

槲皮素对人肝癌高转移细胞生长及侵袭能力的影响

刘 锋, 李 刚, 胡明道, 王志萍, 阿永俊
(昆明医科大学第二附属医院肝胆一科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨槲皮素对肝癌高转移细胞增殖和侵袭能力的影响. **方法** 以人高转移肝细胞癌细胞系 HCCLM6 为研究对象, 倒置显微镜观察槲皮素对肝癌细胞 HCCLM6 细胞形态的影响, MTT 法检测槲皮素对细胞增殖的影响, Transwell 小室侵袭实验检测槲皮素对肝癌细胞侵袭能力的影响. **结果** 倒置显微镜下槲皮素组细胞密度降低, 悬浮细胞增多; 槲皮素组较对照组 HCCLM6 细胞存活率减低; 槲皮素能抑制肝癌细胞在 Transwell 小室中的侵袭作用. **结论** 槲皮素能抑制肝癌高转移细胞 HCCLM6 的增殖和侵袭能力.

[关键词] 癌; 肝细胞; 槲皮素; 增殖; 侵袭

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 05 - 0029 - 04

Influence of Quercetin on Proliferation and Invasive Ability of High-metastasis Hepatoma Cells

LIU Feng, LI Gang, HU Ming - dao, WANG Zhi - ping, A Yong - jun
(Dept. of Hepato-biliary Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore the influence of quercetin on the proliferation and invasive ability of high-metastasis hepatoma cells. **Methods** Human high-metastasis HCC cell line (HCCLM6) was used in this study. The inverted phase contrast microscope was used to observe the influence of quercetin on the morphosis of HCCLM6 cells. MTT method was used to detect the effect of quercetin on the proliferation of hepatoma cells. Transwell chamber assay was used to determine the influence of quercetin on the invasive ability of HCCLM6 cells. **Results** By the inverted microscope, low cell density and the increase of suspension cells were observed in quercetin-treated group. Compared with control group, cell survival rate decreased more significantly in quercetin-treated group. Quercetin inhibited the invasion of HCCLM6 cells in transwell chamber. **Conclusion** Quercetin can inhibit the proliferation and invasive ability of HCCLM6 cells.

[Key words] Carcinoma; Hepatocyte; Quercetin; Proliferation; Invasion

天然黄酮类物质槲皮素 (Quercetin) 广泛存在于许多植物的果实及花叶中^[1]. 研究已经证实槲皮素具有非常广泛的生理和药理作用, 如抗炎抗病毒、调节免疫、扩张冠状血管、降血脂、抗血小板凝集以及清除氧自由基等^[2]. 槲皮素抗肿瘤的作用目前正成为研究热点, 槲皮素被发现可抑制乳腺癌、前列腺癌等肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡^[3,4], 但针对肝癌的研究不多, 目前还没有槲皮素影

响肝癌细胞侵袭能力的报道. 笔者以肝癌高转移细胞 HCCLM6 为研究对象, 观察槲皮素对 HCCLM6 细胞生长及侵袭能力的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

槲皮素购于上海雅吉生物科技有限公司; 二甲

[基金项目] 联邦中青年医药师科研基金资助项目 (2011-L-B-04)

[作者简介] 刘锋 (1982~), 男, 河南信阳市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事肝胆外科临床与研究工作.

[通讯作者] 阿永俊. E-mail: ayj6908@163.com

基亚砷 (DMSO)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 及 PI 染液购于美国 Sigma 公司; Matrigel 胶购于美国 Roche 公司; 24 孔 Transwell 侵袭小室购于美国 Corning 公司.

1.2 细胞培养

人肝癌高转移细胞株 HCCLM6 购于复旦大学肝癌研究所, 培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中. 所用细胞在体外培养均不超过 5 代, 选生长状态好, 处于对数生长期的细胞进行实验.

1.3 倒置显微镜下观察槲皮素对 HCCLM6 细胞形态学的影响

以 5×10^4 个 / 孔将 HCCLM6 细胞接种于 96 孔板中, 孵育 24 h 细胞贴壁生长后对照组加入含 0.04% DMSO 高糖 DMEM 培养液, 实验组加入含 60 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素高糖 DMEM 培养液, 处理 48 h 后采用倒置显微镜观察细胞密度和形态的改变并照相.

1.4 MTT 法测定槲皮素对 HCCLM6 细胞增殖的影响

将对数生长期的 HCCLM6 细胞稀释成 5×10^4 个细胞接种于 96 孔板, 每组浓度设 3 个平行孔. 贴壁培养 24 h 后, 含槲皮素 20、40、60、80、100

$\mu\text{mol/L}$ 的 DMEM 高糖培养基分别加入实验孔, 对照组加入含 0.04% DMSO DMEM 高糖培养基. 培养 24 h、48 h 及 72 h 后, 采用 MTT 比色法检测吸光度值 (A570), 测得的吸光度值进行存活率计算, 存活率计算公式:

$$\text{存活率} = \frac{\text{药物组 A570}}{\text{对照组 A570}} \times 100\%$$

1.5 细胞基底膜侵袭实验槲皮素对 HCCLM6 细胞侵袭能力的影响

重建成胶后的 Matrigel 胶能在聚碳酸酯滤膜表面形成类似天然基底膜的结构, 肿瘤细胞的侵袭能力可由细胞穿过 Matrigel 胶的能力得以反映. 500 $\mu\text{g/mL}$ Matrigel 胶 40 μL 加入 Transwell 小室的聚碳酸酯滤膜上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内过夜孵化成胶. 将 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、40 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素预处理 48 h 的 HCCLM3 细胞消化, 2×10^5 个 / mL 单细胞悬液 100 μL 加入上室. 每组设 3 个平行对照. 孵箱内培养 24 h, 聚碳酸酯滤膜上层细胞擦去后取下滤膜, 采用冰甲醇固定, 干燥后 Giemsa 染色封片. 在 200 倍光镜下计数并照相, 穿过滤膜的肿瘤细胞数计算采用每个滤膜选取 5 个视野 (上、下、左、右、中) 计数, 3 个平行对照一起计算均数. 计算肿瘤细胞抑制率公式:

$$\text{肿瘤细胞抑制率} = \frac{\text{正常对照组平均侵袭细胞数} - \text{实验药物组平均侵袭细胞数}}{\text{正常对照组平均侵袭细胞数}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理

实验数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示. SPSS 软件包分析数据, 用 t 检验进行 2 组间均数比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 槲皮素对 HCCLM6 细胞形态的影响

采用倒置显微镜观察发现对照组细胞呈贴壁生长, 多呈梭形, 生长状态良好, 细胞透明. 60 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 HCCLM6 细胞 48 h 后, 可见细胞生长稀疏, 悬浮细胞增多, 细胞变小、变圆、皱缩, 培养液中细胞碎片增多 (图 1).

2.2 槲皮素对 HCCLM6 细胞增殖的影响

用终浓度为 20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素处理 HCCLM6 细胞 24、48 和 72 h 后, MTT 法检测细胞增殖发现槲皮素对 HCCLM6 细胞增殖具有抑制作用, 0、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素作用 72 h, HCCLM6 细胞的存活率分别为 74.64%、30.16%、26.80%、28.08% 和 26.48%, 见表 1.

2.3 槲皮素对 HCCLM6 细胞基底膜侵袭能力的影响

40 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素处理 48 h 后的 HCCLM6 细胞侵袭到滤膜下面的细胞数为 (27.2 ± 5.08) 个 / 视野, 对照组为 (51.73 ± 6.41) 个 / 视野, 2 组间差别有统计学意义 ($P < 0.05$), 抑制率为 47.42%. 说明槲皮素能抑制 HCCLM6 细胞的侵袭能力. 各组侵袭到滤膜背面的细胞 (图 2).

3 讨论

全世界每年新发生的原发性肝细胞癌中, 42.5% 的病例出现在我国大陆, 肝癌是我国高发的重大疾病. 由于肝癌具有高复发、高转移的特性, 且肝癌切除术后的高复发率是影响患者预后的主要因素, 因此针对肿瘤手术后复发、转移后的治疗手段成为延长患者生存的重要措施. 槲皮素是自然界存在的天然黄酮类物质, 具有低毒副作用的特点, 研究槲皮素对肝癌细胞转移能力的影响显得很有价值.

在细胞层面研究肿瘤的转移能力需要寻找一个

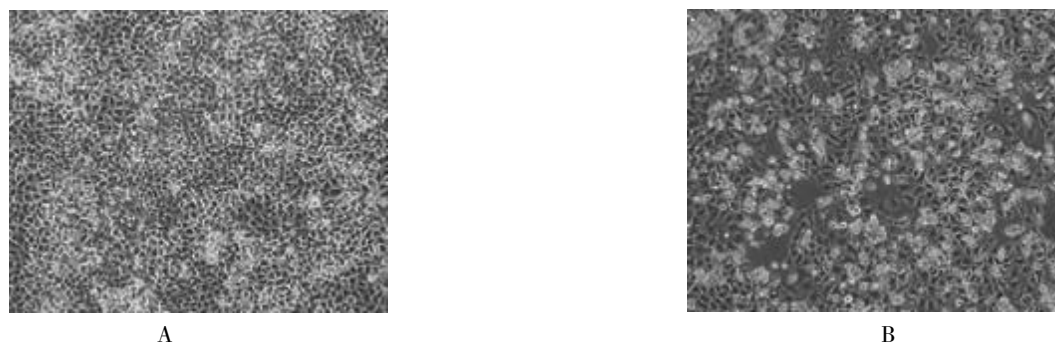


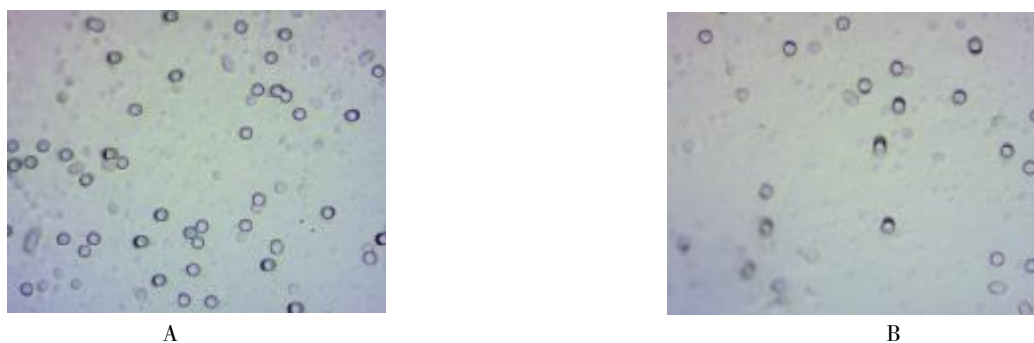
图 1 倒置显微镜观察槲皮素对 HCCLM6 细胞形态的影响 (200×)

Fig. 1 Influence of quercetin on the morphology of HCCLM6 cells by inverted microscope (200×)

A: 对照组; B: 槲皮素组.

表 1 槲皮素对 HCCLM6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 Influence of quercetin on the proliferation of HCC cells ($\bar{x} \pm s$)

槲皮素浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h		48 h		72 h	
	OD 值	存活率 (%)	OD 值	存活率 (%)	OD 值	存活率 (%)
0	1.16 ± 0.10	-	1.20 ± 0.34	-	1.25 ± 0.01	-
20	1.08 ± 0.21	93.00	1.12 ± 0.26	85.87	1.14 ± 0.29	74.64
40	$0.81 \pm 0.05^*$	70.12	$0.66 \pm 0.14^*$	55.52	$0.38 \pm 0.11^{*\Delta}$	30.16
60	$0.59 \pm 0.12^*$	50.60	$0.54 \pm 0.03^*$	44.90	$0.33 \pm 0.09^*$	26.80
80	$0.56 \pm 0.08^*$	48.70	$0.54 \pm 0.04^*$	45.07	$0.35 \pm 0.04^*$	28.08
100	$0.80 \pm 0.27^*$	50.40	$0.54 \pm 0.73^*$	44.82	$0.33 \pm 0.07^{*\Delta}$	26.48

与同时间 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $*P < 0.05$; 与 24 h 组比较, $\Delta P < 0.05$.图 2 Giemsa 染色显示侵袭到滤膜背面的细胞 ($\times 200$)Fig. 2 Cells invaded to tergal filter membrane ($\times 200$)

A 组: 对照组; B 组: 槲皮素处理组.

适宜的肝癌细胞系. 但目前常用的一些肝癌细胞系在体内试验中多不发生自发性转移, 不能体现出人肝癌细胞临床上发生转移的病理特点. 本研究采用高转移细胞系 HCCLM6, 由复旦大学肝癌研究所建立, 细胞检测发现该细胞系能分泌白蛋白、甲胎蛋白以及细胞角质蛋白 8, 具有肝癌细胞特点; 体内实验中原位接种 HCCLM6 瘤组织到裸鼠肝脏, 5 周后观察发现 100% 的裸鼠发生腹壁转移、肝内转移和肺转移, 80% 的裸鼠有腹腔内转

移, 70% 的裸鼠有膈肌转移, 具有类似临床肝癌的自发性转移特性^[5].

癌转移已被证实是一个多步骤的连续发展过程, 原发瘤增殖和癌细胞侵袭基底膜穿入血管或淋巴管是肿瘤转移过程中的重要阶段. 笔者通过 MTT 法检测发现槲皮素对 HCCLM6 细胞增殖具有抑制作用, 采用倒置显微镜观察也证实槲皮素处理组 HCCLM6 细胞生长稀疏, 悬浮细胞增多. 证明槲皮素能抑制肝癌高转移细胞生长增殖. Liotta^[6]报

道了肿瘤细胞侵袭的过程,细胞先和前方基质成分发生粘附,再释放蛋白酶降解基质,然后细胞伸出伪足样结构突入基质被蛋白酶降解后缺损空间,肿瘤细胞脱离原粘连基质再与新的基质粘附,瘤细胞便“履带式”地向前运动而导致肿瘤发生侵袭与转移.因此先控制肿瘤的侵袭,就有希望控制肿瘤的转移.笔者采用得到广泛应用和认同的 Transwell 小室法测定肿瘤细胞的侵袭运动能力,研究发现槲皮素能抑制 HCCLM6 细胞的侵袭能力,槲皮素作用后肿瘤细胞的抑制率为 47.42%.

本研究发现天然黄酮类物质槲皮素能抑制肝癌高转移细胞 HCCLM6 的增殖和侵袭能力.槲皮素对肝癌高转移细胞侵袭能力的抑制作用此前尚未见报道.

[参考文献]

- [1] GIBELLINI L, PINTI M, NASI M, et al. Quercetin and cancer chemoprevention[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 11(4):1 - 15.
- [2] CHIRUMBOLO S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2010, 9(4):263 - 285.
- [3] VIJAYABABU M R, KANAGARAJ P, ARUNKUMAR A, et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131(11):765 - 771.
- [4] CHOI J A, KIM J Y, LEE J Y, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(4):837 - 844.
- [5] 李雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 等. 体内连续筛选法建立自发性肺转移人肝癌细胞系[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(9):601 - 605.
- [6] LIOTTA L A. Tumor invasion and metastasis role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture[J]. *Cancer Res* 1986, 46(1):1 - 7.
(2014 - 03 - 05 收稿)
- [1] GIBELLINI L, PINTI M, NASI M, et al. Quercetin and cancer chemoprevention[J]. *Evid Based Complement Alternat*

(上接第 28 页)

[参考文献]

- [1] GOSIMA J, GOLDBERG V M, CAPLAN A I. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic [J]. *Biomaterials*, 1991, 12(2):253 - 258.
- [2] KUBOKI Y, JIN Q, TAKITA H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-2 induced osteogenesis and chondrogenesis [J]. *Bone Joint Surg Am*, 2001, 832A(suppl):105 - 115.
- [3] 胡孝丽, 陈士龙. 骨髓基质干细胞在口腔颌面组织修复中的研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2009, 25(5):662 - 663.
- [4] 黄桂林, 李华林, 谢文杨, 等. 羟基磷灰石人工骨微粒植入牙槽窝的临床应用研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(2):91 - 92.
- [5] BORUM-NICHOLAS L, WILSON OC J R. Surface modification of hydroxyapatite. Part I. Dodecyl alcohol. [J] *Biomaterials*, 2003, 24(21):3 671 - 3 679.
- [6] XU H H, MARTIN T A, ANTONUCCI J M, et al. Ceramic whisker reinforcement of dental resin composite [J]. *J Dent Res*, 1999, 78(2):706 - 712.
- [7] 张文云, 袁艳波, 陈庆华, 等. 纳米二氧化硅含量对硼酸铝晶须-二氧化硅熔附体填料复合树脂弯曲性能的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2011, 29(2):195 - 198.
- [8] XU HHK, QUINN J B, SMITH D T, et al. Dental resin composites containing silica-fused whiskers-effects of whisker to silica ratio on fracture toughness and indentation properties[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(3):735 - 742.
- [9] XU HHK, QUINN J B, GIUSEPPE TIAA, et al. Effects of whiskers-to-silica ratio on the reinforcement of dental resin composites with silica-fused whiskers [J]. *J Dent Res*, 2000, 79(11):1 844 - 1 849.
- [10] WAHAB R, MISIC HRA A, YUN S T. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via non-hydrolytic solution [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(5):1 917 - 1 925.
- [11] NARESH SAHA, KAHRAMAN KESKINBORA, ENDER SUVACI, et al. Sintering, microstructure, mechanical, and antimicrobial properties of HAp-ZnO biocomposites[J]. *J Biomed Mater Res B*, 2010, 95(B):430 - 440.
- [12] 洪东峰, 雷力, 董会, 等. HAP/CS/KGM 复合骨组织工程支架的研究 [J]. *武汉理工大学学报(自科版)*, 2010, 32(5):72 - 75.
(2014 - 03 - 14 收稿)