

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.04.004

# 槲皮素增强乳腺癌细胞化疗敏感度的研究

李世正<sup>1</sup>, 李 昆<sup>2</sup>, 张俊华<sup>1</sup>, 董 哲<sup>1</sup>

## Quercetin Sensitizes Breast Cancer Cells Chemotherapy *in Vitro*

Li Shizheng<sup>1</sup>, Li Kun<sup>2</sup>, Zhang Junhua<sup>1</sup>, Dong Zhe<sup>1</sup>

1. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China, 2. Department of Clinical Laboratory

**Abstract: Objective** To study the effects and its mechanism of Que on the chemotherapeutics sensitivity of human breast cancer cells. **Methods** The effect of Que on the growth of human breast cancer MCF-7 cells was examined by MTT assay. MCF-7 cells were treated by ADR with or without non-cytotoxic dose of Que. Then, the proliferative capacity of the cells was measured using MTT assay, the cell cycle was analysed using flow cytometry, the invasive capacity was measured by transwell chamber invasive model, HIF-1 $\alpha$  mRNA level was determined by RT-PCR, and HIF-1 $\alpha$  protein expression was detected by Western blot assay. **Results** Less than 0.7  $\mu$ M Que had non-cytotoxic effect on the growth MCF-7 cells. Compared with ADR alone action on MCF-7 cells, 0.7  $\mu$ M Que could enhance inhibitory rate of cell growth, more apoptotic cells, inhibitory capability, and expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein with the same dose of ADR. **Conclusion** Que has potential application in the treatment of chemotherapy-resistant breast cancer.

**Key words:** Quercetin; Breast cancer; Chemotherapy

**摘要:目的** 探讨槲皮素(quecetin, Que)对乳腺癌细胞化疗药物敏感度的影响及其可能的机制。**方法** MTT 法检测不同浓度 Que 对人乳腺癌 MCF-7 细胞生长的影响, 单用阿霉素(adriamycin, ADR)或 ADR 联合无毒剂量 Que 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞, MTT 法检测药物对细胞的增殖抑制作用, 流式细胞法检测细胞凋亡率; Transwell 小室法检测细胞侵袭能力的变化; RT-PCR 法及 Western blot 法分别检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) mRNA 水平和蛋白水平的表达变化。**结果** 不高于 0.7  $\mu$ M Que 对细胞生长无影响。与单用 ADR 组相比较, 0.7  $\mu$ M Que 与 ADR 联用可提高 ADR 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制率、诱导其细胞凋亡、降低其体外侵袭和转移能力、下调 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达。**结论** Que 能够增强人乳腺癌 MCF-7 细胞化疗敏感度, 其机制可能与下调该细胞 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达有关。

**关键词:** 槲皮素; 乳腺癌; 化疗增敏

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)04-0381-04

## 0 引言

目前, 乳腺癌已进入综合治疗时代, 手术治疗、化学治疗和放射治疗成为乳腺癌的重要治疗手段。随着各类新药的开发及基础研究的进展, 化学治疗在乳腺癌的综合治疗中占有重要的地位。但是, 临床上许多乳腺癌患者在经历了最初有效的化学治疗后, 最终仍难免于复发, 其主要原因源于多药耐药所引起的肿瘤细胞对化疗药物的不敏感。因此, 联合用药以增加化疗敏感度成为乳腺癌治疗领域内的研究热点之一。本研究观察了 Que 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响, 并联合临床常用治疗乳腺癌的药物 ADR, 检测 Que 增强 ADR 诱导乳腺癌 MCF-7

细胞凋亡的作用, 并对其机制进行初步探讨, 以期为乳腺癌的临床治疗提供新的思路和方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Que 购于 Sigma 公司, 用二甲基亚砜(DMSO)配成贮存液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 实验时用 1640 培养液稀释; 1640 培养液、FBS、青链霉素均购于 Gibco 公司; 动物 RNA out 购于天泽基因工程公司; HIF-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 引物序列由上海生物工程公司合成; HIF-1 $\alpha$  鼠抗人单克隆抗体购于 Santa cruz 公司;  $\beta$ -actin 兔抗人单克隆抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 人乳腺癌 MCF-7 细胞购于上海索研生物技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Que 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

收稿日期: 2011-08-01; 修回日期: 2011-10-25

作者单位: 1. 121001 辽宁锦州, 辽宁医学院附属第一医院普外科, 2. 检验科

作者简介: 李世正(1980-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤机制和中药药理研究

37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下,人乳腺癌 MCF-7 细胞培养于 10% 1640 培养液中(含 10% FBS 和 100 u/ml 青链霉素),每 3 d 换液 1 次。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/ml,于 96 孔板内每孔接种 150 μl,MTT 法进行实验所需 Que 浓度筛选实验。设置的 Que 槲皮素浓度梯度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、5、10、20、30、40、50、60、70 μM,作用时间为 36 h,同时设置未加 Que 的为对照组。检测方法:实验中的每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml,用 pH 7.4 的 PBS 配制),37℃继续孵育 4 h,吸弃孔内上清液,每孔加 200 μl DMSO,振荡摇匀使结晶物充分溶解,选择 390 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(OD)值。细胞增殖率=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。实验结果显示,Que 浓度≤0.7 μM 对细胞生长无影响,Que 浓度在 0.8~40 μM 对细胞生长具有促进作用,Que≥50 μM 对细胞生长具有抑制作用。因此,本实验选用终浓度为 0.7 μM 的 Que 进行研究。

1.2.2 细胞培养及处理 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下,人乳腺癌 MCF-7 细胞培养于 10% 1640 培养液中,每 3d 换液 1 次。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup> ml,于 96 孔板内每孔接种 150 μl,4 h 贴壁后进行实验。实验分以下 3 组:(1)对照组;(2)MCF-7 + ADR 组;(3)MCF-7 + ADR + 0.7 μM Que 组。设置的 ADR 浓度梯度为 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μg/ml。

1.2.3 MTT 法检测各组细胞增殖抑制率 各组分别于孵育 36 h 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率。方法同 1.2.1。细胞增殖抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。采用 excel 分析各组细胞半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。Que 增敏倍数=IC<sub>50</sub>(ADR)/IC<sub>50</sub>(ADR+Que)。

1.2.4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率 选择 ADR 浓度为 2.5 μg/ml 为代表作为研究对象。各组细胞于培养 36 h 时进行收集,用 PBS 洗涤 2 次,70%冰乙醇固定过夜,再经 PBS 洗涤 2 次,离心,加入含有 100 μg/ml RNA 酶和 50 μg/ml PI 的混合液 1 ml,重新悬浮细胞,室温避光孵育 20min,流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。

1.2.5 细胞体外侵袭实验 选择 ADR 浓度为 2.5 μg/ml 为代表作为研究对象。在 Transwell 小室滤膜的上表面铺 100 μl 基底膜(matrigel),于 37℃作用 1 h 备用,将各组细胞悬液 200 μl 加入小室的上室中,使细胞总数达到 4×10<sup>4</sup> 个,下室加入 10%DMEM,于 37℃培养箱孵育 36 h,用棉签擦净膜上表面细胞,HE 染色后,在倒置显微镜下观察。

1.2.6 RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 的表达 选择 ADR 浓度为 2.5 μg/ml 为代表作为研究对象。各组细胞于孵育 36 h 时进行收集,提取总 RNA,测定相应 RNA 含量并分别稀释至相同的终浓度。RT-PCR 按 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒进行操作。HIF-1α 引物序列:上游引物序列为 5'-AGAAACCT ATGACCTGCT-3',下游引物序列为 5'-AAGCATCCTGTACTGT CCTGTG-3',扩增产物大小为 287 bp;β-actin 为内参照,上游引物序列为 5'-TCATGTTTGAGACCTTCAA-3',下游引物序列为 5'-GTCTTTGCGGATGTC-CACG-3',扩增产物大小为 512 bp。扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶成像系统成像,比较目的条带之间及目的条带与同时扩增的 β-actin 条带亮度,以目的条带亮度较高示 HIF-1α mRNA 含量较高。

1.2.7 Western blot 检测 HIF-1α 蛋白的表达 选择 ADR 浓度为 2.5 μg/ml 为代表作为研究对象。各组细胞于孵育 36 h 时进行收集,提取总蛋白,测定相应蛋白浓度并分别稀释至相同的终浓度。取等量蛋白泳道上样,聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳后转膜,封闭液封闭,抗 HIF-1α(1:1 000)及 β-actin(1:200)4℃下孵育过夜,于二抗室温下孵育 2 h,增强化学发光剂显色,自动电泳凝胶成像分析仪采集图像,比较目的条带之间亮度,以目的条带亮度较高示 HIF-1α 蛋白含量较高。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 10.0 统计软件,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Que 对 ADR 细胞毒作用的影响

ADR 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞后,具有较强的细胞毒性,从而杀伤肿瘤细胞。当 0.7 μM 的 Que 与同样剂量的 ADR 联合使用后,显著增强了 ADR 的细胞毒作用,其增敏倍数为 1.49 倍,见图 1。

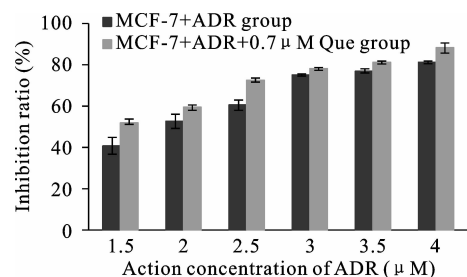


图 1 Que 对 ADR 细胞毒作用的影响

Figure 1 The cytotoxic effect of ADR with or without Que

2.2 Que 对 ADR 诱导细胞凋亡的影响

ADR 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞后,能够明显诱导细胞凋亡。当 0.7 μM 的 Que 与同样剂量的 ADR 联合使用后,显著增强了 ADR 的诱导细胞凋亡作用,起到化疗增敏的作用,见图 2。

2.3 Que 对 ADR 抑制细胞侵袭的影响

ADR 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞后,降低了细胞的侵袭力,从而达抑制细胞侵袭和转移的目的。当 0.7 μM 的 Que 与同样剂量的 ADR 联合使用后,显著降低了细胞的侵袭力,起到了化疗增敏的作用,见图 3。

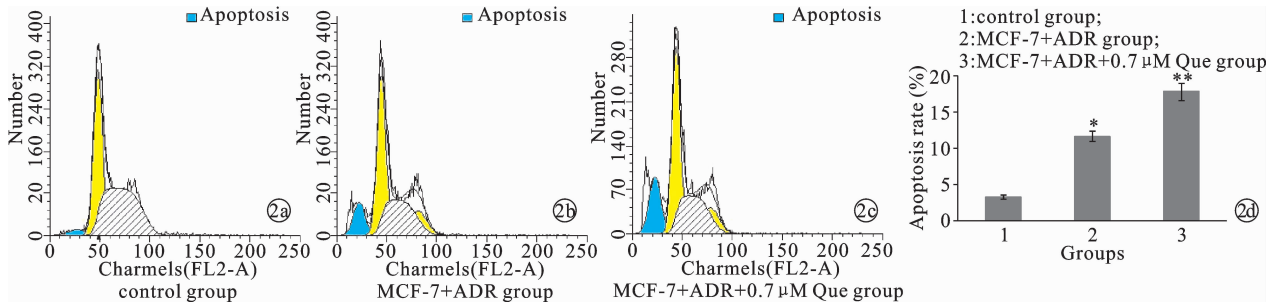
2.4 各组细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白的表达

ADR 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞后,降低了

HIF-1α mRNA 和蛋白的表达,从而达到杀死肿瘤细胞的目的。当 0.7 μM 的 Que 与同样剂量的 ADR 联合使用后,显著降低了 HIF-1α mRNA 和蛋白的表达,从而起到化疗增敏的作用,见图 4。

3 讨论

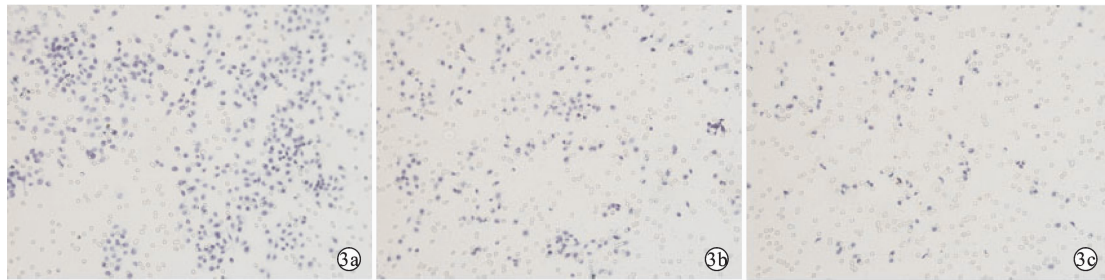
实体肿瘤由于生长迅速,代谢旺盛,处于相对缺氧状态,为解决肿瘤细胞自身所造成的缺氧与需氧的矛盾,肿瘤细胞经历了以下变化:(1)血管生成因子增多和血管生成抑制因子减少促使新生血管形成以保证肿瘤细胞有相对充足的氧供应;(2)糖运输增加和糖酵解增强以使肿瘤细胞有足够的能量供应;(3)抗凋亡因子增加和促凋亡因子减少打破了生存



Compared with control group, \* : P<0.05, \*\* : P<0.01

图 2 Que 对 ADR 诱导细胞凋亡的影响

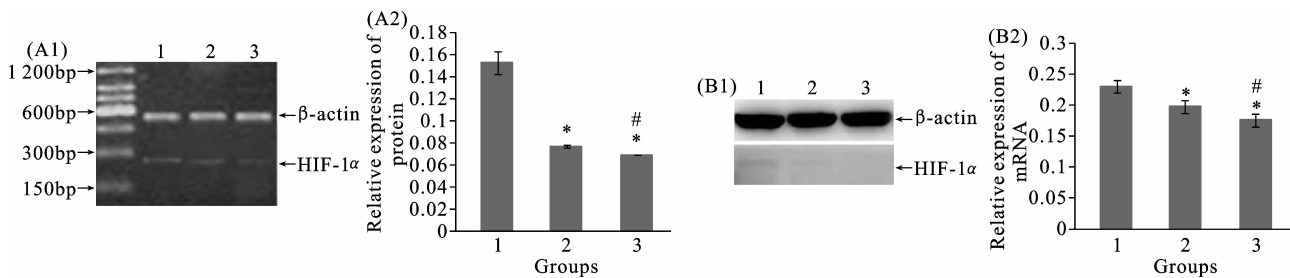
Figure 2 The apoptotic effect of ADR with or without Que



3a: control group; 3b: MCF-7 + ADR group; 3c: MCF-7 + ADR + 0.7 μM Que group

图 3 Que 对 ADR 抑制细胞侵袭的影响

Figure 3 The invasive effect of ADR with or without Que



1: control group; 2: MCF-7 + ADR group; 3: MCF-7 + ADR + 0.7 μM Que group

Compared with control group, \* : P<0.05; compared with MCF-7 + ADR group, # : P<0.05

图 4 各组细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白的表达

Figure 4 The expression of HIF-1α mRNA and protein in different groups

和凋亡的平衡以使肿瘤细胞适应不利的生存环境,从而促进肿瘤细胞进一步增殖、转移、以及抵抗放疗和化疗的杀伤作用<sup>[1-5]</sup>。HIF-1 是缺氧激活的转录因子,对缺氧刺激具有特异的感受性并广泛参与缺氧对多种基因转录的诱导。HIF-1 是由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成的异源二聚体,HIF-1 $\alpha$  为调节亚单位,氧对 HIF-1 的调节主要是通过该单位实现的。近年来研究发现,HIF-1 $\alpha$  是实体肿瘤生长的主要调控因子之一,其通过转录激活下游的靶基因参与肿瘤生长、血管生成、转移和侵袭以及化疗药物的抵抗。但是,由于肿瘤细胞的起源和周围微环境的差异等诸多因素影响,使得 HIF-1 $\alpha$  在不同肿瘤细胞中的表达调控及其作用机制存在着复杂性,其中,对乳腺癌的影响主要表现为促进其侵袭、转移以及对化疗药物的敏感度降低<sup>[6-9]</sup>,HIF-1 $\alpha$  的表达水平直接关系到乳腺癌的预后状况。

槲皮素是一种黄酮类化合物,广泛分布于自然界各种植物的花、叶、果实之中,易于提取、分离及检测。我们前期工作研究发现<sup>[10-11]</sup>,槲皮素能够抑制人乳腺癌细胞的体外增殖、诱导其细胞凋亡、降低其体外侵袭和转移能力。本研究首先筛选对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖无毒剂量的槲皮素,然后联合临床常用于治疗乳腺癌的药物 ADR 作用于人乳腺癌 MCF-7 细胞,结果发现,Que 能够通过下调该细胞 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白的表达提高 ADR 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制率、诱导其细胞凋亡、降低其体外侵袭和转移能力,从而增强人乳腺癌 MCF-7 细胞化疗敏感度。但其能否应用于人乳腺癌的临床治疗还需要进行进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Greco O, Marples B, Joiner MC, et al. How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(3): 312-325.

- [2] Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Mol Med Today*, 2000, 6(4): 157-162.
- [3] Semenza, GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(2): 71-103.
- [4] Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumor growth [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(1): 38-47.
- [5] Papandreou I, Krishna C, Kaper F, et al. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3171-3178.
- [6] Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1831-1837.
- [7] Okada K, Osaki M, Araki K, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1  $\alpha$ ), VEGF-C and VEGF-D in non-invasion and invasive breast ductal carcinomas [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(4): 3003-3009.
- [8] Muñoz-Nájjar UM, Neurath KM, Vumbaca F, et al. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation [J]. *Oncogene*, 2006, 25(16): 2379-2392.
- [9] Li J, Shi M, Cao Y, et al. Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(4): 1341-1351.
- [10] Li SZ, Li K, Zhang JH, et al. Effect of quercetin on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell [J]. *Zhongguo Pu Wai Ji Chu Yu Lin Chuang Za Zhi*, 2009, 16(2): 124-128. [李世正, 李昆, 张俊华, 等. 槲皮素在人乳腺癌细胞中抑制增殖和诱导凋亡的作用 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2009, 16(2): 124-128.]
- [11] Li K, Li SZ, Zhang YL, et al. Effect of quercetin on proliferation and invasion of human breast carcinoma cell line MDA-MB-435S [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2009, 36(7): 549-551. [李昆, 李世正, 张蕴莉, 等. 槲皮素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 增殖及侵袭力的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(7): 549-551.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 周永红]