

## 青蒿琥酯对急性髓系白血病细胞株 MV4-11 增殖凋亡的调控作用

赵小强, 吴雅莉, 张曼, 程英英, 杨海平

[河南科技大学第一附属医院(河南科技大学临床医学院)血液内科, 河南洛阳 471000]

**摘要:**【目的】探讨青蒿琥酯抗急性髓系白血病(AML)的作用。【方法】取对数生长期 AML 细胞株 MV4-11, 用不同浓度青蒿琥酯分别处理 24、48、72 h, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞增殖抑制率, 选择青蒿琥酯处理 48 h 对 MV4-11 细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)进行后续实验。将细胞随机分为对照组、青蒿琥酯组、复合物 C 组与青蒿琥酯+复合物 C 组, MTT 法测定细胞存活率, 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡情况, 定量聚合酶链反应(qPCR)法检测细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的 mRNA 水平, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测细胞腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路相关蛋白的表达水平。【结果】青蒿琥酯可以抑制 MV4-11 细胞增殖, 呈时间、剂量依赖性, 处理 48、72 h 对 MV4-11 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 1.58、1.39 μg/mL。与对照组比较, 青蒿琥酯组细胞存活率降低, 凋亡率升高, G0/G1 期细胞增加, S 期、G2/M 期细胞减少, Bax mRNA 相对表达量升高, Bcl-2 mRNA 相对表达量降低, p-AMPK、Bax 蛋白表达水平上调, p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达水平下调(均  $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 复合物 C 组细胞存活率升高, 凋亡率降低, G0/G1 期细胞减少, S 期、G2/M 期细胞增加, Bax mRNA 相对表达量降低, Bcl-2 mRNA 相对表达量升高, p-AMPK、Bax 蛋白表达水平下调, p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达水平上调(均  $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 青蒿琥酯+复合物 C 组 p-AMPK 蛋白表达水平上调, p-mTOR 蛋白表达水平下调(均  $P < 0.05$ )。与青蒿琥酯组比较, 复合物 C 组与青蒿琥酯+复合物 C 组细胞存活率升高, 凋亡率降低, G0/G1 期细胞减少, S 期、G2/M 期细胞增加, Bax mRNA 相对表达量降低, Bcl-2 mRNA 相对表达量升高, p-AMPK、Bax 蛋白表达水平下调, p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达水平上调(均  $P < 0.05$ )。与复合物 C 组比较, 青蒿琥酯+复合物 C 组细胞存活率降低, 凋亡率升高, G0/G1 期细胞增加, S 期、G2/M 期细胞减少, Bax mRNA 相对表达量升高, Bcl-2 mRNA 相对表达量降低, p-AMPK、Bax 蛋白表达水平上调, p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达水平下调(均  $P < 0.05$ )。【结论】青蒿琥酯对 MV4-11 细胞具有抑制增殖、诱导凋亡的作用, 其机制可能与激活 AMPK 信号通路有关。

**关键词:** 青蒿琥酯; 急性髓系白血病; 细胞增殖; 凋亡; AMPK 信号通路; MV4-11 细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)03-0631-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtc.2022.03.028

## Regulation and Control of Proliferation and Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cell Line MV4-11 by Artesunate

ZHAO Xiao-Qiang, WU Ya-Li, ZHANG Man,  
CHENG Ying-Ying, YANG Hai-Ping

[Dept. of Hematology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology (Clinical Medical School, Henan University of Science and Technology), Luoyang 471000 Henan, China]

**Abstract: Objective** To investigate the effect of artesunate against acute myeloid leukemia (AML). **Methods** The AML cell line MV4-11 at logarithmic growth phase was treated with different concentrations of artesunate for 24, 48 and 72 h. The cell proliferation inhibition rate was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, and the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of artesunate treatment for 48 h on MV4-11 cells was selected for subsequent tests. Cells were randomly divided into control group, artesunate group, compound C group and artesunate+compound C group. Cell survival was measured by MTT, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry (FCM), mRNA levels of B-lymphoma-2 gene (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and the expression levels of adenosine-activated

收稿日期: 2021-04-09

作者简介: 赵小强(1980-), 男, 医学博士, 副主任医师; E-mail: hhx\_77@163.com

基金项目: 河南省医学科技攻关项目(编号: LHGJ20190546)

protein kinase (AMPK) signaling pathway related proteins were detected by Western Blot. **Results** Artesunate inhibited the proliferation of MV4-11 cells in a time- and dose-dependent manner, with  $IC_{50}$  of 1.58 and 1.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for MV4-11 cells at 48 h and 72 h of treatment respectively. Compared with the control group, the cell survival rate in the artesunate group was decreased, the apoptosis rate was increased, the G0/G1 phase cells were increased, the S and G2/M phase cells were decreased, the relative mRNA expression level of Bax was increased and the relative mRNA expression level of Bcl-2 was decreased, the protein expression level of p-AMPK and Bax was upregulated, and the protein expression levels of p-mTOR and Bcl-2 was downregulated ( $P < 0.05$ ); compared with the control group, the cell survival rate in compound C group was increased, and apoptosis rate was decreased, G0/G1 phase cells were decreased, S and G2/M phase cells were increased, relative mRNA expression level of Bax was decreased, relative mRNA expression level of Bcl-2 was increased, p-AMPK and Bax protein expression levels were downregulated, p-mTOR and Bcl-2 protein expression levels were upregulated ( $P < 0.05$ ); compared with the control group, the p-AMPK protein expression level was upregulated and p-mTOR protein expression level was downregulated ( $P < 0.05$ ) in artesunate+compound C group. Compared with the artesunate group, the cell survival rate in compound C group and artesunate+compound C group was increased, and the apoptosis rate was decreased, the G0/G1 phase cells were decreased and the S and G2/M phase cells were increased ( $P < 0.05$ ), the relative mRNA expression level of Bax was decreased, the relative mRNA expression level of Bcl-2 was increased, the protein expression levels of p-AMPK and Bax were downregulated and the protein expression levels of p-mTOR and Bcl-2 were upregulated ( $P < 0.05$ ). Compared with the compound C group, the cell survival rate of artesunate+compound C group was decreased, the apoptosis rate was increased, the G0/G1 phase cells were increased, the S phase and G2/M phase cells were decreased, the relative mRNA expression level of Bax was increased, the relative mRNA expression level of Bcl-2 was decreased, the protein expression levels of p-AMPK and Bax were upregulated, the protein expression levels of p-mTOR and Bcl-2 were downregulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Artesunate inhibits proliferation and induces apoptosis in MV4-11 cells, and the mechanism may be related to the activation of AMPK signaling pathway.

**Keywords:** artesunate; acute myeloid leukemia(AML); cell proliferation; apoptosis; AMPK signaling pathway; MV4-11 cells

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种血液系统恶性肿瘤,占急性白血病的20%~25%,是由骨髓造血前体细胞的分化受阻和恶性克隆引起的过度增殖从而导致的骨髓衰竭,具有恶性增殖、克隆进化、遗传异质性等特征<sup>[1-2]</sup>。目前,AML的临床治疗主要是化疗及自体 and 异基因造血干细胞移植,但多数患者治疗缓解后出现复发、耐药,仅有40%~45%的年轻患者和不足10%的老年患者生存期超过5年<sup>[3]</sup>。因此,亟需开发新型、低毒和高效的药物治疗AML。青蒿素是从中药青蒿(菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L.的全草)中提取的一种含过氧基团的倍半萜内酯,青蒿琥酯(artesanate)是其衍生物。青蒿琥酯具有抗疟、抗感染、抗血管生成、抗脓毒症、免疫调节及抗

肿瘤等功效<sup>[4]</sup>。近年研究显示,青蒿琥酯对乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌及淋巴瘤具有抑制作用<sup>[5-9]</sup>。既往体外、体内实验研究均显示,青蒿琥酯对白血病细胞系及小鼠移植瘤具有明显抑制作用<sup>[10]</sup>。本研究以AML细胞株MV4-11为实验对象,探讨青蒿琥酯的治疗作用及机制,以期为青蒿琥酯相关药物的研发及AML的临床治疗提供参考,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方 法

1.1 细胞株 人AML细胞株MV4-11,购自中国科学院(上海)细胞库。细胞以含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的IMDM培养液在37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。1周2次半换液传代培养。

**1.2 药物、试剂与仪器** 注射用青蒿琥酯(广西桂林南药股份有限公司生产,国药准字H20133237);复合物C(美国Sigma公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)(美国Sigma公司);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司);引物(由上海生工生物工程股份有限公司合成);兔抗人腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抗体、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)抗体(美国Upstate公司);兔抗人B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体和 $\beta$ -actin抗体(美国Santa Cruz公司);山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白(IgG)(英国Abcam公司)。酶标仪(美国BioTek公司);流式细胞仪(美国BD公司);荧光定量PCR仪、蛋白凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.3 观察指标与方法

**1.3.1 MTT法检测细胞增殖能力** 取对数生长期MV4-11细胞,以 $1 \times 10^5$ 个/mL的细胞密度接种于96孔板,每孔180  $\mu$ L。加入不同浓度青蒿琥酯(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0  $\mu$ g/mL)20  $\mu$ L,对照组加入等体积培养液,每组设置3个复孔。培养24、48、72 h后,每孔加入MTT(5 mg/mL)20  $\mu$ L,孵育4 h。终止培养,每孔加入DMSO 150  $\mu$ L,微振荡10 min。应用酶标仪检测各孔490 nm波长的吸光度(OD)值。实验重复3次。计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%)=(对照组OD值-实验组OD值)/对照组OD值 $\times$ 100%。采用Graphpad Prism 7.0软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。选择作用48 h的IC<sub>50</sub>作为后续实验的干预浓度。设置对照组、青蒿琥酯组、复合物C组和青蒿琥酯+复合物C组,青蒿琥酯组、复合物C组分别加入1.58  $\mu$ g/mL青蒿琥酯、50  $\mu$ mol/L复合物C,青蒿琥酯+复合物C组先后加入1.58  $\mu$ g/mL青蒿琥酯和50  $\mu$ mol/L复合物C,对照组加入等体积细胞培养液,均作用48 h,按照上述MTT法检测细胞存活率,细胞存活率(%)=实验组OD值/对照组OD值 $\times$ 100%。

**1.3.2 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡** 收集对照组、青蒿琥酯组、复合物C组和青蒿琥酯+复合物C组细胞。以1 000 r/min(离心半径10 cm)离心5 min,弃上清,收集细胞沉淀;用预冷1 $\times$ PBS

(4  $^{\circ}$ C)洗涤2次,加入预冷体积分数75%乙醇,4  $^{\circ}$ C固定18 h,离心弃上清;PBS洗涤3次,加入RNA酶(Rnase)PI染色液37  $^{\circ}$ C避光染色30 min。上流式细胞仪检测,Modfit软件分析细胞周期。实验重复3次。

收集各组细胞,以2 000 r/min(离心半径15 cm)离心5 min,用预冷1 $\times$ PBS(4  $^{\circ}$ C)重悬细胞,以2 000 r/min离心5 min,洗涤细胞2次;加入300  $\mu$ L的1 $\times$ Binding Buffer悬浮细胞,加入5  $\mu$ L的Annexin V-FITC避光室温孵育15 min;上机前5 min加入5  $\mu$ L的PI避光染色标记,上流式细胞仪检测,CellQuest软件分析细胞凋亡。实验重复3次。

**1.3.3 定量聚合酶链反应(qPCR)法检测细胞Bcl-2、Bax mRNA水平** 收集各组细胞,PBS清洗细胞2次,TRIzol试剂提取总RNA,超微量分光光度计测定其浓度及OD(260 nm)/OD(280 nm)。反转录反应体系:5 $\times$ Mix 4  $\mu$ L,RNA 1  $\mu$ g,加DEPC-H<sub>2</sub>O至20  $\mu$ L。反转录反应程序:25  $^{\circ}$ C,10 min;42  $^{\circ}$ C,30 min;85  $^{\circ}$ C,5 min。反转录产物稀释到1 mL。按照PCR试剂盒配制反应体系后进行反应,反应程序:95  $^{\circ}$ C预变性60 s;95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,15 s;72  $^{\circ}$ C,45 s,共循环40次。待测基因qPCR引物使用Primer 3.0设计,序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因mRNA相对表达水平。

表1 qPCR引物序列

Table 1 Primer sequence for qPCR assay

基因	引物序列	扩增长度/bp
$\beta$ -actin	Forward 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	125
	Reverse 5'-CCTGCCCCTAAGAGCCTTCC-3'	
Bcl-2	Forward 5'-GGTGGGTGTCATGTGTGG-3'	156
	Reverse 5'-CGGTCAGGTAAGTCACTCATCC-3'	
Bax	Forward 5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3'	192
	Reverse 5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'	

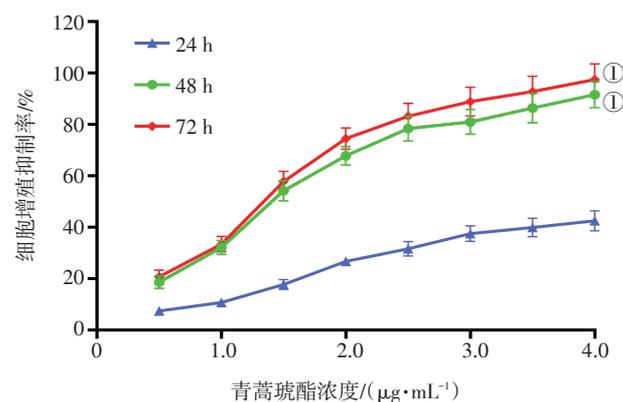
**1.3.4 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测细胞AMPK通路相关蛋白的表达** 收集各组细胞,PBS清洗2次,提取总蛋白,用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒定量,蛋白变性;10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,用湿式转膜仪将其转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上;加入50 g/L脱脂牛奶室温封闭1 h后,分别加入一抗稀释液AMPK(1:500)、p-AMPK(1:200)、mTOR(1:500)、p-mTOR(1:200)、Bcl-2(1:

200)、Bax(1:200)、 $\beta$ -actin(1:1 000)4℃孵育过夜, TBST洗膜10 min×3次;再用HRP标记的二抗(1:2 000稀释)室温孵育1 h, TBST洗膜10 min×3次;用电化学发光(ECL)法于暗室中显影,应用ImageJ软件分析蛋白条带。以目的蛋白条带灰度值/内参 $\beta$ -actin蛋白条带灰度值的比值,作为目的蛋白相对表达水平。

1.4 统计方法 采用SPSS 24.0统计软件进行数据分析,所有实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 青蒿琥酯对MV4-11细胞生长的抑制作用 图1结果显示:1.0、2.0、3.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯处理24、48、72 h后, MV4-11细胞生长受到抑制,随着青蒿琥酯浓度升高、作用时间延长,细胞增殖抑制率逐渐升高。青蒿琥酯作用48、72 h对MV4-11细胞的 $\text{IC}_{50}$ 分别为1.58、1.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。后续实验选取1.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青蒿琥酯进行干预。



① $P < 0.05$ , 与24 h比较

图1 青蒿琥酯对MV4-11细胞生长的抑制作用  
Figure 1 Inhibition of artesunate on growth of MV4-11 cells

2.2 各组MV4-11细胞存活率比较 表2显示:细胞存活率组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,青蒿琥酯组细胞存活率降低,复合物C组细胞存活率升高( $P < 0.05$ );与青蒿琥酯组比较,复合物C组、青蒿琥酯+复合物C组细胞存活率升高( $P < 0.05$ );与复合物C组比较,青蒿琥酯+复合物C组细胞存活率降低( $P < 0.05$ )。

表2 各组MV4-11细胞存活率比较

Table 2 Comparison of MV4-11 cell survival rate among various groups ( $\bar{x} \pm s; n = 3$ )

组别	细胞存活率/%
对照组	100
青蒿琥酯组	51.67 ± 2.84 <sup>①</sup>
复合物C组	131.24 ± 2.36 <sup>②③</sup>
青蒿琥酯+复合物C组	98.26 ± 1.76 <sup>②③</sup>
F值	578.322
P值	<0.001

① $P < 0.05$ , 与对照组比较; ② $P < 0.05$ , 与青蒿琥酯组比较; ③ $P < 0.05$ , 与复合物C组比较

2.3 各组MV4-11细胞周期比较 表3结果显示:G0/G1期、S期与G2/M期细胞组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,青蒿琥酯组G0/G1期、G2/M期细胞增加, S期细胞减少( $P < 0.05$ ),复合物C组G0/G1期、G2/M期细胞减少, S期细胞增加( $P < 0.05$ );与青蒿琥酯组比较,复合物C组、青蒿琥酯+复合物C组G0/G1、G2/M期细胞期细胞减少, S期细胞增加( $P < 0.05$ );与复合物C组比较,青蒿琥酯+复合物C组G0/G1期、G2/M期细胞增加, S期细胞减少( $P < 0.05$ )。

表3 各组MV4-11细胞周期比较

Table 3 Comparison of MV4-11 cell cycle in various groups ( $\bar{x} \pm s, \%; n = 3$ )

组别	G0/G1期	S期	G2/M期
对照组	28.96 ± 1.24	37.83 ± 1.98	33.21 ± 1.36
青蒿琥酯组	53.47 ± 3.76 <sup>①</sup>	8.85 ± 0.76 <sup>①</sup>	37.68 ± 1.79 <sup>①</sup>
复合物C组	18.58 ± 1.52 <sup>②③</sup>	59.47 ± 2.37 <sup>②③</sup>	21.95 ± 1.47 <sup>②③</sup>
青蒿琥酯+复合物C组	31.24 ± 1.85 <sup>②③</sup>	36.62 ± 2.07 <sup>②③</sup>	32.14 ± 2.32 <sup>②③</sup>
F值	98.535	358.705	245.989
P值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$ , 与对照组比较; ② $P < 0.05$ , 与青蒿琥酯组比较; ③ $P < 0.05$ , 与复合物C组比较

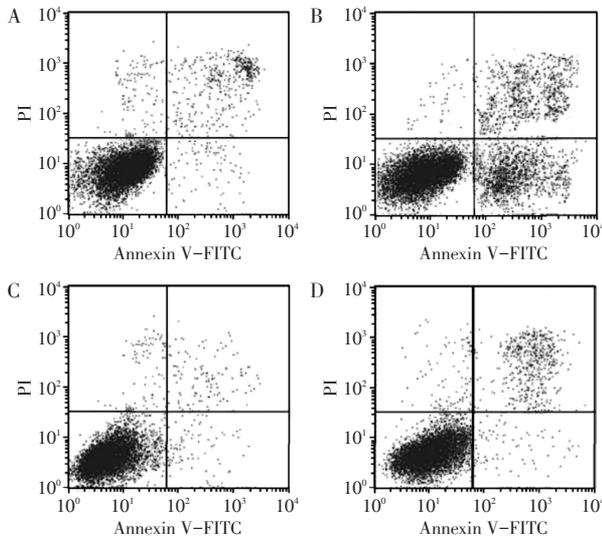
2.4 各组MV4-11细胞凋亡率比较 表4、图2显示:细胞凋亡率组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,青蒿琥酯组细胞凋亡率升高,复合物C组细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ );与青蒿琥酯组比较,复合物C组、青蒿琥酯+复合物C组细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ );与复合物C组比较,青蒿琥酯+复合物C组细胞凋亡率升高( $P < 0.05$ )。

表4 各组 MV4-11 细胞凋亡率比较

Table 4 Comparison of apoptosis rate of MV4-11 cells in various groups ( $\bar{x} \pm s; n = 3$ )

组别	细胞凋亡率/%
对照组	6.24 ± 1.43
青蒿琥酯组	47.89 ± 1.52 <sup>①</sup>
复合物C组	1.31 ± 0.86 <sup>①②</sup>
青蒿琥酯+复合物C组	7.43 ± 1.25 <sup>②③</sup>
F值	841.861
P值	< 0.001

①P < 0.05, 与对照组比较; ②P < 0.05, 与青蒿琥酯组比较; ③P < 0.05, 与复合物C组比较



A. 对照组; B. 青蒿琥酯组; C. 复合物C组; D. 青蒿琥酯+复合物C组

图2 各组 MV4-11 细胞凋亡流式散点图

Figure 2 Flow cytometry scatter diagram of apoptosis of MV4-11 cells in various groups

2.5 各组 MV4-11 细胞中 Bcl-2、Bax mRNA 水平比较

表5结果显示: 各组细胞 Bcl-2、Bax mRNA 相对表达量组间比较, 差异有统计学意义(P < 0.05)。与对照组比较, 青蒿琥酯组 Bax mRNA 相对表达量升高, Bcl-2 mRNA 相对表达量降低(均 P < 0.05), 复合物C组 Bax mRNA 相对表达量降低, Bcl-2 mRNA 相对表达量升高(均 P < 0.05); 与青蒿琥酯组比较, 复合物C组、青蒿琥酯+复合物C组 Bax mRNA 相对表达量降低, Bcl-2 mRNA 相对表达量升高(均 P < 0.05); 与复合物C组比较, 青蒿琥酯+复合物C组 Bax mRNA 相对表达量升高, Bcl-2 mRNA 相对表达量降低(均 P < 0.05)。

2.6 各组 MV4-11 细胞 AMPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

表6、图3结果显示: 各组细胞 p-AMPK、p-mTOR、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平组间比较, 差异有统计学意义(均 P < 0.05)。与对照组比较, 青蒿琥酯组 p-AMPK、Bax 蛋白表达上

表5 各组 MV4-11 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 水平比较

Table 5 Comparison of Bcl-2 and Bax mRNA levels in MV4-11 cells in various groups ( $\bar{x} \pm s; n = 3$ )

组别	Bcl-2 mRNA 相对表达量	Bax mRNA 相对表达量
对照组	5.02 ± 0.36	3.47 ± 0.08
青蒿琥酯组	2.74 ± 0.14 <sup>①</sup>	5.02 ± 0.41 <sup>①</sup>
复合物C组	7.69 ± 0.65 <sup>①②</sup>	2.36 ± 0.12 <sup>①②</sup>
青蒿琥酯+复合物C组	4.38 ± 0.17 <sup>②③</sup>	3.58 ± 0.13 <sup>②③</sup>
F值	58.468	61.493
P值	< 0.001	< 0.001

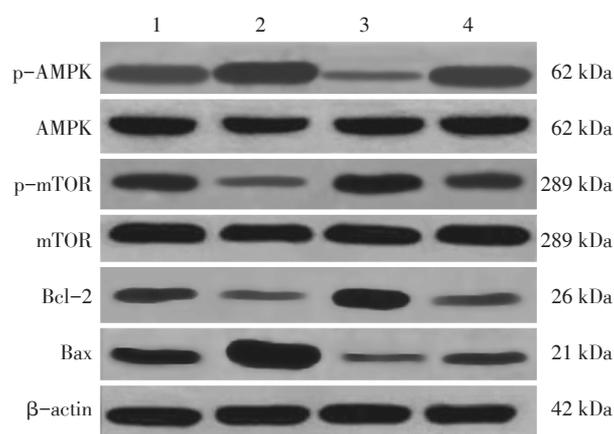
①P < 0.05, 与对照组比较; ②P < 0.05, 与青蒿琥酯组比较; ③P < 0.05, 与复合物C组比较

表6 各组 MV4-11 细胞 AMPK 通路相关蛋白表达水平比较

Table 6 Comparison of expression levels of AMPK pathway-related proteins in MV4-11 cells in various groups ( $\bar{x} \pm s; n = 3$ )

组别	p-AMPK 蛋白 相对表达量	AMPK 蛋白 相对表达量	p-mTOR 蛋白 相对表达量	mTOR 蛋白 相对表达量	Bcl-2 蛋白 相对表达量	Bax 蛋白 相对表达量
对照组	0.83 ± 0.03	1.16 ± 0.12	0.98 ± 0.06	1.28 ± 0.11	0.72 ± 0.09	0.72 ± 0.04
青蒿琥酯组	1.02 ± 0.02 <sup>①</sup>	1.15 ± 0.05	0.49 ± 0.07 <sup>①</sup>	1.04 ± 0.18	0.48 ± 0.02 <sup>①</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>①</sup>
复合物C组	0.32 ± 0.02 <sup>①②</sup>	1.10 ± 0.11	1.13 ± 0.01 <sup>①②</sup>	1.17 ± 0.09	0.97 ± 0.12 <sup>①②</sup>	0.63 ± 0.03 <sup>①②</sup>
青蒿琥酯+复合物C组	0.94 ± 0.04 <sup>①②③</sup>	1.09 ± 0.15	0.71 ± 0.07 <sup>①②③</sup>	1.22 ± 0.12	0.61 ± 0.06 <sup>②③</sup>	0.80 ± 0.07 <sup>②③</sup>
F值	360.333	0.287	71.769	1.891	43.094	44.759
P值	< 0.001	0.77	< 0.001	0.21	< 0.001	< 0.001

①P < 0.05, 与对照组比较; ②P < 0.05, 与青蒿琥酯组比较; ③P < 0.05, 与复合物C组比较



1. 对照组；2. 青蒿琥酯组；3. 复合物 C 组；4. 青蒿琥酯+复合物 C 组

图3 各组 MV4-11 细胞 AMPK 通路相关蛋白电泳条带比较  
Figure 3 Comparison of electrophoretic band size of AMPK pathway-related proteins in various groups

调，p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达下调(均  $P < 0.05$ )，复合物 C 组 p-AMPK、Bax 蛋白表达下调，p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达上调(均  $P < 0.05$ )，青蒿琥酯+复合物 C 组 p-AMPK 蛋白表达上调，p-mTOR 蛋白表达下调(均  $P < 0.05$ )；与青蒿琥酯组比较，复合物 C 组、青蒿琥酯+复合物 C 组 p-AMPK、Bax 蛋白表达下调，p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达上调(均  $P < 0.05$ )；与复合物 C 组比较，青蒿琥酯+复合物 C 组 p-AMPK、Bax 蛋白表达上调，p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达下调(均  $P < 0.05$ )；AMPK、mTOR 蛋白表达各组组间比较，差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

据统计，全球范围内白血病死亡率位于恶性肿瘤中前 10 位，急性髓系白血病(AML)的成人发病率最高，儿童位居第二，占儿童白血病死亡率 50% 以上<sup>[11]</sup>。AML 的发病机制主要是造血干细胞或髓系造血祖细胞分化受阻导致幼稚造血细胞恶性增生，未成熟的髓细胞增殖失控、分化障碍、凋亡受阻，大量蓄积于骨髓及其他造血组织，抑制骨髓的正常造血功能。临床表现为贫血、发热、出血、白细胞减少导致的感染以及肝脾淋巴结肿大等<sup>[12]</sup>。目前，标准的化学疗法可治愈 40% ~ 45% 的年轻 AML 患者和 10% ~ 20% 的成年 AML 患者，但对于复发及难治性疾病的患者，治愈率不超过 10%，异基因造血干细胞移植是这些患者治愈的唯

一希望，然而手术价格昂贵，排异反应大，术后复发率高，且常伴有系列并发症等局限性<sup>[13]</sup>。常规化学药物毒性高、副作用大、机体容易产生耐药性。因此，需要寻找不同的温和、高效药物对其进行联合治疗。

青蒿琥酯是我国经典的一线抗疟药物，具有多种生物学活性，且毒副作用小、易耐受、与中药不产生交叉耐药。研究表明，青蒿琥酯具有抗肿瘤特性<sup>[14-15]</sup>，对多种急性白血病细胞株包括耐药细胞株均具有抑制增殖和促进凋亡的作用<sup>[16]</sup>，但其作用机制研究较少。本研究观察青蒿琥酯对 AML 细胞株 MV4-11 增殖凋亡的影响，结果显示，青蒿琥酯对 AML 细胞株 MV4-11 的增殖具有抑制作用，增殖抑制率呈现时间、剂量依赖性。流式细胞分析实验结果表明，青蒿琥酯可以阻滞 MV4-11 细胞的 G0/G1、G2/M 期，诱导细胞凋亡。

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路与细胞增殖、分化、凋亡等多个生物学过程密切相关，参与肿瘤的发生发展过程，调节 AMPK 通路，可促进 AML 分化和阻断增殖<sup>[17]</sup>。AMPK 是一个异源三聚体蛋白，内含一个催化性  $\alpha$  亚单位和调节性  $\beta$ 、 $\gamma$  亚单位，AMP 结合到  $\gamma$  亚单位后，使苏氨酸 172 位点变成更易磷酸化的底物，变构激活复合体，造成胞内钙离子水平发生变化<sup>[18]</sup>。AMPK 可对 ATP 低水平做出反应，可对补充细胞 ATP 供应的信号转导通路进行正向调控<sup>[19]</sup>，是能量代谢调节的关键分子，对肿瘤细胞的生长、增殖、自噬、凋亡、侵袭转移和极性调控方面具有重要影响。Zhou 等<sup>[20]</sup>研究表明，青蒿琥酯通过上调 ROS 并激活人膀胱癌细胞中的 AMPK-mTOR 信号通路诱导自噬依赖性细胞凋亡。Xiao 等<sup>[21]</sup>研究显示，青蒿琥酯通过激活 AMPK/mTOR 途径抑制口腔鳞状癌细胞增殖。本研究取对数生长期 MV4-11 细胞，经青蒿琥酯、AMPK 通路阻断剂复合物 C 及青蒿琥酯联合复合物 C 处理后检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平，AMPK、Bcl-2、Bax 蛋白表达及 AMPK、mTOR 磷酸化水平。结果显示，青蒿琥酯可以上调 MV4-11 细胞 Bax mRNA 的转录和 p-AMPK、Bax 蛋白的表达，下调 Bcl-2 mRNA 的转录和 p-mTOR、Bcl-2 蛋白的表达，AMPK 通路阻断剂复合物 C 则呈相反的作用效果，阻断剂和青蒿琥酯同时处理后，阻断剂对相关基

因转录和蛋白表达的促进或抑制作用被逆转,提示青蒿琥酯通过调控 AMPK 信号通路抑制 AML 细胞株 MV4-11 的增殖,诱导其凋亡。

综上所述,青蒿琥酯可以抑制 MV4-11 细胞的增殖,诱导其凋亡,其作用机制可能与激活 AMPK 信号通路,调控细胞增殖凋亡相关基因的表达有关,此为青蒿琥酯相关药物的研发及应用于 AML 的临床治疗提供了理论支持。

#### 参考文献:

- [1] HASSERJIAN R P, CAMPIGOTTO F, KLEPEIS V, et al. De novo acute myeloid leukemia with 20% - 29% blasts is less aggressive than acute myeloid leukemia with  $\geq 30\%$  blasts in older adults: a Bone Marrow Pathology Group study[J]. *Am J Hematol*, 2014, 89(11): E193-199.
- [2] DAVER N, SCHLENK R F, RUSSELL N H, et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence[J]. *Leukemia*, 2019, 33(2): 299-312.
- [3] SIVEEN K S, UDDIN S, MOHAMMAD R M. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 13.
- [4] 马里程, 农晓琳. 青蒿琥酯抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2020, 27(11): 921-926.
- [5] PIRALI M, TAHERI M, ZAREIS, et al. Artesunate, as a HSP70 ATPase activity inhibitor, induces apoptosis in breast cancer cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 3369-3375.
- [6] YAO X, ZHAO C R, YIN H, et al. Synergistic antitumor activity of sorafenib and artesunate in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1609-1620.
- [7] ISHIKAWA C, SENBA M, MORI N. Evaluation of artesunate for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872: 172953.
- [8] 王敏, 骆海娟, 林瑛. 青蒿琥酯/顺铂-紫杉醇对卵巢癌化疗的临床研究[J]. *西北药学杂志*, 2016, 31(5): 517-519.
- [9] 胡碧辉, 高元喜. 青蒿琥酯对子宫内膜癌细胞增殖抑制的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(12): 1676-1678.
- [10] FOX J M, MOYNIHAN J R, MOTT B T, et al. Artemisinin-derived dimer ART-838 potently inhibited human acute leukemias, persisted in vivo, and synergized with antileukemic drugs[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7268-7279.
- [11] 张静, 何欢, 曾雪倩, 等. 急性髓系白血病耐药相关信号通路的研究进展[J]. *河北医学*, 2021, 27(1): 167-170.
- [12] 董新怡, 范秋月, 邱树涵, 等. 受体酪氨酸激酶抑制剂在急性髓系白血病中的临床应用概况[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(12): 1665-1671.
- [13] BOSE P, VACHHANI P, CORTES J E. Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(3): 17.
- [14] WARSAME M, HASSAN A H, HASSAN A M, et al. Efficacy of artesunate + sulphadoxine/pyrimethamine and artemether + lumefantrine and dhfr and dhps mutations in Somalia: evidence for updating the malaria treatment policy[J]. *Trop Med Int Health*, 2017, 22(4): 415-422.
- [15] VON HAGENS C, WALTER-SACK L, GOECKEN-JAN M, et al. Prospective open uncontrolled phase I study to define a well-tolerated dose of oral artesunate as add-on therapy in patients with metastatic breast cancer (ARTIC M33/2)[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 164(2): 359-369.
- [16] FOX J M, MOYNIHAN J R, MOTT B T, et al. Artemisinin-derived dimer ART-838 potently inhibited human acute leukemias, persisted in vivo, and synergized with antileukemic drugs[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7268-7279.
- [17] VISNJIC D, DEMBITZ V, LALIC H. The role of AMPK/mTOR modulators in the therapy of acute myeloid leukemia[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(12): 2208-2229.
- [18] MYERS J N, OSMAN A A, DEMBITZ V. The ribonucleoside AICAr induces differentiation of myeloid leukemia by activating the ATR/Chk1 via pyrimidine depletion[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(42): 15257-15270.
- [19] RAUD B, ROY D G, DIVAKARUNI A S, et al. Etomoxir actions on regulatory and memory T cells are independent of Cpt1a-mediated fatty acid oxidation[J]. *Cell Metab*, 2018, 28(3): 504-515.
- [20] ZHOU X, CHEN Y, WANG F, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 331: 109273.
- [21] XIAO Q, YANG L, HU H, et al. Artesunate targets oral tongue squamous cell carcinoma via mitochondrial dysfunction-dependent oxidative damage and Akt/AMPK/mTOR inhibition[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52(2): 113-121.

【责任编辑: 侯丽颖】