DOI:10.16016/j.2097-0927.202310010

植物鞘氨醇诱导白血病细胞凋亡的作用及机制研究

杨官翠[1*],刘金宜[2*],蒋佩洁[1,2],许玉溪[1,2],田小龙[2],王筱淇[2],王 瑞[2,3],杨世杰[2],宋清晓[2,3],魏 锦[1],张 曦[2,3]

637002 南充,川北医学院附属医院血液内科[1];400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院血液病医学中心,全军临床重点专科,创伤与化学中毒全国重点实验室,重庆市临床重点专科,血液病与微环境重庆市重点实验室[2];401329 重庆,金凤实验室[3]

[**摘要**] **目的** 初步探讨植物鞘氨醇(phytosphingosine,PHS)对白血病细胞凋亡的影响及其可能机制。**方法** 采用人白血病细胞株 K562 及 SUP-B15 作为研究模型,CCK-8 法检测细胞活力,EdU 检测细胞 DNA 合成能力,RNA-seq 检测 PHS 处理后差异表达基因,GO 功能富集及 KEGG 信号通路富集分析 PHS 可能作用的分子途径,CTD 数据库和 Discovery Studio 软件对 PHS 进行反向找靶,Discovery Studio 软件对 PHS 和 BCL-2 进行分子对接,流式细胞术检测细胞凋亡变化,JC-1 染色检测线粒体膜电位变化,Western blot 检测凋亡相关分子蛋白水平表达变化。**结果** PHS 能抑制 K562 和 SUP-B15 细胞增殖,且呈剂量和时间依赖性。PHS 的半数抑制浓度在 K562 细胞中分别为 17.67 μmol/L(24 h)和 12.52 μmol/L(48 h),在 SUP-B15 细胞中分别为 17.58 μmol/L(24 h)和 14.86 μmol/L(48 h)。20 μmol/L PHS 作用白血病细胞 48 h 后,能显著抑制细胞 DNA 的合成($P<0.05$)。对 PHS 作用于 K562 细胞后差异基因进行 GO 富集分析发现 PHS 可能参与细胞凋亡正向调控、细胞质膜及组分、激酶结合与活性等生物功能。反向找靶结果提示,BCL-2 作为 PHS 作用靶点的可能性最高。PHS 作用白血病细胞 48 h 后细胞凋亡率显著增加($P<0.05$),呈剂量依赖性;线粒体膜电位下降,抗凋亡蛋白 BCL-2 表达下调($P<0.05$),Cleaved caspase-3 及 Cleaved caspase-9 蛋白表达上调($P<0.05$)。**结论** PHS 诱导白血病细胞发生线粒体依赖性细胞凋亡,抑制白血病细胞增殖,并可能与 PHS/BCL-2 结合体有关。

[**关键词**] 植物鞘氨醇;白血病;细胞凋亡;转录组分析

[**中图法分类号**] R733.7; R965; R977.6 [**文献标志码**] A

Anti-tumor effects of phytosphingosine on leukemia cells by inducing cell apoptosis

YANG Guancui[1*], LIU Jinyi[2*], JIANG Peijie[1,2], XU Yuxi[1,2], TIAN Xiaolong[2], WANG Xiaoqi[2], WANG Rui[2,3], YANG Shijie[2], SONG Qingxiao[2,3], WEI Jin[1], ZHANG Xi[2,3] [1]Department of Hematology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637002; [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Medical Center of Hematology, Military Key Clinical Specialty, Chongqing Key Clinical Specialty, Chongqing Key Laboratory of Hematology and Microenvironment, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [3]Jinfeng Laboratory, Chongqing, 401329, China

[**Abstract**] **Objective** To preliminarily investigate the anti-tumor effects of phytosphingosine (PHS) and the involvement of inducing apoptosis of leukemia cells. **Methods** Cellular model of leukemia was

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82200242);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2022NSCQ-MSX1060,CSTB2023NSCQ-MSX0262);新桥医院青年博士孵育计划项目(2022YQB062)

*: 同等贡献者

[**通信作者**] 张 曦,E-mail: zhangxxi@sina.com

魏 锦,E-mail: 1497058875@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

established in leukemia cell lines K562 and SUP-B15. CCK-8 assay and EdU assay were used to measure the viability and DNA synthesis of K562 and SUP-B15 cells. RNA-seq was carried out to verify the differentially expressed genes (DEGs) after PHS treatment. Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were applied to analyze the involved functions and signaling pathways. Comparative Toxicogenomics Database (CTD) and Discovery Studio software were employed to predict the underlying targets of PHS and molecular docking. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, mitochondrial membrane potential was evaluated by JC-1 probe, and protein expression of key molecules was validated by Western blotting. **Results** PHS inhibited the proliferation of K562 and SUP-B15 cells in a time- and dose-dependent manner. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of K562 cells was 17.67 and 12.52 μmol/L for 24 and 48 h, respectively, and the IC_{50} value of SUP-B15 cells was 17.58 and 14.86 μmol/L for 24 and 48 h, respectively. PHS treatment at a dose of 20 μmol/L for 48 h resulted in significant inhibition of DNA synthesis. GO enrichment analysis of the K562 cells showed that PHS might be involved in positive regulation of apoptotic process, plasma membrane and its integral components, and protein kinase binding and activity. Reverse predictive analysis showed that BCL-2 protein was the most likely target of PHS. PHS significantly increased the apoptotic rate of leukemia cells ($P<0.05$) in a dose-dependent manner, reduced the mitochondrial membrane potential, and down-regulated BCL-2 level ($P<0.05$) and up-regulated the levels of Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 ($P<0.05$). **Conclusion** PHS may inhibit the proliferation of leukemia cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis, possibly through PHS and BCL-2 interaction.

[**Key words**] phytosphingosine; leukemia; apoptosis; RNA-seq

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82200242), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-MSX1060, CSTB2023NSCQ-MSX0262), and the Project of Young Doctor Cultivation Plan of Xinqiao Hospital (2022YQB062).
YANG Guancui and LIU Jinyi contributed equally to the article. Corresponding author: ZHANG Xi, E-mail: zhangxxi@sina.com; WEI Jin, E-mail: 1497058875@qq.com

白血病是一种以造血干细胞/祖细胞的恶性增殖和分化阻滞为主要特征的造血系统恶性肿瘤[1]。目前治疗手段主要包括化疗、造血干细胞移植、靶向治疗、细胞治疗等[2-4]。尽管这些方法能够缓解病情,但都存在一定的局限性,尤其是对老年患者,远期预后更差,2年总生存率仅为20%~40%[5-6]。因此,积极寻找白血病新的治疗靶点及高效低毒的药物,突破现行治疗瓶颈,改善其治疗效果是当前亟待解决的关键问题。

鞘脂是生物膜的重要组成成分,包含神经酰胺(ceramide,Cer)、鞘氨醇(sphingosine,Sph)和鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate,S1P)等[7-8]。鞘脂及其代谢物是一类重要的活性分子,参与多种细胞过程,包括细胞增殖、细胞周期调节、炎症信号通路和细胞死亡[9-11]。鞘脂类物质与肿瘤的发生发展相关。其中,Cer被认为是一种"肿瘤抑制性脂质",可以调节细胞生长、细胞周期阻滞、细胞死亡、衰老、自噬和转移[12]。S1P信号的失调则会导致肿瘤细胞增殖、血管生成并促进肿瘤转移[13]。植物鞘氨醇(phytosphingosine,PHS)是鞘脂类物质的一种,参与调节皮肤炎症[14]。近期研究表明,PHS还可以抑制鼻咽癌等实体肿瘤的进展[15-16]。然而,关于PHS对血液系统肿瘤的作用目前尚不清楚。本实验将对不同浓度PHS对白血病细胞增殖的作用及其机制进行研究,为进一步探索PHS的作用机理及其在白血病临床治疗的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司、IMDM细胞培养基购自以色列BI公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;PHS购自美国MCE公司;CCK-8购自日本同仁公司;RNAiso Plus购自日本TaKaRa公司;细胞凋亡流式检测试剂盒(Annexin V-APC,7aad)购自美国BD公司。BeyoClick™ EdU-594细胞增殖检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、BCA蛋白浓度测定试剂盒、QuickBlock™ Western一抗稀释液、QuickBlock™ Western二抗稀释液、QuickBlock™ Western封闭液均

购自中国碧云天生物技术有限公司;无菌 1×磷酸盐缓冲液(PBS)购自中国北京索莱宝生物科技有限公司;PageRuler 预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo Fisher 公司;β-actin、BCL-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 抗体及辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗均购自美国 CST 公司;ECL 发光试剂盒购自美国 Millipore 公司。多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;倒置显微镜、正置荧光显微镜均购自日本 OLYMPUS 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;电泳仪、Chemi Doc XRS+Imager 高灵敏度化学发光成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 PHS 的配制

10 mg PHS 粉末溶解于 1.57 mL DMSO 有机溶剂中,配制成浓度为 20 μmol/L 的母液,每支 10 μL 分装,-80 ℃保存。

1.3 细胞培养及分组

人慢性髓系粒细胞白血病细胞株 K562 及人急性淋巴细胞白血病细胞株 SUP-B15 均购自美国 ATCC 公司。K562、SUP-B15 细胞采用含 10% FBS 的 IMDM 培养基进行培养,在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养细胞,取对数生长期细胞用于实验。后续实验分为对照组(0 μmol/L PHS)和 PHS 处理组(5、10、20 μmol/L)。

1.4 细胞活力检测

细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板,加入不同浓度的 PHS(5、10、20、30、40 μmol/L)分别作用 24、48 h,每组设置 3 个复孔,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,37 ℃继续培养 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 处的光密度值[D(450)],并按照以下公式计算细胞存活率。

细胞存活率=[实验组 D(450) -空白组 D(450)]/[对照组 D(450)-空白组 D(450)]×100%

1.5 细胞形态学观察

细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,加入 20 μmol/L 的 PHS 作用 48 h 后,倒置显微镜下(40×)观察细胞形态学变化,并拍照记录。

1.6 EdU 检测

细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,加入 20 μmol/L 的 PHS 作用 48 h 后,加入 EdU 工作液孵育 2 h,随后用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,PBS 缓冲液洗 3 次后加入通透液孵育 15 min,随后加入 EdU 反应液避光孵育 30 min,PBS 缓冲液洗涤 3 次后,加入 Hoechst 33342 染色 30 min,荧光显微镜下观察,随机选取 3 个视野拍照,计算阳性细胞率。

1.7 转录组测序及分析

细胞以 1×10^6 个/孔接种 K562 细胞于 60 mm 皿,加入 20 μmol/L PHS 作用 48 h 后收集细胞,由北京博奥晶典公司进行转录组测序分析,利用 limma 包进行生物学重复或配对的差异比较,利用 DESeq 包进行没有生物学重复的差异比较,分析获得 PHS 作用 K562 细胞后的差异表达基因火山图。差异基因筛选标准为:$|\log_2FC|\geq1$ 且 $P\leq0.05$。将筛选得到的差异基因使用 DAVID Bioinformatics Resources(https://david.ncifcrf.gov/)进行 GO 功能富集和 KEGG 信号通路富集,再使用微生信平台(http://www.bioinformatics.com.cn/)进行可视化分析。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,加入不同浓度的 PHS(5、10、20 μmol/L)作用 48 h 后,收集细胞,PBS 洗 2 次,加入 Annexin V-APC 及 7aad 染料各 5 μL,室温避光孵育 30 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

1.9 CTD 数据库反向找靶

利用 CTD 数据库(https://ctdbase.org/),在“Keyword Search”中选择“Chemical”,输入“Phytosphingosine”,在“Gene”选项中筛选出可能与其互作的前 10 位靶点,再使用 Cytoscape 软件进行可视化分析。

1.10 基于药效团模型的反向找靶

运用 Discovery Studio 软件进行反向找靶,导入 PHS 的结构,调出 Ligand Profiler 流程,设置参数:input ligand 一项选择导入的小分子,Input Pharma DB Pharmacophere 一项选择“all”,单击“运行”。对筛选出的药效团按 FitValue 打分从高到低排序,打分越高,作用越强。

1.11 分子对接

从 PDB(Protein Data Bank)网站(https://www.rcsb.org/)上得到 BCL-2 的晶体结构(PDB ID:6O0K)。进一步运用 Discovery Studio 软件对蛋白分子进行优化:加氢、去水、补缺失残基等,定义活性位点为 BCL-2 蛋白含有配体所在的位置,建立基于受体的分子对接模型。对化合物 PHS 进行预处理产生 3D 构象,用该化合物与建立好的分子对接模型进行对接。

1.12 线粒体膜电位检测

细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,加入 20 μmol/L 的 PHS 作用 48 h 后,37 ℃培养箱孵育 20 min,收集各组细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 次,JC-1 试剂 37 ℃下孵育 20 min,收集细胞,用 JC-1 染色缓冲液洗涤、重悬后在正置荧光显微镜下观察,随机选取 3 个视野拍照,观察线粒体膜电位变化情况。

1.13 蛋白提取及 Western blot 检测

细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,加入不同浓度

的 PHS(5、10、20 μmol/L)作用 48 h 后,收集细胞,加入蛋白裂解液 RIPA 及蛋白酶抑制剂冰上裂解 30 min,12 000 r/min、4 ℃离心 10 min。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度并定量。加入适量的 5× loading buffer,100 ℃变性后-20 ℃保存。配制 10% SDS PAGE 胶进行电泳,转膜至 PVDF 膜上,快速封闭液封闭 15 min,4 ℃过夜孵育 BCL-2(1∶1 000)、Cleaved caspase-3(1∶1 000)、Cleaved caspase-9(1∶1 000),β-actin(1∶3 000)抗体作为内参。1×TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 2 h,1×TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。配制显影液,化学发光仪显影并拍照。使用 Image J 软件检测蛋白条带灰度值。目的蛋白相对表达量以目的蛋白与内参灰度值的比值表示。

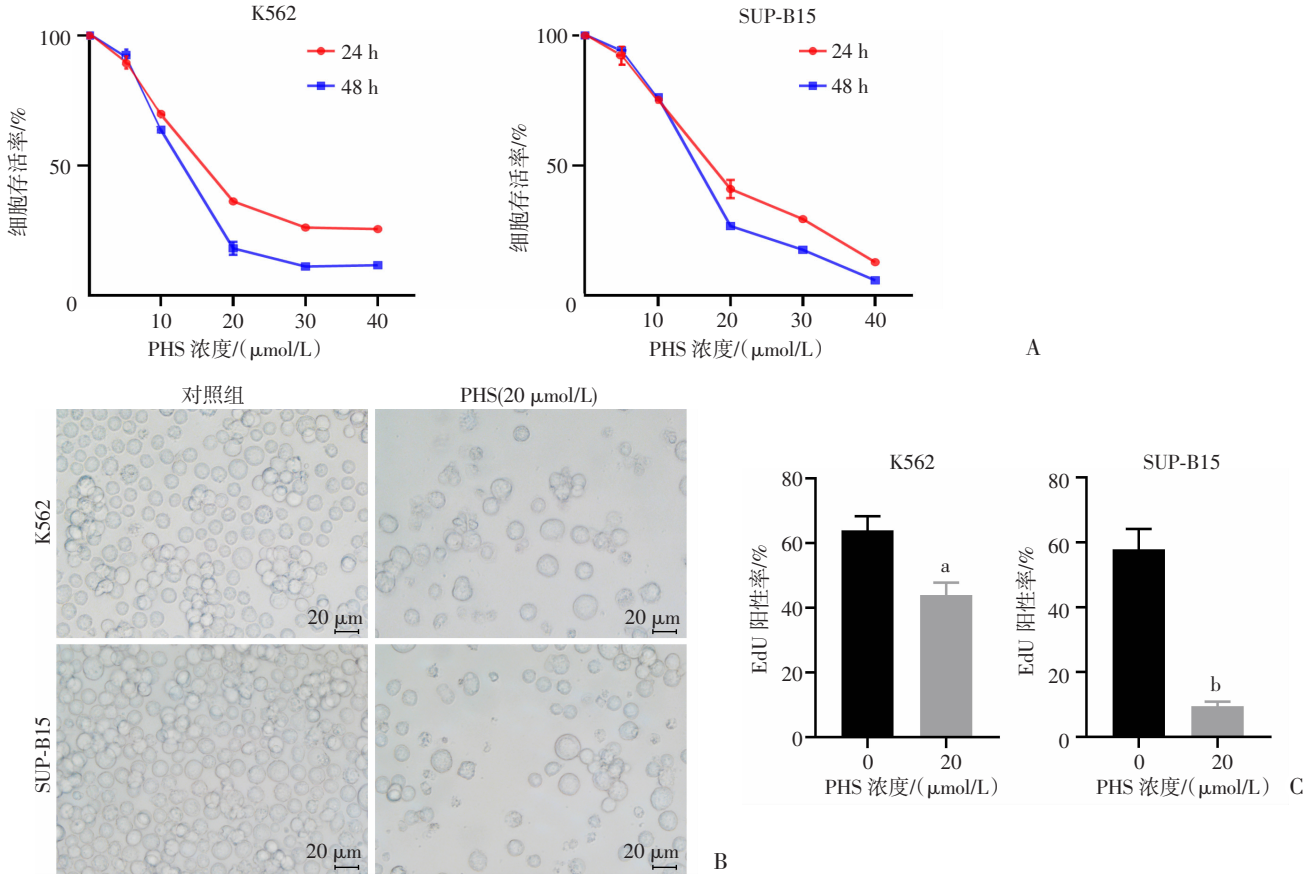
1.14 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析与作图。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,每次实验至少重复 3 次,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHS 抑制白血病细胞增殖

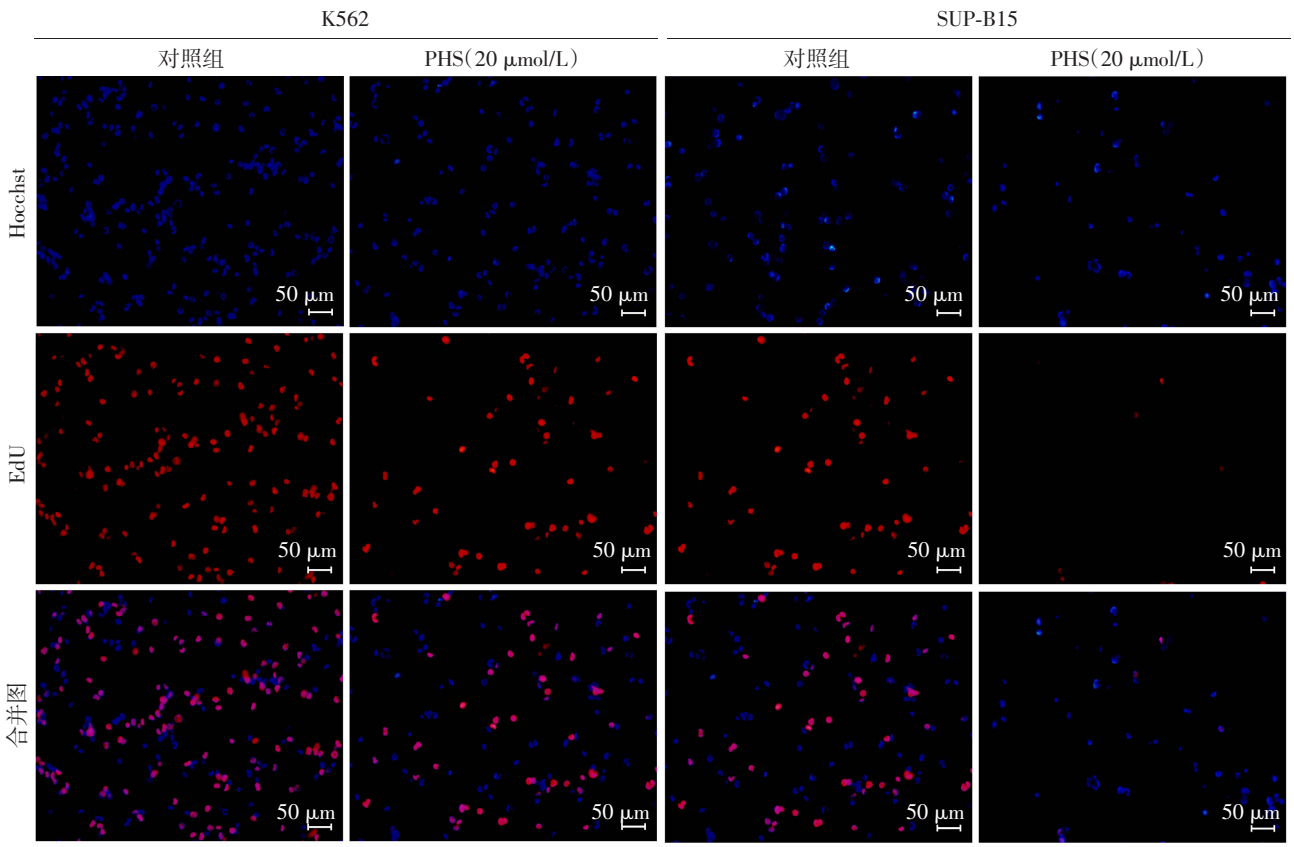
采用 CCK-8 实验检测 PHS 对白血病细胞增殖的影响。结果表明,与对照组(0 μmol/L PHS)相比,PHS 给药后 K562、SUP-B15 细胞增殖能力明显受到抑制,并呈现剂量和时间依赖性。进一步对药物半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration,IC_{50})进行拟合,K562 细胞中 PHS IC_{50} 为 17.67 μmol/L(24 h)和 12.52 μmol/L(48 h),SUP-B15 细胞中 PHS IC_{50} 为 17.58 μmol/L(24 h)和 14.86 μmol/L(48 h),见图 1A。显微镜下观察 PHS 对细胞形态的影响,结果表明,对照组细胞大小均一,形态规则,未见明显改变,而 PHS 处理组(20 μmol/L)细胞出现不同程度的分裂受阻、形态不规则、细胞皱缩等改变(图 1B)。EdU 染色结果表明,PHS 给药组(20 μmol/L)能够显著降低 K562、SUP-B15 细胞的 DNA 合成能力($P<0.05$,图 1C、D)。表明 PHS 可以抑制白血病细胞增殖。



A:PHS 作用 24、48 h 后抑制 K562、SUP-B15 细胞增殖;B:PHS(20 μmol/L)作用 48 h 后细胞形态变化;C:PHS(20 μmol/L)作用后 48 h 后 EdU 阳性比例定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L PHS(对照组)比较

图 1 PHS 处理白血病细胞后细胞增殖的变化

(图 1D 续下页)

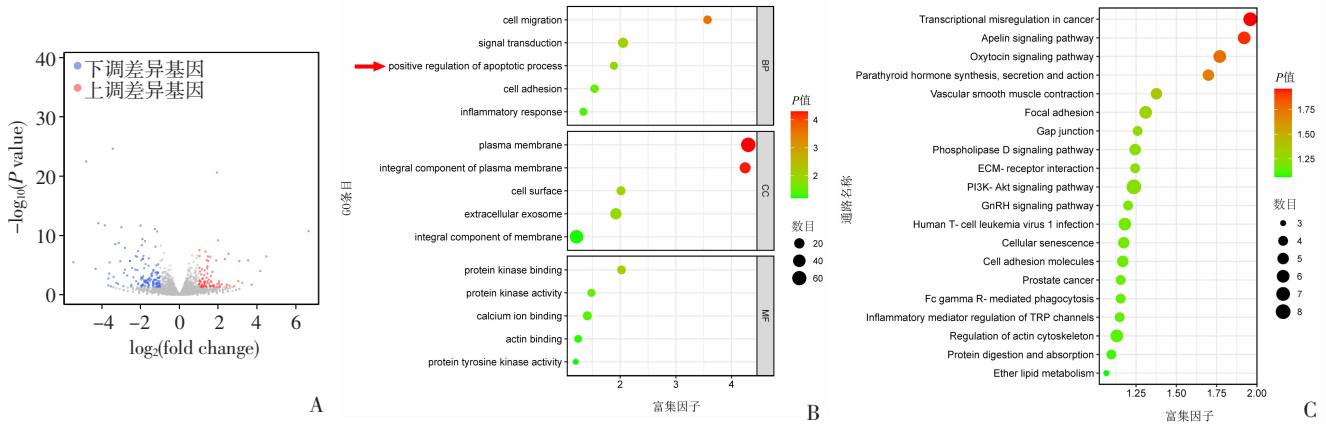


D: PHS (20 μmol/L) 作用 48 h 后抑制 K562、SUP-B15 细胞 DNA 合成

续图 1 PHS 处理白血病细胞后细胞增殖的变化

2.2 PHS 处理后差异基因富集分析

对 PHS(20 μmol/L)处理 48 h 后 K562 细胞和对照组细胞进行转录组测序,以探索 PHS 抑制白血病细胞增殖的分子机制。共发现 239 个差异基因,其中差异上调基因 91 个,差异下调基因 148 个(图 2A)。进一步对差异基因进行 GO 功能富集和 KEGG 信号通路富集。GO 功能富集结果表明,PHS 可能参与细胞凋亡正向调控(红色箭头所示)、细胞质膜及组分、激酶结合与活性等生物功能(图 2B)。KEGG 信号通路富集结果表明,PHS 可能参与转录失调、PI3K-Akt、细胞衰老等信号通路(图 2C)。



A:PHS 作用后差异基因表达火山图;B:PHS 作用后差异基因的 GO(生物进程/BP、细胞组成/CC 及分子功能分析/MF)富集结果;C:PHS 作用后差异基因的 KEGG 富集结果

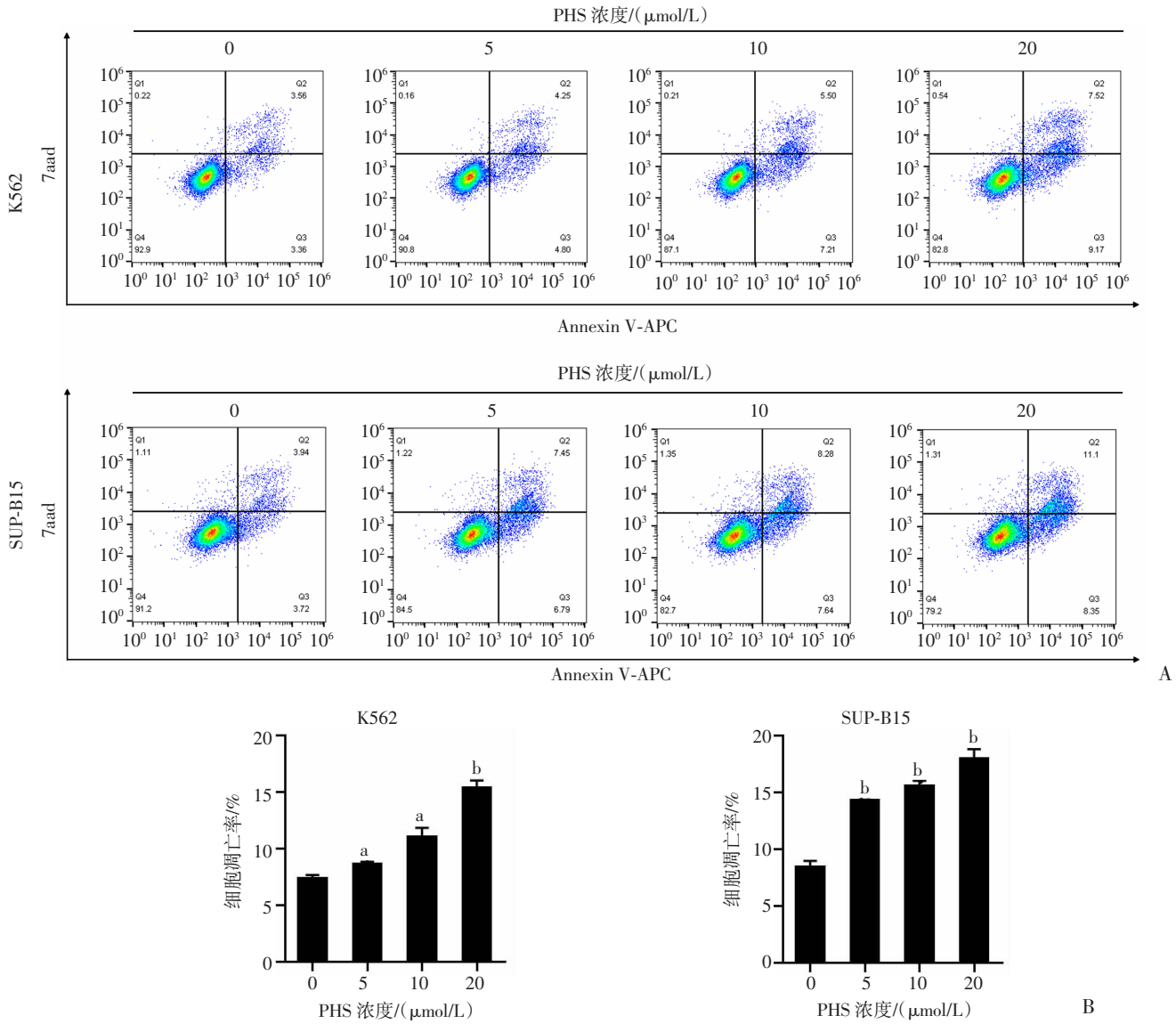
图 2 PHS 处理 K562 细胞后 RNA-seq 分析结果

2.3 PHS 诱导白血病细胞凋亡

结合转录组测序的结果,对细胞凋亡进行检测。通过流式细胞术检测 PHS 作用后的细胞凋亡率。结果显示:与对照组相比,PHS 处理后细胞凋亡比例增加($P<0.05$),且呈现剂量依赖性(图 3)。表明 PHS 可诱导白血病细胞发生凋亡,其中以高浓度组最为显著。

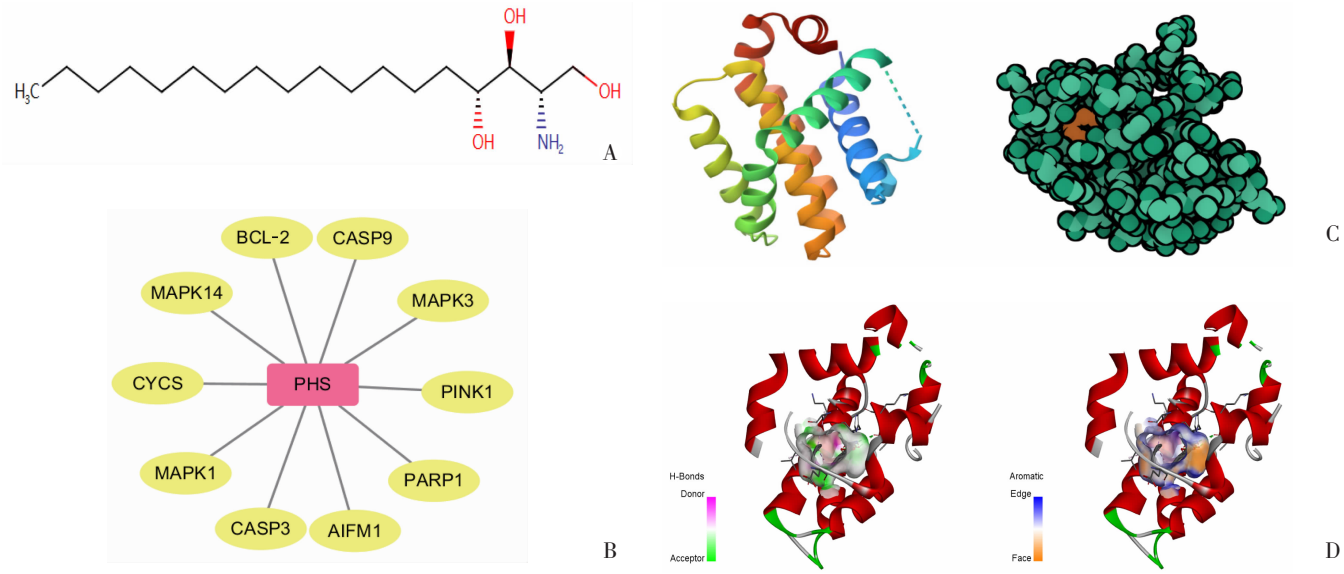
2.4 PHS 反向找靶

为了进一步探索 PHS(图 4A)诱导细胞凋亡的具体途径,通过 CTD 数据库筛选,对 PHS 进行反向找靶。CTD 数据库筛选出 PHS 可能作用的 10 个靶点,包括 BCL-2、CASP9、AIFM1、MAPK1 等(图 4B)。Discovery Studio 软件筛选 PHS 可能作用的靶点,按匹配度打分从高到低排序,发现 PHS 可能作用于 BCL-2、CASP9、PINK1、CASP3、MAPK3、PARP1 等,且 BCL-2 的匹配度最高(表 1)。进一步通过 Discovery Studio 软件对 PHS 和 BCL-2 蛋白进行对接,发现 PHS 可以很好地结合到 BCL-2 的活性口袋(图 4C、D),说明 BCL-2 可能是 PHS 的作用靶点。



A:PHS 作用后诱导 K562、SUP-B15 细胞凋亡;B:PHS 作用后 K562、SUP-B15 细胞凋亡率分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L PHS(对照组)比较

图 3 PHS 处理白血病细胞后细胞凋亡的变化



A:PHS 的化学结构式;B:PHS 潜在作用靶点;C:BCL-2 的晶体结构,PDB ID: 6O0K(左)及 PHS 与 BCL-2 的相互作用(右);D:PHS 与 BCL-2 的氢键(左)及芳香键(右)相互作用

图 4 PHS 反向找靶及分子互作分析

表 1 基于药效团模型的 PHS 反向找靶

Pharma-编号	匹配度	基因名称	Uniprot-编号	靶点分类	靶点分类 A
2ovv	0.951953	BCL-2	P10415	other	other
1y2g	0.901191	CASP9	P55211	Enzymes	Hydrolases
3hrb	0.872873	PINK1	Q9BXM7	Protein kinases	Serine/threonine-protein kinase
2gz7	0.872611	CASP3	P42574	Enzymes	Hydrolases
2ybt	0.820775	MAPK3	Q16644	Enzymes	Transferases
3s92	0.8165	PARP1	P09874	Enzymes	Transferases

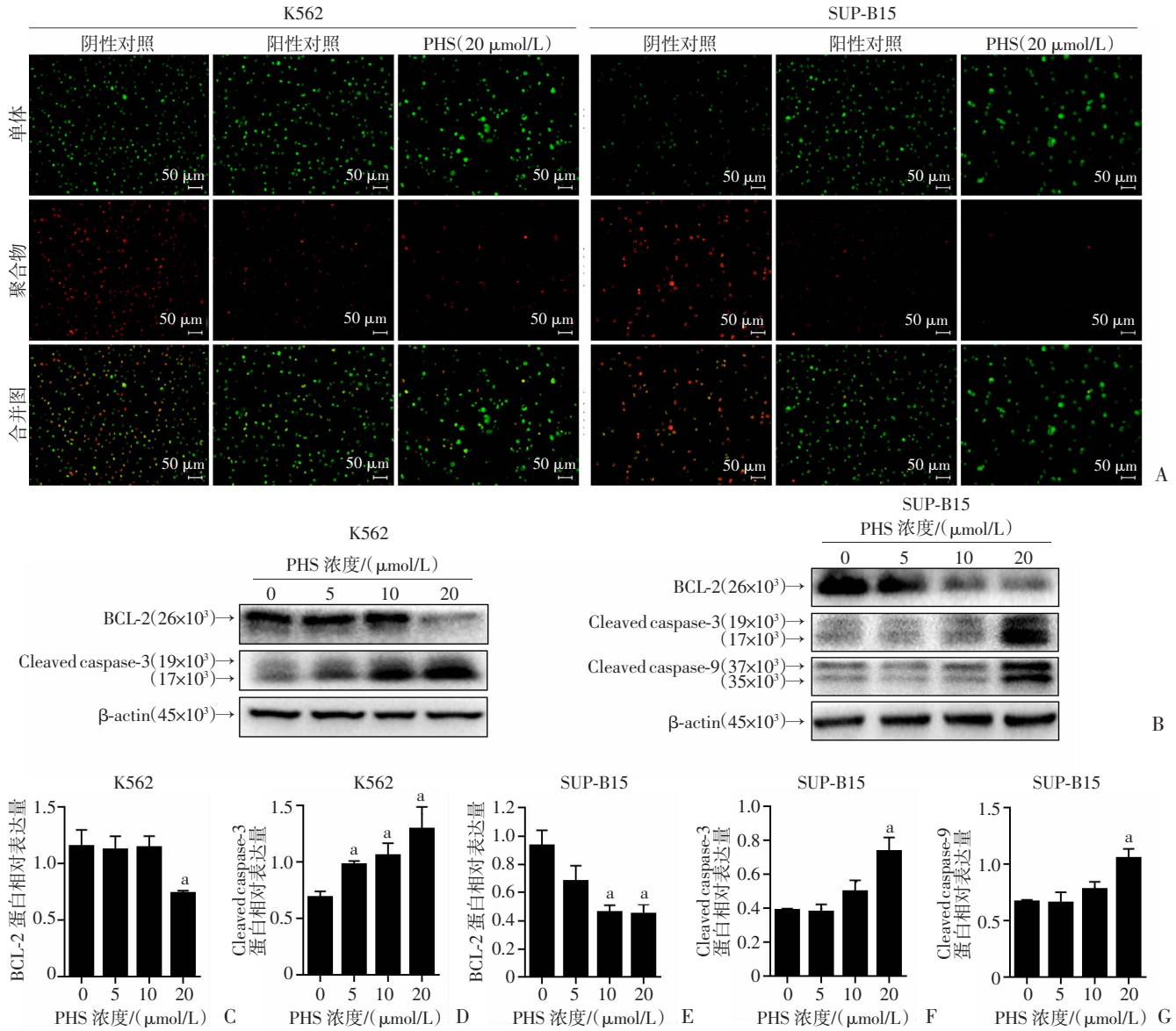
2.5 PHS 诱导白血病细胞线粒体膜电位降低及其对凋亡相关蛋白表达的影响

进一步通过 JC-1 染色检测线粒体膜电位变化情况。结果表明,PHS 给药后 JC-1 单体/聚合物的比值升高,线粒体膜电位出现下降(图 5A)。Western blot 结果表明,PHS 处理后,BCL-2 表达显著下调($P<0.05$),Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 表达显著上调($P<0.05$,图 5B~G)。表明 PHS 可以诱导线粒体膜电位降低,抑制 BCL-2 表达,下游蛋白 Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 表达上调。

3 讨论

白血病是严重危害人类生命健康的重大疾病,具有死亡率高、治疗难度大的特点。目前造血干细胞移植仍是白血病最为有效的治疗方法[3, 17-18]。尽管造血干细胞移植使白血病患者生存率得到极大的改善,然而移植后复发、植入不良、移植物抗宿主病的高发病率以及长期治疗带来的经济压力等不利因素给患者的生活造成了极大的困扰[19-21]。PHS 是鞘脂类物质的一种,以往的研究表明,PHS 可以改善皮肤炎症[14],促进髓系白血病细胞巨核分化[22],在造血干细胞移植后移植物抗宿主病中发挥免疫调控的作用[23]。近年来,有研究发现,PHS 在部分实体肿瘤中也具有抗肿瘤活性,但具体分子调控机制仍不明确[15-16]。目前尚无关于 PHS 对血液系统肿瘤作用影响的报道。本研究旨在探讨 PHS 在白血病细胞中的抗肿瘤作用,并初步探究其相关作用机制。

本研究发现,PHS 可以明显抑制白血病细胞增殖,且呈现剂量、时间依赖性。进一步对 PHS 处理后 K562 细胞 GO 功能富集结果表明,PHS 可能参与细胞凋亡正向调控。流式细胞术结果表明,PHS 能够诱导白血病细胞凋亡,且呈现剂量依赖性。因此,推测 PHS



A: PHS(20 μmol/L)作用 48 h 后 K562、SUP-B15 细胞线粒体膜电位降低　阳性对照为诱导线粒体膜电位降低的 CCCP(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, 10 μmol/L);B: PHS 作用 K562、SUP-B15 细胞后凋亡相关蛋白的表达;C:K562 细胞 BCL-2 蛋白半定量分析;D:K562 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白半定量分析;E:SUP-B15 细胞 BCL-2 蛋白半定量分析;F:SUP-B15 细胞 Cleaved caspase-3 蛋白半定量分析;G:SUP-B15 细胞 Cleaved caspase-9 蛋白半定量分析;a: $P<0.05$,与 0 μmol/L PHS(对照组)比较

图 5　PHS 处理白血病细胞后线粒体膜电位的变化及凋亡相关蛋白表达的变化

可能是通过诱导细胞凋亡进而抑制细胞增殖。细胞凋亡是指机体在生理或病理条件下,为了维持自身内环境的稳态,通过基因调控使细胞产生的主动、有序死亡[24]。细胞凋亡发生的途径包括线粒体途径、内质网途径以及死亡受体途径。为进一步寻找 PHS 诱导细胞凋亡的潜在机制,本研究通过 CTD 数据库及药效团模型两种方法对 PHS 进行反向找靶,根据 FitValue 评分对药效团模型中筛选出的潜在靶点进行排序,其中 BCL-2 的打分最高,结合 CTD 数据库的结果,提示 BCL-2 作为 PHS 作用靶点的可能性最高。同时,对 PHS 与 BCL-2 进行分子对接,发现 PHS 与 BCL-2 之间存在氢键、芳香族相互作用等。这也进一步验证了反向找靶的结果,即 BCL-2 可能是 PHS 的潜在靶点。BCL-2 是线粒体依赖性凋亡途径的重要调控因子,在此过程中,抗凋亡蛋白 BCL-2 活性受到抑制,促凋亡蛋白 Bax 活性增强,进一步导致线粒体膜电位(ΔΨm)下

降,线粒体膜通透性增加,从而释放凋亡因子,激活 caspase-9,进一步激活效应 caspase-3,启动 caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡发生[25]。对线粒体膜电位进行检测,发现 PHS 作用后,线粒体膜电位显著降低。Western blot 结果表明,PHS 作用后 BCL-2 表达下调,下游蛋白 Cleaved caspase-9 和 Cleaved caspase-3 表达上调。综上,本研究结果表明 PHS 可能通过靶向 BCL-2 蛋白,诱导白血病细胞发生线粒体依赖的细胞凋亡。在此过程中,PHS 可能通过竞争性结合于 BCL-2 的 BH3 活性口袋,抑制 BCL-2 活性,并导致其降解,进而抑制 BCL/Bax 二聚体的形成,导致肿瘤细胞发生凋亡[26]。具体降解机制有待进一步验证。此外,通过转录组测序寻找 PHS 潜在的作用机制时发现,PHS 可能影响 Ca^{2+}通道的结合。内质网腔内 Ca^{2+}离子失衡,会引起内质网的应激反应,应激反应过度会触发细胞内的凋亡信号,促使细胞凋亡[24, 27]。这表明 PHS 也可能通过内质网途径引起细胞程序性死亡,但其具体机制需要进一步验证。除此之外,GO 功能富集分析结果显示,PHS 处理后,细胞质膜、质膜整合组分发生了显著变化。细胞质膜的重要组分——鞘脂,参与调节脂质双分子层流动性和膜蛋白运输[28],并介导细胞生理过程,如增殖、凋亡、分化和应激反应[29]。有研究表明,鞘脂类及其相关物质的失调与白血病息息相关[8]。PHS 作为鞘脂类物质的一种,作用于白血病细胞后显著改变细胞膜成分。这也在一定程度上提示 PHS 的稳态可能在白血病细胞生理过程中起着重要作用。KEGG 信号通路富集结果表明,PHS 还可能参与细胞衰老信号通路,细胞衰老是继 DNA 修复和细胞凋亡后的第三大肿瘤屏障[30]。因此,PHS 对白血病细胞的衰老作用及其分子机制仍值得进一步探究。

综上所述,本研究发现 PHS 可以诱导白血病细胞发生线粒体依赖途径凋亡,最终起到抗白血病细胞增殖的作用。PHS 可以作为一种新型的抗白血病药物,但其分子机制仍需进行深入探索。

作者贡献声明 杨官翠、刘金宜参与本研究的实验方案设计、实验操作、数据整理及分析、实验结果统计、初稿撰写及修改;蒋佩洁、许玉溪、田小龙参与本研究实验操作、数据整理及分析、实验结果统计;王筱淇、王瑞、杨世杰、宋清晓参与实验结果可视化、文章的修改;魏锦、张曦负责本研究的设计与构想、结果的审核、实验的监督与管理、稿件审阅与修改等

参考文献:

[1] WHITELEY A E, PRICE T T, CANTELLI G, *et al*. Leukaemia: a model metastatic disease[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(7): 461-475. DOI: 10.1038/s41568-021-00355-z.

[2] KAYSER S, LEVIS M J. Updates on targeted therapies for acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2022, 196(2): 316-328. DOI: 10.1111/bjh.17746.

[3] WANG X Q, HUANG R H, ZHANG X H, *et al*. Current status and prospects of hematopoietic stem cell transplantation in China[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(12): 1394-1403. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002235.

[4] HASLAUER T, GREIL R, ZABORSKY N, *et al*. CAR T-cell therapy in hematological malignancies[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8996. DOI: 10.3390/ijms22168996.

[5] KANTARJIAN H, KADIA T, DINARDO C, *et al*. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions[J]. Blood Cancer J, 2021, 11(2): 41. DOI: 10.1038/s41408-021-00425-3.

[6] PAUTAS C, MERABET F, THOMAS X, *et al*. Randomized study of intensified anthracycline doses for induction and recombinant interleukin-2 for maintenance in patients with acute myeloid leukemia age 50 to 70 years: results of the ALFA-9801 study[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(5): 808-814. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.2652.

[7] LEWIS A C, POPE V S, TEA M N, *et al*. Ceramide-induced integrated stress response overcomes Bcl-2 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2022, 139(26): 3737-3751. DOI: 10.1182/blood.2021013277.

[8] LEWIS A C, WALLINGTON-BEDDOE C T, POWELL J A, *et al*. Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies[J]. Cell Death Discov, 2018, 4: 72. DOI: 10.1038/s41420-018-0075-0.

[9] PATWARDHAN G A, BEVERLY L J, SISKIND L J. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis[J]. J Bioenerg Biomembr, 2016, 48(2): 153-168. DOI: 10.1007/s10863-015-9602-3.

[10] HANNUN Y A, OBEID L M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(3): 175-191. DOI: 10.1038/nrm.2017.107.

[11] VOELKEL-JOHNSON C. Sphingolipids in embryonic development, cell cycle regulation, and stemness—Implications for polyploidy in tumors[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 81: 206-219. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.12.027.

[12] GHANDOUR B, DBAIBO G, DARWICHE N. The unfolding role of ceramide in coordinating retinoid-based cancer therapy[J]. Biochem J, 2021, 478(19): 3621-3642. DOI: 10.1042/BCJ20210368.

[13] SATTAR R S A, SUMI M P, NIMISHA, *et al*. S1P signaling, its interactions and cross-talks with other partners and therapeutic importance in colorectal cancer[J]. Cell Signal, 2021, 86: 110080. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110080.

[14] KIM B H, LEE J M, JUNG Y G, *et al*. Phytosphingosine derivatives ameliorate skin inflammation by inhibiting NF-κB and JAK/STAT signaling in keratinocytes and mice[J]. J Invest Dermatol, 2014, 134(4): 1023-1032. DOI: 10.1038/jid.2013.453.

[15] LI J J, WEN J Y, SUN C X, *et al*. Phytosphingosine-induced cell apoptosis *via* a mitochondrially mediated pathway[J]. Toxicology, 2022, 482: 153370. DOI: 10.1016/j.tox.2022.153370.

[16] SUN C X, CHANG X X, MACISAAC H J, *et al*. Phytosphingosine inhibits cell proliferation by damaging DNA in human cell lines[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 256: 114840. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114840.

[17] GRATWOHL A, BALDOMERO H, ALJURF M, *et al*. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective[J]. JAMA, 2010, 303(16): 1617-1624. DOI: 10.1001/jama.2010.491.

[18] SAAD A, DE LIMA M, ANAND S, *et al*. Hematopoietic cell transplantation, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Cancer Netw, 2020, 18(5): 599-634. DOI:10.6004/jnccn.2020.0021.

[19] XU L P, LU P H, WU D P, *et al*. Hematopoietic stem cell transplantation activity in China 2019: a report from the Chinese Blood and Marrow Transplantation Registry Group[J]. Bone Marrow Transplant, 2021, 56(12): 2940-2947. DOI: 10.1038/s41409-021-01431-6.

[20] ZHANG X H, CHEN J, HAN M Z, *et al*. The consensus from the Chinese Society of Hematology on indications, conditioning regimens and donor selection for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 2021 update[J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 145. DOI: 10.1186/s13045-021-01159-2.

[21] LV M, HUANG X J. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in China: where we are and where to go[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5(1): 1-8. DOI: 10.1186/1756-8722-5-10.

[22] BHATIA R, HOLTZ M, NIU N, *et al*. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment[J]. Blood, 2003, 101(12): 4701-4707. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2780.

[23] HONG T, WANG R, YANG G C, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate acute graft-versus-host disease by elevating phytosphingosine[J]. Exp Hematol, 2023, 122: 19-29. DOI: 10.1016/j.exphem.2023.03.002.

[24] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395-417. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.

[25] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, *et al*. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy[J]. Apoptosis, 2023, 28(1/2): 20-38. DOI: 10.1007/s10495-022-01780-7.

[26] MONTERO J, LETAI A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic?[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 56-64. DOI: 10.1038/cdd.2017.183.

[27] TUMMERS B, GREEN D R. The evolution of regulated cell death pathways in animals and their evasion by pathogens[J]. Physiol Rev, 2022, 102(1): 411-454. DOI: 10.1152/physrev.00002.2021.

[28] OGRETMEN B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(1): 33-50. DOI: 10.1038/nrc.2017.96.

[29] LINGWOOD D, SIMONS K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle[J]. Science, 2010, 327(5961): 46-50. DOI: 10.1126/science.1174621.

[30] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer discov, 2022, 12(1): 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-21-1059.

(收稿:2023-10-06;修回:2023-12-22)

(编辑 汪勤俭)