

# 秦皮乙素调控AKT/SKP2/MTH1通路诱导急性髓系白血病HL-60细胞凋亡的作用研究<sup>△</sup>

宋卫华<sup>1\*</sup>,褚福营<sup>1</sup>,谢玮<sup>1</sup>,陈金亮<sup>2</sup>,赵枰<sup>1</sup>,仇宏<sup>3</sup>,陶健<sup>4</sup>,陈相<sup>1#</sup>(1.东南大学附属南通市第一人民医院检验科,江苏南通 226001;2.东南大学附属南通市第一人民医院呼吸科,江苏南通 226001;3.东南大学附属南通市第一人民医院药剂科,江苏南通 226001;4.东南大学附属南通市第一人民医院血液科,江苏南通 226001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)01-0036-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.01.07



**摘要** 目的 探讨秦皮乙素(Esc)通过调控蛋白激酶B(AKT)/S期激酶相关蛋白2(SKP2)/MutT同源酶1(MTH1)通路诱导急性髓系白血病(AML)HL-60细胞凋亡的作用。方法 将HL-60细胞分为Control组(常规培养)、Esc低浓度组(L-Esc组,25 μmol/L Esc)、Esc中浓度组(M-Esc组,50 μmol/L Esc)、Esc高浓度组(H-Esc组,100 μmol/L Esc)、Esc高浓度+SC79(AKT激动剂)组(100 μmol/L Esc+5 μmol/L SC79)。采用MTT法和克隆形成实验检测细胞增殖能力;采用CM-H<sub>2</sub>DCFDA荧光探针法检测细胞中活性氧(ROS)水平;采用流式细胞术检测细胞凋亡情况;采用Western blot法检测细胞中凋亡相关蛋白[B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、裂解的胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)]和AKT/SKP2/MTH1通路相关蛋白[磷酸化AKT(p-AKT)、AKT、SKP2、MTH1]及AKT上下游效应蛋白磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)和周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(P21)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(P27)的表达。结果 与Control组相比,L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞的存活率、集落数以及AKT、PI3K蛋白的磷酸化水平和SKP2、MTH1、Bcl-2蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),而ROS水平、细胞凋亡率和Bax、cleaved caspase-3、P21、P27蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ ),且Esc的作用具有浓度依赖性( $P<0.05$ );与H-Esc组相比,Esc高浓度+SC79组细胞上述指标均被显著逆转( $P<0.05$ )。结论 Esc可能通过抑制AKT/SKP2/MTH1通路,促进HL-60细胞中ROS的大量产生及细胞凋亡程序的启动,最终有效抑制HL-60细胞增殖。

**关键词** 秦皮乙素;急性髓系白血病;HL-60细胞;蛋白激酶B;细胞凋亡;AKT/SKP2/MTH1通路

## Study on the apoptosis-inducing effect of esculetin on acute myeloid leukemia HL-60 cells via regulating the AKT/SKP2/MTH1 pathway

SONG Weihua<sup>1</sup>, CHU Fuying<sup>1</sup>, XIE Wei<sup>1</sup>, CHEN Jinliang<sup>2</sup>, ZHAO Ping<sup>1</sup>, QIU Hong<sup>3</sup>, TAO Jian<sup>4</sup>, CHEN Xiang<sup>1</sup>(1. Dept. of Laboratory, Nantong First People's Hospital, Southeast University, Jiangsu Nantong 226001, China; 2. Dept. of Respiratory, Nantong First People's Hospital, Southeast University, Jiangsu Nantong 226001, China; 3. Dept. of Pharmacy, Nantong First People's Hospital, Southeast University, Jiangsu Nantong 226001, China; 4. Dept. of Hematology, Nantong First People's Hospital, Southeast University, Jiangsu Nantong 226001, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To investigate the apoptosis-inducing effect of esculetin (Esc) on acute myeloid leukemia (AML) HL-60 cells by regulating the protein kinase B (AKT)/S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)/MutT homolog 1 (MTH1) pathway. **METHODS** AML HL-60 cells were randomly divided into control group (routine culture), Esc low-concentration group (L-Esc group, 25 μmol/L Esc), Esc medium-concentration group (M-Esc group, 50 μmol/L Esc), Esc high-concentration group (H-Esc group, 100 μmol/L Esc), and high-concentration of Esc+ SC79 (AKT agonist) group (100 μmol/L Esc+5 μmol/L SC79). Cell proliferation in each group was detected by MTT assay and colony formation assay. The level of reactive oxygen species (ROS) in cells was measured by using the CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent probe. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Western blot assay was performed to detect the expression levels of apoptosis-related proteins [B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved caspase-3], AKT/SKP2/MTH1 pathway-related

△基金项目 江苏省基础研究计划(自然科学基金)面上项目(No.BK20191207);南通市科技项目(No.MS22021001)

\*第一作者 副主任技师。研究方向:肿瘤免疫。E-mail:myaday@163.com

#通信作者 主任医师,博士。研究方向:肿瘤免疫。E-mail:ntchenx0520@163.com

proteins (p-AKT, AKT, SKP2, MTH1), along with the upstream and downstream proteins of AKT phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (P21) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27). **RESULTS** Compared with control group, the cell viability, colony number, and the phosphorylation levels of AKT and PI3K proteins as well as protein expressions of SKP2, MTH1 and Bcl-2 were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while ROS level, apoptosis rate, and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, P21 and P27 proteins were significantly increased ( $P<0.05$ ). Moreover, the effects of Esc exhibited concentration-dependence ( $P<0.05$ ). Compared with H-Esc group, above indexes of high-concentration of Esc+SC79 group were reversed significantly ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Esc may promote massive ROS production and induce activation of apoptosis in HL-60 cells by inhibiting the AKT/SKP2/MTH1 pathway, thus inhibiting the proliferation of HL-60 cells.

**KEYWORDS** esculetin; acute myeloid leukemia; HL-60 cells; protein kinase B; cell apoptosis; AKT/SKP2/MTH1 pathway

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种髓系前体细胞的遗传改变,导致肿瘤克隆性髓系干细胞过度生成而引起的造血干细胞疾病,其特征是恶性骨髓干细胞无节制增殖并伴有感染、贫血和出血;患者初发时表现多样,部分患者通过常规血液检查发现,另有部分患者则因感染、出血或弥散性血管内凝血等并发症就诊发现<sup>[1]</sup>。近年来,随着AML检测技术的进步以及个体化疗法的发展,AML患者的诊断和预后得以明显改善,但其临床有效治疗仍面临挑战,且部分患者经规范化治疗后预后仍不理想<sup>[2]</sup>。因此,亟须探索AML发病机制,找寻可靠靶点并确定更加有效的治疗策略。

蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)参与细胞周期进程和凋亡,通过转录、翻译和翻译后修饰对S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, SKP2)起正向调节作用;而SKP2是F-Box蛋白的成员之一,可促进多种恶性肿瘤的发生发展<sup>[3]</sup>。据报道,在多种类型的恶性肿瘤中均观察到SKP2过表达和AKT活性升高,且活化的AKT可诱导SKP2进入细胞质<sup>[4]</sup>。此外,MutT同源酶1(MutT homolog 1, MTH1)可通过清除氧化性嘌呤核苷酸,保护癌细胞免受高水平活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导的DNA损伤;抑制MTH1活性可促进氧化损伤,进而抑制肿瘤生长<sup>[5]</sup>。

秦皮乙素(esculigin, Esc)是一种二羟基香豆素衍生物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[6]</sup>。近年来研究发现,Esc可通过瓦解肿瘤细胞氧化防御,在AML细胞中发挥显著的抗增殖作用;同时,其可通过介导Wnt信号通路的“轴移”效应,有效解除AML细胞的阻滞状态,并激活白血病祖细胞向中性粒细胞分化的潜力<sup>[7]</sup>。然而,Esc在AML细胞凋亡中的具体作用途径尚不完全清楚。既往研究报道,一种美罗替类真菌次级代谢物——Neosetophomone B可通过使AKT失活,下调致癌基因SKP2和MTH1表达,最终降低肿瘤细胞活力<sup>[8]</sup>。然而,Esc是否可通过调控AKT/SKP2/MTH1通路,瓦解肿瘤细胞氧化防御,进而诱导肿瘤细胞凋亡,减

缓AML进展,尚需进一步探索。基于此,本研究拟探讨Esc通过调控AKT/SKP2/MTH1通路诱导AML HL-60细胞凋亡的作用,以期为临床治疗AML提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Spectra Max M5型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、BX63型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、GelDoc Go型凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司)、NovoCyte Advanteon型流式细胞仪(美国 Agilent 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:Esc对照品、AKT激动剂SC79对照品(美国 MedChemExpress 公司,批号分别为305-01-1、305834-79-1,纯度分别为99.79%、98.0%),IMDM培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为12200036、10099141),100×青霉素-链霉素双抗(厦门泰京生物技术有限公司,批号ABK0005C),4%多聚甲醛、结晶紫、MTT试剂盒、ROS检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0099、C0121、C0009M、S0035S),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,批号40302ES60],SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、ECL化学发光试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为P1200、PE0010),RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为CW2333S、CW0014S),兔源磷酸化AKT(p-AKT)、AKT、SKP2、MTH1、B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、裂解的胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(cyclin-dependent kinase inhibitor 1, P21)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, P27)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为4060、9272、2652、43918、3498、2772、9661、4249、17366、

2947、3686),兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Affinity公司,批号分别为AF7021、S0001)。

### 1.3 细胞

本研究所用的人急性早幼粒细胞白血病细胞HL-60购自中国科学院上海生命科学研究院。

## 2 方法

### 2.1 Esc浓度筛选

采用含20%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的IMDM完全培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养环境下培养HL-60细胞,每48~72 h更换一次新鲜培养基。待细胞传代培养至第3代后,选取处于对数生长期的细胞用于后续实验研究。使用含终浓度为0(对照)、12、25、50、100、200 μmol/L(对应复孔数为6)的Esc培养液处理HL-60细胞24 h<sup>[7]</sup>。采用MTT试剂盒检测不同浓度Esc对HL-60细胞存活率的影响,具体操作为:每孔中加入10 μL MTT溶液,孵育4 h,再加入150 μL二甲基亚砜终止反应;采用酶标仪在490 nm波长下检测各孔吸光度(OD<sub>490</sub>),根据测量结果计算细胞存活率(细胞存活率=实验组OD<sub>490</sub>值/对照组OD<sub>490</sub>值×100%),并采用非线性回归法计算药物对细胞增殖的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。实验重复3次。

### 2.2 细胞分组

将HL-60细胞分为对照组(Control组)、Esc低浓度组(L-Esc组)、Esc中浓度组(M-Esc组)、Esc高浓度组(H-Esc组)、Esc高浓度+SC79组。其中,Control组细胞常规培养24 h,L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞分别使用含25、50、100 μmol/L Esc的培养液处理24 h,Esc高浓度+SC79组细胞使用含100 μmol/L Esc及5 μmol/L SC79的培养液处理24 h<sup>[9]</sup>。

### 2.3 细胞增殖能力检测

(1)MTT实验:将生长状态良好的HL-60细胞按1×10<sup>5</sup>个/孔接种在96孔板中,按“2.2”项下方法分组(每组设置6个复孔)、处理,按“2.1”项下MTT法检测细胞存活率。实验重复3次。

(2)克隆形成实验:将生长状态良好的HL-60细胞按1×10<sup>3</sup>个/孔接种在6孔板中,按“2.2”项下方法分组(每组设置6个复孔)、处理。在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养至肉眼可见的细胞集落后(显微镜下观察可见大的细胞团块,单个细胞集落中细胞数>50个),停止培养。以4%多聚甲醛固定细胞后进行结晶紫染色、拍照,统计细胞的集落数。实验重复3次。

### 2.4 细胞中ROS水平检测

采用CM-H<sub>2</sub>DCFDA荧光探针法检测。将HL-60细胞按2×10<sup>6</sup>个/孔接种在6孔板中,按“2.2”项下方法分组(每组设置6个复孔)、处理。培养结束后,根据ROS检测试剂盒说明书,以体积比1:1 000的比例将无血清IMDM培养基与CM-H<sub>2</sub>DCFDA探针均匀混合;去除每孔中培养基,加入稀释的CM-H<sub>2</sub>DCFDA探针,孵育30 min;用无血清IMDM培养基充分洗去未进入细胞内的CM-H<sub>2</sub>DCFDA探针后,使用荧光显微镜观察,阳性细胞呈绿色荧光。通过Image J软件对荧光图像进行定量分析,获取各组细胞的荧光强度值,并计算相对荧光强度(相对荧光强度=实验组荧光强度值/Control组荧光强度值×100%)。实验重复3次。

### 2.5 细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。将HL-60细胞按2×10<sup>6</sup>个/孔接种在6孔板中,按“2.2”项下方法分组(每组设置6个复孔)、处理。培养结束后,按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行检测,然后使用流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行分析。实验重复3次。

### 2.6 细胞中AKT/SKP2/MTH1通路和AKT上下游效应蛋白表达检测

采用Western blot法检测。将HL-60细胞按2×10<sup>6</sup>个/孔接种在6孔板中,按“2.2”项下方法分组、处理。培养结束后,收集细胞,经RIPA裂解液充分裂解后,离心收集上清,获得总蛋白提取物。采用BCA法测定总蛋白浓度,并于蛋白变性后,进行SDS-PAGE电泳、转膜、封闭;结束后,在4℃摇床上将膜与一抗Bcl-2(稀释比例为1:2 000)、Bax(稀释比例为1:1 000)、cleaved caspase-3(稀释比例为1:100)、p-AKT(稀释比例为1:1 000)、AKT(稀释比例为1:1 000)、SKP2(稀释比例为1:1 000)、MTH1(稀释比例为1:1 000)、p-PI3K(稀释比例为1:1 000)、PI3K(稀释比例为1:1 000)、P21(稀释比例为1:1 000)、P27(稀释比例为1:1 000)、GAPDH(稀释比例为1:8 000)孵育过夜,再在37℃下将膜与二抗(稀释比例为1:5 000)孵育1 h;在凝胶成像系统中曝光ECL发光液孵育后的蛋白条带,并拍照。采用Image J软件统计蛋白条带灰度值,以目标蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平,以磷酸化蛋白与总蛋白条带灰度值的比值表示相应蛋白的磷酸化水平。实验重复3次。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方

差分析,进一步的组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 Esc浓度筛选结果

浓度筛选结果显示,随着Esc浓度增加,HL-60细胞存活率逐渐降低。Esc对HL-60细胞增殖的 $IC_{50}$ 为100.87  $\mu\text{mol/L}$ 。因此,本研究选取25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ 为后续实验中L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组的干预浓度。

#### 3.2 Esc对HL-60细胞增殖能力的影响

L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞的存活率、集落数均显著低于/少于Control组( $P<0.05$ ),且Esc的作用具有浓度依赖性( $P<0.05$ );Esc高浓度+SC79组细胞的存活率、集落数显著高于/多于H-Esc组( $P<0.05$ )。结果见表1。

表1 各组细胞的存活率和集落数比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 组别           | 存活率/%                     | 集落数/个                     |
|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Control组     | 100±0.00                  | 146.46±10.98              |
| L-Esc组       | 79.85±8.01 <sup>a</sup>   | 115.31±8.67 <sup>a</sup>  |
| M-Esc组       | 66.44±6.64 <sup>ab</sup>  | 99.65±9.03 <sup>ab</sup>  |
| H-Esc组       | 50.23±5.03 <sup>bcd</sup> | 70.72±7.07 <sup>bcd</sup> |
| Esc高浓度+SC79组 | 88.96±8.90 <sup>d</sup>   | 128.08±9.81 <sup>d</sup>  |

a:与Control组比较, $P<0.05$ ;b:与L-Esc组比较, $P<0.05$ ;c:与M-Esc组比较, $P<0.05$ ;d:与H-Esc组比较, $P<0.05$ 。

#### 3.3 Esc对HL-60细胞中ROS水平的影响

Control组、L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组、Esc高浓度+SC79组细胞中ROS的相对荧光强度分别为12.58±2.34、17.34±1.76、22.29±2.33、30.01±3.23、15.64±2.11。其中,L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞中ROS的相对荧光强度均显著高于Control组( $P<0.05$ ),且Esc的作用具有浓度依赖性( $P<0.05$ );Esc高浓度+SC79组细胞中ROS的相对荧光强度显著低于H-Esc组( $P<0.05$ )。结果见图1。

#### 3.4 Esc对HL-60细胞凋亡的影响

L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞的凋亡率和细胞中Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平均显著高于Control组( $P<0.05$ ),细胞中Bcl-2蛋白表达水平均显著低于Control组( $P<0.05$ ),且Esc的作用具有浓度依赖性( $P<0.05$ );Esc高浓度+SC79组细胞的凋亡率和细胞中Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平均显著低于H-Esc组( $P<0.05$ ),细胞中Bcl-2蛋白表达水平均显著高于H-Esc组( $P<0.05$ )。结果见图2、图3、表2。

#### 3.5 Esc对HL-60细胞中AKT/SKP2/MTH1通路相关蛋白表达的影响

L-Esc组、M-Esc组、H-Esc组细胞中AKT蛋白的磷酸化水平和SKP2、MTH1蛋白表达水平均显著低于Control组( $P<0.05$ ),且Esc的作用具有浓度依赖性

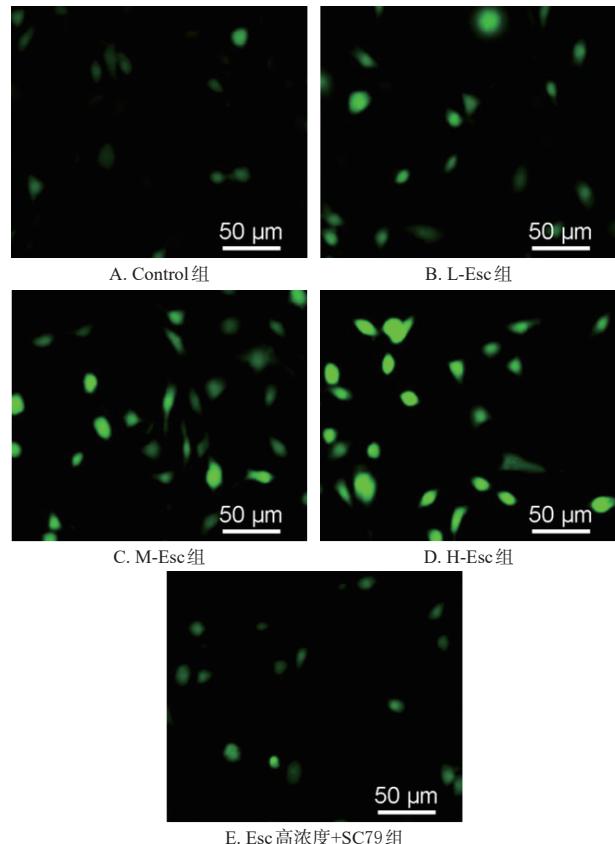


图1 各组细胞中ROS水平检测的荧光探针图

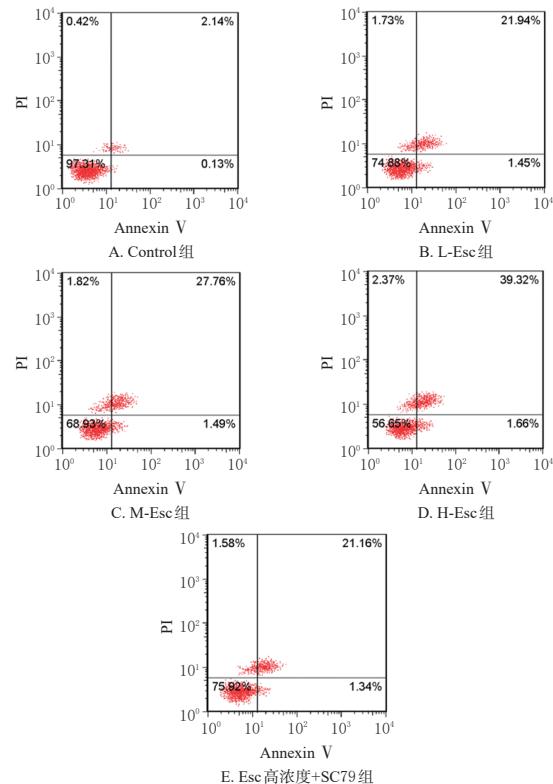
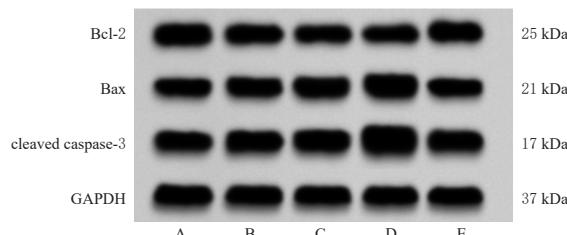


图2 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

( $P<0.05$ );Esc高浓度+SC79组细胞中AKT蛋白的磷酸化水平和SKP2、MTH1蛋白表达水平均显著高于H-Esc组( $P<0.05$ )。结果见图4、表3。



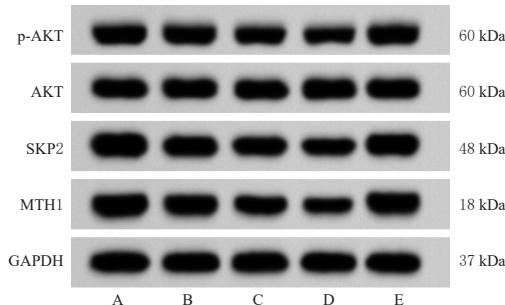
A: Control组; B: L-Esc 组; C: M-Esc 组; D: H-Esc 组; E: Esc 高浓度+SC79 组。

图3 各组细胞中 cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白的电泳图

表2 各组细胞的凋亡率及细胞中凋亡相关蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别             | 凋亡率/%                     | Bcl-2/GAPDH              | Bax/GAPDH                | cleaved caspase-3/GAPDH  |
|----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control组       | 2.51±0.25                 | 1.29±0.13                | 0.70±0.07                | 0.83±0.08                |
| L-Esc 组        | 24.38±2.54 <sup>a</sup>   | 1.02±0.11 <sup>a</sup>   | 0.93±0.09 <sup>a</sup>   | 1.06±0.11 <sup>a</sup>   |
| M-Esc 组        | 30.29±3.03 <sup>ab</sup>  | 0.84±0.08 <sup>ab</sup>  | 1.11±0.11 <sup>ab</sup>  | 1.24±0.12 <sup>ab</sup>  |
| H-Esc 组        | 42.62±4.26 <sup>bcd</sup> | 0.61±0.06 <sup>bcd</sup> | 1.44±0.14 <sup>bcd</sup> | 1.67±0.17 <sup>bcd</sup> |
| Esc 高浓度+SC79 组 | 23.74±2.37 <sup>d</sup>   | 1.10±0.12 <sup>d</sup>   | 0.88±0.09 <sup>d</sup>   | 1.01±0.11 <sup>d</sup>   |

a:与Control组比较,  $P<0.05$ ; b:与L-Esc组比较,  $P<0.05$ ; c:与M-Esc组比较,  $P<0.05$ ; d:与H-Esc组比较,  $P<0.05$ 。



A: Control组; B: L-Esc 组; C: M-Esc 组; D: H-Esc 组; E: Esc 高浓度+SC79 组。

图4 各组细胞中 AKT/SKP2/MTH1 通路相关蛋白的电泳图

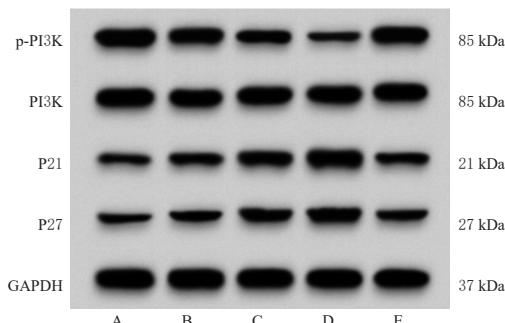
表3 各组细胞中 AKT/SKP2/MTH1 通路和 AKT 上下游效应蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别             | p-AKT/AKT                | SKP2/GAPDH               | MTH1/GAPDH               | p-PI3K/PI3K              | P21/GAPDH                | P27/GAPDH                |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control组       | 1.04±0.10                | 1.53±0.15                | 1.27±0.12                | 0.98±0.12                | 0.32±0.04                | 0.27±0.03                |
| L-Esc 组        | 0.85±0.09 <sup>a</sup>   | 1.21±0.12 <sup>a</sup>   | 1.05±0.11 <sup>a</sup>   | 0.76±0.08 <sup>a</sup>   | 0.48±0.05 <sup>a</sup>   | 0.39±0.05 <sup>a</sup>   |
| M-Esc 组        | 0.63±0.06 <sup>ab</sup>  | 0.99±0.10 <sup>ab</sup>  | 0.86±0.09 <sup>ab</sup>  | 0.57±0.07 <sup>ab</sup>  | 0.69±0.08 <sup>ab</sup>  | 0.57±0.06 <sup>ab</sup>  |
| H-Esc 组        | 0.46±0.05 <sup>bcd</sup> | 0.74±0.07 <sup>bcd</sup> | 0.59±0.06 <sup>bcd</sup> | 0.38±0.04 <sup>bcd</sup> | 0.86±0.09 <sup>bcd</sup> | 0.73±0.09 <sup>bcd</sup> |
| Esc 高浓度+SC79 组 | 0.97±0.10 <sup>d</sup>   | 1.32±0.13 <sup>d</sup>   | 1.13±0.11 <sup>d</sup>   | 0.85±0.09 <sup>d</sup>   | 0.39±0.05 <sup>d</sup>   | 0.32±0.04 <sup>d</sup>   |

a:与Control组比较,  $P<0.05$ ; b:与L-Esc组比较,  $P<0.05$ ; c:与M-Esc组比较,  $P<0.05$ ; d:与H-Esc组比较,  $P<0.05$ 。

### 3.6 Esc 对 HL-60 细胞中 AKT 上下游效应蛋白表达的影响

L-Esc 组、M-Esc 组、H-Esc 组细胞中 PI3K 蛋白的磷酸化水平平均显著低于 Control 组 ( $P<0.05$ ), P21、P27 蛋白表达水平平均显著高于 Control 组 ( $P<0.05$ ), 且 Esc 的作用具有浓度依赖性 ( $P<0.05$ ); Esc 高浓度+SC79 组细胞中 PI3K 蛋白的磷酸化水平显著高于 H-Esc 组 ( $P<0.05$ ), P21、P27 蛋白表达水平平均显著低于 H-Esc 组 ( $P<0.05$ )。结果见表3、图5。



A: Control组; B: L-Esc 组; C: M-Esc 组; D: H-Esc 组; E: Esc 高浓度+SC79 组。

图5 各组细胞中 AKT 上下游效应蛋白的电泳图

### 4 讨论

Esc 又称七叶内酯, 主要富集于桔梗、马蹄莲等多种植物中, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[6]</sup>。既往研究报道, 其可通过阻断 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期, 也能通过抑制 Janus 激酶 2/信号转导及转录活化因子 3 通路, 降低卵巢癌细胞活力及迁移和侵袭能力<sup>[10]</sup>。此外, 罗祥力等<sup>[11]</sup>的研究证实, Esc 可通过下调 *FLVCR1-AS1* 基因表达, 抑制宫颈癌 SiHa 细胞恶性生物学行为。马鑫<sup>[12]</sup>的研究证实, Esc 可通过下调细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6、原癌基因 MYC 编码的蛋白质表达, 显著抑制肾透明细胞癌细胞增殖。以上研究结果表明, Esc 具有多通路调控特性, 在抗肿瘤方面具有潜在价值。

ROS 作为肿瘤微环境中的关键调控因子, 可通过影响基因突变、癌基因表达等途径参与 AML 的发生发展及化疗耐药过程。如 Zhu 等<sup>[13]</sup>的研究证实, 泛素特异性肽酶 11 可通过调控信号转导及转录活化因子 3/ROS 信号轴, 增强 AML 细胞的化疗耐药性。Germon 等<sup>[14]</sup>的研究进一步证实, 阻断 ROS 生成不仅可以抑制 AML 致癌信号转导, 还可以增强 NADPH 氧化酶 2 和 FMS 样酪氨酸激酶 3 抑制剂联合使用对 *FLT3* 突变型 AML 的治疗效果。本研究结果显示, Esc 可通过促进 HL-60 细胞中 ROS 的产生及细胞凋亡, 有效抑制细胞增殖, 这与 Mathur 等<sup>[7]</sup>的研究结论一致。然而, 尽管目前的研究已经揭示了 Esc 的抗肿瘤作用, 但其在分子层面的具体作用机制尚待更深入、系统地探索和研究。

研究显示, AKT/SKP2/MTH1 通路可通过调控细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、血管生成等过程参与肿瘤的发生发展, 并与肿瘤化疗耐药等相关<sup>[15-16]</sup>, 这提示有效调控该通路可能有助于改善 AML 治疗结局。Kuttikrishnan 等<sup>[17]</sup>的研究证明, 诱导 AKT 磷酸化和 SKP2 表达下调, 能够抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡。在急性淋巴细胞白血病中, SKP2 的表达与 MTH1 呈正相关; 下调 SKP2 和 MTH1 的表达, 可促进氧化应激诱导的 DNA 损伤和凋亡, 抑制肿瘤细胞生长<sup>[18]</sup>。本研究结果显示

示,经Esc处理后,HL-60细胞中AKT蛋白的磷酸化水平和SKP2、MTH1蛋白表达水平降低,AKT上游效应信号蛋白——p-PI3K表达水平降低,AKT下游效应信号蛋白——P21、P27表达水平均升高,表明Esc可通过抑制AKT/SKP2/MTH1通路来抑制AML细胞的恶性生物学行为。同时,本研究在高浓度Esc基础上联合AKT激动剂SC79进一步研究发现,HL-60细胞中以上蛋白的表达趋势均发生了逆转,且Esc抑制HL-60细胞增殖等的生物学活性均受到不同程度的负面影响,这与Sanjiv等<sup>[19]</sup>的研究具有相似性。

综上所述,Esc可能是通过抑制AKT/SKP2/MTH1通路,促进HL-60细胞中ROS的大量产生及细胞凋亡程序的启动,最终抑制HL-60细胞增殖。然而,本研究未联合其他细胞株或原代细胞进行验证,也未开展动物实验探讨其体内疗效,后续还需进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] SHIMONY S, STAHL M, STONE R M. Acute myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2025, 100 (5) : 860-891.
- [2] SHORT N J, KONOPLEVA M, KADIA T M, et al. Advances in the treatment of acute myeloid leukemia: new drugs and new challenges[J]. Cancer Discov, 2020, 10 (4):506-525.
- [3] BROWN L K, KANAGASABAI T, LI G L, et al. Co-targeting SKP2 and KDM5B inhibits prostate cancer progression by abrogating AKT signaling with induction of senescence and apoptosis[J]. Prostate, 2024, 84 (9) : 877-887.
- [4] SHAO Y, REN W L, DAI H, et al. SKP2 contributes to AKT activation by ubiquitination degradation of PHLPP1, impedes autophagy, and facilitates the survival of thyroid carcinoma[J]. Mol Cells, 2023, 46(6):360-373.
- [5] LI C S, XUE Y Y, WU J X, et al. MTH1 inhibition synergizes with ROS-inducing agents to trigger cervical cancer cells undergoing parthanatos[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2024, 1870(5):167190.
- [6] REZOAN HOSSAIN M, ZAHRA SHOVA F T, AKTER M, et al. Esculetin unveiled: decoding its anti-tumor potential through molecular mechanisms: a comprehensive review[J]. Cancer Rep (Hoboken), 2024, 7(1):e1948.
- [7] MATHUR A, GANGWAR A, SALUJA D. Esculetin releases maturation arrest and induces terminal differentiation in leukemic blast cells by altering the Wnt signaling axes[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1):387.
- [8] KUTTIKRISHNAN S, BHAT A A, MATEO J M, et al. Anticancer activity of Neosetophomone B by targeting AKT/SKP2/MTH1 axis in leukemic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 601:59-64.
- [9] REN C, PAN R S, HOU L S, et al. Suppression of CLEC3A inhibits osteosarcoma cell proliferation and promotes their chemosensitivity through the AKT1/mTOR/HIF1 $\alpha$  signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(4) : 1739-1748.
- [10] YIN W, FU X, CHANG W W, et al. Antiovary cancer mechanism of esculetin: inducing G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and apoptosis via JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(1):87-97.
- [11] 罗祥力,蔡苋夷,唐文.秦皮乙素对宫颈癌SiHa细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制[J].广西医学,2021,43 (20):2430-2435.
- [12] 马鑫.秦皮乙素对肾透明细胞癌增殖、周期和凋亡的影响[J].临床泌尿外科杂志,2020,1(11):44-48.
- [13] ZHU P, LI H, GE J, et al. Mechanism of USP11 regulated SIRT3/ROS in drug resistance of acute myeloid leukemia [J]. Clin Exp Med, 2025, 25(1):267.
- [14] GERMON Z P, SILLAR J R, MANNAN A, et al. Blockade of ROS production inhibits oncogenic signaling in acute myeloid leukemia and amplifies response to precision therapies[J]. Sci Signal, 2023, 16(778):eabp9586.
- [15] ZHOU H L, ZHOU L, GUAN Q, et al. SKP2-mediated MLKL degradation confers cisplatin-resistant in non-small cell lung cancer cells[J]. Commun Biol, 2023, 6 (1):805.
- [16] ZHANG H P, JIANG R Y, ZHU J Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: an important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer, 2024, 31(4):539-551.
- [17] KUTTIKRISHNAN S, AHMAD F, MATEO J M, et al. Neosetophomone B induces apoptosis in multiple myeloma cells via targeting of AKT/SKP2 signaling pathway[J]. Cell Biol Int, 2024, 48(2):190-200.
- [18] KUTTIKRISHNAN S, PRABHU K S, KHAN A Q, et al. Thiostrepton inhibits growth and induces apoptosis by targeting FoxM1/SKP2/MTH1 axis in B-precursor acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Leuk Lymphoma, 2021, 62(13):3170-3180.
- [19] SANJIV K, CALDERÓN-MONTAÑO J M, PHAM T M, et al. MTH1 inhibitor TH1579 induces oxidative DNA damage and mitotic arrest in acute myeloid leukemia[J]. Cancer Res, 2021, 81(22):5733-5744.

(收稿日期:2025-09-17 修回日期:2025-12-17)

(编辑:林 静)