

## 实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20250225007

# 槲皮素调控 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路抑制结直肠癌细胞迁移及上皮间质转化的作用机制

耿 慧<sup>1</sup>, 王宜生<sup>2</sup>, 赵 喆<sup>3</sup>, 冯 煜<sup>4</sup>, 周利红<sup>5</sup>

1. 上海国际医学中心(上海 201315); 2. 复旦大学附属妇产科医院(上海 200011); 3. 上海市第六人民医院(上海 200233); 4. 上海市浦东新区中医医院(上海 200120); 5. 上海中医药大学附属市中医医院(上海 200071)

**【摘要】 目的** 探讨槲皮素通过调控转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Sma 和 Mad 相关蛋白(Smads)信号通路,抑制结直肠癌细胞迁移和上皮间质转化(EMT)的作用机制。**方法** 体外培养人结直肠癌 HCT-116 细胞,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)实验、Transwell 实验和划痕实验检测槲皮素对 HCT-116 细胞增殖及迁移的抑制作用;Western blot 法检测槲皮素、TGF- $\beta$ /Smads 信号通路激活剂 SRI-011381 及槲皮素联合 SRI-011381 对 HCT-116 细胞中 EMT、转移相关蛋白和 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路蛋白表达的影响。**结果** CCK-8 实验结果表明,槲皮素可以抑制 HCT-116 细胞的增殖活性( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ );Transwell 实验和划痕实验结果表明,槲皮素可以抑制 HCT-116 细胞的迁移能力( $P<0.001$ );Western blot 实验结果表明,槲皮素可以抑制 SRI-011381 对 EMT 相关蛋白锌指转录因子(Snail)、扭曲螺旋转录因子(Twist)表达的促进作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),抑制 SRI-011381 对转移相关蛋白基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 表达的促进作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),以及阻断 SRI-011381 对 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 表达的促进作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),并上调 Smad7 蛋白表达( $P<0.05$ )。**结论** 槲皮素通过阻断结直肠癌细胞中 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路的激活,抑制结直肠癌细胞迁移和 EMT,从而抑制结直肠癌转移。

**【关键词】** 结直肠癌;槲皮素;上皮间质转化;肿瘤转移;细胞迁移;作用机制;中药研究

## Mechanism of quercetin in inhibiting migration and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells via regulation of TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway

GENG Hui<sup>1</sup>, WANG Yisheng<sup>2</sup>, ZHAO Zhe<sup>3</sup>, FENG Yu<sup>4</sup>, ZHOU Lihong<sup>5</sup>

1. Shanghai International Medical Center, Shanghai 201315, China; 2. Hospital of Obstetrics and Gynecology Affiliated to Fudan University, Shanghai 200011, China; 3. Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 4. Shanghai Pudong New Area Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China; 5. Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200071, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of quercetin in inhibiting migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer cells via regulating the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Sma and MAD-related proteins (Smads) signaling pathway. **Methods** Human colorectal cancer HCT-116 cells were cultured *in vitro*. The inhibitory effect of quercetin on the proliferation of HCT-116 cells was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, and the inhibitory effect of quercetin on the migration of HCT-116 cells were detected by Transwell assay and scratch assay. The effects of quercetin, TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway activator SRI-011381 and the combination of quercetin and SRI-011381 on the

expressions of EMT, transfer-related proteins and TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway proteins in HCT-116 cells were detected by Western blot. **Results** CCK-8 assay results revealed that quercetin could inhibit the proliferation activity of HCT-116 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). The results of Transwell assay and scratch assay results indicated that quercetin could inhibit the migration ability of HCT-116 cells ( $P<0.001$ ). Western blot experiments results indicated that quercetin could inhibit the promoting effects of SRI-011381 on the expression of EMT-related proteins zinc finger transcription factor (Snail) and twisted helix transcription factor (Twist) ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and inhibit the promoting effect of SRI-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174145);上海市东方英才计划项目(沪委人才办[2023]24号);上海市浦东新区卫健委“浦东新区国家中医药发展综合改革试验区项目”(PDZY-2024-0712, PDZY-2024-0808, PDZY-2024-1423, PDZY-2024-0708)

[作者简介] 耿慧,女,硕士,主治医师,主要从事老年肿瘤的临床和基础研究工作

[通信作者] 冯煜,主任医师,硕士研究生导师;E-mail: davisfy@126.com。周利红,研究员,硕士研究生导师;E-mail: zlhctm@hotmail.com

011381 on the expression of transfer-related protein matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and block the promoting effect of SRI-011381 on the expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, and Smad3 in the TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and up-regulate the expression of Smad7 protein ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Quercetin can block the activation of TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway in colorectal cancer cells, inhibit colorectal cancer cell migration and EMT, and thus inhibit colorectal cancer metastasis.

**Keywords:** colorectal cancer; quercetin; epithelial-mesenchymal transition; tumor metastasis; cell migration; mechanism of action; Chinese materia medica research

侵袭和转移是中晚期结直肠癌患者术后复发和死亡的重要原因,初次确诊的结直肠癌患者有 20% 左右伴有转移,根治术后患者约 30% 会出现远处转移<sup>[1]</sup>。转移性结直肠癌的预后较差,未经治疗者 1 年生存率不足 30%, 5 年生存率仅 5% 左右<sup>[2]</sup>,而上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是癌症转移的关键<sup>[3]</sup>。因此,探索针对结直肠癌转移的机制,从天然产物中寻找有效治疗药物,对于结直肠癌治疗及预后有着重要意义。

本课题组前期进行的中医药治疗结直肠癌的临床研究从肾虚论治结直肠癌转移<sup>[4]</sup>,发现结直肠癌转移与转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Sma 和 Mad 相关蛋白(Smads)信号通路的激活密切相关<sup>[5]</sup>,筛选出的补肾解毒散结中药对于结直肠癌转移有较好的抑制作用<sup>[6]</sup>。前期进行的补肾解毒散结方(由地黄、女贞子、肉苁蓉、蛇莓、山慈菇、八月札等组成)治疗结直肠癌的网络药理学研究发现<sup>[7]</sup>,槲皮素是该方治疗结直肠癌的主要活性成分。

槲皮素又名槲皮黄素,是一种具有多种生物活性和药理作用的黄酮类化合物,广泛分布于多种植物中,补肾中药女贞子<sup>[8]</sup>、枸杞子<sup>[9]</sup>等均可提取到该成分。研究<sup>[10-13]</sup>显示,槲皮素对肺癌、前列腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤有较好的抑制作用。本研究通过检测槲皮素对结直肠癌细胞迁移、EMT 相关蛋白锌指转录因子(Snail)和扭曲家族 bHLH 转录因子(Twist)、转移相关蛋白基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的抑制作用,探讨槲皮素通过调控 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路中 TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  家族受体下游的信号转导分子(Smad2、Smad3、Smad7)抑制结直肠癌转移的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人结直肠癌 HCT-116 细胞株购自中国科学院细胞库,常规方法培养。

1.1.2 药物与试剂 槲皮素(纯度为 97%,批号:S25567),购自上海源叶生物科技有限公司,用二甲基亚砜(DMSO)配制成 10 mmol/L 母液备用,给药终浓度为 5  $\mu$ mol/L。TGF- $\beta$ /Smads 信号通路激活剂 SRI-011381(纯度为 99.58%,批号:HY-100347-125050),购自美国

MCE 公司,用 DMSO 配成 10 mmol/L 母液备用,给药终浓度为 10  $\mu$ mol/L。

细胞计数试剂盒(CCK-8)(批号:HY-K20210301),日本同仁化学研究所;洛斯基·帕克纪念研究所(RPMI-1640)培养基(批号:11875093),美国 Gibco 公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2,批号:20012050),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;4% 多聚甲醛固定液、结晶紫染色液、Beyo ECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、羊抗鼠 IgG 抗体(批号分别为 P0099、C0121、P0018S、A0208、A0216),上海碧云天生物技术有限公司。鼠抗人 Smad7 单克隆抗体(批号:H00004092-M01AF700),美国 Santa Cruz 公司;兔抗人磷酸化 Smad2(p-Smad2)单克隆抗体、兔抗人磷酸化 Smad3(p-Smad3)单克隆抗体、兔抗人 MMP-2 单克隆抗体、鼠抗人 TGF- $\beta$  单克隆抗体、鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体、兔抗人 Smad2/3 单克隆抗体、鼠抗人 Snail 单克隆抗体、兔抗人 Twist 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(批号分别为 8828s、9520s、40994s、3709、13667、8685、3895、69366、2118),美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(型号:240i),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;倒置显微镜(型号:CKX53),日本 Olympus 公司;超净工作台(型号:SVE-6A1),新加坡 ESCO 公司;台式高速冷冻离心机(型号:5804R),德国 Eppendorf 公司;全自动细胞计数仪(型号:TC20),美国 Bio-Rad 公司;多功能酶标仪(型号:Synergy™ H1),美国 BioTek 公司;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白电泳仪(型号:Mini-PROTEAN Tetra),美国 Bio-Rad 公司;全能型蛋白转印系统(型号:VE-186),上海天能生命科技有限公司;脱色摇床(型号:TS-3D),海门市其林贝尔仪器制造有限公司;化学发光图像分析系统(型号:4600SF),上海天能科技有限公司。

### 1.2 检测指标与方法

1.2.1 CCK-8 法检测 HCT-116 细胞增殖情况 取对数生长期人结直肠癌细胞 HCT-116,常规消化后,以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,在 37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。接种细胞 6 h 后,细胞完全贴

壁,分别加入 RPMI-1640 配制的 0、25、50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  的槲皮素药液(DMSO 浓度均小于 0.1%),每个浓度设 6 个复孔,在细胞培养箱中继续培养。槲皮素干预 24 h、48 h、72 h,将 96 孔板中细胞用 PBS 清洗 2 次后,加入 90  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 和 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,置入培养箱中孵育 1~4 h。96 孔中培养液颜色变为黄色时,于多功能酶标仪上检测各孔在 450 nm 波长处吸光度(OD),绘制细胞存活率曲线,计算槲皮素对人结直肠癌细胞 HCT-116 的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ),实验重复 3 次。细胞存活率(%)=(药物组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ ,其中对照组培养基不含药物,空白组不含细胞而只加入培养基。

**1.2.2 Transwell 实验检测 HCT-116 细胞迁移率** 取细胞生长密度约 80% 的生长状态良好的 HCT-116 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种 200  $\mu\text{L}$  至 Transwell 小室中。将细胞分为对照组、SRI-011381 组、槲皮素组、SRI-011381+槲皮素组,培养细胞 6 h,待细胞贴壁后,下室分别加入 600  $\mu\text{L}$  不含任何药物、含 10  $\mu\text{mol/L}$  的 SRI-011381、含 5  $\mu\text{mol/L}$  的槲皮素、含 10  $\mu\text{mol/L}$  SRI-011381+5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素的完全培养基,细胞置于培养箱中孵育。培养 48 h 后,取出 Transwell 上室,使用棉签将滤膜上层未迁移的细胞轻轻擦去,预冷的 PBS 清洗 2 次,室温条件下使用 4% 多聚甲醛固定 10 min,然后 PBS 清洗 2 次,室温风干后,结晶紫染色液对膜及膜上细胞染色 30 min, PBS 缓缓清洗,室温晾干后显微镜下观察并拍照。在 100 倍条件下用显微镜观察,计算细胞迁移率。细胞迁移比率(%)=(药物组的迁移细胞个数/对照组的迁移细胞个数) $\times 100\%$ 。

**1.2.3 划痕实验检测 HCT-116 细胞迁移能力** 取细胞生长密度约 80% 的生长状态良好的 HCT-116 细胞,以  $5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中,轻晃摇匀后,置于细胞培养箱中培养。待细胞生长密度达 90% 左右时,以 10  $\mu\text{L}$  枪头尖端在单层细胞上划痕,弃去旧培养基, PBS 轻轻清洗脱落细胞。按照对照组(空白培养基)、SRI-011381 组(含 10  $\mu\text{mol/L}$  SRI-011381 的培养基)、槲皮素组(含 5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素的培养基)、SRI-011381+槲皮素组(含 10  $\mu\text{mol/L}$  SRI-011381+5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素的培养基),分别加入含相应处理的细胞培养基。显微镜下观测 0 h 与 72 h 细胞划痕状态,根据划线固定位置拍照记录,统计细胞迁移距离,计算结直肠癌细胞的迁移能力。

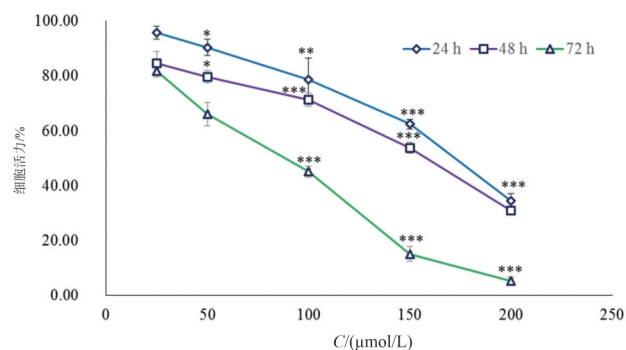
**1.2.4 Western blot 法检测 EMT、转移相关蛋白和 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路蛋白表达** 将 HCT-116 细胞接种于细胞培养瓶中 6 h 后,细胞贴壁良好,分为对照组(空白培养基)、SRI-011381 组(含 10  $\mu\text{mol/L}$  SRI-011381 的培养基)、槲皮素组(含 5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素的培养基)、SRI-011381+槲皮素组(含 10  $\mu\text{mol/L}$  SRI-011381+5  $\mu\text{mol/L}$

槲皮素的培养基),分别加入含相应处理的细胞培养基。细胞培养 48 h 后,裂解细胞并收集蛋白,分别进行蛋白定量、SDS-PAGE、转膜;转好膜的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜小心取出,浸泡于含质量分数 5% 牛血清白蛋白(BSA)或 5% 脱脂奶粉的含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水(TBST 溶液)中,60 r/min 摇床室温封闭 2 h。根据目的蛋白分子量裁剪封闭好的膜,并浸泡入按照说明书稀释的 Snail1、Twist1、MMP-2、MMP-9、TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、Smad7 的一抗工作液,4  $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 摇床孵育过夜。回收一抗, TBST 溶液快速洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应二抗工作液,60 r/min 摇床室温孵育 2 h。回收二抗,室温 TBST 溶液快速洗膜 3 次,每次 10 min。根据说明书配制增强型化学发光试剂(ECL)发光液,适量滴加到 PVDF 膜上,采用化学发光图像分析系统拍照,结果使用 ImageJ 软件进行图像灰度值分析。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组数据比较采用单因素方差分析,若满足正态分布、方差齐,采用多样本单因素方差分析统计实验数据;若不满足正态分布、方差齐,则采用非参数检验。检验标准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 对 HCT-116 细胞增殖的影响** CCK-8 检测结果显示,与空白对照组相比,25、50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  的槲皮素作用 HCT-116 细胞 24、48、72 h 后对 HCT-116 细胞增殖具有明显的抑制作用( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ),且呈剂量和时间依赖性,见图 1。根据实验结果,选取 5  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素无毒剂量作为进行后续功能实验的给药浓度。

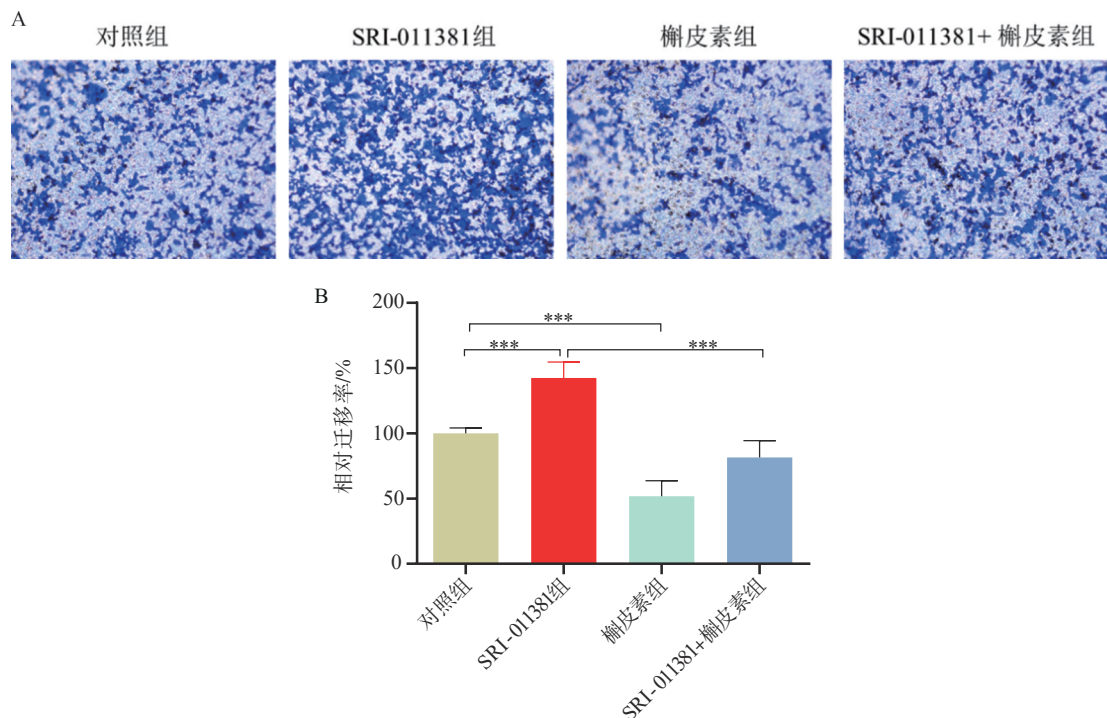


注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ 。

图1 槲皮素对 HCT-116 细胞增殖的抑制作用

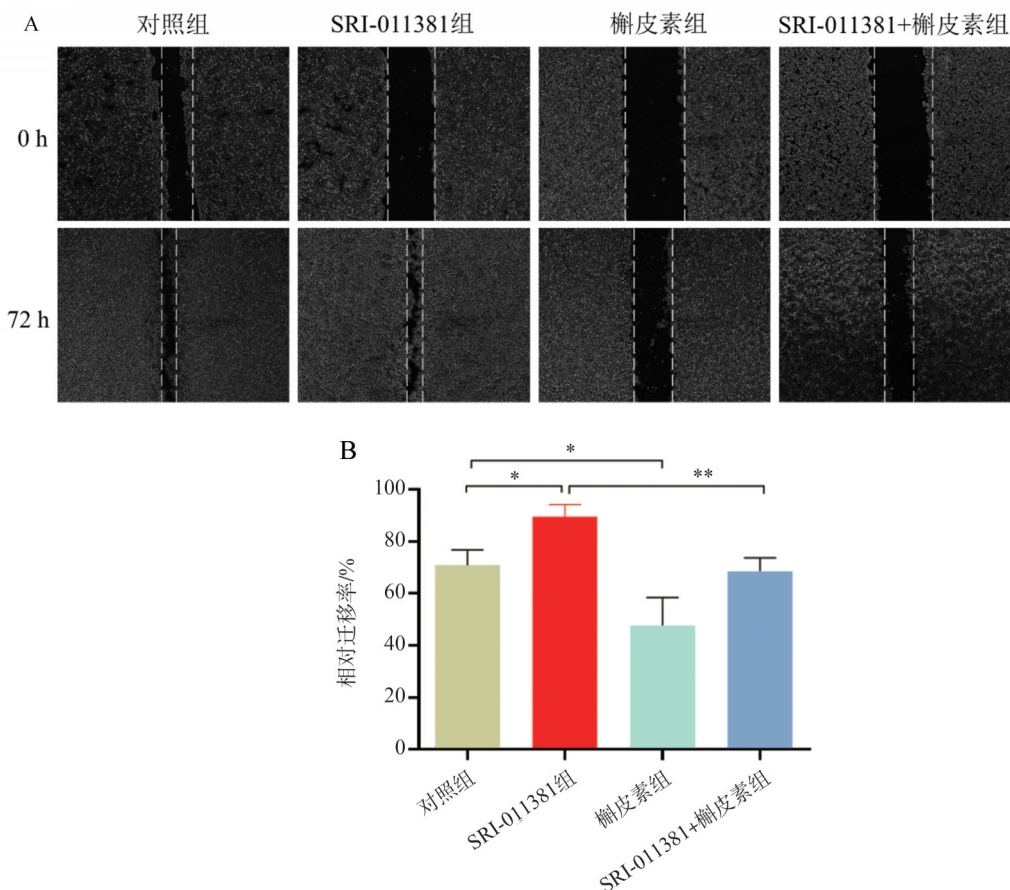
**2.2 对 HCT-116 细胞迁移率和迁移能力的影响** Transwell 实验结果显示,槲皮素作用 HCT-116 细胞 48 h 后,与对照组相比,透膜细胞明显减少( $P<0.001$ ),TGF- $\beta$ /Smads 信号通路激活剂 SRI-011381 能够促进癌细胞的迁移能力( $P<0.001$ ),但该促进作用可以被槲皮素抑制( $P<0.001$ ),

见图 2。划痕实验结果显示,与对照组相比,SRI-011381 组可显著促进划痕细胞的愈合,而槲皮素对划痕后细胞的愈合能力有明显的抑制作用( $P<0.001$ ),见图 3。



注:A为各组细胞穿透Transwell小室后的染色图( $\times 100$ ),B为各组细胞穿透小室的相对迁移率统计图。两组之间比较, $***P<0.001$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ 。

图2 槲皮素对HCT-116细胞迁移能力的影响



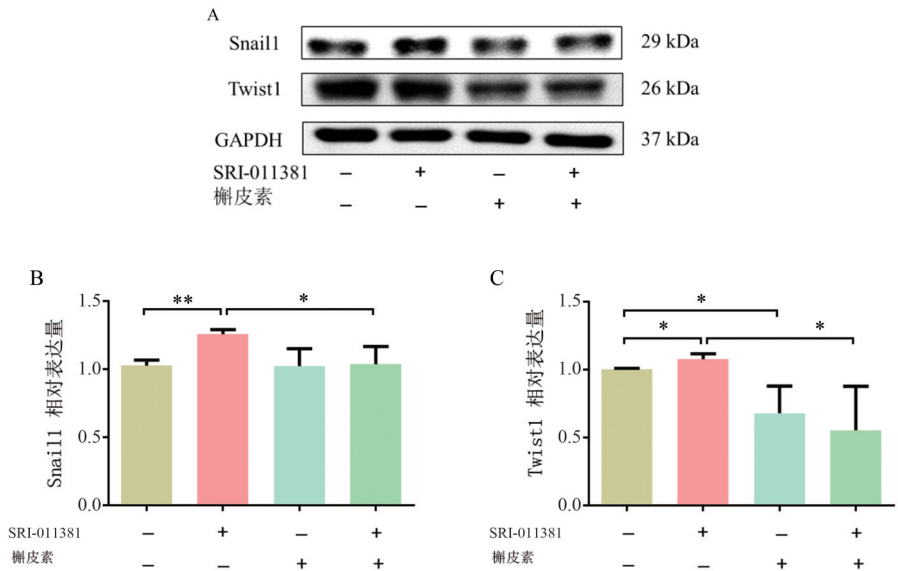
注:A为各组细胞划痕后细胞愈合情况( $\times 100$ ),B为各组细胞划痕愈合的相对迁移率统计图。两组之间比较, $*P<0.05$ , $**P<0.01$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ 。

图3 槲皮素对HCT-116细胞划痕后愈合能力的影响

2.3 对 HCT-116 细胞 EMT 及相关蛋白表达的影响

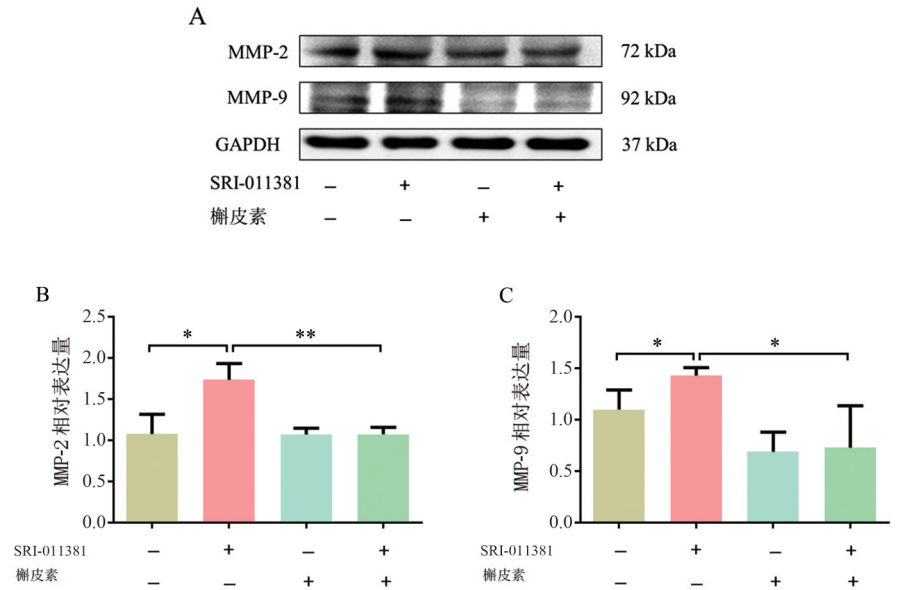
Western blot 结果显示, TGF- $\beta$ /Smads 信号通路激活剂 SRI-011381 能明显促进 HCT-116 细胞 Snail1、Twist1 蛋白表达上调 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 槲皮素则可抑制

SRI-011381 的激活作用, 降低 Snail1、Twist1 蛋白表达 ( $P<0.05$ ), 见图 4。转移相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达在 SRI-011381 的作用下显著上调 ( $P<0.05$ ), 而槲皮素可以抑制该上调作用 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 见图 5。



注: Snail1 为蜗牛同源物 1 (果蝇) 样 1 蛋白, Twist1 为人 Twist 相关蛋白 1, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A 为各组细胞的蛋白条带, B 为各组细胞 Snail1 蛋白相对表达量, C 为各组细胞 Twist1 蛋白相对表达量。两组之间比较,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ 。

图 4 槲皮素对 HCT-116 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响



注: A 为各组细胞的蛋白条带, B 为各组细胞基质金属蛋白酶 (MMP)-2 蛋白相对表达量, C 为各组细胞 MMP-9 蛋白相对表达量。GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。两组之间比较,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ 。

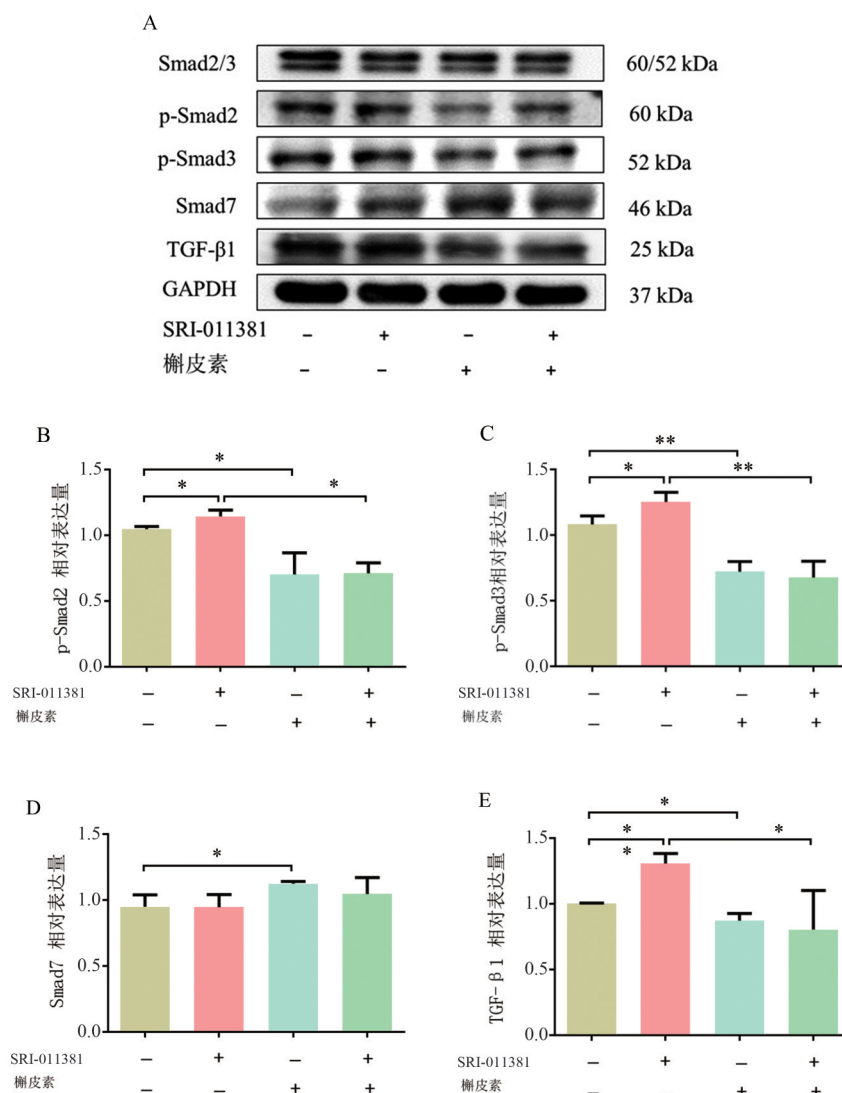
图 5 槲皮素对 HCT-116 细胞转移相关蛋白表达的影响

2.4 对 HCT-116 细胞 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, TGF- $\beta$ /Smads 信号通路激活剂 SRI-011381 能明显上调细胞 TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达 ( $P<0.01$ ), 促进 Smad2、Smad3 磷酸化蛋白 p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达 ( $P<0.05$ )。槲皮素不仅能显著

抑制 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达, 更能显著抑制由 SRI-011381 激活的 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达促进作用 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。同时, 槲皮素还可以显著上调 Smad7 的蛋白表达 ( $P<0.05$ )。结果表明, Smads 通路激活剂 SRI-011381 对

TGF- $\beta$ 1 蛋白表达和 Smad2、Smad3 磷酸化水平的上调 作用可以被槲皮素抑制( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见图 6。



注:Smad为Sma和Mad相关蛋白,p-Smad为磷酸化Smad,TGF- $\beta$ 1为转化生长因子- $\beta$ 1,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A为各组细胞的蛋白条带,B为各组细胞p-Smad2蛋白相对表达量,C为各组细胞p-Smad3蛋白相对表达量,D为各组细胞Smad7蛋白相对表达量,E为各组细胞TGF- $\beta$ 1蛋白相对表达量。两组之间比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ 。

图6 槲皮素对HCT-116细胞TGF- $\beta$ /Smads信号通路蛋白表达的影响

### 3 讨论

结直肠癌患者原发病灶向远处靶器官转移是导致肿瘤进展和死亡的重要原因<sup>[14]</sup>,结直肠癌细胞分泌大量的TGF- $\beta$ 激活Smads信号蛋白的活化,并促进染色体靶基因的转录表达是结直肠癌侵袭转移的关键<sup>[15]</sup>。课题组前期研究发现,TGF- $\beta$ /Smads信号通路和Snail/E-cadherin信号转导是结直肠癌EMT致肿瘤转移的重要促进因素<sup>[16]</sup>,TGF- $\beta$ /Smads信号通路的异常激活是影响结直肠癌EMT和转移的重要环节。

本课题组在进行结直肠癌转移与TGF- $\beta$ /Smads信号通路及EMT机制探讨时发现,circRNA与miRNAs在其中发挥重要作用<sup>[17-18]</sup>。我们使用TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)与mirDIP(<http://ophid.utoronto.ca/>)

数据库预测 circHIPK2 下游的靶向吸附 miRNAs,发现 miR-663b 在结直肠癌中高表达, circHIPK2 可能竞争性结合 miR-663b 调控下游靶基因的表达。我们前期通过生信分析预测 miR-663b 与 Smad7 有结合位点,已有研究<sup>[19]</sup>证明 miR-663b 通过直接靶向 Smad7,促进鼻咽癌的 EMT,但其在结直肠癌中的作用尚未见相关研究。我们通过 GEO 芯片数据发现在结直肠癌发生转移时,Smad7 显著降低,可能是作为抑制转移因子表达下调。由此我们可以确定,Smad7 表达被抑制在 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路调节 EMT、促进结直肠癌转移中发挥了重要作用。

补肾解毒散结方由地黄、女贞子、肉苁蓉、蛇莓、山慈菇、八月札等中药组成,是课题组在健脾解毒方<sup>[20]</sup>、

健脾补肾解毒方治疗结直肠癌的基础上,结合肾虚在结直肠癌转移中的重要作用而研制出的防治结直肠癌转移的中药复方,在临床上用于治疗结直肠癌肾虚证术后复发转移<sup>[21]</sup>。补肾解毒散结方及其中的肉苁蓉有效活性中药单体槲皮素对结直肠癌有明显的抑制作用,对结直肠癌细胞的肿瘤微环境有重要的调节作用,但详细的机制尚不清楚。因此,在本研究中以不同浓度的槲皮素作用于结直肠癌 HCT-116 细胞,探讨其对结直肠癌细胞增殖、迁移及 EMT 的作用机制。

本研究进一步通过 Western blot 实验发现,槲皮素对 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的激活具有显著影响,槲皮素可以显著下调 HCT-116 中 Smad2、Smad3 磷酸化水平,抑制 TGF- $\beta$  蛋白的表达。激活剂 SRI-011381 可以显著上调 EMT 相关蛋白 Twist1、Snail1 的表达,而槲皮素可以消除激活剂对 Twist1、Snail1 蛋白表达的上调作用,阻断细胞的 EMT 进程。同时,槲皮素能够促进 Smad7 蛋白表达,下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达。说明槲皮素可能通过促进 Smad7 蛋白表达,抑制 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 的表达,进而抑制 EMT 进程,减少结直肠癌细胞转移相关蛋白 MMPs 的表达,从而抑制结直肠癌转移。

#### 参考文献:

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] WOLF D, SALCHER S, PIRCHER A. The multivisceral landscape of colorectal cancer metastasis; implications for targeted therapies [J]. J Clin Invest, 2024, 134(5): e178331.
- [3] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics [J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(4): 222-236.
- [4] 刘宁宁, 杨越, 贾茹, 等. 补肾解毒方联合姑息化疗对晚期结直肠癌患者瘤因性疲乏的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(7): 59-63.
- [5] GE H, XU C, CHEN H, et al. Traditional Chinese medicines as effective reversals of epithelial-mesenchymal transition induced-metastasis of colorectal cancer: Molecular targets and mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2022, 13:842295.
- [6] 贾茹, 刘宁宁, 季青, 等. 补肾解毒散结方对结直肠癌术后肿瘤转移及血管新生与金属蛋白酶表达的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(1): 15-19.
- [7] 蔡云梅, 李荣梅, 何思宇, 等. 采用网络药理学和分子对接技术探讨“补肾解毒散结方”治疗结直肠癌的潜在分子机制 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2022, 4(4): 21-29.
- [8] 李蓉, 林艾和, 夏宗霄, 等. HPLC 法测定女贞子中三种黄酮类成分的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(12): 81-83.
- [9] 郑倩倩, 周雪菲, 路丽娟, 等. 枸杞叶 HPLC 特征图谱的研究 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(13): 34-37.
- [10] 王君君, 李坚. 槲皮素通过抑制溶质载体家族 7 成员 11 表达诱导前列腺癌细胞铁死亡的临床研究 [J]. 中国性科学, 2022, 31(9): 42-46.
- [11] 朱剑云, 谢春风, 钟才云. 槲皮素对肺癌干细胞活性的影响 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2022, 9(5): 616-623.
- [12] 池周, 张豪, 蔡玉节, 等. 槲皮素通过 PI3K/AKT 信号通路抑制奥沙利铂耐药胃癌细胞迁移 [J]. 实用药物与临床, 2024, 27(2): 81-85.
- [13] 刘涛, 白浪, 高永涛. 槲皮素金属配合物抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭及增强化疗敏感性的机制分析 [J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(11): 1741-1744.
- [14] SUN Y, GUO Z, LIU X, et al. Noninvasive urinary protein signatures associated with colorectal cancer diagnosis and metastasis [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2757.
- [15] SOLEIMANI A, KHAZAEI M, FERNS G A, et al. Role of TGF- $\beta$  signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9): 14574-14580.
- [16] ZHOU J, LI L, PU Y, et al. Astragaloside IV inhibits colorectal cancer metastasis by reducing extracellular vesicles release and suppressing M2-type TAMs activation [J]. Heliyon, 2024, 10(10): e31450.
- [17] SONG W, FU J, WU J, et al. CircFBXW4 suppresses colorectal cancer progression by regulating the MiR-338-5p/SLC5A7 axis [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(18): e2300129.
- [18] DING N, YOU A B, YANG H, et al. A Tumor-suppressive molecular axis EP300/circRERE/miR-6837-3p/MAVS activates type I IFN pathway and antitumor immunity to suppress colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(11): 2095-2109.
- [19] ZHAO X, LIU S, YAN B, et al. MiR-581/SMAD7 axis contributes to colorectal cancer metastasis: A bioinformatic and experimental validation-based study [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6499.
- [20] LI R, ZHOU J, WU X, et al. Jianpi Jiedu Recipe inhibits colorectal cancer liver metastasis via regulating ITGBL1-rich extracellular vesicles mediated activation of cancer-associated fibroblasts [J]. Phytomedicine, 2022, 100:154082.
- [21] 韩懿存, 季青. 聚焦肿瘤微环境重塑: 中药及其有效成分干预肿瘤复发转移的优势与思考 [J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(4): 1-7.

编辑: 杨轶舜

收稿日期: 2025-02-25