

## 创新团队成果专栏

## 癌-睾丸抗原CT63在慢性髓系白血病中的作用及其机制

孔汝心, 周亚群, 魏婷宜<sup>#</sup>, 雷 鸣<sup>#</sup>

上海交通大学医学院附属第九人民医院精准医学研究院, 上海 200125

**[摘要]** **目的**·研究癌-睾丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA) 家族成员CT63对慢性髓系白血病细胞增殖、分化和成瘤方面的影响, 阐述其分子机制。**方法**·采用生物信息学方法分析癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库中髓系白血病患者的CT63表达差异及其对疾病预后的影响; 构建CT63敲降的人慢性髓系白血病K562细胞系, 通过实时荧光定量PCR和蛋白质印迹法确定CT63的敲降效果; 通过细胞实时成像和CCK-8实验评估CT63对慢性髓系白血病细胞增殖能力的影响; 进行小鼠皮下成瘤实验, 探究CT63在体内环境下对慢性髓系白血病肿瘤发生、生长和细胞分化的影响; 通过佛波酯诱导的K562细胞向单核/巨噬细胞的分化实验, 探究CT63对慢性髓系白血病细胞分化能力的影响; 检测敲降CT63后细胞内线粒体功能的变化。**结果**·Kaplan-Meier生存曲线分析显示, CT63差异表达与髓系白血病患者的预后显著相关; 敲降CT63抑制K562细胞的增殖和成瘤; 敲降CT63促进K562细胞在体内和体外的分化; 敲降CT63抑制K562细胞中线粒体呼吸链复合物IV的活性, 并导致包括细胞色素C氧化酶IV (COX IV)、丙酮酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶A (SDHA) 和电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 的线粒体相关标志物表达下降, 影响K562细胞的线粒体代谢活性。**结论**·CT63的表达水平与髓系白血病患者的预后相关; CT63通过维持线粒体的代谢活性, 促进K562细胞的增殖和体内成瘤; CT63是维持慢性髓系白血病细胞自我更新和分化的重要分子开关。

**[关键词]** 癌-睾丸抗原63; 慢性髓系白血病; 细胞增殖; 细胞分化; 线粒体

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.11.002 **[中图分类号]** R733.72 **[文献标志码]** A

## Function and mechanism of cancer-testis antigen CT63 in chronic myeloid leukemia

KONG Ruxin, ZHOU Yaquin, WEI Tingyi<sup>#</sup>, LEI Ming<sup>#</sup>

Shanghai Institute of Precision Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200125, China

**[Abstract]** **Objective**·To explore the effects of the cancer-testis antigen (CTA) family member CT63 on proliferation, differentiation, and tumorigenicity of chronic myeloid leukemia (CML) cells, and uncover the underlying molecular mechanisms. **Methods**·The link between CT63 expression and the prognosis of myeloid leukemia patients was analyzed using bioinformatics methods (TCGA database). A K562 cell line with CT63 knockdown was established. The knockdown efficiency of CT63 was confirmed by qRT-PCR and Western blotting. Live-cell imaging and CCK-8 methods were adopted to evaluate the inhibitory effect of CT63 knockdown in CML cells. A subcutaneous tumorigenesis assay in nude mice was conducted to examine the effects of CT63 on tumorigenesis, tumor growth, and differentiation of K562 cells *in vivo*. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced monocyte/macrophage differentiation experiment was carried out to investigate the role of CT63 in the differentiation of K562 cells *in vitro*. Mitochondrial function was assessed to determine the impact of CT63 on CML cells both *in vivo* and *in vitro*. **Results**·The Kaplan-Meier survival curve indicated that low expression levels of CT63 were correlated with longer survival in patients with myeloid leukemia. Down-regulation of CT63 in K562 cells inhibited proliferation and promoted differentiation. Live-cell imaging and CCK-8 assays displayed that knockdown of CT63 inhibited cell proliferation and extended cell doubling time in K562 cells. In the subcutaneous xenotransplantation model, down-regulation of CT63 inhibited tumor growth in nude mice. K562 cells expressing lower levels of CT63 were more prone to differentiate into monocyte/macrophage both *in vivo* and *in vitro* under PMA exposure condition. Knockdown of CT63 suppressed the activity of mitochondrial respiratory chain complex IV. This led to decreased expression of mitochondrial markers, including cytochrome C oxidase IV (COX IV), pyruvate dehydrogenase, succinate dehydrogenase A (SDHA), and voltage-dependent anion channel (VDAC), thus affecting the mitochondrial metabolic activity of

**[基金项目]** 国家重点研发计划 (2018YFA0107004); 国家自然科学基金 (32300609)。

**[作者简介]** 孔汝心 (1998—), 男, 硕士生; 电子邮箱: wskrx008@sjtu.edu.cn。

**[通信作者]** 雷 鸣, 电子邮箱: leim@shsmu.edu.cn。魏婷宜, 电子邮箱: weitingyi@sjtu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Key Research and Development Program of China (2018YFA0107004); National Natural Science Foundation of China (32300609)。

**[Corresponding Author]** LEI Ming, E-mail: leim@shsmu.edu.cn. WEI Tingyi, E-mail: weitingyi@sjtu.edu.cn. <sup>#</sup>Co-corresponding authors.



K562 cells. **Conclusion** CT63 is related to the prognosis of myeloid leukemia patients. CT63 plays an important role in promoting proliferation and inhibiting differentiation of K562 cells *in vivo* and *in vitro*. CT63 serves as a switch to regulate the balance between proliferation and differentiation of CML cells *via* the modulation of mitochondrial activity.

**[Key words]** cancer-testis antigen 63; chronic myeloid leukemia; cell proliferation; cell differentiation; mitochondria

慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML), 是一种髓系造血干细胞异常增殖的恶性疾病, 全球每年每 10 万人中有 1~2 例, 占成人白血病总数的 15%~20%, 在各年龄段中均可发生。CML 发生的主要原因是白血病细胞的增殖失控、分化障碍以及凋亡受阻。在 95% 的 CML 患者体内均能检测到染色体易位产生的 *BCR-ABL1* 融合基因, 该融合基因编码一种持续活化的蛋白酪氨酸激酶, 能诱导 CML 的发生<sup>[1]</sup>。目前, 对于 CML 的治疗方案以靶向 *BCR-ABL1* 融合蛋白的酪氨酸激酶抑制剂类药物为主。以伊马替尼 (imatinib) 为代表的酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 可通过竞争性结合激酶区 ATP 位点, 特异性占据 *BCR-ABL1* 融合基因的酪氨酸激酶受体, 从而阻断肿瘤细胞的恶性克隆性增殖过程<sup>[2]</sup>。随着伊马替尼及后续第二、三代 TKI 的广泛临床应用, CML 治疗的 10 年总生存率达到 85% 以上, CML 患者的疾病缓解率及长期生存率得到了显著改善<sup>[3]</sup>。但是, 使用 TKI 治疗 CML 时, 有约 15% 的患者出现了耐药性, 且疾病分期越差, 越容易出现耐药。此外, 经过长期 TKI 治疗, 大部分患者的造血干细胞中仍能检测到 *BCR-ABL1* 的 mRNA 表达; 即使是分子层面上检测不到肿瘤标志物的 CML 患者, 在中断治疗后, 仍有约 60% 的患者会出现病情复发<sup>[4]</sup>。因此, 阐明 CML 细胞增殖及分化的分子机制和寻找 CML 新的治疗靶点, 是目前 CML 疾病研究的重点方向。

癌-睾丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA) 是一类多功能蛋白家族, 生理状态下主要在男性生殖细胞中表达, 而在其他成人体细胞中不表达或低水平表达。研究<sup>[5]</sup>表明, CTA 参与调控肿瘤细胞的转录网络、有丝分裂保真和减数分裂重组、干细胞分化、细胞癌变等过程。CTA 作为一类重要的肿瘤抗原, 在多种癌细胞中表达, 但在正常细胞中表达受限, 具有较好的免疫原性, 可诱导机体产生特异性细胞免疫应答和体液免疫反应<sup>[6]</sup>。因此, CTA 作为肿瘤诊断的生物标志物和免疫治疗的靶点, 具有很大的应用潜力。临床试验中已针对 CTA 家族蛋白黑色素瘤相关抗原

1 (MAGE1) 和纽约食管鳞状上皮细胞癌抗原 (NY-ESO-1) 进行了多种肿瘤疫苗研究, 展现出一定的临床疗效及良好的生物安全性<sup>[7]</sup>。目前, 大多数 CTA 在肿瘤发生和发展过程中的生物学功能尚不清楚。

CT63 是 CTA 家族的一员, 亦称 PASD1 (Per ARNT Sim domain containing 1), 最早在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中被发现<sup>[8]</sup>。2005 年, 研究者在急性髓系白血病患者的血清、骨髓和外周血中检测到 CT63 高表达<sup>[9]</sup>。2019 年, 研究者发现 CT63 在胶质瘤患者中的表达上调, 且敲降 CT63 表达可抑制胶质瘤细胞的增殖能力<sup>[10]</sup>。2022 年, 研究者在结直肠癌组织样本中检测到 CT63 高表达, 并认为 CT63 可作为结直肠癌的免疫治疗靶点<sup>[11]</sup>。在健康人体中, CT63 仅在生殖组织中表达; 但对于肿瘤患者, 肿瘤组织和癌旁一些正常组织中也发现该基因的表达, 这提示 CT63 表达对肿瘤的发生和发展具有促进作用。癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库中现有数据显示, CT63 在 CML 患者肿瘤细胞中的表达量升高, 然而 CT63 在 CML 中的具体作用及其分子机制目前尚不清楚。本研究拟探讨 CT63 在 CML 细胞增殖与分化过程中的作用及其可能的分子机制, 以期相关的靶向治疗研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞、基因与质粒** 人慢性髓系白血病 K562 细胞系以及人胚肾上皮 HEK293T 细胞系均为本实验室保存。人源 CT63 基因的 CDS 区片段来自 NCBI RefSeq 数据库的 NM\_173493.3 序列, 特异靶向 CT63 基因的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列通过 InvivoGen 网站设计 (<http://www.invivogen.com>)。质粒构建、荧光定量 PCR (qRT-PCR) 与合成 shRNA 片段所用引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。质粒构建中使用的 pLVX-mCherry、pGreen-Puro 质粒以及慢病毒包装中使用的 dR8.9、VSVG 质粒均为本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂与仪器** DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基 (源培生物, 中国), 胎牛血清 (Gibco, 新西兰), 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶 (Thermo Fisher, 美国), 兔源 CT63 抗体 (NOVUS, 美国), 兔源 CD11b、CD14 抗体 (Abcam, 英国), 鼠源  $\alpha$ -tubulin、HSP60 抗体 (Proteintech, 美国), 兔源细胞色素 C 氧化酶 IV (cytochrome C oxidase IV, COX IV)、丙酮酸脱氢酶、电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、琥珀酸脱氢酶 A (SDHA) 抗体 (CST, 美国), Lipo3000 细胞转染试剂盒 (Invitrogen, 美国), 反转录试剂盒 (Takara, 日本), Hieff qPCR SYBR Green Master Mix (翌圣生物, 中国), CCK8 试剂、线粒体呼吸链复合物 IV 活性检测试剂盒 (生工生物, 中国), Blood & Cell Culture DNA Mini Kits (QIAGEN, 德国)。

凝胶电泳仪、PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 超灵敏多功能成像仪 (GE, 美国), 共聚焦显微镜 (ZEISS, 德国), QuantStudio™ 7 Flex 实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国), 接触式超声波裂解仪 (SONICS, 美国), FACSCalibur™ 流式细胞分选仪 (BD, 美国), Liveocyte™ 活细胞成像分析系统 (Sartorius, 德国), IVIS™ 小动物活体成像系统 (PerkinElmer, 美国)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HEK293T 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, K562 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养。培养基中均加入 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素双抗混合液, 并培养于 37℃、含有 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中。除病毒生产部分使用 HEK293T 细胞系外, 其余实验结果均来源于 K562 细胞系。

**1.2.2 质粒构建** 对单链 DNA 引物进行沸水浴 10 min, 通过自然降温退火, 使其形成具有 *Bam*H I / *Eco*R I 黏性末端的双链产物。使用 *Bam*H I / *Eco*R I 限制性内切酶切割 pGreen-Puro 载体并切胶回收, 将带有 *Bam*H I / *Eco*R I 黏性末端的 pGreen-Puro 线性化片段与退火产物进行连接, 构建特异性敲降 CT63 基因的 shRNA 敲降质粒, 以下记为 shCT63。同时, 使用不靶向任何基因的相同大小片段作为阴性对照, 记为 shCtrl。含有 shRNA 片段的敲降质粒在细胞中表达后, 能够通过产生 siRNA 特异性结合并降解靶

基因的 mRNA, 下调靶基因的表达水平。shRNA 片段的目的序列见表 1。

表 1 shRNA 片段的目的序列

Tab 1 Target sequences of shRNA

shRNA	Target sequence (5'→3')
PG-shCT63-1	GCTTGCATATCCATGTTCTA
PG-shCT63-2	GCCATTGATAGATACCTCAAA
PG-shCT63-3	CCAAACACATTACGCCACGTT
PG-shCT63-4	GCTACAGTTATTAGATGGCT
PG-shCT63-5	GCCTGAGGTGAATCCATTGTA
PG-shCtrl	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG

**1.2.3 稳转细胞系构建** 将带有绿色荧光信号且含 shRNA 片段的质粒与 dR8.9、VSVG 质粒按比例配置 (4:3:2), 使用 Lipo3000 转染试剂将质粒转染至细胞密度约 80% 的 HEK293T 细胞中。转染 6 h 后更换培养基, 48 h 后收集上清液, 使用孔径 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤, 得到病毒液。将病毒液与培养基按 1:1 比例配置后加入 polybrene (终浓度为 10  $\mu$ g/mL), 将混合液加入细胞密度 40%~60% 的待转 K562 细胞系中, 24 h 后换为含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基。病毒感染 72 h 后使用细胞流式分选仪筛选绿色荧光信号阳性的细胞, 得到敲降 CT63 表达的实验组 K562 细胞 (shCT63 K562 细胞系) 和未敲降 CT63 表达的对照组 K562 细胞 (shCtrl K562 细胞系)。

**1.2.4 qRT-PCR 实验** 使用 TRIzol 法提取细胞的 RNA 后, 使用反转录试剂盒, 参照说明书步骤进行操作, 获得细胞的 cDNA。使用 SYBR 试剂配制反应体系, 并设定反应条件, 上机进行定量 PCR 扩增。参照内参基因, 以算法  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  对实验所得  $C_t$  值进行计算分析, 得到目的基因的相对表达量。实验所用的引物序列见表 2。

**1.2.5 蛋白质印迹检测** 细胞沉淀中加入适量体积裂解液, 混匀后冰上静置 10 min。使用超声裂解仪 40% 功率裂解, 超声条件为超声 3 s, 间隔 3 s, 8 个循环。12 000×g 离心 10 min 后吸取上清液, 蛋白定量后加入适量上样缓冲液, 95℃加热 10 min 形成上样品。进行 SDS PAGE 电泳, 使用湿转仪将蛋白转移至 PVDF 膜上。用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液封闭, 加入对应的一抗, 4℃孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入对应二抗室温孵育 1 h, 再经 TBST 洗膜后加入高敏型化学发光检测试剂, 利用化学发光法进行成像。

**1.2.6 Liveocyte™ 活细胞成像细胞增殖实验** 将



表2 qRT-PCR的引物序列

Tab 2 Sequence of primers used for qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
CT63	CATCGTGGGGAATGAGAGGG	GATTGCAGAGGGGCACAGAT
mtDNA	CGAAAGGACAAGAGAAATAAGG	CTGTAAAGTTTTAAGTTTTATGCG
Nuclear	CAACTTCATCCACGTTACCC	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
HSP60	GTGTAGACCTTTTAGCCGATGC	GTGCCAGTACAGTAGCAGTGG

Note: mtDNA-mitochondrial DNA; HSP60-heat shock protein 60.

shCtrl K562 或 shCT63 K562 细胞系以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔板中, 每组 6 个重复。100×g 离心 6 min 使细胞贴壁后, 将 96 孔板置于 Livecyte™ 仪器中, 在 37 °C、含有 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。每间隔 4 h 对生长中的细胞进行 1 次拍摄, 连续拍摄 4 d, 并使用 Livecyte™ 软件分析细胞成像和增殖。

**1.2.7 小鼠成瘤实验** 使用 6~8 周龄的裸鼠, 以注射 K562 shCtrl 细胞的裸鼠作为对照组 (12 只), 以注射 K562 shCT63-2 细胞 (简称 shCT63) 的裸鼠作为实验组 (12 只)。对小鼠左上肢腋下皮肤进行消毒后, 皮下注射基质胶与细胞悬液 1:1 混合的液体, 每只小鼠注射  $2 \times 10^6$  个细胞。注射 4 周后取出小鼠, 麻醉后在 IVIS™ 小动物成像系统中检测并拍摄荧光信号图。颈椎断裂处死小鼠, 解剖取出肿瘤, 拍照并称重肿瘤, 使用 4% 多聚甲醛固定后进行石蜡包埋并切片。

**1.2.8 苏木精-伊红染色 (H-E 染色)** 石蜡切片在二甲苯、乙醇溶液和水中依次浸泡后, 使用苏木精染液对切片染色 4 min。切片用流水冲洗 10 min, 1% 盐酸乙醇冲洗 3 s, 流水冲洗 10 min, 再浸泡在伊红染液中染色 1 min。最后将切片依次在水、乙醇溶液和二甲苯中浸泡, 取出晾干后封片。

**1.2.9 免疫荧光染色** 细胞在 4% 多聚甲醛中固定 10 min。PBS 洗 2 次, 使用少量 PBS 重悬细胞后, 100×g 离心 8 min。轻轻吸去残留液体, 用含 0.25% NP40、1% Triton X-100 的通透液破膜 10 min, PBS 洗 3 次。用含 5% BSA 的封闭液孵育 30 min, 一抗 4 °C 孵育过夜。用 PBS 洗 3 次, 加荧光二抗 (1:500) 室温孵育 1 h。用 PBS 洗 3 次, 加入 1 μg/mL 浓度的 DAPI 染液室温孵育 10 min。PBS 洗 3 次后封片, 在显微镜下观察并拍照。

**1.2.10 佛波酯诱导分化** 使用 DMSO 配置浓度为 1 mmol/L 的佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 溶液。将适量 PMA 溶液分别加入敲降 CT63

表达的实验组细胞与未敲降 CT63 表达的对照组细胞的培养基中, 使 PMA 工作浓度达到 1 μmol/L。加药后即开始计时, 48 h 后收取细胞样品。

**1.2.11 线粒体 DNA (mtDNA) 检测** 使用 DNA 提取试剂盒, 提取约  $1 \times 10^6$  个细胞的总 DNA。对所得样品进行 qRT-PCR 实验<sup>[12]</sup>, 以样品中 β-globin 基因的核 DNA 含量为内参, 检测 mtDNA 的含量。具体引物序列见表 2。

**1.2.12 线粒体呼吸链复合物 IV 活性检测** 大量培养 shCtrl K562 和 shCT63 K562 细胞系, 使用线粒体呼吸链复合物 IV 活性检测试剂盒, 参照说明书操作, 检测细胞中线粒体呼吸链复合物 IV 的活性。

**1.2.13 细胞活性测定** 使用细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖情况。将 shCtrl K562 或 shCT63 K562 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 在 37 °C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。每组设立 10 个重复孔。细胞每培养 24 h 后, 吸去培养基并在每孔中加入含检测试剂的培养基继续培养 4 h, 使用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的吸光度数值 D (450 nm), 计算相对细胞活力, 反映各组细胞增殖情况。

1.3 数据分析

**1.3.1 生存曲线分析** 使用 Kaplan-Meier plotter 生存分析网站 (<http://kmplot.com/analysis/>), 对来自 TCGA 数据库中 353 例髓系白血病患者样本的 mRNA 表达量与生存数据之间的相关性进行分析。使用 Cox 风险回归模型分别计算高表达组和低表达组与无事件生存期 (event free survival, EFS) 相关性的风险比与 P 值, 分析不同时期中 CT63 基因表达量与 EFS 之间的相关性。

**1.3.2 RNAseq 数据分析** 使用 R 软件 (v4.3.1) 分析来自上海旭燃生物科技有限公司提供的 RNA-seq 数据。将原始数据导入 R 语言程序中, 进行质量控制和



预处理,使用limma包进行差异分析,设置差异表达倍数(fold change)大于1.5或小于-1.5,以 $P$ 值0.05为阈值,筛选出差异表达的基因列表。使用clusterProfiler包对差异基因列表作GO分析与GSEA分析,探究差异基因在生物学功能和信号通路上的富集情况。使用enrichplot包对GO分析和GSEA分析的结果进行可视化,生成图表展示差异基因在功能富集上的结果。

## 2 结果

### 2.1 敲降CT63对K562细胞增殖的作用

从TCGA数据库中筛选出353份髓系白血病患者的样本,Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示CT63高表达的患者生存期显著缩短(图1A)。

qRT-PCR和Western blotting结果显示,与对照组相比,实验组细胞的CT63表达量在mRNA水平均显著降低(图1B),shCT63-1和shCT63-2细胞中的CT63在蛋白水平的敲降最明显(图1C)。活细胞实时监控显示,与对照组相比,CT63敲降效果好的实验组细胞(shCT63-1、2)增殖速度降低(图1D、E),细胞倍增时间显著增加,而蛋白水平降低不明显细胞的倍增时间与对照组相比则无显著差异(图1F)。活细胞实时监控结果显示,敲降CT63能抑制人CML细胞K562细胞系的增殖。CCK-8实验结果显示,与shCtrl组相比,敲降CT63导致K562细胞的增殖速度和细胞活力降低(图1G)。

### 2.2 敲降CT63对小鼠皮下成瘤的影响

注射肿瘤细胞4周后,对照组12只裸鼠均长出了肉眼可见的皮下肿瘤,而实验组仅有3只长出肿瘤(图2A)。使用IVIS™小动物活体成像系统检测裸鼠肿瘤部位的mCherry荧光信号强度。结果显示,与对照组相比,实验组的肿瘤荧光信号强度显著降低(图2B)。对裸鼠进行解剖,取出肿瘤组织后对比发现,实验组肿瘤的大小和质量与对照组相比均显著降低(图2C、D)。H-E染色结果显示,对照组的肿瘤细胞核染色较深,提示肿瘤具有较高的恶性程度(图2E)。免疫荧光染色结果显示,敲降肿瘤细胞中CT63表达后(图2F、G),Ki67阳性的细胞比例降低(图2H、I),说明敲降CT63使肿瘤组织中处于活

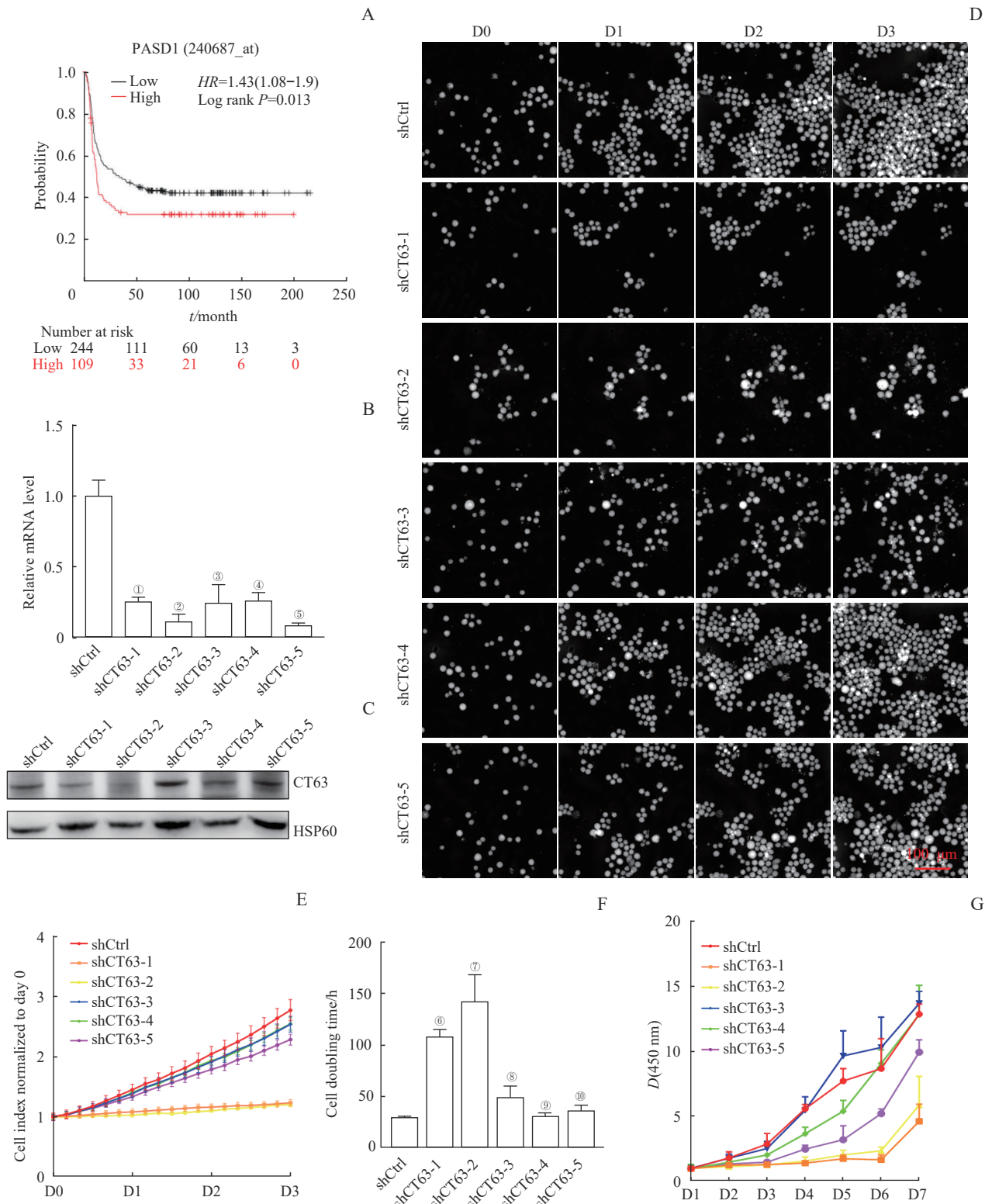
跃分裂期的细胞减少,肿瘤生长可能因此受到了抑制。

### 2.3 敲降CT63对K562细胞分化的影响

筛选CT63敲降后造成的人CML细胞差异表达mRNA,采用RNA-Seq技术研究人CML细胞的表达谱改变,每组设置3个重复。确认了实验组细胞CT63在RNA水平(图3A)和蛋白水平(图3B)的表达量均被降低后,筛选对照组与实验组中基因表达量差异倍数大于1.5( $\log_2FC \geq 1.5$ ,  $P \geq 0.80$ )的差异表达mRNA,对其进行分层聚类热图分析(图3C)。图中每个矩形方块代表一个差异表达值,红色表示表达上调的mRNA,蓝色表示表达下调的mRNA,分层聚类热图分析2组细胞中差异表达mRNA的分布情况。结果显示,敲降CT63后,476个基因的表达上调,同时297个基因的表达下调(图3C)。对2组细胞差异表达mRNA进行GO功能分类及富集分析,发现聚集差异表达mRNA数量前9位的GO term分别是髓系细胞分化、白细胞活化的正调节、白细胞趋化性、髓系白细胞迁移、红细胞稳态、红细胞介导的细胞毒性、粒细胞趋化性的调节、树突状细胞分化和白血病抑制因子信号通路(图3D)。为验证GO分析的结果,利用qRT-PCR实验检测CT63敲降对K562细胞髓系分化相关基因mRNA表达水平的影响,结果显示CT63敲降导致髓系细胞分化相关标志物IL7R、AXL、CD1D和MT16等表达上调(图3E)。

### 2.4 敲降CT63后K562细胞向单核/巨噬细胞分化

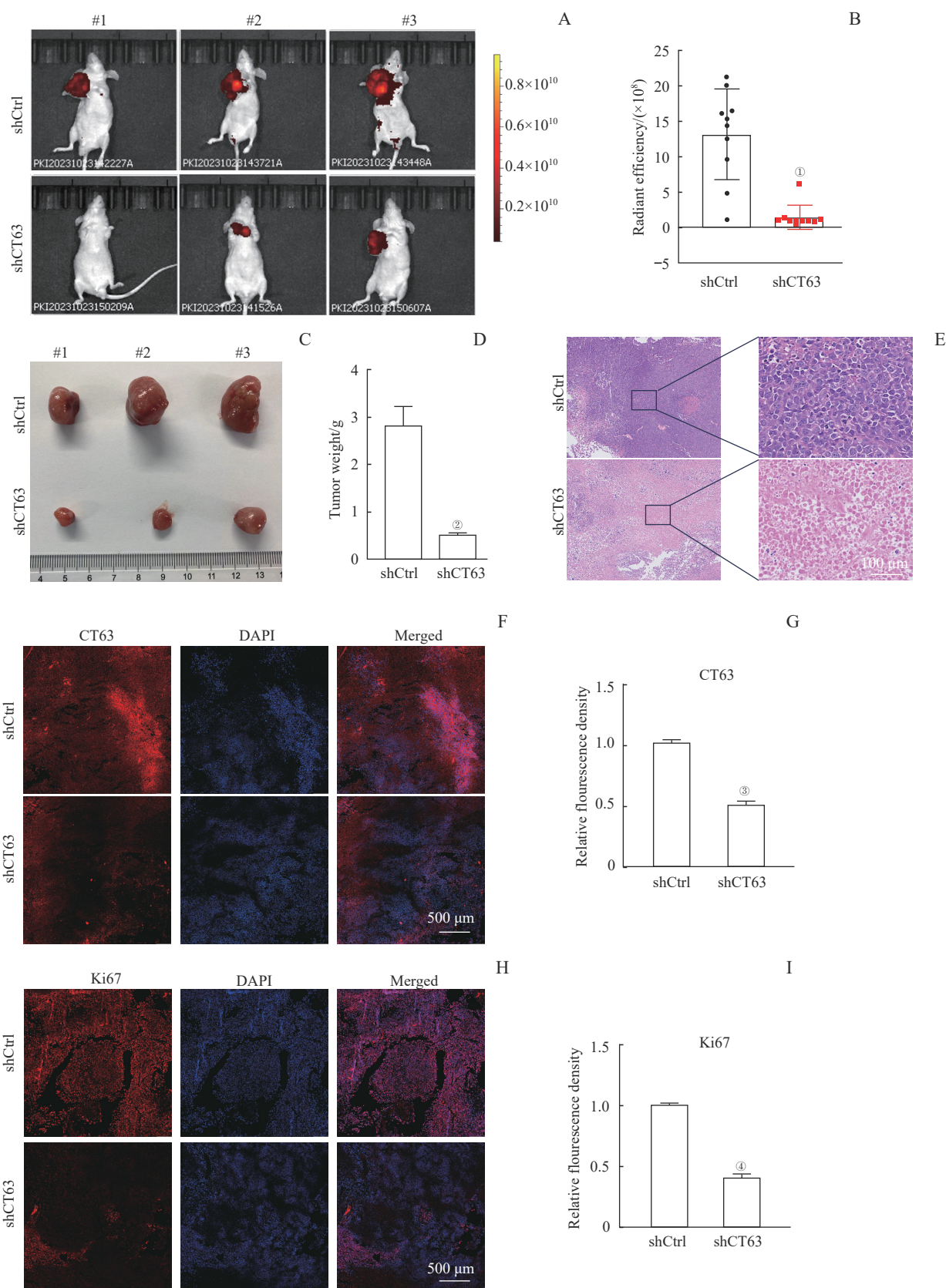
使用PMA分别诱导对照组shCtrl K562细胞和实验组shCT63 K562细胞向单核/巨噬细胞分化。免疫荧光染色结果表明,实验组CT63蛋白下调后(图4A、C),单核/巨噬细胞的细胞表面标志物CD11b(图4B、D)和CD14(图4E、F)阳性的细胞显著增加。Western blotting(图4G)和流式细胞术检测(图4H、I)结果显示CT63敲降促进单核/巨噬细胞的细胞表面标志物CD11b和CD14表达。对皮下成瘤实验获得的肿瘤组织样本进行免疫荧光染色实验,结果同样显示实验组细胞衍生的肿瘤组织中CD11b和CD14阳性的细胞较对照组显著增多(图4J)。该结果提示CT63可能限制肿瘤细胞向单核/巨噬系分化。



**Note:** A. Kaplan-Meier survival curves of high and low expression of CT63 in myeloid leukemia patients. B. qRT-PCR analysis of CT63 knockdown efficiency in K562 cells. C. Western blotting analysis of CT63 levels in stable CT63 knockdown cell lines. D. Proliferation of stable shCtrl and CT63 knockdown cell lines assessed by live cell image assay. E. Live cell image analysis of proliferation rate of K562 after down-regulation of CT63 protein. F. Cell doubling time of K562 after down-regulation of CT63 protein. G. CCK-8 proliferation assay of indicated K562 cells. <sup>①</sup> $P=0.004$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.004$ , <sup>④</sup> $P=0.004$ , <sup>⑤</sup> $P=0.001$ , <sup>⑥</sup> $P=0.003$ , <sup>⑦</sup> $P=0.017$ , <sup>⑧</sup> $P=0.095$ , <sup>⑨</sup> $P=0.463$ , <sup>⑩</sup> $P=0.145$ , compared with the shCtrl group.

**图1 CT63 敲降后 K562 细胞增殖能力变化**  
**Fig 1 Proliferation of K562 cells after down-regulation of CT63**



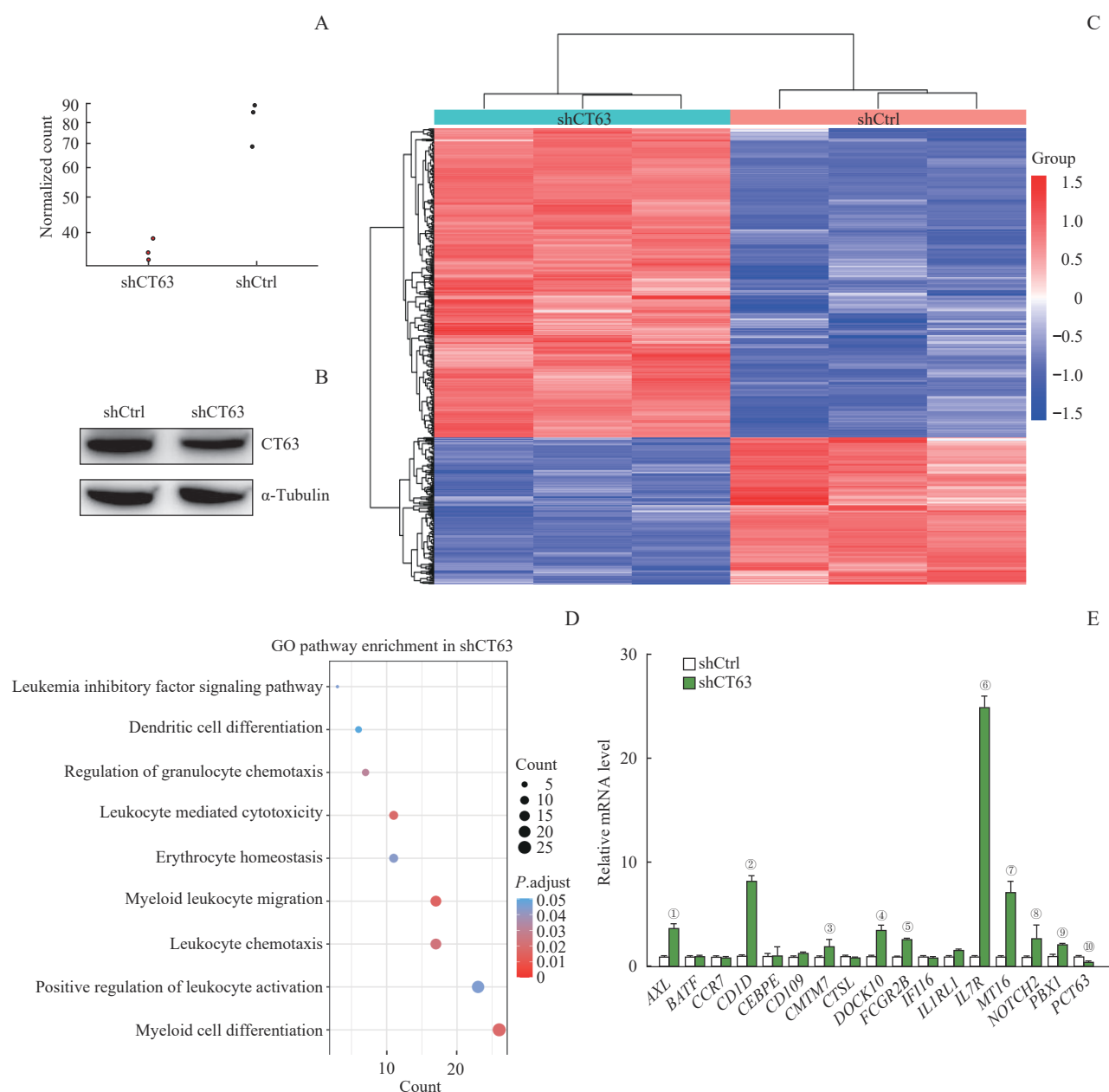


**Note:** A. Subcutaneous tumor of nude mice. B. Average radiant efficiency of region of interest. C. Tumor size. D. Tumor weight. E. H-E staining of tumor. F/H. Immunofluorescence staining of CT63 and Ki67 in tumor tissue. G/I. Relative fluorescence density of Immunofluorescence staining in F and H. ① $P=0.000$ , ② $P=0.029$ , ③ $P=0.000$ , ④ $P=0.000$ , compared with the shCtrl group.

图2 CT63 敲降后 K562 细胞在裸鼠皮下成瘤的能力变化

Fig 2 Tumorigenic ability of K562 cells in nude mice after down-regulation of CT63





**Note:** A/B. CT63 knockdown efficiency in K562 in RNA and protein level. C. Heat maps and hierarchical clustering of differentially expressed mRNA in shCtrl and shCT63 K562 cells. D. GO function analysis of differentially expressed mRNA in shCtrl and shCT63 K562 cells. E. qRT-PCR analysis of the expression of myeloid cell differentiation genes. ① $P=0.000$ , ② $P=0.000$ , ③ $P=0.063$ , ④ $P=0.001$ , ⑤ $P=0.000$ , ⑥ $P=0.000$ , ⑦ $P=0.001$ , ⑧ $P=0.077$ , ⑨ $P=0.001$ , ⑩ $P=0.003$ , compared with the shCtrl group.

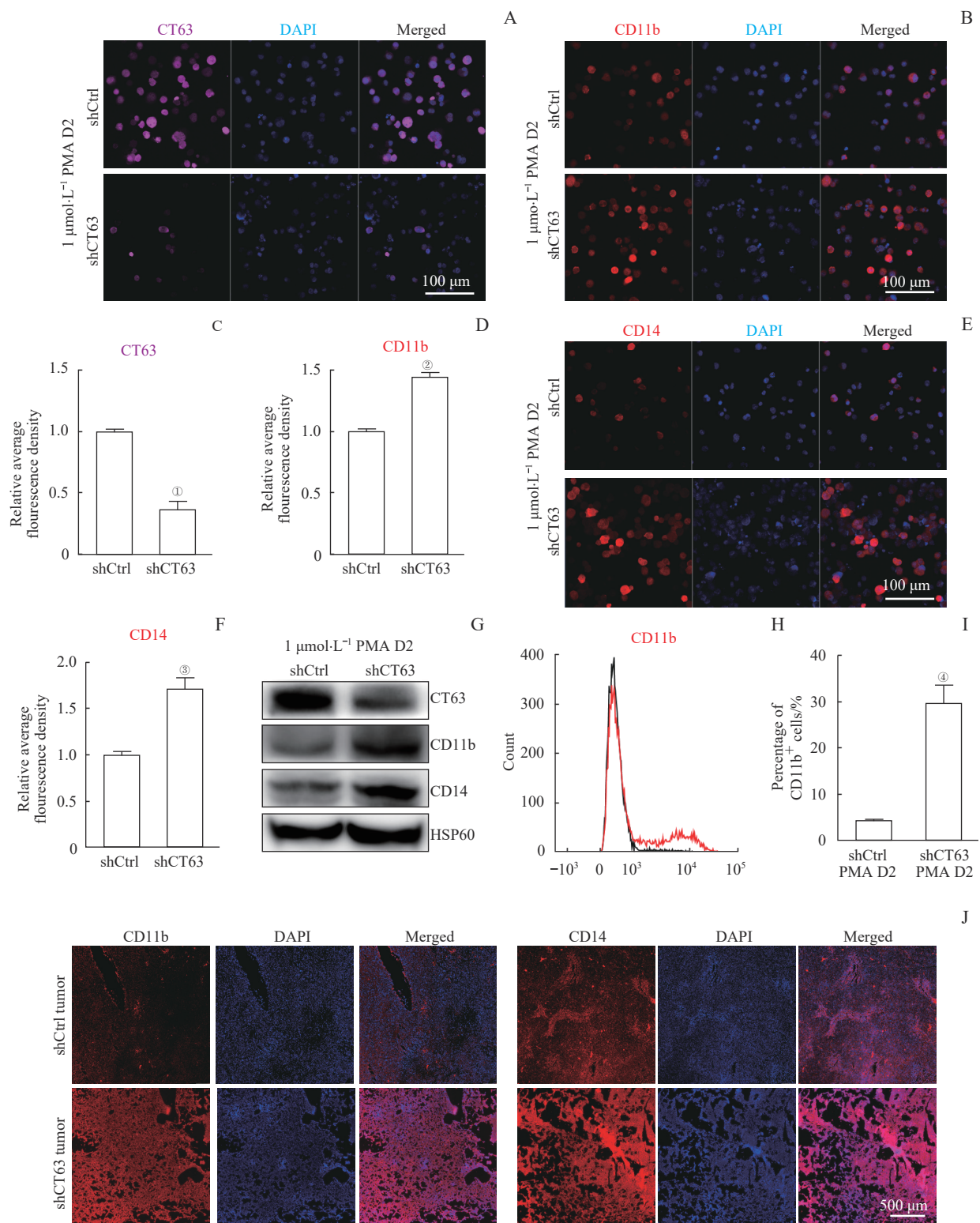
**图3 CT63下调后K562细胞分化能力变化**

**Fig 3** Differentiation of K562 cells after CT63 downregulation

## 2.5 CT63对细胞代谢的调控作用

细胞线粒体呼吸链复合物IV的活性检测结果显示, 实验组 shCT63 K562 细胞中其活性受到抑制 (图 5A)。免疫荧光实验检测线粒体相关标志物在实验组和对照组肿瘤中的表达 (图 5B), 结果显示, 敲降 CT63 后标志蛋白表达降低 (图 5C)。对 PMA 诱导分化 2 d 后的对照组和实验组细胞进行 Western

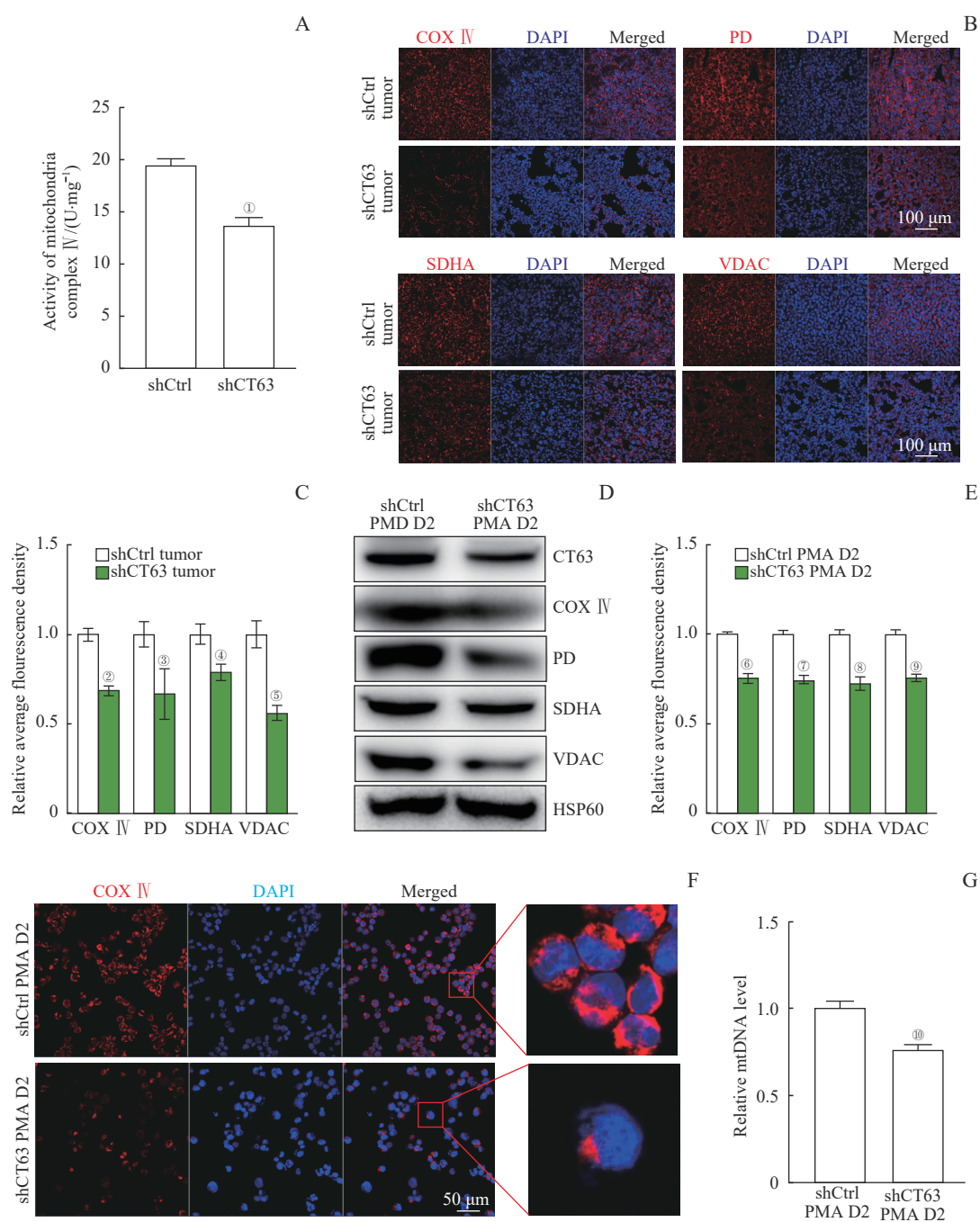
blotting 检测 (图 5D、E), 结果也与肿瘤免疫荧光实验结果一致。COX IV 的免疫荧光实验结果显示: 与对照组相比, 实验组细胞中的 COX IV 表达显著降低, 且亚细胞定位也发生变化 (图 5F)。提取细胞基因组 DNA 检测 mtDNA 的含量, 结果显示实验组的 mtDNA 含量降低 (图 5G), 进一步证明敲降 CT63 导致线粒体功能受损。



**Note:** A, B, E. Immunofluorescence staining of CT63, CD11b, and CD14 after 48 h of PMA exposure in K562 cells. C, D, F. Relative fluorescence density of immunofluorescence staining. G. Western blotting analysis of CT63, CD11b and CD14 in K562 cells after 48 h of PMA exposure. H. CD11b positive cells of CT63-knockdown K562 cells and control after 48 h of PMA exposure. I. The percentage of CD11b positive cells. J. Immunofluorescence staining for CD11b and CD14 in tumor tissues. <sup>①</sup> $P=0.007$ , <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.024$ , <sup>④</sup> $P=0.021$ , compared with the shCtrl group.

**图4** 敲降CT63对K562细胞向单核/巨噬细胞分化的影响

**Fig 4** Effect of knockdown of CT63 on the differentiation of K562 cells into monocytes/macrophages



**Note:** A. Activity of mitochondria complex IV in shCtrl and shCT63 K562 cells. B. Immunofluorescence staining of mitochondrial markers in tumors. PD—pyruvate dehydrogenase C. Relative fluorescence density of immunofluorescence staining in B. D. Western blotting analysis of mitochondrial markers in shCtrl and shCT63 K562 cells with PMA treatment. E. Relative average fluorescence density of Western blotting analysis. F. Immunofluorescence staining and subcellular localization of COX IV. G. Relative mtDNA level in shCtrl and shCT63 K562 cells. <sup>①</sup> $P=0.006$ , <sup>②</sup> $P=0.000$ , <sup>③</sup> $P=0.021$ , <sup>④</sup> $P=0.007$ , <sup>⑤</sup> $P=0.001$ , <sup>⑥</sup> $P=0.000$ , <sup>⑦</sup> $P=0.000$ , <sup>⑧</sup> $P=0.001$ , <sup>⑨</sup> $P=0.000$ , <sup>⑩</sup> $P=0.035$ , compared with the shCtrl group.

图5 CT63对细胞代谢的调控作用

Fig 5 Regulation of CT63 on cell metabolism

### 3 讨论

CML是一种危害较大的恶性肿瘤疾病，在早期，该疾病的治疗多采用羟基脲、白消安、干扰素等药物治疗；造血干细胞移植也可有效消除费城染色体阳性

的细胞，起到一定治疗效果<sup>[13]</sup>。随后，TKI的临床应用大大改善了CML的治疗效果，但仍面临耐药和复发的挑战。为了提高完全治愈率，避免让患者终身服药，迫切需要一种能有效治愈CML的新方法。

许多CTA家族蛋白已经被证明参与肿瘤的发生



与发展过程,其表达与多种肿瘤疾病密切相关。CT63在多种血液系统肿瘤和实体瘤中特异性表达,是急性白血病中最常见的CTA之一<sup>[9]</sup>。由此,我们推测CT63蛋白在血液系统肿瘤发生和发展过程中发挥重要功能。在本研究中,我们通过分析TCGA数据库中的数据发现,CT63高表达的髓系白血病患者存在显著的预后不良,这表明CT63具有成为CML治疗靶点的潜力。研究<sup>[14]</sup>表明,弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)可以杀死CT63阳性的肿瘤细胞。基于CT63的DNA序列设计出的抗肿瘤疫苗能在动物体内诱导CTL细胞生成,且由此激活的免疫反应能成功杀死多发性骨髓瘤细胞<sup>[15]</sup>。这些结果都证明了CT63具有较强的免疫原性。CT63仅在精原干细胞中表达,这意味着CT63的表达局限于精子发生的早期阶段。所以我们推测,基于CT63设计出的肿瘤免疫疗法对治疗白血病具有较高的特异性,且不良反应相对较小。

无限增殖是肿瘤的主要特征之一,持续性的细胞增殖是肿瘤致病性的基础。肿瘤细胞的倍增时间表示细胞增殖1倍所需的时间,是用于量化计算肿瘤生长速度的参数。本研究通过体外活细胞实时成像和CCK-8实验,证实抑制CT63表达可导致CML细胞的增殖速率被抑制,细胞倍增时间增加。裸鼠成瘤实验证实,抑制CT63表达可导致CML细胞成瘤能力下降。免疫荧光染色结果显示,在敲降CT63的CML细胞及其衍生的肿瘤组织中,Ki67阳性的细胞显著减少。这些结果共同表明CT63可能通过调控细胞增殖参与CML细胞的恶性生长。

生理状态下,造血干细胞在骨髓中完全成熟后,会进入循环系统行使正常功能。对于CML患者,造血干细胞发生恶性转化后出现不受限的克隆性增殖,细胞成熟受阻,不成熟细胞大量增殖并被释放到血液中。通过血液细胞形态学检查可以检测到外周血中的不成熟细胞,这也是白血病筛查的一个重要指标<sup>[1]</sup>。本研究通过PMA诱导分化实验证实,敲降CT63显著促进CML细胞向单核/巨噬细胞分化。裸鼠成瘤实验结果进一步表明,敲降CT63后CML细胞的衍生肿瘤组织中单核/巨噬细胞表面标志物CD11b和CD14显著上调。这些结果共同表明,CT63可能通过抑制肿瘤细胞分化促进肿瘤生长。

研究<sup>[16]</sup>表明,线粒体与细胞分化之间存在着密切联系,在CML细胞向巨核细胞分化过程中,线粒

体功能会发生显著变化。本研究发现抑制CT63表达可导致CML细胞线粒体呼吸链复合物IV活性显著下调;免疫荧光染色结果显示,敲降CT63后,CML细胞及其衍生的肿瘤组织中的某些线粒体相关标志蛋白表达显著下降。其中COX IV蛋白是线粒体呼吸链复合物IV的一个亚单位,与其他亚单位共同组成了该复合物。复合物IV是细胞线粒体呼吸链中的关键组成部分,负责将氧气与电子转化为水,同时提供细胞生理活动所需的能量。COX IV在这个过程中发挥着调节作用,参与调节复合物IV的活性和稳定性。COX IV表达正常与否显著影响整条呼吸链的功能状态以及细胞的能量生成。本研究表明,在CML细胞分化的过程中,敲降CT63导致肿瘤细胞COX IV表达降低,并改变了其在细胞内的定位。线粒体的功能与mtDNA的数量和质量紧密相关,mtDNA的数量(即mtDNA拷贝数)又受到mtDNA质量的影响,因此mtDNA拷贝数可作为线粒体功能的重要表征。本实验发现敲降CT63会导致mtDNA拷贝数降低,提示线粒体功能受损。这些结果表明,CT63通过调节线粒体的功能维持肿瘤细胞的持续增殖和未分化状态。

综上所述,本研究发现CT63在髓系白血病细胞中的高表达与患者不良预后密切相关。在实验中,我们观察到敲降CT63不仅延长了细胞的倍增时间,还显著抑制了CML细胞的增殖能力和在裸鼠皮下的成瘤能力。此外,体外实验证实,敲降CT63可促进CML细胞向单核/巨噬细胞分化,进而减弱其增殖和自我更新的能力。进一步的机制研究表明,CT63通过调控线粒体呼吸链复合物IV的功能,维持CML恶性发展。这些研究为CML的临床治疗提供了新的科学依据,提示CT63有望成为该疾病分子靶向治疗的新靶点。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

所有动物实验均由上海交通大学医学院附属第九人民医院机构审查委员会和动物护理使用委员会批准(伦理编号为SH9H-2021-694)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》的规定执行。

All animal experiments were approved by the Institutional Review Board and the Animal Care and Use Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (No. SH9H-2021-694), and all experimental animal protocols were

carried out by following the guidelines of *Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals*.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

雷鸣负责研究设计和指导;孔汝心负责实验操作、数据收集、数据分析及文章撰写;周亚群协助部分实验操作;魏婷宜负责实验指导以及论文修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

LEI Ming designed and guided the research project. KONG Ruxin

completed the work of experiment conducting, data collection, data analysis and article writing. ZHOU Yaquin assisted with some of the experiments. WEI Tingyi was responsible for the guidance of experiment design and the revision of the paper. All authors have read the final manuscript and approved the submission.

• Received: 2024-03-21

• Accepted: 2024-05-14

• Published online: 2024-11-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [2] DEININGER M, BUCHDUNGER E, DRUKER B J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2640-2653.
- [3] PFIRRMANN M, BACCARANI M, SAUSSELE S, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2016, 30(1): 48-56.
- [4] KOÇKAN B, TOPTAŞ T, ATAGÜNDÜZ I, et al. Molecular screening and the clinical impacts of BCR-ABL KD mutations in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2419-2424.
- [5] OLD L J. Cancer/testis (CT) antigens: a new link between gametogenesis and cancer[J]. *Cancer Immun*, 2001, 1: 1.
- [6] WANG C, GU Y Y, ZHANG K, et al. Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10499.
- [7] BHARDWAJ N, FRIEDLANDER P A, PAVLICK A C, et al. Flt3 ligand augments immune responses to anti-DEC-205-NY-ESO-1 vaccine through expansion of dendritic cell subsets[J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(12): 1204-1217.
- [8] LIGGINS A P, BROWN P J, ASKER K, et al. A novel diffuse large B-cell lymphoma-associated cancer testis antigen encoding a PAS domain protein[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(1): 141-149.
- [9] GUINN B A, BLAND E A, LODI U, et al. Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(4): 1293-1304.
- [10] LI R, GUO M, SONG L. PAS domain containing repressor 1 (PASD1) promotes glioma cell proliferation through inhibiting apoptosis *in vitro*[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 6955-6964.
- [11] SUKOR N F, YAHAYA A, SAGAP I, et al. Cancer testis antigen PASD1 expression and immunogenicity in human colorectal cancer and polyps[J]. *Turk J Biol*, 2022, 46(5): 361-374.
- [12] CORREIA-MELO C, ICHIM G, TAIT S W G, et al. Depletion of mitochondria in mammalian cells through enforced mitophagy[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12: 183-194.
- [13] GOLDMAN J M, BAUGHAN A S, MCCARTHY D M, et al. Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia[J]. *Lancet*, 1982, 2(8299): 623-625.
- [14] AIT-TAHAR K, LIGGINS A P, COLLINS G P, et al. Cytolytic T-cell response to the PASD1 cancer testis antigen in patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2009, 146(4): 396-407.
- [15] JOSEPH-PIETRAS D, GAO Y, ZOJER N, et al. DNA vaccines to target the cancer testis antigen PASD1 in human multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2010, 24(11): 1951-1959.
- [16] SHELLY C, PETRUZZELLI L, HERRERA R. PMA-induced phenotypic changes in K562 cells: MAPK-dependent and -independent events [J]. *Leukemia*, 1998, 12(12): 1951-1961.

[本文编辑] 吴 洋