基础研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0707-03

槲皮素活化 mTOR 信号通路对 L929 成纤维细胞增殖的影响

董海良[1],张 颖[1],黄谢梅[1],黄 宏[2],郭 韡[2],邢 伟[2],郝 进[1],徐 祥[2]
(1. 重庆医科大学附属第二医院皮肤科,重庆 400010;2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

【摘 要】目的:探讨槲皮素(Quercetin,QU)对 L929 成纤维细胞增殖的影响及其分子机制。方法:采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 QU 对 L929 细胞增殖的影响,荧光素酶报告基因法检测 QU 对蛋白质翻译调控的影响、Western blot 法检测 QU 对 mTOR 介导的蛋白质翻译调控通路关键基因 mTOR、P-4E-BP1(翻译起始因子 4E 的结合蛋白)的磷酸化,细胞周期调控蛋白 cyclin D1 的表达及 mTOR 通路阻断实验。结果:MTT 法检测结果显示在 36 h 干预点,浓度为 1×10^{-4}、1.5×10^{-4}、2×10^{-4}、2.5×10^{-4} mol/L 时,QU 可明显促进 L929 细胞增殖($P<0.01$);荧光素酶报告基因检测系统结果显示:在 36 h 干预点,2.5×10^{-4} mol/L QU 与对照组相比,RLU(相对光单位)值明显增加($P<0.001$);Western blot 法检测结果显示,mTOR、cyclin、D1 和 P-4E-BP1 的表达明显增加。100 ng/ml 的雷帕霉素作用 36 h 后,与对照组相比,QU 组 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白表达明显增加,雷帕霉素组明显减少,雷帕霉素+QU 组蛋白表达明显增加,但较 QU 组有所减少。结论:QU 可通过诱导 mTOR 信号通路活化,进而促进细胞周期调控蛋白 cyclin D1 的表达,诱导 L929 细胞的增殖。

【关键词】槲皮素;L929 成纤维细胞;mTOR 信号通路;细胞增殖
【中国图书分类法分类号】R758.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-29

The effect of quercetin on mouce fibrob-last cell line L929 proliferation through activating mTOR signal pathway

DONG Hai-liang[1], ZHANG Ying[1], HUANG Xie-mei[1], HUANG Hong[2], GUO Wei[2], XING Wei[2], HAO Jin[1], XU Xiang[2]
(1. Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. State Key Laboratory of Trauma, Bums and Lombined Injary, Institule of Research, the Da-ping Hospital, the Third Military University)

【Abstract】*Objective*: To determine the effect of quercetin on mouce fibrob-last cell line L929 proliferation and explore it(s molecular mechanism. *Methods*: The effect of mouce fibctrob-last cell line L929 proliferation was measured by MTT assay; the effect of quercetin on protein regulation was detected by luciferase reporter assay; the effect of quercetin on the expressions of mTOR, cyclin D1 and p-4E-BP1, key genes in the mTOR-mediated protein translation pathway, was determined by Western blotting analysis. *Results*: A-mong the high concentration groups(1, 1.5, 2, 2.5)$\times10^{-4}$ mol/L at the point of 36 hours, quercetin significantly induced proliferation of mouce Compared with the control group, the RLU(relative light units)of 2.5×10^{-4} mol/L quercetin value fibrob-last cell line L929; the Luciferase reporter gene detection system showed as follows: increased significantly at the point of 36 hours; Quercetin increased the expression of mTOR and cyclin D1, and the phosphorylation of 4E-BP1 in mouce fibro-blast cell line L929 by Western blotting, and mTOR pathway blocking experiments. After 100 ng/ml rapamycin for 36 h, compared with the control group, the P-4E-BP1, mTOR and cyclin D1 protein expressions of quercetin group were significantly increased; those of rapamycin group were significantly re-duced; and those of rapamycin + quercetin group were increased, but decreased compared with quercetin group. *Conclusion*: Quercetin can induce mouce fibrob-last cell line L929 proliferation through activating mTOR signal pathway to increase expression of cyclin D1.

【Key words】quercetin; fibrob-last cell line L929; mTOR signal pathway; cell proliferation

作者介绍:董海良(1983-),男,硕士,
研究方向:皮肤病与性病学。
通信作者:郝 进,男,教授,Email:haojin_cq@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30970651);国家重点实验室基金资助项目(编号:SKLZZ200907)。

槲皮素（Quercetin，QU）是一种广泛存在于植物界的黄酮类化合物，是中药槲树皮的主要提取物之一。因其具有抗炎、抗过敏、解痉、强心、降压降脂、扩张冠脉、抗心率失常、抗血小板聚集、抗氧化、抗肿瘤等广泛的药理作用，而备受关注[1-4]。有研究证实，小剂量 QU（10^{-6} mol/L）抑制细胞增殖，而较大剂量（10^{-4} mol/L）则促进平滑肌细胞增殖[5,6]，其机制可能是由于不同浓度的 QU 对 MAPK（促分裂素原活化蛋白酶）有着不同的影响，而致高低剂量作用不同。还有 QU 对溃疡、创面具有保护作用，并能促进伤口愈合，但其促进伤口愈合的作用机制目前仍不清楚[7,8]。本研究拟以鼠皮肤结缔组织纤维母细胞L929 细胞株为细胞模型，充分探讨 QU 在促进伤口愈合和细胞增殖中的分子机制，为 QU 在伤口愈合治疗中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 L929 成纤维细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。在含 10%新生小牛血清的高糖 DMEM 培养基、37℃ 5%的 CO_2 饱和湿度条件下培养，每 3 d 换液传代，实验选用对数生长期的细胞。

1.1.2 试剂 QU 购自西安飞达有限公司，并用培养基稀释成 2.5×10^{-4} mol/L；DMEM（改良 Eagle 培养基）培养基购自美国 Gibco 公司；新生小牛血清购自 HyClone 公司；四甲基偶氮唑蓝（MTT）和二甲基亚砜（DMSO）购自 Sigma 公司；荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega；子质体 PolyJet™ Reagent 购自美国SignaGen；鼠抗P-4E-BP1单克隆抗体购自Cell Signaling公司；鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、兔抗 mTOR 单克隆抗体购自 Santa Cruz；HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗、HRP（辣根过氧化酶）标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自中杉金桥。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞生长增殖率 L929 细胞按 0.2×10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板，按终浓度不同，设对照组（0 μg/ml）和实验组（1×10^{-4}、1.5×10^{-4}、2×10^{-4}、2.5×10^{-4} mol/L），分别于 36 h 后进行 MTT 试验检测。步骤如下：向每孔内加入 20 μl MTT（5 g/L）溶液，37℃、5% CO_2 培养箱内培养细胞 4 h，弃去孔内培养液，每孔加入 150 μl DMSO，摇床振荡 10 min，使结晶物充分溶解，在酶标仪上测 490 nm 波长处各孔的光密度值 D_{490}。细胞生长增殖率=（实验组 D_{490}-1）/对照组 $D_{490}\times100\%$

1.2.2 荧光素酶报告基因检测 皮肤 L929 成纤维细胞常规培养至对数生长期，细胞按 5×10^4 个/ml 密度接种于 6 孔板，总体积为 2 ml。培养 24 h 后按如下分组处理细胞：实验共分为 2 组，对照组为只加培养基的正常细胞组，等到细胞长到 50%左右进行细胞换液，分别用含 1.0 μg PcDNA-LUC 质粒和 3.0 μl PolyJet™ Reagent 子质体混匀后转染 L929 细胞，10 h 以后换液用 2.5×10^{-4} mol/L QU 加入细胞培养基中，继续培养 36 h，4℃预冷 PBS 洗 3 遍，然后 Glo Lysis Buffer 裂解 5 min，按 Steady-Glo®荧光素酶报告基因检测试剂盒说明进行操作，采用 GOMAX Promega 发光计检测，重复 3 次。

1.2.3 免疫印迹法检测 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白的表达 选用生长状态良好的 L929 细胞，常规培养至对数生长期，细胞按 1×10^5 个/ml 密度接种于 6 cm 板，总体积为 3 ml。培养 24 h 后按如下分组处理细胞：实验共分为 2 组，设只加培养基的正常细胞对照组，2.5×10^{-4} mol/L QU 组，培养 36 h。参照试剂盒说明书，分组提取总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，使每个样品蛋白浓度稀释到 1 μg/ml，每个样品取 50 μl 行 10%SDS-PAGE，半干转移至 PVDF（聚偏氟乙烯）膜上，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，分别加入兔抗 P-4E-BP1 单克隆抗体（1:500）、鼠抗 GAPDH 单克隆抗体（1:500）、兔抗mTOR 单克隆抗体（1:500），兔抗 cyclin D1 单克隆抗体，4℃孵育过夜，TPBS 充分洗膜后分别加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗（1:15 000）和山羊抗兔 IgG 二抗（1:15 000），室温孵育 2 h，TBST 洗膜后，ECL 试剂显色，在 X 光洗片机（HQ-320XT）上曝光，实验重复 3 次。

1.2.4 mTOR 通路阻断实验 实验分为 4 组，设只加培养基的正常细胞为对照组，100 ng/ml 的雷帕霉素组[18,19]，2.5×10^{-4} mol/L QU 组，100 ng/ml 的雷帕霉素+2.5×10^{-4} mol/L QU 组，药物刺激 36 h 后，提取蛋白，然后用 Western blot 检测 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白的表达（方法同上）。

1.3 统计学处理

所有数据均采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据分析采用统计程序软件包（SPSS10.0）进行方差分析，两组之间比较采用 t 检验，多组之间比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 QU 对 L929 细胞的增殖效应

经不同浓度的 QU 处理，培养 36 h 后对 L929 成纤维细胞生长增殖结果表明：①在较大剂量（>10^{-4} mol/L）浓度下，随着药物浓度的增加，细胞存活数量增加，成增长趋势（图1）。②<10^{-4} mol/L 浓度下则相反。

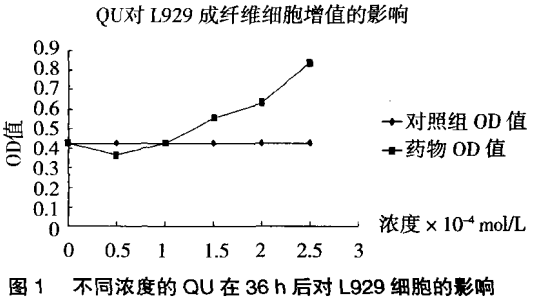


图 1 不同浓度的 QU 在 36 h 后对 L929 细胞的影响

2.2 QU 对细胞增殖的影响

QU 作用于 L929 细胞 36 h 后，Steady-Glo®荧光素酶报告基因检测系统结果显示：2.5×10^{-4} mol/L QU 与对照组相

比，RLU（相对光单位）值明显增加。经 t 检验，$P<0.001$，$n=5$，差异具有统计学意义。见表 1。

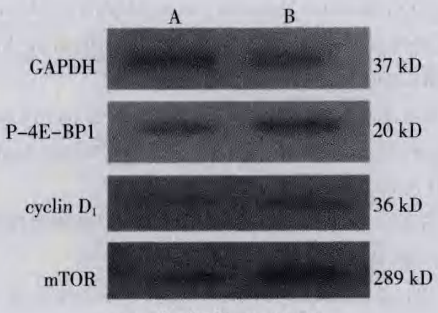
表 1　2.5×10^{-4} mol/L QU 处理 L929 细胞 36 h 后 RLU 值

组别	RLU值
空白对照组	12 730.6 ± 180.350 5
2.5×10^{-4} mol/L QU 组 *	24 422.4 ± 222.235 9

注：*，与对照组比较，$P<0.001$，$n=5$

2.3　免疫印迹检测 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 表达

2.5×10^{-4} mol/L QU 作用 L929 细胞 36 h 后，P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白表达情况见图 2。对照组和 2.5×10^{-4} mol/L QU组均表达 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白的特异性条带，与对照组相比，2.5×10^{-4} mol/L QU 组条带宽度和亮度都明显增加。

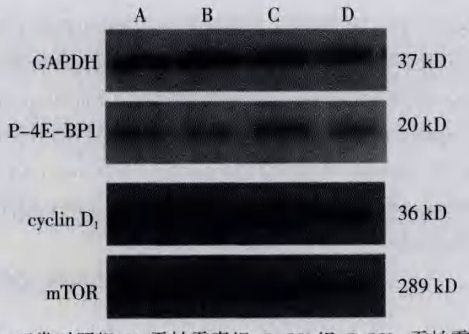


A. 正常对照组；B. QU 组

图 2　Western blot 法检测 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 的表达

2.4　mTOR 通路阻断实验

100 ng/ml 的雷帕霉素作用 36 h 后，P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 蛋白表达情况见图 3 所示。与对照组相比，2.5×10^{-4} mol/L QU 组条带宽度和亮度都明显增加，雷帕霉素组明显减少，100 ng/ml 的雷帕霉素+2.5×10^{-4} mol/L QU 组条带明显增加，但较 QU 组有所减少。



A. 正常对照组；B. 雷帕霉素组；C. QU 组；D.QU+ 雷帕霉素组

图 3　100 ng/ml 雷帕霉素处理后 P-4E-BP1、mTOR、cyclin D1 的表达

3　讨　论

创面愈合包括连续而又相互重叠的 3 个阶段，即炎症期、肉芽组织形成期和瘢痕形成期[9,10]。创面愈合机制尚不完全清楚，目前认为，创面局部的成纤维细胞和表皮细胞的分裂繁殖速度减慢和细胞外基质合成减少、分解加速是创面经久不愈的病理基础。表皮细胞生长因子、血小板源性生长因子、转化生长因子-β、bFGF 和生长因子血管内皮细胞等促进伤口愈合的细胞生长因子及 E-选择素、细胞内粘附分子-1、血管细胞粘附分子-1 等粘附分子的合成和分泌减少，包括胶原酶在内的各种金属蛋白酶的合成和分泌增加是导致慢性难愈性创面病理变化的分子生物学基础[11-13]。如能有效诱导创面局部成纤维细胞、表皮细胞的增殖和分泌功能的增加，合成分泌伤口愈合促愈因子，则可达到治疗慢性创面愈合的目的。本实验研究中药单体 QU 对伤口愈合的作用及其分子机理。

细胞增殖是由基因控制的细胞数量增加过程，细胞增殖在伤口愈合的发生机制中具有重要的意义。研究发现，QU 一方面可通过活化 p38/MAPK 信号通路，诱导 Caspase-3 的表达，抑制 p53、bcl-2 的表达而促进肿瘤细胞的凋亡，发挥抗肿瘤作用。另外，QU 还可诱导转化生长因子-β1 的表达，进而影响细胞周期，将细胞阻断于 G_1 期[2-4]。本实验研究表明，QU 在较大剂量（$>10^{-4}$ mol/L）浓度下具有诱导皮肤 L929 细胞增殖作用，且这一增殖效应是通过诱导细胞周期调控蛋白 cyclin D1（细胞周期蛋白 D1）的表达来实现的，$<10^{-4}$ mol/L 浓度下，则起相反作用。

本实验采用萤火虫荧光素酶（Firefly lucferase，LUC）报告基因实验是在萤火虫荧光素酶报告基因的 mRNA 的 5'端加入一茎环结构。通过检测荧光素酶的表达，可直接反应细胞内的蛋白质翻译水平[14,15]。在蛋白质翻译调控方面，帽依赖性蛋白质翻译途径是哺乳细胞 mRNA 翻译成蛋白质的主要途径，尤其是带有二级结构（茎-环结构）的 mRNA 翻译主要通过此途径来完成，而许多与细胞周期进程、信号转导、转录因子、细胞增殖、mRNA 加工密切相关的基因 mRNA5'端均具有二级结构，因此本实验首先应用此报告基因实验验证 QU 是否影响蛋白质翻译调控，进而调控成纤维细胞的增殖[16,17]。结果显示，QU 处理的细胞荧光素酶活性较对照组明显增加，由此提示其可通过激活蛋白质的翻译信号通路，上调蛋白的表达。

成纤维细胞是伤口愈合的中心细胞，由此，我们推测 QU 的促愈作用可能是通过促进成纤维细胞增殖和分泌相应的促愈因子而发挥促愈作用。再有 mTOR 是调控细胞生长的核心因子，进而我们进一步推测，QU 促进伤口愈合和细胞增殖的分子机制可能是通过诱导 mTOR 信号通路活化，激活蛋白质的翻译，进而促进成纤维细胞的增殖和分泌。因此，研究 QU 对成纤维细胞 mTOR 介导的蛋白质翻译信号通路的影响，进一步探索 QU 上调蛋白质翻译的分子机制，本研究进一步以参与蛋白质翻译和细胞生长的核心调控因子 mTOR（The mammalian target of rapamycin）为对象，通过 Western blot 检测 mTOR 信号通路中关键基因的表达和磷酸化的变化，寻找 QU 对蛋白质翻译调控的环节。结果显示，QU 可诱导 mTOR 的表达，并增加 4E-BP1（Initiation factor 4E-binding protein）

的磷酸化，并通过雷帕霉素阻断实验[18-21]，4E-BP1 的磷酸化表达显著下调。由此提示，QU 通过活化 mTOR 信号通路，进而增加 4E-BP1 的磷酸化，启动帽依赖性蛋白质的翻译。其中eIF-4F（翻译起始因子-4F）的形成是帽依赖性蛋白的翻译起始的关键限速步骤之一。本研究发现 QU 正是通过激活 mTOR 信号通路，进而启动蛋白质翻译起始复合物的形成，而调控 L929 细胞的蛋白质翻译。cyclin D1 作为mTOR 信号通路和 eIF4E 的靶基因，其翻译过程也是通过帽依赖性蛋白质的翻译途径进行。本研究也证实，QU 也可上调 cyclin D1 的表达。cyclin D1 增加，可刺激细胞从 G_1 期进提前进入 S期，从而促进成纤维细胞的增殖和分泌[22]。

本研究显示 QU 在一定浓度范围内可通过诱导 mTOR 的表达，活化此信号通路，进而调控细胞周期调控蛋白 cyclin D1 的表达，促进皮肤 L929 细胞的增殖，在皮肤溃疡、创面愈合的促愈中发挥重要的作用。目前的研究尚未解决 QU 是否存在靶受体，传递致细胞增殖信号具体转导途径等关键问题。因此进一步研究将明确 QU 促进细胞增殖作用机制、探索可能的分子作用靶点。

参 考 文 献

[1] Mitsuyoshi M, Naoko S, Kotaro S, et al. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(2): 253-259.

[2] Rang T B, Liang N C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 1997, 54(9): 1013-1018.

[3] 董　媛，杨永宾. 槲皮素抗氧化作用的实验研究进展[J]. 中华临床营养杂志，2010，18(1)：61-62.

[4] Marias A A, Juan A V, Jose C, et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB168 [J]. Cancer Res, 1994, 54(9): 2424-2428.

[5] 韩　静，王　伟，王绿娅，等. 葛根素与大豆苷元对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 沪国沪药森武，2004，29(5)：437-440.

[6] 韩　莹，史道华. 中药抑制血管平滑肌细胞增殖的新途径-mTOR [J]. 海峡药学，2006，17(6)：10-12.

[7] 许志宇，田永利，葛　林，等. 不同黄酮类药物对大鼠骨损伤愈合的疗效比较[J]. 山东医药，2009，49(29)：70-71.

[8] 舒　毅，谭　陶. 槲皮素的药理学进展[J]. 华西药学杂志，2008，23(6)：689-691.

[9] Chen X Y, Liu J T. Study on tumor cells' multidrug resistance and its reversion by Chinese herbs[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2003, 1(3): 221-225.

[10] Yan L C, Chen X Y. Progress of research on apoptosis of breast cancer cells[J]. Chin Integr Med, 2003, 1(3): 226-229.

[11] Scheper G C, Proud G C. Dose phosphotylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation[J]? Eur J Biochem, 2002, 269(22): 5350-5359.

[12] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines[J]. Physiol Rev, 2003, 83(3): 835-870.

[13] Xue B, He G Z, Huang C B. Chronic wound healing promoted by recombinant human epidermal growth factor combined with basic fibroblast growth factor[J]. Zhongguo Lin Chuang Kang Fu, 2004, 8(2): 262-263.

[14] Shunichi K, Takeshi O, Motonobu O, et al. p51/p63 controls subunit 3 of the major epidermis integrin anchoring the stem cells to the Niche[J]. Cell Biol, 2004, 279(1): 50069-50077.

[15] Scott D R, Kim K H, Amarzguioui M. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(13): 4140-4156.

[16] 孙志东，孙　萍，付秋霞，等. 两种萤火虫荧光素酶活性检测方法的一致性比较[J]. 生技术通讯，2008，19(1)：80-81.

[17] Hu J, Straub J, Xiao X, et al. Phenethyl isothiocyanate, a cancer chemopreventive constituent of cruciferous vegetables, inhibits cap-dependent translation by regulating the level and phosphorylation of 4E-BP1 [J]. Cancer Res, 2007, 67(8): 3569-3573.

[18] 郭　霞，周晨燕，高　举，等. 雷帕霉素逆转急性淋巴细胞白血病 CEM-C1 细胞对糖皮质激素耐药的研究[J]. 临床儿科杂志，2010，28(5)：414-419.

[19] 黄赤兵，张银甫，范明齐，等. 共刺激阻断剂与雷帕霉素联合应对移植肾存活的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2005，30(5)：676-678.

[20] 郑传东，苟　欣，杨华安. 雷帕霉素对大鼠缺血再灌注肾 Fas，bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(3)：285-293.

[21] Kleijn M, Gert C S, Harry O, et al. Regulation of translation initiation factors by signal transduction[J]. Eur J Biochem, 1998, 253(3): 531-544.

[22] Fu X B, Cheng B, Sheng Z Y. The possible role of some cytokines on wound healing and hyperplastic scar formation and their effects[J]. Zhongguo Lin Chuang Kang Fu, 2002, 6(4): 464-466.

（责任编辑：冉明会）