

## · 论著 ·

## 阿扎胞苷联合三氧化二砷对骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1作用的分子机制分析\*

吴志敏\* 魏秀丽

新乡第一人民医院血液内科(河南 新乡 453000)

**【摘要】目的** 探讨阿扎胞苷联合三氧化二砷( $As_2O_3$ )对骨髓增生异常综合征(MDS)细胞株SKM-1作用的分子机制。**方法** 取SKM-1培养,分为4组,分别予以阿扎胞苷、 $As_2O_3$ 、阿扎胞苷联合 $As_2O_3$ ,并设空白对照。48h后,采用基因组转录测序检测差异基因表达;利用基因本体(GO)富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集进行生信分析;构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI);提取总蛋白筛选差异表达的蛋白质。**结果** 与空白对照组比较,阿扎胞苷组有302个基因下调、106个基因上调, $As_2O_3$ 组有107个基因下调、91个基因上调,联合组有406个基因下调、169个基因上调;生信分析显示,在分子功能、细胞组分、生物进程方面均有差异基因表达,差异表达基因涉及人类免疫缺陷病毒I型(HIV I)感染、急性髓细胞白血病(AML)、细胞外基质(ECM)受体相互作用、白介素-17(IL-17)信号通路、同源重组、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-丝氨酸激酶(Akt)信号通路、血小板活化、Ras信号通路、脂质与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、人巨细胞病毒感染、癌症中的mRNA、肾细胞癌、核质转运、内质网中的蛋白质加工、低氧诱导因子(HIF-1)信号通路、胰岛素信号通路、非洲淋巴瘤细胞瘤(EB)病毒感染、肌萎缩侧索硬化症、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路;阿扎胞苷和 $As_2O_3$ 共同作用MDS的靶点有98个;阿扎胞苷和 $As_2O_3$ 作用于MDS的PPI共包括66个节点、222条边,筛选出功能聚合最显著的子网络有6个。**结论** 阿扎胞苷和 $As_2O_3$ 均能通过多种途径治疗MDS,二者联合的作用分子机制涉及HIV I感染、AML、ECM受体相互作用等。

**【关键词】** 阿扎胞苷; 三氧化二砷; 骨髓增生异常综合征; 转录组; 蛋白质组学

**【中图分类号】** R963

**【文献标识码】** A

**【基金项目】** 河南省医学科技攻关计划(LHGJ20200961)

**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2025.5.049

## Molecular Mechanism Analysis of the Effect of Azacytidine Combined with Arsenic Trioxide on MDS Cell Line SKM-1\*

WU Zhi-min\*, WEI Xiu-li.

Department of Hematology, Xinxiang First People's Hospital, Xinxiang 453000, Henan Province, China

**Abstract: Objective** To explore the molecular mechanism of the effect of azacytidine combined with arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) on bone marrow dysplastic syndrome (MDS) cell line SKM-1. **Methods** SKM-1 cells were cultured and divided them into 4 groups, which were given azacytidine,  $As_2O_3$ , and azacytidine combined with  $As_2O_3$  separately, and a blank control was set up. 48 hours later, differential gene expressions were detected using genomic transcriptome sequencing. Bioinformatics analysis was performed using Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment. A protein-protein interaction network (PPI) was constructed, and total proteins were extracted to screen for differentially expressed proteins. **Results** Compared with the blank control group, the azacytidine group had 302 genes down regulated and 106 genes up regulated, the  $As_2O_3$  group had 107 genes down regulated and 91 genes up regulated, and the combined group had 406 genes down regulated and 169 genes up regulated. Bioinformatics analysis showed that there were differential gene expressions in molecular function, cellular components, and biological processes. The differentially expressed genes involve human immunodeficiency virus type I (HIV I) infection, acute myeloid leukemia (AML), extracellular matrix (ECM) receptor interactions, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, homologous recombination, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) serine kinase (Akt) signaling pathway, platelet activation Ras signaling pathway, lipid and atherosclerosis, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, human cytomegalovirus infection, mRNA in cancer, renal cell carcinoma, nuclear cytoplasmic transport, protein processing in endoplasmic reticulum, hypoxia inducible factor (HIF-1) signaling pathway, insulin signaling pathway, African lymphoblastoma (EB) virus infection, amyotrophic lateral sclerosis, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. There were 98 targets for the combined action of azacytidine and  $As_2O_3$  in MDS. The PPI of azacytidine and  $As_2O_3$  acting on MDS included 66 nodes and 222 edges, and 6 sub networks with the most significant functional aggregation were selected. **Conclusion** Azacytidine and  $As_2O_3$  can both treat MDS through multiple pathways, and the molecular mechanisms of their combined action involve HIV I infection, AML, ECM receptor interactions, and so on.

**Keywords:** Azacytidine; Arsenic Trioxide; Myelodysplastic Syndrome; Transcriptome; Proteomics

骨髓增生异常综合征(MDS)是一种顽固性血液病,指起源于造血干细胞的一组异质性髓系克隆疾病,以难治性白细胞减少、无效造血等为主要表现<sup>[1]</sup>。虽然该病总体发病率并不高,但治疗难度大、死亡率高<sup>[2]</sup>。阿扎胞苷是一种属于胞嘧啶核苷酸类似物的去甲基化药物,可诱导脱氧核糖核酸(DNA)去甲基化,并对骨髓造血细胞产生细胞毒作用,常用于治疗MDS、急性髓系白血病等<sup>[3-4]</sup>。三氧化二砷( $As_2O_3$ )可破坏谷胱甘肽的

线粒体膜电位,促使幼稚粒细胞凋亡。有研究<sup>[5]</sup>指出,阿扎胞苷联合 $As_2O_3$ 治疗难治性贫血型MDS可提高血小板计数,降低血管内皮生长因子(VEGF)水平,提示该方案在MDS患者中有效。但阿扎胞苷联合 $As_2O_3$ 治疗MDS的可能分子机制尚未完全清楚。基于此,本研究取MDS细胞株SKM-1进行分组实验,并实施基因测序、生信分析和蛋白质组学分析,见如下报道。

【第一作者】吴志敏,女,主治医师,主要研究方向:血液内科。E-mail: lvnhp5@163.com

【通讯作者】吴志敏

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 细胞来源：MDS细胞株SKM-1，上海钰博生物科技有限公司，货号：YB-H0754。

药品与试剂：阿扎胞苷(四川汇宇制药，规格：100mg)； $As_2O_3$ (北京双鹭药业，规格：10mg)；10%胎牛血清(苏州千舍生物科技有限公司，规格：500mL，货号：SFBE)；RPMI1640培养基(美国Thermo Fisher公司，规格：10×500mL，货号：11875119)；二甲基亚砜(DMSO)(上海善然生物科技有限公司，规格：100mL，货号：D5879)；Trizol试剂(美国Invitrogen公司，规格：100mL，货号：15596026)；二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(上海联迈生物工程，规格：5mg/mL，货号：LM2020)。

设备：8600型二氧化碳( $CO_2$ )培养箱(上海天美仪拓实验室设备)；FQD-96A型聚合酶链反应(PCR)仪(杭州博日科技有限公司)；DYCZ-26C型双向凝胶电泳仪(2-DE)(北京六一仪器厂)；PrismaPro型质谱仪(普发真空技术公司)。

**1.2 方法** 细胞培养、分组与处理：取SKM-1细胞株以RPMI1640培养基(含10%胎牛血清)培养， $CO_2$ 培养箱参数：5%  $CO_2$ 、37℃。2~3d换液1次，消化传代。待处于对数生长期，接种至96孔板，细胞密度 $1 \times 10^5$ 个/mL，每孔100μL。分4组，分别加入阿扎胞苷、 $As_2O_3$ 、阿扎胞苷联合 $As_2O_3$ ，各组药物均以DMSO溶解，终浓度均为50mmol/L，每孔均加入。另设置空白对照组(加等量DMSO)。按上述条件培养48h。

基因测序和差异表达基因筛选、生信分析：(1)取细胞采用Trizol试剂提取总核糖核酸(RNA)，进行信使核糖核酸(mRNA)富集、合成双链互补的脱氧核糖核酸(cDNA)，对末端修复、选择片段并进行PCR扩增、文库检测、Illumina上机测序，控制数据质量，定量检测基因表达。采用BioConductorRNA-seq工作流程鉴定差异表达基因，阈值设置为 $P < 0.05$ 、 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 2$ ；(2)差异表达基因的生信分析：采用DAVID数据库进行差异表达基因的基因本体(GO)富集分析，并采用京都基因与基因组百科全书(KEGG)进行信号通路富集分析。(3)相互作用分析：利用String数据库，输入差异表达基因，采用Cytoscape 3.9.1软件分析蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)，筛选关键差异蛋白，了解可能的相互作用机制。

蛋白质组学检测分析：取细胞提取总蛋白，取200μg实施2-DE，采用Image5.0软件扫描并分析图片，寻找差异点，阈值：蛋白表达差异 $\geq 2$ 倍。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)筛选差异表达蛋白。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 19.0软件。Newman-Keuls检验差异蛋白。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

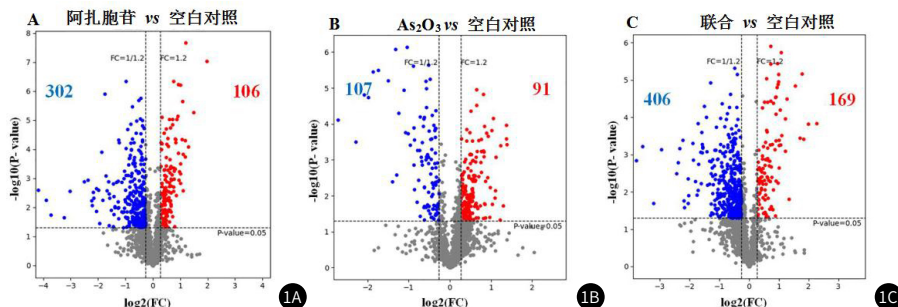
## 2 结果

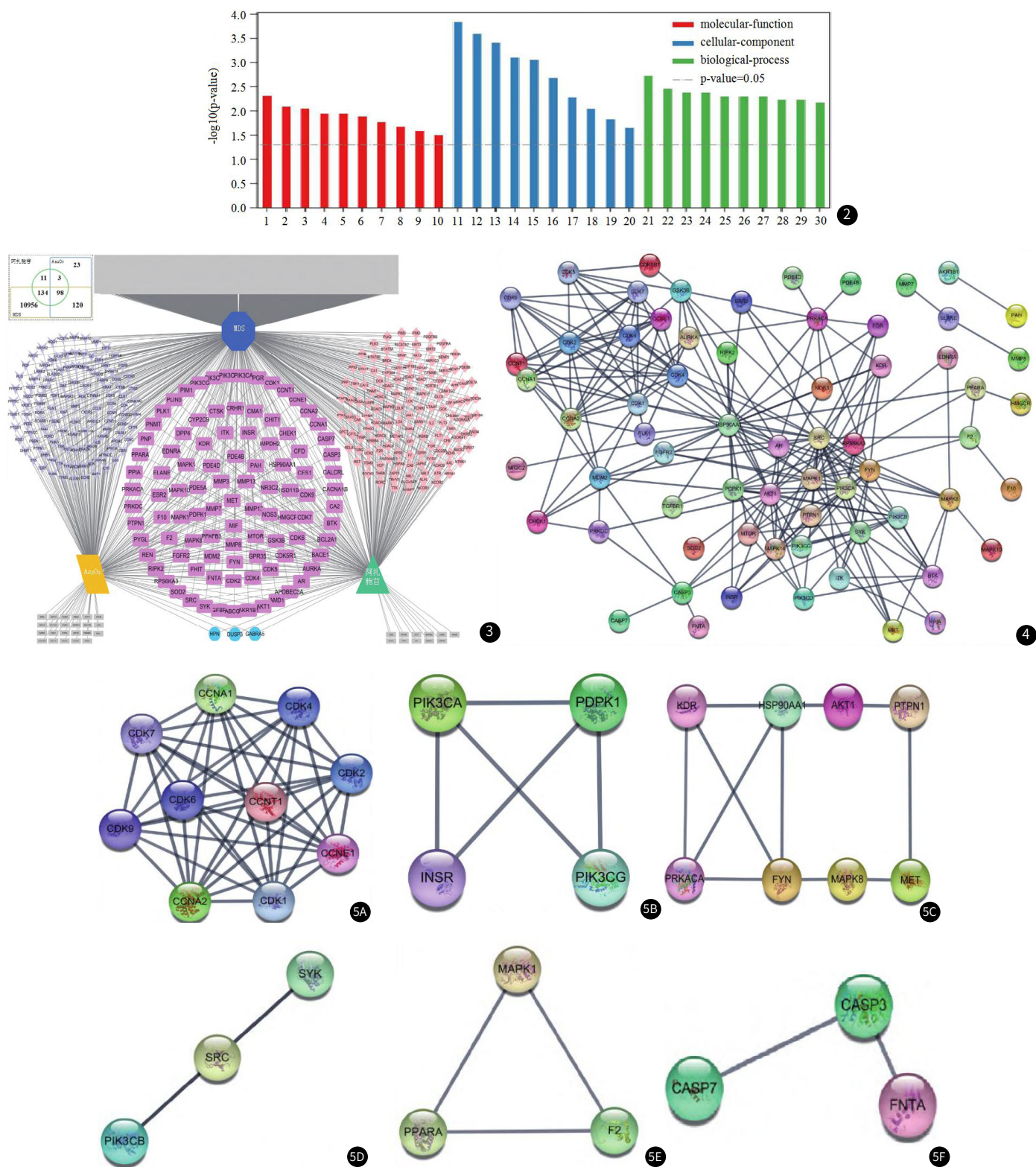
**2.1 差异表达基因筛选** 与空白对照组比较，阿扎胞苷组有302个基因下调、106个基因上调， $As_2O_3$ 组有107个基因下调、91个基因上调，联合组有406个基因下调、169个基因上调，火山图见图1。

GO富集分析显示，在分子功能、细胞组分、生物进程方面均有差异基因表达，具体见图2；KEGG富集分析显示，差异表达基因涉及人类免疫缺陷病毒I型(HIV I)感染、急性髓细胞白血病(AML)、细胞外基质(ECM)受体相互作用、白介素-17(IL-17)信号通路、同源重组、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)-丝氨酸激酶(Akt)信号通路、血小板活化、Ras信号通路、脂质与动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、人巨细胞病毒感染、癌症中的mRNA、肾细胞癌、核质转运、内质网中的蛋白质加工、低氧诱导因子(HIF-1)信号通路、胰岛素信号通路、非洲淋巴细胞瘤(EB)病毒感染、肌萎缩侧索硬化症、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路；String蛋白作用分析显示，阿扎胞苷和 $As_2O_3$ 共同作用MDS的靶点有98个，见图3。

注：1~10代表分子功能，分别为蛋白质跨膜转运蛋白活性、免疫抑制剂(FK506)结合、微管相关蛋白(MAP)激酶活性、前蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶激活剂活性、核糖核酸酶活性、过渡金属离子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、谷氨酰转氨酶(GTP)结合、缩水甘油基丙酰基顺反异构酶活性、支架蛋白结合；11~20代表细胞组分，分别为细胞外分泌体、细胞外基质、角质包膜、血液微粒、细胞外区域、细胞外空间、光受体盘膜、间隙连接、细胞桥粒、血小板α颗粒管腔；21~30代表生物进程，分别为粒作用、角质化、儿茶酚胺刺激的细胞反应、胎盘血管发育、早期内体到晚期内体翻译的调控、其他生物体中的预分解、迷路层血管发育、面部发育、腺苷酸环化酶激活多巴胺受体、补体激活。

**2.2 差异表达蛋白筛选** PPI见图4，阿扎胞苷和 $As_2O_3$ 作用于MDS的PPI共包括66个节点、222条边，筛选出功能聚合最显著的子网络有6个，其中聚类子网络1包括10个节点、43条边，聚类子网络2包括4个节点、5条边，聚类子网络3包括8个节点、11条边，聚类子网络4包括3个节点、2条边，聚类子网络5包括3个节点、3条边，聚类子网络6包括3个节点、2条边，见图5。





**图1** 差异表达基因筛选火山图。注：图1A：阿扎胞苷与空白对照比较；图1B：As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>与空白对照比较；图1C：联合与空白对照比较。蓝点代表下调基因，红点代表上调基因，灰点代表无改变基因。**图2** 差异表达基因的GO富集分析柱状图。**图3** 阿扎胞苷和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在MDS中蛋白作用网络图。**图4** 阿扎胞苷和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在MDS中PPI分析。**图5** 功能聚合最显著的子网络，注：图5A：聚类子网络1；图5B：聚类子网络2；图5C：聚类子网络3；图5D：聚类子网络4；图5E：聚类子网络5；图5F：聚类子网络6。2.2差异表达基因的生信分析。

### 3 讨论

MDS患者多见进行性骨髓衰竭，最终会发展为AML，对患者的身心健康可产生极大的威胁<sup>[6-7]</sup>。然而MDS患者的转白率有明显差异，且生物学特征不同、病情进展速度也不同，但是

该病发生及进展的基本机制目前尚不明确。另一方面，临床上仍缺乏特异性的、高效的MDS治疗方案，了解其中的分子机制有利于研发新药物、优化治疗措施<sup>[8]</sup>。故而差异基因筛选、差异蛋白表达检测及生信分析在MDS患者中十分必要。

阿扎胞苷属于一种胞嘧啶核苷类似物,可抑制异常增生细胞的生长与增殖,杀灭癌细胞,在MDS、单核细胞白血病与AML等患者中均使用<sup>[9]</sup>。有报道<sup>[10]</sup>指出,使用阿扎胞苷可抑制DNA甲基转移酶的活性,并作用于新合成的DNA甲基化进程。也有研究<sup>[11]</sup>认为,阿扎胞苷可抑制核苷代谢,从而达到杀灭肿瘤细胞的目的,对中危2-/高危MDS患者有效。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>能诱导和促进早期幼稚粒细胞凋亡,主要是通过谷胱甘肽线粒体膜电位受损发挥作用的,不仅能够治疗MDS,同时对AML、急性早幼粒细胞白血病复发等也有效<sup>[12-13]</sup>。为了增强疗效,临床上针对MDS患者常联合用药,而阿扎胞苷与As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>联用的效果已得到肯定<sup>[14-15]</sup>。尽管二者治疗MDS分子作用途径有所差异,但是二者单独及联合对MDS的作用分子机制并不完全明确。

本研究筛选差异表达基因发现,阿扎胞苷组有302个基因下调、106个基因上调,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>组有107个基因下调、91个基因上调,联合组有406个基因下调、169个基因上调,提示阿扎胞苷和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>均能对MDS产生多方面作用,且二者联合还可产生新的分子作用途径;经生信分析发现,二者作用途径涉及分子功能、细胞组分、生物进程3个方面,且差异表达基因涉及HIV I感染、AML、ECM受体相互作用、IL-17信号通路、同源重组、PI3K-Akt信号通路、血小板活化、Ras信号通路、脂质与动脉粥样硬化、TNF信号通路、人巨细胞病毒感染、癌症中的mRNA、肾细胞癌、核质转运、内质网中的蛋白质加工、HIF-1信号通路、胰岛素信号通路、EB病毒感染、肌萎缩侧索硬化症和VEGF信号通路,与既往关于MDS差异表达基因筛选结果<sup>[16-17]</sup>均一致,也印证了阿扎胞苷、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>适用于MDS患者。此外,本研究还显示,阿扎胞苷和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>共同作用MDS的靶点有98个,PPI分析发现二者作用MDS包括66个节点、222条边,筛选出功能聚合最显著的子网络有6个,与二者的分子作用机制与既往报道<sup>[18-20]</sup>也基本一致。另外本研究创新性发现了阿扎胞苷联合As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用MDS可能的分子机制,有助于更深入了解其药理作用,也可指导临床推广。

综上所述,阿扎胞苷治疗MDS可下调302个基因、上调106个基因,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可下调107个基因、上调91个基因,二者联合可下调406个基因、上调169个基因,且作用涉及分子功能、细胞组分、生物进程3个方面,差异表达基因涉及HIV I感染、AML、ECM受体相互作用等多种分子机制,并经过PPI分析筛选出蛋白作用网络与功能聚合最显著的子网络。但是本研究仍有不足:(1)本研究筛选出的差异表达基因、差异表达蛋白均未经验证;(2)阿扎胞苷联合As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对MDS的作用分子途径尚需要更精准筛选。建议后期重点探讨上述问题,为该方案的推广应用及优化研究提供新思路

## 参考文献

- [1] Rudelius M, Weinberg OK, Niemeyer CM, et al. The International Consensus Classification (ICC) of hematologic neoplasms with germline predisposition, pediatric myelodysplastic syndrome, and juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Virchows Arch*, 2023, 482(1): 113-130.
- [2] Bazinet A, Bravo GM. New approaches to myelodysplastic syndrome treatment[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2022, 23(5): 668-687.

- [3] Montesinos P, Recher C, Vives S, et al. Ivosidenib and azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(16): 1519-1531.
- [4] Wang ES, Montesinos P, Minden MD, et al. Phase 3 trial of gilteritinib plus azacitidine vs azacitidine for newly diagnosed FLT3mut+AML ineligible for intensive chemotherapy[J]. *Blood*, 2022, 140(17): 1845-1857.
- [5] Chen J, Jin Z, Zhang S, et al. Arsenic trioxide elicits prophylactic and therapeutic immune responses against solid tumors by inducing necroptosis and ferroptosis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(1): 51-64.
- [6] Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98(8): 1307-1325.
- [7] Watts JM, Baer MR, Yang J, et al. Olutasidenib alone or with azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome: phase 1 results of a phase 1/2 trial[J]. *Lancet Haematol*, 2023, 10(1): e46-e58.
- [8] Lee WH, Lin CC, Tsai CH, et al. Clinico-genetic and prognostic analyses of 716 patients with primary myelodysplastic syndrome and myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia based on the 2022 international consensus classification[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98(3): 398-407.
- [9] Pollyea DA, DiNardo CD, Arellano ML, et al. Impact of venetoclax and azacitidine in treatment-naïve patients with acute myeloid leukemia and IDH1/2 mutations[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(13): 2753-2761.
- [10] Kadia TM, Reville PK, Wang X, et al. Phase II study of venetoclax added to cladribine plus low-dose cytarabine alternating with 5-azacitidine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(33): 3848-3857.
- [11] Pratz KW, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Measurable residual disease response and prognosis in treatment-naïve acute myeloid leukemia with venetoclax and azacitidine[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(8): 855-865.
- [12] Paul NP, Galván AE, Yoshinaga-Sakurai K, et al. Arsenic in medicine: past, present and future[J]. *Biomaterials*, 2023, 36(2): 283-301.
- [13] Wang HY, Gong S, Li GH, et al. An effective and chemotherapy-free strategy of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia in all risk groups (APL15 trial)[J]. *Blood Cancer J*, 2022, 12(11): 158.
- [14] 谢伟成, 程淑琴, 曲红, 等. 阿扎胞苷联合三氧化二砷治疗难治性贫血型MDS的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(1): 74-77.
- [15] 张秀娟. 阿扎胞苷治疗老年中高危骨髓增生异常综合征的疗效和安全性分析[J]. *中国现代药物应用*, 2022, 16(14): 37-40.
- [16] Garcia-Ruiz C, Martínez-Valiente C, Cordon L, et al. Concurrent Zrsr2 mutation and Tet2 loss promote myelodysplastic neoplasm in mice[J]. *Leukemia*, 2022, 36(10): 2509-2518.
- [17] Huang X, Liang X, Zhu S, et al. Expression and clinical significance of RAG1 in myelodysplastic syndromes[J]. *Hematology*, 2022, 27(1): 1122-1129.
- [18] Yamamoto K, Shinagawa A, DiNardo CD, et al. Venetoclax plus azacitidine in Japanese patients with untreated acute myeloid leukemia ineligible for intensive chemotherapy[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2022, 52(1): 29-38.
- [19] Ivanov V, Yeh SP, Mayer J, et al. Design of the VIALE-M phase III trial of venetoclax and oral azacitidine maintenance therapy in acute myeloid leukemia[J]. *Future Oncol*, 2022, 18(26): 2879-2889.
- [20] Sun J, Cheng M, Ye T, et al. Nanocarrier-based delivery of arsenic trioxide for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2022, 17(26): 2037-2054.

(收稿日期: 2024-02-15)

(校对编辑: 赵望淇)