

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)15-1395-04

槲皮素诱导人白血病细胞 K562 的凋亡

赵新汉, 王志宇, 李晶, 李丽

(西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤内科, 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西 西安 710061)

Quercetin-induced apoptosis of human leukemia K562 cells

ZHAO Xin-Han, WANG Zhi-Yu, LI Jing, LI Li

Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases of Ministry of Education, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To study the effect of quercetin on the proliferation and apoptosis of human leukemia K562 cells.

METHODS: The growth of K562 cells exposed to quercetin was observed by MTT assay. The apoptosis of K562 cells was detected by comet assay, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), and flow cytometry.

RESULTS: Within the range of $(1-8) \times 10^{-5}$ mol/L, quercetin obviously inhibited the proliferation of K562 cells in a time- and dose-dependent manner, and 8×10^{-5} mol/L quercetin which affected K562 cells for 72 h had the lowest A value; the long comet tail was presented on K562 cells which were treated with quercetin by comet assay; TUNEL showed that K562 cells became smaller and the condensed chromatin presented one or many masses; flow cytometry indicated that apoptosis of K562 cells induced by quercetin mainly occurred in G1/S phase. **CONCLUSION:** Quercetin could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of K562 cells within a certain dose range *in vitro*.

【Keywords】 Quercetin; K562 cells; apoptosis

【摘要】目的: 研究槲皮素对人白血病细胞株 K562 增殖抑制和诱导凋亡作用。方法: 四氮甲唑蓝(MTT)观察细胞的生长状况, 应用彗星分析法、TUNEL 技术和流式细胞仪检测细胞凋亡。结果: 槲皮素在 $(1 \sim 8) \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内能明显抑制 K562 细胞的增殖, 并具有时间和浓度依赖性, 8×10^{-5} mol/L 槲皮素作用 72 h 的 K562 细胞株 A 值最低, 彗星分析法显示经槲皮素作用的 K562 细胞出现长的彗尾条带, 原位细胞凋亡可见细胞变小, 核固缩为一个或多个染色质团块, 流式细胞仪检测细胞凋亡主要发生在 G1/S 期。结论: 槲皮素在体外一定浓度范围内能抑制 K562 细胞增殖, 诱导凋亡。

收稿日期 2006-03-01; 接受日期 2006-05-17

作者简介: 赵新汉, 博士, 副教授, 硕士生导师。Tel (029) 85324136

Email zhaoxinhan@cscs.org.cn

【关键词】 槲皮素; K562 细胞; 凋亡

【中图分类号】 R733 **【文献标识码】** A

0 引言

槲皮素(1,3,4,5,7-五羟基黄酮, Quercetin)是自然界分布最广的生物类黄酮化合物, 糖基化形式包括芸香碱和槲皮苷, 广泛存在于植物中^[1]。槲皮素具有多种生理活性, 如抗炎、抗过敏、抗病毒、抗氧化、降血压等, 在防治慢性退行性疾病过程中可能发挥了重要作用^[2]。最近的研究表明, 槲皮素一方面可以诱导多种肿瘤细胞凋亡, 另一方面可以阻止一些非肿瘤细胞凋亡的发生^[3-4]。我们旨在研究槲皮素在体外对人慢性粒细胞白血病细胞 K562 的诱导凋亡作用, 为其应用于临床提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 由中国医学科学院血液病研究所惠赠。槲皮素(Sigma 公司); 二甲基亚砜(浓度小于 250 mg/L), -20℃ 保存备用; 四氮甲唑蓝(MTT, Sigma 公司); RPMI 1640 培养液(Gibco 公司); 原位细胞凋亡检测试剂盒(产品编号 MK1022, 华美公司), -20℃ 冷冻保存; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 K562 细胞悬浮培养在 RPMI 1640 培养液中(含 100 mL/L 加热灭活胎牛血清、1 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、青霉素、链霉素各 10×10^5 U/L), 培养条件为 50 mL/L CO₂, 37℃ 饱和湿度, 3~5 d 换液 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测槲皮素对 K562 细胞增殖的影响

调细胞密度至 5×10^7 /L, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 然后分别加入 $0, 1 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-5}, 4 \times 10^{-5}, 8 \times 10^{-5}$ mol/L 的槲皮素 200 μ L, 每个浓度设 6 个复孔。将培养板置于含 50 mL/L CO₂ 及 37℃ 饱和湿度的培养箱内培养。分别于 24, 48, 72 h 将培养板从培养箱中取出, 加入新配制的 1 g/L MTT 50 μ L, 混匀, 在相同条件下继续培养 4 h 后, 1000 r/min 离心 5

min 弃上清,每孔加 DMSO 200 μ L,震荡 10 min,使 MTT 还原产物完全溶解。用酶联免疫检测仪测定 $A_{570\text{ nm}}$ 值。按如下公式计算抑制率:抑制率(%) = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.2.3 彗星分析法检测槲皮素对 K562 细胞 DNA 的损伤 根据 MTT 实验结果选择槲皮素合适的作用浓度与作用时间,将槲皮素作用后的细胞稀释成 $5 \times 10^7/\text{L}$ 与 10 g/L 低熔点琼脂糖混合后铺胶质板,将胶板在裂解液(pH 12.8 ~ 13.0)裂解 50 min,漂洗后进行电泳(20 min),用 PI 染色后在荧光显微镜下可见 DNA 断片形成的特征性“彗星”图像。另设一对照组,为无槲皮素作用的 K562 细胞。然后对胶片内的细胞图像依次采图,每个实验点各采集 50 幅图像,并对所采集的图像进行图像分析(Lucia G Version 4.61)。测定彗尾部 DNA 含量,判定细胞 DNA 损伤情况。

1.2.4 原位细胞凋亡检测 将实验组与对照组 K562 细胞涂片,用 40 g/L 多聚甲醛 PBS 液室温固定 15 min,将涂片置于 30 g/L H_2O_2 30 min,以阻断内源性辣根过氧化物酶。涂片浸泡在 $2 \times \text{SSC}$ 80 $^\circ\text{C}$ 20 min, PBS 洗 2 次,胰蛋白酶消化 20 min。TdT 缓冲液孵育 10 min, TdT 反应液 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。涂片浸泡在 $2 \times \text{SSC}$ 溶液 10 min,以终止反应。过氧化物酶标记链霉亲和素孵育 30 min, PBS 洗 2 次。DAB 显色 5 ~ 10 min,苏木精复染 3 ~ 5 min,常规脱水、透明和封片。

1.2.5 流式细胞仪法(FCM 法)检测细胞凋亡 将实验组与对照组悬浮细胞于离心管中制成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 缓冲液洗涤 1 次。将细胞重悬于 PBS 液中,调整密度为 $1 \times 10^9/\text{L}$ 。用 400 目筛网过滤两次。制备的单细胞悬液用 700 mL/L 乙醇固定,4 $^\circ\text{C}$ 保存过夜,离心弃上清,加 200 μ L RNaseA 于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,再加入染色液 600 mg/L 碘化丙啶 500 μ L 混匀,置室温下 30 min。FAC Calbur 流式细胞仪测定荧光强度,激发波长 488 nm,用 Cell Quest 及 Modfit 软件分析细胞周期,确定细胞周期分布。细胞凋亡率 = $[\text{凋亡细胞数} / (\text{凋亡细胞数} + \text{未凋亡细胞数})] \times 100\%$ 。

统计学处理:结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计分析软件进行方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对 K562 细胞增殖抑制作用 槲皮素在 $(1 \sim 8) \times 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内能明显抑制 K562 细胞的增殖,并具有时间和浓度依赖性($P < 0.01$),

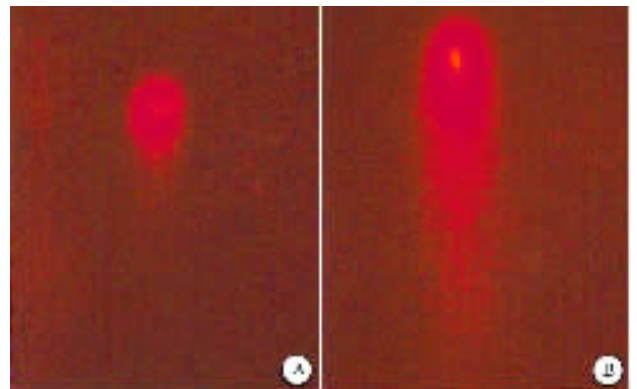
8×10^{-5} mol/L 槲皮素作用 72 h 的 K562 细胞株 $A_{570\text{ nm}}$ 值最低(表 1)。

表 1 槲皮素对 K562 细胞生长抑制作用 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

槲皮素浓度 ($\times 10^{-5}$ mol/L)	24 h		48 h		72 h	
	$A_{570\text{ nm}}$	抑制率 (%)	$A_{570\text{ nm}}$	抑制率 (%)	$A_{570\text{ nm}}$	抑制率 (%)
0	0.74 \pm 0.04		1.25 \pm 0.03		1.48 \pm 0.02	
1	0.68 \pm 0.02 ^b	8.1	0.73 \pm 0.06 ^b	41.6	0.77 \pm 0.04 ^b	48.0
2	0.54 \pm 0.03 ^b	27.0	0.55 \pm 0.04 ^b	56.0	0.58 \pm 0.02 ^b	60.8
4	0.41 \pm 0.05 ^b	44.6	0.42 \pm 0.01 ^b	66.4	0.41 \pm 0.02 ^b	72.3
8	0.32 \pm 0.03 ^b	56.8	0.33 \pm 0.02 ^b	73.6	0.29 \pm 0.02 ^b	80.4

^b $P < 0.01$ vs 0 mol/L。

2.2 彗星分析法测定 K562 细胞 DNA 损伤 根据 MTT 实验结果,选择 8×10^{-5} mol/L 的槲皮素作用于 K562 细胞 72 h 后,与对照组细胞一起行彗星分析。图 1A、B 反映了实验测定的彗星分析图像。对照组 K562 细胞彗尾印迹短浅,细胞形状基本对称。而实验组 K562 细胞拖有很长的彗尾,且彗尾密度远高于对照组 K562 细胞。两组细胞彗尾内损伤 DNA 含量分别为 4.34 ± 0.23 (对照组)和 18.87 ± 0.57 (实验组, $P < 0.01$) 表明一定浓度槲皮素作用的 K562 细胞可以发生凋亡。



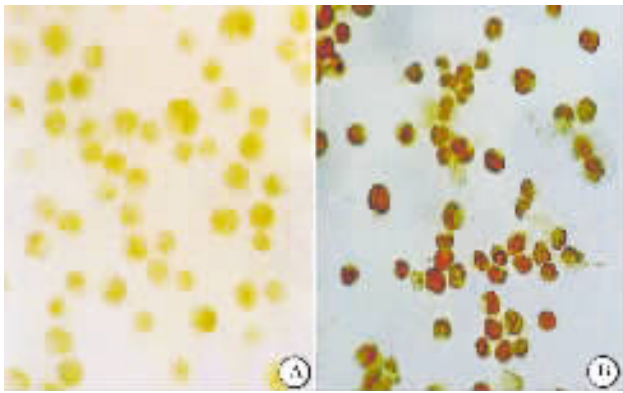
A: 对照组; B: 8×10^{-5} mol/L 槲皮素作用 72 h 后 K562 细胞。

图 1 彗星分析检测结果

2.3 原位细胞凋亡检测 8×10^{-5} mol/L 的槲皮素作用于 K562 细胞株 72 h 后的形态发生明显改变,与对照组相比细胞变小,核固缩为一个或多个染色质团块,而对照组无细胞凋亡,生存良好,未见核明显固缩(图 2A、B)。

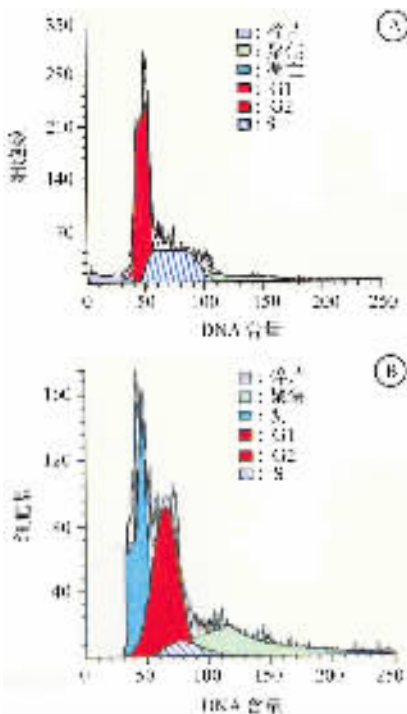
2.4 流式细胞仪检测 8×10^{-5} mol/L 槲皮素作用于 K562 细胞株 72 h 后 G1 期细胞增加, S 期细胞减少, G1/G2 比例增大,出现低于 G1 期 DNA 含量的亚二倍体凋亡峰,凋亡率为 27.10%,而对照组细胞株

细胞周期正常(图3A、B)。



A: 对照组; B: 8×10^{-5} mol/L 的槲皮素作用于 K562 细胞株 72 h。

图2 原位细胞凋亡检测结果 TUNEL $\times 400$



A: 对照组; B: 8×10^{-5} mol/L 的槲皮素作用于 K562 细胞株 72 h。

图3 流式细胞仪检测结果

3 讨论

细胞凋亡是一个基因调节的主动过程,是调节体内细胞数量的生理机制^[5]。肿瘤的发生发展与细胞凋亡有关,随着对白血病细胞凋亡基因调控的研究,已经证明多种化疗药物是通过诱导其凋亡而发挥作用^[6-7],而从天然药物中寻找高效、低毒的抗肿瘤药物是当前的研究热点之一。含砷中药诱导急性早幼粒细胞白血病细胞凋亡的成功^[8-9],更是激发了对祖国传统药物研究的热潮。

槲皮素是具有多种生物学活性的黄酮类化合物,

临床上用于慢性支气管炎、冠心病及高血压的辅助治疗。国外大量研究表明,槲皮素能够诱导结肠癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞的凋亡^[10],其诱导肿瘤细胞凋亡的机制众说纷纭:可能与其干扰某些酶的活性有关,如抑制酪氨酸激酶、蛋白酶 C, cAMP 磷酸二酯酶,增加 cAMP 水平;其次,诱发抗凋亡基因 bcl-2 蛋白发生降解;此外还可以抑制肿瘤血管的生成和转移^[11-12]。为进一步扩大其临床应用范围,我们选取人白血病细胞株 K562 进行研究。

实验结果表明,经槲皮素处理后, K562 细胞出现增殖抑制,其作用强度与药物浓度及作用时间呈依赖关系, 8×10^{-5} mol/L 槲皮素作用 72 h 的 K562 细胞株 $A_{570 \text{ nm}}$ 值最低;彗星分析检测、原位细胞凋亡检测及流式细胞仪检测确认槲皮素对人白血病细胞 K562 有诱导凋亡作用,且凋亡主要发生在 G1/S 期。

我们通过初步研究显示槲皮素对人白血病 K562 细胞株具有增殖抑制和诱导凋亡作用,其机制有待深入研究。我们的实验为临床应用槲皮素治疗白血病提供了一定的理论依据,对开发祖国传统药物,实现中药现代化具有一定的实用价值与指导意义。

【参考文献】

- [1] Cook NC, Samman S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources[J]. *Nutr Biochem*, 1996, 7(3): 66-76.
- [2] 宋传旺. 槲皮素对细胞凋亡的“干涉”作用[J]. *蚌埠医学院学报* 2005, 30(1): 136-137.
- [3] Chae J, Kim J, Park JK, et al. The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 291(10): 386-397.
- [4] Liesveld J, Camille N, Chaohui Lu, et al. Flavonoid effects on normal and leukemic cells[J]. *Leuk Res*, 2003, 27(5): 517-527.
- [5] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy[J]. *Blood*, 2001, 98(9): 2603-2614.
- [6] Lubos C, Ladislav N, Ingrid C, et al. Differential modulation of cisplatin and doxorubicin efficacies in leukemia cells by flavonoids[J]. *Nutr Res*, 2003, 23(4): 1045-1057.
- [7] 郑瑾, 刘强, 王宗仁等. 活血化淤中药复方诱导 K562 细胞凋亡[J]. *第四军医大学学报* 2003, 24(5): 427-429.
- [8] Waxman S, Anderson KC. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy[J]. *Oncologist*, 2001, 6(suppl 2): 3-10.
- [9] 严晓昱, 师建国, 阎庆国等. 三氧化二砷联合抗坏血酸对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(11): 1022-1025.
- [10] Woo K, Myung H, Eul S, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells

[J]. J Nutr Biochem , 2005 , 16(6) 155 - 162 .

[11] Susanne U. Mertens-Talcott , Susan S. Percival , Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells [J]. Cancer Lett , 2005 , 218(12) 141 - 151 .

[12] Michitaka N , Yu T , Hiroyuki N , et al. Quercetin , a flavonoid , inhibits the proliferation , differentiation , and mineralization of osteoblasts in vitro [J]. Eur J Pharmacol , 2004 , 485(9) 89 - 96 .

编辑 黄良田

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)15-1398-01

氨甲蝶呤治疗异位妊娠 66 例疗效观察

赵季梅

(信阳职业技术学院附属医院妇产科 , 河南 信阳 464000)

【关键词】 异位妊娠 药物治疗 氨甲蝶呤

【中图分类号】 R714.22 【文献标识码】 B

1 资料和方法

1.1 资料 2001-03/2004-04 在我院妇科收治入院并确诊为异位妊娠患者 66 例 , 并具备用药条件 : 生命体征稳定 , 无腹腔内急性出血的体征 , B 超证实子宫腔内无妊娠囊 , 附件区异位妊娠包块最大直径一般控制在 ≤ 5 cm ; 肝肾及凝血功能均正常 , 外周血白细胞 $> 4 \times 10^9/L$, 血 β -HCG $< 6 \times 10^3$ IU/L^[1] . 随机分为 A、B 两组 , A 组 32 例 , B 组 34 例 , 两组年龄、孕龄、治疗前 β -HCG 量及附件区包块大小均无显著差异 (表 1) .

表 1 治疗前两组患者临床资料比较 ($n \bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄/岁	孕龄/d	β -HCG/ (IU/L)	附件区包块 最大直径/cm
A	32	29.3 \pm 9.2 (20 ~ 40)	51.5 \pm 10.28 (30 ~ 75)	705.69 \pm 733.48 (156 ~ 4239)	5.22 \pm 1.75 (1.5 ~ 7.3)
B	34	31.5 \pm 4.5 (21 ~ 41)	49.7 \pm 7.28 (37 ~ 72)	931.84 \pm 961.57 (156 ~ 3623)	2.84 \pm 1.24 (1.1 ~ 5.4)

1.2 方法 A 组用 MTX 75 mg 加生理盐水 20 mL 静注 1 次 ; B 组用 MTX 20 mg 肌肉注射 , 连续 5 d , 共 100 mg , 两组均不用甲酸四氢叶酸解毒 . 两组在治疗期间隔日或 2 次/wk 测 β -HCG 值 , 必要时复查 B 超 . 如出现出血征象及时手术 , 并定时测定血象、肝功能 , 记录 MTX 的副反应 . 治疗成功标准为接受 MTX 治疗后症状缓解 , 无腹痛及阴道出血 , 血清 β -HCG 逐渐下降至正常 , 下降幅度 $\geq 15\%$, 妊娠包块缩小至消失^[1] . 治疗过程中如发生腹痛加剧 , 治疗 2 wk 后血 β -HCG 下降幅度 $< 15\%$ 或增高 , 盆腔包块未缩小或增大 , 出现手术适应症予以剖腹探查者为治疗失败 . 采用 t 检验进行统计学处理 .

2 结果 ①A 组有 26 例治疗成功 , 成功率 81% , 6 例改为手

术治疗 , B 组 32 例成功 , 成功率 94% , 2 例改为手术治疗 , 两组间成功率比较差异无显著性 . ②治疗成功患者的血 β -HCG 下降至正常的平均天数 : A 组 11.73 (4 ~ 31) d ; B 组 15.34 (4 ~ 36) d , 经比较两组无显著性差异 . 其中 , 在血 β -HCG 降至正常的时间 ≤ 14 d 的患者中 , A 组 22 例 (85%) , B 组 19 例 (59%) . 在血 β -HCG 降至正常的时间 ≥ 15 d 的患者中 , A 组 4 例 (15%) , B 组 12 例 (41%) , 两组比较差异显著 ($P < 0.05$) . 两组分别有 17 例在用药后出现可忍受的间歇性腹痛 , 持续 2 ~ 3 d 后疼痛减轻或消失 . ③在治疗失败的 8 例中 , A 组 (6 例) 孕龄为 43 ~ 58 d , 血 β -HCG 为 574 ~ 1672 IU/L , 附件包块最大直径为 2.7 ~ 5.3 cm . B 组 (2 例) 分别为 54 ~ 70 d , 749 ~ 2159 IU/L , 2.8 ~ 6.0 cm . 患者多因治疗期间出现腹痛加剧、腹腔内出血、继发感染或附件包块明显增大等情况改为手术治疗 . ④在接受 MTX 治疗后 4 ~ 14 d , A 组有 7 例 (22%) , B 组 8 例 (24%) 有一过性血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 升高 , 升高幅度为 9 ~ 260 U/L , 两组 ALT 和 AST 升高的例数比较差异无显著意义 . 经过 5 ~ 7 d 护肝治疗后恢复正常 . 两组分别有 2 例出现轻度恶心反应 , 持续 3 ~ 4 d 后自然缓解 . B 组有 1 例发生口腔溃疡、白细胞偏低和血尿素氮偏高 , 经处理后好转 . 副反应发生与体质量无明显关系 .

3 讨论 ①治疗方案机制 : MTX 是一种抗代谢类药物 , 滋养细胞对其高度敏感 , 它可使绒毛变形坏死 , 以防止绒毛继续生长穿破输卵管壁引起出血 , 治疗成功率高 , 方法简便易行 , 对要求生育者保留了生育功能 , 成功率大致为 76% ~ 93%^[2] . ②MTX 治疗适应征 提高 MTX 治疗异位妊娠成功率关键在于严格筛选早期病例 . 孕龄长短、包块大小、血 β -HCG 值的高低及腹痛程度是判断异位妊娠是否破裂及是否适合药物治疗的指标 , 其中以 β -HCG 最重要 . 血 β -HCG 滴度升高 , 药物治疗失败率增加 , 但 β -HCG 低值时也有保守治疗失败的可能 , 临床应根据全身情况综合分析 . 我们的结果表明 , 两种方法均是治疗异位妊娠的有效剂量 . 用药后血药浓度均能迅速达到较高水平 , 表现为 β -HCG 迅速降至正常 . 但 MTX 20 mg 5 d 肌注法治疗者的血 β -HCG 降至正常所需时间偏长 , 同时也增加了患者住院天数 .

【参考文献】

[1] 李志凌 . 氨甲蝶呤单次肌肉注射治疗异位妊娠适应症和检测指标的研究 [J]. 实用妇产科杂志 , 1999 , 15(6) 305 .

[2] 乐 杰 . 妇产科学 [M] . 4 版 . 北京 : 人民卫生出版社 , 1996 : 110 .

编辑 王 睿

收稿日期 2006-01-09 ; 接受日期 2006-02-20

作者简介 : 赵季梅 . 主治医师 . Tel (0376) 6283932 Email : liuzhao-liang042@163.com