

肖兰飞,高继萍,闫晓如,等. 槲皮素对口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及 PI3K/AKT 信号通路的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 30-34.

Xiao LF, Gao JP, Yan XR, et al. Effect of quercetin on cell proliferation, migration, and invasion and PI3K/AKT signaling pathway regulation in the oral cancer cell line Tca-8113 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 30-34.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 005

槲皮素对口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及 PI3K/AKT 信号通路的调控作用

肖兰飞¹,高继萍¹,闫晓如¹,王晓堂¹,续国强¹,宋国华^{1,2*}

(1.山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001;
2.山西医科大学附属精神卫生医院,太原 030001)

【摘要】 目的 研究槲皮素对 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭功能的影响及 PI3K/AKT 通路的调控作用。**方法** 体外培养 Tca-8113 细胞,将细胞分为对照组和槲皮素(50 μmol/L)处理组。采用 CCK-8 实验检测细胞增殖能力;Transwell(添加基质胶)检测细胞迁移(侵袭)情况;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中 *PTEN*、*AKT*、*FOXO1* 以及 *BCL2L11* mRNA 表达,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 FOXO1、p-FOXO1、AKT、p-AKT、PTEN 和 BCL2L11 蛋白表达。**结果** 与对照组相比,槲皮素处理组 Tca-8113 细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著降低,*PTEN* 和 *BCL2L11* mRNA 和蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$),*FOXO1* 和 *AKT* 磷酸化水平显著下调($P<0.01$),但 *AKT* 和 *FOXO1* mRNA 表达水平无显著差异。**结论** 槲皮素可抑制 Tca-8113 细胞增殖、迁移及侵袭,其机制可能是槲皮素促进 *PTEN* 的表达,负调控 PI3K/AKT 通路减弱 *FOXO1* 的磷酸化水平,引起 *BCL2L11* 的表达增加实现的。

【关键词】 槲皮素;PI3K/AKT 通路;增殖;迁移;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 06-0030-05

Effect of quercetin on cell proliferation, migration, and invasion and PI3K/AKT signaling pathway regulation in the oral cancer cell line Tca-8113

XIAO Lanfei¹, GAO Jiping¹, YAN Xiaoru¹, WANG Xiaotang¹, XU Guoqiang¹, SONG Guohua^{1,2*}

(1.Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Models, Taiyuan 030001, China. 2. Mental Health School Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of quercetin on cell proliferation, migration, and invasion and PI3K/AKT pathway regulation in the oral cancer cell line Tca-8113. **Methods** Tca-8113 cells were cultured *in vitro* and divided into a control group and quercetin (50 μmol/L) treatment group. A CCK-8 assay was used to detect cell proliferation; a Transwell assay (with Matrigel) was used to detect cell migration (invasion); quantitative real-time polymerase chain reaction was used to detect the expression of *PTEN*, *AKT*, *FOXO1*, and *BCL2L11* mRNA; and Western blot was used to detect FOXO1, p-FOXO1, AKT, p-AKT, PTEN, and BCL2L11 protein expression. **Results** Compared with the control group, the proliferation, migration, and invasion abilities of Tca-8113 cells in the quercetin treatment group

【基金项目】国家自然科学基金(31772551)。

【作者简介】肖兰飞(1995—),男,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:1002186658@qq.com

【通信作者】宋国华(1973—),女,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:ykdsgh@163.com

were significantly reduced; the *PTEN* and *BCL2L11* mRNA and protein expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.05$); and the phosphorylated *FOXO1* and *AKT* levels were significantly down-regulated ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in the *AKT* and *FOXO1* mRNA expression levels between the two groups. **Conclusions** Quercetin can inhibit the proliferation, migration, and invasion of Tca-8113 cells. In terms of the underlying mechanism, quercetin may promote the expression of *PTEN* and negatively regulate the PI3K/AKT pathway to reduce the phosphorylation level of *FOXO1*, causing an increase in the expression of *BCL2L11*.

【Keywords】 quercetin; PI3K/AKT pathway; proliferation; migration; invasion

口腔癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率高,预后差^[1]。尽管口腔癌的预后和治疗取得了很大的进展,但其 5 年生存率仍低于 63%^[2]。因此,寻找疗效确切的抗口腔癌药物,可能成为提高口腔癌治愈率的重要研究方向。近年来,已有研究表明传统中医药在肿瘤治疗中发挥着重要的作用^[3]。槲皮素是广泛存在于我们日常饮食中一种植源性黄酮类化合物,它通过促凋亡作用和抑制多种癌症的发生发展显示出抗癌潜能^[4]。研究发现,槲皮素可通过线粒体和内质网信号通路诱导人口腔癌 SAS 细胞凋亡^[5]。也有研究表明,槲皮素在体外实验可有效抑制口腔癌 SCC-25 细胞生长、迁移和侵袭,其分子机制是通过细胞周期阻滞和线粒体介导的凋亡实现的^[6]。PI3K/AKT 与癌细胞增殖和凋亡、周期调控、侵袭转移以及化放疗抗拒密切相关,在肿瘤的发生发展中起关键作用^[6-8]。目前尚无 PI3K/AKT 信号通路在槲皮素对口腔癌细胞生物学行为中作用的研究。因此,本研究探讨了槲皮素对口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭功能的影响及对 PI3K/AKT 信号通路的调控作用,旨在为口腔癌的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

本实验所使用的人口腔癌细胞系 Tca-8113 购自武汉博士德生物公司。

1.2 主要试剂与仪器

槲皮素购自上海 Acme 公司;CCK-8 试剂盒购自上海翊圣公司;Transwell 小室与 Matrigel 基底膜基质均购自美国 Corning 公司;TRIzol、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 与 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自日本 TaKaRa 公司;RIPA 增强型裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒均购自武汉博士德生物公司;anti-PTEN、anti-AKT 和 anti-FOXO1 一抗均购自 Proteintech 公司;anti-p-AKT 和 anti-p-

FOXO1 购自 Wanleibio 公司;anti-BCL2L11 和 β -actin 均购自美国 CST 公司,货号分别为:22034-1-AP、10176-2-AP、18592-1-AP、WLP001a、WL03634、2933、4970 T。CO₂ 细胞培养箱购自日本 Sanyo 公司;微孔分光光度计 Epoch 购自美国 Bio-tek 公司;实时荧光定量 PCR 仪 Step One Plus 购自美国 ABI 公司;普通 PCR 仪和蛋白垂直电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;化学发光成像仪购自英国 Yngene 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞系的选择

选用 3 种不同分化类型的口腔癌细胞系进行了槲皮素处理预实验。与其余两种细胞系相比,Tca-8113 作为一种低分化的口腔癌细胞系,其对于槲皮素的处理更加敏感,因此我们选用 Tca-8113 作为实验对象。此外,Tca-8113 作为经典的细胞系也在口腔癌研究中被广泛应用^[9]。

1.3.2 细胞的培养与处理

将 Tca-8113 细胞培养在添加有 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,培养温度为 37℃,二氧化碳含量为 5%。将细胞分为对照组和槲皮素处理组,槲皮素处理组细胞依据文献报道,选择槲皮素的最佳作用浓度为 50 μ mol/L^[10],不做任何处理的细胞(即 0 μ mol/L 槲皮素)作为对照组。

1.3.3 细胞增殖检测

胰酶消化细胞后,调整细胞个数为 5×10^4 /mL。用移液器吸取 100 μ L 细胞悬液加入 96 孔板中,药物处理 24、48、72 h,每组设置 5 个复孔。处理结束后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L 后置于 37℃ 培养箱孵育 2 h。酶标仪检测 450 nm 光吸收度(optical density, OD),细胞增殖能力根据下述公式计算:细胞增殖能力 = [(实验孔 - 空白孔)/(对照孔 - 空白孔)] $\times 100\%$ 。

1.3.4 Transwell(添加基质胶)检测细胞的迁移(侵袭)能力

用 PBS 洗涤两次经处理的细胞,胰蛋白酶消化

离心后用不含 FBS 的培养基重悬细胞,调整细胞个数为 $5\times 10^3/\text{mL}$ 。用移液器移取 $200\ \mu\text{L}$ 细胞悬液加入 Transwell 小室中, $700\ \mu\text{L}$ 含有 10% FBS 的培养基加入 24 孔板中,共培养 24 h。培养结束后,用棉签从小室中除去未迁移的细胞,PBS 洗涤一次,4% 多聚甲醛固定 30 min,随后 0.1% 结晶紫染液染色 15~30 min,PBS 缓慢轻柔的洗涤一次。每个小室随机选取 5 个视野进行统计学分析。

1.3.5 qRT-PCR 检测相关 mRNA 表达情况

将培养在六孔板中药物处理后的细胞加入 TRIzol 裂解,裂解完成后提取总 RNA,测定浓度与纯度后根据反转录试剂盒的说明将总 RNA 反转录成 cDNA,最后取反转录完成的 cDNA 进行 qRT-PCR 反应,以 GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

1.3.6 Western blot 检测处理前后相关蛋白表达情况

将培养在六孔板中药物处理后的细胞加入 RIPA 裂解,裂解完成后离心取上清,使用 BCA 试剂盒检测每组细胞的蛋白浓度,每组取 $15\ \mu\text{g}$ 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将其转移至 NC 膜,封闭液封闭后加入一抗于 4°C 孵育过夜,一抗孵育结束后二抗室温孵育 1 h,然后在曝光仪中进行曝光,Image J 分析蛋白的表达量,以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示结果。采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间比较,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素可抑制口腔癌细胞的生长

图 1 结果显示,在槲皮素刚作用于 Tca-8113 细

胞系时,对照组与槲皮素组具有相似的细胞增殖能力;给药后 24 h 细胞的增殖能力较对照组出现下降,直到 48 h 达到最低($P<0.01$)。给药后 72 h,细胞增殖能力出现一定上升,但与 48 h 相比没有差异($P>0.05$),这种现象可能是与随着药物作用时间的增加药效出现降低有关。从以上数据可以得出,槲皮素对 Tca-8113 的增殖可能具有抑制作用,且在 48 h 时效果较好,所以据此选用处理 48 h 作为后续实验的作用时间。

2.2 槲皮素可抑制口腔癌细胞迁移和侵袭

图 2A 显示,与对照组相比,槲皮素处理组 Tca-8113 细胞迁移的数目减少,说明细胞的迁移能力显著降低($P<0.001$);图 2B 侵袭结果显示,槲皮素处理组 Tca-8113 细胞侵袭的数目也出现下降,说明槲皮素也抑制细胞的侵袭能力($P<0.001$),此结果表明槲皮素可以抑制 Tca-8113 细胞的迁移与侵袭。

2.3 槲皮素处理前后细胞 PTEN、AKT、FOXO1、BCL2L11 的表达

如图 3A 结果显示,与对照组相比,槲皮素处理组 PTEN 和 BCL2L11 mRNA 表达水平均显著上调($P<0.05$),但 AKT 和 FOXO1 mRNA 表达水平无显著差异。图 3B 和 3C 结果显示槲皮素处理组 PTEN 和 BCL2L11 蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$),FOXO1 和 AKT 磷酸化水平显著下调($P<0.01$)。

3 讨论

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔癌中最为常见的一种类型,由于其发病部位位于口腔,通过外科手术切除病变会严重影响患者的美观,所以亟需一种合理的治疗方式^[11]。槲皮素是研究较多的一种中药单体,具有抗癌的潜力,已成为一种潜在的抗癌治疗剂^[12]。槲皮素被认为可以诱导包括口腔癌

表 1 各基因引物序列
Table 1 Primer sequences of genes

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
AKT	F:5'-TGACCATGAACGAGTTTGAGTA-3'
	R:5'-GAGGATCTTCATGGCGTAGTAG-3'
FOXO1	F:5'-AAACACCAAGTTGAATTACCCC-3'
	R:5'-TCGACTTATTGTCTGAAGTGT-3'
PTEN	F:5'-GACCAGAGACAAAAAGGGAGTA-3'
	R:5'-ACAAACTGAGGATTGCAAGTTC-3'
BCL2L11	F:5'-AAGGTAATCCTGAAGGCAATCA-3'
	R:5'-CTCATAAAGATGAAAAGCGGGG-3'
GAPDH	F:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	R:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'

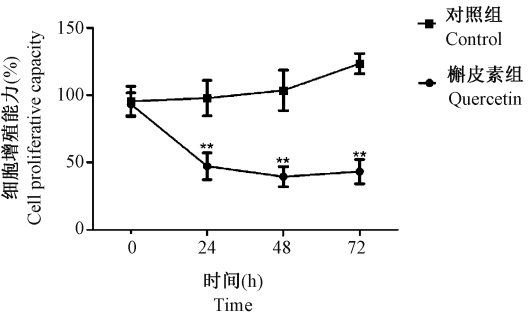
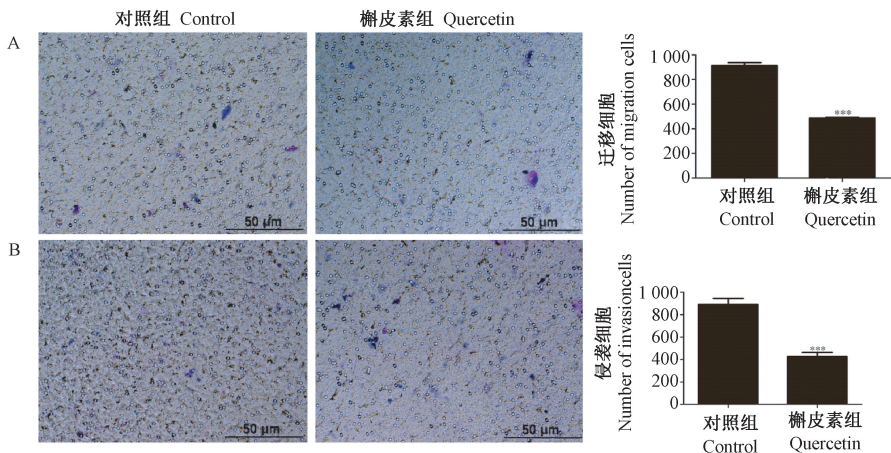


图 1 CCK-8 实验检测槲皮素对 Tca-8113 细胞增殖的影响
Figure 1 CCK-8 assay was used to detect the effect of quercetin on Tca-8113 cell proliferation

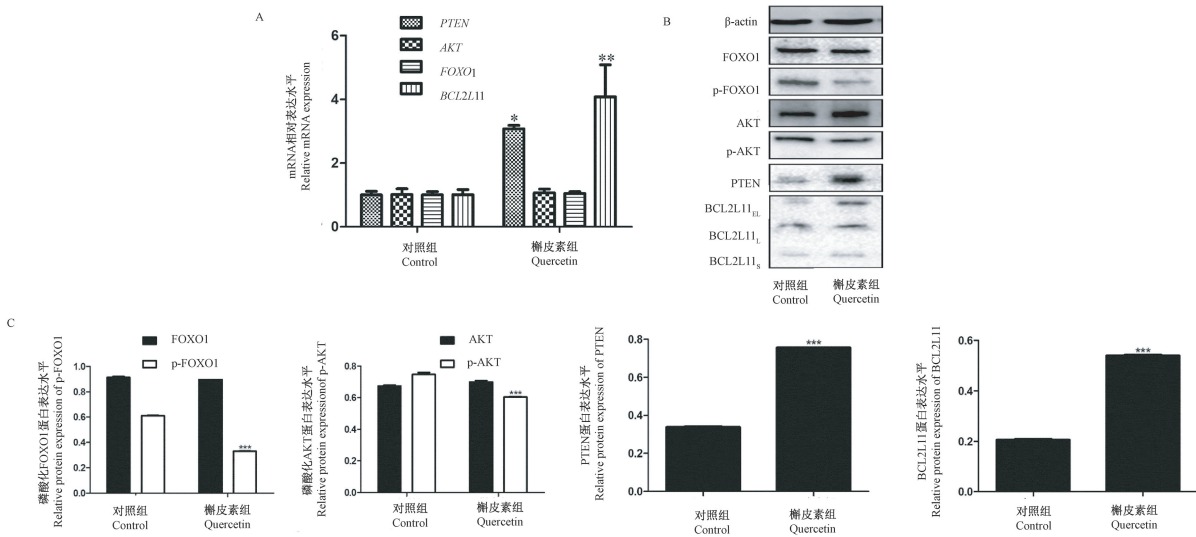


注:A;Transwell 实验检测 Tca-8113 细胞迁移数目及统计图;B;Transwell 实验检测 Tca-8113 细胞侵袭数目及统计图。与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 2 Transwell(添加基质胶)检测 Tca-8113 细胞的迁移(侵袭)能力

Note. A, Transwell assay was used to detect the migration cell number and its statistics of Tca-8113. B, Transwell assay was used to detect the invasion cell number and its statistics of Tca-8113. Compared with control, *** $P<0.001$.

Figure 2 Transwell (add matrigel) to detect migration (invasion) ability of Tca-8113 cell



注:A;qRT-PCR 检测 Tca-8113 各组细胞中 *PTEN*、*AKT*、*FOXO1*、*BCL2L11* mRNA 表达;B;Western blot 检测 Tca-8113 各组细胞 *PTEN*、*AKT*、*p-AKT*、*FOXO1*、*p-FOXO1*、*BCL2L11* 蛋白表达;C:蛋白表达量统计分析。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 3 *PTEN*、*AKT*、*FOXO1*、*BCL2L11* 在 Tca-8113 各组细胞中的表达

Note. A, The Tca-8113 cell mRNA expression of *PTEN*、*AKT*、*FOXO1*、*BCL2L11* determined by qRT-PCR. B, The Tca-8113 cell protein expression of *PTEN*、*AKT*、*p-AKT*、*FOXO1*、*p-FOXO1*、*BCL2L11* determined by Western blot. C, Statistical analysis of protein expression. Compared with control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Expression of *PTEN*、*AKT*、*FOXO1*、*BCL2L11* in Tca-8113 cell

细胞在内的许多癌细胞的生长抑制和细胞死亡^[5,10]。本研究通过探讨槲皮素对口腔癌细胞生物学行为的影响,发现槲皮素可以显著抑制 Tca-8113 细胞的增殖、迁移及侵袭,以上研究与以往研究结果一致。

PTEN 作为 PI3K/AKT 信号通路重要调控因

子,是 PI3K/AKT 信号通路的负调控蛋白,能够抑制 *PIP3* 去磷酸化转变为 *PIP2*,进而抑制 *AKT* 及其下游分子活化,阻止 PI3K/AKT 通路激活^[13-14]。已有文献表明槲皮素可以调控 *PTEN* 的表达以及调控 PI3K/AKT 通路诱导细胞凋亡^[7,15]。本研究利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测了 *PTEN* 和 *AKT*

mRNA 和蛋白水平表达,结果显示在槲皮素处理组中,口腔癌 Tca-8113 细胞中 *PTEN* mRNA 和蛋白表达均上调,相反,*AKT* 磷酸化水平显著下调。

FOXO1 属于叉形头转录因子的 O 亚型,充当肿瘤抑制因子,调节许多涉及凋亡反应、细胞周期调控、细胞分化和细胞代谢的生物学过程^[16]。作为主转录因子,*FOXO1* 通过 PI3K/AKT 信号通路进行调节,然后活化的 AKT 促使 *FOXO1* S256 位点处磷酸化(p-FOXO1),从而驱动自身与 14-3-3 二聚体结合,最后 *FOXO1* 从细胞核输出到细胞质^[17-18]。本研究结果显示,槲皮素处理组中,*FOXO1* 在 mRNA 水平上无显著差异,但 *FOXO1* 磷酸化水平显著降低,与 AKT 表达相一致。*BCL2L11* 是 *BCL2* 家族近年来颇受关注的一个含有 BH3 结构域的成员,该结构域对促进凋亡有重要作用,在许多抗肿瘤药物引起的肿瘤细胞凋亡中都观察到 *BCL2L11* 表达的升高^[19]。有研究表明磷酸化 *FOXO1* 负调控 *BCL2L11* 的表达,当位于 *BCL2L11* 启动子附近的两个保守的 *FOXO1* 结合位点发生突变以防止 *FOXO1* 结合时,这一点就基本消失了,证明了 *BCL2L11* 基因是 *FOXO1* 直接的靶标^[20-22]。本研究结果显示槲皮素处理组 *BCL2L11* mRNA 和蛋白水平表达均显著上调。这提示我们槲皮素对 PI3K/AKT 信号通路具有负调控作用。

综上所述,槲皮素可抑制口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移及侵袭能力,其机制可能是通过上调 *PTEN* 的表达,负调控 PI3K/AKT 通路减弱 *FOXO1* 的磷酸化水平,进而引起 *BCL2L11* 的表达增加实现的。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 60(4): 277-300.
- [2] Marcazzan S, Varoni EM, Blanco E, et al. Nanomedicine, an emerging therapeutic strategy for oral cancer therapy [J]. Oral Oncol, 2018, 76: 1-7.
- [3] 崔玮, 丁玲强, 曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.
- [4] Rauf A, Imran M, Khan IA, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review [J]. Phytother Res, 2018, 32(11): 2109-2130.
- [5] Ma YS, Yao CN, Liu HC, et al. Quercetin induced apoptosis of human oral cancer SAS cells through mitochondria and endoplasmic reticulum mediated signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9663-9672.
- [6] Chen SF, Nien S, Wu CH, et al. Reappraisal of the anticancer efficacy of quercetin in oral cancer cells [J]. J Chin Med Assoc, 2013, 76(3): 146-152.
- [7] Shen X, Si Y, Wang Z, et al. Quercetin inhibits the growth of human gastric cancer stem cells by inducing mitochondrial-dependent apoptosis through the inhibition of PI3K/Akt signaling [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(2): 619-626.
- [8] 徐利本, 吴朝阳, 王远东. PI3K/Akt 信号传导通路在肿瘤发生发展及治疗中的作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(1): 177-180.
- [9] 常凯, 高继萍, 宋晓娜, 等. miR-34c 在口腔鳞状细胞癌的表达及对 Tca8113 细胞生物学行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 15-20.
- [10] Zhao J, Fang Z, Zha Z, et al. Quercetin inhibits cell viability, migration and invasion by regulating miR-16/HOXA10 axis in oral cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 847: 11-18.
- [11] Soga D, Yoshida S, Shigama S, et al. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2013, 30(2): 579-583.
- [12] Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3177.
- [13] David M, Petit D, Bertoglio J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways [J]. Cell Cycle, 2012, 11(16): 3003-3010.
- [14] 孙德丰, 王莹, 杨彦琴, 等. 姜黄素增强 PTEN 野生型三阴性乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂敏感性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 28-33.
- [15] Li SZ, Qiao SF, Zhang JH, et al. Quercetin increase the chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin via PTEN/Akt pathway [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2015, 15(9): 1185-1189.
- [16] Kousteni S. FoxO1: a molecule for all seasons [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(5): 912-917.
- [17] Gerst F, Kaiser G, Panse M, et al. Protein kinase C delta regulates nuclear export of FOXO1 through phosphorylation of the chaperone 14-3-3 zeta [J]. Diabetologia, 2015, 58(12): 2819-2831.
- [18] 张洪开, 具英花, 徐韬钧, 等. PI3K 和 MAPK 信号通路对 A549 细胞 FOXO1 蛋白表达及其亚细胞定位的调节 [J]. 解剖科学进展, 2012, 18(2): 126-129, 133.
- [19] Mendez G, Policarpi C, Cenciarelli C, et al. Role of Bim in apoptosis induced in H460 lung tumor cells by the spindle poison Combretastatin-A4 [J]. Apoptosis, 2011, 16(9): 940-949.
- [20] Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons [J]. J Cell Biol, 2003, 162(4): 613-622.
- [21] Huang K, O'Neill KL, Li J, et al. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis [J]. Cell Res, 2019, 29(11): 942-952.
- [22] Zhang J, Huang K, O'Neill KL, et al. Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53 [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(6): e2266.

[收稿日期] 2020-12-24