

槲皮素对人宫颈鳞癌顺铂耐药细胞 SiHa/DDP 的逆转作用研究[△]

冯磊^{1*}, 杨建敏¹, 杨然¹, 孙丽¹, 董莉丽¹, 张清伟²(1. 南阳市中心医院妇科, 河南南阳 473000; 2. 漯河医学高等专科学校第一附属医院妇科, 河南漯河 462000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2875-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.10



摘要 目的: 研究槲皮素对人宫颈鳞癌顺铂耐药细胞 SiHa/DDP 的逆转作用。方法: 测定顺铂对 SiHa/DDP 细胞的耐药指数以及槲皮素对 SiHa/DDP 细胞的逆转耐药倍数; 考察槲皮素(0.005 μg/mL)、顺铂(2.5 μg/mL)、顺铂联合槲皮素(2.5 μg/mL 顺铂+0.005 μg/mL 槲皮素)、槲皮素联合通路抑制剂(0.005 μg/mL 槲皮素+20 nmol/L 雷帕霉素)对 SiHa/DDP 细胞凋亡率及磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路相关蛋白[PI3K、Akt、mTOR、肿瘤多药耐药蛋白(P-gp)、p70 核糖体 S6 激酶(p70S6K)]表达的影响。结果: 顺铂对 SiHa/DDP 细胞的耐药指数为 5.19, 槲皮素对 SiHa/DDP 细胞的逆转耐药倍数为 4.00。与单用顺铂和单用槲皮素比较, 顺铂联合槲皮素、槲皮素联合雷帕霉素均可显著升高 SiHa/DDP 细胞的凋亡率($P < 0.05$), 显著降低 Akt、mTOR、p70S6K 蛋白的磷酸化水平和 P-gp 蛋白的表达水平($P < 0.05$)。结论: 槲皮素可逆转 SiHa/DDP 细胞对顺铂的耐药性, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达有关。

关键词 槲皮素; 宫颈鳞癌; SiHa/DDP 细胞; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 耐药性; 逆转

Study on Reversal Effect of Quercetin on Human Cervical Squamous Carcinoma Cisplatin-resistant Cell Line SiHa/DDP

FENG Lei¹, YANG Jianmin¹, YANG Ran¹, SUN Li¹, DONG Lili¹, ZHANG Qingwei²(1. Dept. of Gynaecology, Nanyang Municipal Central Hospital, Henan Nanyang 473000, China; 2. Dept. of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Henan Luohe 462000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the reversal effect of quercetin on human cervical squamous carcinoma cisplatin-resistant cell line SiHa/DDP. METHODS: The drug resistance index of cisplatin to SiHa/DDP cells, and the reversal resistance multiple of quercetin to SiHa/DDP cells were determined. The effects of quercetin (0.005 μg/mL), cisplatin (2.5 μg/mL), cisplatin combined with quercetin (2.5 μg/mL cisplatin+0.005 μg/mL quercetin), quercetin combined with pathway inhibitor (0.005 μg/mL quercetin+20 nmol/L rapamycin) on the apoptotic rate of SiHa/DDP cells were investigated, as well as its effects on the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian rapamycin target protein (mTOR) signaling pathway related proteins (PI3K, Akt, mTOR, P-gp, p70S6K). RESULTS: The resistance index of cisplatin to SiHa/DDP cells was 5.19, and reversal resistance multiple of quercetin to SiHa/DDP cells was 4.00. Compared with cisplatin alone and quercetin alone, cisplatin combined with quercetin, quercetin combined with rapamycin could significantly increase the apoptotic rate of SiHa/DDP cells ($P < 0.05$), while decreased the phosphorylation of Akt, mTOR and p70S6K protein as well as the expression of P-gp protein ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Quercetin can effectively reverse drug resistance of SiHa/DDP cells to cisplatin, which may be associated with inhibiting the expression of the protein related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

KEYWORDS Quercetin; Cervical squamous carcinoma; SiHa/DDP cells; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Drug resistance; Reversal

宫颈癌是较常见的恶性肿瘤之一, 其发生、发展与人乳头瘤病毒(HPV)密切相关; 在宫颈癌的病理分类中, 宫颈鳞癌是最主要的类型, 约占 80%^[1]。有研究提示, 以顺铂为基础的辅助化疗对宫颈鳞癌的副作用小、疗效确切, 可改善患者局部病灶, 提高患者生存率; 但顺铂易产生耐药性, 降低肿瘤化疗的效果^[2]。相关研究发

现, 在多数耐药肿瘤细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路常处于异常激活的状态^[3]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白是调控细胞增殖及分裂的关键信号分子, 可影响肿瘤多药耐药蛋白(P-gp)、p70 核糖体 S6 激酶(p70S6K)等蛋白的表达, 从而激活肿瘤细胞的耐药作用^[4-5]。

槲皮素是黄酮类化合物, 对多种恶性肿瘤均具有抑制作用, 可促进肿瘤细胞凋亡, 抑制其迁移和侵袭, 同时还可增加肿瘤细胞对化疗的敏感性^[3]。但槲皮素是否可逆转宫颈癌细胞的耐药性, 尚不明确。为此, 本研究基

[△] 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(No.2018021026); 漯河医学高等专科学校 2020 年度创新创业发展能力提升工程项目(No.2020-LYZKYYB047)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 宫颈癌、子宫内膜癌。电话: 0377-65036103。E-mail: baihe1402@163.com

于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨槲皮素对人宫颈鳞癌顺铂耐药细胞SiHa/DDP的逆转作用,以期为宫颈癌的临床治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用MR-96A型自动酶标仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,CytoFLEX型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司,DGENETM型自动电泳凝胶成像分析仪购自日本Olympus公司,CCL-170B-8型细胞培养箱购自上海必宝生物科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用DMEM培养基、胎牛血清(批号分别为17M483、1967839)购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素溶液、CCK-8试剂、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为1936917、C0038、C1062L、P0012)均购自上海碧云天生物技术有限公司;顺铂(批号H37021358)购自山东齐鲁制药有限公司;槲皮素、兔抗小鼠Akt单克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化Akt(p-Akt)单克隆抗体、兔抗小鼠mTOR单克隆抗体、兔抗小鼠磷酸化mTOR(p-mTOR)单克隆抗体(批号分别为Q4951、SAB4500796、SAB4504331、SAB4501038、SAB4504476)均购自美国Sigma公司;兔抗小鼠p70S6K单克隆抗体、兔抗小鼠P-pg单克隆抗体、兔抗小鼠GAPDH单克隆抗体(批号分别为14485-1-AP、2236-1-AP、16825-1-AP)均购自美国Proteintech公司;兔抗小鼠磷酸化p70S6K(p-p70S6K)多克隆抗体(批号RS-2602R)购自美国Cell Signaling公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(二抗)(批号20000258)购自美国CST公司;高效ECL显色试剂(批号1515601)购自美国Millipore公司;雷帕霉素(批号H12J10J79598,纯度99%)购自上海源叶生物科技有限公司;其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 细胞

人宫颈鳞癌细胞SiHa购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,人宫颈鳞癌顺铂耐药细胞SiHa/DDP购自湖南丰晖生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将SiHa细胞和SiHa/DDP细胞以含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM培养基(以下简称“完全培养基”),于37℃、5%CO₂的培养箱中进行常规培养。在细胞状态良好、融合度达80%~90%时,以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,进行传代。取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 SiHa/DDP细胞的耐药指数检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的SiHa细胞和SiHa/DDP细胞,按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于96孔板中,每孔100 μL,常规培养12 h后,将细胞分为对照组和不同

浓度顺铂组(顺铂终质量浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、7.5 μg/mL,参考文献[6]设置),每组设5个复孔。对照组加入完全培养基200 μL,不同浓度顺铂组加入含相应质量浓度顺铂的完全培养基100 μL,常规培养24 h;弃去培养基,每孔加入CCK-8试剂10 μL,于室温孵育2 h后,采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔光密度(OD)值。计算细胞抑制率[细胞抑制率=(对照组OD值-给药组OD值)/对照组OD值 $\times 100\%$]和顺铂的半抑制浓度(IC₅₀),再在此基础上计算SiHa/DDP细胞的耐药指数(耐药指数=SiHa/DDP细胞的IC₅₀/SiHa细胞的IC₅₀)。

2.3 槲皮素对SiHa/DDP细胞的耐药逆转作用考察

2.3.1 槲皮素对SiHa细胞、SiHa/DDP细胞的抑制作用考察 采用CCK-8法进行考察。取对数生长期的SiHa细胞和SiHa/DDP细胞,按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于96孔板中,每孔100 μL,常规培养12 h后,将两种细胞均分别分为对照组、不同浓度槲皮素组(槲皮素的终质量浓度分别为0.005、0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.125、0.15 μg/mL,参考文献[6]设置),每组设5个复孔。对照组加入200 μL完全培养基,不同浓度槲皮素组加入含相应质量浓度槲皮素的完全培养基100 μL,常规培养24 h;弃去培养基,每孔加入CCK-8试剂10 μL,于室温孵育2 h后,采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔OD值,按“2.2”项下方法计算槲皮素对SiHa、SiHa/DDP细胞的抑制率。

2.3.2 槲皮素对SiHa/DDP细胞的逆转耐药倍数检测 采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的SiHa/DDP细胞,按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于96孔板中,每孔100 μL,常规培养12 h后,将细胞分为对照组、不同浓度顺铂组、顺铂+不同浓度槲皮素组,每组设5个复孔。对照组加入完全培养基200 μL,不同浓度顺铂组加入含顺铂的完全培养基100 μL(顺铂终质量浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、7.5 μg/mL),顺铂+不同浓度槲皮素组加入含顺铂和槲皮素的完全培养基100 μL(固定顺铂的终质量浓度为2.5 μg/mL,槲皮素的终质量浓度分别为0.005、0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.125、0.15 μg/mL,参考“2.2”项下结果以及预实验结果设置),常规培养24 h;弃去培养基,每孔加入CCK-8试剂10 μL,于室温孵育2 h后,采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔OD值,按“2.2”项下方法计算细胞抑制率和药物的IC₅₀,并计算槲皮素对SiHa/DDP细胞的逆转耐药倍数[逆转耐药倍数=顺铂组的IC₅₀/(顺铂+不同浓度槲皮素组的IC₅₀)]^[7-8]。

2.4 槲皮素对SiHa/DDP细胞凋亡率的影响考察

取对数生长期的SiHa/DDP细胞,按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于96孔板中,每孔100 μL,常规培养12 h后,将细胞分为对照组、槲皮素组(0.005 μg/mL)、顺铂组(2.5 μg/mL)、顺铂+槲皮素组(2.5 μg/mL顺铂+0.005 μg/mL槲皮素)、槲皮素+通路抑制剂组(0.005 μg/mL槲皮素+20 nmol/L雷帕霉素),每组设5个复孔。各组给药浓度参考预实验结果设置。对照组加入完全培养基200 μL,各给药组加

入含相应药物的完全培养基 200 μL , 常规培养 24 h; 收集细胞, 以 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 洗涤 2 次, 并调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 以 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 下层细胞加入 Annexin V-FITC 结合液重悬; 取细胞悬液 100 μL , 加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μL 以及碘化吡啶 10 μL , 于室温避光孵育 15 min 后, 加入 PBS 至 500 μL , 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.5 槲皮素对 SiHa/DDP 细胞中 Akt、mTOR、p70S6K、P-gp 蛋白表达的影响考察

采用 Western blot 法进行考察。取对数生长期的 SiHa/DDP 细胞, 按 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 常规培养 12 h 后, 按“2.4”项下方法分组、给药和培养, 每组设 3 个复孔。收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min, 以 12 000 r/min 离心 10 min 后收集总蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白煮沸 10 min 进行变性, 然后取 50 μg 变性蛋白, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 转膜, 以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 Akt (稀释度为 1:1 000)、p-Akt (稀释度为 1:1 000)、mTOR (稀释度为 1:1 000)、p-mTOR (稀释度为 1:1 000)、p-p70S6K (稀释度为 1:1 000)、p70S6K (稀释度为 1:2 000)、P-gp (稀释度为 1:1 000)、GAPDH (稀释度为 1:2 000) 一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜; 以 PBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次, 加入相应二抗 (稀释度为 1:1 000), 于室温孵育 2 h; 以 PBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次, 加入 ECL 显色试剂显色, 置于凝胶成像分析仪中成像。采用 Image J v1.7.0 软件分析, 以 p-Akt 与 Akt、p-mTOR 与 mTOR、p-p70S6K 与 p70S6K 的灰度值比值分别表示 Akt、mTOR、p70S6K 的蛋白磷酸化水平, 以 P-gp 与内参 GAPDH 的灰度值比值表示 P-gp 蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 SiHa/DDP 细胞的耐药指数

顺铂对 SiHa/DDP 细胞的 IC_{50} 为 14.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 显著高于其对 SiHa 细胞的 IC_{50} (2.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.01$); SiHa/DDP 细胞的耐药指数为 5.19。

3.2 槲皮素对 SiHa/DDP 细胞的耐药逆转作用

不同浓度的槲皮素对 SiHa 细胞和 SiHa/DDP 细胞均具有抑制作用, 且细胞抑制率随着槲皮素浓度的增加呈逐渐升高的趋势。另外, 与同一剂量作用于 SiHa 细胞比较, 槲皮素 (0.005~0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 除外) 对 SiHa/DDP 细胞的抑制作用显著增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见表 1。另经计算, 顺铂联合槲皮素对 SiHa/DDP 细胞的 IC_{50} 为 3.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 槲皮素的逆转耐药倍数为 4.00。

表 1 各组 SiHa 细胞和 SiHa/DDP 细胞的抑制率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Inhibition rate of SiHa and SiHa/DDP cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	SiHa 细胞	SiHa/DDP 细胞
对照组	0.73 \pm 0.37	0.84 \pm 0.39
槲皮素 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	6.08 \pm 2.26	8.70 \pm 1.65
槲皮素 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	12.31 \pm 2.50	13.50 \pm 2.30
槲皮素 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	19.33 \pm 1.99	20.72 \pm 3.65
槲皮素 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	34.23 \pm 3.16	50.77 \pm 3.32**
槲皮素 0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	50.78 \pm 2.75	63.85 \pm 2.89**
槲皮素 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	63.08 \pm 2.02	71.54 \pm 3.07*
槲皮素 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	66.89 \pm 2.71	73.23 \pm 2.92*
槲皮素 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	72.92 \pm 2.67	81.54 \pm 3.08*

注: 与同一剂量下的 SiHa 细胞比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. SiHa cells under same dosage, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 槲皮素对 SiHa/DDP 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 槲皮素组、顺铂组、顺铂+槲皮素组、槲皮素+通路抑制剂组的细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$); 与槲皮素组和顺铂组分别比较, 顺铂+槲皮素组、槲皮素+通路抑制剂组的细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 1、表 2。

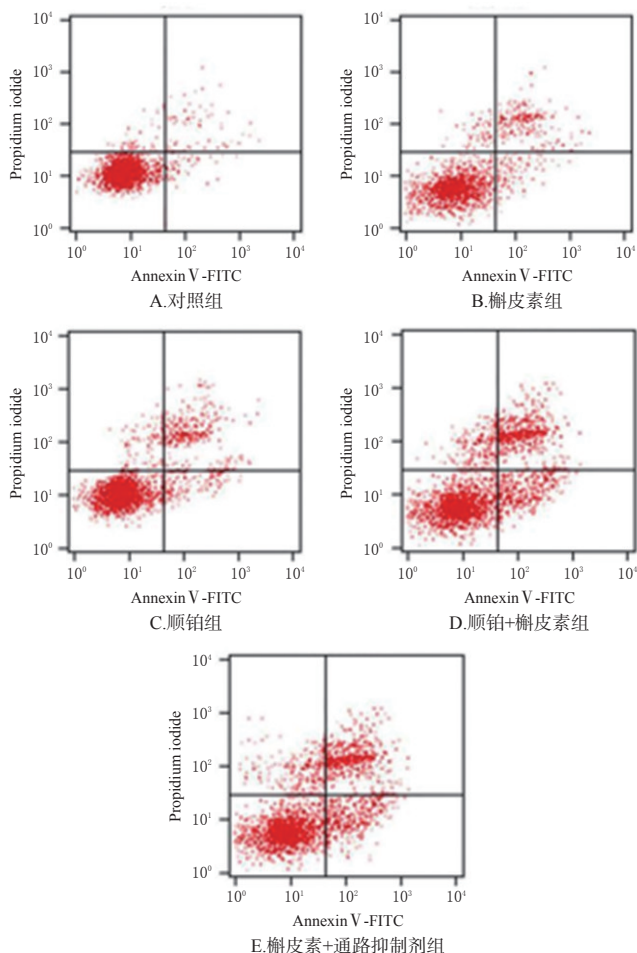


图 1 各组 SiHa/DDP 细胞凋亡的流式图

Fig 1 Flow cytometry chart of the apoptosis of SiHa/DDP cells in each group

表2 各组SiHa/DDP细胞凋亡率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Tab 2 Apoptotic rate of SiHa/DDP cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

组别	细胞凋亡率	组别	细胞凋亡率
对照组	2.03 ± 0.31	顺铂+槲皮素组	28.34 ± 2.69 ^{***}
槲皮素组	15.23 ± 1.69 [*]	槲皮素+通路抑制剂组	29.66 ± 2.93 ^{***}
顺铂组	12.59 ± 1.44 [*]		

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与槲皮素比较, [#] $P < 0.05$; 与顺铂组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. quercetin group, [#] $P < 0.05$; vs. cisplatin group, ^Δ $P < 0.05$

3.4 槲皮素对SiHa/DDP细胞中Akt、mTOR、p70S6K、P-gp蛋白表达的影响

与对照组比较,槲皮素组细胞中Akt、mTOR、p70S6K、P-gp蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$);与槲皮素组和顺铂组分别比较,顺铂+槲皮素组、槲皮素+通路抑制剂组细胞中上述蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见图2、表3。

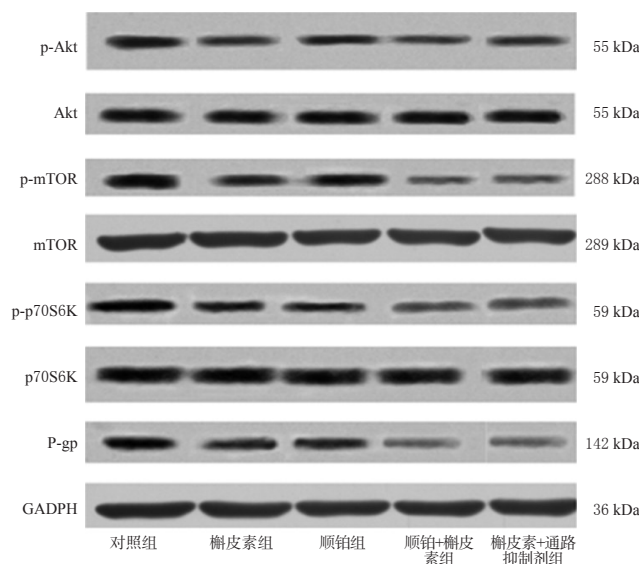


图2 各组SiHa/DDP细胞中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of the expression of the protein related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in SiHa/DDP cells of each group

4 讨论

宫颈癌是世界范围内对女性影响最大的常见恶性肿瘤之一,严重影响女性生命健康和生活质量。在宫颈癌患者群体中,约13%的患者在疾病晚期才得到诊断,从而大大降低了患者生存率^[9]。顺铂作为治疗宫颈癌最常用的治疗药物之一,在临床上得到了广泛的应用,然而耐药性却严重影响其治疗质量^[10]。宫颈癌细胞可以通过很多途径对顺铂产生耐药,例如降低顺铂的摄入并增加外排,对抗顺铂对DNA的损伤作用以及抑制细胞凋亡信号通路等^[11]。相关研究发现,天然药物中的成分

表3 各组SiHa/DDP细胞中PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白磷酸化或表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 The phosphorylation or expression of the protein related to PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in SiHa/DDP cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR	p-p70S6K/p70S6K	P-gp/GAPDH
对照组	0.59 ± 0.07	0.63 ± 0.07	0.77 ± 0.09	0.80 ± 0.12
槲皮素组	0.47 ± 0.04 [*]	0.51 ± 0.04 [*]	0.62 ± 0.08 [*]	0.59 ± 0.07 [*]
顺铂组	0.50 ± 0.01	0.54 ± 0.07	0.66 ± 0.08	0.62 ± 0.05
顺铂+槲皮素组	0.24 ± 0.06 ^Δ	0.27 ± 0.01 ^Δ	0.38 ± 0.02 ^Δ	0.32 ± 0.04 ^Δ
槲皮素+通路抑制剂组	0.26 ± 0.05 ^Δ	0.28 ± 0.02 ^Δ	0.39 ± 0.01 ^Δ	0.35 ± 0.02 ^Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与槲皮素比较, [#] $P < 0.05$; 与顺铂组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. quercetin group, [#] $P < 0.05$; vs. cisplatin group, ^Δ $P < 0.05$

不仅可以单独产生抗肿瘤作用,还可与顺铂产生协同作用,逆转肿瘤细胞对顺铂产生的耐药作用:黄芪多糖和顺铂联用可降低肺癌细胞对顺铂的耐药性^[12];柚皮苷和顺铂联用可大大提高顺铂对耐药A549/DDP细胞株的抑制作用^[13]。因此,联合用药为解决顺铂耐药性的问题提供了新的思路。

刘玉琼^[14]研究发现,青蒿素能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的活性,抑制宫颈癌细胞的扩散;王书惠等^[15]研究发现,紫草素能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路活性,诱导宫颈癌细胞的凋亡和自噬,从而抑制宫颈癌细胞增殖。由此可知,PI3K/Akt/mTOR信号通路对宫颈癌的发生、发展具有重要影响。

有研究发现,槲皮素可通过多条信号通路抑制宫颈癌细胞的增殖,并促进其凋亡^[16-19];还能大大降低乳腺癌MCF-7细胞对阿霉素的耐药性,并抑制耐药相关蛋白的活性^[20-21]。但目前关于槲皮素逆转宫颈癌耐药方面的研究较少。基于此,本研究探讨了槲皮素对人宫颈鳞癌顺铂耐药细胞SiHa/DDP的逆转作用。结果显示,槲皮素对SiHa/DDP细胞具有抑制作用,且呈一定的浓度依赖趋势,提示槲皮素单独应用可对SiHa/DDP细胞产生一定的抑制作用。进一步研究发现,槲皮素对SiHa/DDP细胞的逆转耐药倍数为4.00,表明槲皮素对顺铂耐药细胞SiHa/DDP具有一定逆转作用。这与杜春双等^[7]的研究结果相吻合。

p70S6K是mTOR蛋白的下游底物,被p-mTOR蛋白激活后可调控细胞内p70S6K mRNA的表达,从而影响乳腺癌等恶性肿瘤的发生、发展^[22]。P-gp是一种腺嘌呤核苷三磷酸依赖性跨膜转运蛋白,人体中P-gp越多则癌细胞产生耐药性的能力就越强,因此抑制P-gp蛋白的表达和功能是逆转多药耐药的重要途径^[23]。其次,有研究表明,mTOR是PI3K/Akt/mTOR信号通路的下游成分之一,其抑制剂雷帕霉素可通过抑制该信号通路活性降低

宫颈癌细胞的迁移与侵袭^[24]。因此,本研究采用雷帕霉素作为本实验的抑制剂。本研究结果显示,经槲皮素联合顺铂处理后,SiHa/DDP细胞中的Akt、mTOR、p70S6K的蛋白磷酸化水平和P-gp蛋白表达水平均显著降低,这与槲皮素联合抑制剂雷帕霉素处理后的结果一致,进一步表明槲皮素可通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,逆转SiHa/DDP细胞的耐药性。

综上所述,槲皮素可逆转SiHa/DDP细胞对顺铂的耐药性,其作用机制与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白的表达有关。

参考文献

[1] KOH W J, ABU-RUSTUM N R, BEAN S, et al. Cervical cancer, version 3.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(1): 64-84.

[2] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer[J]. Nature, 2019, 575(7782): 299-309.

[3] 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.

[4] 杨秀凤, 费晓璐, 吕红梅, 等. 宫颈鳞癌组织Akt/mTOR信号通路表达及意义[J]. 齐鲁医学杂志, 2017, 32(4): 388-390.

[5] TORREALBAN, RODRIGUEZ-BERRIGUETE G, FRAILE B, et al. PI3K pathway and Bcl-2 family. Clinicopathological features in prostate cancer[J]. Aging Male, 2018, 21(3): 211-222.

[6] 张欣, 董春力, 付丽丽, 等. 槲皮素对宫颈癌细胞C33A增殖和凋亡的影响[J]. 安徽医学, 2018(4): 400-403.

[7] 杜春双, 马亚妮, 王帅, 等. 左旋紫草素对顺铂耐药人宫颈癌HeLa细胞的逆转作用研究[J]. 中国药房, 2020, 31(15): 1867-1873.

[8] 莫琳, 刘馨, 杨慧敏, 等. 芹菜素影响非小细胞肺癌A549细胞顺铂敏感性的RAD51基因调控机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(6): 708-714.

[9] FENG C, MA F, HU C, et al. SOX9/miR-130a/CTR1 axis modulates DDP-resistance of cervical cancer cell[J]. Cell Cycle, 2018, 17(4): 448-458.

[10] LUO X, WEI J, YANG F L, et al. Exosomal lncRNA HNF1A-AS1 affects cisplatin resistance in cervical cancer cells through regulating microRNA-34b/TUFT1 axis[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 323.

[11] ZHU H, LUO H, ZHANG W, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1885-1895.

[12] 张莹, 贾英杰, 李小江, 等. 注射用黄芪多糖对耐顺铂人肺癌细胞A549/DDP耐药逆转作用研究[J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 417-419.

[13] 崔美英, 贺红柳, 李盼, 等. 柚皮苷对人肺癌顺铂耐药株A549/DDP细胞的逆转作用[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(3): 466-472.

[14] 刘玉琼. 青蒿素通过PI3K/Akt/mTOR信号通路影响宫颈癌细胞的迁移和凋亡[J]. 现代妇产科进展, 2020, 29(2): 144-146.

[15] 王书惠, 尹秀艳, 刘海英, 等. 紫草素通过PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡和自噬[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7): 1189-1194.

[16] KEDHARI S M, RAINA R, AFROZE N, et al. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8): BSR2019-0720.

[17] 王慧玲, 赵维楠, 罗瑞, 等. 基于JAK-STAT通路研究槲皮素对人宫颈癌C-33A细胞的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(7): 1525-1529.

[18] LI X M, LIU J, PAN F F, et al. Quercetin and aconitine synergistically induces the human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress pathway[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0191062.

[19] ALI A, KIM M J, KIM M Y, et al. Quercetin induces cell death in cervical cancer by reducing O-GlcNAcylation of adenosine monophosphate-activated protein kinase[J]. Anat Cell Biol, 2018, 51(4): 274-283.

[20] 王秀艳, 赵千, 王博, 等. 槲皮素逆转人乳腺癌MCF-7细胞阿霉素耐药及其相关机制的研究[J]. 现代预防医学, 2018, 45(10): 1844-1849, 1859.

[21] SONG Y K, YOON J H, WOO J K, et al. Quercetin is a flavonoid breast cancer resistance protein inhibitor with an impact on the oral pharmacokinetics of sulfasalazine in rats[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(5): 397.

[22] 唐男, 张虹. mTOR/p70S6K信号通路在上皮性卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国医学创新, 2016, 13(5): 1-5.

[23] 吕明月, 宁微微, 陈雅慧, 等. 抗肿瘤药物的耐药性及临床治疗对策[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1721-1727.

[24] 张献, 冯欣. PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制剂在宫颈癌治疗中的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1278-1284.

(收稿日期:2021-05-18 修回日期:2021-10-25)

(编辑:唐晓莲)