



基于小分子活性化合物的白血病细胞分化与凋亡信号机制

陈国强, 张晶, 赵倩

上海交通大学医学院细胞分化与凋亡教育部重点实验室/病理生理学教研室, 上海高校化学生物学 E-研究院, 上海 200025

中国科学院上海生命科学研究院-上海交通大学医学院健康科学研究所, 上海 200025

E-mail: chengq@shsmu.edu.cn; gqchen@sibs.ac.cn

2009-05-21 收稿, 2009-07-29 接受

国家高技术研究发展计划(批准号: 2008AA02Z301)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB918400, 2002CB512800)、国家自然科学基金(批准号: 90813034, 30500215, 30600216, 30800452)、中国科学院知识创新工程重要方向性研究(批准号: KSCX2-YW-R-097)和上海市科学技术委员会重点项目(批准号: 08JC1413700, 08JC1413500)资助

摘要 急性髓细胞性白血病(AML)是一种异质性的血液恶性肿瘤,也是发生在成年人中最普遍的急性白血病。过去20年间,对于AML的病理生理学的认识和治疗学等方面取得显著进展。尤其是全反式维甲酸(ATRA)和三氧化二砷(As_2O_3)治疗急性早幼粒细胞性白血病(APL)的成功实践,为许多AML病人带来了生存希望。与此同时,以靶标特异的活性小分子化合物为探针研究重要细胞生命活动规律为主要目的的化学生物学手段,大大地推动了白血病的分子发病学研究和靶向治疗的进步。本文主要以本课题组的工作为重点,对过去10多年中,我国学者在相关研究工作中取得的一些进展作一总结和展望。

关键词
小分子化合物
白血病
细胞分化
凋亡

急性髓细胞性白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种异质性的血液恶性肿瘤,也是发生在成年人中最普遍的急性白血病。业已清楚,细胞遗传学改变尤其是染色体易位产生的异常融合蛋白,如t(15;17)易位产生的PML-RAR α 等通过阻止造血细胞分化在某一阶段并伴随增殖失控和(或)凋亡缺陷等在相应类型的AML发病学上占有重要地位。与此同时,对于AML病人的治疗也获得长足发展。尤其是,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)和砷化合物,如三氧化二砷(As_2O_3)治疗急性早幼粒细胞性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL, 也称M3型AML)的成功实践为许多AML病人带来了生存希望。为此,深入研究白血病细胞生命活动的分子机制,挖掘新的抗白血病药物靶标显得十分重要。与此同时,由于白血病的取材方便,疗效易于观察的“特有”优

势,以靶标特异的活性小分子化合物为探针研究重要细胞生命活动规律为主要目的的化学生物学手段大大地推动了白血病的分子发病学研究和靶向治疗的进步^[1]。本文试图对过去10多年中,包括本课题组在内的我国学者在相关研究中取得的一些进展作一总结和展望。

1 基于ATRA的AML细胞分化机制的发现

自从20世纪80年代中期,上海血液学研究所报告ATRA通过诱导分化有效治疗APL病人^[2,3],并得到国际同行的广泛证实以来,以ATRA(一种维生素A的代谢物)为小分子探针的工作大大地推动了AML发病学和白血病细胞分化机制的研究^[4-6]。在相关基础研究中,我国学者也作出了重要贡献。例如,早在1995年,Zhu等人^[7]分析三种维甲酸同分异构体即ATRA,13-顺式RA和9-顺式维甲酸对APL细胞系

引用格式: 陈国强, 张晶, 赵倩. 基于小分子活性化合物的白血病细胞分化与凋亡信号机制. 科学通报, 2009, 54: 2759~2765

Chen G Q, Zhang J, Zhao Q. Active compounds-based discoveries about the differentiation and apoptosis of leukemic cells. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0628-y

NB4 细胞的诱导分化效应时,报道了维甲酸改变 PML-RAR α 的细胞内定位. 通过差示(DD-)PCR 技术, Mao 等人^[9]分离了种新的与鼠 LY-6 多基因家族同源的 ATRA 上调基因 RIG-E. 随后,该课题组联合应用 cDNA 芯片、抑制性减数杂交 (suppression-subtractive hybridization) 和 DD-PCR 技术,识别 169 个受 ATRA 调控的基因,包括 8 个新基因^[9]. 其他课题组也发现一些受 ATRA 调控的基因,如 JWA 等^[10]. 最近, Wang 等人^[11]应用 cDNA 阵列分析了由天然和合成维甲酸(ATRA, RII 和 R9158)处理的 AML 细胞系 HL60 的基因表达谱的变化,提出维甲类化合物与细胞分化和毒性的构效关系. 此外,利用 ATRA 诱导的细胞分化为模型揭示了 cAMP/蛋白激酶 K 信号途径^[12]、NDRG1 (N-Myc downstream-regulated gene 1)^[13]和 CD44^[14]等在 AML 细胞分化中的作用.

1997 年, Zhou 等人^[15]自人类红细胞膜上分离出一种分子量为 35 kD 的蛋白质,并在白血病细胞系 K-562 的 cDNA 文库中克隆到该蛋白质的编码基因,称为磷脂爬行酶 1(phospholipid scramblase, PLSCR1),因为最初的研究显示它催化细胞膜磷脂的双向跨膜运动. 最近,我们也发现 ATRA 能显著上调 PLSCR1 在 ATRA 敏感的 APL 细胞系 NB4 和 HL-60,但不在对 ATRA 耐药的 NB4-LR1 细胞中的表达. 同时,在 ATRA 和佛波酯(PMA)诱导的单核细胞分化中,也伴随 PLSCR1 的表达显著升高,然而在二甲基亚砜(DMSO)、丁酸钠和维生素 D3 诱导的 AML 细胞系 U937 细胞分化中,PLSCR1 的表达不变或仅有轻微上调^[16]. 据文献报道,ATRA 和 PMA 可以活化蛋白激酶 (PKC) δ ,而 DMSO 和维生素 D3 则不能^[17]. 我们发现 PKC δ 特异性抑制剂 rottlerin 能有效降低 ATRA 和 PMA 诱导的 PLSCR1 的表达,而外源性表达活性形式的 PKC δ 则可直接上调 PLSCR1 的表达^[16]. 2000 年, Zhou 等人^[18]报告干扰素(IFN)能诱导人纤维肉瘤细胞系 HT1080 高表达 PLSCR1,并在 18 h 到高峰. 但是, IFN 并不诱导 STAT1(signal transducers and activators of transcription-1)缺陷的 HT1080 突变细胞系 U3A 表达 PLSCR1. 在此基础上,我们发现 IFN α 通过 PKC- δ 依次活化 JNK 和 STAT1 信号通路上调 PLSCR1 的表达^[19]. 与此同时,利用小分子 RNA 干预(siRNA)技术发现,降低 U937 细胞中 PLSCR1 的表达可以显著抑制 ATRA/ PMA 诱导的 U937 白血病细胞分化;相反,

在经四环素撤除(Tet-off)诱导表达 PLSCR1 的稳转白血病细胞系中, PLSCR1 的诱导表达明显诱导细胞发生 G1 期阻滞,并诱导细胞分化和增强细胞对于鬼臼毒素(etoposide)的凋亡敏感性^[20]. 据此,我们提出 PLSCR1 能够通过引起细胞增殖阻滞、诱导细胞分化以及增强细胞对化疗药物的凋亡敏感性而发挥其抗白血病的生物学功能^[20]. 有趣的是,我国学者也在这些研究工作的基础上发现 Wogonin (一种自中草药黄芩素根部分离的天然化合物)也通过上调 PLSCR1 的表达诱导 AML 细胞分化^[21].

2 从 As₂O₃ 到低氧模拟化合物的研究

自 1971 年以来,哈尔滨医科大学在临床实践中发现 As₂O₃ 能治疗某些类型的白血病,尤其对 APL 有效. 1992 年,孙鸿德等人报道^[22]以 As₂O₃ 为主体的癌灵 1 号结合中医辨证治疗 32 例 APL 病人,结果 21 例达完全缓解. 尤其重要的是,经 As₂O₃ 诱导缓解的 APL 病人的 5 年和 10 年生存率分别达 50% 和 28.8%. 1996 年,张鹏等人^[23]报告在应用纯氧化砷注射液治疗的 30 例 APL 初发和 42 例复发病人中, (complete resolution) 率分别达 73.3% 和 52.3%, 有效率分别达 90% 和 64.2%. 1994 年以来,上海血液学研究所与哈尔滨医科大学合作开展 As₂O₃ 注射液治疗对 ATRA 和常规化疗药物耐药的 APL 复发病人的研究,获得令人鼓舞的结果^[24,25], 随后世界许多国家的临床研究中心开始相关研究,几乎一致证实 As₂O₃ 治疗 APL 的有效性. 于是, As₂O₃ 治疗 APL 的机制研究成为新的国际血液学和肿瘤学研究热点. 早在 1996 年,我们就报道 As₂O₃ 诱导 APL 细胞凋亡,并调变 APL 特异的 PML-RAR α 蛋白^[26]. 随后对于 As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡的效应谱和分子机制进行了比较深入的体外研究,发现其凋亡诱导效应并不局限于 APL. 但是,临床实验显示它似乎并不在其他 AML 或实体瘤呈现治疗效果. 有趣的是,在应用治疗 APL 过程中,病人体内的白血病细胞出现分化^[33]. 这些研究结果提示,体内分化诱导效应与 As₂O₃ 有效治疗 APL 密切相关. 基于体内末梢组织的氧浓度低于 5%, 而体外培养细胞处于 95% 的空气中以及临床病理研究显示骨髓微血管密度和血清血管内皮生长因子(VEGF)含量与 AML 病人的预后密切相关等事实,我们假设体内氧浓度可能影响 As₂O₃ 的诱导分化效应,研究在应用低氧模拟化合物包括氯化钴(CoCl₂)和去铁胺(DFO)等可能对 As₂O₃ 诱导 APL 细胞分化效应的

影响。结果发现,非毒性剂量的 CoCl_2 或在 2%~3% 的低氧环境下,白血病细胞系 NB4 和 U937 细胞和部分 AML 病人的新鲜白血病细胞出现明显的形态和功能分化;同时, CoCl_2 本身不影响 PML-RAR α 融合蛋白在细胞内的分布形式,也不引起 PML-RAR α 融合蛋白的降解或剪切,但它可以加速 ATRA 引起的 PML-RAR α 蛋白的剪切^[34]。在应用移植转基因小鼠产生的可移植性 APL 小鼠模型,间歇性低氧也明显延长小鼠生存时间,并明显抑制白血病细胞在体内的浸润,并有效诱导白血病细胞分化^[35]。随后,采用了蛋白质组学技术,通过二维电泳和质谱技术分离并鉴定出许多在低氧处理 U937 时发生明显变化的蛋白质^[36]。

大量研究表明,细胞内氧稳态的分子调控可以发生在任何水平上,包括基因转录、蛋白质翻译及翻译后修饰等。其中,低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)发挥重要作用。HIF-1 由 α 和 β 亚基组成。其中, HIF-1 α 是依赖于低氧而存在的转录因子,它在维持氧浓度平衡中起着举足轻重的作用。在正常氧条件下,各种组织虽然表达 HIF-1 α mRNA,但是 HIF-1 α 蛋白因快速降解而缺失。已知 HIF-1 α 存在一个结合抑癌蛋白 Von Hippel Lindar (VHL)的结构域。VHL 是一个多蛋白复合体,具有 E3 泛素连接酶活性。它与 HIF-1 α 的结合导致 HIF-1 α 泛素化,并被细胞内的蛋白酶体系统降解。HIF-1 α 的 564 位和 402 位脯氨酸的羟化状态调节 α 亚单位与 VHL 的结合能力,而涉及这个羟化反应的酶活性需要氧气、二价铁离子等的参与。因此,在有氧条件下, HIF-1 α -4-脯氨酰羟化酶因 O_2 的存在而激活,使 HIF-1 α 中的 564 位脯氨酸残基羟化。VHL 上的 E3 泛素连接酶结合脯氨酸羟化的 HIF-1 α , 引发 HIF-1 α 的降解。相反,低氧时, HIF-1 α -4-脯氨酰羟化酶的活性因为氧的缺少而受到抑制,因此 HIF-1 α 则不能被羟化,亦不能被 VHL 识别。于是, HIF-1 α 聚集并通过其核定位信号转移至细胞核与胞核内持续表达的 HIF-1 β (也称 ARNT)亚单位结合形成异二聚体。后者与靶基因的低氧反应元件(HRE, 5'-RCGTG-3')结合,启动某些基因,如 VEGF, EPO 等的转录活性,通过增加新生血管形成,调节葡萄糖代谢及转移,降低氧耗量等,使细胞内、组织内的缺氧状态得到改善。迄今为止,已经发现 100 多个基因受到 HIF-1 调节。最近,我们也在利用蛋白质组学分析技术的基础上,发现两个新的 HIF-1 靶基因^[37]。这些基因主要涉及

血管形成、血管重建、葡萄糖和能量代谢、细胞的增殖及存活、红细胞生成以及维持内环境离子的稳定性等。

基于已有报道显示,促进 HIF-1 α 蛋白降解的羟化酶除了需要氧之外,也需要铁离子作为辅因子的事实,我们进一步研究具有低氧模拟效应的铁离子螯合剂——去铁胺(desferrioxamine, DFO)的潜在效应,发现非毒性浓度的 DFO 的确在稳定 HIF-1 α 蛋白的同时,促进 AML 细胞 NB4 和 U937 向粒系分化^{EN.CITE},而钒酸盐抑制 DFO 诱导的 HIF-1 α 蛋白稳定和 PI3 激酶抑制剂抑制 HIF-1 α 的表达则明显阻止 DFO 诱导的 AML 细胞分化^[39]。利用 Tet-off 系统,建立诱导表达 HIF-1 α 的白血病细胞系 U937^{HIF-1 α} 。结果显示,在 U937^{HIF-1 α} 细胞中诱导表达 HIF-1 α 本身就可以显著地诱导细胞分化,并抑制其增殖。利用 siRNA 技术特异性地抑制 HIF-1 α 在 U937 或 U937^{HIF-1 α} 细胞中的表达则明显阻断低氧及其模拟化合物或诱导表达 HIF-1 α 诱导的细胞分化效应^[40]。

我们先前的工作显示,低氧并不诱导 M2 型 AML 细胞系 Kasumi-1 细胞的分化^[38]。该细胞存在特异的染色体易位 t(8;21)和表达异常融合蛋白 AML1-ETO^[41-43]。在随后的研究工作中,我们建立一种可诱导表达 AML1-ETO 的细胞系 U937-A/E,发现 AML1-ETO 抑制低氧和 DFO, CoCl_2 诱导 AML 细胞分化,但 AML1-ETO 也加强 HIF-1 α mRNA 的转录。同时,利用 siRNA 技术特异性地抑制 HIF-1 β 的表达并不影响低氧和 HIF-1 α 诱导的白血病细胞分化,提示 HIF-1 α 以其转录非依赖的方式触发白血病细胞分化^[37]。基于这些结果,我们从 AML1-ETO 调控的蛋白质^[44]出发,挖掘 HIF-1 α 诱导白血病细胞分化的下游分子。结果显示, HIF-1 α 触发 AML 细胞分化不是通过它的既往已知的功能(即作为转录因子),而是通过与两个造血相关转录因子 C/EBP α 和 RUNX1 直接相互作用实现的。这样一方面有效增加 C/EBP α 和 RUNX1 的转录活性,诱导 AML 细胞分化。另一方面, C/EBP α 和 RUNX1 有效抑制 HIF-1 的转录活性和 HIF-1 靶基因的表达^[45,46]。非常有趣的是, CoCl_2 和 DFO 明显加强 As_2O_3 对 APL 细胞的诱导分化效应,并加速 As_2O_3 诱导 PML/RAR α 蛋白的降解及增强 CoCl_2 和 DFO 对 HIF-1 α 蛋白的累积^[47],而经典的分化诱导药物 ATRA 能够快速稳定 HIF-1 α 蛋白,并在 ATRA 诱导的 AML 细胞分化中发挥作用^[48]。基于以

上发现,我们提出以“HIF-1 α -C/EBP α /RUNX1”为主轴的白血病细胞分化信号途径^[49,50]。最近,以该信号途径为基础, Kim 博士课题组发现一种化合物 Tiron, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid 能够通过上调 HIF-1 α 蛋白,并活化 C/EBP α 诱导 AML 细胞分化^[51]。

3 基于小分子化合物的细胞凋亡研究

细胞凋亡是多细胞生物消除有害细胞的重要生理机制。在过去 20 年中,有关细胞凋亡的发生、发展及其分子调控机制的研究已经取得了十分瞩目的进展。细胞凋亡的异常在许多疾病如肿瘤、神经退行性疾病、自身免疫性疾病等的发病学上具有重要作用。如肿瘤发生过程中,往往伴随肿瘤细胞对来自机体免疫系统及细胞内凋亡调控机制的抵抗。相应地,凋亡诱导药物已经成为肿瘤治疗的重要途径之一。

喜树碱是一种从喜树(*Camptotheca acuminata*)中分离出来的生物碱,属于一种针对细胞核内拓扑异构酶 I (Top I)抑制剂。作为一种新型的抗癌药物,喜树碱具有广阔的发展前景,并且已经深入到治疗及发展中的化疗等诸多领域的前沿,尤其是两种水溶性喜树碱衍生物已经被美国食品药品监督管理局批准应用于临床。它们分别是用于卵巢癌或小细胞肺癌二线治疗的 topotecan 和用于治疗对 5-氟尿嘧啶耐受的结直肠癌,或在首次治疗中结合 5-氟尿嘧啶治疗转移性结直肠癌的 irinotecan。在过去几年中,我们发现一种新型喜树碱衍生物 NSC606985 在纳摩尔浓度下即可以时间-剂量依赖方式抑制 NB4 细胞生长和通过凋亡方式诱导细胞死亡^[52]。() NSC606985 处理的 NB4 细胞在形态学上呈现凋亡细胞的特征性变化,如染色体凝聚、细胞核破裂而无细胞膜破损等;() 流式细胞仪分析核 DNA 含量分布显示, NSC606985 诱导后,因核 DNA 的降解及泄漏,亚倍体细胞(也称为亚 G1 细胞)呈时间和浓度依赖性增长;() NSC606985 处理的 NB4 细胞在琼脂糖电泳中呈现凋亡特异性的梯状 DNA;() Annexin V/PI 双染色的流式细胞仪分析显示 25 nmol/L NSC606985 处理 12 h 即呈现 annexin-V⁺/PI⁻细胞,随后出现 annexin-V⁺/PI⁺细胞增加。有趣的是,该化合物也以时间-浓度依赖的方式抑制 U937 和 K562 细胞的生长。然而,在 K562 细胞中,即使高浓度的 NSC606985(200 nmol/L)在抑制细胞增殖的同时也没有出现显著的细胞凋亡。

值得注意的是, 6.25 nmol/L NSC606985 已经足以对 K562 细胞产生强烈的增殖抑制效应。然而,在 U937 细胞中,纳摩尔浓度的 NSC606985 也能有效诱导凋亡,尽管 U937 细胞对于 NSC606985 诱导的凋亡敏感程度不及 NB4 细胞^[52]。随后,我们进一步利用白血病小鼠模型证实 NSC606985 的潜在临床价值^[53]。Tan 等人^[54]发现 NSC606985 也可诱导前列腺癌细胞系 DU-145, LNCaP and PC-3 等发生凋亡,而该化合物与化疗药物 cisplatin 协同诱导卵巢癌细胞凋亡的效应也被报道^[55]。在上述工作的基础上,本课题组在进一步揭示 NSC606985 破坏线粒体跨膜电位($\Delta\psi$)和活化 caspase-3 之前,快速诱导 AML 细胞中 PKC δ 蛋白裂解为具有持续活化的激酶活性 41 kD 的催化片段。PKC δ 特异抑制剂 rottlerin 预处理或 PKC δ 显性负突变体的转染表达显著抑制 NSC606985 诱导 $\Delta\psi$ 崩塌和 caspase-3 的活化,并完全阻断细胞凋亡,表明 PKC δ 活化在 NSC606985 诱导的细胞凋亡中的始动效应^[52]。为了阐明 NSC606985 诱导 PKC δ 剪切活化的分子机制,本课题组试图通过二维荧光差异凝胶电泳(two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)为基础的定量蛋白质组学的策略结合基质辅助的激光解析/离子飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-TOF)技术,分析 NSC606985 处理的 U937 细胞系,鉴定在 PKC δ 活化之前的蛋白质表达谱的改变,寻找 NSC606985 诱导细胞凋亡早期影响 PKC δ 剪切活化的分子,结果发现了 33 个在该过程中调变的蛋白质。其中, NDRG1 蛋白在早期显著下调。有趣的是, NDRG1 蛋白不仅在 NSC606985 处理早期显著下调,而且其他化疗药物如 doxorubicin, topotecan 和 irinotecan 也在活化 PKC δ 和 caspase-3 之前引起 NDRG1 蛋白的下调,主要表现为 NDRG1 蛋白质降解的增加。利用 tet-off 系统诱导表达 NDRG1 能显著延迟 NSC606985 诱导的 PKC δ 的活化和抑制细胞凋亡;而用 siRNA 技术沉默 NDRG1,能显著促进 PKC δ 的活化和促进凋亡,提示 NDRG1 在白血病细胞凋亡过程中可能起到抗凋亡的作用并参与了 PKC δ 的剪切活化^[56]。与此同时,我们也以 NSC606985 分子为探针,开展细胞凋亡相关的动态亚细胞蛋白质组学研究,在细胞核、线粒体、内质网及细胞浆中分别发现 96, 38, 38 和 41 个差异蛋白点,包括 90 种独立的蛋白质。这些蛋白根据其功能大致可分为代谢, DNA 损伤修复和染色体装配,转录和 mRNA 加工合成、修饰及蛋白降解,

细胞骨架及膜转运, 氧化应激, 信号转导及其他等 8 大类^[57]。比如, 在细胞凋亡过程中, β -actin 被磷酸化^[58], 而二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)发生核易位, 并且不依赖细胞类型。但是, 与由内质网应激等引起的相比, 该现象在由 DNA 损伤引起的细胞凋亡中明显。研究人员进一步发现氨 methotrexate 几乎完全抑制 DHFR 的核易位, 但不影响细胞凋亡过程^[59]。此外, 我们也以 NSC606985 和其他凋亡诱导剂诱导 AML 细胞凋亡为模型, 发现造血转录因子 PU.1^[60]和白血病相关蛋白 AML1-ETO 是细胞凋亡重要的凋亡诱导蛋白 caspase-3 的直接底物^[61], 并通过定点诱变的方法识别出其作用位点。此外, AML1-ETO 的表达可以显著增强白血病细胞对紫外线、新型喜树碱衍生物 NSC606985 和激活型 Fas 抗体等细胞内源性和外源性凋亡途径的诱导剂的敏感性, 并分别在转录和转录后水平上调凋亡相关基因 Bak 和 Fas 受体^[62]。

4 结语

过去的实践表明, 白血病细胞是推动人们对于生命活动和肿瘤发病机制研究的重要工具。实际上,

许多进展包括致癌病毒、肿瘤遗传学改变、诱导分化治疗、靶向治疗等等都源自于对白血病的研究。另一方面, 与遗传学和功能基因组学方法形成互补, 基于小分子活性化合物的化学生物学技术已经成为研究重要细胞生命活动规律的有效工具, 为功能基因组和创新药物研究提供了一条新的思路、策略和方法。在过去 20 年中, 我国许多化学家从一些药用植物中分离了许多化合物^[63,64]。其中, 拥有不少影响细胞生命活动的小分子化合物。例如, 从草药中分离的 Oridonin 能够破坏 AML1-ETO 融合蛋白, 呈现抗 t(8;21)白血病效应^{EN.CITE}。与此同时, 我国在白血病治疗学上已经取得一定国际地位, 并在某些方面得到国际同行的高度重视。但是, 我们应该承认, 无论在研究深度还是在原创性基础理论研究方面都存在不少差距。因此, 我们应该加强合作, 充分利用我国拥有的庞大的天然产物资源, 主动联合各学科尤其是化学、蛋白质组学、功能基因组学、药物学和血液病学等的基础和临床研究力量, 广泛而深入地开展针对白血病的化学生物学研究, 为真正建立具有国际引领地位的白血病研究理论体系和开发新型的白血病靶向治疗药物作出贡献。

致谢 感谢本实验室全体工作人员和研究生对本文的贡献。本文主要涉及笔者所在课题组的部分工作。由于篇幅限制, 难以列出所有参考文献。对于这些学者对本文的贡献, 深表感谢。

参考文献

- 1 Chen G Q, Wang L S, Wu Y L, et al. Leukemia, an effective model for chemical biology and target therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 1316—1324[[doi](#)]
- 2 Huang M E, Ye Y C, Chen S R, et al. All-trans retinoic acid with or without low dose cytosine arabinoside in acute promyelocytic leukemia. Report of 6 cases. *Chin Med J (Engl)*, 1987, 100: 949—953
- 3 Huang M E, Ye Y C, Chen S R, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1988, 72: 567—572
- 4 Collins S J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 346—351[[doi](#)]
- 5 Drumea K, Yang Z F, Rosmarin A. Retinoic acid signaling in myelopoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15: 37—41[[doi](#)]
- 6 Tsiftoglou A S, Pappas I S, Vizirarakis I S. Mechanism involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Parmaol Ther*, 2003, 100: 257-290[[doi](#)]
- 7 Zhu J, Shi X G, Chu H Y, et al. Effect of retinoic acid isomers on proliferation, differentiation and PML relocalization in the APL cell line NB4. *Leukemia*, 1995, 9: 302—309
- 8 Mao M, Yu M, Tong J H, et al. RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5910—5914[[doi](#)]
- 9 Liu T X, Zhang J W, Tao J, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 2000, 96: 1496—1504
- 10 Huang S, Shen Q, Mao W G, et al. JWA, a novel signaling molecule, involved in the induction of differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 440—450[[doi](#)]

- 11 Wang J, Fong C C, T'zang C H, et al. Gene expression analysis of human promyelocytic leukemia HL-60 cell differentiation and cytotoxicity induced by natural and synthetic retinoids. *Life Sci*, 2009, 84: 576—583[doi]
- 12 Zhao Q, Tao J, Zhu Q, et al. Rapid induction of cAMP/PKA pathway during retinoic acid-induced acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Leukemia*, 2004, 18: 285—292[doi]
- 13 Chen S, Han Y H, Zheng Y, et al. NDRG1 contributes to retinoic acid-induced differentiation of leukemic cells. *Leuk Res*, 2009, 33: 1108—1113[doi]
- 14 Liu J, Bi G, Wen P, et al. Down-regulation of CD44 contributes to the differentiation of HL-60 cells induced by ATRA or HMBA. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4: 59—63
- 15 Zhou Q, Zhao J, Stout J G, et al. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating trans-bilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem*, 1997, 272: 18240—18244[doi]
- 16 Zhao K W, Li X, Zhao Q, et al. Protein kinase Cdelta mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate-induced phospholipid scramblase 1 gene expression: Its role in leukemic cell differentiation. *Blood*, 2004, 104: 3731—3738[doi]
- 17 Radominska-Pandya A, Chen G, Czernik P J, et al. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem*, 2000, 275: 22324—22330[doi]
- 18 Zhou Q, Zhao J, Al-Zoghbi F, et al. Transcriptional control of the human plasma membrane phospholipid scramblase 1 gene is mediated by interferon-alpha. *Blood*, 2000, 95: 2593—2599
- 19 Zhao K W, Li D, Zhao Q, et al. Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK. *J Biol Chem*, 2005, 280: 42707—42714[doi]
- 20 Huang Y, Zhao Q, Zhou C X, et al. Antileukemic roles of human phospholipid scramblase 1 gene, evidence from inducible PLSCR1-expressing leukemic cells. *Oncogene*, 2006, 25: 6618—6627[doi]
- 21 Zhang K, Guo Q L, You Q D, et al. Wogonin induces the granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells and up-regulates phospholipid scramblase 1 gene expression. *Cancer Sci*, 2008, 99: 689—695[doi]
- 22 孙鸿德, 马玲. 癌灵 I 号结合中医辨证治疗急性早幼粒细胞白血病 32 例. *中国中西医结合杂志*, 1992, 3: 170—171
- 23 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗急性早幼粒细胞白血病 72 例. *中华血液学杂志*, 1996, 2: 58—60
- 24 Shen Z X, Chen G Q, Ni J H, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*, 1997, 89: 3354—3360
- 25 Niu C, Yan H, Yu T, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: Remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, 1999, 94: 3315—3324
- 26 Chen G Q, Zhu J, Shi X G, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*, 1996, 88: 1052—1061
- 27 Chen G Q, Zhou L, Styblo M, et al. Methylated metabolites of arsenic trioxide are more potent than arsenic trioxide as apoptotic but not differentiation inducers in leukemia and lymphoma cells. *Cancer Res*, 2003, 63: 1853—1859
- 28 Chen Z, Chen G Q, Shen Z X, et al. Expanding the use of arsenic trioxide: Leukemias and beyond. *Semin Hematol*, 2002, 39(2 Suppl 1): 22—26
- 29 Zhu X H, Shen Y L, Jing Y K, et al. Apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 772—778[doi]
- 30 Cai X, Yu Y, Huang Y, et al. Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*, 2003, 17: 1333—1337[doi]
- 31 Cai X, Shen Y L, Zhu Q, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 2000, 14: 262—270[doi]
- 32 Yan H, Wang Y C, Li D, et al. Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: The role of protein kinase Cdelta. *Leukemia*, 2007, 21: 1488—1495[doi]
- 33 Chen G Q, Shi X G, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 1997, 89: 3345—3353
- 34 Huang Y, Du K M, Xue Z H, et al. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: Possible mediation of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Leukemia*, 2003, 17: 2065—2073[doi]
- 35 Liu W, Guo M, Xu Y B, et al. Induction of tumor arrest and differentiation with prolonged survival by intermittent hypoxia in a mouse model of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2006, 107: 698—707[doi]
- 36 Han Y H, Xia L, Song L P, et al. Comparative proteomic analysis of hypoxia-treated and untreated human leukemic U937 cells. *Pro-*

- teomics, 2006, 6: 3262—3274[doi]
- 37 Liao S, Zhao X, Han Y, et al. Proteomics-based identification of two novel direct targets of hypoxia-inducible factor-1 α and their potential roles in migration/invasion of cancer cells. *Proteomics*, 2009, 15: 3901—3912[doi]
 - 38 Jiang Y, Xue Z H, Shen W Z, et al. Desferrioxamine induces leukemic cell differentiation potentially by hypoxia-inducible factor-1 α that augments transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein- α . *Leukemia*, 2005, 19: 1239—1247[doi]
 - 39 Xue Z H, Jiang Y, Yu Y, et al. Metavanadate suppresses desferrioxamine-induced leukemic cell differentiation with reduced hypoxia-inducible factor-1 α protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332: 1140—1145[doi]
 - 40 Song L P, Zhang J, Wu S F, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α -induced differentiation of myeloid leukemic cells is its transcriptional activity independent. *Oncogene*, 2008, 27: 519—527
 - 41 Xu M, Li D, Lu Y, et al. Leukemogenic AML1-ETO fusion protein increases carcinogen-DNA adduct formation with upregulated expression of cytochrome P450-1A1 gene. *Exp Hematol*, 2007, 35: 1249—1255[doi]
 - 42 Gao F H, Wang Q, Wu Y L, et al. c-Jun N-terminal kinase mediates AML1-ETO protein-induced connexin-43 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356: 505—511[doi]
 - 43 Li X, Xu Y B, Wang Q, et al. Leukemogenic AML1-ETO fusion protein upregulates expression of connexin 43: The role in AML1-ETO-induced growth arrest in leukemic cells. *J Cell Physiol*, 2006, 208: 594—601[doi]
 - 44 Zhang L, Wang L S, Xu Y, et al. Comparative proteomic analysis of human leukemic cells with and without inducible expression of leukemogenic AML1-ETO protein. *Chin J Physiol*, 2006, 49: 182—191
 - 45 Peng Z G, Zhou M Y, Huang Y, et al. Physical and functional interaction of Runt-related protein 1 with hypoxia-inducible factor-1 α . *Oncogene*, 2008, 27: 839—847[doi]
 - 46 Yang L, Jiang Y, Wu S F, et al. CCAAT/enhancer-binding protein α antagonizes transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 α with direct protein-protein interaction. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 291—298[doi]
 - 47 Yan H, Peng Z G, Wu Y L, et al. Hypoxia-simulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells. *Haematologica*, 2005, 90: 1607—1616
 - 48 Zhang J, Song L P, Huang Y, et al. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein and its role in the differentiation of myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid. *Haematologica*, 2008, 93: 1480—1487[doi]
 - 49 Janardhan H P. The HIF-1 α -C/EBP α axis. *Sci Signal*, 2008, 1(43): jc2
 - 50 Zhang J, Chen G Q. Hypoxia-HIF-1 α -C/EBP α /Runx1 signaling in leukemic cell differentiation. *Pathophysiology*, 2009, [doi]
 - 51 Kim J S, Cho E W, Chung H W, et al. Effects of Tiron, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid, on human promyelotic HL-60 leukemia cell differentiation and death. *Toxicology*, 2006, 223: 36—45[doi]
 - 52 Song M G, Gao S M, Du K M, et al. Nanomolar concentration of NSC606985, a camptothecin analog, induces leukemic-cell apoptosis through protein kinase C δ -dependent mechanisms. *Blood*, 2005, 105: 3714—3721[doi]
 - 53 Liu W, Zhu Y S, Guo M, et al. Therapeutic efficacy of NSC606985, a novel camptothecin analog, in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*, 2007, 31: 1565—1574[doi]
 - Tan C, Cai L Q, Wu W, et al. NSC606985, a novel camptothecin analog, induces apoptosis and growth arrest in prostate tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63: 303—312[doi]
 - 54 Zhang N, Zhang H, Xia L, et al. NSC606985 induces apoptosis, exerts synergistic effects with cisplatin, and inhibits hypoxia-stabilized HIF-1 α protein in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 2009, 278: 139—144[doi]
 - 55 Zheng Y, Wang L S, Xia L, et al. NDRG1 is down-regulated in the early apoptotic event induced by camptothecin analogs: the potential role in proteolytic activation of PKC δ and apoptosis. *Proteomics*, 2009, 9: 2064—2075[doi]
 - 56 Yu Y, Wang L S, Shen S M, et al. Subcellular proteome analysis of camptothecin analogue NSC606985-treated acute myeloid leukemic cells. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3808—3818[doi]
 - 57 Wang S, Zheng Y, Yu Y, et al. Phosphorylation of beta-actin by protein kinase C- δ in camptothecin analog-induced leukemic cell apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 135—142[doi]
 - 58 Yuan T T, Huang Y, Zhou C X, et al. Nuclear translocation of dihydrofolate reductase is not a pre-requisite for DNA damage induced apoptosis. *Apoptosis*, 2009, 14: 699—710[doi]
 - 59 Zhao M, Duan X F, Wen D H, et al. PU.1, a novel caspase-3 substrate, partially contributes to chemotherapeutic agents-induced apoptosis in leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382: 508—513[doi]
 - 60 Lu Y, Peng Z G, Yuan T T, et al. Multi-sites cleavage of leukemogenic AML1-ETO fusion protein by caspase-3 and its contribution to increased apoptotic sensitivity. *Leukemia*, 2008, 22: 378—386[doi]
 - 61 Lu Y, Xu Y B, Yuan T T, et al. Inducible expression of AML1-ETO fusion protein endows leukemic cells with susceptibility to extrinsic and intrinsic apoptosis. *Leukemia*, 2006, 20: 987—993[doi]
 - 62 Zhao Y, Pu J X, Huang S X, et al. ent-Kaurane diterpenoids from *Isodon pharicus*. *J Nat Prod*, 2009, 72: 988—993[doi]
 - 63 Zhao Y, Pu J X, Huang S X, et al. ent-Kaurane diterpenoids from *Isodon scoparius*. *J Nat Prod*, 2009, 72: 125—129[doi]
 - 64 Zhou G B, Kang H, Wang L, et al. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2007, 109: 3441—3450[doi]