

基于糖酵解通路探究槲皮素抑制肝细胞癌细胞恶性表型的作用机制

谢业容¹, 白秀梅^{1*}, 秦红艳¹, 石慧颖², 文荣¹, 温东樾¹, 杨红^{1,3*}

(1. 广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021;
3. 广西医科大学, 广西区域性高发肿瘤早期防治重点实验室,
省部共建再生医学与医用生物资源开发应用协同创新中心, 南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨槲皮素对肝细胞癌(HCC)细胞的抑制作用及其通过糖酵解通路发挥作用的潜在机制。方法:采用不同浓度槲皮素(0~500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 Huh-7 和 MHCC-97H HCC 细胞,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测细胞存活率并计算细胞半数抑制浓度(IC_{50}),以确定干预浓度范围。将细胞分为空白组,二甲基亚砜(DMSO)组及槲皮素低、中、高浓度组,通过克隆形成实验、划痕愈合实验、Transwell实验分别检测细胞增殖、迁移与侵袭能力。通过RNA测序(RNA-seq)分析差异表达基因(DEGs),并进行基因本体(GO)功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,构建蛋白质相互作用网络(PPI)并采用边缘渗透组件(EPC)算法筛选潜在靶点,采用荧光探针法检测葡萄糖摄取、比色法检测乳酸生成、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测潜在靶点的mRNA及蛋白表达水平。结果:槲皮素呈浓度和时间依赖性抑制HCC细胞增殖($P<0.01$),Huh-7细胞在24、48、72 h的 IC_{50} 值分别为231.0、94.3、75.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,MHCC-97H细胞分别为588.8、184.1、132.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;同时显著减少细胞克隆形成数,降低Transwell迁移、侵袭细胞数及划痕迁移率($P<0.01$),并明显抑制细胞葡萄糖摄取与乳酸生成($P<0.01$)。RNA-seq共筛选出821个DEGs,其中上调399个、下调422个[$|\log_2$ 差异倍数(FC) ≥ 1 ,校正后 $P<0.05$],层次聚类分析显示两组样本基因表达明显分离;GO功能富集分析显示,DEGs在生物过程主要富集于缺氧反应、氧水平调节、丙酮酸代谢等,细胞组分主要富集于含胶原细胞外基质、质膜外侧等,分子功能主要涉及羧酸结合、裂合酶活性等($P<0.05$);KEGG富集分析明显集中于糖酵解/糖异生、碳代谢及低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路($P<0.05$);PPI结合EPC算法筛选出溶质载体家族2成员1(SLC2A1)、丙酮酸激酶M(PKM)、磷酸甘油酸激酶1(PGK1)、神经元特异性烯醇化酶2(ENO2)、果糖二磷酸醛缩酶A(ALDOA)和葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)共6个糖酵解核心基因。Real-time PCR与Western blot结果证实,槲皮素可浓度依赖性显著下调上述6个核心基因的mRNA与蛋白在2种肿瘤细胞中的表达水平($P<0.01$)。结论:槲皮素通过下调SLC2A1、PKM、PGK1等糖酵解关键基因表达,抑制糖酵解活性及HCC细胞增殖、迁移与侵袭,进而阻滞肝细胞癌恶性进展,提示其具有作为天然抗肝癌候选物的潜在应用价值。

[关键词] 槲皮素;肝细胞癌;糖酵解;低氧应答;溶质载体家族2成员1(SLC2A1);丙酮酸激酶M(PKM);磷酸甘油酸激酶1(PGK1)

[中图分类号] R242;R256;R563 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)12-0150-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260266

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260320.1917.009>

[网络出版日期] 2026-03-23 14:07:23

[增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Investigating Mechanism of Quercetin in Inhibiting Malignant Phenotype of Hepatocellular Carcinoma Cells Based on Glycolysis Pathway

XIE Yerong¹, BAI Xiumei^{1*}, QIN Hongyan¹, SHI Huiying², WEN Rong¹, WEN Dongyue¹, YANG Hong^{1,3*}

[收稿日期] 2025-12-09

[基金项目] 广西自然科学基金区域高发疾病研究联合专项(2024GXNSFBA010038);广西自然科学基金项目(2025JJA140182);国家自然科学基金项目(82460352);广西研究生教育创新计划项目(YCSW2025247)

[第一作者] 谢业容,在读硕士,主治医师,从事肝脏肿瘤发生发展相关机制及介入治疗、中药单体抗肿瘤基础研究,E-mail:179881220@qq.com

[通信作者] *杨红,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事肝脏肿瘤发生发展相关机制及介入治疗研究,E-mail:yanghong@gxmu.edu.cn;

*白秀梅,博士,副研究员,硕士生导师,从事肝脏肿瘤发生发展相关机制及介入治疗、中药单体抗肿瘤基础研究,E-mail:928612016@qq.com

(1. *The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;*
2. *Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;*
3. *Guangxi Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor, Collaborative Innovation Centre of Regenerative Medicine and Medical Bioresource Development and Application Co-constructed by Guangxi Province and Ministry of Education, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of quercetin on hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the potential mechanisms by which it exerts its activity through the glycolytic pathway. **Methods:** Huh-7 and MHCC-97H HCC cells were treated with different concentrations of quercetin ($0-500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated to determine the appropriate intervention concentrations. Cells were divided into a control group, a dimethyl sulfoxide (DMSO) group, and quercetin low-, medium-, and high-concentration groups. Colony formation assay, wound healing assay, and Transwell assay were performed to evaluate cell proliferation, migration, and invasion, respectively. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using RNA sequencing (RNA-seq), followed by Gene Ontology (GO) functional enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and potential hub targets were screened using the edge percolated component (EPC) algorithm. Glucose uptake was detected using a fluorescent probe assay, lactate production was measured by a colorimetric method, and the mRNA and protein expression levels of candidate targets were examined using real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Results:** Quercetin inhibited the proliferation of HCC cells in a concentration- and time-dependent manner ($P<0.01$). The IC_{50} values of quercetin in Huh-7 cells at 24, 48, 72 h were 231.0, 94.3, 75.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, while those in MHCC-97H cells were 588.8, 184.1, 132.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. It also significantly reduced colony formation, decreased the number of migrating and invading cells in Transwell assays, and lowered wound healing rates ($P<0.01$). In addition, glucose uptake and lactate production were markedly suppressed ($P<0.01$). RNA-seq identified a total of 821 DEGs, including 399 upregulated and 422 downregulated genes [$|\log_2 \text{fold change (FC)}| \geq 1$, adjusted $P<0.05$]. Hierarchical clustering analysis revealed distinct gene expression patterns between groups. GO enrichment analysis showed that DEGs were mainly enriched in biological processes such as hypoxia response, oxygen level regulation, and pyruvate metabolism, cellular components including collagen-containing extracellular matrix and external side of the plasma membrane, and molecular functions such as carboxylic acid binding and lyase activity ($P<0.05$). KEGG analysis indicated significant enrichment in glycolysis/gluconeogenesis, carbon metabolism, and the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway ($P<0.05$). PPI combined with EPC algorithm identified six key glycolysis-related genes, including solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), pyruvate kinase M (PKM), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), enolase 2 (ENO2), fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA), and glucose-6-phosphate isomerase (GPI). Real-time PCR and Western blot results further confirmed that quercetin dose-dependently downregulated the mRNA and protein expression levels of these six core genes ($P<0.01$). **Conclusion:** Quercetin suppresses glycolytic activity and inhibits the proliferation, migration, and invasion of HCC cells by downregulating key glycolysis-related genes, including SLC2A1, PKM, and PGK1, thereby impeding the malignant progression of HCC. These findings suggest that quercetin has potential as a natural candidate compound for anti-HCC therapy.

[Keywords] quercetin; hepatocellular carcinoma; glycolysis; hypoxic response; solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1); pyruvate kinase M (PKM); phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)

肝癌是全球第六大常见、第三大致死的恶性肿瘤,其中肝细胞癌(HCC)占75%~85%^[1]。HCC起病隐匿、早期诊断困难,患者多在晚期确诊,并伴有较高的转移和复发风险^[2],目前晚期HCC主要依赖酪氨酸激酶抑制剂、免疫检查点抑制剂及其联合治疗,但疗效仍受不良作用和耐药性限制,整体预后不佳^[2-3]。因此,开发安全、高效的新型抗肝癌活性物质具有重要的临床意义。

HCC的发生发展涉及多种细胞程序失衡,其中肿瘤代谢重编程(MR)异常尤为关键,其核心为有氧糖酵解(Warburg效应)增强及低氧诱导的代谢适

应^[4]。研究表明,有氧糖酵解不仅为肿瘤细胞提供快速能量和生物合成原料,支持其持续增殖和转移,还与HCC对靶向治疗和免疫治疗的获得性耐药密切相关,使糖酵解代谢异常逐渐成为抗肝癌研究的重要关注方向^[5]。葡萄糖转运蛋白及糖酵解关键酶,如溶质载体家族2成员1(SLC2A1)、磷酸甘油酸激酶1(PGK1)和神经元特异性烯醇化酶(ENO2)等,在HCC中过表达,并与肿瘤侵袭性增强及预后不良密切相关^[6-8];同时,低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)通过上调己糖激酶2(HK2)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、丙酮酸激酶M2(PKM2)等糖酵解相关基

因,促进肿瘤细胞在缺氧微环境中的代谢适应,从而加速HCC进展^[9-10]。此外,有研究提出“正虚瘀毒”为肝癌进展核心病机,肿瘤免疫微环境(TIME)深度抑制状态是“正虚”的病理体现,而MR驱动的异常代谢亢进及毒性产物堆积则是“瘀毒”的生物学实质,其中中药单体靶向代谢重编程中的糖酵解及其上游低氧信号通路,具有潜在的代谢干预价值^[11]。

槲皮素作为一种广泛存在于洋葱、苹果、茶叶及多种药用植物中的天然黄酮类化合物^[12],也是白花蛇舌草的重要抗肿瘤成分之一^[13],其具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等多重活性,相比合成药物,具低毒性、来源广泛和潜在协同增效优势,已成为肿瘤研究的热点候选药物^[14-15],在HCC中槲皮素表现出显著的抗肿瘤活性。研究表明,槲皮素可抑制多种HCC细胞系的增殖,并诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡,同时通过调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)、细胞外信号调节激酶(ERK)及Janus激酶2/信号转导及转录激活因子3(JAK2/STAT3)等信号通路发挥抗肿瘤作用^[16]。进一步研究发现,槲皮素还可通过抑制泛素特异性蛋白酶18(USP18)调节核受体共激活因子4(NCOA4)去糖基化并促进铁死亡,从而克服肝癌对索拉非尼的耐药性;同时激活干扰素基因刺激蛋白(STING)信号通路并促进自噬,抑制肝癌细胞的增殖与迁移。此外,槲皮素的代谢产物3,4-二羟基苯乙酸(DOPAC)还可通过核因子E₂相关因子2(Nrf2)介导的线粒体自噬增强免疫细胞的抗肿瘤效应^[17-19],表明槲皮素的抗肿瘤作用并非局限于单一生物学过程。

尽管已有研究探讨槲皮素对HCC细胞生长抑制及信号通路调控的作用,但槲皮素是否通过调控肿瘤代谢异常抑制肿瘤进展,证据仍较为欠缺。RNA测序(RNA-seq)作为一种高通量转录组学分析技术,能全面揭示药物作用下基因表达的变化及其相关通路,因此成为阐明天然产物抗肿瘤机制的关键手段^[20]。为了进一步探索槲皮素在HCC中的代谢调控作用,本研究选用了Huh-7和MHCC-97H 2种侵袭特性不同的HCC细胞模型,系统评估槲皮素对细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并重点分析其对糖酵解功能(如葡萄糖摄取和乳酸生成)的调控作用。结合RNA-seq分析及差异表达基因的通路富集结果,进一步验证糖酵解和低氧应答相关基因的表达变化,旨在揭示槲皮素抑制HCC进展的潜在

代谢机制。

1 材料

1.1 仪器 CKX53型倒置显微镜(日本奥林巴斯中国有限公司),Varioskan LUX型多功能酶标仪、QuantStudio 6 Flex型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(赛默飞世尔科技公司),ChemiDoc™ MP型化学发光成像系统、Mini PROTEAN® Tetra Cell型电泳槽、PowerPac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司),NanoPhotometer®型超微量分光光度计(美国MPLN公司),Qubit® 2.0型荧光定量仪(美国Invitrogen公司),DYY-6C型琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一生物科技有限公司),Agilent 2100型生物分析仪(美国安捷伦科技公司),Illumina NovaSeq 6000型高通量测序仪(美国Illumina公司)。

1.2 药物与试剂 槲皮素对照品(大连美仑生物技术有限公司,货号MB2127,纯度≥98%),杜氏改良Eagle培养基(DMEM,美国Thermo Fisher公司,批号C11995500BT),胎牛血清(FBS)、二甲基亚砜(DMSO)(北京翱擎生物科技有限公司,批号分别为AQmv09900、AQ62650),100×青霉素-链霉素溶液、10×含EDTA 2.5%胰酶(北京中科迈晨科技有限责任公司,批号分别为CC004、CC012.1),细胞增殖与活性检测试剂盒(CCK-8)、细胞总RNA提取试剂盒、VAHTS™ mRNA-seq V2文库构建试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为A311-02、RC112-01、NR612),逆转录试剂盒、Real-time PCR预混试剂盒(日本TaKaRa公司,货号分别为RR047A、RR820A),葡萄糖摄取检测试剂盒(日本Dojindo公司,批号UP02),L-乳酸检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号BC2235),放射免疫沉淀法缓冲液(RIPA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、磷酸酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、ST507、P1005),Transwell小室(孔径8 μm)、Matrigel基质胶(美国Corning公司,批号分别为3422、354248),Immobilon-P PVDF膜(美国Millipore公司,批号0000445360),TRIzol总RNA提取试剂盒、无RNA酶的DNA酶I(DNase I)、核糖核酸酶H(RNase H)、琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号分别为B511311、B006331、B110070、A620014],尿嘧啶特异性切除试剂酶(USER)、Phusion高保真DNA聚合酶(美国NEB公司,货号分别为M5505S、M0530S),AMPure XP磁珠纯化系统(美国Beckman Coulter公司,货号

A63881), SLC2A1、PGK1、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶A(ALDOA)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为21829-1-AP、68035-1-Ig、80837-1-RR、67178-1-Ig、10494-1-AP);丙酮酸激酶M型(PKM)抗体(英国Abcam公司,批号ab154816),ENO2抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号ET1610-96),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G、HRP标记山羊抗兔IgG(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为H680666012、H651665001)。

1.3 细胞 人肝癌细胞系Huh-7购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号CL-0120),人肝癌细胞系MHCC-97H购自赛百康(上海)生物技术股份有限公司(货号iCell-h143),实验均使用5~10代对数生长期细胞,细胞系均经短串联重复序列(STR)鉴定。

2 方法

2.1 细胞培养 槲皮素以DMSO溶解配制成储备液。人肝癌Huh-7和MHCC-97H细胞系于含10% FBS及1%青链霉素的DMEM培养基中培养,于37℃、5% CO₂、95%空气湿润培养箱中维持培养。当细胞融合度达80%~90%时进行传代。

2.2 CCK-8法检测细胞活力 取对数生长期的Huh-7和MHCC-97H细胞,按5×10³个/孔接种于96孔板中,每孔100 μL,过夜培养。随后给予不同梯度浓度的槲皮素(0、25、50、75、100、125、150、200、300、500 μmol·L⁻¹)处理,各组设6个复孔,分别培养24、48、72 h。弃去原培养基后,每孔加入含10% CCK-8的DMEM完全培养基100 μL,避光孵育2 h,于450 nm波长处测定吸光度A,并按公式计算细胞存活率,细胞存活率=(A_{实验组}-A_{空白孔})/(A_{空白组}-A_{空白孔})×100%。据此计算槲皮素对两种细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。后续各功能实验中,槲皮素处理浓度的梯度均以48 h条件下测得的IC₅₀为依据进行设置,低、中、高剂量分别为0.5、1、2倍的IC₅₀。其中,划痕实验为避免细胞毒性对细胞迁移结果的干扰,选用较低的亚致死浓度范围(0.25、0.5、1倍IC₅₀);RNA测序实验选用IC₅₀作为处理浓度。DMSO作为溶剂对照,同一细胞系内同一实验各处理组DMSO终浓度保持一致,且均控制在0.5%以下(已有研究表明该浓度范围内DMSO对肿瘤细胞无明显毒性^[21])。

2.3 CCK-8法检测细胞生长曲线 Huh-7及MHCC-97H细胞按前述密度接种于96孔板,过夜贴

壁后分为空白组、DMSO组及槲皮素低、中、高剂量组(0.5、1、2倍IC₅₀)。Huh-7细胞加入含槲皮素47.2、94.3、188.6 μmol·L⁻¹的完全培养基,各处理组及DMSO组终浓度均为0.19%;MHCC-97H细胞加入含槲皮素92.1、184.1、368.2 μmol·L⁻¹的完全培养基,各处理组及DMSO组终浓度均为0.37%。细胞连续培养5 d,每日向各孔加入CCK-8试剂10 μL,避光孵育2 h后,采用酶标仪在450 nm波长处测定A,并绘制细胞生长曲线。

2.4 集落形成实验 将Huh-7和MHCC-97H细胞消化后,以2×10⁵个/孔接种于6孔板中,过夜贴壁后,按2.3项所述分组及药物处理条件分别给予DMSO或槲皮素处理48 h。处理结束后收集并计数细胞,再以2 000个/孔接种于新的6孔板中继续培养,每2 d更换1次培养基。培养14 d后,用甲醇固定细胞15 min,0.1%结晶紫染色30 min,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤并自然晾干。在倒置显微镜下计数细胞数≥50个的克隆斑,采用ImageJ软件进行统计分析。

2.5 划痕愈合实验 将细胞接种于6孔板中培养,待细胞融合度达约90%时,使用无菌枪头在细胞单层上垂直划出直线划痕。根据实验分组加入DMSO或槲皮素处理,经预实验筛选药物浓度,最终选取槲皮素低、中、高剂量组(0.25、0.5、1倍IC₅₀)。随后更换为含2% FBS的DMEM继续培养48 h,并于0 h和48 h在相同位置拍摄划痕区域图像以评估细胞迁移情况。采用ImageJ软件测量划痕面积,细胞迁移率按(初始面积-48 h面积)/初始面积×100%计算。

2.6 Transwell迁移与侵袭实验 采用孔径为8 μm的Transwell小室检测细胞迁移与侵袭能力。侵袭实验中,上室膜面预先铺涂Matrigel基质胶并孵育1 h使其固化,迁移实验不铺胶。细胞经DMSO或槲皮素低、中、高剂量组(0.5、1、2倍IC₅₀)处理48 h后收集,重悬于无血清培养基中,以2×10⁵个/mL接种于上室(300 μL/孔),下室加入含10% FBS的完全培养基(700 μL/孔),孵育24 h。孵育结束后,棉签轻柔擦除上膜未迁移或未侵袭的细胞,下膜以4%多聚甲醛固定并用0.2%结晶紫染色。经PBS洗涤、自然晾干后,在倒置显微镜下随机选取多个视野进行拍照与计数。

2.7 RNA测序及生物信息学分析

2.7.1 文库构建与测序 取Huh-7细胞,培养条件同前,实验组加槲皮素(1倍IC₅₀)、对照组加等体积DMSO,培养48 h后收集细胞,每组设3次生物学重

复。采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 经 DNase I 去除基因组 DNA 污染, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, NanoPhotometer 和 Qubit 分别测定 RNA 纯度与浓度, 选取 RIN>7、总量≥1 μg、质量浓度≥20 mg·L⁻¹ 的高质量样品, 送生工生物(上海)有限公司完成文库构建与高通量测序。经 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA, 二价阳离子高温片段化后, 以随机六聚体引物合成第一链 cDNA, 再经 DNA 聚合酶 I 与 RNase H 合成第二链 cDNA; 经末端平端化、3'端加 A 尾、连接测序接头, 筛选 150~200 bp cDNA 片段, USER 酶处理后 PCR 扩增并纯化, 获得高质量文库。文库经 Agilent 2100 检测, 定量混合后在 Illumina NovaSeq 平台完成双端测序 [磷脂酰乙醇胺(PE)150, 每端 150 bp]。

2.7.2 数据质控与差异表达基因(DEGs)分析 原始测序数据经 FastQC 0.11.2 质控, Trimmomatic 0.36 过滤接头序列、Q<20 低质量碱基及长度<35 nt 短读段, 获得 Clean Data。利用 HISAT2 2.0 将 Clean Data 比对至人类参考基因组, 用 RSeQC 2.6.1、Qualimap 2.2.1、BEDTools 2.26.0 依次统计比对结果、检验基因组结构均一性、分析基因覆盖度。采用 StringTie 1.3.3b 计算转录本表达量, 以每百万转录本数(TPM)归一化, 去除样本中 TPM 均<1 的低表达基因; 通过 PCA、主坐标分析(PCoA)分析样品间表达差异, edgeR 筛选 DEGs, 筛选标准为 |log₂ 差异倍数(FC)|≥1 且经错误发现率(FDR)校正后 P<0.05, 结果用散点图、MA 图、火山图进行可视化。

2.7.3 功能注释 基于 R 软件 4.1.2, 通过 clusterProfiler 对 DEGs 进行基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 采用超几何检验, 以 FDR<0.01 为显著富集阈值。基于 STRING 数据库 12.0 构建 DEGs 的蛋白-蛋白相互作用网络(PPI), 经 Cytoscape 3.10.2 可视化, 运用边缘渗透组件(EPC)算法筛选核心基因(Hub genes)。

2.8 Real-time PCR 检测基因水平 将 Huh-7 和 MHCC-97H 细胞经 DMSO 或槲皮素低、中、高剂量(0.5 倍、1 倍、2 倍 IC₅₀)处理 48 h 后收集, 采用细胞总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 经逆转录试剂盒反转录为 cDNA。Real-time PCR 反应在 QuantStudio 6 Real time PCR 系统上进行, 使用 Real-time PCR 预混试剂盒进行扩增。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s、60 °C 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 引物序列见表 1, 引

物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。基因相对表达量采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 ATCCCATCACCATCTTCCA	120
	下游 AATGAGCCCCAGCCTTC	
SLC2A1	上游 GCTTCCTGCTCATCAACC	115
	下游 TGCCGACTCTCTTCCTTC	
PKM	上游 GCTGTGGACTTGCCTGCTGT	101
	下游 GCCTTGCGGATGAATGACG	
PGK1	上游 CCGAATCACCACCTCT	104
	下游 TCTCATAACGACCCGCTT	
ENO2	上游 CCACATCAACTCCACCATC	102
	下游 TCAGTCCCATCCAACCTCC	
ALDOA	上游 CCCCTTTCCTTCCACA	104
	下游 GTTCCGGTGCTTCAGAGG	
GPI	上游 AGAGACGGCGAAGGAGTG	75
	下游 GACAGGGCAACAAAGTGCT	

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞蛋白表达水平 Huh-7 及 MHCC-97H 细胞分别经 DMSO 或槲皮素低、中、高剂量(0.5 倍、1 倍、2 倍 IC₅₀)处理 48 h, PBS 洗涤后采用含 PMSF 及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解提取蛋白。聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液(体积比 4:1)混匀并沸水浴变性。等量蛋白上样, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离后转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗(GAPDH、PKM、PGK1、ALDOA、GPI, 1:5 000; SLC2A1、ENO2, 1:1 000)4 °C 摇床孵育过夜, 次日用含聚山梨酯-20 的 Tris 缓冲生理盐水(TBST)洗膜 3 次, 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。蛋白条带使用 Bio-Rad ChemiDoc MP 成像系统检测。ImageJ 分析条带灰度值, 将蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值, 获得相对灰度值, 进行统计分析, 绘制数据表。

2.10 葡萄糖摄取实验 将 Huh-7 和 MHCC-97H 细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 过夜培养待细胞贴壁后, 分别给予 DMSO 或槲皮素低、中、高剂量(0.5 倍、1 倍、2 倍 IC₅₀)处理 48 h。采用葡萄糖摄取检测试剂盒进行检测, 倒置荧光显微镜拍摄荧光图像, 并采用 ImageJ 分析灰度值以评估摄取水平。

2.11 乳酸生成实验 细胞种板方式同 2.10 项。DMSO 或槲皮素低、中、高剂量(0.5 倍、1 倍、2 倍

IC₅₀)处理48 h后收集培养上清,采用L-乳酸检测试剂盒检测乳酸含量,于570 nm记录A,并依据标准曲线计算。

2.12 统计学分析 使用GraphPad Prism 9.5.1软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据均进行正态性和方差齐性检验,服从正态分布的计量资料的组间比较采用单因素方差分析,不服从正态分布时采用非参数秩和检验以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞存活率的影响 与空白组比较,槲皮素显著降低Huh-7和MHCC-97H细胞的存活率,且呈浓度依赖性和时间依赖性。槲皮素对Huh-7细胞在24、48、72 h时的IC₅₀分别为231.0、94.3、75.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对MHCC-97H细胞的IC₅₀分别为588.8、184.1、132.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)。基于48 h处理时间下抑制效应稳定且具有代表性,后续实验分别以2种细胞48 h的IC₅₀值为依据设置处理浓度,Huh-7细胞选用47.2、94.3、188.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,MHCC-97H细胞选用92.1、184.1、368.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。DMSO作为溶剂对照,其终浓度均控制在0.5%以下;同一细胞系内各处理组的DMSO终浓度保持一致,其中Huh-7细胞为0.19%,MHCC-97H细胞为0.37%。见表2、表3。

表2 槲皮素对Huh-7细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of quercetin on Huh-7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白组		100.00±0.03	100.00±1.48	100.00±0.37
槲皮素组	25	104.70±0.05	115.70±3.00 ²⁾	106.80±0.72 ²⁾
	50	99.30±0.03	99.42±2.92	88.52±1.07 ²⁾
	75	89.91±0.01 ²⁾	72.26±3.54 ²⁾	47.41±1.32 ²⁾
	100	84.04±0.03 ²⁾	43.97±2.38 ²⁾	25.19±1.25 ²⁾
	125	74.62±0.04 ²⁾	18.15±2.33 ²⁾	7.83±0.86 ²⁾
	150	66.53±0.04 ²⁾	14.07±2.47 ²⁾	5.57±0.96 ²⁾
	200	40.52±0.03 ²⁾	4.13±1.91 ²⁾	2.62±1.06 ²⁾
	300	34.08±0.03 ²⁾	5.06±1.52 ²⁾	2.71±1.36 ²⁾
500	41.10±0.02 ²⁾	8.04±1.69 ²⁾	3.39±1.12 ²⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3同)

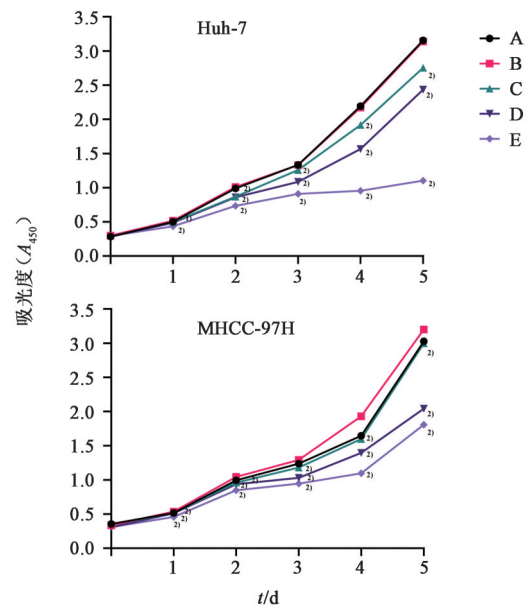
3.2 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞生长曲线的影响 在本实验条件下,DMSO组细胞生长曲线A值与空白组整体接近,未观察到明显抑制细胞活力的现象。与DMSO组比较,槲皮素低、中、高剂量处理组

表3 槲皮素对MHCC-97H细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of quercetin on MHCC-97H cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白组		100.00±3.26	100.00±1.80	100.00±1.20
槲皮素组	25	87.50±2.26 ²⁾	107.70±2.03 ²⁾	89.86±1.72 ²⁾
	50	93.59±1.81 ²⁾	97.92±2.48	87.91±1.35 ²⁾
	75	86.57±1.56 ²⁾	96.12±3.23	74.39±1.93 ²⁾
	100	83.37±1.52 ²⁾	83.53±2.64 ²⁾	64.46±1.01 ²⁾
	125	83.51±3.86 ²⁾	73.56±2.81 ²⁾	59.48±2.11 ²⁾
	150	71.45±0.97 ²⁾	66.88±4.16 ²⁾	47.96±1.34 ²⁾
	200	70.74±2.63 ²⁾	50.86±4.91 ²⁾	24.74±1.08 ²⁾
	300	70.60±3.17 ²⁾	7.20±2.11 ²⁾	5.00±1.45 ²⁾
500	50.38±2.36 ²⁾	12.80±2.30 ²⁾	3.88±1.43 ²⁾	

可显著降低Huh-7和MHCC-97H细胞的细胞活力,且呈时间和剂量依赖性($P < 0.01$)。见图1。



注:A.空白组;B.DMSO组;C.槲皮素低剂量;D.槲皮素中剂量;E.槲皮素高剂量(图2-图4同);与DMSO组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;同一细胞系内各处理组DMSO终浓度保持一致

图1 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞生长曲线的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of quercetin on growth curves of Huh-7 and MHCC-97H cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞克隆形成及Transwell迁移/侵袭的影响 结果显示,与DMSO组比较,槲皮素低、中、高剂量处理组均可明显减少Huh-7和MHCC-97H细胞的克隆形成数及穿过Transwell小室膜的迁移/侵袭细胞数,且抑制作用随药物浓度升高而增强,差异具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。见图2、图3、表4、表5。

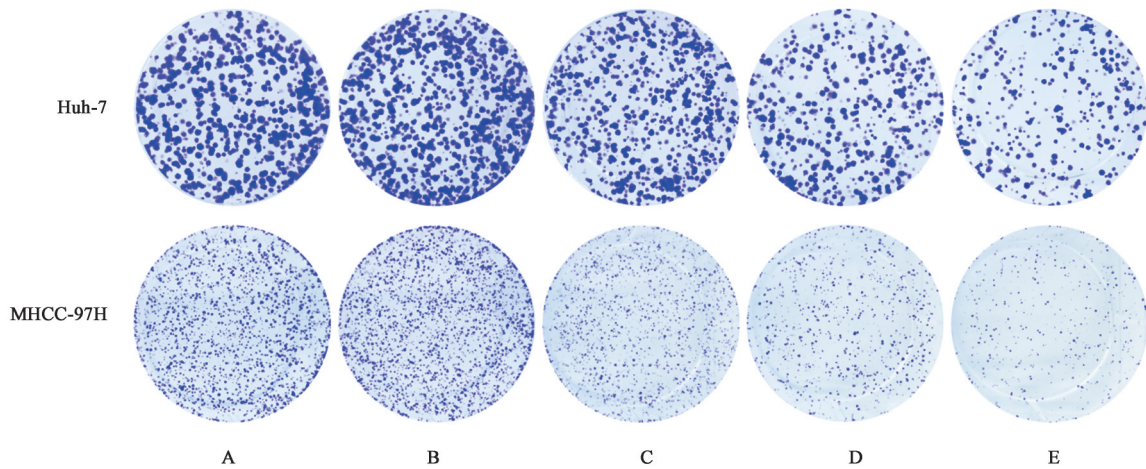


图2 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞克隆形成的影响

Fig. 2 Effect of quercetin on colony formations of Huh-7 and MHCC-97H cells

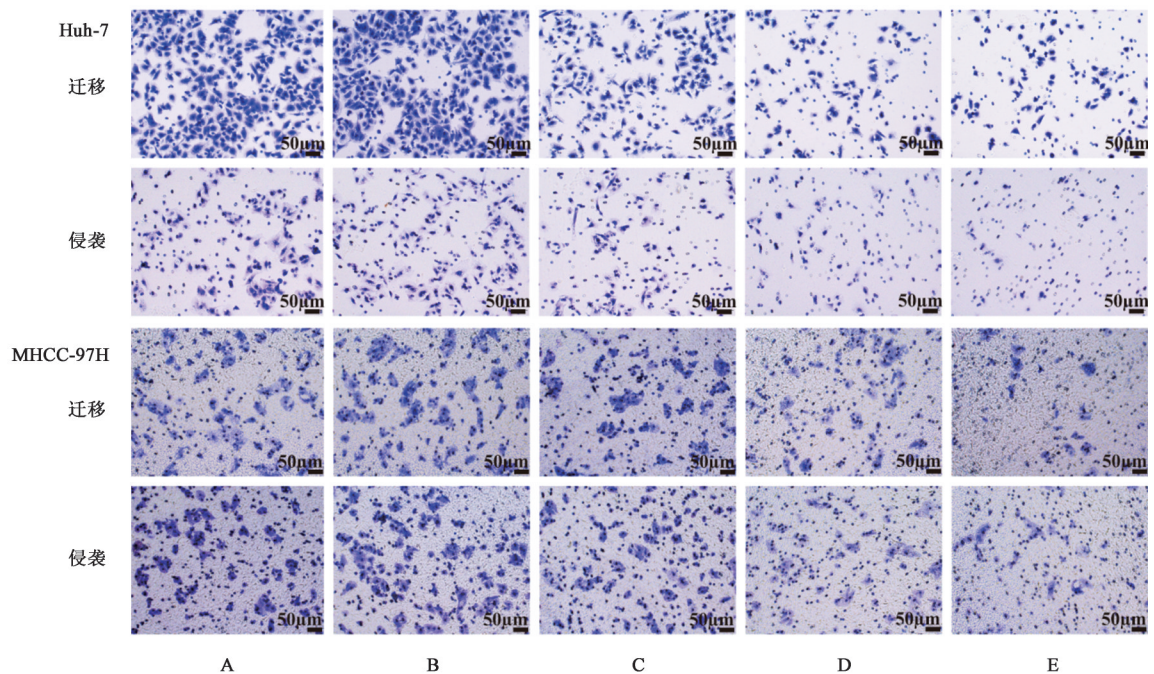


图3 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞的Transwell迁移/侵袭的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 3 Effect of quercetin on Transwell migration and invasion of Huh-7 and MHCC-97H cells (inverted microscope,×200)

3.4 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞划痕迁移的影响 在0 h时,各组细胞划痕面积基本一致。48 h后,与DMSO组比较,槲皮素低、中、高剂量处理组均可显著降低细胞迁移率($P<0.01$)。见图4、表6。

3.5 转录组学分析探究槲皮素作用于HCC的机制 RNA-seq分析结果显示,DMSO组与槲皮素处理组样本间基因表达分布一致性良好,样本整体表达水平相近,具有较好的重复性和可比性。差异表达分析共筛选获得821个DEGs,其中上调399个,下调422个($|\log_2FC| \geq 1, P < 0.05$),火山图展示了两组间差异基因的分布情况。差异基因的层次聚类分析

结果显示,两组样本在基因表达模式上呈明显分离,提示槲皮素处理可显著改变HCC细胞的转录表达谱。GO功能富集分析显示,DEGs在生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个层面均显著富集($P < 0.05$)。BP主要富集于氧水平反应、缺氧反应、氧水平降低反应、金属离子反应及创伤愈合等过程;CC主要富集于含胶原细胞外基质、细胞基底膜、质膜外侧、基底质膜及内质网腔等结构;MF主要涉及羧酸结合、有机酸结合、裂合酶活性、铁离子结合及脂肪酶活性等功能。KEGG通路富集分析显示,DEGs明显富集于糖酵解/糖异生、碳代谢、果糖和甘露糖代谢、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通

表4 槲皮素对Huh-7细胞克隆形成及Transwell迁移/侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of quercetin on colony formation and Transwell migration/invasion of Huh-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) 个

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞克隆个数	Transwell 迁移 细胞数目	Transwell 侵袭 细胞数目
空白组		323.30±27.15	368.30±3.22	204.00±6.56
DMSO组		360.00±45.83	371.00±9.64	204.30±13.58
槲皮素 低剂量组	47.2	236.70±7.64 ²⁾	252.30±1.53 ²⁾	125.30±0.58 ²⁾
槲皮素 中剂量组	94.3	191.30±5.51 ²⁾	169.00±22.52 ²⁾	85.67±1.53 ²⁾
槲皮素 高剂量组	188.6	86.67±12.10 ²⁾	84.00±3.61 ²⁾	52.00±12.12 ²⁾

注:与DMSO组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;同一细胞系内各处理组DMSO终浓度保持一致(表5-表12同)

路、ECM-受体相互作用、细胞因子-受体相互作用及PI3K/Akt信号通路等($P<0.05$)。为进一步筛选潜在关键靶基因,基于基因蛋白相互作用检索搜查工具(String)数据库构建DEGs的PPI网络,并在Cytoscape软件中采用cytoHubba插件的EPC算法进行分析。结果筛选获得6个排名靠前的核心基因,分别为SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI。上述基因均为糖酵解过程中的关键酶或转运

表5 槲皮素对MHCC-97H细胞克隆形成及Transwell迁移/侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effects of quercetin on colony formation and Transwell migration/invasion of MHCC-97H cells ($\bar{x}\pm s, n=3$) 个

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞克隆数	Transwell 迁移 细胞数	Transwell 侵袭 细胞数
空白组		726.00±20.66	182.00±8.72	185.00±11.36
DMSO组		766.70±23.54	184.00±9.64	187.70±10.02
槲皮素低 剂量组	92.1	328.70±16.17 ²⁾	137.30±3.51 ²⁾	160.70±2.08 ¹⁾
槲皮素中 剂量组	184.1	174.00±9.33 ²⁾	99.33±4.16 ²⁾	91.33±5.69 ²⁾
槲皮素高 剂量组	368.2	60.33±6.81 ²⁾	49.00±12.00 ²⁾	44.33±6.03 ²⁾

蛋白,并与缺氧应答密切相关,提示槲皮素可能通过调控糖酵解及缺氧相关通路影响HCC细胞的生物学行为。具体数据见增强出版附加材料。

3.6 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞葡萄糖摄取和乳酸生成量的影响 葡萄糖摄取和乳酸生成实验显示,与DMSO组比较,槲皮素低、中、高剂量处理组均可显著降低Huh-7和MHCC-97H细胞的葡萄糖摄取及乳酸生成水平($P<0.01$)。见表7、表8、图5。

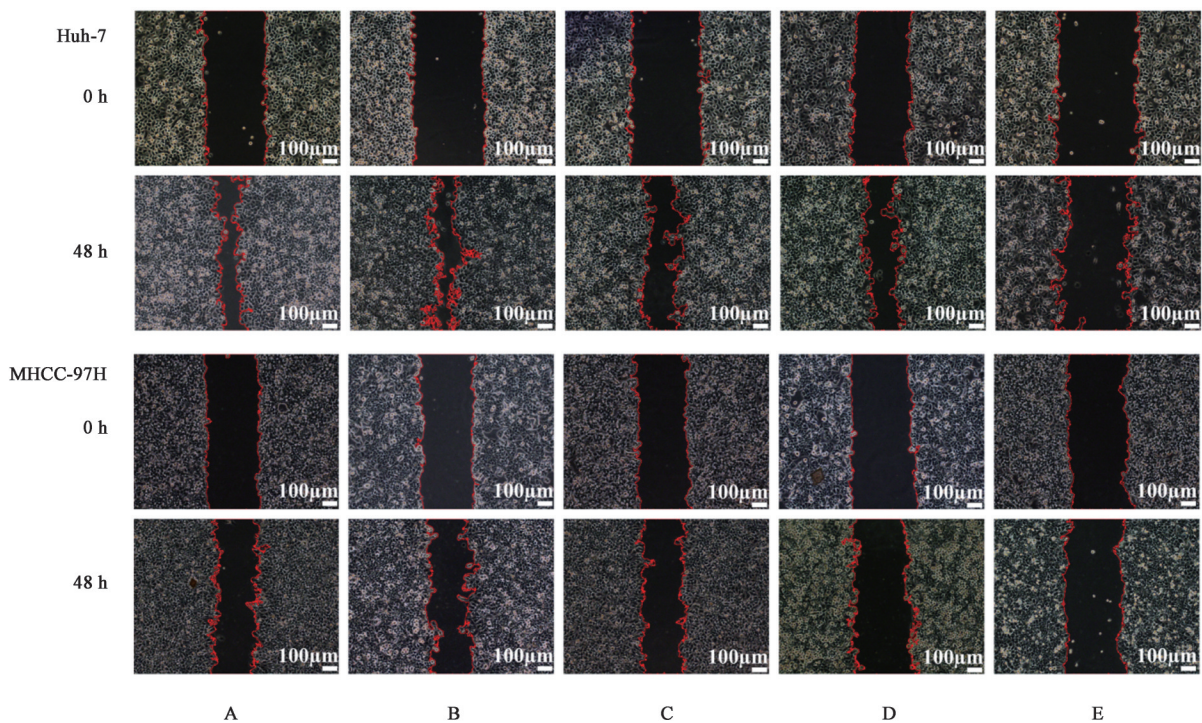


图4 槲皮素对Huh-7细胞和MHCC-97H划痕迁移的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 4 Effect of quercetin on wound healing of Huh-7 and MHCC-97H cells (inverted microscope, ×100)

3.7 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞中糖酵解关键酶基因mRNA表达的影响 与DMSO组比较,

槲皮素低、中、高剂量处理组中糖酵解关键酶基因SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI mRNA

表6 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞划痕迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of quercetin on wound-healing migration of Huh-7 and MHCC-97H cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Huh-7细胞		MHCC-97H细胞	
	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	48 h 细胞迁移率/%	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	48 h 细胞迁移率/%
空白组		85.83±9.36		32.12±1.09
DMSO组		86.36±7.81		30.34±1.01
槲皮素低剂量组	23.6	59.11±0.94 ²⁾	46.1	25.67±0.76 ²⁾
槲皮素中剂量组	47.2	54.12±1.51 ²⁾	92.1	16.40±1.39 ²⁾
槲皮素高剂量组	94.3	22.51±1.62 ²⁾	184.1	5.96±0.47 ²⁾

表7 槲皮素对Huh-7细胞葡萄糖摄取及乳酸生成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 7 Effect of quercetin on glucose uptake and lactate production in Huh-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖摄取率/%	乳酸含量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
DMSO组		100.00±3.02	17.21±0.05
槲皮素低剂量组	47.2	79.31±3.83 ²⁾	13.09±0.02 ²⁾
槲皮素中剂量组	94.3	62.17±3.75 ²⁾	9.16±0.04 ²⁾
槲皮素高剂量组	188.6	41.25±2.26 ²⁾	7.63±0.06 ²⁾

显著降低($P<0.01$)。见表9、表10。

3.8 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞中糖酵解关键酶蛋白表达的影响

与DMSO组比较,槲皮素

表8 槲皮素对MHCC-97H细胞葡萄糖摄取及乳酸生成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

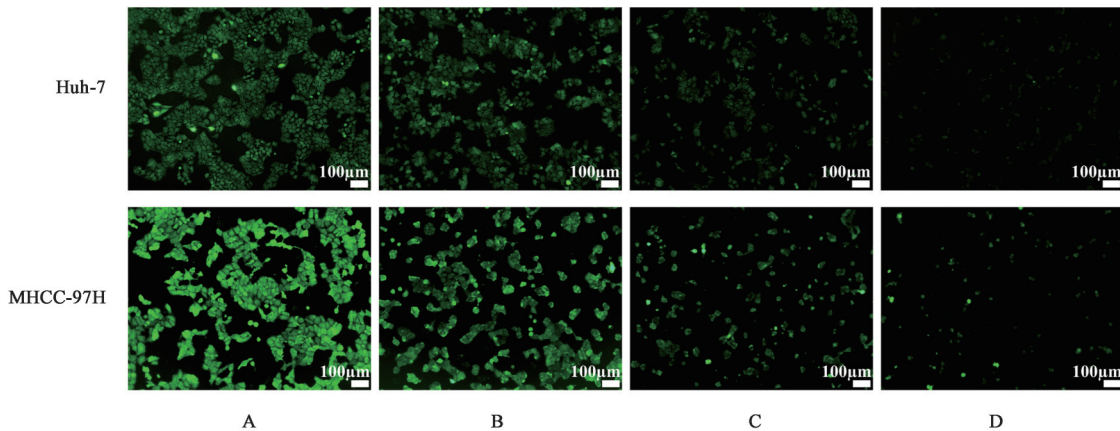
Table 8 Effect of quercetin on glucose uptake and lactate production in MHCC-97H cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖摄取率/%	乳酸含量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
DMSO组		100.00±5.26	16.58±0.08
槲皮素低剂量组	92.1	75.93±0.23 ²⁾	12.37±0.06 ²⁾
槲皮素中剂量组	184.1	55.62±1.79 ²⁾	8.57±0.05 ²⁾
槲皮素高剂量组	368.2	28.88±2.14 ²⁾	7.10±0.04 ²⁾

低、中、高剂量处理组中糖酵解关键基因SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI蛋白表达水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图6、表11、表12。

4 讨论

尽管槲皮素的抗肿瘤潜力已被广泛认可,但在具有代谢重编程异常特征的HCC中,其是否通过代谢重编程发挥作用尚未完全明确。本研究通过转录组学联合实验验证,揭示槲皮素可调控糖酵解及缺氧相关通路,同步下调通路关键基因,有效抑制HCC细胞增殖、迁移及侵袭,为HCC的代谢靶向治疗提供了新策略,也为其临床转化提供了新思路。



注:A.DMSO组;B.槲皮素低剂量;C.槲皮素中剂量;D.槲皮素高剂量(图6同)

图5 槲皮素对Huh-7和MHCC-97H细胞葡萄糖摄取的影响(荧光染色,×100)

Fig. 5 Effect of quercetin on glucose uptake in Huh-7 and MHCC-97H cells (fluorescence staining, ×100)

表9 槲皮素对Huh-7细胞SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of quercetin on mRNA expressions of SLC2A1, PKM, PGK1, ENO2, ALDOA and GPI in Huh-7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SLC2A1	PKM	PGK1	ENO2	ALDOA	GPI
DMSO组		1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.06	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.01
槲皮素低剂量组	47.2	0.62±0.03 ²⁾	0.65±0.03 ²⁾	0.81±0.02 ²⁾	0.65±0.04 ²⁾	0.85±0.05 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾
槲皮素中剂量组	94.3	0.50±0.03 ²⁾	0.39±0.17 ²⁾	0.41±0.04 ²⁾	0.43±0.01 ²⁾	0.29±0.01 ²⁾	0.33±0.01 ²⁾
槲皮素高剂量组	188.6	0.07±0.01 ²⁾	0.14±0.01 ²⁾	0.11±0.01 ²⁾	0.06±0.01 ²⁾	0.35±0.02 ²⁾	0.10±0.01 ²⁾

本研究中,槲皮素处理后HCC细胞的葡萄糖摄取量显著减少、胞外乳酸生成量明显降低,证实槲

皮素可有效抑制HCC细胞的糖酵解活性,而糖酵解异常增强是HCC代谢重编程的核心特征^[22],提示槲

表10 槲皮素对MHCC-97H细胞SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of quercetin on mRNA expressions of SLC2A1, PKM, PGK1, ENO2, ALDOA and GPI in MHCC-97H cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SLC2A1	PKM	PGK1	ENO2	ALDOA	GPI
DMSO组		1.00±0.03	1.01±0.13	1.10±0.20	1.01±0.14	1.00±0.07	1.00±0.08
槲皮素低剂量组	92.1	0.77±0.02 ²⁾	0.63±0.10 ²⁾	1.03±0.13	0.70±0.02 ²⁾	1.12±0.18	0.83±0.01 ²⁾
槲皮素中剂量组	184.1	0.54±0.02 ²⁾	0.28±0.01 ²⁾	0.65±0.10 ²⁾	0.42±0.01 ²⁾	0.31±0.04 ²⁾	0.43±0.02 ²⁾
槲皮素高剂量组	368.2	0.08±0.01 ²⁾	0.12±0.01 ²⁾	0.29±0.10 ²⁾	0.05±0.01 ²⁾	0.43±0.04 ²⁾	0.13±0.01 ²⁾

表11 槲皮素对Huh-7细胞SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Effect of quercetin on protein expressions of SLC2A1, PKM, PGK1, ENO2, ALDOA and GPI in Huh-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SLC2A1 /GAPDH	PKM /GAPDH	PGK1 /GAPDH	ENO2 /GAPDH	ALDOA /GAPDH	GPI /GAPDH
DMSO组		1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.01	1.00±0.05	1.00±0.02
槲皮素低剂量组	47.2	1.14±0.01 ²⁾	0.97±0.01 ²⁾	0.90±0.01 ²⁾	0.69±0.03 ²⁾	0.85±0.05 ²⁾	0.89±0.02 ²⁾
槲皮素中剂量组	94.3	0.67±0.02 ²⁾	0.76±0.01 ²⁾	0.74±0.02 ²⁾	0.57±0.04 ²⁾	0.46±0.03 ²⁾	0.22±0.01 ²⁾
槲皮素高剂量组	188.6	0.41±0.01 ²⁾	0.26±0.01 ²⁾	0.44±0.02 ²⁾	0.51±0.02 ²⁾	0.37±0.02 ²⁾	0.16±0.01 ²⁾

表12 槲皮素对MHCC-97H细胞SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Effect of quercetin on protein expressions of SLC2A1, PKM, PGK1, ENO2, ALDOA and GPI in MHCC-97H cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SLC2A1 /GAPDH	PKM /GAPDH	PGK1 /GAPDH	ENO2 /GAPDH	ALDOA /GAPDH	GPI /GAPDH
DMSO组		1.00±0.01	1.00±0.05	1.00±0.01	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.01
槲皮素低剂量组	92.1	0.81±0.03 ²⁾	0.33±0.03 ²⁾	0.84±0.03 ²⁾	0.83±0.03 ²⁾	0.58±0.03 ²⁾	0.76±0.02 ²⁾
槲皮素中剂量组	184.1	0.45±0.03 ²⁾	0.31±0.03 ²⁾	0.86±0.02 ²⁾	0.78±0.05 ²⁾	0.38±0.02 ²⁾	0.75±0.04 ²⁾
槲皮素高剂量组	368.2	0.32±0.02 ²⁾	0.27±0.04 ²⁾	0.23±0.01 ²⁾	0.54±0.02 ²⁾	0.40±0.01 ²⁾	0.51±0.02 ²⁾

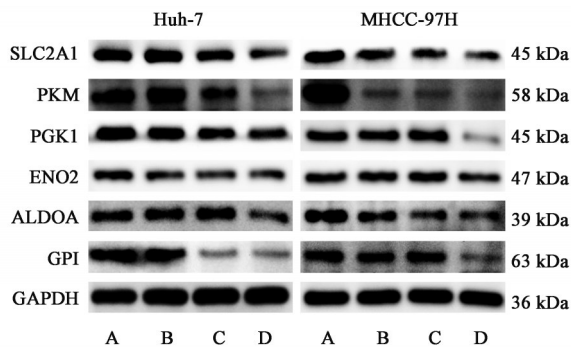


图6 Huh-7和MHCC-97H细胞SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA、GPI蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of protein expressions of SLC2A1, PKM, PGK1, ENO2, ALDOA and GPI in Huh-7 and MHCC-97H cells

皮素可通过抑制糖酵解,逆转HCC细胞的异常代谢重编程。该代谢改变可有效限制肿瘤细胞的能量供应,进而抑制其恶性进展^[23]。糖酵解通量依赖HK2、PKM、LDHA、ALDOA等关键基因的协同调控^[24],靶向上述糖酵解关键分子可增敏肿瘤细胞化疗效果^[25]。已有研究报道槲皮素可通过结合ALDOA抑制肺癌生长^[26],通过PFKP-LDHA轴抑制乳腺癌迁移^[27],但其对HCC糖酵解核心基因的系统

性调控尚不明确。本研究进一步证实槲皮素可在HCC中同步下调SLC2A1、PKM、PGK1、ENO2、ALDOA和GPI等糖酵解关键基因,形成协同抑制效应。这些下调的基因均为糖酵解关键节点,且与肿瘤恶性进展密切相关:SLC2A1编码GLUT1蛋白,负责介导葡萄糖摄取,同时可通过lncRNA调控机制影响胰腺癌免疫微环境,促进肿瘤转移^[28];PKM作为糖酵解限速酶,是维持有氧糖酵解的核心^[29];PGK1可促进ATP合成、放大Warburg效应,驱动HCC侵袭转移^[30];ENO2通过调控肿瘤相关巨噬细胞极化推动淋巴瘤进展^[31];ALDOA通过调控果糖-1,6-二磷酸代谢促进肿瘤增殖^[32];GPI经C-X-C基序趋化因子受体4/核转录因子- κ B(CXCR4/NF- κ B)信号通路促进直肠癌肝转移^[33]。尽管槲皮素在HCC中调控这些基因的具体机制尚需深入探索,但现有证据提示,其同步下调上述基因可直接干扰糖酵解全过程。这一多靶点协同模式补充了既往单靶点代谢调控机制,也为解释槲皮素抗HCC的增殖与转移抑制效应提供了代谢层面的依据。

此外,肿瘤代谢与微环境密切相关,缺氧作为

HCC的典型微环境特征,可通过HIF-1 α 进而调控PFK1、HK2、LDHA、PKM等多种糖酵解酶基因,推动Warburg效应,并促进肿瘤免疫逃逸、耐药性及血管生成^[34-35]。既往研究表明,槲皮素可抑制HIF-1 α 活性并增强化疗药物的细胞毒性^[36],也可通过抑制乳腺癌细胞乳酸生成与外排,降低HIF-1 α /血管内皮生长因子(VEGF)信号通路活化水平并重塑肿瘤免疫微环境^[37]。结合既往研究证实的HIF-1 α 是糖酵解上游调控通路这一结论^[9-10],以及本研究发现槲皮素可调控缺氧相关通路及HIF-1 α 下游糖酵解基因,提示槲皮素可能通过干预HIF-1 α 调控其下游糖酵解通路,为其抗HCC作用提供微环境和代谢层面的机制支撑。这也是本研究的另一个创新之处。

综上,推测槲皮素可能通过2种途径协同抑制HCC进展,一是直接下调多个糖酵解关键基因以抑制糖酵解,进而抑制HCC进展;二是通过抑制HIF-1 α 间接降低糖酵解基因表达,进而协同发挥抑制效应。从临床转化角度而言,HCC一线治疗面临耐药困境,而糖酵解增强与耐药、免疫抑制密切相关^[5]。槲皮素具有低毒、易获取的特点,其代谢调控作用使其具备成为HCC辅助治疗药物的潜力,这一潜力也得到了既往研究的支持:一方面,槲皮素代谢产物DOPAC可增强CD8⁺T细胞介导的抗肿瘤免疫反应,并在联合免疫检查点抑制剂治疗中表现出协同抗肿瘤效应;另一方面,槲皮素相关成分可通过抑制USP18增强NCOA4介导的铁死亡,进而提高HCC细胞对索拉非尼及瑞戈非尼的治疗敏感性^[17-19]。本研究揭示的代谢调控机制,为这一联合治疗策略提供了额外的理论依据,也为其临床应用拓展了新的思路。但本研究尚有一些不足之处,对于槲皮素抗HCC的代谢调控作用研究还停留在体外实验阶段,未通过动物体内实验验证其抗肝癌效应及代谢调控机制,且未明确其调控SLC2A1、PKM、PGK1等糖酵解核心基因的直接分子机制,同时,虽发现DEGs显著富集于HIF-1信号通路,但未直接检测HIF-1 α 的mRNA及蛋白表达变化,也未明确其是否可作为糖酵解上游调控通路,相关调控机制仍需补充验证,此外,已知代谢重编程与免疫密切相关,但本研究未涉及二者关联探究,相关深入研究及实验尚在进行中。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer

statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] SINGAL A G, KANWAL F, LLOVET J M. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: Implications for screening, prevention and therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(12): 864-884.

[3] ZHENG J, WANG S, XIA L, et al. Hepatocellular carcinoma: Signaling pathways and therapeutic advances [J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 35.

[4] YANG F, HILAKIVI-CLARKE L, SHAHA A, et al. Metabolic reprogramming and its clinical implication for liver cancer [J]. Hepatology, 2023, 78(5): 1602-1624.

[5] FENG J, LI J, WU L, et al. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 126.

[6] ZHANG Y, SONG H, CUI W, et al. A prognostic signature based on insulin-signaling-pathway genes for hepatocellular carcinoma [J]. Discov Oncol, 2025, 16(1): 1901.

[7] YI J, LUO X, HUANG W, et al. PGK1 is a potential biomarker for early diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2024, 27(3): 109.

[8] YANG C C, YAN Y C, PAN G Q, et al. Thyroid hormones inhibit tumor progression and enhance the antitumor activity of lenvatinib in hepatocellular carcinoma via reprogramming glucose metabolism [J]. Cell Death Discov, 2025, 11(1): 92.

[9] ZHANG X, LI Y, MA Y, et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1 α and sustains HIF-1 α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 216.

[10] AZOITEI N, BECHER A, STEINSTEEL K, et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation [J]. Mol Cancer, 2016, 15: 3.

[11] 李霞, 杨杰雄, 刘西洋, 等. 基于“正虚瘀毒”探讨免疫微环境和代谢重编程在肝癌中的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, doi:org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252024.

LI X, YANG J X, LIU X Y, et al. Exploring roles of immune microenvironment and metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma from perspective of "deficiency of healthy qi and stasis-toxin" [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, doi:org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252024.

[12] SUN D, ZOU Y, SONG L, et al. A cyclodextrin-based nanoformulation achieves co-delivery of ginsenoside Rg₃ and quercetin for chemo-immunotherapy in colorectal cancer [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 378-393.

[13] 朱恒舟, 桑天庆, 季漪, 等. 基于消癌解毒方中白花蛇舌草有效成分治疗肿瘤的靶点研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(5): 132-135, 276-277.

ZHU H Z S T Q, JI Y, LI W T, WU M H. Study on target of treating tumors based on active constituents of Baihuasheshecao (*Hedyotis diffusa*) in Xiaoi Jiedu decoction [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(5): 132-135, 276-277.

- [14] WANG L, HE S, LIU R, et al. A pH/ROS dual-responsive system for effective chemoimmunotherapy against melanoma via remodeling tumor immune microenvironment[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(5): 2263-2280.
- [15] 冯保卫, 王艳, 李畅, 等. 基于ROS/NLRP3/IL-1 β 信号通路探究槲皮素对痛风性关节炎模型大鼠的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(2): 145-153.
- FENG B W, WANG Y, LI C, et al. Quercetin ameliorates gouty arthritis in rats via ROS/NLRP3/IL-1 β signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2026, 32(2): 145-153.
- [16] RAJESH R U, SANGEETHA D. Therapeutic potentials and targeting strategies of quercetin on cancer cells: Challenges and future prospects[J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155902.
- [17] HAN P, CHU S, SHEN J, et al. Quercetin-derived microbial metabolite DOPAC potentiates CD8⁺ T cell anti-tumor immunity via NRF2-mediated mitophagy[J]. *Cell Metab*, 2025, 37(12): 2438-2454. e2438.
- [18] 陈琳, 武国智, 朱玉, 等. 槲皮素通过干扰素基因刺激蛋白信号促进HCCLM3细胞自噬的作用及机制研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2025, 33(11): 1064-1069.
- CHEN L, WU G Z, ZHU Y, et al. Study on the role and mechanism of quercetin promoting autophagy in HCCLM3 cells via STING signaling[J]. *Chin J Hepatol*, 2025, 33(11): 1064-1069.
- [19] YE S, CHEN J, ZHENG Y, et al. Targeting USP18 overcomes acquired resistance in hepatocellular carcinoma by regulating NCOA4 deISGylation and ferroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 448.
- [20] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [21] YEOM J, MA S, LIM Y H. Oxyresveratrol induces autophagy via the ER stress signaling pathway, and oxyresveratrol-induced autophagy stimulates MUC2 synthesis in human goblet cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(3): 214.
- [22] CHEN H, LI Y, LI H, et al. NBS1 lactylation is required for efficient DNA repair and chemotherapy resistance[J]. *Nature*, 2024, 631(8021): 663-669.
- [23] PAREDES F, WILLIAMS H C, SAN MARTIN A. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 502: 133-142.
- [24] LINCET H, ICARD P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? [J]. *Oncogene*, 2015, 34(29): 3751-3759.
- [25] UPADHYAY S, KHAN S, HASSAN M I. Exploring the diverse role of pyruvate kinase M2 in cancer: Navigating beyond glycolysis and the Warburg effect[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2024, 1879(3): 189089.
- [26] FU H, GAO H, QI X, et al. Aldolase A promotes proliferation and G₁/S transition via the EGFR/MAPK pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Commun*, 2018, 38(1): 18.
- [27] UMAR S M, KASHYAP A, KAHOL S, et al. Prognostic and therapeutic relevance of phosphofructokinase platelet-type (PFKP) in breast cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(1): 112282.
- [28] LI F, HE C, YAO H, et al. GLUT1 regulates the tumor immune microenvironment and promotes tumor metastasis in pancreatic adenocarcinoma via an ncRNA-mediated network[J]. *J Cancer*, 2022, 13(8): 2540-2558.
- [29] ZHANG Z, ZHENG Y, CHEN Y, et al. Gut fungi enhances immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells by activating PKM2-dependent glycolysis to promote colorectal tumorigenesis[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 88.
- [30] XIE H, TONG G, ZHANG Y, et al. PGK1 drives hepatocellular carcinoma metastasis by enhancing metabolic process[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1630.
- [31] SHAO R, LIU C, XUE R, et al. Tumor-derived exosomal ENO2 modulates polarization of tumor-associated macrophages through reprogramming glycolysis to promote progression of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(3): 848-863.
- [32] SNAEBJORNSSON M T, POELLER P, KOMKOVA D, et al. Targeting aldolase A in hepatocellular carcinoma leads to imbalanced glycolysis and energy stress due to uncontrolled FBP accumulation[J]. *Nat Metab*, 2025, 7(2): 348-366.
- [33] FUKUSHI A, KIM H D, CHANG Y C, et al. Revisited metabolic control and reprogramming cancers by means of the Warburg effect in tumor cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10037.
- [34] RANKIN E B, NAM J M, GIACCIA A J. Hypoxia: Signaling the metastatic cascade[J]. *Trends Cancer*, 2016, 2(6): 295-304.
- [35] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors: Coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype[J]. *Embo J*, 2017, 36(3): 252-259.
- [36] LEE D H, LEE Y J. Quercetin suppresses hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) through inhibiting protein synthesis[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(2): 546-553.
- [37] ZHAO P, WANG S, JIANG J, et al. Targeting lactate metabolism and immune interaction in breast tumor via protease-triggered delivery[J]. *J Control Release*, 2023, 358: 706-717.

[责任编辑 吕冬梅]