

# 槲皮素对人早幼粒白血病细胞 RNA 聚合酶活性和细胞周期的影响

黄迪南 侯 敢 祝其锋

**摘要** 本文旨在探讨槲皮素对人早幼白血病细胞(HL-60)RNA 聚合酶活性和细胞周期的影响及其相互关系。分别用 4、20 和 100 $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理培养的 HL-60 细胞 2 天或用 20 $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理 0~5 天。应用流式细胞仪进行细胞周期分析,并通过体外核转录实验测定总 RNA 聚合酶活性和 RNA 聚合酶 II 活性。结果表明,槲皮素处理 HL-60 细胞后,体外核转录活性降低,总 RNA 聚合酶活性尤其是 RNA 聚合酶 II 活性受抑制,并呈时间和剂量依赖关系;细胞周期中  $G_1$  期细胞增加,并与作用时间和剂量呈依赖关系,提示槲皮素阻断 HL-60 细胞周期于  $G_1$  期;结果分析还表明,槲皮素处理的 HL-60 细胞,其总 RNA 聚合酶活性尤其是 RNA 聚合酶 II 活性受抑制程度与  $G_1$  期细胞所占百分比增加程度呈明显的相关性。提示槲皮素抑制 HL-60 细胞体外核转录活性尤其抑制 RNA 聚合酶 II 活性,可能是槲皮素阻断 HL-60 细胞周期于  $G_1$  期的影响因素之一。

**关键词** 槲皮素;白血病;早幼粒;细胞周期;RNA 聚合酶

槲皮素及其甙类是植物中分布最广的黄酮醇类化合物。以往的研究表明,槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的生长<sup>[1]</sup>及加强某些抗癌药物的抗癌细胞生长作用,并可抑制癌细胞 DNA 的生物合成<sup>[2]</sup>。因而,槲皮素被认为是颇具应用前景的抗癌药物或抗癌辅助药物。然而,槲皮素抗癌细胞增殖的机理尚未阐明。本文研究了槲皮素对培养的人早幼粒白血病细胞株(HL-60)RNA 聚合酶活性和细胞周期的影响及其相互关系,以期探讨槲皮素抑制 HL-60 细胞增殖的作用机理。

## 1 材料和方法

1.1 HL-60 细胞株 由军事医学科学院惠赠。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基(Gibco),槲皮素(Guercetin, Sigma), $\alpha$ -鹅膏蕈碱( $\alpha$ -amanitin, Sigma),Nonidet P-40(Sigma),HEPES(Aldrich), $^3\text{H}$ -UTP(20mCi/mmol, 中科院上海原子能研究所),余为国产分析纯试剂。

1.3 药物处理 取对数生长期细胞以  $1 \times 10^5/\text{ml}$  细胞于大培养瓶中培养,按所需量加入槲皮素(DMSO 溶解)或等量 DMSO 作空白对照(DMSO 终浓度均  $< 0.01\%$ ),培养至实验所需时间后取细胞进行细胞周期分析或制备细胞核。

1.4 细胞核的制备 参照 Stallcup 和 Washington 方法<sup>[3]</sup>进行。分离的核涂片,要求在相差显微镜下检查无细胞质污染。按二苯胺法测定细胞核的 DNA 含量,

以  $1\mu\text{g/ml}$  DNA 浓度将核悬于 0.34mol/L 蔗糖溶液中备用。

1.5 体外核转录实验 参照 Goodland 方法<sup>[4]</sup>进行。RNA 聚合酶活性以参入 RNA 中的  $^3\text{H}$ -UTP 量计算,用 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA 表示。

1.6 细胞周期分析 参照 Krishan 方法<sup>[5]</sup>进行。应用 EPICSXL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司产品)进行细胞周期分析(软件自动处理)。

## 2 结果

2.1 槲皮素作用剂量和作用时间对 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性的影响

不同剂量的槲皮素处理 HL-60 细胞 2 天,等量 DM-SO 为空白对照,进行体外核转录实验,计算 RNA 聚合酶活性,结果见图 1。20 $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理 HL-60 细胞 0~4 天,结果见图 2。

图 1 和图 2 显示,槲皮素处理 HL-60 细胞后,各处理组 RNA 聚合酶活性降低(与对照组比较,  $P < 0.01$ ),呈剂量和时间依赖关系。其中, RNA 聚合酶 II 活性较总 RNA 聚合酶活性受抑制程度更高,剂量和时间依赖关系更为明显。

2.2 槲皮素作用剂量和作用时间对 HL-60 细胞及其周期的影响

分别用 4、20 和 100 $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理 HL-60 细胞 2 天,或 20 $\mu\text{mol/L}$  槲皮素处理 0~5 天,细胞周期的变化见表 1 和表 2。

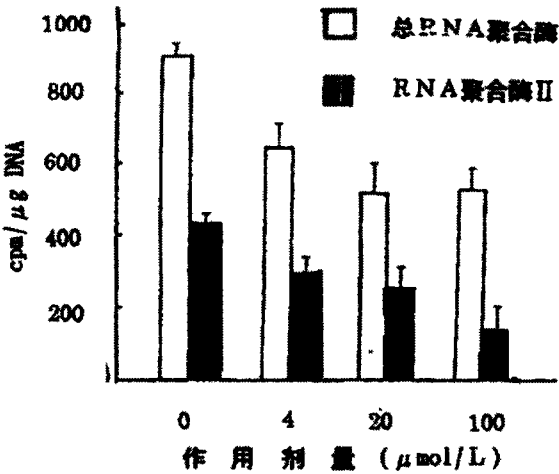


图1 槲皮素浓度对 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性的影响  
表 1

槲皮素浓度对 HL-60 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ )					
剂 量 ( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>n</i>	$G_1$ (%)	S (%)	$G_2$ (%)	$G_2/G_1$ (DNA 含量比)
对 照	3	22.6 $\pm$ 0.3	59.1 $\pm$ 0.6	18.6 $\pm$ 0.3	1.919 $\pm$ 0.003
4	3	31.5 $\pm$ 0.7 *	54.5 $\pm$ 1.2	14.4 $\pm$ 0.4	1.939 $\pm$ 0.007
20	3	35.2 $\pm$ 1.1 *	53.2 $\pm$ 1.8	15.5 $\pm$ 0.6	1.944 $\pm$ 0.003
100	3	38.4 $\pm$ 1.5 *	54.9 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 1.7	1.956 $\pm$ 0.004

\*  $P < 0.01$  与对照组比较

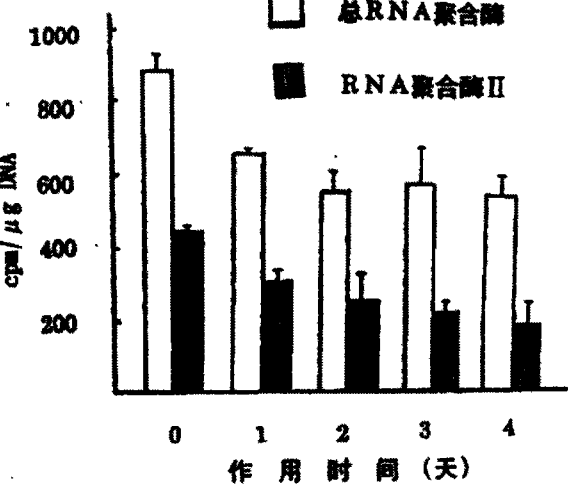


图2 槲皮素作用时间对 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性的影响

表 2 槲皮素作用时间对 HL-60 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ )

时 间 (天)	<i>n</i>	$G_1$ (%)	S (%)	$G_2$ (%)	$G_2/G_1$ (DNA 含量比)
0	3	22.7 $\pm$ 0.1	58.8 $\pm$ 0.5	19.0 $\pm$ 0.4	1.922 $\pm$ 0.002
1	3	29.3 $\pm$ 1.1 *	53.2 $\pm$ 1.6	17.8 $\pm$ 0.6	1.923 $\pm$ 0.004
2	3	34.3 $\pm$ 1.0 *	50.1 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 1.3	1.931 $\pm$ 0.003
3	3	37.2 $\pm$ 0.5 *	48.0 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 0.5	1.935 $\pm$ 0.006
4	3	38.1 $\pm$ 1.5 *	47.2 $\pm$ 2.9	15.2 $\pm$ 1.3	1.955 $\pm$ 0.004
5	3	41.5 $\pm$ 2.2 *	47.6 $\pm$ 1.2	11.4 $\pm$ 1.8	1.952 $\pm$ 0.008

\*  $P < 0.01$  与对照组比较

表 1 和表 2 结果显示,随槲皮素处理 HL-60 细胞时间延长或剂量增加, $G_1$  期细胞所占百分比明显增加,且呈剂量和时间依赖关系,而其余各期细胞相对减少。提示槲皮素阻断 HL-60 细胞于  $G_1$  期。

2.3 槲皮素作用后 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性与细胞周期的关系分析

分别以槲皮素作用剂量(对数)或作用时间为横坐标,以 RNA 聚合酶活性抑制率和  $G_1$  期细胞增加率为纵坐标作图,如图 3 和图 4 所示。

图 3 和图 4 表明,槲皮素处理后的 HL-60 细胞,总

RNA 聚合酶活性抑制率尤其是 RNA 聚合酶 II 活性抑制率与  $G_1$  期细胞增加率呈明显的相关性。

3 讨论

在已往的报道中,各种癌细胞生长抑制剂和分化诱导剂等对 HL-60 细胞 RNA 生物合成的影响结果尚无定论。Grosso 等<sup>[6]</sup>将 HL-60 细胞核用 60mmol/L DMSO 处理 5 天,细胞核 run-off 实验表明总 RNA 聚合酶活性无明显改变。Emey 等<sup>[7]</sup>用 Calatriol 处理 HL-60 细胞核,总 RNA 聚合酶和对  $\alpha$ -Amanitin 敏感的 RNA 聚合酶 II 活性均显著降低。Tsiftoglou 等<sup>[8]</sup>发现 DMSO 和维甲酸处理

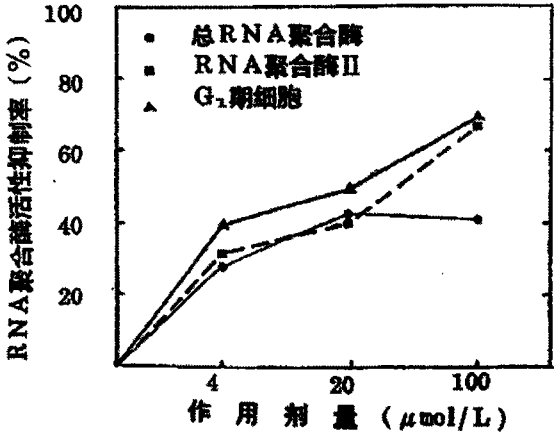


图 3 不同浓度槲皮素作用 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性与细胞周期的关系

的 HL-60 细胞,其<sup>3</sup>H-UTP 参入核和胞浆中的量在 48 ~ 72 小时显著减少。虽然,Uddin 等<sup>[2]</sup>曾报道了槲皮素能抑制 HL-60 细胞的 DNA 生物合成,但尚未见有关槲皮素对肿瘤细胞 RNA 生物合成影响的报道。本文用槲皮素处理培养的 HL-60 细胞后,分离纯化核进行体外核转录实验,结果表明,体外核转录活性降低,总 RNA 聚合酶活性尤其是对  $\alpha$ -Amanitin 敏感的 RNA 聚合酶 II 活性明显受抑制,并呈剂量和时间依赖关系。另外,我们还发现 100 $\mu$ mol/L 槲皮素处理超过 3 天或 20 $\mu$ mol/L 处理超过 4 天,流式细胞仪上显示出死细胞明显增加,表明槲皮素对 HL-60 细胞具有细胞毒性作用。槲皮素的这种细胞毒性可能导致核(膜)的损伤,以至于我们在观察时间因素的影响时,槲皮素处理进行到第 5 天即无法制备出有转录活性的完整细胞核。

槲皮素对细胞周期的影响有多家报道结果不一,似乎涉及到细胞增殖的各期。Ranellitte 等<sup>[1]</sup>报道,槲皮素阻断 HT-29、WiDr、COL0201 和 LS-174 人克隆细胞株于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。Hosokawa 等<sup>[9]</sup>的研究表明,槲皮素阻断人克隆癌细胞株 (Co10320 DM) 于 G<sub>1</sub>/S 交界处。Avila 等<sup>[10]</sup>报道了人乳腺癌细胞 (MDA-M13468) 可被槲皮素阻断于 G<sub>1</sub>/M 期。本文研究结果表明,经槲皮素处理的 HL-60 细胞,G<sub>1</sub> 期细胞增加并呈剂量和时间依赖关系,说明细胞被阻断于 G<sub>1</sub> 期,这与多数报道相一致。

众所周知,G<sub>1</sub> 期为 DNA 和蛋白质合成的准备阶段,细胞 RNA 生物合成旺盛,各种与复制有关蛋白质的 mRNA 在此期由对  $\alpha$ -Amanitin 敏感的 RNA 聚合酶 II 合成。因此,我们推测,槲皮素阻断细胞周期于 G<sub>1</sub> 期与抑制 RNA 的生物合成之间可能存在着某种内在的联系。通过对本文结果的进一步分析也表明,槲皮素处理 HL-60 细胞后,其核转录活性特别是 RNA 聚合酶 II

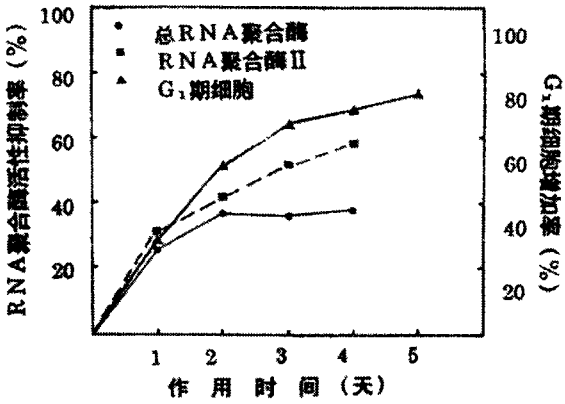


图 4 槲皮素作用不同时间 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性与细胞周期的关系

活性抑制程度与 G<sub>1</sub> 期细胞增加程度呈明显的相关性。Baserga 等<sup>[11]</sup>曾研究了对温度敏感的 Syrian Hamster BHK 细胞株,发现温度敏感株较非温度敏感株 RNA 聚合酶 II 活性降低并阻断于 G<sub>1</sub> 期,因此认为 RNA 聚合酶 II 是细胞周期通过 G<sub>1</sub>/S 期阻断点的主要调控因子。据此,我们进而推测,RNA 聚合酶 II 活性受抑制可能是槲皮素阻断 HL-60 细胞于 G<sub>1</sub> 期的影响因素之一。

参 考 文 献

- 1 Ranelletti FO, Ricci, R, Larocca LM, et al. Growth-inhibitory effect quercetin and presence of type II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colonrectal tumors. *Int J Cancer*, 1992, 50(3):486
- 2 Uddin S, and Chaudhry MA. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the DNA synthesis of human leukemia cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 36(3):545
- 3 Stallcup MR, and Washington LD. Region specific initiation of mouse mammary tumor virus RNA synthesis by endogenous RNA polymerase II in preparation of cell nuclei. *J Biol Chem*, 1983, 258:2802
- 4 Goodlad GA, and Clark CM. Response of skeletal muscle RNA polymerase I and II to tumour growth. *Biochim biophys Acta*, 1988, 950:296
- 5 Krishnam AA. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, 1975, 66:188
- 6 Grosso LE, and Pitot HC. Transcriptional regulation of c-myc during chemically induced differentiation of HL-60 cultures. *Cancer Res*, 1985, 45:87
- 7 Emerg H, and Robert US. Effect of calatriol on nuclear transcription during human HL-60 promyelocyte Leukemia cell differentiation. *Cancer Res*, 1986, 46:4979

《癌症》编辑部