

槲皮素抗白血病作用的研究进展

矫 强,赵劲秋,欧阳仁荣

(上海第二医科大学附属仁济医院 血液科,上海 200001)

槲皮素作为一种天然黄酮类化合物,广泛存在于蔬菜和水果中。由于具有诸多方面的生理活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血脂等,目前正受到医学界的普通关注。实验研究表明,槲皮素尚可以预防肿瘤的发生,并对多种恶性肿瘤细胞生长有明显抑制及促凋亡作用^[1~3],诱导某些白血病细胞的分化^[4,5]。值得注意的一点,槲皮素可逆转肿瘤细胞的多药耐药性^[6~9]。本文就近年来有关槲皮素抗白血病细胞作用的研究及其可能机制进行综述。

1 槲皮素抗细胞增殖作用

槲皮素可抑制多种白血病细胞的增殖,其可能机制:

1.1 抑制蛋白质合成:最近, Ito等^[10]发现 100 μ mol/L槲皮素可显著抑制 HFS/N1、H7等白血病细胞的蛋白质合成。同时,实验中观察到干扰素诱导的蛋白激酶(PKR)、血红素调控抑制物(HRI)、内质网蛋白激酶(PERK)3种真核生物转录起始因子 α (eIF α)激酶活性较未使用槲皮素的对照组显著增加。由此证明,槲皮素可通过激活 eIF α 激酶,使 eIF2磷酸化失活而抑制蛋白质合成。进一步研究表明,槲皮素可促进 Rax蛋白与 PKR的结合而激活 PKR。HRI在非红细胞中的调控尚不清楚,但已知在网状细胞中热休克蛋白 HSP90为其抑制物。槲皮素可能通过抑制 HSP90合成对其产生影响。PERK可被内质网应激原特异性激活,这种应激活动源于内质网钙离子的释放,而槲皮素已被证明有抑制肌浆网 Ca²⁺-ATP酶的作用,由此猜测是否槲皮素在白血病细胞中也通过类似机制激活 PERK?

1.2 阻断细胞周期:HL-60细胞经 20~80 μ mol/L槲皮素处理后增殖明显受抑制,G0/G1期细胞减少,G2/M期细胞增加,S期细胞数变化不大。说明槲皮素可将 HL-60细胞阻滞于 G2/M期。同一实验中发现槲皮素对 HL-60细胞的胞浆蛋白激酶 C(PKC)和胞膜酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性有明显抑制作用。PKC与 TPK均为调控细胞增殖的重要酶类。推测槲皮素影响细胞周期的机制应与其抑制 PKC与 TPK活性有关^[11]。

1.3 上调 TGF β_1 的分泌:转化生长因子 β_1 (TGF β_1)对造血干细胞生长有双向调节作用。在白血病细胞中多数情况下显示负性调节作用。其调控作用可能是通过诱导周期素依赖性激酶抑制物(CDKI)和抑制周期素/周期素依赖性激酶复合体形成而实现的。槲皮素在体外实验中能诱导 AML细胞与 ALL细胞产生大量 TGF β_1 ,并使细胞生长受抑。槲皮素的这一作用可被 TGF β_1 单克隆抗体和 TGF β_1 反义寡核苷

酸阻断。证明槲皮素可通过诱导 TGF β_1 来抑制白血病细胞生长^[12]。

1.4 作用于雌激素受体:II型雌激素结合位点存在于多种白血病细胞,与细胞增殖有关。在槲皮素与阿糖胞苷协同作用抗 HL-60细胞增殖的实验中,槲皮素抗细胞增殖程度与剂量呈依赖性,并与其和II型雌激素结合位点的结合数量呈正相关。而与槲皮素结构类似的芦丁不与II型雌激素结合位点结合,亦无抗细胞增殖作用。这说明槲皮素可作用于雌激素受体而抑制细胞增殖^[13]。

2 槲皮素诱导细胞凋亡的作用

2.1 下调 bcl-2基因表达:bcl-2基因表达是一种重要的抗凋亡基因,其表达产物 bcl-2蛋白家族广泛分布于线粒体外膜、内质网和核膜。其中 bcl-2蛋白可以作用于各种因素致凋亡的共同通路,抑制 bax蛋白在线粒体外膜上形成通道的活性,从而抑制了凋亡的起始步骤——钙离子进入胞浆。其过度表达可导致细胞生长失控。槲皮素可明显抑制 HL-60细胞中 bcl-2蛋白合成及 bcl-2 mRNA水平,并诱导 HL-60细胞凋亡。这表明槲皮素诱导 HL-60细胞凋亡与下调 bcl-2基因表达有关^[1]。

2.2 抑制与增殖有关基因表达:c-myc、ki-ras是与细胞增殖有关的致癌基因,在 K562细胞中高度表达。经槲皮素处理后,首先出现胞内三磷酸肌醇(IP3)浓度下降,继而 c-myc、ki-ras基因表达下降,随后出现 K562细胞的凋亡。由于槲皮素是 PI-3激酶抑制剂,推测槲皮素可能通过抑制 PI-3激酶下调 c-myc、ki-ras基因表达,诱导 K562细胞凋亡^[5]。

2.3 促使细胞色素 C从线粒体释放:在胞浆中有 dATP和细胞色素 C存在的条件下,胞浆中的 APAF-1蛋白可使两分子半胱天冬酶 9(caspase-9)聚合而激活,进而激活半胱天冬酶 3(caspase-3)。激活的 caspase-3可激活半胱天冬酶激活的 DNA酶(CAD),使 DNA降解,导致细胞凋亡。在槲皮素诱导 HL-60细胞凋亡的实验中发现,槲皮素可促使细胞色素 C自线粒体释放,引起线粒体跨膜电位下降,其作用呈剂量依赖性。同时亦观察到 caspase-3活性随槲皮素剂量的增加而增加。证明槲皮素可通过促使细胞色素 C自线粒体释放而降低线粒体膜电位。可见,槲皮素促使细胞色素 C自线粒体释放是其诱导凋亡的又一途径^[14]。

3 槲皮素诱导白血病细胞分化

在 27种黄酮类化合物对 HL-60细胞分化作用研究中,发现 10 μ mol/L槲皮素可诱导 HL-60细胞向单核细胞分

* 收稿日期:2002-01-08

作者简介:矫 强(1976-),男,硕士研究生,目前正从事中药干预白血病多药耐药的研究。Tel (021)63260930转 2022 E-mail jiao-qiang200@ yahoo.com.cn

化^[4]。槲皮素处理 HL-60 细胞 5 d 后发现细胞生长明显受抑制, 胞核胞浆扩大, 向单核细胞分化。通过对黄酮类化合物的比较, 认为其作用机制可能是通过竞争 PKC、TPK、PKA 拓扑异构酶的 ATP 结合位点, 抑制这些酶的活性, 从而影响细胞的增殖分化。有趣的是, 实验发现 PI-3 激酶抑制剂可诱导 HL-60 向粒细胞分化, 而槲皮素作为一种强的 PI-3 激酶抑制剂却不诱导 HL-60 向粒细胞分化, 其机制尚待澄清。

4 槲皮素对热休克蛋白的影响

热休克蛋白 (HSPs) 是某些细胞在受热冲击后产生的一种保护性蛋白。作为伴随蛋白, 它参与蛋白质合成时肽链盘曲折叠, 纠正错误盘曲及蛋白质在细胞内的转位功能。HSP 基因转录主要受热休克顺式作用元件 (HSE) 和热休克反式作用因子 (HSF) 调控。HSF 通过亮氨酸拉链结构形成三聚体, 经丝氨酸残基磷酸化后进入核内作用于 HSE, 从而启动 HSP 基因转录。HSP90 对 HSP 基因转录有反馈抑制作用。Li 等^[15]在研究 L929 细胞的热休克活动中, 发现预先加入槲皮素可在最初十几小时内抑制 HSPs 的合成, 却在之后的恢复阶段增加其合成。而在热冲击后加入槲皮素则不能抑制 HSPs 的合成。这与槲皮素对 HSF 的影响是一致的。说明槲皮素对 HSPs 合成的抑制点早于 HSF, 可能是通过上游激酶发挥作用的。由于槲皮素可抑制 HSF 与 HSE 的结合能力, 而并不影响 HSF 三聚体的形成。同一实验中亦表明槲皮素可下调磷酸化 HSF 的含量。由此证明槲皮素通过抑制 HSF 磷酸化而抑制 HSP 基因转录。结合以前实验中热休克可引起 PKC 活性增加, PKC 抑制剂 H7 可抑制热休克活动, 而槲皮素也可抑制 PKC 活性, 推测槲皮素对热休克蛋白的影响与其抑制 PKC 活性有关。HSP90 可负反馈调节 HSP90 基因转录可能是槲皮素处理的细胞在热冲击后 20 h HSP 合成反而较对照组增加的原因。

5 槲皮素逆转 P 糖蛋白 (Pgp) 介导的多药耐药

5.1 直接抑制 Pgp 外排泵功能: Pgp 结构目前已经清楚, 由 12 个穿膜结构域和两个胞内可溶性蛋白结构域所组成。可分为两半, 每部分包括 N 端 6 次穿膜结构和 C 端的胞内核苷酸结合结构域 (NBD)。NBD 可结合 ATP 并发挥 ATP 酶作用, 这在 Pgp 药物外排泵功能中是必需的^[16]。通过对提纯的 Pgp 进行研究, 发现槲皮素可竞争 Pgp 的 NBD, 从而抑制 Pgp 的药物外排泵功能。此外, 槲皮素还可抑制谷胱甘肽-S 转移酶活性^[8], 而多药耐药相关蛋白 (MRP) 必须在谷胱甘肽存在下才能发挥药物外排泵功能, 这可能与槲皮素在非 Pgp 介导的多药耐药细胞 (如 HL-60/ADR) 中的作用有关^[9]。

5.2 抑制 mdr1 基因转录: 最近 Kim 等^[16]研究表明槲皮素可下调多药耐药细胞中 Pgp 及 mdr1 基因转录。根据 FM3A/M 和 P388/M 耐药细胞中 HSF 呈活化状态, 且 mdr1 基因启动子中含有 HSE, 提出槲皮素可能是通过抑制 HSF 活性而影响 mdr1 基因转录的。

6 槲皮素抗氧化损伤作用

DNA 氧化损伤早造成突变往往是药物性白血病发病原

因。Sestili 等^[17]发现槲皮素在铁离子存在下可抑制氢过氧化物造成的 DNA 断裂和损伤。认为槲皮素是通过与铁离子形成螯合物而发挥抗氧化作用的。一些稠环芳香化合物如氯霉素可诱导 DNA 加合而致癌。槲皮素作为芳烃受体的天然配体, 可与之结合并诱导 CYP1A1 基因转录合成细胞色素 P450, 从而抑制稠环芳烃诱导的 DNA 损伤, 起到防癌作用。

7 结语

综上所述, 槲皮素的抗白血病作用主要是通过广泛竞争性抑制 ATP 酶活性而发挥作用的。其作用于细胞增殖分化凋亡信号传递通路的具体调控点不是单一的, 但槲皮素的抗白血病作用已得到医学界的普遍肯定, 并将进入临床试验阶段。相信不久的将来, 槲皮素将作为一种新的临床抗白血病药物展现在世人面前。

参考文献:

- [1] 肖东, 顾振纶, 朱寿彭, 等. 槲皮素下调人白血病 HL-60 细胞 bcl-2 基因表达 [J]. 中国药理学报, 1998, 19(6): 551-553.
- [2] Richter M, Ebermann R, Marian B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling [J]. Nutr Cancer, 1999, 34(1): 88-99.
- [3] Miodini P, Fioravanti L, Fronzo G D, et al. The two phytoestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function [J]. Br J Cancer, 1999, 80(8): 1150-1155.
- [4] Kwaii S, Tomono Y, Katase E, et al. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation [J]. Anticancer Res, 1999, 19(2A): 1261-1269.
- [5] Csokay B, Prajna N, Weber G, et al. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin [J]. Life Sci, 1997, 64(24): 2157-2163.
- [6] Kim S H, Yeo G S, Lim Y S, et al. Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells [J]. Exp Mol Med, 1998, 30(2): 87-92.
- [7] Conseil G, Baubichon C H, Dayan G, et al. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein [J]. PNAS, 1998, 95(17): 9831-9836.
- [8] Shapiro A B, Ling V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted Pglycoprotein [J]. Biochem Pharmacol, 1997, 53: 587-596.
- [9] Versantvoort C H, Shuudhuis G S, Pinedo H M, et al. Genistein modulates the resistance drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated resistant tumor cells [J]. Br J Cancer, 1993, 68(5): 939-946.
- [10] Ito T, Warnken S P, May W S, et al. Protein synthesis inhibition by flavonoids: role of eukaryotic initiation factor 2 α kinases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(2): 589-594.
- [11] Kang T B, Liang N C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells [J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54: 1013-1018.
- [12] Larocca L M, Teofili L, Sica S, et al. Quercetin inhibits the growth of leukemic progenitors and induces the expression of transforming growth factor β_1 in these cells [J]. Blood, 1995, 85(12): 3654-3661.
- [13] Teofili L, Pierelli L, Iovino S M, et al. The combination of quercetin and arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth [J]. Leuk Res, 1992, 16(5): 497-503.
- [14] Wang I K, Lin-Shiau S H, Lin J K, et al. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome C release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells [J]. Eur J Cancer, 1999, 35(10): 1517-1525.
- [15] Li D P, Calzi S L, Sanchez E R, et al. Inhibition of heat shock potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression [J]. Cell Stress Chaperones, 1999, 4(4): 223-234.
- [16] Ros D D. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia

[J]. Leukemia, 2000, 14(3): 467-473.

[17] Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, et al. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-

butylhydroperoxide free radical scavenging versus iron chelating mechanism [J]. Free Radic Biol Med, 1998, 25(2): 196-200.

枳椇子研究进展

嵇扬¹, 陆红²

(1. 解放军总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100071; 2. 解放军 463 医院 传染科, 辽宁 沈阳 110005)

枳椇子为鼠李科 (Rhamnaceae) 拐枣属 (*Hovenia* Thunb.) 植物枳椇的干燥成熟种子。又名鸡距子、拐枣、枸等。始载于《唐本草》、《本草纲目》、《雷公炮制论》、《苏沈良方》、《救荒本草》、《医林纂要》等多部医药著作中均有记载。属养阴、生津、润燥、止渴、凉血类药物。其功效主要为清热利尿、止渴除烦、解酒毒。用于热病烦渴、呃逆、小便不利、酒精中毒^[1,2]。近年来, 国内外学者对枳椇的研究有新的进展。现综述如下:

1 原植物及其分布

枳椇属植物有 3 种, 2 变种。北枳椇 *Hovenia dulcis* Thunb; 枳椇 *H. acerba* Lindl, 枳椇 (原变种) *H. acerba* Lindl. var. *acerba*, 侏江枳椇 (变种) *H. acerba* Lindl. var. *kiukiangensis* (Hu et Cheng) C. Y. Wu; 毛果枳椇 *H. trichocarpa* Chun et Tsiang, 毛果枳椇 (原变种) *H. trichocarpa* Chun et Tsiang var. *trichocarpa*, 光叶毛果枳椇 (变种) *H. trichocarpa* var. *robusta* (Nakai et Y. Kimura) Y. L. Chen et P. K. Chou

本属植物分布于中国、朝鲜、日本和印度。我国除东北外各省区均有分布, 野生或栽培。在世界各国也常有栽培。

2 药用部位及其功效^[2]

北枳椇的果实、种子可清热利尿、止渴除烦、解酒毒, 用于热病烦渴、呃逆、呕吐、小便不利、酒精中毒; 树皮可活血、舒筋解毒, 用于腓肠肌痉挛、食积、铁棒锤中毒; 果梗可健胃、补血, 用于滋养补血; 叶用于死胎不出; 汁液用于腋下狐臭。

枳椇的种子可止渴除烦、解酒毒、利二便, 用于醉酒、烦热、口渴、呕吐、二便不利; 果序轴可治疗风湿。

毛果枳椇的种子可止渴除烦、解酒毒、利二便。

3 枳椇和枳椇子的本草考证^[4]

枳椇外形酷似北枳椇, 容易混淆。无论是古代本草, 还是现代资料对二者均未加以严格区分。事实上, 由于两种植物形态和分布十分相似, 均来源于枳椇树、拐枣树等。因此, 这两种植物应同等药用。药材中所指枳椇应为肉质膨大的花序轴; 枳椇子应为种子。

4 化学成分及有效部位

4.1 葡萄糖, 硝酸钾, 苹果酸钾^[5]

4.2 黄酮类化合物^[6,7]: 双氢山柰酚、槲皮素、(+)-3, 3', 5', 5, 7-五羟基双氢黄酮(+)-双氢杨梅黄素, 亦称蛇葡萄素或白藜素 (ampelopsin)

4.3 皂苷和糖苷^[5,8]: 枳椇苷 C D G G' H (hovenoside G D G G' H), 枳椇苷 D G 相应的苷元为酸枣苷元; 北枳椇苷 A₁ A₂ B₁ B₂ (hovenidulcioside A₁ A₂ B₁ B₂) 即 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] hovenidulcigenin A 3-O- β -D-glucopyranosyl hovenidulcigenin A 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl] hovenidulcigenin B 3-O- β -D-glucopyranosyl hovenidulcigenin B; 北拐枣苷 III (hoduloside III)

4.4 生物碱^[9]: β -carboline 系生物碱化合物 (perlyryrine), 亦称黑麦草碱; 枳椇碱 I, II, III (hovenitins I, II, III)^[10]

4.5 脂肪酸^[11]: 戊酸甲酯等 22 个饱和脂肪酸和 Δ^9 -十八烯酸甲酯等 5 个不饱和脂肪酸及 14 个少量或痕量脂肪酸成分。

4.6 (+)-没食子儿茶素 [(+)-gallocatechin]^[8]

5 药理作用

5.1 对酒精中毒的作用

5.1.1 对脂多糖 (LPS) 诱发长期饲喂乙醇大鼠肝损害具保护作用^[12]: 大鼠给予枳椇子水提取物 100 mg/kg (相当于生药 570 mg/kg) 每日 2 次, 同时给予含乙醇 (占总热量 36%) 液体食物 4 周, 按 1 mg/kg iv LPS 后, 8 h 尾静脉取血测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST); 24 h 摘取肝脏测丙二醛 (MDA)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)。结果表明: 枳椇子水提取物显著抑制给予乙醇+LPS 引起的 ALT、AST 及 MDA、TG、TC 升高。

5.1.2 加快乙醇代谢^[12]: 大鼠 ig 给予枳椇子水提取物 100 mg/kg (相当于生药 570 mg/kg), 1 h 后大鼠 ig 给予 50% 乙醇, 剂量为 2 g/kg 体重。结果显示: 枳椇子水提取物可显著降低给予乙醇后 3, 6 h 的血中乙醇浓度。

5.1.3 抑制乙醇诱导的肌松作用^[10]: 枳椇子中分得的二氢黄酮 (hovenitins I, II, III) 对乙醇诱导的肌松作用有抑制作用。

5.2 保肝活性^[13]

* 收稿日期: 2001-09-07

作者简介: 嵇扬 (1957-), 女, 医学硕士, 副主任药师, 现在解放军总后勤部药检所药理室工作, 从事药检药理工作, 主要研究药品质量控制。

Tel: 010-66949079