

·基础研究·

三氧化二砷对T急淋白血病及DNA转甲基酶1的影响

苏嘉茵¹, 吴忠道², 罗学群¹

(1. 中山大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室//中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】本研究旨在探索三氧化二砷(ATO)对急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞中DNA转甲基酶1(DNMT1)表达的影响及其抗白血病作用机制。【方法】体外培养T-ALL细胞株(Jurkat、CCRF-CEM、Molt-4),依据不同ATO干预浓度,分为对照组(0 μmol/L)、低浓度组(3 μmol/L)、高浓度组(6 μmol/L),应用RT-qPCR和western blot研究ATO(0、3、6 μmol/L)干预24 h后细胞内DNMT1和cleaved-caspase-3表达的变化;应用流式细胞术测定T-ALL细胞系(Jurkat、CCRF-CEM、MOLT-4)的细胞死亡率;在ATO的干预下,应用Z-DEVD-FMK后检测DNMT1和cleaved-caspase-3表达和细胞死亡率的变化;在ATO的干预下,过表达DNMT1检测T-ALL细胞死亡率的变化。【结果】随着ATO浓度的增加,T-ALL细胞DNMT1表达水平降低,cleaved-caspase-3蛋白表达水平增加,细胞死亡率增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);应用Z-DEVD-FMK后可特异性抑制cleaved-caspase-3,减弱ATO对DNMT1表达的抑制作用,降低细胞死亡率,差异具有统计学意义($P<0.05$);在T-ALL细胞中过表达DNMT1可显著降低ATO处理后诱导的细胞死亡,差异具有统计学意义($P<0.05$)。【结论】在一定浓度范围内,ATO可通过激活caspase-3有效抑制DNMT1的表达从而诱导T-ALL细胞死亡,为未来ATO作为去甲基化药物应用于提高T-ALL的临床治疗提供了一定的理论依据。

关键词:急性白血病;细胞死亡;三氧化二砷;DNA转甲基酶1

中图分类号:R733.71

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)03-0422-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0310

Effect of Arsenic Trioxide on Acute T-Lymphocytic Leukemia and DNA methyltransferase 1

SU Jia-yin¹, WU Zhong-dao², LUO Xue-qun¹

(1. Department of Paediatrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University// Key Laboratory of Tropical Disease Control, Sun Yat-sen University, Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: LUO Xue-qun; E-mail: luoxq@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To explore the effect of arsenic trioxide (ATO) on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and its anti-leukemia mechanism in acute T-lymphocytic leukemia (T-ALL) cells.【Methods】T-ALL cell lines (Jurkat, CCRF-CEM, Molt-4) were cultured in vitro and divided into control (0 μmol/L), low concentration (3 μmol/L) and high concentration (6 μmol/L) groups according to the dose of ATO, and the expression of DNMT1 and cleaved-caspase-3 were investigated by RT-qPCR and western blot after ATO treatment for 24 h (0, 3 and 6 μmol/L) intervention; Flow cytometry was applied to detect cell death in T-ALL cell lines (Jurkat, CCRF-CEM, MOLT-4); The expression of DNMT1 and cleaved-caspase-3 and cell death were detected after applying ATO and Z-DEVD-FMK (caspase-3 specific inhibitor); T-ALL cell death was detected after overexpressing DNMT1 under ATO intervention.【Results】With

收稿日期:2022-02-25

基金项目:广东省中医药局科研基金(20201056);广东省医学科学技术研究基金(20191118191022583)

作者简介:苏嘉茵,硕士生,研究方向:儿童血液肿瘤,E-mail:sujy26@mail2.sysu.edu.cn;罗学群,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:luoxq@mail.sysu.edu.cn.

the dose of ATO increasing, the expression level of *DNMT1* in T-ALL cells decreased, the expression level of *cleaved-caspase-3* protein increased, and the cell mortality increased ($P<0.05$); The application of Z-DEVD-FMK specifically inhibited *cleaved-caspase-3*, diminished the inhibitory effect of ATO on *DNMT1* expression, and decreased the cell mortality ($P<0.05$); Overexpression of *DNMT1* in T-ALL cells significantly reduced cell death induced by ATO treatment ($P<0.05$).
【Conclusion】 Within a certain concentration range, ATO effectively down-regulates the expression of *DNMT1* via the activation of *caspase-3* in a dose-dependent manner, thus inducing cell death in T-ALL cells, which provides a theoretical basis for the future application of ATO as a demethylating drug to improve the clinical treatment of T-ALL.

Key words: acute leukemia; cell death; arsenic trioxide; DNA methyltransferase 1

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(3):422-429]

急性淋巴细胞白血病是一种大量原始和幼稚的淋巴细胞在骨髓异常增生的血液癌症,是儿童最常见的恶性肿瘤。三氧化二砷(Arsenic trioxide, ATO)用于急性早幼粒细胞白血病取得较好疗效,有文献提示ATO在体外能诱导髓系、淋巴系和浆细胞性白血病细胞株凋亡,且有研究发现ATO可改善耐药性急性淋巴细胞白血病(Acute lymphocytic leukemia, ALL)对化疗药物的敏感性^[1]。但目前关于ATO在急性T淋巴细胞白血病(Acute T-lymphocytic leukemia, T-ALL)中的应用研究较少,其作用机制仍有待进一步探索。本研究主要选取人类T-ALL细胞株,探索ATO对T-ALL细胞中*DNMT1*表达的影响及其抗白血病作用机制,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

本实验所用的三氧化二砷(ATO)是由医院采购部经广州市食品药品监督管理局审核后所购买。ATO溶于PBS制备为1 mmol/L的储备液; Z-DEVD-FMK(*caspase-3*抑制剂)购自Selleck(#S7312),按产品说明书储存,使用浓度为25 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 实验分组与处理

体外培养T-ALL细胞系(Jurkat、CCRF-CEM、Molt-4)至细胞状态良好,依据干预的ATO浓度的不同,分为对照组、低浓度组、高浓度组,对照组用DMSO(3 mL/L)处理24 h,低浓度组和高浓度组分别予以3 $\mu\text{mol/L}$ 、6 $\mu\text{mol/L}$ ATO处理24 h后进行后续实验;依据ATO和Z-DEVD-FMK干预的不同,分为ATO组和ATO+DEVD组,ATO组予以6 $\mu\text{mol/L}$

ATO处理24 h,ATO+DEVD组同时加入6 $\mu\text{mol/L}$ ATO和25 $\mu\text{mol/L}$ Z-DEVD-FMK(*caspase-3*特异性抑制剂)干预24 h后进行后续实验。

1.3 Annexin-V/PI流式细胞检测

T-ALL细胞经过ATO或Z-DEVD-FMK按特定浓度处理后培养24 h,分别收集不同ATO浓度处理的细胞离心(400 \times g, 10 min)。用Annexin-V/PI试剂盒(KeyGEN, #KGA108)按产品说明书检测并统计Annexin-V⁺PI⁺染色阳性的细胞比例。

1.4 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)

TRIzol法提取T-ALL细胞的总RNA, 20 μL mRNA逆转录体系中加入5 \times Prime Script RT Master Mix 4 μL 以及1 000 ng总RNA模板进行逆转录,获得相应的cDNA,以*GAPDH*为内参检测相关基因mRNA表达水平。利用BioRad CFX Quantitative PCR System进行实时荧光定量PCR并分析所得实验结果。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相应值,比较不同实验分组间*DNMT1*基因的表达水平。相应的引物序列列于表1。

1.5 Western blot蛋白印迹检测

用RIPA裂解法提取细胞总蛋白,用BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, #P0012S)按照产品说明书测定蛋白浓度并进行热变性。将制成的蛋白进行电泳(SDS-PAGE),根据蛋白大小选择合适的转膜条件将蛋白转移到硝酸纤维素(NC)膜上,蛋白条带加入一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,二抗孵育2 h。用增强型化学发光法(ECL)检测确定目的蛋白的表达强弱,*GAPDH*或 β -actin作为内参。

1.6 *DNMT1*过表达质粒转染

将T-ALL细胞接种于12孔板,当细胞密度70%~90%时,进行细胞pECMV-*DNMT1*过表达质

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

| Gene | Primer sequence (5'-3') |
|-------|---------------------------|
| DNMT1 | F, CCTAGCCCCAGGATTACAAGG |
| | R, ACTCATCCGATTGGCTCTTTC |
| GAPDH | F, GAGTCAACGGATTGGTCGTAT |
| | R, ATGGGTGGAATCATATTGGAAC |

粒转染,对照组转染空载质粒。具体实验操作如下:分别将 1.875 μL Lipofectamine™ 3000 试剂用 62.5 μL Opti-MEM 培养基稀释成混合液 A, 2.5 μg 质粒用 62.5 μL Opti-MEM 培养基稀释,与 2.5 μL P3000™ 试剂混合成混合液 B。再将混合液 B 加入混合液 A 中,室温孵育 15 min 后,加入细胞培养皿中。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 的培养箱中继续培养 48 h 后,分别检测 DNMT1 的表达水平和用 6 $\mu\text{mol/L}$ ATO 处理 24 h 后检测细胞死亡率。过表达质粒序列如下: pECMV-DNMT1: 5'-AGGCGGCTCAAA-GATTTGGAA-3'。

1.7 统计学分析

数据的统计分析用 GraphPad Prism 8 进行。两组数据的比较采用成组 t 检验进行分析。多组之间的比较采用单因素方差分析或双因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。图表和误差条代表独立生物实验的平均值 \pm 标准差。

2 结果

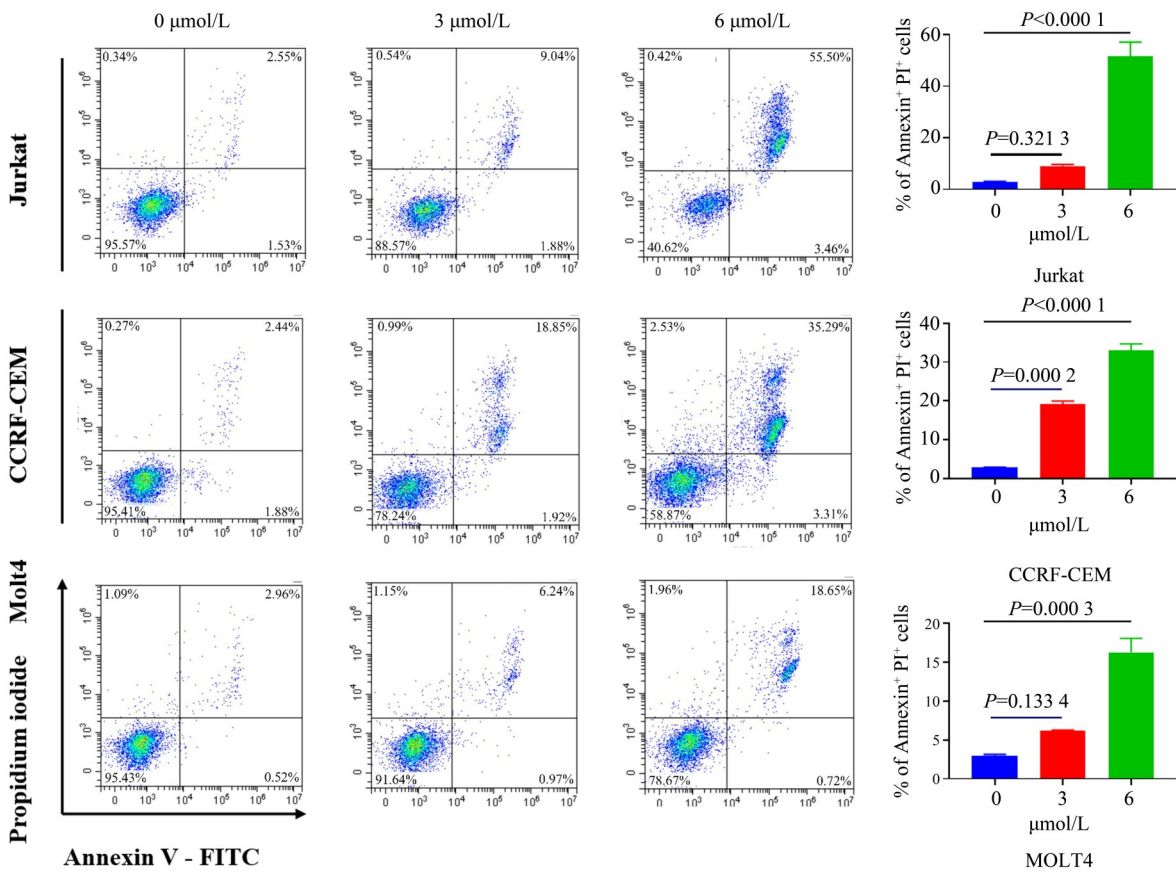
2.1 不同浓度 ATO 干预对 T-ALL 细胞存活的影响

ATO 以不同浓度 (0、3、6 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 后进行流式检测。对三个不同浓度组干预后的细胞 PI 阳性率进行检测比较,经单因素方差分析,ATO 处理后 Jurkat 细胞的三组间差异有统计学意义 ($F = 78.53$, $P < 0.000 1$),采用 Bonferroni 法进一步作两两比较发现,对照组与低浓度组 (3 $\mu\text{mol/L}$) 比较差异无统计学意义 ($P = 0.321 3$),而与高浓度组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 比较差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$); ATO 处理后 CCRF-CEM 细胞的三组间差异有统计学意义 ($F = 136.9$, $P < 0.000 1$),作两两比较,发现对照组与低浓度组比较差异有统计学意义 ($P = 0.000 2$),与高

浓度组比较差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$); ATO 处理后 MOLT-4 细胞的三组间差异有统计学意义 ($F = 40.26$, $P = 0.000 3$),作两两比较,发现对照组与低浓度组比较差异无统计学意义 ($P = 0.133 4$),与高浓度组比较差异有统计学意义 ($P = 0.000 3$)。随着 ATO 干预浓度的增加, T-ALL 细胞株 Jurkat、CCRF-CEM、Molt-4 的 PI 阳性率增加,表明 ATO 对 T-ALL 细胞具有杀伤作用,呈浓度依赖性 (图 1)。

2.2 不同浓度 ATO 干预对 T-ALL 细胞 DNMT1 和 cleaved-caspase-3 表达的影响

ATO 以三个不同浓度干预后对 DNMT1 和 cleaved-caspase-3 的表达水平进行检测比较。经方差分析,用 ATO 处理后三组间 DNMT1 的 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($F = 64.45$, $P < 0.000 1$; 图 2A),采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现 Jurkat 细胞低浓度组 (3 $\mu\text{mol/L}$) 的 DNMT1 的 mRNA 表达水平与对照组相比显著降低 ($P = 0.002$),高浓度组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组相比显著降低 ($P = 0.000 3$); CCRF-CEM 细胞低浓度组 (3 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组相比降低,但差异不具有统计学意义 ($P = 0.050 9$),高浓度组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组相比显著降低 ($P < 0.000 1$); MOLT-4 细胞低浓度组与对照组相比显著降低 ($P = 0.013 9$),高浓度组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组相比显著降低 ($P < 0.000 1$); 三组间 DNMT1 的蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F = 3.557$, $P = 0.049 9$; 图 2B),采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现 Jurkat 细胞的对照组与低浓度组 (3 $\mu\text{mol/L}$) 比较差异无统计学意义 ($P = 0.171$),与高浓度组 (6 $\mu\text{mol/L}$) 比较差异有统计学意义 ($P = 0.0212$); CCRF-CEM 细胞的对照组与低浓度组比较差异无统计学意义 ($P = 0.718 9$),与高浓度组比较差异有统计学意义 ($P = 0.017 6$); MOLT-4 细胞



Representative results of flow cytometry showed that after ATO (Arsenic trioxide) treatment (0,3,6 μmol/L) for 24 h, the percentages of PI+ cells increased dose-dependently (6 μmol/L vs. the control or 3 μmol/L vs. the control, $n=3$).

图1 Annexin-V/PI流式细胞检测急性T淋巴细胞白血病细胞株的细胞死亡率

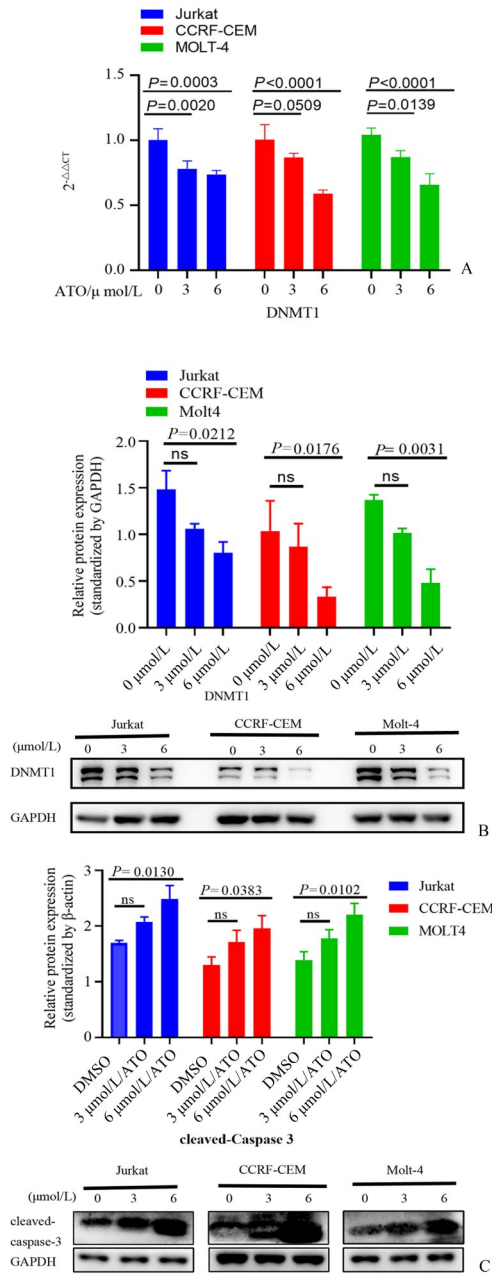
Fig. 1 Annexin-V/PI flow cytometry showed the cellular mortality of acute T-lymphocytic leukemia cell lines.

的对照组与低浓度组比较差异无统计学意义($P=0.2643$),与高浓度组比较差异有统计学意义($P=0.0031$)。经方差分析,用ATO处理后三组间cleaved-caspase-3蛋白表达水平差异有统计学意义($F=4.758, P=0.0219$;图3C),采用Bonferroni法进一步作两两比较,发现Jurkat细胞的对照组与低浓度组(3 μmol/L)比较差异无统计学意义($P=0.2940$),高浓度组(6 μmol/L)与对照组相比显著升高($P=0.0130$);CCRF-CEM细胞的对照组与低浓度组比较差异无统计学意义($P=0.2324$),高浓度组(6 μmol/L)与对照组相比显著升高($P=0.0383$);MOLT-4细胞的对照组与低浓度组比较差异无统计学意义($P=0.2865$),高浓度组(6 μmol/L)与对照组相比显著升高($P=0.0102$)。由图2可见,随着ATO干预浓度的增加,T-ALL细胞株Jurkat、CCRF-CEM、Molt-4中DNMT1的mRNA及蛋白表达水平逐渐降低,cleaved-caspase-3的蛋白表达

水平逐渐增加,表明ATO可同时抑制T-ALL细胞的DNMT1表达并激活cleaved-caspase-3的蛋白表达,呈浓度依赖性。

2.3 抑制caspase-3后ATO对T-ALL细胞中DNMT1表达影响的变化

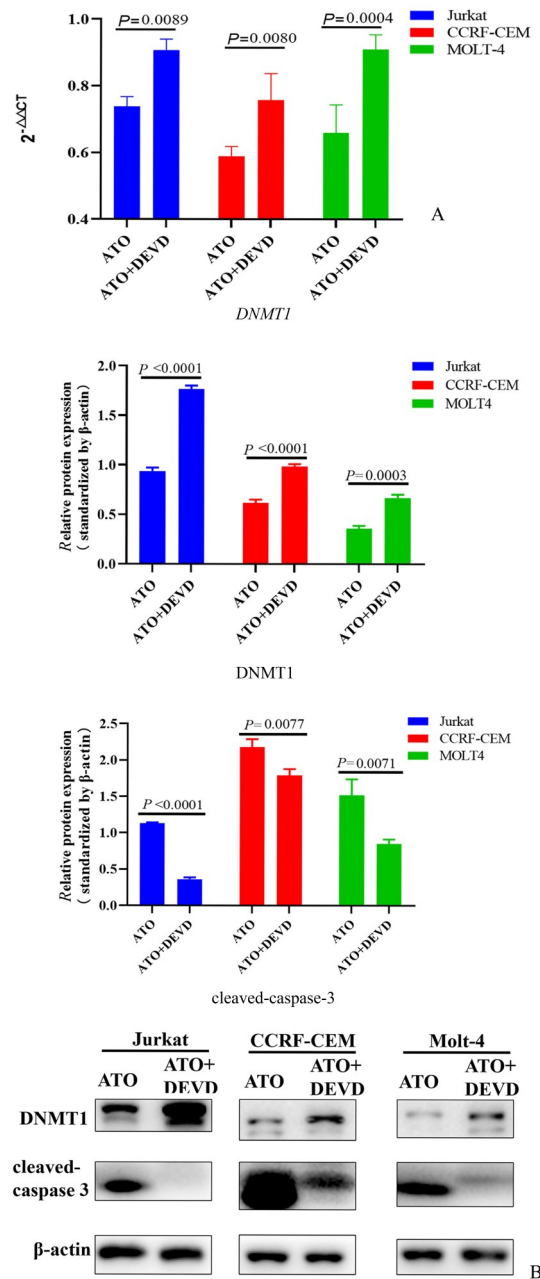
由图3A可见,对ATO组和ATO+DEVD组的DNMT1基因表达水平进行检测比较,经t检验分析,Jurkat细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=3.773, P=0.0089$),CCRF-CEM细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=3.709, P=0.008$),MOLT-4细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=5.55, P=0.0004$);由图3B可见,对ATO组或ATO+DEVD组的DNMT1蛋白表达水平进行检测比较,经t检验分析,Jurkat细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=28.76, P<0.0001$),CCRF-CEM细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=15.71, P<0.0001$),MOLT-4细胞的两组间比较差异有统计学意义($t=12.29, P=$



The T-ALL (acute T-lymphocytic leukemia) cells in the ATO group were treated with ATO (0, 3, 6 μmol/L) for 24 h. A: ATO treatment significantly down-regulated the gene expression levels of *DNMT1* dose-dependently (6 μmol/L vs. the control, $n=3$); B: ATO treatment significantly down-regulated the protein expression levels of *DNMT1* dose-dependently (6 μmol/L vs. the control, $n=3$); C: ATO treatment significantly up-regulated the protein expression level of *cleaved-caspase-3* dose-dependently (6 μmol/L vs. the control or 3 μmol/L vs. the control, $n=3$).

图2 急性T淋巴细胞白血病细胞中*DNMT1*和*cleaved-caspase-3*的表达水平

Fig. 2 The expression levels of *DNMT1* and *cleaved-caspase-3* in acute T-lymphocytic leukemia cells



The T-ALL (acute T-lymphocytic leukemia) cells in the ATO group were treated with 6 μmol/L ATO, and those in the ATO+DEVD group were treated with 6 μmol/L ATO and 25 μmol/L Z-DEVD-FMK. A: RT-qPCR of *DNMT1* mRNA level in T-ALL cells (ATO vs. ATO+DEVD, $n=3$). B: Western blots of the protein expression levels of *DNMT1* and *cleaved-caspase-3* in T-ALL cells of two groups. (ATO vs. ATO+DEVD, $n=3$).

图3 抑制*caspase-3*后ATO对急性T淋巴细胞白血病细胞*DNMT1*表达影响的改变

Fig. 3 Changes in the effect of ATO on *DNMT1* expression in acute T-lymphocytic leukemia cells after inhibition of *caspase-3*

0.000 3);对ATO组或ATO+DEVD组的 *cleaved-caspase-3* 蛋白表达水平进行检测比较,经 *t* 检验分析, Jurkat 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=51.04, P<0.000 1$), CCRF-CEM 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=4.966, P=0.007 7$), MOLT-4 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=5.069, P=0.007 1$)。结果表明应用 Z-DEVD-FMK (*caspase-3* 的特异性抑制剂)可有效抑制 *cleaved-caspase-3* 的表达水平, *cleaved-caspase-3* 是 *caspase-3* 的活化形式,表明 Z-DEVD-FMK 可有效抑制 *caspase-3* 的活化水平,ATO+DEVD 组相对于 ATO 组的 *DNMT1* 基因及蛋白表达水平均显著升高,说明抑制 *caspase-3* 的活化可解除 ATO 对 *DNMT1* 表达的抑制作用。

2.4 ATO 通过活化 *caspase-3* 抑制 *DNMT1* 表达对 T-ALL 细胞死亡的影响

由图 4A 可见,对 ATO 组与 ATO+DEVD 组的细胞 PI 阳性率进行检测比较,经 *t* 检验分析, Jurkat 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=5.629, P=0.004 9$), CCRF-CEM 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=5.749, P=0.004 5$), MOLT-4 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=16.79, P<0.000 1$), 说明应用 Z-DEVD-FMK 抑制 *caspase-3* 可显著降低 T-ALL 细胞的死亡率,表明 ATO 通过活化 *caspase-3* 发挥对 T-ALL 细胞的杀伤作用;转染 pEC-MV-*DNMT1* 过表达质粒的 T-ALL 细胞与对照组相比 *DNMT1* 的表达水平显著上调 ($P<0.05$; 图 4B); 将 *DNMT1* 过表达组与对照组的 T-ALL 细胞分别用 $6 \mu\text{mol/L}$ ATO 处理后用 Annexin-V/PI 流式细胞术检测 PI 阳性的细胞死亡率,经 *t* 检验分析, Jurkat 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=7.64, P<0.000 1$), CCRF-CEM 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=17.72, P<0.000 1$), MOLT-4 细胞的两组间比较差异有统计学意义 ($t=13.26, P<0.000 1$), 说明 ATO 处理后 *DNMT1* 过表达组与对照组相比细胞死亡率显著下降 ($P<0.05$; 图 4C, D), 提示 ATO 通过抑制 *DNMT1* 表达诱导 T-ALL 细胞死亡。

3 讨论

3.1 主要研究发现

为探索 ATO 对急性 T 淋巴细胞白血病的去甲

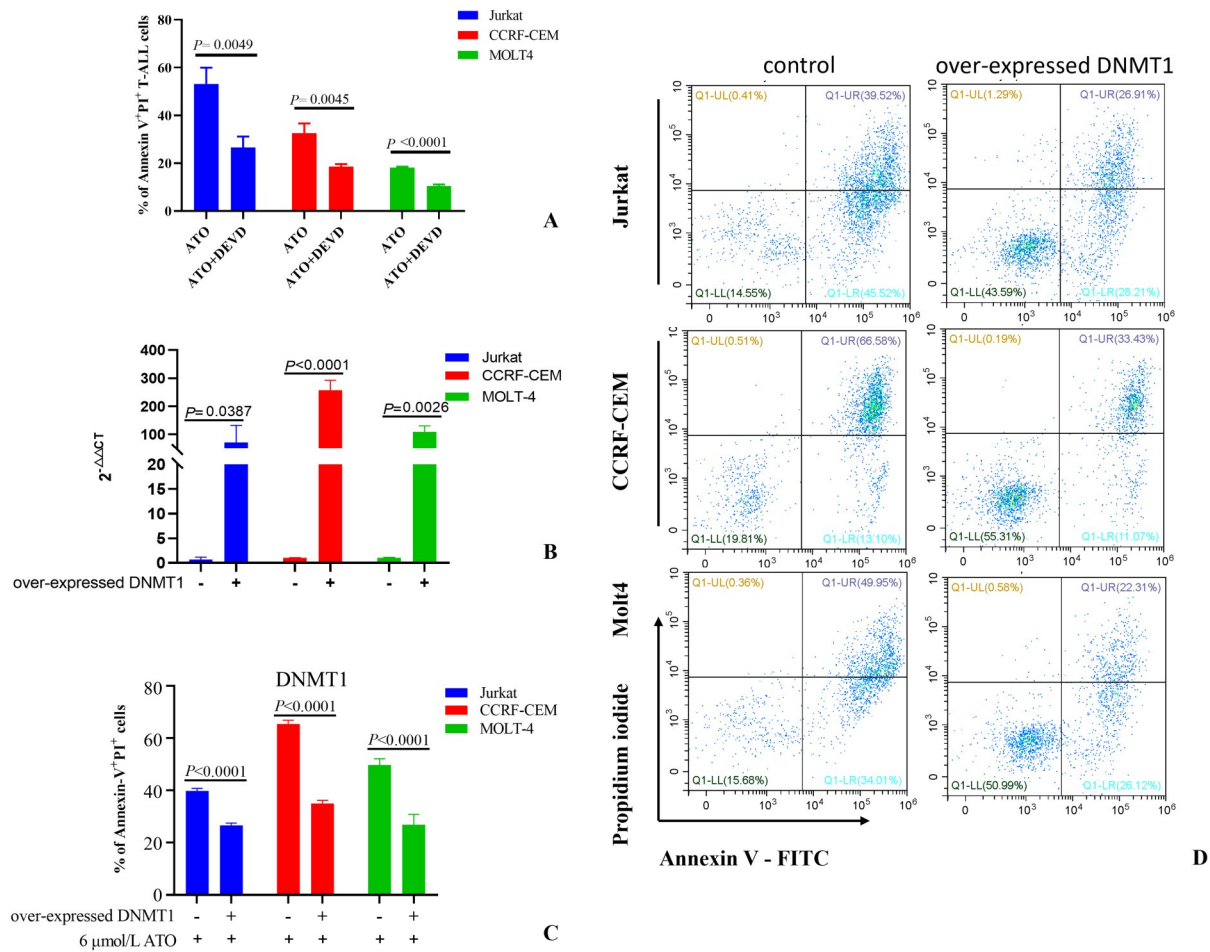
基化作用和抗肿瘤作用机制,本研究检测了 ATO 对 T-ALL 细胞中 *DNMT1* 表达的影响及其潜在作用机制。已有临床研究表明,ATO 的临床血药浓度峰值为 $6\sim 7 \mu\text{mol/L}$, 而后下降并维持在 $1\sim 2 \mu\text{mol/L}$ 内^[2-3], 过往关于 ATO 的体外研究多数将作用浓度设置在 $0\sim 8 \mu\text{mol/L}$ 范围内^[4-6]。本实验在 $0\sim 6 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内检测其药物作用,发现 ATO 在体外通过激活 *caspase-3* 显著抑制 *DNMT1* 的表达从而诱导 T-ALL 细胞死亡,这种作用呈剂量依赖性。

3.2 意义与应用

急性淋巴细胞白血病是大量原始和幼稚的淋巴细胞在骨髓异常增生的血液癌症,是儿童最常见的恶性肿瘤,占有小儿癌症病例的近四分之一^[7]。根据免疫表型, ALL 病例可大致分为急性 B 细胞淋巴细胞白血病、急性 T 细胞淋巴细胞白血病 (T-ALL) 及混合型白血病,其中 T-ALL 占初诊患者的 $10\%\sim 15\%$ 。T-ALL 是一种由未成熟 T 细胞前体 (T 淋巴细胞) 引起的血液系统恶性肿瘤^[8]。T-ALL 患者的预后较差,具有更高的复发风险^[9]。T-ALL 的原始幼稚细胞对常规化疗药物更具抵抗力,耐药是导致预后差的重要危险因素^[10-11]。探索 T-ALL 的耐药机制,挖掘新型有效的临床药物是改善预后的重要途径。

肿瘤化疗过程中的耐药与基因组高甲基化水平密切相关, DNA 转甲基酶 1 (DNA methyltransferase 1, *DNMT1*) 是人体内最重要的转甲基酶,在白血病中呈高表达的状态^[12-13]。近来有研究表明,耐药的 T 细胞白血病-淋巴瘤细胞系中未呈现出非耐药细胞对化疗药物的细胞反应,包括 *DNMT1* 的消耗和 DNA 低甲基化的状态^[12], 而 DNA 去甲基化治疗的表观遗传改变可恢复对化疗耐药的人类恶性淋巴细胞对化疗药物的凋亡反应^[14]。这些研究提示可以通过将细胞暴露于有 DNA 去甲基化作用的化合物来逆转 T-ALL 的耐药。但目前仍缺乏抑制 T-ALL 中 *DNMT1* 表达的药物研究。目前已有关于 ATO 对 T-ALL 的药物作用研究较少,尚不清楚 ATO 是否可以降低 T-ALL 中的 *DNMT1* 表达,本研究为这一领域的研究作了补充。

ATO 作为临床上已应用成熟的药物,其安全性和疗效都较可靠,本研究的新发现完善了国内外关



The T-ALL (acute T-lymphocytic leukemia) cells were divided into *DNMT1* over-expression group and the control group. Cells in *DNMT1* over-expression group were transfected with pECMV-*DNMT1* overexpressing plasmid, and those in the control group were transfected with empty plasmid. After 48 h, T-ALL cells in the two groups were treated with 6 μmol/L ATO. A: Annexin-V/PI flow cytometric analysis of cellular mortality of T-ALL cells (ATO vs. ATO+DEVD, $n=3$). B: RT-qPCR assays of the gene expression of *DNMT1* in T-ALL cells (*DNMT1* over-expression vs. control, $n=3$). C, D: Annexin-V/PI flow cytometric analysis of cellular mortality of T-ALL cells (ATO+ *DNMT1* over-expression vs. ATO, $n=3$).

图4 ATO抑制*DNMT1*表达对急性T淋巴细胞白血病细胞死亡的影响

Fig. 4 The effect of the inhibition of *DNMT1* by ATO on the cell mortality in acute T-lymphocytic leukemia cells

于ATO在T-ALL中抗肿瘤作用机制的研究,有利于进一步探索ATO去甲基化作用的具体机制,有利于为难治性耐药性T-ALL的治疗提供新选择。然而,关于ATO是否能通过抑制*DNMT1*逆转T-ALL患者化疗耐药性还有待进一步探索。

3.3 结论与展望

综上所述,在一定浓度范围内,ATO可通过激活*caspase-3*有效抑制T-ALL细胞中的*DNMT1*表达从而诱导细胞死亡,为未来ATO作为去甲基化药物应用于提高T-ALL的临床治疗提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Bornhauser BC, Bonapace L, Lindholm D, et al. Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway [J]. *Blood*, 2007, 110(6):2084-2091.
- [2] Deng ZY, Zhu SR, Wang MJ, et al. Relation of blood arsenic concentration with effect and safety of arsenic-containing Qinghuang Powder in patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(7):497-501.
- [3] Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients [J]. *Blood*, 1997, 89(9):3354-3360.
- [4] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, et al. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system [J]. *Blood*, 1999, 93(1):268-277.
- [5] 郑立敏,王丽娜,梁聪,等.全反式维甲酸调控内质网应激诱导FLT3-ITD蛋白自噬降解促进白血病细胞凋亡[J].*中华血液学杂志*,2020,41(10):836-842.
- Zheng LM, Wang LN, Liang C, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress induced by all-trans retinoic acid on apoptosis of FLT3-ITD mutated leukemia cells by activating autophagy in FLT3-ITD mutated protein [J]. *Chin J Hematol*, 2020, 41(10):836-842.
- [6] 王韞芳,孙红琰,李昕权,等.三氧化二砷对NB4及Jurkat细胞系端粒酶活性的抑制效应[J].*中国实验血液学杂志*,2003,(4):359-362.
- Wang YF, Sun HY, Wang QL, et al. Inhibiting effect of arsenic trioxide on telomerase activity of NB4 and Jurkat cell lines [J]. *Chin J Exp Hematol*, 2003, 11(4):359-362.
- [7] Terwilliger T, Abdul-Hay M. Abdul-Hay. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(6): e577.
- [8] Aldoss I, Douer D, Pullarkat V. Therapy-related acute lymphoblastic leukemia: where do we stand with regards to its definition and characterization [J]. *Blood Rev*, 2019, 37:100584.
- [9] Sánchez-Martínez D, Baroni ML, Gutierrez-Agüera F, et al. Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2019, 133(21):2291-2304.
- [10] Teachey DT, Hunger SP. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2013, 162(5):606-620.
- [11] Sarmiento-Ribeiro AB, Scorilas A, Gonçalves AC, et al. The emergence of drug resistance to targeted cancer therapies: clinical evidence [J]. *Drug Resist Updat*, 2019, 47:100646.
- [12] Yoshida-Sakai N, Watanabe T, Yamamoto Y, et al. Adult T-cell leukemia-lymphoma acquires resistance to DNA demethylating agents through dysregulation of enzymes involved in pyrimidine metabolism [J]. *Int J Cancer*, 2022, 150(7):1184-1197.
- [13] Rahmani T, Azad M, Chahardouli B, et al. Patterns of DNMT1 promoter methylation in patients with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2017, 11(3):172-177.
- [14] Grimm C, Herling CD, Komnidi A, et al. Evaluation of a prognostic epigenetic classification system in chronic lymphocytic leukemia patients [J]. *Biomark Insights*, 2022, 17:11772719211067972.

(编辑 祁方昉)