

- [15] Kim S H, Lee S, Piccolo S R, *et al.* Menthol induces cell-cycle arrest in PC-3 cells by down-regulating G₂/M genes, including polo-like kinase 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(3): 436-441.
- [16] Li Q, Wang X H, Yang Z H, *et al.* Menthol induces cell death *via* the TRPM8 channel in the human bladder cancer cell line T24[J]. *Oncology*, 2009, 77(6): 335-341.
- [17] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(10): 1124-1132.
- [18] Rubinstein A D, Eisenstein M, Ber Y, *et al.* The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2011, 44(5): 698-709.

槲皮素对 A549 细胞 PI3K/Akt 信号通路及肿瘤恶性特征的调控机制

吴洪皓, 杨 华, 吴 鹏*

(江西省赣州市中医院, 江西 赣州 341000)

摘要: **目的** 探究槲皮素对肺腺癌 A549 细胞 PI3K/Akt 信号通路及肿瘤恶性特征的调控机制。**方法** 体外培养肺腺癌 A549 细胞, 用 20、50、100 μmol/L 槲皮素处理 24 h, CCK8 法、流式细胞术、Transwell 分别检测细胞增殖率、细胞凋亡情况以及细胞侵袭水平, RT-qPCR 检测 *PI3K*、*Akt* mRNA、miR-29b 表达, Western blot 检测 PI3K、Akt 和相关功能蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 槲皮素组细胞增殖率、侵袭水平均降低, 与槲皮素浓度呈负相关, 而凋亡率升高, 与槲皮素浓度呈正相关 ($P<0.05$)。与对照组比较, 槲皮素组的 miR-29b、Bax 表达升高, 而 PI3K、Akt、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 槲皮素可能通过促进 miR-29b 表达抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活, 进而促进肺腺癌 A549 细胞的凋亡, 抑制其凋亡。

关键词: 槲皮素; A549 细胞; miR-29b; PI3K/Akt

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3476-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.042

肺癌 (lung cancer) 是常见的恶性肿瘤, 并且是五年生存率最低的恶性肿瘤之一。本世纪以来, 无论在我国还是全世界, 肺癌的年发病人数、年致死人数均已跃居第一^[1-2], 其全球年发病人数 180 万, 死亡人数 160 万^[3], 是严重危害人类生命健康的公共卫生问题。肺癌可以分为非小细胞肺癌和小细胞肺癌两大类, 其中非小细胞肺癌占肺癌的大多数, 而肺腺癌 (lung adenocarcinoma) 是非小细胞肺癌的三大亚型之一, 占总肺癌发病人数的 40% 以上^[4]。尽管早期肺腺癌相对容易治疗, 但肺腺癌发病较隐匿, 大多数患者就诊时已进展到中晚期, 癌细胞已经发生侵袭或转移, 导致肺腺癌成为五年生存率较低的恶性肿瘤之一^[5]。靶向治疗及免疫治疗的应用在一定程度上改善了这种现状, 使患者的生存期得到了延长^[6-7], 但耐药以及治疗后的转移仍是亟待解决的一大难题。因此探究合适的治疗药物和治疗靶点对于肺腺癌的研究和治疗意义重大。槲皮素 (quercetin) 是一种天然黄酮类物质, 有研究表明其在肺腺癌中有一定治疗作用^[8]; 目前 microRNAs (miRNAs)

在肿瘤中的研究愈加深入, 其中已有大量文献报道 miR-29b 在肿瘤发生进程中参与肿瘤细胞侵袭转移等关键作用机制。而槲皮素介导 miR-29b 在肺腺癌中的调控机制鲜有报道, 因此本研究旨在探究槲皮素通过调节 miR-29b 介导 PI3K/Akt 信号通路缓解肺腺癌 A549 细胞癌变分子机制。

1 材料

1.1 细胞 人肺癌细胞系 A549 (批号 PT-1034, 美国模式培养物保藏中心 ATCC), 用基础培养基 + 20% FBS + 8% DMSO 培养。

1.2 药物 槲皮素 (纯度 ≥93%, CAS 号 117-39-5, 江苏永健医药科技有限公司), 溶于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 配成 20、50、100 μmol/L 溶液, 在 -20 ℃ 下保存备用。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Annexin V-FITC/PI (上海硕嘉生物技术有限公司); XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); BPH-9052 型细胞培养箱

收稿日期: 2020-12-10

基金项目: 江西省卫生计生委中医药科研课题 (2017A174); 江西省卫生厅中医药科研基金课题 (2011A104); 赣州市科技计划项目 [赣市科发 (2020) 3]

作者简介: 吴洪皓 (1978—), 男, 硕士, 副主任中医师, 研究方向为肺部疾病的中医治疗。Tel: 15079766920

* **通信作者:** 吴 鹏 (1983—), 男, 副主任中医师, 研究方向为内科疾病的临床诊疗。Tel: 13879787573

(上海轩仪仪器设备有限公司); 2D 双向电泳电泳仪 (广州浩翰仪器有限公司)。

1.3.2 试剂 Annexin V-FITC (批号 130-092-052)、碘化丙啶 PI (批号 P8080)、凋亡检测试剂盒 (批号 CA1020) (上海恒斐生物科技有限公司); 二甲基亚砷 (批号 D120527) (上海科敏生物科技有限公司); CCK8 (批号 CK04) (北京智杰方远科技有限公司); 胎牛血清 (批号 FBS500-S)、RPMI-1640 培养基 (批号 507767) (美国 Gibco 公司); 兔抗 PI3K (批号 ab140307)、兔抗 Akt (批号 ab8805)、兔抗 MMP-2 (批号 ab37150)、兔抗 MMP-9 (批号 ab73734)、兔抗 Bcl-2 (批号 ab182858)、兔抗 Bax (批号 ab32503)、兔抗 GAPDH (批号 ab181602)、IgG 抗体 (批号 ab6721) (英国 Abcam 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞用含 10% FBS、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的伯克改良伊格尔培养基培养, 在 37 ℃、5% CO₂ 下孵育。

2.2 分组 取处于对数生长期 A549 细胞, 调整细胞密度为 1×10⁶/mL, 接种到 96 孔板, 每孔 200 μL, 实验分为 4 组, 每组 3 个复孔, 其中对照组为 A549 细胞, 槲皮素低、中、高浓度组浓度分别为 20、50、100 μmol/L。

2.3 指标检测

2.3.1 CCK8 法检测细胞增殖 将细胞以 2×10³ 个/孔密度接种到 96 孔板中, 设置只加培养基不加细胞的空白对照组用于调零, 细胞转染 24 h 后于 24、48、72 h 每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 在 37 ℃下再孵育 4 h, 采用酶标仪于 450 nm 波长处测定吸光度, 计算实验组、对照组吸光度比值, 绘制细胞生存能力曲线, 重复 3 次, 取平均值。

2.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞培养后以 0.25% 胰酶消化各组细胞后, 用 RPMI-1640 培养基终止消化, 1 000 r/min离心 5 min, 弃上清液, 4 ℃预冷的 70%乙醇固定, 调整细胞密度为 1 × 10⁶/mL, 取 1 mL 细胞, 1 500 r/min离心 10 min, 弃上清, 每 1 mL 细胞加 2 mL PBS, 离心, 弃上清, 加入预冷的 70%乙醇固定细胞, 4 ℃过夜, 第 2 天用 PBS 洗涤细胞 2 次, 取 100 μL 细胞悬液, 加入 50 μg 含 RNAase 的 PI 染液, 避光 30 min, 100 目尼龙网过滤, 流式细胞仪记录在 488 nm 激发波长处红色荧光, 检测细胞周期。

2.3.3 Transwell 实验检测细胞侵袭水平 细胞培养 24 h 后, 取出-80 ℃保存的基底胶, 4 ℃平衡过夜融化成液态, 在 200 μL 无血清培养基中加入 200 μL Matrigel 胶, 稀释基质胶, Transwell 板上室加入 50 μL, 放入培养箱中, 孵育 2~3 h 待胶成为固态后消化细胞、计数, 用无血清培养基配成细胞悬液, 每孔上室中加入 200 μL 细胞悬液, 下室中加入 600 μL 含有 20% FBS 条件培养基, 37 ℃培养箱孵育 20~24 h。取出 Transwell 板, PBS 漂洗 2 次, 甲醛固定 10 min, 再用清水洗 3 次, 0.1% 结晶紫染色, 室温放置 30 min, PBS 漂洗 2 次, 棉球擦去上表面的细胞, 晾干后

用倒置显微镜随机计数 5 个视野的细胞, 重复 3 次, 取平均值。

2.3.4 RT-qPCR 检测 PI3K、Akt mRNA、miR-29b 表达 采用 Trizol 提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 体系 20 μL, 反应条件为 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。以 cDNA 为模板, TaqMan MicroRNA Assay 和 TaqMan® Universal PCR Master Mix 用于 RT-qPCR, U6 mRNA 水平作为内参对结果进行归一化, 使用 SYBR Premix EX Taq 试剂盒进行加样, 样品在实时荧光定量 PCR 仪中进行 RT-qPCR 反应, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 记录各孔 CT 值, mRNA 以 GAPDH 为内参, miRNA 以 U6 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT}法计算产物相对表达量。

2.3.5 Western blot 检测 PI3K、Akt 和相关功能蛋白表达 取各细胞提取总蛋白, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将 30 μg 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒定电压 80 V, 35 min 后 120 V 电泳 45 min, 转移到 PVDF 膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 倾去封闭液, 4 ℃孵育兔抗 PI3K、兔抗 Akt、兔抗 MMP-2、兔抗 MMP-9, 兔抗 Bcl-2、兔抗 Bax, 兔抗 GAPDH, 过夜, PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液) 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔的二抗 IgG 抗体, 室温孵育 1 h, PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 于光学发光仪扫描显影后, 使用 Image Pro Plus 6.0 软件分析蛋白相对表达量。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素抑制 A549 细胞增殖 与对照组比较, 槲皮素组细胞增殖率降低, 差异均具有统计学意义 (*P*<0.05), 并与其浓度呈负相关, 见表 1。

表 1 槲皮素对细胞增殖的影响 (% , $\bar{x}\pm s$, *n*=3)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.195±0.024	0.451±0.057	0.819±0.092
槲皮素低浓度组	0.171±0.019	0.334±0.035	0.508±0.061 *
槲皮素中浓度组	0.168±0.021	0.289±0.037 *	0.406±0.058 *
槲皮素高浓度组	0.161±0.017	0.241±0.022 *	0.377±0.034 *

注:与对照组比较, * *P*<0.05。

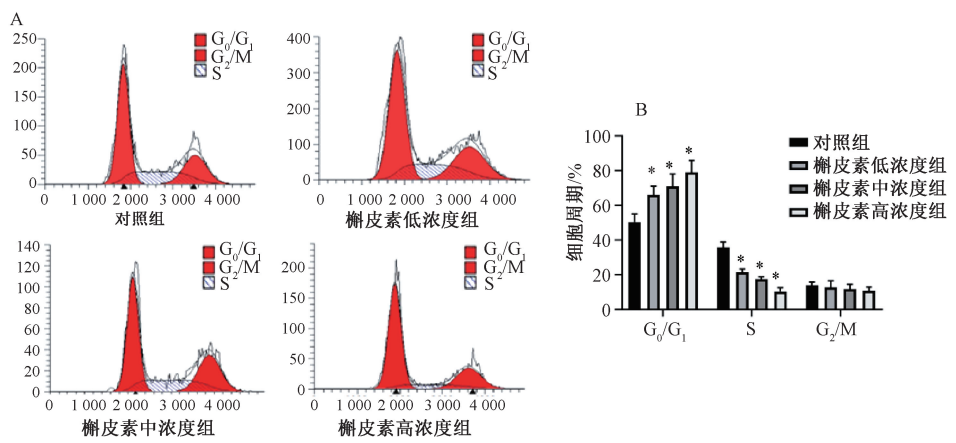
3.2 槲皮素促进 A549 细胞凋亡 与对照组比较, 槲皮素组细胞 G₀/G₁ 期细胞增加, S 期细胞减少, 差异均具有统计学意义 (*P*<0.05), 并与其浓度呈正相关, 见表 2、图 1。

表 2 槲皮素对细胞周期的影响 (% , $\bar{x}\pm s$, *n*=3)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	50.31±4.65	35.74±3.02	13.95±1.76
槲皮素低浓度组	65.84±5.09 *	21.47±1.85 *	12.69±3.77
槲皮素中浓度组	70.84±7.09 *	17.47±1.34 *	11.69±2.77
槲皮素高浓度组	73.97±6.78 *	15.31±2.16 *	10.72±2.14

注:与对照组比较, * *P*<0.05。

3.3 槲皮素抑制 A549 细胞侵袭 与对照组比较, 槲皮素



注：A 为流式细胞图，B 为流式细胞检测直方图。与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 1 各组细胞周期 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组细胞侵袭水平降低，差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)， 并与其浓度呈负相关，见图 2。

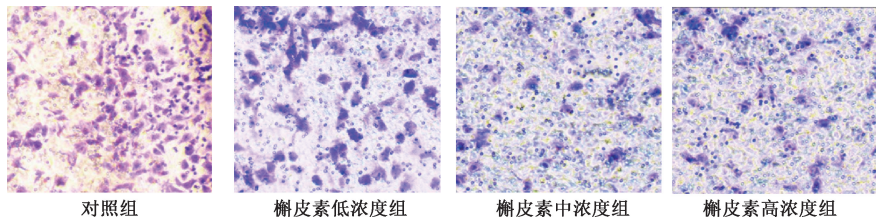
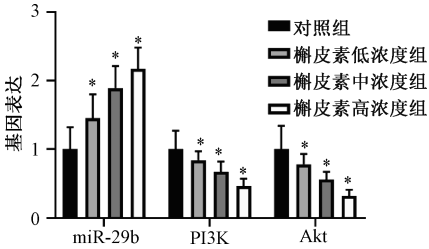


图 2 各组细胞侵袭 ($\times 100$)

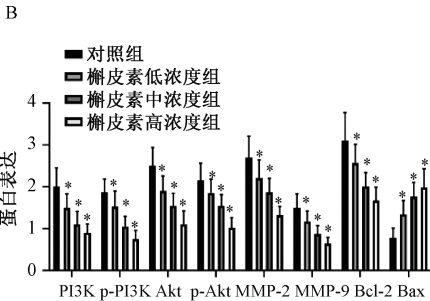
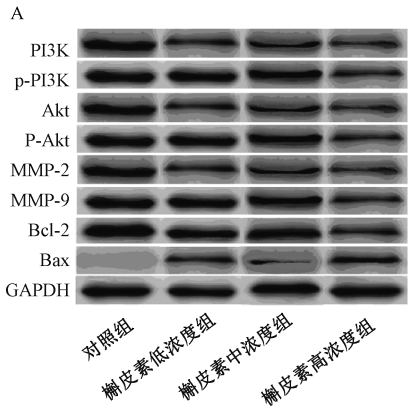
3.4 *PI3K*、*Akt* mRNA、miR-29b 表达 与对照组比较，槲皮素组 miR-29b 表达升高，并与其浓度呈正相关；*PI3K*、*Akt* mRNA 表达降低，并与其浓度呈负相关，差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 3。

3.5 *PI3K*、p-*PI3K*、*Akt*、p-*Akt* 及相关功能蛋白表达 与对照组比较，槲皮素组 *PI3K*、p-*PI3K*、*Akt*、p-*Akt*、MMP-2、MMP-9、Bcl-2 表达降低，并与其浓度负相关；Bax 表达升高，并与其浓度呈正相关，差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)，见图 4。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 3 各组 *PI3K*、*Akt* mRNA、miR-29b 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

图 4 各组 *PI3K*、p-*PI3K*、*Akt*、p-*Akt* 及相关功能蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

槲皮素 (quercetin, 又名槲皮黄素, $C_{15}H_{10}O$, 相对分子质量 302.236) 是植物界分布广泛, 具有抗肿瘤、抗氧化

等多种药理活性的黄酮醇类化合物^[9]。在肿瘤研究中已有大量文献报道槲皮素的抗肿瘤作用, Pang 等^[10]在直肠癌的研究发现, 槲皮素可通过靶向 SLC01B1 并通过使用该化合

物产生增强的作用，抑制细胞生长并诱导肿瘤细胞凋亡来降低直肠癌患者的死亡率，Chen 等^[11]研究发现，槲皮素能够抑制人皮肤鳞癌癌细胞的上皮-间质转化（EMT）标记和转移能力，进而达到治疗的目的，而在肺腺癌研究领域也有大量关于槲皮素治疗肺腺癌的研究成果，Lee 等^[12]研究发现，槲皮素在肺癌细胞中可以抑制 HSP70 表达，并且与肺癌细胞的生长抑制和对化学治疗的敏感性有关，在肺癌治疗中可能具有化学增敏作用。

本次研究中，体外培养肺腺癌 A549 细胞，用不同浓度（20、50、100 μmol/L）的槲皮素处理，检测结果发现，槲皮素能够降低肺腺癌 A549 细胞增殖率和侵袭能力，促进肺腺癌 A549 细胞凋亡。

进一步的研究也发现了槲皮素能够在肺腺癌 A549 细胞中促进 miR-29b 表达。目前越来越多的研究发现了 miRNA 参与生命过程中许多重要进程，包括生长发育、疾病发生，代谢机制，甚至是肿瘤的发生^[13]。Sonoki 等^[14]研究发现，在肺腺癌的研究中，槲皮素可以增加 miR-16 表达，抑制 claudin-2 表达从而改善肿瘤进程。Wang 等^[15]研究也表明，槲皮素可通过调节 miR-16-5p 和 WEE1 表达增强非小细胞肺癌细胞的放射敏感性。而关于槲皮素与 miR-29b 之间的调控关系，目前仅有 Wang 团队关于糖尿病性视网膜病变的有相关研究^[16]。而在肿瘤研究中尚未有相关报道，本研究的发现具有一定的创新性和研究意义。

另外在肺腺癌中槲皮素能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活，Huang 等^[17]在肺腺癌的研究中发现，抑制 PI3K/Akt 途径能够增强癌细胞对顺铂的耐药性，促进肿瘤细胞的凋亡。有大量研究已经证实了 PI3K/Akt 信号通路在肿瘤发生过程中扮演的关键角色，探究其在肿瘤发生进程中介导的调控机制是肿瘤研究的重要突破点。

本项目结合中药有效成分，miRNA 以及明星信号通路，研究三者之间的靶向调节关系以及在肺腺癌肿瘤调控中发挥的作用，初步探究槲皮素对肺腺癌 A549 细胞药效作用，在临床应用方面有良好的发展前景和医用价值。但是肿瘤发病机制复杂，本研究得到的结论应用到临床还需要进一步实验验证。

参考文献：

[1] 陈万青, 李 贺, 孙可欣, 等. 2014 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(1): 5-13.

[2] 张国桢. 老年性微小肺癌影像诊断研究进展[J]. 老年医学与保健, 2016, 22(3): 133-135.

[3] Hirsch F R, Scagliotti G V, Mulshine J L, *et al.* Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.

[4] de Groot P M, Wu C C, Carter B W, *et al.* The epidemiology

of lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 7 (3): 220-233.

[5] Allemani C, Weir H K, Carreira H, *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25, 676, 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9972): 977-1010.

[6] Teicher B A. Targets in small cell lung cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(2): 211-219.

[7] 韦 笑, 陈仿军, 辛 恺, 等. 免疫毒素新进展: 肿瘤靶向治疗与免疫治疗的结合 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24 (7): 643-648.

[8] 党树伟, 李国东, 刘 明. 槲皮素逆转肿瘤多药耐药机制的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(10): 802-807.

[9] Magar R T, Sohng J K. A Review on structure, modifications and structure-activity relation of quercetin and its derivatives [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(1): 11-20.

[10] Pang B, Xu X G, Lu Y, *et al.* Prediction of new targets and mechanisms for quercetin in the treatment of pancreatic cancer, colon cancer, and rectal cancer [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (9): 5339-5349.

[11] Chen K C, Hsu W H, Ho J Y, *et al.* Flavonoids luteolin and quercetin inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(3): 1180-1191.

[12] Lee S H, Lee E J, Min K H, *et al.* Quercetin enhances chemosensitivity to gemcitabine in lung cancer cells by inhibiting heat shock protein 70 expression [J]. *Clin Lung Cancer*, 2015, 16(6): e235-e243.

[13] 王 坦, 王 玉, 杨廷桐. microRNA 在肺癌发生发展中的研究进展 [J]. 新乡医学院学报, 2011, 28(6): 784-787.

[14] Sonoki H, Sato T, Endo S, *et al.* Quercetin decreases claudin-2 expression mediated by up-regulation of microRNA miR-16 in lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4578-4592.

[15] Wang Q, Chen Y K, Lu H J, *et al.* Quercetin radiosensitizes non-small cell lung cancer cells through the regulation of miR-16-5p/WEE1 axis [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72 (5): 1012-1022.

[16] Wang X J, Li H, Wang H, *et al.* Quercetin attenuates high glucose-induced injury in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 by up-regulation of miR-29b [J]. *J Biochem*, 2020, 167(5): 495-502.

[17] Huang T H, Ren K Q, Ding G G, *et al.* miR-10a increases the cisplatin resistance of lung adenocarcinoma circulating tumor cells *via* targeting PIK3CA in the PI3K/Akt pathway [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(6): 1906-1914.