

引用:刘东杰,陈红跃,雷震,杨萌萌,王鹏宇.槲皮素下调miR-146抑制甲状腺癌细胞增殖并诱导凋亡[J].中医导报,2025,31(10):16-21.

槲皮素下调miR-146抑制甲状腺癌细胞增殖并诱导凋亡*

刘东杰^{1,2},陈红跃^{1,2},雷震²,杨萌萌²,王鹏宇^{1,2}

(1.河南中医药大学,河南 郑州 450046;

2.河南中医药大学第二附属医院/河南省中医院,河南 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨槲皮素(Que)对甲状腺癌细胞增殖、凋亡的影响及潜在机制。方法:以人甲状腺乳头状癌(B-CPAP)细胞为研究对象,设置对照组和加药组,以不同浓度Que干预甲状腺癌细胞。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞活力,依据结果选取低、中、高3个浓度Que用于后续实验;5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)检测细胞增殖;倒置显微镜观察细胞形态变化;流式细胞术检测细胞凋亡及周期;Western blotting检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白的相对表达;RT-qPCR法检测微小RNA-146(miR-146) mRNA的相对表达量。结果:在一定浓度范围内,与对照组比较,相同作用时间,随着Que浓度增加,细胞OD值显著降低($P<0.05$),且呈浓度依赖性;不同作用时间比较,Que浓度在40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞OD值差异更为显著,且作用24 h时,组间差异更为显著。与对照组比较,Que低浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)、中浓度组(80 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度组(160 $\mu\text{mol/L}$)细胞增殖能力显著降低;Que各加药组细胞形态发生变化,随着药物浓度升高,细胞体积缩小、形态皱缩,漂浮的死亡细胞增多;Que各浓度组细胞总凋亡率均显著升高($P<0.01$),随着药物浓度的升高,细胞G₁期延长,S期缩短,细胞周期阻滞于G₁期($P<0.05$);Que各浓度组增殖相关蛋白PCNA、周期相关蛋白CyclinD1、凋亡相关蛋白Bcl-2表达均显著降低($P<0.05$);Que加药组miR-146 mRNA相对表达量显著降低($P<0.05$)。结论:Que具有抗甲状腺癌作用,能抑制B-CPAP细胞的增殖,阻滞细胞周期,促进凋亡,其作用机制可能与下调miR-146表达有关。

[关键词] 甲状腺癌;槲皮素;细胞凋亡;细胞增殖;微小RNA-146;人甲状腺乳头状癌细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)10-0016-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.10.003

Quercetin Down-Regulates miR-146 to Inhibit the Proliferation of Thyroid Cancer Cells and Induce Apoptosis

LIU Dongjie^{1,2}, CHEN Hongyue^{1,2}, LEI Zhen², YANG Mengmeng², WANG Pengyu^{1,2}

(1.He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China; 2.The Second Affiliated Hospital of He'nan University of Traditional Chinese Medicine/ He'nan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450046, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of quercetin(Que) on the proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells and its potential mechanism. Methods: Human papillary thyroid carcinoma(B-CPAP) cells were the research object, and control group and dosing group were set up. Different concentrations of Que were used to intervene thyroid carcinoma cells. Cell viability was detected by CCK-8 method, and three concentrations of Que were selected for subsequent experiments according to the results. EdU detected cell proliferation. The morphological changes of cells were observed by inverted microscope. Apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The expressions of Bax, Bcl-2, Cyclin D1 and PCNA were detected by Western blotting. RT-qPCR method was used to detect the expression of miR-146 mRNA. Results: In a certain concentration range, when the drug concentration was different, compared with the control group, with the increase of drug concentration, the cell OD value was obviously reduced ($P<0.05$). Compared with the same concentration and different action time, the difference of cell OD value was more significant when the drug concentration was 40,

*基金项目:河南省中医药科学研究专项项目(2022ZY2020)

通信作者:陈红跃,男,主任医师,研究方向为胃肠外科,甲状腺、乳腺外科疾病

80 and 160 $\mu\text{mol/L}$. Moreover, the difference between the groups became more significant after 24 hours of action. Compared with the control group, the cell proliferation ability of low (40 $\mu\text{mol/L}$), medium (80 $\mu\text{mol/L}$) and high (160 $\mu\text{mol/L}$) concentrations of Que was significantly reduced. Compared with the control group, the cell morphology of Que groups changed. With the increase of drug concentration, the cell volume decreased, and the shape shrank. The floating dead cells increased. The total apoptosis rate of Que cells in all groups increased significantly ($P<0.01$). With the increase of drug concentration, cell G_1 was prolonged, and S phase was shortened. Cell cycle was arrested in G_1 phase ($P<0.05$). The expression of proliferating protein PCNA, Cyclin D1 and Bcl-2 decreased significantly ($P<0.05$) in each addition group of Que. The expression of miR-146 mRNA in Que group decreased significantly ($P<0.05$). Conclusion: Que has anti-thyroid cancer effect, which can inhibit the proliferation of human papillary thyroid carcinoma B-CPAP cells, block cell cycle and promote apoptosis, and its mechanism may be related to down-regulating the expression of miR-146.

[Keywords] thyroid carcinoma; Quercetin; cell apoptosis; cell proliferation; miR-146; human papillary thyroid carcinoma cells

甲状腺癌(thyroid cancer, TC)是内分泌系统最常见肿瘤之一,2022年报告显示TC总发病率居肿瘤发病率第三位^[1-2],给大众健康带来巨大威胁。分化型甲状腺癌(differentiated thyroid cancer, DTC)是其主要病理类型,占93.75%^[3]。虽然手术和辅助治疗为其提供了相对有效的治疗手段,但对其发病机制的探究、寻找新的治疗策略及药物,仍具有重要的临床意义。槲皮素(Que)作为黄酮类的天然化合物,已被证实具有抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤血管生成等作用^[4-5],对肺癌^[6]、肝癌^[7]、乳腺癌^[8]等不同癌症都具有良好的抗肿瘤效果。但目前关于Que对甲状腺癌细胞的作用及机制尚不完善,本研究旨在探讨Que对人分化型甲状腺癌B-CPAP细胞的增殖、凋亡、周期的影响,以及其潜在的调控机制,为甲状腺癌的治疗提供体外实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞 人甲状腺癌B-CPAP细胞系由中国科学院上海细胞生物所提供(300785-B-CPAP)。

1.2 主要试剂与仪器 槲皮素、二甲基亚砜、RPMI-1640、PBS缓冲液、胰酶消化液、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒、4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为:SQ8030、D8371、31800、P1020、T1300、CA1210、70085400);胎牛血清(以色列BI公司,批号:04-001-1);BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0071S);异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白V(Annexin V-FITC)细胞凋亡及周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为:KGA110150、KGA9101);荧光定量PCR检测试剂盒(北京宝日医生物技术有限公司,批号:R047A、RR820A);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(BAX)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(PCNA)、 β -肌动蛋白(β -Actin)抗体(兔)、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为:50599-2-Ig、12789-1-AP、26939-AP-50、10205-2-AP、66009-1-Ig、SA00001-2)。引物合成、DEPC处理水(上海生工生物工程股份有限公司);CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司,型号:3120);低速离心机、微量移液器(德国Eppendorf公司);流式细胞分析仪(青岛瑞斯凯尔生物科技

有限公司,型号:RaiseCyte 2L6C);倒置显微镜(日本OLYMPUS公司,型号:CKX 41)、荧光显微镜(日本尼康公司,型号:Ti-E);PCR系统(美国Applied Biosystems公司,型号:7500Fast)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将人甲状腺癌B-CPAP细胞培养于含双抗(100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素),添加10%胎牛血清的RPMI-1640培养基,置于37℃、5% CO₂(pH值7.2~7.4)的恒温加湿培养箱中培养。2~3 d以1:3~1:2的比例传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.2 Que配制 将20 mg Que的无菌冻干粉瞬间离后,溶于1.323 5 mL的二甲基亚砜(DMSO),Que分子式C₁₅H₁₀O₇,摩尔质量(M)为302.24 mg/mol。依据公式 $c=m/(M \cdot V)$,配制成 $c=50$ mmol/L的Que母液,-20℃分装保存;以RPMI-1640培养液将母液稀释到工作浓度。

1.3.3 CCK-8法检测Que对B-CPAP细胞增殖活性 设置细胞分组,空白组(不含细胞的完全培养基)、对照组(不加Que干预)、加药组(等比稀释,分别设置5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$ 7个药物浓度梯度),每组设置5个复孔。取生长状态良好的B-CPAP细胞接种于96孔板中,接种密度为 6×10^3 个/孔,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,待细胞完全贴壁生长后,换液添加含不同浓度的Que的完全培养基;分别培养12、24、48 h,换液,每孔加入含10% CCK-8的完全培养基100 μL ,培养箱中孵育2~3 h。酶标仪检测450 nm处各组吸光度(OD)值,重复实验3次,记录每块板的数值,并计算细胞活力。细胞活力(%)=(加药组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值) $\times 100\%$ 。

1.3.4 EdU法检测细胞增殖 根据CCK-8实验结果设置实验分组,对照组、Que低浓度(40 $\mu\text{mol/L}$)组、Que中浓度(80 $\mu\text{mol/L}$)组、Que高浓度(160 $\mu\text{mol/L}$)组。将生长对数期细胞按 1×10^5 个/mL细胞悬液接种在6孔板中,待细胞贴壁且处于生长对数期时,换液,按照上述分组情况添加Que新培养基,继续培养24 h。按照说明书进行细胞增殖检测,配制20 $\mu\text{mol/L}$ EdU工作液,37℃预热,孵育2 h,去除培养液,加入1 mL 4%多聚甲醛,室温固定15 min,固定、洗涤、通透后,加入0.5 mL Click Additive Solution

(Click反应液),室温避光孵育30 min,洗涤3次,使用倒置荧光显微镜检测。实验重复3次,并对每个孔中至少3个位置的细胞进行拍照、分析。

1.3.5 倒置显微镜观察细胞形态 取对数期细胞,常规消化计数,以 1×10^5 个/mL接种于6孔板,恒温箱培养24 h后,按“1.3.4”分组进行药物干预,24 h后倒置显微镜观察细胞形态变化并拍照,重复3次实验。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 选取生长状态良好的细胞消化并计数,以 1×10^5 个/mL细胞密度接种于6孔板中,放入CO₂孵箱中培养24 h。待细胞贴壁生长状态良好,按“1.3.4”分组进行干预,药物作用24 h后使用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化,制备单细胞悬液,2 000 r/min(离心半径为16.5 cm)离心5 min后,收集细胞,预冷的PBS缓冲液洗涤细胞2次,每个样品管加入500 μ L结合缓冲液(Binding Buffer)进行细胞重悬,加入Annexin V-FITC/PI荧光染料,避光反应5 min后,利用流式细胞仪分析结果。实验重复3次,Flow Jo软件检测细胞凋亡率。

1.3.7 流式细胞术检测细胞周期 按周期试剂盒说明书进行检测,将细胞接种于6孔板中,接种数目约 2×10^5 个/孔,培养箱孵育24 h。待细胞完全贴壁后,按“1.3.4”所示分组干预,继续培养24 h后收集细胞,胰酶消化制备单细胞悬液,并调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。取1 mL悬液1 000 r/min(离心半径为16.5 cm)、4 $^{\circ}$ C离心5 min,弃上清液,70%预冷乙醇500 μ L重悬,4 $^{\circ}$ C固定2~6 h。预冷PBS进行洗涤,加入500 μ L新配PI/RNaseA工作液,避光室温孵育30 min,流式细胞仪检测细胞周期,Flow Jo软件分析数据。

1.3.8 Western blotting法检测细胞中蛋白表达水平 将对数生长期细胞,接种后培养箱孵育,根据“1.3.4”设置实验分组进行Que干预;24 h后收集细胞,Ripa裂解,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min(离心半径为7.5 cm)离心5 min,取上清液得到总蛋白,BCA法定量后调整相对浓度,加入4 $\times$ 上样缓冲液>Loading buffer),95 $^{\circ}$ C金属浴加热变性。以10~20 μ L/孔加样,在10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳1~2 h,目的蛋白分离后转模至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1~2 h,吸干水分,加入稀释一抗,4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜。Tris缓冲盐溶液-Tween 20(TBST)洗涤6次,5 min/次,洗涤后,二抗室温摇床孵育2 h,TBST洗涤6次,5 min/次,显影。独立重复3次实验,ImageJ软件分析条带灰度值,Graphpad Prism计算绘图。

1.3.9 RT-qPCR检测细胞中相关mRNA表达水平 上述实验显示Que在中浓度(80 μ mol/L)时对B-CPAP细胞作用显著,将实验分为对照组(0 μ mol/L)和Que中浓度组(80 μ mol/L),检测Que干预后细胞中微小RNA-146(miR-146)的表达情况。取生长对数期的B-CPAP细胞接种于6孔板中, 5×10^5 个/孔,每组3个复孔,培养24 h。观察细胞状态良好时,分组干预,24 h后按RNAeasyTM试剂盒提取总RNA。反转录后获得cDNA,使用相应的引物和荧光染料进行RT-qPCR检测。miR-146、U6引物由上海生工生物股份有限公司设计。通过PCR仪记录的Ct值进行相对定量分析,重复3次实验。以U6为内参,以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算miR-146 mRNA的相对表达量。

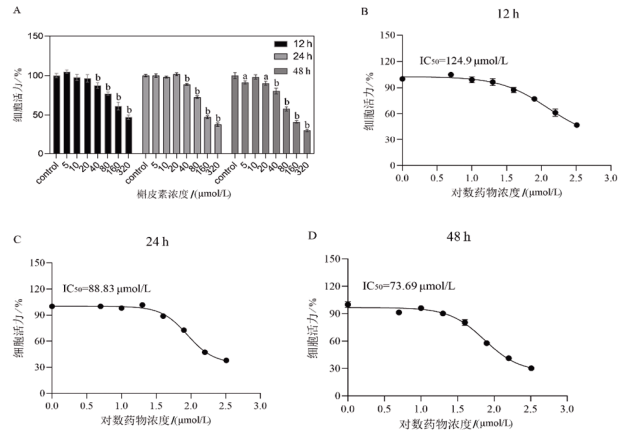
表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物长度/bp
miRNA-146	ACACTCCAGCTGGGGCCCTGTGGACTCACT	TGCTGTCTGGAGTCG	62
U6	CTCGCTTGGCAGCACA	AAGCCTTCACGAATTTCGCT	96

1.4 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行数据分析,并使用Graphpad Prism 9.5、Flow Jo、ImageJ软件对实验数据进行分析 and 绘图。计量数据以“均数 $\pm$ 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异采用独立样本 t 检验比较,多组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较,两两进一步比较采用SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Que对B-CPAP细胞活力的影响 不同浓度的Que分别干预B-CPAP细胞12、24、48 h后结果表明:处理12、24 h时,Que 5、10、20 μ mol/L组对B-CPAP细胞活力影响与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);处理48 h时,Que 10 μ mol/L组对细胞活力影响与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),余组别与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。相同作用时间,随着Que浓度增加,细胞OD值均显著降低($P<0.05$),且一定范围内呈有浓度依赖性。浓度相同,不同作用时间比较,一定范围内随着时间延长,细胞活力降低。不同作用时间比较,药物浓度在40、80、160 μ mol/L时,细胞OD值的变化更为显著。在12 h($F=403.8, P<0.05$)、24 h($F=922.1, P<0.05$)、48 h($F=140.7, P<0.05$)这3个作用时间中,24 h的时间变量易于控制,且组间差异更为显著,故选取40、80、160 μ mol/L、Que干预24 h,进行后续实验,并以80 μ mol/L为中浓度,设置Que低浓度组(40 μ mol/L)、Que中浓度组(80 μ mol/L)和Que高浓度组(160 μ mol/L)。(见图1、表2)



注:A.汇总图;B.作用时间12 h;C.作用时间24 h;D.作用时间48 h;与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

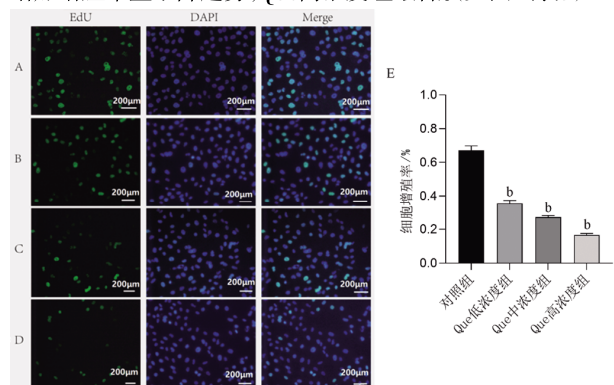
图 1 不同浓度 Que 对 B-CPAP 细胞活力的影响

表 2 不同浓度槲皮素对 B-CPAP 细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Que浓度/(μ mol/L)	<i>n</i>	12 h	24 h	48 h
0(对照组)	5	100.00 $\pm$ 2.34	99.98 $\pm$ 1.37	100.00 $\pm$ 3.20
5	5	104.95 $\pm$ 1.82	99.90 $\pm$ 1.87	91.33 $\pm$ 1.86 ^a
10	5	97.65 $\pm$ 3.29	98.03 $\pm$ 1.04	98.20 $\pm$ 2.44
20	5	96.48 $\pm$ 4.05	101.75 $\pm$ 1.46	90.25 $\pm$ 2.26 ^a
40	5	87.38 $\pm$ 3.05 ^b	88.83 $\pm$ 1.00 ^b	80.40 $\pm$ 3.12 ^b
80	5	77.10 $\pm$ 1.88 ^b	72.68 $\pm$ 1.43 ^b	57.75 $\pm$ 2.32 ^b
160	5	61.38 $\pm$ 4.15 ^b	47.28 $\pm$ 1.45 ^b	41.23 $\pm$ 1.34 ^b
320	5	47.28 $\pm$ 2.46 ^b	37.80 $\pm$ 1.81 ^b	30.30 $\pm$ 1.33 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.2 Que对B-CPAP细胞增殖的影响 采用EdU法测定B-CPAP细胞的增殖水平,不同浓度Que处理24 h后,EdU阳性细胞数均呈剂量依赖性减少,ImageJ软件定量后发现,细胞增殖率分别是对照组(67.22±2.08)%、Que低浓度组(35.28±1.71)%、Que中浓度组(27.22±0.79)%、Que高浓度组(16.67±0.68)%,各组细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,各加药组增殖率均显著降低($P<0.01$),且随着药物浓度增加增殖率呈下降趋势,Que高浓度组最低。(见图2、表3)



注:A.对照组;B.Que低浓度组;C.Que中浓度组;D.Que高浓度组;E.细胞增殖率;与对照组比较,^a $P<0.01$ 。

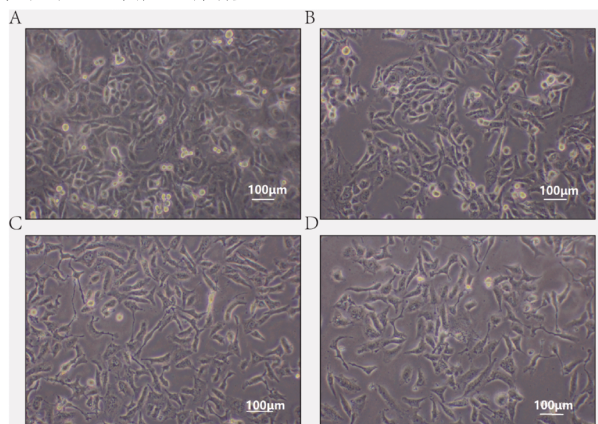
图2 Que对B-CPAP细胞增殖的影响 (×200)

表3 各组细胞增殖率、凋亡率及周期分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	增殖率/%	总凋亡率/%	G ₀ /G ₁ 期/%	S期/%	G ₂ /M期/%
对照组	67.22 ± 2.08	3.99 ± 0.09	31.73 ± 0.31	55.80 ± 2.11	12.40 ± 2.03
Que低浓度组	35.28 ± 1.71 ^b	11.58 ± 0.65 ^a	40.20 ± 0.46 ^b	45.17 ± 3.98 ^b	12.50 ± 0.92
Que中浓度组	27.22 ± 0.79 ^b	21.18 ± 0.54 ^b	52.10 ± 0.70 ^b	33.40 ± 3.39 ^b	13.60 ± 2.39
Que高浓度组	16.67 ± 0.68 ^b	36.47 ± 1.23 ^b	60.20 ± 0.52 ^b	24.90 ± 3.02 ^b	13.43 ± 1.42

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

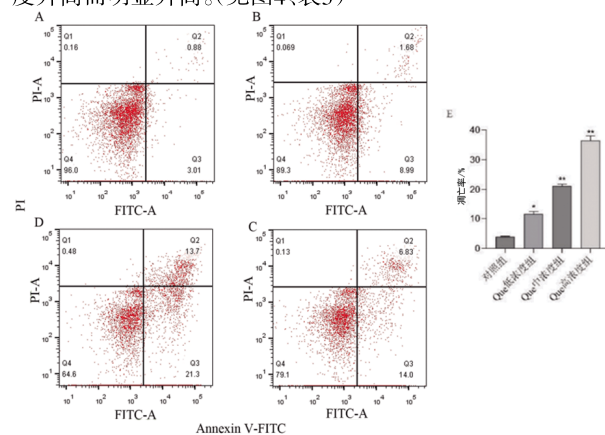
2.3 Que对B-CPAP细胞形态的影响 用不同浓度(0、40、80、160 μmol/L)的Que处理B-CPAP细胞24 h后,在倒置光学显微镜下观察细胞形态变化。结果如图3所示,对照组细胞贴壁生长,细胞形态饱满,折光性好,表面光滑,增殖速度较快。而加药组细胞形态发生变化,随着Que浓度的升高,细胞体积开始缩小,形态皱缩,触角减少,细胞间空隙加大,出现细胞碎片,漂浮的死亡细胞逐渐增多。



注:A.对照组;B.Que低浓度组;C.Que中浓度组;D.Que高浓度组。

图3 Que对B-CPAP细胞形态的影响 (×200)

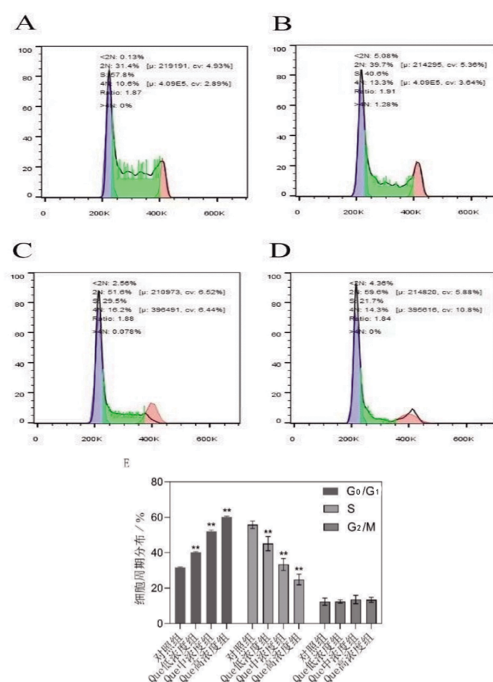
2.4 Que对B-CPAP细胞凋亡的影响 流式细胞术结果表明,40、80、160 μmol/L的Que均能促进B-CPAP细胞凋亡,且呈浓度依赖性,总凋亡率分别为Que低浓度组(11.58±0.65)%、Que中浓度组(21.18±0.54)%、Que高浓度组(36.47±1.23)%,与对照组的(3.99±0.09)%比较,Que浓度越高,凋亡率越显著,差异均有统计学意义($P<0.05$)。早期及晚期凋亡率也随Que浓度升高而明显升高。(见图4、表3)



注:A.对照组;B.Que低浓度组;C.Que中浓度组;D.Que高浓度组;E.细胞凋亡率;与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图4 Que对B-CPAP细胞凋亡的影响

2.5 Que对B-CPAP细胞周期的影响 流式细胞术检测发现,与对照组比较,Que低、中、高浓度组B-CPAP细胞的G₀/G₁期细胞数明显增加,S期细胞数明显减少($P<0.01$),Que高浓度组变化最显著;各加药组细胞中G₂/M期细胞比例与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。Que可将B-CPAP细胞的周期阻滞在G₀/G₁期,其阻滞程度与Que浓度成正比。(见图5、表3)



注:A.对照组;B.Que低浓度组;C.Que中浓度组;D.Que高浓度组;E.细胞周期分布;与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图5 Que对B-CPAP细胞周期的影响

2.6 Que对B-CPAP细胞PCNA、Cyclin D1、Bax、Bcl-2蛋白表

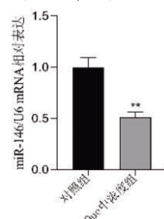
达的影响 以 β -actin为内参蛋白,与对照组比较,Que低、中、高浓度组增殖蛋白PCNA、周期蛋白Cyclin D1表达均降低($P<0.05$),且随着Que浓度提高,PCNA表达进一步降低,Que高浓度组的表达下降最显著($P<0.001$)。与对照组比较,加药组促凋亡相关蛋白Bax表达均升高($P<0.05$),抑制凋亡相关蛋白Bcl-2表达均降低($P<0.05$),Bax/Bcl-2均升高($P<0.05$),且变化均呈浓度依赖性。(见图6、表4)

表4 Que对B-CPAP细胞中增殖、凋亡及周期相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Bax/Bcl-2	PCNA/ β -actin	Cyclin D1/ β -actin
对照组	3	0.46 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.05
Que低浓度组	3	0.93 $\pm$ 0.07 ^b	0.25 $\pm$ 0.05 ^a	0.44 $\pm$ 0.01 ^b
Que中浓度组	3	1.89 $\pm$ 0.38 ^b	0.21 $\pm$ 0.05 ^b	0.33 $\pm$ 0.02 ^b
Que高浓度组	3	3.91 $\pm$ 0.31 ^b	0.13 $\pm$ 0.03 ^b	0.21 $\pm$ 0.02 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.7 Que对B-CPAP细胞miR-146表达的影响 RT-qPCR测定B-CPAP细胞miR-146的表达情况,结果表明,与对照组比较,中浓度组(80 μ mol/L)细胞miR-146 mRNA相对表达量显著降低($P<0.01$)。(见图7、表5)



注:与对照组比较,^a $P<0.01$ 。

图7 RT-qPCR检测B-CPAP细胞miR-146的相对表达

表5 B-CPAP细胞miR-146的相对表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-146/U6
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.08
Que中浓度组	3	0.51 $\pm$ 0.04 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.01$ 。

3 讨论

TC作为内分泌系统常见肿瘤,近年来发病呈上升趋势^[29],对其治疗及相关机制的探究一直是研究重点。Que作为一种天然化合物,广泛存在于植物的花、叶、果中,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等作用^[10],也是夏枯草^[11]、黄芪、黄芩、当归、积雪草^[12]、藏红花^[13]等多种中药的有效活性成分。且夏枯草^[14-15]、黄

芪^[16]、黄芩^[17]、当归^[18]均在临床上用于治疗甲状腺癌。本课题组前期研究^[19]表明,中药夏枯草可通过下调miR-146表达相关,抑制B-CPAP细胞增殖、侵袭、迁移;而Que作为其有效活性成分,具有来源广泛、疗效确切、副作用小等优势,故本研选用Que进行探究。

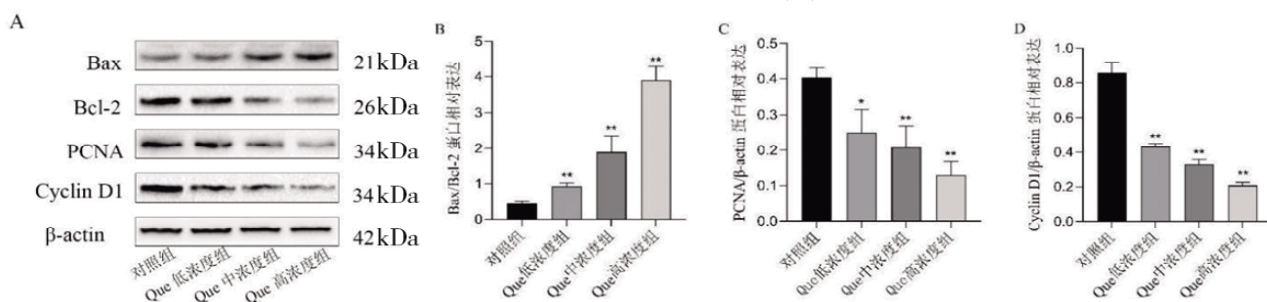
本研究通过体外实验验证,使用不同浓度的Que干预B-CPAP细胞,CCK-8法、EdU实验及镜下观察细胞形态,表明Que能够抑制B-CPAP细胞的增殖,且呈浓度依赖性。流式细胞术凋亡检测显示,Que对B-CPAP细胞早期凋亡、晚期凋亡均有促进作用;周期检测发现,Que可能抑制B-CPAP细胞S期进程,使G₀/G₁期细胞增多,将细胞周期阻滞在G₀/G₁期。Western blotting结果显示,Que抑制增殖相关蛋白PCNA的表达,降低周期相关蛋白CyclinD1的表达,减少Bcl-2家族抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,增加促凋亡蛋白Bax的表达,且调控作用与浓度相关。CyclinD1是调控细胞G₁至S期的转变的关键蛋白^[20]。Bax、Bcl-2蛋白表达失衡、比例失调,可引起线粒体膜电位改变,导致线粒体途径的细胞凋亡^[21]。细胞周期失调导致增殖失控,凋亡逃逸使异常细胞免于清除,是肿瘤发展的重要原因^[22]。因此,在甲状腺癌治疗中,选择具有抑制增殖、阻滞细胞周期、促进凋亡作用的Que可能是一种有效的治疗方法。

miRNA是一类短的单链非编码RNA,可以调控基因的表达,影响细胞的增殖、凋亡、分化等活动^[23-24]。作为miRNA一员,miR-146在TC细胞中呈高表达,可作为DTC诊断、预后的标志物^[25-26]。RT-qPCR结果显示Que组miR-146mRNA表达显著降低($P<0.01$),这与其参与肿瘤细胞凋亡、周期的调控结果一致^[27-28]。

综上所述,Que可抑制人甲状腺癌B-CPAP细胞增殖,阻滞细胞周期于G₀/G₁期,促进其凋亡,且呈浓度依赖性。该作用机制可能为Que干扰miR-146的表达,进而阻滞细胞周期,并通过线粒体凋亡途径调控下游Bcl-2家族蛋白,促进B-CPAP细胞凋亡。本研究表明Que在甲状腺癌治疗中具有潜在应用前景,并为Que防治甲状腺癌提供了实验基础;然而对于Que治疗TC的相关体内实验及具体机制,仍需进一步验证。

参考文献

- [1] 黄劲松,贺喜常.益气消瘿饮联合左甲状腺素钠片治疗甲状腺癌术后气虚痰瘀证患者的临床研究[J].中医导报,2023,29(10):69-73.



注:A.Que干预后的蛋白质表达电泳分析;B.Bax/Bcl-2的相对表达量;C.PCNA蛋白的相对表达量;D.Cyclin D1蛋白的相对表达量;与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图6 Que对B-CPAP细胞增殖、凋亡及周期相关蛋白表达的影响

- [2] 王裕新,潘凯枫,李文庆.2022全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2024,10(3):1-16.
- [3] 李玉姝,单忠艳,滕卫平.《甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南(第二版)》解读[J].中国实用内科杂志,2023,43(11):884-889.
- [4] JAFARINIA M, SADAT HOSSEINI M, KASIRI N, et al. Quercetin with the potential effect on allergic diseases[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2020, 16:36.
- [5] 徐瑞雪,王宇.槲皮素抗肿瘤作用研究进展[J].中成药, 2024,46(9):3027-3032.
- [6] 吴思琪,李毅俊,孙伟芬.槲皮素及其衍生物抗肺癌机制研究进展[J].中药药理与临床,2021,37(6):231-236.
- [7] 李兴强,晁旭,冯雪松.槲皮素对肝细胞性肝癌的增效减毒效应研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2024,26(2):287-293.
- [8] 祝珊珊,余惟一,毕丽伟,等.槲皮素通过激活PTEN抑制PI3K/AKT及JNK信号通路诱导人乳腺癌细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2022,38(8):714-720.
- [9] 何林桦,王艺超,李志辉.2022年中国甲状腺癌流行情况分析:基于《中国肿瘤登记年报》2005-2018年数据[J].中国普外基础与临床杂志,2024,31(7):790-795.
- [10] 冯亚莉,李浩,刘娟,等.槲皮素研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(20):5185-5193.
- [11] 陈蕾,卢泽容,黄雨晴,等.夏枯草有效成分对儿童甲状腺癌的抑制作用研究[J].发育医学电子杂志,2022,10(4):241-249.
- [12] 刘青,刘敬,郑逸航,等.积雪草活性成分槲皮素通过介导STAT3磷酸化抑制IL-23/IL-17A炎症轴发挥抗银屑病作用[J].南方医科大学学报,2025,45(1):90-99.
- [13] 李燕,陈蓉,郭启靖,等.藏红花活性成分槲皮素通过Bcl-2/Bax/Caspase-3信号通路抑制胃癌进展[J].中国老年学杂志,2024,44(21):5286-5290.
- [14] 李杉杉,夏长军,吴峰.夏枯草治疗甲状腺疾病的作用机制[J].中医学报,2024,39(5):973-979.
- [15] 王艳杰,郝嘉平,代巧妹,等.中药夏枯草药理作用及其分子机制研究进展[J].中医药导报,2022,28(2):118-122.
- [16] 李会敏,韦茂英,高云逸,等.基于古今医案云平台探讨中医药治疗甲状腺癌术后组方规律[J].北京中医药,2022,41(6):670-673.
- [17] 马利燕,付培亭,刘秀宝,等.复方黄芩含漱液联合经口腔手术治疗甲状腺癌的临床观察[J].深圳中西医结合杂志, 2025,35(2):51-53.
- [18] 刘梦雅,郑玉玲,张亚玲,等.郑玉玲辨治甲状腺癌用药规律[J].中医学报,2023,38(6):1256-1262.
- [19] 栗栗,陈红跃,武红园,等.夏枯草通过调控MicroRNA-146b-3p对BRAFV600E基因突变型甲状腺乳头状癌细胞生物学特性的影响[J].时珍国医国药,2023,34(5):1084-1088.
- [20] AHMADI Y, FAIQ T, ABOLHASANI S. Impact of G1 phase kinetics on the acquisition of stemness in cancer cells: The critical role of cyclin D[J]. Mol Biol Rep, 2025,52(1):230.
- [21] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023,24(10):732-748.
- [22] LIU Y, AO X, JIA Y, et al. The FOXO family of transcription factors: Key molecular players in gastric cancer[J]. J Mol Med (Berl), 2022,100(7):997-1015.
- [23] 李勇,郭敏,康英英.microRNA在甲状腺癌中的研究进展[J].中华全科医学,2022,20(2):298-301,351.
- [24] 李杰,卢佳姝.miRNA-106-3p、miRNA-654-5p与结直肠癌肝转移患者术后复发的关系研究[J].中国肿瘤外科杂志,2021,13(6):606-610.
- [25] FERRAZ C, CUNHA G B, DE OLIVEIRA M M B, et al. The diagnostic and prognostic role of miR-146b-5p in differentiated thyroid carcinomas[J]. Front Endocrinol, 2024,15:1390743.
- [26] 郝润梅,刘竟,刘洁,等.长链非编码RNA X染色体失活特异转录物和微小RNA-146-5p在甲状腺癌中的表达及临床意义[J].实用临床医药杂志,2023,27(5):72-75,81.
- [27] TUTUNCHI S, NOURMOHAMMADI P, TOFIGH R, et al. The critical role and functional mechanism of microRNA-146a in doxorubicin-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2025,44(2):124-135.
- [28] 武彬,丁雨溪,王静,等.miR-146a-5p靶向调控Notch2促进人晶状体上皮细胞线粒体损伤诱导的细胞凋亡[J].中国医科大学学报,2022,51(11):1003-1008.

(收稿日期:2025-04-22 编辑:刘国华)