

# SENEX基因介导急性髓细胞白血病免疫逃逸的机制研究

凌 渊<sup>1,2</sup>, 陈天平<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>安徽医科大学儿童医学中心, 安徽 合肥

<sup>2</sup>安徽医科大学第五临床医学院, 安徽 合肥

收稿日期: 2026年2月16日; 录用日期: 2026年3月9日; 发布日期: 2026年3月18日

## 摘 要

目的: SENEX基因介导急性髓细胞白血病免疫逃逸的机制研究。方法: (1) 留取实验组患儿及正常健康对照儿童的血清, 采用密度梯度离心法可得到外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。将CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>界定为Treg细胞的表型标志, 分别采用流式细胞术(Flow Cytometry, FC)、实时定量PCR(QRT-PCR)和酶联免疫吸附测定(ELISA), 测定相关样本中Treg细胞的占比、FoxP3 mRNA的表达量, 以及血清中TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-17、TGF- $\beta$ 1等细胞因子的浓度。(2) 采集3名健康儿童对照和4名初诊AML患儿的外周血, 各取10 ml; 分离并保留血清, 经密度梯度离心获得外周血单个核细胞。利用流式细胞术分选并纯化CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg细胞与CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>效应T细胞(Teffs), 并且在体外进行短时间的原代培养, 24小时后评估自发性凋亡; 并以不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导氧化应激损伤, 通过流式分析Annexin V (+)凋亡细胞的比例。(3) 采用RNA干扰策略特异性下调Treg/Teff细胞中SENEX基因的表达, 在体外建立SENEX-siRNA转染的Treg/Teff细胞模型。运用QRT-PCR检测Treg/Teff细胞内SENEX及促凋亡相关基因P53、P16、P21、Caspase-3的mRNA表达水平, 并用流式细胞术统计Annexin V (+)凋亡细胞的比例。结果: (1) 初诊儿童AML外周血Treg细胞比例显著增高。同时, AML患儿外周血FoxP3基因mRNA表达显著高于儿童健康对照( $p < 0.05$ )。与健康儿童对照组相比, AML患儿血清中IL-10 ( $11.17 \pm 1.08$  pg/ml)、IL-17 ( $21.78 \pm 3.69$  pg/ml)、TGF- $\beta$ 1 ( $12.51 \pm 1.02$  ng/ml)及TNF- $\alpha$  ( $21.35 \pm 4.16$  pg/ml)的水平均显著升高; 而其血清IL-2浓度( $165.29 \pm 26.45$  pg/ml)较对照组( $409.24 \pm 90.81$  pg/ml)明显降低, 差异有统计学意义( $p < 0.05$ )。(2) 初诊AML患儿外周血中Treg细胞的自发性凋亡率明显低于Teff细胞; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的Treg/Teff细胞凋亡呈剂量依赖关系, 在相同剂量H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下, Teff细胞的诱导凋亡率始终高于Treg细胞, 差异具有统计学意义。(3) 以100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理2小时, 可明显提高AML患儿Treg与Teff细胞的凋亡比例, 分别达到 $11.2\% \pm 2.6\%$ 和 $13.1\% \pm 4.3\%$ 。在体外建立SENEX基因SiRNA转染Treg/Teff细胞模型后发现, 与单纯H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理2 h的Treg细胞比较, 转染后加用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理2 h的Treg细胞凋亡相关基因P53、P16、P21和Caspase-3 mRNA表达均明显升高( $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为 $6705.73 \pm 1124.07$ 、 $253.08 \pm 16.01$ 、 $154.58 \pm 35.12$ 和 $5135.79 \pm 985.47$ ;  $p < 0.05$ )。此外, 在相同处理条件下, 干扰SENEX基因表达的转染组可显著提高Treg细胞的凋亡率( $21.5 \pm 3.4\%$ ); 在Teff细胞( $13.9 \pm 3.1\%$ )中则未观察到该抗凋亡效应。这说明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导下SENEX基因能够抵抗Treg细胞凋亡, 但对Teff细胞凋亡无抵抗作用。结论: 在AML发病进程中, SENEX基因通过P16INK4A/Rb途径诱导细胞周期停滞, 使AML患者Treg细胞获得抗凋亡能力, 促使其外周Treg累积, 从而促进了AML细胞的免疫逃逸。

\*通讯作者。

## 关键词

SENEX基因, 免疫逃逸, 应激性衰老, 急性髓细胞白血病

# Study on the Mechanism of SENEX Gene-Mediated Immune Escape in Acute Myeloid Leukemia

Yuan Ling<sup>1,2</sup>, Tianping Chen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Children's Medical Center, Anhui Medical University, Hefei Anhui

<sup>2</sup>The Fifth Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: February 16, 2026; accepted: March 9, 2026; published: March 18, 2026

## Abstract

**Objective:** To investigate the mechanism by which the SENEX gene mediates immune escape in acute myeloid leukemia (AML). **Methods:** (1) Serum was collected from children in the experimental group and healthy control children. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by density gradient centrifugation. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> was defined as the phenotypic marker of Treg cells. The proportion of Treg cells, the expression level of FoxP3 mRNA, and the concentration of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-17, and TGF- $\beta$ 1 in the relevant samples were measured by flow cytometry (FC), quantitative real-time PCR (QRT-PCR), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (2) Peripheral blood specimens (10 ml per sample) were obtained from 3 healthy children and 4 children newly diagnosed with AML. Serum was separated and retained, and peripheral blood mononuclear cells were obtained by density gradient centrifugation. PBMCs were isolated, and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Teffs were purified and sorted by flow cytometry. Furthermore, the cells were cultured *in vitro* for a short period of time, and spontaneous apoptosis was assessed after 24 hours. Oxidative stress damage was induced by different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the proportion of Annexin V (+) apoptotic cells was analyzed by flow cytometry. (3) RNA interference was employed to selectively knock down SENEX expression in Treg/Teff cells, thereby establishing an *in vitro* SENEX-siRNA transfection model. mRNA transcripts of SENEX and proapoptotic genes (P53, P16, P21, Caspase-3) levels in Treg and Teff cell groups were determined by QRT-PCR; apoptosis rate (Annexin V-positive cells%) was detected by flow cytometry. **Results:** (1) Peripheral blood Treg frequency was markedly higher in children with newly diagnosed AML. Simultaneously, FoxP3 gene mRNA expression in AML children was significantly higher than in healthy controls ( $p < 0.05$ ). Compared to the healthy control group, serum concentrations of IL-10 ( $11.17 \pm 1.08$  pg/ml), IL-17 ( $21.78 \pm 3.69$  pg/ml), TGF- $\beta$ 1 ( $12.51 \pm 1.02$  ng/ml), and TNF- $\alpha$  ( $21.35 \pm 4.16$  pg/ml) were significantly elevated in AML children, while the serum IL-2 concentration ( $165.29 \pm 26.45$  pg/ml) was significantly lower than in healthy controls ( $409.24 \pm 90.81$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). (2) The spontaneous apoptosis rate of Tregs from newly diagnosed AML children was significantly lower than that of Teff cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in Treg/Teff cells showed a dose-response relationship. At the same H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, the induced apoptosis rate was consistently higher in Teff cells than in Tregs, with a statistically significant difference. (3) Treatment with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 hours significantly increased the apoptosis rate in both Tregs ( $11.2\% \pm 2.6\%$ ) and Teff cells ( $13.1\% \pm 4.3\%$ ) from AML children. The SENEX gene siRNA transfection model in Treg/Teff cells was successfully established

**in vitro.** Compared with Treg cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone for 2 h, the expression of apoptosis-related genes P53, P16, P21 and Caspase-3 mRNA in Treg cells after transfection and subsequent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment for 2 h was significantly increased (2- $\Delta\Delta$ CT values were  $6705.73 \pm 1124.07$ ,  $253.08 \pm 16.01$ ,  $154.58 \pm 35.12$  and  $5135.79 \pm 985.47$ , respectively;  $p < 0.05$ ). Under the same treatment conditions, SENEX-siRNA transfection significantly increased the apoptosis rate of Tregs ( $21.5 \pm 3.4\%$ ). However, no SENEX-mediated anti-apoptotic effect was observed in Teff cells (apoptosis rate  $13.9 \pm 3.1\%$ ). These results indicate that the SENEX gene can antagonize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in Tregs but not in Teff cells. **Conclusion:** In the pathogenesis of AML, the SENEX gene induces cell cycle arrest through the P16INK4A/Rb pathway, enabling AML patient Treg cells to acquire anti-apoptotic capabilities, promoting the accumulation of peripheral Tregs, and thus facilitating the immune escape of AML cells.

## Keywords

SENEX Gene, Immune Evasion, Stress-Induced Senescence, Acute Myeloid Leukemia

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 背景

AML 发病率约占儿童、青少年急性白血病的 20%，随年龄增长发病率升高，而且进展迅速，致死率高[1]。随着诊断以及治疗体系的逐渐完善，儿童 AML 的治愈率达 65% 以上，较前明显提高。鉴于 AML 属于源自造血干细胞的恶性克隆性病变目前其治疗已经进入平台期[2]。因此，探索 AML 发病机制，并以此为基础研发针对性的治疗措施，对于改善 AML 患儿预后具有重要意义。急性髓系白血病(Acute Myeloid Leukemia, AML)发生发展过程非常复杂，CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg 细胞)、与其相关的细胞因子介导的肿瘤免疫逃逸是近些年来研究 AML 的重要切入点[3]-[5]。迄今为止，在血液系统恶性肿瘤，以及包括乳腺癌[6]、肝细胞癌[7]、结肠癌[8]、膀胱癌[9]等多种实体瘤中，皆可见外周 Treg 细胞累积的现象。

2004 年，研究者证实成功克隆了与细胞老化相关的 SENEX 基因。该基因在机体多种器官及外周血白细胞中均有表达。SENEX 编码的蛋白包含 Rho GTP 酶激活蛋白(Rho GAP)功能结构域；而 Rho 家族蛋白与肿瘤发生紧密相关，能够调控基因转录，并参与细胞周期、衰老与凋亡等过程的控制[10]-[13]。Coleman 等人的研究显示，在人血管内皮细胞中上调 SENEX 表达后，会出现多种衰老相关的增殖抑制表型： $\beta$ -半乳糖苷酶活性(SA- $\beta$ -GAL)显著增强，细胞周期阻滞在 G1 期等，且这些变化与过表达的 SENEX 基因高度相关。进一步观察发现，由 SENEX 基因过表达触发的内皮细胞衰老并未伴随端粒缩短；同时，作为复制性衰老典型标志而通常会上调的三个基因——IL-1 $\alpha$  (interleukin-1 $\alpha$ )、COX2 (cyclooxygenase 2)和 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)——在 SENEX 基因过表达时其表达并未增加。综上所述，SENEX 诱发的衰老是应激性早期衰老(stress-induced premature senescence, SIPS)，而不是复制性衰老(replicative senescence, RS)。在使用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)为刺激诱导细胞程序性死亡的实验体系中，高表达 SENEX 基因的内皮细胞呈抗凋亡表型。SENEX 上调的内皮细胞屏障更加牢固；即使有 TNF- $\alpha$  存在也不受其激活而促进中性粒细胞及单核细胞的粘附，并减少 IL-8 的产生，对 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡也起到保护作用[14]。而在 SIPS 中，衰老细胞进入生长阻滞阶段，但是它们仍有能力重新进入细胞周期[15]。SIPS 细胞在许多细胞因子的作用下可以再次分化而恢复增殖。因此，SENEX 可能通过使细胞进入“休眠”样状态来规避凋亡，进而促使细胞逐步积累。如上述，SENEX 基因可能通过诱导应激性衰老使 Treg 细胞获得抗凋亡的能力。

细胞进入衰老状态依赖特定的信号传导网络来实现, 其中起决定性作用的两条通路分别由 P16INK4A/Rb 轴与 P19ARF-P53-P21Cip1 轴所主导。当这些通路中的关键调控因子的表达发生变化时, 细胞可能出现衰老延后, 或逃避衰老而继续增殖。位于上述两条衰老信号通路枢纽位置的是若干抑癌基因产物, 包括 Rb、P16INK4A、P53、P19ARF 及 P21Cip1 蛋白[16][17]。Coleman 等报道显示, 当 SENEX 基因过量表达时, 内皮细胞中 P53 与 P21 蛋白水平未见改变, 而 P16 的 mRNA 与蛋白水平均上调, 同时 Rb 蛋白的高磷酸化状态显著下降[14]。视网膜母细胞瘤抑制蛋白(retinoblastomaprotein, Rb)是 CDK4/6 激酶(cyclin-dependent kinases)的主要底物之一, 当其处于未磷酸化形态时, 可通过与 E2F 因子结合并遮挡其转录激活区, 进而压制细胞从 G 期过渡到 S 期所需的下游基因的表达, 最终使细胞增殖停滞并进入静息状态[17]。

这些研究结果均提示, SENEX 基因可能是通过活化 P16INK4A/Rb 途径诱导细胞周期停滞, 使 AML 患者 Treg 细胞获得凋亡抵抗的能力, 促使其外周 Treg 累积, 从而促进了 AML 细胞的免疫逃逸。为检验该假设, 本研究计划收集急性髓系白血病患者及健康对照者的血清与外周血单个核细胞(PBMC), 使用多种分子生物学方法测定调节性 T 细胞比例(CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup>)、FoxP3 mRNA 表达水平及血清中细胞因子, 如 TGF- $\beta$ 1、IL-10、IL-2、TNF- $\alpha$  等的浓度; 从健康对照与初次诊断的 AML 患儿 PBMC 中分离纯化 CD4<sup>+</sup> CD25 高表达的 Treg 和 CD4<sup>+</sup> CD25 阴性 Teff 细胞原代培养后测得培养 24 h 的自发性凋亡百分比, 并用不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化应激, 观察其凋亡敏感度(Annexin V<sup>+</sup>); 使用 SENEX-siRNA 在分离得到 Treg/Teff 中特异沉默 SENEX 基因, 并测定氧化应激下促凋亡基因(P53, P16, P21, Caspase-3) mRNA 表达水平以及细胞凋亡率(Annexin V<sup>+</sup>比例), 以期阐明 SENEX 在调节 Treg/Teff 细胞抗凋亡能力中的作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 细胞

初诊 AML 患儿外周血及健康儿童外周血 Treg 细胞、Teff 细胞。其中, 所有 AML 患者均按照 WHO 相关诊断标准明确诊断, 健康儿童均通过健康体检排除血液/造血系统疾病和其他系统性疾病; 且标本留取均在实验前履行告知义务, 并取得家长的知情同意。

### 2.2. 药物及试剂

RPMI-1640 和 OPTI-MEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于美国 Gibco 公司; 24 孔和 96 孔细胞培养板购于美国 Costar 公司; 25 mL 培养瓶购于美国 Corning 公司; 单抗(CD3, CD28)、细胞因子(重组人 IL-2)及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液购于 Sigma 公司; 地塞米松磷酸钠注射液购自蚌埠丰原涂山制药有限公司等。

### 2.3. 主要仪器

**Table 1.** General clinical characteristics of the study subjects

**表 1.** 研究对象一般临床资料

实验分组	年龄区间	年龄均值	例数	性别(例数)	
				男	女
初诊儿童 AML	8 月~14 岁	5.35 岁	35	17	18
健康儿童对照组	9 月~14 岁	5.75 岁	38	19	19

流式细胞仪由贝克曼库尔特公司购入, PowerPac Basic Power Supply 购买自 BIO-RAD 公司, 显微镜均选购自日本 Olympus (奥林巴斯)公司, 生物安全柜来自新加坡艺思高科技有限公司, 培养箱采购于日本 Thermo 公司, 低、高速离心机(TG-16, TG16-WS)由科大创新股份有限公司提供, Model 550 酶联分析仪购置于美国 GIBICO 公司, PCR 仪来自赛默飞公司, Centrifuge 5417R 型高速冷冻离心机、移液枪为德

国 Eppendorf 品牌, 国产细胞计数板等。

**Table 2.** Primer sequences for QRT-PCR  
**表 2.** QRT-PCR 引物序列

Name	Sequences (5' → 3')
<i>SENEX</i> -Forward	TTGCTCTGTTTTCCAGATTGGA
<i>SENEX</i> -Reverse	GCCCCAGTGCTTGAGGCT
<i>Caspase-3</i> -Forward	TAGTGTGTGTGTTGCTCAGTC
<i>Caspase-3</i> -Reverse	CTCGACAAGCCTGAATAAAG
<i>P53</i> -Forward	CCCGGATGGAGATAACTTG
<i>P53</i> -Reverse	CACAGTTGTCCATTGAGCAC
<i>P16</i> -Forward	TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCA
<i>P16</i> -Reverse	GAGAACTCAAGAAGGAAATTGG
<i>P21</i> -Reverse	ATGCAGCTCCAGACAGATGA
<i>P2</i> -Forward	CGCAAACAGACCAACATCAC
<i>GAPDH</i> -Reverse	TGCACCACCAACTGCTTAGC
<i>GAPDH</i> -Forward	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

#### 2.4. Treg 细胞比例与功能验证

选取安徽省儿童医院血液肿瘤科自 2015 年 5 月至 2019 年 5 月初次诊断为急性髓系白血病(Acute Myeloid Leukemia, AML)的 35 例患儿外周静脉血作为样本, 实验组与对照组患儿一般临床资料见表 1 所示。留取实验组患儿以及正常健康对照儿血清, 用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 以 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 定义 Treg 细胞的表型标记物, 分别应用流式细胞仪检测(Flow Cytometry, FC)、定量逆转录聚合酶链反应(QRT-PCR) (表 2)和酶联免疫吸附试验(ELISA), 检测上述标本 Treg 细胞百分比、FoxP3 mRNA 表达量及血清细胞因子 TGF- $\beta$ 1、IL-10、IL-2、IL-17 和 TNF- $\alpha$  等的浓度情况。

**Table 3.** Sequences of siRNA-SENEX for RNA interference  
**表 3.** RNA 干扰 SiRNA-SENEX 序列

Name	Sequences (5' → 3')
SiRNA- <i>SENEX</i> -homo-236	GCACCACCAUCAAGUUAUTT AUAACUUUGAUGGUGGUGCTT
SiRNA- <i>SENEX</i> -homo-1189	GGAGCUGCCAUUAGAAUCATT UGAUUCUAAUGGCAGCUCCTT
SiRNA- <i>SENEX</i> -homo-436	GCCGGUUUAUCCAAUCUCUTT AGAGAUUGGAUAAACCGGCTT

#### 2.5. SENEX 基因在 Treg 凋亡抵抗中的作用

分别从 3 名健康儿童对照者和 4 名初次确诊 AML 患儿采集每例 10 mL 外周血, 分离并保留血清后, 采用密度梯度离心法获取外周血单个核细胞。随后利用流式细胞分选技术纯化 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> 调节性 T 细

胞(Treg)与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>效应 T 细胞(Teff), 进行短期体外原代培养; 再以 100 μM 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理以诱发氧化应激损伤, 最后通过流式细胞术检测 Annexin V 阳性凋亡细胞的比例。

## 2.6. SENEX 调控 P16INK4A/Rb 通路的分子机制

利用终浓度为 100 μM 的过氧化氢溶液诱导经流式细胞仪纯化及分选出的外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Teff 原始培养细胞产生氧化应激损伤; 应用 RNA 干扰方法(表 3)在 Treg/Teff 细胞内特异性沉默 SENEX 基因, 采用实时荧光定量 PCR 检测 SENEX 和促凋亡基因 P53、P16、P21 及 Caspase-3 的 mRNA 表达情况并用流式细胞术检测 Annexin V 阳性凋亡细胞比例。

## 3. 结果与结论

初诊儿童 AML 外周血 Treg 细胞比例显著增高: (7.14 ± 0.41%)。同时; 儿童 AML 患儿外周血 FoxP3 基因 mRNA 表达显著增加(2-ΔΔCT = 0.0198 ± 0.0081)要显著高于儿童健康对照组(2-ΔΔCT = 0.0031 ± 0.00015), 差异均有统计学意义(p < 0.05)。儿童 AML 患儿外周血多种细胞因子分泌呈失衡状态: 相较健康对照儿童, 其血清 IL-10 (11.17 ± 1.08 pg/ml)、IL-17 (21.78 ± 3.69 pg/ml)、TGF-β1 (12.51 ± 1.02 ng/ml)及 TNF-α (21.35 ± 4.16 pg/ml)水平均显著升高, 而 IL-2 血清浓度为 165.29 ± 26.45 pg/ml, 较健康对照组的 409.24 ± 90.81 pg/ml 明显降低, 上述差异具有统计学意义(p < 0.05)。Treg 累积与 AML 免疫抑制微环境相关, 通过 FoxP3 和细胞因子谱证实, 其功能增强可能促进肿瘤逃逸。

对初诊 AML 患儿外周血 Treg 和 Teff 细胞分别进行原代培养并在 24 h 后检测其自发凋亡情况, 发现相同的培养条件及时间下(24 h), Treg 自发凋亡百分率(AnnexinV 阳性细胞)显著低于 Teff (Treg: 3.53 ± 0.17%, Teff: 5.78 ± 0.46%), 提示患儿外周 Treg 具有抗凋亡性。进一步采用不同浓度的过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导两类细胞凋亡发现: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理对 Treg 细胞与 Teff 细胞均可诱导其发生细胞凋亡, 且可见二者均表现为浓度依赖的剂量 - 效应关系。

以不同浓度梯度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25、50、100 及 150 μM)分别处理 Treg 细胞 2 小时后, 即时测得的凋亡率为 4.3 ± 0.32%、4.9 ± 0.48%、5.7 ± 0.41% 和 9.7 ± 0.95%; 同样测得 Teff 细胞凋亡率分别为 5.1 ± 0.53%、5.7 ± 0.76%、6.8 ± 0.75% 及 11.7 ± 1.04%。同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理对比可见, Treg 细胞的凋亡比例始终低于 Teff 细胞的凋亡比例, 且差异具有统计学意义。抑制 SENEX 基因表达使 Treg 凋亡率由 11.2% 升高到 21.5%, 且促凋亡基因表达增加, 包括 P16 mRNA 增加 253 倍; 由此可见, SENEX 基因抑制促凋亡途径 (P16INK4A/Rb), 从而增强了 Treg 的抗凋亡作用, 并使其积累。

① 在体外建立 SENEX 基因 siRNA 导入的 Treg/Teff 细胞模型后, 实时定量 PCR 结果显示: 采用脂质体 LipofectaininTM2000 进行 siRNA-SENEX 转染时, Treg 与 Teff 细胞中 SENEX mRNA 的表达抑制幅度均在 80% 以上。② SENEX 基因对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱发的 Treg 细胞凋亡具有抵抗作用。100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-2 h 处理组, 可见显著提高 AML 患儿 Teff 细胞和 Treg 细胞的凋亡比例, 分别达到 13.1 ± 4.3% 和 11.2 ± 2.6%; 并且, 在相同处理条件下, 转染 SENEX-siRNA 组会明显提高 Treg 细胞的凋亡水平(21.5 ± 3.4%); 在 Teff 细胞(13.9 ± 3.1%)中, 不能观察到 SENEX 基因介导的抗凋亡现象。实验结果可说明, SENEX 基因可抵抗 Treg 细胞在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下发生凋亡, 而对 Teff 细胞凋亡无抵抗作用。相同地, 在初诊 AML 患儿 Treg 细胞中转染 SENEX 特异性 siRNA 后, 凋亡相关基因表达水平明显升高: Caspase-3 mRNA、P21、P16、及 P53 的表达均显著增加(2-ΔΔCT 分别为: 5135.79 ± 985.47、154.58 ± 35.12、253.08 ± 16.01 及 6705.73 ± 1124.07), 组间比较差异均有统计学意义。siRNA 转染组与单纯 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-2h 处理组比较, p < 0.05。

## 4. 讨论

外周聚集的 Treg 细胞能够通过多种途径削弱 AML 患者的抗肿瘤免疫反应, 从而促成肿瘤的免疫逃

逸。研究提示, 外周 Treg 增多与其对凋亡的耐受性增强密切相关。在 Foxp3-IRES-GFP 基因同源重组 BALB/c 小鼠的试验中, IL-2 可选择地促进 Bim<sup>lo</sup> 表型 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞的分化和扩展; 而 BrdU 掺入诱导的 T 细胞凋亡情况下, 外周积聚的 Treg 死亡率明显降低[18]。由此推测, 综上所述, 在 AML 中 Treg 数量及比例增加主要由 Treg 凋亡降低所导致。

无论成人还是儿童, 初诊 AML 患者外周血及骨髓内 Treg 比例均明显高于对照组[19]-[22]。这些 Treg 既可通过分泌 IL-10、TGF- $\beta$  等抑制性因子[5] [14]显著抑制 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> 效应性 T 细胞(Teff)的增殖与细胞因子产生[19], 亦能抑制过继转移的肿瘤抗原特异性 CTL 的扩增和扩散[23] [24]。因此, Treg 及其相关抑制性细胞因子构成了促使 AML 细胞逃避免疫监视与抗肿瘤应答的关键因素。有研究指出, AML 患者体内 Treg 细胞的异常聚集与疾病的发生与复发高度相关[3] [4] [25]; 进一步显示, Treg 数量的增加既可能源于天然 Treg (nTreg)自身具备独特的抗凋亡保护机制[26], 也与衰老、肿瘤细胞等因素诱导形成的适应性 Treg 细胞(iTreg)有关[27]; 此外还有报道指出, 一方面, 伴随体外培养的过继性免疫细胞扩增的 Treg 细胞可能成为限制其最大免疫杀伤效应的关键因素[28], 另一方面, 使用优化培养方案降低其中的 Treg 细胞比例, 则可显著提升其在体外对 AML 细胞的杀伤效应[29]。本研究首次阐明 SENEX 基因在儿童 AML 发病进程中的重要作用, 初步论证了 SENEX 基因介导儿童 AML 细胞免疫逃逸的作用机制; 首次阐明基因对 AML 患儿外周 Treg 累积的作用机制, 阐述 SENEX 基因对 Treg 细胞衰老、凋亡的影响。因此, 我们认为 SENEX 基因或许可以作为 AML 治疗的潜在靶点。

总体而言, 在 AML 的发展过程中, SENEX 基因或可通过上调 P16INK4A 蛋白活性, 妨碍 CDK4/6 激酶与细胞周期蛋白 Cyclin D1 的相互作用, 进而使 CDK4/6 无法对 Rb 进行磷酸化, 导致转录因子 E2F 不能被释放, 触发细胞周期阻滞, 使 AML 患者的 Treg 细胞具备抗凋亡特性, 造成外周 Treg 的积聚, 从而推动 AML 细胞的免疫逃逸。本研究初步阐明 SENEX 基因调控 Treg 细胞凋亡的信号转导通路及分子作用机制, 为儿童 AML 的防治提供了新的靶点。其他 SENEX 基因对 AML 患者 Treg 细胞生物学特性的影响及具体机制还有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 杜成坎, 卢莹. 儿童急性髓细胞白血病基因突变与靶向药物治疗的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(2): 631-635.
- [2] 于皎乐, 郑胡铺. 儿童急性髓细胞白血病治疗新进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(4): 246-252.
- [3] 王会平, 沈元元, 熊术道, 陈天平, 陶千山, 张睿, 翟志敏. 老年急性髓细胞白血病患者体内 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞的检测和临床意义[J]. 中华老年医学杂志, 2013, 32(7): 754-756.
- [4] 陶盛能, 王会平, 沈元元, 卢娟, 赵一鸣, 翟志敏. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与急性髓细胞白血病关系的研究[J]. 白血病淋巴瘤, 2009, 18(11): 654-656.
- [5] Ustun, C., Miller, J.S., Munn, D.H., Weisdorf, D.J. and Blazar, B.R. (2011) Regulatory T Cells in Acute Myelogenous Leukemia: Is It Time for Immunomodulation? *Blood*, **118**, 5084-5095. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365817>
- [6] Decker, T., Fischer, G., Bücke, W., Bücke, P., Stotz, F., Grüneberger, A., et al. (2012) Increased Number of Regulatory T Cells (T-Regs) in the Peripheral Blood of Patients with Her-2/Neu-Positive Early Breast Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **138**, 1945-1950. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1258-3>
- [7] Zhou, J., Ding, T., Pan, W., Zhu, L., Li, L. and Zheng, L. (2009) Increased Intratumoral Regulatory T Cells Are Related to Intratumoral Macrophages and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma Patients. *International Journal of Cancer*, **125**, 1640-1648. <https://doi.org/10.1002/ijc.24556>
- [8] Lin, Y., Mahalingam, J., Chiang, J., Su, P., Chu, Y., Lai, H., et al. (2012) Activated but Not Resting Regulatory T Cells Accumulated in Tumor Microenvironment and Correlated with Tumor Progression in Patients with Colorectal Cancer. *International Journal of Cancer*, **132**, 1341-1350. <https://doi.org/10.1002/ijc.27784>
- [9] Horn, T., Grab, J., Schusdziarra, J., Schmid, S., Maurer, T., Nawroth, R., et al. (2013) Antitumor T Cell Responses in Bladder Cancer Are Directed against a Limited Set of Antigens and Are Modulated by Regulatory T Cells and Routine

- Treatment Approaches. *International Journal of Cancer*, **133**, 2145-2156. <https://doi.org/10.1002/ijc.28233>
- [10] Zhou, Q., Bucher, C., Munger, M.E., Highfill, S.L., Tolar, J., Munn, D.H., *et al.* (2009) Depletion of Endogenous Tumor-Associated Regulatory T Cells Improves the Efficacy of Adoptive Cytotoxic T-Cell Immunotherapy in Murine Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, **114**, 3793-3802. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208181>
- [11] Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J. (2005) RhoGDIs Revisited: Novel Roles in Rho Regulation. *Traffic*, **6**, 957-966. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00335.x>
- [12] Calvisi, D.F., Ladu, S., Conner, E.A., Seo, D., Hsieh, J., Factor, V.M., *et al.* (2011) Inactivation of Ras GTPase-Activating Proteins Promotes Unrestrained Activity of Wild-Type Ras in Human Liver Cancer. *Journal of Hepatology*, **54**, 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.036>
- [13] Sahai, E. and Marshall, C.J. (2002) RHO-GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2**, 133-142. <https://doi.org/10.1038/nrc725>
- [14] Coleman, P.R., Hahn, C.N., Grimshaw, M., Lu, Y., Li, X., Brautigan, P.J., *et al.* (2010) Stress-Induced Premature Senescence Mediated by a Novel Gene, SENEX, Results in an Anti-Inflammatory Phenotype in Endothelial Cells. *Blood*, **116**, 4016-4024. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-252700>
- [15] Bischof, O., Dejean, A. and Pineau, P. (2009) A Review of Cellular Senescence: Friend or Foe of Tumorigenesis? *Médecine/Sciences*, **25**, 153-160. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009252153>
- [16] Katoh, M. and Katoh, M. (2004) Characterization of Human ARHGAP10 Gene *in Silico*. *International Journal of Oncology*, **25**, 1201-1207. <https://doi.org/10.3892/ijo.25.4.1201>
- [17] Gil, J. and Peters, G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a Tumour Suppressor Locus: All for One or One for All. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**, 667-677. <https://doi.org/10.1038/nrm1987>
- [18] Tao, Q., Chen, T., Tao, L., Wang, H., Pan, Y., Xiong, S., *et al.* (2013) IL-15 Improves the Cytotoxicity of Cytokine-Induced Killer Cells against Leukemia Cells by Upregulating CD3+CD56+ Cells and Downregulating Regulatory T Cells as Well as IL-35. *Journal of Immunotherapy*, **36**, 462-467. <https://doi.org/10.1097/cji.0000000000000001>
- [19] Rayess, H., Wang, M.B. and Srivatsan, E.S. (2011) Cellular Senescence and Tumor Suppressor Gene p16. *International Journal of Cancer*, **130**, 1715-1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- [20] Szczepanski, M.J., Szajnik, M., Czystowska, M., Mandapathil, M., Strauss, L., Welsh, A., *et al.* (2009) Increased Frequency and Suppression by Regulatory T Cells in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*, **15**, 3325-3332. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-3010>
- [21] Moon, H., Kim, B.H., Park, C.M., Hur, M., Yun, Y., Kim, S., *et al.* (2011) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>foxp3<sup>+</sup> Regulatory T-Cells in Hematologic Diseases. *Annals of Laboratory Medicine*, **31**, 231-237. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.231>
- [22] Shenghui, Z., Yixiang, H., Jianbo, W., Kang, Y., Laixi, B., Yan, Z., *et al.* (2011) Elevated Frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup> Regulatory T Cells Is Associated to Poor Prognosis in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Cancer*, **129**, 1373-1381. <https://doi.org/10.1002/ijc.25791>
- [23] Wu, H., Li, P., Shao, N., Ma, J., Ji, M., Sun, X., *et al.* (2012) Aberrant Expression of Treg-Associated Cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- $\beta$  in Acute Myeloid Leukemia. *Oncology Letters*, **3**, 1119-1123. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.614>
- [24] Zhou, Q., Munger, M.E., Highfill, S.L., Tolar, J., Weigel, B.J., Riddle, M., *et al.* (2010) Program Death-1 Signaling and Regulatory T Cells Collaborate to Resist the Function of Adoptively Transferred Cytotoxic T Lymphocytes in Advanced Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, **116**, 2484-2493. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275446>
- [25] Yang, W. and Xu, Y. (2013) Clinical Significance of Treg Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia. *International Journal of Hematology*, **98**, 558-562. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1436-3>
- [26] Li, Q., Zhai, Z., Xu, X., Shen, Y., Zhang, A., Sun, Z., *et al.* (2010) Decrease of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells and TGF- $\beta$  at Early Immune Reconstitution Is Associated to the Onset and Severity of Graft-Versus-Host Disease Following Allogeneic Haematogenesis Stem Cell Transplantation. *Leukemia Research*, **34**, 1158-1168. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.03.017>
- [27] Chen, T., Wang, H., Zhang, Z., Li, Q., Yan, K., Tao, Q., *et al.* (2014) A Novel Cellular Senescence Gene, SENEX, Is Involved in Peripheral Regulatory T Cells Accumulation in Aged Urinary Bladder Cancer. *PLOS ONE*, **9**, e87774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087774>
- [28] 王会平, 翟志敏, 李庆, 张爱梅, 徐修才, 张翠萍, 沈元元, 卢娟, 洪海鸥. 老年肿瘤患者外周血 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 中华老年医学杂志, 2008, 27(4): 269-272.
- [29] Tao, Q., Wang, H. and Zhai, Z. (2014) Targeting Regulatory T Cells in Cytokine-Induced Killer Cell Cultures (Review). *Biomedical Reports*, **2**, 317-320. <https://doi.org/10.3892/br.2014.234>