DOI:10.16016/j.2097-0927.202201220

西达本胺联合吗替麦考酚酯抑制继发性急性髓系白血病细胞增殖

蔡 铎[1,2],梁思敏[1],周 巧[1],王 利[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:血液内科[1],重大代谢性疾病转化医学重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨西达本胺(chidamide,CDM)和吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil,MMF)联合应用对继发性急性髓系白血病细胞增殖的影响。**方法** 慢性髓系白血病急变期细胞株 K562 及 MDS 转白细胞株 SKM-1,分别按照不同浓度的 CDM 单药组(0.25、0.5、1、2、4 μmol/L),MMF 单药组(0.5、1、2、4、8 μmol/L)及联合用药组(CDM∶MMF=1∶2)干预 24、48、72 h 后,CCK-8 实验检测细胞增殖抑制率。基于最佳联合干预浓度干预 72 h 后,流式细胞学检测细胞周期及凋亡率的变化,并通过网络药理学探讨其作用机制。**结果** CCK-8 结果显示,联合组(1 μmol/L CDM+2 μmol/L MMF)在 K562 和 SKM-1 细胞中的联合指数分别为 0.389 44 和 0.630 98。与 CDM 及 MMF 单药组比较,联合用药能显著提高对 K562 和 SKM-1 细胞增殖抑制率($P<0.01$),并促进 K562 细胞凋亡率增高($P<0.05$)。相较单药 MMF 组,联合组显著诱导 K562、SKM-1 细胞 G_0/G_1 期阻滞,但较 CDM 单药无统计学差异。其后网络药理学构建出 66 个节点、222 条边的药物-疾病靶点 PPI 网络,并根据拓扑学筛选出 CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、CDK9、SYK、BTK、KDR、PIK3CB 等 9 个核心靶点,富集分析主要涉及蛋白质磷酸化、细胞增殖、凋亡调控等多种生物进程,及 PI3K-AKT、FOXO 等信号通路。**结论** CDM 联合 MMF 可显著抑制继发性急性髓系白血病细胞生长。

[关键词] 西达本胺;麦考酚酸;继发性急性髓系白血病;网络药理学
[中图法分类号] R733.7; R965; R979.1 [文献标志码] A

Chidamide combined with mycophenolate mofetil suppress proliferation of secondary acute myeloid leukemia cells

CAI Duo[1,2], LIANG Simin[1], ZHOU Qiao[1], WANG Li[1] [1]Department of Hematology, [2]Key Laboratory of Translational Medicine for Major Metabolic Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of combined application of chidamide (CDM) and mycophenolate mofetil (MMF) on the proliferation of secondary acute myeloid leukemia (sAML) cells. **Methods** Chronic myeloid leukemia blast-phase cell line K562 and myelodysplastic syndromes (MDS)-transformed leukocyte line SKM-1 were employed in the study. The cells were divided into groups according to different concentrations of intervention drugs: CDM alone groups (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 μmol/L), MMF alone groups (0.5, 1, 2, 4 and 8 μmol/L) and combined drug groups (CDM∶MMF=1∶2), respectively. The inhibitory rate of cell proliferation was detected by CCK-8 assay after treatment for 24, 48 and 72 h, respectively. Moreover, the changes of cell cycle and apoptotic rate were determined by flow cytometry after 72 h of intervention under the optimal combined drug concentration, and its mechanism was analyzed by network pharmacology. **Results** CCK-8 assay showed that the combination index of the combined drug group (1 μmol/L CDM+2 μmol/L MMF) was 0.389 44 in K562 cells and 0.630 98 in SKM-1 cells. When compared with the CDM and MMF monotherapy groups, the combined treatment significantly enhanced the

[基金项目] 重庆市科卫联合医学科研项目重点项目(2018ZDXM001)
[通信作者] 王 利,E-mail:liwangls@yahoo.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/)

inhibitory effect on the proliferation of both K562 and SKM-1 cells ($P<0.01$), and increased the apoptotic rate of K562 cells ($P<0.05$). As compared with the MMF alone group, the combination group remarkably arrested the cell cycle at the G_0/G_1 phase, though which had no statistical difference with CDM alone. Subsequently, a drug-disease target protein-protein interaction (PPI) network including 66 nodes and 222 edges was constructed through network pharmacology, and 9 core targets including CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK9, SYK, BTK, KDR, and PIK3CB were screened out according to topology. Enrichment analysis indicated that various biological processes such as protein phosphorylation, cell proliferation, and apoptosis regulation were mainly involved, as well as PI3K-AKT, FOXO and other signaling pathways. **Conclusion** CDM combined with MMF significantly inhibits the growth of sAML cells.

[**Key words**] chidamide; mycophenolic acid; secondary acute myeloid leukemia; network pharmacology

Supported by the Key Project of Joint Medical Scientific Research of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2018ZDXM001). Corresponding author: WANG Li, E-mail: liwangls@yahoo.com

髓系白血病是一类起源于骨髓造血干细胞的克隆性增殖的恶性肿瘤,其中以急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)发病为主,慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia,CML)其次[1-2]。根据SEER回顾研究发现髓系白血病确诊时中位年龄为68岁左右[3],这意味着老年患者仍面临化疗不耐受及较差的预后。与此同时,相较于原发AML而言,由骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes,MDS)等血液系统疾病所继发急性髓系白血病(secondary acute myeloid leukemia,sAML)发病率随着年龄增长也逐渐增高,且同时伴随更高复发率及更差预后[4]。因此,目前仍然亟待探索针对sAML的新治疗方案。近年来,联合用药已被认为是一种毒性低、副作用少的治疗策略,可用于提高单药治疗的疗效。

近年来,研究发现表观遗传学及免疫功能失调等诸多因素参与了MDS及sAML发生发展。西达本胺(chidamide,CDM)是一类新型组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂,而吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil,MMF)是一类造血干细胞移植术后常用免疫抑制剂。本研究旨在探究CDM联合MMF对sAML细胞增殖的影响,为全面探究CDM联合MMF治疗sAML的作用及潜在作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

以慢性髓系白血病急变期细胞株K562及MDS转白细胞株SKM-1为研究模型,细胞培养用RPMI1640培养基(美国赛默飞世尔公司),含10%胎牛血清(德国PAN seratech公司)和1%青-链霉素(中国碧云天公司),在37 ℃恒温、5%CO_2孵箱中孵育,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 药物及处理方式

CDM购自深圳微芯生物,MMF购自瑞士罗氏公司。CDM和MMF均以二甲基亚砜(DMSO)溶解为50 mmol/L浓度,分装保存在-20 ℃备用。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖

细胞以5×10^3/孔接种到96孔板中,并加入CDM单药(0.25、0.5、1、2、4 μmol/L),MMF单药(0.5、1、2、4、8 μmol/L)及联合用药(CDM∶MMF=1∶2),在37 ℃,5%CO_2孵箱中分别孵育24、48、72 h后,加入CCK-8试剂,孵育2 h。然后用Multiskan光谱(美国赛默飞世尔公司)在450 nm读取$D(450)$值。细胞抑制率=[$D(450)_{对照组}-D(450)_{用药组}$]/[$D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}$]×100%。

1.4 流式细胞学检测细胞凋亡及周期

将细胞随机分为对照组、单药CDM(1 μmol/L)、单药MMF(2 μmol/L)、联合用药组(1 μmol/L CDM+2 μmol/L MMF)进行干预,并在37 ℃、5%CO_2条件下孵育72 h后,PBS洗涤。细胞凋亡分析用5 mL Annexin V-FITC和10 mL PI(德国BD Biosciences),2~8 ℃避光孵育20 min后检测。细胞周期则用75%乙醇(-20 ℃)固定,-4 ℃过夜,50 mg/mL含RNase的PI染色30 min,BD流式细胞仪分析检测。采用FlowJo 10.6.2软件对细胞凋亡率及各周期细胞比例进行分析。

1.5 CDM、MMF药物及继发性急性髓系白血病候选作用靶点筛选

利用PubChem数据库得到CDM及MMF药物化学结构及其相关标准延时格式(Standard Delay Format,SDF)文件。选用SEA、Swiss Target Predict、TargetNe及PharmMapper等4个网络药理学数据库来筛选候选靶点。将上述各自候选靶点分别汇总去重后获得CDM和MMF的药物作用靶点。利用OMIM、DisGeNet及GeneCard等3个数据库,获得与sAML相

关疾病靶点,进行汇总去重后得到相关疾病靶点。

1.6 蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction,PPI)网络构建及分析

将上述药物及疾病共同候选靶点上传至 STRING 平台(https://string-db.org/),最低相互作用阈值≥0.9,得到 PPI 网络图。同时利用 MCODE 插件对 PPI 网络进行聚类分析及拓扑分析,分别筛选得到 12 个拓扑数据,进而筛选出最佳关键核心靶点。

1.7 基因本体(GO)和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 在线富集分析网站(https://david.ncifcrf.gov/)对上述 PPI 候选靶点进行基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)途径富集分析,涉及生物过程(biological process,BP)、细胞组分(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)及信号通路(Pathway)等,并通过微生信网站进行数据可视化(http://www.bioinformatics.com.cn/)。

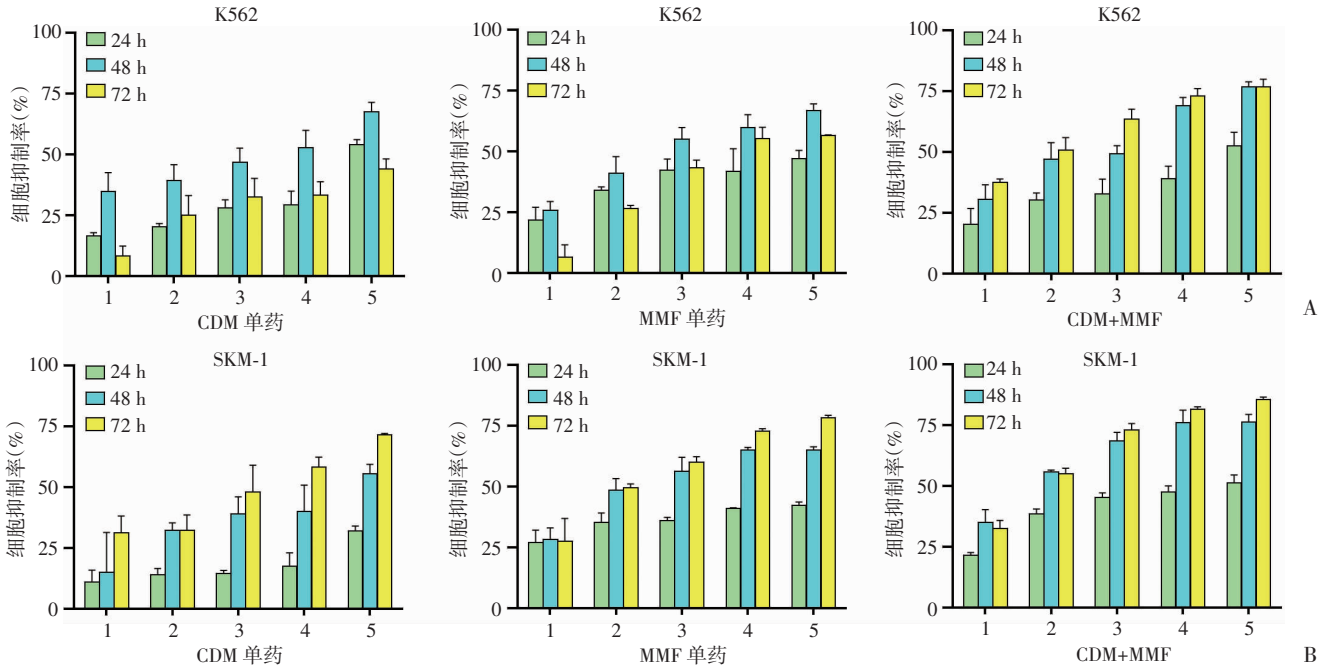
1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism8.01 软件进行统计分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,两因素比较采用 two-way ANOVA 分析,然后 Tukey's 事后检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。联合用药协同作用评估使用 CompuSyn 软件计算联合指数(CI),CI<1 表示协同作用;CI=1 表示相加作用;CI>1 表示拮抗作用。所有实验为 3 次独立实验。

2 结果

2.1 CDM 和 MMF 对继发性急性髓系白血病细胞增殖作用的影响

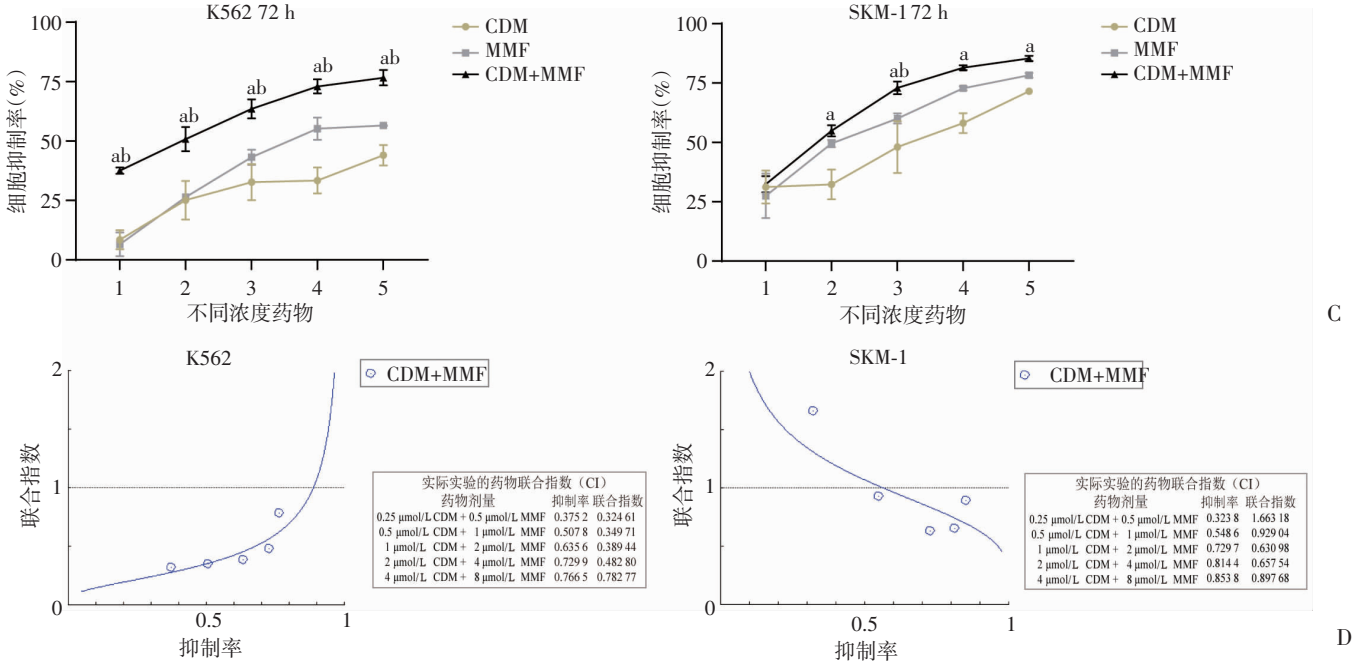
CDM 及 MMF 无论是单药还是联合方案,都呈现以时间依赖性及浓度依赖性的方式抑制细胞生长。干预 72 h 后,CDM 单药和 MMF 单药对 K562 细胞的 IC_{50} 分别为(5.782±5.459)μmol/L 和(3.924±1.051)μmol/L,而 SKM-1 细胞中分别为(1.138±0.261)μmol/L 和(1.267±0.193)μmol/L(图 1A、B)。干预 72 h 后,与单药作用相比较,在 K562 细胞中不同浓度组的联合用药方案细胞抑制率均明显增高($P<0.01$),在 SKM-1 细胞中仅 1 μmol/L CDM+2 μmol/L MMF 组细胞抑制率同时高于 CDM 及 MMF 单药组($P<0.01$,图 1C)。CompuSyn 分析显示,K562 细胞的 CI 在 0.324 61~0.782 77 之间,而 SKM-1 中除 0.25 μmol/L CDM+0.5 μmol/L MMF 组外,其余 CI 在 0.630 98~0.929 04 之间,表明联合方案具有较好协同效应(图 1D)。1 μmol/L CDM+2 μmol/L MMF 浓度方案在 K562 和 SKM-1 组中的细胞抑制率均明显优于 CDM 和 MMF 单药组,故以此浓度方案进行后续实验。



A、B:CCK-8 法检测不同处理下各时间点 K562、SKM-1 细胞增殖抑制率;1~5 分别对应药物浓度:CDM 0.25、0.5、1、2、4 μmol/L,MMF 0.5、1、2、4、8 μmol/L 及联合用药 CDM:MMF=1:2

图 1 CCK-8 法检测西达本胺与吗替麦考酚酯处理下各时间点 K562、SKM-1 细胞增殖抑制率($n=3,\bar{x}\pm s$)

(图 1C、D 续下页)



C:西达本胺与吗替麦考酚酯处理 72 h 后 K562、SKM-1 细胞抑制率;1~5 分别对应药物浓度:CDM 0.25、0.5、1、2、4 μmol/L,MMF 0.5、1、2、4、8 μmol/L 及联合用药 CDM∶MMF=1∶2　a:$P<0.05$,与 CDM 组比较;b:$P<0.05$,与 MMF 组比较;D:CompuSyn 软件分析 CI 计算结果

续图 1　CCK-8 法检测西达本胺与吗替麦考酚酯处理下各时间点 K562、SKM-1 细胞增殖抑制率($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.2　CDM 和 MMF 对继发性急性髓系白血病细胞凋亡的影响

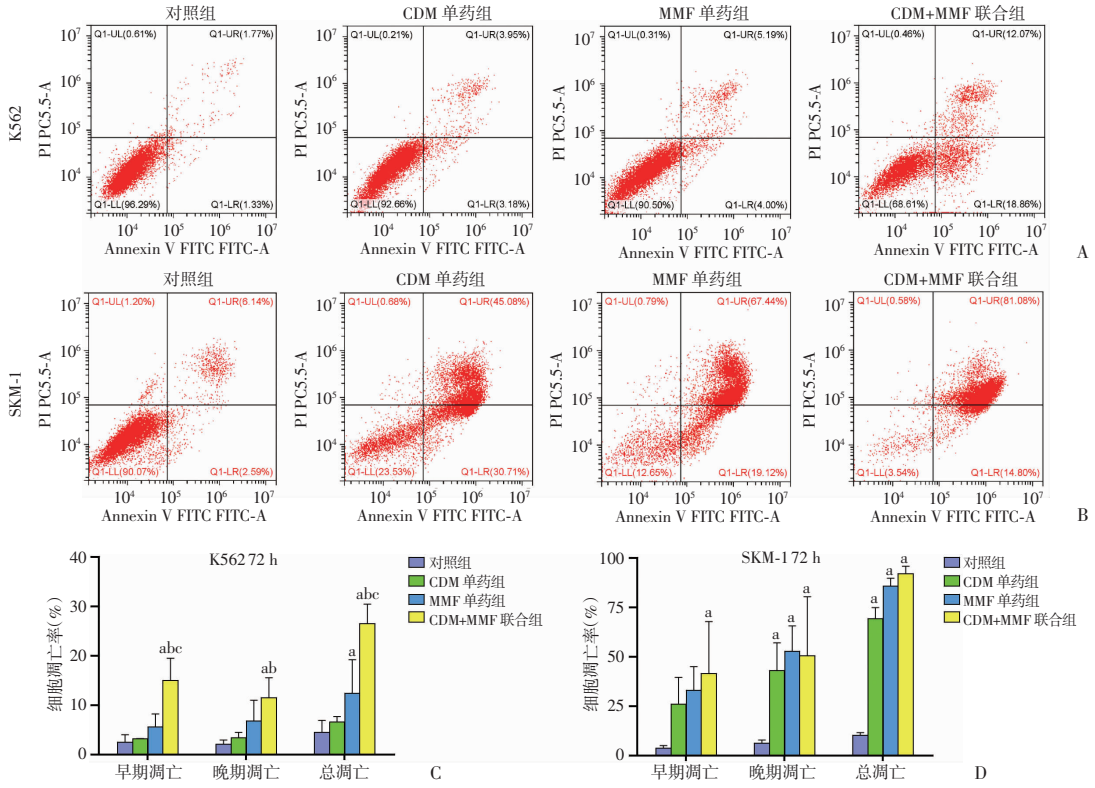
药物处理 72 h 后,与对照组相比,K562 细胞(图 2A、C)及 SKM-1 细胞(图 2B、D)中,联合用药组早期、晚期及总凋亡细胞(Annexin V 阳性)比例明显增高($P<0.05$),MMF 单药组总凋亡率均增高($P<0.05$)。而 CDM 组仅在 SKM-1 细胞中提示晚期、总凋亡率增高($P<0.05$)。与 CDM 单药组比较,联合用药组在 K562 细胞中早期、晚期及总凋亡率都增高($P<0.05$),在 SKM-1 细胞中无统计学差异。与 MMF 单药组相比,联合用药组在 K562 细胞中早期及总凋亡率增高($P<0.05$),而 SKM-1 细胞中无统计学差异。

2.3　CDM 和 MMF 对继发性急性髓系白血病细胞周期的影响

药物处理 72 h 后,与对照组相比,单药 CDM 及联合用药方案在 K562 细胞(图 3A、C)和 SKM-1 细胞(图 3B、D)中均出现显著 G_0/G_1 周期比例增高($P<0.05$),S 期比例下降($P<0.01$),提示出现 G_0/G_1 期阻滞。而单药 MMF 组仅在 K562 细胞中出现 S 期比例增高($P<0.05$)及 G_2/M 期比例降低($P<0.05$),提示 S 期阻滞。相较于单药组,联合用药组在 K562 及 SKM-1 中均较 MMF 单药组出现显著 G_0/G_1 周期比例增高($P<0.01$),与 CDM 单药组间无统计学差异。

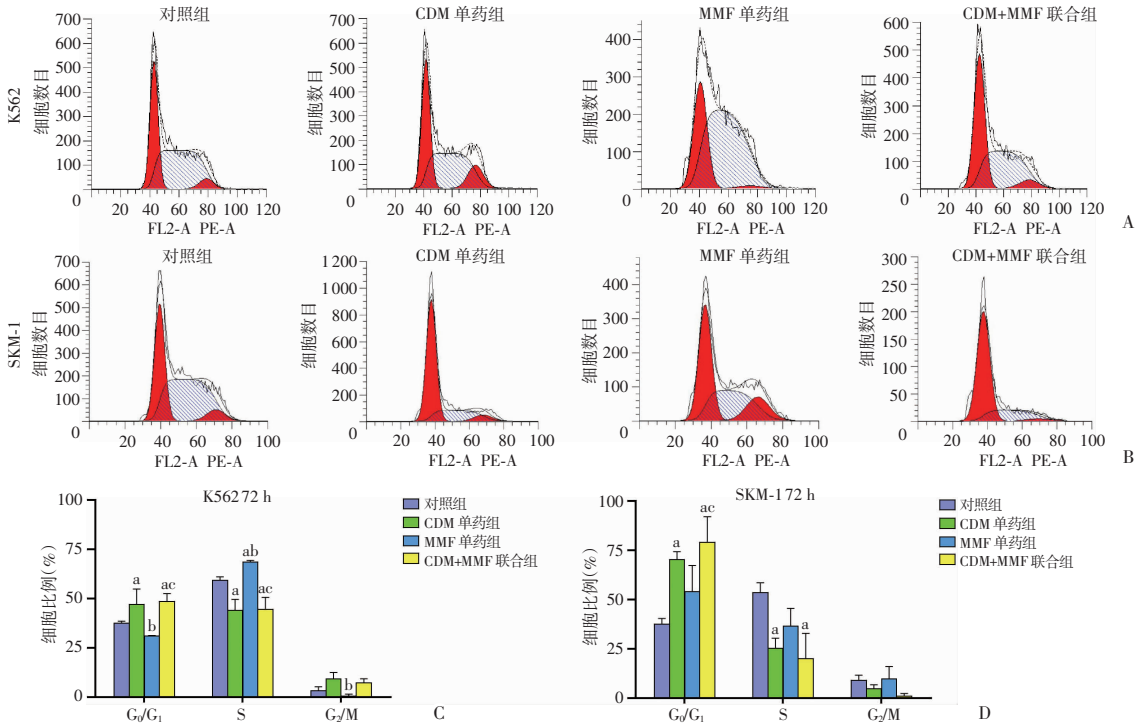
2.4　CDM 和 MMF 药物候选作用靶点及疾病相关靶点的获取与筛选

为了进一步研究 CDM 和 MMF 联合治疗 sAML 的作用机制,通过已知药物及疾病数据库的网络药理学策略,分别从 SEA 数据库得到 CDM 38 个及 MMF 38 个靶点、PharmMapper 数据库得到 CDM 89 个及 MMF 136 个靶点、Swiss Target Predict 数据库得到 CDM 102 个及 MMF 109 个靶点、TargetNet 数据库得到 CDM 56 个和 MMF 27 个靶点。汇总剔重后,分别得到 CDM 246 个、MMF 244 个药物作用靶点。从 OMIM 数据库、DisGeNet 数据库及 GeneCards 数据库分别获取 sAML 相关靶点 117、385、11 250 个,最终汇总剔重得到 11 308 个疾病相关靶点。如图 4 所示,CDM-MMF-sAML 三者共有 98 个潜在作用靶点交集。



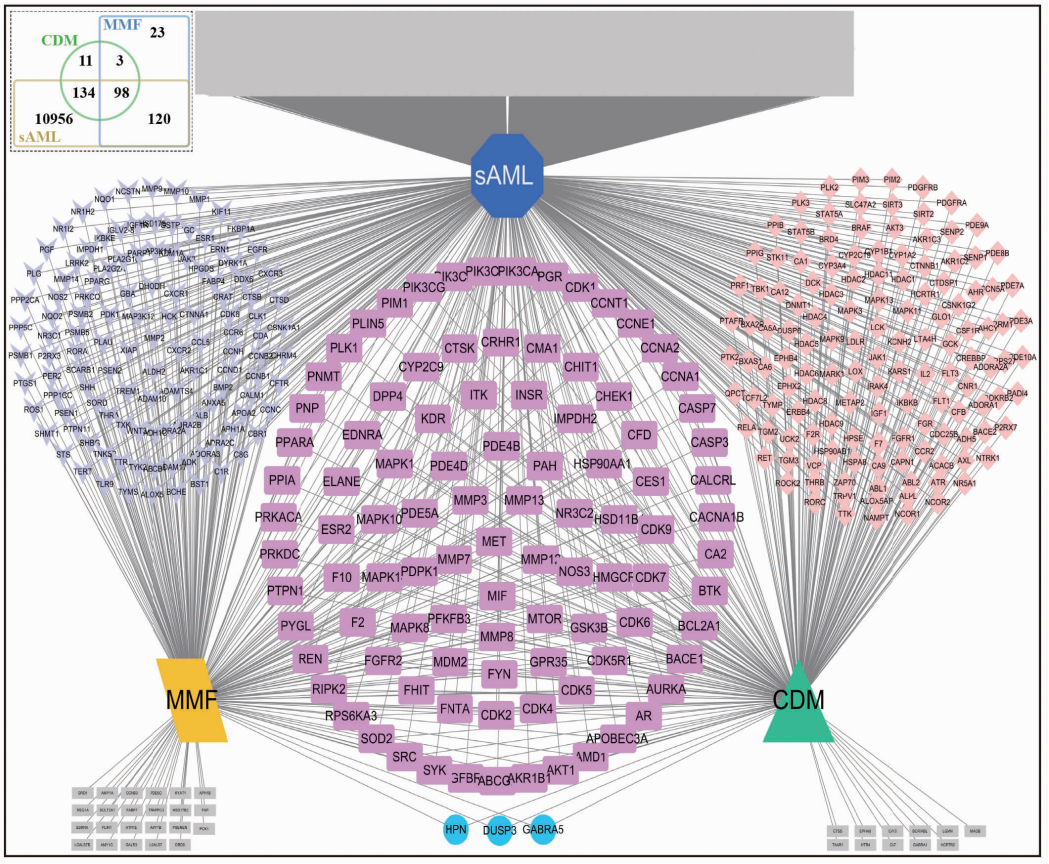
A、B:流式细胞学检测 K562、SKM-1 细胞凋亡率;C、D:K562、SMK-1 细胞凋亡率统计分析;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 CDM 组比较;c:$P<0.05$,与 MMF 组比较

图 2 西达本胺与吗替麦考酚酯对 K562、SKM-1 细胞凋亡的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A、B:流式细胞学检测 K562、SKM-1 细胞周期变化;C、D:K562、SKM-1 细胞周期统计分析 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 CDM 组比较;c:$P<0.05$,与 MMF 组比较

图 3 西达本胺与吗替麦考酚酯对 K562、SKM-1 细胞周期的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



紫红色:示 CDM-MMF-sAML 三者共同靶点;紫色:示 sAML-MMF 二者单独作用共同靶点;粉色:示 sAML-CDM 二者单独作用共同靶点;蓝色:示 CDM-MMF 二者单独作用共同靶点

图 4 西达本胺及吗替麦考酚酯药物靶点与继发性急性髓系白血病疾病相关 CDM-MMF-sAML 候选靶点网络图

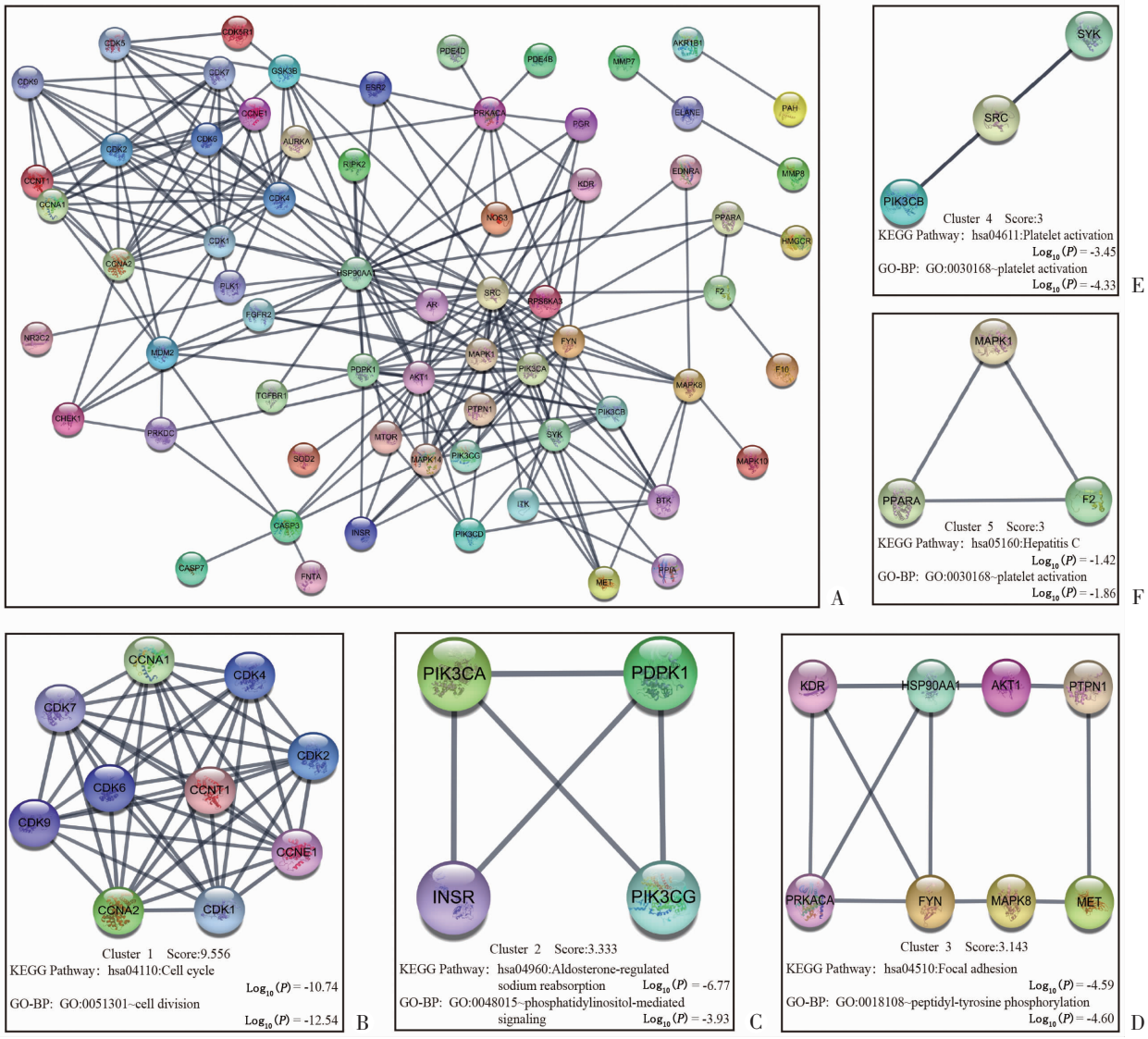
2.5 CDM 联合 MMF 作用于继发性急性髓系白血病相关 PPI 网络构建

将上述 98 个靶点上传至 STRING 数据分析平台构建 PPI 网络图,除去孤立靶点后,利用 Cytoscape 软件成功构建共同作用靶点 PPI 网络图(图 5A),包括 66 个节点、222 条边。利用 MCODE 算法进一步筛选出 5 个聚类子网络图,按照其评分高低,分别如图 5 B~F 排列,评分越高其相对作用越关键。该子网络 PPI 网络主要聚类于细胞分化、磷脂酰肌醇介导的信号、肽基酪氨酸磷酸化、血小板激活等生物功能,而其中最重要的聚类集合主要影响细胞周期相关通路。为了进一步探究 PPI 网络中核心枢纽靶点,利用 Cytoscape 中 CytoHubba 插件对整个网络进行拓扑学分析,根据 12 个拓扑学指标筛选出了 9 个核心靶点,分别为 CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、CDK9、SYK、BTK、KDR、PIK3CB(表 1)。

表 1 CytoHubba 拓扑分析筛选的核心靶点

基因	MCC	DMNC	MNC	节点度	EPC	BottleNeck	EcCentricity	亲和度	辐射度	中间性	应力	Clustering Coefficient
KDR	30	0.402 46	7	7	13.899	1	0.308 08	30.5	3.619 95	22.650 61	186	0.523 81
BTK	84	0.466 52	8	8	14.012	1	0.231 06	29.083 33	3.435 1	15.682 88	86	0.571 43
CDK9	40 326	0.715 99	9	9	15.94	2	0.231 06	29.5	3.435 1	35.818 55	226	0.833 33
CDK6	5 776	0.542 98	11	11	17.283	6	0.231 06	31.75	3.589 14	83.826 91	526	0.581 82
CDK4	46 104	0.587 56	13	13	17.671	1	0.231 06	33.833 33	3.727 78	145.883 68	854	0.589 74
CDK2	46 105	0.712 66	11	12	17.027	1	0.231 06	31.5	3.542 93	108.974 64	452	0.636 36
CDK1	46 142	0.493 58	16	16	18.843	5	0.308 08	35.833 33	3.835 61	206.594 02	1 082	0.458 33
PIK3CB	108	0.477 33	9	9	15.646	1	0.231 06	30.583 33	3.542 93	21.395 35	164	0.555 56
SYK	96	0.453 46	9	9	15.594	1	0.231 06	29.583 33	3.465 91	15.968 11	104	0.527 78

MCC:最大集团中心度;DMNC:最大邻域分量密度;MNC:最大邻域分量;EPC:边缘渗透分量



A:CDM-MMF-sAML 药物-疾病相关 PPI 网络图(包括 66 个节点、222 条边);B:聚类子网络 1(包括 10 个结节,43 条边,得分 9.556);C:聚类子网络 2(包括 4 个结节,5 条边,得分 3.333);D:聚类子网络 3(包括 8 个结节,11 条边,得分 3.143);E:聚类子网络 4(包括 3 个结节,3 条边,得分 3);F:聚类子网络 5(包括 3 个结节,3 条边,得分 3);MCODE 算法聚类筛选出 PPI 网络中功能聚合最显著的 5 个子网络,并根据其 $\log_{10}(P)$ 值列出其各自主要涉及的 BP 及 KEGG 通路

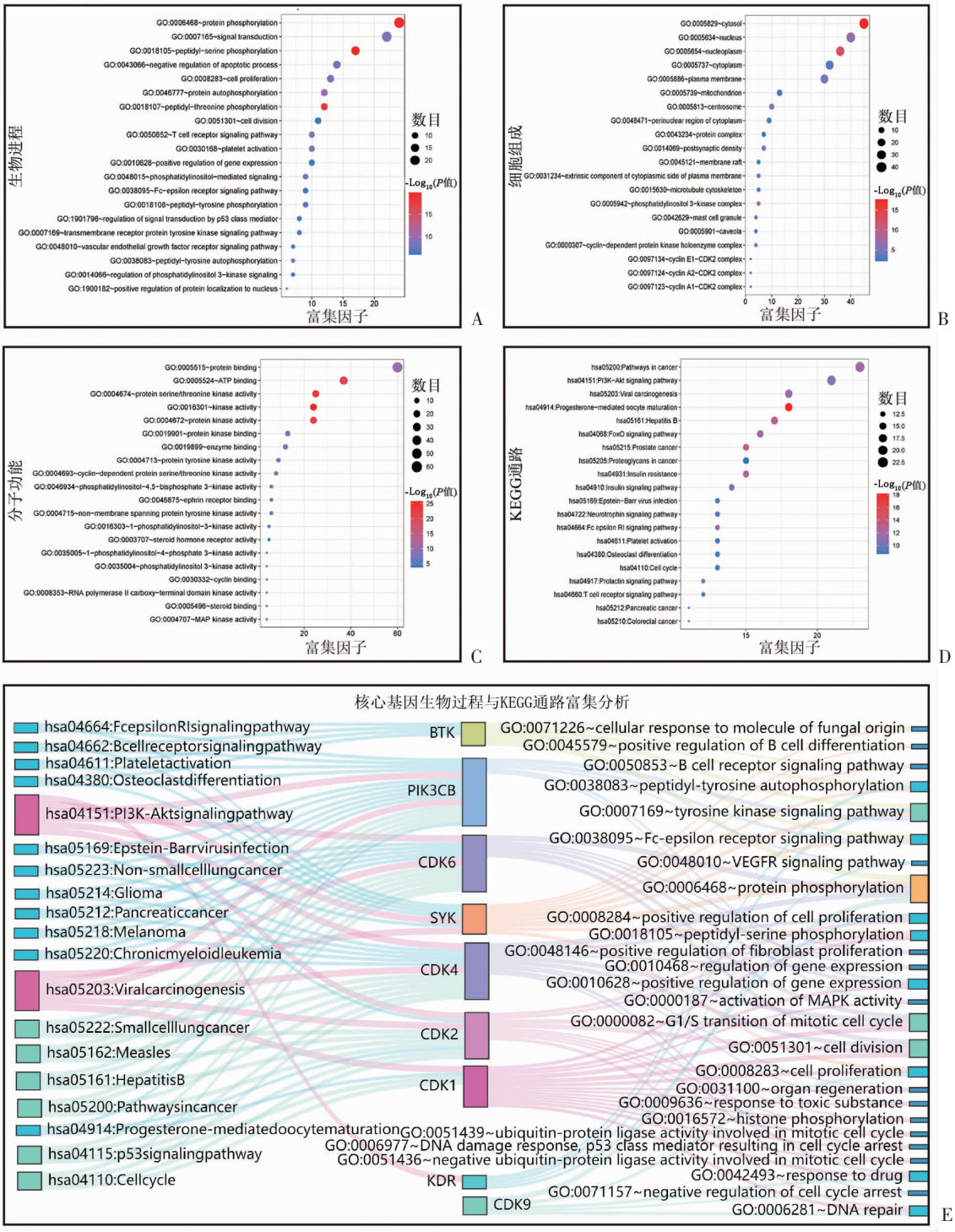
图 5 西达本胺联合吗替麦考酚酯作用于继发性急性髓系白血病相关 PPI 构建

2.6 潜在治疗靶点的 GO 及 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 数据库对上述 66 个作用靶点进行富集分析,分别得到 GOBP 富集条目 257 条、GOCC 富集条目 45 条、GOMF 富集条目 57 条、KEGG 富集条目 94 条,对上述富集结果前 20 条进行可视化(图 6A~D)。发现共同靶点主要涉及蛋白质磷酸化、肽基丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等磷酸化、信号转导、T 细胞受体信号通路、磷脂酰肌醇介导信号通路、细胞增殖、凋亡调控、血管内皮生长因子受体信号通路、p53 类介质对信号转导的调控、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号转导的调节、细胞分裂等多种生物进程,主要在胞质、PI3K 复合物、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物(CDKs)、中心体、质膜、线粒体、与 CDK2 相关的细胞周期复合物等细胞成分中,发挥了激酶活性、ATP 结合、蛋白质结合、细胞周期蛋白激酶活化、蛋白激酶结合、蛋白酪氨酸激酶活化、PI3K 活化、MAPK 活化、细胞周期蛋白结合等分子功能。而通过对其 KEGG 通路富集分析结果判读,发现与 sAML 相关潜在通路可能涉及 FOXO 信号通路、肿瘤相关通路、病毒致癌作用、PI3K-AKT 信号通路、细胞周期、血小板激活、癌症

相关蛋白多糖通路等。

如图 6E 所示,通过进一步评估 PPI 网络中 9 个核心靶点在 GO 及 KEGG 中的富集情况,发现蛋白质磷酸化(CDK4、CDK6、CDK9、SYK、BTK)、有丝分裂细胞周期的 G_1/S 过渡(CDK1、CDK2、CDK4、CDK6)及细胞分化(CDK1、CDK2、CDK4、CDK6)为核心靶点主要富集生物进程,而与 sAML 相关性最高的富集通路为 PI3K-AKT 信号通路(CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、SYK、PIK3CB)。



A:生物学进程富集分析图;B:细胞成分富集分析图;C:分子功能富集分析图;D:KEGG 通路富集分析图(图中圆圈大小代表富集的基因数目,颜色由蓝至红,越红代表 P 值越小,显著性越高);E:核心靶点基因所富集的相关重要生物进程及信号通路桑基图(图中方块大小代表其富集数目的大小,反映其重要程度)

图 6　潜在治疗靶点的前 20 位 GO 及 KEGG 通路富集分析

3 讨论

白血病是一类起源于造血干细胞的最常见的恶性血液系统疾病,其中以 AML 占比最高,其次是 CML,目前中位确诊年龄在 68 岁左右[3]。随着老龄化的进展,近年来髓系白血病的发病率呈现上升趋势[5],尤其对于老年或健康状况不佳的 AML 患者而言,他们往往很难耐受常规化疗等治疗手段[6]。同时,相较于原发性 AML 患者,sAML 或 CML 急变期的患者可能面临更低的整体治疗缓解率、更短的生存期,以及极差的整体预后[4,7]。因此,目前仍亟待寻找高效、低毒且耐受性好的治疗方案。

3.1 CDM 及 MMF 抑制 sAML 细胞增殖

MMF 是一种非竞争性的肌苷-5′-单磷酸脱氢酶(inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH)抑制剂,目前被广泛用于预防移植术后的移植物抗宿主病(graft versus-host disease, GVHD)[8-9]。有研究发现,IMPDHⅡ型的表达量在白血病细胞中是正常细胞的 15~42 倍[10],由于 IMPDH 是一种通过将 IMP 转化为 XMP 来催化从头合成嘌呤的关键限速酶,其在白血病中具有潜在的抗肿瘤活性[11-12]。有针对 CML 急变期的Ⅰ/Ⅱ期临床试验发现,患者对于非竞争性 IMPDH 抑制剂噻唑羧胺核苷(Tiazofurin)的客观应答率(ORR)为 48%,为此 Tiazofurin 也在 2000 年被美国 FDA 批准为该病的孤儿药[13]。这一结果也为探究 MMF 用于 AML 的治疗潜力提供了理论依据。有研究[14]报道,在人 B 细胞淋巴瘤、T 细胞白血病、T 淋巴母细胞瘤、胰腺癌、结肠腺癌和非小细胞肺腺癌的裸鼠移植瘤模型和同基因小鼠 B 细胞淋巴瘤转移模型的相关实验中,MMF 均表现出显著的抗肿瘤生长作用。另有研究[15-16]报道,MMF 不仅可诱导骨髓瘤细胞、人结肠癌细胞 G_1~S 期细胞周期阻滞,还能激活 Caspase 依赖通路促进细胞凋亡。与前述报道一致,本研究表明,单药 MMF 确实可以抑制 K562、SKM-1 细胞株增殖,且呈时间依赖性及浓度依赖性;同样,MMF 可能进一步诱导 K562 细胞 S 期阻滞。结合其后的网络药理学分析结果,不难发现 CDM 与 MMF 联合作用的 9 个核心靶点中,CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、CDK9 均与细胞周期直接相关。这一结果再次佐证了 MMF 很可能主要通过靶向细胞周期相关通路的核心靶点,达到抗肿瘤增殖的作用。除了本研究所涉及的肿瘤增殖、凋亡及周期等功能外,有研究发现 MMF 可能通过降低结肠癌及前列腺癌细胞的黏附力,进一步帮助降低实体肿瘤侵袭能力[17]。同时值得留意的是,还有研究发现 MMF 可以通过降低细胞内 GTP 水平,诱导 HL-60 和 U937 细胞以及一些具有中度成熟倾向的新鲜白血病细胞发生分化[18]。综上所述,可以推测 MMF 很可能成为 sAML 的潜在抗肿瘤新药,本研究结果为未来进一步探寻其用于临床研究的可能性提供了一定的理论依据。

由于恶性肿瘤疾病的复杂性和异质性,单一抗肿瘤药物的治疗效果往往较为有限,故本研究就 MMF 联合一种新型表观遗传修饰靶向药物共同用于 sAML 治疗的可行性进行了探究。CDM 作为一种新型口服 HDAC 抑制剂,其主要作用机制为抑制 HDAC 去除组蛋白和非组蛋白赖氨酸残基上的乙酰化的能力,从而导致固缩的染色质展开,进而诱导先前沉默的抑癌基因转录激活[19]。此外,HDAC 抑制剂还能介导癌细胞的死亡、分化、周期停滞等功能,且对健康细胞的毒性较小[20]。前期本课题组研究发现,CDM 单药可能通过降低 p-PI3K 和 p-AKT 水平,抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活、诱导 K562 细胞 G_0/G_1 细胞周期阻滞和凋亡,从而抑制细胞增殖[21]。多项研究表明,CDM 不仅可以通过 Hedgehog 信号通路抑制伊马替尼耐药 K562 细胞株增殖并诱导凋亡[22],还可以通过上调 H2AX 蛋白磷酸化及下调 ATM 和 BRCA1 蛋白磷酸化水平,逆转 CML 阿霉素耐药细胞株对柔红霉素的耐药性[23]。除此之外,还有多项白血病治疗的基础及临床研究发现,CDM 在与诸如地西他滨、维奈托克等多种药物联合治疗时,表现出较好的安全性及有效性[24-27]。结合本研究结果表明,CDM 联合 MMF 方案在抑制 sAML 细胞生长方面优于单药治疗,主要表现在显著提高了细胞凋亡率,其中以早期凋亡为主。就细胞周期而言,联合方案与 CDM 单药方案均以 G_0/G_1 细胞周期阻滞为主要表现,二者无统计学差异,这意味着在联合方案对细胞周期的阻滞表现中,CDM 可能发挥了主要作用。上述结果提示小剂量 CDM 联合 MMF 可能是一种用于 sAML 的潜在有效的治疗方案。

3.2 药物-疾病作用机制

本研究整合多个药物-疾病数据库信息,利用网络药理学系统探究并阐述了 CDM 联合 MMF 用于 sAML 治疗的潜在作用机制[28]。如上述结果所示,联合药物-疾病相关靶点 PPI 中有 66 个节点、222 条边。其 GO 及 KEGG 富集分析表明,CDM 联合 MMF 治疗 sAML 的机制主要通过细胞质、细胞核质、PI3K 复合物、质膜、中心体、CDKs、线粒体等细胞成分,参与蛋白质磷酸化、细胞增殖、信号转导、凋亡调控、转录因子活性调节等生物进程,发挥 ATP 结合、蛋白质结合、蛋白

激酶活化、PI3K 活化、CDK 活化、MAPK 活化等分子功能。进一步探究发现,PPI 网络 KEGG 信号通路富集诸如 FOXO 信号通路、肿瘤相关信号途径、PI3K-AKT 信号通路、癌症相关蛋白多糖通路等多条信号通路。

同时,结合拓扑学分析筛选出 9 个药物-疾病潜在核心作用靶点(CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、CDK9、SYK、BTK、KDR、PIK3CB)。值得关注的是,上述核心靶点富集最高的信号通路为 PI3K-AKT 信号通路(CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、SYK、PIK3CB),该结果与本课题组前期研究结果及文献证据相符。此外,核心靶点 CDK2,是细胞从 G_1 期向 S 期转变所必需的重要蛋白,而 CDK4 控制 G_1 期,二者都是细胞周期的正调控因子[29]。有研究发现,可以通过下调 CDK2、CDK6 等表达抑制 CDK4、CDK6 的表达,并上调促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达,从而促进白血病细胞凋亡,抑制细胞增殖[30]。同样,CDK4 抑制剂也会诱导白血病细胞 G_0/G_1 周期阻滞并促进细胞凋亡,从而抑制细胞增殖[31]。结合前述本课题组前期 CDM 研究发现,CDM 主要通过抑制 CDK2、CDK4 及上调 p21 蛋白表达,诱导 G_0/G_1 细胞周期阻滞[21]。这也再次佐证了此次网络药理学分析的结果,CDK2 及 CDK4 富集多条相关生物功能及通路,提示二者可能是 CDM 联合 MMF 用于 sAML 治疗的关键核心靶点。本研究结果为后续实验验证 CDM 联合 MMF 作用机制提供了理论依据,该作用机制也将是我们下一步深入研究的重点方向。

综上所述,本研究通过实验发现 CDM 联合 MMF 协同诱导 sAML 细胞凋亡,并显著抑制其增殖。结合网络药理学研究初探了 CDM 联合 MMF 可能通过多靶点、多信号通路在 sAML 中发挥抗肿瘤作用,为后续进一步临床研究提供了一定理论基础。

志谢 感谢法国巴黎大学 Fernando Rodrigues-lima 教授为本课题研究提供的帮助

参考文献:

[1] JABBOUR E, KANTARJIAN H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring[J]. Am J Hematol, 2020, 95(6): 691-709. DOI: 10.1002/ajh.25792.

[2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.

[3] NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER cancer statistics review (CSR) 1975-2016 [EB/OL]. [2020-04-09]. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.

[4] 董悦昕. 继发性急性髓系白血病和粒细胞缺乏性发热的临床分析[D]. 上海:上海交通大学,2020.
DONG Y X. Clinical study of secondary acute myeloid leukemia and febrile neutropenia[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2020.

[5] NCCN. NCCN clinical practice guidelines in oncology acute myeloid leukemia Version 3.2020[EB/OL]. [2020-12-21]. http://www.nccn.org.

[6] WALTER R B, ESTEY E H. Management of older or unfit patients with acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2015, 29(4): 770-775. DOI:10.1038/leu.2014.216.

[7] JAIN P, KANTARJIAN H M, GHORAB A, *et al*. Prognostic factors and survival outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase in the tyrosine kinase inhibitor era: cohort study of 477 patients[J]. Cancer, 2017, 123(22): 4391-4402. DOI:10.1002/cncr.30864.

[8] PAVIGLIANITI A, LABOPIN M, BLAISE D, *et al*. Comparison of mycophenolate mofetil and calcineurin inhibitor versus calcineurin inhibitor-based graft-versus-host-disease prophylaxis for matched unrelated donor transplant in acute myeloid leukemia. A study from the ALWP of the EBMT[J]. Bone Marrow Transplant, 2021, 56(5): 1077-1085. DOI: 10.1038/s41409-020-01155-z.

[9] VILLARROEL M C, HIDALGO M, JIMENO A. Mycophenolate mofetil: an update[J]. Drugs Today (Barc), 2009, 45(7): 521-532. DOI: 10.1358/dot.2009.45.7.1384878.

[10] JAYARAM H N, COONEY D A, GRUSCH M, *et al*. Consequences of IMP dehydrogenase inhibition, and its relationship to cancer and apoptosis[J]. Curr Med Chem, 1999, 6(7): 561-574.

[11] KOFUJI S, HIRAYAMA A, EBERHARDT A O, *et al*. IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(8): 1003-1014. DOI: 10.1038/s41556-019-0363-9.

[12] KOEHL G E, WAGNER F, STOELTZING O, *et al*. Mycophenolate mofetil inhibits tumor growth and angiogenesis *in vitro* but has variable antitumor effects *in vivo*, possibly related to bioavailability[J]. Transplantation, 2007, 83(5): 607-614. DOI: 10.1097/01.tp.0000253756.69243.65.

[13] NAFFOUJE R, GROVER P, YU H Y, *et al*. Anti-tumor potential of IMP dehydrogenase inhibitors: a century-long story[J]. Cancers, 2019, 11(9): 1346. DOI:10.3390/cancers11091346.

[14] TRESSLER R J, GARVIN L J, SLATE D L. Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors *in vivo*[J]. Int J Cancer, 1994, 57(4): 568-573.

DOI:10.1002/ijc.2910570421.

[15] 栗若兰,郑智慧,路新华,等. 霉酚酸对人结肠癌 SW620 细胞凋亡的诱导作用及其机制[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2013, 37(5): 519-523. DOI:10.13763/j.cnki.jhebnu.nse.2013.05.010.
LI R L, ZHENG Z H, LU X H, *et al*. Induction effect of mycophenolic acid on apoptosis of human colon cancer cell line SW620 and its mechanism[J]. J Hebei Norm Univ Nat Sci Ed, 2013, 37(5): 519-523. DOI:10.13763/j.cnki.jhebnu.nse.2013.05.010.

[16] TAKEBE N, CHENG X F, FANDY T E, *et al*. IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(2): 457-466. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-05-0340.

[17] ENGL T, MAKAREVIĆ J, RELJA B, *et al*. Mycophenolate mofetil modulates adhesion receptors of the beta1 integrin family on tumor cells: impact on tumor recurrence and malignancy[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 4. DOI:10.1186/1471-2407-5-4.

[18] INAI K, TSUTANI H, YAMAUCHI T, *et al*. Differentiation induction in non-lymphocytic leukemia cells upon treatment with mycophenolate mofetil[J]. Leuk Res, 2000, 24(9): 761-768. DOI:10.1016/s0145-2126(00)00045-x.

[19] XU W S, PARMIGIANI R B, MARKS P A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action[J]. Oncogene, 2007, 26(37): 5541-5552. DOI:10.1038/sj.onc.1210620.

[20] SANAEI M, KAVOOSI F. Histone deacetylases and histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action in various cancers[J]. Adv Biomed Res, 2019, 8: 63. DOI:10.4103/abr.abr_142_19.

[21] LIANG S M, ZHOU X J, CAI D, *et al*. Chidamide inhibits cell proliferation *via* the PI3K/AKT pathway in K562 cells based on network pharmacology and experimental validation[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(26): 2990-2998. DOI:10.2174/1381612827666210701152250.

[22] 张黎琴. 西达本胺对 K562/G01 细胞增殖抑制、凋亡及 Hedgehog 信号通路相关机制的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
ZHANG L Q. Study of the effects of chidamide on proliferation, apoptosis and related mechanism of hedgehog signaling in K562/G01 cells[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.

[23] 王世广, 司旭艳, 李晓婷, 等. 西达本胺增加慢性髓系白血病耐药株 K562/ADM 细胞对柔红霉素的敏感性[J]. 解剖学报, 2019, 50(6): 754-760. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2019.06.009.
WANG S G, SI X Y, LI X T, *et al*. Enhancing effect of chidamide on the sensibility of human chronic myeloid leukemia K562/ADM cells to daunorubicin[J]. Acta Anat Sin, 2019, 50(6): 754-760. DOI:10.16098/j.issn.0529-1356.2019.06.009.

[24] XU F F, GUO H G, SHI M Y, *et al*. A combination of low-dose decitabine and chidamide resulted in synergistic effects on the proliferation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(12): 7644-7655.

[25] CHEN K, YANG Q Y, ZHA J, *et al*. Preclinical evaluation of a regimen combining chidamide and ABT-199 in acute myeloid leukemia[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 778. DOI:10.1038/s41419-020-02972-2.

[26] LI X, YAN X, GUO W J, *et al*. Chidamide in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia and the synergistic effect in combination with cytarabine[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 699-704. DOI:10.1016/j.biopha.2017.04.037.

[27] HUANG H, YANG W B, DONG A S, *et al*. Chidamide enhances the cytotoxicity of cytarabine and sorafenib in acute myeloid leukemia cells by modulating H3K9me3 and autophagy levels[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1276. DOI:10.3389/fonc.2019.01276.

[28] 刘洋. 雷公藤治疗口腔鳞状细胞癌的网络药理学分析和分子对接研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
LIU Y. Network pharmacology analysis and molecular docking study of Tripterygium wilfordii Hook. F. in the treatment of oral squamous cell carcinoma[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021.

[29] LIM S, KALDIS P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation[J]. Dev Camb Engl, 2013, 140(15): 3079-3093. DOI:10.1242/dev.091744.

[30] 周俊, 单慧蓉, 王小龙, 等. CDK4/6 对急性白血病细胞增殖及凋亡的影响[J]. 江苏医药, 2017, 43(17): 1209-1212. DOI:10.19460/j.cnki.0253-3685.2017.17.001.
ZHOU J, SHAN H R, WANG X L, *et al*. Influence of CDK4/6 on proliferation and apoptosis of acute leukemia cells[J]. Jiangsu Med J, 2017, 43(17): 1209-1212. DOI:10.19460/j.cnki.0253-3685.2017.17.001.

[31] 舒可. CDK4 抑制剂及 FLT3 抑制剂的设计、合成与生物活性评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
SHU K. Design, synthesis and bioactivity evaluation of CDK4 inhibitors and FLT3 inhibitors[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.

(**收稿**:2022-01-23;**修回**:2022-03-05)

(编辑 栾 嘉)