

槲皮素对结肠癌细胞 SW480 增殖、细胞周期和 cyclin B1 蛋白表达的影响

Effects of Quercetin on Proliferation, Cell Cycle and Cyclin B1 Protein Expression of Colon Carcinoma Cell Line SW480

李润青/单保恩*

(河北医科大学第四医院科研中心, 河北石家庄 050011)

LI Run-qing, SHAN Bao-en*

(Research Center of the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

【摘要】背景与目的: 探讨槲皮素对人结肠癌细胞 SW480 增殖、凋亡、细胞周期及 CyclinB1 蛋白表达的影响, 并探讨其抗肿瘤机制。材料与方法: 以 10、20、40、60、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素处理 SW480 细胞, 采用 MTT 比色法、流式细胞技术、Western blot 方法分析槲皮素对细胞增殖、凋亡、细胞周期及 cyclin B1 蛋白表达的影响。结果: 与对照组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素可促进 SW480 细胞增殖 ($P < 0.05$), 但 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素可明显抑制 SW480 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 抑制作用呈剂量和时间依赖性。20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 SW480 细胞 48 h, G_0/G_1 期和 S 期细胞减少, G_2/M 期细胞显著增多 ($P < 0.01$)。80 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 48 h 后细胞凋亡率 (13.32 \pm 4.62)%, 较对照组 (2.68 \pm 1.04)% 显著升高 ($P < 0.01$); 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 SW480 细胞 48 h 后, cyclin B1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论: 槲皮素对结肠癌细胞 SW480 的增殖有一定的调节作用, 低浓度可促进其增殖, 而高浓度则可抑制其增殖, 其抑制作用机制可能与影响细胞周期分布、诱导细胞凋亡、调节 cyclin B1 蛋白表达有关。

【关键词】槲皮素; SW480; 细胞周期; 细胞凋亡; cyclin B1

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)05-0384-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the effects of quercetin on proliferation, cell cycle and apoptosis of colon carcinoma cell line SW480 and to study its probable molecular mechanisms. MATERIALS AND METHODS: SW480 cells were treated with different concentrations of quercetin (10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, 48 h and 72 h. Then the cell proliferation, cell cycle, apoptosis rate and cyclin B1 protein expression of SW480 cells were analyzed using MTT assay, flow cytometry and immunoblot methods, respectively. RESULTS: Proliferation of SW480 cells was promoted by quercetin at a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), while it was significantly inhibited by quercetin at concentrations of 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$), in a dose-and time-dependent manner. After treatment with 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin for 48 h, the percentages of SW480 cells at G_0/G_1 phase were decreased, and those at G_2/M phase were increased markedly ($P < 0.01$). when SW480 cells were incubated with 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin for 48 h, the apoptosis rate increased from baseline of 2.68% \pm 1.04% to 13.32% \pm 4.62% ($P < 0.01$). The expression of cyclin B1 protein could be down-regulated by quercetin at concentrations of 40, 60, 80 $\mu\text{mol/L}$. CONCLUSION: Quercetin at lower concentrations could promote proliferation of colon carcinoma cell line SW480, while it could inhibit proliferation and induce apoptosis of these cells at higher concentrations. Quercetin might exert its anti-tumor effect by blocking the cell cycle, inducing apoptosis and down-regulation of cyclin B1 protein.

【KEY WORDS】quercetin; SW480; cell cycle; cell apoptosis; cyclin B1

收稿日期: 2006-10-18; 修订日期: 2006-12-19

作者简介: 李润青 (1981-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤分子诊断。

* Correspondence to: SHAN Bao-en. Tel: 0311-86095283, E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

槲皮素是一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于水果、蔬菜、种子、核桃、茶、红酒和多种中草药中^[1-3],具有降血脂、抗血小板凝集、抗炎、抗过敏等多种药理作用^[4],能诱导多种肿瘤细胞凋亡^[5-7]。国外已将其作为抗癌药物应用于临床,但槲皮素的抗肿瘤机制尚不十分明确。我们检测了槲皮素对结肠癌细胞 SW480 的增殖、细胞周期、细胞凋亡及相关蛋白表达的影响,分析其抗肿瘤机制,以期槲皮素作为抗癌药物的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

槲皮素 (Quercetin, Q0125, MW: 338.27) 购于美国 Sigma 公司,用二甲基亚砜 (DMSO) 配成储存液, -20 °C 保存。试验时用 DMEM 培养液稀释, DMSO 的体积分数小于 1 ml/L。噻唑蓝 (MTT)、碘化丙啶 (PI) 购自美国 Sigma 公司。DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季青生物公司产品。鼠抗人 cyclin B1 单克隆抗体、ECL 化学发光试剂盒购自美国 Santa cruz 公司。羊抗鼠 HRP-IgG 为 Sigma 公司产品。结肠癌细胞 SW480 由中科院上海细胞库提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结肠癌细胞 SW480 用含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 DMEM 培养液,于 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 的培养箱中培养,呈对数生长期时用于试验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖反应 实验分为阴性对照组 (DMEM 培养液) 和不同浓度槲皮素作用组 (10、20、40、80、160 μmol/L)。MTT 比色法^[8]分别测定槲皮素作用 24 h、48 h、72 h 后 SW480 细胞的吸光度值 (A 570 nm),每组实验均重复 3 次。按下列公式计算细胞增殖率:

$$\text{增殖率}(\%) = \frac{\text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.2.3 细胞周期分布和凋亡率的检测 分别收集经不同浓度 (10、20、40、60、80 μmol/L) 的槲皮素作用 48 h 后的 SW480 细胞,4 °C 70% 乙醇固定过夜后, PBS 洗去固定液,用 RNaseA (终浓度为 20 mg/L) 37 °C 消化 1 h,与 PI 室温反应 10 min,用流式细胞仪 (Epics-XL II, 美国 Beckman Coulter 公司) 检测,并应用 Single histogram statistic 软件进行细胞周期和细胞凋亡分析。

1.2.4 Western blot 分析 收集经浓度为 40、60、80 μmol/L 的槲皮素作用 48 h 后的 SW480 细胞,常规提取细胞总蛋白,取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭后,加入

抗 cyclin B1 抗体 4 °C 孵育 1 h 后室温下孵育 1 h,加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗,室温下孵育 1 h,以 ECL 试剂盒显影 1 min、曝光 10 min 后,观察结果。用 gel-pro Analyzer 3.1 分析软件分析图象,结果以积分光密度值 (integral optical density, IOD) 表示,并计算 cyclin B1 蛋白的相对表达量 (cyclin B1 条带 IOD 值 / GAPDH 条带 IOD 值)。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,多个实验组均数与一个对照组均数比较用 Dunnett-t 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 槲皮素对 SW480 细胞增殖的影响

与对照组比较,20 μmol/L 的槲皮素能够促进 SW480 细胞增殖 ($P < 0.05$),而 40、80、160 μmol/L 的槲皮素则对细胞的增殖有明显的抑制作用 ($P < 0.01$),抑制作用呈剂量和时间依赖性,见图 1。

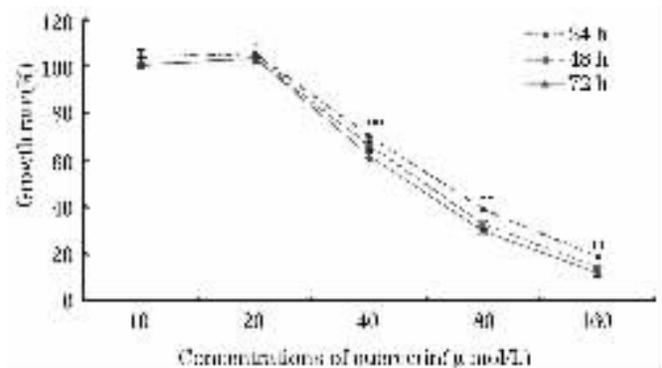


图 1 不同浓度槲皮素作用 24、48、72 h 对 SW480 细胞增殖的影响
Figure 1 The growth inhibitory effect on SW480 cells exposed to quercetin with different concentrations for 24, 48, 72 h. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 槲皮素对 SW480 细胞周期分布和细胞凋亡的影响

与对照组相比,槲皮素作用 48 h 后,10 μmol/L 的槲皮素对细胞周期影响不大 ($P > 0.05$),但 20、40、60、80 μmol/L 的槲皮素可使 G₂/M 期细胞显著增多 ($P < 0.01$),而 G₀/G₁ 和 S 期细胞减少 ($P < 0.05$) (表 1, 图 2B)。细胞凋亡率随槲皮素浓度的增加而升高,作用 48 h 后凋亡率升高到 (13.32 ± 4.62)% 与对照组的 (2.68 ± 1.04)% 比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 1, 图 2D)。

2.3 槲皮素对 SW480 细胞 cyclin B1 蛋白表达的影响

经槲皮素作用 48 h 后,SW480 细胞 cyclin B1 的蛋



白表达水平下降,与对照组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着槲皮素浓度的增高, cyclin B1 蛋白表

达量逐渐下降,呈剂量依赖性 ($r = 0.999, P = 0.001$),见图 3。

表 1 槲皮素作用 48 h 对 SW480 细胞细胞周期分布和细胞凋亡的影响
Table 1 Effect of quercetin on cell cycle and apoptosis rate of SW480 cells

Groups ($\times 10^{-6}$ mol/L)	n	Cell cycle (%)			Apoptosis rate (%)
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Control	3	56.56 ± 3.92	35.80 ± 2.39	7.64 ± 1.51	2.68 ± 1.04
Quercetin 10	3	55.40 ± 3.72	34.00 ± 2.51	10.60 ± 0.65	2.74 ± 1.82
20	3	53.20 ± 2.71	32.80 ± 3.13	14.00 ± 3.64**	3.91 ± 2.65
40	3	51.70 ± 1.46	32.60 ± 3.57	15.70 ± 2.20**	9.23 ± 2.74**
60	3	49.80 ± 3.15*	30.40 ± 6.43	19.80 ± 2.12**	12.59 ± 4.65**
80	3	49.00 ± 4.94*	27.70 ± 4.14*	23.30 ± 1.22**	13.32 ± 4.62**

Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

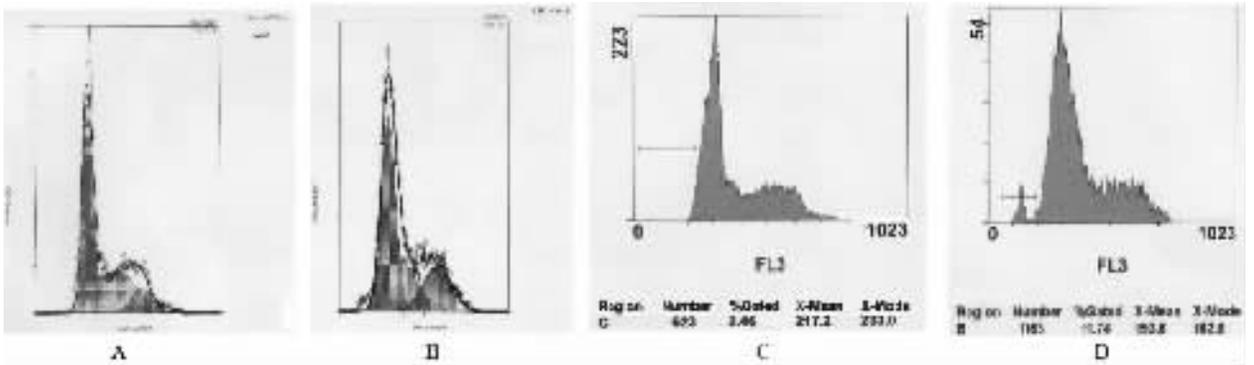


图 2 槲皮素作用于 SW480 细胞后细胞周期分布和细胞凋亡变化。A: 对照组细胞 48 h 细胞周期; B: 80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h 后细胞周期变化; C: 对照组细胞 48 h 细胞凋亡; D: 80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h 后细胞凋亡变化

Figure 2 The effects of quercetin on cell cycle and apoptosis of SW480 cells. A: cell cycle of control group; B: the changes of cell cycle after 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin treatment for 48 h; C: apoptosis of control group; D: the changes of apoptosis after 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin treatment for 48 h

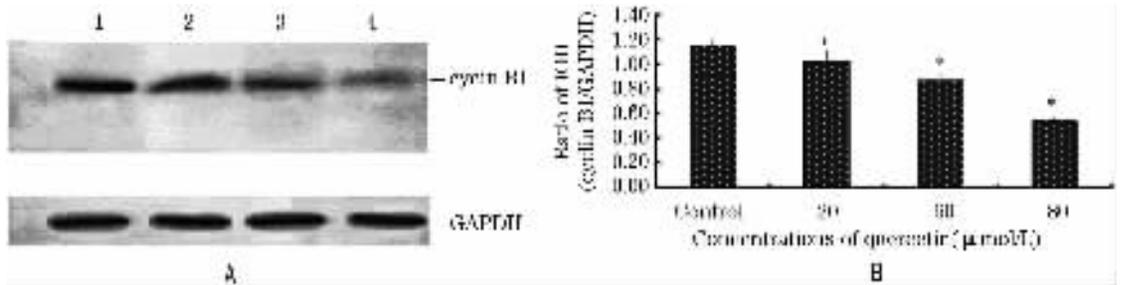


图 3 槲皮素对 SW480 细胞 cyclin B1 蛋白表达的影响 A: Western blot 结果。1 对照组 2 40 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素 3 60 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素 4 80 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。B: 蛋白条带半定量分析图

Figure 3 Expression of cyclin B1 protein in SW480 cells after incubation with different concentrations of quercetin for 48 h by Western blot analysis. A: Western blot result 1: Control; 2: 40 $\mu\text{mol/L}$ quercetin; 3: 60 $\mu\text{mol/L}$ quercetin; 4: 80 $\mu\text{mol/L}$ quercetin B: semi-quantitative analysis. Compared with control group, * $P < 0.05$

3 讨论

研究表明槲皮素能诱导多种肿瘤细胞凋亡^[5,9]、抑制肿瘤细胞增殖^[6,10]、逆转肿瘤细胞的多药耐药性^[11]。然而槲皮素对结肠癌细胞的作用机制不明确。因此,我们研究了槲皮素对结肠癌细胞 SW480 的作用。

结果显示槲皮素对 SW480 细胞增殖表现出双向性, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素可促进 SW480 细胞增殖, 高浓度 ($> 40 \mu\text{mol/L}$) 时抑制 SW480 细胞增殖, 并且随着槲皮素浓度增大和作用时间的延长, SW480 细胞抑制率逐渐增大。160 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 72 h 抑制率达到 89.00%。20 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素虽能促进 SW480 细胞的增殖, 但对细胞周期和细胞凋亡的影响均不大

($P > 0.05$)。槲皮素的这种生物效应,可能与其具有弱雌激素活性有关^[12-13]。

细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中有重要作用^[14]。研究发现在细胞周期的 G_1/S 期及 G_2/M 期存在检验点调控 (check point control),其功能是在细胞进行有丝分裂时控制有丝分裂器的装配,维持细胞倍性,保持细胞分裂的同步,从而保证细胞周期在上游事件完成的前提下启动下游事件^[15]。细胞周期检验点的调控除了修复损伤之外,还可以通过诱导凋亡来清除损伤的细胞,阻滞细胞增殖周期进程而引起凋亡,而凋亡也常伴有细胞生长阻滞^[16]。本研究结果显示,槲皮素作用 SW480 细胞 48 h 后, G_0/G_1 期细胞所占比例降低,而 G_2/M 期细胞所占比例增加,S 期变化不明显。说明槲皮素可以使 SW480 细胞周期阻滞于 G_2/M 期,我们的研究结果与 Marion^[9]和 Yang^[17]等的研究结果一致。槲皮素作用 SW480 细胞 48 h 后,细胞凋亡率随槲皮素浓度的增加而增加,80 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 48 h 后,细胞凋亡率比对照组增加了 3.97 倍(表 1)。细胞周期素(cyclins)是一类随细胞周期变化而变化的蛋白质,cyclin B1 在 G_2 期表达增加,cyclin B1 与 p34cdc2 形成激酶复合物,控制细胞由 G_2 进入 M 期。本研究结果显示,槲皮素作用 48 h 后,SW480 细胞 cyclin B1 蛋白表达下降,提示槲皮素可能通过降低 cyclin B1 蛋白表达将细胞阻滞在 G_2/M 期,抑制细胞增殖。

综上所述,槲皮素对 SW480 细胞的生长具有双向调节作用,但主要表现为抑制作用,其作用机制可能与细胞周期阻断和诱导细胞凋亡有关。槲皮素作为一种广泛存在于自然界中的植物补体,已被证实具有较为肯定的抗肿瘤活性,是一种很有希望的天然化学防癌剂和化学治疗药物。随着研究的深入,必将揭开其抗癌活性的分子机制,为其在肿瘤防治中的应用提供理论基础。

参考文献:

- [1] Echeverry C, Blasina F, Leighton F, et al. Cytoprotection by neutral fraction of tannat red wine against oxidative stress-induced cell death[J]. *Agric Food Chem*, 2004, 52(24): 7395 - 7399.
- [2] Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, et al. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells[J]. *Proteomics*, 2004, 4(7): 2160 - 2174.
- [3] Sampson L, Rimm E, Hollman PC, et al. Flavonol and

flavone intakes in US health professionals [J]. *Am Diet Assoc*, 2002, 102(10): 1414 - 1420.

- [4] Candlish JK. Antioxidants in food and chronic degenerative disease [J]. *Biomed Environ*, 1996, 9(2-3): 117 - 123.
- [5] Borska S, Gebarowska E, Wysocka T, et al. The effects of quercetin vs cisplatin on proliferation and the apoptotic process in A549 and SW1271 cell lines *in vitro* conditions[J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2004, 63(1): 103 - 105.
- [6] Akbas SH, Timur M, Ozben T. The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells [J]. *Surg Res*, 2005, 125(1): 49 - 55.
- [7] Pawlikowska-Pawlega B, Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, et al. The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180 [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2001, 39(2): 217 - 218.
- [8] 张静,单保恩,刘刚叁,等. 香加皮提取物抗肿瘤活性的研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 8(2): 108 - 111.
- [9] Marion R, Robert E, Brigitte M. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling [J]. *Nutrition and cancer*, 1999, 34(1): 88 - 89.
- [10] Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69(2): 307 - 314.
- [11] Chung SY, Sung MK, Kim NH, et al. Inhibition of P-glycoprotein by natural products in human breast cancer cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(7): 823 - 828.
- [12] Van Der Woude H, Ter Veld MG, Jacobs N, et al. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(8): 763 - 771.
- [13] Virgili F, Acconcia F, Ambra R, et al. Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signaling [J]. *IUBMB life*, 2004, 56(3): 145 - 151.
- [14] Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1821 - 1828.
- [15] Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events [J]. *Science*, 1989, 246(4390): 629 - 634.
- [16] Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, et al. Apoptosis and the cell cycle [J]. *Cell Mol Biol Res*, 1994, 40(7-8): 603 - 612.
- [17] Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, et al. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G_2/M arrest and induction of apoptosis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(2): 296 - 304.

