

## 槲皮素对人胃癌 MKN45 细胞的抑制作用研究

付丽娜, 刘维红, 徐爱军, 宋丽杰

天津市第四中心医院 消化内科, 天津 300140

**摘要:** 目的 探讨槲皮素对人胃癌 MKN45 细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 取对数生长期的 MKN45 细胞分为对照组和 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素组。应用 MTT 比色法测定细胞活性, Hoechst 染色、流式细胞技术检测细胞凋亡, 比色法检测凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-9 表达。结果 槲皮素能显著抑制 MKN45 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 升高 Caspase-3、Caspase-9 基因表达水平。结论 槲皮素可通过增强 Caspase-3、Caspase-9 基因表达诱导人胃癌 MKN45 细胞凋亡。

**关键词:** 槲皮素; MKN45 细胞; 凋亡; Caspase-3; Caspase-9

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2017)06 - 0983 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.06.005

## Inhibition of quercetin on human gastric carcinoma MKN45 cells

FU Li-na, LIU Wei-hong, XU Ai-jun, SONG Li-jie

Department of Digestive Medicine, the Fourth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of quercetin on MKN45 cells. **Methods** MKN45 cells were divided into four groups: negative control group and quercetin groups (20, 40, and 80  $\mu\text{mol/L}$ ). Cell viability was measured by MTT colorimetric assay, apoptosis was detected by Hoechst staining and flow cytometry assay, and expression of apoptosis-related factors Caspase-3 and Caspase-9 were tested by colorimetric detection. **Results** Quercetin could obviously inhibit MKN45 cell proliferation and promote apoptosis, and could increase Caspase-3 and Caspase-9 gene expression levels. **Conclusion** Quercetin can induce gastric carcinoma MKN45 cells apoptosis by enhancing the expression of Caspase-3 and Caspase-9 gene.

**Key words:** quercetin; gastric carcinoma MKN45 cell; apoptosis; Caspase-3; Caspase-9

胃癌是消化道常见恶性肿瘤之一, 其发生与慢性胃炎密切相关, 目前以手术和化疗为主<sup>[1]</sup>。传统化疗药物能够诱导肿瘤细胞凋亡, 控制亚临床病灶和微转移灶, 但同时也具有较大的毒副作用<sup>[2-3]</sup>, 因此寻找一种毒副作用小且安全有效的药物尤为重要。槲皮素作为黄酮类化合物, 具有多种生物学功能, 包括抗炎、扩张冠状动脉、清除自由基、下调由活性氧介导的下游信号通路, 抑制多种恶性肿瘤细胞增殖等<sup>[4-5]</sup>。已有研究证实, 槲皮素能够抑制胃癌细胞的增殖<sup>[5]</sup>。本实验旨在研究槲皮素对胃癌 MKN45 细胞增殖和凋亡的影响, 探讨槲皮素在 MKN45 细胞凋亡中的作用机制。

### 1 材料和仪器

人胃癌细胞株 MKN45 (美国 ATCC 公司, 货号 TCP-1008), 青霉素、链霉素 (华北制药股份有限

公司, 批号分别为 A20070002、H13020650), 槲皮素 (美国 Sigma 公司, 质量分数 > 97%, 货号 PHR1488), RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司, 货号 SH30809.01B), 四甲基偶氮唑盐 (MTT, 美国 Sigma 公司, 货号 M2128), Annexin V FITC/PI (美国 BD 公司, 货号 556570)。Hoechst 凋亡染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G3680), Caspase-3、Caspase-9 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 G015-3、G009)。318C 酶标仪 (上海精密科学仪器有限公司)。

### 2 方法

#### 2.1 细胞培养

MKN45 细胞株培养在胎牛血清浓度为 10% 的 RPMI 1640 培养基中, 培养箱内温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  体积分数为 5%, 细胞贴壁生长, 取对数生长期的

收稿日期: 2017-02-03

基金项目: 天津市中医中西医结合科研课题 (2015054)

作者简介: 付丽娜, 女, 硕士, 研究方向为消化内科。Tel: (022)8555765 E-mail: songzhehuadr@163.com

细胞进行实验。

## 2.2 细胞分组

以正常培养液培养作为对照组；槲皮素组中槲皮素的浓度分别为 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ 。MKN45 细胞于不同培养基中培养 48 h 后进行相关检测。

## 2.3 MTT 法检测细胞存活率

MKN45 细胞  $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 、200  $\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板中，分为 5 组，空白组（调零组）没有细胞，只加培养液；各组细胞分别加入 0（对照组：正常细胞，不加任何干预）、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素，每组设 4 个复孔，培养 48 h 后，加入体积分数为 0.5% 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ，温育 4 h，吸弃上清液，加入 DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$ ，室温下振荡 20 min 后，在全自动酶标光度仪上进行比色，测定各孔 570 nm 的吸光度 ( $A$ ) 值，实验重复 3 次，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

## 2.4 Hoechst 染色观察细胞凋亡

MKN45 细胞培养 48 h 后，用 PBS 洗涤 2 次，在 150  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 中加入 2  $\mu\text{L}$  Hoechst 染液，避光、室温反应 5 min 后置于荧光显微镜下观察，放大倍数为 400 倍。活细胞呈均匀淡蓝色荧光，凋亡细胞的细胞核内染色质浓缩，镜下可见浓染致密的颗粒状荧光，呈亮蓝色荧光，计算细胞凋亡率。

$$\text{细胞凋亡率} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$$

## 2.5 流式细胞技术细胞凋亡检测

MKN45 细胞接种于 6 孔板中，分为 4 组，各组细胞分别加入 0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素，每组设 4 个复孔，培养 48 h 后，0.1% 胰酶消化后制备细胞悬液。1 000 r/min 离心后收集细胞，用 Annexin V-FITC 试剂盒中 binding buffer 悬浮细胞，调节细胞浓度为  $5 \times 10^5/\text{L}$ ，分别加入 Annexin 和 PI，混匀后孵育 20 min，于 1 h 内使用流式细胞仪检测细胞凋亡，以上操作均在暗室内避光进行。

## 2.6 Caspase 活性检测

MKN45 细胞接种于 6 孔板中，分为 4 组，各组细胞分别加入 0、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素，每组设 4 个复孔，培养 48 h 后，收集细胞并用 0.1% 胰酶消化，1 200 r/min 离心 10 min，收集细胞并用 PBS 冲洗 2 次，加入 30  $\mu\text{L}$  细胞裂解液后冰上孵育 20 min，10 000 r/min 离心 10 min，检测方法按试剂盒进行，Bradford 法作蛋白定量，读取 595 nm 吸光度 ( $A_{595 \text{ nm}}$ ) 值，再加入 50  $\mu\text{L}$  反应缓冲液和 5  $\mu\text{L}$  Caspase 底物，37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h，读取 405 nm 吸光

度 ( $A_{405 \text{ nm}}$ ) 值，计算 Caspase 活性。

$$\text{Caspase 活性} = A_{405 \text{ nm}} / A_{595 \text{ nm}}$$

## 2.7 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示，多组比较采用 One-way 方差分析，两组间比较采用 Student's  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度槲皮素对 MKN45 细胞存活率的影响

与对照组比较，不同浓度槲皮素组对 MKN45 细胞存活率差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、0.01)。随着槲皮素浓度的增加，抑制作用逐渐明显，提示槲皮素能够剂量相关性地抑制细胞存活，见表 1。

表 1 槲皮素对 MKN45 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )  
Table 1 Effect of quercetin on MKN45 cells viability by MTT assay ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$A$ 值	存活率/%
对照	—	$0.44 \pm 0.08$	$96.67 \pm 3.09$
槲皮素	20	$0.35 \pm 0.05$	$78.00 \pm 4.17^*$
	40	$0.30 \pm 0.02$	$64.67 \pm 3.79^{**}$
	80	$0.27 \pm 0.04$	$57.00 \pm 2.33^{**}$

与对照组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 3.2 Hoechst 核染色法检测 MKN45 细胞凋亡

对照组未见明显凋亡染色的细胞核，各槲皮素组细胞核呈亮蓝色荧光，见图 1。

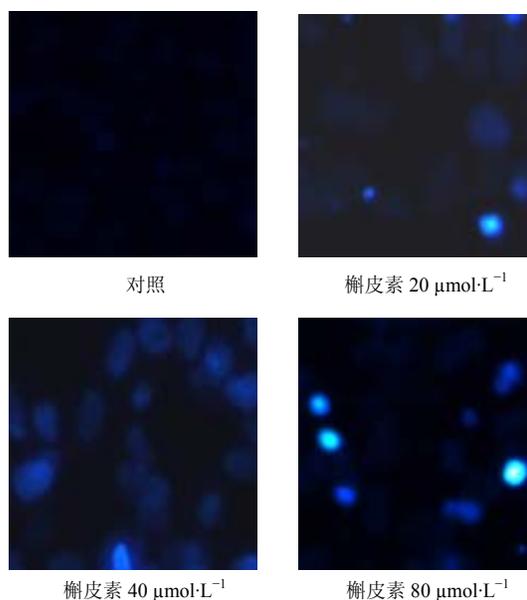


图 1 Hoechst 33258 核染色法检测 MKN45 细胞凋亡情况  
Fig. 1 Apoptosis of MKN45 cells determined by Hoechst staining assay

不同浓度槲皮素处理 MKN45 细胞后, 凋亡细胞比例逐渐增加, 与对照组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 见表 2。

表 2 不同浓度槲皮素对 MKN45 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Table 2 Effect of quercetin on apoptosis of MKN45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照	—	2.00 ± 1.06
槲皮素	20	20.43 ± 4.22%*
	40	37.00 ± 3.42%**
	80	57.00 ± 2.33%**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 3.3 流式细胞术检测 MKN45 细胞凋亡率

不同浓度槲皮素作用后能明显诱导 MKN45 细胞凋亡。随着槲皮素浓度升高, MKN45 细胞凋亡数量逐渐增加。槲皮素 20、40、80  $\mu\text{mol/L}$  组凋亡细胞率分别为 (18.93 ± 3.77)%、(29.68 ± 2.05)%、(45.48 ± 4.23)% , 与对照组 (1.03 ± 0.64)% 比较差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

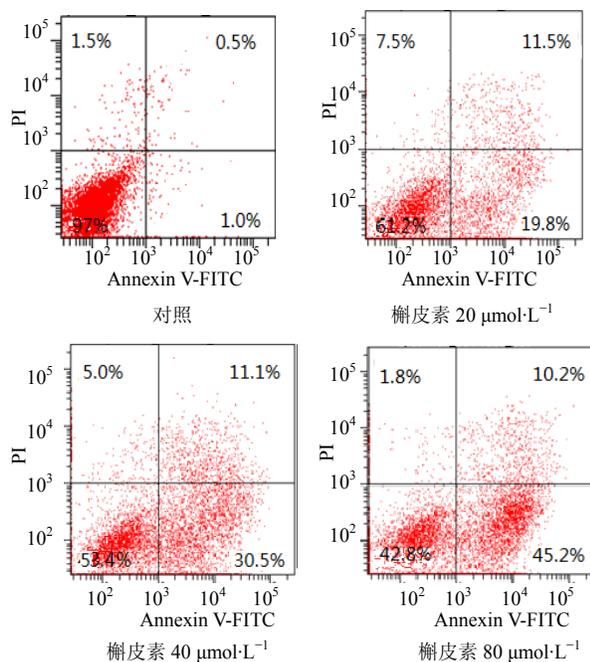


图 2 槲皮素对 MKN45 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of quercetin on apoptosis of MKN45 cells

### 3.4 不同浓度槲皮素对 MKN45 细胞内 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响

给予不同浓度槲皮素处理后, MKN45 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 表达量逐渐升高, 与对照组比

较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 槲皮素对 MKN45 细胞 Caspase-3、Caspase-9 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 3 Activity effect of Caspase-3 and Caspase-9 of quercetin on MKN45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Caspase-3/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$	Caspase-9/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$
对照	—	87.95 ± 3.53	97.39 ± 3.54
槲皮素	20	101.31 ± 2.53*	106.48 ± 2.63*
	40	111.63 ± 3.54**	114.76 ± 3.04**
	80	122.50 ± 3.76**	121.65 ± 2.95**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 4 讨论

胃癌是发病率和死亡率较高的消化道恶性肿瘤, 寻找一种毒副作用小且安全有效的抗癌药物尤为重要。中医药在肿瘤的治疗中应用广泛, 可以明显提高肿瘤治疗的疗效, 减轻化疗毒副作用和延长患者生存时间。选择合理有效的中药、并从分子生物学角度寻找中药作用靶点是目前研究热点<sup>[6]</sup>。药物化疗原理是通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥其治疗作用<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞对化疗药物的耐药性以及化疗药物的严重毒副作用严重影响了患者的生存质量, 所以从天然生物中开发不良反应小的抗肿瘤药物已成为治疗胃癌的重要发展战略之一<sup>[8]</sup>。

槲皮素具有广泛的生理和药理活性, 广泛分布于蔬菜、水果和常见中草药中, 其毒副作用小, 是一个很经济的黄酮类药物<sup>[9-10]</sup>。生理剂量的槲皮素能有效抑制单细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、细胞间黏附因子-1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附因子-1 (VCAM-1) 的基因表达, 有效逆转线粒体膜电位下降并抑制活性氧 (ROS) 浓度的增加, 从而发挥细胞保护作用<sup>[11]</sup>。有研究显示槲皮素能够抑制膀胱癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌细胞增殖<sup>[12]</sup>, 但该药物对消化系统肿瘤细胞侵袭的研究甚少。本结果显示, 槲皮素可明显抑制胃癌 MKN45 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 这种细胞保护作用呈浓度相关性, 提示槲皮素在胃癌的治疗中也是颇具应用前景的抗癌药物之一。

细胞凋亡是受基因控制的, 众多基因参与凋亡过程, Caspase-3 及 Caspase-9 是细胞凋亡通路的重要启动者和参与者。在许多肿瘤的发生过程中, Caspase-3、Caspase-9 表达率呈逐渐增加的趋势, 提

示 Caspase-3、Caspase-9 表达增加是肿瘤细胞凋亡的重要机制之一<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, 给予不同浓度槲皮素处理后, MKN45 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 表达量逐渐升高, 与对照组比较差异具有显著性, 证实了槲皮素能够诱导胃癌细胞凋亡。

综上所述, 槲皮素对胃癌 MKN45 细胞具有显著的抑制其增殖、诱导其凋亡的作用, 作用机制可能为升高 Caspase-3 和 Caspase-9 活性。

#### 参考文献

- [1] 苗儒林, 李子禹, 季加孚. 早期胃癌的规范化治疗 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(1): 16-19.
- [2] 戴广海, 郭晓川. 胃癌靶向治疗药物新进展 [J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(5): 260-263.
- [3] 吴胜春, 檀碧波, 吕品田. 等. 胃癌组织铂类药物体外化疗药敏性与多种耐药相关因子表达的关系 [J]. 广东医学, 2010, 31 (4): 470-473.
- [4] Lee M, McGeer EG, McGeer PL. Quercetin, not caffeine, is a major neuroprotective component in coffee [J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 5(46): 113-123
- [5] 贾雪峰, 陈文明, 孙道萍, 等. 槲皮素抑制胃癌上皮-间质转化的研究 [J]. 海南医学院学报, 2015, 21(8): 1030-1033.
- [6] She J J, Zhang P G, Wang X, *et al.* Side population cells isolated from KATO III human gastric cancer cell line have cancer stem cell-like characteristics [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(33): 4610-4617.
- [7] Rizi B S, Nagrath D. Linking omentum and ovarian cancer: NO. [J]. *Oncoscience*. 2015, 2(10): 797-798.
- [8] Power L, Lefas G, Lambert P, *et al.* Hormone use after nonserous epithelial ovarian cancer: overall and disease-free survival [J]. *Obstet Gynecol*, 2016, 127(5): 837-847.
- [9] Jing Z, Wang Z, Li X, *et al.* Protective Effect of quercetin on posttraumatic cardiac injury [J]. *Sci Rep*, 2016, 29(6): 30812.
- [10] Kanazawa L K, Vecchia D D, Wendler E M, Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 28(99): 79-86.
- [11] 秦 燕, 何丽娅, 陈 勇, 等. 槲皮素对人胃癌 MGC-803 细胞中瘦素、瘦素受体表达及 JAK-STAT 通路的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(1): 13-15.
- [12] 张志琴, 朱双雪. 槲皮素的药理活性与临床应用研究进展 [J]. 药学研究, 2013, 32(7): 400-402
- [13] Inserte J, Cardona M, Poncelas-Nozal M, *et al.* Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *J Cancer*, 2016, 7(3): 314-323.