

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research石蒜碱调节 PTEN/PI3K/AKT 通路对急性
早幼粒细胞白血病细胞增殖及凋亡的影响

Effects of lycorine on proliferation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells by regulating PTEN/PI3K/AKT pathway

秦桢伟^a, 王欣萌^b, 孙 寅^c,
钟 晴^c(滕州市中心医院, a. 儿科一病区; b. 儿科
新生儿科; c. 新生儿科二病区; 山东 滕州
277599)QIN Zhen - wei^a,
WANG Xin - meng^b,
SUN Yin^c, ZHONG Jing^c(a. Pediatric Ward 1; b. Pediatric
Newborns; c. Neonatology Ward 2,
Tengzhou Central People's Hospital,
Tengzhou 277599, Shandong Province,
China)基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划基金
资助项目(202006010355)作者简介: 秦桢伟(1991 -), 女, 硕士, 主治医师,
主要从事儿科疾病诊疗方面的研究及工作

通信作者: 钟晴, 副主任医师

MP: 15906322363

E-mail: c3s46d@163.com

摘要:目的 探究石蒜碱(LYC)调节磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路对急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞增殖及凋亡的影响。方法 用1.0~32.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的石蒜碱处理人APL细胞(NB4)细胞,检测细胞活性,筛选石蒜碱实验浓度;将NB4细胞分为A组(对照组)、B组、C组、D组(石蒜碱低浓度组、中浓度组、高浓度组)、E组(高浓度石蒜碱+PI3K激活剂740 Y-P组),对照组除外,B组、C组、D组分别用石蒜碱4.0、8.0和16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理24 h;E组用16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 石蒜碱和25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的740 Y-P处理24 h;检测细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移以及细胞周期情况;检测相关蛋白表达。将人自然杀伤细胞(NK细胞)与NB4细胞共培养24 h,检测NK细胞对NB4细胞的杀伤率。结果 NB4细胞用石蒜碱4.0、8.0和16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理后,细胞存活率显著降低,此浓度用于后续实验。A组、B组、C组、D组和E组NB4细胞克隆形成数分别为(151.38 $\pm$ 16.42)、(117.15 $\pm$ 12.78)、(81.04 $\pm$ 8.36)、(56.17 $\pm$ 6.05)和(105.02 $\pm$ 10.64)个,划痕愈合率分别为(89.62 $\pm$ 9.15)%、(72.57 $\pm$ 7.45)%、(55.34 $\pm$ 5.83)%、(36.78 $\pm$ 3.72)%和(65.59 $\pm$ 6.58)%,细胞侵袭数量分别为(168.27 $\pm$ 17.82)、(132.69 $\pm$ 14.39)、(90.58 $\pm$ 9.25)、(61.64 $\pm$ 6.37)和(110.59 $\pm$ 12.27)个,S期细胞比例分别为(46.17 $\pm$ 4.71)%、(35.18 $\pm$ 3.56)%、(28.20 $\pm$ 3.13)%、(20.52 $\pm$ 2.16)%和(32.01 $\pm$ 3.32)%,G₂/M期细胞比例分别为(24.68 $\pm$ 2.56)%、(19.34 $\pm$ 1.97)%、(15.62 $\pm$ 1.55)%、(11.15 $\pm$ 1.23)%和(17.03 $\pm$ 1.89)%,周期素依赖性激酶1(CDK1)水平分别为0.95 $\pm$ 0.09、0.74 $\pm$ 0.07、0.50 $\pm$ 0.05、0.32 $\pm$ 0.03和0.63 $\pm$ 0.06,基质金属蛋白酶-2(MMP-2)水平分别为1.14 $\pm$ 0.11、0.83 $\pm$ 0.08、0.56 $\pm$ 0.05、0.37 $\pm$ 0.03和0.69 $\pm$ 0.06,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)水平分别为0.94 $\pm$ 0.09、0.70 $\pm$ 0.07、0.47 $\pm$ 0.04、0.26 $\pm$ 0.02和0.55 $\pm$ 0.05,磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)/PI3K分别为0.86 $\pm$ 0.08、0.71 $\pm$ 0.07、0.45 $\pm$ 0.04、0.26 $\pm$ 0.02和0.55 $\pm$ 0.05,磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)/AKT表达量分别为0.91 $\pm$ 0.09、0.78 $\pm$ 0.07、0.53 $\pm$ 0.05、0.31 $\pm$ 0.03和0.69 $\pm$ 0.06,细胞凋亡率分别为(2.23 $\pm$ 0.26)%、(17.41 $\pm$ 1.82)%、(26.34 $\pm$ 2.75)%、(39.62 $\pm$ 4.05)%和(21.58 $\pm$ 2.27)%,G₀/G₁期细胞比例分别为(29.15 $\pm$ 3.06)%、(45.48 $\pm$ 4.67)%、(56.18 $\pm$ 5.73)%、(68.33 $\pm$ 6.88)%和(50.96 $\pm$ 5.01)%,Bcl-2相关X蛋白(Bax)水平分别为0.26 $\pm$ 0.02、0.41 $\pm$ 0.04、0.72 $\pm$ 0.07、0.98 $\pm$ 0.09和0.66 $\pm$ 0.06,PTEN水平分别为0.32 $\pm$ 0.03、0.45 $\pm$ 0.04、0.74 $\pm$ 0.07、0.96 $\pm$ 0.09和0.61 $\pm$ 0.06,B组、C组、D组与A组相比,E组与D组相比,以上指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。NK细胞与NB4细胞共培养后,与A组相比,B组、C组、D组细胞杀伤率升高($P < 0.001$),与D组相比,E组细胞杀伤率降低($P < 0.001$)。结论 石蒜碱抑制APL细胞增殖,促进APL细胞凋亡,并伴随PTEN表达上调和PI3K/AKT通路抑制,且其效应依赖于PI3K/AKT通路。

关键词: 石蒜碱; 急性早幼粒细胞白血病; 磷酸酶和张力蛋白同源物/脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 增殖; 凋亡

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.22.009

中图分类号: R733.7 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-6821(2025)22-3206-08

Abstract: Objective To investigate the effects of lycorine (LYC) on the proliferation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia (APL) cells by regulating the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway. **Methods** Human APL cells (NB4) were treated with 1.0–32.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LYC, the cell viability was detected, and the LYC experimental concentration was screened. NB4 cells were divided into group A (control group), group B, group C, group D (lycorine low concentration group, medium concentration group, high concentration group), group E (high concentration lycorine + PI3K activator 740 Y-P group). Except for the control group, groups B, C, and D were treated with 4.0, 8.0 and 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lycorine, respectively, for 24 hours. Group E was treated with 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lycorine combined with 25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 740 Y-P for 24 hours. Cell proliferation, apoptosis, invasion, migration, and cell cycle status were detected, and the expression of related proteins was detected. **Results** After treatment with concentrations of 4.0, 8.0 and 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of lycorine, the survival rate of NB4 cells prominently decreased, therefore, they were used for subsequent experiments. The colony formation numbers of NB4 cells in group A, group B, group C, group D and group E were 151.38 ± 16.42 , 117.15 ± 12.78 , 81.04 ± 8.36 , 56.17 ± 6.05 and 105.02 ± 10.64 , respectively. The scratch healing rates were $(89.62 \pm 9.15)\%$, $(72.57 \pm 7.45)\%$, $(55.34 \pm 5.83)\%$, $(36.78 \pm 3.72)\%$ and $(65.59 \pm 6.58)\%$, respectively. The number of cell invasion was (168.27 ± 17.82) , (132.69 ± 14.39) , (90.58 ± 9.25) , (61.64 ± 6.37) and (110.59 ± 12.27) , respectively. The proportion of cells in S phase was $(46.17 \pm 4.71)\%$, $(35.18 \pm 3.56)\%$, $(28.20 \pm 3.13)\%$, $(20.52 \pm 2.16)\%$ and $(32.01 \pm 3.32)\%$, respectively. The percentages of cells in G₂/M phase were $(24.68 \pm 2.56)\%$, $(19.34 \pm 1.97)\%$, $(15.62 \pm 1.55)\%$, $(11.15 \pm 1.23)\%$ and $(17.03 \pm 1.89)\%$, respectively. The levels of cyclin dependent kinase 1 (CDK1) were 0.95 ± 0.09 , 0.74 ± 0.07 , 0.50 ± 0.05 , 0.32 ± 0.03 and 0.63 ± 0.06 , respectively. The levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) were 1.14 ± 0.11 , 0.83 ± 0.08 , 0.56 ± 0.05 , 0.37 ± 0.03 and 0.69 ± 0.06 , respectively. The levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were 0.94 ± 0.09 , 0.70 ± 0.07 , 0.47 ± 0.04 , 0.26 ± 0.02 and 0.55 ± 0.05 , respectively. The phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K)/PI3K were 0.86 ± 0.08 , 0.71 ± 0.07 , 0.45 ± 0.04 , 0.26 ± 0.02 and 0.55 ± 0.05 , respectively. The expression levels of phosphorylated protein kinase B (p-AKT)/AKT were 0.91 ± 0.09 , 0.78 ± 0.07 , 0.53 ± 0.05 , 0.31 ± 0.03 and 0.69 ± 0.06 , respectively. The apoptosis rates were $(2.23 \pm 0.26)\%$, $(17.41 \pm 1.82)\%$, $(26.34 \pm 2.75)\%$, $(39.62 \pm 4.05)\%$ and $(21.58 \pm 2.27)\%$, respectively. The proportion of cells in G₀/G₁ phase was $(29.15 \pm 3.06)\%$, $(45.48 \pm 4.67)\%$, $(56.18 \pm 5.73)\%$, $(68.33 \pm 6.88)\%$ and $(50.96 \pm 5.01)\%$, respectively. The levels of Bcl-2 associated X protein (Bax) were 0.26 ± 0.02 , 0.41 ± 0.04 , 0.72 ± 0.07 , 0.98 ± 0.09 and 0.66 ± 0.06 , respectively. The levels of PTEN were 0.32 ± 0.03 , 0.45 ± 0.04 , 0.74 ± 0.07 , 0.96 ± 0.09 and 0.61 ± 0.06 , respectively. Group B, group C, group D compared with group A, group E compared with group D, the above indicators were statistically significant ($P < 0.05$). After NK cells were co-cultured with NB4 cells, compared with the A group, the cell killing rate of B, C and D groups increased ($P < 0.001$). Compared with the D group, the cell killing rate of E group decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Lycorine inhibited APL cells with up-regulation of PTEN expression and inhibition of PI3K/AKT pathway, and its effect is dependent on PI3K/AKT pathway.

Key words: lycorine; acute promyelocytic leukemia; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; proliferation; apoptosis

急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 的一种特定亚型, 由骨髓和外周血中白血病性早幼粒细胞的恶性增殖所驱动^[1]。APL 是

一种通常表现为危及生命的出血性疾病,也是一种高度致死的疾病^[2]。因此,探索针对 APL 的有效药物以及发病机制对 AML 其他亚型的临床治疗和潜在机制具有重要意义。近年来,天然化合物已被证明对血液疾病治疗有效。石蒜碱(lycorine,LYC)是一种源自孤挺花科药用植物的天然生物碱,具有一系列生物活性,包括抗炎、抗病毒、抗真菌和抗肿瘤活性^[3]。研究发现,石蒜碱能够显著抑制 B 细胞急性淋巴细胞白血病(b-cell acute lymphoblastic leukemia,B-ALL) REH 和 NALM-6 细胞生长和增殖,并诱导细胞凋亡^[4]。但石蒜碱在 APL 中的作用机制尚未阐明。磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)是一种重要的抑癌基因,可拮抗脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,AKT)抗凋亡途径,作为细胞内重要的信号枢纽,PTEN/PI3K/AKT 通路的失调通过影响细胞增殖、分化、侵袭与转移,成为驱动肿瘤进展的关键环节^[5-6]。但其作用的具体机制仍有待研究。文献报道,TET1 通过促进 miR-188-5p 启动子羟甲基化来提高 miR-188-5p 的表达,miR-188-5p 抑制 PTEN 表达以诱导 PI3K/AKT 信号通路激活,导致 AML 中的阿霉素耐药^[7]。本研究将人 APL 细胞株 NB4 细胞作为实验对象,基于 PTEN/PI3K/AKT 信号通路,初步探索石蒜碱对 APL 细胞的增殖、凋亡的作用机制,为 APL 的临床治疗提供理论依据。

材料与方 法

1 材料

细胞 人 APL 细胞(human acute promyelocytic leukemia cells,NB4),购买于武汉益普生物科技有限公司。人自然杀伤细胞(natural killer,NK),购自武汉赛奥斯生物科技有限公司。

药品与试剂 石蒜碱,规格:每支 20 mg,纯度:≥98%,批号:A131442,上海抚生实业有限公司生产;PI3K 激活剂 740 Y-P,规格:1 mL,纯度:≥96.35%,批号:LZ-01X12364,上海联祖生物科技有限公司生产;兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)抗体、周期素依赖性激酶 1(cyclin dependent kinase 1,CDK1)抗体、PTEN 抗体、PI3K 抗体、AKT 抗体、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2,MMP-2)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)抗体,均由武汉博士德生物有

限公司生产;兔抗磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase,p-PI3K)抗体、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B,p-AKT)抗体,均由赛默飞公司生产;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,武汉益普生物科技有限公司生产。

仪器 Bigfoot 流式细胞仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品;CLARIOstar PLUS 多功能酶标仪,德国 BMG LABTECH 公司产品;Mini-PROTEAN Tetra Cell,Mini Trans-Blot Module 垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 伯乐公司产品;DMIL 显微镜,德国 Leica 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[8]

用含 10% 胎牛血清+L-谷氨酰胺的艾斯考维改良杜尔贝科(iscove's modified dulbecco medium,IMDM)培养基培养 NB4 细胞,培养条件:5% CO₂、37℃培养箱。

2.2 实验分组

将 NB4 细胞用不同浓度的石蒜碱(1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μmol·L⁻¹)处理 24 h,筛选石蒜碱处理浓度。将 NB4 细胞随机分为 A 组(对照组)、B 组(石蒜碱低浓度组)、C 组(石蒜碱中浓度组)、D 组(石蒜碱高浓度组)和 E 组(高浓度石蒜碱+PI3K 激活剂 740 Y-P 组),B 组、C 组、D 组分别用石蒜碱 4.0、8.0 和 16.0 μmol·L⁻¹处理 24 h;E 组用 16.0 μmol·L⁻¹石蒜碱和 25.0 μmol·L⁻¹的 740 Y-P 处理^[9] 24 h,A 组不做任何处理。

2.3 平板克隆法检测细胞增殖^[10]

培养各组 NB4 细胞至肉眼可见的克隆,终止培养,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)轻柔冲洗,加预冷的甲醇孵育,0.1% 结晶紫染色,PBS 冲洗多余染料,室温风干,显微镜下拍照,统计克隆形成数。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡^[11]

用 0.25% 胰酶消化 NB4 细胞,预冷的 PBS 清洗 3 次,离心完成后弃上清,悬浮细胞与结合缓冲液中,室温条件下依次加膜联蛋白 V 偶联荧光素(annexin V fluorescein,Annexin V-FITC)缓冲液、0.5 mg·L⁻¹碘化丙啶(propidium iodide,PI),混匀,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 体外侵袭实验(transwell assay,Transwell)检测细胞侵袭^[11]

用基质胶涂抹小室,晾干,将制备好的 NB4 细胞

悬液加入小室,在下室加入正常培养基作为趋化剂,培养 24 h 后,依次通过 PBS 清洗、甲醛固定及结晶紫染色处理侵袭至膜下表面的细胞,显微镜下计数统计。

2.6 划痕法检测细胞迁移^[10]

为评估 NB4 细胞的迁移能力,将处于对数生长期的细胞($5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)接种于 6 孔板中。在细胞达到 90% 汇合度后,使用 100 μL 枪头进行划痕,并于划痕后 0 h 与 24 h 分别拍摄记录。通过比较两个时间点的划痕宽度计算细胞的划痕愈合率。

2.7 流式细胞术检测细胞周期^[12]

各组 NB4 细胞用 PBS 清洗,收集细胞,制备 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞浓度,加预冷的 70% 乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定 12 h,离心,PBS 清洗,加 PI 染色液,使其悬浮,室温避光孵育染色 15 min,流式细胞仪上机检测细胞周期。

2.8 免疫印记法检测蛋白表达^[12]

将各组 NB4 细胞使用放射免疫沉淀裂解液 (radioimmunoprecipitation assay lysis buffer,RIPA) 充分裂解,裂解后,离心提取蛋白,分离上清液,蛋白总量用二辛可酸 (bicinchoninic acid,BCA) 法检测。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS - PAGE),转至聚偏二氟乙烯膜上,室温下,脱脂奶粉封闭 1 h,加 CDK1、Bax、PTEN、p - PI3K、PI3K、p - AKT、AKT、MMP - 2、MMP - 9 一抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加二抗稀释液,稀释比例为 1:5 000,室温孵育 2 h,增强型化学发光剂 (enhanced chemiluminescence,ECL) 显色,用凝胶成像系统分析蛋白条带灰度值,计算蛋白表达量。

2.9 细胞计数法 (cell counting kit - 8,CCK - 8) 检测 NK 细胞对 NB4 细胞的杀伤率^[13]

在 96 孔板中建立 NK 细胞与 NB4 细胞的共培养体系,4 h 后离心,每孔吸取 50 μL 上清液进行收集,加 CCK - 8 试剂,测各组细胞吸光值,计算 NK 细胞对 NB4 细胞杀伤率。

3 统计学处理

以 SPSS 25.0 分析数据,以 $\bar{x} \pm s$ 展示符合正态分布的实验数据,单因素方差分析比较多组间差异,组间差异以 SNK - *q* 检验比较。

结 果

1 石蒜碱浓度筛选

经 1.0 ~ 32.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 石蒜碱处理 24 ~ 72 h

后,当浓度 $\geq 4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,NB4 细胞的存活率呈时间与浓度依赖性显著降低 ($P < 0.05$);与石蒜碱浓度为 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的细胞存活率相比,石蒜碱浓度为 32.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细胞存活率无显著差异 ($P > 0.05$),本研究选择石蒜碱 4.0、8.0 和 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的作为本研究浓度,见表 1。

表 1 石蒜碱对急性早幼粒细胞白血病 (NB4) 细胞存活率的影响

Table 1 The effect of lycorine on the survival rate of human acute promyelocytic leukemia (NB4) cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Lycorine ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cell survival rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0	100.00 $\pm$ 0
1.0	98.93 $\pm$ 9.96	98.85 $\pm$ 9.94	98.74 $\pm$ 9.89
2.0	97.76 $\pm$ 9.87	97.26 $\pm$ 9.80	97.05 $\pm$ 9.79
4.0	86.52 $\pm$ 8.79 *	83.21 $\pm$ 8.58 *	80.63 $\pm$ 8.11 *
8.0	72.34 $\pm$ 7.46 *	69.47 $\pm$ 7.25 *	67.56 $\pm$ 6.95 *
16.0	49.68 $\pm$ 5.15 *	49.44 $\pm$ 5.23 *	49.01 $\pm$ 5.02 *
32.0	49.11 $\pm$ 5.12 *	48.75 $\pm$ 4.96 *	48.24 $\pm$ 4.87 *

Compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, * $P < 0.05$.

2 石蒜碱对 APL 细胞增殖的影响

740 Y - P 为 PI3K 激活剂,用于激活 PI3K/AKT 信号通路。与 A 组比较,B 组、C 组、D 组细胞克隆形成数、CDK1 表达量均显著降低 ($P < 0.001$);与 D 组相比,E 组克隆形成数、CDK1 表达量显著升高 ($P < 0.001$),见表 2。

表 2 石蒜碱对 NB4 细胞增殖的影响

Table 2 The effect of lycorine on the proliferation of NB4 cells in each group ($\pm$ SD, $n = 8$)

Group	Clone formation number (n)	Protein quantification of CDK1
A	151.38 $\pm$ 16.42	0.95 $\pm$ 0.09
B	117.15 $\pm$ 12.78 ***	0.74 $\pm$ 0.07 ***
C	81.04 $\pm$ 8.36 *****	0.50 $\pm$ 0.05 *****
D	56.17 $\pm$ 6.05 ***** $\triangle\triangle\triangle$	0.32 $\pm$ 0.03 ***** $\triangle\triangle\triangle$
E	105.02 $\pm$ 10.64 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.63 $\pm$ 0.06 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$

Compared with A group, *** $P < 0.001$; Compared with B group, ### $P < 0.001$; Compared with C group, $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$; Compared with D group, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$; CDK1: Cyclin dependent kinase 1; Group A: No treatment was applied; Groups B, C and D: Treated with lycorine at concentrations of 4.0, 8.0 and 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively for 24 h; Group E: Treated with a combination of 16.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ lycorine and 25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 740 Y - P for 24 h.

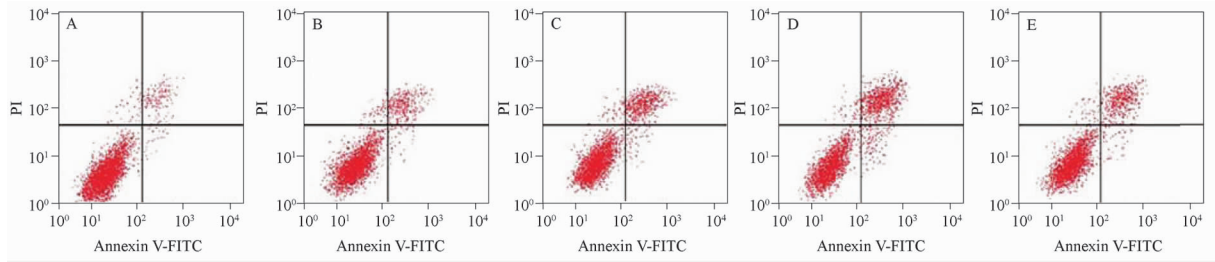


图1 各组NB4细胞凋亡情况
Figure 1 Apoptosis of NB4 cells in each group

3 石蒜碱对 APL 细胞凋亡的影响

与A组比较,B组、C组、D组细胞凋亡率均显著升高,Bax表达升高($P<0.001$);与D组相比,E组凋亡率、Bax表达均显著降低($P<0.001$),见图1、图2和表3。

4 石蒜碱对 APL 细胞迁移、侵袭的影响

相比A组,B组、C组、D组划痕愈合率均显著减小、细胞侵袭数量均显著降低,MMP-2、MMP-9表达均显著下调($P<0.001$),见图2;相比D组,E组划痕愈合率显著增大、细胞侵袭数量显著升高,MMP-2、MMP-9表达显著上调($P<0.001$),见图2和表4。

5 石蒜碱对 APL 细胞周期的影响

与A组比较,B组、C组、D组G₀/G₁期细胞比例均显著升高,S期、G₂/M期细胞比例均显著降低(均

$P<0.001$);与D组相比,E组G₀/G₁期细胞比例均显著下降,S期、G₂/M期细胞比例均显著升高(均 $P<0.001$),见表5。

表3 石蒜碱对NB4细胞凋亡率和凋亡蛋白表达的影响

Table 3 Effects of allicin on apoptosis rate and apoptosis protein expression in NB4 cells (±SD, n=8)

Group	Apoptosis rate (%)	Protein quantification of Bax
A	2.23 ± 0.26	0.26 ± 0.02
B	17.41 ± 1.82 ***	0.41 ± 0.04 ***
C	26.34 ± 2.75 ***###	0.72 ± 0.07 ***###
D	39.62 ± 4.05 ***###△△△	0.98 ± 0.09 ***###△△△
E	21.58 ± 2.27 ▲▲▲	0.66 ± 0.06 ▲▲▲

Compared with A group, *** $P<0.001$; Compared with B group, ### $P<0.001$; Compared with C group, △△△ $P<0.001$; Compared with D group, ▲▲▲ $P<0.001$; Bax: Bcl-2 associated X protein.

表4 石蒜碱对NB4细胞迁移、侵袭的影响

Table 4 Effects of allicin on migration and invasion of NB4 cells (±SD, n=8)

Group	Scratch healing rate (%)	Number of cell invasions	Protein quantification of MMP-2	Protein quantification of MMP-9
A	89.62 ± 9.15	168.27 ± 17.82	1.14 ± 0.11	0.94 ± 0.09
B	72.57 ± 7.45 ***	132.69 ± 14.39 ***	0.83 ± 0.08 ***	0.70 ± 0.07 ***
C	55.34 ± 5.83 ***###	90.58 ± 9.25 ***###	0.56 ± 0.05 ***###	0.47 ± 0.04 ***###
D	36.78 ± 3.72 ***###△△△	61.64 ± 6.37 ***###△△△	0.37 ± 0.03 ***###△△△	0.26 ± 0.02 ***###△△△
E	65.59 ± 6.58 ▲▲▲	110.59 ± 12.27 ▲▲▲	0.69 ± 0.06 ▲▲▲	0.55 ± 0.05 ▲▲▲

Compared with A group, *** $P<0.001$; Compared with B group, ### $P<0.001$; Compared with C group, △△△ $P<0.001$; Compared with D group, ▲▲▲ $P<0.001$; MMP-2: Matrix metalloproteinase 2; MMP-9: Matrix metalloproteinase 9.

表5 石蒜碱对NB4细胞周期的影响

Table 5 The effect of lycorine on the cell cycle of NB4 cells (±SD, n=8)

Group	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
A	29.15 ± 3.06	46.17 ± 4.71	24.68 ± 2.56
B	45.48 ± 4.67 ***	35.18 ± 3.56 ***	19.34 ± 1.97 ***
C	56.18 ± 5.73 ***###	28.20 ± 3.13 ***###	15.62 ± 1.55 ***###
D	68.33 ± 6.88 ***###△△△	20.52 ± 2.16 ***###△△△	11.15 ± 1.23 ***###△△△
E	50.96 ± 5.01 ▲▲▲	32.01 ± 3.32 ▲▲▲	17.03 ± 1.89 ▲▲▲

Compared with A group, *** $P<0.001$; Compared with B group, ### $P<0.001$; Compared with C group, △△△ $P<0.001$; Compared with D group, ▲▲▲ $P<0.001$.

表 6 石蒜碱对磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)/脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B 信号 (AKT) 通路蛋白表达的影响

Table 6 Effects of allicin on the expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) / phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) pathway proteins (±SD, n = 8)

Group	Protein quantification of PTEN	Protein quantification of p - PI3K/PI3K	Protein quantification of p - AKT/AKT
A	0.32 ± 0.03	0.86 ± 0.08	0.91 ± 0.09
B	0.45 ± 0.04 ***	0.71 ± 0.07 ***	0.78 ± 0.07 ***
C	0.74 ± 0.07 *** ###	0.45 ± 0.04 *** ###	0.53 ± 0.05 *** ###
D	0.96 ± 0.09 *** ### △△△	0.26 ± 0.02 *** ### △△△	0.31 ± 0.03 *** ### △△△
E	0.61 ± 0.06 ▲▲▲	0.55 ± 0.05 ▲▲▲	0.69 ± 0.06 ▲▲▲

Compared with A group, *** $P < 0.001$; Compared with B group, ### $P < 0.001$; Compared with C group, △△△ $P < 0.001$; Compared with D group, ▲▲▲ $P < 0.001$; PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; PI3K: Phosphatidylinositol 3 - kinase; AKT: Protein kinase B; p - PI3K: Phosphorylated phosphatidylinositol 3 - kinase; p - AKT: Phosphorylated protein kinase B.

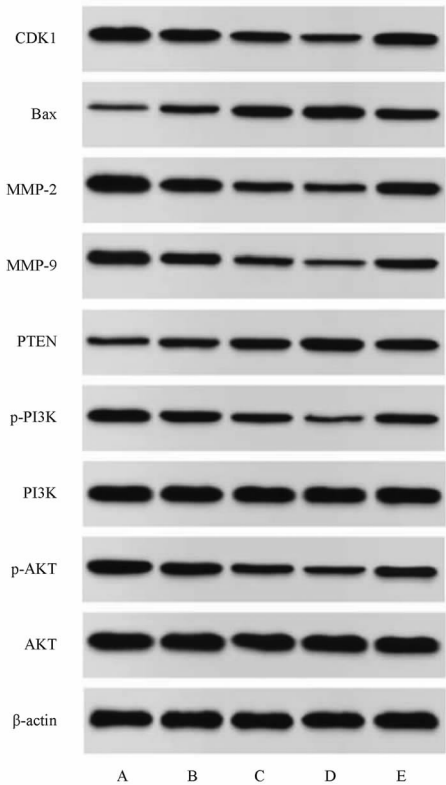


图 2 各组 NB4 细胞蛋白表达情况

Figure 2 The protein expression of NB4 cells in each group

CDK1: Cyclin dependent kinase 1; Bax: Bcl - 2 associated X protein; MMP - 2: Matrix metalloproteinase 2; MMP - 9: Matrix metalloproteinase 9; PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; PI3K: Phosphatidylinositol 3 - kinase; AKT: Protein kinase B; p - PI3K: Phosphorylated phosphatidylinositol 3 - kinase; p - AKT: Phosphorylated protein kinase B; β - actin: Beta - actin.

6 石蒜碱对 PTEN/PI3K/AKT 通路的影响

与 A 组相比, B 组、C 组、D 组 PTEN 表达均显著上调, p - PI3K/PI3K、p - AKT/AKT 表达均显著下调 (均 $P < 0.001$), 见图 2; 与 D 组相比, E 组 PTEN 表达

均显著下调, p - PI3K/PI3K、p - AKT/AKT 表达均显著上调 (均 $P < 0.001$), 见图 2 和表 6。

7 石蒜碱对 APL 细胞杀伤率的影响

A 组、B 组、C 组、D 组、E 组自然杀伤率分别为 (9.23 ± 1.45)%, (17.04 ± 2.11)%, (28.65 ± 2.37)%, (39.52 ± 4.28)% 和 (21.37 ± 2.15)%; 与 A 组相比, B 组、C 组、D 组杀伤率上升 (均 $P < 0.001$); 与 D 组相比, E 组杀伤率降低 ($P < 0.001$)。

讨 论

APL 是由骨髓中异常的早幼粒细胞恶性增殖且无法分化而引起的。该病具有特定的生物学和临床特征, 主要包括贫血、出血、感染、肝脾肿大、淋巴结肿大和骨痛^[14]。目前, APL 主要通过全反式维甲酸联合三氧化二砷或化疗治疗。然而, 复发/难治性 APL 患者的耐药性是临床治疗过程中的关键问题^[15]。因此, 寻找低毒性的新型药物有利于 APL 的治疗。

石蒜碱是一种从孤挺花科植物中提取的异喹啉生物碱, 除具有抗病毒、抗菌等作用外, 其在抗炎与抗肿瘤领域亦展现出显著的治疗潜力。诱导细胞凋亡是具有抗肿瘤活性的天然化合物的常见机制。石蒜碱通过触发肿瘤细胞凋亡与坏死、阻滞其细胞周期进程, 并削弱其侵袭与转移能力, 从而发挥多途径的抗肿瘤效应^[16]。研究表明, 石蒜碱可降低 AML 细胞活力, 促进细胞凋亡^[17]。LI 等^[18]研究证实, 盐酸石蒜碱可将细胞周期停滞在 S 期并诱导胃癌细胞凋亡。以上研究表明, 石蒜碱能够抑制癌细胞活性, 促进癌细胞凋亡, 本研究 APL 细胞通过低、中、高浓度的石蒜碱处理后, 细胞克隆形成

数、划痕愈合率、细胞侵袭数量下降,细胞凋亡率升高,且增殖、迁移、侵袭、凋亡相关蛋白 CDK1、MMP-2、MMP-9 表达量降低,Bax 表达量增加,上述结果提示石蒜碱能在 APL 中通过调控细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡而展现出抗肿瘤作用,与既往研究^[17-18]结果相同。本研究将 NK 细胞与 APL 细胞共培养后,细胞杀伤率升高,表明石蒜碱能够抑制 APL 细胞免疫逃逸。然而本研究仅通过检测细胞杀伤率,研究内容尚不充分,后续应在此研究基础上设计更加详细的实验内容,从而证明石蒜碱能够抑制 APL 细胞免疫逃逸。

细胞周期调控紊乱是肿瘤发生的重要原因,靶向细胞周期治疗被认为是消除癌细胞的有效方法^[19]。细胞周期的中断在白血病的发展中起着重要作用。 G_1/S 、 S/G_2 和 M 期细胞周期检查点失调可导致异常细胞增殖。细胞周期的主要调节是通过一系列细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶 (cell cycle related kinase, CDK) 实现^[20]。文献报道,石蒜碱通过多种机制有效阻止耐伊马替尼白血病细胞增殖,包括增强细胞凋亡和诱导细胞周期停滞^[21]。本研究通过不同浓度的石蒜碱处理 APL 细胞,结果显示,APL 细胞 S 期、 G_2/M 期细胞比例下降, G_0/G_1 期细胞比例上升,表明石蒜碱能够调控 APL 细胞周期,并且将 APL 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,从而诱导细胞凋亡。

PTEN 在防止 T 细胞恶性转化方面至关重要,其表达和功能在人 T-ALL 中发生改变。PTEN 是 PI3K/AKT/雷帕霉素机制靶标信号通路的主要负调节因子,在控制细胞增殖、生长、存活和新陈代谢中起着关键作用^[22]。文献报道,白藜芦醇 (resveratrol, Resv) 处理后能够上调 APL 细胞中 PTEN 的表达并降低 p-AKT 蛋白的表达,抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡发挥抗白血病作用^[23]。SHI 等^[24] 研究发现,抑制 LncRNA SNHG16 表达能够通过 PTEN/PI3K/AKT 轴抑制 AML 细胞增殖和迁移。本研究 APL 细胞经梯度浓度的石蒜碱处理后,p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 下调表达,PTEN 上调表达,表明石蒜碱能够上调 PTEN 表达抑制 PI3K/AKT 通路活性从而发挥抑癌作用。本研究用 PI3K 激活剂 740 Y-P 处理 APL 细胞后,石蒜碱对 APL 细胞和对 PI3K/AKT 通路活性的抑制作用发生了逆转,表明石蒜碱能够抑制 APL 细胞增殖、迁移、侵袭,诱导细胞周期停滞,促进细胞凋亡,可能与 PTEN/PI3K/AKT 通路有关。然而 PI3K 激活剂 740 Y-P 未能完全逆转石蒜碱对

APL 细胞的抗癌作用,推测石蒜碱可能还存在其他作用靶点,或可能还存在其他通路的作用,如最新研究显示,石蒜碱通过靶向三方基序 22 (tripartite preface 22, TRIM22),调节 JAK2/STAT3 通路,能有效抑制食管鳞状细胞癌^[25]。

综上,石蒜碱抑制 APL 细胞并伴随 PTEN 表达上调和 PI3K/AKT 通路抑制,且其效应依赖于 PI3K/AKT 通路。本研究初步证明了石蒜碱在体外对 APL 发展的影响以及可能的作用机制,为石蒜碱用于 APL 的治疗提供了理论支持,然而,仅使用单一激活剂处理是本研究的不足之处,后续实验应设置 PTEN 敲低实验,从而对本研究结果进行验证和完善,并且石蒜碱是否通过其他途径有待进一步验证。

参考文献:

- [1] FU Y, LI L, HOU J, et al. miR-139-5p regulates the proliferation of acute promyelocytic leukemia cells by targeting MNT [J]. *J Oncol*, 2021, 2021(1): 5522051—5522060.
- [2] TANG D, LUO Y, JIANG Y, et al. LncRNA KCNQ1OT1 activated by c-Myc promotes cell proliferation via interacting with FUS to stabilize MAP3K1 in acute promyelocytic leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 795—805.
- [3] LV F, LI X, WANG Y. Lycorine inhibits angiogenesis by docking to PDGFR α [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 873—886.
- [4] LIU Y, DU Z, LI T, et al. Lycorine eliminates B-cell acute lymphoblastic leukemia cells by targeting PSAT1 through the serine/glycine metabolic pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 961(1): 176162—176177.
- [5] LI L, FENG Y, HU S, et al. ZEB1 serves as an oncogene in acute myeloid leukaemia via regulating the PTEN/PI3K/AKT signalling pathway by combining with P53 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(11): 5295—5304.
- [6] FENG Y, HUA X, NIU R, et al. ROS play an important role in ATPR inducing differentiation and inhibiting proliferation of leukemia cells by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 26—39.
- [7] LU N, WANG X, WANG W, et al. TET1-mediated microRNA-188-5p promoter hydroxymethylation regulates PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in acute myeloid leukemia cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 736(1): 109523—109535.
- [8] 张孟孟, 伍燕平, 张平平, 等. 甲基转移酶样蛋白 14 对急性早幼粒白血病细胞增殖, 凋亡, 侵袭和迁移的调节作用 [J]. *山东医药*, 2024, 64(2): 27—30.
- [9] 王湘宁, 张金华, 江娜, 等. 异莲心碱通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡和自噬 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(7): 694—699.
- [10] 李彦卿, 许晓炜, 刘江, 等. LncRNA NORAD 调控 miR-136-5p/CBX4 轴对急性髓系白血病细胞迁移和侵袭的影响 [J]. *河*

- 北医学,2025,1(5):723—730.
- [11] 杨菲菲,唐浩,孙慧,等. LncRNA GABPB1-AS1 调控急性髓系白血病细胞增殖侵袭迁移及凋亡的作用和机制[J]. 中国肿瘤临床,2024,51(8):392—400.
- [12] 齐姗姗,武纪生,霍志刚,等. miR-203a-5p 靶向 FABP4 对慢性髓系白血病 K562 细胞增殖,凋亡与细胞周期的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2025,47(4):812—821.
- [13] 罗靖,罗政权,谷晓辉,等. 白血病细胞分泌 miR-17-5p 抑制 NK 细胞杀伤敏感性并促进白血病细胞免疫逃逸[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2024,33(6):540—546.
- [14] 何婉婷,陈佳琦,任雨悦,等. 急性早幼粒细胞白血病细胞形态分类体系及其与实验室检查和 FLT3-ITD 突变的相关性分析[J]. 中国实验血液学杂志,2024,32(5):1334—1342.
- [15] WU J, YOU Y Q, MA Y X, *et al.* DDX5-targeting fully human monoclonal autoantibody inhibits proliferation and promotes differentiation of acute promyelocytic leukemia cells by increasing ROS production [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7):552—566.
- [16] SUN Y, GU Y, GAO X, *et al.* Lycorine suppresses the malignancy of breast carcinoma by modulating epithelial mesenchymal transition and β -catenin signaling [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 195(1):106866—106879.
- [17] LIANG X, FU W, PENG Y, *et al.* Lycorine induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells and inhibits triglyceride production *via* binding and targeting FABP5 [J]. *Ann Hematol*, 2023, 102(5):1073—1086.
- [18] LI C, DENG C, PAN G, *et al.* Lycorine hydrochloride inhibits cell proliferation and induces apoptosis through promoting FBXW7-MCL1 axis in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):230—246.
- [19] QIN X, CHEN X, GUO L, *et al.* Hinokiflavone induces apoptosis, cell cycle arrest and autophagy in chronic myeloid leukemia cells through MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1):100—112.
- [20] XIE B, ZHAO L, ZHANG Z, *et al.* CADM1 impairs the effect of miR-1246 on promoting cell cycle progression in chemo-resistant leukemia cells [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1):955—966.
- [21] BAI J, FENG Z, CHEN Y, *et al.* Lycorine attenuated proliferation and induced apoptosis on imatinib-resistant K562 cell by inhibiting autophagy [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1):217—232.
- [22] HLOZKOVA K, HERMANOVA I, SAFRHANSOVA L, *et al.* PTEN/PI3K/Akt pathway alters sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia to L-asparaginase [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1):4043—4053.
- [23] MENG J, LIU G J, SONG J Y, *et al.* Preliminary results indicate resveratrol affects proliferation and apoptosis of leukemia cells by regulating PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10):4285—4292.
- [24] SHI M, YANG R, LIN J, *et al.* LncRNA-SNHG16 promotes proliferation and migration of acute myeloid leukemia cells *via* PTEN/PI3K/AKT axis through suppressing CELF2 protein [J]. *J Biosci*, 2021, 46(1):4—17.
- [25] LIU J, QIU L, CHEN J, *et al.* Lycorine hydrochloride suppresses the proliferation and invasion of esophageal cancer by targeting TRIM22 and inhibiting the JAK2/STAT3 and Erk pathways [J]. *Cancers (Basel)*, 2025, 17(5):718—742.

(收稿日期 2025-08-06)

作者更正

刊登于《中国临床药理学杂志》2025 年 10 月第 19 期 2827 页至 2832 页的稿件《MRI 特征预测老年中风后认知障碍的临床研究》作者更正内容如下:2827 页内容“基金项目:国家自然科学基金面上基金资助项目(62171209)”修改为“青岛市 2023 年度医药卫生科研指导项目(2023-WJZD196)”,特此更正。