

槲皮素在急性白血病中的作用及其机制的研究进展

韦 敏 谢春红 刘 琴 李天寿 黄锦雄

柳州市人民医院血液内科 广西柳州 545006

【中图分类号】R733.7

【文献标识码】A

【文章编号】1002-3763 (2024) 06-170-02

急性髓细胞白血病 (AML) 是成年人中最常见的一种急性白血病, 约占成年患者的 70%。随着化疗不断发展, AML 患者诱导化疗的完全缓解 (complete remission, CR) 率及无病长期生存 (disease free survival, DFS) 率均得到一定的提高, 但 5 年总生存率仍仅为 40%-50%。因此, 寻找新的化疗药物成为改善 AML 患者生存率的重要手段之一。槲皮素 (1, 3, 4, 5, 7- 五羟基黄酮, Quercetin) 是类黄酮化合物, 是一种在自然界中普遍存在的黄酮类成分, 具有抗黑色素瘤、抗肿瘤、肺癌等多种肿瘤的作用。可通过诱导肿瘤细胞凋亡、引起肿瘤细胞周期阻滞及逆转肿瘤细胞多药耐药等机制发挥抗肿瘤作用。槲皮素在慢性髓性白血病中具有有良好的诱导细胞凋亡效果^[1-2], 但目前针对槲皮素单药在急性髓系白血病中的作用, 尚缺乏较大、深入的研究。以下就国内外关于槲皮素在急性白血病中的作用及其机制的研究现状进行综述。

一、槲皮素与白血病细胞凋亡

细胞凋亡 (apoptosis) 是一种受基因调控的程序性死亡 (PCD), 按其激活方式可分为内源性和外源性两种。外源性细胞凋亡主要通过细胞膜上的死亡受体 (TNFR1)、Fas/CD95、DR3 及 TRAILR1、TRAILR2 等, 其胞质区含有 80 个氨基酸的死亡区域 (DD)。在此过程中, 死亡配体与受体结合后, 通过胞浆区 DD 招募对应的接头蛋白, 进而与 Caspase-8 及 Fas 组成死亡诱导信号复合体 (DISC)。DISC 与 caspase-8 相互作用, 激活 caspase-8 形成 caspase-8, 后者进一步剪切 caspase-3, 促进细胞凋亡。我们前期研究发现, 在多种凋亡因子的刺激下, 线粒体外膜通透性增加, 多种凋亡相关蛋白从线粒体外释放, 并与胞浆中 Apaf-1 结合, 形成凋亡小体, 招募 caspase-9。在此过程中, caspase-9 激活 caspase-3, 激活 PARP, 终止 DNA 损伤修复, 激活核小体之间的链接, 导致 DNA 断裂为 180-200 bp, 同时, 细胞骨架蛋白, ECM 蛋白, 核蛋白等受到损伤, 细胞发生凋亡^[3-4]。

目前有研究表明槲皮素在急性白血病细胞株中具有诱导凋亡的作用。Wei-Jiunn Lee 等研究发现^[5], 槲皮素 (100 μ M) 单药处理 HL-60 细胞, 通过 DAPI 染色可发现凋亡小体出现, Western Blot 实验证明槲皮素处理组出现 PARP、Caspase3、Caspase8 及 Caspase9 等凋亡相关蛋白剪切条带, 槲皮素处理 12 小时后, 通过细胞周期检测可发现处理组 sub-G1 期细胞显著增加, PI-AnnexinV 双染色可发现槲皮素处理组的凋亡细胞比例上升, 且其作用可被 z-DEVD-fmk、z-IETD-fmk 及 z-VAD-fmk 等凋亡抑制剂削弱, 以上结果充分证明槲皮素可诱导 HL-60 细胞凋亡。进一步检测发现, 槲皮素 (100 μ M) 可引起引起线粒体膜电位改变及细胞内 ROS 水平上升, 从而启动细胞凋亡程序, 其机制可能是通过激活 ERK 通路所致。此外, 他们在小鼠成瘤试验中发现, 槲皮素可以通过激活 ERK 通路, 增加细胞的凋亡, 从而降低 HL-60 细胞在小鼠中的成瘤能力, 以上结果通过瘤体大小对比及免疫荧光染色得到证实。但此研究所使用的细胞系仅有 HL-60 一株, 说服力仍有不足, 且仅

检测 ERK 单种蛋白的磷酸化水平, 并未获得完整的通路蛋白表达改变, 机制研究仍不够深入。Yun-Ru Chen 等研究证实^[6], 槲皮素可激活 HL-60 细胞中的 c-jun/AP-1 通路, 上调 Fas-L 的表达, 引起 caspase-8 和 PRAP 的剪切, 激活外源性凋亡通路, 诱导细胞凋亡。在此过程中, 槲皮素同时可促进组蛋白去乙酰化, 此作用与 FasL 表达的上调相关。肖洁等人研究发现, 槲皮素对人白血病 HL-60 株有明显的促凋亡作用, 且这种作用具有时间和浓度依赖性。我们前期研究发现, 槲皮素可激活 HL-60 细胞 AMPK, 上调其磷酸化水平, 而 AMPK 特异性抑制剂 Compound C 可阻断该过程, 且槲皮素诱导 HL-60 细胞凋亡能力下降, 提示槲皮素可能是通过 AMPK 通路调节 HL-60 凋亡。

二、槲皮素与白血病细胞周期阻滞

G1/S、G2/M 是细胞周期的重要限制点, G1/S 期间细胞 DNA 复制活跃, 在 G2/M 期, RNA 的合成和染色质的形成是高度活跃的, 此时的细胞对于外源刺激更加敏感, 极易出现复制错误、修饰、损伤或断裂等。DNA 损伤是机体内、外环境等多种原因引起的, 它会使细胞无法通过细胞周期检测, 进而引起细胞周期停滞, 进而启动 DNA 修复。在多种应激因子的作用下, DNA 损伤严重且不能修复时, p53、Bcl-2 等多个凋亡相关蛋白被激活, 从而启动了凋亡过程。一项关于槲皮素对急性髓系白血病细胞株 U937 作用的研究中^[8], 研究者首先将 U937 细胞中热休克蛋白 27 (Heat shock protein 27, HSP27) 进行敲除以获得 shHSP27 细胞株, 因 HSP27 的高表达常与肿瘤细胞耐药相关。其次对比了未加入槲皮素处理及槲皮素 2 μ M 分别处理空载细胞及 shHSP27 细胞, CCK-8 结果提示 shHSP27 细胞、槲皮素处理的空载细胞及槲皮素处理的 shHSP27 细胞, 与对照组相比均表现出了生长抑制, 而槲皮素处理的 shHSP27 细胞最为显著。PI-AnnexinV 双染色结果类似, 槲皮素处理的 shHSP27 细胞凋亡最为明显。检测细胞内的信号通路蛋白, 发现槲皮素处理的 shHSP27 细胞中 Notch-1 蛋白的表达水平及其下游蛋白 AKT、mTOR 的磷酸化水平均有明显下调, 而其余组别未见明显的统计学差异。通过对细胞周期分布及 Cyclin 家族的检测发现, 槲皮素 + shHSP27 细胞的 G1/S 期细胞显著增加, 而 Cyclin B1 及 Cyclin D1 表达水平的下调, 也佐证了这一结果。

三、槲皮素与白血病细胞耐药

多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是恶性肿瘤耐药的重要原因之一, 其发生由多种因素参与。目前认为, 其机制之一是 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp-ABCB1)、乳腺癌相关蛋白 (breast cancer related protein, BCRP-ABCG2) 和多药耐药相关蛋白 (multiresistance protein, MRP-ABCC1) 等药物外流蛋白表达上调, 将化疗药物泵出胞外, 使之在胞内的有效浓度下降, 不能达到治疗效果^[9]。目前, 逆转肿瘤细胞的耐药已成为研究的热点, 其中, 将化疗药物与增敏剂或药物外流蛋白抑制剂联用, 是较为主流的策略之一。槲皮素被发现发现于肝癌、卵巢癌、黑色素瘤等多种肿瘤中, 能够提高

其对化疗药物的敏感性,增加其在肿瘤内的靶向性和吸收率,减少其对乳腺癌的耐药性^[10-12]。目前尚未有研究针对槲皮素在急性髓系白血病耐药细胞株中的作用进行深入的探索。Chen 等^[13]将槲皮素与阿霉素联合处理人慢性髓性白血病细胞株 K562 及阿霉素耐药的细胞株 K562/ADR,槲皮素与阿霉素联用可有效抑制上述两株细胞增殖并通过降低线粒体膜电位而诱导其凋亡,此结果被瑞氏染色观察细胞形态及 PI-Rh123 双染色所证实,槲皮素与阿霉素联用组中, Bcl-2 及 Bcl-x1 表达水平的下降同样支持上述结论。进一步研究表明,槲皮素可降低 ERK 的磷酸化水平,并降低 P-gp 的表达。以上结果表明,槲皮素可能通过降低 P-gp 的表达及抑制 MAPK/ERK/JNK 信号通路,从而降低线粒体膜电位,启动细胞凋亡程序,逆转 K562/ADR 对阿霉素的耐药。

目前,近年来,天然小分子药物在抗肿瘤治疗中的应用日益受到关注。槲皮素是一种富含黄酮类物质的黄酮类物质,是人体膳食中一种重要的黄酮类物质,具有良好的抗炎、抗氧化和免疫调节功能。槲皮素对许多恶性肿瘤如黑色素瘤,肺癌,乳腺癌,胰腺癌,前列腺癌,白血病等都有很好的疗效。其机理主要有:逆转肿瘤细胞耐药性,诱导肿瘤细胞分化,抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,阻滞肿瘤细胞周期等^[8, 14-15],并涉及 NF- κ B、Ras/MAPK/JNK、PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT5 等多个信号通路^[16-20]。然而,对于其在急性白血病中的作用机制,目前没有深入的研究,仍有待进一步探索。同时,槲皮素的抗肿瘤作用具有选择性,其对正常外周血的毒副作用较低。这种特性为槲皮素投入临床应用提供了更多的可能和更广阔的发展前景。本研究将对槲皮素在急性髓系白血病中的作用及其靶点进行深入探索,并初步探讨槲皮素临床应用的可能。

参考文献

[1]Hassanzadeh A, Hosseinzadeh E, Rezapour S, Vahedi G, Haghnavaz N, Marofi F. Quercetin Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis and Attenuates the Proliferation of Human Chronic Myeloid Leukemia Cell Line-K562 Through Interaction with HSPs (70 and 90), MAT2A and FOXM1. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(12):1523-1534.

[2]卢虹颖,陈娟,杜圣红,等.槲皮素对慢性髓系白血病伊马替尼耐药细胞株的作用及机制研究[J].*中国实验血液学杂志*, 2017, 25(2):346-352.

[3]Holoch Peter A and Griffith Thomas S. Tnf-related apoptosis-inducing ligand (trail): A new path to anti-cancer therapies. *European journal of pharmacology*, 2009; 625(1): 63-72.

[4]Secchiero Paola and Zauli Giorgio. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the regulation of hematopoiesis. *Current opinion in hematology*, 2008; 15(1):42-48.

[5]Lee W. J., Hsiao M., Chang J. L., et al. Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated erk activation in hl-60 leukemia cells and xenograft. *Arch Toxicol*, 2015; 89(7):1103-1117.

[6]Chen Y. R., Lee W. J. and Tseng T. H. Quercetin induces fasl-related apoptosis, in part, through promotion of histone h3 acetylation in human leukemia hl-60 cells. *Oncol Rep*, 2011; 25(2):

583-591.

[7]肖洁,尹松梅,谢双锋,等.槲皮素调控 AMPK 活性诱导 HL-60 细胞自噬与凋亡[J].*中山大学学报(医学版)*, 2018, 4(39):501-509.

[8]Chen X., Dong X. S., Gao H. Y., et al. Suppression of hsp27 increases the antitumor effects of quercetin in human leukemia u937 cells. *Mol Med Rep*, 2016; 13(1):689-96.

[9]Fang Shencun, Zhu Wei, Zhang Yingming, et al. Paeoniflorin modulates multidrug resistance of a human gastric cancer cell line via the inhibition of nf-kb activation. *Molecular medicine reports*, 2012; 5(2):351-356.

[10]Hsieh M. J., Chen M. K., Chen C. J., et al. Glabridin induces apoptosis and autophagy through jnk1/2 pathway in human hepatoma cells. *Phytomedicine*, 2016; 23(4):359-366.

[11]Liu Smith Feng and Meyskens Frank L. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. *Molecular nutrition & food research*, 2016;6(60): 1264-1274.

[12]Nam J. S., Sharma A. R., Nguyen L. T., et al. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: From nutrition to nanomedicine. *Molecules*, 2016; 21(1): E108.

[13]Chen F. Y., Cao L. F., Wan H. X., et al. Quercetin enhances adriamycin cytotoxicity through induction of apoptosis and regulation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase/c-jun n-terminal kinase signaling in multidrug-resistant leukemia k562 cells. *Mol Med Rep*, 2015; 11(1):341-8.

[14]Aune Dagfinn, Lau Rosa, Chan Doris Sm, et al. Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology*, 2011; 141(1):106-118.

[15]Knekt Paul, Kumpulainen Jorma, Järvinen Ritva, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 2002; 76(3):560-568.

[16]Reddy E Premkumar and Aggarwal Anel K. The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes & cancer*, 2012; 3(5-6):447-454.

[17]Dinitto Jonathan P and Wu Joe C. Molecular mechanisms of drug resistance in tyrosine kinases cabl and ckit. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2011; 46(4):295-309.

[18]Bu He-Qi, Liu Dian-Lei, Wei Wei-Tian, et al. Oridonin induces apoptosis in sw1990 pancreatic cancer cells via p53-and caspase-dependent induction of p38 mapk. *Oncology reports*, 2014; 31(2):975-982.

[19]Zhang Y, Fu R, Liu Y, et al. Dephosphorylation and mitochondrial translocation of cofilin sensitizes human leukemia cells to cerulenin-induced apoptosis via the rock1/akt/jnk signaling pathway. *Oncotarget*, 2016; 7(15):20655-68.

[20]Hochhaus Andreas, Kreil S, Corbin As, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (sti571) therapy. *Leukemia*, 2002; 16(11):2190-2196.