

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.005

· 基础研究 ·

伊马替尼联合 PRI-724 对 BCR-ABL1 阳性慢性髓系白血病细胞及荷瘤模型的抑制作用及其机制

糟秀梅¹, 宋丽君², 魏学花¹, 任全霞³ (1. 银川市第一人民医院 血液内科, 宁夏 银川 750001; 2. 宁夏回族自治区人民医院 血液内科, 宁夏 银川 750002; 3. 银川市第一人民医院 药学部, 宁夏 银川 750001)

[摘要] **目的:** 探讨 β -catenin/CREB 结合蛋白 (CBP) 通路抑制剂 PRI-724 联合伊马替尼对 BCR-ABL1 阳性慢性髓系白血病 (CML) 细胞及荷瘤模型的抗肿瘤作用及其潜在机制。**方法:** 体外实验采用人 K562 细胞、能够稳定表达野生型 BCR-ABL1 (32D-WT) 和 T315I 突变型 BCR-ABL1 (32D-T315I) 的鼠源 32D 髓系细胞。采用 CCK-8 法检测伊马替尼、PRI-724 单药及联合处理对细胞存活能力的影响, 并计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 和联合指数 (CI); 采用 SA- β -gal 染色检测细胞衰老相关表型; 采用免疫共沉淀 (Co-IP) 法检测 PRI-724 对 β -catenin 与 CBP/p300 相互作用的影响。体内实验采用 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞建立裸鼠皮下荷瘤模型, 分别设未治疗组、伊马替尼组、PRI-724 组及伊马替尼+PRI-724 组, 并给予相应处理, 观察瘤体生长变化, 并基于肿瘤生长抑制率 (TGI) 计算体内 CI 。采用 WB 法检测瘤组织中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白、核内 β -catenin/CBP 及下游效应因子 c-Myc、Cyclin D1 的表达。**结果:** 伊马替尼和 PRI-724 对 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞均呈浓度依赖性抑制作用。伊马替尼对 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞的 IC_{50} 分别为 0.860、0.594 和 1.646 $\mu\text{mol/L}$; PRI-724 对上述 3 种细胞的 IC_{50} 分别为 1.120、0.761 和 0.756 $\mu\text{mol/L}$ 。与 32D-WT 细胞相比, 32D-T315I 细胞对伊马替尼的敏感性降低, 而对 PRI-724 的敏感性未见明显下降。K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞中伊马替尼 + PRI-724 联合处理的 CI 分别为 0.635、0.780 和 0.689, 提示两药在体外具有协同抑制作用。SA- β -gal 染色显示, 与伊马替尼单药组相比, PRI-724 单药组 3 种 CML 细胞 β -gal 阳性细胞比例均升高, 联合伊马替尼后进一步升高。Co-IP 结果显示, PRI-724 处理后 β -catenin 免疫沉淀复合物中 CBP 共沉淀水平降低, 而 p300 共沉淀水平升高。体内实验显示, 与伊马替尼单药组相比, 伊马替尼 + PRI-724 联合组瘤体体积和瘤体质量进一步降低; 但基于 TGI 计算的 K562、32D-WT 和 32D-T315I 荷瘤模型体内 CI 均 > 1 , 提示在当前剂量和给药方案下, 两药体内联合效应未达到理论相加预期, 可能存在拮抗趋势。WB 结果显示, 与伊马替尼单药组相比, 联合治疗组瘤体组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值降低, 核内 β -catenin、CBP、c-Myc 和 Cyclin D1 表达水平均降低。**结论:** PRI-724 联合伊马替尼在体外具有协同抑制作用, 并可在体内较伊马替尼单药进一步抑制瘤体生长。其机制可能与调节 β -catenin/CBP/p300 复合物、抑制 PI3K/AKT 信号通路及下调 c-Myc、Cyclin D1 表达有关。

[关键词] 慢性髓系白血病; T315I 突变; PRI-724; 伊马替尼; β -catenin/CREB 结合蛋白; PI3K/AKT

[中图分类号] R733.72; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0848-09

Inhibitory effects and underlying mechanisms of imatinib combined with PRI-724 on BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia cells and xenograft models

Zao Xiumei¹, Song Lijun², Wei Xuehua¹, Ren Quanzia³ (1. Department of Hematology, The First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan, Ningxia 750001, China; 2. Department of Hematology, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia 750002, China; 3. Pharmacy Department, The First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitumor effects and potential mechanisms of the β -catenin/CREB-binding protein (CBP) pathway inhibitor PRI-724 combined with imatinib in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia (CML) cells and xenograft models. **Methods:** Human K562 cells and murine 32D myeloid cells stably expressing wild-type BCR-ABL1 (32D-WT) or T315I-mutant BCR-ABL1 (32D-T315I) were used for *in vitro* experiments. The effects of imatinib, PRI-724, and their combination on cell viability were detected using the CCK-8 assay, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and combination index (CI) were calculated. Senescence-associated phenotypes were examined by SA- β -gal staining. Co-immunoprecipitation (Co-IP) was used to detect the effect of PRI-724 on the interaction between β -catenin and CBP/p300. For *in vivo* experiments, subcutaneous xenograft models were established in nude mice using K562, 32D-WT, and 32D-T315I cells. Untreated, imatinib, PRI-724, and imatinib + PRI-724 groups

[基金项目] 银川市科技计划(2024SF014); 宁夏自然科学基金(2024AAC03782)

[作者简介] 糟秀梅(1985—), 女, 本科

[通信作者] 糟秀梅(扫码获取作者通信方式)



were established, and each group received the corresponding treatment, and tumor growth was monitored. The *in vivo* CI was calculated based on tumor growth inhibition (TGI). WB was used to detect the expression of PI3K/AKT signaling pathway-related proteins, nuclear β -catenin/CBP, and downstream effectors c-Myc and Cyclin D1 in tumor tissues. **Results:** Imatinib and PRI-724 inhibited K562, 32D-WT, and 32D-T315I cells in a concentration-dependent manner. The IC_{50} values of imatinib in K562, 32D-WT, and 32D-T315I cells were 0.860, 0.594, and 1.646 $\mu\text{mol/L}$, respectively; the IC_{50} values of PRI-724 in the above three cell types were 1.120, 0.761, and 0.756 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with 32D-WT cells, 32D-T315I cells showed reduced sensitivity to imatinib, whereas no obvious decrease in sensitivity to PRI-724 was observed. The CI values of imatinib + PRI-724 in K562, 32D-WT, and 32D-T315I cells were 0.635, 0.780, and 0.689, respectively, suggesting a synergistic inhibitory effect *in vitro*. SA- β -gal staining showed that, compared with imatinib monotherapy, PRI-724 monotherapy increased the proportion of SA- β -gal-positive cells in all three cell models, and the combination further increased this proportion. Co-IP results showed that, after PRI-724 treatment, the level of CBP co-precipitated with β -catenin was decreased, whereas the level of p300 co-precipitated with β -catenin was increased. *In vivo* experiments showed that, compared with the imatinib monotherapy group, the imatinib + PRI-724 combination group showed further reductions in tumor volume and tumor weight. However, the *in vivo* CI values calculated using the TGI-based response-additivity approach in the K562, 32D-WT, and 32D-T315I xenograft models were all > 1 , suggesting that, under the current dose and administration regimen, the *in vivo* combination effect of the two drugs did not reach the expected additive effect and may have shown an antagonistic trend. WB showed that, compared with the imatinib monotherapy group, the combination treatment group had lower p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT ratios and lower expression levels of nuclear β -catenin, CBP, c-Myc, and Cyclin D1 in tumor tissues. **Conclusion:** PRI-724 combined with imatinib exhibits a synergistic inhibitory effect *in vitro* and further suppresses tumor growth *in vivo* compared with imatinib monotherapy. The underlying mechanism may be related to modulation of the β -catenin/CBP/p300 complex, inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway, and downregulation of c-Myc and Cyclin D1 expression.

[Key words] chronic myeloid leukemia (CML); T315I mutation; PRI-724; imatinib; β -catenin/CREB-binding protein (β -catenin/CBP); PI3K/AKT

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 848-856. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.005]

慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种骨髓增殖性肿瘤, 其发生主要源于 ABL1 基因序列 (9q34) 与 BCR 基因序列 (22q11) 发生相互易位 [t(9;22)(q34;q11)], 导致 22 号染色体长臂端截断变短, 这一异常的衍生 22 号染色体被称为费城染色体 (Philadelphia chromosome, Ph)。由此产生的 BCR-ABL1 嵌合蛋白是一种组成型激活的酪氨酸激酶, 可激活多种信号通路, 共同驱动造血细胞恶性转化^[1]。随着酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 的广泛应用, CML 患者的预期寿命显著延长。但与此同时, 其患病人数仍持续增长, 预计到 2050 年, 美国的 CML 患病人数将达到 18 万人^[2]。目前, 多种 TKI 已获批用于 CML 的临床治疗。其中, 伊马替尼是第一代 TKI, 是 CML 一线治疗的重要药物^[3]。然而, 部分患者因出现伊马替尼耐药或不耐受而不得不停药或更换治疗^[4]。BCR-ABL1 结构域突变是导致 TKI 耐药的主要机制之一, 其中 T315I 突变尤为常见^[5]。因此, 研发 BCR-ABL1 非依赖性靶向药物对携带 BCR-ABL1 结构域突变的 CML 患者具有重要的临床意义。

β -catenin 是一种在进化上高度保守的多功能蛋白, 在细胞增殖、分化、干细胞特性维持及肿瘤发生发展中发挥重要作用^[6-8]。近年来, 多种 β -catenin 抑制剂已开发并用于 CML 治疗研究^[9]。其中, PRI-724 是一种可阻断 β -catenin 与其共转录因子 CREB 结合蛋白 (CREB binding protein, CBP) 相互作用的抑制剂, 已在头颈癌、

肝癌等临床前及 I~II 期临床研究中表现出良好的抗肿瘤效果^[10-12]。然而, PRI-724 用于 T315I 突变型 CML 的治疗效果及其潜在的抗肿瘤机制, 尚缺乏明确证据。因此, 本研究通过体外细胞实验和体内裸鼠荷瘤实验, 探讨 β -catenin 抑制剂 PRI-724 联合伊马替尼治疗 T315I 突变型 CML 的抗肿瘤效应及其潜在分子机制。

1 实验材料与方法

1.1 动物、细胞及主要试剂

5~6 周龄、体质量 21~25 g 的 C57 nu/nu 裸鼠, 雌、雄各 36 只, 均购自宁夏医科大学实验动物中心 [生产许可证号: SCXK(宁)2026-0001], 小鼠饲养于恒温 21~25 $^{\circ}\text{C}$ 、恒湿 (55%~70%)、配备有 12 h 光照/12 h 黑暗循环的标准 SPF 级鼠房。动物实验流程符合动物福利伦理要求, 经宁夏银川市第一人民医院伦理委员会审核批准 [批准号: KY-2024-56]。

人类 CML 细胞 K562 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 稳定表达野生型 BCR-ABL1 (32D-WT) 或 T315I 突变型 BCR-ABL1 (32D-T315I) 的鼠源 32D 髓系细胞由广州中山大学眼科医院潘景轩教授实验室惠赠。

细胞核蛋白/细胞质蛋白提取试剂盒 (WB 高效型) (N1491647) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, CBP/ β -catenin 拮抗剂 PRI-724 (S8968) 购自美国 Selleck Chemicals 公司, 伊马替尼 (D56847) 购自北

京博奥森生物技术有限公司, 抗人/小鼠 Lamin B1 (702972)、p-PI3K (PA5-17387)、PI3K (MA5-14870)、p-AKT (17-9715-42)、AKT (44-609G)、GAPDH (MA5-15738)、CBP (MA5-13634)、p300 (MA1-16608)、c-Myc (MA1-980)、Cyclin D1 (MA5-14512)、IP 用 β -catenin (13-8400) 及 HRP 标记 IgG 二抗 (31460) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养

K562 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 32D-WT 细胞和 32D-T315I 细胞培养于含 5×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$ Wnt3a、10% 胎牛血清、100 U/mL 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基中。上述细胞均置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的细胞培养箱中维持培养。

1.3 CCK-8 法检测伊马替尼和 PRI-724 对 CML 细胞增殖能力的影响

将 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞均以 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中。分别加入 0、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.50 和 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 的伊马替尼或 PRI-724 处理 48 h, 以 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理的细胞作为对照。处理结束后, 每孔加入 3 μL CCK-8 试剂并继续培养 6 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度 (D) 值, 使用 GraphPad Prism v8 软件绘制剂量-反应曲线并计算 IC_{50} 值, 以比较两种药物对 CML 细胞增殖能力的影响。

1.4 联合指数 (combination index, CI) 法评价伊马替尼和 PRI-724 的联合用药效应

K562、32D-WT 和 32D-T315I 3 种细胞均划分为伊马替尼、PRI-724 单药和两药联合处理组, 联合组采用等浓度配比给药, 剂量梯度分别为 0、0.050、0.125、0.250、0.375、0.500、0.625、0.750、0.875、1.000、1.250 和 1.500 $\mu\text{mol/L}$ 。

$CI = D_{\text{伊马替尼}}/D_{x, \text{伊马替尼}} + D_{\text{PRI-724}}/D_{x, \text{PRI-724}}$ 其中, $D_{\text{伊马替尼}}$ 和 $D_{\text{PRI-724}}$ 分别为联合处理时 2 种药物在达到特定细胞抑制率 f_a 时的实际给药剂量; $D_{x, \text{伊马替尼}}$ 和 $D_{x, \text{PRI-724}}$ 分别为两种药物单独作用时达到相同 f_a 时所需的理论剂量, 按 $D_x = \text{IC}_{50} \times f_a / (1 - f_a)$ 计算, IC_{50} 为该药物的半数抑制浓度。随后, 根据不同 f_a 水平下计算得到的 CI 值绘制 f_a -CI 曲线^[13]。

1.5 SA- β -gal 染色检测伊马替尼和 PRI-724 对 CML 细胞衰老相关表型的影响

将 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞分别以 1.5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每种细胞均分别给予伊马替尼、PRI-724 或伊马替尼 + PRI-724 联合处理。单药组剂量按各药物 IC_{50} 设置, 联合处理组中伊马替尼和 PRI-724 均按各自 IC_{50} 剂量加入, 处理 48 h。

处理结束后, 细胞经 2% 多聚甲醛固定, 按照 SA- β -gal 染色试剂盒说明书进行染色, 随后在 IX71S8F 型倒置光学显微镜下观察并采集图像。蓝色染色细胞计为 SA- β -gal 阳性细胞。每孔随机选取 5 个视野, 统计 SA- β -gal 阳性细胞比例, 并取平均值代表该孔阳性率; 每组设置至少 3 个复孔, 取各复孔阳性率的平均值用于统计分析。

1.6 免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 法检测 PRI-724 对 CML 细胞中 β -catenin 与 CBP/p300 结合的影响

将 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞分别接种于 6 孔板中, 并按实验分组给予相应药物处理。处理结束后收集各组细胞, 使用 PBS 洗涤后加入 1 mL 4 °C 预冷的 Co-IP 裂解液 (含蛋白酶抑制剂)。充分裂解后收集上清, 并采用 BCA 法测定蛋白浓度。随后, 各组取等量总蛋白, 将其中少量样本留作 Input, 其余样本用于免疫沉淀实验。用于免疫沉淀的蛋白样本先加入 Protein G Plus/Protein A 琼脂糖珠, 以预清除非特异性结合。随后, 分别加入 IgG 对照抗体或 β -catenin 抗体 (1 $\mu\text{g/mL}$), 4 °C 反应过夜。次日, 再加入 Protein G Plus/Protein A 琼脂糖珠继续反应, 以捕获抗原-抗体免疫复合物。沉淀复合物经 IP 裂解缓冲液洗涤 3 次后, 加入蛋白上样缓冲液煮沸变性, 随后采用 WB 检测 β -catenin 免疫沉淀复合物中 CBP 和 p300 的共沉淀水平 (所用检测抗体均 1:1 000 稀释)。

1.7 WB 法检测伊马替尼和 PRI-724 对 CML 细胞及瘤体中相关蛋白表达的影响

取各组细胞或瘤体组织样本, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白, 并按照细胞核蛋白/细胞质蛋白提取试剂盒说明书进行核蛋白提取。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离, 并转膜至 PVDF 膜进行封闭处理。封闭后, 加入相应一抗 4 °C 反应过夜。

总蛋白样本用于检测 PI3K/AKT 信号通路活性及下游效应因子表达。其中, PI3K/AKT 信号通路活性检测采用 p-PI3K 抗体 (1:1 500)、PI3K 抗体 (1:2 000)、p-AKT 抗体 (1:1 500) 和 AKT 抗体 (1:2 000), 并以 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值评价通路活化水平; 下游效应因子表达采用 c-Myc 抗体 (1:2 000) 和 Cyclin D1 抗体 (1:2 000)。总蛋白检测以 GAPDH 抗体 (1:2 000) 作为内参。核蛋白样本用于检测核内 β -catenin 和 CBP 表达水平, 分别采用 β -catenin 抗体 (1:2 000) 和 CBP 抗体 (1:2 000) 进行反应, 并以 Lamin B (1:2 000) 作为核蛋白内参。次日, 加入 HRP 标记二抗 (1:5 000) 室温反应, 目的条带采用超敏 ECL 化学发光底物显影, 并进行灰度值分析。

1.8 CML细胞裸鼠皮下荷瘤模型的建立及伊马替尼与PRI-724单药或联合治疗

将K562、32D-WT和32D-T315I细胞分别以 1.5×10^7 个细胞重悬于100 μL 基质胶中,皮下注射至裸鼠左后肢背侧皮下,以建立皮下荷瘤模型。细胞接种3 d后开始给药,并观察至第21天。给药期间每隔3 d使用游标卡尺测量瘤体长径(L)和短径(W),按公式 $V = 0.5 \times L \times W^2$ 。实验结束后处死裸鼠,剥离瘤体并称重。

72只C57 nu/nu裸鼠随机分为12组,每组6只,雌雄各3只。K562、32D-WT和32D-T315I荷瘤小鼠分别设未治疗组、伊马替尼组、PRI-724组及伊马替尼+PRI-724组。细胞接种3 d后开始给药:伊马替尼组口服伊马替尼(50 mg/kg,每日1次)^[14];PRI-724组腹腔注射(i.p.)PRI-724(30 mg/kg,每日1次)^[14];伊马替尼+PRI-724(联合用药)组口服伊马替尼(50 mg/kg,每日1次)联合PRI-724(i.p.,30 mg/kg,每日1次)^[15];未治疗组仅在皮下接种相应肿瘤细胞,不给予药物干预。

为评价不同治疗方案的体内抑瘤效果及联合用药效应,本研究基于肿瘤生长抑制率(tumor growth inhibition, TGI)计算体内联合指数CI。

TGI按以下公式计算: $TGI_{\tau} = \{1 - [V_{\tau(Tend)} - V_{\tau(T0)}] / [V_{\text{未治疗组}(Tend)} - V_{\text{未治疗组}(T0)}]\} \times 100\%$ 。其中, τ 代表伊马替尼、PRI-724或伊马替尼+PRI-724处理组,T0为给药起始时间,Tend为实验终点。

体内CI按以下公式计算: $CI = TGI_{\text{add}} / TGI_{\text{Combined}}$,其中 $TGI_{\text{add}} = TGI_{\text{伊马替尼}} + TGI_{\text{PRI-724}}$,而 $TGI_{\text{Combined}} = TGI_{\text{伊马替尼+PRI-724}}$ 。 $CI=1$ 表示相加作用; $CI<1$ 表示协同作用; $CI>1$ 表示未达到相加预期,提示可能存在拮抗作用^[13]。

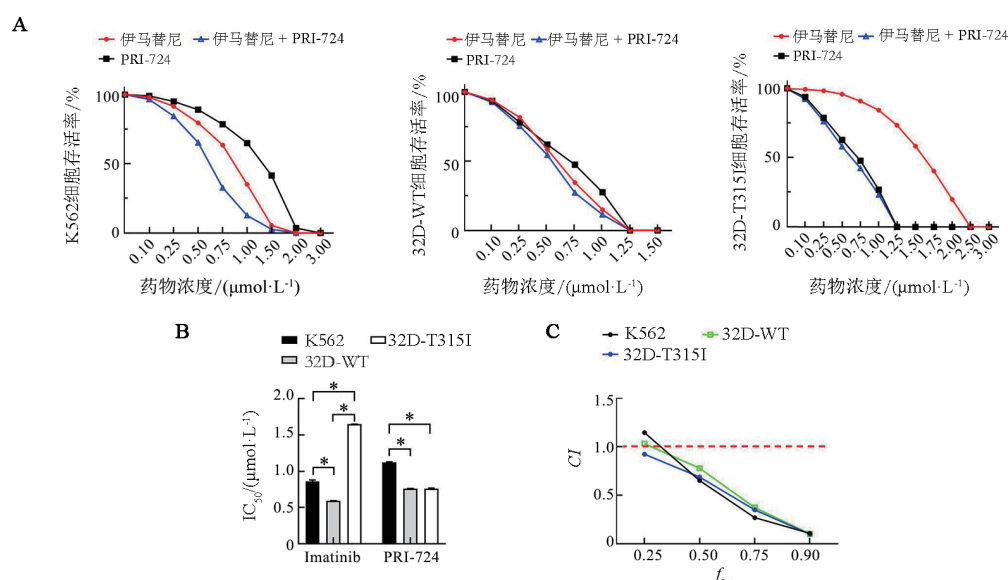
1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism v8软件进行统计学分析。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用Tukey事后检验。所有体外实验均独立重复6次;动物实验中72只C57 nu/nu裸鼠随机分为12组,每组6只,每只裸鼠作为1个独立生物学重复。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 伊马替尼和PRI-724浓度依赖性降低3种CML细胞存活能力

CCK-8法检测结果(图1A)显示,伊马替尼和PRI-724单药及伊马替尼+PRI-724联合用药对K562、32D-WT及32D-T315I细胞均呈现浓度依赖性的细胞增殖抑制作用。 IC_{50} 检测结果(图1B)显示,伊马替尼单药处理后,各组细胞的 IC_{50} 分别为0.860、0.594和1.646 $\mu\text{mol/L}$;PRI-724单药处理后,各组细胞的 IC_{50} 分别为1.120、0.761和0.756 $\mu\text{mol/L}$ 。与32D-WT细胞相比,32D-T315I细胞对伊马替尼的 IC_{50} 明显升高,提示T315I突变降低了细胞对伊马替尼的敏感性。相比之下,PRI-724对32D-WT细胞和32D-T315I细胞的 IC_{50} 未见明显差异,提示T315I突变未明显影响PRI-724对CML细胞的增殖抑制作用。进一步基于伊马替尼+PRI-724联合用药的CCK-8检测结果计算CI,结果(图1C)显示,K562、32D-WT和32D-T315I细胞的CI值分别为0.635、0.780和0.689,均小于1,提示联合用药在体外对上述3种CML细胞具有协同抑制作用。



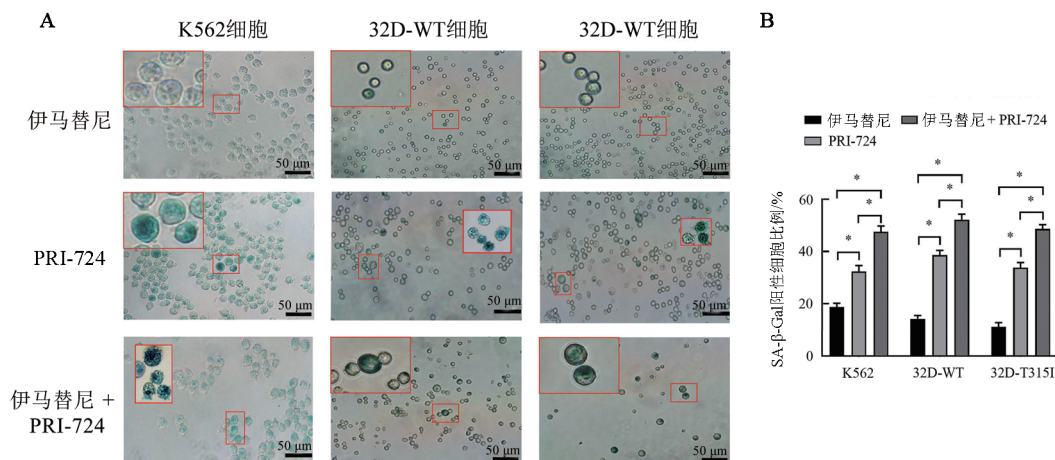
A:不同浓度伊马替尼、PRI-724单药及联合处理48 h后3种CML细胞的存活率曲线;B:伊马替尼和PRI-724处理48 h后3种CML细胞 IC_{50} 值的统计分析;C:伊马替尼联合PRI-724处理3种CML细胞的 f_a -CI曲线。* $P<0.05$ 。

图1 伊马替尼、PRI-724单药及联合处理对3种CML细胞存活率及联合效应的影响

2.2 PRI-724 促进 3 种 CML 细胞衰老相关表型

SA- β -gal 染色结果(图 2A)显示,伊马替尼、PRI-724 及伊马替尼 + PRI-724 联合处理后,3 种 CML 细胞中均可见不同程度的蓝色 SA- β -gal 阳性染色细胞。阳性细胞比例统计结果(图 2B)显示,3 种

CML 细胞在不同药物处理组间的 SA- β -gal 阳性细胞比例存在显著差异。与伊马替尼单药组相比,其余两组的 SA- β -gal 阳性细胞比例均显著升高(均 $P < 0.05$),且联合用药处理后的 SA- β -gal 阳性细胞比例相较于 PRI-724 单药组进一步升高($P < 0.05$)。



A: SA- β -gal 染色观察不同药物处理后 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞的衰老相关表型,蓝色染色细胞为 SA- β -gal 阳性细胞;

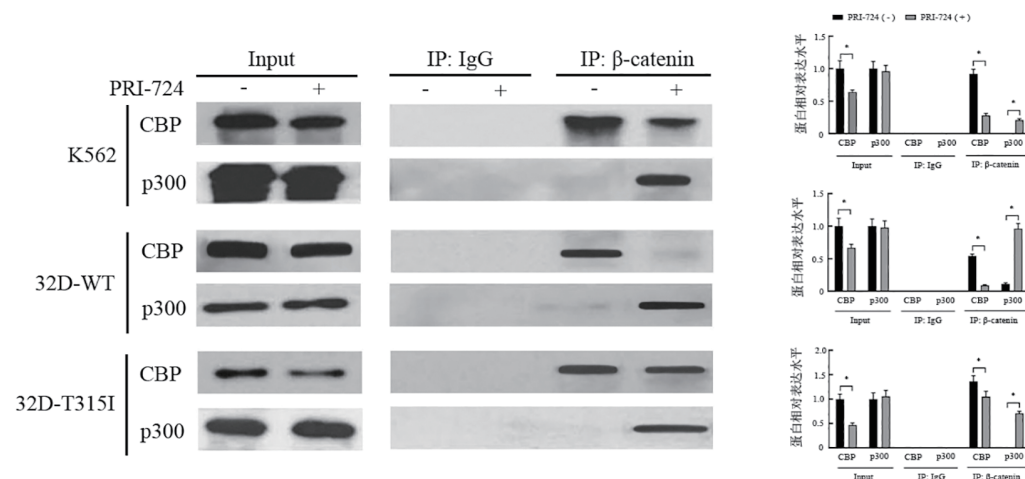
B: 各组 SA- β -gal 阳性细胞比例统计结果。* $P < 0.05$ 。

图2 伊马替尼和 PRI-724 对 3 种 CML 细胞 SA- β -gal 阳性细胞比例的影响

2.3 PRI-724 抑制 β -catenin 与 CBP 结合并促进其与 p300 结合

Co-IP 检测结果(图 3)显示,在 Input 样本中,与未处理组相比, PRI-724 处理后 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞中 CBP 总蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),而 p300 总蛋白水平差异无统计学意义

($P > 0.05$)。在 IgG 阴性对照组中,未见明显 CBP 和 p300 共沉淀条带,提示免疫沉淀结果具有较好的特异性。在 β -catenin 免疫沉淀复合物中,与未处理组相比,加 PRI-724 处理后 3 种细胞的 CBP 共沉淀水平均显著降低($P < 0.05$),而 p300 共沉淀水平均显著升高($P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ 。

图3 Co-IP 法检测 PRI-724 对 3 种 CML 细胞中 β -catenin 与 CBP/p300 相互作用的影响

2.4 联合用药较伊马替尼单药进一步抑制 CML 细胞裸鼠移植瘤的生长

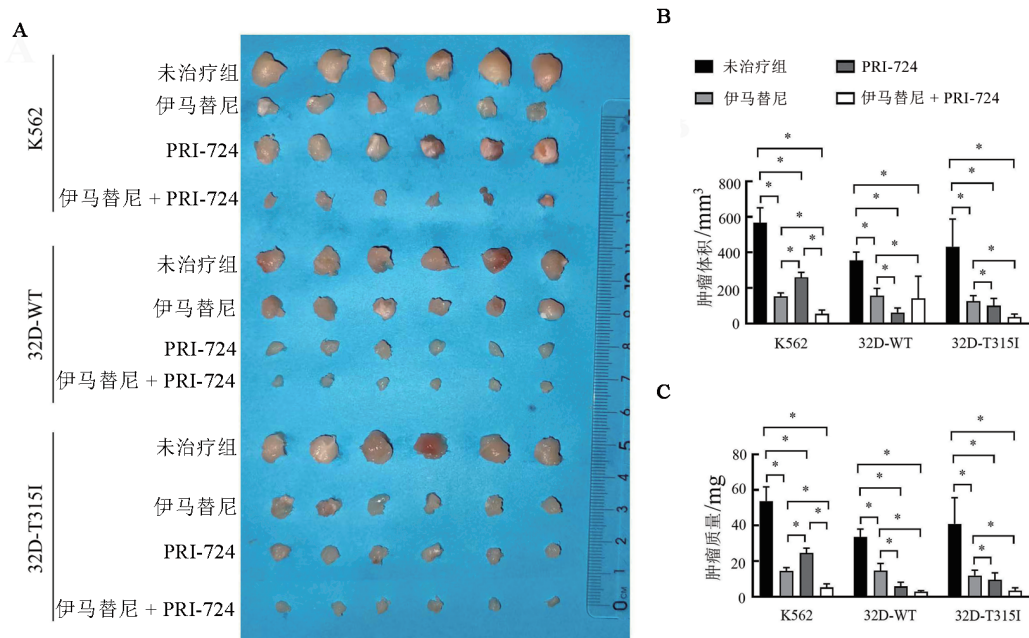
体内荷瘤实验结果(图 4)显示, K562、32D-WT

和 32D-T315I 细胞均可在裸鼠体内形成皮下移植瘤。经相应药物处理 21 d 后,与未治疗组相比,各治疗组的瘤体体积、质量均有不同程度降低。与伊马替尼

单药组相比,伊马替尼 + PRI-724 联合用药组在 3 种荷瘤模型中的瘤体体积、质量均进一步降低(均 $P < 0.05$),提示联合用药可显著增强单药对 CML 荷瘤模型的抑瘤效果,但其相对于 PRI-724 单药的优势及体内联合效应仍需结合 TGI 及 CI 结果谨慎判断。

各组不同观察时点的瘤体体积见图 5。进一步基于 TGI 评估体内联合效应,结果(表 1)显示,K562、32D-WT 及 32D-T315I 荷瘤模型中伊马替尼 + PRI-724 联合组的 TGI 分别为 92.75%、67.58% 和 94.67%。根据

TGI 计算所得 CI 值分别为 1.41、2.14 和 1.61,均大于 1,提示在本研究剂量和给药方案下,伊马替尼与 PRI-724 的体内联合效应未达到理论相加预期,可能存在拮抗趋势。其中,32D-WT 荷瘤模型中 PRI-724 单药组 TGI 为 85.98%,高于联合组的 67.58%,进一步提示该模型中联合治疗未优于 PRI-724 单药治疗。因此,PRI-724 联合伊马替尼虽可较伊马替尼单药进一步抑制瘤体生长,但其体内联合效应仍需通过优化剂量配比和给药方案进一步验证。



A: K562、32D-WT 和 32D-T315I 荷瘤小鼠经不同药物处理后剥离瘤体的大体形态; B: 各组荷瘤小鼠瘤体体积统计结果; C: 各组荷瘤小鼠瘤体质量统计结果。* $P < 0.05$ 。

图 4 PRI-724 与伊马替尼联合治疗对 3 种 CML 细胞皮下荷瘤小鼠模型瘤体生长的抑制作用

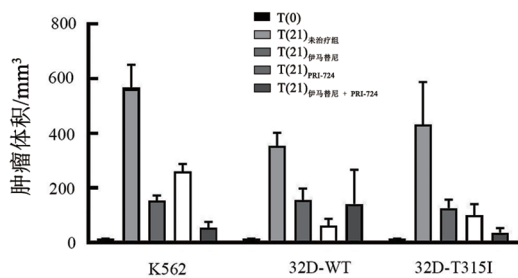


图 5 伊马替尼和 PRI-724 单药或联合治疗对 3 种 CML 细胞荷瘤模型肿瘤体积变化量的影响

2.5 伊马替尼联合 PRI-724 抑制瘤体中 PI3K/AKT 信号通路活性

WB 法检测结果(图 6)显示,在 K562、32D-WT 和 32D-T315I 细胞 3 种荷瘤模型的瘤体组织中,伊马替尼 + PRI-724 联合组的 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值较伊马替尼单药组显著降低(均 $P < 0.05$)。上述结果提示,PRI-724 联合伊马替尼可进一步抑制 CML 荷瘤

模型瘤体组织中 PI3K/AKT 信号通路的活化。

表 1 不同治疗方案对 3 种 CML 细胞荷瘤模型的 TGI 及 CI 计算结果			
评价指标	K562 细胞	32D-WT 细胞	32D-T315I 细胞
$TGI_{伊马替尼}/\%$	74.86	58.35	73.36
$TGI_{PRI-724}/\%$	55.58	85.98	79.38
$TGI_{伊马替尼 + PRI-724}/\%$	92.75	67.58	94.67
CI	1.41	2.14	1.61

2.6 伊马替尼联合 PRI-724 降低瘤体组织中核内 β -catenin/CBP 及下游促癌相关效应因子表达

WB 法检测结果(图 7)显示,在 K562、32D-WT 及 32D-T315I 3 种荷瘤模型的瘤体组织中,与伊马替尼单药组相比,伊马替尼 + PRI-724 联合组瘤体组织细胞核内 β -catenin 和 CBP 蛋白表达水平均显著降低(均 $P <$

0.05)。同时, β -catenin 下游促癌相关效应因子 c-Myc 和 Cyclin D1 的表达水平亦显著下调(均 $P < 0.05$)。其中, 32D-T315I 荷瘤模型中 c-Myc 的表达水平下降幅度最大(从 1.00 ± 0.14 降至 0.26 ± 0.02)。上述结果表明,伊马

替尼联合 PRI-724 降低瘤体组织中核内 β -catenin/CBP 及下游促癌相关效应因子表达,并抑制 c-Myc 和 Cyclin D1 等下游效应因子的表达,从而可能参与其抗肿瘤作用。

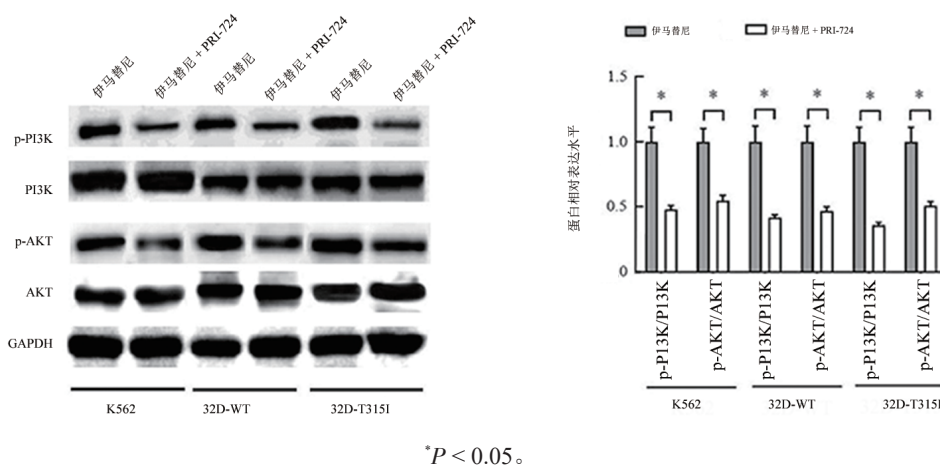


图6 PRI-724与伊马替尼联合治疗对荷瘤裸鼠的瘤体中PI3K/AKT信号通路活性的影响

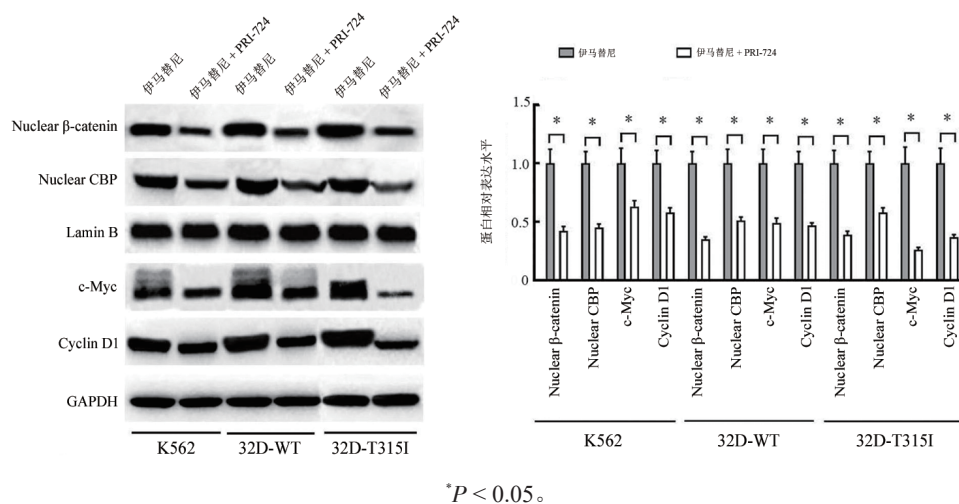


图7 伊马替尼联合 PRI-724 对 CML 荷瘤裸鼠瘤体组织中 β -catenin/CBP 及下游效应因子表达的影响

3 讨论

BCR-ABL1 嵌合蛋白是一种具有组成性激活特征的酪氨酸激酶,可持续激活 PI3K/AKT、RAS/MAPK 及 JAK/STAT 等多条下游信号通路,从而促进白血病细胞增殖存活、抑制细胞凋亡、异常调节细胞黏附与迁移,并诱发基因组不稳定性^[1]。尽管一代及二代 TKI 在 CML 治疗中取得了显著疗效,但 T315I 突变介导的耐药仍是临床面临的重大挑战^[16]。近年来,已针对这一突变开发出多种新型 TKI 并取得一定疗效,如阿西米尼(asciminib)^[17]和奥雷巴替尼(olverembatinib)^[18-19],但治疗相关不良反应及耐药问题仍需关注。因此,探索不完全依赖 BCR-ABL1 激酶抑制的新型治疗策略,对于改善 T315I 突变 CML 患者的治疗效果具有重要意义。

Wnt/ β -catenin 信号通路是调控造血干细胞自我更新和干性维持的关键通路之一^[20-21]。在经典 Wnt 信号激活状态下, β -catenin 可进入细胞核,并与 T 细胞转录因子 1 (T cell factor 1, TCF1)/淋巴细胞增强因子 1 (lymphoid enhancer factor 1, LEF1) 及 CBP、p300 等转录共调节因子共同调控下游靶基因表达^[22]。既往研究^[23-24]表明,该通路的异常活化与 CML 细胞增殖、白血病干/祖细胞维持及 TKI 耐药密切相关。其中, β -catenin 与 CBP 结合通常与细胞增殖和干细胞特性维持相关,而 β -catenin 与 p300 结合则更倾向于促进细胞分化相关转录程序^[25-26]。因此,靶向 β -catenin/CBP 相互作用,可能为克服 CML 耐药和诱导白血病细胞分化或衰老提供新的治疗切入点。

本研究结果显示, PRI-724 对 K562、32D-WT 和

32D-T315I 细胞均具有浓度依赖性的增殖抑制作用。对比 32D-WT 和 32D-T315I 细胞的实验结果可见, T315I 突变降低了细胞对伊马替尼的敏感性, 但未明显影响 PRI-724 对 CML 细胞的抑制作用。进一步分析显示, 伊马替尼与 PRI-724 联合处理后, 3 种 CML 细胞的 *CI* 值均小于 1, 提示两药在体外具有协同抑制效应。

细胞衰老是肿瘤治疗中重要的抗肿瘤机制之一。本研究采用 SA- β -gal 染色检测细胞衰老相关表型, 结果提示, PRI-724 能够诱导 CML 细胞出现衰老相关表型, 且该效应在与伊马替尼联用时进一步增强; 但该药物是否真正诱导细胞衰老, 仍需结合细胞周期阻滞及 p16、p21、p53 等衰老相关指标进一步验证。结合 Co-IP 结果推测, PRI-724 可能通过调节 β -catenin 相关转录复合物组成以减少 β -catenin 与 CBP 的结合, 并增加其与 p300 的结合。上述变化可能与 CML 细胞增殖抑制及衰老相关表型增加有关, 但其对具体转录程序的影响仍需进一步验证。需要指出的是, 本研究中 PRI-724 处理后 CBP 总蛋白水平亦降低。因此, β -catenin 免疫沉淀复合物中 CBP 减少可能同时受到 CBP 总蛋白表达下降及 β -catenin/CBP 相互作用减弱的共同影响。

本研究进一步通过裸鼠荷瘤模型评估 PRI-724 与伊马替尼联合的体内抗肿瘤效果, 结果显示, 相较于伊马替尼单药, PRI-724 联合伊马替尼可进一步抑制 CML 移植瘤生长。但结合 *TGI* 与 *CI* 结果综合分析, 尚不能判定两药体内存在协同效应。WB 法结果显示, 联合治疗组瘤体组织中 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值降低, 提示联合治疗可进一步抑制 PI3K/AKT 信号通路活化。既往研究亦证实, PI3K/AKT/mTOR 信号通路异常活化参与 CML 细胞对伊马替尼的耐药过程^[27]; 在 T315I 突变相关 CML 中, PI3K/AKT 信号活化亦可通过调控 c-Myc 等下游效应因子促进细胞存活和耐药^[28]。本研究中, 联合治疗还下调了 β -catenin/CBP 相关信号及其下游促癌相关效应因子 c-Myc 和 Cyclin D1 的表达, 提示 PRI-724 联合伊马替尼的抗肿瘤效应可能与降低核内 β -catenin/CBP 水平、抑制 PI3K/AKT 通路活化, 以及下调 c-Myc、Cyclin D1 等下游促癌效应因子表达有关。

值得注意的是, 本研究体外 *CI* 结果与体内 *CI* 结果并不完全一致。体外实验中, 伊马替尼与 PRI-724 在 3 种 CML 细胞中均表现为协同作用; 然而, 基于 *TGI* 计算的体内 *CI* 值均大于 1, 提示在当前剂量和给药方案下, 两药在体内的联合效应未达到理论相加预期。造成上述差异的原因可能包括: 其一, 体内药物吸收、分布、代谢和清除过程较体外环境更为复杂, 两药在体内可能存在药代动力学或药效学相互影响; 其二, 本研究体内给药剂量和频率尚未经过系

统剂量优化, 可能未能反映两药最佳联合比例; 其三, 动物实验样本量有限, 可能影响 *TGI* 及 *CI* 计算的稳定性; 其四, 基于 *TGI* 的 *CI* 计算模型对肿瘤生长抑制与药物剂量之间的关系存在一定假设, 该假设未必完全适用于本研究所用的药物组合及模型体系。因此, 本研究中体内 *CI* 结果应谨慎解读, 后续仍需通过扩大样本量、优化剂量配比、增加多剂量联合设计及采用更适宜的药效学模型进一步验证两药的体内联合效应。

综上所述, 本研究结果提示, β -catenin/CBP 通路抑制剂 PRI-724 可抑制 CML 细胞增殖并促进其衰老相关表型形成, 且该作用可能不依赖于 T315I 突变状态。在本研究给药条件下, PRI-724 联合伊马替尼未达到理论相加预期, 暂无法证实体内协同作用。后续可借助免疫荧光、染色质免疫沉淀、核质分离及功能回补等实验, 进一步阐明 PRI-724 对 β -catenin 转录程序的调控作用、药物干预后 β -catenin 的核内分布改变及其下游分子机制。

[参 考 文 献]

- [1] Osman A E G, Deininger M W. Chronic myeloid leukemia: modern therapies, current challenges and future directions[J]. Blood Rev, 2021, 49: 100825. DOI:10.1016/j.blre.2021.100825.
- [2] Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring[J]. Am J Hematol, 2022, 97(9): 1236-1256. DOI:10.1002/ajh.26642.
- [3] Eşkazan A E, Kok C H, Yeung D, et al. Editorial: advances in the treatment of chronic myeloid leukemia[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1166588. DOI:10.3389/fonc.2023.1166588.
- [4] Zackova D, Klamova H, Belohlavkova P, et al. Dasatinib treatment long-term results among imatinib-resistant/intolerant patients with chronic phase chronic myeloid leukemia are favorable in daily clinical practice[J]. Leuk Lymphoma, 2021, 62(1): 194-202. DOI:10.1080/10428194.2020.1827242.
- [5] Lu T T, Cao J Y, Zou F M, et al. Discovery of a highly potent kinase inhibitor capable of overcoming multiple imatinib-resistant ABL mutants for chronic myeloid leukemia (CML)[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 897: 173944. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.173944.
- [6] 闻若彤, 韩磊, 朱文涵, 等. BRD8 介导 CAPN2 调节 Wnt/ β -catenin 信号通路维持乳腺癌细胞干性[J]. 解剖科学进展, 2025, 31(3): 313-317. DOI:10.16695/j.cnki.1006-2947.2025.03.005.
- [7] 院刚, 朱明慧, 郝灵芳. LRP5 通过调控 Wnt/ β -catenin 通路影响直肠癌细胞 SW837 增殖、侵袭和迁移[J]. 解剖科学进展, 2025, 31(3): 405-408. DOI:10.16695/j.cnki.1006-2947.2025.03.027.
- [8] Dev A J, Vachher M, Prasad C P. β -catenin inhibitors in cancer therapeutics: intricacies and way forward[J]. Bioengineered, 2023, 14(1): 2251696. DOI:10.1080/21655979.2023.2251696.
- [9] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 165. DOI:10.1186/s13045-020-00990-3.

- [10] Kleszcz R, Frąckowiak M, Dorna D, et al. Combinations of PRI-724 Wnt/ β -catenin pathway inhibitor with vismodegib, erlotinib, or HS-173 synergistically inhibit head and neck squamous cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10448. DOI:10.3390/ijms241310448.
- [11] Kimura K, Kanto T, Shimoda S, et al. Safety, tolerability, and anti-fibrotic efficacy of the CBP/ β -catenin inhibitor PRI-724 in patients with hepatitis C and B virus-induced liver cirrhosis: an investigator-initiated, open-label, non-randomised, multicentre, phase 1/2a study[J]. *EBioMedicine*, 2022, 80: 104069. DOI:10.1016/j.ebiom.2022.104069.
- [12] Gabata R, Harada K, Mizutani Y, et al. Anti-tumor activity of the small molecule inhibitor PRI-724 against β -catenin-activated hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(9): 5211-5219. DOI:10.21873/anticancer.14524.
- [13] Melillo N, Dickinson J, Tan L, et al. Radius additivity score: a novel combination index for tumour growth inhibition in fixed-dose xenograft studies[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1272058. DOI:10.3389/fphar.2023.1272058.
- [14] Pan T, Wang M, Yang L X, et al. Aptamer-based drug delivery for targeted therapy of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor[J]. *Theranostics*, 2025, 15(17): 8738-8756. DOI:10.7150/thno.115496.
- [15] Schmidtova S, Kalavaska K, Liskova V, et al. Targeting of deregulated Wnt/ β -catenin signaling by PRI-724 and LGK974 inhibitors in germ cell tumor cell lines[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4263. DOI:10.3390/ijms22084263.
- [16] 陈晨, 许娜, 江雪杰, 等. T315I 基因突变的慢性髓性白血病临床特征及泊那替尼疗效[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(3): 364-368. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2019.03.16.
- [17] Cortes J E, Sasaki K, Kim D W, et al. Asciminib monotherapy in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia with the T315I mutation after ≥ 1 prior tyrosine kinase inhibitor: 2-year follow-up results[J]. *Leukemia*, 2024, 38(7): 1522-1533. DOI:10.1038/s41375-024-02278-8.
- [18] Jiang Q, Li Z R, Qin Y Z, et al. Olverembatinib (HQP1351), a well-tolerated and effective tyrosine kinase inhibitor for patients with T315I-mutated chronic myeloid leukemia: results of an open-label, multicenter phase 1/2 trial[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 113. DOI:10.1186/s13045-022-01334-z.
- [19] 胡贝妮, 吕康康, 徐倩文, 等. 奥雷巴替尼在伴 T315I 突变的复发 Ph^+ 急性淋巴细胞白血病的临床应用研究[J]. *临床血液学杂志*, 2025, 38(5): 394-400. DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2025.05.012.
- [20] Kwarteng E O, Hétu-Arbour R, Heinonen K M. Frontline science: Wnt/ β -catenin pathway promotes early engraftment of fetal hematopoietic stem/progenitor cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103(3): 381-393. DOI: 10.1002/JLB.1HI0917-373R.
- [21] Wang Y T, Cui H, Tao S, et al. High canonical Wnt/ β -catenin activity sensitizes murine hematopoietic stem and progenitor cells to DNA damage[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(1): 212-221. DOI: 10.1007/s12015-019-09930-2.
- [22] Liu H W, Su Y K, Bamodu O A, et al. The disruption of the β -catenin/TCF-1/STAT3 signaling axis by 4-acetylanthroquinol B inhibits the tumorigenesis and cancer stem-cell-like properties of glioblastoma cells, *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancers*, 2018, 10(12): 491. DOI:10.3390/cancers10120491.
- [23] Yang K, Wang F, Zhang H, et al. Target inhibition of CBP induced cell senescence in BCR-ABL-T315I mutant chronic myeloid leukemia[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 588641. DOI:10.3389/fonc.2020.588641.
- [24] Yang K, Fu K, Zhang H, et al. PBA2, a novel inhibitor of the β -catenin/CBP pathway, eradicates chronic myeloid leukemia including BCR-ABL T315I mutation[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 209. DOI: 10.1186/s12943-024-02129-1.
- [25] Brown A D, Cranstone C, Dupré D J, et al. β -catenin interacts with the TAZ1 and TAZ2 domains of CBP/p300 to activate gene transcription[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 238: 124155. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124155.
- [26] Leung Y K, Lee S G, Wang J, et al. The loss of an orphan nuclear receptor NR2E3 augments Wnt/ β -catenin signaling *via* epigenetic dysregulation that enhances Sp1- β catenin-p300 interactions in hepatocellular carcinoma[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(29): e2308539. DOI: 10.1002/adv.202308539.
- [27] Jiang Y Q, Xiao S S, Huang S W, et al. Extracellular vesicle-mediated regulation of imatinib resistance in chronic myeloid leukemia *via* the miR-629-5p/SEN2/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. *Hematology*, 2024, 29(1): 2379597. DOI:10.1080/16078454.2024.2379597.
- [28] Ding L H, Chen Q W, Chen K, et al. Simvastatin potentiates the cell-killing activity of imatinib in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells mainly through PI3K/AKT pathway attenuation and Myc downregulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 913: 174633. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174633.
- [29] Hu J, Feng M, Liu Z L, et al. Potential role of Wnt/ β -catenin signaling in blastic transformation of chronic myeloid leukemia: cross talk between β -catenin and BCR-ABL[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 15859-15872. DOI:10.1007/s13277-016-5413-3.

[收稿日期] 2026-03-20

[修回日期] 2026-05-29

[本文编辑] 陈怡宁