

维奈克拉增强 MDS 细胞系对地西他滨化疗敏感性机制的实验研究

曲志梅, 董 伟, 刘艳萍 (山东第一医科大学附属人民医院, 济南 271199)

摘要: **目的** 研究维奈克拉 (venetoclax, VCX) 对骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 细胞系地西他滨 (decitabine, DAC) 化疗敏感性的可能作用机制。**方法** CCK-8 法检测不同浓度 VCX 对 MDS 细胞 (SKM-1 和 MUTZ-1 细胞系) 增殖活力的影响; 将 MUTZ-1 细胞根据不同处理分为 4 组: 对照组、VCX 组、DAC 组和 VCX+DAC 组; Annexin V-FITC/PI 法检测各组细胞凋亡率; Western blotting 检测细胞中凋亡相关蛋白 [细胞色素 C (cytochrome C), 裂解型半胱天冬酶 3 (cleaved Caspase-3) 表达水平], B 细胞白血病/淋巴瘤 2 (B cell leukemia/lymphoma-2, Bcl-2) 与 Bcl-2 相关蛋白 X (Bax) 比值; JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒检测各组 SKM-1 和 MUTZ-1 细胞的线粒体膜电位; H2DCF-DA 荧光探针法检测细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量; Western blotting 检测细胞中自噬相关蛋白 Beclin1, P62 和 LC3- II /LC3- I 比值。**结果** 随 VCX 浓度升高, MUTZ-1 细胞增殖活性明显降低, 且呈浓度依赖性 ($F=0.003$, $P=0.001$)。与对照组 ($4.28\% \pm 1.66\%$) 相比, VCX 组 ($13.75\% \pm 3.02\%$), DAC 组 ($12.39\% \pm 4.16\%$) 和 VCX+DAC 组 ($18.10\% \pm 3.50\%$) 细胞凋亡率明显增高, 差异有统计学意义 ($F=45.782$, $P<0.05$)。与对照组 (1.01 ± 0.02 , 1.04 ± 0.02 , 1.01 ± 0.04) 相比, VCX 组 (1.67 ± 0.05 , 2.23 ± 0.10 , 0.43 ± 0.05), DAC 组 (1.62 ± 0.08 , 1.85 ± 0.06 , 0.49 ± 0.07) 和 VCX+DAC 组 (3.24 ± 0.10 , 3.81 ± 0.19 , 0.13 ± 0.01) 细胞中凋亡相关蛋白 cytochrome C, cleaved Caspase-3 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值明显升高, 差异均有统计学意义 ($F=116.384$, 282.069 , 248.035 , 均 $P<0.05$)。与对照组 (2.05 ± 0.34 , 8.78 ± 1.37) 相比, VCX 组 (8.72 ± 1.26 , 14.02 ± 1.45), DAC 组 (8.44 ± 2.13 , 13.20 ± 2.41) 和 VCX+DAC 组 (15.66 ± 2.90 , 26.45 ± 1.53) 细胞线粒体膜电位及 ROS 含量明显升高, 差异具有统计学意义 ($F=66.782$, 69.071 , 均 $P<0.05$)。与对照组 (1.05 ± 0.04 , 1.02 ± 0.08 , 1.01 ± 0.07) 相比, VCX 组 (1.62 ± 0.15 , 2.60 ± 0.19 , 0.56 ± 0.15), DAC 组 (1.67 ± 0.17 , 2.45 ± 0.20 , 0.54 ± 0.14) 和 VCX+DAC 组 (3.72 ± 0.21 , 3.58 ± 0.27 , 0.13 ± 0.09) 自噬相关蛋白 Beclin1, LC3- II /LC3- I 表达明显升高, 而 P62 蛋白表达则明显降低, 差异均有统计学意义 ($F=118.257$, 209.422 , 236.92 , 均 $P<0.05$)。与 DAC 组比较, VCX+DAC 组细胞凋亡率、cytochrome C, cleaved Caspase-3, Beclin1 蛋白表达水平, LC3- II /LC3- I 比值和 ROS 含量均明显降低 ($t=2.473$, 28.564 , 17.291 , 16.115 , 7.021 , 9.319); 线粒体膜电位、Bcl-2/Bax 比值和 P62 蛋白表达均明显升高 ($t=4.621$, 9.244 , 4.278), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。DAC 组和 VCX 组细胞中上述检测指标差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。**结论** VCX 可能通过调节细胞凋亡、自噬和氧化应激来促进 MDS 细胞对 DAC 的化疗敏感性。

关键词: 维奈克拉; 地西他滨; 骨髓增生异常综合征; 细胞凋亡; 自噬

中图分类号: R551.3; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 03-053-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.010

Experimental Study on the Mechanism of Venetoclax Enhancing the Sensitivity of MDS Cell Lines to Decitabine Chemotherapy

QU Zhi-mei, DONG Wei, LIU Yan-ping

(the People's Hospital Affiliated to the First Medical University of Shandong, Jinan 271199, China)

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism of action of venetoclax (VCX) susceptibility to chemotherapy in the myelodysplastic syndrome (MDS) cell line decitabine (DAC). **Methods** The CCK-8 method detected the effect of different concentrations of VCX on the proliferation and viability of MDS cells (SKM-1 and MUTZ-1 cell lines). MUTZ-1 cells were divided into 4 groups according to different treatments: control group, VCX group, DAC group and VCX+DAC group. The apoptosis rates of MUTZ-1 cells in each group were detected by Annexin V-FITC/PI method. Western blotting measured the ratio of apoptosis-associated protein (cytochrome C, cleaved Caspase-3) in cells, B-cell leukemia/lymphoma-2, Bcl-2, to Bcl-2-related protein X (Bax). Detection of mitochondrial membrane potential of SKM-1 and MUTZ-1 cells by JC-1 method.

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (编号: 2017WS137); 戊乙奎醚对脓毒症诱发的肺损伤的保护作用及其机制研究。

作者简介: 曲志梅 (1971-), 女, 学士学位, 主管药师, 研究方向: 药理学基础实验, E-mail: CC9671a@163.com。

H2DCF-DA fluorescent probe method to detect the content of reactive oxygen species (ROS) in cells. Western blotting measured the ratio of autophagy-related proteins Beclin1, P62 and LC3-II/LC3-I in cells. **Results** With the increase of VCX concentration, the proliferative activity of MUTZ-1 cells decreased significantly, and it was concentration-dependent. Compared with the control group ($4.28\% \pm 1.66\%$), the apoptosis rate of VCX group ($13.75\% \pm 3.02\%$), DAC group ($12.39\% \pm 4.16\%$) and VCX+DAC group ($18.10\% \pm 3.50\%$) was significantly higher, and the difference was statistically significant ($F=45.782$, $P<0.05$). Compared with the control group (1.01 ± 0.02 , 1.04 ± 0.02 , 1.01 ± 0.04), the VCX group (1.67 ± 0.05 , 2.23 ± 0.10 , 0.43 ± 0.05), the DAC group (1.62 ± 0.08 , 1.85 ± 0.06 , 0.49 ± 0.07). In the VCX+DAC group (3.24 ± 0.10 , 3.81 ± 0.19 , 0.13 ± 0.01), apoptosis-related protein cytochrome C, cleaved Caspase-3 expression and Bcl-2/Bax ratio were increased significantly, the differences were statistically significant ($F=116.384$, 282.069 , 248.035 , all $P<0.05$). Compared with control group (2.05 ± 0.34 , 8.78 ± 1.37), VCX group (8.72 ± 1.26 , 14.02 ± 1.45), DAC group (8.44 ± 2.13 , 13.20 ± 2.41), VCX+DAC group (15.66 ± 2.90 , 26.45 ± 1.53) mitochondrial membrane potential and ROS contents were significantly increased, and the differences were statistically significant ($F=66.782$, 69.071 , all $P<0.05$). Compared with control group (1.05 ± 0.04 , 1.02 ± 0.08 , 1.01 ± 0.07), VCX group (1.62 ± 0.15 , 2.60 ± 0.19 , 0.56 ± 0.15), DAC group (1.67 ± 0.17 , 2.45 ± 0.20 , 0.54 ± 0.14), in VCX+DAC group (3.72 ± 0.21 , 3.58 ± 0.27 , 0.13 ± 0.09), the expression of autophagy related protein Beclin1, LC3-II/LC3-I was significantly increased, while the expression of P62 protein was significantly decreased, with statistical significance ($F=118.257$, 209.422 , 236.92 , all $P<0.05$). Compared with DAC group, apoptosis rate, cytochrome C, cleaved Caspase-3, Beclin1 protein expression level, LC3-II/LC3-I ratio and ROS content in VCX+DAC group were significantly decreased ($t=2.473$, 28.564 , 17.291 , 16.115 , 7.021 , 9.319). Mitochondrial membrane potential, Bcl-2/Bax ratio and P62 protein expression were significantly increased ($t=4.621$, 9.244 , 4.278), the differences were statistically significant, respectively (all $P<0.05$). There was no statistical significance in the above indexes between DAC group and VCX group (all $P>0.05$). **Conclusion** VCX may promote chemotherapy sensitivity of MDS cells to DAC by regulating apoptosis, autophagy, and oxidative stress.

Keywords: venetoclax; decitabine; myelodysplastic syndrome; apoptosis; autophagy

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 是起源于造血干细胞以病理性造血为特征的异质性克隆性疾病, 具有向急性髓系白血病转化的高风险^[1]。目前 MDS 发病机制尚不清楚, 可能与分子遗传学、造血微环境变化、造血干/祖细胞增殖、细胞凋亡紊乱和肿瘤抑制基因甲基化等多种因素相关^[2-3]。传统化疗对 MDS 疗效有限, 去甲基化药物 (hypomethylating agents, HMAs) 已成为对于国际预后评分系统 (the international prognostic scoring system, IPSS) 不适合移植的中危-2 级和高危患者的临床治疗首选药物^[4]。HMA 是一种特异性的 DNA 甲基转移酶抑制剂, 包括阿扎胞苷和地西他滨 (decitabine, DAC), 尽管 HMAs 治疗的总有效率约为 50%, 但患者的完全缓解率仅为 20%, 且严重的骨髓抑制需要多疗程巩固治疗等因素导致患者治疗依从性较差^[5]。此外, 随治疗时间的延长, 部分患者的疗效会逐渐下降, 耐药性普遍存在严重影响 HMAs 临床效果。为进一步提高 MDS 患者的缓解率和生存时间, 探索与 HMAs 的联合治疗是 MDS 治疗的主要目标。

维奈克拉 (venetoclax, VCX) 是 2016 年获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 加速批准用于治疗急性淋巴细胞白血病, 在 2019 年获得可用于治疗慢性淋巴细胞白血病和淋巴瘤的高选择性 B 细胞白血病/淋巴瘤-2 (B-cell

leukemia/lymphoma-2, Bcl-2) 抑制剂^[6]。在 MDS 治疗领域, 多个地区的临床研究表明, VCX 联合 HMAs 对初治高危 MDS 是安全有效的^[7]。一项前瞻性研究也报道, DAC 联合 VCX 维持治疗对预防 MDS 患者异基因造血干细胞移植治疗后复发和降低化疗耐受性具有一定的有效性^[8]。这表明 DAC 联合 VCX 对 MDS 的治疗可能具有较大应用潜力。因此本研究通过体外培养 MDS 细胞系探讨了 DAC 联合 VCX 对 MDS 化疗敏感性的影响及潜在可能机制, 以期改善 MDS 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人 MDS 细胞系 SKM-1 细胞和 MUTZ-1 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司), 采用含 10% (v/v) FBS 的 RPMI-1640 培养液在 37 °C, 5% (v/v) CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

1.2 试剂与仪器 RPMI-1640 培养液 (美国 Hyclone 公司); VCX 和 DAC (西安杨森制药有限公司); CCK-8 试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (美国 eBioscience 公司); JC-1 试剂盒 (美国 SAB 公司); H2DCF-DA 试剂盒 (美国 MedChemExpress 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司); Laemmli 上样缓冲液 (美国 Bio-Rad 公司); 小鼠抗 Bcl-1, cleaved Caspase-3, P62 (美国 Cell Signal Technology 公司); 兔抗 LC3B, Bax, Beclin 1, cytochrome C 和 β -actin

(美国 Santa Cruz 公司); 大鼠抗小鼠或山羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司); CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); LightCycler480II 型 RT-PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); 800TS 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); CytoFLEX 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 法检测 MDS 细胞增殖活性: 取生长状态良好的 SKM-1 和 MUTZ-1 细胞, 按每孔 3×10^4 个细胞接种至 96 孔板, 用稀释后不同浓度的 VCX (0, 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理 SKM-1 或 MUTZ-1 细胞 24h, 每孔加入 10 μl CCK-8 试剂, 继续孵育 2h; 采用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的吸光度值 (A 值)。将 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 VCX 设为 0 加药组, 并设置不含细胞的培养液孔为空白组。计算各组细胞增殖活性, 使用统计学软件绘制曲线, 分析 VCX 对细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。细胞增殖活性 = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{0\text{加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。IC₅₀ 值即与对照组 A 值减少一半所需的 VCX 浓度。每组每个浓度设置 6 个复孔, 实验重复三次取平均值。

1.3.2 细胞处理和分组: 根据上述“CCK-8 法检测 MDS 细胞增殖活性”的检测结果, 使用 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 VCX 分别处理 MUTZ-1 细胞; 按细胞处理方式的不同将 MUTZ-1 分为 4 组: 无任何药物处理的对照组、VCX 组、DAC 组 (参考文献^[9-10]方法使用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAC 处理) 和 VCX+DAC 组 (使用 VCX 和 DAC 联合处理细胞)。将各组细胞在培养箱中培养 24h 后用于后续实验检测。

1.3.3 Annexin V-FITC/PI 法检测 MDS 细胞凋亡率: 取各组待测 MUTZ-1 细胞, 常规胰酶消化制成细胞悬液, 细胞计数后按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒使用说明书加入 Annexin V-FITC 和 PI 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 ~ 20 min, 上机分析。其中 Annexin V-FITC 阳性, PI 阴性为早期凋亡细胞, Annexin V-FITC 和 PI 双阳性为晚期凋亡细胞, 两者之和为总凋亡细胞。实验重复三次取平均值。

1.3.4 JC-1 染色法检测 MDS 细胞线粒体膜电位: 取各组待测 MUTZ-1 细胞, 胰酶消化制成细胞悬液, 计数后加入 JC-1 荧光染料, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30

min, PBS 溶液再次洗涤后上机进行分析。JC-1 荧光染色后细胞通常发出红色荧光, 但当线粒体膜电位降低时 JC-1 则变为绿色荧光, 通过计算绿色荧光比值可分析细胞的线粒体膜电位改变。实验重复三次取平均值。

1.3.5 H2DCF-DA 荧光探针法检测 MDS 细胞中 ROS 含量: 按前述方法收集各组细胞, 800 g 离心 5 min, 取细胞沉淀, 加入 H2DCF-DA 试剂重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, PBS 溶液再次洗涤细胞, 上机检测各组细胞中 ROS 含量。实验重复三次取平均值。

1.3.6 Western blotting 检测 MDS 细胞中凋亡与自噬相关蛋白的表达: 取各组待测 MUTZ-1 细胞, 用预冷 RIPA 细胞裂解液和蛋白酶抑制剂在冰上提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度; 取 40 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 后转移至 PVDF 膜上, 分别加入 Bcl-1 (1:800), Bax (1:800), cleaved Caspase-3 (1:1000), cytochrome C (1:1000), LC3B (1:1000), Beclin 1 (1:800), P62 (1:800) 和 β -actin (1:2000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日加入抗小鼠或抗兔二抗 (1:1000), 室温孵育 2 h, 通过增强化学发光检测方法对蛋白条带进行显影。采用 Image J 软件评估蛋白条带的灰度值, 以 β -actin 为内参, 通过计算目的蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值对目的蛋白进行半定量分析。实验重复三次取平均值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均数比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VCX 对 MDS 细胞增殖的影响 见表 1。CCK-8 法检测显示, 随 VCX 浓度升高, SKM-1 细胞和 MUTZ-1 细胞增殖活性均明显降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。VCX 对 SKM-1 细胞的 IC₅₀ 值为 $10.14 \pm 3.26 \mu\text{mol/L}$, 对 MUTZ-1 细胞的 IC₅₀ 值为 $8.09 \pm 2.73 \mu\text{mol/L}$ 。选择对 VCX 更为敏感的 MUTZ-1 细胞, 并使用 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 VCX 分别处理 MUTZ-1 细胞进行后续研究。

表 1 不同浓度 VCX 对 MDS 细胞增殖活性的影响 [($\bar{x} \pm s$) %]

细胞	空白组	VCX(μ mol/L)							F 值	P 值
		0.1	1.0	2.5	5.0	10.0	25.0	50.0		
SKM-1	98.23 ± 7.11	92.97 ± 3.18	85.23 ± 1.90 [*]	70.52 ± 1.58 [*]	62.84 ± 2.07 [*]	45.14 ± 1.08 [*]	21.24 ± 0.58 [*]	5.00 ± 0.09 [*]	17.292	23.770
MUTZ-1	101.05 ± 6.92	94.00 ± 2.43	86.54 ± 3.21 [*]	75.09 ± 2.39 [*]	63.04 ± 1.18 [*]	50.61 ± 1.27 [*]	26.92 ± 0.94 [*]	6.18 ± 0.15 [*]	0.003	0.001

注: 与空白组比较, ^{*} $t_{\text{SKM-1}}$ =2.139, 5.286, 11.268, 14.391, 21.589, 31.308, 37.912, $t_{\text{MUTZ-1}}$ =2.844, 5.854, 10.474, 15.336, 20.351, 29.909, 38.076, 均 $P < 0.05$ 。

2.2 各组 MDS 细胞凋亡率与凋亡相关蛋白表达 见表 2。Annexin V-FITC/PI 实验检测表明,与对照组比较,VCX 组、DAC 组和 VCX+DAC 组细胞凋亡率明显升高 ($t=3.604, 3.086, 5.259$, 均 $P < 0.05$);与 DAC 组比较,VCX 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($t=0.518, P > 0.05$), VCX+DAC 组凋亡率则明显升高 ($t=2.473, P < 0.05$)。Western blotting 实验结果显示,与对照组比较,VCX 组, DAC 组和 VCX+DAC 组细胞中促凋亡蛋白 cytochrome C, cleaved Caspase-3 表达水平均明显升高 ($t=11.637,$

10.755, 39.319; 13.023, 8.864, 30.314, 均 $P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值明显降低 ($t=14.893, 13.352, 22.596$, 均 $P < 0.05$);与 DAC 组比较,VCX 组细胞中 cytochrome C, cleaved Caspase-3 表达和 Bcl-2/Bax 比值差异均无统计学意义 ($t=0.882, 4.159, 1.541$, 均 $P > 0.05$);而 VCX+DAC 组细胞中 cytochrome C, cleaved Caspase-3 表达水平均明显升高 ($t=28.564, 17.291$, 均 $P < 0.05$), Bcl-2/Bax 比值则明显降低 ($t=9.244, P < 0.05$)。

表 2 各组 MDS 细胞凋亡率和凋亡相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组	VCX 组	DAC 组	VCX+DAC 组	F 值	P 值
凋亡率 (%)	4.28 ± 1.66	13.75 ± 3.02	12.39 ± 4.16	18.10 ± 3.50	45.782	0.014
Bcl-2/Bax	1.01 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.49 ± 0.07	0.13 ± 0.01	248.035	0.047
cleaved Caspase-3	1.04 ± 0.02	2.23 ± 0.10	1.85 ± 0.06	3.81 ± 0.19	282.069	0.022
cytochrome C	1.01 ± 0.02	1.67 ± 0.05	1.62 ± 0.08	3.24 ± 0.10	116.384	0.025

2.3 各组 MDS 细胞线粒体膜电位与细胞中 ROS 表达 见表 3。JC-1 法检测显示,与对照组比较,VCX 组, DAC 组和 VCX+DAC 组细胞线粒体膜电位均明显降低 ($t=4.269, 4.089, 8.710$, 均 $P < 0.05$);与 DAC 组比较,VCX 组细胞线粒体膜电位虽有降低,但差异无统计学意义 ($t=0.179, P > 0.05$),而 VCX+DAC 组细胞的线粒体膜电位

明显降低 ($t=4.621, P < 0.05$)。H2DCF-DA 荧光探针法检测结果表明,与对照组比较,VCX 组、DAC 组和 VCX+DAC 组细胞中 ROS 含量明显升高 ($t=3.686, 3.109, 12.428$, 均 $P < 0.05$);与 DAC 组比较,VCX 组细胞中 ROS 含量的差异无统计学意义 ($t=0.577, P > 0.05$),而 VCX+DAC 组细胞中 ROS 含量明显升高 ($t=9.319, P < 0.05$)。

表 3 各组 MDS 细胞线粒体膜电位和细胞中 ROS 含量 [$(\bar{x} \pm s) \%$]

项 目	对照组	VCX 组	DAC 组	VCX+DAC 组	F 值	P 值
JC-1 染色	2.05 ± 0.34	8.72 ± 1.26*	8.44 ± 2.13*	15.66 ± 2.90*#	66.782	0.041
ROS 含量	8.78 ± 1.37	14.02 ± 1.45*	13.20 ± 2.41*	26.45 ± 1.53*#	69.071	0.046

2.4 各组 MDS 细胞自噬相关蛋白表达 见表 4。Western blotting 检测显示,与对照组比较,VCX 组、DAC 组和 VCX+DAC 组细胞中自噬相关蛋白 Beclin1 表达和 LC3- II /LC3- I 比值均明显升高,而 P62 蛋白水平明显降低,差异具有统计学意义 ($t=4.481, 4.874, 20.988; 9.818, 8.886, 15.907; 4.696, 4.905, 9.183$, 均 $P < 0.05$);与 DAC 组比

较,VCX 组细胞中 Beclin1, P62 蛋白表达及 LC3- II /LC3- I 比值差异均无统计学意义 ($t=0.393, 0.932, 0.209$, 均 $P > 0.05$),而 VCX+DAC 组细胞中 Beclin1 表达和 LC3- II /LC3- I 比值均明显升高, P62 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义 ($t=16.115, 7.021, 4.278$, 均 $P < 0.05$)。

表 4 各组 MDS 细胞的自噬相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	对照组	VCX 组	DAC 组	VCX+DAC 组	F 值	P 值
Beclin1	1.05 ± 0.04	1.62 ± 0.15	1.67 ± 0.17	3.72 ± 0.21	118.257	0.017
P62	1.01 ± 0.07	0.56 ± 0.15	0.54 ± 0.14	0.13 ± 0.09	236.92	0.007
LC3- II /LC3- I	1.02 ± 0.08	2.60 ± 0.19	2.45 ± 0.20	3.58 ± 0.27	209.422	0.009

3 讨论

Bcl-2 家族蛋白作为一类膜整合蛋白,能够通过调节细胞的完整性和凋亡因子的释放来调控细胞的存亡^[11]。研究表明, Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的过度表达与血液系统恶性疾病发生和耐药性的形成密

切相关,而 VCX 是一种高效、选择性的 Bcl-2 抑制剂,其能与 Bcl-2 直接结合,改变线粒体外膜的通透性,活化凋亡相关蛋白,诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。目前,VCX 在我国主要与 HAMs 类药物联合应用于治疗高龄难治性急性髓系白血病患者^[12]。然而临

床研究发现,VCX联合HAMs对MDS治疗同样有效^[7-8]。因而本研究通过体外细胞培养实验,验证了应用VCX对MDS细胞DAC化疗敏感性的影响及机制。

研究表明,Bcl-2在MDS高危组中表达水平明显高于低危组,且在急性粒细胞白血病中表达水平最高,推测应与Bcl-2蛋白在不成熟造血细胞中堆积相关,增加MDS向恶性髓系白血病转化的风险^[11]。而本研究表明,VCX对MDS细胞生长具有浓度依赖性抑制能力,可能与Bcl-2在MDS中的过度表达相关。为明确VCX与DAC的应用对MDS细胞的凋亡作用,本实验探究发现,VCX与DAC联合应用明显提高MDS细胞的凋亡率,增加细胞中凋亡相关蛋白cytochrome C,cleaved Caspase-3的表达,下调Bcl-2/Bax比值。众所周知,线粒体损伤被认为是化疗敏感性机制中的一个重要因素,线粒体膜电位的丧失会增加线粒体膜通透性,调节线粒体依赖的细胞凋亡途径^[13]。Bax作为Bcl-2家族中的重要蛋白,主要通过与Bcl-2形成异二聚体促进线粒体外膜的通透性,发挥促凋亡作用^[14]。研究发现,Bcl-2/Bax比值可直接决定细胞是否走向凋亡^[15]。此外,DAC还可直接通过引起线粒体跨膜电位的丢失,进而激活线粒体凋亡途径^[15]。本研究通过检测细胞线粒体膜电位来观察线粒体损伤程度,结果表明,VCX与DAC共处理组细胞线粒体膜电位丧失较两药物单独处理组明显增高。

ROS的产生和积累可导致线粒体损伤和细胞凋亡^[16]。包括HMAS在内的多种化疗药物在诱导ROS产生的过程中会激活抗氧化通路,诱导抗氧化酶的生成,中和ROS,削弱化疗药物对肿瘤细胞的杀伤。但有数据表明,联合应用VCX与DAC可减少抗氧化酶的产生^[17]。本实验结果同样显示VCX与DAC共处理组ROS产生明显增多。此外,氧化应激也被认为是化疗药物介导细胞自噬相关死亡的关键途径^[18]。研究报道,自噬途径的关键启动因子Beclin1具有Bcl-2同源结构域BH3。Bcl-2蛋白与Beclin1的BH3结构域的相互作用,阻止了自噬体结构的组装,导致细胞的自噬进程被抑制^[19]。微管相关蛋白1轻链3(LC3)是自噬发生的常用指标,自噬过程中,胞质可溶形式的LC3-I与亲脂性磷脂酰乙醇胺结合转换为自噬囊泡相关形式的LC3-II。而P62是LC3的选择性底物之一,P62直接与LC3结合,促进泛素化蛋白聚集物降解。由于自噬被激活时,LC3-II积累,而P62减少,因此LC3-II/LC3-I和P62常被用作研究自噬的标准标志物^[20]。本研究结果发现,VCX与DAC共处理组细胞自噬水平、Beclin1蛋白表达及LC3-II/LC3-I比值均

明显升高,P62蛋白则显著降低。这提示VCX与MDS的联合可能通过上调MDS细胞的自噬水平参与细胞的凋亡。然本研究是基于体外细胞实验进行探究分析,VCX增强MDS对DAC化疗敏感性的机制还需通过裸鼠成瘤体内实验进一步研究分析。

综上所述,VCX可能通过调节细胞凋亡、自噬和氧化应激来促进MDS细胞对DAC的化疗敏感性。VCX与MDS的联合使用可能成为有效的MDS治疗策略的潜在候选方案,值得临床进一步探究。

参考文献:

- [1] CAZZOLA M. Myelodysplastic syndromes[J]. New England Journal of Medicine, 2020, 383(14): 1358-1374.
- [2] NAGATA Y, MACIEJEWSKI J P. The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome[J]. Leukemia, 2019, 33(12): 2779-2794.
- [3] 张冬梅,万顺伦,于丽华.骨髓增生异常综合征患者外周血单个核细胞中OTC4,Gli1基因的表达及与预后的COX回归分析[J].现代检验医学杂志,2022,37(6): 58-64.
ZHANG Dongmei, WAN Shunlun, YU Lihua. Expression of OTC4 and Gli1 genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with myelodysplastic syndrome and their correlation with prognosis by COX regression analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(6): 58-64.
- [4] 曹蓝,江兆清,刘文洁,等.含去甲基化药物方案治疗中高危骨髓增生异常综合征/骨髓增殖性肿瘤29例疗效观察[J].南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(11): 1578-1582,1587.
CAO Lan, JIANG Zhaoqing, LIU Wenjie, et al. Observation on curative effect of 29 cases of middle-and high-risk myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasms treated with regimens containing demethylating drugs[J]. Journal of Nanjing Medical University(Natural Sciences), 2022, 42(11): 1578-1582, 1587.
- [5] FLOTHO C, SOMMER S, LÜBBERT M. DNA-hypomethylating agents as epigenetic therapy before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia[J]. Seminars in Cancer Biology, 2018, 51: 68-79.
- [6] LI Qingfang, CHENG Li, SHEN Kai, et al. Efficacy and safety of Bcl-2 inhibitor venetoclax in hematological malignancy: A systematic review and meta-analysis of clinical trials[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 697.
- [7] WEI Yunxiong, XIONG Xia, LI Xin, et al. Low-dose decitabine plus venetoclax is safe and effective as post-transplant maintenance therapy for high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. Cancer Science, 2021, 112(9): 3636-3644.

(下转第78页)

- Research progress on the biological function of scaffold protein family IQGAP in tumor[J]. *Letters in Biotechnology*, 2020, 31(6): 775-780.
- [13] TANG Tianjiao, WANG Jing, ZHANG Lidan, et al. IQGAP2 acts as an independent prognostic factor and is related to immunosuppression in DLBCL[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 603.
- [14] SONG Fei, KOTOLLOSHI R, GAJDA M, et al. Reduced IQGAP2 promotes bladder cancer through regulation of MAPK/ERK pathway and cytokines[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(21): 13508.
- [15] KUMAR D, PATEL S A, KHAN R, et al. IQ motif-containing GTPase-activating protein 2 inhibits breast cancer angiogenesis by suppressing VEGFR2-AKT signaling[J]. *Molecular Cancer Research*, 2022, 20(1): 77-91.
- [16] MURPHY N P, BINTI AHMAD MOKHTAR A M, MOTT H R, et al. Molecular subversion of CDC42 signalling in cancer[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49(3): 1425-1442.
- [17] MILLER K E, KANG P J, PARK H O. Regulation of Cdc42 for polarized growth in budding yeast[J]. *Microbial Cell*, 2020, 7(7): 175-189.
- [18] RAMOS-ÁLVAREZ I, LEE L, JENSEN R T. Group II p21-activated kinase, PAK4, is needed for activation of focal adhesion kinases, MAPK, GSK3, and β -catenin in rat pancreatic acinar cells[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2020, 318(3): G490-G503.
- [19] YAN Shushan, REN Xiaoxia, YANG Jinghan, et al. Exosomal miR-548c-5p regulates colorectal cancer cell growth and invasion through HIF1A/CDC42 axis[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13: 9875-9885.
- [20] NGUYEN P, CHAKRABARTI J, LI Yuan, et al. Rational targeting of CDC42 overcomes drug resistance of multiple myeloma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 958.
- 收稿日期: 2023-02-19
修回日期: 2023-03-16

(上接第57页)

- [8] GARCIA J S. Prospects for venetoclax in myelodysplastic syndromes[J]. *Hematology-Oncology Clinics of North America*, 2020, 34(2): 441-448.
- [9] LIU Jin, LIANG Long, LI Xin, et al. AICAR suppresses cell proliferation and synergizes with decitabine in myelodysplastic syndrome via DNA damage induction[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(6): 1131-1142.
- [10] ZHAO Fang, WANG Jie, YAO Liu, et al. Synergistic inhibitory effect of Smo inhibitor jervine and its combination with decitabine can target Hedgehog signaling pathway to inhibit myelodysplastic syndrome cell line[J]. *Hematology*, 2021, 26(1): 518-528.
- [11] SHARMA P, POLLYEA D A. Shutting down acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome with BCL-2 family protein inhibition[J]. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 2018, 13(4): 256-264.
- [12] 中国临床肿瘤学会(CSCO)白血病专业委员会. 维奈克拉治疗恶性血液病临床应用指导原则(2021年版)[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2021, 30(12): 710-718.
- Leukemia Expert Committee of Chinese Society of Clinical Oncology(CSCO). Clinical practice guideline principles for treatment of hematologic malignancies with venetoclax (2021 edition)[J]. *Journal of Leukemia and Lymphoma*, 2021, 30(12): 710-718.
- [13] CHOI J H, BOGENBERGER J M, TIBES R. Targeting apoptosis in acute myeloid leukemia: current status and future directions of BCL-2 inhibition with venetoclax and beyond[J]. *Targeted Oncology*, 2020, 15(2): 147-162.
- [14] MORADIPOUR A, DARIUSHNEJAD H, AHMADIZADEH C, et al. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis[J]. *Medical Oncology*, 2022, 40(1): 46.
- [15] 张丽丽, 欧亚, 元小冬, 等. 脂肪基质细胞诱导分化为星形胶质细胞过程中 Bax/Bcl-2 蛋白与细胞凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(31): 4982-4987.
- ZHANG Lili, OU Ya, YUAN Xiaodong, et al. Bax/Bcl-2 protein and apoptosis during adipose-derived stromal cell differentiation into astrocytes[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(31): 4982-4987.
- [16] LUO Zhen, XU Xue, SHO T, et al. ROS-induced autophagy regulates porcine trophectoderm cell apoptosis, proliferation, and differentiation[J]. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2019, 316(2): C198-C209.
- [17] NGUYEN L X T, TROADEC E, KALVALA A, et al. The Bcl-2 inhibitor venetoclax inhibits Nrf2 antioxidant pathway activation induced by hypomethylating agents in AML[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 14040-14049.
- [18] YUN H R, JO Y H, KIM J, et al. Roles of autophagy in oxidative stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(9): 3289.
- [19] 王冬琴, 许鸣, 陆嘉惠. 细胞自噬在骨髓增生异常综合征发病机制中的作用[J]. *医学综述*, 2019, 25(14): 2837-2841, 2849.
- WANG Dongqin, XU Ming, LU Jiahui. Role of autophagy in pathogenesis of myelodysplastic syndrome[J]. *Medical Recapitulate*, 2019, 25(14): 2837-2841, 2849.
- [20] VISHNUPRIYA S, PRIYA DHARSHINI L C, SAKTHIVEL K M, et al. Autophagy markers as mediators of lung injury-implication for therapeutic intervention[J]. *Life Sciences*, 2020, 260: 118308.
- 收稿日期: 2022-09-26
修回日期: 2023-03-08