

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 μ mol/L槲皮素处理培养的HL-60细胞2天或用20 μ 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G₁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G₁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G₁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G₁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^[1]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^[2]。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(Guerbetin, Sigma), α -鹅膏蕈碱(α -amanitin, Sigma), Nonidet P-40(Sigma), HEPES(Aldrich), ³H-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 1×10^5 /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^[3]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 μ 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^[4]进行。RNA聚合酶活性以参入RNA中的³H-UTP量计算,用cpm/ μ g DNA表示。

1.6 细胞周期分析 参照Krishan方法^[5]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DMSO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 μ 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 μ mol/L槲皮素处理HL-60细胞2天,或20 μ mol/L槲皮素处理0~5天,细胞周期的变化见表1和表2。

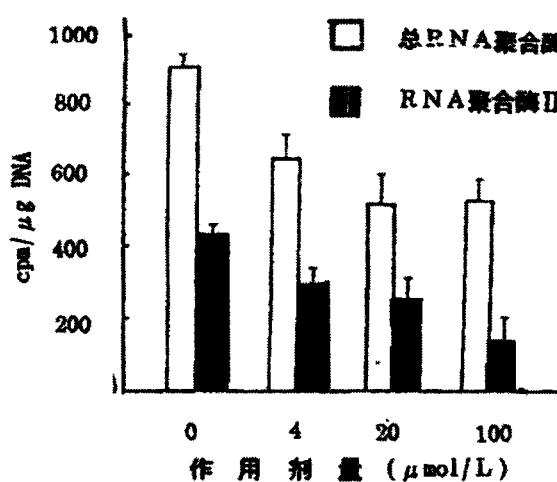


图1 槲皮素浓度对HL-60细胞RNA聚合酶活性的影响

表1

槲皮素浓度对HL-60细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (μmol/L)	n	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ (%)	G ₂ /G ₁ (DNA含量比)
对照	3	22.6 ± 0.3	59.1 ± 0.6	18.6 ± 0.3	1.919 ± 0.003
4	3	31.5 ± 0.7 *	54.5 ± 1.2	14.4 ± 0.4	1.939 ± 0.007
20	3	35.2 ± 1.1 *	53.2 ± 1.8	15.5 ± 0.6	1.944 ± 0.003
100	3	38.4 ± 1.5 *	54.9 ± 2.6	7.5 ± 1.7	1.956 ± 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

作用时间 (天)

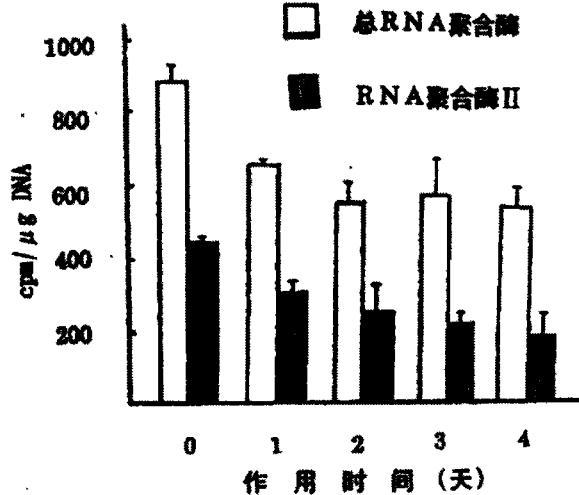


表2

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

时间 (天)	n	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ (%)	G ₂ /G ₁ (DNA含量比)
0	3	22.7 ± 0.1	58.8 ± 0.5	19.0 ± 0.4	1.922 ± 0.002
1	3	29.3 ± 1.1 *	53.2 ± 1.6	17.8 ± 0.6	1.923 ± 0.004
2	3	34.3 ± 1.0 *	50.1 ± 0.9	15.0 ± 1.3	1.931 ± 0.003
3	3	37.2 ± 0.5 *	48.0 ± 1.2	14.3 ± 0.5	1.935 ± 0.006
4	3	38.1 ± 1.5 *	47.2 ± 2.9	15.2 ± 1.3	1.955 ± 0.004
5	3	41.5 ± 2.2 *	47.6 ± 1.2	11.4 ± 1.8	1.952 ± 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,G₁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G₁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G₁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G₁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^[6]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^[7]用Calatriol处理HL-60细胞核,总RNA聚合酶和对α-Amanitin敏感的RNA聚合酶II活性均显著降低。Tsiftsoglou等^[8]发现DMSO和维甲酸处理

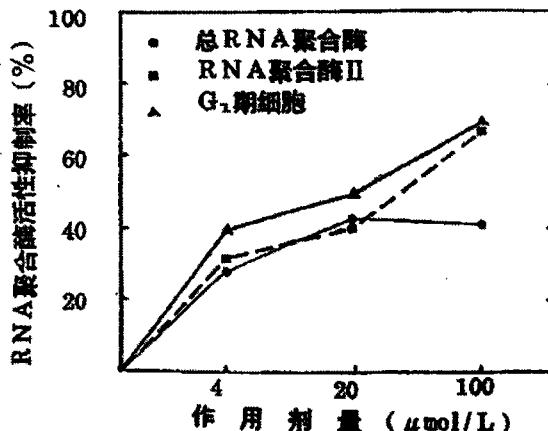


图 3 不同浓度槲皮素作用 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性与细胞周期的关系

的 HL-60 细胞, 其³H-UTP 参入核和胞浆中的量在 48~72 小时显著减少。虽然, Uddin 等^[2]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 α -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 μ mol/L 槲皮素处理超过 3 天或 20 μ 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。Ranellite 等^[1]报道, 槲皮素阻断 HT-29、WiDr、COLO201 和 LS-174 人克隆细胞株于 G_0/G_1 期。Hosokawa 等^[9]的研究表明, 槲皮素阻断人克隆癌细胞株 (Co10320 DM) 于 G_1/S 交界处。Avila 等^[10]报道了人乳腺癌细胞 (MDA-M13468) 可被槲皮素阻断于 G_1/M 期。本文研究结果表明, 经槲皮素处理的 HL-60 细胞, G_1 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_1 期, 这与多数报道相一致。

众所周知, G_1 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 α -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_1 期与抑制 RNA 的生物合成之间可能存在某种内在的联系。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

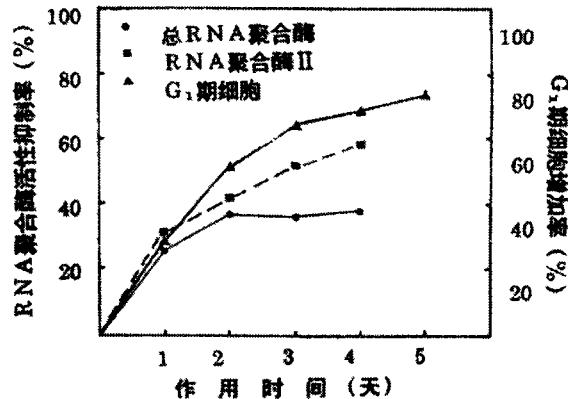


图 4 槲皮素作用不同时间 HL-60 细胞 RNA 聚合酶活性与细胞周期的关系

活性抑制程度与 G_1 期细胞增加程度呈明显的相关性。Baserga 等^[11]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_1 期, 因此认为 RNA 聚合酶 II 是细胞周期通过 G_1/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_1 期的影响因素之一。

参 考 文 献

- 1 Ranelliti FO, Ricci, R, Larocca LM, et al. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal 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 tumor growth. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 950:296
- 5 Krishan 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

- 8 Tsiftsoglou AS, Wang, W, Hyman R, et al. Analysis of commitment of human leukemia HL-60 cells to terminal granulocytic maturation. *Cancer Res*, 1985, 45:2334
- 9 Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai M, et al. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly Cell-cycle-related 17-KDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer*, 1990, 45(6):1119
- 10 Avila MA, Velasco JA, Cansado J, et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res*, 1994, 54(9):2424
- 11 Baserg R, Waechter DE, Soprano KJ, et al. Molecular biology of cell division. *Ann N Y Acad Sci*, 1982, 397:110

The effect of quercetin on RNA polymerases and cell cycle in human leukemia HL-60 cell

Huang Dinan, et al

Department of biochemistry, Guangdong Medical college, Zhanjiang 524023

To study the effect and the relationship of quercetin on RNA polymerases and cell cycle in Human leukemia HL-60 cells. Treating of HL-60 cells with 4, 20 and 100 μ mol/L quercetin for 2 days, or with 20 μ mol/L for 1 ~ 5 days, the cell cycle were analyzed with flow cytometer. And total RNA polymerases activity and RNA polymerase II activity were measured in isolated HL-60 nuclei by nuclear transcription in vitro. After treatment of HL-60 cells with quercetin, total RNA polymerase activity, especially RAN polymerase II activity showed inhibitory effects in time-and dose-dependent manner. The cells at G₁ phase increased at the same way. This phenomena revealed that quercetin could arrest cell cycle progression of HL-60 at G₁ phase. These observation also suggest that quercetin treatment of HL-60 cells gave the inhibitory effects of total RNA polymerases activity and especially RNA polymerase II activity, is related to the cell increase at G₁ phase. It may be one of reason that quercetin could block in G₁ phase of HL-60 cell cycle because of its inhibitory effects on nuclear transcription in vitro, especially on RNA polymerase II.

Key words: Quercetin; Leukemia; Promyelocytic; Cell Cycle; RNA Polymerases

《癌症》征订启事

《癌症》是中山医科大学肿瘤防治中心主办的双月刊肿瘤学专业杂志,已成为我国肿瘤学界的重要学术论坛,在国内外享有一定的信誉和影响;1992年首批进入中国科技核心期刊,且排位逐年上升,据中国科学引文数据库统计的“被引频次最高中国科技期刊 500 名排行榜”,《癌症》1996 年排位于 143 名,在国内同类杂志中,按引用指数排第二位,被“中国科学引文数据库”等多家国内权威检索机构收录为来源期刊;部分文章被美国“Science Citation index”检索刊物收录,被《中国科技期刊(光盘版)》首批选为全文收录来源期刊,并进入国际“因特网”,可见《癌症》具有良好的发展势头。

为了缩短发表周期,提高出版质量,从明年起(1999 年)《癌症》每期从 80 页增加到 96 页;除保留现有栏目外,增设“即发论著”专栏,专发表“高、尖、新”的研究论文、述评、专题综论等文章,并接受全英文论文,以外文形式全文发表,以扩大国际交流面;另外,还将开设彩色照片图版(相应加收彩图版面费),以提高科学性及版面质量。

欢迎广大读者踊跃投稿及订阅《癌症》,欢迎刊登广告!

《癌症》可在全国各地邮局订阅,邮发代号 46—21,定价 9 元/册,全年 54 元;漏订者可直接寄款编辑部邮购或订阅。地址:广州市东风东路 651 号 中山医科大学肿瘤医院内,邮政编码:510060。电话:020—8777136。