

林晓静,赵臻怡,陈舒雅,等. 沉默血红素加氧酶-1 对急性单核细胞白血病小鼠模型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (12): 7-13,42.

Lin XJ, Zhao ZY, Chen SY, et al. Effect of silencing heme oxygenase-1 on xenografted mouse models of acute monocytic leukemia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 7-13,42.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 12. 002

沉默血红素加氧酶-1 对急性单核细胞白血病 小鼠模型的影响

林晓静¹,赵臻怡¹,陈舒雅²,方 琴³,王季石^{2*}

(1.川北医学院附属医院,四川 南充 637000;2.贵州省血液病研究所,贵阳 550004;
3.贵州医科大学附属白云医院,贵阳 550004)

【摘要】 目的 探讨沉默血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达对急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, French-American-British classification M5)小鼠模型白血病疾病的影响。**方法** 通过慢病毒转染 U937 细胞株沉默 HO-1 的表达,采用不同处理组的 U937 细胞皮下注射 NOD/SCID 小鼠的腋下,建立模型,分为空白组及实验组(U937 组、沉默 HO-1 组、空载体组)。鉴定模型构建成功后,比较不同组小鼠的肿块形成时间、肿块体积的大小、肿瘤对周围组织的浸润、外周血白细胞及血小板计数、血红蛋白含量及生存时间。**结果** 荧光显微镜及 Western blot 证实慢病毒转染成功。与空白组相比,实验组小鼠腋下形成肿块,外周血白细胞计数明显升高、涂片见白血病细胞,且骨髓液中发现一群细胞表达 CD13、CD14、CD64,证实造模成功。与 U937 及空载体组相比,沉默 HO-1 组 M5 小鼠模型出现皮下肿块所需时间明显延长($P<0.05$)、肿块生长的速度较慢($P<0.05$)、外周血白细胞数升高及血小板下降的速度更慢($P<0.05$)、且生存时间显著延长($P<0.05$)。**结论** 沉默 HO-1 的表达可减缓 M5 小鼠模型的白血病进展,HO-1 有望成为 M5 的治疗靶点之一。

【关键词】 血红素加氧酶-1;急性髓系白血病;小鼠模型;NOD/SCID 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0007-07

Effect of silencing heme oxygenase-1 on xenografted mouse models of acute monocytic leukemia

LIN Xiaojing¹, ZHAO Zhenyi¹, CHEN Shuya², FANG Qin³, WANG Jishi^{2*}

(1. the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China. 2. Hematological Institute of Guizhou Province, Guiyang 550004. 3. the Affiliated Baiyun Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of silencing heme oxygenase-1 (HO-1) on the progression of leukemia in xenografted mouse models of acute monocytic leukemia (M5). **Methods** U937 cells were infected with a lentivirus to silence expression of HO-1. Then, modified U937 cells were subcutaneously injected into the armpits of NOD/SCID mice to establish M5 xenografted mouse models that were divided into blank and experimental groups (U937, vehicle, and siHO-1 groups). Subsequently, the tumor formation time, tumor volume, tumor infiltration into surrounding tissues, peripheral white blood cell and platelet counts, hemoglobin content, and survival time of the mice were assessed.

【基金项目】 国家自然科学基金(81660616);南充市市校科技战略合作项目(18SXHZ0136)。

【作者简介】 林晓静(1981—),女,硕士研究生,研究方向:血液病的靶向治疗。E-mail: 23105171@qq.com

【通信作者】 王季石(1958—),男,博士生导师,研究方向:血液病的靶向治疗。E-mail: wangjishi9636@163.com

Results Fluorescence microscopy and Western blot confirmed successful infection. After formation of an axillary mass, an increased white blood cell count and leukemic cells in peripheral blood and expression of CD13, CD14, and CD64 in bone marrow indicated successful establishment of the xenografted mouse models. Compared with the U937 and vehicle groups, there was a significant increase in disease latency in the siHO-1 group ($P < 0.05$). Xenografted mouse models with HO-1 downregulation developed tumors more slowly ($P < 0.05$), and the peripheral white blood cell count was increased and platelets were decreased more slowly ($P < 0.05$). Mice in the HO-1 downregulated group survived significantly longer than those in the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Silencing expression of HO-1 may slow the progression of leukemia in M5 xenograft mouse models.

【Keywords】 heme oxygenase-1; acute myeloid leukemia; xenografted mouse model; NOD/SCID mice

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类造血干/祖细胞恶性克隆性疾病,以血液和骨髓中髓系原始细胞的扩增为特征^[1]。随着化疗及造血干细胞移植的进展,显著提高了 AML 的治疗效果,但成人 AML 的生存率仍然很低,5 年无病生存率仅为 20%~30%^[2-4]。而 AML 的预后主要依赖于其细胞遗传学及分子生物学的改变^[5],因此寻找 AML 标志性分子学研究成为探索靶向治疗的热点之一。

血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是血红素分解代谢过程中的限速酶,是机体重要的氧化调节酶之一。正常生理条件下,HO-1 主要参与铁的循环利用和维持细胞内环境稳定。在疾病或应激条件下,HO-1 具有抗凋亡、促增殖及减轻炎症反应的作用^[6-7]。目前已经明确 HO-1 在多种实体肿瘤中异常高表达,且与肿瘤发生及发展相关^[7]。在血液疾病肿瘤中,有研究证实,与健康供者 CD34⁺细胞相比,72%的 AML 患者 CD34⁺细胞中 HO-1 的表达显著升高。亚组分析发现急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, French-American-British classification M5)患者中 HO-1 的表达水平更高,与正常人相比,其表达可增加 8~10 倍^[8]。进一步的研究显示,在 AML 患者中,HO-1 的表达与危险分层呈正相关,与生存时间呈负相关^[9]。另外体外实验证实下调 HO-1 的表达能够抑制 AML 细胞株的增殖、促进其凋亡,且能增强阿糖胞苷等化疗药物的敏感性^[8,10-12]。由此可见,HO-1 有望成为 AML 的潜在治疗靶点之一,尤其是 M5 亚型,但针对这一亚型,目前尚缺乏体内实验进一步证实。

本研究拟通过慢病毒转染沉默 U937 细胞中 HO-1 的表达,建立 M5 小鼠模型,探索沉默 HO-1 的表达对 M5 小鼠白血病疾病的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 NOD/SCID 小鼠 40 只,体重 18~20 g,6~8 周龄,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004],饲养于贵州医科大学动物房 SPF 层流柜[SYXK(黔)2018-0001]。含复合维生素 B 的标准颗粒饲料、饮水、垫料及一切与鼠接触的物品经灭菌处理,动物实验室温度保持在 25℃左右,相对湿度保持在 40%~70%,每日光照 12 h,适应性饲养一周。实验方案符合 3R 原则并通过贵州医科大学实验动物伦理委员会(IACUC)审批(2015-046)。

1.1.2 细胞株

人 AML 细胞株 U937(急性单核细胞白血病,t(10;11)(p13;q14))购买于美国菌种保藏中心。细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,培养条件为 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱,细胞悬浮生长,根据生长情况每 2~3 d 传代一次。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素-链霉素双抗、BCA 蛋白浓度试剂盒(碧云天生物技术公司)、anti-human CD13-PE、anti-human CD15-FITC、anti-human CD14-APC、anti-human CD64-FITC 及 anti-human CD45-PE-CY(美国 eBioscience);HO-1 与 β -actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号 CytoFLEX);Western blot 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司,型号 164-5070)。

1.3 实验方法

1.3.1 重组慢病毒的转染

重组慢病毒包括沉默 HO-1 表达的 pRNAi-

U6.2/Lenti-EGFP-siHO-1 和空载体 pRNAi-U6.2/Lenti-EGFP 构建及包装由中国南通百奥迈科公司完成。将处于对数生长期的细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔培养板中,以感染复数(MOI)为 10 的标准加入慢病毒上清和聚凝胺($10 \mu\text{g/mL}$)。37℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 24 h,用不含聚凝胺的完全培养基补液。感染后的 72 h,收集部分细胞,荧光显微镜观察绿色荧光。

1.3.2 Western blot 检测蛋白表达

收集不同处理组的 U937 细胞,PBS 洗涤 2 次,每 10^6 个细胞加 $100 \mu\text{L}$ 裂解液,冰上裂解 30 min,12000 r/min 4℃ 离心 10 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,按照 $30 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 的体系加入蛋白及上样缓冲液,沸水浴变性 10 min。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白,将分离的蛋白进行电转膜至 PVDF 膜上后,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。然后孵育一抗 2 h,回收一抗,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,室温孵育二抗 1 h,TBST 洗膜 3 次。将 ECL 试剂盒中的 A、B 液按照 1:1 的比例进行配制,均匀地浸润在 PVDF 膜上,在显影仪上显影。

1.3.3 小鼠造模

NOD/SCID 小鼠随机分 4 组,每组 10 只,将处于对数生长期的不同组 U937 细胞(每只小鼠 5×10^6 个细胞)经皮下注射到小鼠的腋下。具体分组如下:空白组—皮下注射生理盐水;U937 组—皮下注射 U937 细胞;沉默 HO-1 组—皮下注射转染 siHO-1 慢病毒的 U937 细胞;空载体组—皮下注射转染空载体的 U937 细胞。

1.3.4 小鼠肿瘤体积的测量

接种处理后,密切观察并记录小鼠皮下包块体积的变化,如出现皮下包块,采用游标卡尺每 5 d 检测 1 次,计算肿瘤体积,公式为: $\pi/6$ 长 $\times$ 宽 2 。

1.3.5 小鼠生存时间的记录

记录小鼠的死亡时间,采用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线。

1.3.6 小鼠外周血常规及血涂片检测

分别于皮下注射前、注射后的第 10、20、30、40、50 天经尾静脉取外周血约 $100 \mu\text{L}$,收集于 EDTA 抗凝管中,进行血常规检查计数白细胞、血红蛋白含量和血小板。另外,若发现白细胞升高,取外周血行吉姆萨-瑞氏染色后,油镜下观察细胞形态,并以空白组小鼠作对照。

1.3.7 流式细胞术检测

取对数生长期的 U937 细胞,调整细胞数至

$(0.5 \sim 1) \times 10^6/\text{mL}$,加入人源单克隆抗体,避光 15 min 后上机检测。另外将出现白细胞升高的实验组及同一时间段的空白组小鼠,经过尾静脉取外周血 $100 \mu\text{L}$,并将上述小鼠各处死一只,取其肱骨样本,收集用生理盐水冲出的骨髓液 $50 \mu\text{L}$ 。细胞数调至 $(0.5 \sim 1) \times 10^6/\text{mL}$,各加入 $5 \mu\text{L}$ CD45-PE-CY、CD13-PE、CD14-APC、CD64-FITC,避光 15 min 后,流式细胞仪检测。

1.3.8 病理组织学检查

死亡或处死后的各组小鼠,取其皮下包块,生理盐水冲洗,在 4% 甲醛固定 24 h,包埋在石蜡里面做成蜡块,进行切片、铺片和烘片,后采用苏木素-伊红(HE)染色法染色,显微镜下观察结果。

1.4 统计学方法

数据统计分析采用 SPSS 23.0 软件。以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较,符合正态分布采用 t 检验,不符合采用非参数检验。Kaplan-Meier 绘制生存曲线,并采用 log-rank test 分析结果。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染率及转染效果

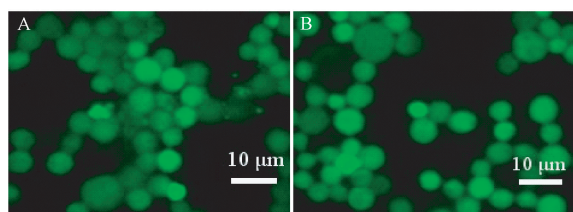
Western blot 检测发现 U937 细胞中 HO-1 在蛋白水平呈高表达,故转染慢病毒沉默 HO-1 的表达。转染 72 h 后荧光显微镜观察显示 U937 细胞的绿色荧光明显增强,阳性转染率在 95% 以上(图 1)。同时发现转染了 siHO-1 慢病毒的 U937 细胞中 HO-1 呈低表达,而空载体组 HO-1 的表达无明显变化,从而提示转染成功(图 2)。

2.2 M5 小鼠模型的鉴定

与对照组相比,实验组小鼠出现腋下包块(图 3),并且白细胞数明显升高(表 1),同时外周血涂片查见白血病细胞(图 4)。流式细胞术检测发现 U937 细胞表达 CD13、CD14、CD64,而与对照组相比,实验组小鼠骨髓液中有一群细胞表达 CD13、CD14、CD64(图 5)。上述结果证实成功构建了急性单核细胞白血病小鼠模型。

2.3 M5 小鼠模型的肿块形成

沉默 HO-1 组小鼠出现皮下肿块所需的平均时间明显长于 U937 组及空载体组($32.6 \pm 4.87 \text{ d}$ vs $18.3 \pm 2.82 \text{ d}$ vs $19.4 \pm 2.93 \text{ d}$)(图 6)。在肿块形成后的相同时间点,与 U937 组及空载体组相比,沉默 HO-1 组小鼠的肿块体积明显缩小(图 7)。形成肿

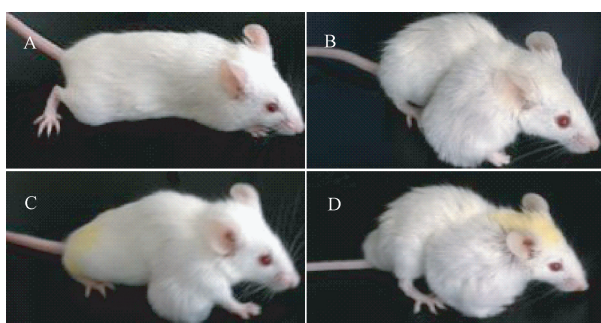


注:A:沉默 HO-1 组;B:空载体组。

图 1 荧光显微镜观察细胞的慢病毒转染率

Note. A, siHO-1 group. B, Vehicle group.

Figure 1 Positivity of lentivirus transfections observed by fluorescence microscopy



注:A:空白组;B:U937 组;C:沉默 HO-1 组;D:空载体组。

图 3 空白组及实验组腋下包块的比较

Note. A, Blank group. B, U937 group. C, siHO-1 group. D, Vehicle group.

Figure 3 Comparison of axillary mass between blank group and experimental group

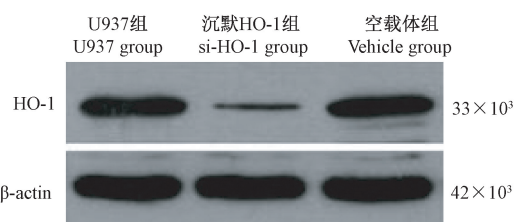
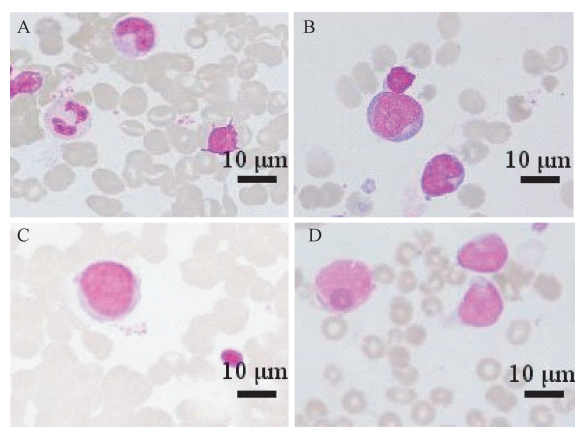


图 2 Western blot 检测细胞转染后 HO-1 的表达水平

Figure 2 Expression of HO-1 after transfections was detected by Western blot



注:A:空白组;B:U937 组;C:沉默 HO-1 组;D:空载体组。

图 4 空白组及实验组外周血涂片 (吉姆萨-瑞氏染色)

Note. A, Blank group. B, U937 group. C, siHO-1 group. D, Vehicle group.

Figure 4 Morphology of leukemia cells in the peripheral blood of blank group and experimental group (Wright Giemsa staining)

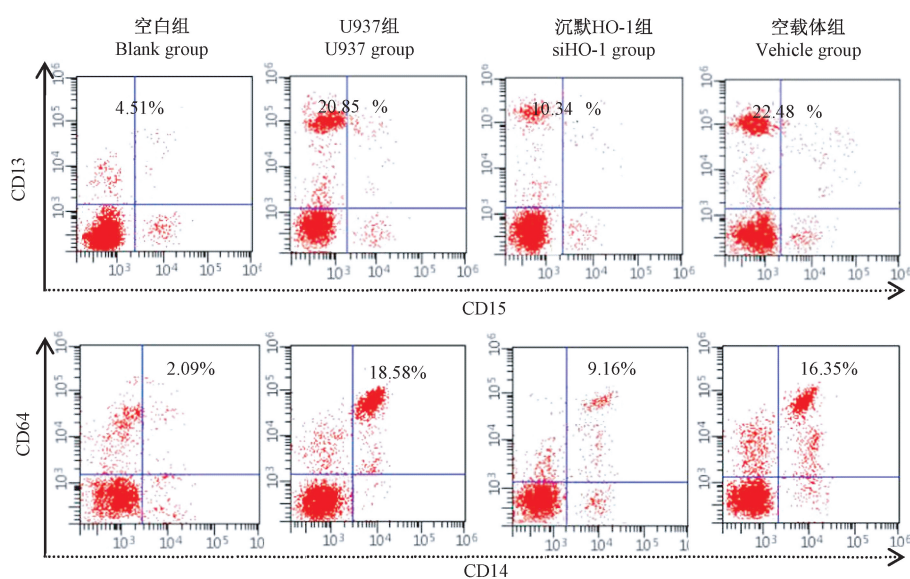


图 5 小鼠骨髓流式细胞图

Figure 5 Flow cytometric analysis of the mouse bone marrow cells

块后第 20 天处死小鼠,病理结果证实 U937 及空载体组小鼠瘤组织重度生长,浸润周围横纹肌,横纹肌重度变性、坏死,而沉默 HO-1 组小鼠瘤组织中度生长,浸润周围横纹肌,横纹肌中度变性、坏死(图 8)。

2.4 M5 小鼠模型的血细胞计数

与空白组相比,第 30 天,U937 组及空载体组小鼠外周血白细胞计数显著升高,且随着时间延长进行性上升,而第 50 天,才发现沉默 HO-1 组小鼠白细胞数升高(表 1)。相反,第 30 天,高表达 HO-1 组小鼠外周血血小板计数明显下降,随着时间延长,下降更明显,而沉默 HO-1 组却第 50 天才下降(表 2)。与空白组相比,第 50 天,U937 组及空载体组小

鼠外周血血红蛋白的含量明显下降,但沉默 HO-1 组血红蛋白未见显著变化(表 3)。U937 组及空载体组间比较,白细胞数、血小板计数及血红蛋白含量差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 M5 小鼠模型的生存情况

成瘤后的小鼠逐渐出现翘毛、弓背、萎靡少动等表现,随着时间的延长,出现步态不稳、濒死。与 U937 组及空载体组相比,沉默 HO-1 组小鼠的生存时间明显延长($P = 0.004$),但 U937 组与空载体组相比,两组模型小鼠的生存时间差异无显著学意义($P = 0.1836$)(图 9)。

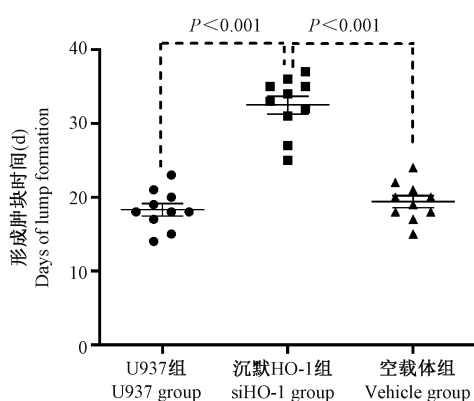
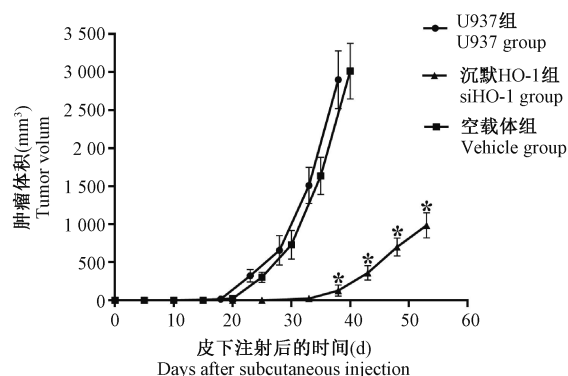


图 6 M5 小鼠模型成瘤的时间

Figure 6 Tumor formation time in M5 xenograft mouse model

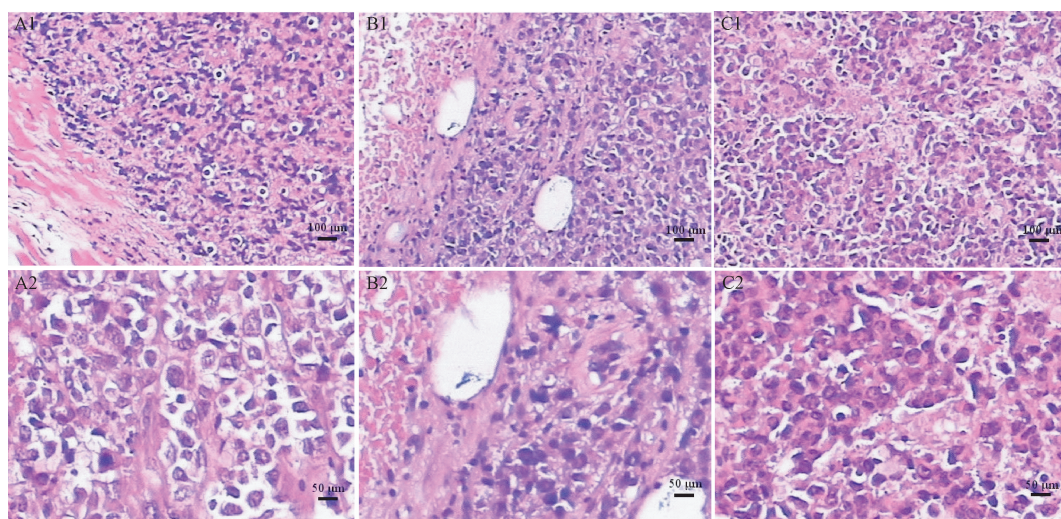


注:与沉默 HO-1 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 M5 小鼠模型成瘤后的肿瘤体积

Note. Compared with the siHO-1 group, * $P < 0.05$.

Figure 7 Tumor volume after tumor formation in M5 xenograft mouse models



注:A1:U937 组;A2:U937 组;B1:沉默 HO-1 组;B2:沉默 HO-1 组;C1:空载体组;C2:空载体组。

图 8 M5 小鼠模型的皮下肿块病理形态

Note. A1, U937 group. A2, U937 group. B1, siHO-1 group. B2, siHO-1 group. C1, Vehicle group. C2, Vehicle group.

Figure 8 Pathological morphology of subcutaneous mass in M5 xenograft mouse models

表 1 各组小鼠外周血白细胞计数的变化($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L, n=6$)

Table 1 Changes in peripheral blood white blood cell counts of mice in each group

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day	第 40 天 40 th day	第 50 天 50 th day
空白组 Blank group	2.94±0.85	2.90±0.53	3.11±0.51	2.95±0.73	3.15±0.61	3.04±0.47
U937 组 U937 group	3.07±0.63	2.94±0.55	3.32±0.41	4.56±0.53 *	9.12±1.09 **	14.31±2.27 **
沉默 HO-1 组 siHO-1 group	2.80±0.68	2.98±0.57	2.95±0.79	3.01±0.62	3.09±0.68	4.24±0.71 *
空载体组 Vehicle group	2.91±0.73	3.06±0.69	2.93±0.73	4.15±0.58 *	9.51±1.51 **	15.75±1.55 **

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.001$ 。Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.001$.表 2 各组小鼠外周血血小板计数的变化($\bar{x}\pm s, \times 10^9/L, n=6$)

Table 2 Changes of peripheral blood platelets counts in each group

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day	第 40 天 40 th day	第 50 天 50 th day
空白组 Blank group	509.50±93.65	521.23±69.81	508.34±62.44	514.51±93.14	503.50±76.85	517.17±69.75
U937 组 U937 group	504.67±73.71	512.83±78.65	518.68±85.67	333.76±74.15 *	289.83±57.76 *	181.17±55.15 **
沉默 HO-1 组 siHO-1 group	511.83±73.90	505.01±63.12	499.00±74.09	501.83±60.84	496.10±79.22	376.67±68.38 *
空载体组 Vehicle group	499.67±70.14	515.33±88.98	495.67±50.84	378.35±67.75 *	310.41±49.30 *	173.03±58.59 **

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.001$ 。Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.001$.表 3 各组小鼠外周血血红蛋白的变化($\bar{x}\pm s, g/L, n=6$)

Table 3 Changes of peripheral blood hemoglobin in each group

组别 Groups	注射前 Before	第 10 天 10 th day	第 20 天 20 th day	第 30 天 30 th day	第 40 天 40 th day	第 50 天 50 th day
空白组 Blank group	143.16±13.75	145.96±16.08	139.35±18.98	150.87±19.61	136.48±13.41	140.20±15.29
U937 组 U937 group	141.40±16.55	150.84±19.29	143.06±19.45	139.14±17.27	123.86±16.13	112.56±14.89 *
沉默 HO-1 组 siHO-1 group	140.10±22.20	146.32±18.70	149.28±16.50	142.94±20.67	133.85±18.75	127.44±19.30
空载体组 Vehicle group	145.40±19.61	149.54±22.73	143.25±19.85	131.64±18.42	127.38±14.39	120.39±18.60 *

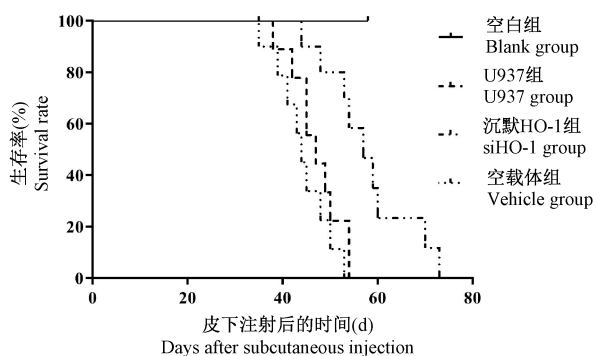
注:与空白组比较, * $P<0.05$ 。Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$.

图 9 各组小鼠的生存曲线

Figure 9 Survival curves of mice in each group

3 讨论

先前的研究表明 HO-1 在 M5 患者中的表达水平更高^[8-9],且我们课题组前期已经证实 M5 细胞株 U937 及 THP-1 中 HO-1 在 mRNA 及蛋白水平的表达均显著高于 Kasumi-1、HL-60 及 NB4 等其它 AML 亚型的细胞株^[8,13]。在体外实验中,已经证实 HO-1 能够抑制 U937 细胞的凋亡及促进其增殖,且与化疗药物耐药有关^[8,12]。但由于体内受细胞因子、生长因子等微环境的影响,HO-1 是否影响 M5 疾病的进展,这就需要建立动物模型进一步验证。故本研

究通过慢病毒转染 U937 细胞株沉默 HO-1 的表达,并采用不同处理组的 U937 细胞皮下注射至 NOD/SCID 小鼠的腋下,建立 M5 小鼠模型,进一步探索沉默 HO-1 的表达对 M5 小鼠模型白血病疾病的影响。

目前国内大多采用 SCID 及 NOD/SCID 小鼠建立动物肿瘤模型^[14-15],本实验使用 NOD/SCID 小鼠进行造模,不但发现接种 U937 细胞的 NOD/SCID 小鼠成瘤率为 100%,而且外周血查见白血病细胞,同时小鼠骨髓液中发现一群异常细胞,其抗原表达与 U937 细胞相似,证实 M5 小鼠模型构建成功,这与之前的报道一致^[16]。NOD/SCID 小鼠成瘤率高,小鼠的发病率稳定,是因为该小鼠既保留了 SCID 小鼠 T、B 淋巴细胞功能缺陷的特点,同时还具有 NK 细胞活性很低、无循环补体、巨噬细胞和 APC 细胞功能损害的特性,而且这种小鼠很少出现淋巴细胞免疫功能恢复^[17-19]。

与 U937 及空载体组,也就是高表达 HO-1 组相比,沉默 HO-1 组的 M5 小鼠模型出现皮下肿瘤所需时间明显延长、肿瘤生长较缓慢、肿瘤体积较小、肿瘤对周围组织的浸润程度较轻、外周血白细胞计数升高及血小板下降的速度更慢,且小鼠的生存时间显著延长,这些数据表明沉默 HO-1 可抑制 M5 小鼠模型白血病的进展,进一步证实了 HO-1 在 AML 中体外实验的结果^[8,13],HO-1 有望成为 M5 的潜在治疗靶点之一。HO-1 药物抑制剂的研发早已成为了热点,其中锌原卟啉-IX (Zinc protoporphyrin-IX, ZnPPiX) 的有效性已经在动物模型中得到验证,如能显著抑制肝癌大鼠模型、肉瘤及肺癌小鼠模型的肿瘤生长^[20-21]。由于 ZnPPiX 不能被生理盐水溶解,这就需要研发新的水溶性 HO-1 抑制剂,如聚乙二醇-共轭 ZnPPiX (Polyethyleneglycol-conjugated ZnPPiX, PEG-ZnPPiX)。PEG-ZnPPiX 的血药浓度约为非聚乙二醇化 ZnPPiX 的 40 倍,更重要的是,它选择性地抑制肿瘤中 HO-1 的活性^[22]。更加鼓舞人心的是发现 PEG-ZnPPiX 可以抑制 CD34⁺ AML 祖细胞的增殖,并在小鼠模型中得到证实^[23]。由此可见,HO-1 抑制剂有望运用于 AML 患者中,尤其是 M5 这一亚型中。

U937 细胞仅是 M5 细胞株的一种,并不能完全代表 M5 疾病的发展,这就需要采用多种细胞株建立小鼠模型验证,最好建立人源肿瘤异种移植模型 (Patient-Derived tumor Xenograft, PDX)^[24],此为本

研究的不足之处,拟下一步构建 PDX 模型进一步验证,并进行机制研究。

综上所述,体内实验证实 HO-1 的高表达加速了 M5 小鼠模型的白血病进展,相反沉默 HO-1 的表达可减缓白血病疾病的进展,进一步为 M5 靶向治疗提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Tallman MS, Wang ES, Altman JK, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3. 2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(6): 721-749.
- [2] Huls G, Chitu DA, Havelange V, et al. Azacitidine maintenance after intensive chemotherapy improves DFS in older AML patients [J]. Blood, 2019, 133(13): 1457-1464.
- [3] Pulte D, Redaniel MT, Jansen L, et al. Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: Overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups [J]. Haematologica, 2013, 98(2): 222-229.
- [4] Chen SL, Qin ZY, Hu F, et al. The role of the HOXA gene family in acute myeloid leukemia [J]. Genes (Basel), 2019, 10(8): 621.
- [5] Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet [J]. Blood, 2010, 115(3): 453-474.
- [6] Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 20(1): 39.
- [7] Chau LY. Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy [J]. J Biomed Sci, 2015, 22(1): 22.
- [8] Lin X, Fang Q, Chen S, et al. Heme oxygenase-1 suppresses the apoptosis of acute myeloid leukemia cells via the JNK/c-JUN signaling pathway [J]. Leuk Res, 2015, 39(5): 544-552.
- [9] Yu M, Wang J, Ma D, et al. HO-1, RET and PML as possible markers for risk stratification of acute myelocytic leukemia and prognostic evaluation [J]. Oncol Lett, 2015, 10(5): 3137-3144.
- [10] Miyazaki T, Kirino Y, Takeno M, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional Bach 1 [J]. Cancer Sci, 2010, 101(6): 1409-1416.
- [11] Rushworth SA, MacEwan DJ. HO-1 underlies resistance of AML cells to TNF-induced apoptosis [J]. Blood, 2008, 111(7): 3793-3801.
- [12] Zhe N, Wang J, Chen S, et al. Heme oxygenase-1 plays a crucial role in chemoresistance in acute myeloid leukemia [J]. Hematology, 2015, 20(7): 384-391.

(下转第 42 页)

- [11] Blanco S, Hernández R, Franchelli G, et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage [J]. Nitric Oxide, 2017, 62(1): 32-43.
- [12] Yong Y, Guo J, Zheng D, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates brain injury in a mouse model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via the AKT/eNOS pathway [J]. Life Sci, 2019, 235(8): 116821-116829.
- [13] Liu H, Wei X, Chen L, et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat by an antioxidant action via inhibition of NADPH oxidase and iNOS expression [J]. Pharmacology, 2013, 92(3-4): 198-206.
- [14] 王星, 杨峻岭, 樊秀娟, 等. GCH1 基因、BH4 对疼痛的作用机制研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(16): 44-47.
- [15] McNeill E, Crabtree MJ, Sahgal N, et al. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 206-216.
- [16] Li W, Yang Y, Hu Z, et al. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. Front Neuroanat, 2015, 9: 48.
- [17] Yan Y, Tong F, Chen J. Endogenous BMP-4/ROS/COX-2 mediated IPC and resveratrol alleviated brain damage [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(9): 1030-1039.
- [18] Qi J, Rong Y, Wang L, et al. Rab7b overexpression-ameliorated ischemic brain damage following tMCAO involves suppression of TLR4 and NF- κ B p65 [J]. J Mol Neurosci, 2019, 68(2): 163-170.
- [19] Fang H, Li HF, Yang M, et al. NF- κ B signaling pathway inhibition suppresses hippocampal neuronal apoptosis and cognitive impairment via RCAN1 in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. Cell Cycle, 2019, 18(9): 1001-1018.
- [20] Vasilikos L, Spilgies LM, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins [J]. Immunol Cell Biol, 2017, 95(2): 160-165.

[收稿日期]2021-03-10

(上接第 13 页)

- [13] Wei S, Wang Y, Chai Q, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of heme oxygenase-1 silencing on the survival of acute myelocytic leukemia-M2 cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 931-940.
- [14] 张坤, 徐昊森, 程涓, 等. 尾静脉注射 HL60/HL60/ADR 细胞建立 SCID beige 小鼠白血病动物模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 43-51.
- [15] 尹君, 李景丁莎, 左从林, 等. 人源性肝癌细胞小鼠原位移植瘤模型的建立及特点的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 68-74.
- [16] 杨红, 刘建兴, 周泽平, 等. 应用 SCID 和 NOD/SCID 小鼠构建急性髓系白血病模型成瘤率的比较 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 328-334.
- [17] Shan WL, Ma XL. How to establish acute myeloid leukemia xenograft models using immunodeficient mice [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(12): 7057-7063.
- [18] Wu J, Zhang J, Jiang M, et al. Comparison between NOD/SCID mice and BALB/c mice for patient-derived tumor xenografts model of non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 6695-6703.
- [19] Shang Z, Wang J, Wang D, et al. Establishment of xenotransplantation model of human CN-AML with FLT3-ITD (mut)/NPM1 (-) in NOD/SCID mice [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013, 33(3): 329-334.
- [20] Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(12): 2099-2117.
- [21] Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice [J]. Int J Cancer, 2007, 120(3): 500-505.
- [22] Podkalicka P, Mucha O, Józkowicz A, et al. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2018, 22(1): 23-32.
- [23] Herrmann H, Kneidinger M, Cerny-Reiterer S, et al. The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on CD34⁺/CD38⁺ and CD34⁺/CD38⁻ AML progenitor cells [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(1): 51-63.
- [24] Hassan N, Yang J, Wang JY. An improved protocol for establishment of AML patient-derived xenograft models [J]. STAR Protoc, 2020, 1(3): 100156.

[收稿日期]2020-10-28