

· 基础研究 ·

4-羟基水杨酰苯胺对T淋巴细胞白血病肿瘤增殖与凋亡的影响

邓 惠^{1,2,3}, 陈格格², 徐 莉², 贾新颜², 施菊妹^{1,2,3,4*}

¹安徽医科大学上海临床学院, 上海 200072; ²上海市东方医院血液科, 上海 200120; ³安徽医科大学第五临床医学院, 安徽合肥 230032; ⁴同济大学附属上海第十人民医院血液科, 上海 200072

[摘要] 目的: 研究4-羟基水杨酰苯胺(4-hydroxysalicylaniline, HDS)对T淋巴细胞白血病细胞Jurkat和Hut-78的抑制效果及其机制。方法: 体外实验中, 梯度浓度的HDS处理Jurkat和Hut-78细胞后, 以CCK-8和克隆形成实验检测细胞增殖状况; 用细胞流式术检测细胞周期变化, 通过Western blot检测周期相关蛋白的表达水平; 用细胞流式术检测细胞凋亡水平, 通过Western blot检测凋亡相关蛋白的表达水平; 以 γ -H2AX免疫荧光染色检测DNA损伤状况, 并通过Western blot检测DNA损伤相关蛋白的表达水平。体内实验中, 通过皮下注射Jurkat细胞构建小鼠肿瘤模型, 处理组腹腔注射HDS, 对照组给予等量溶剂, 记录小鼠体重与肿瘤体积变化, 13 d后, 取肿瘤组织, 通过HE染色观察组织形态, 并通过Ki67和 γ -H2AX的免疫组织化学染色, 分析药物对肿瘤组织增殖与DNA损伤的影响。结果: 在体内和体外, 证明了HDS可通过诱导Jurkat和Hut-78细胞S期细胞周期阻滞与凋亡, 并且通过CHK1/CHK2信号通路的磷酸化激活, 加重DNA损伤, 抑制T淋巴细胞白血病肿瘤, 但HDS对小鼠无明显毒性。结论: HDS可作为潜在的抗T淋巴细胞白血病药物, 可抑制细胞周期, 诱导细胞凋亡, 并通过CHK1/CHK2信号通路影响DNA损伤修复过程。

[关键词] T淋巴细胞白血病; 4-羟基水杨酰苯胺; 细胞周期S期阻滞; 细胞凋亡; DNA损伤

[中图分类号] R733.71

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)09-1185-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230901

Effects of 4-hydroxysalicylaniline on the proliferation and apoptosis of T-cell lymphoblastic leukemia

DENG Hui^{1,2,3}, CHEN Gege², XU Li², JIA Xinyan², SHI Jumei^{1,2,3,4*}

¹Shanghai Clinical College, Anhui Medical University, Shanghai 200072; ²Department of Hematology, Shanghai East Hospital, Shanghai 200120; ³the Fifth Clinical College of Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ⁴Department of Hematology, Shanghai Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to investigate the effect of 4-hydroxysalicylaniline (HDS) on the proliferation and apoptosis of T-lymphoblastic leukemia cells, Jurkat and Hut-78, *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** *In vitro*, HDS was used to treat Jurkat and Hut-78 cells with different concentration gradients. The CCK-8 assay and colony formation assay were used to detect the effect of HDS on cell proliferation. Cell cycle changes were detected by flow cytometry, and the expression levels of cycle-related proteins were detected by Western blot. The apoptosis level was detected by flow cytometry, and the expression levels of apoptosis-related proteins were detected by Western blot. DNA damage was detected by γ -H2AX immunofluorescence staining, and the expression levels of DNA damage related proteins were detected by Western blot. *In vivo*, the mouse T-cell lymphoblastic leukemia tumor model was constructed by subcutaneous injection of Jurkat cells, and HDS was injected to observe the effect of drugs on tumor volume and body weight of mice. HE staining was used to observe the morphological changes of tumors after 13 days of HDS treatment. Immunohistochemical staining of Ki67 and γ -H2AX protein was used to analyze the effect of drugs on cell proliferation and DNA damage in tumors. **Results:** In Jurkat and Hut-78 cell lines, HDS could induce cell cycle arrest at S phase, induce cell apoptosis, and block DNA damage repair through phosphorylation of CHK1/CHK2 signaling pathway, both *in vitro* and *in vivo*. HDS inhibited T-cell lymphoblastic leukemia tumors, and it had no obvious toxicity to mice. **Conclusion:** HDS can be used as a potential anti-T-cell

[基金项目] 国家自然科学基金(82170200、82170201、82170190)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shijumei@tongji.edu.cn

lymphoblastic leukemia drug. The effect of HDS on T-cell lymphoblastic leukemia may be accomplished by interfering cell cycle and apoptosis, and DNA damage repair through CHK1/CHK2 signaling pathway.

[Key words] T-cell lymphoblastic leukemia; 4-hydroxysalicylaniline; S phase cell cycle arrest; apoptosis; DNA damage

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(09): 1185-1193]

急性淋巴细胞白血病是一种侵袭性肿瘤,包括急性B淋巴细胞白血病和急性T淋巴细胞白血病。虽然T淋巴细胞白血病5年生存率超过85%,但疾病复发率与死亡率仍非常高^[1-2]。目前迫切需要开发多药化疗的药物谱,针对性地杀伤肿瘤细胞,提高治疗效果。对于T淋巴细胞白血病或其他恶性肿瘤,细胞异常增殖是常见的特征^[3-4]。在特定的细胞类型中干扰这一过程可能会提供潜在的治疗方法。在细胞增殖过程中,DNA损伤修复是细胞正常运行的保证。因此,DNA损伤修复异常成为恶性肿瘤转化的关键。无数新药通过阻断DNA损伤修复来干扰异常增殖,从而在抗肿瘤方面取得了惊人效果^[5-7]。

在DNA复制和损伤修复的过程中,核糖核苷酸还原酶(ribonucleic reductase, RNR)是催化核糖核苷二磷酸合成脱氧核糖核苷酸的关键酶^[8-9]。RNR的上调和激活,可导致肾上腺皮质癌、乳腺癌、子宫内膜癌、胶质母细胞瘤、肝细胞癌等恶性肿瘤的发生,提示RNR可能是肿瘤治疗的潜在靶点^[10-13]。基于RNR的抗癌药物或小分子药物有吉西他滨、氟达拉滨、羟基脲、曲平等^[14-16]。而4-羟基水杨酰苯胺(4-hydroxysalicylaniline, HDS)已被证明,可通过与酶活性位点的竞争结合而抑制RNR酶活性,这也提示HDS可能是一种治疗某些癌症的潜在药物^[14,17]。事实上,HDS已被用于治疗多种肿瘤,如肝细胞癌和多发性骨髓瘤^[14]。但HDS在T淋巴细胞白血病中的作用及其机制尚不清楚。

鉴于HDS的临床优势及其通过抑制细胞增殖对多种癌症的疗效,本研究在体内外实验中观察了HDS对T淋巴细胞白血病的疗效,为开发HDS作为潜在的抗T淋巴细胞白血病药物提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人源细胞株 Jurkat、Hut-78 细胞购自美国 ATCC (American Type Culture Collection)。HDS 由上海中科院药物所惠赠,用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配成 40 mmol/L 的溶液储存于 -20 °C 备用。5 周龄雄性 BALB/c 裸鼠购自江苏华创信诺医药

科技有限公司。培养基 RPMI-1640、DMSO (Gibco 公司,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司,美国);一抗 Cdc25A、CyclinA2、CDK2、GAPDH、Bad、Bax、Bcl-XL、Bcl-2、 γ -H2AX、CHK1、p-CHK1、CHK2、p-CHK2、Ki-67 抗体,HRP 标记的二抗,R488 标记的荧光二抗(Abcam 公司,美国);PI/RNase 细胞周期染色液和 Annexin-V-FITC/PI 试剂盒、流式细胞分析仪(BD 公司,美国);Synergy H4 多功能酶标仪(BioTek 公司,美国);Leica 正置荧光显微镜、Zeiss LSM710 共聚焦显微镜(Leica 公司,德国)。本研究经过同济大学附属上海第十人民医院伦理委员会审查批准[SYXK(沪)2021-0012]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Jurkat 和 Hut-78 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基培养,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中,每 2~3 d 更换 1 次细胞培养液,以维持细胞培养所需条件。

1.2.2 细胞 CCK-8 实验

取处于对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞,以 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的密度接种于 96 孔板, HDS 按梯度稀释后加入对应 96 孔板中,在恒温培养箱中培养 24、48、72 h 后,于检测前 2 h 向每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,继续避光放入 37 °C 恒温培养箱孵育,酶标仪波长在 450 nm 下测量每孔吸光度值,计算细胞存活率,用 CalcuSyn 软件计算 HDS 对细胞的半数致死量(IC₅₀)。

1.2.3 软琼脂糖克隆形成实验

配制 3.5% 和 1.66% 琼脂糖液,高压灭菌后置于 42 °C 水浴锅备用;配制含 20% 血清的 RPMI-1640 培养液备用;将 3.5% 的琼脂糖液和 20% 的 RPMI-1640 培养液按 1:5 比例混合,在 12 孔板中制备下层胶(每孔 1 mL);收集对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞,配制密度为 $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个/mL 细胞悬液,根据浓度加入相应体积的 HDS 母液;将 1.66% 琼脂糖与细胞悬液按 1:5 的比例混合配制上层胶(每孔 700 μ L),室温凝固后将 12 孔板置于培养箱中,每 5~7 d 补充 1 次培养液,集落形成后每孔加入 0.005% 的龙胆紫

染液 1 mL, 室温避光染色 1 h 后吸走残余染液, 拍照并计算克隆形成数。

1.2.4 细胞周期检测

收集对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞, 配成密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液, 按每孔 1 mL 接种至 24 孔板中, 用不同浓度的 HDS 药物处理, 放入培养箱培养; 至处理时间点时收集细胞至流式管中, 按照“先慢后快”的原则, 逐滴向每管加入 1 mL 预冷 ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) 的 70% 乙醇, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 固定至少 12 h, 检测当天离心并用 PBS 清洗 1 遍后, 每管加 300 μL 的细胞周期检测试剂 PI/RNase, 室温避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞凋亡检测

收集对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞, 配成密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液, 按每孔 1 mL 接种至 24 孔板中, 每孔按不同浓度加入 HDS 药物处理, 放入培养箱培养; 至处理时间点时收集细胞至流式管中, 每管加入 2.5 μL Annexin-V-FITC 和 50 μL $1 \times$ Binding Buffer, 室温避光染色 15 min; 每管加入 5 μL PI 和 250 μL $1 \times$ Binding Buffer, 室温避光染色 5 min 后, 用流式细胞仪检测。读取数据, 计算细胞凋亡百分比。

1.2.6 Western blot 检测

收集对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞, 配成密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液, 按不同浓度加入 HDS 药物处理 48 h 后, 用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白并进行蛋白定量, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 取 20 μL 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转移于硝化纤维素 (NC) 微孔滤膜, 5% BSA 封闭 1 h 后进行抗体孵育 ($4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜)。次日用 PBST 清洗 NC 膜 3 遍以后, 根据一抗种属进行二抗孵育 (室温, 1 h), 再用 PBST 清洗 3 遍。Amersham Imager 600 自动化学发光凝胶成像仪曝光检测并保存图片, 用 Image J 软件对图片进行分析。

1.2.7 γ -H2AX 免疫荧光法

收集对数生长期的 Jurkat 和 Hut-78 细胞, 配成密度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液, 按不同浓度加入 HDS 药物处理 48 h 后, 用 PBS 清洗 1 次, 按细胞沉淀: PBS = 1: 20 (体积比) 的比例加入适量 PBS 重悬细胞, 混匀后每个样品取 50 μL 均匀涂片于正电荷黏附防脱载玻片上 (涂片面积约为 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$), 经 4% 多聚甲醛固定、0.5% Triton X-100 破膜、0.5% BSA 封闭、一抗 γ -H2AX 抗体孵育 ($4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜)、R488 标记的二抗孵育 (室温, 1 h)、DAPI 孵育 10 min、

防荧光淬灭剂封片后, 激光扫描共聚焦显微镜观察 γ -H2AX 阳性细胞, 并拍照。

1.2.8 裸鼠移植瘤与 HDS 的抗肿瘤活性检测

收集对数生长期的 Jurkat 细胞, 无菌 PBS 清洗 2 次并用其配成密度为 2×10^7 个/mL 的细胞悬液, 与基质胶按体积比 1: 1 混匀置于冰上备用。裸鼠注射部位消毒后, 用 1 mL 注射器抽取细胞悬液, 皮下注射 100 μL , 定期观察裸鼠情况。待移植瘤长至约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 时, 将裸鼠随机分为对照组和 HDS 处理组。HDS 处理组腹腔注射 HDS 100 mg/(kg·d), 对照组注射同体积的溶剂 DMSO。每日记录裸鼠移植瘤的大小, 至实验结束, 裸鼠安乐死后, 剥离皮下肿瘤组织, 并收集裸鼠心脏、肝脏和肾脏组织, 在 4% 多聚甲醛中固定备用。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 实验组与对照组间比较采用 Student's *t* 检验; 多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 各组之间的两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

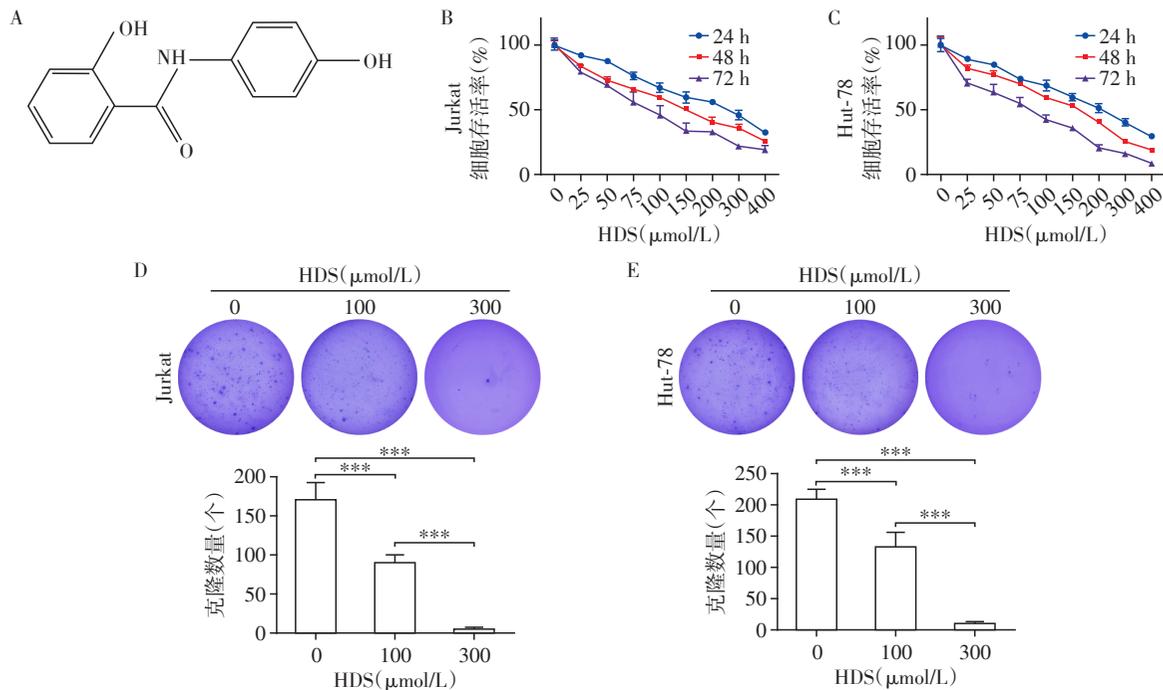
2 结果

2.1 HDS 可抑制 T 淋巴细胞白血病细胞的增殖和克隆形成

HDS 是一种临床批准的药物, 其相对分子量为 229.24 Da (图 1A)。为了确定 HDS 是否具有抗 T 淋巴细胞白血病肿瘤的能力, 将不同浓度的 HDS (0、25、50、75、100、150、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用于 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 和 Hut-78 细胞 24、48、72 h。HDS 对 T 淋巴细胞白血病细胞株有细胞毒性, 且表现出剂量和时间依赖性 (图 1B、C)。HDS 作用 48 h 后, Jurkat 和 Hut-78 细胞半数抑制浓度 (IC_{50} 值) 分别为 151.18 $\mu\text{mol/L}$ 和 173.67 $\mu\text{mol/L}$ 。琼脂集落形成法检测不同浓度的 HDS 对 Jurkat 和 Hut-78 细胞集落形成能力的影响。结果显示, HDS 可显著抑制两种细胞系的集落形成, 且集落形成数与药物浓度呈负相关 (图 1D、E)。

2.2 HDS 可诱导 T 淋巴细胞白血病细胞停滞于细胞周期 S 期

为探讨 HDS 对 T 淋巴细胞白血病细胞细胞周期的影响, 用不同浓度的 HDS 作用于 Jurkat 和 Hut-78 细胞 (0、100、300 $\mu\text{mol/L}$) 48 h, 然后用碘化丙啶 (PI) 染色和流式细胞术分析细胞周期。结果显示, 处于 S 期的 Jurkat (图 2A) 和 Hut-78 (图 2B) 细胞群比例逐



A: HDS的分子结构; B、C: Jurkat(B)和Hut-78细胞(C)以不同浓度(0、25、50、75、100、150、200、300、400 μmol/L)HDS处理24、48、72 h, CCK-8检测细胞活力($n=3$); D、E: 0、100、300 μmol/L HDS作用于Jurkat细胞(D)和Hut-78细胞(E), 集落形成实验显示HDS对Jurkat细胞和Hut-78细胞的集落形成能力有抑制作用($n=3$)。两组比较, $***P < 0.001$ 。

图1 HDS可抑制T淋巴细胞白血病细胞的增殖和克隆形成

Figure 1 HDS can inhibit the proliferation and colony formation of T-lymphoblastic leukemia cells

渐增高,且呈浓度依赖性(图2C、D)。Western blot实验结果也表明,经HDS处理, Jurkat和Hut-78细胞的Cdc25A、CDK2、Cyclin A2表达水平明显下调(图2E~G)。综上所述, HDS通过抑制Cdc25A、CDK2和Cyclin A2等细胞周期S期相关蛋白的表达,使T淋巴细胞白血病细胞停滞于细胞周期S期。

2.3 HDS可诱导T淋巴细胞白血病细胞凋亡

为了进一步探讨HDS对T淋巴细胞白血病细胞的影响,并确定T淋巴细胞白血病细胞的增殖抑制是否是通过诱导凋亡而引起,用不同浓度的HDS(0、25、50、100、300 μmol/L)处理Jurkat和Hut-78细胞48 h(图3A、B)。细胞流式结果表明, HDS可显著促进Jurkat和Hut-78细胞的凋亡,且呈浓度依赖性(图3C、D)。同时,通过免疫印迹法检测细胞凋亡相关蛋白Bad、Bax、Bcl-XL和Bcl-2的表达。结果显示,在两细胞系中,促凋亡蛋白Bad和Bax表达上调,抗凋亡蛋白Bcl-XL和Bcl-2表达降低,且呈剂量依赖关系(图3E~G)。这些结果与流式细胞检测的趋势是一致的,即HDS可显著诱导T淋巴细胞白血病细胞的凋亡。

2.4 HDS可通过CHK1/CHK2信号通路阻断T淋巴细胞白血病细胞的DNA损伤修复过程

为了确定HDS是否影响T淋巴细胞白血病细

胞的DNA损伤修复过程,进而加重细胞DNA损伤,以100 μmol/L和300 μmol/L的HDS处理Jurkat(图4A)和Hut-78(图4B)细胞48 h,并检测DNA合成损伤的标志基因 γ -H2AX的表达。结果显示,与对照组相比, HDS处理组中, Jurkat和Hut-78细胞 γ -H2AX阳性细胞比例明显增加,且呈剂量依赖关系(图4C、D)。同时,用免疫印迹法检测DNA损伤相关蛋白CHK1、p-CHK1、CHK2、p-CHK2和 γ -H2AX的表达水平(图4E~G)。结果表明, γ -H2AX的表达与免疫荧光染色数据的趋势相一致,且HDS可通过磷酸化相应的下游分子CHK1和CHK2,抑制DNA损伤修复过程,导致T淋巴细胞白血病细胞DNA损伤加重。

2.5 HDS可抑制小鼠中T淋巴细胞白血病肿瘤的生长

建立裸鼠皮下T淋巴细胞白血病细胞异种移植模型来研究HDS对T淋巴细胞白血病肿瘤的治疗效果。采用5周龄BALB/c裸鼠,皮下注射Jurkat细胞(1×10^7 个/只)。小鼠T淋巴细胞白血病肿瘤形成后, HDS组每只每天腹腔注射100 mg/kg HDS,对照组注射等量的DMSO,同时每天测量肿瘤大小和小鼠体重,共13 d。数据显示,与对照组相比,经HDS处理

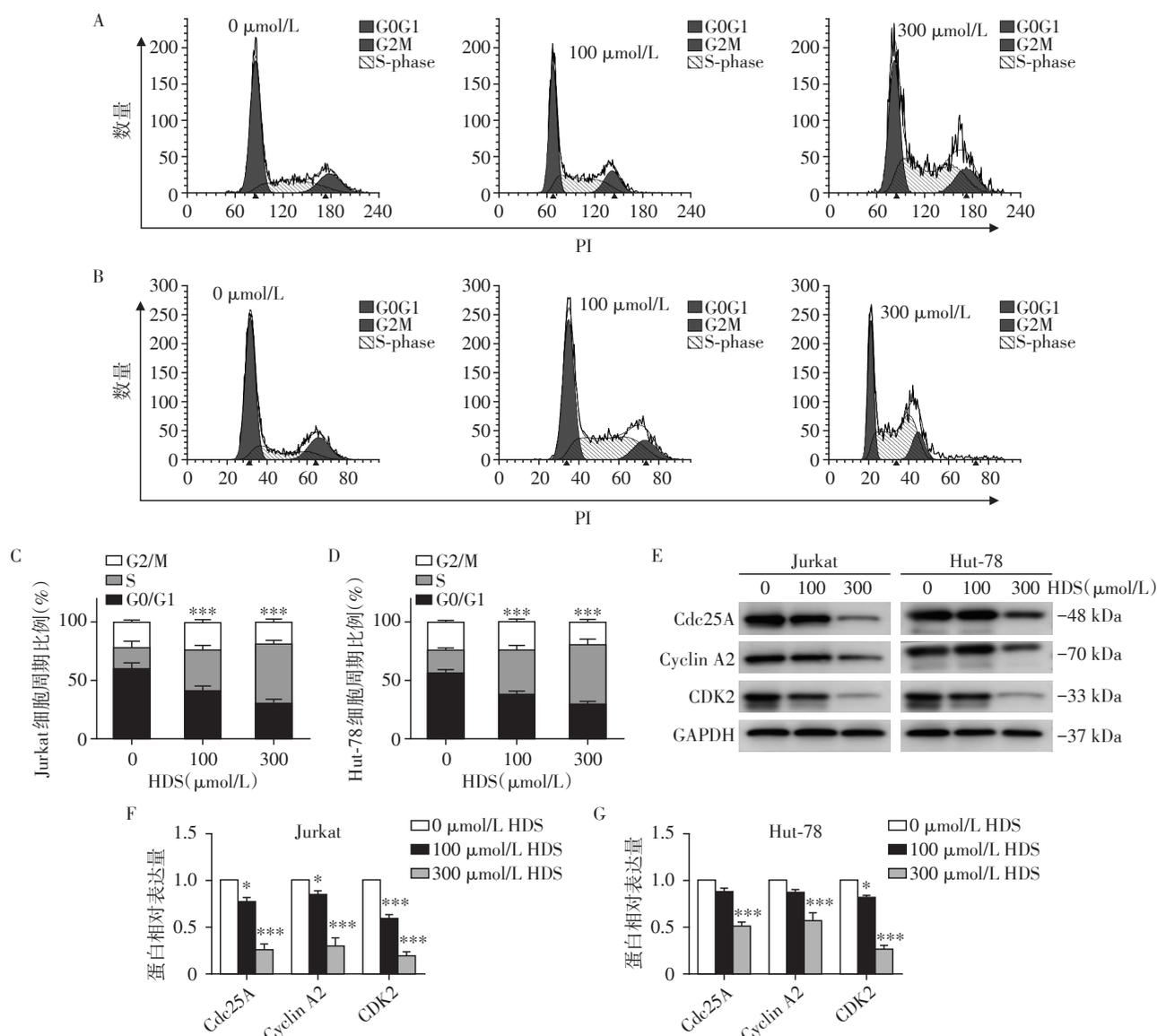


图2 HDS可诱导T淋巴细胞白血病细胞停滞于细胞周期S期
Figure 2 HDS can induce cell cycle arrest at S phase of T-lymphoblastic leukemia cells

A、B:用0、100、300 μmol/L的HDS处理Jurkat细胞(A)和Hut-78细胞(B)48 h,用PI染色和流式细胞术检测细胞周期(n=3);C、D:Jurkat(C)和Hut-78(D)细胞在细胞周期各时相的百分比,与0 μmol/L HDS处理组比较,***P < 0.001(n=3);E:用0、100、300 μmol/L HDS处理Jurkat和Hut-78细胞48 h,Western blot检测Cdc25A、Cyclin A2和CDK2蛋白表达水平;F、G:Jurkat细胞(F)和Hut-78细胞(G)中各蛋白表达的灰度值分析,与0 μmol/L HDS组比较,*P < 0.05,***P < 0.001(n=3)。

图2 HDS可诱导T淋巴细胞白血病细胞停滞于细胞周期S期

Figure 2 HDS can induce cell cycle arrest at S phase of T-lymphoblastic leukemia cells

的小鼠,其T淋巴细胞白血病肿瘤生长明显受到抑制(图5A、B)。但HDS组与对照组小鼠体重无显著差异(图5C)。

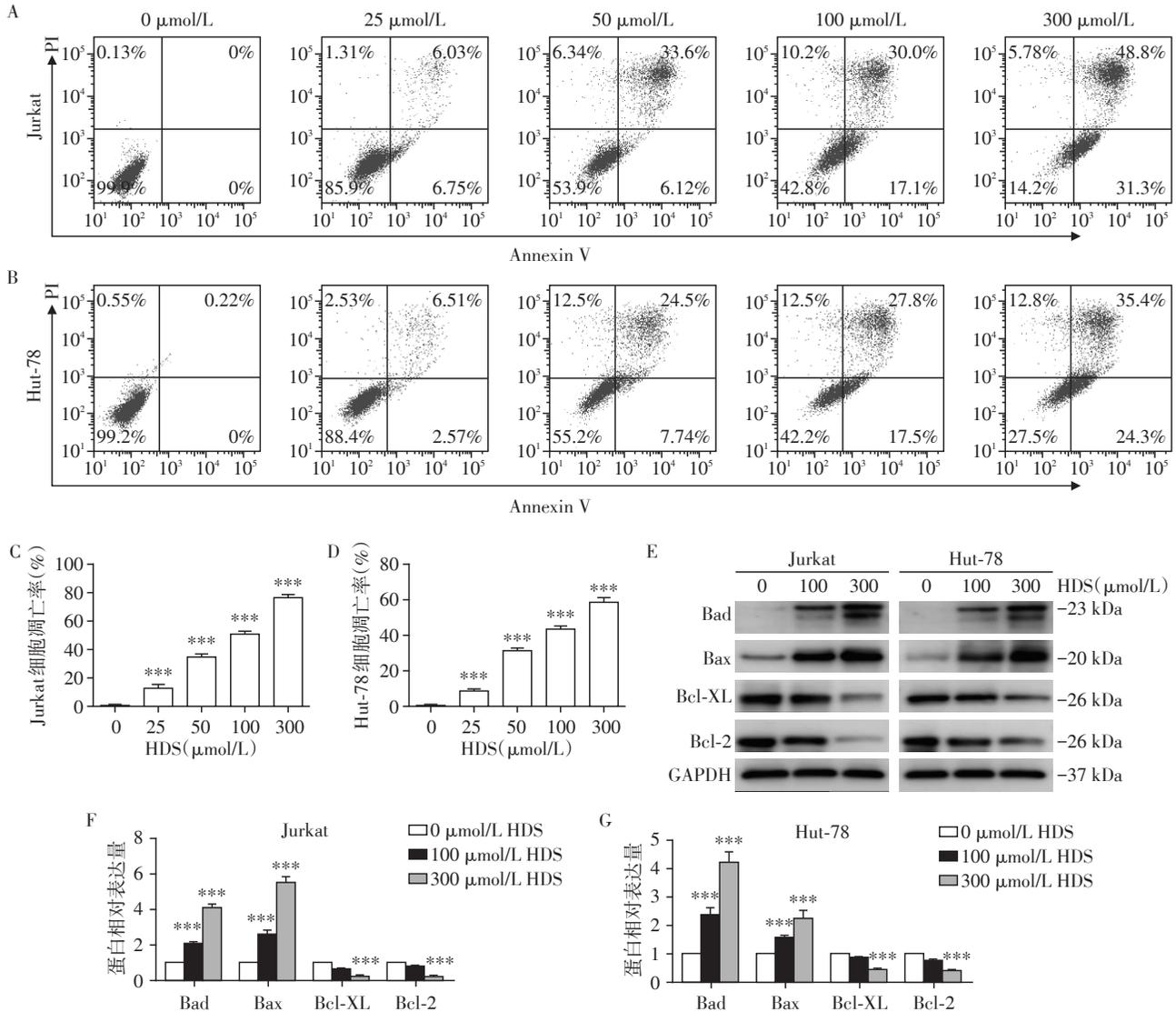
HDS处理13 d后,取动物的肿瘤组织,进行切片和苏木精-伊红染色,结果显示HDS组小鼠的肿瘤组织坏死明显增加,但心脏、肝脏和肾脏组织没有明显变化(图5D)。上述实验结果表明,HDS可抑制小鼠体内移植的T淋巴细胞白血病肿瘤,但对小鼠无明显毒性。

将肿瘤组织切片进行免疫组化染色分析,数据

显示,HDS组小鼠肿瘤组织中,Ki67阳性细胞比例较对照组明显降低,γ-H2AX阳性细胞比例较对照组明显升高(图5E),表明在小鼠体内,HDS亦可显著诱导T淋巴细胞白血病细胞DNA损伤,抑制T淋巴细胞白血病细胞的增殖。

3 讨论

急性淋巴细胞白血病是一种侵袭性肿瘤,目前针对T淋巴细胞白血病的治疗方案效果较差,疾病复发率与死亡率仍非常高^[1-2]。因此,开发新的药物



A、B:用HDS(0、25、50、100、300 μmol/L)作用于Jurkat(A)和Hut-78(B)细胞48 h后,收集细胞,进行Annexin-V/PI双重染色,并用流式细胞仪检测;C、D:Jurkat(C)和Hut-78(D)细胞的凋亡率,与0 μmol/L HDS处理组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$);E:用Western blot检测HDS作用48 h后,细胞Bad、Bax、Bcl-XL和Bcl-2的蛋白表达水平;F、G:Jurkat细胞(F)和Hut-78细胞(G)各蛋白表达的灰度值分析,与0 μmol/L组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 HDS可诱导T淋巴细胞白血病细胞凋亡

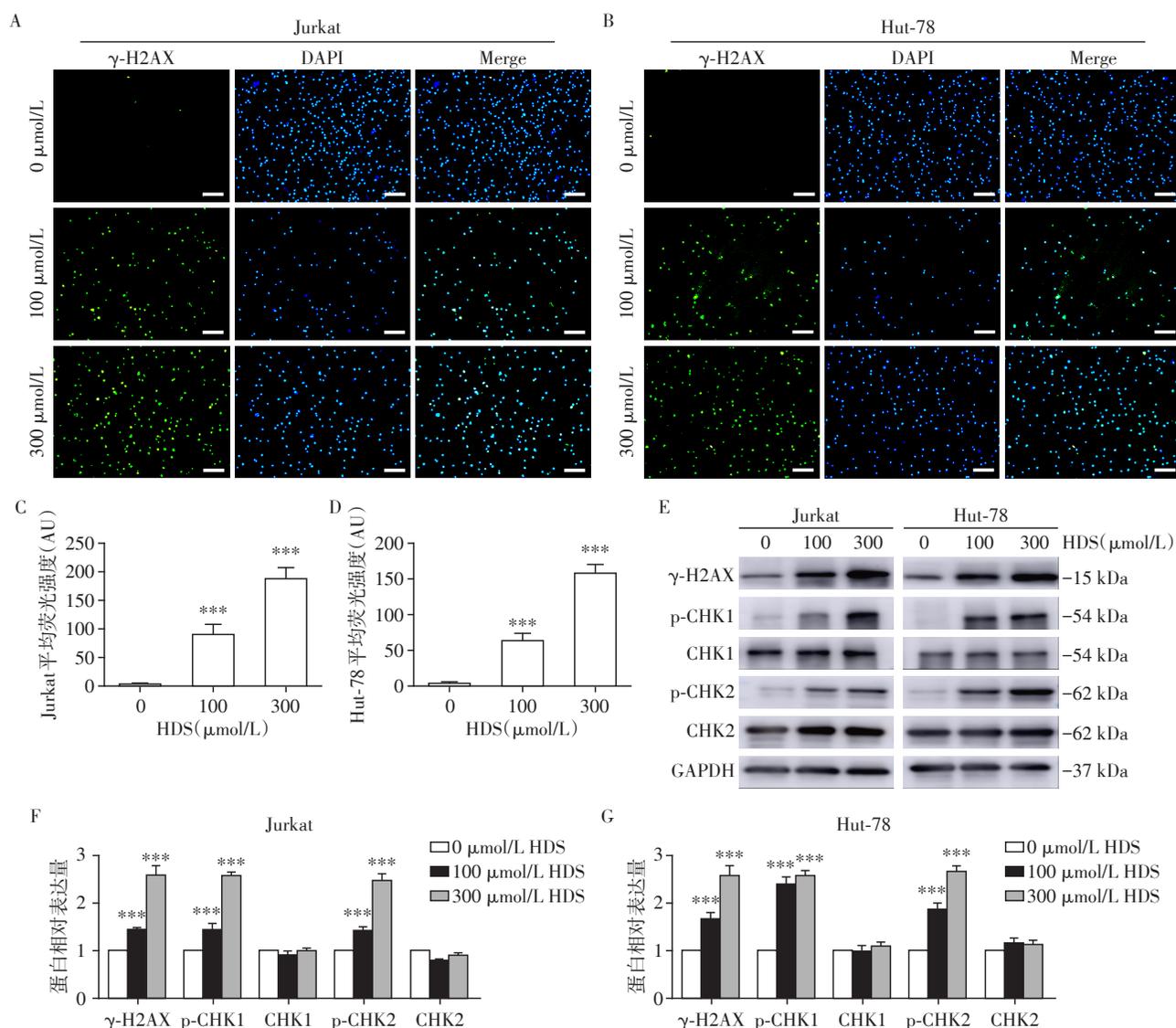
Figure 3 HDS can induce the apoptosis of T-lymphoblastic leukemia cells

和治疗策略非常有意义。

本研究以T淋巴细胞白血病细胞株Jurkat和Hut-78细胞为研究对象,探讨HDS对T淋巴细胞白血病的体外治疗作用。通过CCK-8和克隆形成实验,发现HDS以剂量和时间依赖的方式显著抑制T淋巴细胞白血病细胞的生长。CCK-8结果表明,HDS通过下调T淋巴细胞白血病细胞中Cdc25A、CDK2和Cyclin A2的蛋白水平,以剂量和时间依赖的方式阻断细胞周期的S期。

除了细胞周期停滞外,细胞死亡也可能导致肿瘤抑制^[18]。细胞凋亡是细胞死亡的常见亚型^[19]。

因此,研究了HDS作用后T淋巴细胞白血病细胞的凋亡表型。Annexin V/PI双重染色和流式细胞仪检测结果显示,T淋巴细胞白血病细胞株Jurkat和Hut-78细胞发生明显的细胞凋亡,在特定剂量下培养48 h,凋亡率为60%~80%。此外,Bad、Bax、Bcl-2和Bcl-XL在细胞凋亡中起重要作用^[19]。HDS处理肿瘤细胞后,Western blot结果表明,促凋亡蛋白Bax和Bad表达上调,抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-XL表达降低,呈剂量依赖关系,提示这可能是HDS抗T淋巴细胞白血病的相关机制。此外,与细胞凋亡相关的详细通路还有待进一步探索。



A、B:用HDS(0、100、300 $\mu\text{mol/L}$)处理Jurkat(A)和Hut-78细胞(B)48 h,免疫荧光法标记 $\gamma\text{-H2AX}$,共聚焦显微镜检测 $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞比例, $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞呈绿色(比例尺:200 μm);C、D:用Image J计算Jurkat(C)和Hut-78(D)细胞的 $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞的平均荧光强度,与0 $\mu\text{mol/L}$ HDS处理组比较,*** $P < 0.001$ ($n=5$);E:100、300 $\mu\text{mol/L}$ HDS处理Jurkat和Hut-78细胞后,Western blot检测细胞CHK1、p-CHK1、CHK2、p-CHK2和 $\gamma\text{-H2AX}$ 的蛋白水平;F、G:对Jurkat细胞(F)和Hut-78细胞(G)各蛋白表达的灰度值分析,与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图4 HDS可通过CHK1/CHK2信号通路阻断T淋巴细胞白血病细胞的DNA损伤修复过程

Figure 4 HDS can block the DNA damage repair process of T-lymphoblastic leukemia cells through the CHK1/CHK2 signaling pathway

HDS是一种与核糖核苷酸还原酶亚单位M2(ribonucleotide reductase small subunit M2, RRM2)受体竞争结合的RNR抑制剂。RNR在DNA损伤修复中发挥关键作用^[16]。此外,关于HDS在其他类型肿瘤中的研究也很多,如肝癌^[13]。研究认为,HDS可能会干扰DNA损伤修复过程。 $\gamma\text{-H2AX}$ 染色结果显示,经HDS处理的细胞DNA损伤加重。蛋白免疫印迹结果显示,HDS处理上调了p-CHK1和p-CHK2的表达。CHK2是一种位于DNA损伤检查点的限速蛋白,可以指导与S期细胞周期停滞相关的

Cdc25A^[20-21]。ATM/ATR可以反映DNA损伤,并将信号传递给其下游分子CHK2/CHK1,最终导致细胞周期停滞或凋亡^[22-23]。

为了进一步验证药物的有效性和安全性,建立了T淋巴细胞白血病异种移植小鼠模型。在体内,HDS可以抑制小鼠T淋巴细胞白血病肿瘤细胞的增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,从而增加肿瘤组织坏死,但对小鼠的心脏、肝脏等其他器官没有明显影响,表明HDS对T淋巴细胞白血病肿瘤具有杀伤作用,且无明显毒性。结合体外实验数据,表明HDS可有效

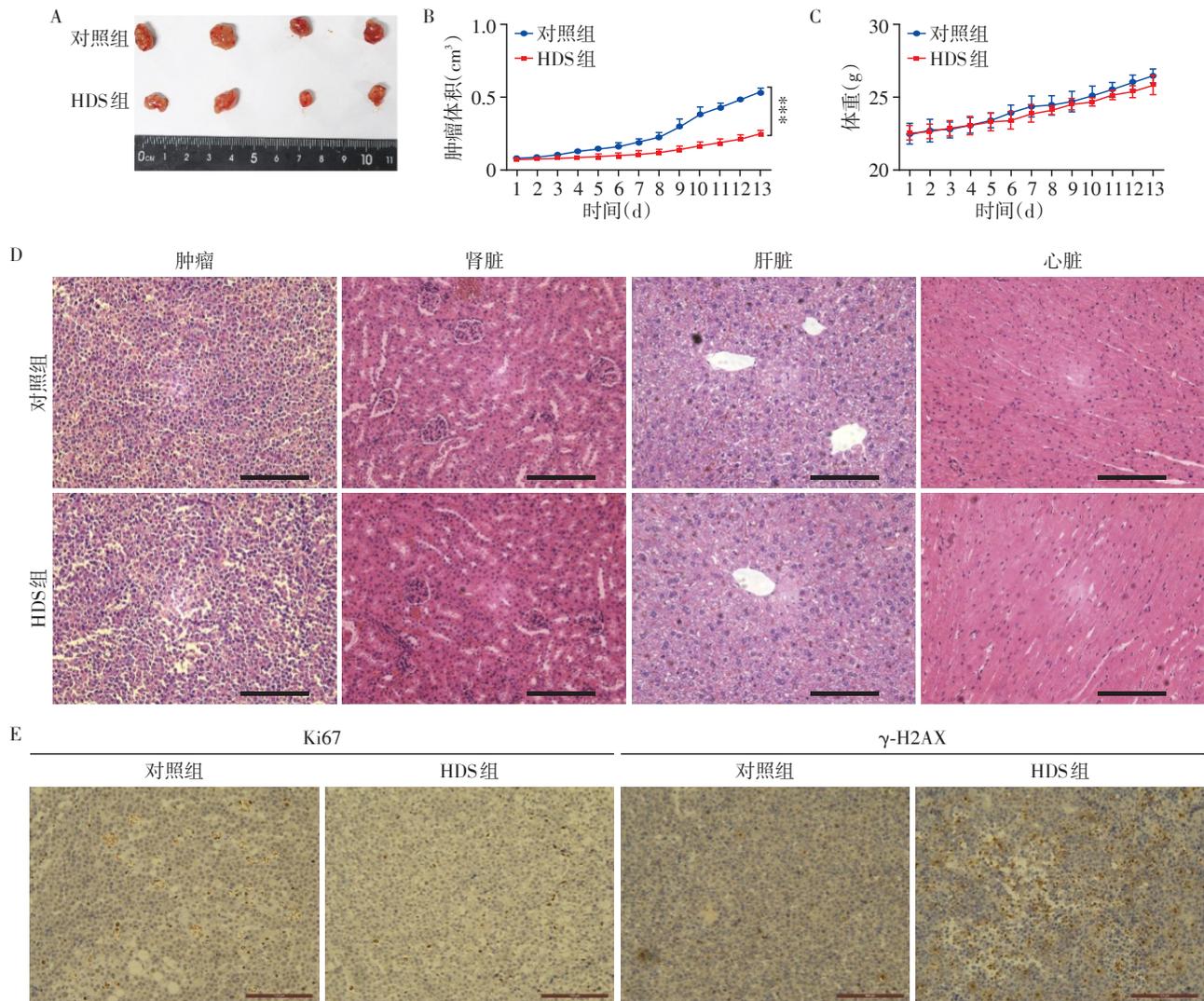


图5 HDS可抑制小鼠中T淋巴细胞白血病肿瘤的生长
Figure 5 HDS can inhibit the growth of T-cell lymphoblastic leukemia tumors in mice

A: 两组肿瘤外观($n=4$); B: 连续13 d每天测量肿瘤体积, 两组比较, $***P < 0.001$ ($n=4$); C: 两组小鼠体重比较($n=4$); D: 应用HDS后, 肿瘤组织和肾、肝、心脏苏木精-伊红(HE)染色(比例尺: $200 \mu\text{m}$); E: 免疫组织化学进行Ki-67和 γ -H2AX染色, 检测治疗后小鼠体内肿瘤组织细胞增殖和DNA损伤情况(比例尺: $200 \mu\text{m}$)。

图5 HDS可抑制小鼠中T淋巴细胞白血病肿瘤的生长

Figure 5 HDS can inhibit the growth of T-cell lymphoblastic leukemia tumors in mice

杀伤T淋巴细胞白血病细胞,可作为治疗T淋巴细胞白血病的靶向药物。

HDS在抗肿瘤方面有其独特优势。首先,HDS是一种成分清晰、结构稳定的复方药物,可以在体外合成;其次,它已被临床批准用于肝胆疾病,本研究将旧药用于新的目的,改变现有药物的用途,可以显著降低新药开发的费用和时间;此外,HDS作为一种临床药物对T淋巴细胞白血病具有明显的疗效和安全性。

HDS在T淋巴细胞白血病治疗中的应用仍需进一步探索。首先,目前尚不清楚在停药期间移植的T淋巴细胞白血病肿瘤是否会复发;其次,HDS抗T淋巴细胞白血病肿瘤的具体机制除诱导细胞凋亡

和细胞周期停滞外,还有待进一步研究;最后,HDS作为RNR抑制剂,可以影响RRM2的活性,需要进一步找出HDS作用RNR的亚型以及与这些还原酶结合的金属因子,这可能涉及细胞铁死亡或与金属离子相关的其他形式的细胞死亡^[10]。

综上所述,体外和体内实验均显示,HDS对T淋巴细胞白血病有良好的治疗效果。它可促进细胞凋亡、通过CHK1/CHK2信号通路加重DNA损伤,且可诱导S期细胞周期停滞等途径抑制细胞增殖。HDS已被批准用于肝病治疗,为进一步临床应用用于T淋巴细胞白血病患者提供了理论依据。本研究也为进一步开发和优化其他药物的使用策略提供了依据。

[参考文献]

- [1] ANON. A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-hodgkin's lymphoma [J]. *Blood*, 1997, 89(11):3909-3918
- [2] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [J]. *Blood*, 2016, 127(20):2391-2405
- [3] KIYKIM A, N EKER, SUREKLI O, et al. Malignancy and lymphoid proliferation in primary immune deficiencies; hard to define, hard to treat [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2020, 67(2):e28091
- [4] LAURA B, ROBERT A, FERRANDO ADOLFO A. Deregulation of enhancer structure, function, and dynamics in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(5):418-431
- [5] CHANG S, LI B, XIE Y, et al. DCZ0014, a novel compound in the therapy of diffuse large B-cell lymphoma via the B cell receptor signaling pathway [J]. *Neoplasia*, 2022, 24(1):50-61
- [6] WANG Y, HUANG J, LI B, et al. A small-molecule inhibitor targeting TRIP13 suppresses multiple myeloma progression [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(3):536-548
- [7] ZHANG Z, MAO H, DU X, et al. A novel small molecule agent displays potent anti-myeloma activity by inhibiting the JAK2 - STAT3 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8):9296-9308
- [8] AYE Y, LI M, LONG M J C, et al. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies [J]. *Oncogene*, 2015, 34(16):2011-2021
- [9] NORDLUND P, REICHARD P. Ribonucleotide reductases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75(1):681-706
- [10] LIU X, ZHANG H, LAI L, et al. Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers [J]. *Clin Sci*, 2013, 124(9):567-578
- [11] GUILLAUME R, WU X N, HARRIS L E, et al. Targeting IGF perturbs global replication through ribonucleotide reductase dysfunction [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(8):2128-2141
- [12] MAZZU Y Z, ARMENIA J, CHAKRABORTY G, et al. A novel mechanism driving poor-prognosis prostate cancer: overexpression of the DNA repair gene, ribonucleotide reductase small subunit M2 (RRM2) [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(14):4480-4492
- [13] SATOW R, SHITASHIGE M, KANAI Y, et al. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(9):2518-2528
- [14] TANG Q, WU L, XU M, et al. Osalmid, a novel identified RRM2 inhibitor, enhances radiosensitivity of esophageal cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020, 108(5):1368-1379
- [15] RAHMAN M A, AMIN A R M R, WANG D, et al. RRM2 regulates Bcl-2 in head and neck and lung cancers: a potential target for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(13):3416-3428
- [16] CHEN C W, LI Y, HU S, et al. DHS (trans-4, 4'-dihydroxystilbene) suppresses DNA replication and tumor growth by inhibiting RRM2 (ribonucleotide reductase regulatory subunit M2) [J]. *Oncogene*, 2019, 38(13):2364-2379
- [17] LIU X, XU Z, HOU C, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by targeting ribonucleotide reductase M2 protein [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 103:118-128
- [18] STRASSER A, VAUX D L. Cell death in the origin and treatment of cancer [J]. *Mol Cell*, 2020, 78(6):1045-1054
- [19] LIU J, HONG M, LI Y, et al. Programmed cell death tunes tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:847345
- [20] CHUI H C, YI S W, CHOW-JEREMY P H, et al. The relative contribution of CHK₁ and CHK₂ to adriamycin-induced checkpoint [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 304(1):1-15
- [21] MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3):153-166
- [22] WALTERS D K, WU X, TSCHUMPER R C, et al. Evidence for ongoing DNA damage in multiple myeloma cells as revealed by constitutive phosphorylation of H2AX [J]. *Leukemia*, 2011, 25(8):1344-1353
- [23] KASTAN M B, BARTEK J. Cell-cycle checkpoints and cancer [J]. *Nature*, 2004, 432(7015):316-323

[收稿日期] 2023-03-30

(本文编辑:陈汐敏)