

槲皮素调控 AMPK 活性诱导 HL-60 细胞自噬与凋亡

肖洁, 尹松梅, 谢双锋, 李益清, 聂大年, 马丽萍, 王秀菊, 吴裕丹, 刘红云
(中山大学孙逸仙纪念医院血液内科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】观察槲皮素对急性髓系白血病 HL-60 细胞凋亡与自噬的影响及腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 活性的变化, 探讨槲皮素抗白血病的分子机制。【方法】流式细胞仪、电镜、蛋白质印迹法检测槲皮素孵育 HL-60 细胞 24、48 h 后细胞凋亡与自噬的水平; 检测槲皮素作用后 HL-60 细胞 AMPK、p-AMPK 的表达; 流式、蛋白质印迹法检测不同浓度槲皮素与 AMPK 小分子抑制剂 Compound C 共同孵育 HL-60 细胞后 AMPK 活化的情况及细胞凋亡、自噬的变化。【结果】槲皮素可诱导 HL-60 细胞发生凋亡, 且细胞凋亡率与槲皮素浓度、作用时间呈正相关。槲皮素浓度越大, 细胞凋亡率越高 ($P = 0.000$); 随着作用时间的延长, 细胞凋亡率进一步增加 ($P = 0.000$); 不同浓度槲皮素 (25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 与 HL-60 细胞共同孵育 24 h 及 48 h 后, 电镜观察到自噬体形成; 绿色荧光标记自噬体后用流式细胞仪对荧光强度进行检测, 结果发现槲皮素作用后细胞内绿色荧光强度明显较对照组增加 ($P = 0.001$); Western blot 检测 LC3 II/I 比值增高 ($P < 0.001$); 证实槲皮素能够诱导 HL-60 细胞发生自噬。槲皮素能够浓度依赖性的激活 AMPK 活性, 使得 AMPK 的磷酸化水平增高 ($P = 0.001$)。槲皮素与 Compound C 联合用药组与单用槲皮素组比较, p-AMPK 的表达降低, Compound C 能够阻断槲皮素诱导的 AMPK 磷酸化。槲皮素+Compound C 组与单用槲皮素组比较, 细胞凋亡率下降 ($P < 0.001$); 抑制 AMPK 的活性后, 槲皮素诱导细胞凋亡的作用减弱。槲皮素+Compound C 组 LC3 II/I 比值低于单用槲皮素组 ($P < 0.001$); 抑制 AMPK 的活性后, 槲皮素诱导细胞自噬的作用减弱。【结论】槲皮素通过诱导 HL-60 细胞凋亡与自噬发挥抗白血病作用, AMPK 可能是槲皮素诱导细胞凋亡与自噬的重要信号分子。

关键词: 槲皮素; 急性髓系白血病; 凋亡; 自噬; 腺苷酸活化蛋白激酶

中图分类号: R733.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)04-0501-09

Quercetin Modulate AMPK Activity and Induce Apoptosis and Autophagy in HL-60 Cells

XIAO Jie¹, YIN Song-mei¹, XIE Shuang-feng¹, LI Yi-qing¹, NIE Da-nian¹, MA Li-ping¹, WANG Xiu-ju¹,
WU Yu-dan¹, LIU Hong-yun¹

(Department of Hematology, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the anti-leukemia mechanism of quercetin through observing apoptosis and autophagy of HL-60 cells and examining the expressions of AMP-activated protein kinase (AMPK). 【Methods】 The effect of quercetin on apoptosis and autophagy in human acute myeloid leukemia HL-60 cells were detected by flow cytometry, Western-blot and electron microscopy. The proteins expression of AMPK, p-AMPK in HL-60 cells incubated with quercetin were tested by Western-blot. Western-blot and flow cytometry were used to test the AMPK and p-AMPK expressions and the change of apoptosis and autophagy in HL-60 cells, which were incubated with quercetin and AMPK inhibitor (Compound C). 【Results】 Quercetin induced cell apoptosis. The quercetin concentrations and time of action were both the major factors affecting the apoptosis of HL-60 cells. The autophagosomes were observed by electron microscopy in HL-60 cells which were incubated with different concentrations of quercetin (25, 50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h and

收稿日期: 2018-03-12

基金项目: 广东省基础与应用基础研究专项(2016A030313270); 广东省医学科研基金(A2016070)

作者简介: 肖洁, 博士, 主治医师, 研究方向: 血液肿瘤的防治, E-mail: xiaojie3@mail.sysu.edu.cn; 尹松梅, 通信作者, E-mail: yinsongmei@

21cn.com

48 h. The difference of autophagy fluorescence intensity which were analyzed by flow cytometry were significant among the control groups and the different concentration quercetin groups ($P = 0.001$). The difference of LC3 II/I ratios were also significant among the control group and the different concentration quercetin groups ($P < 0.001$). Quercetin activated the phosphorylation of AMPK in HL-60 cells ($P = 0.001$). While HL-60 cells were incubated both with quercetin and Compound C, Compound C can not only inhibit the phosphorylation of AMPK, but also the apoptosis and autophagy induced by quercetin in HL-60 cells. [Conclusions] Quercetin induced apoptosis and autophagy in HL-60 cells through modulated the activity of AMPK.

Key words: quercetin; acute myelocytic leukemia; apoptosis; autophagy; AMP-activated protein kinase

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(4): 501-509]

急性髓系白血病是成年人血液系统最常见的恶性肿瘤之一。为提高急性白血病的治愈率,延长患者生存,要不断寻找针对肿瘤细胞的新型药物。槲皮素摩尔分子质量为 302.238 g/mol,分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。其是一种植物来源的黄酮类化合物,几乎无毒性,因其强抗氧化性和抗癌功效,多年来受到广泛关注。槲皮素被认为是一种“分子靶向药物”,可以干扰肿瘤细胞的信号转导通路,调节分子转导通路的关键靶点使细胞死亡^[1-2]。凋亡和自噬的调控与肿瘤发展密切相关,而腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是调控细胞能量代谢的关键分子,能量代谢异常可诱发细胞凋亡及自噬。前期的研究结果证实槲皮素能够诱导 HL-60 细胞内 Bcl-2 的表达,升高 Bax 的表达,使 Bax 同源二聚体形成增多,激活凋亡信号通路下游靶蛋白 Caspase-3,诱导凋亡^[3]。而槲皮素对急性髓系白血病自噬的影响目前未见相关研究报道。本研究将槲皮素作用于 HL-60 细胞,观察其对 HL-60 细胞凋亡及自噬的影响,观察槲皮素孵育后 HL-60 细胞腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)的活性变化,探讨槲皮素诱导凋亡与自噬可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人急性髓细胞白血病细胞 HL-60 购于中国医学科学院血液学研究所。槲皮素、3-Methyladenine 购自美国 Sigma Chemical 公司;Compound c 购自德国 Merck 公司;RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;自噬检测试剂盒购自英国 Abcam 公司;AnnexinV-FITC 试剂盒购自美国 Bender 公司;鼠抗

人 AMPK alpha 1 + AMPK alpha 2 单克隆抗体、兔抗人单克隆 AMPK alpha 1 (phospho T183) + AMPK alpha 2 (phospho T172) 抗体、兔抗人 LC3B 抗体、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞分离与培养

HL-60 细胞复苏后,接种于含 10% 胎牛血清、3% 谷氨酰胺的 RPMI1640 完全培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 2~3 d 传代换液 1 次,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.3 研究方法

1.3.1 流式细胞仪 AnnexinV-FITC+PI 染色法检测凋亡细胞 取浓度为 0、25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素孵育 24、48 h 的 HL-60 细胞,2 000 r/min 离心 10 min ($r = 15 \text{ cm}$),PBS 洗涤两次后重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取细胞悬液 50 μL ,加入 5 μL AnnexinV-FITC,2.5 μL PI。避光孵育 30 min,流式细胞仪测定细胞凋亡率。早期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+)-PI(-),晚期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+)-PI(+)

1.3.2 透射电镜检测槲皮素对 HL-60 细胞自噬的影响 收集对数生长期的 HL-60 细胞,1 000 r/min 离心 5 min ($r = 15 \text{ cm}$),去上清。完全培养基重悬细胞,计数,接种于 6 孔板,每孔接种细胞 1×10^6 个。槲皮素设高浓度组(50 $\mu\text{mol/L}$)、低浓度组(25 $\mu\text{mol/L}$)。在相同实验条件下,各处理组细胞在培养箱中共同孵育 24 h 及 48 h,每组设 3 个平行孔。1 000 r/min 离心 5 min ($r = 15 \text{ cm}$),收集细胞,2.5% 戊二醛 4 °C 固定,1% 锇酸固定 20 min。30%、50%、70%、80%、90%、95% 的酒精各 1 次,每次 5 min;100% 丙酮 2 次,每次 10 min。1/3 树脂+2/3 丙酮浸泡 1 h;2/3 树脂+1/3 丙酮浸泡 1 h;纯树脂 2 次,每次 1 h,第 3 次过夜。用环氧树脂以倒扣包

埋法进行包埋。在烤箱中 70 ℃ 聚合 24 h。常规修块,超薄切片机切片。超薄切片厚 80 nm,载于 200~300 网孔的镍网上。置 1% H_2O_2 内 10 min 至 1 h。双蒸水洗 3 次,每次 10 min。5% 醋酸铀(双蒸水配制)染 5 min,然后用双蒸水洗。枸橼酸铅染色 5 min,双蒸水洗净。透射电镜观察。

1.3.3 流式细胞仪检测自噬信号 取 6 孔细胞培养板,每孔细胞密度为 1×10^6 cells/mL。实验分组为槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)组、槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)组、Rapa(1 $\mu\text{mol/L}$)组、Rapa(1 $\mu\text{mol/L}$)+3-MA 组(5 mmol/L)、槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)+3-MA(5 mmol/L)组及槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)+3-MA(5 mmol/L)组。在相同实验条件下,各处理组细胞在培养箱中共同孵育 24 h,每组设 3 个平行孔。室温下,1 000 r/min 离心 5 min ($r = 15$ cm)收集细胞。用 1 \times 检测缓冲液洗涤细胞 2 次,小心移除上清液。细胞重悬于含有 5% 胎牛血清的 250 μL 细胞培养基中。在每个样本中加入自噬检测试剂 250 μL ,混合后避光,室温下孵育 30 min。室温下,1 000 r/min 离心 5 min ($r = 15$ cm),收集细胞,在 1 \times 检测缓冲液中洗涤 2 次。用 500 μL 新鲜 1 \times 检测缓冲液重悬细胞。在 40 g/L 多聚甲醛溶液中孵育细胞 20 min。1 \times 检测缓冲液中洗涤 3 次。在流式分析仪中,选择绿色(FL1)通道分析样本。

1.3.4 蛋白质印迹法检测细胞中 LC3 II/I 蛋白的表达 收集终浓度为 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素孵育 48 h 的 HL-60 细胞提取总蛋白。测定蛋白浓度后每孔按 50 μg 蛋白上样。将蛋白经 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶 37 ℃ 封闭 1 h 后,加入含一抗的封闭液中(LC3:稀释比例 1:1 000,转膜条件:300 mA 恒流转膜 15 min; AMPK:稀释比例 1:1 000,转膜条件:300 mA 恒流转膜 62 min;p-AMPK:稀释比例 1:1 000,转膜条件:300 mA 恒流转膜 64 min),4 ℃ 摇床孵育过夜。用 TBST 将 PVDF 膜洗 3 次后放入含 1:10000 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 单抗或羊抗兔 IgG 单抗封闭液中,室温轻摇 1 h。洗涤后进行发光鉴定,并用凝胶分析软件对图象进行分析。

1.3.5 蛋白质印迹法检测槲皮素加或者不加 AMPK 抑制剂 Compound C 作用后 HL-60 细胞中 AMPK、p-AMPK 蛋白表达的变化 实验分为对照组、槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)组及槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)组,观察槲皮素孵育 48 h 后细胞内 AMPK、p-

AMPK 蛋白的表达变化。并观察加入 AMPK 小分子抑制剂 Compound C 后槲皮素对细胞内 AMPK 及 p-AMPK 表达影响的变化。

1.3.6 流式细胞仪 AnnexinV-FITC+PI 染色法检测和蛋白质印迹法检测 Compound C 抑制 AMPK 活性后槲皮素对凋亡及自噬的影响 实验分为对照组、槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)组、槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)组、槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)+Compound C 组及槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)+Compound C 组,观察采用 Compound C 特异性抑制 AMPK 的活化后,槲皮素对凋亡及自噬的影响,明确槲皮素诱导 HL-60 细胞凋亡与自噬中的分子机制。

1.4 统计学方法

计量资料的描述用均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$)。多组计量资料间均数比较采用单因素方差分析或者两因素方差分析,若组间比较存在差异,则采用 LSD- t 检验进行多重比较;所有数据应用 SPSS 19.0 统计软件处理,检验水准定为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对 HL-60 细胞凋亡的影响

分别用 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素孵育 HL-60 细胞 24 h 及 48 h 后,流式细胞仪双染法检测凋亡率。采用多因素方差分析进行统计后得出:槲皮素可诱导 HL-60 细胞发生凋亡,且细胞凋亡率与槲皮素浓度、作用时间均相关。槲皮素浓度越大,细胞凋亡率越高($F = 267.81, P = 0.000$);随着作用时间的延长,细胞凋亡率进一步增加($F = 214.47, P = 0.000$);时间和药物浓度两因素存在交互效应($F = 16.88, P = 0.01$;表 1,图 1)。

2.2 槲皮素对 HL-60 细胞自噬的影响

2.2.1 电镜观察槲皮素诱导 HL-60 细胞发生自噬 将不同浓度的槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$)与 HL-60 细胞进行共培养,分别于培养后 24 h 及 48 h 收集细胞,经戊二醛固定(不吹悬)后,电镜观察槲皮素作用前后的细胞,发现槲皮素处理组细胞内可观察到双层膜泡结构,即自噬体(图 2)。

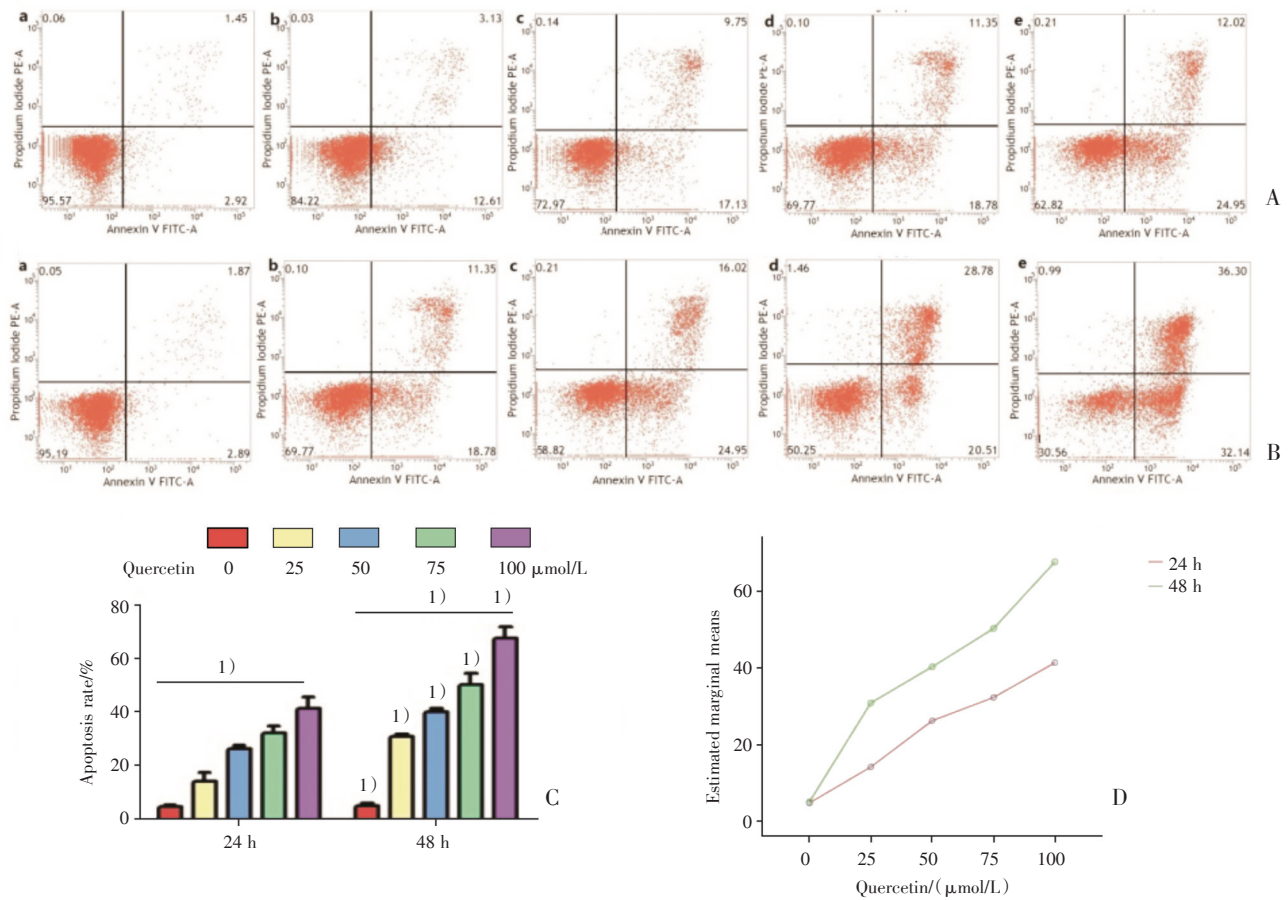
2.2.2 绿色荧光标记自噬小体,流式细胞仪检测细胞内荧光强度 雷帕霉素(Rapamycin, Rapa)是目前实验常用的自噬诱导剂。本实验将细胞分为空白对照组、阳性对照组(1 $\mu\text{mol/L}$ Rapa)、低浓度

表1 槲皮素对HL-60细胞凋亡的影响

Table 1 The apoptosis rates of HL-60 cells incubation with quercetin

(n = 6)

	Quercetin/ ($\mu\text{mol/L}$)					F	P
	0	25	50	75	100		
24 h	4.82 \pm 0.52	14.18 \pm 3.37	26.20 \pm 1.51	32.26 \pm 2.63	41.29 \pm 4.28	80.04	0.00
48 h	5.09 \pm 0.85	30.80 \pm 1.06	40.22 \pm 0.99	50.18 \pm 4.20	67.50 \pm 4.38	203.92	0.00



The apoptotic rates of HL-60 cells were detected by flow cytometry after the cells incubated with quercetin (0, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h (A) and 48 h (B). The early apoptosis was defined as PI (-) AnnexinV-FITC (+); the late apoptosis was defined as PI (+) AnnexinV-FITC (+). a: Quercetin 0 $\mu\text{mol/L}$, b: Quercetin 25 $\mu\text{mol/L}$, c: Quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$, d: Quercetin 75 $\mu\text{mol/L}$, e: Quercetin 100 $\mu\text{mol/L}$. C: Apoptosis rates were expressed in arbitrary units. Each bar represents mean values of 6 independent experiments. The quercetin concentration is one of the major factors which affected the apoptosis of HL-60 cells, $1) P < 0.001$. D: Interaction effect contour map shows that the interaction is extremely significant between the two factors, quercetin concentrations and times of action, $P < 0.01$.

图1 槲皮素作用24 h及48 h后HL-60细胞凋亡率变化

Fig.1 The apoptosis rates of HL-60 cells incubation with quercetin

槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$)组、高浓度槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)组。将细胞与药物共同作用24 h,加入自噬检测试剂,采用流式细胞仪检测上述各组细胞中平均自噬荧光强度,采用单因素方差分析进行统计,结果发现对照组、1 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素(Rapamycin, Ra-

pa)组、Rapamycin(1 $\mu\text{mol/L}$)+3MA(5 mmol/L)组平均荧光强度差异显著($F = 30.13, P = 0.001$)。各组间多重比较得出以下结论:Rapa可诱导细胞发生自噬,与空白对照组比,细胞内平均自噬荧光强度高于空白对照组($P = 0.001$)。3-MA预处理细胞

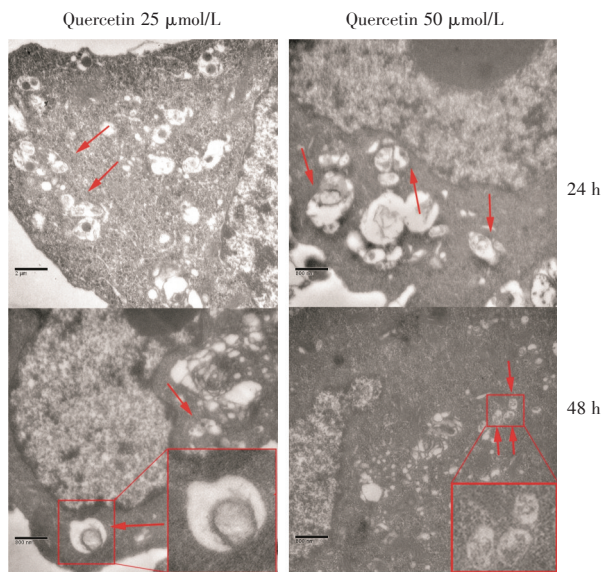


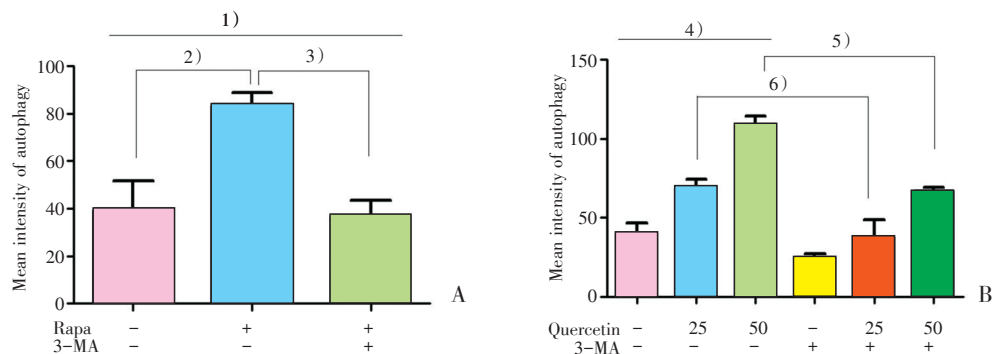
图2 槲皮素诱导 HL-60 细胞内自噬小体生成
Fig.2 Quercetin induced autophagy in HL-60 cells

后, Rapa 诱导的细胞自噬被抑制, 与 Rapa 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P = 0.70$, 图 3A)。

自噬平均荧光强度在对照组、槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组及槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组各组间的差异有统计学意义 ($F = 42.24, P < 0.001$)。槲皮素诱导后 HL-60 细胞内平均自噬荧光强度均高于空白对照组, 且随着槲皮素浓度的增高, 诱导自噬的效应更加明显。组间多重比较, 槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P = 0.01$);

槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。加或不加自噬抑制剂 3-MA (5 mmol/L), 槲皮素诱导的细胞自噬有明显变化, 自噬抑制剂 3-MA 能够抑制槲皮素诱导的细胞自噬 (图 3B)。

2.2.3 蛋白免疫印迹法检测槲皮素处理后 HL-60 细胞中 LC3 II / I 的变化 LC3 是目前最明确贯穿整个自噬过程并能出现在晚期自噬溶酶体中的自噬相关蛋白, 自噬激活时, LC3-I 在泛素样反应酶的作用下与磷脂酰乙醇胺偶联生成 LC3-II。LC3-I 定位于胞质内, LC3-II 定位于自噬体的内外膜。LC3 II / I 比值的变化能够反应细胞内自噬水平的高低。将细胞分为空白对照组、槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组、槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组、槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) + 3-MA (5 mmol/L) 组及槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) + 3-MA (5 mmol/L) 组。药物处理 24 h 后收集各组细胞, Western blot 检测各组细胞中 LC3 II / I 的变化。结果表明, 对照组、槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组、槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组各组之间 LC3 II / I 比值存在差异 ($F = 79.79, P = 0.000$), 槲皮素处理后细胞内 LC3 II / I 比值明显高于空白对照组, 且随着槲皮素浓度的增高, 细胞内 LC3 II / I 比值增高更明显。加入自噬抑制剂 3-MA 预处理 HL-60 细胞 4 h 后, 再予不同浓度槲皮素孵育 HL-60 细胞 24 h, 细胞内 LC3 II / I 比值降低 ($P = 0.000$), 证明槲皮素诱导的细胞自噬能够被 3-MA 所抑制 (表 2, 图 4)。



A: HL-60 cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ Rapamycinor both with 3-MA for 24 h ($n = 3$). 1) $F = 30.13, P = 0.001$ among each group; 2) $P = 0.01$ vs control group; 3) $P = 0.000$ vs Rapa+3-MA group. B: HL-60 cells untreated or treated with quercetin (25, 50 $\mu\text{mol/L}$) or both with 3-MA for 48 h ($n = 3$). The difference are significant between the groups which were treated with different concentrations of quercetin, 4) $F = 42.24, P < 0.001$, 5) $P = 0.002$ vs quercetin 25 $\mu\text{mol/L}$ group, 6) $P < 0.001$ vs quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ group.

图3 流式细胞仪检测各组细胞平均荧光强度
Fig.3 Flow cytometry-based profiling of autophagy detection in HL-60 cells

表2 各组HL-60细胞中LC3 II/I水平变化
Table 2 The ratio of LC3 II/I in HL-60 cells

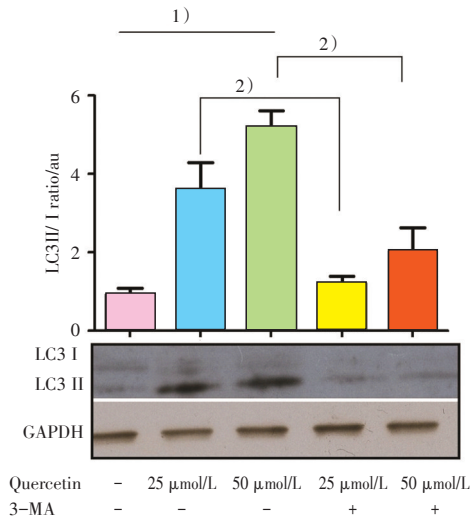
LC3 II/I	Control	Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)		5 mmol/L 3MA +Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)	
		25	50	25	50
	0.92 ± 0.17	$3.59 \pm 0.70^{1)}$	$5.20 \pm 0.42^{1)}$	$1.20 \pm 0.20^{2)}$	$2.03 \pm 0.60^{3)}$

$n = 3, 1) F = 79.79, P < 0.001$ among different concentrations of quercetin groups; 2) $P < 0.001$ vs the single quercetin (25 $\mu\text{mol/L}$) group; 3) $P = 0.000$ vs the single quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) group.

表3 槲皮素对HL-60细胞中p-AMPK/AMPK表达的影响
Table 3 The effect of Quercetin on the ratio of p-AMPK/AMPK in HL-60 cells

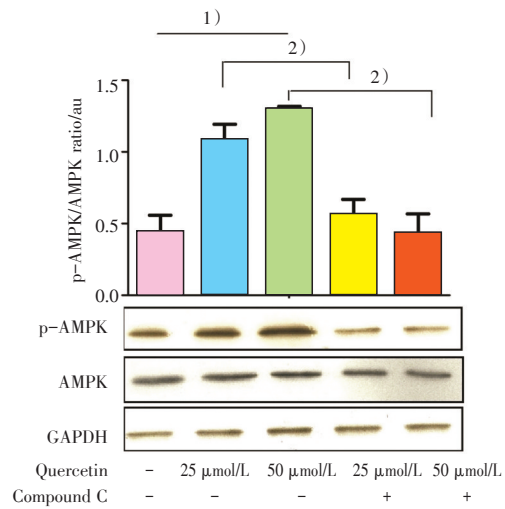
p-AMPK/AMPK	Control	Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)		Compound C 25 $\mu\text{mol/L}$ +Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)	
		25	50	25	50
	0.44 ± 0.12	$1.08 \pm 0.11^{1)}$	$1.30 \pm 0.02^{1)}$	$0.56 \pm 0.11^{2)}$	$0.43 \pm 0.14^{3)}$

$n = 3, 1) F = 48.84, P < 0.001$ among different concentration quercetin groups; 2) $P = 0.000$ vs the single quercetin (25 $\mu\text{mol/L}$) group, 3) $P < 0.001$ vs the single quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) group.



1) $F = 79.79, P < 0.001$ among groups; 2) $P < 0.001$ between groups.

图4 HL-60细胞中LC3 II/I的变化
Fig.4 The ratio of LC3 II/I in HL-60 cells



1) $F = 48.84, P < 0.001$ among groups; 2) $P < 0.001$ between groups.

图5 槲皮素对HL-60细胞内p-AMPK/AMPK表达的影响
Fig.5 Quercetin activated AMPK in HL-60 cells

2.3 槲皮素处理后HL-60细胞中AMPK、p-AMPK表达的变化

不同浓度槲皮素(25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$)孵育HL-60细胞24 h后, Western Blot检测细胞中AMPK、p-AMPK蛋白的变化。采用两因素方差分析进行统计,结果发现槲皮素能够浓度依赖性的激活AMPK活性,使得AMPK的磷酸化水平增高($F = 48.84, P = 0.000$)。25 $\mu\text{mol/L}$ Compound C与不同浓度槲皮素(25、50 $\mu\text{mol/L}$)共同孵育HL-

60细胞24 h,收集细胞,提取总蛋白,Western blot检测蛋白表达。结果发现,槲皮素与Compound C联合用药组与单用槲皮素组比较,p-AMPK的表达降低,Compound C能够阻断槲皮素诱导的AMPK磷酸化(表3,图5)。

2.4 Compound C抑制AMPK磷酸化后槲皮素对细胞凋亡及自噬的影响

不同浓度槲皮素加或者不加Compound C孵育HL-60细胞24 h后,采用流式细胞仪Annex-

inV-FITC+PI 染色法检测凋亡细胞。结果显示:槲皮素浓度依赖性的诱导 HL-60 细胞凋亡的发生 ($F = 316.41, P = 0.000$); 槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) + Compound C (25 $\mu\text{mol/L}$) 组与槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组比较, 细胞凋亡率下降 ($P < 0.001$)。槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) + Compound C (25 $\mu\text{mol/L}$) 组与槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 细胞凋亡率下降 ($P < 0.001$; 表 4, 图 6)。

表 4 AMPK 磷酸化受抑后槲皮素对 HL-60 细胞凋亡的影响

Table 4 The apoptosis level induced by quercetin after AMPK phosphorylation inhibited

	Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)		Compound C 25 $\mu\text{mol/L}$ + Quercetin($\mu\text{mol/L}$)	
	25	50	25	50
Apoptosis	16.65 \pm 1.85	28.35 \pm 1.23	5.47 \pm 0.66 ¹⁾	15.68 \pm 1.25 ²⁾

$n = 6, 1) P < 0.001$ vs single quercetin (25 $\mu\text{mol/L}$) groups; 2) $P < 0.001$ vs single quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) groups.

不同浓度槲皮素加或者不加 Compound C 孵育 HL-60 细胞 24 h 后, 蛋白免疫印迹法检测细胞中 LC3 II/I 比值。结果显示:槲皮素诱导 HL-60 细胞自噬的作用与浓度相关, 浓度越高, 作用越明显 ($F = 454.07, P = 0.000$); 槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$) + Compound C (25 $\mu\text{mol/L}$) 组与槲皮素 (25 $\mu\text{mol/L}$)

L) 组比较, LC3 II/I 比值下降, 细胞自噬程度降低, $P < 0.001$ 。槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) + Compound C (25 $\mu\text{mol/L}$) 组 LC3 II/I 比值低于槲皮素 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组, $P < 0.001$ 。抑制 AMPK 的活性后, 槲皮素诱导细胞自噬的作用减弱 (表 5, 图 7)。

表 5 AMPK 磷酸化受抑后槲皮素对 HL-60 细胞自噬的影响

Table 5 The autophagy level induced by quercetin after AMPK phosphorylation inhibited

	Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)		Compound C 25 $\mu\text{mol/L}$ + Quercetin/($\mu\text{mol/L}$)	
	25	50	25	50
LC3 II/I	4.20 \pm 0.34	6.47 \pm 0.26	0.36 \pm 0.16 ¹⁾	0.37 \pm 0.22 ²⁾

$n = 3, 1) P < 0.001$ vs single quercetin (25 $\mu\text{mol/L}$) groups; 2) $P < 0.001$ vs single quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) groups.

3 讨论

目前, 联合化疗仍然是急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 治疗的主要方法。传统的细胞毒性药物治疗急性白血病毒性大, 副反应多。槲皮素是植物来源的抗肿瘤药物, 具有低毒性的特点, 近年来受到广泛的关注。有研究发现槲皮素作为一种“分子靶向药物”, 可以

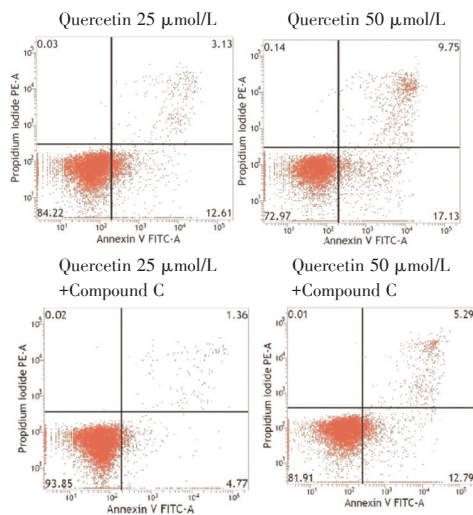


图 6 AMPK 磷酸化受抑后槲皮素对 HL-60 细胞凋亡的影响

Fig.6 The apoptosis level induced by quercetin after AMPK phosphorylation inhibited

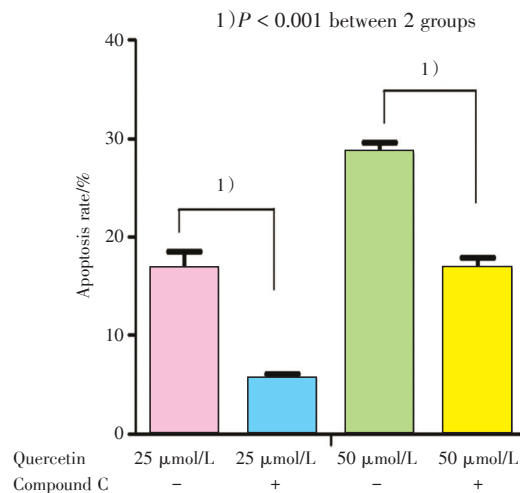
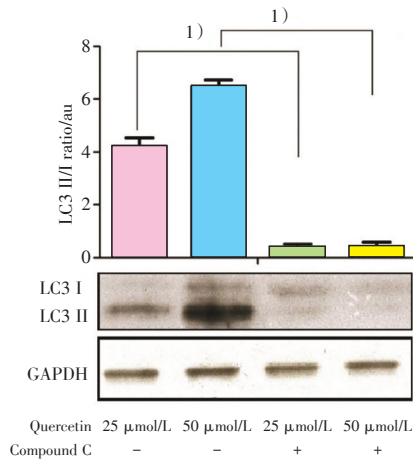


图 6 AMPK 磷酸化受抑后槲皮素对 HL-60 细胞凋亡的影响

Fig.6 The apoptosis level induced by quercetin after AMPK phosphorylation inhibited



1) $P < 0.001$ between 2 groups

图7 AMPK磷酸化受抑后槲皮素对HL-60细胞自噬的影响

Fig.7 The autophagy level induced by quercetin after AMPK phosphorylation inhibited

干扰肿瘤细胞中信号转导通路的关键靶点使细胞死亡,对多种肿瘤细胞有生长抑制作用^[3-5]。槲皮素可调节多种蛋白激酶如酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶等,从而诱导细胞凋亡^[6-7]。在美国,其作为非处方药物(Difaprost®)用于前列腺癌的治疗;含有槲皮素的圆叶葡萄皮提取物治疗生化复发前列腺癌的药物临床试验正在进行中^[8]。槲皮素是一种有应用前景的抗肿瘤药物。然而其在急性髓系白血病中的研究非常有限,有文献报道槲皮素能够阻滞急性髓系白血病细胞于G0/G1期,诱导凋亡及保护性自噬的发生^[9],我们前期研究发现槲皮素对急性髓系白血病HL-60细胞株有抑制增殖的活性^[3],但其具体的机制有待进一步阐明。

本研究发现,槲皮素能够诱导白血病HL-60细胞株发生凋亡,其对凋亡的影响呈时间及浓度依赖性。同时,通过电镜、Western Blot等检测方法我们还发现,槲皮素能诱导HL-60细胞株发生自噬。我们认为,槲皮素通过诱导HL-60细胞同时发生凋亡和自噬,从而发挥其抗白血病作用。但是其诱导凋亡及自噬的具体信号通路及信号分子有待进一步明确。

自噬与凋亡属于两种不同的细胞程序性死亡。自噬、凋亡与肿瘤的发生、发展以及治疗有着非常密切的关系^[10]。细胞凋亡是受基因调控的精确过程,当细胞接受体内外信号刺激后,半胱氨酸

蛋白酶Caspase被激活,导致细胞凋亡的发生。研究证实,槲皮素可以直接诱导白血病细胞发生线粒体应激产生凋亡效应实现其抗白血病作用^[11]。最新的研究表明:自噬作为II型细胞程序性死亡,是肿瘤细胞的死亡方式之一^[12-13]。在真核细胞中,自噬通过溶酶体途径降解损伤的细胞器及长寿蛋白等物质,对维持内环境稳定起到十分重要的作用。在急性髓系白血病的研究中发现,硼替佐米可以诱导急性髓系白血病发生自噬,通过自噬途径加速FLT-3/ITD的降解,继而发挥其抗白血病作用^[14]。针对自噬途径寻找新的治疗靶点是目前肿瘤研究的热点。有研究表明:凋亡和自噬作为两种不同的细胞程序性死亡,可能存在共同的信号分子通路。

凋亡及自噬都受细胞内能量代谢的调控,腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是细胞的能量感受器,调节细胞能量代谢。AMPK由 $\alpha\beta\gamma$ 三个亚单位组成, α -亚基N-末端包含一个保守的Ser/Thr激酶区,苏氨酸(Thr-172)位点的磷酸化是其激酶活性所必需的。细胞缺氧的状态可能导致AMPK的活化^[15]。肿瘤常伴随能量代谢紊乱和AMPK激活抑制。因此,AMPK被视为治疗肿瘤的潜在作用靶点^[16]。体内外研究发现,激活急性髓系白血病AMPK并抑制mTOR的活性,可使得翻译起始因子4E-BP1发生去磷酸从而产生抑制肿瘤的作用,但对正常的髓系造血干细胞功能无影响^[17]。研究发现白藜芦醇能够通过AMPK信号通路调节细胞内能量代谢,抑制糖酵解,增加葡萄糖有氧化,增强肿瘤细胞的氧化能力发挥抗肿瘤的作用^[18]。本研究发现,槲皮素能够活化HL-60细胞中AMPK,导致细胞内p-AMPK的表达增加。这一过程能够被AMPK特异性的小分子抑制剂Compound C所阻断。但采用Compound C阻断AMPK的活化后,槲皮素对HL-60细胞凋亡及自噬的诱导作用均减弱。槲皮素可能通过激活AMPK实现对HL-60细胞凋亡及自噬的调控。

综上所述:槲皮素作为一种植物来源的低毒性药物,具有抗肿瘤的作用。槲皮素可能通过激活细胞内AMPK,影响细胞内能量代谢的变化,导致细胞凋亡和自噬的发生从而发挥抗白血病作用。但其具体的分子通路还有待进一步的阐明。

参考文献

- [1] Messer JG, Hopkins RG, Kipp DE. Quercetin metabolites up-regulate the antioxidant response in osteoblasts isolated from fetal rat calvaria [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(9): 1857-1866.
- [2] Granato M, Rizzello C, Gilardini Montani MS, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41(9): 124-136.
- [3] 肖洁, 牛国敏, 尹松梅, 等. 槲皮素抑制 HL-60 细胞增殖与诱导凋亡机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(21): 1685-1690.
Xiao J, Niu GM, Yin SM, et al. Mechanism of quercetin in inducing apoptosis and inhibiting proliferation on HL-60 cells [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2014, 21(21): 1685-1690.
- [4] Khan F, Niaz K, Maqbool F, et al. Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: An update [J]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 529-545.
- [5] Lei CS, Hou YC, Pai MH, et al. Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: In vitro and in vivo studies [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 51(9): 105-113.
- [6] Tomas-Hernández S, Blanco J, Rojas C, et al. Resveratrol potently counteracts quercetin starvation-induced autophagy and sensitizes hepG2 cancer cells to apoptosis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(5): 1700610.
- [7] Kim JH, Kim MJ. Quercetin sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through JNK-mediated cFLIP turnover [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 78(9): 327-334.
- [8] Paller CJ, Rudek MA, Zhou XC, et al. A phase I study of muscadine grape skin extract in men with biochemically recurrent prostate cancer: Safety, tolerability, and dose determination [J]. *Prostate*, 2015, 75(14): 1518-1525.
- [9] Chang JL, Chow JM, Chang JH, et al. Quercetin simultaneously induces G0/G1-phase arrest and caspase-mediated crosstalk between apoptosis and autophagy in human leukemia HL-60 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(7): 1857-1868.
- [10] Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: Facts and apparent artefacts [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 87-95.
- [11] Cheng S, Gao N, Zhang Z, et al. Quercetin induces tumor-selective apoptosis through downregulation of Mcl-1 and activation of Bax [J]. *Clin Cancer Res*. 2010, 16(23): 5679-5691.
- [12] Slator C, Molphy Z, McKee V, et al. Triggering autophagic cell death with a di-manganese(II) developmental therapeutic [J]. *Redox Biol*, 2017, 12(2): 150-161.
- [13] Bikas AD, Jensen K, Patel A, et al. Glucose-deprivation increases thyroid cancer cell sensitivity to metformin [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(6): 919-932.
- [14] Larrue C, Saland E, Boutzen H, et al. Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells [J]. *Blood*, 2016, 127(7): 882-892.
- [15] 李娜, 贺涓涓, 汪倩, 等. Compound C 抑制腺苷酸活化蛋白激酶的磷酸化后对缺氧预处理的影响及其机制 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(2): 168-174.
Li N, He JJ, Wang Q, et al. Effect and mechanism of phosphorylated AMPK on hypoxia preconditioning with its special inhibitor-compound C [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(2): 168-174.
- [16] Bungard D, Fuerch BJ, Zeng PY. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation [J]. *Science*, 2010, 329(5996): 1201-1205.
- [17] Green AS, Chapuis N, Maciel TT, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4262-4273.
- [18] Saunier E, Antonio S, Regazzetti A, et al. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6945-6956.

(编辑 孙慧兰)