

槲皮素对人白血病 HL-60 细胞 DNA 和细胞周期的影响[△]

苏州医学院药理学研究室(215007) 肖 东* 顾振纶

摘 要 以人白血病 HL-60 细胞为实验对象,利用³H-脱氧胸苷(³H-TdR)掺入实验,JAM 实验法及流式细胞仪观察槲皮素对 HL-60 细胞 DNA 和细胞周期的影响。结果显示,槲皮素 15 μmol/L~120 μmol/L 可显著抑制 HL-60 细胞的 DNA 合成及诱发 DNA 链断裂;槲皮素主要是阻滞 G₁ 期向 S 期移行,使 G₁ 期细胞蓄积,S 期细胞减少。槲皮素的作用呈明显的剂量依赖关系。

关键词 槲皮素 DNA 损伤 培养的 HL-60 细胞 细胞周期

槲皮素(quercetin, Que)为天然的黄酮类化合物,存在于许多植物中,具有抗血小板、抗氧自由基及抗缺血/再灌性心律失常作用^[1~5]。Que 对多种癌细胞的生长具有抑制作用^[6~9]。意味着 Que 可能是一种新的抗癌剂。我们研究了 Que 对人早幼粒白血病细胞系(HL-60)细胞 DNA 和细胞周期的影响,以期 Que 用于抗癌治疗提供理论依据。

1 材料

HL-60 细胞由本实验室所有。槲皮素为 Sigma 产品。RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 产品,小牛血清为中国杭州四季青生物工程材料公司产品。³H-脱氧胸苷(37 kBq/L,比活性 13.32 kBq/mmol)为中国科学院上海原子核研究所产品。

2 方法

2.1 细胞培养:见文献^[6]。

2.2 Que 配制:见文献^[6]。

2.3 ³H-脱氧胸苷(³H-TdR)掺入实验:HL-60 细胞为 1×10⁵cells/L,接种于 12 孔板,每孔 2 mL,分别加入药物或 RPMI-1640 完全培养基,37℃培养 3 h 后,各组分别加入³H-TdR 各 37 kBq,继续培养 12 h,按常规玻璃纤维纸过滤法制样,烘干滤膜,加闪烁

液,于 Beckman 液体闪烁计数器进行自动计数,计算掺入抑制率。

$$\text{掺入抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 cpm} - \text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

2.4 DNA 链断裂量的观察:采用 JAM 实验方法^[10]检测细胞 DNA 链断裂程度,收获 HL-60 细胞 1×10⁵cells/L,接种于 24 孔板。每孔 1 mL,加入 37 kBq ³H-TdR 后 37℃培养 6 h。再次收集细胞去除未掺入的³H-TdR,分别加入药物或 RPMI-1640 完全培养基,37℃培养 48 h,按上法收集样品。细胞 DNA 链断裂程度按以下公式计算:

$$\text{DNA 断裂率}(\%) = \frac{\text{对照组 cpm} - \text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

2.5 细胞周期分析:按文献^[11]方法,在给药物 48 h 后收获细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,在较暗环境下加入碘化丙锭(Sigma)染色(4℃×30 min)。用流式细胞仪(EPICS XL, Coulter, USA)分析细胞周期。

2.6 统计学方法:显著性检验用方差分析。

3 结果

3.1 对 HL-60 细胞 DNA 合成的影响:结果见表 1。与对照相比较,Que 15 μmol/L~120 μmol/L 能明显抑制人 HL-60 细胞 DNA 的合成,120 μmol/L 抑制率高达 88%。经统计

* Address: Xiao Dong, Suzhou Medical College, Suzhou

肖 东 男,36 岁,博士后,副教授。在苏州医学院获得医学博士学位,现在中国科学院上海药物研究所肿瘤细胞和分子药理实验室从事博士后研究。主要从事心血管药理、肿瘤药理和新药研究开发。主持和参与多项课题研究,已发表科研论文 20 余篇,多次在国际会议上进行学术交流,其中 5 篇论文被 SCI 收录。获得部级科技进步三等奖 2 项。

[△]香港保健协会资助项目

学检验,差异非常显著($P<0.01$)。

表 1 Que 对 HL-60 细胞 DNA 合成的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	cpm ($2\times 10^5\text{cells}$)	抑制率 (%)
对照	—	4 336 $\pm$ 330	—
Que	15	3 606 $\pm$ 147*	16.8
	30	2 696 $\pm$ 79**	37.8
	60	1 928 $\pm$ 54**	55.5
	120	522 $\pm$ 52**	88.0

$n=10$,与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ (下同)

3.2 对 HL-60 细胞 DNA 链断裂的影响:结果见表 2。Que 15 $\mu\text{mol/L}$ ~120 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 能诱发 HL-60 细胞 DNA 链断裂,与对照组比较,差异非常显著。

表 2 Que 对 HL-60 细胞 DNA 链断裂的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	cpm ($1\times 10^6\text{cells}$)	DNA 断裂 (%)
对照	—	3 804 $\pm$ 304	—
Que	15	3 085 $\pm$ 97*	18.9
	30	1 904 $\pm$ 202**	49.9
	60	1 360 $\pm$ 84**	64.2
	120	806 $\pm$ 61**	78.8

3.3 对 HL-60 细胞周期的影响:Que 15 $\mu\text{mol/L}$ ~120 $\mu\text{mol/L}$ 处理 HL-60 细胞 48 h, G_1 期细胞从 42.5%增加至 52.3%,S 期细胞从 50.5%降到 30.7%, G_2/M 期细胞也有所增加。Que 主要使 HL-60 细胞迫迟在 G_1 期,与对照组比较,有显著差异(表 3)。

表 3 Que 对 HL-60 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

药物剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞周期(%)		
	G_1	S	G_2/M
0	42.5 $\pm$ 3.1	50.5 $\pm$ 4.9	6.6 $\pm$ 1.9
15	48.5 $\pm$ 5.9	39.7 $\pm$ 4.3**	11.6 $\pm$ 3.0*
30	51.5 $\pm$ 3.7**	38.5 $\pm$ 2.9**	10.0 $\pm$ 2.6*
60	51.1 $\pm$ 2.3**	37.2 $\pm$ 3.3**	11.7 $\pm$ 1.0**
120	52.3 $\pm$ 3.0**	30.7 $\pm$ 2.5**	17.0 $\pm$ 1.2**

4 讨论

在本实验条件下,槲皮素能明显抑制人白血病 HL-60 细胞 DNA 合成,诱发 DNA 链断裂;槲皮素主要是阻滞 G_1 期向 S 期移行,使 G_1 期细胞蓄积, G_2-M 期细胞增加。槲皮素的作用呈明显的剂量依赖关系。

HL-60 细胞是人早幼粒白血病细胞,来源于人急性早幼粒白血病患者的外周血中,

我们既往研究发现槲皮素 15 $\mu\text{mol/L}$ ~120 $\mu\text{mol/L}$ 能明显抑制 HL-60 细胞增殖^[6]。本实验采用脱氧腺苷($^3\text{H-TdR}$)参入实验,发现槲皮素 15 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 即能明显抑制 DNA 的合成,抑制率达 18.9%,随着剂量增加,抑制率明显增加,当 120 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制率高达 88%。结果提示,槲皮素通过抑制 DNA 合成而抑制 HL-60 细胞的增殖。

细胞周期的研究长期以来一直是生命科学领域中的一项重要内容。它有两个重要的时相转换: G_1-S 和 G_2-M ,分别在它们的转接点 G_1/S 及 G_2/M 上设有各自的“检查点”(checkpoint),从而严格控制关卡的通行,实现对细胞周期的调控。本实验表明槲皮素处理的 HL-60 细胞,主要是阻滞 G_1 期向 S 期移行,使 G_1 期细胞蓄积, G_2-M 期细胞增加,而 S 期细胞明显减少。结果与文献^[12]槲皮素对人白血病 T 细胞的作用基本相符。

为了探讨槲皮素抑制 HL-60 细胞增殖、DNA 合成以及其对细胞周期影响的机制,本实验采用 JAM 法探讨槲皮素作用下 DNA 链是否发生断裂。DNA 链断裂早于细胞膜破裂之前发生,因此 JAM 法是一种快速、敏感检测细胞死亡的方法。该方法使用 $^3\text{H-TdR}$ 标记细胞,简便易行^[10]。实验结果显示槲皮素 15 $\mu\text{mol/L}$ ~120 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 能促使 HL-60 细胞 DNA 链断裂,随着剂量增加,断裂量明显增加,当槲皮素增加到 120 $\mu\text{mol/L}$,断裂率为 78.8%。DNA 链裂解成小片段,即槲皮素诱导 HL-60 细胞凋亡。细胞周期分析显示槲皮素首先使 HL-60 细胞阻滞于 G_1 期,然后进入细胞凋亡。我们采用琼脂糖凝胶电泳法、流式细胞仪检测及电镜观察发现槲皮素外理的 HL-60 细胞出现典型的凋亡改变^[6]。从而提示槲皮素能诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡,这可能是槲皮素抑制白血病细胞增殖的机制之一。

参考文献

1 Gu zl, et al. Acta Pharmacol Sin, 1993;14:263
2 Gu zl, et al. Acta Acad Med Suzhou, 1991;11:262

- 3 Gu zl, *et al.* Acta Pharmacol Sin, 1994;15:414
- 4 Xiao D, *et al.* Acta Pharmacol Sin, 1993;14:505
- 5 Xiao D, *et al.* Acta Pharmacol Sin, 1995;16:223
- 6 Xiao D, *et al.* Acta Pharmacol Sin, 1997;18:280
- 7 Scambia G, *et al.* Int J Cancer, 1994;57:211
- 8 Osman Y, *et al.* Exp Hematol, 1995;23:444
- 9 Larocca LM, *et al.* Blood, 1995;85:3654
- 10 Matzinger P. J Immunological Methods, 1991;145:185
- 11 Avila MA, *et al.* Cancer Res, 1994;54:2424
- 12 Yoshida M, *et al.* Cancer Res, 1992;52:6676.

(1998-02-24 收稿)

Effects of Quercetin on DNA and Cell Cycle of Human Promyelocytic Leukemia Cells (HL 60)

Xiao Dong and Gu Zhenlun (Research Section of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

Abstract Effects of quercetin, a flavonoid found in many plants, on DNA and cell cycle of human promyelocytic leukemia cells (HL60) were studied. Assay to ³H-TdR incorporation, JAM test and flow cytometric analysis were undertaken. Quercetin, 15~120 μ mol/L decreased the syntheses of DNA, degraded their DNA into small fragments, mainly blocked to progress through S-phase and arrested at G₁ phase of HL-60 cells in a concentration-dependent manner. Results suggested that antitumor action of quercetin may be related to its inhibition of DNA syntheses and initiation of DNA damage.

Key words quercetin DNA damage HL-60 cells cultured tumor cells cells cycle

蝎毒与吗啡中枢镇痛作用效果比较

潍坊医学院应用药理学实验室(261042) 李 宁* 吕欣然 韩惠蓉 朱庆磊 李红军
北京大学生命科学院 于龙川

摘 要 蝎毒及其提取物有明显的镇痛作用,我们对其中枢镇痛作用效果与吗啡进行了比较。向大鼠中脑导水管周围灰质(PAG)内微量注射蝎毒(scorpion venom, SV)和吗啡(morphine),以热辐射甩尾法为指标,观察比较二者中枢镇痛作用效果。结果表明:向大鼠 PAG 内恒速注射 0.025%~0.10% SV 0.5 μ L(相当于 0.5 μ g/kg~2 μ g/kg)即出现痛阈升高,20 min 达峰值(痛阈最大提高 150%以上),与对照组比较有显著差异($P<0.01$),而欲使大鼠痛阈提高 150%,PAG 内注射吗啡的用量约为 10 μ g/kg。提示 SV 有很强的中枢镇痛作用,作用强于吗啡 4 倍以上。

关键词 蝎毒 吗啡 镇痛作用 中枢

全蝎为名贵中药,《本草纲目》记载以全虫或蝎尾入药;主治风湿痹痛。刘崇铭^[1]、雷留根^[2]等报道蝎毒(SV)及其提取物有较强的镇痛效果,但其镇痛机制的研究未见报道。我们用热辐射甩尾法研究了 SV 的中枢镇痛作用,为进一步揭示 SV 最佳镇痛效果及其

中枢机制奠定基础。

1 材料

1.1 SV 的采集:电刺激法采自山东泗水县产东亚钳蝎 *Buthus marthensii* Karsch^[3],用生化法分离、提取 SV,低温制成冻干粉。

1.2 药物的配制:用 Hank's 缓冲液 pH

* Address: Li Ning, Weifang Medical College, Weifang

李 宁 男,医学学士,讲师。主要从事药理和生理学方面的研究工作。现为山东省教委重点实验室——应用药理学实验室的成员。先后参加了国家自然科学基金、省自然科学基金、省卫生厅、省教委等多项科研课题的研究工作。其中参加的国家自然科学基金“单纤维肌电图及其应用”的课题获省科委科技进步二等奖,参加的省教委“蝎毒对心脑血管药理作用的研究”课题获省教委应用成果三等奖。目前承担着山东省教委“蝎毒对神经痛模型镇痛作用的研究”等课题。