

黄酮和黄酮醇诱导人食管癌细胞 周期停滞的分子机制

张 强 赵新淮*

(东北农业大学, 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 黄酮和黄酮醇是两类具有抑癌活性的类黄酮化合物. 为了探索它们对人食管癌细胞的抑制作用和分子机制, 采用 MTT 法和流式细胞术, 鉴定了 3 种黄酮(木犀草素、白杨素、芹菜素)和 3 种黄酮醇(槲皮素、山奈酚、杨梅素)对 2 株人食管癌细胞(鳞癌 KYSE-510 和腺癌 OE33)的增殖抑制作用和 G2/M 周期停滞的诱导作用. 结果表明, 木犀草素和槲皮素分别对 KYSE-510 和 OE33 细胞的抑制活性相对最高. KYSE-510 细胞和 OE33 细胞分别经木犀草素和槲皮素作用后, 采用基因芯片分析细胞周期调控相关基因的表达变化. 结果表明, 木犀草素诱导 KYSE-510 细胞中 p21^{waf} 的表达, 抑制 cyclin B1 的表达, 槲皮素诱导 OE33 细胞中 GADD45 β 和 14-3-3 σ 的表达, 抑制 cyclin B1 的表达. 采用荧光定量 RT-PCR 和 Western-blot 进一步验证基因芯片的分析结果, 并比较了 6 种化合物对上述基因 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平的影响. 结果表明, p21^{waf}、GADD45 β 、14-3-3 σ 和 cyclin B1 为介导黄酮和黄酮醇诱导 KYSE-510 和 OE33 细胞 G2/M 周期停滞的目标基因.

关键词 黄酮, 黄酮醇, 分子机制, 细胞周期, 癌症

学科分类号 Q25, Q291

类黄酮化合物是一类富含于植物性食物中的苯- γ -吡喃酮衍生物, 按结构分为黄酮醇(flavonols)、黄酮(flavones)、黄烷酮(flavanones)、黄烷醇(flavanols)、异黄酮(isoflavones)以及花色苷(anthocyanins)^[1], 而黄酮和黄酮醇(结构见图 1)是含量最丰富的两类^[2,3]. 流行病学调查、动物实验及体外实验研究结果表明, 类黄酮化合物特别是黄酮

和黄酮醇对人消化道癌症(如胃癌、结肠癌和肝癌等)具有抑制作用^[4~6]. 但是, 黄酮和黄酮醇抑制人食管癌(主要包括食管鳞癌和腺癌两种类型)的分子机制研究, 至今罕见报道.

本文研究了黄酮[木犀草素(luteolin), 白杨素(chrysin), 芹菜素(apigenin)]和黄酮醇[槲皮素(querletin), 山奈酚(kaempferol), 杨梅素(myricetin)]

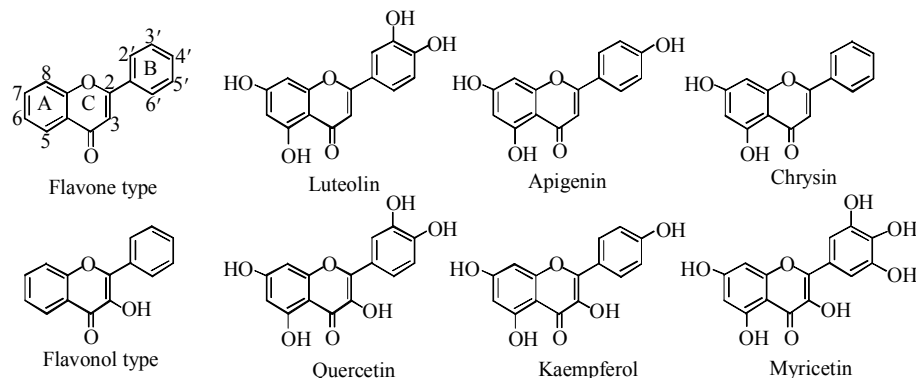


Fig. 1 Chemical structures of flavones and flavonols

* 通讯联系人.

Tel: 0451-55191813, Fax: 0451-55190340, E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

收稿日期: 2008-02-04, 接受日期: 2008-04-10

对人食管癌细胞 KYSE-510 和 OE33 的增殖抑制作用和细胞周期停滞的诱导作用. 通过基因芯片、荧光定量 RT-PCR 以及 Western-blot 等方法, 确定了黄酮和黄酮醇诱导 KYSE-510 和 OE33 细胞 G2/M 周期停滞的目标基因.

1 材料和方法

1.1 材料

白杨素(纯度 > 96%)、杨梅素(纯度 > 95%)和 MTT 购自 Sigma 公司. 槲皮素、木犀草素、芹菜素以及山奈酚(纯度 > 98%)购自南京青泽医药科技发展有限公司. 碘化丙锭(PI)、二甲基亚砜(DMSO)以及 RNase 购自北京索莱宝生物科技有限公司. TRIzol 试剂和荧光定量 PCR 反应试剂盒(SYBR® PrimeScript™ RT-PCR)分别购自 Gibco 公司和大连宝生物工程有限公司. 细胞裂解液和超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司. 鼠抗人 p21^{waf1} 和 cyclin B1 单克隆抗体分别购自 Santa Cruz 公司和 Lab Vision 公司. 兔抗人 GADD45 β 和 14-3-3 σ 多克隆抗体分别购自 Chemicon 公司和 Abcam 公司. 兔抗人 β -actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司. 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、鼠第二抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 人食管鳞癌 KYSE-510 细胞和腺癌 OE33 细胞分别购自天津市肿瘤医院和河北医科大学第四医院, 于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640(Gibco)培养液中, 37℃, 5% CO₂ 贴壁培养.

1.2.2 细胞增殖抑制测定. 将 KYSE-510 和 OE33 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 分

别加入木犀草素、白杨素、芹菜素、槲皮素、山奈酚以及杨梅素的 DMSO 溶液. 作用浓度为 10、20、40 和 80 μ mol/L, 作用时间为 24 h、48 h 和 72 h. 0.1% DMSO 和 100 μ mol/L 5- 氟脲嘧啶 (5-FU)细胞处理组分别设为阴性和阳性对照. 作用后, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液, 继续培养 4 h. 4℃, 1 800 *g* 离心 5 min 后, 弃上清液. 每孔加入 100 μ l DMSO, 酶标仪(Bio-Rad)测定 A₅₇₀ 值, 根据 24 h 的剂量 - 效应曲线计算 IC₅₀ 值.

1.2.3 细胞周期测定. 接种于 6 孔细胞培养板中的 2 种细胞, 无血清培养 36 h, 使细胞同步于 G0 期. 分别加入浓度为 80 μ mol/L 的 6 种化合物作用 24 h. 作用后, 经胰蛋白酶溶液消化, PBS 溶液洗涤 3 次, 悬浮于 75%乙醇溶液中, -20℃ 固定过夜. 细胞经 110 *g* 离心 5 min 后, 重悬于 500 μ l 含 20 mg/L RNase 的 PBS 中, 37℃ 作用 30 min. 加入 100 μ l 50 mg/L 的 PI 溶液, 避光染色 1 h 后, 上流式细胞仪(Beckman)分析.

1.2.4 细胞总 RNA 提取和基因芯片检测. 接种于 6 孔细胞培养板中的 2 种细胞, 经 6 种化合物 (80 μ mol/L)作用 24 h 后, 采用 TRIzol 试剂, 按厂家说明提取细胞总 RNA, 并保存于 -80℃. 其中, 木犀草素处理 KYSE-510 细胞的部分总 RNA 样品和槲皮素处理 OE33 细胞的部分总 RNA 样品, 被送往北京博奥生物芯片有限责任公司, 进行人细胞信号转导寡核苷酸芯片的检测.

1.2.5 荧光定量 RT-PCR. 采用荧光定量 RT-PCR, 按照 PCR 反应试剂盒的厂家说明, 进行基因芯片结果的验证, 并比较 6 种化合物对各筛选基因表达的调节活性. 各基因引物序列见表 1, β -actin 基因作为内参基因.

Table 1 Primers used for real-time PCR analysis

Genes	Primer sequences	PCR products
p21 ^{waf1}	5' AAG ACC ATG TGG ACC TGT 3'	131 bp
	5' GGT AGA AAT CTG TCA TGC TG 3'	
GADD45 β	5' GGT GTA CGA GTC GGC CAA GT 3'	103 bp
	5' GAT TTG CAG GGC GAT GTC A 3'	
14-3-3 σ	5' CCT GCG AAG AGC GAA ACC TG 3'	88 bp
	5' TCA ATA CTG GAC AGC ACC CTC C 3'	
Cyclin B1	5' CGC AAA GCG CGT TCC T 3'	157 bp
	5' AAT GAC TTT TCC AGT AGC TGA AGG TTT 3'	
β -Actin	5' AAC ACC CCA GCC ATG TAC G 3'	254 bp
	5' ATG TCA CGC ACG ATT TCC C 3'	

1.2.6 Western-blot. 2 种细胞接种于 6 孔细胞培养板, 经 6 种化合物(80 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后, PBS 洗涤 3 次. 加入冷的细胞裂解液冰上作用 30 min, 刮取细胞于微量离心管中. 4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 g 离心 15 min 后, 吸取上层澄清液. 紫外分光光度计(Amarsham)测定各样品总蛋白质浓度, 并调节浓度一致. 样品在 10%~12% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶中电泳(浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V) 4 h 后, 转印于硝酸纤维素膜上(100 mA, 20~60 min). 硝酸纤维素膜经封闭液(5%脱脂乳, 0.05% Tween 20, pH 7.6)封闭 3 h 后, TBS(20 mmol/L, pH 7.6)洗涤 3 次, 于第一抗体工作液(稀释比例 1:5 00~1:2 000)中孵育 2 h. TBS 洗涤 3 次, 辣根过氧化物酶标记的第二抗体工作液(稀释比例 1:2 000)孵育 2 h. TBS 洗涤 3 次, 超敏发光液显光, 感光 X 光片后, 显影定影. β -actin 蛋白作为内参蛋白.

2 结 果

2.1 黄酮和黄酮醇对食管癌细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法考察黄酮和黄酮醇对 KYSE-510 细胞和 OE33 细胞增殖的抑制作用, 结果如图 2a、图 2b. 3 种黄酮和 3 种黄酮醇对 2 种食管癌细胞均有确切的增殖抑制作用, 且抑制作用随化合物浓度的加大及作用时间的延长而加强, 有剂量和时间依赖关系. 但是, 6 种化合物对 2 种细胞的增殖抑制活性并不完全相同(如表 2 所示), 对 KYSE-510 细胞的抑制活性顺序为: 木犀草素 > 槲皮素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素, 对 OE33 细胞的抑制活性顺序为: 槲皮素 > 木犀草素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素. 从各化合物抑制 2 种细胞增殖的总体趋势可看出, KYSE-510 细胞对黄酮和黄酮醇的敏感性比 OE33 细胞高.

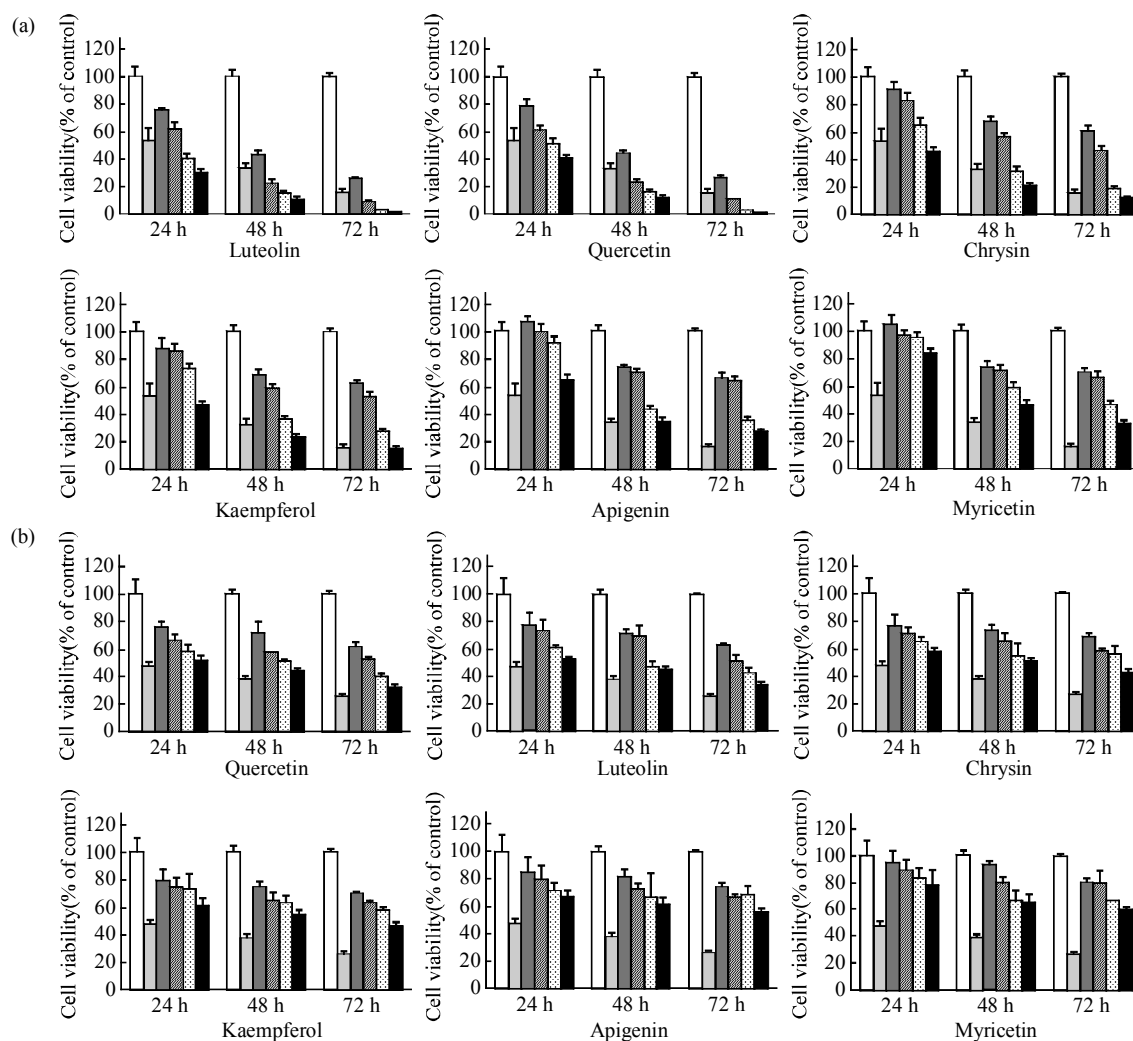


Fig. 2 Inhibitory effects of flavones and flavonols on the proliferation of KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b)

The values are represented as the percentage cell inhibition where vehicle-treated cells were regarded as 100%. The data represents ($\bar{x} \pm s$) of three experiments each conducted in triplicate. □: Negative control(0.1% DMSO), ▨: Positive control(100 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU), ▤: 10 $\mu\text{mol/L}$, ▩: 20 $\mu\text{mol/L}$, ▦: 40 $\mu\text{mol/L}$, ■: 80 $\mu\text{mol/L}$.

Table 2 Comparative effects of flavones and flavonols on inhibition of KYSE-510 and OE33 cells

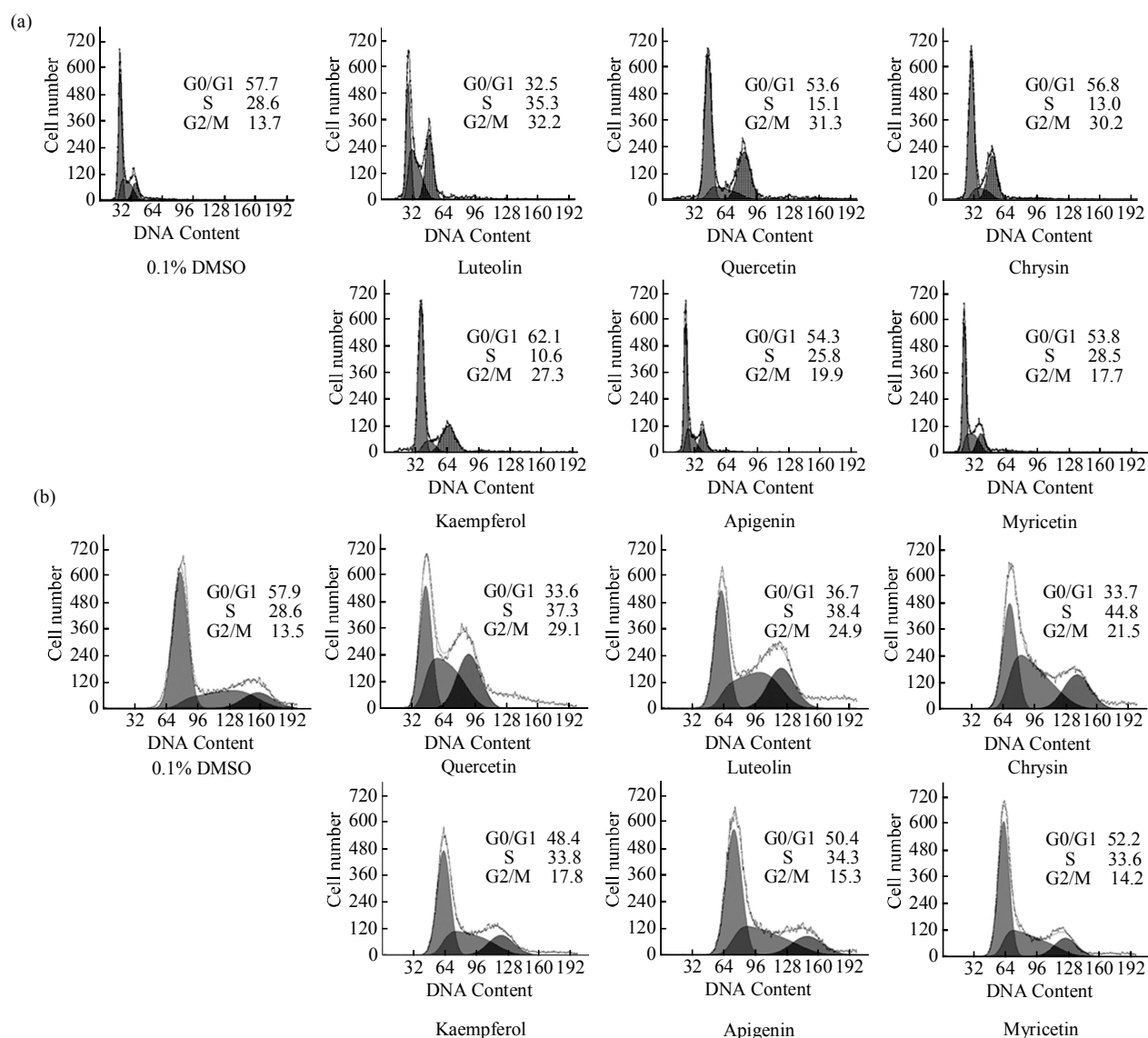
Cells	Luteolin	Quercetin	Chrysin	Kaempferol	Apigenin	Myricetin
	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$					
KYSE-510	35.3±7.2 a	48.1±0.9 ab	62.8±8.9 b	72.5±10.2 bc	111.8±6.2 cd	232.9±81.6 d
OE33	83.6±5.1 a	78.0±4.6 a	107.2±5.4 a	111.4±22.3 ab	151.1±12.1 b	205.4±53.1 c

IC_{50} s were determined from the concentration response curves for 24 h. The data represent ($\bar{x} \pm s$) of three experiments conducted in triplicate. Values with different letters differ significantly, $P < 0.05$.

2.2 黄酮和黄酮醇对食管癌细胞周期停滞的诱导作用

细胞增殖的抑制很有可能是细胞周期循环过程紊乱的结果. 因此采用流式细胞仪分析 2 种癌细胞(同步化)经黄酮和黄酮醇作用后, 其细胞周期循环的变化情况. 结果如图 3a、图 3b 所示: 全部化合物均诱导了 KYSE-510 和 OE33 细胞发生 G2/M 期

周期停滞, 诱导活性顺序分别为: 木犀草素 > 槲皮素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素和槲皮素 > 木犀草素 > 白杨素 > 山奈酚 > 芹菜素 > 杨梅素. 同时, 上述细胞周期停滞诱导活性顺序, 分别与黄酮和黄酮醇对 2 种癌细胞的增殖抑制活性顺序(见 2.1 节)相对应, 表明诱导细胞周期停滞, 很可能是黄酮和黄酮醇发挥抑制癌细胞增殖活性的主要途径.

**Fig. 3** Effects of flavones and flavonols on the cell cycle progression in KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b)

Percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phase were calculated using Multicycle software and are represented in the right side of the histograms.

2.3 基因芯片分析结果

为确定黄酮和黄酮醇诱导食管癌细胞发生 G2/M 期周期停滞的目标基因，选取抑制活性最高的木犀草素和槲皮素为代表性化合物，分别作用 KYSE-510 和 OE33 细胞 24 h，然后进行人细胞信号转导寡核苷酸芯片分析。结果如表 3 所示，KYSE-510 细胞经木犀草素作用后，在所有表达差

异大于 1.5 倍的基因中，只有 p21^{waf1}(上调表达 2.67 倍)和 cyclin B1(下调表达 1.52 倍)与 G2/M 期细胞周期停滞有关；OE33 细胞经槲皮素作用后，在所有表达差异大于 1.5 倍的基因中，只有 GADD45β (上调表达 1.86 倍)、14-3-3σ(上调表达 1.51 倍)和 cyclin B1(下调表达 1.67 倍)与 G2/M 期细胞周期停滞有关。

Table 3 The alteration levels of gene expression in KYSE-510 cells and OE33 cells by luteolin and quercetin treatment, respectively

Cells	Genes	Description	Accession No.	Fold change
KYSE-510	p21 ^{waf1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	NM_000389	+2.67
	Cyclin B1	Cyclin B1	NM_031966	-1.52
OE33	GADD45β	Growth arrest and DNA damage inducible, beta	NM_015675	+1.86
	14-3-3σ	Stratifin	NM_006142	+1.51
	Cyclin B1	Cyclin B1	NM_031966	-1.67

“+” denotes up-regulated expression; “-” denotes down-regulated expression.

2.4 荧光定量 RT-PCR 分析结果

采用荧光定量 RT-PCR 验证基因芯片分析结果，并比较 6 种化合物对筛选基因表达的调节活性，结果如表 4 所示。木犀草素调节 KYSE-510 细胞中 p21^{waf1} 和 cyclin B1 表达的荧光定量 RT-PCR 分析结果，与基因芯片分析结果基本一致。槲皮素

调节 KYSE-510 细胞中 GADD45β、14-3-3σ 和 cyclin B1 表达的荧光定量 RT-PCR 分析结果，也与基因芯片分析结果基本一致。同时，6 种化合物对上述基因表达的调节活性，与其细胞增殖抑制活性和细胞周期停滞诱导活性相对应。

Table 4 Real-time RT-PCR analysis of comparative effects of flavones and flavonols on the regulation of genes in Table 3

Cells	Genes	Luteolin	Quercetin	Chrysin	Kaempferol	Apigenin	Myricetin
		Fold change					
KYSE-510	p21 ^{waf1}	+3.12±0.42	+2.95±0.42	+2.61±0.43	+2.05±0.30	+1.52±0.69	+1.19±0.08
	Cyclin B1	-1.58±0.25	-1.51±0.38	-1.43±0.46	-1.38±0.41	-1.24±0.50	-1.11±0.19
OE33	GADD45β	+1.75±0.51	+2.07±0.29	+1.35±0.31	+1.29±0.49	+1.09±0.04	+1.07±0.32
	14-3-3σ	+1.72±0.51	+1.84±0.40	+1.62±0.10	+1.54±0.55	+1.40±0.08	+1.37±0.33
	Cyclin B1	-1.65±0.39	-1.66±0.10	-1.13±0.19	-1.11±0.08	-1.09±0.08	-1.06±0.23

“+” denotes up-regulated expression; “-” denotes down-regulated expression.

2.5 Western-blot 结果

为确定黄酮和黄酮醇对 p21^{waf1}、GADD45β、14-3-3σ 和 cyclin B1 mRNA 表达水平的影响，是否最终导致这些基因的蛋白质表达水平发生变化，采用 Western-blot 分析上述基因的蛋白质表达情况。结果如图 4a、图 4b 所示：6 种化合物不同程度地

诱导 KYSE-510 细胞中 p21^{waf1} 蛋白的表达，抑制 cyclin B1 蛋白的表达，不同程度地诱导 OE33 细胞中 GADD45β 和 14-3-3σ 蛋白的表达，抑制 cyclin B1 蛋白的表达。这进一步验证了基因芯片和荧光定量 RT-PCR 的分析结果。

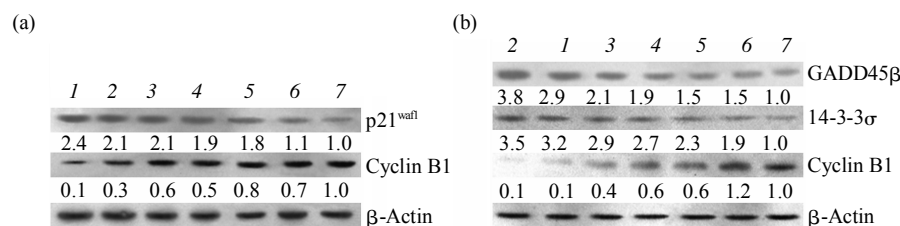


Fig. 4 Effects of flavones and flavonols on the expression of proteins related to cell cycle in KYSE-510 cells (a) and OE33 cells (b)

1: Luteolin; 2: Quercetin; 3: Chrysin; 4: Kaempferol; 5: Apigenin; 6: Myricetin; 7: 0.1% DMSO.

3 讨 论

迅速增殖是癌细胞的主要特征之一, 遏制癌细胞迅速增殖是控制癌症发展的重要途径. MTT 分析结果表明, 黄酮和黄酮醇以剂量和时间依赖方式, 抑制食管癌 KYSE-510 细胞和 OE33 细胞的增殖. 与本研究结果一致, 在有关其他类型癌细胞(如结肠癌细胞、肝癌细胞、前列腺癌细胞和肺癌细胞)的前期研究中, 也发现了黄酮和黄酮醇的细胞增殖抑制活性^[7~12]. 这表明黄酮和黄酮醇具有广谱的癌细胞增殖抑制活性. 但是, 从 6 种化合物抑制 2 种细胞增殖的总体趋势中可看出, KYSE-510 细胞的敏感性比 OE33 细胞要高, 表明黄酮和黄酮醇对癌细胞的增殖抑制活性可能具有细胞类型特异性. 从他人的相关研究中, 已发现这种特异性的存在. Kuntz 等^[13](1999 年)发现, 同一种类黄酮化合物, 对 2 种结肠癌 Caco-2 细胞和 HT-29 细胞的增殖抑制活性并不相同. Horinaka 等^[14](2005 年)研究表明, 木犀草素对宫颈癌 HeLa 细胞具有增殖抑制活性, 但对正常细胞无此活性.

细胞增殖的过程也是细胞周期循环(包括 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期)的过程. 因此, 细胞增殖的抑制很可能是细胞周期循环停滞的结果. 流式细胞仪分析结果表明, 黄酮和黄酮醇诱导了 KYSE-510 细胞和 OE33 细胞的周期循环停滞在 G2/M 期. 与本研究结果一致, 在其他类型癌细胞(如前列腺癌细胞、白血病细胞以及结肠癌细胞)的相关研究中, 亦发现黄酮和黄酮醇的 G2/M 细胞周期停滞的诱导活性^[8, 15, 16]. 但是, 也有研究表明, 黄酮和黄酮醇诱导某些癌细胞(肺癌、肝癌及前列腺癌)的周期循环停滞发生于 G0/G1 期^[17~19]. 因此, 黄酮和黄酮醇诱导不同癌细胞周期停滞的分子机制可能有所不同.

真核细胞周期循环过程受一系列周期循环蛋白(cyclin)和周期循环蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, cdk)的共同调控. 在 G1 期, cyclin D/cdk4/6 和 cyclin E/cdk2 使成视网膜细胞瘤蛋白磷酸化, 从而解除了其对 E2F 转录因子的抑制, 导致许多参与细胞周期循环的蛋白质得以表达, 进而促进细胞进入 S 期; 在 S 期, cyclin A/cdk2 可以激活 DNA 聚合酶 α , 促进细胞染色体的复制; 在 G2/M 期, cyclin B/cdk1 调控细胞的有丝分裂, 使细胞重新进入周而复始的循环过程. 不论在哪一时期, 控制 cyclin/cdk 的表达或活性, 细胞周期循环就会改变, 细胞增殖过程就会受到影响. 因此, 黄酮和黄酮醇诱导 KYSE-510 和 OE33 细胞发生 G2/M 期细胞周期停滞, 很可能是通过调控 cyclin B/cdk 的表达或活性来实现. 基因芯片、荧光定量 RT-PCR 以及 Western-blot 的分析结果显示, 黄酮和黄酮醇的确抑制 KYSE-510 和 OE33 细胞中 cyclin B1 的表达. 不仅如此, 6 种化合物还诱导了 KYSE-510 细胞中 p21^{waf1} 的表达, 它作为一种 cdk1 的抑制分子^[20], 可能促进 KYSE-510 细胞发生 G2/M 期细胞周期停滞. 在 OE33 细胞中, 黄酮和黄酮醇还诱导 GADD45 β 和 14-3-3 σ 的表达, 前者能破坏 cyclin B/cdk1 结合状态^[21], 后者则能通过 Weel 磷酸化 cdk1, 或使 Cdc25c 去磷酸化, 促进 cyclin B/cdk1 向细胞核外的转运^[22], 并控制细胞进入有丝分裂期^[23], 从而引起 OE33 细胞发生 G2/M 期细胞周期停滞. 已有报道显示, 多种天然产物可通过诱导 14-3-3 σ 的表达, 干扰癌细胞的周期循环过程, 进而抑制癌细胞的增殖速度^[24]. 但是, 有关黄酮和黄酮醇诱导 14-3-3 σ 的表达, 介导食管癌细胞周期停滞的研究, 本文尚属首次报道. 综上所述, p21^{waf1} 和 cyclin B1 可能为木犀草素、白杨素、芹菜素、槲皮素、山奈酚和杨梅素诱导 KYSE-510

细胞周期停滞的目标基因, GADD45 β 、14-3-3 σ 和 cyclin B1 可能为上述化合物诱导 OE33 细胞周期停滞的目标基因.

参 考 文 献

- Ren W, Qiao Z, Wang H, *et al.* Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 2003, **23**(4): 519~534
- Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, **79**(5): 727~747
- Martens S, Mithofer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 2005, **66**(20): 2399~2407
- Neuhouser M L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 2004, **50**(1): 1~7
- Neuhouser M L. Flavonoids and cancer prevention: What is the evidence in humans?. *Pharmaceutical Biology*, 2004, **42** (Suppl): 36~45
- Birt D F, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 2001, **90**(2-3): 157~177
- Chen Y C, Shen S C, Chow J M, *et al.* Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol*, 2004, **25**(3): 661~670
- Takagaki N, Sowa Y, Oki T, *et al.* Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *Int J Oncol*, 2005, **26**(1): 185~189
- Lim do Y, Jeong Y, Tyner A L, *et al.* Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, **292**(1): G66~G75
- Chiang L C, Ng L T, Lin I C, *et al.* Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human HepG2 cells. *Cancer Lett*, 2006, **237**(2): 207~214
- Vijayababu M R, Kanagaraj P, Arunkumar A, *et al.* Quercetin induces p53-independent apoptosis in human prostate cancer cells by modulating Bcl-2-related proteins: a possible mediation by IGFBP-3. *Oncol Res*, 2006, **16**(2): 67~74
- Leung H W, Lin C J, Hour M J, *et al.* Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol*, 2007, **45** (10): 2005~2013
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr*, 1999, **38**(3): 133~142
- Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, *et al.* Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene*, 2005, **24**(48): 7180~7189
- Haddad A Q, Venkateswaran V, Viswanathan L, *et al.* Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006, **9**(1): 68~76
- Kuo H M, Chang L S, Lin Y L, *et al.* Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer Res*, 2007, **27**(1A): 395~405
- Hsu Y L, Kuo P L, Liu C F, *et al.* Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Cancer Lett*, 2004, **212**(1): 53~60
- Mu C, Jia P, Yan Z, *et al.* Quercetin induces cell cycle G1 arrest through elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human hepatoma cell line (HepG2). *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, **29**(3): 179~183
- Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle*, 2007, **6**(9): 1102~1114
- Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*, 2000, **247**(1-2): 1~15
- Schwartz G K, Shah M A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(36): 9408~9421
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, *et al.* Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 2003, **116**(20): 4077~4085
- Chan T A, Hermeking H, Lengauer C, *et al.* 14-3-3 Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 1999, **401**(6753): 616~620
- Luk S C, Siu S W, Lai C K, *et al.* Cell cycle arrest by a natural product via G2/M checkpoint. *Int J Med Sci*, 2005, **2**(2): 64~69

Molecular Mechanism of Flavones and Flavonols on The Induction of Cell Cycle Arrest in Human Esophageal Carcinoma Cells

ZHANG Qiang, ZHAO Xin-Huai*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Flavones and flavonols belong to flavonoids that have anti-cancer activities. In order to explore molecular mechanism and inhibitory effects of flavones and flavonols on human esophageal carcinoma cells, the inhibition of proliferation and the induction of G2/M cell cycle arrest in KYSE-510 cells and OE33 cells treated with three flavones (luteolin, apigenin, chrysin) and three flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin) were analyzed by MTT array and flow cytometry. Among these compounds, luteolin and quercetin were the most active flavonoid to inhibit the proliferation of KYSE-510 cells and OE33 cells, respectively. The genes related to cell cycle control were analyzed by gene chip, after KYSE-510 cells and OE33 cells were treated by luteolin and quercetin, respectively. The results were shown that the expression of p21^{waf1} was induced and the expression of cyclin B1 was suppressed in KYSE-510 cells, and that the expression of GADD45 β and 14-3-3 σ were induced and the expression of cyclin B1 was suppressed in OE33 cells. These results were verified by real-time RT-PCR and Western-blot. The comparative effects of all six compounds on the regulation of these gene expressions at the mRNA and protein levels were also analyzed by real-time RT-PCR and Western-blot. The results were shown that p21^{waf1}, GADD45 β , 14-3-3 σ and cyclin B1 were the target genes which mediated the effects of flavones and flavonols on induction of cell cycle arrest in KYSE-510 cells and OE33 cells.

Key words flavone, flavonols, molecular mechanism, cell cycle, cancer

*Corresponding author.

Tel: 86-451-55191813, Fax: 86-451-55190340, E-mail: zhaoxh@mail.neau.edu.cn

Received: February 4, 2008 Accepted: April 10, 2008