

基于网络药理学和细胞实验探讨葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞凋亡和细胞周期的影响

石慧慧¹, 苏雅静¹, 刘景文¹, 张 曼¹, 郭家缘¹, 刘洺欣¹, 韦润红^{2,3}, 王河春^{2,3},
刘现辉^{2,3}, 马秋玲^{1,2,3*}

[1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院), 河南中医药大学血液病研究所, 河南 郑州 450002; 3. 河南省中西医结合防治血液病工程研究中心, 河南 郑州 450002]

摘要: **目的** 探讨葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞凋亡和细胞周期的影响。**方法** 网络药理学预测葫芦素 B 治疗急性髓系白血病的分子机制。CCK-8 法筛选葫芦素 B 质量浓度。25 nmol/L 葫芦素 B 分别与 80 ng/mL 柔红霉素、40 ng/mL 阿糖胞苷和 40 ng/mL 高三尖杉酯碱联合, 探究其作用。细胞分为对照组、葫芦素 B 组、化疗药物组、葫芦素 B+化疗药物组, CCK-8 法检测细胞活性。以 0、25、50、100 nmol/L 葫芦素 B 处理急性髓系白血病细胞株, 瑞氏染色法观察细胞形态变化, 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期, Western blot 法检测细胞 Caspase-3、PARP、P21、cyclin B1、CDK1、PI3K110、Akt 蛋白表达。**结果** 关键靶点为 Akt1、EGFR, 均能与葫芦素 B 稳定结合。葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞株增殖具有抑制作用, 并呈时间、浓度依赖性; 与葫芦素 B (25 nmol/L) 组比较, 葫芦素 B+化疗药物组可增强对 U937、THP-1 细胞增殖的抑制作用 ($P<0.01$); 与对照组比较, 葫芦素 B (25、50、100 nmol/L) 组 U937、THP-1 细胞出现萎缩、核碎裂, 细胞凋亡率、G₂/M 期细胞比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP、P21 蛋白表达升高 ($P<0.01$), cyclin B1、CDK1、PI3K110、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 葫芦素 B 可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路诱导细胞凋亡和 G₂/M 期周期阻滞, 抑制急性髓系白血病细胞增殖, 增强临床化疗药物的作用。

关键词: 葫芦素 B; 急性髓系白血病; 细胞凋亡; 细胞周期; PI3K/Akt 信号通路; 网络药理学; 细胞实验

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)10-3467-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.044

急性髓系白血病是最常见的血液系统恶性肿瘤, 其特征是骨髓干细胞恶性增殖, 伴有感染、贫血和出血^[1], 2022 年美国现有患者 526 730 例, 新诊断患者 60 650 例^[2]。尽管化疗、骨髓移植和靶向药物可延缓急性髓系白血病的进展, 但具有高复发率和转移风险, 不良反应明显。因此, 需要寻找有效的治疗药物, 提高急性髓系白血病的治愈率。

从天然药用植物中提取的抗肿瘤物质具有高效低毒的特点, 已成为相关研究的热点。葫芦素 B 是从葫芦科等植物中分离得到的四环三萜类化合物, 含量丰富, 具有保肝、消炎、抗肿瘤等广泛的药理活性^[3-4]。本研究旨在探讨葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞增殖、凋亡、周期以及 PI3K/Akt 信号通路的影响, 以期急性髓系白血病临床用药提供坚实的理论基础。

1 材料

1.1 细胞 人急性髓细胞白血病细胞株 KG-1 细胞株, 购

自武汉普诺赛生命科技有限公司; U937、THP-1 细胞均由浙江大学第一附属医院金洁老师赠予。

1.2 试剂与药物 葫芦素 B (上海皓鸿生物医药科技有限公司, 批号 20220427130829, 纯度 99%)。柔红霉素 (瀚晖制药有限公司, 国药准字 H33020925)。阿糖胞苷 [辉瑞制药 (无锡) 有限公司, 国药准字 H20205027]; 高三尖杉酯碱 (杭州民生药业股份有限公司, 国药准字 H33020007)。RPMI1640 培养基 (批号 8122159)、高效 RIPA 细胞裂解液、PMSF 蛋白酶抑制液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 R0010、P8340); 胎牛血清 (上海双沭生物科技有限公司, 批号 TJ05977); 二甲基亚砜 (DMSO, 天津津东天正精细化学试剂厂, 批号 20230501); CCK-8 试剂盒 [东仁化学科技 (上海) 有限公司, 货号 CK04]; 凋亡检测试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 货号 AP101); 细胞周期检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有

收稿日期: 2024-11-25

基金项目: 河南省自然科学基金 (222300420487); 河南省中医药科学研究专项项目 (2021ZY1050, 2024ZY2069)

作者简介: 石慧慧 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向中西医结合防治血液病。Tel: 18638522398, E-mail: shh2496255108@163.com

*通信作者: 马秋玲 (1975—), 女, 博士, 副主任医师, 研究方向中西医结合防治血液病。Tel: 13608697816, E-mail: ling93317@163.com

限公司, 货号 KGA512); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (上海碧云天生物科技公司, 货号 P0011); Caspase-3、PARP (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 9662、9542); cyclin B1、CDK1、P21、 β -actin、PI3K p110、Akt、p-Akt、GAPDH、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 55004-1-AP、19532-1-AP、10355-10-AP、20536-10-AP、20584-1-AP、10176-2-AP、66444-1-Ig、10494-1-AP、B900210、B900120)。

1.3 仪器 PHOMO 酶标仪 [安图实验仪器 (郑州) 有限公司]; 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Western blot 电泳仪、Western blot 转膜仪、SDS-PAGE 凝胶系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); Western blot 成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学 检索 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 和 GeneCards (<http://www.genecards.org/>) 数据库, 获得急性髓系白血病相关靶点, 去除重复数据, 获得更全面的肿瘤相关靶点集。葫芦素 B 的分子结构来自 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站, 以 SDF 格式保存。将葫芦素 B 的 SDF 格式导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>)、TCMSP (<http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、Pharm Mapper (<https://lilab-ecust.cn/pharmmappe>) 数据库进行预测, 获取葫芦素 B 靶点, 去除重复数据后发现葫芦素 B 潜在靶点。将葫芦素 B 靶点和急性髓系白血病相关靶点导入 Draw Venn 软件进行数据分析, 获得主要相关靶点的韦恩图, 导入 STRING (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 数据库中获得蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件中分析核心靶点。将交集靶点引入微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>), 以 $P<0.05$ 为标准绘制 GO 富集直方图, 筛选分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 前 10 位的条目。以 $P<0.05$ 为标准, 选取 KEGG 富集排名前 10 位的代表性通道, 绘制 KEGG 气泡图, Cytoscape 3.9.1 软件绘制药物-靶点-通路网络图。

2.2 分子对接 从 PDB 网站获得关键靶标 Akt1、EGFR 的三维结构, 去除水分子, 增加电荷, 加氢原子, 并转化为 pdbqt 格式。采用 AutoDock 工具中的 Grid Box 工具找到活性口袋, Auto Dock Vina 软件对其进行功能模拟, PyMOL、Liglot 软件对其进行作用力分析和可视化。

2.3 细胞培养 将 U937、THP-1、KG-1 细胞放入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 以细胞悬液与新培养基比例 1:2~1:3 进行传代, 取对数生长期者进行后续实验。

2.4 CCK-8 法检测细胞活性 取对数生长期 U937、THP-1、KG-1 细胞, 将密度调整为 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔板中,

每孔 100 μ L, 分别加入 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 nmol/L 葫芦素 B, 每孔设置 3 个复孔, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 3 h, 在 450 nm 波长处检测光密度 (OD), 计算细胞存活率和抑制率, 公式分别为存活率 = (OD_{实验组}/OD_{对照组}) $\times$ 100%、抑制率 = (1-OD_{实验组}/OD_{对照组}) $\times$ 100%, 重复 3 次, 计算 IC₅₀ 值。另外, KG-1 细胞实验结果不理想, 故选择 U937、THP-1 细胞。

2.5 CCK-8 法检测葫芦素 B 与化疗药物联用后的细胞活性 柔红霉素、阿糖胞苷、高三尖杉酯碱 3 种化疗药物的质量浓度分别设置为 0、10、20、40、80、160 ng/mL, 按“2.4”项下方法计算 IC₅₀ 值, 25 nmol/L 葫芦素 B 分别与 IC₅₀ 值最接近的药物 (80 ng/mL 柔红霉素、40 ng/mL 阿糖胞苷、40 ng/mL 高三尖杉酯碱) 联合, 分为对照组、葫芦素 B 组、化疗药物组、葫芦素 B+化疗药物组。使用 96 孔微量滴定板, 每孔加入 U937、THP-1 细胞悬液各 100 μ L 及相应药物, 每孔设置 3 个复孔, 培养 48 h 后加入 10 μ L CCK-8 溶液, 培养箱中继续培养 3 h 后检测 OD 值, 计算细胞存活率, 重复 3 次。

2.6 瑞氏染色法观察细胞形态变化 以 0、25、50、100 nmol/L 葫芦素 B 处理 U937、THP-1 细胞 48 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀加入微量培养基, 混匀后滴在载玻片右侧近 1/3 处, 用另一载玻片均匀向左端推片。待干燥后以 Wright-Giemsa 染液染色固定 1 min, 加入磷酸盐缓冲液吹匀, 静置 15 min, 在显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 将 U937、THP-1 细胞离心后弃去上清, 加入新的培养基, 调整密度至 1×10^5 /mL, 平铺在 6 孔板内, 终体积为每孔 10 mL, 分组同“2.6”项, 培养 48 h, 收集细胞, PBS 缓冲液洗涤 1 次, 重悬计数并收集 1×10^6 个重悬液, 离心后去除上清, 加入 500 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 每管加入 5 μ L FITC 和 10 μ L PI 混匀, 室温避光孵育染色 5 min, 上机检测细胞凋亡率。收集 1×10^6 个细胞的重悬液, 离心后去除上清, 加入 1 mL 70% 乙醇, 4 ℃固定过夜, 第 2 天用 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次, 加入 500 μ L 染色工作液重悬细胞, 室温避光孵育染色 30 min, 上机检测细胞周期。

2.8 Western blot 法检测细胞凋亡周期蛋白 Caspase-3、PARP、P21、cyclin B1、CDK1 表达 分别收集 0、25、50、100 nmol/L 葫芦素 B 处理 48 h 后的 U937、THP-1 细胞, 加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液, 提取总蛋白, BCA 法检测含量, 取等量进行变性, 加入蛋白上样缓冲液, 冷冻保存。制备聚丙烯酰胺凝胶, 上样, 电泳, 湿转法转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 分别加入 Caspase-3、PARP、P21、cyclin B1、CDK1 抗体 (1:1 000), 4 ℃孵育过夜, 次日加入二抗 (1:1 000), 室温孵育 1 h, ECL 发光显影, 凝胶分析成像仪进行条带显像, 以 β -actin 为内参, 通过 Image lab 软件分析条带光密度值, 计算蛋白相对表达量。采用改良 RIPA 裂解液处理细胞沉淀, 冰上裂解,

4 ℃、12 000×g 离心 15 min，取上清，BCA 法检测蛋白含量，95 ℃变性 5 min，-80 ℃保存，制备 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h，分别加入 PI3K p110、Akt 抗体（1：1 000），4 ℃孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000），室温孵育 1 h，ECL 发光显影，凝胶分析成像仪进行条带显像，以 GAPDH 为内参，通过 Image lab 软件分析条带光密度值，计算蛋白相对表达。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，GraphPad Prism 9.0 软件辅助作图，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 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

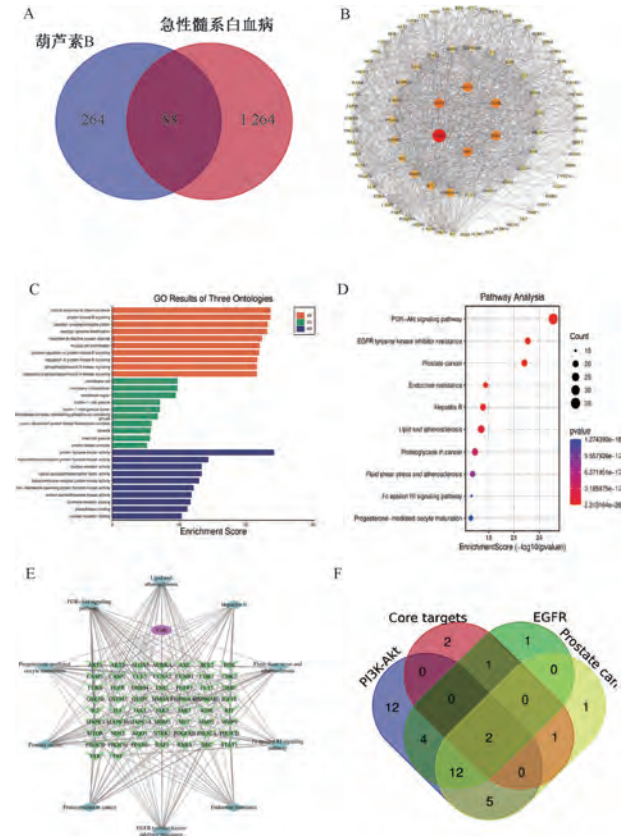
3.1 网络药理学分析 共得到 352 个葫芦素 B 潜在治疗靶点和 1 352 个急性髓系白血病相关基因，韦恩图见图 1A。PPI 网络中重要节点为 TNF、Akt1、EGFR 等，见图 1B。GO 富集分析排名前 10 位的 BP、CC、MF 条目主要涉及信号传导、活性氧反应、氧化应激过程，见图 1C。KEGG 分析显示，主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、肿瘤蛋白聚糖、脂质与动脉粥样硬化等急性髓系白血病相关通路，见图 1D~1E。前 3 位通路靶点与核心靶点取交集，见图 1F，得到关键靶点 Akt1 和 EGFR，进行后续实验。

3.2 分子对接 葫芦素 B 以与 Akt1 蛋白中 Asp262 和 Ser259 氨基酸形成 2 个氢键，与 Tyr417、Tyr263、Typ413 和 Gln414 氨基酸形成疏水相互作用力，见图 2A~2B。葫芦素 B 与 EGFR 蛋白中的氨基酸 Met793 和 Pro794 形成 2 个氢键，与 Thr790、Ala743、Leu844、Glu792、Thr854、Met766、Val726、Leu718 和 Gly796 氨基酸形成疏水相互作用力，见图 2C~2D。其中，葫芦素 B 与蛋白 Akt1、EGFR 的结合能分别为-15.6、-13.9 kcal/mol，表明前者可与后两者稳定结合。

3.3 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞增殖的影响 24 h 时，葫芦素 B 抑制 U937、THP-1、KG-1 细胞的 IC_{50} 值分别为 (25.29±0.52)、(35.51±1.39)、(53.21±2.60) nmol/L；48 h 时， IC_{50} 值分别为 (20.14±1.52)、(34.41±0.29)、(39.76±7.65) nmol/L；72 h 时， IC_{50} 值分别为 (16.90±5.24)、(34.24±0.62)、(18.06±5.58) nmol/L，即呈时间、浓度依赖性，见图 3。另外，KG-1 细胞实验结果不理想，故选择 U937、THP-1 细胞。

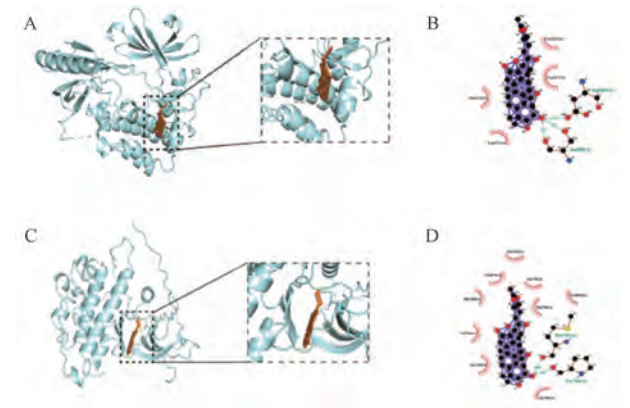
3.4 葫芦素 B 与临床化疗药物联合对急性髓系白血病细胞株的影响 柔红霉素、阿糖胞苷、高三尖杉酯碱均可抑制 U937、THP-1 细胞增殖， IC_{50} 值分别为 78.56、54.45、38.44 ng/mL 和 53.64、34.04、41.78 ng/mL，将 25 nmol/L 葫芦素 B 分别与 80 ng/mL 柔红霉素、40 ng/mL 阿糖胞苷、40 ng/mL 高三尖杉酯碱进行联合，见图 4。与对照组比较，葫芦素 B 和 3 种化疗药物联用均可抑制急性髓系白血病细胞株 U937、THP-1 细胞增殖 ($P<0.01$)，见图 5。

3.5 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞形态的影响 与葫芦



注：A 为成分靶点与疾病靶点交集韦恩图，B 为蛋白相互作用（PPI）网络，C 为靶蛋白 GO 富集分析，D 为急性髓系白血病相关靶点 KEGG 富集分析，E 为葫芦素 B-靶点-通路网络，F 为核心靶点与通路靶点交集韦恩图。

图 1 网络药理学图

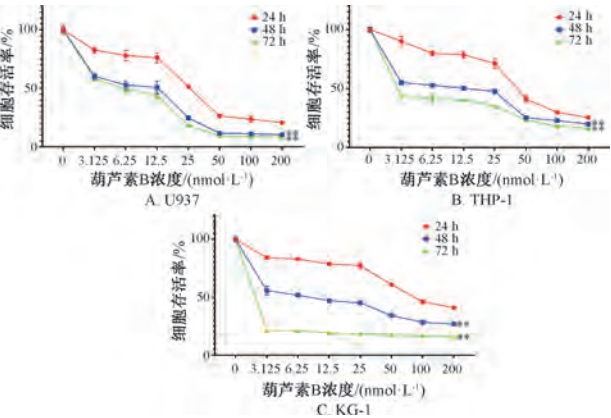


注：A 为葫芦素 B 与 Akt1 蛋白相互作用 3D 图，B 为葫芦素 B 与 Akt1 蛋白相互作用 2D 图，C 为葫芦素 B 与 EGFR 蛋白相互作用 3D 图，D 为葫芦素 B 与 EGFR 蛋白相互作用 2D 图。

图 2 分子对接图

素 B（0 nmol/L）组比较，葫芦素 B（25、50、100 nmol/L）组 U937、THP-1 细胞膜破损、皱缩并出现碎片，而且呈浓度依赖性，见图 6。

3.6 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞凋亡的影响 与葫芦素 B（0 nmol/L）组比较，葫芦素 B（25、50、100 nmol/L）组 U937、THP-1 细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)，并呈浓度依



注：与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，** $P<0.01$ 。

图 3 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

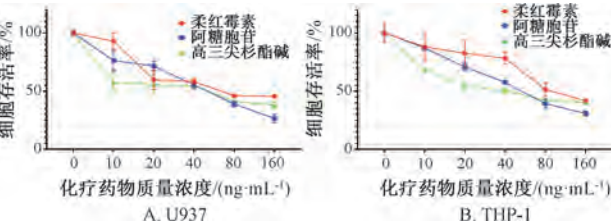


图 4 化疗药物对急性髓系白血病细胞株的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

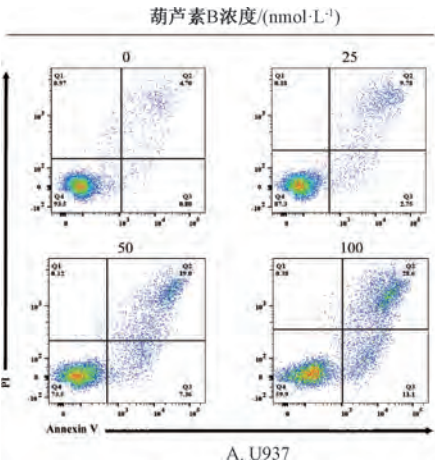


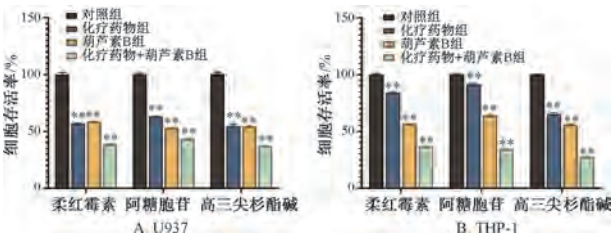
图 7 葫芦素 B 对 U937、THP-1 细胞凋亡情况的影响

葫芦素 B 浓度/ (nmol·L ⁻¹)	细胞凋亡率/%	
	U937	THP-1
0	4.94±0.57	3.78±0.66
25	13.37±1.03 **	12.13±1.50 **
50	26.66±1.06 **	18.23±1.31 **
100	39.75±1.53 **	40.86±1.32 **

注：与葫芦素 B 0 nmol/L 组比较，** $P<0.01$ 。

3.8 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞凋亡和周期相关蛋白表达的影响 与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，葫芦素 B (25、50、100 nmol/L) 组 U937、THP-1 细胞 PARP 和 caspase3 蛋白

3470



注：与对照组比较，** $P<0.01$ 。

图 5 葫芦素 B 联合化疗药物对急性髓系白血病细胞株的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

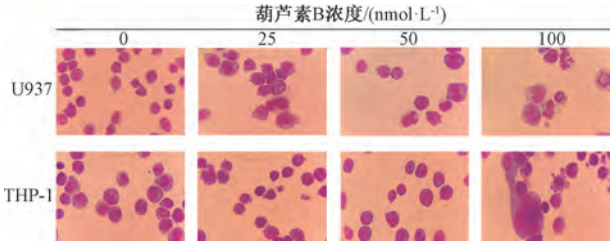
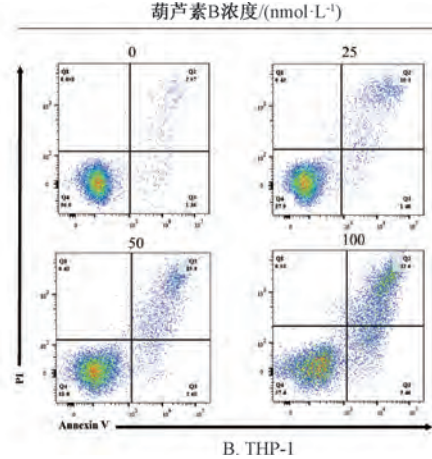


图 6 葫芦素 B 对 U937、THP-1 细胞形态的影响 (瑞氏染色, $\times 1\,000$)

赖性，见图 7、表 1。

3.7 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞周期的影响 与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，葫芦素 B (25、50、100 nmol/L) 组 U937、THP-1 细胞 G_2/M 期比例升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈浓度依赖性，见图 8、表 2。



葫芦素 B 浓度/ (nmol·L ⁻¹)	G_2/M 期阻滞率/%	
	U937	THP-1
0	14.37±1.21	16.30±1.77
25	20.77±1.80 *	22.67±1.89 **
50	25.53±1.25 **	27.10±1.83 **
100	42.83±3.28 **	39.33±2.24 **

注：与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

出现剪切激活带，cleaved-PARP、cleaved-Caspase-3、P21 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，PARP、Caspase-3、cyclin B1、CDK1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，见图 9、表 3。

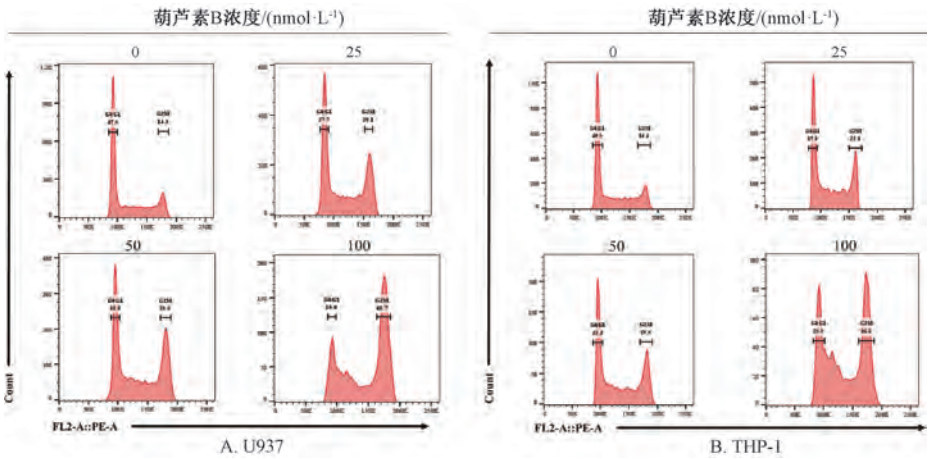


图 8 葫芦素 B 对 U937、THP-1 细胞 G₂/M 期的影响

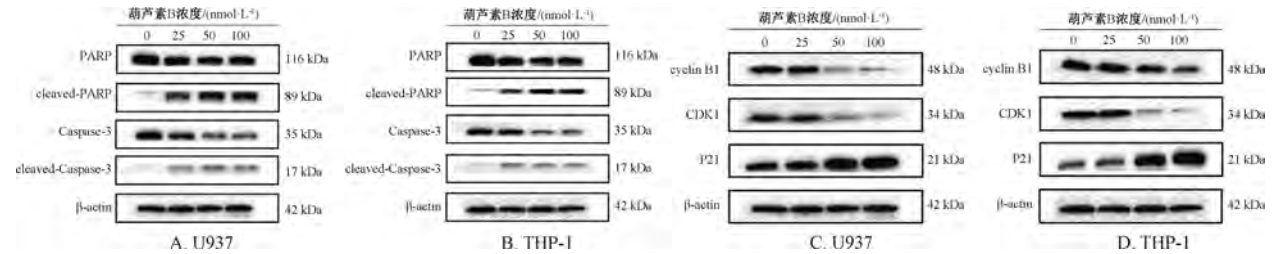


图 9 各组 U937、THP-1 细胞凋亡蛋白条带

表 3 葫芦素 B 对 U937、THP-1 细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

葫芦素 B 浓度/ (nmol·L ⁻¹)	cleaved-PARP/PARP		cleaved-Caspase-3/Caspase-3		cyclin B1		CDK1		P21	
	U937	THP-1	U937	THP-1	U937	THP-1	U937	THP-1	U937	THP-1
0	0.16±0.01	0.21±0.01	0.17±0.01	0.30±0.01	0.98±0.01	0.95±0.01	0.98±0.01	1.17±0.07	0.54±0.01	0.31±0.01
25	0.85±0.02 **	0.73±0.02 **	0.95±0.02 **	0.54±0.01 **	0.97±0.02	0.88±0.01 **	0.90±0.01 **	1.10±0.01	0.69±0.01 **	0.40±0.02 **
50	1.21±0.02 **	1.29±0.01 **	2.01±0.12 **	1.85±0.01 **	0.25±0.01 **	0.75±0.02 **	0.39±0.01 **	0.26±0.01 **	0.92±0.01 **	0.98±0.01 **
100	1.35±0.02 **	1.34±0.02 **	2.30±0.09 **	2.47±0.02 **	0.15±0.01 **	0.50±0.02 **	0.15±0.01 **	0.10±0.01 **	1.19±0.04 **	1.19±0.02 **

注：与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，** $P<0.01$ 。

3.9 葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞株 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，葫芦素 B (25、50、100 nmol/L) 组 U937、THP-1 细胞 PI3K p110、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，而 Akt 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)，见图 10、表 4。

4 讨论

急性髓系白血病是一种血液系统恶性肿瘤，治疗手段有限^[5-6]。研究发现，许多中药提取物对肿瘤具有较好的抑制作用^[7]，同时具有不良反应少、不易产生耐药性、应用

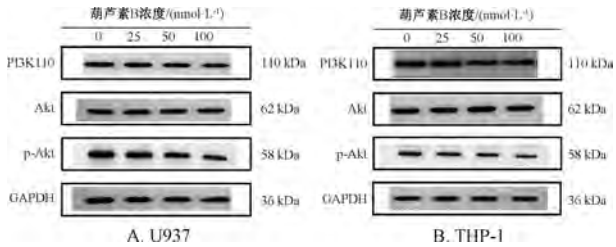


图 10 各组 U937、THP-1 细胞 PI3K/Akt 信号通路蛋白条带

表 4 葫芦素 B 对 U937、THP-1 细胞通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

葫芦素 B 浓度/ (nmol·L ⁻¹)	PI3K p110		Akt		p-Akt	
	U937	THP-1	U937	THP-1	U937	THP-1
0	0.99±0.01	1.26±0.03	1.00±0.03	1.05±0.01	0.92±0.02	1.07±0.01
25	0.95±0.01 *	1.18±0.02	1.01±0.05	1.04±0.01	0.89±0.02	1.00±0.01 **
50	0.77±0.01 **	1.13±0.02 *	0.95±0.04	1.06±0.01	0.74±0.03 *	0.85±0.02 **
100	0.48±0.01 **	0.93±0.05 **	0.95±0.05	1.09±0.04	0.65±0.04 **	0.83±0.02 **

注：与葫芦素 B (0 nmol/L) 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

方便等优势。葫芦素是从甜瓜蒂和葫芦科等其他科属植物中提取出的苦味苷元成分^[8-10]，研究表明，葫芦素 B 及其家族化合物均具有明显的抗肿瘤活性，具有良好的研究前景^[11]。

本研究经网络药理学发现，葫芦素 B 可稳定结合 Akt1、EGFR 靶点，前者参与了多种促进肿瘤细胞恶性增殖的细胞过程^[12-13]；后者过表达与许多恶性肿瘤的发病机制有关，并且肿瘤 EGFR 阳性状态通常与不良预后和结局相关^[14-15]。

再探讨葫芦素 B 对急性髓系白血病细胞增殖、凋亡及周期的影响，发现它能抑制急性髓系白血病细胞的增殖，与临床化疗药物联合应用时呈现协同抑制作用。细胞凋亡对维持细胞稳态至关重要^[16]，本研究发现，葫芦素 B 可使急性髓系白血病细胞碎裂，核固缩，从而诱导细胞凋亡。细胞凋亡调控在抗肿瘤中有着重要意义^[17-19]，本研究结果显示，葫芦素 B 呈浓度依赖性地诱导细胞凋亡，还可使 Caspase-3^[20]、PARP 剪切激活带蛋白表达升高，与瑞氏染色、流式分析一致。同时，葫芦素 B 能诱导多种肿瘤细胞周期阻滞在 G₂/M 期^[21-22]，还可降低 cyclin B1、CDK1 蛋白表达，升高 P21 蛋白表达^[23-27]，从而使细胞阻滞于 G₂/M 期。另外，葫芦素 B 作用于急性髓系白血病时可通过多种通路，其中 PI3K/Akt 信号通路是肿瘤中的主要信号通路^[28-29]，也是急性髓系白血病内异常升高的细胞通路之一，其活化可促进细胞增殖，抑制细胞凋亡，为本病的不良预后因素^[30]，还可降低 PI3K p110、p-Akt 蛋白表达，从而抑制 PI3K/Akt 信号通路活化。

综上所述，葫芦素 B 与急性髓系白血病相关靶点能稳定结合，并通过抑制 PI3K/Akt 通路活化诱导细胞凋亡和 G₂/M 期周期阻滞，增强临床化疗药物功效，本研究可为葫芦素 B 在急性髓系白血病中的潜在应用提供科学依据。

参考文献:

[1] Shimony S, Stahl M, Stone R M. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management[J]. *Am J Hematol*, 2023, 98(3): 502-526.

[2] Miller K D, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(5): 409-436.

[3] 刘金坤, 应 敏, 王 琴, 等. 中药成分诱导肿瘤细胞自噬的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(3): 207-215.

[4] Toyofuku M, Fujinaga D, Inaba K, et al. The plant-derived triterpenoid, cucurbitacin B, but not cucurbitacin E, inhibits the developmental transition associated with ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*[J]. *J Insect Physiol*, 2021, 134: 104294.

[5] Chen Y F, Chen J, Zou Z Y, et al. Crosstalk between autophagy and metabolism: implications for cell survival in acute myeloid leukemia[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 46.

[6] Roman Diaz J L, Vazquez Martinez M, Khimani F. New approaches for the treatment of AML beyond the 7+3 regimen: current concepts and new approaches[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(3): 677.

[7] Luo H, Vong C T, Chen H B, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine[J]. *Chin Med*, 2019, 14: 48.

[8] Chen J C, Chiu M H, Nie R L, et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities[J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(3): 386-399.

[9] 许 康, 白 丽. 中药及中药提取物抗肿瘤研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(10): 54-59.

[10] 杨 凯, 郑 刚. 葫芦素 BE 的药理作用研究进展[J]. *国际中医中药杂志*, 2006, 28(1): 27-29.

[11] 张金芳, 张晓瑞, 郑敏思, 等. 葫芦素类化合物的药理作用研究进展[J]. *医药导报*, 2020, 39(12): 1710-1716.

[12] Hinz N, Jucker M. Distinct functions of Akt isoforms in breast

cancer: a comprehensive review[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 154.

[13] Chen B G, Li Y X, Li W, et al. Antitumor activity and mechanism of terpenoids in seaweeds based on literature review and network pharmacology[J]. *Adv Biol (Weinh)*, 2024, 8(3): e2300541.

[14] Shaban N, Kamashev D, Emelianova A, et al. Targeted inhibitors of EGFR: structure, biology, biomarkers, and clinical applications[J]. *Cells*, 2023, 13(1): 47.

[15] Pastwinska J, Karas K, Karwaciak I, et al. Targeting EGFR in melanoma—The sea of possibilities to overcome drug resistance[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(4): 188754.

[16] Barman J, Kumar R, Saha G, et al. Apoptosis: mediator molecules, interplay with other cell death processes and therapeutic potentials[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(8): 644-663.

[17] Braicu C, Zanoaga O, Zimta A A, et al. Natural compounds modulate the crosstalk between apoptosis- and autophagy-regulated signaling pathways: Controlling the uncontrolled expansion of tumor cells[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 80: 218-236.

[18] 喻婷婷, 徐 丽, 董超群, 等. 葫芦素 B 抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖和侵袭并促进其凋亡[J]. *肿瘤*, 2019, 39(4): 249-258.

[19] 于振源. 葫芦素 B 作用于口腔鳞状细胞癌的网络药理学分析及实验研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2022.

[20] Tait S W G, Green D R. Mitochondrial regulation of cell death[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(9): a008706.

[21] 周敬凯. 葫芦素 B 对胰腺癌细胞杀伤作用及相关机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.

[22] 李 慧. 葫芦素 B 对急性淋巴细胞白血病 Reh 细胞的作用及机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2022.

[23] 唐加步, 姚运红, 欧阳 清, 等. 人乳腺癌端粒酶基因 RNA 与雌激素受体、细胞周期蛋白 B1、C-erbB-2 相关性研究[J]. *现代医药卫生*, 2021, 37(1): 30-33.

[24] 邹 晨, 乔凤杰, 方 森, 等. β-巯基酮酸对肝癌细胞的增殖和凋亡的影响及其机制[J/OL]. *基因组学与应用生物学*, 1-19(2023-11-09)[2025-02-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20231108.1507.002.html>.

[25] 邹晶晶, 郭敬强. 细胞周期蛋白 B2 基因在胰腺癌中表达的生物信息学分析[J]. *浙江医学*, 2023, 45(18): 1927-1931; 2018-2019.

[26] 李赞峰, 朱卿文, 吴 蔚, 等. IMP-3 和 cyclin B1 在鼻咽癌中的表达水平及临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2023, 38(11): 1777-1780.

[27] 张高山, 蒋青青, 陈 敏, 等. Nrf2 与 p53/p21 信号通路在肿瘤中作用的研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2023, 26(6): 549-555.

[28] Lawrence M S, Stojanov P, Mermel C H, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types[J]. *Nature*, 2014, 505(7484): 495-501.

[29] He Y, Sun M M, Zhang G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.

[30] Nepstad I, Hatfield K J, Gronningsaeter I S, et al. The PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2907.