［文章编号］ 1671-587X(2024)04-0908-09 DOI:10. 13481/j. 1671-587X. 20240404

尿石素C对人急性髓系白血病HL-60细胞增殖、凋亡和自噬的影响及其机制

于国兴[1,2]，张 鑫[1,2]，杜恒玮[3]，崔冰洁[2]，高 娜[1]，刘翠兰[2]，杜 静[2]
（1. 滨州医学院附属医院血液内科，山东 滨州 256603；2. 滨州医学院附属医院医学研究中心，山东 滨州 256603；3. 滨州医学院附属医院妇科，山东 滨州 256603）

［摘 要］ **目的**：探讨尿石素C（UC）对急性髓系白血病（AML）HL-60细胞增殖、凋亡和自噬的影响，阐明其相关作用机制。**方法**：HL-60细胞分为不同浓度（0、20、40、60、80及100 μmol·L^{-1}）尿石素A（UA）、尿石素B（UB）和UC组，采用CCK-8法检测各组细胞增殖活性，光学显微镜观察不同浓度UC组细胞形态表现；HL-60细胞分为不同浓度（0、20、40及80 μmol·L^{-1}）UC组和3-甲基腺嘌呤（3-MA）联合不同浓度（0、20、40及80 μmol·L^{-1}）UC组，采用CCK-8法检测各组细胞增殖活性。HL-60细胞分为对照组和不同浓度（20、40及80 μmol·L^{-1}）UC组，采用活/死细胞染色法检测各组死细胞率，流式细胞术检测各组细胞凋亡率，细胞自噬染色检测试剂盒［单丹磺酰戊二胺（MDC）法］检测各组细胞自噬情况，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测各组细胞中苄氯素1（Beclin 1）、自噬相关蛋白9（ATG9）和自噬相关蛋白7（ATG7）mRNA表达水平，Western blotting法检测各组细胞中含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3（Caspase-3）、活化的Caspase-3（Cleaved Caspase-3）、微管相关蛋白1轻链3（LC-3）、细胞外信号调节激酶（ERK）、磷酸化ERK（p-ERK）、AMP依赖的蛋白激酶（AMPK）和磷酸化AMPK（p-AMPK）蛋白表达水平。**结果**：CCK-8法，培养24、48和72 h，分别与0 μmol·L^{-1} UA、UB和UC组比较，不同浓度UA、UB和UC组细胞增殖活性均降低（$P<0.05$或$P<0.01$），且呈浓度和时间依赖性；48 h时，与UA和UB比较，UC半数抑制浓度（IC_{50}）最低。细胞形态表现，与对照组比较，随着UC浓度升高，细胞间连接和细胞数量减少，细胞碎片增加。CCK-8法，与40和80 μmol·L^{-1} UC组比较，3-MA联合40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞增殖活性升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。活/死细胞染色，与对照组比较，40和80 μmol·L^{-1} UC组死细胞率升高（$P<0.01$）。流式细胞术，与对照组比较，80 μmol·L^{-1} UC组细胞凋亡率升高（$P<0.01$）。MDC法，与对照组比较，随着UC浓度升高，不同浓度UC组细胞绿色荧光逐渐增强。RT-qPCR法，与对照组比较，80 μmol·L^{-1} UC组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平升高（$P<0.01$）。Western blotting法，与对照组比较，20、40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞中Cleaved Caspase-3蛋白表达水平升高（$P<0.01$），80 μmol·L^{-1} UC组细胞中膜型LC3/胞浆型LC3（LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ）比值升高（$P<0.05$），40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞中p-AMPK/AMPK及p-ERK/ERK比值升高（$P<0.01$）。**结论**：UC可抑制人AML HL-60细胞增殖，诱导其细胞凋亡和自噬，并可提高细胞中ERK和AMPK蛋白磷酸化水平。

［关键词］ 尿石素C；白血病细胞；细胞增殖；细胞凋亡；细胞自噬
［中图分类号］ R733. 71; R979. 19 ［文献标志码］ A

［收稿日期］ 2023-08-28
［基金项目］ 国家自然科学基金项目（82373097）；国家自然科学基金青年基金项目（31900441）；山东省泰山学者青年专家和齐鲁卫生与健康杰出青年人才项目（tsqn202103191）；山东省卫健委中医药科技基金项目（Q-2022121）
［作者简介］ 于国兴（1990－），男，山东省青岛市人，医师，医学硕士，主要从事肿瘤发生发展机制和治疗方面的研究。
［通信作者］ 杜 静，研究员，硕士研究生导师（E-mail：djedith@126.com）；
刘翠兰，主管技师（E-mail：chouzi_19@163.com）

Effect of urolithin C on proliferation, apoptosis and autophagy of human acute myeloid leukemia HL-60 cells and its mechanism

YU Guoxing[1,2], ZHANG Xin[1,2], DU Hengwei[3], CUI Bingjie[2], GAO Na[1], LIU Cuilan[2], DU Jing[2]

(1. Department of Hematology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China;
2. Medical Research Center, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China;
3. Department of Gynecology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the effect of urolithin C (UC) on the proliferation, apoptosis, and autophagy of the acute myeloid leukemia (AML) HL-60 cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** The HL-60 cells were divided into different concentrations (20, 40, 60, 80, and 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$) of urolithin A (UA) groups, urolithin B (UB) groups, and UC groups. CCK-8 assay was used to detect the proliferation activity of the cells in various groups; the morphology of the cells in different concentrations of UC groups was observed under optical microscope. The HL-60 cells were divided into different concentrations (0, 20, 40, and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$) of UC groups and 3-methyladenine (3-MA) combined with different concentrations (0, 20, 40, and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$) of UC groups. CCK-8 assay was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups. The HL-60 cells were divided into control group (0 $\mu mol \cdot L^{-1}$) and different concentrations (20, 40, and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$) of UC groups. The live/dead cell staining method was used to detect the dead rates of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; the autophagy of the cells was detected by autophagy staining kit (monodansylcadaverine, MDC) method; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of Beclin 1, autophagy related gene 9 (ATG9), and autophagy related gene 7 (ATG7) mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Cleaved Caspase-3), microtubule-associated protein 1 light 3 (LC-3), extracellular regulated protein kinases (ERK), phosphorylated ERK (p-ERK), AMP-activated protein kinase (AMPK), and phosphorylated AMPK (p-AMPK) in the cells in various groups. **Results:** The CCK-8 assay results showed that after cultured for 24, 48, and 72 h, compared with 0 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UA, UB, and UC groups, the proliferation activities of the cells in different concentrations of UA, UB, and UC groups were decreased ($P<0.01$) with a concentration-and time-dependent manner; at 48 h, compared with UA and UB, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of UC was the lowest. The cell morphology observation results showed that compared with control group, the intercellular connection and the number of the cells were decreased with the increasing of UC concentration, and the cell fragment was increased. The CCK-8 assay results showed that compared with 40 and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC groups, the proliferation activities of the cells in 3-MA combined with 40 and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC groups were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The live/dead cell staining results showed that compared with control group, the dead rates of the cells in 40 and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC groups were increased ($P<0.01$). The flow cytometry results showed that compared with control group, the apoptotic rate of the cells in 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC group was increased ($P<0.01$). The MDC method results showed that with the increasing of UC concentration, the green fluorescence in the cells in different concentrations of UC groups was gradually intensified. The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of Beclin 1, ATG9, and ATG7 mRNA in the cells in 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC group were increased ($P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Cleaved Caspase-3 protein in the cells in 20, 40, and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC groups were increased ($P<0.01$), the ratio of membrane LC3 / cytoplasmic LC3 (LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ) in the cells in 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC group was increased ($P<0.05$), and the ratios of p-AMPK/AMPK and p-ERK/ERK in the cells in 40 and 80 $\mu mol \cdot L^{-1}$ UC groups were increased ($P<0.01$). **Conclusion**: UC can inhibit the proliferation of the AML HL-60 cells, induce the apoptosis and autophagy, and increase the phosphorylation levels of ERK and AMPK proteins in the cells.

KEYWORDS Urolithin C; Leukemia cell; Cell proliferation; Apoptosis; Cell autophagy

急性髓系白血病（acute myeloid leukemia，AML）是一种造血系统异常引起的血液系统恶性肿瘤，具有发病率高、发展迅速、侵袭性强、异质性高、生存期短和预后差等特征。AML是成人白血病最常见的形式，其发病率逐年上升，诊断的中位年龄为68岁，5年生存率仅为30.5%[1-2]。目前针对AML的治疗方式主要包括联合化疗、靶向治疗、造血干细胞移植和免疫疗法[3]，但针对耐药患者、老年患者和具有不良风险疾病特征的患者，仍需要探索新的治疗药物和方法。尿石素是鞣花单宁食物产生的肠道微生物代谢产物，包括尿石素A（urolithin A，UA）、尿石素B（urolithin B，UB）、尿石素C（urolithin C，UC）和尿石素D（urolithin D，UD），具有多种生物活性，包括抗炎、抗癌、降糖、抗衰老和心血管及神经保护作用[4]。细胞自噬和凋亡是程序性细胞死亡途径，细胞自噬和凋亡信号通路通过各种串扰机制相互连接调控肿瘤细胞活性，是许多抗癌药物作用的靶点[5]。在胆管癌中，UA可靶向丝氨酸/苏氨酸激酶（serine/threonine kinase，AKT）/WNK赖氨酸缺陷型蛋白激酶1（WNK lysine-deficient protein kinase 1，WNK1）轴诱导细胞自噬，发挥抗肿瘤作用[6]。UB和UC对细胞自噬的影响尚未见报道。UA和UB可通过改变白血病细胞代谢，诱导细胞凋亡，发挥抗白血病的作用[7]，但UC对白血病的作用尚未见相关报道。本研究以人AML HL-60细胞为研究对象，探讨UC对白血病细胞的作用，并初步阐明其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人AML HL-60细胞保存于滨州医学院附属医院医学研究中心。UA、UB、UC、细胞自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）、磷酸酶抑制剂Cocktail Ⅰ和Cocktail Ⅱ购于美国MCE公司，凋亡检测试剂盒、CCK-8试剂盒和活/死细胞活性/毒性检测试剂盒购于苏州优逸兰迪有限公司，抗α微管蛋白（α-tubulin）抗体和细胞自噬染色检测试剂盒购于北京碧云天生物技术有限公司，含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3（cysteinyl aspartate specific proteinase-3，Caspase-3）、活化的Caspase-3（Cleaved Caspase-3）、微管相关蛋白1轻链3（microtubule-associated protein 1 light 3，LC3）、细胞外信号调节激酶（extracellular regulated protein kinases，ERK）、磷酸化ERK（phosphorylated-ERK，p-ERK）、AMP依赖的蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）和磷酸化AMPK（phosphorylated-AMPK，p-AMPK）抗体购于美国CST公司，BCA蛋白浓度测定试剂盒购于上海博彩生物有限公司，RIPA裂解液购于北京索莱宝生物技术有限公司，特超敏ECL化学发光即用型底物购于武汉博士德生物有限公司，实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒购于苏州近岸蛋白有限公司，细胞总RNA提取试剂盒购于美国Omega公司，反转录试剂盒购于美国赛默飞公司，RPMI 1640培养基、胎牛血清和青-链霉素双抗购于上海逍鹏生物有限公司。二氧化碳细胞培养箱和生物安全柜购于新加坡Esco公司，全自动细胞计数仪购于上海睿钰生物科技有限公司，倒置显微镜购于日本Olympus公司，多功能微孔板检测仪购于美国安捷伦科技有限公司，流式细胞仪购于美国BD公司，微量紫外分光光度仪和高速离心机购于德国Eppendorf公司，荧光定量PCR仪和成像系统购于美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养、分组和处理 HL-60细胞在含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基中，置于37 ℃和5% CO_2的培养箱中培养。

1.3 CCK-8法检测不同浓度UA、UB和UC组HL-60细胞增殖活性 取对数期HL-60细胞接种于96孔细胞培养板，每孔接种5×10^3个细胞，分别用不同浓度（0、20、40、60、80及100 $\mu mol \cdot L^{-1}$）

UA、UB和UC分别处理24、48及72 h；取对数生长期HL-60细胞接种于96孔细胞培养板，每孔接种5×10^3个细胞，分为不同浓度（0、20、40和80 μmol·L^{-1}）UC组和3-MA联合不同浓度（0、20、40和80 μmol·L^{-1}）UC组，细胞经1 mmol·L^{-1} 3-MA预处理2 h后分别加用不同浓度（0、20、40和80 μmol·L^{-1}）UC处理48 h。离心去除培养基，每孔加入100 μL培养基和10 μL CCK-8试剂，37 ℃孵育2 h，酶标仪检测波长450 nm处的吸光度（A）值，计算各组细胞增殖活性，细胞增殖活性＝（实验组A值－空白组A值）/（对照组A值－空白组A值）；采用Graphad Prism 8.0.1统计软件计算UA、UB和UC的半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC_{50}）。

1.4 光学显微镜观察各组细胞形态表现 取对数生长期HL-60细胞接种于6孔细胞培养板，每孔接种6×10^5个细胞，分为对照组和不同浓度（20、40和80 μmol·L^{-1}）UC组，处理24 h后光学显微镜观察各组细胞形态表现。

1.5 活/死细胞染色法检测各组细胞中死细胞率

取对数生长期HL-60细胞接种于12孔细胞培养板中，每孔接种4×10^5个细胞。分别用0、20、40和80 μmol·L^{-1} UC处理18 h，0 μmol·L^{-1} UC组为对照组，300 g离心5 min收集各组细胞，加入2 μmol·L^{-1} Calcein AM和4.5 μmol·L^{-1}碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色工作液，混匀，室温孵育15 min，PBS缓冲液洗涤3次，荧光显微镜下观察各组细胞，并计算死细胞率。死细胞率＝死细胞数/（活细胞数＋死细胞数）×100％。

1.6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 取对数生长期HL-60细胞接种于6孔细胞培养板中，每孔接种6×10^5个细胞，分别用0、20、40和80 μmol·L^{-1} UC处理24 h，0 μmol·L^{-1} UC组为对照组，300 g离心5 min收集各组细胞，PBS缓冲液洗涤3次，加入200 μL PBS缓冲液重悬细胞，加入4 μL Annexin Ⅴ-FITC混匀，再加入5 μL PI混匀，避光孵育15 min后上机检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率＝早期细胞凋亡率＋晚期细胞凋亡率。

1.7 细胞自噬染色检测试剂盒[单丹磺酰戊二胺(monodansylcadaverine，MDC)法]检测各组细胞自噬情况 取对数生长期HL-60细胞接种于12孔细胞培养板中，每孔接种4×10^5个细胞，分别用0、20、40和80 μmol·L^{-1} UC处理24 h，0 μmol·L^{-1} UC组为对照组，300 g离心5 min收集细胞，加入Assay Buffer稀释后的1×MDC，在细胞培养箱中37 ℃避光孵育30 min。用Assay Buffer洗涤细胞3次。荧光显微镜下用紫外激发光激发，观察绿色荧光强度，即细胞自噬的特征性变化。

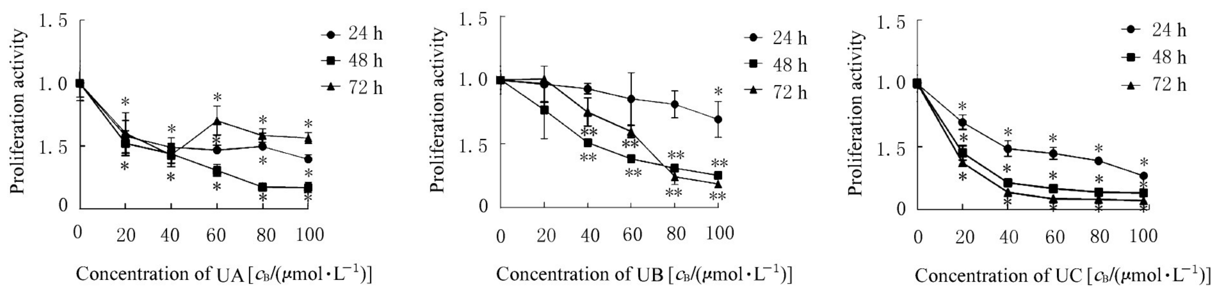
1.8 RT-qPCR法检测各组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平 HL-60细胞经0、20、40和80 μmol·L^{-1} UC处理24 h，0 μmol·L^{-1} UC组为对照组，离心收集各组细胞，用总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA，逆转录为cDNA作为qPCR模板。根据SYBR Green荧光定量试剂盒说明书进行荧光定量扩增，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组细胞中目的基因mRNA表达水平。引物序列：Beclin 1，上游引物5′-CCATGCAGGTGAGCTTCGT-3′，下游引物5′-G-AATCTGCGAGAGACACCATC-3′；ATG9，上游引物5′-CTGCCCTTCCGTATTGCAC-3′，下游引物5′-CTCACGTTTGTGGATGCAGAT-3′；ATG7，上游引物5′-CAGTTTGCCCCTTTTAGTAGTGC-3′，下游引物5′-CCAGCCGATACTCGTTCAGC-3′；GAPDH，上游引物5′-CTCCTCCTGTTCGACAGTCAGC-3′，下游引物5′-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3′。

1.9 Western blotting法检测各组细胞中Caspase-3、Cleaved Caspase-3、膜型LC3(LC3-Ⅱ)、胞浆型LC3(LC3-Ⅰ)、AMPK、ERK、p-AMPK和p-ERK蛋白表达水平 HL-60细胞经0、20、40和80 μmol·L^{-1} UC处理24 h，0 μmol·L^{-1} UC组为对照组，离心收集各组细胞，用含有蛋白酶抑制剂PMSF和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解细胞，提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度，加入上样缓冲液，100 ℃变性10 min。取20 μg蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳，湿转法将蛋白转至0.22 μm的PVDF膜，5％脱脂奶粉封闭，加入一抗4 ℃封闭过夜，经TBST洗涤后，加入二抗室温孵育1 h，经TBST洗涤后，加入ECL显影液进行显影。Image J软件进行灰度识别，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值；计算LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、p-AMPK/AMPK和p-ERK/ERK比值。

1.10 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0.1统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性、死细胞率和细胞凋亡率，各组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平，各组细胞中Caspase-3、 Cleaved Caspase-3蛋白表达水平及LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、p-AMPK/AMPK和p-ERK/ERK比值均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　不同浓度UA、UB和UC组细胞增殖活性及UA、UB和UC的IC_{50}值　培养24 h时，分别与0 μmol·L^{-1} UA、UB和UC组比较，不同浓度UA组和UC组及100 μmol·L^{-1} UB组细胞活性降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；48和72 h时，分别与0 μmol·L^{-1} UA、UB和UC组比较，不同浓度UA、UB和UC组细胞增殖活性均降低（$P<0.01$），且呈浓度和时间依赖性。UA、UB和UC作用于HL-60细胞48 h的IC_{50}值分别为18.25、28.91和16.14 μmol·L^{-1}。见图1。



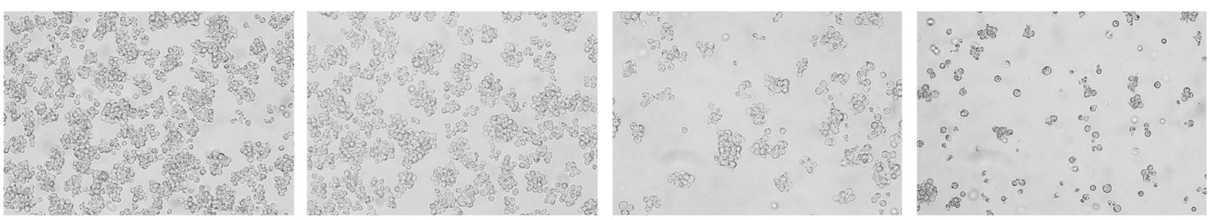
A　　B　　C

A: Proliferation activities of cells in UA group ($^*P<0.01$ *vs* 0 μmol·L^{-1} UA group); B: Proliferation activities of cells in UB group ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* 0 μmol·L^{-1} UB group); C: Proliferation activities of cells in UC group ($^*P<0.01$ *vs* 0 μmol·L^{-1} UC group).

图1　不同浓度UA、UB和UC组细胞增殖活性

Fig. 1　Proliferation activities of cells in different concentrations of UA, UB, and UC groups

2.2　各组细胞形态表现　光学显微镜观察：与对照组比较，随着UC浓度的增加，不同浓度UC组细胞间连接和细胞数量减少，细胞碎片增加。见图2。



A　　B　　C　　D

A: Control group; B: 20 μmol·L^{-1} UC group; C: 40 μmol·L^{-1} UC group; D: 80 μmol·L^{-1} UC group.

图2　不同浓度UC组细胞形态表现（×200）

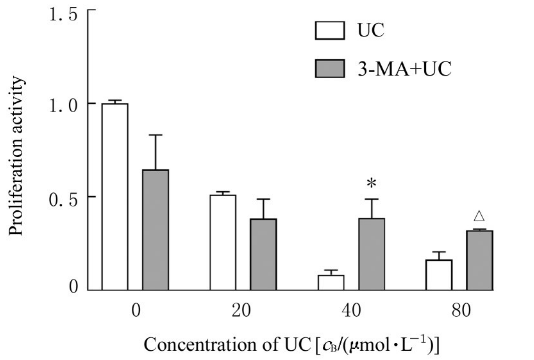
Fig. 2　Morphology of cells in different concentrations of UC groups (×200)

2.3　抑制自噬后各组细胞增殖活性　与0和20 μmol·L^{-1} UC组比较，3-MA联合0和20 μmol·L^{-1} UC组细胞增殖活性差异无统计学意义（$P>0.05$）；与40和80 μmol·L^{-1} UC组比较，3-MA联合40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞增殖活性升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。见图3。

2.4　各组死细胞率　与对照组（1.00%±0.21%）比较，20 μmol·L^{-1} UC组细胞中死细胞率（5.22%±0.88%）差异无统计学意义（$P>0.05$），40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞中死细胞率（11.82%±1.90%和23.65%±0.26%）升高（$P<0.01$）。见图4。

2.5　各组细胞凋亡率　与对照组（3.02%±0.55%）比较，20和40 μmol·L^{-1} UC组细胞凋亡率（3.74%±1.06%和4.13%±0.62%）差异无统计学意义（$P>0.05$），80 μmol·L^{-1} UC组细胞凋亡率（11.09%±1.98%）升高（$P<0.01$）。见图5。

2.6　各组细胞自噬情况　与对照组比较，随着UC浓度升高，不同浓度UC组细胞绿色荧光逐渐增强，表明细胞中自噬体产生增多。见图6。



$^*P<0.01$ *vs* 40 μmol·L^{-1} UC group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* 80 μmol·L^{-1} UC group.

图3 自噬抑制剂3-MA作用后不同浓度UC组细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of cells in different concentrations of UC groups after treated with autophagy inhibitor 3-MA

2.7 各组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平 与对照组（Beclin1：1.00±0.04；ATG9：1.00±0.06；ATG7：1.00±0.05）比较，20和40 μmol·L^{-1} UC组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$），80 μmol·L^{-1} UC组细胞中Beclin 1、ATG9和ATG7 mRNA表达水平（1.68±0.08、2.49±0.17和1.69±0.05）升高（$P<0.01$）。

2.8 各组细胞中Caspase-3和Cleaved Caspase-3蛋白表达水平 各组细胞中Caspase-3蛋白表达水平基本一致，组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组（1.00±0.01）比较，20、40和80 μmol·L^{-1} UC组细胞中Cleaved Caspase-3蛋白表达水平（4.09±0.19、6.14±0.22和15.22±0.83）升高（$P<0.01$）。见图7。

2.9 各组细胞中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值 与对照组（1.00±0.01）比较，20和40 μmol·L^{-1} UC组细胞中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值（0.97±0.03和1.50±0.09）差异无统计学意义（$P>0.05$），80 μmol·L^{-1} UC组细胞中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值（2.63±0.53）升高（$P<0.05$）。见图8。

2.10 各组细胞中p-AMPK/AMPK和p-ERK/ERK比值 与对照组（1.00±0.01）比较，40和80 μmol·L^{-1} UC组p-AMPK/AMPK比值（4.54±0.36和7.99±0.49）升高（$P<0.01$）；与对照组（1.00±0.01）比较，40和80 μmol·L^{-1} UC组p-ERK/ERK的比值（2.01±0.12和2.74±0.17）升高（$P<0.01$）。见图9。

3 讨论

AML是一种异质性和侵袭性的造血系统恶性肿瘤，尽管化疗和造血干细胞移植有了很大的进步，但仍有35%～45%患者难以治愈或复发[8]。

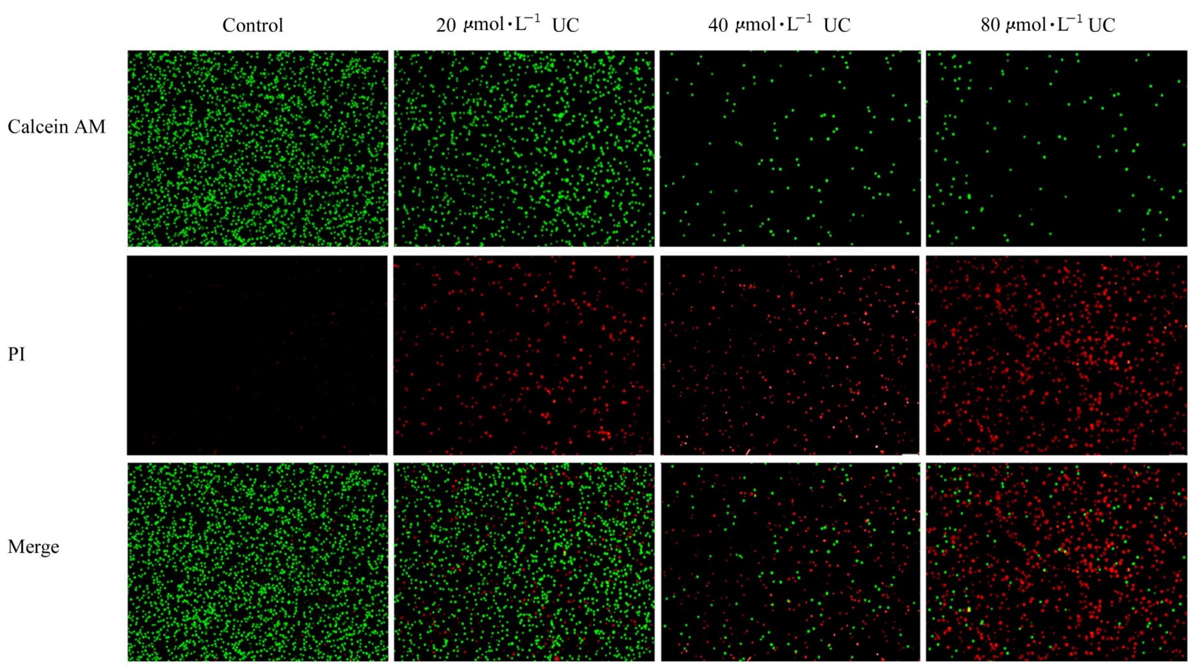
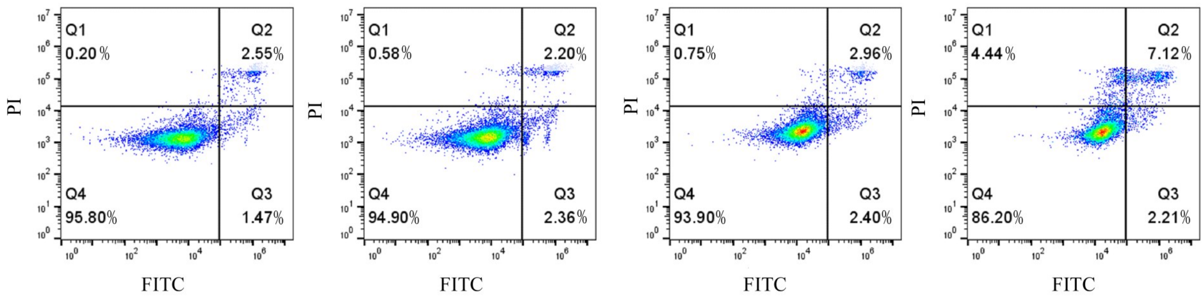


图4 各组细胞活/死细胞染色结果(×100)

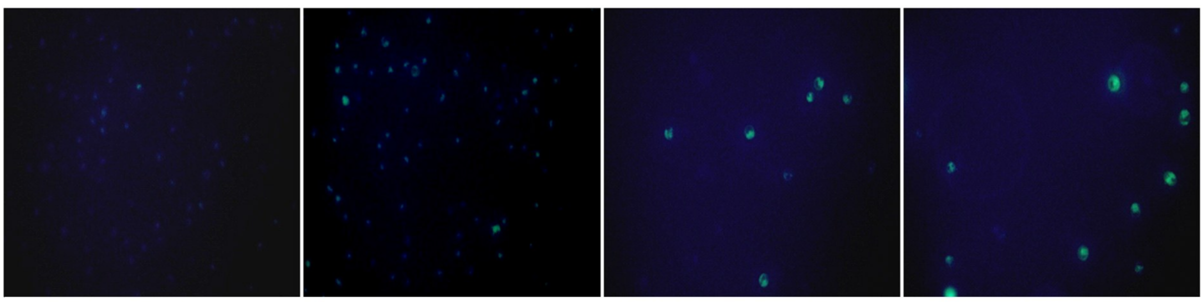
Fig. 4 Live/dead cell staining results of cells in various groups (×100)



A：Control group；B：20 μmol·L^{-1} UC group；C：40 μmol·L^{-1} UC group；D：80 μmol·L^{-1} UC group.

图 5　流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Fig. 5　Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry

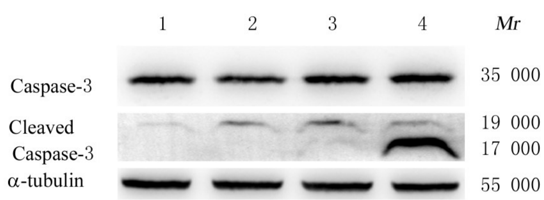


A　　　B　　　C　　　D

A：Control group；B：20 μmol·L^{-1} UC group；C：40 μmol·L^{-1} UC group；D：80 μmol·L^{-1} UC group.

图 6　各组细胞自噬情况（MDC，×200）

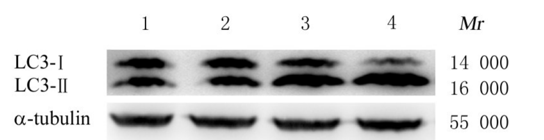
Fig. 6　Autophagy of cells in various groups (MDC，×200)



Lane 1：Control group；Lane 2：20 μmol·L^{-1} UC group；Lane 3：40 μmol·L^{-1} UC group；Lane 4：80 μmol·L^{-1} UC group.

图 7　Western blotting 法检测各组细胞中 Caspase-3 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达电泳图

Fig. 7　Electrophoregram of expressions of Caspase-3 and Cleaved Caspase-3 proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

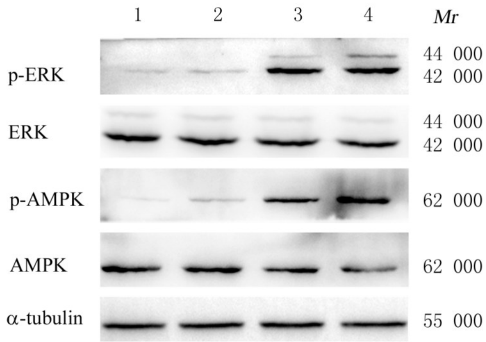


Lane 1：Control group；Lane 2：20 μmol·L^{-1} UC group；Lane 3：40 μmol·L^{-1} UC group；Lane 4：80 μmol·L^{-1} UC group.

图 8　Western blotting 法检测各组细胞中自噬相关蛋白表达电泳图

Fig. 8　Electrophoregram of expressions of autophage related proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

难治性/复发性 AML 患者预后不佳，3 年生存率低于 10%[9]。对于难治性/复发性 AML 患者尚无标准的挽救性治疗措施，迫切需要新的治疗方法。在 AML 的治疗中，中药及中药中的天然化合物作为一种辅助药物已被应用于临床[10-11]。尿石素是肠道微生物对鞣花单宁和富含鞣花酸食物（石榴、浆果和坚果）的次生多酚代谢产物，是一类新的抗癌化合物，可通过细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡、促进细胞自噬及衰老和调节癌基因转录等机制发挥抗癌作用[12-13]。研究[7]表明：UA 和 UB 可通过改变白血病细胞代谢、抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡发挥治疗白血病的功能。在本研究中，分别检测了 UA、UB 和 UC 对白血病细胞增殖的抑制作用，结果显示：三者均可抑制 HL-60 细胞增殖，均具有抗白血病活性，48 h 时 UC 的 IC_{50} 值最低，表明 UC 抗白血病细胞增殖的效果更好。



Lane 1: Control group; Lane 2: 20 μmol·L^{-1} UC group; Lane 3: 40 μmol·L^{-1} UC group; Lane 4: 80 μmol·L^{-1} UC group.

图 9 Western blotting法检测各组细胞中p-ERK、ERK、p-AMPK和AMPK蛋白表达电泳图

Fig. 9 Electrophoregram of expressions of p-ERK, ERK, p-AMPK, and AMPK proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

细胞自噬和凋亡是程序性细胞死亡途径。Caspase-3在细胞凋亡中起重要作用，当细胞接受凋亡刺激时，Caspase-3可被剪切成Cleaved Caspase-3，进而诱导细胞发生凋亡。研究[6]表明：UA主要通过靶向蛋白质的磷酸化过程和P53蛋白发挥抗癌活性。在结肠癌中，UA可通过P53通路诱导细胞衰老，抑制细胞增殖[14-16]。UA可通过调控磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路的磷酸化水平，诱导胰腺癌细胞凋亡发挥抗癌作用[17]。UB也具有抗癌活性，可通过诱导Wnt/β-连环蛋白（β-catenin）通路的失活抑制肝癌细胞增殖[18]，通过抑制基质金属蛋白酶2（matrix metalloproteinases-2，MMP-2）和基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinases-9，MMP-9）蛋白活性及P53蛋白表达诱导胶质瘤细胞凋亡，阻滞细胞周期[19-20]。本研究结果表明：UC可诱导HL-60细胞凋亡，增加死细胞率，促进Caspase-3蛋白的剪切水平，表明UC具有促细胞凋亡作用。细胞自噬也是细胞程序性死亡的形式之一，与肿瘤的发生发展有密切关联。LC3蛋白全程参与自噬形成，LC3-Ⅰ会被酶解成为LC3-Ⅱ，LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值常作为自噬的指标。UA还可通过诱导细胞自噬发挥抗肿瘤作用[21-22]。UC对细胞自噬的影响尚未见报道。本研究结果表明：不同浓度UC组HL-60细胞中MDC绿色荧光增强，LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值和自噬相关基因Beclin 1、ATG9及ATG7 mRNA表达水平升高，表明UC可诱导细胞自噬；同时自噬抑制剂3-MA处理可提高UC诱导的细胞增殖活性降低，进一步说明UC具有促进白血病细胞自噬的作用。

研究[23-24]表明：UC可通过介导ERK蛋白的磷酸化水平参与胰岛素的信号转导，通过AMPK信号通路调节肠道微生物群对抗非酒精性脂肪肝。AMPK参与调控肿瘤细胞的代谢途径、线粒体动力学和线粒体功能及表观遗传调控的异常激活，调控肿瘤的各项特征，可作为天然中草药的作用靶点[25-26]。AMPK可通过调控自噬相关蛋白直接或间接促进细胞自噬[27]。ERK通路是癌症治疗的重要靶点，许多抗癌药物可诱导ERK活化，进而发挥抑制细胞增殖并促进细胞凋亡的抗癌作用[23]。本研究结果表明：UC可明显促进HL-60细胞中ERK和AMPK的磷酸化水平。

综上所述，本研究通过体外实验证实UC具有抑制白血病细胞HL-60细胞增殖、诱导细胞凋亡和自噬的功能，其机制可能是UC通过提高ERK和AMPK蛋白的磷酸化水平，进一步促进AMPK下游基因表达进而发挥抗癌作用。UC治疗白血病的作用还需通过动物体内实验进一步验证，以期为UC作为治疗白血病的潜在药物提供实验依据。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

于国兴参与实验设计、数据分析和论文撰写，张鑫参与数据采集，杜恒伟参与论文撰写和修改，崔冰洁参与数据收集和实验指导，高娜参与研究设计，刘翠兰参与指导实验过程和论文撰写及修改，杜静参与整体研究过程指导。

[参考文献]

[1] DINARDO C D, ERBA H P, FREEMAN S D, et al. Acute myeloid leukaemia[J]. Lancet, 2023, 401(10393): 2073-2086.

[2] 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.

[3] BHANSALI R S, PRATZ K W, LAI C. Recent advances in targeted therapies in acute myeloid leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 29.

[4] HASHEMINEZHAD S H, BOOZARI M, IRANSHAHI M, et al. A mechanistic insight into the biological activities of urolithins as gut microbial

metabolites of ellagitannins [J]. Phytother Res, 2022, 36(1): 112-146.

[5] DAS S, SHUKLA N, SINGH S S, et al. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer [J]. Apoptosis, 2021, 26(9-10): 512-533.

[6] SAHASHI H, KATO A, YOSHIDA M, et al. Urolithin A targets the AKT/WNK1 axis to induce autophagy and exert anti-tumor effects in cholangiocarcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12: 963314.

[7] ALZAHRANI A M, SHAIT MOHAMMED M R, ALGHAMDI R A, et al. Urolithin A and B alter cellular metabolism and induce metabolites associated with apoptosis in leukemic cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 5465.

[8] BEJANYAN N, WEISDORF D J, LOGAN B R, et al. Survival of patients with acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a center for international blood and marrow transplant research study[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2015, 21(3): 454-459.

[9] THOL F, SCHLENK R F, HEUSER M, et al. How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2015, 126(3): 319-327.

[10] ZHONG W J, MA L D, YANG F F, et al. Matrine, a potential c-Myc inhibitor, suppresses ribosome biogenesis and nucleotide metabolism in myeloid leukemia[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1027441.

[11] JIN H, ZHANG Y, YU S J, et al. Venetoclax combined with azacitidine and homoharringtonine in relapsed/refractory AML: a multicenter, phase 2 trial[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 42.

[12] AL-HARBI S A, ABDULRAHMAN A O, ZAMZAMI M A, et al. Urolithins: the gut based polyphenol metabolites of ellagitannins in cancer prevention, a review[J]. Front Nutr, 2021, 8: 647582.

[13] GANDHI G R, ANTONY P J, CEASAR S A, et al. Health functions and related molecular mechanisms of ellagitannin-derived urolithins [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2024, 64(2): 280-310.

[14] ROGOVSKII V S. The therapeutic potential of urolithin A for cancer treatment and prevention [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2022, 22(9): 717-724.

[15] GIMÉNEZ-BASTIDA J A, ÁVILA-GÁLVEZ M, ESPÍN J C, et al. The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 139: 111260.

[16] NORDEN E, HEISS E H. Urolithin A gains in antiproliferative capacity by reducing the glycolytic potential via the p53/TIGAR axis in colon cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2019, 40(1): 93-101.

[17] EL-WETIDY M S, AHMAD R, RADY I, et al. Urolithin A induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting Bcl-2, increasing p53-p21 proteins and reactive oxygen species production in colorectal cancer cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2021, 26(3): 473-493.

[18] LV M Y, SHI C J, PAN F F, et al. Urolithin B suppresses tumor growth in hepatocellular carcinoma through inducing the inactivation of Wnt/β-catenin signaling [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17273-17282.

[19] EIDIZADE F, SOUKHTANLOO M, ZHIANI R, et al. Inhibition of glioblastoma proliferation, invasion, and migration by Urolithin Bthrough inducing G_0/G_1 arrest and targeting MMP-2 /-9 expression and activity [J]. Biofactors, 2023, 49(2): 379-389.

[20] RAHIMI-KALATEH SHAH MOHAMMAD G, MOTAVALIZADEHKAKHKY A, DARROUDI M, et al. Urolithin B loaded in cerium oxide nanoparticles enhances the anti-glioblastoma effects of free urolithin B *in vitro*[J]. J Trace Elem Med Biol, 2023, 78: 127186.

[21] TOTIGER T M, SRINIVASAN S, JALA V R, et al. Urolithin A, a novel natural compound to target PI3K/AKT/mTOR pathway in pancreatic cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18(2): 301-311.

[22] ZHANG Y J, JIANG L, SU P F, et al. Urolithin A suppresses tumor progression and induces autophagy in gastric cancer via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Drug Dev Res, 2023, 84(2): 172-184.

[23] TOUBAL S, OIRY C, BAYLE M, et al. Urolithin C increases glucose-induced ERK activation which contributes to insulin secretion [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2020, 34(5): 571-580.

[24] XU J Y, TIAN H Y, JI Y J, et al. Urolithin C reveals anti-NAFLD potential via AMPK-ferroptosis axis and modulating gut microbiota [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2023, 396(10): 2687-2699.

[25] HSU C C, PENG D N, CAI Z, et al. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 52-68.

[26] PENG B, ZHANG S Y, CHAN K I, et al. Novel anti-cancer products targeting AMPK: natural herbal medicine against breast cancer [J]. Molecules, 2023, 28(2): 740.

[27] WANG S Y, LI H Y, YUAN M H, et al. Role of AMPK in autophagy [J]. Front Physiol, 2022, 13: 1015500.