

Cox-2 在槲皮素抑制耐药白血病 HL-60、 HL-60A 细胞增殖中的作用

牛国敏,张复华,杨国雷,凌奕文,潘焕玉,徐嘉愉
(南方医科大学附属南海医院,广东 佛山 528200)

摘要: **目的** 探讨槲皮素体外对急性白血病耐药细胞株 HL-60、HL-60A 的抑制作用及环氧化酶-2(Cox-2)在其中起的作用。**方法** CCK-8 法检测槲皮素对 HL-60 及 HL-60A 细胞的抑制作用,流式细胞仪检查槲皮素诱导细胞凋亡作用;Westert-blot 法检测 Cox-2 在正常人外周血单个核细胞、HL-60 及 HL-60A 细胞表达情况;观察不同浓度槲皮素处理 HL-60 及 HL-60A 细胞前后 Cox-2 表达的变化趋势。**结果** 槲皮素可以诱导 HL-60 及 HL-60A 细胞凋亡及抑制其增殖;Cox-2 在正常人外周血单个核细胞低表达,在 HL-60 及 HL-60A 表达明显升高,HL-60A 表达升高更加明显;经槲皮素处理后,Cox-2 在 HL-60 及 HL-60A 的表达明显下降,HL-60A 下降更加明显。**结论** Cox-2 表达与急性白血病细胞耐药有关,槲皮素通过抑制 Cox-2 的表达诱导 HL-60A 细胞凋亡而抑制细胞增殖。

关键词: 槲皮素;细胞株 HL-60A;细胞凋亡;Cox-2;白血病

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)01-0014-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.01.005

Expression of Cox-2 in Quercetin inhibition of drug-resistant leukemia HL-60 and HL-60A cells

Niu Guomin, Zhang Fuhua, Yang Guolei, Ling Yiwen, Pan Huanyu, Xu Jiayu

(Nanhai Hospital Affiliated to Nanfang Medical University, Foshan 528200, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of Quercetin on leukemia HL-60 and HL-60A cell lines in vitro and the the role of Cox-2 plays during the reaction. **Methods** The CCK-8 assay was used to measure the inhibition of Quercetin on HL-60 and HL-60A cell lines, and a flow cytometry was used to detect the apoptosis of HL-60 and HL-60A cells after exposure to Quercetin; the expressions of Cox-2 in HL-60, HL-60A cells and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from healthy adults were detected by using Western-blot. The change tendency of Cox-2 expression in HL-60, HL-60A cells were detected before and after treatment with Quercetin at different concentrations. **Results** Quercetin inhibited HL-60 and HL-60A cell proliferation and induced apoptosis. Compared with healthy adult PBMC, low expression in PBMC, the expression of Cox-2 on leukemia HL-60 and HL-60A cells increased, and the expression of Cox-2 on HL-60A increased more significantly; the expression of Cox-2 on HL-60A decreased after the cells were exposed to Quercetin, the HL-60A cells decreased more significantly. **Conclusion** The expression of Cox-2 was related to acute leukemia cells drug-resistance, Quercetin induced apoptosis by inhibiting the Cox-2 expression for inhibiting HL-60A cell proliferation.

Key words: Quercetin; HL-60A cell lines; apoptosis, ; Cox-2; leukemia

急性白血病是血液系统常见的恶性疾病,自然病程短,死亡率高,近年来随着化疗方案的不断改进,缓解率有很大提高,但仍有部分患者不能缓解或缓解后很快复发。白血病细胞对化疗药物产生耐药是化疗失败的主要原因。环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, Cox-2)是前列腺素合成过程中的重要限速酶^[1],在多种肿瘤包括急性白血病中表达异常增高^[2-3],通过多种途径参与白血病的发生发展。有研究表明 Cox-2 与恶性肿瘤耐药有关。槲皮素(Quercetin, Que)是自然界常见的植物黄酮类化合物,通过抑制 Cox-2 的表达诱导急性白血病细胞凋亡^[4]。那么槲皮素是否可以同样抑制急性白血病耐药细胞凋亡,其作用机制是否与 Cox-2 有关,本研究通过观察槲皮素处理后 Cox

-2 的表达水平来探讨 Cox-2 在急性白血病细胞耐药中的作用。

1 材料和方法

1.1 槲皮素 槲皮素(sigma 公司)用二甲亚砜(DMSO)溶解,浓度为 100 mmol/L, -20℃低温保存。

1.2 细胞培养 耐药白血病细胞株 HL-60、HL-60A 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,本实验室冷冻保存。复苏的 HL-60 细胞接种于含 10% 胎牛血清(杭州四季青 中国)、3% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 完全培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 2~3 d 传代换液 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 外周血单个核细胞(Peripheral blood mononu-

clear cells, PBMC) 的提取 无菌操作抽取正常成人新鲜离体的静脉全血, EDTA 抗凝后将细胞悬液加在淋巴细胞分离液上, 离心后吸出血浆层和淋巴细胞分离液交界面的外周血单个核细胞。

1.4 CCK-8 法检测槲皮素对 HL-60、HL-60A 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期的 HL-60 及 HL-60A 细胞, 据预实验设槲皮素终浓度为 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 分别加入不同浓度的槲皮素孵育 48 h 后, 再加入 CCK-8 试剂, 在培养箱中继续孵育 4 h 后在酶标仪上检测, 取三个复孔的平均吸光度值作为该浓度条件下的 OD 值。细胞存活率(%)=(处理组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪 AnnexinV-FITC/PI 染色法检测凋亡细胞 取终浓度为 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 48 h 后的 HL-60 及 HL-60A 细胞, 加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 2.5 μl PI。避光孵育 30 min, 流式细胞仪测定细胞凋亡率。早期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+)/PI(-), 晚期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+)/PI(+)

1.6 Western-blot 检测细胞 Cox-2 蛋白的表达 取终浓度为 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h 后的 HL-60 及 HL-60A 细胞, 洗净后于冰上加入 RIPA 裂解液, 冰上充分裂解 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心收集上清, 行 SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜上, 用相应的抗体杂交后加入 HRP(辣根过氧化物酶) 标记的二抗, 以 DAB 显色。用 Actin 作为内参对照以确定加载的蛋白量相等。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件进行数据分析, 计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法分析槲皮素对 HL-60 及 HL-60A 细胞毒性作用 用 CCK-8 法检测细胞存活率, 分析槲皮素的细胞毒性作用, 结果显示, 用浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素分别孵育 HL-60 及 HL-60A 细胞 48 h 后, 细胞存活率逐渐下降, 对 HL-60 细胞毒性作用更明显, 其半数抑制浓度(inhibitory concentration 50, IC50) 值为分别为 61.14 $\mu\text{mol/L}$ 、80.56 $\mu\text{mol/L}$, 结果提示槲皮素不仅能抑制 HL-60 细胞生长, 还能抑制其耐药细胞 HL-60A 的生长。见图 1。

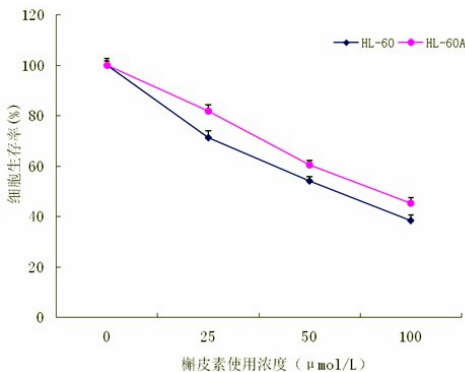


图 1 槲皮素对 HL-60 及 HL-60A 的毒性作用

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 槲皮素作用 HL-60 及 HL-60A 细胞 48 h 后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 结果发现, 槲皮素可以诱导 HL-60 及 HL-60A 细胞凋亡, 并随着药物浓度的增高, 凋亡率逐渐增加, 见表 1。

表 1 槲皮素诱导 HL-60/HL-60A 的细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	HL-60	HL-60A
对照组	2.24 \pm 1.37	1.52 \pm 1.11
槲皮素处理组 ($\mu\text{mol/L}$)		
25	8.79 \pm 1.01 ^a	6.37 \pm 0.82 ^a
50	16.88 \pm 0.89 ^a	14.10 \pm 1.29 ^a
100	21.23 \pm 0.95 ^a	18.31 \pm 0.89 ^a

注: 与对照组比较, a: $P < 0.05$

2.3 正常人 PBMC 和 HL-60、HL-60A 的 Cox-2 蛋白表达水平 正常人外周血中提取单个核细胞用来检测 Cox-2 蛋白的表达, 并与人白血病细胞株 HL-60 和 HL-60A 对比。结果显示: 正常人 Cox-2 的表达量低, HL-60 及 HL-60A 的表达显著升高, HL-60A 中 Cox-2 表达是 HL-60 的 1.52 倍。见图 2。

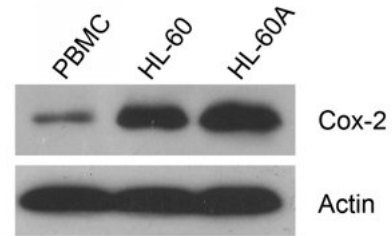


图 2 Cox-2 蛋白在正常人 PBMC、HL-60、HL-60A 的表达

2.4 槲皮素对 HL-60、HL-60A 细胞 Cox-2 蛋白表达的影响 槲皮素处理 HL-60 细胞 48 h 后, 随着槲皮素浓度的升高, Cox-2 蛋白表达水平下降; HL-60A 细胞有相同的趋势, 而且相同槲皮素浓度作用后 HL-60A 细胞 Cox-2 蛋白下降更为明显。见图 3。

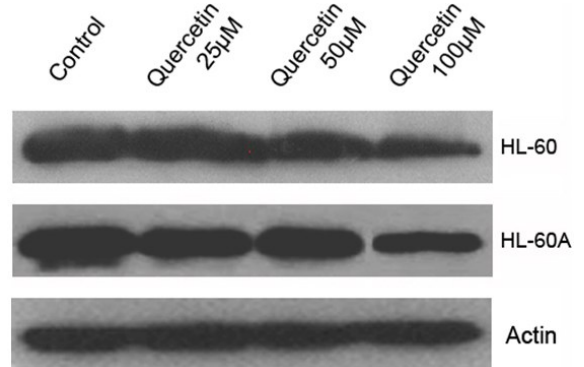


图 3 槲皮素对 HL-60、HL-60A 细胞 Cox-2 蛋白表达的影响

3 讨论

作为自然界分布最广泛的黄酮类化合物,槲皮素具有抗氧化、抗过敏、抗血栓及保护神经等药理作用^[5],而其抑制包括急性白血病在内多种肿瘤生长的作用也得到广泛的证实^[6]。本研究证实槲皮素不仅可以抑制急性白血病细胞株 HL-60 的生长,还可抑制耐药细胞株 HL-60A 的生长。HL-60A 细胞株耐药的主要原因为高表达以 P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药相关蛋白(MRP1)等为代表的 ATP(adenosine triphosphate)结合膜转运蛋白,它们利用 ATP 水解释放的能量将药物泵出细胞,使细胞内药物浓度减低而导致耐药。蔡讯等^[7-8]的一系列研究表明低剂量槲皮素可以抑制 P-gp 和 MRP1 的外流泵功能达到逆转耐药的目。本研究采用 CCK-8 法测定槲皮素对 HL-60 及 HL-60A 的毒性作用,结果发现 IC₅₀ 值分别为 61.14 μmol/L、80.56 μmol/L;相对于需要数倍于原有剂量才可以对耐药细胞产生相同杀伤作用的细胞毒药物来讲,槲皮素仅轻度提高剂量就可以对耐药细胞株发挥相似的杀伤效应,提示槲皮素可以直接抑制 HL-60A 细胞生长增殖。

细胞凋亡(cell apoptosis)又被称为程序化细胞死亡(Programmed cell death,PCD)在正常机体受到严密调控,而细胞凋亡异常的发生几乎贯穿恶性肿瘤发病的整个过程^[9]。针对凋亡异常采取诱导细胞凋亡的药物治或基因治疗可以直接杀伤异常肿瘤细胞,对正常细胞损害小。本研究流式细胞仪测定细胞凋亡,发现槲皮素可以通过诱导细胞凋亡而抑制 HL-60 及 HL60A 细胞增殖。Cox-2 与急性白血病的发生发展关系密切。许多血液肿瘤的原代细胞和细胞株(如急性髓系白血病、急性单核细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤等)均有 Cox-2 的高表达^[10-11]。Cox-2 的表达量与一些血液系统肿瘤的临床预后密切相关,被认为是影响预后因素的独立指标。本研究发现 Cox-2 不仅在 HL-60 细胞高表达,而且在 HL-60A 细胞表达进一步增高;而且经槲皮素处理后 HL-60A 细胞 Cox-2 的表达下降较 HL-60 细胞更加显著。本课题前期研究发现槲皮素通过抑制 Cox-2 的表达降低 Bcl-2 的表达,同时诱导 Bax 的表达,启动 Caspase-3 级联反应诱导 HL-60 细胞凋亡。因此,我们推测槲皮素亦可能通过抑制 Cox-2 的表达启动级联凋亡效应诱导细胞凋亡而抑制 HL-60A 细胞生长增殖。由于槲皮素抑制 HL-60A 细胞 Cox-2 表达较 HL-60 细胞更加显著,推测 Cox-2 在槲皮素抑制

HL-60A 细胞增殖过程中起到了更加重要的作用。

参考文献:

- [1] Guerra JA, Molina MF, Abad MJ, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum macrophyllum*[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(1): 1723-1728.
- [2] Cheong E, Ivory K, Doleman J, et al. Synthetic and naturally occurring COX-2 inhibitors suppress proliferation in a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by inducing apoptosis and cell cycle arrest[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(10): 1945-1952.
- [3] Bernard MP, Phipps RP. CpG oligodeoxynucleotides induce cyclooxygenase-2 in human B lymphocytes: implications for adjuvant activity and antibody production[J]. *Clin Immunol*, 2007, 125(2): 138-48.
- [4] Niu G, Yin S, Xie S, et al. Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(1): 30-37.
- [5] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications[J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4): 418-425.
- [6] Larocca LM, Teofili L, Sica S, et al. Quercetin inhibits the growth of leukemic progenitors and induces the expression of transforming growth factor-beta 1 in these cells[J]. *Blood*, 2005, 85(12): 3654-3661.
- [7] 蔡讯,陈芳源,韩洁英,等. 槲皮素逆转白血病细胞株 HL-60/ADM 多药耐药的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(6): 326-329.
- [8] 陈芳源,蔡讯,韩洁英,等. 槲皮素逆转 HL-60/ADR 多药耐药机制的研究[J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, 24(B11): 9-11.
- [9] Kaiser HE, Bodey B. The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms[J]. *In Vivo*, 2000, 14(6): 789-803.
- [10] Zetterberg E, Lundberg LG, Palmblad J. Expression of cox-2, tie-2 and glycodefin by megakaryocytes in patients with chronic myeloid leukaemia and polycythaemia vera[J]. *Br J Haematol*, 2003, 121(3): 497-499.
- [11] Giles FJ, Kantarjian HM, Bekele BN, et al. Bone marrow cyclooxygenase-2 levels are elevated in chronic-phase chronic myeloid leukaemia and are associated with reduced survival[J]. *Br J Haematol*, 2002, 119(1): 38-45.

收稿日期:2014-12-30;修回日期:2015-01-08