

西达苯胺联合传统化疗药物促进急性 T 淋巴细胞系的凋亡^{*}

华中科技大学同济医学院附属同济医院 潘越 朱学海^{*}, 武汉 430030

摘要 目的:探讨西达苯胺联合伊达比星或左旋门冬酰胺酶对急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 增殖及凋亡的影响。方法:CCK8 法检测西达苯胺、伊达比星、左旋门冬酰胺酶单药或两药联合对 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 细胞的增殖抑制作用,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blot 法检测凋亡相关蛋白的表达。结果:西达苯胺、伊达比星、左旋门冬酰胺酶单药作用于细胞,细胞的增殖抑制呈现药物浓度及作用时间依赖性。流式细胞术检测发现,西达苯胺联合伊达比星或左旋门冬酰胺酶作用于细胞相较于任何一种单药诱导细胞凋亡更加明显(均 $P < 0.05$),具有明显的协同效应($CI < 0.7$),且联合用药组细胞凋亡蛋白表达水平较单药组显著升高。结论:西达苯胺联合伊达比星或左旋门冬酰胺酶具有协同抑制急性 T 淋巴细胞白血病细胞系 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 增殖,促进细胞凋亡的作用。

关键词 西达苯胺;伊达比星;左旋门冬酰胺酶;急性淋巴细胞白血病

中图分类号 R551.2 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzz20210216

Chidamide combined with traditional chemotherapy promotes apoptosis of T lymphoblastic leukemia cell lines PAN Yue, ZHU Xue-hai^{*}. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To investigate the effect of chidamide combined with idarubicin (IDA) or L-Asparaginase (L-ASP) on the proliferation and apoptosis of acute T lymphoblastic leukemia cell line Jurkat, MOLT4 and CCRF-CEM. Methods: CCK8 kit was used to determine the anti-proliferation effect of different concentrations of chidamide, IDA and L-ASP. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry and the expression of apoptosis-associated protein was detected by Western blotting. Results: Chidamide, IDA and L-ASP displayed inhibitory effects on proliferation of cell lines in a dose- and time-dependent manner. The combination of chidamide with IDA or L-ASP led to higher apoptosis than chidamide, IDA or L-ASP alone in the same concentration gradient after 48 h ($P < 0.05$), and the cooperation indexes of the two drugs were all less than 0.7. In addition, the expression of apoptosis-associated protein was significantly higher in combination group than in the single group. Conclusion: Combination of chidamide with IDA or L-ASP shows a significantly synergistic effects on proliferation inhibition and apoptosis of acute T-cell lymphoblastic leukemia cell line Jurkat, MOLT4 and CCRF-CEM, which may be associated with apoptosis-associated protein expression.

Key words Chidamide; Idarubicin; L-Asparaginase; Acute lymphoblastic leukemia

急性 T 淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)是一类源于胸腺 T 祖细胞,好发于青少年的血液系统恶性肿瘤,临床常伴有纵隔巨块,易浸润中枢神经系统、肝脾等组织,以进展凶险、常规化疗不敏感著称,具有强侵袭性及异质性^[1]。近年来,随着化疗、免疫治疗及造血干细胞移植等综合治疗方法的发展,T-ALL 患者的整体生存(overall survival, OS)率有所改善,但仍有相当部分复发或难治性的患者,其对标准化疗方案不敏感,

难以被常规化疗诱导缓解,预后很差^[2~4]。西达苯胺(Chidamide)作为新一代酰胺类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂,被批准用于治疗复发/难治性外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T cell lymphoma, PTCL),但也有研究表明其对 T-ALL 具有一定疗效^[5]。伊达比星(Idarubicin, IDA)与左旋门冬酰胺酶(L-Asparaginase, L-ASP)是治疗 T-ALL 的常用化疗药物,常与其他药物联用作为 T-ALL 的一线诱导缓解及巩固治疗方案^[6~8]。前期临床观察发现西达苯胺联合传统化疗药物对复发/难治性 T-ALL 具有一定疗效^[5],本研究以 T-ALL 细胞系为研究对象,选取 3 种 T-ALL 细胞系 Jurkat、

^{*}基金项目:国家自然科学基金(No:81873456)

^{*}通信作者:朱学海, E-mail: zhuxuehaitj@163.com

MOLT4 和 CCRF-CEM, 分别观察西达苯胺联合伊达比星或左旋门冬酰胺酶对其增殖及凋亡的影响, 为后续西达苯胺联合传统化疗药物应用于 T-ALL 的临床治疗提供一定的实验依据。

材料与方法

试剂与仪器 西达苯胺、IDA、L-ASP 均购自美国 Med Chem Express 公司, 西达苯胺、伊达比星分别溶于 DMSO, -80°C 保存, 左旋门冬酰胺酶溶于 PBS, -20°C 保存。RPMI1640 培养基、PBS、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, Cell Counting Kit8 (CCK8) 试剂购自上海诺唯赞生物有限公司, Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自武汉安特捷生物有限公司, β -actin、Cleaved-Caspase-3、8、9、PARP 兔抗人单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品; CO_2 恒温孵育箱为美国 Thermo Scientific 公司产品。

细胞来源与培养 T-ALL 细胞系 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 均由华中科技大学同济医学院附属同济医院血液内科实验室提供, 均悬浮培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 在 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的恒温培养箱中培养, 48 ~ 72 h 传代换液, 取对数生长期的细胞进行实验, 所有实验均独立重复 3 次。

CCK8 法检测药物对细胞增殖的影响 取对数生长期的 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 96 孔板, 每孔 $100\mu\text{L}$, 每组设置 5 个平行复孔, 分别加入不同浓度的西达苯胺、IDA 和 L-ASP。作用于 Jurkat 细胞的西达苯胺终浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8 μM , IDA 终浓度 5、10、20、40、80、160 nM, L-ASP 终浓度为 1、10、100、1000、10 000、20 000 U/L; 作用于 MOLT4 细胞的西达苯胺终浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8 μM , IDA 终浓度 2.5、5、10、20、40、80 nM, L-ASP 终浓度为 0.5、1、2、5、10、100 U/L; 作用于 CCRF-CEM 细胞的西达苯胺终浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8 μM , IDA 终浓度 10、100、200、500、1 000、2 000 nM, L-ASP 终浓度为 1、5、10、50、100、1 000 U/L。在培养箱中培养 24 h 和 48 h 后, 每孔加入 $10\mu\text{L}$ CCK8 溶液并继续孵育 3 h, 用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度 (A), 计算细胞增殖抑制率。计算公式如下: 细胞增殖抑制率 (%) = $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{本底对照孔}}) / (A_{\text{空白对照孔}} - A_{\text{本底对照孔}}) \times 100\%$ 。

AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取对数生长期的 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞, 以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 每组设置 3 个平行复孔, 分别加入不同浓度的西达苯胺、IDA 和 L-ASP。作用 48 h 后收集细胞悬液, $1\ 200\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 $200\ \mu\text{L}$ 的结合缓冲液重悬细胞, 避光加入 $2\ \mu\text{L}$ 的 AnnexinV-FITC 和 $1.5\ \mu\text{L}$ 的 PI, 避光孵育 15 min, 1 h 内上流式细胞仪检测, 采用 Calcu Syn 软件计算协同指数 (combination index, CI)。

Western blot 法检测蛋白表达水平 取对数生长期的 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞各 5×10^6 个, 分别加入不同浓度的药物作用 48 h 后收集细胞悬液。将未处理细胞作为对照组, 加入药物作用的细胞作为实验组。作用于 Jurkat 细胞的西达苯胺终浓度为 3 μM , IDA 终浓度为 10 nM, L-ASP 终浓度为 6 000 U/L; 作用于 MOLT4 细胞的西达苯胺终浓度为 3 μM , IDA 终浓度为 5 nM, L-ASP 终浓度为 10 U/L; 作用于 CCRF-CEM 细胞的西达苯胺终浓度为 2 μM , IDA 终浓度为 400 nM, L-ASP 终浓度为 30 U/L。细胞悬液 $1\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min 弃上清, 预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 细胞沉淀中加入细胞裂解液混匀后冰上裂解 20 min, 离心收集上清, 考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。以 40 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 后转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 按照抗体说明书加入相应浓度的 β -actin、Cleaved-Caspase-3、8、9 以及 PARP 抗体, 4°C 孵育过夜, 次日洗涤后加入相应二抗共孵育 1 h, 洗涤后进行曝光显影。

统计学处理 采用 SPSS 25.0 及 Graphpad Prism 8.0 统计学软件进行数据分析, 组间比较采用 One-way ANOVA 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

西达苯胺、IDA 和 L-ASP 对 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞增殖的影响 西达苯胺、IDA 和 L-ASP 均能抑制 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞的增殖, 且作用呈时间和浓度依赖性, 随着药物浓度的增加以及作用时间延长, 细胞增殖抑制更加明显, 见图 1。

西达苯胺、IDA 和 L-ASP 对 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞凋亡的影响 根据细胞增殖抑制检测的结果, 选用较低浓度的西达苯胺、IDA 和 L-ASP 分别或两药联合作用于 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞 48 h, 不同浓度药物处理均能引起细胞凋

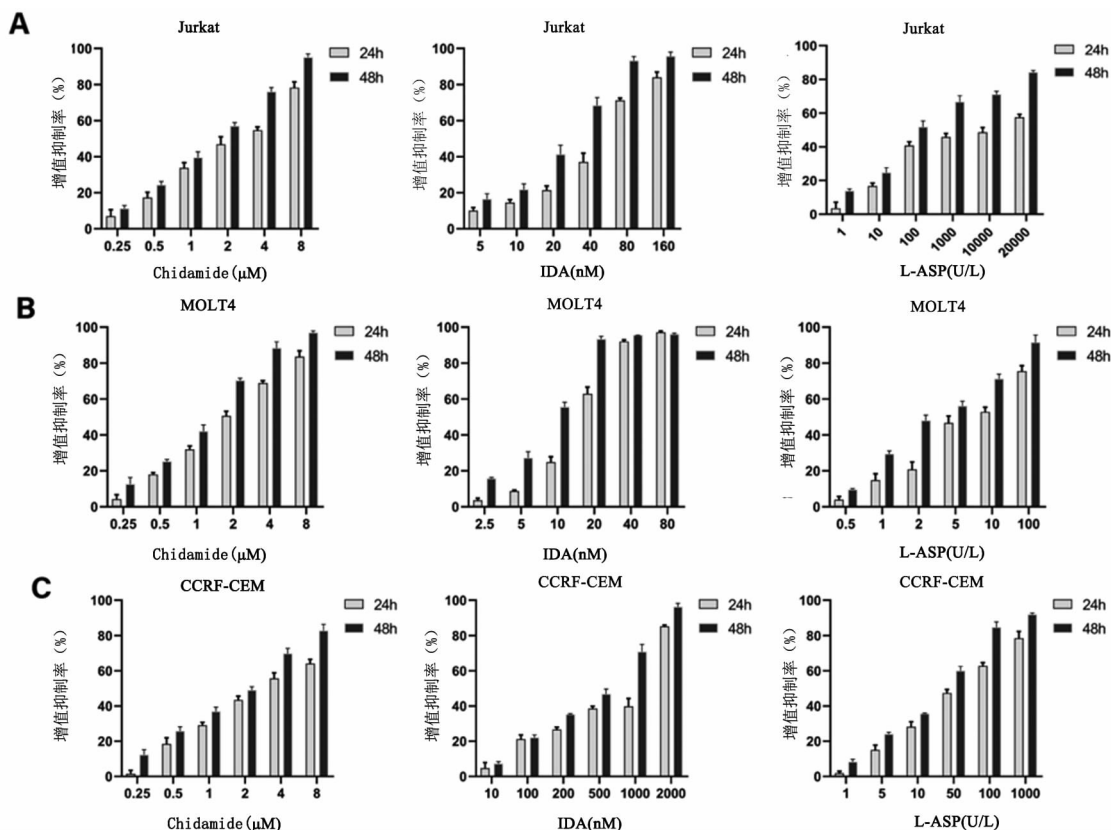


图1 西达苯胺、伊达比星和左旋门冬酰胺酶对 Jurkat(A)、MOLT4(B)和 CCRF-CEM(C)细胞的增殖抑制作用

亡,且药物联合作用于细胞的凋亡率显著高于单药组,见图2。根据公式计算两种药物联合的 CI , $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 为叠加作用, $0.85 \leq CI < 0.9$ 为低度协同作用, $0.7 \leq CI < 0.85$ 为中度协同作用, $0.3 \leq CI < 0.7$ 为高度协同作用, $0.1 \leq CI < 0.3$ 为强协同作用, $CI < 0.1$ 为超强协同作用。结果显示,西达苯胺联合 IDA 或 L-ASP 对 3 种细胞系均具有高度以上的协同效应 ($CI < 0.7$)。

西达苯胺、IDA 和 L-ASP 对 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 不同浓度西达苯胺单独或联合 IDA、L-ASP 处理 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞 48 h 后,与对照组相比,实验组细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase-3、8、9 以及 PARP 的表达均有不同程度上调,且联合用药组蛋白表达上调较单药组更为明显,见图3。

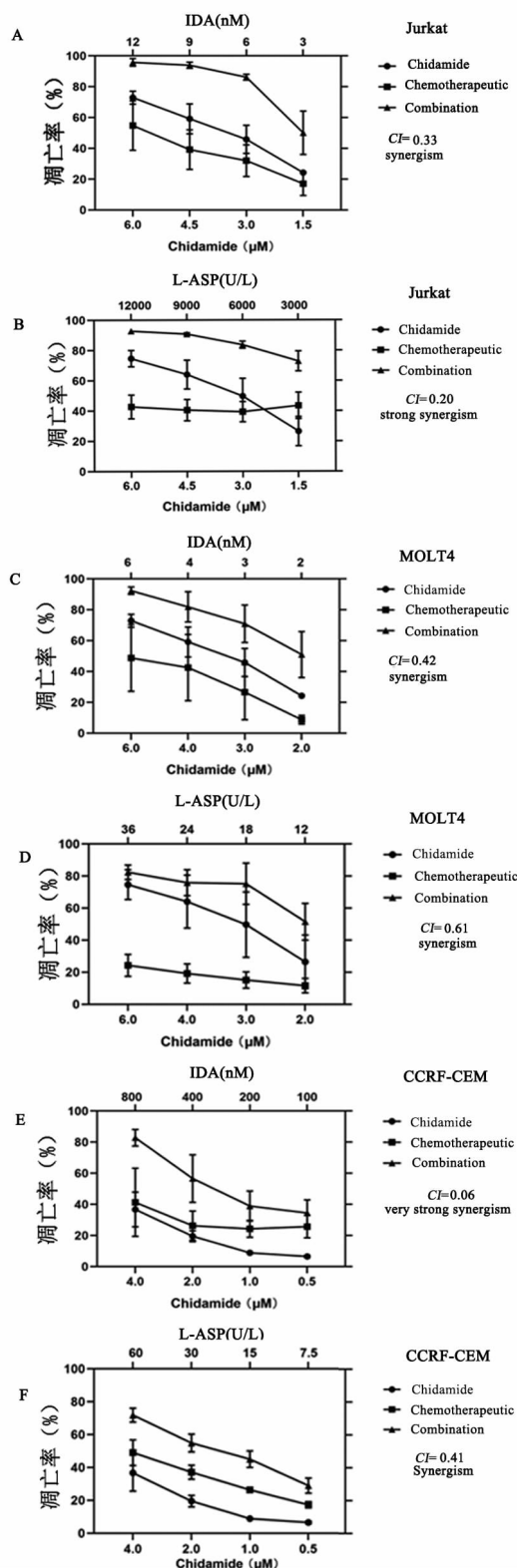
讨论

表观遗传的改变常出现在肿瘤的形成中^[9,10],随着对 T-ALL 发病机制研究的深入,一些表观遗传的调控包括 DNA 甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白乙酰化等与 T-ALL 的发生密切相关。此外,表观遗传调控还可以影响疾病的耐药性及预后,组蛋白乙酰化水平升高与 ALL 患者预后不良相关^[11]。根据文

献报道,T-ALL 患者中可发生染色体易位,使转录因子 TAL1 过表达,进而招募含 HDAC1 的复合物促进 T-ALL 的发生发展^[12]。以上研究结果提示,HDAC 在 T-ALL 的发病中具有重要作用,也为 T-ALL 的治疗提供了新思路。

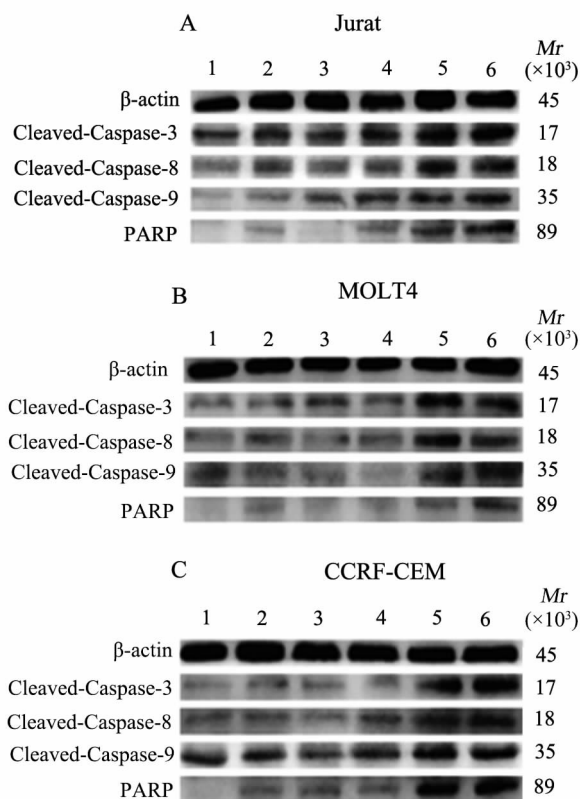
HDAC 抑制剂是近年来广泛应用的表观遗传药物,具有显著的抗肿瘤能力和较低的毒副作用,在临床上与其他药物联合应用于多种血液肿瘤^[13,14]。中国自主研发的新型 HDACi 西达苯胺主要针对 HDAC1、2、3 和 10,其作用机制与疗效因肿瘤类型而异^[13~16],总体上通过增加组蛋白的乙酰化水平调控相应基因转录,诱导细胞周期阻滞、促进肿瘤分化以及诱导肿瘤细胞凋亡等发挥抗肿瘤作用。有研究表明,西达苯胺在 T-ALL 细胞系中可以通过细胞 FLICE 抑制蛋白(c-FLIP)诱导细胞凋亡,发挥显著的抗肿瘤作用^[17],也有临床研究表明,西达苯胺联合传统化疗药物治疗 T-ALL 相较于传统化疗药物能获得更高的完全缓解率和总缓解^[5]。但至今尚未有西达苯胺联合传统化疗药物作用于 T-ALL 细胞系的基础实验研究。

本研究中西达苯胺、IDA、L-ASP 对 T-ALL 细胞系 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 均具有明显的增殖抑制作用。其中,西达苯胺在 $0.25 \sim 8 \mu\text{M}$ 范围内能



注:图 A、C、E 分别表示西达苯胺与 IDA 单药或联合作用于 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞;图 B、D、F 分别表示西达苯胺与 L-ASP 单药或联合作用于 Jurkat、MOLT4 和 CCRF-CEM 细胞

图 2 流式检测不同浓度西达苯胺、伊达比星、左旋门冬酰胺酶单独或联合作用于 Jurkat(A、B)、MOLT4(C、D)和 CCRF-CEM(E、F)细胞 48h 后引起的细胞凋亡



注:1)对照组;2)Chidamide 作用组;3)IDA 作用组;4)L-ASP 作用组;5)Chidamide 联合 IDA 作用组;6)Chidamide 联合 L-ASP 作用组

图 3 Western blot 法检测西达苯胺、伊达比星、左旋门冬酰胺酶单独或联合作用 48h 对 Jurkat(A)、MOLT4(B)和 CCRF-CEM(C)细胞凋亡相关蛋白表达的影响

够浓度依耐性地抑制细胞系的增殖,抑制程度在 3 种细胞系中大致相似;而 IDA 在较低浓度(20 ~ 80 nM)时就能明显抑制 MOLT4 细胞的增殖,在中等浓度(40 ~ 160 nM)时可以抑制 Jurkat 细胞的增殖,但只有在较高浓度(500 ~ 2 000 nM)时才能对 CCRF-CEM 细胞起到增殖抑制作用。此外,3 种细胞系对 L-ASP 的敏感性也不尽相同,MOLT4 细胞在较低浓度的 L-ASP(10 ~ 100 U/L)作用下即出现明显的增殖抑制,CCRF-CEM 细胞在中等浓度的 L-ASP(100 ~ 1 000 U/L)作用下才能出现细胞增殖抑制效应,Jurkat 细胞则只有在高浓度的 L-ASP(1 000 ~ 20 000 U/L)作用下才出现明显的增殖抑制。通过比较 24 h 及 48 h 的增殖抑制率可以发现,48 h 的细胞增殖抑制均强于 24 h,表明这 3 种药物在 48 h 时对细胞的作用均具有时间依赖性。为进一步探讨药物的协同作用,本研究选取各药物作用 48 h 时 IC₅₀ 左右的浓度进行细胞凋亡率的流式检测,发现西达苯胺、IDA、L-ASP 单独作用均可诱导细胞凋亡,

且凋亡率随着药物浓度递增;而西达苯胺联合 IDA 或 L-ASP 组相较于单药组诱导的细胞凋亡更为显著。通过计算 *CI* 发现,西达苯胺联合 IDA 或 L-ASP 对于 3 种细胞系均具有协同作用。此外,西达苯胺联合 L-ASP 作用于 Jurkat 细胞具有强协同作用 ($CI=0.20$),而西达苯胺联合 IDA 作用于 MOLT4 细胞具有强协同作用 ($CI=0.06$)。本研究发现 Jurkat 细胞相比于其他 2 种细胞对 L-ASP 的增殖抑制作用最不敏感,而相同浓度下的 IDA 在 3 种细胞系中对 MOLT4 的抑制作用是最弱的,但是与西达苯胺联合消除了这种抗性,联合后的协同效应相较于其他实验组更为明显。是否对于传统化疗药物越不敏感的肿瘤细胞,西达苯胺的联合应用就会起到更佳的效果呢?这一猜想需要进一步的实验研究来证实。

此外,本研究在分子水平上也进一步进行了验证,根据流式检测细胞凋亡的结果选取了不同浓度的药物作用于细胞,发现西达苯胺联合 IDA 或 L-ASP 组相较于单药组所诱导的凋亡蛋白水平也明显升高,进一步说明西达苯胺联合用药能更加显著促进细胞凋亡。

本研究只在细胞及分子水平验证了西达苯胺联合传统化疗药物 IDA 或 L-ASP 能更加显著诱导 T-ALL 细胞系的凋亡,但并未在机制上进行进一步的探索,药物之间的联合通过何种方式何种途径发挥协同作用无从得知;此外,在今后的研究中也将继续在动物体内进行相应的体内实验以及在原代标本中进行进一步的验证,以更好地证明本研究的结论。

综上所述,本研究通过体外细胞实验表明西达苯胺联合传统化疗药物 IDA 或 L-ASP 能更加显著诱导 T-ALL 细胞系 Jurkat、MOLT4、CCRF-CEM 的凋亡,西达苯胺与 IDA 或 L-ASP 联用针对 T-ALL 具有协同效应,为西达苯胺与传统药物联合应用于临床提供了部分理论及实验依据。

参考文献

- 1 Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China,2015 [J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- 2 Hefazi M,Litzow MR. Recent advances in the biology and treatment of

- T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2018,13(4):265-274.
- 3 Guru Murthy GS,Pondaiah SK,Abedin S,et al. Incidence and survival of T cell acute lymphoblastic leukemia in the United States[J]. Leuk Lymphoma,2019,60(5):1171-1178.
- 4 顾江英,杨帆,殷玉明,等. 单份脐血移植治疗难治复发急性白血病危险因素分析[J]. 内科急危重症杂志,2020,26(4):304-309.
- 5 Guan W,Jing Y,Dou LP,et al. Chidamide in combination with chemotherapy in refractory and relapsed T lymphoblastic lymphoma/leukemia[J]. Leuk Lymphoma,2020,61(4):855-861.
- 6 Pui CH,Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med,2006,354(2):166-178.
- 7 Clavell LA,Gelber RD,Cohen HJ,et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. N Engl J Med,1986,315(11):657-663.
- 8 Linker CA,Levitt LJ,O'Donnell M,et al. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with intensive cyclical chemotherapy: a follow-up report[J]. Blood,1991,78(11):2814-2822.
- 9 Chan TA,Baylin SB. Epigenetic biomarkers[J]. Curr Top Microbiol Immunol,2012,355:189-216.
- 10 Hatziaepostolou M,Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis[J]. Cell Mol Life Sci,2011,68(10):1681-1702.
- 11 Peirs S, Van der Meulen J, Van de Walle I, et al. Epigenetics in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Immunol Rev,2015,263(1):50-67.
- 12 Cardoso BA, De Almeida SF, Laranjeira ABA, et al. TAL1/SCL is downregulated upon histone deacetylase inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Leukemia, 2011, 25 (10): 1578-1586.
- 13 Li SL,Wang F,Qu YH,et al. HDAC2 regulates cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells[J]. Oncol Lett,2017,13(1):403-409.
- 14 Ahn MY,Yoon JH. Histone deacetylase 8 as a novel therapeutic target in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep,2017,37(1):540-546.
- 15 Zhou J,Zhang C,Sui X,et al. Histone deacetylase inhibitor chidamide induces growth inhibition and apoptosis in NK/T lymphoma cells through ATM-Chk2-p53-p21 signalling pathway [J]. Invest New Drugs,2018,36(4):571-580.
- 16 Robert C,Rassool FV. HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair[J]. Adv Cancer Res,2012,116:87-129.
- 17 Chi ZF,Gao HY,Liu H,et al. Chidamide induces necroptosis via regulation of c-FLIPL expression in Jurkat and HUT-78 cells[J]. Mol Med Rep,2020,21(2):936-944.

(2021-01-23 收稿 2021-03-12 修回)