

# 槲皮素自微乳的抗肿瘤作用及其机制分析

孙阳, 于水澜, 吴勃岩\*, 车艳新, 王雪  
(黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:** 研究槲皮素自微乳( quercetin self-nanoemulsifying drug delivery system, Q-SNEDDS)抑制小鼠肉瘤细胞 S180 的分子机制。**方法:** 制备槲皮素自微乳和空白自微乳, 对其粒径和 Zeta 电位分别进行检测。体内实验分 6 组: 空白组、环磷酰胺(20 mg·kg<sup>-1</sup>)组、槲皮素自微乳高、中、低剂量(50, 25, 12.5 mg·kg<sup>-1</sup>)组、槲皮素组(50 mg·kg<sup>-1</sup>)。采用肿瘤细胞移植法建立 S180 移植瘤模型, 用药 10 d 后, 检测各组抑瘤率、肝指数、脾指数和胸腺指数等指标; 采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测各组 S180 细胞的 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax), 蛋白激酶 B(Akt) mRNA 表达的情况; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞 Bax, Bcl-2, Akt, 磷酸化-Akt(p-Akt)的蛋白表达。**结果:** 与空白组比较, 槲皮素自微乳、环磷酰胺及槲皮素组均能抑制肿瘤细胞生长, 槲皮素自微乳组抑瘤率高于槲皮素组( $P < 0.05$ ); 环磷酰胺组脏器指数低于空白组( $P < 0.05$ ), 槲皮素自微乳组脏器指数高于环磷酰胺组( $P < 0.05$ )。与空白组比较, 槲皮素自微乳上调 S180 细胞 Bax mRNA 和蛋白表达( $P < 0.05$ ), 下调 S180 细胞 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.05$ ), 对 Akt 蛋白表达影响不明显, 但是可以下调 Akt mRNA 和 p-Akt 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。**结论:** 槲皮素自微乳具有体内抑制 S180 细胞的作用, 槲皮素自微乳抑瘤作用高于槲皮素组。槲皮素自微乳可能通过抑制 Akt 信号通路, 发挥其抗肿瘤的作用。

**[关键词]** 槲皮素自微乳; S180 细胞; 蛋白激酶 B(Akt) 信号通路; 机制

**[中图分类号]** R22; R242; R273; R285.5; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0097-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181315

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180418.0957.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-18 11:57

## Anti-tumor Effect and Mechanisms of Quercetin Self-nanoemulsifying Drug Delivery System

SUN Yang, YU Shui-lan, WU Bo-yan\*, CHE Yan-xin, WANG Xue

(College of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-tumor effect of quercetin self-nanoemulsifying drug delivery system (Q-SNEDDS) on mice sarcomarosarcoma cell S180 and explore its molecular mechanism. **Method:** Q-SNEDDS and Blank-SNEDDS were prepared, and then their particle size and Zeta potential were measured respectively. The *in vivo* experiment was divided into 6 groups: blank group, cyclophosphamide (CTX) group (20 mg·kg<sup>-1</sup>), high dose Q-SNEDDS group (50 mg·kg<sup>-1</sup>), middle dose Q-SNEDDS group (25 mg·kg<sup>-1</sup>), low dose Q-SNEDDS group (12.5 mg·kg<sup>-1</sup>) and quercetin control group (50 mg·kg<sup>-1</sup>). S180 bearing mice models were established by using tumor cell transplantation method. After 10 days of drug administration, the inhibition rate and indexes of organ (liver, spleen and thymus) were measured in all groups. B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and protein kinase B (Akt) mRNA expression levels of S180 were measured by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression levels of Bax, Bcl-2,

**[收稿日期]** 20171022(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81704054); 中国博士后科学基金项目(2014M551288); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13205); 黑龙江中医药大学优秀青年教师支持计划项目(051234)

**[第一作者]** 孙阳, 博士, 副教授, 在读博士后, 从事中医药抗肿瘤分子机制的基础研究, E-mail: yangsun66@sina.com

**[通信作者]** \* 吴勃岩, 硕士, 教授, 从事中医药抗肿瘤分子机制的基础研究, Tel: 0451-82193641, E-mail: wuboyan.1958@163.com

Akt and p-Akt were measured by Western blot method. **Result:** Q-SNEDDS, CTX and quercetin groups could inhibit the growth of tumor cells as compared with blank group, and the inhibition rate in Q-SNEDDS groups was higher than that in Quercetin group ( $P < 0.05$ ). The organ indexes of CTX group were lower than those in blank group ( $P < 0.05$ ) and the indexes of Q-SNEDDS group were higher than those in CTX group ( $P < 0.05$ ). As compared with blank group, Q-SNEDDS up-regulated Bax mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ ). Q-SNEDDS down-regulated Bcl-2 mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ ), down-regulated Akt mRNA and p-Akt protein, but Akt protein expression didn't change obviously. **Conclusion:** Q-SNEDDS played the anti-tumor role *in vivo*, and the effect was superior to quercetin. Its mechanism may be associated with inhibiting Akt signaling pathway.

**[Key words]** quercetin self-nanoemulsifying drug delivery system (Q-SNEDDS); S180 cell; protein kinase B (Akt) signaling pathway; mechanism

槲皮素 (quercetin), 又名栲精、槲皮黄素, 是具有多种生物学活性的黄酮类化合物, 存在于多种植物中<sup>[1]</sup>, 多数中药中含有槲皮素。研究发现, 槲皮素具有抗炎症、抗肿瘤、抗过敏、抗氧化等作用。近年来, 槲皮素抗肿瘤的研究较多, 槲皮素可以诱导多种肿瘤细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>, 抑制肿瘤细胞增殖和侵袭<sup>[4-5]</sup>, 诱导肿瘤细胞自噬<sup>[6]</sup>, 并可逆转肿瘤细胞耐药性<sup>[7]</sup>。槲皮素抗肿瘤效果显著, 毒副作用小, 但由于其水溶性较差, 与水、油均不相溶, 限制了药物的临床应用。为了提高槲皮素的口服生物利用度, 学者们将槲皮素制成不同剂型, 主要有固体脂质纳米粒、自微乳、滴丸、包合物等剂型<sup>[8-9]</sup>, 但将槲皮素自微乳应用于抗肿瘤的研究鲜有报道。自微乳是一种由油、乳化剂、助乳化剂及药物组成的均一透明溶液, 口服后自发形成微乳<sup>[10]</sup>, 该给药系统通过提高药物溶解度、降低表面张力、增加对肠道上皮穿透性等来提高药物到达全身血液循环率<sup>[8]</sup>。前期实验发现, 槲皮素水溶液抑制了 S180 细胞的增殖。本研究主要通过制备槲皮素自微乳, 将槲皮素自微乳和未制备剂型的槲皮素组分别作用于 S180 荷瘤小鼠, 比较两者对 S180 细胞抑制作用的差异, 开展体内实验研究槲皮素抑瘤作用及其分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞株** 60 只清洁级昆明种健康小鼠, 雌雄各半, 体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 6 ~ 8 周龄, 购自于黑龙江中医药大学药物安全评价中心, 合格证号 SCXK(黑)2013-004。S180 肉瘤细胞由黑龙江中医药大学王艳杰副教授馈赠。本实验研究均符合黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会有关实验动物研究指导原则。

**1.2 药品与试剂** 槲皮素 (Sigma 公司, 货号 117-39-5); 蓖麻油 (Aladdin Industrial Corporation 公司, 批号 E1414071); 聚山梨酯-80 (天津市富宇精细化

工有限公司, 批号 20140901); 蓖麻油聚氧乙烯醚 (RH40, 麦克林公司, 货号 61791-12-6); 聚乙二醇 400 (PEG400, 天津市光复精细化工研究所, 批号 20131112); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 货号 M-2128); B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (Abcam 公司, 货号分别为 ab182858, ab32503, ab128915); 蛋白激酶 B (Akt), 磷酸化-Akt (p-Akt) 抗体 (CST 公司, 货号分别为 9272, 4060)。

**1.3 仪器** Aira 型流式细胞仪 (美国 BD 公司), Multiskan MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), Zetasizer Nano-ZS90 型纳米粒及 Zeta 电位分析仪 (英国 Malvern 公司), MX3000P 型 Real-time PCR Instrument (美国 Agilent 公司), PowerPac™ HC 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), VE-180 型垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 槲皮素自微乳制备** 按照文献[11]制备槲皮素自微乳, 槲皮素 ( $30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 与蓖麻油-聚山梨酯-80-RH40-PEG400, 混合  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴温 and 搅拌直至药物完全溶解, 槲皮素自微乳呈棕色透明粘稠液; 同时制备无槲皮素的空白自微乳。取槲皮素自微乳和空白自微乳加蒸馏水分别稀释制成黄色和无色透明微乳液, 置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中 48 h, 无杂质析出, 对其粒径和 Zeta 电位检测。将制备的微乳液过  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱内保存待用。

**2.2 抑瘤作用及脏器指数检测** 取传代 7 d 的 S180 腹水移植瘤小鼠, 用无菌注射器抽取小鼠腹部腹水, 抽取出的腹水为乳白色液体, 转移至无菌离心管中,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清液, 生理盐水混匀, 细胞计数  $1 \times 10^7$  个/L, 吹打成单细胞悬液, 接种于待接种小鼠右前腋皮下,  $0.2 \text{ mL/只}$ 。于接种次日给药。空白组灌胃生理盐水  $0.2 \text{ mL/}$

只,灌胃 10 d;环磷酰胺组腹腔注射环磷酰胺 20 mg·kg<sup>-1</sup>,3 d<sup>[12]</sup>;槲皮素自微乳 3 个剂量组<sup>[13]</sup>(50,25,12.5 mg·kg<sup>-1</sup>)组灌胃给药 10 d;槲皮素组(50 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃 10 d。接种 S180 肿瘤细胞 11 d 后,称量小鼠体质量,用断颈椎的方法处死小鼠。剥瘤组织、肝脏、脾脏、胸腺,称重并记录。

抑瘤率 = (1 - 实验组瘤质量/空白组瘤质量) × 100%

肝体比 = 肝脏质量(mg)/小鼠体质量(g) × 10

脾脏指数 = 脾脏质量(mg)/小鼠体质量(g) × 10

胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/小鼠体质量(g) × 10

**2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 S180 细胞 Bcl-2, Bax, Akt 基因表达** 通过查找 Genbank 数据库,查找 Bax, Bcl-2, Akt, GAPDH mRNA 的全基因序列。引物由上海艾博思生物科技有限公司合成, Bcl-2 (83 bp): 上游 5'-AGGATAACGGAGGCTGGGATG-3', 下游 5'-CAGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC-3'; Bax (89 bp): 上游 5'-GCAGAGGATGATTGCTGACGTG-3', 下游 5'-TGAAGTTCATCAGCAAACATG-3'; Akt (106 bp): 上游 5'-ATGAACGACGTAGCCATTGTG-3', 下游 5'-TTGTAGCCAATAAAGTGCCAT-3'; GAPDH (129 bp): 上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'。

逆转录实验方法及条件同文献[14]。各组组织细胞用 trizol 法提取总 RNA,所得的 RNA 采用琼脂糖凝胶电泳法分析 RNA 的完整度,应用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。在无菌离心管中配置反应体系。反应条件:95 ℃ 变性 3 min;95 ℃ 30 s,62 ℃ 40 s,共 40 个循环。收集荧光信号,反应结束后,使用软件 (Sequence Detection software version 1.2.3) 分析各组的 C<sub>t</sub>。相对定量法 (ΔΔC<sub>t</sub>) 定量分析,比较 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 变化,分析各基因的表达,即相对 mRNA 表达 = 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>。以 GAPDH 作为内参,空白组作为基准,每组做 3 个样本。

**2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 S180 细胞 Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt 蛋白表达** 各组组织加入组织细胞裂解液 300 μL,取样本 10 μL 加入上样缓冲液混匀,100 ℃ 加热 5 min,冰上冷却,12 000 × g 离心 5 min 去除不溶沉淀。经过凝胶电泳、转膜、封闭、加入稀释好的一抗溶液 (Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt 1:1 000;GAPDH 1:1 万),4 ℃ 封闭过夜,第 3 天洗涤后加入后的二抗 (1:5 000) 孵育后显影检测,Gel-Pro Analyzer 分析电泳条带灰度值。实验重复 3 次。

**2.5 统计学方法** 数据应用 SPSS 19.0 统计软件

进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间计量资料比较采用方差分析,t 检验;P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 槲皮素自微乳和空白自微乳外观形态、粒径及 Zeta 电位观察** 空白自微乳 (Blank-SNEDDS) 为均一透明微黄的油状液体,槲皮素自微乳 (Q-SNEDDS) 为棕黄色均一油状液体,两种乳化剂加水稀释后发现,空白自微乳水溶液颜色为透明液体有乳光,槲皮素自微乳水溶液为淡黄的均一液体。用动态粒径电位分析仪测定槲皮素自微乳水溶液粒径为 (109.9 ± 7.1) nm, Zeta 电位 (-17.4 ± 2.9) mV; 空白纳米粒水溶液粒径为 (58.02 ± 2.25) nm, Zeta 电位 (-6.93 ± 0.80) mV。结果表明,与空白自微乳比较,槲皮素自微乳粒径升高 (P < 0.05)。考虑药物分子上的亲水基团增加了药物分子的极性,会吸引更多非极性分子 (如油性外壳),因此粒径变大。此外,与空白自微乳比较,槲皮素自微乳 Zeta 电位绝对值升高 (P < 0.05),说明槲皮素自微乳体系相对稳定。

**3.2 槲皮素自微乳对 S180 荷瘤小鼠抑瘤作用及对脏器指数的影响** 与空白组相比,用药组瘤质量降低 (P < 0.05);随着槲皮素自微乳浓度增加,抑瘤率增加,具有剂量-效应依赖性。与槲皮素组相比,槲皮素自微乳组瘤质量降低 (P < 0.05),抑瘤率升高,说明自微乳提高了药物抗肿瘤作用。与空白组比较,环磷酰胺组脏器指数降低 (P < 0.05),槲皮素自微乳高剂量组升高 (P < 0.05);与环磷酰胺组比较,槲皮素自微乳组脏器指数升高 (P < 0.05)。结果表明,槲皮素自微乳可能提高了机体免疫系统功能,环磷酰胺对免疫功能有抑制作用。槲皮素自微乳抑瘤率低于环磷酰胺,但其对机体重要器官的保护作用明显优于环磷酰胺。见表 1。

**3.3 槲皮素自微乳对 S180 细胞 Bcl-2, Bax, Akt mRNA 表达的影响** 与空白组比较,槲皮素自微乳随着剂量增加,Bcl-2, Akt mRNA 表达均降低 (P < 0.01), Bax mRNA 表达升高 (P < 0.01);与环磷酰胺组比较,槲皮素各组 Bcl-2, Akt mRNA 的表达升高 (P < 0.05), Bax mRNA 表达降低 (P < 0.05);与槲皮素组比较,槲皮素自微乳高剂量组 Akt mRNA 表达降低 (P < 0.01), Bax mRNA 表达升高 (P < 0.01)。见表 2。

**3.4 槲皮素自微乳对 S180 细胞 Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt 蛋白表达的影响** 与空白组比较,槲皮素自微

表 1 槲皮素自微乳对 S180 荷瘤小鼠抑瘤作用及对脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Anti-tumor effect of Q-SNEDDS on S180 tumor bearing mice and effect on organ indexes ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	瘤质量 /g	抑瘤率 /%	肝/体比 /mg·g <sup>-1</sup>	脾指数 /mg·g <sup>-1</sup>	胸腺指数 /mg·g <sup>-1</sup>
空白	-	1.895 ± 0.563	-	60.38 ± 8.18	5.32 ± 2.13	2.02 ± 0.78
环磷酰胺	20	0.815 ± 0.283 <sup>2)</sup>	56.99	54.15 ± 3.40 <sup>1)</sup>	2.49 ± 0.58 <sup>1)</sup>	1.36 ± 0.47 <sup>1)</sup>
槲皮素	50	1.240 ± 0.186 <sup>1)</sup>	34.56	58.14 ± 9.29 <sup>3)</sup>	5.53 ± 2.48 <sup>4)</sup>	2.48 ± 0.35 <sup>1,4)</sup>
槲皮素自微乳	12.5	1.141 ± 0.103 <sup>1)</sup>	39.75	58.20 ± 3.16 <sup>3)</sup>	5.22 ± 1.08 <sup>4,5)</sup>	2.09 ± 0.39 <sup>3,5)</sup>
	25	1.030 ± 0.157 <sup>2,5)</sup>	45.64	60.51 ± 5.42 <sup>3,5)</sup>	5.96 ± 0.91 <sup>4,5)</sup>	2.33 ± 0.55 <sup>4)</sup>
	50	0.891 ± 0.244 <sup>2,6)</sup>	52.94	67.79 ± 6.43 <sup>1,4,6)</sup>	6.64 ± 2.39 <sup>1,4,6)</sup>	2.54 ± 0.52 <sup>1,4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与环磷酰胺组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与槲皮素组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

表 2 槲皮素自微乳对小鼠 Bcl-2, Bax, Akt mRNA 相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Q-SNEDDS on mice of relative mRNA expression of Bcl-2, Bax and Akt in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax	Akt
空白	-	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
环磷酰胺	20	0.42 ± 0.01 <sup>2)</sup>	2.11 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>2)</sup>
槲皮素	50	0.62 ± 0.01 <sup>2,4)</sup>	1.29 ± 0.02 <sup>2,4)</sup>	0.84 ± 0.03 <sup>2,4)</sup>
槲皮素自微乳	12.5	0.82 ± 0.01 <sup>2,4,6)</sup>	1.50 ± 0.01 <sup>2,4,6)</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>
	25	0.71 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	1.75 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>
	50	0.58 ± 0.03 <sup>2,4)</sup>	2.03 ± 0.03 <sup>2,3,6)</sup>	0.49 ± 0.02 <sup>2,3,6)</sup>

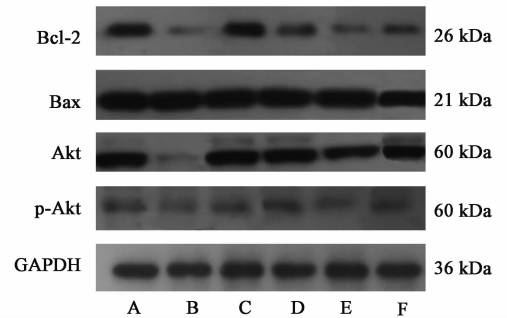
乳随着剂量增加, Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 环磷酰胺组低于槲皮素各组 ( $P < 0.05$ ), 但与槲皮素自微乳高剂量组比较, 无统计学差异。与空白组比较, 各用药组 Bax 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较, 环磷酰胺组 Akt 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ), 环磷酰胺组和槲皮素自微乳高剂量组 p-Akt 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。见图 1, 表 3。

表 3 槲皮素自微乳对小鼠 Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Q-SNEDDS on mice of relative protein expression of Bcl-2, Bax and Akt in different groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白	-	0.93 ± 0.02	0.84 ± 0.02	1.07 ± 0.01	0.43 ± 0.01
环磷酰胺	20	0.22 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.87 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>2)</sup>
槲皮素	50	0.38 ± 0.01 <sup>2,4)</sup>	1.08 ± 0.02 <sup>2,4)</sup>	1.25 ± 0.03 <sup>1,4)</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>4)</sup>
槲皮素自微乳	12.5	0.96 ± 0.01 <sup>4,6)</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>1,3,6)</sup>	1.10 ± 0.02 <sup>4,5)</sup>	0.44 ± 0.01 <sup>4)</sup>
	25	0.59 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	1.07 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	1.04 ± 0.06 <sup>4,5)</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>4)</sup>
	50	0.22 ± 0.01 <sup>2,6)</sup>	1.45 ± 0.02 <sup>2,4,6)</sup>	0.99 ± 0.05 <sup>4,5)</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>2,3,6)</sup>

提高了药物体内抗肿瘤作用, 也增强了荷瘤鼠的免疫功能。



A. 空白组; B. 环磷酰胺组; C ~ E. 槲皮素自微乳低、中、高剂量组; F. 槲皮素组

图 1 各组小鼠 Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expressions of Bcl-2, Bax, Akt and p-Akt in rats of different groups

#### 4 讨论

本实验通过制备槲皮素自微乳剂型, 并将其作用于 S180 荷瘤小鼠, 实验发现槲皮素自微乳对 S180 细胞具有明显的抑制作用, 并能提高肝、脾、胸腺指数, 说明药物发挥了免疫调节作用。相同剂量 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的槲皮素自微乳与未制备剂型的槲皮素组比较, 抑瘤率和脏器指数均升高, 说明自微乳

Akt 信号通路的激活过度是肿瘤细胞存活机制<sup>[15-17]</sup>。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是

PI3K 的下游靶分子之一,激活 PI3K/Akt 信号通路可以抑制细胞凋亡,促进细胞生长、增殖<sup>[18-19]</sup>。本实验发现槲皮素自微乳下调 Akt mRNA 的表达,对 Akt 蛋白影响不明显,但可下调 p-Akt 蛋白表达,说明槲皮素对 Akt 信号通路有一定的抑制作用,但抑制作用低于环磷酸胺。

Akt 信号通路在 Bcl-2 和 Bax 上游,Bcl-2 和 Bax 均属于 Bcl-2 家族,与细胞凋亡密切相关<sup>[20]</sup>,但二者作用相反,Bcl-2 抑制细胞凋亡,Bax 诱导细胞凋亡。Bcl-2 抑制了促进凋亡的 Caspase-3 或其他蛋白酶的活性而抑制细胞凋亡,肿瘤细胞高水平的 Bcl-2 蛋白保证了细胞的存活;Bax 的表达升高可以激活 Caspase 相关的蛋白酶,影响线粒体通透性,诱发细胞凋亡。因此,Bax 和 Bcl-2 基因的表达对细胞的存活起到关键性作用。本实验证实,槲皮素可以抑制 Bcl-2 基因和蛋白表达,上调 Bax 基因和蛋白表达,槲皮素自微乳高剂量组上调 Bax 基因表达和下调 Bcl-2 基因表达作用高于槲皮素组,因此槲皮素自微乳组抑瘤率高于槲皮素组。槲皮素可能通过抑制 Akt 信号通路促进细胞凋亡,进而发挥抗肿瘤的作用。从实验结果还可以发现,药物下调 Bcl-2 基因表达的作用比较明显,是否其上游还有其他信号通路对其有调控作用,本课题组会继续深入研究。

#### 【参考文献】

[1] 孙阳,车艳新,吴勃岩. 槲皮素抗肿瘤药理作用及剂型研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(20): 3142-3144.

[2] 马建勋,田宏伟,李安强,等. 槲皮素诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(23): 1792-1795.

[3] Youn H S, Jeong J C, Jeong Y S, et al. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(6): 944-951.

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

[5] ZHOU J, LI L, FANG L, et al. Quercetin reduces cyclin D<sub>1</sub> activity and induces G<sub>1</sub> phase arrest in HepG2 cells [J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 516-522.

[6] LUO C L, LIU Y Q, WANG P, et al. The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via

JAK2 suppression [J]. Biomed Pharmacother, 2016 (82): 595-605.

[7] 李彩丽,成丹,孙泽群,等. 槲皮素逆转结肠癌耐药细胞 SW480/OXP 耐药性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(5): 551-554.

[8] Bagad M, Khan Z A. Poly (N-butylcyanoacrylate) nanoparticles for oral delivery of quercetin: preparation, characterization, and pharmacokinetics and biodistribution studies in Wistar rats [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10(1): 3921-3935.

[9] Lockhart J N, Stevens D M, Beezer D B, et al. Dual drug delivery of tamoxifen and quercetin: regulated metabolism for anticancer treatment with nanosponges [J]. J Control Release, 2015, 220 (Pt B): 751-757.

[10] Hauss D J. Oral lipid-based formulations[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2007, 59(7): 667-676.

[11] TRAN T H, GUO Y, SONG D H, et al. Quercetin-containing self-nanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability [J]. J Pet Sci, 2014, 103(3): 840-852.

[12] 于娅,李利民,潘嘉,等. 鞣花酸抗 S180, H22 肿瘤及其抑制新生血管机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 145-150.

[13] 马双慰,吴凯南,钟晓刚,等. 槲皮素对人乳腺癌裸鼠移植瘤抑制作用的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(3): 248-251.

[14] 孙阳,杨婧,张琪琪,等. 红花多糖对肝癌细胞增殖阻滞的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 156-159.

[15] 牛国梁,张树友. PI3K/Akt 信号转导通路与肿瘤[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3994-3996.

[16] 杨鹏,张松,郭舜,等. 苦参碱抑制 Akt 信号通路诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 109-113.

[17] Manning B D, Cantley L C. Akt/PKB signaling: navigating downstream [J]. Cell, 2017, 129(7): 1261-1271.

[18] 壮雨雯,周锦勇,吴坚,等. 澳洲茄胺诱导肠癌 HCT-116 细胞凋亡的实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 69-73.

[19] 赵琴,杨国成,杨桂艳,等. 青蒿素对 MCF-7 乳腺癌细胞 Akt 及 survivin 蛋白表达影响的研究[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2017, 11(5): 766-769.

[20] DONG J W, ZHU H F, ZHU W Z, et al. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression [J]. Cell Res, 2003, 13(5): 385-391.

【责任编辑 张丰丰】