狼毒大戟中二萜类化合物DP抗白血病的作用机制研究Δ

马立威[1,2*]，陈　哲[3]，王文豹[4]，张金玲[1]，张洪涛[5]，葛鹏玲[2]，刘吉成[1#]（1.齐齐哈尔医学院医药科学研究院（博士后工作站），黑龙江 齐齐哈尔　161006；2.黑龙江中医药大学博士后流动站，哈尔滨　150040；3.齐齐哈尔医学院公共卫生学院，黑龙江 齐齐哈尔　161006；4.齐齐哈尔医学院药学院，黑龙江 齐齐哈尔　161006；5.齐齐哈尔医学院附属第三医院妇产科，黑龙江 齐齐哈尔　161099）

中图分类号　R966；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）07-0825-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.11

摘　要　目的　探究狼毒大戟中二萜类化合物12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯（DP）能否通过磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路发挥抗白血病的作用，为将其开发成抗白血病新药提供实验依据。**方法**　以LY294002（PI3K特异性抑制剂）为工具药，采用MTT、Annexin Ⅴ-FITC/PI、AO-EB染色法观察并测定DP作用24 h后对人原髓细胞白血病细胞HL60增殖、凋亡的影响；采用ELISA法测定DP作用24 h后细胞培养液中乳酸脱氢酶（LDH）的释放量及细胞中胱天蛋白酶3（caspase-3）、caspase-9的活性。采用实时荧光定量-PCR法检测DP作用24 h后细胞中caspase-3、caspase-9、叉头框O3a（FoxO3a）、B细胞淋巴瘤2细胞死亡的相互作用介质（Bim）的mRNA转录水平；采用Western blot法检测细胞中磷酸化FoxO3a（p-FoxO3a）、磷酸化Akt（p-Akt）的蛋白表达水平，并采用免疫染色法在激光共聚焦显微镜下观察细胞中FoxO3a蛋白核转位情况。**结果**　10 μmol/L DP和10 μmol/L DP+LY294002对HL60细胞有明显的增殖抑制及凋亡诱导作用（$P<0.01$）；5、10、20 μmol/L DP作用后的细胞均呈典型的凋亡形态学特征，细胞培养液中LDH释放量和细胞中caspase-3、caspase-9活性均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），其作用具有一定的浓度依赖性趋势；10 μmol/L DP和10 μmol/L DP+LY294002作用后细胞中caspase-3、caspase-9和Bim mRNA转录水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），FoxO3a mRNA转录水平和p-FoxO3a、p-Akt蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；10 μmol/L DP+LY294002组细胞可见FoxO3a蛋白的核转位变化，且该变化较LY294002组明显。**结论**　DP可通过抑制PI3K/Akt信号通路抑制人白血病HL60细胞增殖并诱导其凋亡。

关键词　狼毒大戟；12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯；人原髓细胞白血病细胞HL60；磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路

Study on the mechanism of diterpenoid DP from *Euphorbia fischeriana* against leukemia

MA Liwei[1,2], CHEN Zhe[3], WANG Wenbao[4], ZHANG Jinling[1], ZHANG Hongtao[5], GE Pengling[2], LIU Jicheng[1] [1. Research Institute of Medicine and Pharmacy (Postdoctoral Workstation), Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. Mobile Postdoctoral Station, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. School of Public Health, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 4. School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 5. Dept. of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161099, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore whether diterpenoid 12-deoxyphorbol-13-palmitate (DP) from *Euphorbia fischeriana* can exert anti-leukemia effects through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway, and to provide experimental evidence for developing it into a new anti-leukemia drug. **METHODS** Using LY294002 (PI3K specific inhibitor) as tool drug, the effects of 24 h DP treatment on the proliferation and apoptosis of human myeloid leukemia HL60 cells were detected by MTT method, Annexin Ⅴ-FITC/PI staining and AO-EB staining. ELISA method was used to detect lactic dehydrogenase (LDH) release and the activities of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (caspase-3) and caspase-9. The transcriptional level of caspase-3, caspase-9, forkhead box O3a (FoxO3a) and B cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death (Bim) mRNA were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The protein expression of phosphorylated FoxO3a (p-FoxO3a) and phosphorylated Akt (p-Akt) were detected by Western blot method. The nuclear translocation of FoxO3a protein was detected by immunostaining combined with laser confocal microscopy. **RESULTS** 10 μmol/L DP and 10 μmol/L DP+LY294002 could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HL60 cells ($P<0.01$). After treatment of 5, 10,

Δ**基金项目** 黑龙江省中医药管理局科技计划项目（No.ZHY2020-179）；齐齐哈尔市科技计划联合引导项目（No.LHYD-202028）

＊**第一作者** 副研究员，博士。研究方向：天然药物抗肿瘤。E-mail：maliwei@qmu.edu.cn

＃**通信作者** 教授，博士生导师，博士。研究方向：天然药物抗肿瘤。E-mail：jcliu@qmu.edu.cn

20 μmol/L DP, HL60 cells showed typical morphological characteristics of apoptosis; DP could significantly increase the levels of LDH release and the activities of caspase-3 and caspase-9 ($P<0.05$ or $P<0.01$), in dose-dependent manner. After treatment of 10 μmol/L DP and 10 μmol/L DP+LY294002, the transcriptional levels of caspase-3, caspase-9 and Bim mRNA were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), and transcriptional level of FoxO3a mRNA and protein expressions of p-FoxO3a and p-Akt were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Nuclear translocation changes were observed in FoxO3a protein in 10 μmol/L DP+LY294002 group, and the change was more significant than that of LY294002 group. **CONCLUSIONS** DP can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HL60 cells via inhibiting PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS *Euphorbia fischeriana*; 12-deoxyphorbol-13-palmitate; human myeloid leukemia HL60 cells; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway

白血病是造血系统最常见的恶性肿瘤，发病率和病死率均较高[1]。研究表明，我国白血病发病率居各类型肿瘤的第6位，位居儿童恶性肿瘤首位，已成为儿童死亡的主要原因之一[2]。急性髓系白血病是白血病中常见的类型，发病率约为70%，占小儿白血病发病例数的30%[3]。虽然急性髓系白血病患者在接受全反式维甲酸和三氧化二砷等靶向治疗后的治愈率较高，但治疗后易复发，严重影响了患者的疗效和预后[3]。有研究报道，磷脂酰肌醇3激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路对细胞的生长、存活、增殖及凋亡均有调控作用，该通路的异常激活与人白血病特别是急性淋巴细胞白血病的发生发展密切相关[4－5]。

狼毒大戟为大戟科草本植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 的根，其野生品种在黑龙江省山区草原广泛分布，药源充足。作为传统的毒性中草药，其味辛，性平，具有逐水祛痰、散结杀虫等多种药理活性，多用于水肿、腹水、肝癌、肺癌等疾病的治疗[6]。12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯（DP）是从狼毒大戟中分离出的一种四环二萜类单体化合物，分子式为$C_{36}H_{58}O_6$，化学结构见图1。本课题组前期研究发现，DP在体外能抑制人原髓细胞白血病细胞HL60增殖并诱导其凋亡[7]，但具体的作用机制还不清楚。本研究拟通过体外实验探究DP能否通过PI3K/Akt信号通路抑制HL60细胞增殖并诱导其凋亡，为将其开发成抗白血病新药提供实验依据。

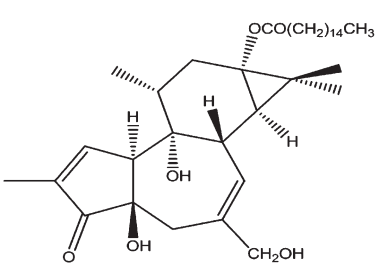


图1　DP的化学结构

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用的主要仪器有3111型CO_2细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司），Spark型酶标仪（瑞士Tecan公司），Observer A1型荧光显微镜、LSM710型激光共聚焦显微镜（德国CarlZeiss公司），FACSCallbur型流式细胞仪（美国BD公司），Q5型实时荧光定量-聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Applied Biosystems公司），Biospec-nano型微量紫外分光光度计（日本Shimadzu公司）。

1.2　主要药品与试剂

DP由齐齐哈尔医学院天然药物实验中心提供，经高效液相色谱法测定其纯度≥98%，在4 ℃保存，使用时用二甲基亚砜（DMSO）调成所需质量浓度。AO-EB染色试剂盒（批号DA26FA0002）购自生工生物（工程）上海股份有限公司；胎牛血清购自美国Hyclone公司；IMDM培养基购自安徽白鲨生物科技有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）活性检测试剂盒（批号20180708）购自南京建成生物工程研究所；Annexin Ⅴ-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒（批号4293719）购自美国BD公司；胱天蛋白酶3（cysteinyl aspartate specific proteinase 3，caspase-3）、caspase-9酶活性检测试剂盒（批号分别为042821211029、042621211036）购自上海碧云天生物技术有限公司；实时荧光定量-PCR试剂盒、Trizol试剂（批号分别为AK6002、AI51028A）购自宝生物工程（大连）有限公司；兔抗人磷酸化Akt（p-Akt）单克隆抗体、工具药LY294002（PI3K特异性抑制剂）、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗均购自美国Cell Signaling Technology公司；兔抗人叉头框O3a（forkhead box O3a，FoxO3a）、磷酸化FoxO3a（p-FoxO3a）单克隆抗体购自美国Abcam公司；caspase-3、caspase-9、FoxO3a、B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma 2，Bcl-2）细胞死亡的相互作用介质（Bim）、β-肌动蛋白（β-actin）的PCR序列均由生工生物工程（上海）股份有限公司设计、合成。

1.3　细胞株

人原髓细胞白血病细胞HL60购自中国科学院上海细胞库，以液氮保存于齐齐哈尔医学院医药科学研究所实验室中。

2 方法

2.1 细胞培养

将HL60细胞复苏后接种于培养瓶中，用含20%胎牛血清的IMDM培养基进行培养。将细胞置于37 ℃、5%CO_2培养箱中，平均2 d传代1次。

2.2 细胞增殖能力检测

采用MTT法进行检测。取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL，按每孔0.2 mL接种到96孔细胞培养板中。实验分组如下：空白对照组、DP 10 μmol/L组[7]、LY294002组（40 μmol/L，按照试剂说明书设置）、DP10 μmol/L+LY294002组（10 μmol/L DP+40 μmol/L LY294002，LY294002在DP作用结束前1 h加入，并按试剂说明书设置浓度），每个组设3个复孔。将培养板置于培养箱中常规培养，培养24 h后取出96孔板，每孔加入MTT溶液（5 g/L）20 μL，放入培养箱中继续培养4 h后，离心（300×*g*，10 min）并弃上清，每孔加入150 μL DMSO溶解甲瓒，采用酶标仪测定各孔在490 nm波长处的吸光度（OD），根据公式计算细胞的增殖抑制率：增殖抑制率（%）=（1－用药组OD平均值/空白对照组OD平均值）×100%。实验重复3次。

2.3 细胞凋亡检测

采用Annexin Ⅴ-FITC/PI双染色法进行检测。取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL，按每孔2 mL接种到6孔板中，实验分组、给药同“2.2”项下。药物作用24 h后，离心（200×*g*，10 min）并收集细胞于流式管中，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗2次，然后按试剂盒说明书方法操作：每管加入300 μL结合缓冲液，随后添加Annexin Ⅴ-FITC染液、PI染液各5 μL，室温避光孵育10 min，最后上机检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率结果以早期凋亡率（右下象限）和晚期凋亡率（右上象限）的总和表示。

2.4 细胞形态学观察

采用AO-EB染色法进行观察。取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL，按每孔2 mL接种到6孔板中。实验分为空白对照组和DP不同浓度（5、10、20 μmol/L[7]）组。DP作用细胞24 h后，离心（300×*g*，10 min）并弃掉培养基，用PBS洗2次，然后再次离心（300×*g*，10 min）并弃上清。按AO-EB染色试剂盒说明书方法操作进行染色，然后于荧光显微镜下观察细胞形态学变化并拍照。

2.5 细胞培养液中LDH释放量和细胞中caspase-3、caspase-9活性测定

采用ELISA法进行检测。（1）细胞培养液中LDH释放量检测：细胞准备、实验分组、给药均同“2.4”项下。培养24 h后，用加样枪抽取各组细胞上清液100 μL备用；按LDH试剂盒说明书方法操作并计算细胞培养液中LDH的释放量。（2）细胞中caspase-3、caspase-9活性测定：细胞准备、实验分组、给药同“2.4”项下。收集培养24 h的细胞于EP管中，加PBS重悬，离心（200×*g*，3 min）并弃上清；向各EP管中加100 μL蛋白裂解液，在冰浴上裂解15 min（每5 min混匀一次各EP管），离心（4 ℃，12 000×*g*）15 min，用加样枪抽取各组细胞上清液，备用。按照相应试剂盒说明书操作，检测细胞中caspase-3、caspase-9活性。上述实验均重复3次。

2.6 细胞中caspase-3、caspase-9、FoxO3a、Bim mRNA转录水平测定

采用实时荧光定量-PCR法进行检测。取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL。细胞接种、分组、给药均同“2.2”项下。作用24 h后，收集各组细胞至EP管中，加PBS重悬，离心（300 × *g*）10 min并弃上清；每管加入Trizol试剂1 mL，待细胞充分溶解后，提取各组细胞的总RNA，并在微量紫外分光光度计上测定其浓度及纯度；然后按照试剂盒说明书方法，首先将RNA逆转录合成cDNA，再以cDNA为模板进行PCR反应。按照试剂盒说明书设置仪器的扩增条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火/延伸31 s，共40个循环。扩增体系（共25.0 μL）如下：TB green 12.5 μL，上、下游引物各0.5 μL，cDNA模板2.0 μL，50×Rox Dye 0.5 μL，RNase-free水9.0 μL。以*β*-actin为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法检测各目标基因的相对表达量。引物序列及扩增产物长度见表1。实验重复3次。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列	扩增产物长度/bp
β-actin	上游：5′-GTTGTCGACGACGAGCG-3′	93
	下游：5′-GCACAGAGCCTCGCCTT-3′	
caspase-3	上游：5′-TCGCTTCCATGTATGATCTTTG-3′	110
	下游：5′-CTGCCTCTTCCCCCATTCT-3′	
caspase-9	上游：5′-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3′	93
	下游：5′-AGGTTCTCAGACCGGAAACA-3′	
FoxO3a	上游：5′-AGTTCCCTCATTCTGGACCC-3′	102
	下游：5′-CTTCAAGGATAAGGGCGACA-3′	
Bim	上游：5′-GATAGTGGTTGAAGGCCTGG-3′	102
	下游：5′-CCTCCCTACAGACAGAGCCA-3′	

2.7 细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白表达水平测定

采用Western blot法进行检测。取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL，将细胞接种于100 mm细胞培养皿中（每皿8 mL），实验分组和细胞给药同“2.2”项下。培养24 h后，收集各组细胞于EP管中，PBS洗涤，然后每管加入1.5 mL含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液，提取细胞中总蛋白，按照BCA试剂盒说明书方法对总蛋白进行定量。取20 μg高温变性的蛋白，上样十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（电压80 V，时间2 h），然后电转至聚偏氟乙烯膜上（300 mA恒流转印2 h）。将载有蛋白的膜经5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h，用TBST缓冲液（含1%聚山梨酯20，下同）洗膜3次（10 min/次），加入一抗GAPDH（稀释比例为1∶1 000）、

p-FoxO3a（稀释比例为1∶2 000）、p-Akt（稀释比例为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；TBST缓冲液洗膜3次（10 min/次），加入二抗（稀释比例为1∶2 000），室温孵育1.5 h；TBST缓冲液洗膜3次（10 min/次），滴加ECL发光液，于全自动荧光及化学发光成像系统上曝光获取图片。采用仪器自带软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值的比值来表示目的蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.8 细胞中FoxO3a蛋白核转位情况观察

取对数生长期细胞，调整细胞密度为2×10^4个/mL。取1 mL含细胞的完全培养基接种到共聚焦显微镜专用24孔细胞培养板（黑壁底透）上，实验分组如下：空白对照组、LY294002组（40 μmol/L）和DP 10 μmol/L+LY294002组（10 μmol/L DP+40 μmol/L LY294002，LY294002在药物作用结束前1 h加入）。将细胞放入培养箱中常规孵育24 h后，离心（300×*g*，10 min）并弃上清，加入4%多聚甲醛，在室温下固定30 min，采用Triton X-100免疫染色通透液在室温下通透30 min后，再用含1%牛血清白蛋白的PBS在37 ℃下封闭30 min，随后加入FoxO3a一抗（稀释比例为1∶500）在4 ℃冰箱中孵育过夜；将孔板洗涤、离心（300×*g*，10 min）并弃上清，加入二抗（稀释比例为1∶1 000）并在室温下避光孵育60 min；加入二脒基苯基吲哚（DAPI）染液在室温下孵育15 min，对细胞核进行染色。染色结束后，于激光共聚焦显微镜下观察并记录各组细胞的形态变化以及荧光蛋白表达位置的变化并拍照，拍照时将激光强度调成一致，蛋白阳性表达呈红色荧光。

2.9 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率测定结果

与空白对照组比较，DP 10 μmol/L组、DP 10 μmol/L+LY294002组细胞的增殖均受到显著抑制（$P<0.01$），且DP 10.0 μmol/L +LY294002组的抑制效果优于DP 10 μmol/L组。结果见表2。

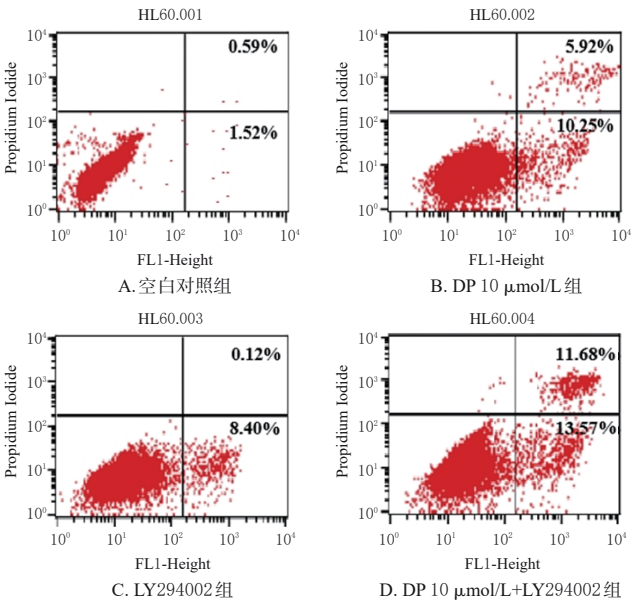
表2 各组细胞的增殖抑制率测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	OD值	抑制率/%
空白对照组	1.416±0.073	
DP 10 μmol/L组	1.122±0.077[a]	20.79
LY294002组	1.268±0.050	9.18
DP10 μmol/L+LY294002组	0.899±0.059[a]	36.49

a：与空白对照组比较，$P<0.01$

3.2 细胞凋亡率测定结果

与空白对照组[细胞凋亡率（3.22±1.07）%]比较，DP 10 μmol/L组、DP 10 μmol/L+LY294002组细胞的凋亡率[（13.79±2.07）%、（23.86±1.78）%]显著升高（$P<0.01$），但LY294002组细胞凋亡率[（7.82±2.34）%]的差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图2。



A. 空白对照组　B. DP 10 μmol/L组　C. LY294002组　D. DP 10 μmol/L+LY294002组

图2 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

3.3 细胞形态学观察结果

空白对照组细胞生长旺盛，呈重叠样增殖，并可见均匀的绿色荧光；5、10、20 μmol/L DP作用24 h后，细胞形态发生变化，表现为红色荧光逐渐增强，细胞数量减少、轮廓模糊不清，可见较多的细胞碎片，且随着药物浓度的增大上述变化更明显。结果见图3。

3.4 细胞培养液中LDH释放量和细胞中caspase-3、caspase-9活性测定结果

与空白对照组比较，DP 5、10、20 μmol/L组细胞培养液中LDH释放量和细胞中caspase-3、caspase-9活性均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），且均具有一定的浓度依赖性趋势。结果见表3。

3.5 细胞中caspase-3、caspase-9、Bim、FoxO3a mRNA转录水平测定结果

与空白对照组比较，DP 10 μmol/L组、LY294002组、DP 10 μmol/L+LY294002组细胞中caspase-3、caspase-9、Bim mRNA的转录水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），FoxO3a mRNA的转录水平显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），且DP 10 μmol/L+LY294002组的效果在一定程度上优于DP 10 μmol/L组。结果见表4。

3.6 细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白表达水平测定结果

与空白对照组比较，DP 10 μmol/L组、DP 10 μmol/L+LY294002组细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），且DP 10 μmol/L+LY294002组的效果较DP 10.0 μmol/L组更明显。结果见图4、表5。

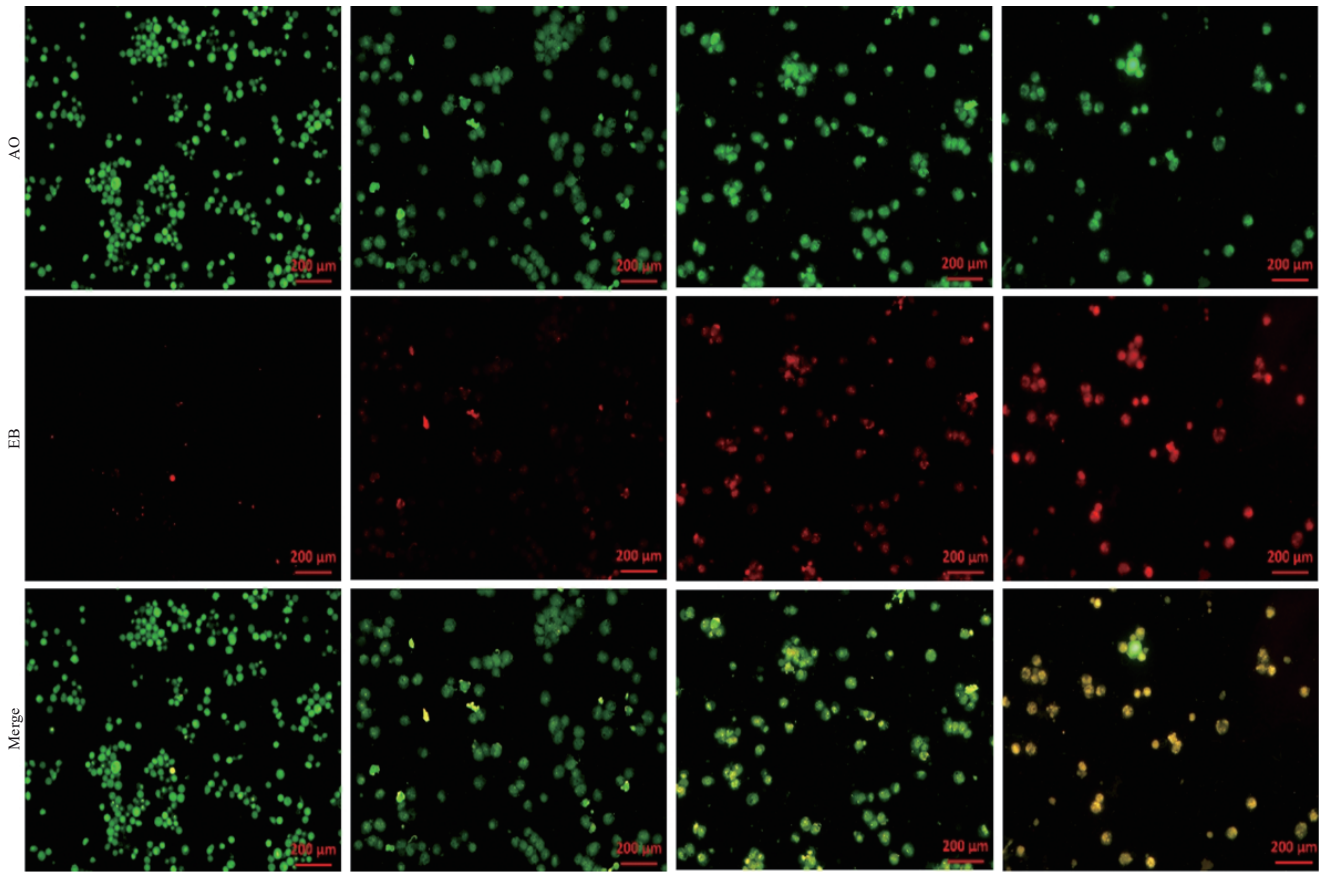


图3　各组细胞形态学变化检测的荧光显微图（AO-EB染色）

表3　各组细胞的LDH释放量和caspase-3、caspase-9活性测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	LDH释放量/(U/L)	caspase-3活性	caspase-9活性
空白对照组	112.697±10.870	5.393±1.258	5.627±1.567
DP 5 μmol/L组	155.220±8.223[a]	12.760±1.763[a]	10.640±1.474[b]
DP 10 μmol/L组	217.367±16.294[a]	26.553±2.483[a]	19.023±1.980[a]
DP 20 μmol/L组	238.191±14.972[a]	34.601±2.382[a]	24.090±1.412[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

表4　各组细胞中caspase-3、caspase-9、Bim、FoxO3a mRNA转录水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	caspase-3/β-actin	caspase-9/β-actin	Bim/β-actin	FoxO3a/β-actin
空白对照组	1.000	1.000	1.000	1.000
DP 10 μmol/L组	3.454±0.400[a]	2.864±0.436[b]	2.718±0.431[b]	0.731±0.046[a]
LY294002组	2.634±0.316[b]	2.547±0.282[b]	2.492±0.324[b]	0.803±0.037[b]
DP 10 μmol/L+LY294002组	5.404±0.457[a]	4.593±0.439[a]	4.030±0.433[a]	0.526±0.040[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

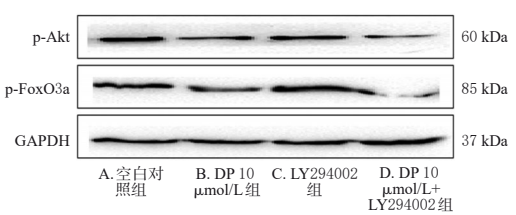


图4　各组细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白表达的电泳图

3.7　细胞中FoxO3a蛋白核转位观察结果

共聚焦显微镜下可见，表示FoxO3a蛋白的红色荧光在空白对照组细胞DAPI核染色区域内表达不明显，

表5　各组细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-FoxO3a/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白对照组	1.060±0.086	0.959±0.062
DP 10 μmol/L组	0.572±0.045[a]	0.733±0.061[b]
LY294002组	0.970±0.111	0.901±0.057
DP 10 μmol/L+LY294002组	0.401±0.039[a]	0.479±0.051[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与空白对照组比较，$P<0.05$

空白对照组和LY294002组细胞胞质内的红色荧光相对较明显，而DP 10 μmol/L+LY294002组细胞核染色区域内的红色荧光较强，显示出较明显的核转位变化。结果见图5。

4　讨论

本研究中，笔者分别采用MTT法和ELISA法检测了DP对HL60细胞的增殖抑制能力及细胞培养液中LDH的释放量，通过AO-EB和Annexin Ⅴ-FITC/PI染色法观察并测定了细胞形态学变化及细胞凋亡率，进一步证实了DP能抑制HL60细胞增殖并诱导其凋亡，这与前期研究结果一致[7]。

另外，鉴于PI3K/Akt信号通路与白血病发生发展的关系密切[5]，而LY294002作为PI3K的特异性抑制剂，又能够抑制包括Akt在内的下游效应物的激活[8]，是研究与PI3K/Akt信号通路相关的分子机制中常用的抑制剂，因此，本研究结合LY294002来验证实验对象DP是否能

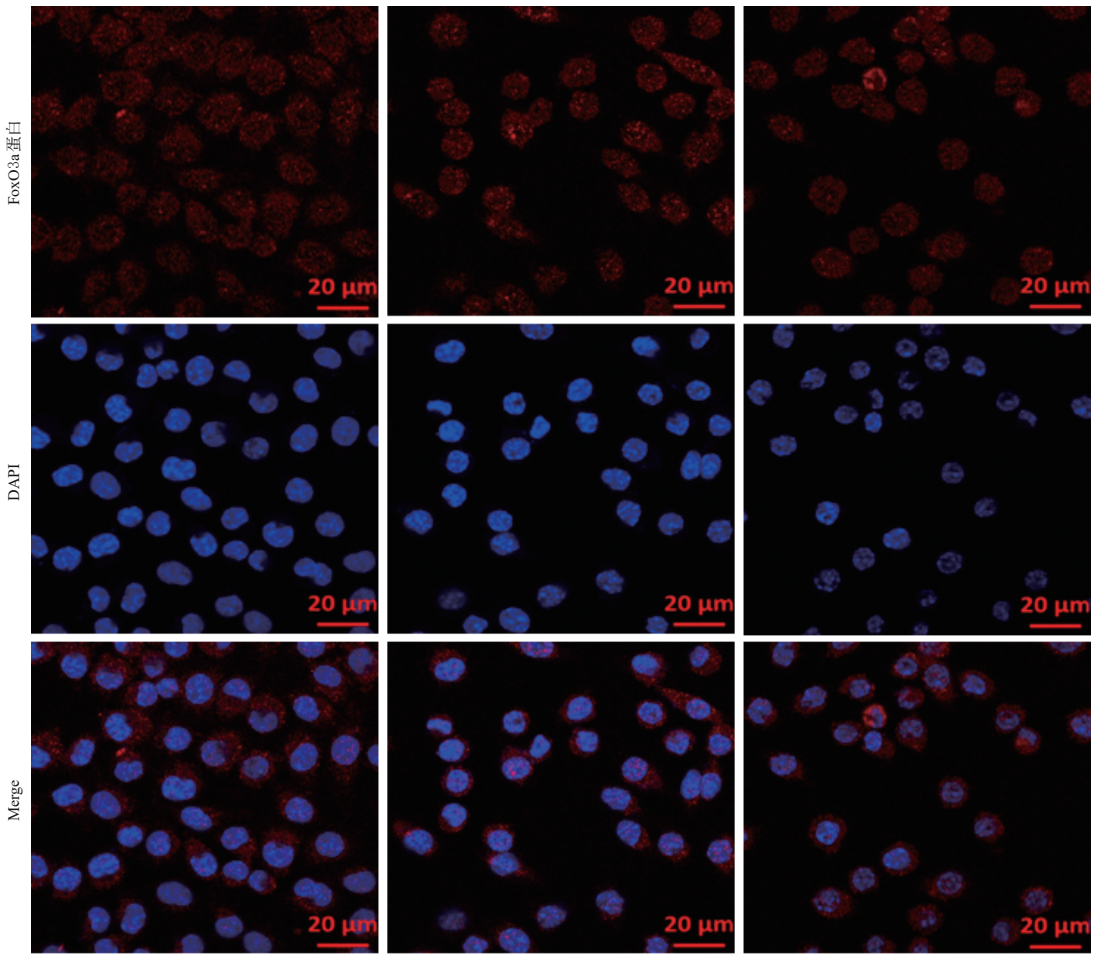


图5　各组细胞中FoxO3a蛋白核转位结果显微图（DAPI染色）

通过PI3K/Akt信号通路抑制白血病HL60细胞的增殖并诱导其凋亡。结果发现，DP与LY294002联合使用对细胞的增殖抑制作用及细胞凋亡率较DP单独作用的效果更好，这表明DP与LY294002之间存在协同作用。另据文献报道，FoxO3a作为Akt的重要核心底物，可上调细胞凋亡因子，并调节细胞周期因子，从而促进细胞凋亡和周期阻滞，抑制肿瘤的发生和发展[9－10]。本研究中，笔者通过Western blot法和实时荧光定量-PCR法检测发现，DP或DP联合LY294002均能减少HL60细胞中p-FoxO3a、p-Akt蛋白（FoxO3a、Akt蛋白的活化形式）表达，并能使FoxO3a mRNA转录水平降低。这初步证实了DP可通过PI3K/Akt信号通路抑制HL60细胞增殖并诱导其凋亡。但值得注意的是，在Western blot实验中，也有可能是因为细胞密度的下降或细胞生长受到抑制，导致细胞中p-Akt、p-FoxO3a蛋白的表达量降低，后续研究中需通过设计更加严谨的实验进行验证。

有研究报道，Bim和Bax均为Bcl-2家族成员，而由Bcl-2家族因子参与的线粒体凋亡途径在细胞凋亡过程中发挥着重要作用[11]。Bim是Bcl-2家族中BH3-only亚族成员，是一种重要的促凋亡蛋白；同时Bim也是FoxO3a下游的关键因子，FoxO3a可以结合在Bim的启动子上促进Bim蛋白的表达，从而启动线粒体途径的细胞凋亡过程[12]。笔者前期研究证实，DP能够下调Bcl-2 mRNA的转录水平，上调Bax mRNA的转录水平[7]。在本研究中，笔者通过实时荧光定量-PCR法检测发现，DP也能够上调细胞中Bim mRNA的转录水平，这进一步证实了DP可通过线粒体途径抑制HL60细胞增殖并诱导其凋亡。另外，有文献指出，caspase-3是细胞凋亡途径中的执行者，参与细胞程序性死亡的最后阶段[13－14]。Bcl-2蛋白家族中的Bax/Bak通过影响线粒体外膜通透性，释放凋亡因子，激活caspase[15－16]。caspase是细胞凋亡的重要介质，而caspase-3是一种经常被激活的死亡蛋白酶[17]。caspase-3可被caspase-9切割，随后激活下游的其他caspase因子，将靶细胞引导到凋亡、死亡的临界点[18]。在本研究中，笔者也证实了DP单用或联合LY294002后能增加HL60细胞中caspase-3、caspase-9活性并上调其mRNA的转录水平。

有研究报道，活化后的PI3K/Akt信号通路可以刺激FoxO3a发生磷酸化，使得FoxO3a从细胞核转运到细胞质内，同时降低其下游Bim蛋白的表达，抑制细胞的凋亡；然而当PI3K/Akt信号通路受到抑制时，去磷酸化的FoxO3a又会从细胞质内进入细胞核，从而导致其下游

细胞内的Bim蛋白表达增加，进而导致细胞凋亡发生[19]。内源性FoxO3a的核转位被认为是细胞凋亡的标志特征[20]。在本研究中，笔者通过共聚焦显微镜观察发现，DP联合LY294002后比LY294002单用对HL60细胞中FoxO3a蛋白核转位的影响更大，间接证实了DP能够引起FoxO3a蛋白核转位的发生。

综上所述，DP可通过抑制PI3K/Akt信号通路抑制HL60细胞增殖并诱导其凋亡。本研究在探究DP的作用机制时仅围绕PI3K/Akt信号通路开展，其抗白血病作用是否有其他信号通路或机制还有待进一步探讨。

参考文献

[1] 付海荣，庞毅，谭家华，等. 山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究[J]. 中国药房，2019，30(24)：3392-3398.

[2] 李泮霖，苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药，2016，47(16)：2938-2942.

[3] 陈乃川，周智辉，李宏，等. 蟾毒它灵逆转急性髓系白血病HL60/ADR耐药细胞的作用及机制[J]. 甘肃科学学报，2022，34(2)：34-42.

[4] OLIVEIRA M L，AKKAPEDDI P，ALCOBIA I，et al. From the outside，from within：biological and therapeutic relevance of signal transduction in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Cell Signal，2017，38：10-25.

[5] EFIMENKO E，DAVÉ U P，LEBEDEVA I V，et al. PI3Kγ/δ and NOTCH1 cross-regulate pathways that define the T-cell acute lymphoblastic leukemia disease signature[J]. Mol Cancer Ther，2017，16(10)：2069-2082.

[6] 马立威，陈哲，李京，等. 大戟大枣汤含药血清通过PI3K/Akt通路对乳腺癌细胞凋亡的影响[J]. 中成药，2020，42(10)：2584-2591.

[7] 马立威，周丽，李世玲，等. 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯对HL60细胞增殖抑制及诱导凋亡的研究[J]. 中国药学杂志，2018，53(1)：30-34.

[8] 段少伯，万海同，周惠芬，等. 基于PI3K/AKT信号通路的谷红注射液抗H9c2心肌细胞缺氧/复氧损伤的机制研究[J]. 中国药学杂志，2020，55(8)：588-594.

[9] YU W J，WANG J Y，MA L F，et al. CD166 plays a procarcinogenic role in liver cancer cells via inhibition of FOXO proteins through AKT[J]. Oncol Rep，2014，32(2)：677-683.

[10] FU Z，TINDALL D J. FOXOs，cancer and regulation of apoptosis[J]. Oncogene，2008，27(16)：2312-2319.

[11] BI L，YAN X J，CHEN W P，et al. Antihepatocellular carcinoma potential of tetramethylpyrazine induces cell cycle modulation and mitochondrial-dependent apoptosis：regulation of p53 signaling pathway in HepG2 cells *in vitro*[J]. Integr Cancer Ther，2016，15(2)：226-236.

[12] STRASSER A，PUTHALAKATH H，BOUILLET P，et al. The role of BIM，a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control[J]. Ann N Y Acad Sci，2000，917：541-548.

[13] QI G H，SUN D，TIAN Y，et al. Fast activation and tracing of caspase-3 involved cell apoptosis by combined electrostimulation and smart signal-amplified SERS nanoprobes[J]. Anal Chem，2020，92(11)：7861-7868.

[14] NICHANI K，LI J Z，SUZUKI M，et al. Evaluation of caspase-3 activity during apoptosis with fluorescence lifetime-based cytometry measurements and phasor analyses[J]. Cytometry A，2020，97(12)：1265-1275.

[15] MA X Q，YU M X，HAO C X，et al. Shikonin induces tumor apoptosis in glioma cells via endoplasmic reticulum stress，and Bax/Bak mediated mitochondrial outer membrane permeability[J]. J Ethnopharmacol，2020，263：113059.

[16] DEWSON G. Investigating the oligomerization of Bak and Bax during apoptosis by cysteine linkage[J]. Cold Spring Harb Protoc，2015，2015(5)：481-484.

[17] ZHANG J L，WANG X M，YANG J F，et al. Novel diosgenin derivatives containing 1，3，4-oxadiazole/thiadiazole moieties as potential antitumor agents：design，synthesis and cytotoxic evaluation[J]. Eur J Med Chem，2020，186：111897.

[18] YIN F，ZHOU H F，FANG Y C，et al. Astragaloside Ⅳ alleviates ischemia reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the activation of key factors in death receptor pathway and mitochondrial pathway[J]. J Ethnopharmacol，2020，248：112319.

[19] SEDDING D G. FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing：a new fork on the way to longevity?[J]. Biol Chem，2008，389(3)：279-283.

[20] LIU Z X，SHI Z C，LIN J R，et al. Piperlongumine-induced nuclear translocation of the FOXO3A transcription factor triggers BIM-mediated apoptosis in cancer cells[J]. Biochem Pharmacol，2019，163：101-110.

（收稿日期：2022-10-09　修回日期：2023-03-07）

（编辑：林　静）