DOI:10.16016/j.2097-0927.202109071

奥普佐米协同三氧化二砷抑制急性早幼粒白血病细胞增殖的分子机制

丁 鑫,姜秀星,李志强,雷 令,高 宁 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系生药学与中药学教研室

[摘要] **目的** 探讨奥普佐米协同三氧化二砷抑制急性早幼粒白血病细胞增殖分子机制。**方法** MTT 法检测不同联合用药对急性早幼粒白血病 NB4、HL-60 细胞存活率的影响:①梯度浓度三氧化二砷(NB4 细胞:0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L;HL-60 细胞:0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μmol/L)单用或与固定浓度奥普佐米(NB4 细胞:40 nmol/L;HL-60 细胞:160 nmol/L)联用;②梯度浓度奥普佐米(NB4 细胞:0、5、10、20、40 nmol/L;HL-60 细胞:0、40、80、120、160、200 nmol/L)单用或与固定浓度三氧化二砷(NB4 细胞:0.4 μmol/L;HL-60 细胞:1.2 μmol/L)联用;③单独或联合用药作用不同时间(12、24、48 h);④相同浓度的硼替佐米或奥普佐米分别与梯度浓度三氧化二砷联用。单独用药或联合用药或用 NAC 预处理后,流式细胞仪检测细胞凋亡及 ROS 生成量;Western blot 检测凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9、PARP-1 及融合基因蛋白 PML-RARA 的表达。**结果** 与单用组比较,奥普佐米与三氧化二砷联用后,NB4、HL-60 细胞存活率显著降低($P<0.01$),呈剂量和时间依赖性,并具有明显的协同作用,协同系数小于 1。联合用药可使约 80% 的 NB4 细胞 ROS 水平明显升高,融合蛋白 PML-RARA 表达降低,细胞凋亡率增加约 70%($P<0.01$);与联合用药组比较,ROS 抑制剂 NAC 预处理后,细胞凋亡减少约 41%($P<0.01$),PML-RARA 的表达升高。**结论** 奥普佐米协同三氧化二砷诱导急性早幼粒白血病细胞 ROS 生成,并导致 PML-RARA 蛋白表达降低,促进细胞凋亡。

[关键词] 奥普佐米;急性早幼粒细胞白血病;PML-RARA;ROS;凋亡

[中图法分类号] R733.71; R966; R979.19 [文献标志码] A

Molecular mechanism of oprozomib synergistic with arsenic trioxide in inhibiting proliferation of acute promyeloid leukemia cells

DING Xin, JIANG Xiuxing, LI Zhiqiang, LEI Ling, GAO Ning Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Medicine, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the molecular mechanism of oprozomib synergistically acting with arsenic trioxide in inhibiting the proliferation of acute promyeloid leukemia cells. **Methods** MTT assay was used to observe the effects of different medication strategies on the survival rate of NB4 and HL-60 cells respectively: ①gradient concentration of arsenic trioxide was adopted alone (for NB4 cells: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/L; for Hl-60 cells: 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 μmol/L) or combined with fixed concentration of oprozomib (for NB4 cells: 40 nmol/L; for Hl-60 cells: 160 nmol/L); ② gradient concentration of oprozomib was applied alone (for NB4 cells: 0, 5, 10, 20, 40 nmol/L; for Hl-60 cells: 0, 40, 80, 120, 160, 200 nmol/L) or combined with fixed concentration of arsenic trioxide (for NB4 cells:

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31571425)

[通信作者] 高 宁,E-mail:gaoning59@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

0.4 μmol/L; for Hl-60 cells: 1.2 μmol/L); ③ the treatment results of single drug or combination were observed for 12, 24 and 48 h respectively; ④the effects of bortezomib or oprozomib (both at the same concentration) were compared when in combination with arsenic trioxide (at gradient concentration). In addition, flow cytometry was used to detect cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production, and Western blotting was performed to determine the expression of apoptosis related proteins cleaved-Caspase 3, cleaved-Caspase 9, PARP-1 and the fusion gene protein PML-RARA, in the presence or absence of N-acetylcysteine (NAC, ROS inhibitor, 5 mmol/L). **Results** As compared with the single drug group, the combination of oprozomib and arsenic trioxide resulted in a significant decline of cell viability of NB4 and HL-60 cells ($P<0.01$) in a dose- and time-dependent manner, showing an obvious synergistic effect, and the synergistic coefficient was less than 1. The combined medication strategy also increased the ROS production by about 80%, improved the apoptotic rate by 70%, and reduced the expression of PML-RARA in NB4 cells($P<0.01$). However, inhibiting ROS production by NAC pretreatment decreased the apoptotic rate by about 41% ($P<0.01$), along with elevated expression of PML-RARA. **Conclusion** The combination of oprozomib and arsenic trioxide promotes apoptosis by inducing ROS generation and reducing the expression of PML-RARA protein in acute promyelocytic leukemia cells.

[**Key words**] oprozomib; acute promyelocytic leukemia; PML-RARA; reactive oxygen species; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31571425). Corresponding author: GAO Ning, E-mail: gaoning59@163.com

白血病是全球常见恶性肿瘤之一。流行病学报道显示,2020年全球癌症死亡率白血病排名第十,中国癌症死亡率白血病排名第九[1]。急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia,APL)是急性髓系白血病(acute myelogenous leukemia,AML)的一种独特亚型(M3),其特征为PML-RARA融合基因,由t染色体易位产生(15;17)(q24;q21)[2]。该病好发于中青年,起病凶险,进展快,出血倾向明显,早期病死率高,但同时对化疗非常敏感。

三氧化二砷(arsenic trioxide,ATO)是治疗急性早幼粒细胞白血病的经典一线药物,可实现接近100%的完全缓解率和大于98%的长期生存率[3]。但是,三氧化二砷与其他化疗药物一样,在杀灭肿瘤细胞的同时不可避免地会损伤人体正常细胞,从而出现药物的不良反应。并且,这些毒副反应与三氧化二砷用量呈正相关[4]。因此,在治疗方案上,还常采用药物组合的方式,即用其他不同作用机制的药物来协同化疗药物发挥作用,以起到降低药物用量、缩短治疗周期、减少不良反应、提高化疗效果的作用。目前以三氧化二砷为主要化疗药物的药物组合还比较少。相比研发新药,对目前已知药物的创新利用显得更加快捷、高效、可靠[5]。

奥普佐米(oprozomib,OPZ)是新一代不可逆蛋白酶体抑制剂。目前正处于全球Ⅲ期临床试验,主要用于多发性骨髓瘤的治疗[6-7],且展示出临床前抗多种肿瘤活性和宽的治疗窗口[8]。当前对奥普佐米协同其他化疗药物治疗白血病分子机制研究较少。本研究采用MTT法检测三氧化二砷和奥普佐米单用及不同联合用药对急性早幼粒白血病NB4、HL-60细胞存活率的影响,探讨奥普佐米协同三氧化二砷抑制NB4、HL-60细胞增殖的机制,为奥普佐米成为白血病治疗药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

NB4、HL-60细胞购自美国ATCC细胞库,RPMI 1640培养基、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、PI、三氧化二砷(ATO)购自Sigma-Aldrich公司;胎牛血清购自天津康源公司;Annexin V-FITC购自BD公司;Western blot试剂购自Bio-Basic公司;CM-H2DCFDA探针购自美国Invitrogen公司;ROS抑制剂NAC购自碧云天公司;奥普佐米(OPZ)购自Selleck公司;β-actin购自Santa Cruz公司;PML-RARA购自Abcam公司;cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9、PARP-1均购自Cell signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 NB4、HL-60细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基于37 ℃、饱和湿度5% CO_2 恒温培养箱中培养,每2天传代。MTT法检

测细胞存活率:①奥普佐米协同三氧化二砷对 NB4、HL-60 细胞存活率的影响;②比较奥普佐米联合三氧化二砷与硼替佐米联合三氧化二砷对 NB4、HL-60 细胞存活率的影响。对 NB4 细胞:固定奥普佐米(或硼替佐米)浓度为 40 nmol/L,三氧化二砷浓度梯度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L,固定三氧化二砷浓度为 0.4 μmol/L,奥普佐米浓度梯度为 0、5、10、20、40 nmol/L。对 HL-60 细胞:固定奥普佐米(或硼替佐米)浓度为 160 nmol/L,三氧化二砷浓度梯度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μmol/L,固定三氧化二砷浓度为 1.2 μmol/L,奥普佐米浓度梯度为 0、40、80、120、160、200 nmol/L。

MTT 法时效检测、凋亡检测、ROS 检测、Western blot 检测分组:对照组、三氧化二砷组、奥普佐米组、奥普佐米加三氧化二砷组、NAC 组、奥普佐米加三氧化二砷加 NAC 组。其中三氧化二砷对 NB4、HL-60 细胞剂量分别为 0.4、1.2 μmol/L。奥普佐米对 NB4、HL-60 细胞剂量分别为 40、160 nmol/L。NAC 的作用浓度为 5 mmol/L。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞活度 处于对数生长期的细胞计数后,按 1×10^4 个/孔铺于 96 孔板中,每孔 90 μL 培养基,培养 24 h。加入完全培养基配制的梯度浓度药液,先加入奥普佐米预处理 2 h,再加入三氧化二砷,继续培养 48 h。每孔加入 20 μL 的 5% MTT 工作液,37 ℃避光孵育 4 h,每孔加入 100 μL 三联液,37 ℃过夜。酶标仪于波长 595 nm 处测光密度值,计算细胞存活率。

1.2.3 细胞凋亡检测 细胞计数后,按 3×10^5/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL 培养基,培养 24 h。加药培养 48 h。细胞收集于离心管内,1 000 r/min,4 ℃离心 5 min,弃上清,按每个样 100 μL 1×binding buffer、2.2 μL Annexin V-FITC、5 μL PI (50 μg/mL)配制染液,每个样加入 100 μL 混合染液,充分重悬细胞,转移至 1.5 mL 的 EP 管内,避光染色 5 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 ROS 检测 初始步骤同凋亡检测,培养 24 h。加药培养 24 h。每孔加入 2 μL 的 CM-H2DCFDA 探针,继续孵育 1 h,收集细胞后离心(同凋亡检测),弃上清,每个样加入 100 μL PBS,后续步骤同凋亡检测,流式细胞仪检测细胞 ROS 生成量。

1.2.5 Western blot 检测 细胞加药处理 48 h 后,分别提取全蛋白并测定蛋白浓度,蛋白液加入 Loading buffer,96 ℃,金属浴 10 min,-20 ℃保存。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转 4 h 至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 30 min,4 ℃摇床上孵育一抗过夜,TBST 洗涤一抗 3 次,每次 10 min,加入二抗于室温下继续孵育 2 h,TBST 洗涤后显影[9]。

1.3 统计学分析

MTT 数据采用 GraphPad Prism 8.3 软件分析,量效关系、协同系数数据采用 Calcusyn 软件分析,流式检测数据采用 FlowJo7.6.1 软件进行分析,Western blot 检测结果采用 Photoshop 软件分析。采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本组间比较采用 t 检验,多样本组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 奥普佐米协同三氧化二砷抑制 NB4、HL-60 细胞增殖

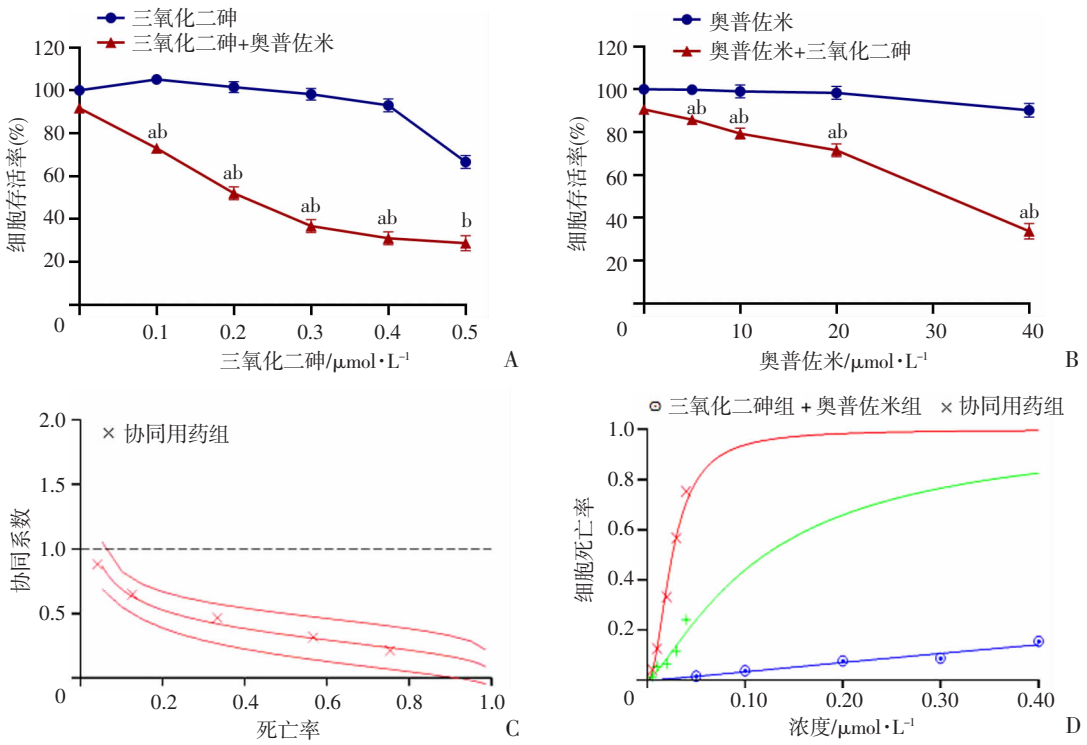
MTT 实验检测奥普佐米协同三氧化二砷对 NB4、HL-60 细胞存活率影响,结果显示(图 1A、1B、2A、2B)奥普佐米与三氧化二砷联合作用于 NB4、HL-60 细胞,明显减少了细胞存活率,而两种药物单独作用对细胞存活率影响较小。利用 Calcusyn 软件求得协同系数和量效关系,结果显示(图 1C、1D、2C、2D)在一定剂量范围内,药物效应与浓度呈正相关。协同系数均小于 1,表明两药联合作用效果为协同,且对 NB4 细胞增殖抑制的协同效果优于 HL-60 细胞。

联合用药作用于 NB4、HL-60 细胞。分别在 12、24、48 h 检测细胞的存活率,结果显示(图 3A、B),联合用药抑制细胞增殖具有较好的时效性。经过 12、24 h,细胞存活率逐渐降低。48 h 时 HL-60 细胞存活率 37.09%,NB4 细胞仅有 23.65%,差异有统计学意义($P<0.01$)。

相同浓度硼替佐米、奥普佐米分别与三氧化二砷联用作用于 NB4、HL-60 细胞,比较其联用效果。结果显示(图 4A、B),前者的药物组合对两种细胞的增殖抑制不明显,几乎只有三氧化二砷单用的效果,而后者的药物组合能明显抑制两种细胞增殖。实验结果证明奥普佐米与三氧化二砷联用效果明显优于硼替佐米与三氧化二砷联用效果。

2.2 奥普佐米协同三氧化二砷诱导 NB4 细胞凋亡

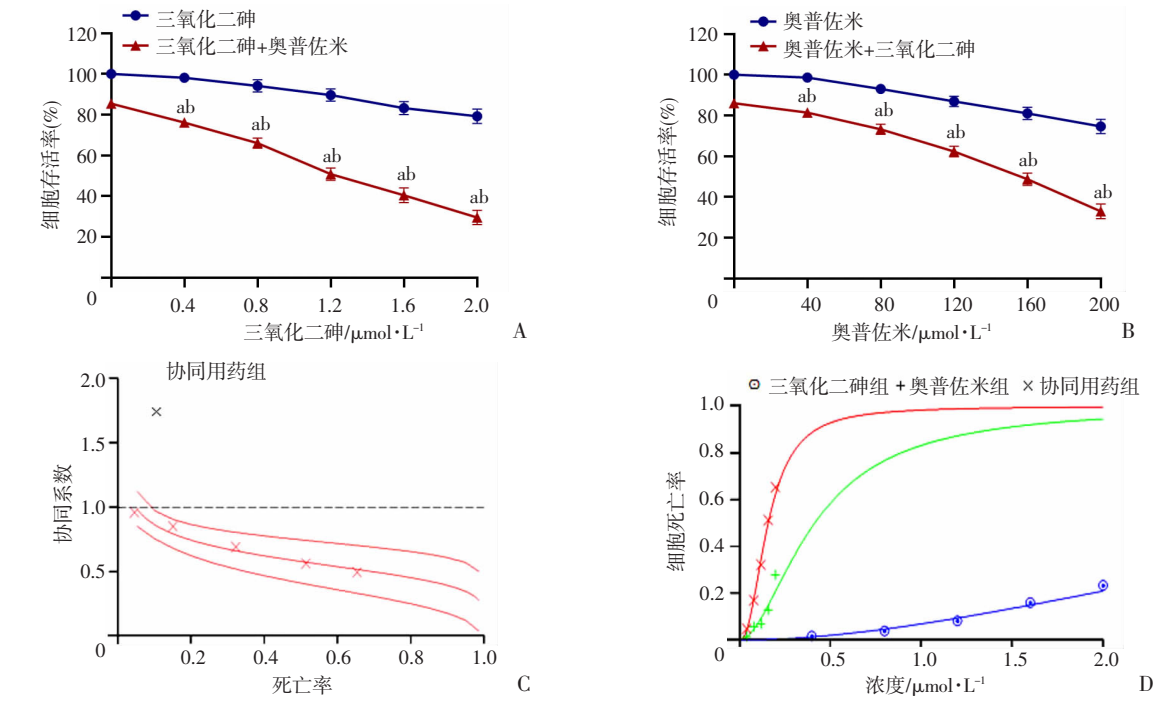
Annexin V-FITC 和 PI 双染的方法处理 NB4 细胞,通过流式细胞仪检测凋亡,对 3 次重复数据通过统计学处理进行定量分析,结果显示奥普佐米协同三氧化二砷促进 NB4 细胞凋亡(图 5A),定量分析结果显示(图 5B),奥普佐米协同三氧化二砷可显著升高 NB4 细胞凋亡率约 70%,差异有统计学意义($P<0.01$)。



a:$P<0.01$,与前一个浓度组比较;b:$P<0.01$,与对应单用组比较

A:梯度浓度三氧化二砷对 NB4 细胞存活率的影响(奥普佐米 40 nmol/L);B:梯度浓度奥普佐米对 NB4 细胞存活率的影响(三氧化二砷 0.4 μmol/L);C:奥普佐米联用三氧化二砷协同系数;D:药物浓度与细胞死亡率之间量效关系

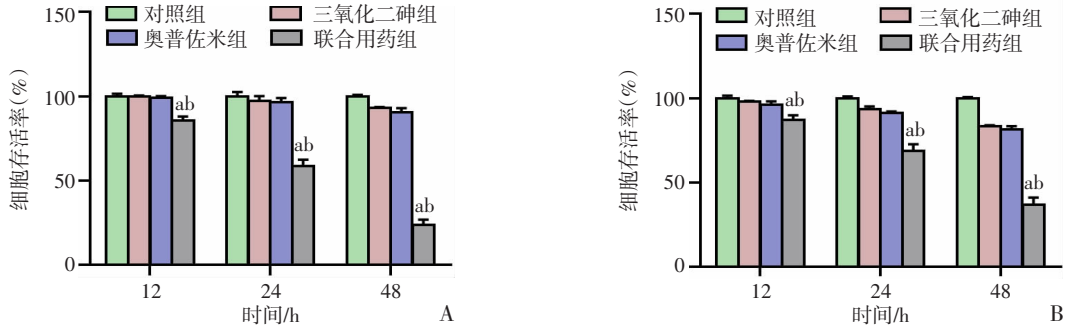
图 1 奥普佐米协同三氧化二砷对 NB4 细胞存活率的影响



a:$P<0.01$,与前一个浓度组比较;b:$P<0.01$,与对应单用组比较

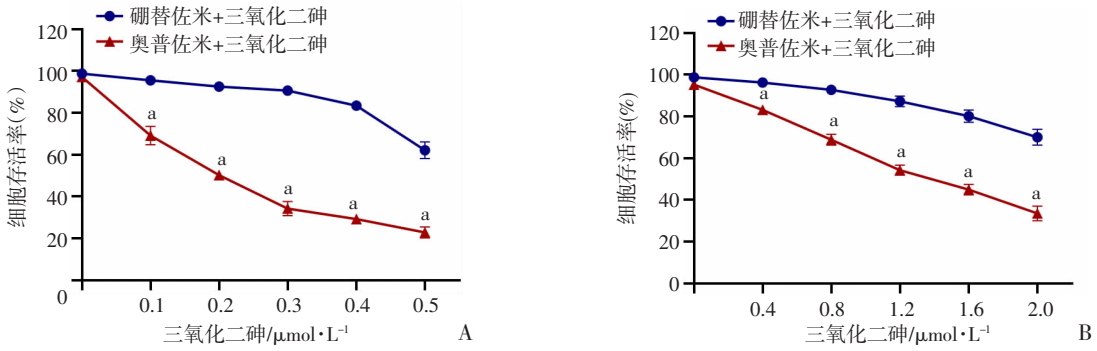
A:梯度浓度三氧化二砷对 HL-60 细胞存活率的影响(奥普佐米 160 nmol/L);B:梯度浓度奥普佐米对 HL-60 细胞存活率的影响(三氧化二砷 1.2 μmol/L);C:奥普佐米联用三氧化二砷协同系数;D:药物浓度与细胞死亡率之间量效关系

图 2 奥普佐米协同三氧化二砷对 HL-60 细胞存活率的影响



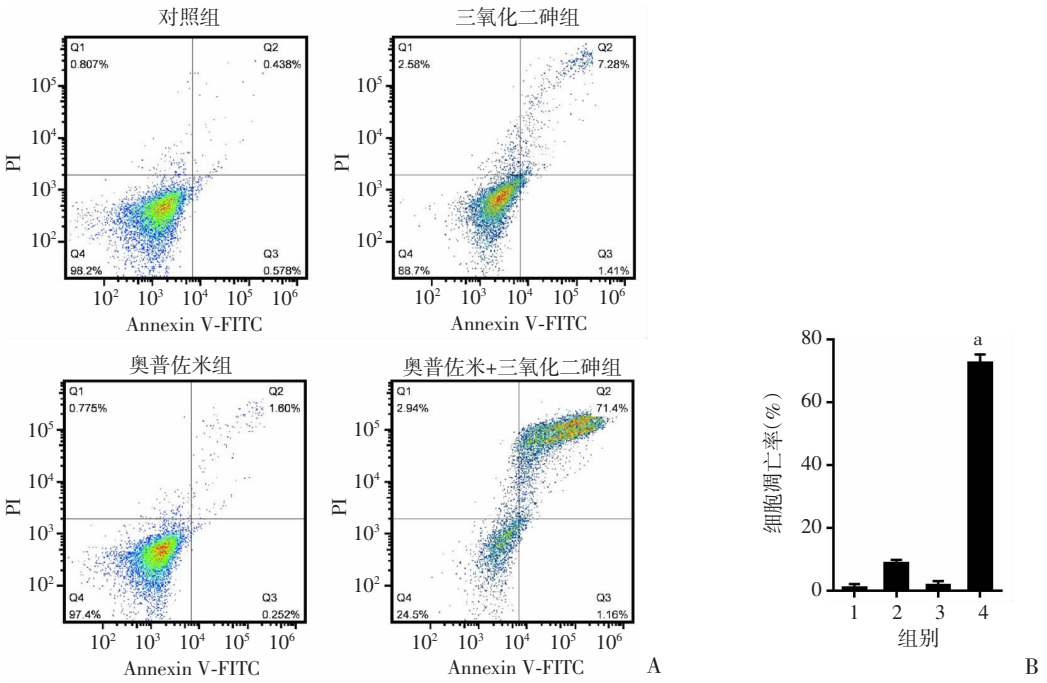
a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与前一时间点的联合用药组比较
A:联合用药抑制 NB4 细胞增殖的时效;B:联合用药抑制 HL-60 细胞增殖的时效

图 3 联合用药抑制 NB4、HL-60 细胞增殖的时效性



a:$P<0.01$,与对应硼替佐米+三氧化二砷组比较
A:硼替佐米(40 nmol/L)、奥普佐米(40 nmol/L)分别与三氧化二砷(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L)联用对 NB4 细胞存活率的影响;B:硼替佐米(160 nmol/L)、奥普佐米(160 nmol/L)分别与三氧化二砷(0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μmol/L)联用对 HL-60 细胞存活率的影响

图 4 三氧化二砷分别与奥普佐米、硼替佐米联用对 NB4 和 HL-60 细胞效果比较

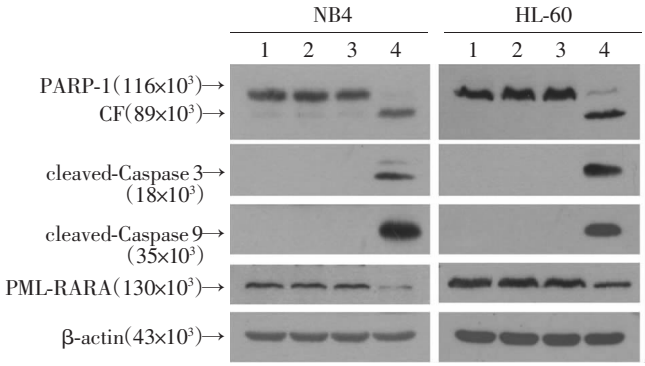


A:流式细胞仪检测 NB4 细胞凋亡;B:NB4 细胞凋亡率统计分析 1:对照组;2:三氧化二砷组;3:奥普佐米组;4:奥普佐米+三氧化二砷组;a:$P<0.01$,与对照组比较

图 5 奥普佐米协同三氧化二砷诱导 NB4 细胞凋亡

2.3 奥普佐米协同三氧化二砷导致凋亡相关蛋白表达升高,PML-RARA 表达降低

Western blot 检测凋亡相关蛋白,结果显示(图 6),奥普佐米协同三氧化二砷使 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 蛋白表达升高,PARP-1 剪切激活,表达升高。同时检测影响急性早幼粒细胞白血病发生与预后的关键融合蛋白 PML-RARA,结果显示,联合用药可明显减少 PML-RARA 蛋白表达,而单独用药时无明显影响。上述结果表明,奥普佐米协同三氧化二砷激活细胞凋亡通路,诱导凋亡发生;同时减少了 PML-RARA 蛋白表达。



1:对照组;2:三氧化二砷组;3:奥普佐米组;4:奥普佐米+三氧化二砷组;CF:PARP-1 的剪切条带

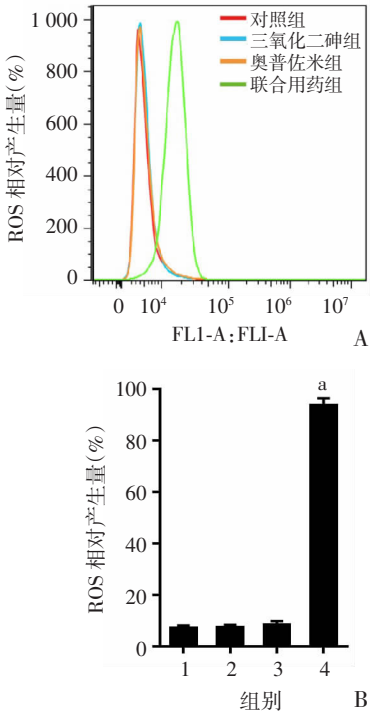
图 6 Western blot 检测联合用药对凋亡相关蛋白及 PML-RARA 表达的影响

2.4 奥普佐米协同三氧化二砷诱导 ROS 生成

流式细胞仪检测 ROS 水平,结果显示(图 7A)联合用药组 ROS 水平明显升高。定量分析结果显示(图 7B),奥普佐米和三氧化二砷单独处理细胞,ROS 相对产生量无明显差别,协同作用可使约 80% 的 NB4 细胞 ROS 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.5 抑制 ROS 可降低凋亡率

加入 ROS 抑制剂 NAC,流式细胞仪检测 ROS 水平和细胞凋亡率,结果显示(图 8A、C),加入 NAC 之后联合用药组的 ROS 水平明显下降,细胞凋亡率减少。定量分析结果显示(图 8B、D):加入 NAC 后联合用药组 ROS 相对生成量下降约 70%,凋亡率下降约 41%,差异有统计学意义($P<0.01$)。



A:流式细胞仪检测 ROS 生成量;B:ROS 生成量统计分析 1:对照组;2:三氧化二砷组;3:奥普佐米组;4:奥普佐米+三氧化二砷组;a:$P<0.01$,与对照组比较

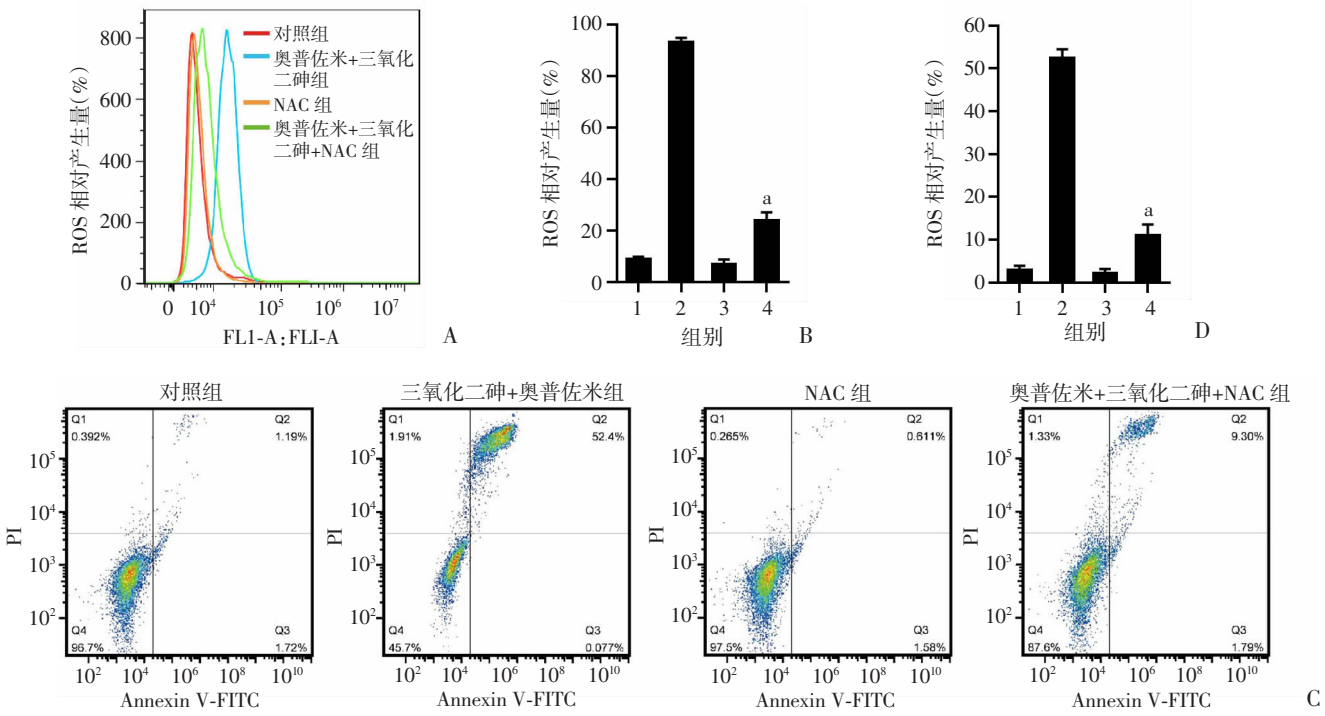
图 7 奥普佐米协同三氧化二砷诱导 NB4 细胞产生 ROS

2.6 抑制 ROS 可减少凋亡相关蛋白表达,抑制 PML-RARA 的表达减少

Western blot 结果显示(图 9),加入 NAC 之后的联合用药组较之前凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 表达降低,抑制 PARP-1 剪切激活,cleaved-PARP 表达下降,PML-RARA 表达增加。综合上述流式及 Western blot 检测结果,表明抑制 ROS 可抑制凋亡通路,从而抑制凋亡相关蛋白的表达;对关键的融合蛋白 PML-RARA 也有明显的影响。

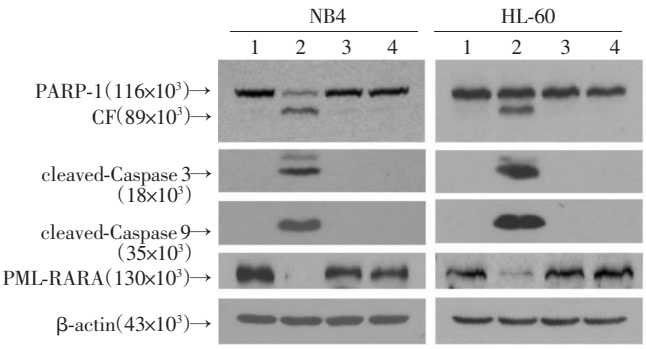
3 讨论

白血病是一类造血干细胞恶性克隆性疾病。其特点是白血病细胞分化成熟障,停滞在细胞发育不同阶段,且大量增殖,浸润其他器官和组织,并伴有凋亡抑制[10]。早幼粒细胞白血病(PML)/维甲酸受体 α(PML-RARA)肿瘤融合蛋白被证明是一种转录抑制因子,对急性早幼粒细胞白血病(APL)的发生至关重要[11]。



1:对照组;2:奥普佐米+三氧化二砷组;3:NAC 组;4:奥普佐米+三氧化二砷+NAC 组;a:$P<0.01$,与奥普佐米+三氧化二砷组比较
A:NAC 减少联合用药诱导 NB4 细胞产生 ROS;B:ROS 相对产生量统计分析;C:NAC 减少联合用药诱导的 NB4 细胞凋亡;D:细胞凋亡率统计分析

图 8 NAC 减少联合用药 NB4 细胞产生的 ROS 和凋亡



1:对照组;2:奥普佐米+三氧化二砷组;3:NAC 组;4:奥普佐米+三氧化二砷+NAC 组;CF:PARP-1 的剪切条带

图 9 Western blot 检测 NAC 对凋亡相关蛋白及 PML-RARA 表达的影响

奥普佐米具有抑制 20S 蛋白酶体 β5/LMP7 的 CT-L 活性药理作用。其抗肿瘤机制包括泛素-蛋白酶体途径、自噬溶酶体途径、内质网应激途径、细胞存活信号途径、外泌体介导和骨髓微环境介导[12]。研究表明[13-16],奥普佐米通过以下方式增强其他化疗药物的抗癌疗效:显著的癌基因 MYB 抑制活性;降低 TNF-α 和 NF-κB 等抗凋亡蛋白的表达;增加促凋亡蛋白 Noxa 的水平;增强 Caspase-3 和 PARP 的裂解,激活凋亡信号通路 JNK 的磷酸化,诱导肿瘤细胞凋亡;降解促生存蛋白;诱导髓系白血病细胞分化蛋白(MCL1);抑制药物外移转运蛋白;激活 Parkin/Pink 途径诱导线粒体自噬等。本研究证明奥普佐米协同三氧化二砷能诱导急性早幼粒白血病细胞 ROS 生成,降低 PML-RARA 的表达,诱导细胞凋亡。且奥普佐米的效果明显优于 FDA 批准的第 1 代蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib, BTZ)。

活性氧(ROS)形成的升高导致分子损伤,称为“氧化应激”[17-18]。大量产生和累积的 ROS 会导致 DNA 损伤,脂质、蛋白质受损,破坏正常的细胞信号传导[19],随后激活内质网应激,进而诱导细胞其他机制如自噬、凋亡等发生[20]。本研究证明奥普佐米和三氧化二砷适当剂量的联用会导致大量 ROS 生成,而抑制 ROS 则抑制了凋亡和关键蛋白 PML-RARA 的表达降低。表明 ROS 生成对细胞凋亡的发生和 PML-RARA 蛋白有着重要影响。

凋亡取决于一系列胱天蛋白酶的激活。如启动 Caspase:Caspase 8、Caspase 9、Caspase 10 以及执行 Caspase:Caspase 3、Caspase 6、Caspase 7[21]。其中

Caspase 3 是最重要的凋亡执行者,cleaved-Caspase 3 可直接导致细胞凋亡发生[22]。许多化疗药物通过细胞凋亡途径而发挥治疗作用。大量实验研究表明[23-26],凋亡和其他细胞机制如氧化应激、自噬等彼此独立而又有着密切的联系,并且具有协同作用。细胞受到药物刺激,先产生氧化应激,当刺激水平过高,则会导致细胞凋亡。本研究证明适当剂量的奥普佐米和三氧化二砷联用能明显诱导凋亡发生。

综上所述,奥普佐米协同三氧化二砷诱导急性早幼粒白血病细胞 ROS 生成,PML-RARA 蛋白表达减少,激活下游的 Caspase 家族,导致细胞凋亡发生。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] WANG Z, WEN L J, ZHANG L, *et al*. Identification of a novel TNRC18-RARA fusion in acute promyelocytic leukemia lacking t(15;17)(q24;q12)/PML-RARA[J]. Mol Carcinog, 2021, 60(2): 101-105. DOI: 10.1002/mc.23276.

[3] SHORT N J, KONOPLEVA M, KADIA T M, *et al*. Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: new drugs and new challenges[J]. Cancer Discov, 2020, 10(4): 506-525. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-1011.

[4] WANG Q Q, HUA H Y, NARANMANDURA H, *et al*. Balance between the toxicity and anticancer activity of arsenic trioxide in treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 409: 115299. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115299.

[5] COLLINS F S. Mining for therapeutic gold[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(6): 397. DOI: 10.1038/nrd3461.

[6] YANG Y, LI Y, GU H, *et al*. Emerging agents and regimens for multiple myeloma[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 150. DOI: 10.1186/s13045-020-00980-5.

[7] SHERMAN D J, LI J. Proteasome inhibitors: harnessing proteostasis to combat disease[J]. Molecules, 2020, 25(3): E671. DOI: 10.3390/molecules25030671.

[8] HARI P, MATOUS J V, VOORHEES P M, *et al*. Oprozomib in patients with newly diagnosed multiple myeloma[J]. Blood Cancer J, 2019, 9(9): 66. DOI: 10.1038/s41408-019-0232-6.

[9] 姜秀星, 傅若秋, 高宁. 千金藤素协同多柔比星逆转 K562/ADR 耐药的分子机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(23): 2154-2161. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201807166.
JIANG X X, FU R Q, GAO N. Molecular mechanism of cepharanthine synergistically acting with doxorubicin in reversing multidrug resistance of K562/ADR cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(23): 2154-2161. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201807166.

[10] YOUSEFNIA S. Mechanistic effects of arsenic trioxide on acute promyelocytic leukemia and other types of leukemias[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(6): 1148-1157. DOI: 10.1002/cbin.11563.

[11] WANG G J, TIAN Y, HU Q Z, *et al*. PML/RARa blocks the differentiation and promotes the proliferation of acute promyelocytic leukemia through activating MYB expression by transcriptional and epigenetic regulation mechanisms[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(2): 1210-1220. DOI: 10.1002/jcb.27077.

[12] 吴姣, 刘竞. 蛋白酶体抑制剂在多发性骨髓瘤中耐药的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(8): 900-908. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200430.
WU J, LIU J. Research progress in proteasome inhibitor-resistance to multiple myeloma[J]. Cent South Univ (Med Sci), 2021, 46(8): 900-908. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200430.

[13] YUSENKO M V, BIYANEE A, ANDERSSON M K, *et al*. Proteasome inhibitors suppress MYB oncogenic activity in a p300-dependent manner[J]. Cancer Lett, 2021, 520: 132-142. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.07.010.

[14] NARAYANAN S, CAI C Y, ASSARAF Y G, *et al*. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway to overcome anti-cancer drug resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 48: 100663. DOI: 10.1016/j.drup.2019.100663.

[15] ZHU H G, WANG T H, XIN Z, *et al*. An oral second-generation proteasome inhibitor oprozomib significantly inhibits its lung cancer in a p53 independent manner *in vitro*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(10): 1034-1040. DOI: 10.1093/abbs/gmz093.

[16] WU M M, CHEN P, LIU F C, *et al*. ONX0912, a selective oral proteasome inhibitor, triggering mitochondrial apoptosis and mitophagy in liver cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 547: 102-110. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.037.

[17] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(7): 363-383. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

(下转 355 页)

[23] WANG X, LI N, HAN A, *et al*. Ezrin promotes hepatocellular carcinoma progression by modulating glycolytic reprogramming[J]. Cancer Sci, 2020, 111(11): 4061-4074. DOI: 10.1111/cas.14562.

[24] WEAVER A M. Cortactin in tumor invasiveness[J]. Cancer Lett, 2008, 265(2): 157-166. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.066.

[25] ZHAO G, ZHANG H Y, HUANG Z M, *et al*. Cortactin and Exo70 mediated invasion of hepatoma carcinoma cells by MMP-9 secretion[J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(5): 407-414. DOI: 10.1007/s11033-016-3972-4.

[26] CRIMALDI L, COURTNEIDGE S A, GIMONA M. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(15): 2581-2592. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.06.012.

[27] OSER M, YAMAGUCHI H, MADER C C, *et al*. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation[J]. J Cell Biol, 2009, 186(4): 571-587. DOI: 10.1083/jcb.200812176.

[28] CLARK E S, WHIGHAM A S, YARBROUGH W G, *et al*. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia[J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4227-4235. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-3928.

[29] SONG Y, MA X, ZHANG M, *et al*. Ezrin mediates invasion and metastasis in tumorigenesis: a review[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 588801. DOI: 10.3389/fcell.2020.588801.

(收稿:2021-11-11;修回:2021-12-01)

(编辑 王 红)

(上接336页)

[18] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, *et al*. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(7): 385-396. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.26.

[19] HU K H, LI W X, SUN M Y, *et al*. Cadmium induced apoptosis in MG63 cells by increasing ROS, activation of p38 MAPK and inhibition of ERK 1/2 pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(2): 642-654. DOI: 10.1159/000430127.

[20] YANG Z, HUANG R H, WEI X Y, *et al*. The SIRT6-autophagy-Warburg effect axis in papillary thyroid cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1265. DOI: 10.3389/fonc.2020.01265.

[21] MCCOMB S, CHAN P K, GUINOT A, *et al*. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7[J]. Sci Adv, 2019, 5(7): eaau9433. DOI: 10.1126/sciadv.aau9433.

[22] ZHANG Y, YANG X, GE X H, *et al*. Puerarin attenuates neurological deficits *via* Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 109: 726-733. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.161.

[23] WEN L L, CHEN Y T, LEE Y G, *et al*. Perfluorooctane sulfonate induces autophagy-associated apoptosis through oxidative stress and the activation of extracellular signal-regulated kinases in renal tubular cells[J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0245442. DOI: 10.1371/journal.pone.0245442.

[24] CHOU H Y, LIU L H, CHEN C Y, *et al*. Bifunctional mechanisms of autophagy and apoptosis regulations in melanoma from Bacillus subtilis natto fermentation extract[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 150: 112020. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112020.

[25] PANG X N, ZHANG X Y, JIANG Y H, *et al*. Autophagy: mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 135. DOI: 10.3390/biom11020135.

[26] JANG M, HARA S, KIM G H, *et al*. Dutomycin induces autophagy and apoptosis by targeting the serine protease inhibitor $SERPINB_6$[J]. ACS Chem Biol, 2021, 16(2): 360-370. DOI: 10.1021/acschembio.0c00889.

(收稿:2021-09-08;修回:2021-11-07)

(编辑 张 维)