

УДК 577.164.3:612.014.469:57.085.23:616-006.446.8

Т.В. РОМАНОВСКАЯ, С.Г. НАУМЕНКО, В.В. ГРИНЕВ

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОН-3-ОЛА КВЕРЦЕТИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ K562 ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

The influence of flavone-3-ol quercetin on the proliferation, differentiation and survival of the K562 erythroblastic crisis of chronic myeloid leukemia cell line was studied. It was shown that quercetin is able to modulate the proliferative activity and survival of the K562 chronic myeloid leukemia cell line as well as to induce the cell differentiation. The character of quercetin action on the leukemia cells depends on the quercetin concentration.

Флавоноиды представляют собой обширную группу полифенольных соединений, продуцируемых растениями. Одним из наиболее известных и часто используемых в фармаколо-

гии флавоноидов является кверцетин, относящийся к классу флавоно-3-олов [1]. Как фармакологический препарат кверцетин применяется главным образом в качестве антиоксидантного соединения с протекторными свойствами (витамин Р) [2]. Исследования последних лет позволили обнаружить ряд дополнительных биологических активностей кверцетина. В частности, было показано, что он является эффективным модулятором экспрессии и/или активности тирозин киназ [3], белков теплового шока [4], топоизомераз [5], ряда специфических онкогенных белков, таких как теломераза [6], мутантный белок p53 [7], и других белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, дифференцировки и апоптоза.

Отмеченные данные позволяют предположить, что кверцетин может обладать противораковыми свойствами. Действительно, исследования *in vitro*, проведенные на клеточных линиях, и *in vivo* – на лабораторных животных, подтвердили способность кверцетина достаточно эффективно и специфично подавлять рост онкологизированных клеток различной этиологии: рака кишечника, кожи, яичников, молочной железы, желудка, легких и некоторых типов лейкозных клеток [1, 2]. Однако механизм(-ы) реализации противоопухолевого и противолейкозного действия кверцетина, в частности в отношении хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), остаются пока недостаточно изученными. В пользу исследования кверцетина как потенциального противоракового препарата говорят и факты высокой избирательности его действия на трансформированные клетки [8] и исключительно низкой токсичности для организма, что было подтверждено как в экспериментах на животных [1, 2], так и в клинических испытаниях I фазы, проводившихся в 1990-е гг. [3].

Цель данной работы – определение характера влияния кверцетина на клетки линии K562 эритробластного криза хронического миелоидного лейкоза человека, в частности способности кверцетина ингибировать пролиферацию, индуцировать дифференцировку и/или апоптоз этих клеток.

Материал и методика

Клеточная линия. Объектом исследования служили клетки линии K562 эритробластного криза ХМЛ. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ/л L-глутамин, 1,5 г/л бикарбоната натрия, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при +37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂.

Исследуемое соединение. Кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) производства компании Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., США) растворяли в ДМСО и хранили при –25 °С. Конечная концентрация ДМСО при разбавлении сток-раствора в тестах не превышала 0,1 %.

МТТ-тест проводили по методике, описанной в [9].

Тест на исключение трипанового синего. К суспензии клеток добавляли равный объем 0,2 % трипанового синего, ресуспендировали и стандартным способом подсчитывали количество живых (не окрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток в гемоцитометре.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки без предварительной фиксации окрашивали акридиновым оранжевым (15 мкг/мл) и этидиум бромидом (5 мкг/мл) и анализировали под флуоресцентным микроскопом (увеличение 40X). Критериями апоптоза служила конденсация хроматина и повышенная проницаемость мембран для этидиум бромида, окрашивающего клетки в красный цвет. Учитывалось не менее 300 клеток на пробу.

Гель-электрофорез. ДНК выделяли методом экстрагирования в 0,2 мМ/л фосфатном буфере [10]. Экстрагированную низкомолекулярную ДНК разделяли с помощью стандартного нативного электрофореза в 2 % агарозном геле при напряжении электрического поля 4 В/см, а по сохранившимся клеткам оценивали клеточный цикл.

Клеточный цикл. Для его анализа использовали методику из работы [10]. Аналитическую цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, США). Данные собирали и анализировали с помощью программы FCS Express (De Novo Software, Oxford, Великобритания).

Иммунофенотипирование проводилось по стандартной методике на проточном цитофлуориметре. Были использованы специфические антитела к поверхностным маркерам дифференцировки клеток CD11b, CD33, CD117, HLA-DR и гликофору А.

Анализ продукции гемоглобина в клетках. Долю гемоглобин-продуцирующих клеток определяли по методике [11] путем окрашивания их раствором, содержащим бензидин и перекись водорода. Подсчитывалось не менее 300 клеток на пробу. Спектрофотометрическое определение внутриклеточного содержания гемоглобина производили по методу, описанному в [12].

Математическая обработка данных. IC_{50} рассчитывали методом нелинейной регрессии [13], используя результаты МТТ-теста, с помощью программы OriginPro 7.0.

Статистический анализ данных. Каждый эксперимент ставили не менее чем в трех независимых повторах. Для оценки достоверности различий между двумя группами данных использовали *t*-тест Стьюдента. Достоверным считали различие при уровне значимости $P \leq 0,05$. Для проведения описательной статистики и оценки достоверности различий между двумя группами данных использовалась программа OriginPro 7.0.

Результаты и их обсуждение

Влияние кверцетина на пролиферацию и апоптоз клеток линии K562. МТТ-тест, использованный нами для оценки общего цитотоксического и/или цитостатического действия кверцетина на клетки линии K562, выявил выраженное время- и дозозависимое снижение относительной выживаемости лейкозных клеток под влиянием кверцетина. Для определения времязависимой цитотоксичности кверцетина клетки инкубировались с препаратом на протяжении 24, 48, 72 и 96 ч. Поскольку эффект кверцетина был наиболее выражен при его 96-часовом инкубировании с клетками-мишенями, то соответствующий временной интервал использовался нами во всех последующих экспериментах. Диапазон исследованных в МТТ-тесте концентраций кверцетина охватывал от 5 до 160 мкМ/л, при этом относительная выживаемость клеток дозозависимо снижалась со 107 до 3,9 % по отношению к контролю соответственно, а IC_{50} для кверцетина и клеток линии K562 составила $64,1 \pm 5,1$ мкМ/л.

В последующих экспериментах мы определяли и сравнивали с контролем эффекты трех фиксированных концентраций кверцетина: 5, 20 и 80 мкМ/л. Результаты теста на исключение трипанового синего показали, что количество жизнеспособных лейкозных клеток снижается с $744,5 \pm 49,3$ тыс./мл в контроле до $323,2 \pm 28,5$ тыс./мл при концентрации кверцетина 20 мкМ/л и до $49,2 \pm 10,6$ тыс./мл при концентрации 80 мкМ/л. Общая же жизнеспособность клеток при этом уменьшается с $95,5 \pm 0,6$ % до $74,4 \pm 4,0$ % и $32,6 \pm 6,7$ % соответственно. При концентрации кверцетина 5 мкМ/л достоверных отличий от контроля по количеству клеток ($736,2 \pm 43,5$ тыс./мл) и их жизнеспособности ($95,8 \pm 0,6$ %) нами не обнаружено.

Сходные результаты были получены с применением флуоресцентной микроскопии, проведенной с целью выявления апоптоза по специфическим изменениям состояния хроматина (конденсация) и проницаемости клеточной мембраны. Доля апоптотических клеток при дозе кверцетина 5 мкМ/л составляла $6,2 \pm 0,9$ %, при дозе 20 мкМ/л – $19,8 \pm 4,0$ % ($P \leq 0,01$), а при 80 мкМ/л – $53,7 \pm 10,0$ % ($P \leq 0,01$) по сравнению с $6,6 \pm 0,6$ % в контрольном образце. Качественный тест на фрагментацию ДНК подтвердил высокую частоту апоптоза в пробах, где клетки инкубировались с 80 мкМ/л кверцетина. Характерная лесенка межнуклеосомных фрагментов заметна, хотя и менее отчетливо, и в образце с концентрацией кверцетина 20 мкМ/л, а в контрольном образце и в образце с концентрацией кверцетина 5 мкМ/л лесенка не наблюдается.

Анализ клеточного цикла показал, что обработка лейкозных клеток кверцетином приводит к увеличению доли находящихся в гиподиплоидной фазе клеточного цикла (апоптотические клетки), а также в тетраплоидной фазе (G_2/M). Фракция же клеток в диплоидной (G_0/G_1) и синтетической (S) фазах дозозависимо снижается (табл. 1). Все это свидетельствует о том, что кверцетин, помимо индукции апоптоза лейкозных клеток, вызывает также задержку клеточного цикла в G_2/M -фазе. Как видно из табл. 1, данные по количеству апоптотических клеток (с гиподиплоидным содержанием ДНК вследствие ее фрагментации и частичной утраты) хорошо согласуются с описанными выше результатами, полученными с помощью микроскопических методов оценки апоптоза.

Влияние флавоноид-3-ола кверцетина на распределение клеток линии K562 по фазам клеточного цикла

Концентрация кверцетина, мкМ/л	Частота встречаемости клеток, %			
	Фаза			
	гипо-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	4,90 ± 0,47	53,39 ± 1,02	38,47 ± 0,92	8,14 ± 0,47
5	6,45 ± 0,12	51,65 ± 3,13	40,35 ± 2,60	8,00 ± 1,44
20	17,88 ± 2,17 ***	44,62 ± 3,32 ***	40,16 ± 2,83	15,22 ± 5,36 ***
80	30,87 ± 2,97 ***	45,35 ± 9,94	34,33 ± 1,44	20,31 ± 10,51 **

Примечание. Анализ клеточного цикла проводился с помощью проточной цитометрии по количеству ДНК в клетках. Клетки брались спустя 96 ч после начала их инкубации с кверцетином. Результаты достоверно отличаются от контроля при уровне значимости * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ и *** $P < 0,0001$.

Влияние кверцетина на дифференцировку клеток линии K562. Исследование экспрессии дифференцировочных маркеров, таких как гемоглобин и поверхностные антигены, дало следующие результаты. Содержание гемоглобина в клетках линии K562 без обработки кверцетином составило $1,51 \pm 0,24$ пкг/кл., в пробах с добавлением 5 мкМ/л кверцетина – $1,51 \pm 0,18$ пкг/кл., при инкубировании с 20 мкМ/л – $1,74 \pm 0,38$ пкг/кл., а при инкубировании с 80 мкМ/л – $0,60 \pm 0,21$ пкг/кл. Таким образом, мы констатировали лишь достоверное понижение количества продуцируемого клетками гемоглобина при инкубировании их с высокотоксичной дозой кверцетина. При анализе распределения положительных и отрицательных по гемоглобину клеток микроскопическим методом были получены несколько отличающиеся результаты. Доля клеток, спонтанно продуцирующих гемоглобин, в контрольных пробах составила $16,5 \pm 2,5$ %, а положительных по гемоглобину достоверно повышается до $28,3 \pm 3,1$ % при использовании 5 мкМ/л кверцетина. Однако при дозе кверцетина 20 мкМ/л этот эффект элиминируется (гемоглобинположительные клетки составляют $15,2 \pm 3,8$ %), а при 80 мкМ/л наблюдается значительное снижение (до $2,1 \pm 1,0$ %) доли клеток, продуцирующих гемоглобин.

Среди исследованных нами дифференцировочных антигенов (CD11b, CD33, CD117, HLA-DR и гликофорин А) достоверные различия наблюдались лишь по экспрессии CD33 маркера. Доля CD33⁺ клеток дозозависимо снижалась с $93,2 \pm 1,8$ % в контроле до $80,4 \pm 2,5$ % и $59,0 \pm 1,4$ % в пробах с концентрацией кверцетина 5 и 20 мкМ/л соответственно (табл. 2). Тенденция к снижению экспрессии наблюдалась и для маркера миелоидной дифференцировки CD11b. Не было установлено заметных изменений в экспрессии белков HLA-DR (маркер антигенпрезентирующих клеток) и CD117 (маркер стволовых клеток крови), которую в целом для изучаемой нами модели можно характеризовать как низкую.

Таблица 2

Влияние флавоноид-3-ола кверцетина на экспрессию дифференцировочных антигенов на клетках линии K562

CD	Концентрация кверцетина, мкМ/л		
	0	5	20
CD11b	39,0 ± 20,2 (197,4 ± 34,7)	13,6 ± 4,4 (135,7 ± 21,4)	9,4 ± 3,7 (171,8 ± 22,4)
CD33	93,2 ± 1,8 (137,8 ± 10,3)	80,4 ± 2,5* (176,9 ± 36,3)	59,0 ± 1,4** (184,9 ± 36,3)
CD117	8,9 ± 4,3 (212,0 ± 7,9)	4,0 ± 0,5 (211,2 ± 9,0)	3,9 ± 0,5 (220,6 ± 34,7)
HLA-DR	3,0 ± 1,0 (113,8 ± 13,4)	1,0 ± 0,8 (137,3 ± 42,9)	1,0 ± 0,5 (96,5 ± 16,1)
Гликофорин А	96,5 ± 0,7 (1988,2 ± 107,2)	96,9 ± 0,6 (2235,2 ± 70,7)	91,3 ± 1,9 (2083,2 ± 148,8)

Примечание. Иммунофенотипический анализ проводился с помощью проточной цитометрии; для иммунофенотипического анализа клетки были взяты спустя 96 ч после начала их инкубации с кверцетином. Представлены данные по частоте (в %) встречаемости антигенположительных клеток, а также по интенсивности экспрессии, выраженной в условных единицах средней интенсивности флуоресценции (СИФ, показана в скобках), изучаемых антигенов на поверхности лейкозных клеток. Результаты достоверно отличаются от контроля при уровне значимости * $P < 0,01$ и ** $P < 0,001$.

Таким образом, наше исследование подтвердило данные ряда зарубежных авторов об ингибирующем действии кверцетина на пролиферацию и выживаемость клеток линии K562 [2, 15, 16]. Высокий проапоптотический потенциал кверцетина в отношении клеток линии K562 был подтвержден нами с помощью методов, учитывающих изменения ядерного хроматина (конденсация и фрагментация хроматина, его частичная утрата) при апоптозе.

Неоднозначны приводимые разными группами исследователей данные о влиянии кверцетина на распределение клеток по фазам клеточного цикла. В одних случаях говорится об аресте клеточного цикла в фазе G_0/G_1 [2, 17], в других авторы показывают, что клеточный цикл при воздействии кверцетина останавливается в фазе G_2/M [18]. В нашем исследовании инкубирование клеток линии K562 с кверцетином в течение 96 ч приводило к дозозависимой аккумуляции клеток в G_2/M -фазе с одновременным дозозависимым снижением фракции клеток в фазе G_0/G_1 .

Наличие у кверцетина способности индуцировать дифференцировку раковых клеток также является спорным вопросом. Эта способность была обнаружена у кверцетина в отношении некоторых нелимфоидных клеточных линий [1]. В то же время в отношении клеток линии K562 такая способность обнаруживалась у структурного аналога кверцетина – генистеина, но не была показана для самого кверцетина [16].

Исходя из полученных нами данных по продукции гемоглобина, установлено увеличение частоты эритроидной дифференцировки этих клеток под влиянием нетоксической дозы кверцетина (5 мкМ/л) примерно в 1,8 раза. При этой же концентрации наблюдается и некоторое снижение экспрессии молекул CD33. Однако повышение дозы кверцетина приводит к тому, что частота экспрессии CD33 маркера продолжает дозозависимо снижаться, в то же время частота клеток Hb⁺ оказывается даже более низкой, чем в контроле. Не исключена возможность дифференцировки клеток линии K562 в ином (не эритроидном) направлении гематопозитического ряда под воздействием кверцетина.

В заключение следует отметить, что исследованные в данной работе концентрации кверцетина, оказывающие цитотоксическое или цитостатическое действие на клетки линии K562, находятся в пределах концентраций, которые, согласно проведенным ранее предварительным клиническим испытаниям, достижимы в сыворотке крови пациентов без проявления заметных побочных эффектов [3]. Все сказанное является убедительным доказательством перспективности дальнейшего изучения кверцетина как потенциального противолейкозного препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (гранты № Б04Р-158 и № Б06М-074). Авторы выражают искреннюю благодарность доктору химических наук В.А. Костюку за консультативную помощь, а также В.В. Смольниковой и М.В. Белевцеву за техническую помощь в проведении исследования.

1. Middletoon E.J., Kandaswami Ch., Theoharides C. // Pharm Rev. 2000. Vol. 52. P. 673.
2. Lamson D.W., Brignall M.S. // Altern Med Rev. 2000. Vol. 5. P. 196.
3. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J. et al. // Clin Cancer Res. 1996. Vol. 2. P. 659.
4. Rusak G., Gutzeit H.O., Ludwig-Muller J. // Food Technol Biotechnol. 2002. Vol. 40. P. 267.
5. Strick R., Strissel P.L., Borgers S. et al. // PNAS. 2000. Vol. 97. P. 4790.
6. Naasani I., Oh-hashii F., Oh-hara T. et al. // Cancer Res. 2003. Vol. 63. P. 824.
7. Avila M.A., Velasco J.A., Cansado J., Notario V. // Cancer Res. 1994. Vol. 54. P. 2424.
8. Larocca L.M., Teofili L., Leone G. et al. // Br J Haematol. 1991. Vol. 79. P. 562.
9. Niks M., Otto M. // J Immunol. 1900. Vol. 130. P. 149.
10. Gong J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. // Analyt Biochem. 1994. Vol. 218. P. 314.
11. Belhacène N., Maulon L., Guérin S. et al. // FASEB J. 1998. Vol. 12. P. 531.
12. Tsiftoglou A.S., Gusella J.F., Volloch V., Housman D.E. // Cancer Res. 1979. Vol. 39. P. 3849.
13. Khafif A., Schantz S.P., Chou T.-C. et al. // Carcinogenesis. 1998. Vol. 19. P. 419.
14. Agullo G., Gamet-Payrastra L., Manenti S. et al. // Biochem Pharmacol. 1997. Vol. 53. P. 1649.
15. Weber G., Shen F., Prajda N. et al. // Adv Enzyme Regul. 1997. Vol. 37. P. 35.
16. Deora A.B., Miranda M.B., Rao S.G. // Tumori. 1997. Vol. 83. P. 756.
17. Goldman J.M., Melo J.V. // N Eng J Med. 2003. Vol. 349. P. 1451.
18. Kang T.B., Liang N.C. // Biochem Pharmacol. 1997. Vol. 54. P. 1013.

Поступила в редакцию 24.09.07.

Татьяна Владимировна Романовская – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – В.В. Гринев.
Светлана Георгиевна Науменко – студентка 5-го курса биологического факультета.
Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики.