

简易 BH3 分析法在血液肿瘤药敏筛选的初步探索

曾令基, 李敏明, 王玉连, 吴 苗, 黄艳艳, 耿素霞, 赖沛龙
杜 欣, 翁建宇

(血液内科, 南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院), 广州 510080)

[摘要] **目的** 建立一种血液肿瘤 BCL-2 抗凋亡蛋白抑制剂药敏筛选的简易 BH3 分析法。**方法** 建立基于显微镜和 JC-1 染色的 BH3 分析方法, 通过 BH3-only 模拟肽描绘 K562、NB4 细胞系 BCL-2 家族抗凋亡蛋白依赖谱, 应用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)加以验证; 回溯临床治疗疗效, 检验该方法对临床样本 BH3 药敏分析结果的符合情况。**结果** BH3 分析结果显示 NB4 对抗凋亡蛋白的依赖程度依次为 BCL2>MC1-1>BCL-XL; K562 的依赖程度依次为 BCL-XL>MC1-1>BCL2。PCR 分析 BCL-2 家族基因表达量显示, K562 抗凋亡蛋白 MCL-1、BCL2、BCL-XL 相对表达程度较高, BH3-only 促凋亡蛋白中 BIM、PUMA、NOXA 高表达而 HRK 低表达, 细胞抗凋亡能力更依赖于 BCL-XL; NB4 抗凋亡蛋白 BCL-XL 表达明显低于 MCL-1 与 BCL-2, BH3-only 促凋亡蛋白 NOXA 低表达, 细胞抗凋亡更依赖于 MCL-1 与 BCL-2 而非 BCL-XL, 与 BH3 分析结果相符。对连续 6 例血液肿瘤患者骨髓进行 BH3 分析, 结果显示 6 例患者均对 HRK(BCL-XL 抑制物)、VEN(BCL-2 抑制物)不敏感; 4 例患者(例 1~3, 例 5)对 NOXA(MCL-1 抑制物)表现为敏感, 2 例(例 4、例 6)的敏感度较低(<50%)。药敏预测结果显示 6 例患者均对 BCL-2 抑制剂耐药, 例 1~3、例 5 患者对 MCL1 抑制剂敏感, 例 4 和例 6 对 MCL1 抑制剂可能耐药。回溯临床用药效果(4~6 个疗程)显示例 1~5 患者对 BCL-2 抑制剂相关方案治疗无效, 考虑与 BCL-2 抑制剂不敏感有关, 例 5 更换西达苯胺治疗有效, 例 4 和例 6 患者西达苯胺相关方案疗效不佳, 考虑与 MCL-1 抑制物不敏感有关, 上述临床结局与 BH3 预测结果一致。**结论** 基于荧光显微镜和 JC-1 染色的 BH3 分析是简便可行的, 可用于检测血液肿瘤细胞对不同抗凋亡蛋白的依赖性, 从而为 BCL-2 家族相关抑制剂的选择提供证据。

[关键词] BH3 分析; BCL-2; 荧光显微镜; JC-1

[中图分类号] R733.7

[文献标志码] A

DOI:10.12019/j.issn.1671-5144.202311009

Preliminary Exploration of Simple BH3 Profiling in Screening Drug Susceptibility of Blood Tumors

ZENG Ling-ji, LI Min-ming, WANG Yu-lian, WU Miao, HUANG Yan-yan,
GENG Su-xia, LAI Pei-long, DU Xin, WENG Jian-yu

(Department of Hematology, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To establish a simple BH3 profiling for drug-sensitive screening of anti-apoptotic protein inhibitors of the BCL-2 family in blood tumors. **Method** To establish the BH3 profiling method based on the microscope and JC-1 staining, describe the dependence of K562 and NB4 cell lines on anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family by BH3-only simulated peptide, and verify it by polymerase chain reaction (PCR) method. Clinical drug efficacy was retrospectively reviewed to check the conformity of BH3 drug sensitivity analysis results. **Results** BH3 profiling results showed that the anti-apoptotic protein dependence of the NB4 cell line was BCL2 > MC1-1 > BCL-XL; the K562

[基金项目] 白求恩·血液科研能力建设项目二期 (BCF-IBW-XY-20231023-16)。

[作者简介] 曾令基 (1989-), 男, 广东佛山人, 医学学士, 主要研究方向为血液肿瘤遗传学/诊断学。

[通讯作者] 翁建宇, E-mail: wengjianyu@gdph.org.cn。

cell line was BCL-XL > MCL-1 > BCL2. PCR analysis of BCL-2 family expression showed that anti-apoptotic proteins MCL-1, BCL2, and BCL-XL were highly expressed in K562, while BIM, NOXA, and PUMA were highly expressed in BH3-only protein and HRK was low. The anti-apoptotic ability of cells depended more on BCL-XL. In NB4, the anti-apoptotic protein BCL-XL was significantly lower than MCL-1 and BCL-2, while NOXA in BH3-only protein was lower. NB4 cells were more dependent on MCL-1 and BCL-2 than BCL-XL; Which was consistent with BH3 profiling results. Bone marrow BH3 profiling results of 6 patients with hematologic tumors showed that HRK (BCL-XL inhibitor) and VEN (BCL-2 inhibitor) were not sensitive. NOXA (MCL-1 inhibitor) was sensitive to examples 1, 2, 3 and 5, while the sensitivity of examples 4 and 6 was low (< 50%). It was speculated that all 6 cases were resistant to BCL-2 inhibitor; Cases 1, 2, 3 and 5 were sensitive to MCL1 inhibitor, and cases 4 and 6 might be resistant to MCL1 inhibitor. Retrospective clinical efficacy (4~6 sessions): Cases 1~5 were not sensitive to the treatment regimen containing BCL-2 inhibitor, which was considered to be related to insensitivity to BCL-2 inhibitor. Chidamide was effective in case 5, but not effective in cases 4 and 6, which were considered to be related to MCL-1 inhibitor insensitivity. The above clinical outcomes were consistent with the predicted results of BH3 profiling. **Conclusions** BH3 profiling based on fluorescence microscopy and JC-1 staining is simple and feasible and can be used to detect the dependence of blood tumor cells on different anti-apoptotic proteins, thus providing evidence for the selection of inhibitors related to the Bcl-2 family.

Key words: BH3 profiling; BCL-2; fluorescence microscopy; JC-1

BH3 分析(BH3 profiling)技术是近年兴起的一种检测细胞凋亡阈值的技术,最早由 Letai 教授提出^[1]。该技术根据不同细胞 BCL-2 家族蛋白表达模式不一样,应用体外合成的 BH3-only 模拟肽(BH3 peptides)或小分子抗凋亡蛋白抑制剂作用于目的细胞,检测细胞是否发生凋亡启动从而判断肿瘤细胞凋亡倾向性。BCL-2 家族蛋白成员接近 20 种,成员间相互作用关系繁杂而重要,单纯获知蛋白成员的表达水平无法确定成员间的相互作用的最终结果。BH3 分析基于 BCL-2 家族蛋白促凋亡与抗凋亡的功能分类,不以 BCL-2 家族成员单一对应关系为研究对象,而是以 BCL-2 家族蛋白成员促/抗凋亡力量抗衡的最终结果为研究目标的功能性试验,其通过检测不同的 BH3-only 模拟肽作用后是否引起线粒体膜电位改变($\Delta\Psi_m$)/细胞色素 C 释放来间接评估线粒体启动状态,即线粒体外膜通透 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP),或者说细胞为凋亡所做准备的程度,从而预测细胞拮抗凋亡主要作用的蛋白。但临床上往往发现并非所有患者对 BCL-2 抑制剂都有良好反应,因而寻找合适有效的检测“靶点”成为亟待解决的问题。而 BH3 分析技术可检测细胞对抗凋亡蛋白的依赖性,有望可为 BCL-2 相关抑制剂选择提供证据,从而实现精准治疗。常规 BH3 分析方法对使用荧光微孔板仪或流式细胞仪进行检测,对设备和实验要求较高。综合既往报道的 BH3 分析方法,

我们改良并建立一种基于荧光显微镜和 JC-1 染色的 BH3 分析方法用于检测血液肿瘤对抗凋亡蛋白依赖性,该方法具有结果直观(可观测每个细胞凋亡状态)、操作简便快捷、支持少样本分析、成本低廉的优势。

1 材料及方法

1.1 研究样本

研究共纳入 2 株细胞系及 6 例血液肿瘤患者骨髓样本。(1)2 株细胞系 NB4 及 K562,由本实验室购自 ATCC,以细胞冻存液(STEM CELL)冻存于液氮中,解冻复苏后用新鲜介质洗涤重悬于含 10% FBS(GIBCO)的 RPMI 1640 培养基(GIBCO),于含 5% CO₂、37 °C 加湿培养箱中培养。(2)6 例白血病患者骨髓样本来自在广东省人民医院确诊的白血病患者,所有患者均经形态学、细胞遗传学、分子学、免疫学检测并严格按照 WHO 2016(The 2016 revision of the World Health Organization classification)标准诊断。

1.2 主要材料

(1)药物及试剂:洋地黄皂苷(digitonin)(MCE, HY-N4000);Hoechst 33342(碧云天, C1025);JC-1 (MCE, HY-15534);CCCP(MCE, HY-100941);ABT199(Active Biochem);HEPES(GIBCO, 15630-106);BSA(SIGMA, SRE0096),海藻糖(Macklin, D807342),EGTA(源叶, S30018),EDTA(Macklin,

E809068), 琥珀酸(源叶, S30140)。(2)BH3 模拟肽 (BH3 peptides): 包括 hBIM、hBID-Y、mBAD、PUMA、mNOXA、MS-1、W-HRK, 由上海吉尔生化合成, 序列见表 1^[2]。(3)实验仪器: 徕卡 DM4000B 荧光显微镜。

表 1 BH3 模拟肽序列
Tab.1 BH3 mimics sequences

BH3 peptides	Sequences
hBIM	Ac-MRPEIWIAQELRRIGDEFNA-NH2
hBID-Y	Ac-EDIIRNIARHLAQVGDSMDRY-NH2
mBAD	Ac-LWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGL-NH2
mNoxaA	Ac-AELPPEFAAQLRKIGDKVYC-NH2
MS-1	Ac-RPEIWMQTGLRRLGDEINAYYAR-NH2
Puma	Ac-EQWAREIGAQLRRMADDLNA-NH2
W-Hrk	Ac-WSSAAQLTAARLKALGDELHQ-NH2

1.3 研究方法

1.3.1 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测

收集 2~4 mL 样本, TRIzol 法提取样本总 RNA, 按说明书合成 cDNA 和构建 RCR 反应体系, 检测 *BIM*、*BID*、*BAD*、*PUMA*、*NOXA*、*HRK*、*BAX*、*BAK*、*BCL2*、*BCL-XL*、*MCL1*、*BCL-W* 等基因(引物序列见表 2), 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

1.3.2 BH3 分析

BH3 分析体系部件: (1)配制 DTEB 缓冲液: 10 mM HEPES pH 7.5, 135 mM 海藻糖, 50 mM KCl, 0.02 mM EGTA, 0.02 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM 琥珀酸。(2)洋地黄皂苷 (digitonin): 溶解于 DMSO 中制成 5% 储存液 (50 mg/mL)。(3)JC-1: 溶解于 DMSO 中准备 5 mM 储存液, 并储存在 -80 °C; 使用前稀释为 200 μ M 工作液。(4)药物: ABT-199(BCL-2 抑制剂)溶解于 DMSO 制作成 1 mM 溶液备用。(5)样本处理液: 每 1 mL 的 DTEB 中含 0.008%/0.004% 洋地黄皂苷、20 mM β -巯基乙醇 (洋地黄皂苷终浓度 0.002%/0.001%)。(6)模拟肽: 合成的 BH3 模拟肽溶解于 DMSO 中, 浓度为 1 mM; 使用时根据工作浓度用 DTEB 稀释。

BH3 谱系检测步骤: (1)含培养基的待测样本加入等体积 Hoechst 33342 染色 10 min, 经 PBS 洗涤后重悬于 DTEB 中, 浓度为 5×10^6 /L, 与等体积样本处理液混合。(2)同时取 96 孔板分别加入 50 μ L DTEB (含 DMSO)、CCCP (50 μ M)、hBIM (20 μ M)、

表 2 RT-qPCR 引物序列

Tab.2 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Sequences
<i>BIM-F</i>	AGCCCAGCACCCATGAGTTGTGAC
<i>BIM-R</i>	CTCTGGGCGCATATCTGCAGG
<i>BID-F</i>	ATGGACCGTAGCATCCCTCC
<i>BID-R</i>	GTAGGTGCGTAGGTTCTGGT
<i>BAD-F</i>	GTTTGAGCCGAGTGAGCAGG
<i>BAD-R</i>	ATAGCGCTGTGCTGCCCAGA
<i>NOXA-F</i>	ACCAAGCCGGATTTGCGATT
<i>NOXA-R</i>	ACTTGCACTTGTTCCTCGTGG
<i>HRK-F</i>	CAGGCGGAACCTTGTAGGAAC
<i>HRK-R</i>	GCTGGATTTCCAAAGGGCTT
<i>PUMA-F</i>	GACCTCAACGCACAGTACGAG
<i>PUMA-R</i>	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
<i>BAX-F</i>	TCTGACGGCAACTTCAACTG
<i>BAX-R</i>	GGAGGAAGTCCAATGTCCAG
<i>BAK-F</i>	GTTTTCGCGAGCTACGTTTTT
<i>BAK-R</i>	GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC
<i>BCL-2-F</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA
<i>BCL-2-R</i>	GCCGGTTCAGGTACTCAGTC
<i>BCL-xL-F</i>	GGAGGCAGGCGACGAGTTTGAA
<i>BCL-xL-R</i>	AAGGGGGTGGGAGGGTAGAGTGG
<i>BCL-W-F</i>	GCGGAGTTCACAGCTCTATAC
<i>BCL-W-R</i>	AAAAGGCCCTACAGTTACCA
<i>MCL-1-F</i>	CGGTAATCGGACTCAACCTC
<i>MCL-1-R</i>	CCTCCTTCTCCGTAGCCAA
<i>GAPDH-F</i>	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
<i>GAPDH-R</i>	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

hBID-Y (20 μ M)、mBAD (20 μ M)、PUMA (20 μ M)、mNOXA (20 μ M)、MS-1 (20 μ M)、W-HRK (20 μ M)、ABT-199 (20 μ M)、hBIM (1 μ M)、hBID-Y (1 μ M)、mBAD (1 μ M)、PUMA (1 μ M)、mNOXA (1 μ M)、MS-1 (1 μ M)、W-HRK (1 μ M)、ABT-199 (1 μ M) 共 18 孔。(3)每孔加入步骤 (1) 中细胞混合液 50 μ L, 混匀后 37 °C 孵育 30~60 min。(4)每孔加入 1 μ L JC-1 (200 μ M) 37 °C 孵育 30 min。(5)经离心洗涤后重悬于 DTEB, 取细胞悬液滴入玻片中待自然沉降后使用荧光显微镜观察, 计数线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 降低 (去极化) 的细胞比率, 根据公式修正去极化率, 并绘制 BH3 谱系色阶图。(图 1) 色阶图中以肽空白孔 (DMSO) 为阴性对照 (凋亡通常低于 10%), CCCP 孔为阳性对照 (通常 100% 凋亡), 各孔凋亡程度 (去极化率) 从低到高显示从绿到黄到红的不同颜色。去极化率计算公式如下:

$$\text{去极化率} \% = \left[1 - \frac{(\text{肽处理孔} - \text{CCCP})}{(\text{DMSO} - \text{CCCP})} \right] \times 100\%$$

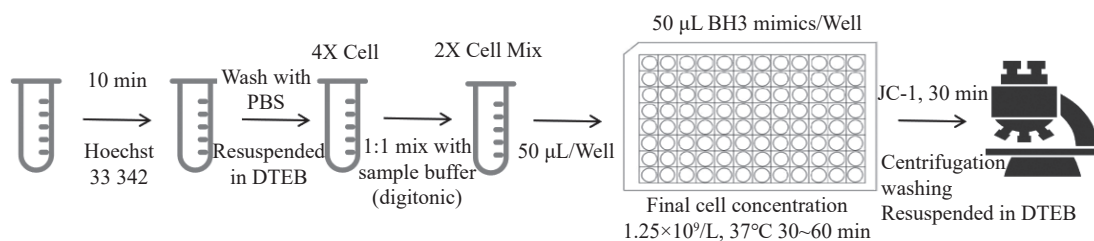


图 1 BH3 分析步骤

Fig.1 Steps for BH3 profiling

1.3.3 临床验证

6 例血液肿瘤患者骨髓样本, 按 1.3.2 步骤进行 BH3 分析, 结果与临床实际药物疗效比对。

2 结果

2.1 细胞系(K562、NB4)BH3 分析

根据 BCL2 家族抗凋亡蛋白和 BH3-only 蛋白相互作用模式, 见表 3, 结果显示不同样本对 BCL2 家族蛋白有不用依赖性, 有不同的 BH3 谱系结果。从谱系结果可推断抗凋亡蛋白的依赖性及依赖程度。

为充分体现细胞对不同 BH3-only 蛋白的反应程度, 避免在某一浓度下结果接近无法分辨, 实验中分别使用高低两种浓度的 BH3 模拟肽作用于细胞, 计数 $\Delta\Psi_m$ 减低的细胞比例(见表 4, 图 2), 从 $\Delta\Psi_m$ 在不同浓度降低的比例可以得出抗凋亡蛋白是否依赖及依赖程度。结果显示 K562 细胞反应 HRK>NOXA/MS1>VEN, 即依赖程度 BCL-XL>MC1-1>BCL2, 而 NB4 细胞反应 VEN>NOXA/MS1>HRK, 即依赖程度 BCL2>MC1-1>BCL-XL。

表 3 BCL2 家族抗凋亡蛋白和 BH3-only 蛋白相互作用模式

Tab.3 Interaction model of BCL2 family anti-apoptotic protein and BH3-only protein

Anti-apoptotic protein	BH3-only protein							BH3 inhibitor		
	BIM	BID	BAD	PUMA	NOXA	MS1	HRK	ABT199(VEN)	S63845	WEHI539
BCL-2										
BCL-XL										
BCL-W										
MCL-1										

注: *红色代表强抑制, 绿色代表弱抑制或者无抑制。

Note: * Red represented strong inhibition, and green represented weak or no inhibition.

表 4 细胞系 BH3 分析结果 (色阶图)

Tab.4 Cell line BH3 profiling results (level diagram)

		DMSO	CCCP	BIM	BID	NOXA	MS1(syn)	HRK	BAD	PUMA	VEN
NB4	1 µM	7.80%	100.00%	97.94%	90.56%	27.11%	67.90%	24.08%	100.00%	91.11%	94.90%
	20 µM	7.80%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	97.51%	83.73%	90.89%	100.00%	100.00%
K562	1 µM	0.00%	100.00%	90.00%	0.00%	1.70%	4.10%	10.60%	87.30%	40.40%	1.30%
	20 µM	14.60%	100.00%	67.80%	24.59%	40.40%	39.34%	43.44%	81.26%	71.43%	11.94%

注:阳性对照(CCCP)显示100%凋亡, 空白对照低凋亡。连续色阶图显示对BH3模拟肽的敏感程度, 从红到黄到绿代表敏感强度从高到低, 去极化率=1-[(肽处理孔-阳性对照)/(空白-阳性对照)]。

Note: Positive control (CCCP) showed 100% apoptosis, while blank control showed low apoptosis. The continuous color level diagram showed the sensitivity to BH3 mimic peptide, and the diagram from red to yellow to green represented the sensitivity intensity from high to low.

%Depolarization=1-[(Sample-CCCP)/(Blank-CCCP)].

2.2 PCR 检测

运用 PCR 检测 BCL2 家族相关基因基础表达量。BCL-2 家族相互作用复杂, 最终凋亡敏感性由

各成员综合作用结果。分析 BCL-2 家族基因表达谱, K562 抗凋亡蛋白中 MCL-1、BCL-2、BCL-XL 相对表达程度较高, BCL-W 低表达; BH3-only 中

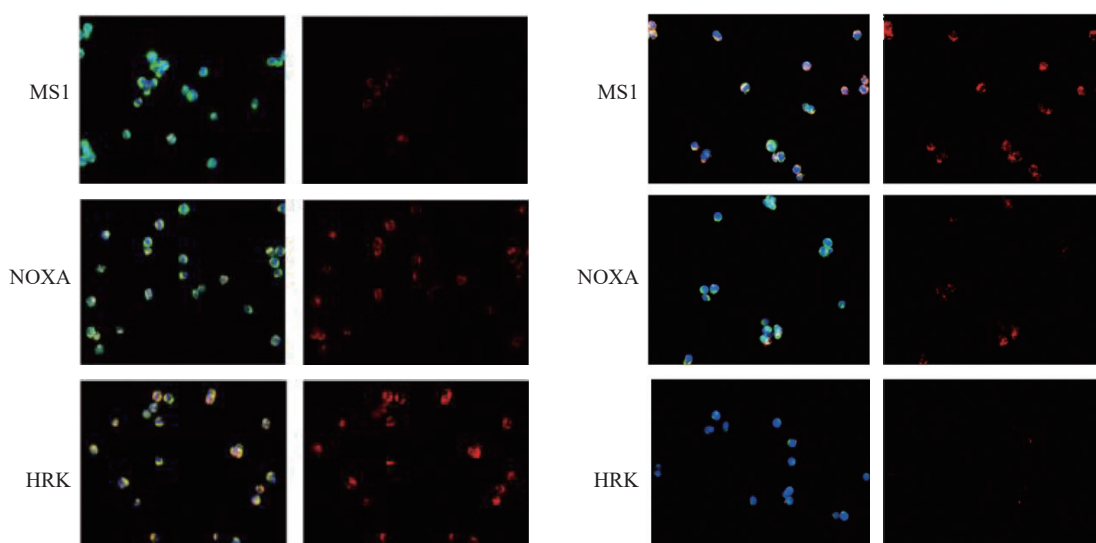


图 2 (左)模拟肽作用于 NB4,经 JC-1 染色后镜检;(右)模拟肽作用于 K562,经 JC-1 染色后镜检(200×)

Fig.2 (Left) BH3 peptide as a treatment for NB4, observed by microscope after JC-1 staining; (Right) BH3 peptide as a treatment for K562, viewed by microscope after JC-1 staining (200×)

注: $\Delta\Psi_m$ 降低细胞表现为 JC-1 红色荧光减弱或消失。

Note: Cells with reduced Ψ_m showed decreased or disappeared JC-1 red fluorescence.

BIM、PUMA、NOXA 表达程度较高,可能抵消 MCL-1、BCL-2 的抗凋亡作用,而与 BCL-XL 相互作用的 HRK 表达较低,从而可见在外源性引入 HRK 时可能更容易打破 BCL-2 家族的平衡导致细

胞凋亡;而 NB4 抗凋亡蛋白中 BCL-XL 表达明显低于 MCL-1 与 BCL-2, BH3-only 中与 MCL-1 相互作用的 NOXA 表达则较低,显然 NB4 细胞更依赖于 MCL-1 与 BCL-2 而非 BCL-XL,见图 3。

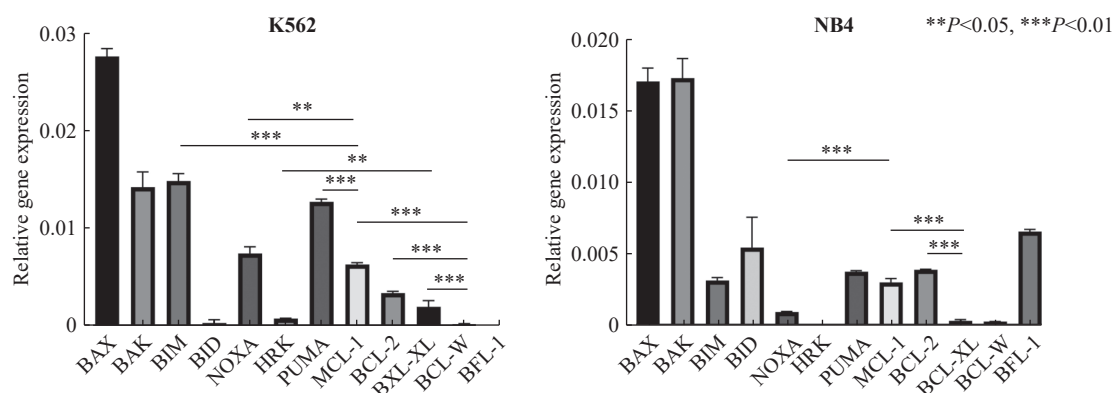


图 3 BCL-2 家族基因表达量,(左) K562、(右) NB4

Fig.3 Gene expression of BCL-2 family, (left) K562, (right) NB4

2.3 临床样本检测

2021 年 3 月 25 日至 2022 年 4 月 30 日,对 6 例血液肿瘤患者骨髓细胞进行 BH3 分析并追踪临床疗效,分析结果及 BCL-2 抑制剂疗效预测如表示(表 5、表 6)。不同患者个体骨髓细胞 BH3 谱系结果不一:6 例患者均表现为对 HRK(BCL-XL)、VEN(BCL-2)不敏感,而对 NOXA(MCL-1)敏感度存在异质性。如表 5 所示,例 1~3、例 5 患者对 NOXA

敏感,而例 4 和例 6 的敏感度较低(<50%);6 例患者骨髓细胞对 VEN 均不敏感。上述结果提示 6 例患者抗凋亡均不依赖于 BCL-XL 和 BCL-2,而对 MCL-1 依赖性则有所不同。根据 BH3 分析原理,细胞对 BH3-only 模拟肽敏感度越高,则对相互对应的抗凋亡蛋白(表 3)依赖程度较高,反之依赖程度低,因而推测 6 例均对 BCL-2 抑制剂(维奈克拉)、BCL-XL 抑制剂(WEHI-539)耐药,例 1~3、例 5 骨

髓细胞对 MCL1 抑制剂(Servier63845、西达苯胺^[3]、高三尖杉酯碱^[4])敏感, 例 4 和例 6 对 MCL1 抑制剂敏感度可能较低或出现耐药。另外, 例 1 对 VEN、BAD、HRK 敏感度均低, 而 BAD 与 BCL-2、BCL-W、BCL-XL 均可相互作用, 故综上例 1 抗凋亡也不依赖于 BCL-W。回溯 6 例患者临床 4~6 个疗程

治疗情况(表 6)所示: 例 1~5 患者对 BCL-2 抑制剂相关方案治疗无效, 考虑与 BCL-2 抑制剂不敏感有关, 例 2 患者西达苯胺有效, 例 4 和例 6 患者西达苯胺相关方案疗效不佳, 考虑与 MCL-1 抑制物不敏感有关, 与 BH3 预测结果基本一致。

表 5 临床样本 BH3 分析结果

Tab.5 BH3 profiling results of clinical samples

Case	DMSO	CCCP	BIM	BID	NOXA	HRK	BAD	PUMA	VEN
1	8.75%	100.00%		91.01%	86.74%	25.48%	15.40%	91.34%	5.75%
2	11.40%	100.00%	90.86%	41.08%	77.88%	14.00%	64.90%	98.19%	23.36%
3	20.00%	100.00%	93.38%	69.88%	73.50%	33.63%	85.63%	89.00%	15.13%
4	22.90%	100.00%	100.00%	82.88%	45.91%	0.52%	52.14%	93.77%	15.95%
5	11.30%	100.00%	92.78%	59.98%	77.11%	34.61%	96.96%	82.64%	27.40%
6	23.20%	100.00%	61.20%	72.53%	49.35%	16.41%	79.95%	51.69%	29.04%

注: 阳性对照(CCCP)显示100%凋亡, 空白对照低凋亡。去极化率 $\% = 1 - [(\text{肽处理孔} - \text{阳性对照}) / (\text{空白} - \text{阳性对照})]$ 。

Note: The apoptosis of positive control (CCCP) was 100%, the apoptosis of blank control was low. $\% \text{Depolarization} = 1 - [(\text{Sample} - \text{CCCP}) / (\text{Blank} - \text{CCCP})]$.

表 6 药敏预测及临床样本疗效

Tab.6 Drug sensitivity prediction and clinical sample drug efficacy

Case	Predict sensitive targets	Possible drug-resistant targets	Clinical effects (4~6 sessions)
1	MCL-1	BCL-2, BCL-XL, BCL-W	Regimens containing BCL-2 inhibitor was ineffective
2	MCL-1	BCL-2, BCL-XL	Regimens containing BCL-2 inhibitor was ineffective
3	MCL-1	BCL-2, BCL-XL	Regimens containing BCL-2 inhibitor was ineffective
4		BCL-2, BCL-XL, MCL-1	Regimens containing BCL-2 inhibitor was ineffective, the addition of chidamide was ineffective
5	MCL-1	BCL-2, BCL-XL	Regimens containing BCL-2 inhibitor was ineffective, remission was maintained with chidamide
6		BCL-2, BCL-XL, MCL-1	Regimens containing chidamide was ineffective

3 讨论

WHO 下属国际癌症研究机构发布的《2020 年全球癌症负担报告》显示白血病无论在全球范围或中国均为死亡病例前十的恶性肿瘤^[5]。BCL-2 抑制剂(Venetoclax)作为新药已应用于急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)及慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)等血液肿瘤的治疗, 其联合去甲基化药物(hypomethylating agent, HMA)可提高老年 AML 及复发难治白血病的疗效已被国外研究所报道^[6-9]。目前临床尚无合适有效的检测“靶点”预测 BCL-2 抑制剂药敏。BCL-2 家族蛋白成员众多, 相互作用繁杂, 孤立分析某个 BCL-2 家族相关基因或蛋白无法获得细胞总体的凋亡启动状态及对 BCL-2 家族蛋白的依赖

程度。BH3 分析作为一种活细胞功能性检查, 最早便是为解决血液肿瘤化疗敏感性问题而提出, 随着技术的发展及深入, 应用越来越广泛; 除检测化疗敏感性以外, 还可用于判断预后、筛选药物^[10-11]等。BH3 分析技术将线粒体途径作为一个整体, 不对内部相互作用过程分析而直接通过促凋亡/抗凋亡的最终效应来判读凋亡启动状态的结果, 结果通俗易懂, 且可反映细胞实际的线粒体凋亡相关蛋白依赖关系, 将有望用于指导 BCL-2、MCL-1、BCL-XL、BCL-W 等抑制剂的应用。同时, 肿瘤细胞的凋亡, 往往与 BCL-2 家族蛋白失衡密切相关, 而抗肿瘤药物如细胞毒药物与新型抗肿瘤药物大多通过线粒体通路诱导肿瘤细胞凋亡^[12], 该项技术将为广泛抗肿瘤药物及方案筛选决策提供支持。

BH3 分析方法常用的指示剂包括 JC-1 及细胞

色素 C 抗体, 检查手段包括有流式细胞术、酶标仪、荧光显微镜等^[13-15]。我们发现相较于细胞色素 C 抗体, JC-1 染料成本低廉, 信号清晰易辨, 结果更为直观。在检测手段上, 因细胞经洋地黄皂苷透性处理后容易粘连, 使用流式细胞术容易导致堵管风险, 操作不便, 而滤器过滤耗损细胞, 影响检测结果准确性; 荧光酶标仪亦非多大临床实验室所具备, 而荧光显微镜则是大多血液实验室具备的常规实验设备, 但至今尚未见报道在 BH3 检测终点时使用 JC-1 染色后荧光镜检。我们结合前述的方法组合优化出一种简便快捷、结果直观、适合小样本、且成本低廉的基于荧光显微镜和 JC-1 染色的 BH3 分析方法。

结果显示, 基于荧光显微镜和 JC-1 染色的 BH3 分析技术可检测出肿瘤细胞的 BH3 依赖谱系, PCR 分析 BCL-2 家族基因表达量显示与 BH3 分析结果一致, 且 K562 的 BH3 分析结果^[16]与文献报道相符(NB4 尚未见有相关文献报道)。进一步应用临床样本分析发现, BH3 分析结果提示 VEN、BAD 反应不佳的患者临床中容易发生 BCL-2 抑制剂耐药或反应不佳。同时, 不同患者通常在 NOXA 或 HRK 上有不同的表现, 提示不同患者对 MCL1 和 BCL-XL 起调节作用的药物敏感度不一, 为临床单独或联合用药提供依据。本研究对 BH3 分析在血液肿瘤 BCL-2 家族蛋白抑制剂药敏筛选上的应用进行了初步探索, 初步验证了 BH3 分析可预测 BCL-2 家族蛋白抑制剂的敏感性。本研究中分析的 6 例血液肿瘤患者均为维奈克拉治疗无效, 没有维奈克拉治疗缓解的患者作为对照, 故尚需进一步增加样本量, 验证该项技术对血液肿瘤 BH3 药敏分析的准确性。

[参 考 文 献]

- [1] CERTO M, DEL GAIZO MOORE V, NISHINO M, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(5): 351-365. doi: [10.1016/j.ccr.2006.03.027](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027).
- [2] FRASER C, RYAN J, SAROSIEK K. BH3 profiling: a functional assay to measure apoptotic priming and dependencies[M]// GAVATHIOTIS E. BCL-2 family proteins: methods and protocols. New York: Springer, 2019: 61-76. doi: [10.1007/978-1-4939-8861-7_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8861-7_4).
- [3] LI G P, LI D B, YUAN F F, et al. Synergistic effect of chidamide and venetoclax on apoptosis in acute myeloid leukemia cells and its mechanism[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(20): 1575. doi: [10.21037/atm-21-5066](https://doi.org/10.21037/atm-21-5066).
- [4] NGUYEN T, PARKER R, ZHANG Y, et al. Homoharringtonine interacts synergistically with bortezomib in NHL cells through MCL-1 and NOXA-dependent mechanisms[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 1129. doi: [10.1186/s12885-018-5018-x](https://doi.org/10.1186/s12885-018-5018-x).
- [5] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. doi: [10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660).
- [6] JIN. J. New drug therapy for acute myeloid leukemia[J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2019, 32(3): 174-176. [金洁. 急性髓细胞白血病的药物治疗[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(3): 174-176.] doi: [10.13201/j.issn.1004-2806.2019.03.003](https://doi.org/10.13201/j.issn.1004-2806.2019.03.003).
- [7] DINARDO C D, PRATZ K, PULLARKAT V, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2019, 133(1): 7-17. doi: [10.1182/blood-2018-08-868752](https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-868752).
- [8] DINARDO C D, PRATZ K W, LETAI A, et al. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(2): 216-228. doi: [10.1016/S1470-2045\(18\)30010-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30010-X).
- [9] DINARDO C D, RAUSCH C R, BENTON C, et al. Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies[J]. *Am J Hematol*, 2018, 93(3): 401-407. doi: [10.1002/ajh.25000](https://doi.org/10.1002/ajh.25000).
- [10] NI CHONGHAILE T, SAROSIEK K A, VO T T, et al. Pre-treatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy[J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1129-1133. doi: [10.1126/science.1206727](https://doi.org/10.1126/science.1206727).
- [11] DEL GAIZO MOORE V, LETAI A. BH3 profiling-measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2): 202-205. doi: [10.1016/j.canlet.2011.12.021](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.021).
- [12] CARDENAS C, MONTAGNA M K, PITRUZZELLO M, et al. Adipocyte microenvironment promotes Bcl_{xl} expression and confers chemoresistance in ovarian cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(4): 558-569. doi: [10.1007/s10495-016-1339-x](https://doi.org/10.1007/s10495-016-1339-x).
- [13] RYAN J, LETAI A. BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS[J]. *Methods*, 2013, 61(2): 156-164. doi: [10.1016/j.ymeth.2013.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.006).
- [14] MONTERO J, SAROSIEK K A, DEANGELO J D, et al. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy[J]. *Cell*, 2015, 160(5): 977-989. doi: [10.1016/j.cell.2015.01.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.042).
- [15] BHOLA P D, AHMED E, GUERRIERO J L, et al. High-throughput dynamic BH3 profiling may quickly and accurately predict effective therapies in solid tumors[J]. *Sci Signal*, 2020, 13(636): eaay1451. doi: [10.1126/scisignal.aay1451](https://doi.org/10.1126/scisignal.aay1451).
- [16] RAMSEY H E, FISCHER M A, LEE T, et al. A novel MCL1 inhibitor combined with Venetoclax rescues Venetoclax-resistant acute myelogenous leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(12): 1566-1581. doi: [10.1158/2159-8290.CD-18-0140](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0140).

[收稿日期] 2023-11-09