论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1852-03

槲皮素对肺腺癌A549细胞生长的影响

王 箭,张鹏辉,涂植光 (重庆医科大学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 观察槲皮素对肺腺癌A549细胞生长及对hTERT基因表达的影响。**方法** 以台盼蓝拒染法计数肺腺癌细胞的生长抑制率,透射电镜和DNA Ladder实验了解A549细胞凋亡的发生;PCR-TRAP法检测端粒酶活性,实时RT-PCR检测hTERT mRNA表达。**结果** 台盼蓝拒染法计数显示槲皮素抑制肺腺癌A549细胞增殖的作用明显,且呈剂量和时间依赖性,槲皮素处理48 h后的IC_{50}为22.5 μmol/L。DNA Ladder实验和透射电镜形态学检测显示出细胞凋亡的特征性变化,细胞呈现核固缩、染色质边集、凋亡小体形成等典型凋亡表现。经槲皮素处理后肺腺癌A549细胞hTERT mRNA表达降低,端粒酶活性受抑制。**结论** 槲皮素能抑制肺腺癌细胞的生长,呈时间、剂量依赖性,能诱导A549细胞凋亡,其抑制增生与诱导凋亡的机制可能与下调hTERT基因表达,抑制端粒酶活性,破坏端粒稳定性有关。

关键词: 槲皮素;肺腺癌A549细胞;凋亡;端粒酶;hTERT

中图法分类号: R285.5; R730.2; R734.2 **文献标识码:** A

Effects of quercetin on proliferation of lung cancer cell line A549 by down-regulating hTERT gene expression

WANG Jian, ZHANG Peng-hui, TU Zhi-guang (Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of quercetin on the growth of lung cancer cell line A549 and the expression of hTERT gene. **Methods** The number of viable cells was ascertained by trypan blue dye exclusion test. Morphological changes of apoptotic cells were observed by electronic microscopy and DNA ladder assay. The telomerase activity was analyzed by PCR-TRAP assay and hTERT mRNA expression was detected by quantitative RT-PCR. **Results** Quercetin had a significant inhibition on the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner. The IC_{50} was 22.5 μmol/L after exposure to quercetin for 48 h. The results from electron microscopy and DNA ladder showed that apoptosis occurred in the A549 cells of treatment groups. The results of quantitative RT-PCR and PCR-TRAP revealed that the expression of hTERT mRNA was significantly inhibited by quercetin and telomerase activity was decreased. **Conclusion** Quercetin inhibits the growth of lung cancer cell line A549 in a dose-dependent manner, and induce their apoptosis. The down-regulated expression of hTERT, suppression of telomerase activity and destruction of telomere stability may all contribute to the mechanism of apoptosis induction.

Key words: quercetin; lung cancer A549 cell; apoptosis; telomerase; human telomerase reverse transcriptase gene

中药提取物槲皮素[1](Quercetin,Qu)作为一种具有广泛生理作用的天然生物黄酮类化合物,广泛存在于蔬菜和水果中,具有抗感染、抗变态反应、扩血管和抑制血小板凝集等功能。近年来,槲皮素潜在的肿瘤预防和治疗作用日益受到关注,其抑癌机制众说纷纭。为了证实槲皮素的抗癌效果及可能作用机制,我们观察了槲皮素对肺腺癌细胞A549生长及对人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因表达和端粒酶活性的影响,探讨其抑制A549细胞生长的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

端粒酶TRAP-Hyb Kit(华美生物工程公司),总RNA提取试剂、PCR试剂(TaKaRa公司),槲皮素(Sigma公司),二甲基

基金项目:国家自然科学基金(30400539)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400539)

作者简介:王 箭(1959-),男,重庆市人,讲师,主要从事临床检验方面的研究。电话:(023)68485388

收稿日期:2006-11-13;修回日期:2007-01-24

亚砜溶解（<25%），-20 ℃保存备用，用前加 RPMI1640 稀释至使用浓度。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及处理　　肺腺癌细胞 A549 细胞株购自上海细胞生物研究所。在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养。1～3 d 换液 1 次，癌细胞为贴壁生长。取对数生长期细胞，调浓度为 2×10^5/ml，接种于培养瓶，进行试验。将槲皮素以 10、20、40、80 μmol/L 的终浓度加入培养液中，同时设不加药的细胞培养液为对照处理组。

1.2.2　台盼蓝拒染试验　　不同浓度槲皮素处理的细胞分别于 24、48、72、96 h 经 0.4% 台盼蓝染液染色后用血球计数仪于光镜下计数，死细胞被染成蓝色，活细胞则不被染色，计数活细胞。

细胞抑制率（%）=［1－（实验组活细胞数/对照组活细胞数）］×100%

1.2.3　电子显微镜观察　　收集肺腺癌细胞 A549 细胞 1×10^6 个，PBS 洗涤 2 遍，25% 的 4℃冷戊二醛固定 2 h，体积分数为 50%、70%、90%、100% 梯度丙酮脱水，618 环树脂包埋，LKBNOVa 切片，厚度 500 Å，醋酸铀、枸橼酸铅双染色法染色，电镜下观察。

1.2.4　DNA 凋亡片段分析　　参照 Herrmann 等[2] 的方法，将槲皮素处理组和对照组细胞分别收集于 1.5 ml 离心管中，加入 500 μl 细胞裂解液（10 mmol/L Tris，10 mmol/L EDTA，75 mmol/L NaCl，0.5% SDS，150 μg/ml 蛋白酶 K），置于 37 ℃水浴过夜至混合物变清亮；用酚氯仿异戊醇（25∶24∶1）抽提液提取 DNA，离心弃上清，TE 缓冲液溶解，2% 琼脂糖凝胶电泳，记录结果。

1.2.5　端粒酶活性检测　　采用 PCR-TRAP 法检测端粒酶活性，培养细胞 10^6 个经 4 000 r/min 离心 10 min，沉淀加入裂解液，取上清 2 μl 做 TRAP 反应模板。在 PCR 反应管中各加入反应混合物 45 μl，混匀，离心数秒，置 25 ℃水浴 30 min。PCR 仪扩增，各孔加入杂交反应液反应，洗板，加显色剂 A、B 各 1 滴，37 ℃避光显色 10 min，加终止液，在酶标仪上（450 nm/595 nm）测得吸光度值，判断端粒酶活性。

1.2.6　实时 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达　　实时 PCR 反应体系 25 μl，内含 5×实时 PCR Buffer 5 μl，300 μmol/L dNTP，5 mmol/L $MgCl_2$，hTERT 上下游引物各 200 nmol/L，相应荧光探针 120 nmol/L，*Taq* 酶 1.25 U，CDNA 2 μl，水补齐到 25 μl。95 ℃ 3 min 后，按下述条件进行循环：95 ℃ 15 s，65 ℃ 25 s，40 循环，每个样本设 3 个平行反应。换取内参照 PO 基因（编码人酸性核糖体磷酸蛋白）的引物和探针，按前述同样条件进行 RT-PCR 检测。结果数据采用 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 进行定量分析。hTERT mRNA 含量 N hTERT（标化）以 hTERT/PO 的相对比值来确定，其中 hTERT 为端粒酶逆转录酶基因的拷贝数，PO 为内参照基因拷贝数。

hTERT 及内参照 PO 基因的探针和引物序列如下。

hTERT 上游引物：5′-TGACACCTCACCTCACCCAC-3′，扩增产物 95 bp；下游引物：5′-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3′，探针：5′-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3′。

PO 基因上游引物：5′-GGCGACCTGGAAGTCCAACT-3′，扩增产物 149 bp；下游引物：5′-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3′，探针：5′-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3′。

1.3　统计学处理

采用 SAS 6.12 统计软件，计量资料采用两小样本均数 t 检验，完全随机设计资料方差分析。

2　结果

2.1　槲皮素抑制肺腺癌 A549 细胞生长

台盼蓝拒染计数结果显示不同浓度槲皮素对 A549 细胞增殖有抑制作用，其抑制率随剂量的增大和作用时间的延长而增加。对照组（不加药的细胞培养液）细胞接种 36 h 后开始快速生长，72 h 细胞数量已明显高于各槲皮素组。而槲皮素处理的细胞均受到不同程度的抑制，10 μmol/L 槲皮素作用 A549 细胞 48 h 后，对细胞的抑制率与对照组有显著差异（$P<0.05$），其 IC_{50} 为 22.5 μmol/L；20 μmol/L 槲皮素作用 24、48、72、96 h 后对肺腺癌 A549 细胞的抑制率分别为 25.6%、34.4%、55.8%、83.7%，分别高于 10 μmol/L 槲皮素相同时间处理组（$P<0.05$），呈时间、剂量依赖性。

2.2　槲皮素诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡

透射电镜下观察 A549 细胞染色质丰富，核规则或不规则，核仁大，细胞器少，表面有短小微绒毛，具有典型的癌细胞特征。20 μmol/L 槲皮素处理细胞 48 h 后，细胞体积缩小、细胞表面纤毛丧失、细胞质固缩，核碎裂，可见凋亡小体形成（图 1）。

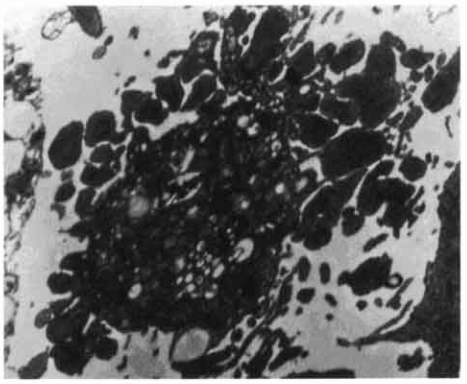
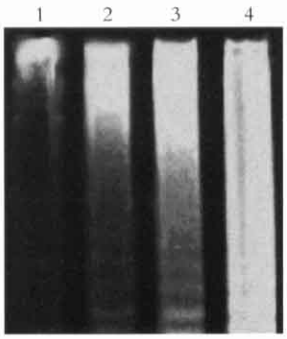


图 1　凋亡的肺腺癌 A549 细胞　（TEM ×6000）

2.3　DNA 片段分析

20 μmol/L 槲皮素作用 48、72、96 h 后，肺腺癌 A549 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳可见凋亡细胞典型的梯状条带；对照组（不加药的细胞培养液）未出现此变化，仅呈现正常细胞 DNA 条带（图 2）。



1：对照处理组；2－4：分别为 20 μmol/L 槲皮素作用 48、72、96 h 组

图 2　肺腺癌 A549 细胞 DNA 片段分析

2.4 端粒酶活性检测

20 μmol/L 槲皮素作用肺腺癌 A549 细胞 48、72、96 h 后，其吸光度均值分别为 0.68、0.52、0.39，对照组（不加药的细胞培养液）吸光度均值为 1.51，空白对照均值为 0.05。可见槲皮素作用组肺腺癌 A549 细胞端粒酶活性明显降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.5 实时 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达

20 μmol/L 槲皮素作用肺腺癌 A549 细胞 48、72、96 h 后，hTERT mRNA 表达均明显降低，与对照组相比，其差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测不同处理时间各组 hTERT mRNA 表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	hTERT mRNA 表达
槲皮素作用 48 h 组	26.5±3.69[a]
槲皮素作用 72 h 组	19.7±1.45[a]
槲皮素作用 96 h 组	11.9±2.98[a]
对照处理组	53.7±0.56

a：$P<0.05$，与对照处理组比较

3 讨论

端粒酶是一种核糖核蛋白酶，由 RNA 和蛋白质组成，具有逆转录酶的功能，能以自身的 RNA 为模板合成端粒 DNA，从而维持端粒的长度。在正常人体细胞，端粒随细胞分裂而进行性缩短，当达到一定程度，细胞就衰老死亡。端粒酶激活可使端粒长度保持相对稳定，从而使细胞获得永生化，进一步发生癌变，提示端粒酶的激活与恶性肿瘤发生、发展密切相关[3,4]。而端粒酶催化亚基（hTERT），与肺腺癌关系更为密切，在肺腺癌发生的早期就有表达，随着肿瘤的进展，hTERT 在单个肿瘤细胞中的表达量不断增加，且表达 hTERT 的肿瘤细胞数也相应增多，表明端粒酶在肺腺癌发生早期就有激活，并随肿瘤的发展而增加[5]。

由于 hTERT 在正常肺组织细胞中不表达，而特异性地表达在肺癌细胞中，且在肺癌的发生、发展中起重要作用，因此，hTERT 有望成为新的肺癌治疗靶点。

槲皮素有较广的抗瘤谱，对多种肿瘤细胞株及移植瘤有较高的抑制率：对乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌、皮肤癌、胰腺癌等均具有抑制作用[1,6-8]，但其抑癌机制尚不清楚。Granado-Serrano 等[6]对槲皮素引起肝癌细胞株 HepG2 凋亡进行研究，发现槲皮素直接活化 caspase-3 和 caspase-9 途径，降低 Bcl-xL: Bcl-xS 比值，加速 Bax 向线粒体膜的转移，持续抑制 Akt 和 ERK 增殖调控通路而导致 HepG2 凋亡。Conklin 等[9]报道槲皮素可提高 Cx43 和 GJIC 表达，抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的增殖。

在本研究中，我们研究了槲皮素对肺腺癌细胞 A549 细胞生长及 hTERT 表达的影响，探讨其可能的抗肿瘤机制。结果显示槲皮素可下调肺癌细胞 hTERT 基因表达，抑制端粒酶活性，破坏端粒稳定性而促进肺癌细胞凋亡，且细胞凋亡与槲皮素呈一定的剂量效应关系。20 μmol/L 的槲皮素作用 48 h 的肺癌细胞凋亡率明显高于 10 μmol/L 作用组（$P<0.05$）。电镜下经 20 μmol/L 槲皮素处理细胞 48 h 后，细胞表现凋亡细胞的特征性形态变化：细胞体积缩小、细胞表面纤毛丧失、细胞质固缩，核碎裂，可见凋亡小体形成。同样，20 μmol/L 槲皮素作用后，肺腺癌 A549 细胞 DNA 片段呈现典型的梯状条带，进一步证实了槲皮素可诱导细胞凋亡。

本研究表明槲皮素促进肺癌细胞凋亡的可能机制是，槲皮素下调 hTERT 基因的表达，抑制端粒酶活性，破坏端粒稳定性而导致细胞凋亡的发生。抗端粒酶治疗可能成为从分子水平上治疗肺癌的一种新手段，端粒酶抑制剂可能达到治疗肺癌的目的。

参考文献：

[1] 苑辉卿，郭怀芳，贺美兰，等. c-Jun 和 CBP 在槲皮素抑制前列腺癌中的作用[J]. 药学学报，2006，41(9)：819-824.

[2] Herrmann M，Lorenz H M，Voll R，*et al*. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments[J]. Nucleic Acid Res，1994，22 (24)：5506-5507.

[3] Pendino F，Tarkanyi I，Dudognon C，*et al*. Telomeres and telomerase：Pharmacological targets for new anticancer strategies? [J]. Curr Cancer Drug Targets，2006，6 (2)：147-180.

[4] Paradis V，Bieche I，Dargere D，*et al*. hTERT expression in sporadic renal cell carcinomas[J]. J Pathol，2001，195 (2)：209-217.

[5] Kolquist K A，Ellisen L W，Counter C M，*et al*. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues [J]. Nat Genet，1998，19 (2)：182-186.

[6] Granado-Serrano A B，Martin M A，Bravo L，*et al*. Quercetin induces apoptosis *via* caspase activation，regulation of Bcl-2，and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2)[J]. J Nutr，2006，136 (11)：2715-2721.

[7] Knowles L M，Zigrossi D A，Tauber R A，*et al*. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation[J]. Nutr Cancer，2000，38 (1)：116-122.

[8] Dechsupa S，Kothan S，Vergote J，*et al*. Quercetin，Siamois 1 and Siamois 2 Induce Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-435 Cells Xenograft *In Vivo*[J]. Cancer Biol Ther，2007，6 (1)：56-61.

[9] Conklin C M，Bechberger J F，MacFabe D，*et al*. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells [J]. Carcinogenesis，2007，28 (1)：93-100.

（编辑 郭建秀）