

# 水苏碱调节 FOXO3-FOX M1 信号轴对急性髓系白血病细胞增殖、凋亡和放疗敏感性的实验研究

熊涛<sup>1</sup>, 许旋旋<sup>1</sup>, 刘荟敏<sup>1</sup>, 张江召<sup>1</sup>, 王远丽<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup> (1.荆州市中心医院血液内科, 湖北荆州 434000; 2.湖北中医药大学高等专科学校医疗系, 湖北荆州 434000)

**摘要:**目的 探究水苏碱(STA)调节转录因子叉头框蛋白O3(FOXO3)-叉头框蛋白M1(FOX M1)信号轴对急性髓系白血病(AML)细胞增殖、凋亡和放疗敏感性的实验研究。方法 用浓度为50~1 600  $\mu$ mol/L的STA处理人AML细胞(HL-60),用CCK-8法检测HL-60细胞活性,筛选最佳药物浓度;将HL-60细胞分为对照组(Control组)、水苏碱低、中、高浓度组(STA-L组, STA-M组, STA-H组)、水苏碱+慢病毒转染对照组(STA-H+LV-NC组)、水苏碱高浓度+FOXO3过表达慢病毒组(STA-H+LV-FOXO3组)。5-乙炔基脱氧尿苷(Edu)检测HL-60细胞增殖;流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡;细胞克隆实验检测细胞放疗敏感性;免疫印迹(Western blot)检测细胞核增殖抗原标记物(Ki67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax), FOXO3和FOX M1蛋白表达。结果 选择STA浓度为100, 200和400  $\mu$ mol/L用于后续实验。与Control组比较, STA-L, STA-M, STA-H组Ki67, Cyclin D1, Edu阳性率、FOXO3, FOX M1表达水平依次降低( $t_{STA-L}=2.169 \sim 5.879$ ,  $t_{STA-M}=3.089 \sim 11.284$ ,  $t_{STA-H}=4.572 \sim 11.502$ ), Caspase-3, Bax表达水平、细胞凋亡率依次升高( $t_{STA-L}=9.171, 10.082, 20.144$ ;  $t_{STA-M}=5.435, 7.530, 7.450$ ;  $t_{STA-H}=4.138, 4.159, 5.956$ ), 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$ );与STA-H+LV-NC组相比, STA-H+LV-FOXO3组Edu阳性率、Ki67, Cyclin D1, FOXO3, FOX M1表达水平显著升高( $t=10.055 \sim 16.267$ ), Bax, Caspase-3表达水平、细胞凋亡率显著降低( $t=5.736, 5.433, 8.939$ ), 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。放疗组、STA+放疗组HL-60细胞克隆形成率随着放疗剂量的增加而降低, 差异具有统计学意义( $F=78.630, 137.843$ , 均 $P<0.05$ ), 且STA+放疗组HL-60细胞克隆形成率比放疗组同剂量低( $t=1.480 \sim 11.301$ , 均 $P<0.05$ )。结论 水苏碱通过抑制FOXO3-FOX M1信号轴抑制AML细胞增殖、诱导凋亡、增强放疗敏感性。

**关键词:**水苏碱;急性髓系白血病;叉头框蛋白O3-叉头框蛋白M1信号轴;增殖;凋亡;放疗敏感性

**中图分类号:**R557;R446.113 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2025)06-028-05

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2025.06.006

## Experimental Study on the Effect of Stachydrine on Proliferation, Apoptosis and Radiosensitivity of AML Cells by Regulating FOXO3-FOX M1 Signaling Axis

XIONG Tao<sup>1</sup>, XU Xuanxuan<sup>1</sup>, LIU Huimin<sup>1</sup>, ZHANG Jiangzhao<sup>1</sup>, WANG Yuanli<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup> (1.Department of Pediatric Hematology, Jingzhou Central Hospital, Hubei Jingzhou 434000, China; 2.Medical Department of Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Hubei Jingzhou 434000, China)

**Abstract: Objective** The effects of stachydrine (STA) on the proliferation, apoptosis and radiosensitivity of acute myeloid leukemia (AML) cells by regulating the transcription factor forkhead box protein O3 (FOXO3)-forkhead box protein M1 (FOX M1) signaling axis. **Methods** Human AML cells (HL-60) were treated with STA at a concentration of 50 ~ 1 600  $\mu$ mol/L, and the activity of HL-60 cells was detected using the cell counting kit-8 (CCK-8) method to screen for the optimal drug concentration; HL-60 cells were separated into Control group, low, medium, and high concentration STA groups (STA-L group, STA-M group, STA-H group), STA+lentivirus transfection control group (STA-H+LV-NC group), and high-concentration STA+FOXO3 overexpression lentiviral group (STA-H+LV-FOXO3 group). 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) was applied to detect HL-60 cell proliferation; flow cytometry(FCM) was applied to detect cell apoptosis; cell cloning experiments were applied to detect the radiotherapy sensitivity of cells; Western blot was applied to detect the expression of cell proliferation antigen markers (Ki67), Cyclin D1, Caspase-3, B-cell lymphoma2 associated X protein (Bax), FOXO3, and FOX M1 proteins. **Results** STA concentrations of 100, 200 and 400  $\mu$ mol/L were selected for subsequent experiments. Compared with the control group, the positive rate of Ki67, Cyclin D1, Edu, FOXO3 and FOX M1 expression levels in the STA-L, STA-M, and STA-H groups decreased sequentially( $t_{STA-L}=2.169 \sim 5.879$ ,  $t_{STA-M}=3.089 \sim 11.284$ ,  $t_{STA-H}=4.572 \sim 11.502$ ), Caspase-3 and Bax expression levels, the apoptosis rate, increased sequentially ( $t_{STA-L}=9.171, 10.082, 20.144$ ;  $t_{STA-M}=5.435, 7.530, 7.450$ ;  $t_{STA-H}=4.138, 4.159, 5.956$ ) and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ), respectively. Compared with the STA-H+LV-NC group, the positive rate of Edu and the expression levels of Ki67, Cyclin D1, FOXO3 and FOX M1 were obviously increased in the STA-H+LV-

**作者简介:**熊涛(1979-),男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:血液系统恶性肿瘤性疾病及血液病危重症, E-mail: xiongtaojz@sina.com。

FOXO3 group( $t=10.055 \sim 16.267$ ), Caspase-3 and Bax expression levels, the apoptosis rate were obviously reduced ( $t=5.736, 5.433, 8.933$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ), respectively. The colony formation rate of HL-60 cells in the radiotherapy group and STA+radiotherapy group decreased with the increase of radiotherapy dose, and the differences were statistically significant( $F=78.630, 137.843$ , all  $P<0.05$ ), and the colony formation rate of HL-60 cells in the STA+radiotherapy group was lower than that in the radiotherapy group at the same dose ( $t=1.480 \sim 11.301$ , all  $P<0.05$ ).

**Conclusion** Stachydrine inhibits AML cell proliferation, induces apoptosis, and enhances radiotherapy sensitivity by inhibiting the FOXO3-FOXMI signaling axis.

**Keywords:** stachydrine; acute myeloid leukemia; forkhead box protein O3-forkhead box protein M1 signal axis; proliferation; apoptosis; radiotherapy sensitivity

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成人中最常见的急性白血病形式,也是儿童中第二常见的急性白血病形式<sup>[1]</sup>。AML是一种造血组织中异常髓系干细胞和祖细胞不受控制的克隆性增殖的疾病。转化的髓样细胞或“白血病母细胞”表现出异常分化并积聚在骨髓(bone marrow, BM)中,会降低正常的造血功能,导致血小板减少和贫血、造血功能衰竭和死亡<sup>[2-3]</sup>。尽管在AML的治疗方面取得了进展,但长期生存率仍然很低<sup>[4]</sup>。因此寻找有效的药物进行治疗十分关键。水苏碱(stachydrine, STA)是一种亲水性季胺盐,具有良好的抗肿瘤作用,但由于其代谢快、生物利用度低,其应用受到限制<sup>[5]</sup>。研究证明,STA通过抑制多种受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)对急变期慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia in blastic phase, BP-CML)有效<sup>[6]</sup>。然而STA在AML中的作用机制仍不清楚。叉头盒(foxa1, FOX)蛋白在正常发育过程中负责多种转录程序,而叉头框蛋白O3(forkhead box protein O3, FOXO3)-叉头框蛋白M1(forkhead box m1, FOXMI)轴与癌症的发生、进展和耐药性有关<sup>[7]</sup>。研究证明,FOXO3可能是乳腺癌(breast cancer, BC)潜在的治疗靶点;白屈菜碱通过诱导乳腺癌细胞M期阻滞,抑制蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/FOXO3/FOXMI通路,从而诱导乳腺癌的有丝分裂<sup>[8]</sup>。然而STA能否通过调控FOXO3-FOXMI轴对AML细胞行为产生影响尚不清楚,本文基于FOXO3-FOXMI轴,将人AML细胞HL-60作为实验对象,主要探究STA对AML细胞增殖、凋亡和放疗敏感性的影响,为AML的临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 人AML细胞(HL-60)。

1.2 仪器与试剂 HL-60细胞(中国科学院上海细胞生物研究所);水苏碱(YZ-0605索莱宝公司);病毒转染试剂(FH880807维真生物公司);兔抗CyclinD1(ab134175), Ki67(ab16667), Caspase-3(ab32150), Bax(ab182733), FOXO3(ab109629), FOXMI(ab207298)抗体(Abcam公司)。Annexin V-FITC/PI试剂盒(A005-1北京百奥莱博公司)。恒温培养箱(上海净信实业发

展公司, DHP-9272);流式细胞仪(美国BD Biosciences公司, FACSCalibur);倒置显微镜(日本Nikon, Eclipse Ti-S)。

### 1.3 方法

1.3.1 HL-60细胞复苏与常规培养流程:HL-60细胞培养:37℃融化液氮冻存的HL-60细胞,将其放于10g/dl胎牛血清和1g/dl青霉素-链霉素的RPMI-1640培养液中进行培养,置于5%(v/v)CO<sub>2</sub>的37℃培养箱常规培养。

1.3.2 HL-60细胞处理及分组:将对数生长期的HL-60细胞,以每孔 $2 \times 10^4$ 个细胞接种于96孔板中,使用浓度为50, 100, 200, 400, 800, 1 600  $\mu\text{mol/L}$ 的STA处理24h,用CCK-8法检测HL-60细胞活性,筛选最佳药物浓度。将HL-60细胞接种于6孔板,分为Control组、水苏碱低、中、高浓度组(STA-L组, STA-M组, STA-H组)、水苏碱+慢病毒(lentiviral, LV)转染-NC组(STA-H+LV-NC组)、水苏碱高浓度+FOXO3过表达组(STA-H+LV-FOXO3组),其中STA低、中、高浓度分别使用100, 200, 400  $\mu\text{mol/L}$ 的STA处理HL-60细胞24h; STA-H+LV-NC组, STA-H+LV-FOXO3组使用400  $\mu\text{mol/L}$ 的STA和慢病毒处理HL-60细胞24h。

1.3.3 5-乙炔-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu)检测HL-60细胞增殖:将各组HL-60细胞接种于96孔培养板中,37℃5%(v/v)CO<sub>2</sub>环境下培养24h,每孔加入50  $\mu\text{mol/L}$ 的Edu孵育2h,4ml/dl多聚甲醛固定,避光条件下加Apollo荧光染料,4',6-二咪基-2-苯基吲哚(4'-6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色,显微镜下观察,统计Edu阳性率,计算HL-60细胞增殖率。

1.3.4 细胞凋亡实验:用0.25g/dl的胰酶将HL-60细胞进行消化,预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤两次,800r/min,离心5min,弃上清,将细胞浓度调整约为 $5 \times 10^5$ 个/ml,加入膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)缓冲液重悬细胞,然后加入V-FITC和碘化丙啶,轻轻混合后室温黑暗条件下孵育30min,流式细胞仪(flow cytometer, FCM)检测细胞凋亡,计算凋亡率。

1.3.5 HL-60细胞放疗处理:将培养板放于照射野(20cm $\times$ 20cm)内,细胞板上放置1.5cm硅胶补偿膜,

使用6mV直线加速器X射线照射,照射剂量:0,2,4,6,8Gy,吸收剂量率250cGy/min。

1.3.6 细胞克隆形成:放疗组HL-60细胞分别给予0,2,4,6,8Gy的X射线照射。STA+放疗组用400  $\mu\text{mol/L}$ 的STA和0,2,4,6,8Gy剂量的X射线照射处理。STA+放疗组在照射前采用STA培养24h,处理后更换培养液,培养10天,每3天更换一次培养液,当细胞培养板中出现克隆时,用甲醇、结晶紫进行固定、染色30min。在光学显微镜下计数>50的细胞克隆数。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ ,

1.3.7 免疫印迹(Western blot)检测细胞核增殖抗原标记物(Ki67)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、FOXO3、FOXM1蛋白表达:收集各组HL-60细胞,加裂解液提取蛋白,BCA法检测蛋白含量,配置十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、转移至硝酸纤维素膜上,5g/dl脱脂牛奶封闭2h,加入相应一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,

表 1

STA 对 HL-60 细胞存活率的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别        | Control 组         | STA ( $\mu\text{mol/L}$ ) |                  |                  |                  |                  |                  |
|-----------|-------------------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|           |                   | 50                        | 100              | 200              | 400              | 800              | 1 600            |
| 克隆形成率 (%) | 100.00 $\pm$ 0.00 | 97.64 $\pm$ 9.86          | 86.25 $\pm$ 8.77 | 74.33 $\pm$ 7.81 | 65.35 $\pm$ 6.64 | 62.57 $\pm$ 6.48 | 61.13 $\pm$ 6.52 |

2.2 不同浓度STA对HL-60细胞增殖、凋亡相关蛋白及FOXO3-FOXM1信号轴蛋白的影响 见表2。STA-L, STA-M, STA-H组Edu阳性率( $t=3.122$ ,  $11.284$ ,  $9.610$ )、Ki67( $t=2.169$ ,  $3.089$ ,  $4.572$ )、CyclinD1( $t=3.244$ ,  $5.389$ ,  $8.152$ )表达水平呈浓度依赖性降低;

表 2

STA 对 HL-60 细胞增殖、凋亡及相关蛋白的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 项目        | Control 组        | STA-L 组          | STA-M 组          | STA-H 组          | F       | P       |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|---------|
| Edu (%)   | 52.62 $\pm$ 5.37 | 43.78 $\pm$ 4.39 | 28.84 $\pm$ 2.93 | 15.57 $\pm$ 1.69 | 107.857 | < 0.001 |
| Ki67      | 1.25 $\pm$ 0.26  | 0.97 $\pm$ 0.18  | 0.69 $\pm$ 0.13  | 0.43 $\pm$ 0.05  | 25.159  | < 0.001 |
| CyclinD1  | 1.13 $\pm$ 0.22  | 0.82 $\pm$ 0.08  | 0.60 $\pm$ 0.06  | 0.36 $\pm$ 0.04  | 42.917  | < 0.001 |
| 细胞凋亡率 (%) | 2.22 $\pm$ 0.28  | 15.74 $\pm$ 1.62 | 25.87 $\pm$ 2.91 | 37.76 $\pm$ 3.93 | 205.447 | < 0.001 |
| Caspase-3 | 0.42 $\pm$ 0.04  | 0.69 $\pm$ 0.06  | 0.93 $\pm$ 0.09  | 1.27 $\pm$ 0.18  | 68.495  | < 0.001 |
| Bax       | 0.31 $\pm$ 0.03  | 0.55 $\pm$ 0.05  | 0.84 $\pm$ 0.08  | 1.19 $\pm$ 0.19  | 75.342  | < 0.001 |
| FOXO3     | 0.97 $\pm$ 0.09  | 0.75 $\pm$ 0.07  | 0.52 $\pm$ 0.05  | 0.27 $\pm$ 0.02  | 136.692 | < 0.001 |
| FOXM1     | 0.88 $\pm$ 0.08  | 0.64 $\pm$ 0.06  | 0.43 $\pm$ 0.04  | 0.22 $\pm$ 0.02  | 160.050 | < 0.001 |

2.3 STA对HL-60细胞放疗敏感性的影响 见表3。2,4,6,8Gy时HL-60细胞克隆形成率显著降低,且与放疗剂量的增加有关( $P<0.05$ )。与STA+放疗组0Gy比较,放射剂量2,4,6,8Gy的HL-60细胞克隆形成率显著降低,且与放疗剂量的增加有关( $P<0.05$ )。当STA剂量为400  $\mu\text{mol/L}$ ,STA+放疗组各放射剂量HL-60细胞克隆形成率均显著低于放疗

TBST(Tris-Borate-Sodium Tween-20)洗涤3次,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)连接的二抗于室温孵育2h,洗涤3次,增强化学发光(Enhanced chemiluminescence, ECL)显色,用Image-J软件分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学分析 用SPSS 25.0进行统计分析,符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,用独立样本 $t$ 检验进行两组间比较,用单因素方差分析进行多组间比较,用SNK- $q$ 检验进行组间比较。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 STA浓度筛选 见表1。随着STA浓度增加,HL-60细胞存活率受到抑制。STA低浓度时,对细胞存活率抑制作用尚不明显,浓度在100~400  $\mu\text{mol/L}$ 范围内,HL-60细胞存活率受到抑制( $t=0.586$ ,  $3.840$ ,  $8.051$ , 均 $P<0.05$ )。浓度在>400  $\mu\text{mol/L}$ 时,HL-60细胞存活率显著降低( $t=14.149$ ,  $14.603$ , 均 $P<0.05$ ),因此选择STA浓度为100,200和400  $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

细胞凋亡率( $t=20.144$ ,  $7.450$ ,  $5.956$ )、Caspase-3( $t=9.171$ ,  $5.435$ ,  $4.138$ )、Bax( $t=10.082$ ,  $7.530$ ,  $4.159$ )表达水平呈浓度依赖性升高,FOXO3( $t=4.726$ ,  $6.549$ ,  $11.371$ )、FOXM1( $t=5.879$ ,  $7.133$ ,  $11.502$ )表达水平依次降低,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$ )。

组同剂量,能明显增加对HL-60细胞的放疗敏感性( $t=1.480$ ,  $2.733$ ,  $4.226$ ,  $11.301$ ,  $4.871$ , 均 $P<0.05$ )。

2.4 FOXO3逆转STA对HL-60细胞增殖、凋亡及相关蛋白的影响与STA-H+LV-NC组相比 见表4。STA-H+LV-FOXO3组FOXO3, FOXM1表达水平、Edu阳性率、Ki67, CyclinD1表达水平显著升高,细胞凋亡率、Caspase-3, Bax表达水平显著降低,差异

具有统计学意义(均 $P<0.001$ )。

表3 STA为400 $\mu\text{mol/L}$ 时对HL-60细胞放疗克隆形成的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别      | 放射剂量(Gy)         |                  |                  |                  |                  | F       | P值      |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|---------|
|         | 0                | 2                | 4                | 6                | 8                |         |         |
| 放疗组     | 80.25 $\pm$ 8.33 | 71.36 $\pm$ 7.47 | 58.64 $\pm$ 6.02 | 45.92 $\pm$ 4.88 | 23.07 $\pm$ 2.67 | 78.630  | < 0.001 |
| STA+放疗组 | 73.44 $\pm$ 7.59 | 60.37 $\pm$ 6.42 | 45.28 $\pm$ 4.87 | 20.85 $\pm$ 2.39 | 16.61 $\pm$ 1.85 | 137.843 | < 0.001 |

表4 FOXO3逆转STA对HL-60细胞增殖、凋亡及相关蛋白的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

| 项目        | STA-H+LV-NC组     | STA-H+LV-FOXO3组  | t      | P       |
|-----------|------------------|------------------|--------|---------|
| FOXO3     | 0.26 $\pm$ 0.02  | 0.68 $\pm$ 0.06  | 16.267 | < 0.001 |
| FOXO1     | 0.23 $\pm$ 0.02  | 0.58 $\pm$ 0.05  | 15.920 | < 0.001 |
| Edu (%)   | 16.27 $\pm$ 1.55 | 30.35 $\pm$ 3.06 | 10.055 | < 0.001 |
| Ki67      | 0.42 $\pm$ 0.04  | 0.82 $\pm$ 0.08  | 10.954 | < 0.001 |
| CyclinD1  | 0.35 $\pm$ 0.03  | 0.75 $\pm$ 0.07  | 12.865 | < 0.001 |
| 细胞凋亡率(%)  | 36.63 $\pm$ 3.85 | 20.17 $\pm$ 2.35 | 8.939  | < 0.001 |
| Caspase-3 | 1.26 $\pm$ 0.17  | 0.82 $\pm$ 0.08  | 5.736  | < 0.001 |
| Bax       | 1.20 $\pm$ 0.20  | 0.73 $\pm$ 0.07  | 5.433  | < 0.001 |

### 3 讨论

AML由造血系统疾病引起,是一种高度致死的血液系统恶性肿瘤,其特征是髓系祖细胞的恶性转化和增殖,导致正常造血功能的替代<sup>[9]</sup>。AML通常采用化疗和/或造血干细胞移植治疗。但是,43%的年轻患者最终在达到完全缓解后复发<sup>[10]</sup>。放疗也是白血病的一种治疗方式,急性白血病细胞对电离辐射非常敏感,放射免疫治疗具有一定的剂量依赖性,仍然需要额外的、有效的药物来补充或取代现有的药物并改善结果<sup>[11]</sup>。因此,探索有效的AML治疗药物势在必行<sup>[12]</sup>。

STA是从日本虎尾草(中药中的“益母草”)的叶子中提取,是其主要的生物活性成分。目前为止,已发现水苏碱有治疗癌症、心血管疾病、子宫疾病、脑损伤和炎症的各种生物活性<sup>[13]</sup>。CHEN等<sup>[14]</sup>研究发现,STA已被发现具有抑制肿瘤潜力,它通过Smad2/3和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路阻止转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor beta-1, TGF- $\beta$ 1)诱导的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞中上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),表明STA可能是HCC的潜在治疗剂。BAO等<sup>[15]</sup>研究证实,STA盐酸盐(stachydrine hydrochloride, SH)通过调节白细胞抑制因子(leukocyte inhibitory factor, LIF)/腺苷-磷酸活化的蛋白质激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)轴调节自噬和细胞周期停滞并诱导细胞衰老,从而抑制HCC的肿瘤发生和发展。ZHAI等<sup>[16]</sup>研究指出,STA通过抑制II A型

磷脂酶A2(type II A phospholipase A2, PLA2G2A)/脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCN)轴抑制BC细胞的生长,促进细胞周期停滞和凋亡。研究表明,STA具有克服BP-CML中酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)耐药性的潜力<sup>[7]</sup>。还有研究发现,在连续服用高剂量STA 14天后,没有观察到死亡或体重和行为发生变化。在对动物进行尸检后,未观察到任何主要器官(例如心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、大脑和胸腺)异常,说明STA可能是无毒或毒性非常低<sup>[17]</sup>。本研究用50~1 600 $\mu\text{mol/L}$ 的STA处理HL-60细胞,发现HL-60细胞存活率逐渐降低,说明STA能够抑制HL-60细胞增殖。STA处理HL-60细胞后,能够提高HL-60细胞凋亡率,上调Caspase-3, Bax蛋白表达,STA可抑制AML细胞增殖,促进细胞凋亡,说明STA在AML中发挥抗癌作用。本研究用0~8 Gy剂量对HL-60细胞进行照射,结果发现STA可以增强HL-60细胞对放疗的敏感性,说明STA能够提高放疗杀伤AML细胞的能力。但STA在AML中抗癌机制尚不明确。

FOXO3之前被称为FOXO3a和FKHR-L1,是叉头盒蛋白(forkhead box m1, FOXOs)“O”类亚家族的成员,与其他FOXO蛋白相比,FOXO3在控制癌症发展和化疗药物敏感性方面具有更重要的作用,在FOXO3参与细胞增殖、细胞存活和衰老的关键下游靶点中,最关键的靶点之一是强效致癌基因FOXO1,其表达和活性受FOXO3负调控<sup>[8]</sup>。叉头框(forkhead box, FOX)蛋白是一种转录因子,FOXO1在胚胎、再生和癌组织中高度表达,并且表现出很高的增殖能力,与多种恶性肿瘤有紧密联系<sup>[18-19]</sup>。LIU

等<sup>[20]</sup>研究发现,通过调节BC中的FOXO3a/FOXM1/SOX2信号传导来抑制DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)活性抑制肿瘤生长。GHOSH等<sup>[21]</sup>研究表明,尿石素A(urolithin a, UroA)及其结构类似物UAS03通过调节FOXO3-FOXM1轴使药物转运蛋白致敏,从而限制5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5FU)耐药结肠肿瘤的进展。本研究显示,STA可下调FOXO3, FOXM1蛋白表达,猜测STA通过抑制FOXO3-FOXM1轴抑制AML细胞增殖,促进细胞凋亡。对此结果进行验证,本研究在STA处理AML细胞的基础上进行病毒转染处理,分析发现,过表达FOXO3可逆转STA对AML细胞增殖的抑制作用,说明STA可以通过抑制FOXO3-FOXM1信号通路抑制AML细胞的增殖,促进凋亡。进一步证实了STA可通过抑制FOXO3-FOXM1信号通路抑制AML细胞生长。

综上, STA通过抑制FOXO3-FOXM1信号轴从而抑制AML细胞增殖,诱导凋亡,增强放疗敏感性。但研究仍有局限性, STA调控FOXO3-FOXM1信号轴的机制需要结合动物模型进行深入研究。

#### 参考文献:

- [1] CARTER J L, HEGE K T, YANG J, et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 288.
- [2] SHIMONY S, STAHL M, STONE R M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *American Journal of Hematology*, 2023, 98(3): 502-526.
- [3] 李悦, 徐焕铭, 樊华. 基于TCGA数据对60岁以上不同分层急性髓系白血病患者相关lncRNA的基因信息学分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(3): 20-25.  
LI Y, XU H M, FAN H. Genetic informatics analysis of lncRNA related to patients with different stratified acute myeloid leukemia over 60 years based on TCGA database[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(3): 20-25.
- [4] PABON C M, ABBAS H A, KONOPLEVA M. Acute myeloid leukemia: therapeutic targeting of stem cells[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2022, 26(6): 547-556.
- [5] ZENG H H, XU D J, SONG Y G, et al. Synthesis, characterization and anti-breast cancer activities of stachydrine derivatives[J]. *European Journal of Medical Chemistry*, 2023, 259: 115679.
- [6] GU R X, ZHANG W, XU D D. Stachydrine is effective and selective against blast phase chronic myeloid leukaemia through inhibition of multiple receptor tyrosine kinases[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2022, 60(1): 700-707.
- [7] CUI W Y Q, XIE N, LAM E W F, et al. High expression of cytoplasmic FOXO3 protein associated with poor prognosis of rectal cancer patients: a study from Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy to big database analysis[J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e15342.
- [8] LI H M, TANG X Y, SUN Z W, et al. Integrating bioinformatics and experimental models to investigate the mechanism of the chelidone-induced mitotic catastrophe via the AKT/FOXO3/FOXM1 axis in breast cancer cells[J]. *Biomolecules & Biomedicine*, 2024, 24(3): 560-574.
- [9] NEWELL L F, COOK R J. Advances in acute myeloid leukemia[J]. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 2021, 375: n2026.
- [10] LIU Y L, WANG G Q, ZHANG J S, et al. CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 86.
- [11] WALTER R B. Where do we stand with radioimmunotherapy for acute myeloid leukemia?[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2022, 22(5): 555-561.
- [12] LIU J T, WEI Y H, JIA W B, et al. Chenodeoxycholic acid suppresses AML progression through promoting lipid peroxidation via ROS/p38 MAPK/DGAT1 pathway and inhibiting M2 macrophage polarization[J]. *Redox Biology*, 2022, 56: 102452.
- [13] CHENG F, ZHOU Y X, WANG M, et al. A review of pharmacological and pharmacokinetic properties of stachydrine[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 155: 104755.
- [14] CHEN X N, YAN N. Stachydrine inhibits TGF- $\beta$  1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells through the TGF- $\beta$ /Smad and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2021, 32(8): 786-792.
- [15] BAO X M, LIU Y M, HUANG J Y, et al. Stachydrine hydrochloride inhibits hepatocellular carcinoma progression via LIF/AMPK axis[J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154066.
- [16] ZHAI Z, MU T L, ZHAO L N, et al. Stachydrine represses the proliferation and enhances cell cycle arrest and apoptosis of breast cancer cells via PLA2G2A/DCN axis[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2024, 103(1): e14429.
- [17] LIAO L, TANG Y, LI B, et al. Stachydrine, a potential drug for the treatment of cardiovascular system and central nervous system diseases[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 161: 114489.
- [18] 许君伟, 梁亚林, 宋丽. FOXM1/FOXO3a在乙肝相关性肝癌中的表达及临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(5): 709-712.  
XU J W, LIANG Y L, SONG L. Expression and clinical significance of FOXM1/FOXO3a in hepatitis B-related liver cancer[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2021, 36(5): 709-712.
- [19] LIU C, BARGER C J, KARP A R. FOXM1: A multifunctional oncoprotein and emerging therapeutic target in ovarian cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(12): 3065.
- [20] LIU H, SONG Y, QIU H S, et al. Downregulation of FOXO3a by DNMT1 promotes breast cancer stem cell properties and tumorigenesis[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2020, 27(3): 966-983.
- [21] GHOSH S, SINGH R, VANWINKLE Z M, et al. Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXM1 axis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(12): 5574-5595.

收稿日期: 2024-06-04

修回日期: 2024-11-26