

槲皮素恢复柔红霉素在白血病耐药细胞 K562/ADM 和 HL-60/ADM 中的分布

蔡 讯¹, 陈芳源², 韩洁英², 顾春红², 钟 华², 欧阳仁荣²

Restorative Effect of Quercetin on Subcellular Distribution of Daunorubicin in Multidrug Resistant Leukemia Cell Lines K562/ADM and HL-60/ADM

CAI Xun¹, CHEN Fang-Yuan², HAN Jie-Ying², GU Chun-Hong², ZHONG Hua², OUYANG Ren-Rong²

1. 上海交通大学
附属第六人民医院肿瘤内科,
上海 200233
2. 上海第二医科大学
附属仁济医院血液科
上海血液学研究所白血病研究室,
上海 200001

1. Department of Oncology,
Shanghai No. 6 People's Hospital,
Shanghai Jiaotong University,
Shanghai, 200233,
P. R. China

2. Leukemia Unit, Shanghai Institute
of Hematology, Renji Hospital,
Shanghai Second Medical University,
Shanghai, 200001,
P. R. China

通讯作者 蔡 讯

Correspondence to: CAI Xun
Tel: 86 - 21 - 64369181 - 8873
Fax: 86 - 21 - 64701361
E-mail: caixunen@yahoo.com.cn

基金项目:上海市科委基金资助项目
(No. 994319228);上海市卫生局基
金资助项目(No. 98418)

Grants: Fund from Science Council
of Shanghai City (No. 994319228),
Fund from Health Bureau of Shanghai
City (No. 98418)

收稿日期:2004-04-06

修回日期:2004-05-24

万方数据

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Quercetin, a widely distributed natural flavonoid with a variety of biological functions, can reverse multidrug resistance (MDR) in leukemia according to recent researches. This study was to investigate the mechanism of quercetin restoring subcellular distribution of daunorubicin (DNR) in multidrug resistant leukemia cell lines, K562/ADM and HL-60/ADM, and reversing their MDR. METHODS: MTT cell viability assay was used to verify the sensitization of DNR by quercetin in K562/ADM and HL-60/ADM cells, and determine the reverse concentration extent, confocal laser scanning microscope was used to observe the subcellular distribution of DNR in K562/ADM and HL-60/ADM cells, and relevant sensitive cell lines, K562/S and HL-60/S, before and after quercetin exposition. RESULTS: Compared with K562/S and HL-60/S cells, 20-40 μmol/L of quercetin *in vitro* remarkably enhanced the sensitivity of K562/ADM and HL-60/ADM cells to DNR, restore the subcellular distribution of DNR, so as to reverse MDR. CONCLUSION: quercetin could be a candidate of effective multidrug resistance-reversing agent in leukemia chemotherapy.

KEYWORDS: Quercetin; Leukemia; Multidrug resistance; Reverse

【摘要】背景与目的 槲皮素是一种天然黄酮类中药成分,具有多种生理活性,最近发现其有逆转白血病细胞耐药的作用,本研究旨在探讨槲皮素恢复柔红霉素在白血病耐药细胞的分布从而达到逆转耐药的机制。方法 通过 MTT 体外药敏法检测槲皮素对柔红霉素的增敏作用并确定逆转的浓度范围,作用于 K562/ADM、HL-60/ADM 细胞及相应敏感株 K562 和 HL-60,借助激光共聚焦显微镜观察槲皮素作用前后柔红霉素在亚细胞水平的分布变化。结果:20~40 μmol/L 槲皮素在体外能明显提高柔红霉素对 K562/ADM 和 HL-60/ADM 的敏感性,恢复柔红霉素在亚细胞水平的分布,使其回归细胞核内,从而逆转多药耐药。结论 黄酮类中药槲皮素能够成为萘环类药物治疗白血病中有效的化疗增敏剂。

关键词 槲皮素;白血病;多药耐药;逆转

中图分类号 R733.7 文献标识码 A

文章编号:1000-467X(2004)12-1611-05

多药耐药(multidrug resistance, MDR)往往与药物在细胞内蓄积或分布的改变有关^[1],其中膜转运蛋白在白血病细胞耐药的形成中占有重要地位。一些经典的耐药逆转剂如钙拮抗剂等,在达到有效逆转浓度时往往因严重毒性而限制了其在临床的应用,而中药逆转剂以其本身的低毒性成为研究的新热点。其中槲皮素(quercetin, Que)是一种天然黄酮类化合物,具有抗炎、扩血管等多种生理活性,并能促进肿瘤细胞

的分化与凋亡^[2,3],最近的研究还发现其有逆转耐药的作用^[4]。因此,我们选用表达 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP1)的 K562/ADM 和 HL-60/ADM 细胞株^[5,6],探讨槲皮素逆转耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人急性髓系白血病细胞株 HL-60 由上海血液学研究所提供;K562 和 K562/ADM 为慢性粒细胞白血病红白血病及其阿霉素耐药株,HL-60/ADM 细胞株为 ADM 诱导 HL-60 细胞建立的多药耐药细胞株,均由中国医学科学院血液学研究所提供。上述细胞分别培养于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素及 1 μg/ml 柔红霉素(daunorubicin, DNR)的 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司)中,培养条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。

1.2 主要试剂和仪器

槲皮素(Sigma 公司),DNR(Pharmacia 公司)和 MTT(华美公司)分别以无水乙醇和生理盐水(DNR 和槲皮素)稀释成不同工作浓度。激光共聚焦显微镜(Zeiss 510,德国)和酶标仪(Multi-skan MK3,芬兰)。

1.3 MTT 法检测 DNR 增敏效果

取对数生长期细胞进行四甲基偶氮唑蓝(tetrazolium bromide, MTT)体外药敏法检测,调整细胞密度为 2×10^5 /ml,接种于 96 孔培养板,分别加入不同浓度的 DNR 溶液并设 3 个复孔(对照组加入生理盐水),37℃ 孵育 72 h 后每孔加入 MTT(5 mg/ml)继续培养 4 h,弃上清,加入二甲基亚砷 200 μl,混匀后于酶标仪测 570 nm 波长处吸光度值,计算出半数抑制浓度(IC₅₀)及耐药倍数(IC₅₀ = $\lg^{-1} [X_m - i(\Sigma p - 0.5)]$ ^[7],耐药倍数 = 耐药细胞 IC₅₀/敏感细胞 IC₅₀)。并在 DNR IC₅₀ 值上下各设一浓度梯度,比较加与不加槲皮素(对照组加入无水乙醇)DNR IC₅₀ 值有无明显差异,从而判断槲皮素的增敏作用,并计算增敏倍数(增敏倍数 = 无槲皮素时 IC₅₀/槲皮素作用下 IC₅₀)。

1.4 激光共聚焦显微镜观察 DNR 在细胞内分布

取 2×10^5 /ml 细胞悬液 1 ml,分别加入终浓度为 10、20、40 μmol/L 的槲皮素孵育 1 h,再加入终浓度为 4 μmol/L 的 DNR^[7]孵育 1 h,用 1 × PBS 洗涤 2 次后重悬细胞,加入特制载玻片容器,静置待细胞

沉降后置激光共聚焦显微镜下,观察 DNR 荧光在细胞内分布的变化(激发波长 488 nm,发射波长 515 nm)。

1.5 统计学方法

用 SPSS10.0 统计学软件进行统计学处理,采用配对 *t* 检验比较两均数有无显著性差异。

2 结果

DNR 对 K562/ADM 和 K562 细胞的 IC₅₀ 分别为 5.54 μmol/L 和 0.45 μmol/L;DNR 对 HL-60/ADM 和 HL-60 细胞的 IC₅₀ 为 1.04 μmol/L 和 0.11 μmol/L。K562/ADM 和 HL-60/ADM 对 DNR 的耐药倍数分别为 12.82 倍和 9.24 倍。槲皮素单药对 K562 和 K562/ADM 的 IC₅₀ 分别为 (36.63 ± 6.77) μmol/L 和 (79.21 ± 9.74) μmol/L,对 HL-60 和 HL-60/ADM 的 IC₅₀ 为 (96.36 ± 10.98) μmol/L 和 (74.18 ± 6.72) μmol/L。与槲皮素合用时,K562/ADM 和 HL-60/ADM 对 DNR 的敏感性显著提高。当槲皮素终浓度为 40 μmol/L 和 20 μmol/L 时,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$);槲皮素终浓度为 160 μmol/L 时,K562/ADM 和 HL-60/ADM 的增敏倍数分别为 3.57 倍和 7.76 倍,而 K562 和 HL-60 仅为 1.93 倍和 2.93 倍。见表 1、图 1 和图 2。

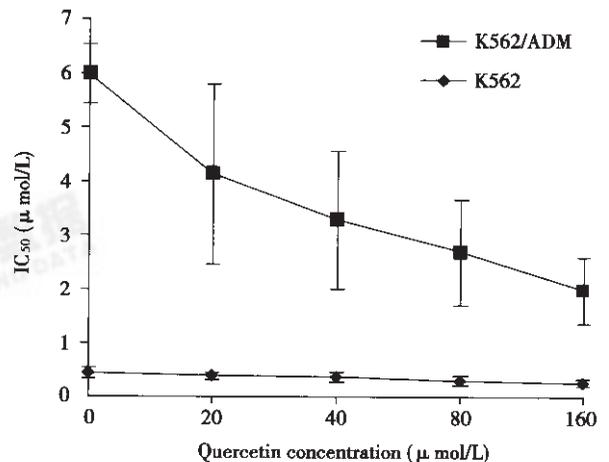


图 1 不同浓度槲皮素作用后柔红霉素对 K562 和 K562/ADM 细胞的 IC₅₀ 值

Figure 1 IC₅₀ value of daunorubicin in K562 and K562/ADM cells after treated with different concentrations of quercetin

K562 细胞 DNR 荧光弥漫分布于胞核及胞浆中;HL-60 细胞 DNR 荧光主要位于胞核、胞浆及胞膜上,以细胞核中荧光最强,胞浆中 DNR 荧光均匀弥漫状,胞膜荧光连续分布,不同浓度槲皮素对细胞核内 DNR 荧光强度基本无影响。K562/ADM 细胞中 DNR 荧光

表 1 与槲皮素联用后柔红霉素对各种细胞的 IC₅₀ 值及增敏倍数($\bar{x} \pm s$)

Table 1 IC₅₀ value and sensitizing fold (SF) of K562, K562/ADM, HL-60, HL-60/ADM cells treated by quercetin and daunorubicin (DNR) ($\bar{x} \pm s$)

Quercetin ($\mu\text{mol/L}$)	K562 cells		K562/ADM cells		HL-60 cells		HL-60/ADM cells	
	IC ₅₀ ^a of DNR ($\mu\text{mol/L}$)	SF ^b	IC ₅₀ of DNR ($\mu\text{mol/L}$)	SF	IC ₅₀ of DNR ($\mu\text{mol/L}$)	SF	IC ₅₀ of DNR ($\mu\text{mol/L}$)	SF
0	0.45 ± 0.09	-	5.54 ± 0.55	-	0.11 ± 0.02	-	1.04 ± 0.14	-
20	0.39 ± 0.06	1.16 ± 0.26	3.74 ± 1.67	1.65 ± 0.60	0.07 ± 0.01	1.74 ± 0.37	0.48 ± 0.05 ^c	2.18 ± 0.32
40	0.36 ± 0.08	1.29 ± 0.31	2.92 ± 1.28 ^c	2.08 ± 0.63	0.04 ± 0.01 ^c	2.85 ± 0.64	0.39 ± 0.06 ^d	2.69 ± 0.16
80	0.29 ± 0.09	1.64 ± 0.54	2.39 ± 0.98 ^c	2.63 ± 1.09	0.04 ± 0.01 ^c	2.98 ± 0.77	0.17 ± 0.03 ^d	5.87 ± 0.28
160	0.24 ± 0.06 ^c	1.93 ± 0.50	1.73 ± 0.62 ^c	3.57 ± 1.38	0.04 ± 0.01 ^d	2.93 ± 0.25	0.14 ± 0.03 ^d	7.76 ± 1.22

Concentration gradients of DNR were 0, 1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 $\mu\text{mol/L}$ in K562 cells; 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, and 12.0 $\mu\text{mol/L}$ in K562/ADM cells; 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ in HL-60 cells; and 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, and 1.6 $\mu\text{mol/L}$ in HL-60/ADM cells.

a: $\text{IC}_{50} = \lg -1 \{ X_m - i (\sum p - 0.5) \}^{71}$

Xm: log value of designed maximal concentration; i: log value of multiple proportion among different concentration; $\sum p$: sum of growth inhibition rate; 0.5: experience constant.

b: sensitizing fold = IC₅₀ value with sensitizer / IC₅₀ value without sensitizer

^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs. control group.

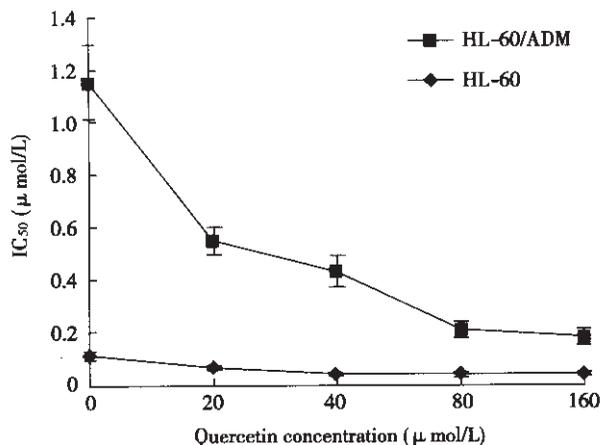


图 2 不同浓度槲皮素作用后柔红霉素对 HL-60 和 HL-60/ADM 细胞的 IC₅₀

Figure 2 IC₅₀ value of daunorubicin in HL-60 and HL-60/ADM cells after treated with different concentration of quercetin

主要集中在核周与外围胞浆,核内未见荧光信号;HL-60/ADM 细胞中 DNR 荧光主要分布于胞浆外围及胞膜上,呈棘点状,颗粒不很均匀,核内也基本不见荧光。随着槲皮素处理浓度的升高,两种细胞胞浆与胞核内的荧光逐渐增强,至 40 $\mu\text{mol/L}$ 时基本恢复至敏感株的水平,呈弥漫颗粒状分布(见图 3 和图 4)。

3 讨论

从药物敏感性实验的结果来看,槲皮素能显著提高柔红霉素对白血病耐药细胞株的敏感性,而对敏感株的增敏作用则不明显。Kim 等^[4]通过体外药敏也发现槲皮素作用后白血病细胞耐药株 FM3A 和 P388/M 对长春新碱的敏感性分别提高了 3.5 和 3.0 倍,与本实验结果一致,表明槲皮素在体外具有

逆转多药耐药的作用。

膜转运蛋白在白血病细胞中的过度表达造成化疗药物的外流,从而降低了药物在细胞内的有效浓度,是白血病产生耐药的主要机制之一。为进一步探讨槲皮素逆转耐药的机制,我们利用治疗白血病常用的萘环类化疗药物 DNR 本身固有的荧光,借助 CLSM 观察槲皮素作用前后 DNR 在细胞内分布的变化,以间接反映槲皮素对膜转运蛋白 P-gp 和 mdr1 功能的影响。

由结果可见,敏感细胞中 DNR 荧光弥漫分布于细核与胞浆中,不同浓度槲皮素对细胞核内 DNR 荧光强度基本无影响;而耐药细胞的细胞核内基本未见 DNR 荧光信号,随着槲皮素预处理浓度的升高,耐药株胞浆与胞核内的荧光逐渐增强直至基本恢复到敏感株的水平。细胞核是 DNR 作用的靶点,DNR 主要通过插入 DNA 模板,干扰 DNA 和 RNA 的合成来发挥杀伤白血病细胞的作用,因此槲皮素可能通过抑制膜转运蛋白的转运活性达到恢复耐药细胞中 DNR 的异常分布,从而逆转白血病细胞的多药耐药。

实验中还发现,K562/ADM 耐药株未用槲皮素处理前,核周及胞浆周围可见少量颗粒状荧光,呈不连续分布,这不能完全用膜转运蛋白将药物泵出细胞来解释。近年来国内外一些研究发现,P-gp 或 mdr1 在亚细胞水平也有分布。本实验室曾用三种分别标记线粒体、高尔基体和溶酶体的荧光探针(Rh123、NBD-ceramide、中性红)与 DNR 在 K562/ADM 细胞内的分布相比较,发现 DNR 与 Rh123 在细胞内的分布相似,且高尔基体阻断剂 brefeldin A 和溶酶体亲

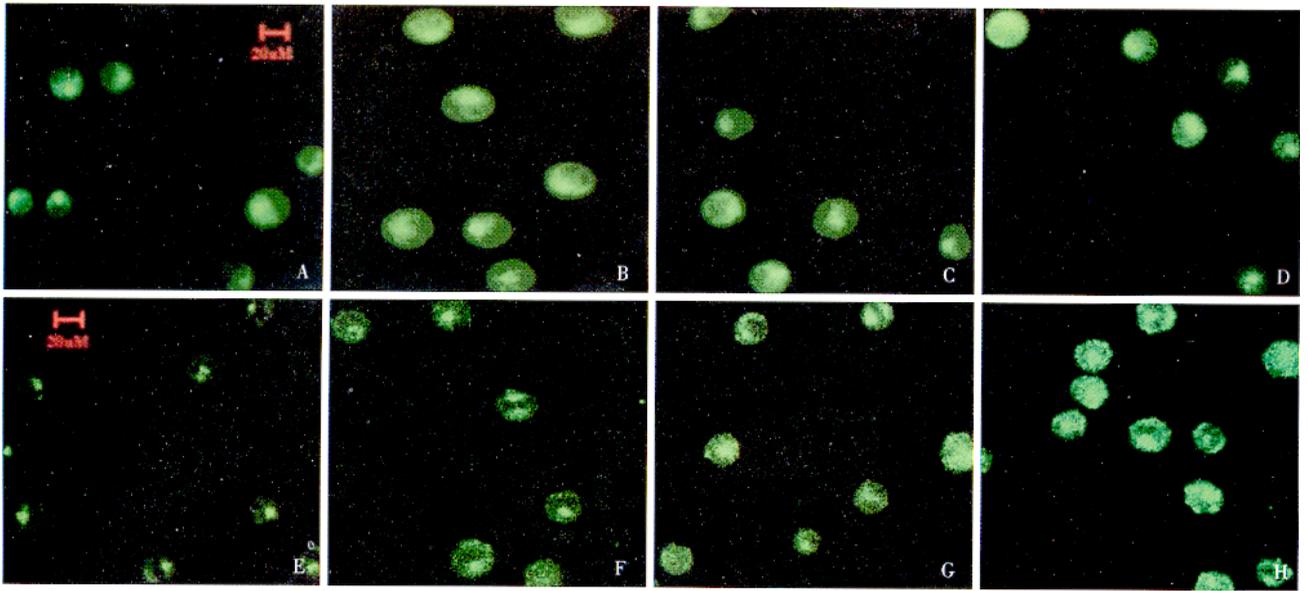


图 3 不同浓度槲皮素作用前后 DNR 荧光在 K562 和 K562/ADM 细胞内的分布 (×500)

Figure 3 Daunorubicin fluorescence distribution in K562 and K562/ADM cells before and after exposed to quercetin (×500)
A: control K562 cells; B, C, D: K562 cells treated with 10, 20, 40 μmol/L of Que, respectively; E: control K562/ADM cells; F, G, H: K562/ADM cells treated with 10, 20, 40 μmol/L of Que, respectively.

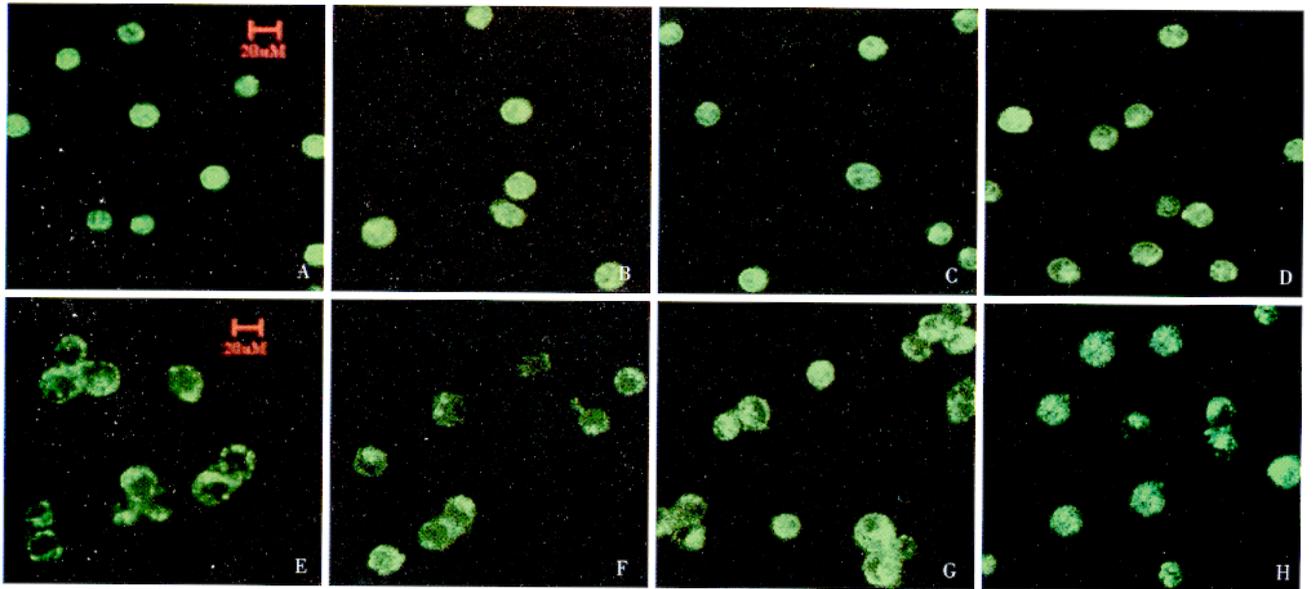


图 4 不同浓度槲皮素作用前后 DNR 荧光在 HL-60 和 HL-60/ADM 细胞内的分布 (×500)

Figure 4 Daunorubicin fluorescence distribution in HL-60 and HL-60/ADM cells before and after exposed to quercetin (×500)
A: control HL-60 cells; B, C, D: HL-60 cells treated with 10, 20, 40 μmol/L of Que, respectively; E: control HL-60/ADM cells; F, G, H: HL-60/ADM cells treated with 10, 20, 40 μmol/L of Que, respectively.

和剂氯喹不能增加细胞内 DNR 含量和恢复 DNR 在细胞内的分布,证明线粒体为 K562/ADM 中 DNR 蓄积的细胞器,提示细胞内 P-gp 表达可能与化疗药物在细胞内的隔离有关,使药物远离其作用靶点,同样也有助于耐药的形成^[4]。而槲皮素对细胞器膜上转运蛋白的作用可通过免疫电镜技术进一步观察。

万方数据

在逆转白血病细胞耐药的研究中,中药逆转剂因其本身的低毒性而逐渐受到重视。上述研究表明,槲皮素可能通过直接抑制细胞膜上 P-gp 和 mdr1 外流泵的功能,减少耐药细胞内化疗药物的外流而恢复药物在细胞内的分布,使其回归到作用靶点——细胞核,达到逆转耐药的目的,因而很有希望成为白

血病治疗中有效且低毒的化疗增敏剂。

[参 考 文 献]

- [1] Coley HM, Amos WB, Twentyman PR, et al. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localization of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines [J]. Br J Cancer, 1993, 67(6): 1316 - 1323.
- [2] Larocca LM, Leone TG, Sica S, et al. Antiproliferative activity of quercetin on normal bone marrow and leukaemic progenitors [J]. Br J Haematol, 1991, 79(4): 562 - 566.
- [3] 钟 璐, 陈芳源, 韩洁英, 等. 槲皮素对白血病细胞中 PML 基因及蛋白表达的影响和定位研究[J]. 中华血液杂志, 2002, 23(2): 87 - 90.
- [4] Kim SH, Yeo GS, Lim YS, 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.
- [5] Wada H, Saikawa Y, Niida Y, et al. Selectively induced high MRP gene expression in multidrug-resistant human HL-60 leukemia cells [J]. Exp Hematol, 1999, 27(1): 99 - 109.
- [6] Grandjean F, Bremond L, Verdier M, et al. Sequential gene expression of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein: functional activity of P-gp and MRP present in the doxorubicin-resistant human K562 cell lines [J]. Anticancer Drugs, 2001, 12(3): 247 - 258.
- [7] 徐叔云, 卞如瀛, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 204.
- [8] 龚玉萍, 王燕婷, 陈芳源, 等. 柔红霉素在耐药细胞株 K562/ADR 内的异常分布[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(3): 184 - 186.

[编辑及校对: 张 菊]

· 书 讯 ·

《抗肿瘤药物研究与开发》一书正式出版

《抗肿瘤药物研究与开发》一书由中国抗癌协会抗癌药物专业委员会主任委员、中国药理学会肿瘤药理专业委员会主任甄永苏院士主编, 60 位从事肿瘤与抗肿瘤药物研究的著名教授和专业人员参与编写。作者汇集了国内外浩若瀚海的、最新的文献资料, 结合自己的研究工作, 全面论述了抗肿瘤药物研究的最新成果和发展趋势, 阐述了多种药物分子靶点的作用基础和相关药物的筛选研究方法, 对药物的来源、样品制备技术以及筛选过程进行了较为系统的说明, 同时介绍了新药评价的指导原则与方法等。该书内容包括抗肿瘤药物研究的最新进展、相关的基础研究以及技术方法, 是一部系统介绍抗肿瘤新药研究与开发的专著。

本书分二部分, 共 45 章, 从新药研究开发和应用密切相关的 4 个文献进行阐述: ①研究现状与发展趋向。对肿瘤药物治疗、抗肿瘤新药研究相关的基础和临床领域的研究现状与发展趋向进行较全面的概括与探讨, 以利于思考与确定研究策略与方向。②药物靶点与筛选方法。对抗肿瘤药物分子靶点的理论依据以及其检测方法进行较深入的介绍与讨论, 以利于选择药物筛选靶点与采用相关的检测方法。③药物来源与研制技术。对药物筛选样品的来源与制备技术进行介绍与讨论, 以利于确定研究开发药物资源的路线和采用相应的制备技术方法。④药物评价的指导原则与方法。对包括药效学、毒理学、药物动力学与临床研究在内的新药评价指导原则与方法进行介绍与讨论, 以利于从整体的角度考虑药物筛选、临床前研究和临床研究工作的合理安排和实施。

本书的出版将有助于增进科技工作者对抗肿瘤药物研究的了解, 促进交流和合作, 并将对我国抗肿瘤药物的研究和开发起到积极的推动作用。本书反映了抗肿瘤药物研究与开发的全景, 从一定高度阐述了目前研究的现状。可供从事抗肿瘤药物研究和开发及相关领域研究技术人员阅读和参考。

本书由化学工业出版社出版, 大 16 开, 892 页。读者可到各新华书店购买, 定价: 158 元。

