

槲皮素对 SW620 细胞迁移和侵袭的影响

黄文涛¹, 周 进^{1*}, 王贵玉²

(1. 武汉市第一医院药学部, 湖北 武汉 430000; 2. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤科, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 探索槲皮素对结直肠癌细胞 SW620 迁移和侵袭的影响。**方法** 不同浓度 (0、25、50、100 μmol/L) 槲皮素处理 SW620 细胞后, MTT 法检测细胞存活率, Transwell 法检测细胞迁移和侵袭, RT-PCR、Western blot 分别检测 STAT3 mRNA、蛋白表达。**结果** 槲皮素呈剂量和时间依赖性降低 SW620 细胞存活率、STAT3 mRNA 表达。最佳浓度、处理时间分别为 50 μmol/L、48 h, 细胞迁移和侵袭显著降低 ($P<0.05$)。敲低 STAT3, SW620 细胞存活率、迁移和侵袭数目明显减少 ($P<0.05$)。STAT3 过表达显著逆转槲皮素对细胞存活率、迁移和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$)。**结论** 槲皮素可通过调控 STAT3 表达来抑制 SW620 细胞迁移和侵袭。

关键词: 槲皮素; SW620 细胞; 迁移; 侵袭; STAT3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)09-2079-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.012

Effects of quercetin on the migration and invasion of SW620 cells

HUANG Wen-tao¹, ZHOU Jin^{1*}, WANG Gui-yu²

(1. Department of Pharmacy, The First Hospital of Wuhan, Wuhan 430000, China; 2. Department of Oncology, Cancer Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of quercetin on migration and invasion of colorectal cancer SW620 cells. **METHODS** SW620 cells were treated with different concentrations (0, 25, 50, 100 μmol/L) of quercetin, after which cell viability was detected by MTT assay, cell migration and invasion were detected by Transwell assay, STAT3 mRNA and protein expressions were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **RESULTS** Quercetin decreased SW620 cell viability and STAT3 mRNA expression in dose-dependent and time-dependent mannerso the optimal concentration and treatment time were determined to be 50 μmol/L and 48 h, repsectively, along with significantly reduced cell migration and invasion ($P<0.05$); and the cell viability, migration and invasion of SW620 cells were significantly redued when STAT3 was knocked down ($P<0.05$). The overexpression of STAT3 obviously reversed the inhibitory effects of quercetin on cell viability, migration and invasion ($P<0.05$). **CONCLUSION** Quercetin can inhibit the migration and invasion of SW620 cells by regulating STAT3 expression.

KEY WORDS: quercetin; SW620 cells; migration; invasion; STAT3

结直肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1],发病率在恶性肿瘤中排名第4位,死亡率居第5位^[2]。手术、放疗、化疗为结直肠癌主要治疗方式,但毒副作用较大,预后效果不佳^[3],故寻找毒副作用较小的高效药物具有重要意义。

槲皮素是一种存在于车前子、紫花地丁等多种

中药中的黄酮类化合物,具有抗菌消炎、保护心血管、抗肿瘤等作用^[4],能诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖,延长细胞周期,调节肿瘤相关基因表达,在乳腺癌、卵巢癌、肝癌等多种恶性肿瘤中发挥抑制作用^[5-7]。Avinaba等^[8]发现,槲皮素可通过调节 STAT3 信号通路来诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡;Yang等^[9]报道,槲皮素可通过调节 Akt/c-

收稿日期: 2018-12-05

作者简介: 黄文涛 (1979—),男,硕士,主管药师,研究方向为新制剂研发。Tel: 18627077301, E-mail: hnliuskzj@163.com

* 通信作者: 周 进 (1983—),男,硕士,主管药师,研究方向为药物制剂。Tel: (027) 61871268

Myc 信号通路来诱导结直肠癌 HT-29 细胞凋亡，使细胞周期停滞，从而抑制细胞增殖，但尚无关于槲皮素调控 STAT3 表达来影响结直肠癌 SW620 细胞迁移、侵袭的报道。因此，本实验观察槲皮素对 SW620 细胞活力、迁移、侵袭的抑制作用，以及对 STAT3 表达的影响，探讨相关作用机制。

1 材料

人正常结肠上皮细胞 NCM460、人结肠癌细胞 SW620 购自中国典型培养物保藏中心（CCTCC）。胎牛血清、RPMI-1640 培养基、二甲基亚砷（DMSO）购自美国 Gibco 公司；槲皮素、胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司；BCA 试剂盒、PBS 缓冲液、MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司；Transwell 小室购自美国 Corning 公司；β-actin、STAT3 一抗购自英国 Abcam 公司；HRP 二抗购自上海碧云天生物科技公司；Trizol 试剂、Lipofectamine TM 2000、SDS-PAGE 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司；TaKaRa 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司；PVDF 膜购自美国 Millipore 公司；ABI-7300 实时荧光定量 PCR 仪购自上海普迪生物技术有限公司；NanoDrop 微量核酸测定仪购自美国赛默飞世尔科技公司；凝胶成像分析仪购自柯达公司。

2 方法

2.1 细胞培养及转染 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 下培养 NCM460、SW620 细胞，每 2 d 换液 1 次，细胞汇合度达到 80% 后用 0.25% 胰酶消化并传代，待细胞生长状态稳定后取对数生长期细胞用于后续实验。收集汇合度约 50% 的 SW620 细胞，按照 Lipofectamine TM 2000 转染试剂说明书分别加入转染试剂 Lipofectamine 与 si-NC、si-STAT3、pcDNA、STAT3，并依次标记为 si-NC 组、si-STAT3 组、槲皮素+pcDNA 组、槲皮素+STAT3 组。

2.2 给药及分组 DMSO 溶解槲皮素，配成 20 mmol/L 贮备液，于 -20 ℃ 下保存，使用时用 RPMI-1640 培养液稀释，用于细胞培养。将其加入到 SW620 细胞培养液中，槲皮素终浓度分别为 0、25、50、100 μmol/L，重复 5 次，各组细胞置于细胞培养箱中，37 ℃、5% CO₂ 下常规培养 24 h，50 μmol/L 槲皮素处理的细胞分别培养 0、24、48、72 h，每组重复 5 次。

2.3 细胞存活率检测 采用 MTT 法。取槲皮素 0 μmol/L 组、25 μmol/L 组、50 μmol/L 组、

100 μmol/L 组，si-NC 组，si-STAT3 组细胞，在转染后的槲皮素+pcDNA 组和槲皮素+STAT3 组细胞培养液中加入槲皮素，调整终浓度为 50 μmol/L。培养 24 h 后，各组细胞加入 20 μL MTT 孵育 4 h，弃去培养基，每孔加 150 μL DMSO，振荡溶解 10 min，酶标仪检测 490 nm 波长处各孔光密度（OD）值，计算存活率，公式为存活率=（实验组 OD 值/对照组 OD 值）×100%。

2.4 细胞迁移和侵袭检测 采用 Transwell 法。各组细胞加入 2.5 μg/mL 丝裂霉素 C 干预 24 h 以抑制细胞分裂，培养结束后加入适量胰酶消化，PBS 缓冲液清洗后用无血清培养基重悬细胞，调整密度为 3×10⁴/mL，取 200 μL 接种于包被、未包被基质胶的小室中，放到含完全培养基的下室中常规培养 24 h，弃去多余培养基，PBS 缓冲液洗涤后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min，0.1% 结晶紫染色 10 min，显微镜观察并随机选取 6 个视野拍照，计数。

2.5 STAT3 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法。收集各组对数生长期的细胞，充分研磨后加入 Trizol 试剂提取总 RNA，NanoDrop 微量核酸测定仪检测 RNA 纯度和浓度，凝胶电泳系统检测 RNA 完整性。TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，按照 TaKaRa 荧光定量试剂盒使用说明配制反应体系，以 β-actin 为内参，置于 ABI-7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增，每个样品重复 3 次，引物序列见表 1，采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	5'-3'
STAT3	正向 TGTCCGTCGTGGATCTGAC
STAT3	反向 CCTGCTTACCACCTTCTTG
β-actin	正向 CTCCTGGCAAGAATGGAGAT
β-actin	反向 AATCCACGAGCACCCTGA

2.6 STAT3 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。各组细胞超声粉碎后，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解 5 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，收集上清，BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 50 μL 进行 SDS-PAGE 电泳，结束后转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉 PBST 封闭 2 h，加入稀释过的 β-actin 或 STAT3 单克隆抗体，一抗于 4 ℃ 下孵育过夜，PBST 漂洗 3 次，加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h，PBST 漂洗 3 次，ECL 试剂显色，凝胶成像系统拍照。每个样品重复 3 次。

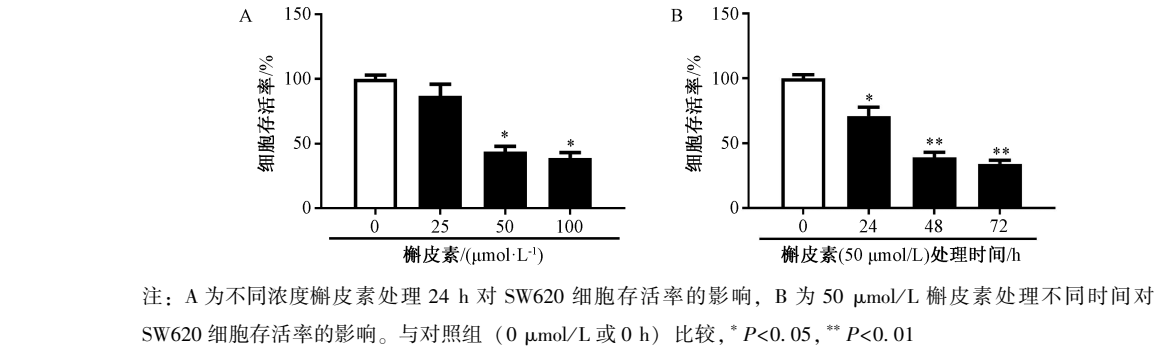
2.7 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分

析和SNK-q法,不同时间点数据比较采用重复测量方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对SW620细胞存活率的影响 图1显示,与对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L}$)比较,50、100 $\mu\text{mol/L}$

槲皮素处理后细胞存活率显著降低($P<0.05$),考虑到成本方面,选择50 $\mu\text{mol/L}$;与对照组(0 h)比较,50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理24、48、72 h后其存活率也显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),考虑到效率方面,选择48 h。



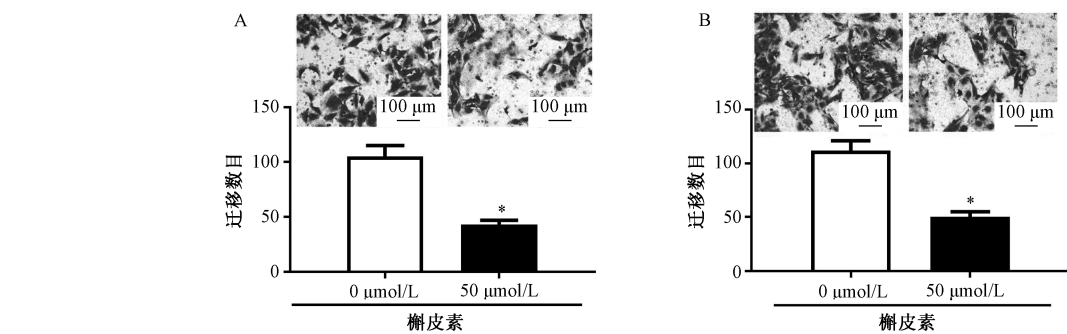
注: A 为不同浓度槲皮素处理 24 h 对 SW620 细胞存活率的影响, B 为 50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理不同时间对 SW620 细胞存活率的影响。与对照组 ($0\text{ }\mu\text{mol/L}$ 或 0 h) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图1 槲皮素对SW620细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of quercetin on the survival rate of SW620 cells

3.2 槲皮素对SW620细胞迁移、侵袭的影响 图2显示,50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理48 h后,细胞迁移

数目、侵袭数目较对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L}$)显著降低($P<0.05$)。



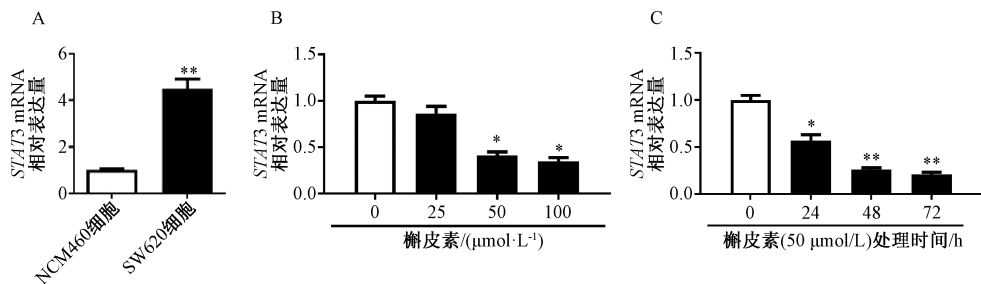
注: A 为槲皮素对 SW620 细胞迁移数目的影响, B 为槲皮素对 SW620 细胞侵袭数目的影响。与对照组 ($0\text{ }\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P<0.05$

图2 槲皮素对SW620细胞迁移、侵袭的影响

Fig. 2 Effects of quercetin on the migration and invasion of SW620 cells

3.3 槲皮素对STAT3 mRNA表达的影响 图3显示,与NCM460细胞组比较,SW620细胞组STAT3 mRNA表达显著上调($P<0.01$);与对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L}$)比较,50、100 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理后

其mRNA表达显著下调($P<0.05$);与对照组(0 h)比较,处理24、48、72 h后其mRNA表达也显著下调($P<0.05$, $P<0.01$)。

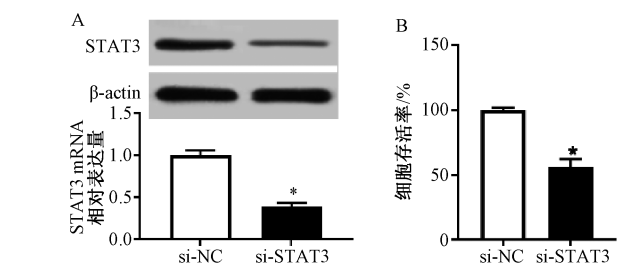


注: A 为 STAT3 在人正常结肠上皮细胞 NCM460、结直肠癌细胞 SW620 中的表达, B 为不同浓度槲皮素处理 24 h 对 STAT3 表达的影响, C 为 50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理不同时间对 STAT3 表达的影响。与 NCM460 组比较, ** $P<0.01$; 与对照组 ($0\text{ }\mu\text{mol/L}$ 或 0 h) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图3 槲皮素对STAT3 mRNA表达的影响

Fig. 3 Effect of quercetin on STAT3 mRNA expression

3.4 敲低 STAT3 对 SW620 细胞存活率、迁移、侵袭的影响 图 4 显示, 敲低 STAT3 后其蛋白表达显著下

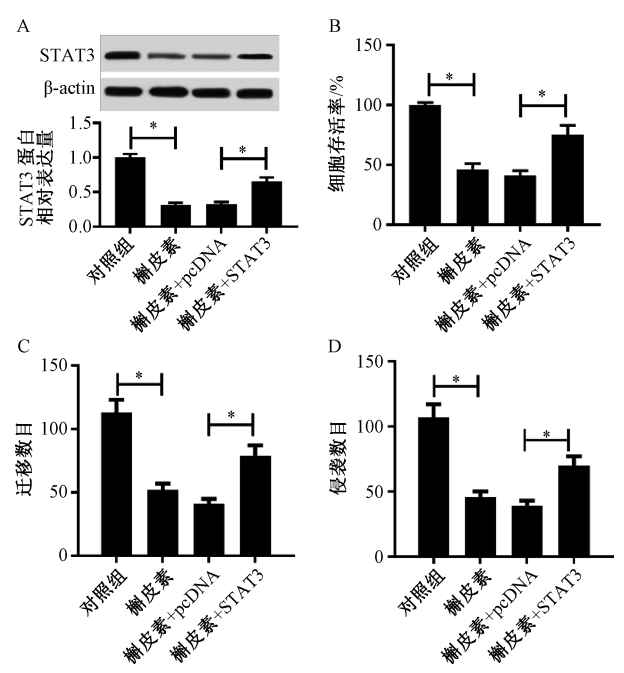


注: A 为 STAT3 蛋白表达, B 为细胞存活率, C 为细胞迁移数目, D 为细胞侵袭数目。与 si-NC 组比较, * $P<0.05$

图 4 敲低 STAT3 对 SW620 细胞存活率、迁移、侵袭的影响

Fig. 4 Effects of knockdown of STAT3 on the survival, migration and invasion of SW620 cells

3.5 过表达 STAT3 对 SW620 细胞存活率、迁移、侵袭的影响 图 5 显示, 与对照组比较, 槲皮素组 STAT3 蛋白表达显著下调 ($P<0.05$), 而过表达 STAT3 后槲皮素+STAT3 组蛋白表达显著上调 ($P<0.05$); 槲皮素组细胞存活率、迁移数目、侵袭数目显著降低 ($P<0.05$), 而过表达 STAT3 后槲皮素+STAT3 组生存、迁移、侵袭能力显著增强 ($P<0.05$)。



注: 与对照组或槲皮素+pcDNA 组比较, * $P<0.05$

图 5 过表达 STAT3 对 SW620 细胞存活率、迁移、侵袭的影响

Fig. 5 Effects of overexpression of STAT3 protein expression on the survival, migration and invasion of SW620 cells

4 讨论

结直肠癌发生与年龄、性别、遗传等多种因素

调 ($P<0.05$); 与 si-NC 组比较, si-STAT3 组细胞存活率、迁移数目、侵袭数目显著降低 ($P<0.05$)。

有关, 我国结直肠癌患者主要为中老年人, 其中男性居多^[10]。目前, 手术是主要治疗手段, 辅以放疗、化疗, 但对患者毒副作用较强, 影响患者预后生活质量。研究显示, 中药在结直肠癌治疗中能提高机体免疫力, 减轻放疗、化疗引起的不良反应, 提高预后生存率^[11]。

槲皮素在肿瘤细胞中能阻滞细胞周期, 诱导细胞凋亡^[12], 例如在肺癌细胞中通过抑制极光激酶 B (Aurora B) 活性来抑制肿瘤生长^[13]; 在胃癌细胞中通过调节基质金属蛋白酶、核转录因子- κ B、细胞外调节蛋白激酶 (ERK1/2) 表达来抑制细胞迁移和侵袭, 发挥抗肿瘤转移的作用^[14]; 在胶质母细胞瘤细胞中通过调节 STAT3 表达来抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭^[15]; 在结直肠癌的研究中不仅能通过调节 Akt/c-Myc 信号通路来诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖^[9], 还能通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路来延长细胞周期, 抑制细胞凋亡^[16]。本实验发现, 槲皮素能呈剂量、时间依赖性地抑制 SW620 细胞存活率、迁移、侵袭, 以 50 μ mol/L 下处理 48 h 效果最佳, 同时也能呈剂量、时间依赖性地抑制 STAT3 表达。

STAT3 是信号转导与转录活化因子 (STAT) 家族的一员, 能调节与细胞周期、免疫应答等相关基因的表达, 并参与血管生成、细胞增殖、凋亡等生物过程, 是 JAK/STAT 信号通路中的重要因子^[17-18], 存在于多种肿瘤细胞中, 激活时能抑制癌细胞凋亡, 促进肿瘤发生^[19]。研究表明, STAT3 能通过靶向 Bcl-2、Bcl-xl、细胞周期蛋白 D1 等下游靶基因来调节乳腺癌肿瘤的生长^[20], 敲除 STAT3 能抑制 Bcl-2、Bcl-xl 表达, 诱导卵巢癌细胞凋亡^[21]; 干扰 STAT3 表达能促进结直肠癌细胞凋亡, 抑制细胞侵袭^[22-23]; Zhang 等^[24]报道,

激活 STAT3 信号传导途径能增强结直肠癌细胞生长、转移，促进肿瘤发生。本实验发现，敲低 STAT3 能抑制 SW620 细胞存活、迁移、侵袭，与前期报道^[22-24]一致；槲皮素处理后，STAT3 蛋白表达明显下调，细胞存活率、迁移和侵袭能力明显减弱，过表达 STAT3 能逆转槲皮素对 SW620 细胞迁移、侵袭的抑制作用。

综上所述，槲皮素能抑制 SW620 细胞存活、迁移、侵袭，其机制可能与抑制 SW620 细胞中 STAT3 表达有关，表明槲皮素可能对结直肠癌发生发展具有抑制作用，可为相关深入研究提供实验基础。

参考文献：

[1] Connell L C, Mota J M, Braghiroli M I, *et al.* The rising incidence of younger patients with colorectal cancer: questions about screening, biology, and treatment[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(4): 23.

[2] 韦金磊, 张 森. 结直肠癌的临床治疗进展[J]. 中国临床新医学, 2018, 11(2): 202-208.

[3] Yi H, Yao Y, Gu J. Sensitive biomarkers of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer patients[J]. *Chin J Gastrointest Surg*, 2014, 17(3): 206-211.

[4] 黎 敏, 杨武斌, 米本中, 等. 槲皮素抗癌作用机制相关研究报道[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(2): 24, 129-132.

[5] Nguyen L T, Lee Y H, Sharma A R, *et al.* Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2017, 21(2): 205-213.

[6] Liu Y, Gong W, Yang Z Y, *et al.* Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(4): 544-557.

[7] Zhou J, Li L U, Fang L I, *et al.* Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(1): 516-522.

[8] Mukherjee A, Khuda-Bukhsh A R. Quercetin down-regulates IL-6/STAT-3 signals to induce mitochondrial-mediated apoptosis in a non-small-cell lung-cancer cell line, A549[J]. *J Pharmacopuncture*, 2015, 18(1): 19-26.

[9] Yang L, Liu Y, Wang M, *et al.* Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN6-Myc signaling axis[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4559-4566.

[10] 赵晓敏, 李云涛, 季国忠. 结直肠癌筛查现状与进展[J].

中国临床研究, 2016, 29(6): 838-841.

[11] 李 娟, 杨 柱, 唐东昕, 等. 中医药防治结直肠癌研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(12): 157-159.

[12] Kashyap D, Mittal S, Sak K, *et al.* Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 12927-12939.

[13] Xingyu Z, Peijie M, Dan P, *et al.* Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B kinase[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(11): 3156-3165.

[14] Li H, Chen C. Quercetin has antimetastatic effects on gastric cancer cells via the interruption of uPA/uPAR function by modulating NF- κ b, PKC- δ , ERK1/2, and AMPK α [J]. *Integr Cancer Ther*, 2018, 17(2): 511-523.

[15] Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(8): 925-935.

[16] Shan B E, Wang M X, Li R Q. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(6): 604-612.

[17] Pruitt H C, Devine D J, Samant R S. Roles of N-Myc and STAT interactor in cancer: from initiation to dissemination[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(3): 491-500.

[18] Furtak S L, Backos D S, Matheson C J, *et al.* Strategies and approaches of targeting STAT3 for cancer treatment [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(2): 308-318.

[19] Siveen K S, Sikka S, Surana R, *et al.* Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2): 136-154.

[20] Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(11): 2570-2578.

[21] Han Z, Feng J, Hong Z, *et al.* Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2): 188-194.

[22] Shi N, Yu L, Chen L, *et al.* Growth inhibition and underlying mechanisms following siRNA silencing of STAT3 in colorectal cancer SW480 cells [J]. *Chin J Cancer*, 2014, 21(1): 44-48.

[23] Zhang J, Lu Y, Yue X, *et al.* MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70300.

[24] Zhang X, Hu F, Li G, *et al.* Human colorectal cancer-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 25.