

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.19.008

槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞的凋亡作用及机制研究*

甘霖 熊志峰 杨化超 王鸿林 王婷 吕钢[△]

(重庆市中医院 / 重庆市中医研究院乳腺甲状腺科 重庆 400021)

摘要 目的: 探讨槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞的凋亡作用,并探讨其作用机制。**方法:** 采用活细胞计数法(CCK-8)测定槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖的作用,分别采用细胞划痕实验和 Transwell 实验测定槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞迁移和侵袭的影响,采用流式细胞术测定槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞凋亡的作用,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫印迹法(West-blotting)测定槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞 Fas、FasL、Bcl-2 和 Bax mRNA 和蛋白表达的影响。**结果:** 槲皮素 (50~200 $\mu\text{mol/L}$) 作用乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞 24 h、48 h 和 72 h 对其增殖具有显著的抑制作用,并且呈浓度依赖性 ($P<0.05$); 细胞划痕实验中槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞划痕宽度较对照组显著增加 ($P<0.05$); Transwell 试验中槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 穿膜细胞较对照组显著降低 ($P<0.05$); 槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞凋亡率较对照组显著升高 ($P<0.05$); 槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞中 Bcl-2 mRNA 表达较对照组显著降低 ($P<0.05$), Fas、FasL 和 Bax mRNA 表达较对照组显著升高 ($P<0.05$); 槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 可使乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞中 Bcl-2 蛋白表达较对照组显著降低 ($P<0.05$), Fas、FasL 和 Bax 蛋白表达较对照组显著升高 ($P<0.05$)。**结论:** 槲皮素可促进乳腺癌细胞的凋亡,可能与其通过作用 Fas/FasL 凋亡信号通路而激活外源性凋亡途径,通过作用 Bcl-2 凋亡信号通路而激活内源性凋亡途径有关。

关键词: 乳腺癌; 槲皮素; 增殖; 凋亡; Fas; FasL; Bcl-2; Bax

中图分类号: R-33; R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)19-3638-07

Apoptosis Effect and Mechanism Study of Quercetin on the Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-435 Cells*

GAN Lin, XIONG Zhi-feng, YANG Hua-chao, WANG Hong-lin, WANG Ting, LÜ Gang[△]

(Department of Breast and Thyroid, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine/Chongqing Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 400021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the apoptosis effect of quercetin on the breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells, and to explore its mechanism. **Methods:** The cell counting kit-8 (CCK 8) method was used to determine the effect of quercetin on proliferation of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells, the cell scratch test and the Transwell test were respectively used to determine the effect of quercetin on migration and invasion of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells. Flow cytometry was used to determine the effect of quercetin on apoptosis in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells. The real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and West-blotting (West-blotting) were used to determine the effect of quercetin on mRNA and protein expression of Fas, FasL, Bcl-2 and Bax in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells. **Results:** Quercetin (50~200 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells for 24 h, 48 h and 72 h, and it was concentration dependent manner ($P<0.05$). The cell scratch width of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells by quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ were significantly increased in cell scratch test compared with those in control group ($P<0.05$). In Transwell test, the penetrating cells of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 by quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ were significantly reduced compared with those in the control group ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the cell apoptosis rate of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 by quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ were significantly increased ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the expression of Bcl-2 mRNA of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells by quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ were significantly decreased ($P<0.05$), while the expressions of Fas, FasL and Bax mRNA were significantly increased compared with those in the control group ($P<0.05$). The protein expression of Bcl-2 of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells by quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ were significantly reduced compared with those in the control group ($P<0.05$), while the protein expression of Fas, FasL and

* 基金项目: 重庆市 2018 年科研机构绩效激励引导专项项目(cstc2018jxj1130063)

作者简介: 甘霖(1979-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 乳腺癌基础与临床, E-mail: ganlin8088@126.com

[△] 通讯作者: 吕钢(1969-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 乳腺疾病诊治, E-mail: cqszzyrxk@126.com

(收稿日期: 2021-03-28 接受日期: 2021-04-23)

Bax were significantly increased compared with those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Quercetin can promote the apoptosis of breast cancer cells, which may be related to the activation of exogenous apoptosis pathway by acting on the Fas/FasL apoptosis pathway, and the activation of endogenous apoptosis pathway by acting on the Bcl-2 apoptosis pathway.

Key words: Breast cancer; Quercetin; Proliferation; Apoptosis; Fas; FasL; Bcl-2; Bax

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)19-3638-07

前言

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升的趋势,并且年龄逐渐年轻化,已成为全球女性新发癌症中发病率最高的癌症^[1]。目前化疗是乳腺癌术后辅助治疗的主要手段,但是不良反应严重,主要表现为骨髓抑制、神经损伤等,并且随着治疗的推进,患者逐渐产生耐药,导致临床治疗效果逐渐变差^[2-4]。中医药是临床抗癌治疗的重要组成,并且具有其独特的临床优势。中药因具有保护骨髓、毒性较小等优势,在现代医学研究中占据一定地位^[5]。随着现代药理研究的发展,中药在乳腺癌的治疗中发挥着越来越重要的地位,寻求毒副作用小、治疗效果显著的中医药物成为研究重点之一。槲皮素是一种广泛存在于多种中草药的黄酮类化合物,具有止咳、抗炎、抗过敏、抗病毒和抗氧化等多种药理作用^[6]。随着进一步的研究,发现槲皮素对宫颈癌、胰腺癌等肿瘤均具有较强的抑制作用等^[7,8]。此外,已有研究^[9]表明,槲皮素可抑制乳腺癌细胞的增殖,但是关于作用机制研究的报道较少。本文对槲皮素抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞的作用机制进行研究,为槲皮素应用于临床抗乳腺癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株

乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞,购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂

槲皮素,购自美国 Sigma 公司(纯度 $\geq 98\%$),DMSO 配成 200 mmol/L 母液,临用前用 RPMI-1640 培养液配成所需浓度(DMSO 浓度 $<0.1\%$),过滤除菌备用。RPMI-1640 培养液,购自美国 HyClone 公司;胎牛血清、青霉素和链霉素,购自美国 Invitrogen Gibco 公司;活细胞计数法(CCK-8)检测试剂盒,购自美国 Abbkine 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、PCR 试剂,购自天根生化科技(北京)有限公司;Annexin V-FITC/PI 试剂盒,购自美国 Everbright Inc 公司;Transwell 小室,购自美国 Corning 公司;B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bax、 β -actin 一抗,购自美国 Affinity Biosciences 公司;Fas 和 FasL 一抗,购自美国 Santa-Cruz 公司;胰蛋白酶、HRP 标记的二抗、RIPA 裂解液、BCA 试剂,购自上海碧云天公司。Fas、FasL、Bcl-2、Bax、 β -actin 引物序列均由大连 Takara 公司提供,引物序列及产物长度请见表 1。

表 1 PCR 引物序列和产物长度
Table 1 PCR primer sequence and product length

Names	Sequence	Product length(pb)
Fas	Forward: 5'- AACCGACAACAAGTCTCAGAAGG -3'	324
	Reverse: 5'- TTCGTGTGCAAGGCTCAAGGATG -3'	
FasL	Forward: 5'- GACAGCAGTGCCACTTCTCCTTG -3'	278
	Reverse: 5'- CCATTCCAACAGAGCCACCAG -3'	
Bcl-2	Forward: 5'- GCGGTCAAAATGGGTGAATTTC -3'	205
	Reverse: 5'- TGTCTTCTGTTCGCCTGGTA -3'	
Bax	Forward: 5'- TCCACCAAGAAGCTGAGCGAG -3'	207
	Reverse: 5'- GTCCAGCCCATGATGGTTCT -3'	
β -actin	Forward: 5'- ATCAGCAAGCAGGAGTATG -3'	105
	Reverse: 5'- AATAAAGCCATGCCAATC -3'	

1.3 主要仪器

微量移液器,购自德国 Eppendorf 公司;371 型 CO₂ 恒温培养箱,购自美国 Thermo 公司;X-15R 型低温离心机,购自美国 Allerga 公司;Multiskan Sky 全自动酶标仪,购自美国 Thermo Fisher 公司;FC500 型流式细胞仪,购自美国 Beckman 公司;9700 型 PCR 仪,购自美国 ABI 公司;免疫印迹法(West-blotting)电泳仪、电转仪,购自美国 Bio-Red 公司。

1.4 方法

1.4.1 MCF-7 细胞和 MDA-MB-435 细胞的培养

将冻存的乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞迅速复苏,用 RPMI-1640 培养液(含 10%胎牛血清)于 37℃、5%CO₂ 条件下培养,待细胞在细胞培养瓶底部数量达到 80%~90%时经胰酶消化,传代,取第 3~4 代细胞用于实验。

1.4.2 CCK-8 检测槲皮素对乳腺癌细胞增殖的影响 取对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔培养板,分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(25、50、100、150、200 μ mol/L)。各组用 RPMI-1640 培养液 24 h 后,分别替换为含不同浓度槲皮素(0、25、50、100、150、200 μ mol/mL)

的培养基继续在 37℃、5% CO₂、37℃ 条件下继续培养,分别在培养 24 h、48 h 和 72 h 时加入 CCK-8 试剂混匀,1 h 后用于 450 nm 处检测吸光值,各组细胞的相对数量采用吸光值衡量。选择合适的槲皮素浓度进行后续试验。

1.4.3 细胞划痕实验检测槲皮素对乳腺癌细胞迁移的影响 取对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔培养板,分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(50、100 μ mol/L)。各组细胞培养至融合率超过 80%时使用 20 μ L 移液枪头垂直划痕,PBS 冲洗。以含槲皮素(0、50、100 μ mol/L)的培养基在 37℃、5% CO₂、37℃ 条件下继续培养至 48 h,拍照,测量划痕间距。

1.4.4 Transwell 实验检测槲皮素对乳腺癌细胞侵袭的影响 采用 RPMI-1640 培养液 4:1 稀释的 Matrigel 基质胶包被 Transwell 小室的上室,37℃ 放置 1 h,然后加入对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞(10^5 个/mL),分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(50、100 μ mol/L)。将各组上室放入含浓度槲皮素(0、50、100 μ mol/L)RPMI-1640 培养液的下室,培养 48 h 后取出,用湿棉签擦去基质胶和膜表面的细胞,多聚甲醛固定,染色,双蒸水冲洗上室,在光学显微镜下取 3~5 个视野进行计数。

1.4.5 流式细胞术检测槲皮素对乳腺癌细胞凋亡的影响 取对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔培养板,分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(50、100 μ mol/L)。各组细胞用 RPMI-1640 培养液培养 24 h 后,以含不同浓度槲皮素(0、50、100 μ mol/L)的培养基继续在 37℃、5% CO₂、37℃ 条件下培养至 48 h。收集细胞后用 PBS 冲洗,胰酶消化后将细胞移至离心管,离心,弃上清,加入 PBS 冲洗,吸至 1.5 mL EP 管中,离心,悬浮细胞,加入 FITC 标记的 Annexin-V,避光孵育。加入 PI,冰浴中避光孵育后加入 PBS,采用流式细胞仪进行检测各组细胞的凋亡率。

1.4.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测槲皮素对乳腺癌细胞 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL mRNA 表达的影响 取对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔培养板,分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(50、

100 μ mol/L)。各组细胞用 RPMI-1640 培养液培养 24 h 后,以含不同浓度槲皮素(0、50、100 μ mol/L)的培养基继续培养至 48 h。收获各组细胞,采用 TRIZOL 试剂提取总 RNA,测定浓度及纯度。将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行定量 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 扩增的条件:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,退火 55℃ 45 s,72℃ 60 s,反应 40 个循环,72℃ 延伸 5 min。采用 2^{- Δ CT}法计算目标基因的相对表达量。

1.4.7 Western blotting 检测槲皮素对乳腺癌细胞 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL 蛋白表达的影响 取对数生长期乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔培养板,分为对照组(0 μ mol/L)及槲皮素组(50、100 μ mol/L)。各组细胞用 RPMI-1640 培养液培养 24 h 后,以含不同浓度槲皮素(0、50、100 μ mol/L)的 RPMI-1640 培养液继续培养至 48 h。收获各组细胞,PBS 漂洗,用 RIPA 试剂提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,煮沸变性。按 30 μ g/孔进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿法转至 PVDF 膜,用脱脂奶粉封闭,TBST 洗膜,加入一抗后 4℃ 过夜,TBST 洗膜,加入二抗,室温下孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 化学发光试剂显色,采用 Fluor Chem Q 蛋白印迹成像和定量分析系统测定各组细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析,计量资料经检验符合正态分布和方差齐性采用 $\bar{X} \pm SD$ 表示,采用方差分析+LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖的抑制作用

槲皮素(50~200 μ mol/L)作用乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞 24 h、48 h 和 72 h 时均可使各组细胞的 OD 值显著降低,并且呈浓度依赖性($P < 0.05$),说明槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖具有抑制作用,具体结果见图 1。

2.2 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞迁移的抑制作用

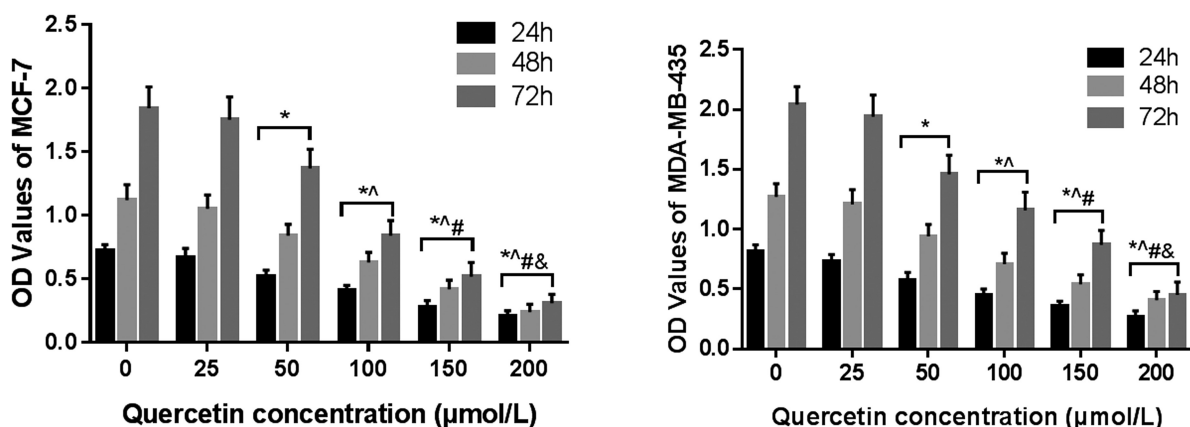


图 1 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖抑制作用的实验结果(n=6)

Fig. 1 The experimental results of quercetin on the proliferation inhibition of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells(n=6)

Note: Compared with 0 μ mol/L, * $P < 0.05$. Compared with 50 μ mol/L, ^ $P < 0.05$. Compared with 100 μ mol/L,

$P < 0.05$. Compared with 150 μ mol/L, & $P < 0.05$.

对照组、槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞划痕宽度在开始培养时(0 h)差异均无统计学意义($P>0.05$),培养 48 h 时槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞划痕宽度较对照组显著升高

($P<0.05$),槲皮素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞划痕宽度较对照组和槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著升高($P<0.05$),具体结果见图 2。

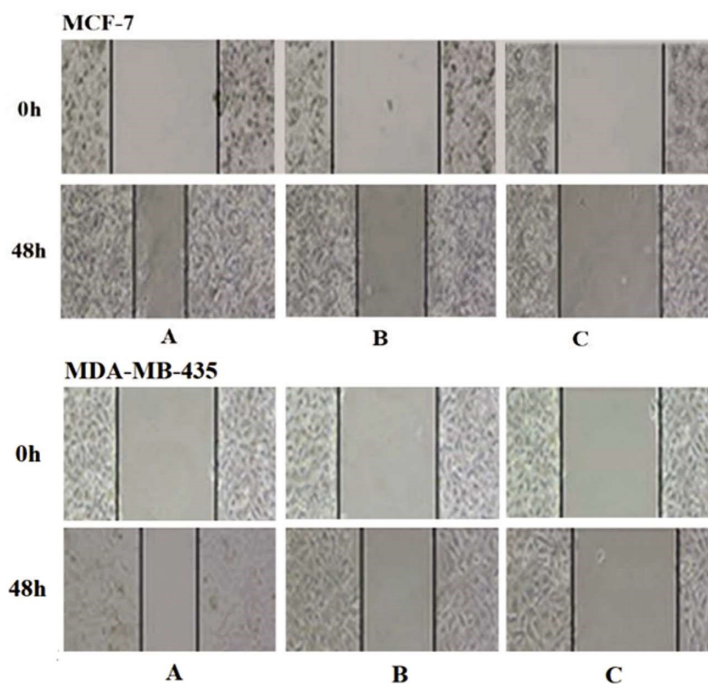
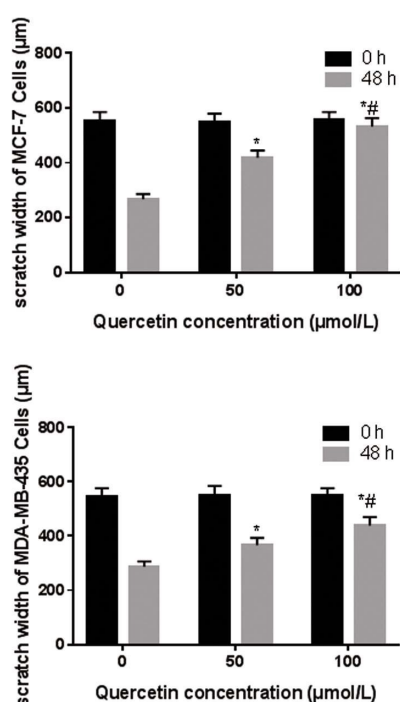


图 2 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞迁移影响的实验结果($n=6$)

Fig. 2 Effect of quercetin on the migration of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells ($n=6$)

Note: Compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$), * $P<0.05$. Compared with 50 $\mu\text{mol/L}$ group, # $P<0.05$. A: Control group.

B: Quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ group. C: Quercetin 100 $\mu\text{mol/L}$ group.

2.3 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞侵袭的抑制作用

槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组侵袭细胞数量较对

照组显著降低($P<0.05$),并且槲皮素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组侵袭细胞数量较槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著降低($P<0.05$),具体结果见图 3。

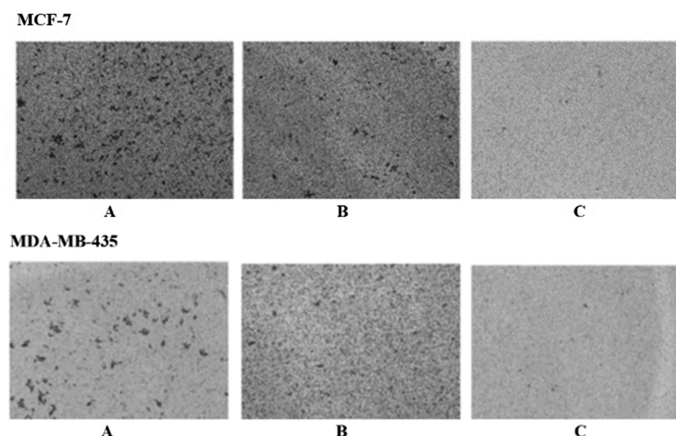
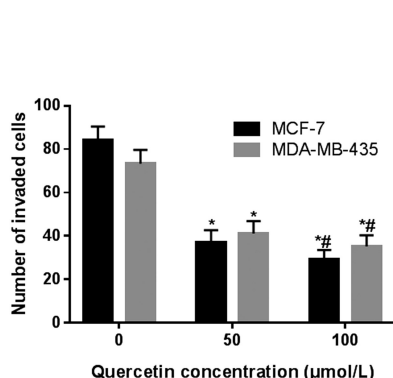


图 3 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞侵袭影响的实验结果($n=6$)

Fig. 3 Experimental results of quercetin on invasion of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells ($n=6$)

Note: Compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$), * $P<0.05$. Compared with 50 $\mu\text{mol/L}$,

$P<0.05$. A: Control group. B: Quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ group. C: Quercetin 100 $\mu\text{mol/L}$ group.

2.4 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞凋亡的促进作用

槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡细胞数量较对

照组显著升高($P<0.05$),并且槲皮素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡细胞数量较槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著升高($P<0.05$),具体结果见图 4。

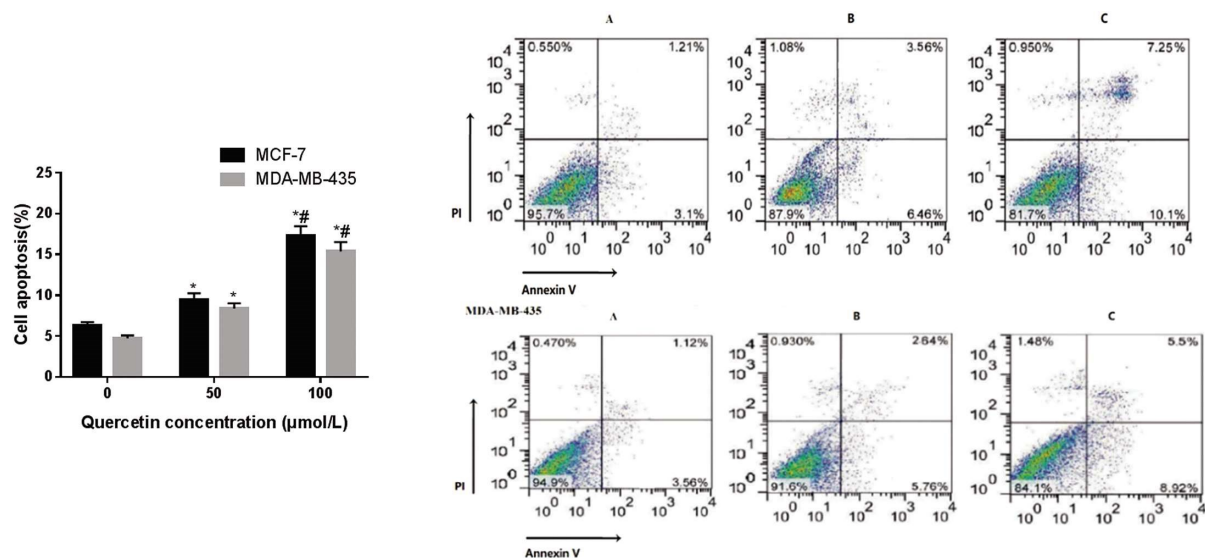


图 4 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞凋亡影响的实验结果(n=6)

Fig. 4 Experimental results of the effect of quercetin on apoptosis of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells (n=6)

Note: Compared with the control group (0 μmol/L), * $P < 0.05$. Compared with 50 μmol/L, # $P < 0.05$. A: Control group.

B: Quercetin 50 μmol/L group. C: Quercetin 100 μmol/L group.

2.5 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞中 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL mRNA 表达的影响

槲皮素 50 μmol/L 组和 100 μmol/L 组的 Bcl-2 mRNA 表达水平较对照组显著降低($P < 0.05$), Fas、FasL 和 Bax mRNA 表

达水平较对照组显著升高($P < 0.05$), 并且槲皮素 100 μmol/L 组的 Bcl-2 mRNA 表达水平较槲皮素 50 μmol/L 组显著降低($P < 0.05$), Fas、FasL 和 Bax mRNA 表达水平较槲皮素 50 μmol/L 组显著升高($P < 0.05$), 具体结果见图 5。

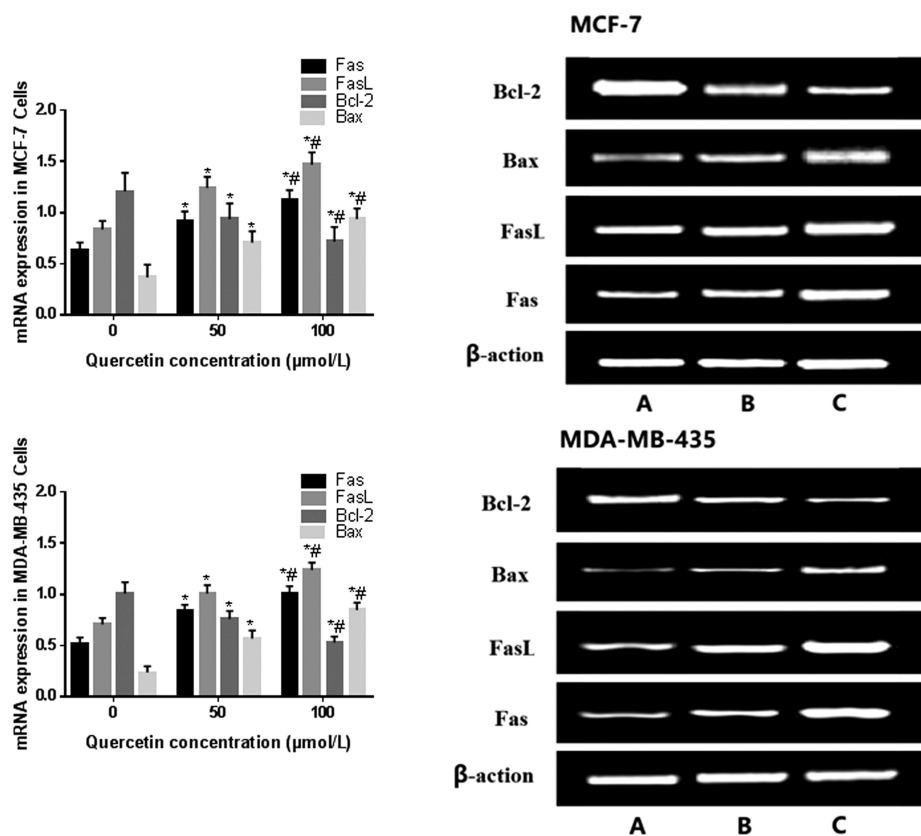


图 5 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL mRNA 表达影响的实验结果(n=6)

Fig. 5 Effects of quercetin on expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL mRNA in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells (n=6)

Note: Compared with the control group (0 μmol/L), * $P < 0.05$. Compared with 50 μmol/L, # $P < 0.05$.

A: Control group. B: Quercetin 50 μmol/L group. C: Quercetin 100 μmol/L group.

2.6 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞中 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL 蛋白表达的影响

槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bcl-2 蛋白表达水平较对照组显著降低 ($P<0.05$), Fas、FasL 和 Bax 蛋白表达水

平较对照组显著升高 ($P<0.05$), 并且槲皮素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Bcl-2 蛋白表达水平较槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著降低 ($P<0.05$), Fas、FasL 和 Bax 蛋白表达水平较槲皮素 50 $\mu\text{mol/L}$ 组显著升高 ($P<0.05$), 具体结果见图 6。

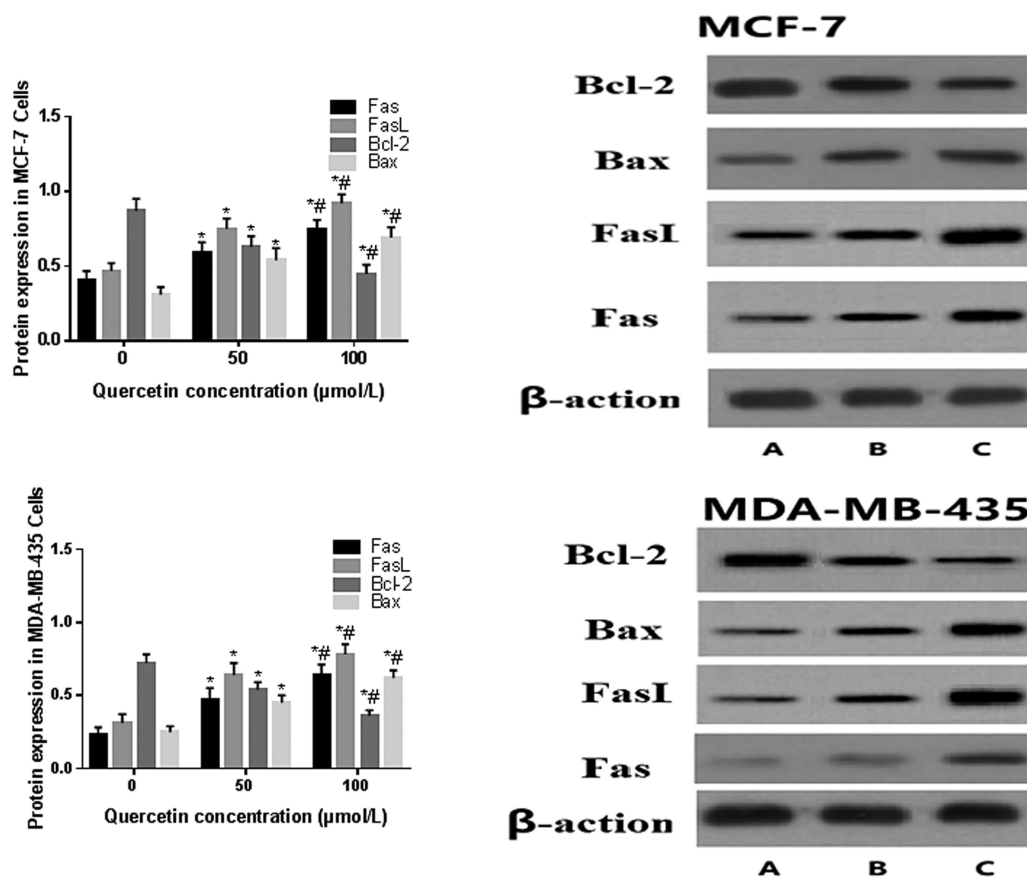


图 6 槲皮素对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞中 Bcl-2、Bax、Fas 和 FasL 蛋白表达的实验结果 ($n=6$)

Fig. 6 Experimental results of quercetin on expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells ($n=6$)

Note: Compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$), * $P<0.05$. Compared with 50 $\mu\text{mol/L}$, # $P<0.05$. A: Control group.

B: Quercetin 50 $\mu\text{mol/L}$ group. C: Quercetin 100 $\mu\text{mol/L}$ group.

3 讨论

乳腺癌已成为全球女性发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,并且发病率逐年增高^[10],同时发病率趋于年轻化,严重危害女性生命健康^[11]。目前乳腺癌临床上的主要治疗手段包括手术切除、术后放疗化疗、内分泌治疗等,能够在一定程度延长患者的生存期,但是整体上临床预后较差^[12-14]。中药中富含的独特的化合物骨架是多种抗肿瘤先导化合物的来源。槲皮素作为多种中药的黄酮类成份,对多种恶性肿瘤具有较好的抑制作用^[15,16]。本研究结果显示,槲皮素(50~200 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h、48 h 和 72 h 时对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖具有抑制作用,并且呈浓度依赖性,进一步论证槲皮素对乳腺癌的增殖具有抑制作用。虽然已知槲皮素对乳腺癌具有抑制作用,但是具体机制仍然不十分明确。

肿瘤复发和转移导致肿瘤治疗失败,其中侵袭和转移是最常见原因。侵袭转移是恶性肿瘤的基本生物学特征,与肿瘤细胞侵袭性增强、粘附能力降低、细胞外基质降解等因素有关^[17-19]。划痕实验中槲皮素(50、100 $\mu\text{mol/L}$)可浓度依赖性增大乳腺癌

MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞划痕宽度,在 Transwell 实验中可浓度依赖性降低乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 穿膜细胞数量,说明槲皮素可抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞迁移和侵袭。细胞凋亡是指细胞在基因调控下自主有序的死亡活动^[20,21]。正常生理情况下凋亡对于细胞维持内环境稳定的作用举足轻重,当细胞出现失控性无限增殖和凋亡抑制则肿瘤发生,因此诱导肿瘤细胞凋亡是防治肿瘤的重要策略^[22-24]。槲皮素(50、100 $\mu\text{mol/L}$)可浓度依赖性升高乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞凋亡率,说明槲皮素可抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞增殖、迁移和侵袭,可能与促进细胞凋亡有关。

外源性途径(死亡受体活化)和内源性途径(线粒体损伤途径)是经典的凋亡途径。Fas/FasL 凋亡信号通路和 Bcl-2 凋亡信号通路分别为是重要的外源性凋亡和内源性凋亡途径^[25,26]。Fas 是肿瘤坏死因子受体超家族的成员,作为细胞表面重要的死亡受体,与其配体 FasL 结合后能够激活死亡受体途径的细胞凋亡,通过下游 Caspase 家族蛋白来传导凋亡信号并最终引起细胞凋亡^[27]。内源性凋亡途径是由 Bcl-2 家族蛋白调控,Bcl-2 家

族成员定位于线粒体上,其可控制线粒体的通透性,细胞色素C的释放,激活下游Caspase级联反应,诱发细胞凋亡^[28,29]。Bcl-2家族蛋白由促凋亡蛋白(Bax等)和抗凋亡蛋白(Bcl-2等)构成,Bcl-2与Bax常以异源二聚体的形式存在,共同调节细胞凋亡^[30,31]。在本研究结果中,槲皮素可浓度依赖性降低乳腺癌MCF-7和MDA-MB-435细胞内Bcl-2 mRNA和蛋白的表达水平,而升高Fas、FasL和Bax mRNA和蛋白的表达水平,说明槲皮素通过作用Fas/FasL凋亡信号通路而激活外源性凋亡途径,以及通过作用Bcl-2凋亡信号通路而激活内源性凋亡途径,这可能是其可以促进乳腺癌MCF-7和MDA-MB-435细胞凋亡作用机制之一。

综上,槲皮素可促进乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-435的凋亡,可能与其通过作用Fas/FasL凋亡信号通路而激活外源性凋亡途径以及通过作用Bcl-2凋亡信号通路而激活内源性凋亡途径有关。

参考文献(References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424
- [2] Qi A, Li Y, Yan S, et al. Effect of postoperative chemotherapy on blood glucose and lipid metabolism in patients with invasive breast cancer[J]. Gland Surg, 2021, 10(4): 1470-1477
- [3] Liu W, Chen W, Zhang X, et al. Higher efficacy and reduced adverse reactions in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by using pegylated liposomal doxorubicin compared with pirarubicin [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 199
- [4] Ao M, Xiao X, Li Q. Efficacy and safety of compound Kushen injection combined with chemotherapy on postoperative Patients with breast cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(3): e14024
- [5] 刘晓宇, 李静蔚, 刘晓菲, 等. 中药联合新辅助化疗治疗乳腺癌的研究进展[J]. 环球中医药, 2021, 14(2): 357-362
- [6] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 221-224
- [7] Kedhari Sundaram M, Raina R, Afroze N, et al. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8): BSR20190720
- [8] Hoca M, Becer E, Kabaday H, et al. The Effect of Resveratrol and Quercetin on Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem Cell[J]. Nutr Cancer, 2020, 72(7): 1231-1242
- [9] 殷雪琴, 张夏炎, 高雅茹, 等. 槲皮素对缺氧诱导的乳腺癌细胞增殖及干性的影响[J]. 中南药学, 2019, 17(11): 1809-1813
- [10] 马丹丹, 刘坤. 2018年全球癌症统计:乳腺癌发病和死亡人数统计[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2018, 12(6): 375
- [11] 张雪, 董晓平, 管雅喆, 等. 女性乳腺癌流行病学趋势及危险因素研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(1): 87-92
- [12] Taylor DB, Bourke AG, Westcott EJ, et al. Surgical outcomes after radioactive 125I seed versus hookwire localization of non-palpable breast cancer: a multicentre randomized clinical trial [J]. Br J Surg, 2021, 108(1): 40-48
- [13] 梁文龙, 柳林, 陈晰, 等. 曲妥珠单抗在HER-2阳性乳腺癌治疗中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(27): 5385-5388
- [14] 孟春艳, 张付菊, 苏永平. 来曲唑在乳腺癌辅助内分泌治疗中的研究进展[J]. 癌症进展, 2021, 19(5): 438-441
- [15] Liu ZJ, Xu W, Han J, et al. Quercetin induces apoptosis and enhances gemcitabine therapeutic efficacy against gemcitabine-resistant cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(7): 684-692
- [16] Kedhari Sundaram M, Hussain A, Haque S, et al. Quercetin modifies 5'CpG promoter methylation and reactivates various tumor suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 18357-18369
- [17] Guan X, Chen S, Zhao Y. The role of RhoC in malignant tumor invasion, metastasis and targeted therapy[J]. Histol Histopathol, 2018, 33(3): 255-26
- [18] Jiang Z, Cui H, Zeng S, et al. miR-885-5p Inhibits Invasion and Metastasis in Gastric Cancer by Targeting Malic Enzyme 1 [J]. DNA Cell Biol, 2021, 40(5): 694-705
- [19] 刘洁, 常进, 贺建霞, 等. 浆细胞肿瘤患者临床病理学及分子生物学特征分析[J]. 白血病·淋巴瘤, 2020, 29(10): 599-604
- [20] Oladnabi M, Mishan MA, Rezaeikanavi M, et al. Correlation between ELF-PEMF exposure and Human RPE Cell Proliferation, Apoptosis and Gene Expression[J]. J Ophthalmic Vis Res, 2021, 16(2): 202-211
- [21] 张朝霞, 王璋, 金黎明, 等. piRNA NU13对肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(2): 184-192
- [22] 张迪, 李晓兰. 肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体及其受体与宫颈癌的关系[J]. 国际妇产科学杂志, 2019, 46(3): 245-248, 258
- [23] Solárová Z, Kello M, Solár P. Apoptotic Effect of Homobrassinin and Thiazino [6,5-b]indol is Associated with Downregulation of Heat Shock Proteins in Human Ovarian Adenocarcinoma Cells [J]. Acta Chim Slov, 2021, 68(1): 151-158
- [24] 高飞, 郭文. 线粒体促凋亡蛋白Smac/DIABLO及其与肿瘤的关系[J]. 肿瘤, 2007, 27(10): 844-846
- [25] Xie J, Li B, Yao B, et al. Transforming growth factor- β 1-regulated Fas/FasL pathway activation suppresses nucleus pulposus cell apoptosis in an inflammatory environment [J]. Biosci Rep, 2020, 40(2): BSR20191726
- [26] 任丽平, 李先佳, 金少举. 基于caspase-3/bcl-2/bax信号通路的槐定碱诱导胰腺癌细胞株capan-1凋亡机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(3): 325-328
- [27] 孙建华, 李雁. Fas/FasL系统在肿瘤细胞凋亡中的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(20): 3694-3696
- [28] Khan MA, Siddiqui S, Ahmad I, et al. Phytochemicals from Ajwa dates pulp extract induce apoptosis in human triple-negative breast cancer by inhibiting AKT/mTOR pathway and modulating Bcl-2 family proteins[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10322
- [29] Chan HH, Leong YQ, Voon SM, et al. Effects of Amyloid Precursor Protein Overexpression on NF- κ B, Rho-GTPase and Pro-Apoptosis Bcl-2 Pathways in Neuronal Cells[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2021, 9(4): 417-425
- [30] 尹智勇, 杨俊元, 祁宏. Bcl-2蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2017, 30(2): 340-344
- [31] 张克君, 孙传东, 李德春. p53和Bcl-2家族蛋白在胰腺癌中的表达与细胞凋亡的关系[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2010, 2(2): 102-107