基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.004091

哇巴因靶向 Wnt/β-catenin 信号通路逆转慢性髓系白血病的伊马替尼耐药

杨 薇[1]，赵天祺[1]，舒 琦[2]，翁鑫华[2]，刘滢溪[2]，金明睿[1]，冯 敏[1]，胡 晶[3]
（1.重庆医科大学基础医学院，重庆 400016；2.重庆医科大学第一临床学院，重庆 400016；
3.重庆医科大学检验医学院/教育部临床检验诊断学重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨哇巴因靶向 Wnt/β-catenin 信号通路逆转慢性髓系白血病（chronic myeloid leukemia，CML）伊马替尼（imatinib，IM）耐药的作用及机制。**方法：**体外以 IM 耐药细胞株 K562R 为研究对象，通过细胞活力检测和集落形成实验观察哇巴因单用或与 IM 联用的抗白血病效应；通过蛋白免疫印迹法（Western blot）检测 K562R 细胞中 β-catenin、Cyclin D1 的蛋白表达水平；体内建立 IM 耐药 CML 小鼠模型，通过外周血白细胞计数、血涂片染色、组织病理学技术及生存分析等评价联合治疗方案的体内抗白血病疗效。**结果：**体外实验显示，哇巴因与 IM 具有协同治疗作用，可明显抑制 K562R 细胞的活力及克隆形成能力（$P<0.001$），并同时下调 β-catenin（$P<0.01$）和 Cyclin D1（$P<0.001$）的表达水平。体内实验显示，CML 小鼠对 IM 治疗不敏感，与对照组相比，哇巴因联合 IM 治疗可有效控制 CML 小鼠的白血病负荷，缓解小鼠体质量减轻（$P<0.001$），降低外周血中白细胞总数（$P<0.05$），减少外周血及骨髓中的白血病细胞浸润，减轻肝（$P<0.01$）、脾（$P<0.001$）的质量，并明显延长 CML 小鼠的生存期。**结论：**哇巴因能够增强 CML 对 IM 的敏感性，这可能与抑制 Wnt/β-catenin 信号通路有关。

【关键词】慢性髓系白血病；伊马替尼耐药；哇巴因；Wnt/β-catenin 通路；联合治疗
【中图分类号】R733.72 **【文献标志码】**A

Ouabain reverses imatinib resistance in chronic myeloid leukemia by targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway

Yang Wei[1], Zhao Tianqi[1], Shu Qi[2], Weng Xinhua[2], Liu Yingxi[2], Jin Mingrui[1], Feng Min[1], Hu Jing[3]
(1.Basic Medical College, Chongqing Medical University; 2.The First Clinical College, Chongqing Medical University; 3.Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education/College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and mechanism of ouabain in reversing imatinib (IM) resistance in chronic myeloid leukemia (CML) by targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway. ***Methods*:** In vitro experiments were performed using the IM-resistant K562R cell line. CCK-8 assay and colony formation assay were used to detect the anti-leukemic effects of ouabain alone or in combination with IM. Western blot was applied to measure the protein expression levels of β-catenin and Cyclin D1 in K562R cells. For *in vivo* study, a IM-resistant CML mouse model was established. The anti-leukemic efficacy of the combination therapy was evaluated by peripheral white blood cell count, blood smear staining, histopathological techniques, and survival analysis. ***Results*:** In vitro experiments showed that ouabain exerted a synergistic therapeutic effect with IM, significantly inhibiting the viability and clonogenic capacity of K562R cells ($P<0.001$), and downregulating the expression levels of β-catenin ($P<0.01$) and Cyclin D1 ($P<0.001$). *In vivo* experiments demonstrated that CML mice were insensitive to IM treatment, whereas the combination of ouabain and IM effectively controlled the leukemic burden in CML mice, alleviated body weight loss ($P<0.001$), reduced the total peripheral white blood cell count ($P<0.05$), and significantly decreased leukemic cell infiltration in both peripheral blood and bone marrow compared with the control group. Additionally, the weights of the liver ($P<0.01$) and spleen ($P<0.001$) were reduced, and the survival of CML mice was significantly prolonged. ***Conclusion*:** Ouabain enhanced the sensitivity of CML to IM therapy, which may be associated with the inhibition of the Wnt/β-catenin signaling pathway.

【Key words】chronic myeloid leukemia; imatinib resistance; ouabain; Wnt/β-catenin signaling pathway; combination therapy

作者介绍：杨 薇，Email：2023110008@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：白血病耐药机制及药物治疗。
通信作者：胡 晶，Email：jinghu@cqmu.edu.cn。
基金项目：重庆市科技局自然科学基金面上资助项目（编号：CSTB2022NSCQ-MSX0764）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260417.1048.002（2026-04-17）

慢性髓系白血病（chronic myeloid leukemia，CML）是一种以费城染色体为特征的造血干细胞恶性肿瘤，*BCR-ABL*融合基因是CML的遗传学特征，其编码的BCR-ABL融合蛋白，具有高酪氨酸激酶活性，可激活下游多条信号通路促进白血病的发生发展[1-2]。尽管伊马替尼（imatinib，IM）等BCR-ABL酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors，TKIs）明显改善了CML患者的治疗结局，但获得性耐药仍是目前临床面临的主要难题[3-6]。研究发现Wnt/β-catenin信号通路在CML急变及耐药中发挥着重要作用[6-7]。β-catenin作为该通路的关键效应分子，在CML细胞中降解减少，胞内聚集增加并转位至细胞核激活c-Myc、Cyclin D1等下游致癌靶基因的转录，进而维持细胞的异常存活与增殖[8]。

哇巴因是一种传统用于心力衰竭临床治疗的强心苷类药物，近年来研究发现其在多种恶性肿瘤中具有广谱抗肿瘤活性[9-12]。值得注意的是，越来越多的证据表明，哇巴因等强心苷类药物可通过干扰Wnt/β-catenin信号通路，抑制结直肠癌、肝癌等实体肿瘤的进展[13-14]。本课题组利用IM耐药CML细胞模型K562R细胞株的初步研究发现，哇巴因不仅可直接抑制耐药细胞增殖，还能明显增强其对IM的化疗敏感性，且在临床前动物实验中表现出良好的安全性[15]。但哇巴因在体内对IM耐药的CML逆转作用以及该作用是否由直接抑制Wnt/β-catenin通路介导，目前尚不明确，这也是探索IM耐药型CML新型治疗策略的关键科学问题。

基于Wnt/β-catenin通路在CML耐药中的明确作用，以及哇巴因良好的抗肿瘤和化疗增敏特性，本研究采用IM耐药人CML细胞株K562R和IM耐药CML小鼠模型，系统探究哇巴因单药及与IM联用对IM耐药CML的体内、体外抗白血病作用；通过细胞活力检测、集落形成实验和蛋白质印迹法（Western blot），评价耐药细胞的增殖能力、克隆形成能力及Wnt/β-catenin通路关键分子的表达；通过外周血白细胞计数、血涂片染色、组织病理学技术及生存分析等评价联合治疗方案的体内抗白血病疗效。本研究的主要目的为阐明哇巴因对IM耐药CML的化疗增敏作用机制，为开发以哇巴因为基础的联合治疗方案、克服CML患者的IM耐药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体

哇巴因（纯度>95%）购自美国Sigma-Aldrich公司，伊马替尼购自美国TargetMol公司。两种药物均用二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）溶解，配制成20 mmol/L储备液，于-20 ℃保存。β-catenin抗体、Cyclin D1抗体及甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体均购自中国Affinity Biosciences公司。本研究其他化学试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养

K562R细胞为重庆医科大学检验医学院科研平台构建的IM耐药细胞株，采用含10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，美国Gibco公司）、100 μg/mL链霉素（美国HyClone公司）和100 U/mL青霉素（美国HyClone公司）的RPMI-1640培养基（美国Gibco公司）培养。为维持细胞耐药性，培养体系中加入1 μmol/L IM。所有细胞均置于37 ℃、5% CO_2恒温恒湿培养箱培养，实验仅选用对数生长期且活力>90%的细胞。

1.3 方法

1.3.1 细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）法检测细胞活力 取K562R细胞以5×10³个/孔的密度接种于96孔板，每孔加100 μL完全培养基；分别用不同浓度的哇巴因、IM或二者联合处理细胞24 h，对照组加入等体积无药培养基。药物处理结束后，每孔加入10 μL CCK-8试剂，37 ℃孵育1.5 h，采用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度值。细胞活力计算公式：细胞活力（%）=[（实验组吸光度值-空白组吸光度值）/（对照组吸光度值-空白组吸光度值）]×100%。

1.3.2 甲基纤维素集落形成实验 药物处理后收集K562R细胞，用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗涤3次；将细胞调整为2×10³个/mL的悬液，接种于含10% FBS的半固体甲基纤维素培养基中，于37 ℃、5% CO_2条件下培养10 d，倒置显微镜下观察并计数>50个细胞的集落数。

1.3.3 Western blot检测蛋白表达 收集细胞，加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀分析裂解液（radioimmunoprecipitation assay lysis buffer，RIPA），4 ℃裂解20 min；离心后收集上清液，采用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。经Tris-甘氨酸SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，转印至硝酸纤维素膜（nitrocellulose membrane，NC膜）；用含5%脱脂牛奶的吐温-20的Tris缓冲盐溶液（Tris-buffered saline with Tween-20，TBST）室温封闭1 h后，将膜与一抗4 ℃孵育过夜，TBST洗膜3次后，与IRDye标记的二抗室温孵育1 h。一抗稀释比为1∶500~1∶1 000，二抗稀释比为1∶5 000。采用美国LI-COR公司Odyssey红外荧光扫描仪并检测蛋白条带。

1.3.4 IM耐药CML小鼠模型 为建立CML异种移植模型，对10~12周龄非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷（non-obese diabetic/severe combined immunodeficient，NOD/SCID）小鼠采用X射线辐照仪给予2.0 Gy亚致死剂量辐照；24 h后，经尾静脉向小鼠体内移植2×10⁶个K562R细胞。建模第2周起，将建模成功的小鼠随机分为3组，每组8只，进行相应处理：①空白对照组（Con组），腹腔注射等体积生理盐水；②IM组，腹腔注射50 mg/kg IM；③哇巴因联合IM组（IM+Ouabain组），腹腔注射50 mg/kg的IM+1 mg/kg的哇巴因。IM工作液浓度4.5 mg/mL，哇巴因工作液浓度0.09 mg/mL，给药体积均为0.2 mL/只，药物及生理盐水均隔日腹腔注射1次，连续治疗6周。本研究经重庆医科大学实验动物伦理委员会批准

（批准号：IACUC-CQMU-2023-0031）。

1.3.5 小鼠一般状况、体质量及生存期监测 实验期间每日观察并评估小鼠的一般健康状况（包括饮食、皮毛、活动等）；每周采用精密电子天平称量小鼠体质量2次；每日监测并记录小鼠生存期，对达到预设人道终点的濒死小鼠实施安乐死，并纳入生存分析的事件统计。

1.3.6 小鼠外周血白细胞计数及血涂片制备 每周经尾静脉采集小鼠外周血样本，采用全自动血液分析仪（迈瑞BC-3000）检测白细胞总数；取新鲜血样立即制备血涂片，自然干燥后按标准流程行瑞氏染色，晾干后在显微镜下进行细胞分类分析。

1.3.7 小鼠组织石蜡切片的制备及苏木精-伊红染色（haematoxylin and eosin stain，HE） 颈椎脱臼法处死小鼠，分离肝、脾、骨髓，剪取适当大小组织块，4%多聚甲醛固定液室温固定24 h，流水冲洗1~2 h，置于70%乙醇中；依次脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。制成4~7 μm厚石蜡切片，经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后，采用常规苏木精-伊红染色法染色。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.5.0软件进行统计学分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2组间比较采用非配对双尾Student's t检验，多组间比较采用单因素方差分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 哇巴因对K562R细胞活力的影响

为检测K562R细胞对IM的敏感性，将细胞经1~10 μmol/L不同浓度IM处理24 h后，采用CCK-8法检测细胞活力，结果显示K562R细胞对IM存在明显耐药性（图1A）。同时，检测50~10 μmol/L哇巴因单药及与1 μmol/L IM联合处理24 h对K562R细胞的作用，结果显示4个浓度的哇巴因单药均可降低K562R的细胞活力，且与IM联用时，细胞活力明显降低（t=7.120，t=6.210，t=3.650，t=6.420；P<0.001，P<0.001，P=0.009，P<0.001），提示K562R细胞的IM耐药性被明显逆转（图1B）。以上结果表明，哇巴因可增强IM对IM耐药CML细胞的抗白血病疗效。

2.2 哇巴因对K562R细胞集落形成的影响

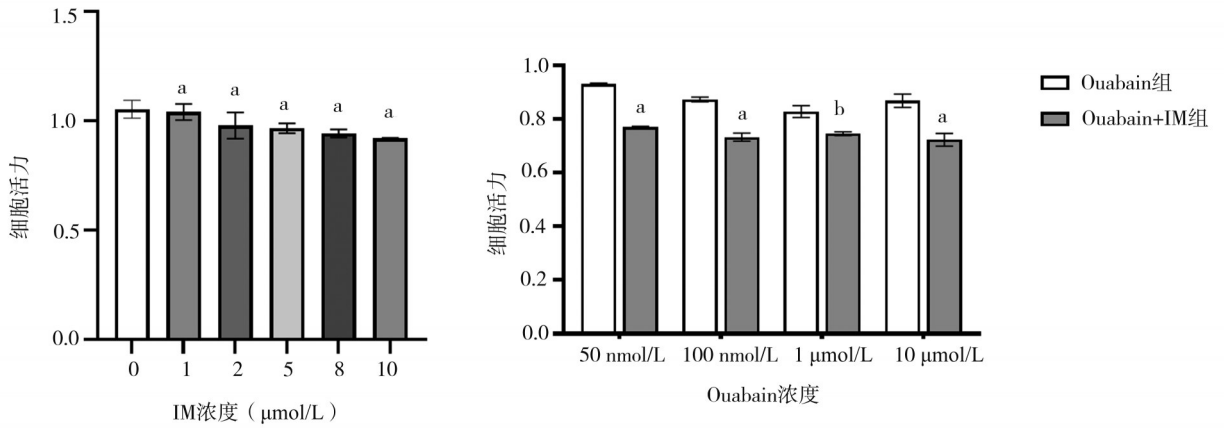
采用集落形成实验评估K562R细胞的克隆形成能力，结果显示（图2A），与Con组比较，50 nmol/L哇巴因单药处理可明显抑制K562R细胞的集落形成能力，表现为集落数量明显减少，且集落体积更小、分布更稀疏。此外，哇巴因与1 μmol/L IM联合处理后，对集落形成的抑制作用明显增强，IM+Ouabain组仅形成极少数集落，且多数为散在细胞组成的微集落；统计学分析显示（图2B），IM+Ouabain组与Con组的集落数量差异有统计学意义（F=21.740，P<0.001）。以上结果表明，哇巴因可有效削弱K562R细胞的克隆形成能力和增殖能力，且与IM联用具有明显的协同抑制作用。

2.3 哇巴因对K562R细胞中Wnt/β-catenin信号通路的影响

已有大量研究证实Wnt/β-catenin通路与CML的IM耐药密切相关。为探究哇巴因逆转K562R细胞IM耐药的潜在机制，将细胞经50 nmol/L哇巴因单药及1 μmol/L IM联合处理24 h后，采用Western blot检测β-catenin的蛋白表达水平。结果显示（图3），哇巴因单药可下调β-catenin的蛋白表达，且与IM联用时，该抑制作用明显增强（F=18.300，P=0.003）；与之相一致，β-catenin的关键下游靶基因Cyclin D1的蛋白表达水平也随β-catenin的下调而明显降低（F=30.540，P<0.001）。

2.4 耐药CML小鼠模型的建立

为评价哇巴因逆转IM耐药的体内疗效，经尾静脉向放射处理后的10~12周龄NOD/SCID小鼠注射K562R细胞，建立CML异种移植小鼠模型。建模6周后，小鼠外周血白细胞计数均明显升高（t=9.430，P<0.001，图4A）；小鼠外周血涂片中出现大量幼稚白血病细胞，表现为核质比增高、染色质疏松、核仁明显（图4B），骨髓涂片中可见较多白血病细胞（图4C）；同时，小鼠相继出现驼背、竖毛、活动能力下降等白血病相关恶病质表现，证实IM耐药CML异种移植小鼠模型构建成功。



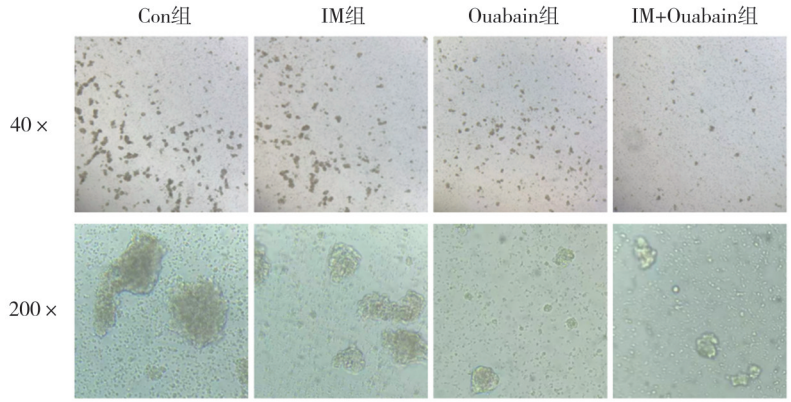
注：a，与对照组相比，P>0.05

A. IM对K562R细胞活力的影响

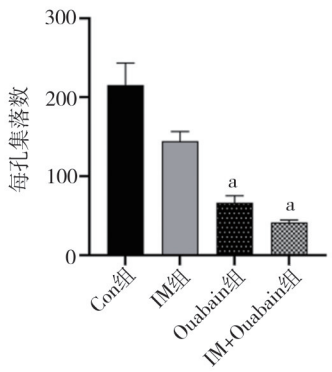
注：a，与Ouabain组相比，P<0.001；b，与Ouabain组相比，P<0.01

B. 哇巴因与IM联合处理对K562R细胞活力的影响

图1 哇巴因对K562R细胞活力的影响



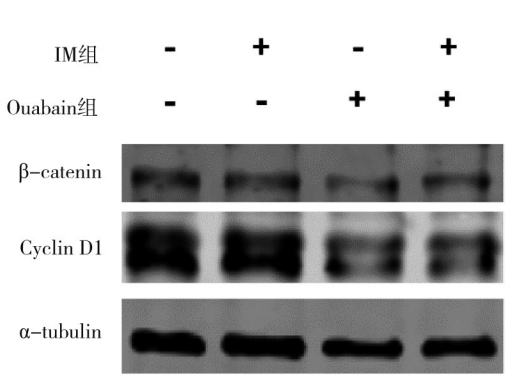
A. 集落形成实验镜下观察



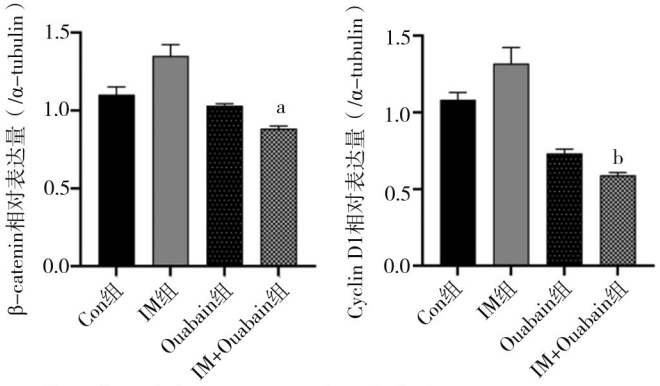
注：a，与Con组相比，$P<0.001$

B. 集落形成实验计数

图2　哇巴因对K562R细胞集落形成的影响



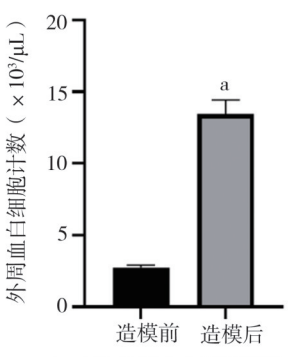
A. β-catenin和Cyclin D1蛋白表达情况



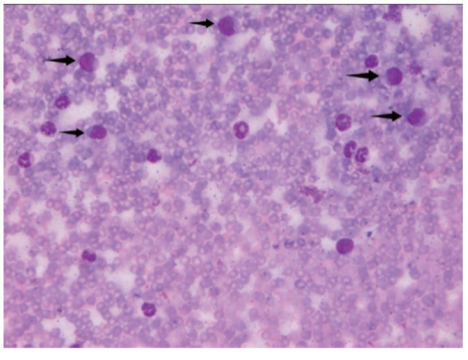
注：a，与Con组相比，$P<0.01$；b，与Con组相比，$P<0.001$

B. β-catenin和Cyclin D1蛋白水平定量分析

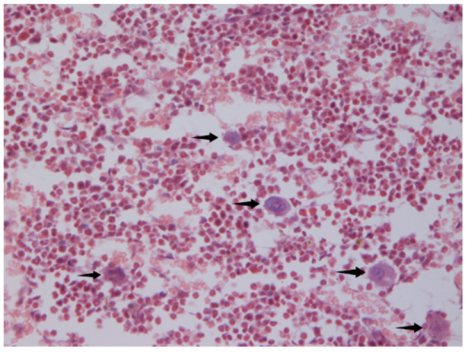
图3　哇巴因对K562R细胞中Wnt/β-catenin信号通路的影响



A. 小鼠外周血白细胞计数



B. CML模型小鼠外周血涂片（×400）



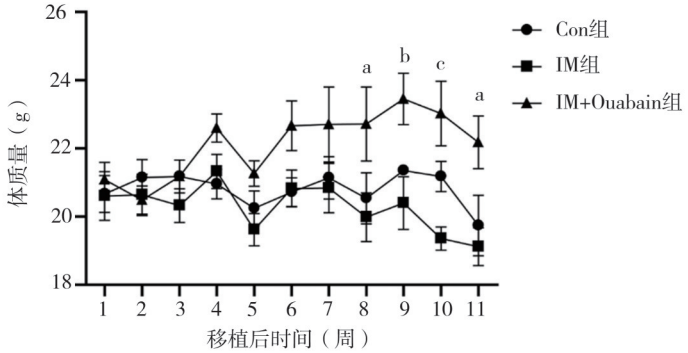
C. CML模型小鼠骨髓涂片（×400）

注：a，与造模前相比，$P<0.05$；箭头，白血病细胞

图4　耐药CML小鼠模型的建立

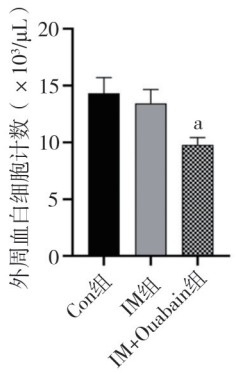
2.5　哇巴因联合IM对耐药CML模型小鼠的治疗效果

经6周治疗后，IM+Ouabain组小鼠的白血病进展得到缓解，体质量下降明显改善（10周 $F=24.100$，$P=0.004$，图5A），外周血白细胞数量也明显降低（$F=5.520$，$P<0.021$，图5B），同时外周血涂片中的幼稚细胞也明显减少（图5C）；Con组和IM组小鼠的外周血白细胞计数仍维持在较高水平，2组间差异无统计学意义（$P>0.05$，图5B），且血涂片仍可见大量幼稚细胞，证实小鼠体内存在IM耐药。IM+Ouabain组小鼠的肝（与Con组比较，$F=13.800$，$P=0.001$；与IM组比较，$F=13.870$，$P=0.001$）、脾（与Con组比较，$F=18.900$，$P<0.001$；与IM组比较，$F=18.900$，$P<0.001$）质量均明显小于Con组小鼠（图5D）；生存曲线分析显示，IM+Ouabain组表现出更好的生存趋势，CML小鼠的生存率得到提高（$P>0.05$，图5E）。



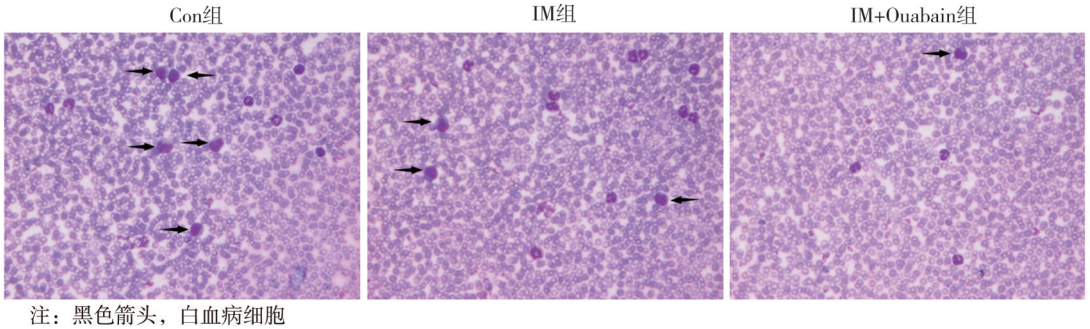
注：a，与Con组和IM组相比，$P<0.05$；b，与IM组相比，$P<0.01$；c，与IM组相比，$P<0.001$

A. 移植后各组小鼠体质量变化



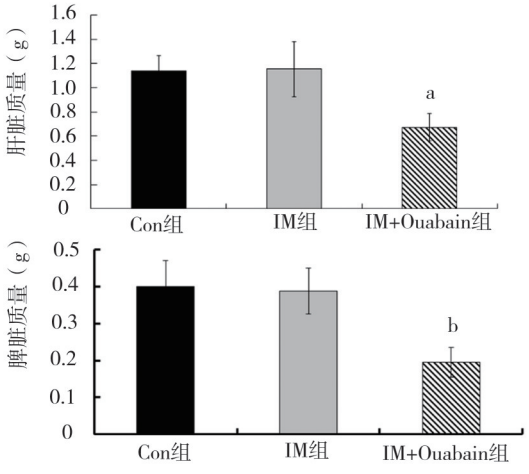
注：a，与Con组和IM组比较，$P<0.01$

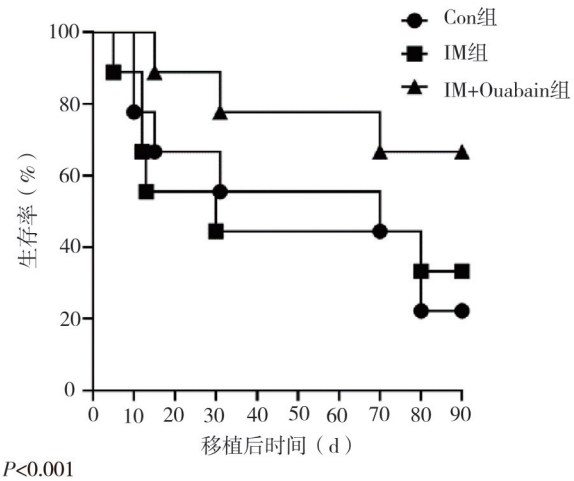
B. 各组小鼠外周血白细胞计数



注：黑色箭头，白血病细胞

C. 各组小鼠外周血涂片





注：a，与Con组及IM组相比，$P<0.01$；b，与Con组及IM组相比，$P<0.001$

D. 各组小鼠肝脏及脾脏质量

E. 各组小鼠Kaplan-Meier生存曲线

图 5　哇巴因联合 IM 对耐药 CML 模型小鼠的治疗效果

3　讨　论

BCR-ABL 融合基因编码的酪氨酸激酶是 CML 发生发展的核心驱动因素，该激酶的异常可激活下游包括 Wnt/β-catenin 通路在内的多条信号通路，促进白血病的发生发展。大量研究证实，Wnt/β-catenin 通路的异常激活是多种血液系统肿瘤和实体肿瘤发生、干细胞自我更新及治疗耐药的关键驱动因素[16-17]。在 CML 中，尤其是白血病干细胞群体中，该通路的激活明显促进 TKIs 治疗后疾病的持续存在和最终复发[8,11]。β-catenin 的激活可通过调控下游靶基因的表达促进白血病干细胞的自我更新和存活，而这些靶基因对细胞周期进程和增殖至关重要；此外，β-catenin 信号可通过维持白血病干细胞的静息状态、增强脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）损伤修复机制介导 TKIs 耐药，使白血病干细胞逃避治疗诱导的凋亡[17-18]。近年来，靶向白血病干细胞 Wnt/β-catenin 通路已成为克服 TKIs 耐药的重要策略[9]。本研究利用 IM 耐药 CML

细胞模型K562R，为上述结论提供了直接的功能学证据：集落形成实验显示，IM单药对K562R细胞集落形成的抑制作用有限，明确验证了该细胞模型的耐药表型。值得注意的是，IM与哇巴因联用后表现出明显的协同抑制作用，几乎完全抑制了细胞集落形成，该结果提示，哇巴因介导的信号通路调控可有效靶向白血病干细胞中介导IM耐药的关键存活机制，为其在CML临床治疗中的老药新用奠定了实验基础。基于Wnt/β-catenin通路在CML耐药中的核心作用，本研究进一步探索了哇巴因对该通路的调控作用，以期明确其逆转IM耐药的具体机制。

哇巴因是临床应用历史悠久的经典强心苷类药物，传统用于心血管疾病的治疗，近年来其潜在的抗肿瘤特性备受关注，凸显了其在药物新定位中的应用价值。既往研究表明，强心苷类药物可通过多种机制诱导肿瘤细胞凋亡，如破坏细胞内离子稳态、抑制核因子κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）信号通路、触发内质网应激等[12,19]。BCR-ABL与Wnt/β-catenin通路之间存在复杂的交互调控：BCR-ABL可通过激活下游通路间接稳定β-catenin，促进白血病干细胞的自我更新和耐药[20]。近期研究显示，强心苷类药物可通过靶向钠-钾三磷酸腺苷酶（sodium-potassium adenosine triphosphatase，Na^+/K^+ ATP）干扰多种激酶信号网络，包括Src激酶、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）及磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）通路[21]。在结直肠癌、肝癌等实体肿瘤的研究中也发现哇巴因可通过干扰Wnt/β-catenin信号通路，抑制肿瘤的进展[13-14]。本研究发现哇巴因克服CML耐药的作用模式可能是通过靶向抑制Wnt/β-catenin通路，实现IM耐药CML细胞的功能再敏化，这也是其在血液系统肿瘤中新应用的关键突破。本研究观察到，哇巴因单药虽可抑制耐药细胞增殖，但其与IM联用产生的强效协同作用提示，其核心作用并非单纯的毒性叠加，而是精准破坏维持细胞耐药状态的存活信号网络。Western blot结果证实，哇巴因处理可明显降低β-catenin的蛋白稳定性，这与既往结直肠癌研究中发现的强心苷类药物可促进β-catenin降解的结论高度一致[13,16]。近年来，强心苷类药物的抗肿瘤机制研究取得重要进展，多项研究证实其可通过多靶点调控肿瘤细胞存活信号通路[10,19]。特别值得关注的是，最新研究表明哇巴因能够有效靶向白血病干细胞的凋亡机制，且该作用不依赖于细胞分化状态，进一步支持其在克服白血病干细胞介导耐药中的潜在应用价值[22]。哇巴因作为临床常用强心苷类药物，其临床应用剂量、不良反应及监测方案已明确，且本研究使用剂量低于文献报道的心脏毒性剂量，为其老药新用提供了安全基础。

在体内动物模型中，IM联合哇巴因成功控制CML小鼠的白血病负荷并明显延长其生存期，为该方案应用于IM耐药CML患者的临床转化提供了有力的临床前证据。哇巴因联合治疗后CML小鼠的外周血及骨髓白血病细胞浸润及肝脾肿大均有缓解，但本研究也发现，联合治疗对晚期CML小鼠的全身状况（如体质量下降）改善效果有限。尽管哇巴因与IM联用可部分清除小鼠体内的白血病细胞，在给药期间和停药后短期内有效降低外周血白细胞计数，并明显延长生存期，但最终未能逆转整体疾病结局。该结果可能源于两方面原因：其一，联合治疗可能未完全根除小鼠体内白血病干细胞，而作为疾病复发的根源，白血病干细胞的持续存在最终导致治疗失败，这也是CML临床治疗面临的关键难题[23]，提示需进一步优化以哇巴因为基础的联合治疗策略，以实现对白血病干细胞的更有效靶向；其二，当前给药策略（包括给药时机、剂量强度和治疗时长）仍需进一步优化，以在维持药物疗效的同时，最大化靶向残留病灶。此外，作为传统用于心力衰竭临床治疗的强心苷类药物，哇巴因在动物实验中的心脏安全性值得关注。近期系统综述指出，强心苷类药物在抗肿瘤治疗中的心脏毒性呈剂量依赖性，低剂量方案可明显降低心血管不良事件风险[24-25]。未来研究中，除观察骨髓及髓外造血器官（肝、脾等）的白血病浸润外，还应系统评估哇巴因对小鼠心脏结构与功能的影响，包括心电图检查、心脏超声检查及心肌组织病理学分析，以明确其在CML治疗中的安全性边界。以上结果提示，未来研究应聚焦于探索白血病干细胞的新型靶向策略，系统优化联合治疗方案的实施条件，旨在将哇巴因的抗耐药作用转化为IM难治性CML患者的实际临床获益。

本研究的局限性为未来提升哇巴因的临床应用价值指明了研究方向。目前最关键的科学问题仍未解决：作为Na^+/K^+ ATP酶抑制剂，哇巴因如何上游调控Wnt/β-catenin通路的活性？是通过改变细胞内Na^+/K^+离子梯度影响关键激酶或磷酸酶的活性，还是直接干扰β-catenin与降解复合物的相互作用，要阐明该机制，未来可通过质谱分析、蛋白质组学等方法，进一步揭示哇巴因调控Wnt/β-catenin通路的上游分子机制，这对于合理设计临床试验、

优化哇巴因的治疗潜力至关重要。此外，本研究主要采用单一浓度的哇巴因进行验证，未来需在动物模型中系统评价不同剂量方案的疗效和安全性，尤其重点探索低剂量哇巴因与第二代TKIs的联合策略。这对于哇巴因的临床重定位应用尤为重要，低剂量方案可最大限度降低其主要临床不良反应——心脏毒性，提高患者的长期耐受性，从而促进其整合入CML的标准治疗方案。

综上，本研究不仅验证了哇巴因逆转CML耐药的有效性，更重要的是阐明了其通过抑制Wnt/β-catenin信号通路发挥作用的分子机制。本研究结果凸显了哇巴因作为老药新用治疗IM耐药CML的重要价值，与新型抗肿瘤药物相比，该策略具有明显的临床优势，包括明确的安全性特征、已确立的药代动力学特性以及更低的研发成本。本研究为这一经典强心苷类药物重定位应用于克服肿瘤耐药提供了坚实的临床前理论依据，为解决CML治疗中持续存在的TKIs耐药难题提供了新的研究方向。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨薇：实验研究、数据整理、论文撰写；赵天祺、舒琦：实施研究、分析数据；翁鑫华：实施研究；刘滢溪：实验研究（细胞培养与集落形成实验）；金明睿：实施研究、数据收集；冯敏：实验技术指导、实验方案修订；胡晶：研究方案设计、项目管理、基金申请、论文修改

参 考 文 献

[1] Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: a review[J]. JAMA, 2025, 333(18): 1618-1629.

[2] Singh P, Kumar V, Gupta SK, et al. Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review[J]. Med Oncol, 2021, 38(1): 10.

[3] Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring[J]. Am J Hematol, 2024, 99(11): 2191-2212.

[4] Guilhot F, Hehlmann R. Long-term outcomes of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2025, 145(9): 910-920.

[5] Soverini S, Martelli M, Bavaro L, et al. Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the emerging role of novel therapeutic strategies[J]. Leukemia, 2024, 38(1): 1-12.

[6] Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(1): 5-21.

[7] Ng JJ, Ong ST. Therapy resistance and disease progression in CML: mechanistic links and therapeutic strategies[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2022, 17(6): 181-197.

[8] Kozik M, Giotopoulos G, Huntly BJP. Leukemic stem cells: from leukemic niche to therapeutic opportunities[J]. Blood Rev, 2023, 57: 100997.

[9] Shi X, Liu Y, Zhang J, et al. Wnt/β-catenin signaling in leukemia: a new therapeutic target[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1123456.

[10] Toth RK, Warfel NA. Targeting PIM kinases to overcome therapeutic resistance in cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2021, 20(1): 3-10.

[11] Zhou YY, Jian SQ, Lu LJ, et al. Targeting the N-cadherin/β-catenin axis with MSAB reverses malignant phenotypes in blast crisis of CML[J]. Front Oncol, 2025, 15: 1657508.

[12] Weidemann H, Sarsour AD, Brodie C. Ouabain-a double-edged sword in tumor development and progression? a review of half a century [J]. Front Physiol, 2025, 16: 1685871.

[13] Dhalla NS, Elimban V, Adameova AD. Role of Na^+-K^+ ATPase alterations in the development of heart failure[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(19): 10807.

[14] Bejček J, Spiwok V, Kmoníčková E, et al. Na^+/K^+-ATPase revisited: on its mechanism of action, role in cancer, and activity modulation [J]. Molecules, 2021, 26(7): 1905.

[15] Sun C, Liu J, Zhai SQ, et al. Inhibitory effect of ouabain on resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia K562/G01 cells[J]. Indian J Pharm Sci, 2023, 85(3): 621-631.

[16] Ren YL, Anderson AT, Meyer G, et al. Digoxin and its Na^+/K^+-ATPase-targeted actions on cardiovascular diseases and cancer[J]. Bioorg Med Chem, 2024, 114: 117939.

[17] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 3.

[18] Mojtahedi H, Yazdanpanah N, Rezaei N. Chronic myeloid leukemia stem cells: targeting therapeutic implications[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 603.

[19] Láinez-González D, Alonso-Aguado AB, Alonso-Dominguez JM. Understanding the Wnt signaling pathway in acute myeloid leukemia stem cells: a feasible key against relapses[J]. Biology, 2023, 12(5): 683.

[20] Liu Y, Chen X, Zhang L, et al. Cardiac glycosides as novel anticancer agents: Mechanisms and clinical perspectives[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 215.

[21] Amarante-Mendes GP, Rana A, Santos Datoguia T, et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase complex signaling transduction: challenges to overcome resistance in chronic myeloid leukemia[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(1): 215.

[22] Fujii T, Shimizu T, Sakai H. Pathophysiological roles of two intracellular P-type ATPases: the cancer-associated Na^+, K^+-ATPase α3 isoform and the Parkinson's disease-related ATP13A2[J]. Int J Mol Sci, 2026, 27(4): 1800.

[23] Poohadsuan J, O'Doherty GA, Owattanapanich W, et al. Cardiac glycoside ouabain efficiently targets leukemic stem cell apoptotic machinery independent of cell differentiation status[J]. Cell Commun Signal, 2023, 21(1): 283.

[24] Bansal M, Verma M. Potential therapeutic targets in chronic myeloid leukemia[J]. Med Oncol, 2025, 42(8): 344.

[25] Xiao SY, Tong MQ, Ren JY, et al. Cardiac glycosides toxicity: Mechanisms and mitigation strategies in recent studies[J]. Chem Biol Interact, 2026, 423: 111817.

（收稿：2026-02-28；修回：2026-03-30；录用：2026-03-31）

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

杨 薇，赵天祺，舒 琦，等. 哇巴因靶向Wnt/β-catenin信号通路逆转慢性髓系白血病的伊马替尼耐药[J]. 重庆医科大学学报，2026，51(5)：662-668.