准程序[11]进行，使用的特异性抗体包括：Actin、STAT3、p-STAT3、AKT、p-AKT、ERK1/2、p-ERK1/2、BTK、p-BTK、CDK1、p-CDK1、GSK3β、p-GSK3β，均购自英国 Abcam 公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。独立实验重复 3 次，数据均以 $\overline{X}\pm S$ 表示。多组间均数比较采用方差分析，2 组间均数比较用 Student's t 检验。双侧检验，$P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 维奈克拉和泽布替尼联合给药对 AML 细胞株增殖的影响 根据预实验结果以及文献报道[12-13]，采取泽布替尼（50、100、150 μmol/L）和维奈克拉（KG-1：2、4、6 μmol/L；THP-1：0.5、1、2 μmol/L）处理共培养前后的 AML 细胞 24 h，结果显示，两药分别单用对 KG-1 和 THP-1 细胞均表现出一定的增殖抑制作用，且该效应呈浓度依赖性（图 1）。然而，与单独培养组比较，黏附共培养组的细胞对药物的敏感性显著下降（图 1）。进一步采用 50 μmol/L 的泽布替尼以及针对不同细胞系（KG-1：2 μmol/L；THP-1：1 μmol/L）的维奈克拉，分别或联合处理共培养的 AML 细胞，结果显示，联合用药对黏附共培养的 AML 细胞产生了显著的协同抑制作用，且该效应随作用时间的延长而持续增强（图 2A、B）。细胞生存曲线进一步证实，这种协同效应具有时间依赖性（图 2C～F）。

进一步采用金氏公式[14]计算 Q 值，判断维奈克拉与泽布替尼的联合作用（24 h），结果显示，两药联合使用后 $Q>1.15$，联合作用为协同（表 1）。

$$Q=E_{ab}/(E_a+E_b-E_aE_b)$$

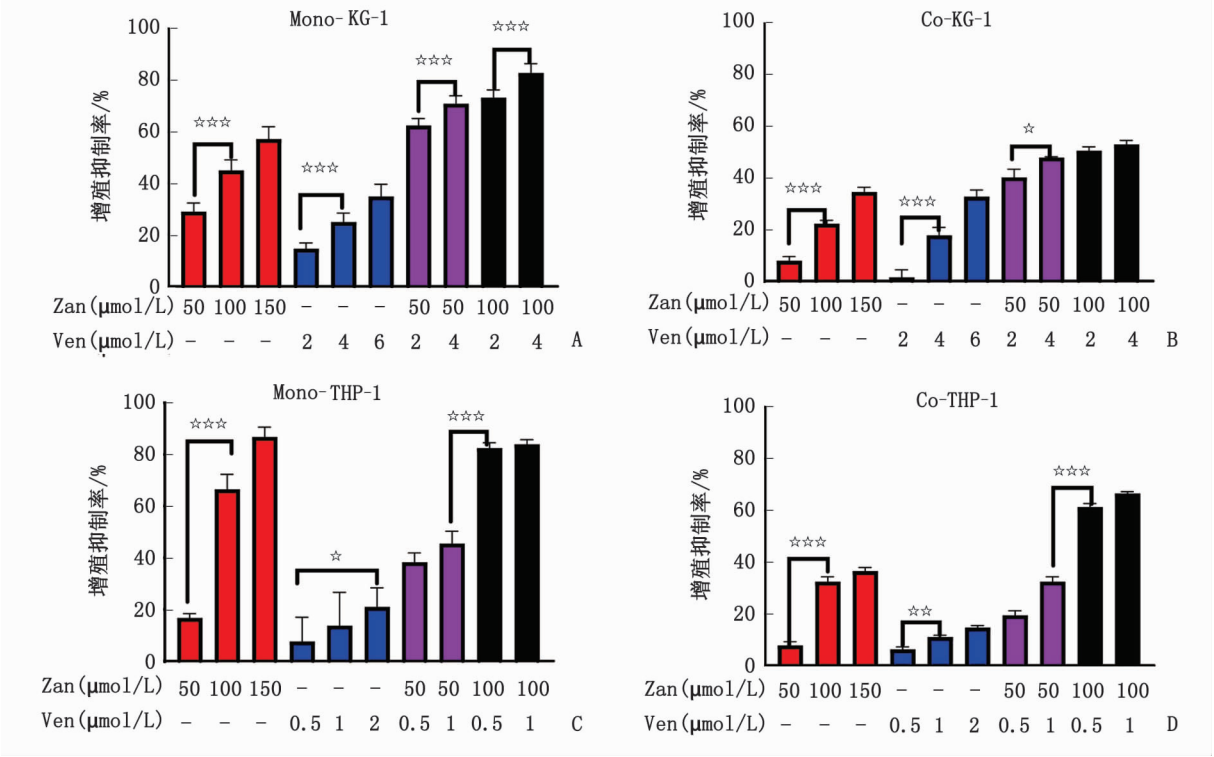
E_a 和 E_b 代表各药单用抑制率，E_{ab} 为两药联用抑制率。

表 1 维奈克拉联合泽布替尼对 KG-1 和 THP-1 细胞的作用

Tab. 1 The effect of Venetoclax combined with Zanubrutinib on KG-1 and THP-1 cells

细胞	维奈克拉（μmol/L）+泽布替尼（μmol/L）	Q
Mono-KG-1	2+50	1.579 7
	4+50	1.514 4
	2+100	1.433 3
	4+100	1.409 4
Co-KG-1	2+50	4.411 0
	4+50	1.981 8
	2+100	2.177 6
	4+100	1.474 0
Mono-THP-1	0.5+50	1.665 3
	1+50	1.623 5
	0.5+100	1.193 4
	1+100	1.180 2
Co-THP-1	0.5+50	1.435 4
	1+50	1.814 8
	0.5+100	1.674 9
	1+100	1.671 8

联合效应定义为：$Q\leqslant0.85$ 表示拮抗，$0.85<Q\leqslant1.15$ 表示相加，$Q>1.15$ 表示协同。Mono：单培养；Co：共培养。



AML：急性髓系白血病；Zan：泽布替尼；Ven：维奈克拉。KG-1(A、B)和 THP-1(C、D)细胞分别用不同浓度的泽布替尼(50、100、150 μmol/L)和维奈克拉(KG-1：2、4、6 μmol/L；THP-1：0.5、1、2 μmol/L)处理 24 h，通过单培养(A、C)和共培养(B、D)实验评估细胞增殖情况。组间比较，☆：$P<0.05$，☆☆：$P<0.01$，☆☆☆：$P<0.001$。

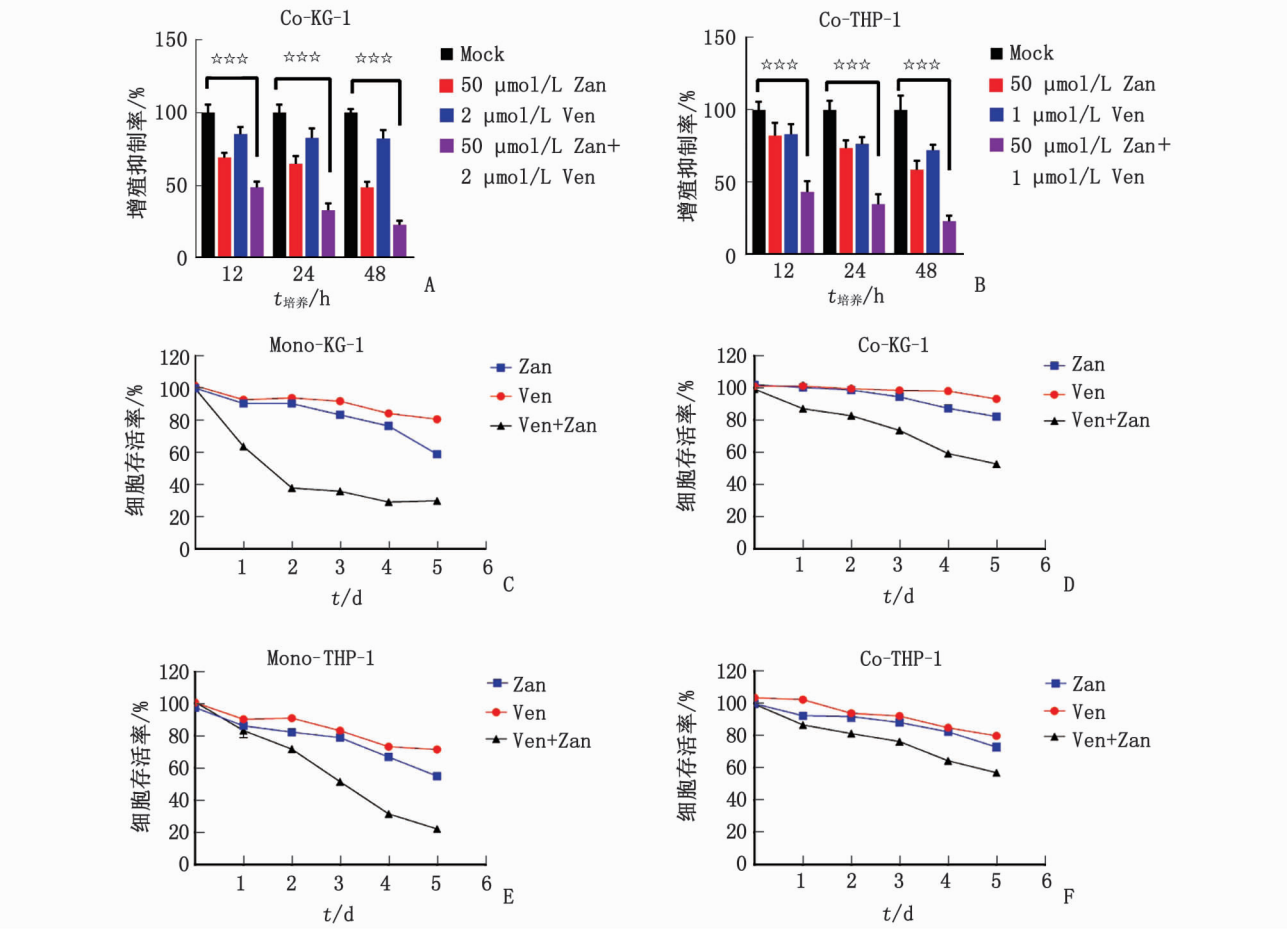
图 1　泽布替尼和维奈克拉对单培养和共培养条件下 AML 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1　Inhibitory effects of Zanubrutinib and Venetoclax on AML cell proliferation under mono-culture and co-culture conditions

2.2　维奈克拉与泽布替尼联合给药对 AML 细胞凋亡的影响　维奈克拉与泽布替尼处理 24 h 后，单培养的 KG-1 和 THP-1 细胞发生凋亡，且呈现浓度依赖性(图 3A、B)。进一步在共培养模型中进行验证(图 3C、D)，联合用药同样显著提升细胞凋亡水平。在 Co-KG-1 中，联合用药使凋亡率由维奈克拉单药的 13.03%提升至 29.50%；在 Co-THP-1 中，则由 16.47%提升至 23.08%，表明联合策略在微环境共培养条件下仍具有显著促凋亡作用。

2.3　TMT 标记定量磷酸化蛋白质组学分析　分析结果显示，在与基质细胞共培养的 KG-1 细胞中($n=3$)共鉴定出 40 个差异磷酸化蛋白(上调、下调各为 20 个)，而整体鉴定结果(蛋白组 639 个，磷酸化多肽 311 条)的错误发现率均<1%(图 4A)。为验证所筛选差异蛋白的合理性和可靠性，进一步基于这些蛋白对各组样本进行层次聚类分析。原始定量值经 *Z*-score 标准化后用于聚类，结果显示所选蛋白可有效区分不同培养条件下的样本(图 4B)。进一步将 PI3K 与 AKT 纳入差异蛋白集，通过 WebGestalt 数据库进行通路富集分析，结果表明，差异蛋白显著富集于细胞周期蛋白依赖性丝氨酸/苏氨酸激酶活性、细胞周期蛋白依赖性激酶活性以及 RNA 结合等通路($P<0.05$)，涉及的关键蛋白包括 CDK1、CDK2、CDK3、GSK3α、GSK3β 等(图 4C)。为深入探索差异蛋白与 PI3K/AKT 信号通路及 BCL-2、BTK 蛋白之间的潜在关联，将 BCL-2、BTK、PI3K 和 AKT 加入差异蛋白集中，构建 PPI 网络，结果如图 5 所示。

2.4　维奈克拉与泽布替尼联合对 AML 细胞 p-BTK、p-AKT/p-GSK3β、p-STAT3、p-CDK1、p-ERK1/2 信号通路相关蛋白的影响　KG-1 细胞(单培养或共培养)分别使用维奈克拉(2 μmol/L)、泽布替尼(50 μmol/L)及其联用方案处理 12、24 h；THP-1 细胞(单培养或共培养)则分别使用维奈克拉(1 μmol/L)、泽布替尼(50 μmol/L)及其联用方案处理 12、24 h。检测目标包括 STAT3、AKT、ERK、BTK、CDK1 及 GSK3β 等蛋白的总量及其磷酸化形式。结果显示，在单培养及黏附共培养的 AML 细胞中，经联合方案处理后，ERK1/2、AKT、BTK、STAT3、GSK3β、CDK1 总蛋白改变不明显，p-AKT、p-BTK、p-STAT3、p-GSK3β、p-CDK1、p-ERK1/2 的表达量均下降，且随着作用时间的延长下降越明显(图 6～7)。



AML:急性髓系白血病;Zan:泽布替尼;Ven:维奈克拉。共培养体系中的 KG-1(A)与 THP-1 细胞(B)经泽布替尼、维奈克拉单药或联合处理后,在指定时间点(12、24、48 h)的细胞增殖情况。单培养或共培养下的 KG-1 细胞(C、D)及 THP-1 细胞(E、F)对药物处理[50 μmol/L 泽布替尼以及针对不同细胞系(KG-1 2 μmol/L;THP-1 1 μmol/L)的维奈克拉]的反应。组间比较,☆☆☆:$P<0.001$。

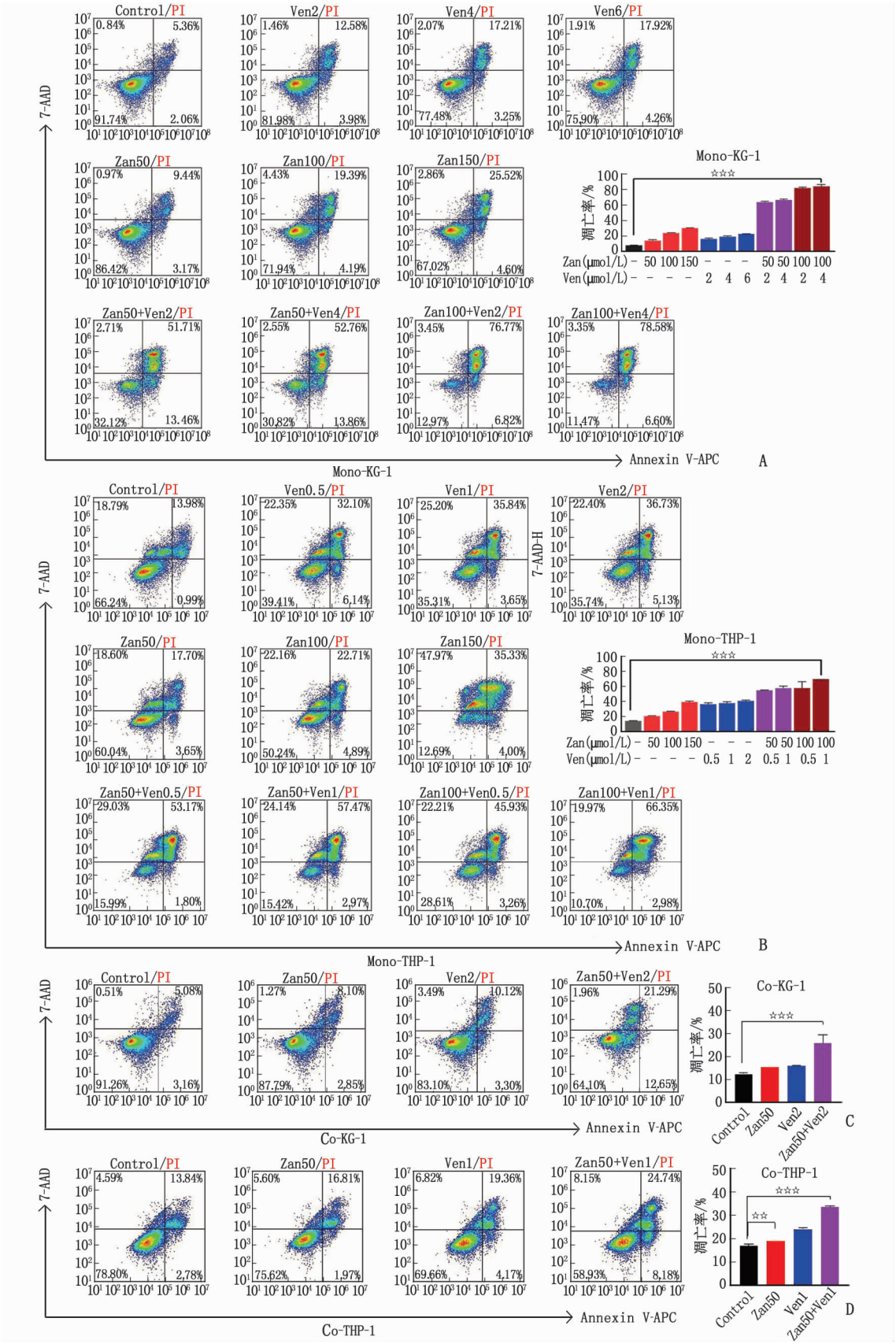
图 2 泽布替尼联合维奈克拉对 AML 细胞增殖的时间依赖性抑制

Fig. 2 Time-dependent inhibition of AML cell proliferation by the combination of Zanubrutinib and Venetoclax

3 讨 论

AML 是一种高度异质性的血液系统恶性肿瘤,其特征是髓系细胞分化受阻、凋亡受抑和恶性增殖。尽管靶向药物可显著提升 AML 的缓解率,但耐药与复发仍是其临床治疗的主要瓶颈[15]。骨髓微环境通过激活细胞内源性抗凋亡信号和诱导代谢重编程为白血病细胞提供庇护,是导致耐药的重要根源[13]。维奈克拉作为高效的 BCL-2 选择性抑制剂,通过诱导线粒体途径凋亡发挥抗白血病作用。然而,其临床疗效常因微环境介导的多种代偿性生存通路激活而受限[16-20]。近年研究发现,BTK 在多种白血病细胞中异常高表达,其活性与细胞黏附介导的生存信号密切相关[8]。泽布替尼作为新一代高选择性的 BTK 抑制剂,可有效阻断 BTK 及其下游信号转导。BTK 抑制剂与 BCL-2 抑制剂的联合治疗策略已在多种血液恶性肿瘤中显示出协同效应[21-24]。因此,本研究设想泽布替尼联合维奈克拉可有效抑制骨髓微环境中 AML 细胞增殖,结果显示,二者联用可有效抑制与基质细胞共培养的 AML 细胞的增殖并诱导其凋亡。为探讨联合用药的具体机制,本研究进一步通过磷酸化蛋白质组学分析对可能参与的信号通路分子进行了筛选。

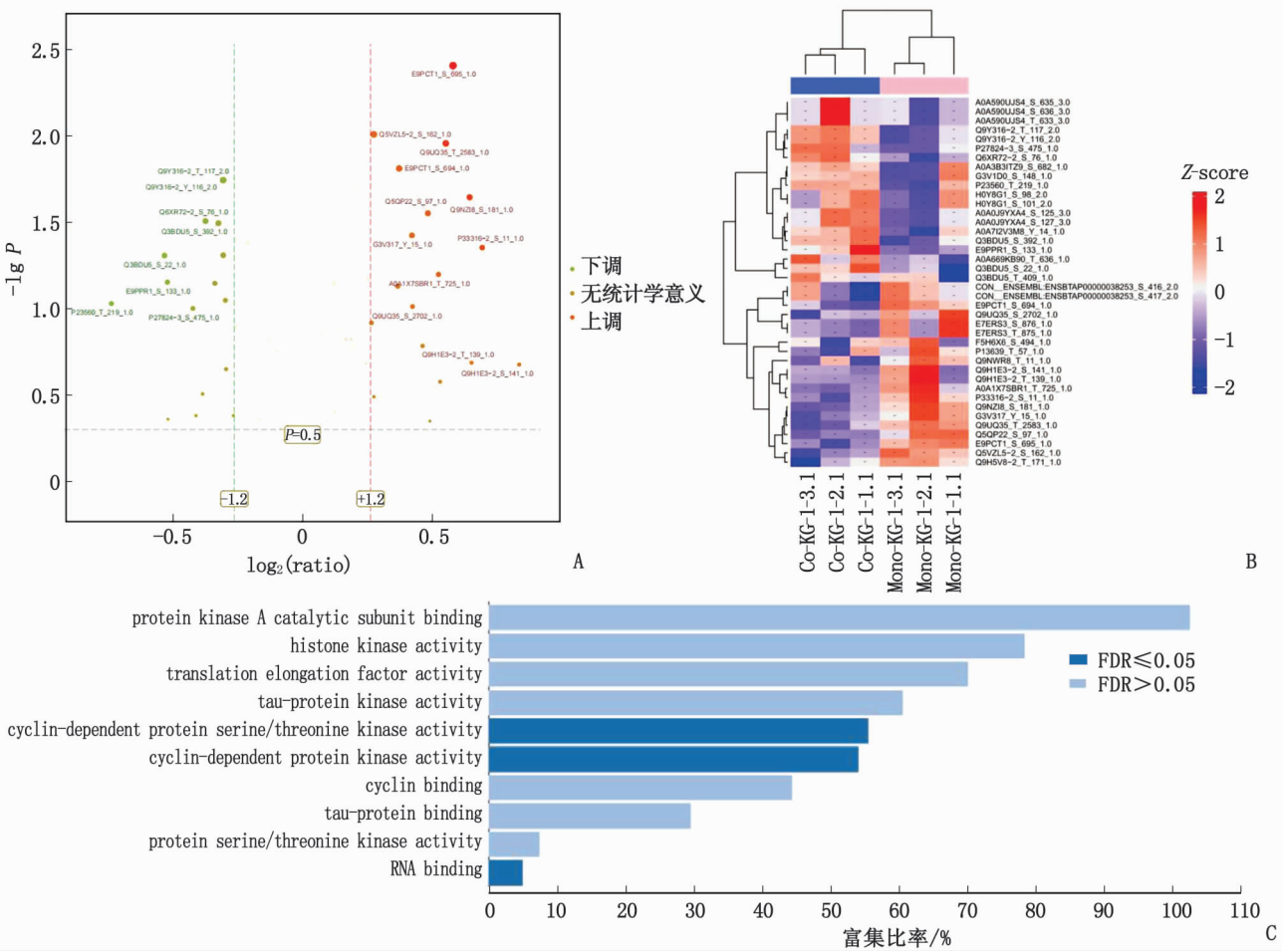
蛋白质磷酸化是一种广泛存在的酶促修饰过程,通过将磷酸基团转移至蛋白质氨基酸残基,动态、可逆地调控细胞内几乎所有的生物学过程。该过程参与信号转导、细胞周期、生长发育及癌症发生发展等重要生命活动,其信号通路失调是癌症等多种疾病的重要标志[25]。课题组前期研究发现,基质微环境诱导的 AML 细胞药物抵抗与黏附共培养过程中 AML 细胞的 PI3K/AKT、JAK/STAT3 等信号通路中重要信号分子的蛋白质磷酸化异常激活有关[6,26],且共培养后 p-AKT、p-STAT3、p-ERK 的表达量发生变化。ZHANG 等[27]也总结出靶向



AML：急性髓系白血病；Zan：泽布替尼；Ven：维奈克拉。单培养 KG-1 细胞(A)、单培养 THP-1 细胞(B)、共培养 KG-1(C)及 THP-1 细胞(D)在单药(泽布替尼或维奈克拉)与联合治疗下的凋亡情况。组间比较，☆☆：$P<0.01$，☆☆☆：$P<0.001$。

图 3　不同药物浓度对 AML 细胞凋亡的影响

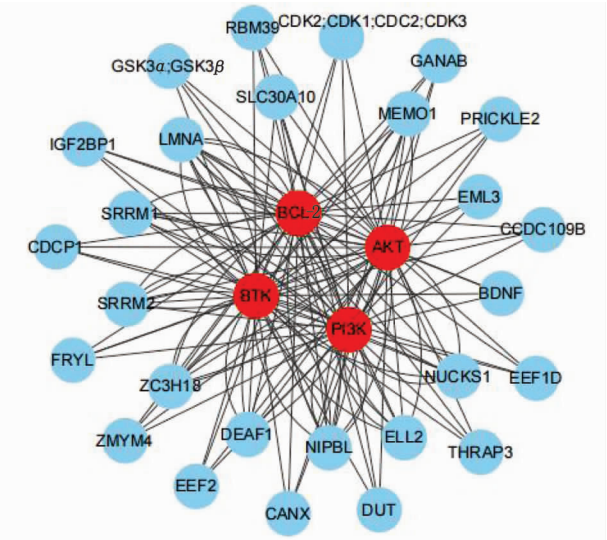
Fig. 3　Effect of drugs on apoptosis of AML cells at different concentrations



GO:基因本体论;FDR:错误发现率。A:差异表达蛋白火山图。实验组中显著上调的蛋白以亮红色标示,显著下调的蛋白以深绿色标示,无统计学差别的蛋白则标记为浅棕色。B:差异蛋白层次聚类分析。顶部色条表示样本分组,下方标注对应样本名称。右侧色阶代表经过 Z-score 标准化的蛋白表达水平,右侧列出的蛋白名称对应差异蛋白列表中的"Track_id"字段。C:差异表达蛋白及 PI3K、AKT 的 GO 富集分析。

图 4 KG-1 细胞在共培养与单培养体系下的差异蛋白表达

Fig. 4 Differential protein expression between co-cultured and monocultured KG-1 cells

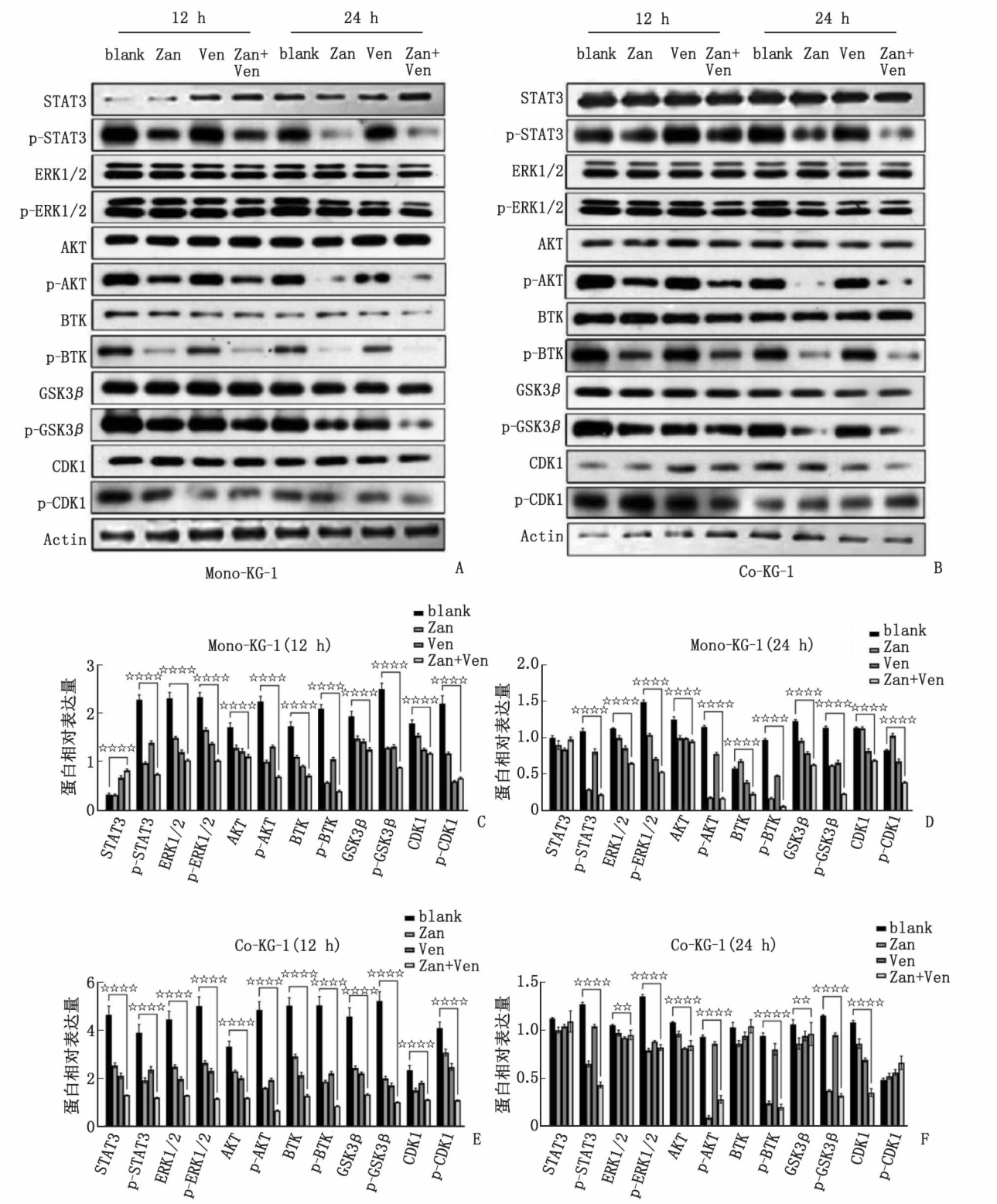


PPI:蛋白-蛋白相互作用。

图 5 整合 BCL-2、BTK、PI3K 和 AKT 至差异蛋白质组的 PPI 网络

Fig. 5 PPI network incorporating BCL-2, BTK, PI3K, and AKT into the differential proteome

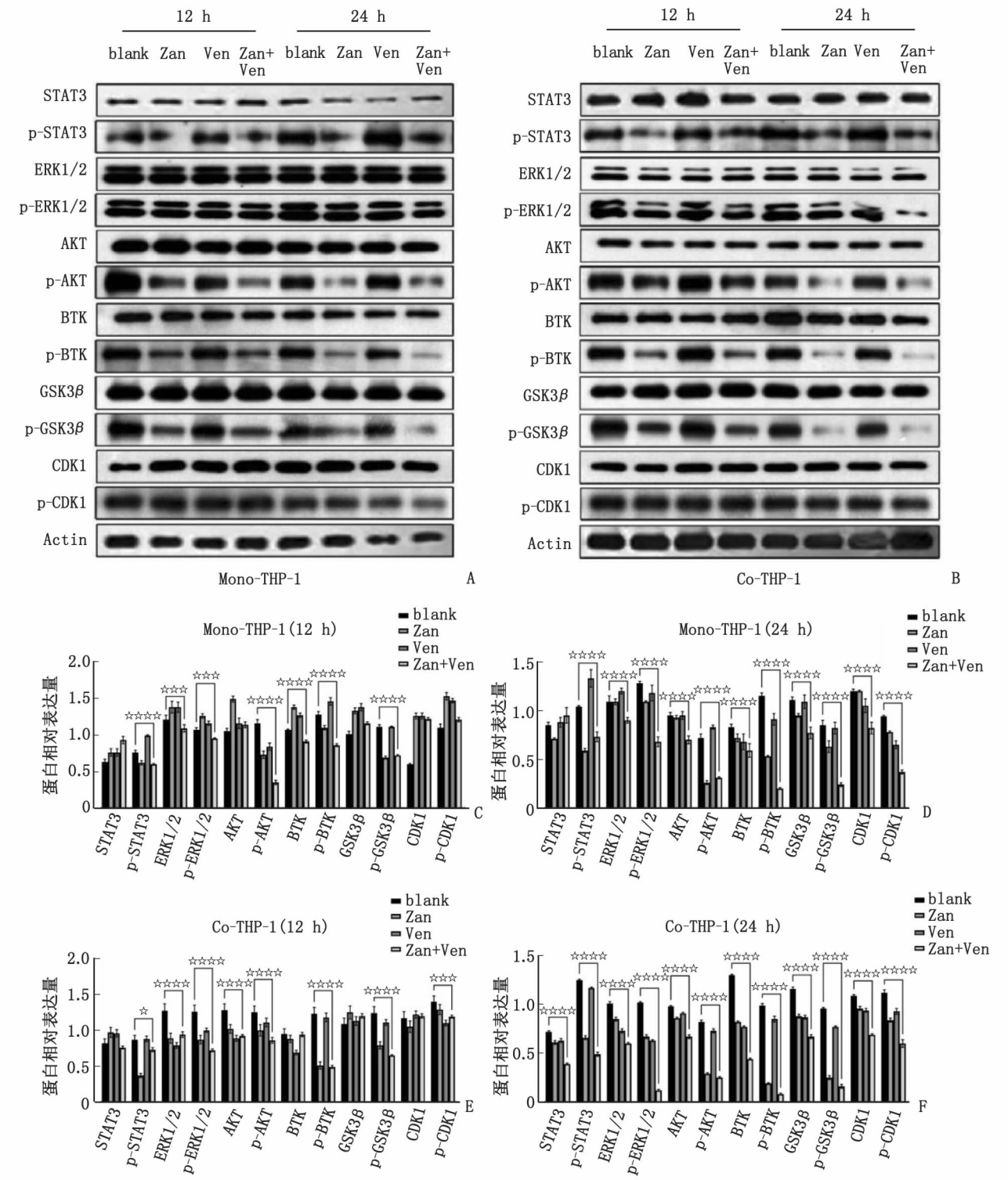
NF-κB、WNT/β-catenin、Hedgehog、Notch、EGFR、TGF/SMAD 和 PPAR 信号通路可靶向杀伤造血干细胞。因此本研究对共培养前后的 KG-1 细胞进行 TMT 标记定量磷酸化蛋白质组学分析,鉴定出一组差异磷酸化蛋白。进一步通过生物信息学分析,结果发现这些蛋白与 PI3K/AKT、BCL-2 及 BTK 等信号分子存在潜在相互作用,并提示 CDK1、CDK2、CDK3、GSK3α、GSK3β 等可能在微环境介导的 AML 耐药中发挥关键作用。为深入探讨药物作用机制,本研究采用 Western-blot 技术检测共培养体系中 AML 细胞相关蛋白的表达变化,结果显示,在联合用药后,ERK1/2、AKT、BTK、STAT3、GSK3β、CDK1 的总蛋白水平未见显著改变,但其磷酸化形式(p-AKT、p-BTK、p-STAT3、p-GSK3β、p-CDK1、p-ERK1/2)表达量均出现下降,且呈时间依赖性增强。虽然已有研究报道 MCL-1 参与维奈克拉耐药[18],但本研究并未发现 MCL-1 磷酸化,



Zan：泽布替尼；Ven：维奈克拉。泽布替尼与维奈克拉对单培养(A)及共培养(B)KG-1 细胞中 STAT3、p-STAT3、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、BTK、p-BTK、CDK1、p-CDK1、GSK3β 及 p-GSK3β 蛋白表达的影响。Western-blot 检测 (C) Mono-KG-1 (12 h)、(D) Mono-KG-1 (24 h)、(E) Co-KG-1 (12 h) 和 (F) Co-KG-1 (24 h) 细胞中目标蛋白的定量分析。组间比较，☆☆：$P<0.01$，☆☆☆☆：$P<0.000\ 1$。

图 6　泽布替尼与维奈克拉对 KG-1 细胞关键信号蛋白表达的影响

Fig. 6　Effects of Zanubrutinib and Venetoclax on key signaling protein expression in KG-1 cells



Zan:泽布替尼;Ven:维奈克拉。泽布替尼与维奈克拉对(A)单培养及(B)共培养 THP-1 细胞中 STAT3、p-STAT3、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、BTK、p-BTK、CDK1、p-CDK1、GSK3β 及 p-GSK3β 蛋白表达的影响。Western-blot 检测(C) Mono-THP-1 (12 h)、(D) Mono-THP-1 (24 h)、(E) Co-THP-1 (12 h)和(F) Co-THP-1 (24 h)细胞中目标蛋白的定量分析。组间比较,☆:$P<0.05$,☆☆☆:$P<0.001$,☆☆☆☆:$P<0.0001$。

图 7 泽布替尼与维奈克拉对 THP-1 细胞关键信号蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of Zanubrutinib and Venetoclax on key signaling protein expression in THP-1 cells

考虑 MCL-1 本身的稳定性主要受上游激酶（如 GSK3β）介导的磷酸化事件控制，这一调控最终体现为蛋白总量的变化，而非其自身磷酸化位点丰度的改变。上述结果提示，维奈克拉与泽布替尼联用可能不仅通过抑制 p-BTK 依赖的信号通路逆转骨髓微环境诱导的耐药，还可能涉及 PI3K/p-AKT/p-GSK3β 通路及其他非 BTK 依赖途径（如 p-STAT3、p-CDK1等）的调控。本研究为两药联用提供了初步理论依据，其具体凋亡与增殖抑制机制仍有待进一步阐明。

综上所述，维奈克拉和泽布替尼两药联用具有协同作用，可抑制黏附共培养前后的白血病细胞的增殖以及诱导白血病细胞的凋亡，可通过抑制 p-BTK、p-AKT/p-GSK3β、p-STAT3、p-CDK1、p-ERK 信号通路分子增强抗白血病效应，在一定程度上逆转骨髓微环境庇护所引起的白血病细胞的耐药。然而，本研究仍存在一些局限性：首先，实验所使用的泽布替尼为市售商品化制剂，其含有的药用辅料可能对实验结果产生潜在影响；其次，本研究结论均基于体外实验，尚未在动物模型中得到体内验证，因此其临床相关性有待进一步确认，可在后续研究中采用高纯度原料药并开展体内实验，以完善本研究。

参考文献：

[1] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2023 年版)[J]. 中华血液学杂志，2023，44(9)：705-712.

[2] ZANG W，KOIKE Y，NISHIMURA K，et al. BRD4 and MYB inhibition overcomes Venetoclax resistance in EVI1-rearranged acute myeloid leukemia[J]. Sci Rep，2025，15(1)：37099.

[3] KONOPLEVA M，POLLYEA D A，POTLURI J，et al. Efficacy and biological correlates of response in a phase Ⅱ study of Vnetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia[J]. Cancer Discov，2016，6(10)：1106-1117.

[4] CHEN Q L，YUAN Y，CHEN T. Morphology，differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients[J]. Mol Med Rep，2014，9(1)：293-298.

[5] DA ROS A，BENETTON M，BORELLA G，et al. Leukemic cells hijack stromal bioelectricity to reprogram the bone marrow niche *via* CAV1. 2-dependent mechanisms[J]. Adv Sci (Weinh)，2025，12(39)：E08940.

[6] CHEN P，WEN X F，WANG B，et al. PI3K/Akt inhibitor LY294002 potentiates homoharringtonine antimyeloma activity in myeloma cells adhered to stromal cells and in SCID mouse xenograft[J]. Ann Hematol，2018，97(5)：865-875.

[7] SAAD J，NEWMAN R，KHABUSHEVA E，et al. Predictors of response and rational combinations for the novel MCL-1 inhibitor MIK665 in acute myeloid leukemia[J]. Mol Oncol，2024，144(S1)：1560.

[8] RUSHWORTH S A，MURRAY M Y，ZAITSEVA L，et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia[J]. Blood，2014，123(8)：1229-1238.

[9] PILLINGER G，ABDUL-AZIZ A，ZAITSEVA L，et al. Targeting BTK for the treatment of FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia[J]. Sci Rep，2015，5：12949.

[10] GRIFFIN J，WU Y，MU Q X，et al. Design and characterization of a novel Venetoclax-Zanubrutinib nano-combination for enhancing leukemic cell uptake and long-acting plasma exposure[J]. Pharmaceutics，2023，15(3)：1016.

[11] EATON S L，HURTADO M L，OLDKNOW K J，et al. A guide to modern quantitative fluorescent western blotting with troubleshooting strategies[J]. J Vis Exp，2014，(93)：E52099.

[12] PENG X H，LI Y H，TANG F T，et al. BCL-2 inhibitor regulates number，function，and antitumor immunity of T cells by influencing glycolysis in AML[J]. Cancer Sci，2025，116(10)：2657-2676.

[13] SOUMERAI J D，MATO A R，DOGAN A，et al. Zanubrutinib，Obinutuzumab，and Venetoclax with minimal residual disease-driven discontinuation in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma：A multicentre，single-arm，phase 2 trial[J]. Lancet Haematol，2021，8(12)：e879-e890.

[14] YU T，YU T，LI X，et al. Determining the interaction in a drug combination using the dose-based or effect-based method[J]. Curr Neuropharmacol，2025，23(10)：1260-1263.

[15] PAN Z，HU R，LI D，et al. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis identifies adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells as a driver of chemoresistance in acute myeloid leukemia[J]. J Exp Clin Cancer Res，2025，44(1)：291.

[16] YOU R L，HOU D Y，WANG B，et al. Bone marrow microenvironment drives AML cell OXPHOS addiction and AMPK inhibition to resist chemotherapy[J]. J Leukoc Biol，2022，112(2)：299-311.

[17] NEGOTEI C，MITU I，STANCA O，et al. The effectiveness of hypomethylating agents in elderly patients with acute myeloid leukemia：Insights from a single-center experience[J]. Cureus，2025，17(4)：e82957.

[18] LIU Y，ZHANG Y，GAO J，et al. Venetoclax and hypomethylating agents versus induction chemotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia patients：A systematic review and Meta-analysis[J]. BMC Cancer，2025，25(1)：894.

[19] ZHANG J Y，WANG Y T，YIN C J，et al. Artesunate improves venetoclax plus cytarabine AML cell targeting by regulating the Noxa/Bim/Mcl-1/p-Chk1 axis[J]. Cell Death Dis，2022，13(4)：379.

[20] CHONG S J F，LAI J X H，ISKANDAR K，et al. Superoxide-mediated phosphorylation and stabilization of Mcl-1 by AKT

underlie Venetoclax resistance in hematologic malignancies[J]. Leukemia,2025,39(10):2477-2491.

[21] YIN S,ZHENG X,ZHANG W,et al. Efficacy and safety of new-generation Bruton tyrosine kinase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: A systematic review and Meta-analysis[J]. Ann Hematol,2024,103(7):2231-2244.

[22] EIDE C A,KURTZ S E,KAEMPF A,et al. Simultaneous kinase inhibition with ibrutinib and BCL2 inhibition with venetoclax offers a therapeutic strategy for acute myeloid leukemia[J]. Leukemia,2020,34(9):2342-2353.

[23] LUO W,LI C,WU J,et al. Bruton tyrosine kinase inhibitors preserve anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell functionality and reprogram tumor micro-environment in B-cell lymphoma[J]. Cytotherapy,2023,25(7):739-749.

[24] VARELI A,VAIDEHI NARAYANAN H,CLARK H,et al. Systems biology-enabled targeting of NF-κB and BCL2 overcomes microenvironment-mediated BH3-mimetic resistance in DLBCL[J]. Cell Death Dis,2025,16(1):620.

[25] MARUNDE M R,POPOVA I K,HALL N W,et al. Nucleosome context regulates chromatin reader preference[J]. Nucleic Acids Res,2025,53(20):gkaf1061.

[26] CHEN P,JIN Q,FU Q,et al. Induction of multidrug resistance of acute myeloid leukemia cells by cocultured stromal cells *via* upregulation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Oncol Res,2016,24(4):215-223.

[27] ZHANG D,GUO Y,PENG Z,et al. FLT3L-based drug conjugate effectively targets chemoresistant leukemia stem cells in acute myeloid leukemia[J]. Cell Rep Med,2025,6(10):102365.

Mechanism of Venetoclax Combined with Zanubrutinib in Overcoming Stromal Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia

LIN Kaiting, LI Xiaojing, WANG Kuangfei, XIAO Qirong, LIN Xiaobin, CHEN Ping

Fujian Institute of Hematology, Fujian Provincial Key Laboratory on Hematology,

Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou **350001**, China

ABSTRACT: **Objective** To elucidate the synergistic antitumor effects and molecular mechanism of Venetoclax combined with Zanubrutinib on acute myeloid leukemia (AML) cells in the bone marrow microenvironment. **Methods** A co-culture model mimicking the bone marrow microenvironment was established using HS-5 stromal cells and AML cell lines (KG-1/THP-1). The effects of drugs on cell proliferation and apoptosis were assessed *via* cell counting kit-8 (CCK-8) assay and Annexin V-APC/7-AAD double staining. TMT-based phosphoproteomic analysis was performed to identify differentially expressed proteins, followed by bioinformatics analysis. Western-blot was used to evaluate phosphorylation levels of key signaling proteins. **Results** The combination of Venetoclax and Zanubrutinib exhibited synergistic effects against co-cultured AML cells, significantly inhibiting proliferation and promoting apoptosis. Phosphoproteomics revealed that key differentially phosphorylated proteins were primarily enriched in the PI3K/AKT, BCL-2, and BTK signaling pathways. Western-blot confirmed that the drug combination synergistically downregulated phosphorylation of p-BTK, p-AKT/p-GSK3β, p-STAT3, p-CDK1, and p-ERK. **Conclusion** Venetoclax and Zanubrutinib synergistically target AML cells in the bone marrow microenvironment, potentially through inhibition of signaling pathway molecules including p-BTK, p-AKT/p-GSK3β, p-STAT3, p-CDK1, and p-ERK.

KEY WORDS: Venetoclax; Zanubrutinib; bone marrow stromal cells; acute myeloid leukemia

(编辑:何佳凤)