文章编号:1000-5404(2009)10-0895-03

论著

3,6-二羟黄酮降低白血病细胞HL-60抗氧化酶活性并影响MAPKs信号通路

林 辉,糜漫天,常 徽 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察3,6-二羟黄酮对白血病细胞HL-60抗氧化酶活性及MAPKs信号通路的影响,探讨其抗肿瘤作用分子机制。**方法** 采用CASY-TT亚流式细胞分析技术测定3,6-二羟黄酮对白血病HL-60细胞存活率的影响;化学比色法测定3,6-二羟黄酮作用HL-60细胞后,细胞内抗氧化酶SOD、CAT、GSH-Px的活性变化;Western blot检测胞内ERK、p38MAPK及JNK蛋白磷酸化水平变化。**结果** 3,6-二羟黄酮显著降低HL-60细胞存活率,其作用呈剂量和时间依赖性;20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用于HL-60细胞,胞内抗氧化酶SOD、CAT、GSH-Px活性显著降低,MDA含量显著升高($P<0.05$);Western blot检测结果表明,20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用HL-60细胞2、8、24 h,P-ERK蛋白水平明显降低($P<0.01$)、P-p38MAPK和P-JNK的蛋白水平则显著升高($P<0.01$)。**结论** 3,6-二羟黄酮可显著降低HL-60细胞内抗氧化酶活性,增加胞内氧化应激压力,并由此影响MAPKs信号通路,这可能是其诱导HL-60细胞凋亡和增殖抑制的重要分子机制。

关键词: 3,6-二羟黄酮;HL-60细胞;抗氧化酶;MAPKs信号通路
中图法分类号: R151.2;R73-361;R733.7 **文献标识码:** A

3,6-dihydroxyflavone decreases anti-oxidative enzyme activities in human leukemia HL-60 cells *via* MAPKs signaling pathway

LIN Hui, MI Man-tian, CHANG Hui (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the intracellular mechanisms by which 3,6-dihydroxyflavone inducing apoptosis of HL-60 cells. Methods After the HL-60 cells were treated with 3,6-dihydroxyflavone at the concentration of 5, 10, 20 or 40 mol/L, the cells then were inoculated under the selected optimal concentration. The survival rate of HL-60 cells was analyzed using a haemocytometer with standard trypan blue dye exclusion and a CASY cell counter and analyzer. The contents of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the cells were measured by chemochromatometry. The expression of phosphorylation of ERK, JNK and p38MAPK were examined by Western blotting. Results The survival rate of HL-60 cells was significantly reduced in a dose- and time-dependent manner after 3,6-dihydroxyflavone treatment. When the dose was over 10 mol/L or the time was longer than 12 h under the concentration of 20 mol/L, significantly decreased survival rate was observed ($P<0.05$, $P<0.01$). When the cells were treated with 20 mol/L 3,6-dihydroxyflavone, the activities of SOD, CAT and GSH-Px reached the lowest in 2 h, and still significantly lower than those of normal control in 24 h ($P<0.05$ or $P<0.01$). While, the content of MDA raised to its summit in 2 h and then gently decreased, but still significantly higher than that of normal control in 24 h ($P<0.05$). The protein of phosphorylation of ERK in HL-60 cells was significantly decreased in 2 h after 20 mol/L 3,6-dihydroxyflavone treatment and then increased to normal level in 24 h. However, the expressions of phosphorylation of JNK and p38MAPK was increased significantly in 2 h ($P<0.01$) and then decreased slowly, but still higher than those of normal control in 24 h. Conclusion 3,6-dihydroxyflavone significantly decreases the activities of anti-oxidative enzymes and increases the oxidative stress in HL-60 cells, probably through the JNK and MAPK signaling pathways.

Key words: 3,6-dihydroxyflavone; HL-60 cells; anti-oxidative enzyme; MAPKs pathway

基金项目: 国家自然科学基金(30671754);国家科技支撑计划(2008BAI58B06)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671754) and the National Supporting Plan for Science and Technology (2008BAI58B06)
作者简介: 林 辉,男,江西省南昌市人,硕士研究生,助教,主要从事植物黄酮与肿瘤方面的研究。电话:(023) 68752291, E-mail: linhui77@tom.com
通信作者: 糜漫天, 电话:(023) 68752292
收稿日期: 2009-01-15;**修回日期:** 2009-02-16

植物黄酮为一大类植物多酚化合物，广泛存在于各种植物膳食中，具有众多优良药理活性，以其天然、低毒、高效的特点而受到关注[1,2]。在既往研究中，本课题组通过构效关系研究，从23种纯度单一、结构明确且自然界中较为典型存在的植物黄酮中，成功筛选出了3种对HL-60细胞增殖抑制作用强的植物黄酮，且初步证实了它们能够显著提高HL-60细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平，引发细胞内氧化应激，诱导肿瘤细胞凋亡和增殖抑制[3]。人丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号转导通路参与多种细胞功能的调控，尤其是在细胞增殖、分化、运动、凋亡中起着关键作用，且与氧化应激反应关系密切，因此植物黄酮对细胞内ROS之外的关键性抗氧化酶的影响，以及细胞内环境中氧化还原状态的改变对与细胞增殖分化凋亡密切相关的MAPK信号通路的影响值得深入研究。本研究通过观察3,6-二羟黄酮对白血病细胞HL-60抗氧化酶活性及MAPKs信号通路的影响，旨在探讨其抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

白血病细胞株HL-60细胞由中科院上海细胞所提供。3,6-二羟黄酮购于Sigma公司，DMSO为Sigma公司产品，RPMI1640培养基、小牛血清和Hanks缓冲液为HyClone公司产品，超歧物过氧化物酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物(GSH-Px)试剂盒均购自南京建成生物研究所，磷酸化细胞外调控激酶(P-ERK)、磷酸化c-JUN氨基末端激酶(P-JNK)、P-p38MAPK一抗和抗兔二抗购自Cell Signaling公司，总蛋白提取液为北京赛百盛公司产品，ECL PLUS化学发光试剂购自Amersham公司，CASY快速细胞计数仪为德国Innovatis公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 人白血病HL-60细胞培养于含10%小牛血清的1640培养液中，37 ℃，5% CO_2，常规传代培养。3,6-二羟黄酮用DMSO分别配制成浓度为40 mmol/L的储备液，使用时用RPMI1640培养液稀释至所需浓度。DMSO在各组培养液中的终体积分数均为0.5%，所有实验均取对数生长期的细胞进行。

1.2.2 CASY-TT亚流式细胞分析检测细胞存活率 分别以5、10、20、40 μmol/L 3,6-二羟黄酮处理HL-60细胞24 h(以0.5% DMSO为对照)，利用亚流式细胞分析系统测定细胞存活率；筛选20 μmol/L浓度[3]，以该浓度处理HL-60细胞2、4、8、12、24 h，检测细胞存活率。

1.2.3 抗氧化酶活性及MDA含量检测 收集各组细胞，PBS洗涤细胞2次，加入细胞裂解液，振荡，显微镜下观察无细胞后，离心(3 000 r/min,5 min)，分别取100 μl上清液按试剂盒说明书操作，比色法测定SOD、CAT、GSH-Px和MDA的吸光度值并计算其活性或含量。

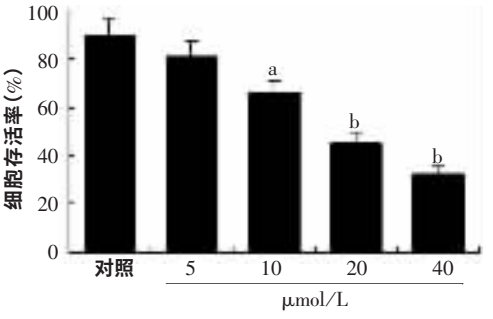
1.2.4 蛋白表达检测 收集各组细胞，PBS漂洗3次后按照总蛋白提取试剂使用说明书操作，用BCA法进行蛋白定量，行12% SDS-PAGE凝胶电泳分离目标蛋白，用Bio-Rad半干转印转至PVDF膜上，TBST漂洗5 min×3次，5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭1 h后，加入一抗，4 ℃孵育过夜，TBST漂洗5 min×3次，加入二抗，37 ℃孵育1 h，再次漂洗5 min×3次，加入化学发光底物，X线片暗室曝光，常规显影定影，图像以Bio-Rad图像分析系统分析，用条带的平均灰度值表示蛋白表达的相对强度，同时以β-actin为内参，标准化上样量。

1.2.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

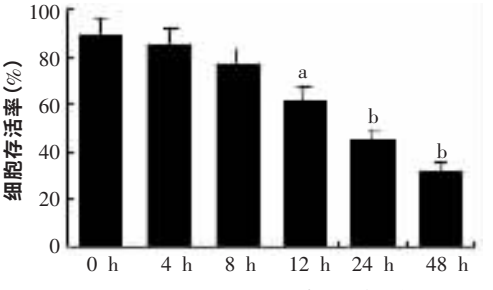
2.1 3,6-二羟黄酮对HL-60细胞存活率的影响

不同浓度3,6-二羟黄酮作用HL-60细胞24 h，利用亚流式细胞仪分析HL-60细胞存活率，结果表明，细胞存活率随3,6-二羟黄酮作用浓度增加而降低，10 μmol/L以上浓度组与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$，图1)；以20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用HL-60细胞，分别在4、8、12、24、48 h检测细胞存活率，结果表明，细胞存活率随作用时间增加而降低，并在作用12 h以上出现统计学差异($P<0.05$, $P<0.01$，图2)。综上可见，3,6-二羟黄酮对HL-60细胞的毒性作用呈剂量和时间依赖性。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

图1 不同浓度3,6-二羟黄酮作用24 h对HL-60细胞存活率的影响



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组(0 h)比较

图2 20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用不同时间HL-60细胞存活率的变化

2.2 3,6-二羟黄酮对HL-60细胞抗氧化酶活性及MDA含量的影响

抗氧化酶活性检测结果表明，20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用于HL-60细胞，细胞内SOD、CAT、GSH-Px活性显著下降，在2 h降到最低，然后逐渐回升，但24 h内均显著低于对照组；同时结果表明，细胞内脂质过氧化物MDA含量显著升高，在2 h达到顶峰，然后逐渐下降，但24 h内均显著高于对照组，见表1。

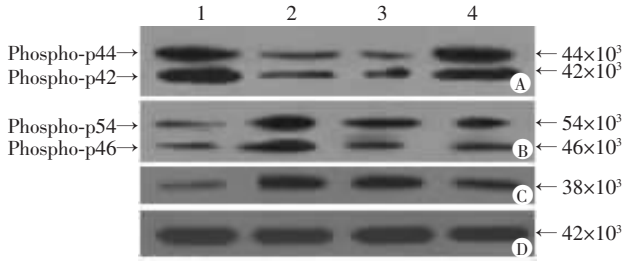
表 1　3,6-二羟黄酮对 HL-60 细胞抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响（$\bar{x} \pm s$）

时间	SOD（U/μg）	CAT（U/μg）	GSH-Px（U/μg）	MDA（nmol/mg）
0 h	189.33 ± 20.84	12.52 ± 1.64	1 058.92 ± 121.31	0.98 ± 0.13
2 h	75.67 ± 7.77[b]	5.84 ± 0.82[b]	589.3 ± 61.24[b]	3.31 ± 0.38[b]
8 h	82.26 ± 9.53[b]	6.91 ± 0.83[b]	658.2 ± 71.63[b]	2.04 ± 0.32[b]
24 h	90.59 ± 9.23[b]	8.30 ± 1.15[a]	756.3 ± 82.96[a]	1.88 ± 0.33[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 0 h 比较

2.3　3,6-二羟黄酮对 HL-60 细胞 MAPKs 信号通路的影响

Western blot 检测结果表明，20 μmol/L 3,6-二羟黄酮作用于 HL-60 细胞，细胞质内磷酸化 ERK 在处理 2 h 后显著下降（$P<0.01$），至 24 h 恢复到正常水平；与之相反，JNK 与 p38MAPK 则表现为磷酸化蛋白水平增高，在处理 2 h 后，磷酸化蛋白含量显著增加（$P<0.01$），然后缓慢下降，但 24 h 内仍高于正常水平，提示 3,6-二羟黄酮对 JNK、p38MAPK 信号通路的影响较大，见图 3。



1：对照组；2：2 h；3：8 h；4：24 h

A：P-ERK；B：P-JNK；C：P-p38MAPK；D：β-actin

图 3　3,6-二羟黄酮对 HL-60 细胞 MAPKs 信号通路中蛋白活性的影响

3　讨论

急性髓性白血病是临床一种严重的致死性疾病，目前的化疗不能有效延长生存率，诱导凋亡是治疗白血病的有效手段，而干预信号转导途径诱导凋亡为白血病治疗带来新的希望[4]。植物黄酮为天然多酚物质，其抗肿瘤作用一直倍受关注。本课题前期研究表明，3,6-二羟黄酮能够显著诱导 HL-60 细胞凋亡和增殖抑制，且其中涉及 ROS 水平的显著升高[5]。正常情况下，细胞通过抗氧化酶系统以及 GSH、硫氧还蛋白（TRx）等组成的巯基还原缓冲体系，使细胞 ROS 的产生与消解处于一种动态平衡过程中，细胞内环境氧化还原状态相对稳定[6]。本研究结果显示，3,6-二羟黄酮可显著降低 HL-60 细胞内抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 的活性，表明胞内清除 ROS 的能力降低，这与前期研究表明的 ROS 水平升高结果相一致，表明细胞内氧化应激压力增高，MDA 的检测结果也证实了这一点。

近年来，ROS 和氧化应激可介导 MAPKs 信号途径的改变，诱导细胞凋亡，其中 JNK/SAPK 和 p38MAPK 2 条途径在氧化应激的研究中引起广泛关注。如乙醛可通过增高胞内 ROS 水平导致 JNK 蛋白磷酸化水平升高，激活 JNK 途径诱导心肌细胞凋亡[7]；过氧化物 H_2O_2 可有效激活心肌细胞 JNK 和 p38MAPK 信号途径[8]；而阻断或抑制 JNK 信号通路，可减少高氧暴露下肺细胞的凋亡[9]。文献[10]发现，氧化应激可通过 JNK 磷酸化激活线粒体依赖性激酶 Mcl-1，诱导细胞凋亡。本研究结果表明，3,6-二羟黄酮处理 HL-60 细胞后，JNK 和 p38MAPK 磷酸化蛋白呈同向变化，表现出早期迅速下降，后期缓慢升高，表明两者介导的信号通路具有一定的协同性。抑制 ERK 的活性可抑制细胞的增殖。有研究显示，肾上皮细胞发生中等程度以下的氧化应激时，EGFR/Ras/MEK/ERK 生长途径仍然可以促进细胞生存，但 H_2O_2 介导的 ERK 激活却可以导致视网膜色素上皮细胞的凋亡[11]，这可能与蛋白的磷酸化后不能顺利实现核转位有关。在本研究中，3,6-二羟黄酮处理 HL-60 细胞后 ERK 活性被抑制，说明激活方式不同，细胞类型不同，同一信号通路也可能产生不同的生物学效应。因此，尽管氧化应激是细胞内短时间发生氧化还原状态改变的结果，但是氧化应激的程度会选择性激活不同信号途径使某些分子活化，从而执行特定生物学功能。

参考文献：

[1] 常　徽，糜漫天，顾艳艳，等. 黑米花色苷对白血病细胞株 HL-60 及正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(7)：585－587.

[2] Galati G，O'Brien P J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics：significance for their chemopreventive and anticancer properties [J]. Free Radic Biol Med，2004，37(3)：287－303.

[3] 常　徽，糜漫天，顾艳艳，等. 植物黄酮抗人白血病 HL-60 细胞增殖的结构-效应关系[J]. 癌症，2007，26(12)：1309－1314.

[4] 佘妙容，郭坤元，牛新清，等. 氧化还原状态的改变控制手霉素诱导 HL-60 白血病细胞凋亡[J]. 中国药理学通报，2008，24（6）：772－777.

[5] 常　徽，糜漫天，顾艳艳，等. 植物黄酮诱导白血病 HL-60 细胞凋亡过程中活性氧水平的变化[J]. 肿瘤，2008，28(4)：275－278.

[6] Leung H W，Kuo C L，Yang W H，*et al*. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis [J]. Eur J Pharmacol，2006，534(1－3)：12－18.

[7] 王时俊，邹云增，孙爱军，等. 氧化应激在乙醛引起的心肌细胞凋亡中的作用[J]. 中国病理生理杂志，2008，24(8)：1464－1468.

[8] Carvalho H，Evelson P，Sigaud S，*et al*. Mitogen-activated protein kinases modulate H_2O_2-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells [J]. J Cell Biochem，2004，92(3)：502－513.

[9] 胡　兰，许　峰，李　静，等. 高氧肺损伤中肺细胞凋亡及 JNK 信号通路调控机制[J]. 第四军医大学学报，2008，29(12)：1067－1670.

[10] Inoshita S，Takeda K，Hatai T，*et al*. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress [J]. J Biol Chem，2002，277(46)：43730－43734.

[11] Arany I，Faisal A，Nagamine Y，*et al*. p66shc inhibits pro-survival epidermal growth factor receptor/ERK signaling during severe oxidative stress in mouse renal proximal tubule cells[J]. J Biol Chem，2008，283(10)：6110－6117.

（编辑　龙　亮）