

# 槲皮素对结肠癌细胞生长的影响

谭赛男<sup>1,2</sup> 陆彩玲<sup>2</sup> 崔熠<sup>2</sup> 马旭<sup>2\*</sup><sup>(1</sup>北京协和医学院研究生院, 北京 100730; <sup>2</sup>国家人口计生委科学技术研究所遗传研究室, 北京 100081)

**摘要** 通过 MTT 试验观察槲皮素对结肠癌细胞系 RKO 生长的影响; 通过流式细胞仪技术观察槲皮素对细胞周期和细胞凋亡的影响; 采用 RT-PCR 和 Western 印迹技术, 确定槲皮素对 p21、p27 和 p53 表达的影响。MTT 法显示槲皮素加药组生长抑制作用明显, 且具有剂量依赖性; 流式细胞仪分析结果显示, 经 5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素作用后细胞周期明显阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期; 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  3 个剂量组的细胞凋亡率分别为 23.4%、24.2%、47.9%, 而对照组为 13.2%; p21 和 p27 的 mRNA 及蛋白质表达水平上调, 促凋亡蛋白 p53 表达水平上调。因此, 槲皮素对 RKO 生长有明显的抑制作用, 槲皮素可能通过上调 p21 和 p27 表达使 RKO 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 可能通过上调促凋亡蛋白 p53 表达诱导 RKO 细胞发生凋亡。

**关键词** 槲皮素; 细胞周期; 凋亡

结肠癌是一种常见肿瘤, 在欧美国家, 结肠癌的患病率在癌症中已占到第三位<sup>[1]</sup>。遗传因素在结肠癌的发生中仅占 10%, 而环境因素在结肠癌的发生中占很大比重, 高达 80% 的结肠癌的发生可归结于饮食, 研究表明多吃水果和蔬菜可以预防结肠癌。植物中含有的植物雌激素可能与预防结肠癌有关, 黄酮类是食物里含量最多的一种植物雌激素<sup>[2]</sup>。

槲皮素(图 1)是一种天然黄酮类化合物, 化学名为 3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮, 在苹果、洋葱、茶叶和红酒中含量丰富, 具有扩张冠状动脉、降血脂、抗炎、抗过敏、抗糖尿病并发症等多种药理作用。体内外的研究表明槲皮素能够预防结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌等<sup>[2]</sup>。

本研究观察槲皮素对结肠癌细胞系 RKO 生长、细胞周期和细胞凋亡的影响, 并初步探讨其分子作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及仪器

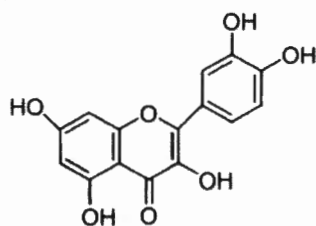


图 1 槲皮素的结构

**1.1.1 试剂** 槲皮素(Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司); 噻唑蓝(MTT, Sigma 公司); RPMI-1640 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(Gibco 公司)。其余试剂均为国产分析纯。人结肠癌细胞系 RKO 为北京肿瘤所邓大君教授赠送。槲皮素溶于 DMSO 中。

**1.1.2 仪器** 37  $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> 恒温培养箱; 医用超净工作台; 普通光学显微镜; Thermo 酶联免疫检测仪; 流式细胞仪; Biometra T Gradient PCR 仪; Junyi JY SP3 电泳槽; Biostep 凝胶成像系统。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞系按常规方法进行培养, RKO 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养, 培养液含 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/ml 青霉素和链霉素。细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 混合气体培养箱中培养, 隔 2~3 天换一次液, 3~5 天细胞长到 80% 左右传代。

**1.2.2 MTT 法测定槲皮素对 RKO 细胞增殖的抑制作用** 将对数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化单层细胞, 用含 10% 胎牛血清的完全培养液配成单细胞悬液, 以每孔 10<sup>4</sup> 个细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 每孔接种 200  $\mu\text{l}$ 。将培养板放入 CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 培养 24 h 后, 分别加入不同浓度槲皮素。实验设计分 7 组: 对照组(加入 0.02% DMSO 液)、槲皮素

收稿日期: 2007-08-06 接受日期: 2007-10-12

国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助(No.2007CB5119005)

\*通讯作者。Tel: 010-62179059, E-mail: genetic@263.net.cn

组(5、10、20、40、80、160 μmol/L), 每组设4个平行孔。继续培养72 h后, 每孔加入新鲜配制的20 μl 5 mg/ml MTT液, 37 °C继续培养4 h, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入150 μl DMSO, 振荡培养板10 min, 使孔中蓝紫色结晶物充分溶解。在酶标仪上以570 nm为检测各孔光密度(A<sub>570</sub>)值, 记录结果。实验重复3次, 取每次各浓度孔A<sub>570</sub>值的均值作为该浓度的最终光密度值。

计算抑制率: 抑制率=(1- A<sub>570</sub> 药物组 / A<sub>570</sub> 对照组) × 100%。

**1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期** 试验分为槲皮素处理组和DMSO对照组(含0.02% DMSO)。加槲皮素于培养瓶中, 使浓度为5、10、20 μmol/L, 分别收集对照组及槲皮素作用2天的RKO细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化, 用离心管离心(800 r/min), 离心5 min, 去上清液, PBS漂洗两次后收集细胞, 加入70%的冷乙醇固定, 4 °C冰箱过夜, PBS洗涤去乙醇, 800 r/min, 离心5 min, 去上清液, 0.5 ml PBS重悬细胞, 同时加入PI和RNase A至终浓度50 μg/ml, 37 °C避光温浴30 min。上机前以标准荧光微球体调整仪器的变异系数并稳定在2%以内, 用300目的尼龙网过滤一遍细胞, 上机后收集2万个细胞, 荧光强度以对数放大, 计算机自动输出荧光强度对细胞数目直方图, 同时输出G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>/M期的细胞数、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>、S和G<sub>2</sub>/M各期细胞数的百分比以及凋亡细胞的百分比(凋亡细胞的DNA断裂, 比单倍体细胞的DNA小)。

**1.2.4 RT-PCR法检测p21和p27基因mRNA表达**

分别收集对照组和5、10、20 μmol/L槲皮素作用2天的RKO细胞, 用Trizol提取液提取细胞总RNA。p21、p27及GAPDH基因的引物序列引自文献<sup>[3]</sup>(表1)。cDNA第一链的合成及PCR扩增按TaKaRa反转录试剂盒说明书操作。PCR产物经琼脂糖电泳后, 用Biostep凝胶成像系统成像分析。

**1.2.5 Western印迹法检测p21、p27和p53表达**

取10 μl蛋白质样品(约含100 μg蛋白质), p21、p27和p53抗体来自MBL公司, 均为鼠单抗; 二抗为

马抗小鼠单抗, 来自中杉金桥公司, 1:500稀释一抗, 1:1 000稀释二抗。

## 2 结果

### 2.1 槲皮素对RKO细胞系的生长抑制作用

不同浓度的槲皮素处理RKO细胞系后, MTT法测定吸光值(A<sub>570</sub>值)(表2), 计算抑制率。其结果显示槲皮素加药组生长抑制作用明显, 且随着槲皮素浓度的增加, 抑制细胞增殖的趋势增强, 具有剂量依赖性。

### 2.2 槲皮素对RKO细胞系细胞周期的影响

槲皮素处理RKO细胞系2天, 流式细胞仪分析显示对照组与加药5、10、20 μmol/L细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的百分比分别为52.4%、73.1%、58.9%、58.0%; G<sub>2</sub>/M期的百分比分别为23.3%、13.2%、15.1%、18.0%; S期的百分比分别为24.2%、13.7%、26.0%、24.1%(图2)。与对照组相比, 经5 μmol/L槲皮素作用2天后, 细胞周期明显阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 而加药10 μmol/L和20 μmol/L组细胞周期阻滞不明显。

### 2.3 槲皮素对RKO细胞凋亡的影响

槲皮素作用RKO细胞2天后, 流式细胞仪分析显示对照组和加药5、10、20 μmol/L组的凋亡细

表2 不同浓度槲皮素对RKO细胞增殖的抑制作用(MTT法)( $\bar{x} \pm s$ )

加药浓度(μmol/L)	A <sub>570</sub>	抑制率(%)
0	1.7569±0.146	0
5	1.4432±0.087	17.86
10	1.4217±0.024	19.08
20	1.4203±0.099	19.16
40	1.3680±0.173	22.14
80	1.0012±0.016	43.01
160	0.7038±0.058	59.94

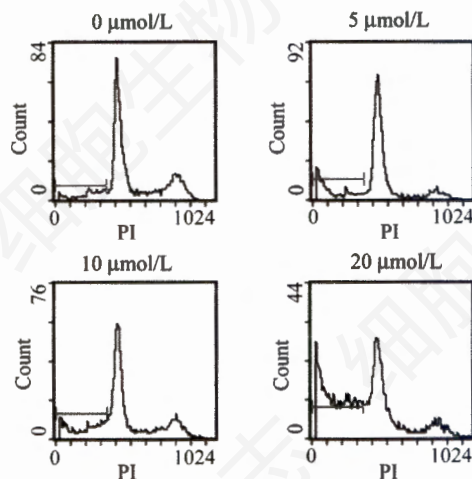


图2 槲皮素对RKO细胞周期的影响

表1 RT-PCR的特异性引物序列

引物	序列5'-3'
p21	ATGTGGACCTGTCACCTGCTTGTA
	AGGGTATGTACATGAGGAGGTGGT
p27	CATTTGGTGGACCCAAAGAC
	CCTCCCTTCCCAAAAGTTTA
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	GAAGATGGTGATGGGATTTT

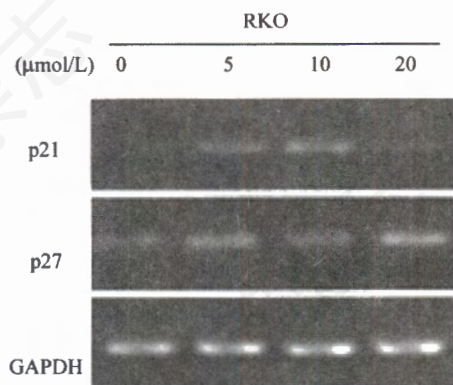


图3 RT-PCR 分析对照组和槲皮素加药组 p21、p27 基因结果, 以管家基因 GAPDH 作为内对照

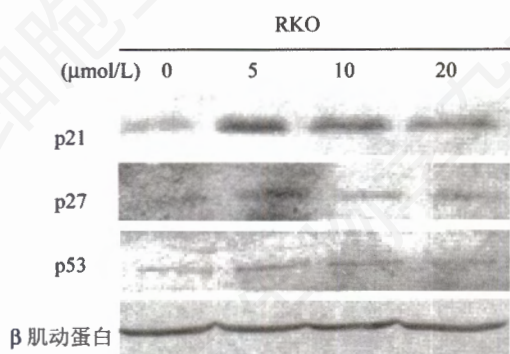


图4 槲皮素加药组与对照组 p21、p27 和 p53 Western 印迹结果, 以 β 肌动蛋白为内对照

胞率分别为 12.3%、23.4%、24.2%、47.9%, 可见加药组凋亡细胞率明显高于对照组。

#### 2.4 槲皮素对 RKO 细胞 p21、p27 基因 mRNA 表达的影响

不同浓度槲皮素处理 RKO 细胞系 2 天后, 测定 p21、p27 基因 mRNA 的表达(图 3)。加药后 p21、p27 基因 mRNA 的表达均有增强。加药 5 μmol/L 和 10 μmol/L 组 p21 基因 mRNA 显著增强。

#### 2.5 槲皮素对 RKO 细胞 p21、p27 和 p53 表达的影响

Western 印迹检测 p21、p27 和 p53 表达(图 4), 槲皮素作用 2 天后 p21、p27 和 p53 表达均有增强。加药 5 μmol/L 组 p21、p27 表达显著增强。

### 3 讨论

本研究发现槲皮素在体外能抑制结肠癌 RKO 细胞的增殖, 且其抑制作用存在一定的剂量依赖关系; 同

时流式细胞仪分析细胞周期发现, 经槲皮素处理 RKO 细胞 2 天后, 5 μmol/L 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显增多, S 期和 G<sub>2</sub>/M 期的细胞比例减少, 而 10 μmol/L 和 20 μmol/L 组细胞比例变化不明显, 表明 5 μmol/L 槲皮素能够阻止 RKO 细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期移行, 使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 提示 5 μmol/L 槲皮素对结肠癌 RKO 细胞增殖的抑制作用可能主要是通过使细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期而实现的。

为进一步探讨槲皮素对 RKO 细胞周期阻滞的作用机制, 本研究应用 RT-PCR 和 Western 印迹技术, 分别从 RNA 水平和蛋白质水平确定 p21 和 p27 表达的变化。p21 和 p27 为细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)。p21 为 p53 诱导的细胞生长阻滞的调节子, 是 CDK 活性的直接调节子之一<sup>[4]</sup>。p21 主要对 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 CDK 起抑制作用, 从而影响细胞周期进程。p27 主要抑制细胞周期蛋白 E-CDK2 和细胞周期蛋白 D-CDK4 等激酶复合物活性, 使细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[5]</sup>。实验结果显示, 槲皮素处理 RKO 细胞后, p21 和 p27 基因的表达水平均有增高, 而加药 5 μmol/L 组 p21、p27 表达显著增强, 提示我们 5 μmol/L 槲皮素可能通过上调 p21 和 p27 基因表达使细胞周期阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。

诱导细胞凋亡是许多抗肿瘤药物发挥作用的重要手段, 我们通过流式细胞仪观察到经槲皮素处理的 RKO 细胞的凋亡细胞率增加, 这说明槲皮素能够诱导 RKO 细胞产生凋亡。p53 是重要的凋亡相关蛋白, 其作用是促进凋亡的发生<sup>[6]</sup>, 结合 p53 的 Western 印迹结果, 提示槲皮素诱导 RKO 细胞凋亡可能是通过上调 p53 表达实现的。

总之, 本研究发现, 槲皮素可能通过上调 p21 和 p27 基因表达使 RKO 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 可能通过上调促凋亡蛋白 p53 表达诱导 RKO 细胞发生凋亡。本研究结果揭示了槲皮素抗肿瘤的可能作用机制, 为其抗癌药效的开发和应用打下了基础。

#### 参考文献(References)

- [1] Go VL *et al.* *J Nutr*, 2003, **133**: 3830S
- [2] Eberhardt MV *et al.* *Nature*, 2000, **405**: 903
- [3] Gong Y *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**: 6158
- [4] Noda A *et al.* *Exp Cell Res*, 1994, **211**: 90
- [5] Polyak K *et al.* *Genes Dev*, 1994, **8**: 9
- [6] Slee EA *et al.* *Oncogene*, 2004, **23**: 2809

## Effects of Quercetin on Growth of Colon Cancer Cell Line RKO

Sai-Nan Tan<sup>1,2</sup>, Cai-Ling Lu<sup>2</sup>, Yi Cui<sup>2</sup>, Xu Ma<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China; <sup>2</sup>Department of Genetics, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

**Abstract** MTT assay tested cell growth of colon cancer cell line RKO; cell cycle and cell apoptosis was observed by flow cytometry technique; RT-PCR and Western blot technique detected the expression of p21, p27 and p53. MTT assay showed that quercetin significantly inhibited cell growth and had dose-dependent effect; Flow cytometry technique showed that with 5  $\mu\text{mol/L}$  quercetin the cell cycle was arrested in  $G_0/G_1$  phase; apoptosis rates of 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  groups were 23.4%, 24.2%, 47.9%, and apoptosis rate of the control group was 13.2%; mRNA and protein expression level of p21 and p27 increased, the expression level of pro-apoptotic protein p53 increased. Quercetin has significant growth inhibition on RKO cells. Cell cycle is arrested in  $G_0/G_1$  phase by upregulating the expression of p21 and p27; quercetin may also induce apoptosis by upregulating the expression of p53.

**Key words** quercetin; cell cycle; apoptosis

Received: August 6, 2007 Accepted: October 12, 2007

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2007CB5119005)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-62179059, E-mail: genetic@263.net.cn