槲皮素通过G4调控癌基因表达影响肿瘤 细胞增殖与凋亡

马云青¹ 李晓梅¹ 刘雪萍¹ 韩洋洋^{2*} 黄伟伟^{1*} (¹西北农林科技大学生命科学学院,杨陵 712100; ²西安交通大学医学部基础医学院人体解剖与组织胚胎学系,西安 710061)

摘要 该研究采用CCK-8法、流式细胞术、免疫印迹法、实时定量PCR和体外结合实验等 方法检测了槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞生长和凋亡,以及对受G4调控基因表达的影响。结果显 示,槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞生长具有明显抑制作用,并诱导细胞周期停滞在S期;槲皮素诱导 Hep-2和MCF-7细胞凋亡,表现出磷脂酰丝氨酸外翻、细胞膜通透性增加、染色质凝集、caspase活 化等凋亡特征;槲皮素显著抑制*c-Myc、KRAS、YYI*等受G4调控基因的表达;槲皮素促进*c-Myc*启 动子区G4形成序列Pu27形成G4结构并抑制核蛋白与其结合。以上结果表明,槲皮素可能通过促进 细胞内G4形成序列形成稳定G4结构并抑制G4解旋酶对其解旋,引起受G4调控的肿瘤相关基因表 达降低,最终抑制肿瘤细胞生长并诱导细胞凋亡。

关键词 槲皮素;细胞增殖;细胞凋亡;G-四链体;基因表达

Quercetin Regulates the Expression of Oncogenes through G-quadruplex and Affects the Proliferation and Apoptosis of Tumor Cells

MA Yunqing¹, LI Xiaomei¹, LIU Xueping¹, HAN Yangyang^{2*}, HUANG Weiwei^{1*}

(¹College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; ²Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences of Xi' an Jiaotong University Health Science Center, Xi' an 710061, China)

Abstract The effect of quercetin on Hep-2 and MCF-7 cells growth and G4-regulated tumor-associated genes expression were investigated by using CCK-8, flow cytometry, immunoblotting, Real-time PCR and *in vitro* binding assay. The results showed that quercetin significantly inhibited the growth of Hep-2 and MCF-7 cells and induced cell cycle arrest in S phase. Quercetin also induced Hep-2 and MCF-7 cells apoptosis and showed typical apoptotic characteristics such as phosphatidylserine eversion, cell membrane incompletion, chromatin condensation, procaspases activation. Meanwhile, Quercetin significantly inhibited the expression of G4-regulated tumor-associated genes such as *c-Myc*, *KRAS*, *YY1*. Furthermore, Quercetin promoted 27 nucleotide *c-Myc* promoter G4 (G-quadruplex) formation sequence Pu27 to form stable G4 structures and inhibited binding of the nuclear protein to G4-Pu27. These results indicate that quercetin may inhibit the expression of G4-regulated tumor-associated gene through inducing intracellular G4 structure formation and inhibiting the resolving by G4 helicases, which results

Received: April 16, 2019 Accepted: August 12, 2019

收稿日期: 2019-04-16 接受日期: 2019-08-12

国家自然科学基金(批准号: 31300654)、陕西省自然科学基金(批准号: 2014JQ3098)和西北农林科技大学基本科研业务费专项资金项目(批准号: 2452018157) 资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 18966711391, E-mail: yangyanghan07@hotmail.com; Tel: 13630239874, E-mail: whuang0210@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.831300654), the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grant No.c2014JQ3098) and the Special Fund for Fundamental Research of Northwest A & F University (Grant No.2452018157)

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-18966711391, E-mail: yangyanghan07@hotmail.com; Tel: +86-13630239874, E-mail: whuang0210@163.com

网络出版时间: 2020-01-06 17:06:10 URL: http://kns.enki.net/kems/detail/31.2035.Q.20200106.1706.006.html

into tumor cell growth inhibition and cell apoptosis.

Keywords quercetin; cell growth; cell apoptosis; G-quadruplex; gene expression

黄酮类化合物具有良好的生物活性,是重要的 药物开发资源。槲皮素(quercetin)是生物活性较强 的黄酮类化合物之一,其化学名为3,3',4',5,7-五羟基 黄酮,广泛存在于各种水果蔬菜和野生植物中,含量 丰富,是主要的膳食黄酮醇^[1]。由于分子结构比较独 特,能够清除自由基和螯合金属离子,槲皮素具有较 强的抗氧化能力。药理研究证实,槲皮素具有调节 免疫、抗炎抗菌、保护心血管、降糖、抑制肥胖等 多种生物学活性^[24],具有较好的药用潜力。

近年来槲皮素抗癌活性备受关注。药理研究 发现, 槲皮素在体内外能够抑制肝癌、胃癌、结肠 癌、前列腺癌、乳腺癌、骨肉瘤、淋巴瘤等多种肿 瘤细胞的生长、迁移和转移,以及血管生成,并诱导 肿瘤细胞发生凋亡、坏死、自噬,其抗癌活性表现 出明显的时间和浓度依赖性[4]。槲皮素对放化疗具 有增敏和缓解毒副作用的功效[5]。这些研究结果表 明, 槲皮素具有良好的抗癌功效, 并可能作为抗癌增 敏剂应用于临床治疗。机制研究发现, 槲皮素的抗 癌作用除了与其抗氧化活性有关外,还与槲皮素广 谱的蛋白激酶抑制活性相关。關皮素能够抑制多 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性^[7],已发现蛋白激酶 PI3K^[8]和CK2^[9]是槲皮素的直接蛋白质靶标。槲皮 素可能通过抑制这些蛋白激酶干扰多条肿瘤相关信 号转导通路,如槲皮素直接或者通过激活PI3K-Akt 信号通路间接抑制mTOR活性发挥抗癌作用^[10]。此 外,研究报道,槲皮素还直接靶向黄嘌呤氧化酶[11]、 血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)^[12]、芳香烃受体(aromatic hydrocarbon receptor, AhR)^[13]和抗凋亡蛋白Bcl-2^[14]等 重要功能蛋白。Carvalho等^[15]通过基于配体相似性 检索,结合位点比较和反向对接的分级筛选,并结合 分子动力学模拟鉴定,发现了一系列潜在的槲皮素 蛋白靶标,主要为蛋白激酶和聚ADP核糖聚合酶,槲 皮素通过模拟ADP/ATP与蛋白靶标结合,从而影响 多条信号通路中的关键信号蛋白,发挥多层次的生 物活性。这些研究表明, 槲皮素是多靶点药物, 能够 影响多种细胞生理代谢过程,这与槲皮素多种生物 活性相对应,然而这些蛋白靶标在槲皮素抗肿瘤活 性中的作用及其机制还需深入研究。

除了靶向蛋白激酶等靶标外,槲皮素可能还靶 向核酸。研究发现槲皮素能够特异结合G-四链体(Gquadruplex, G4)^[16]。G4是由富含串联重复鸟嘌呤的 核酸链折叠形成的一种四链结构[17]。序列分析显示, 人类基因组中至少存在30万个G4形成序列,并且特 异地分布于端粒、基因启动子、RNA的5'-UTR区 等重要功能区,表明G4在染色体组装和核酸代谢中 发挥重要作用[17]。富含鸟嘌呤的串联重复端粒序列 能够形成G4,并抑制端粒酶的功能,是潜在的抗癌靶 标[18]。细胞增殖和周期调控等相关基因,尤其是癌 基因的启动子区和mRNA的5'-UTR区富含G4形成序 列,已在c-Myc^[19]、Bcl-2^[20]、KRAS^[21]、hTERT^[22]等基 因的启动子发现G4并抑制基因转录表达。因此, G4 被认为可能是一种新的抗癌靶点,通过小分子配体 结合并稳定G4,抑制端粒酶活性和癌基因转录翻译, 达到抗癌目的。目前已经筛选了一些G4小分子配体 如Pyridostatin^[23]和360A^[24]具有较好的抗癌活性。因 此,本实验利用喉癌细胞Hep-2和乳腺癌细胞MCF-7 为模型,研究槲皮素作为G4配体对癌细胞生长、凋 亡、受G4调控肿瘤相关基因表达等的影响,以期揭 示槲皮素的抗肿瘤分子机制,为槲皮素的临床应用 提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 Hep-2和MCF-7细胞购自国家实验细胞资源共享服务平台(北京总部),用添加有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和100 U/mL青霉素/链霉素的高糖DMEM培养基于5% CO₂、37°C培养箱中静置培养。

1.1.2 试剂 槲皮素(≥98.5%,Q111273-20 mg)购自阿 拉丁试剂(上海)有限公司;蛋白酶抑制剂(04693132001) 和磷酸酶抑制剂(04906837001)购自Roche公司;Lipofectamine 2000(11668-019)和ECL显色液(34080)购 自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(C1063)、细胞核与细胞质蛋白提 取试剂盒(P0027)、RIPA裂解液(P0013B)、CCK-8试 剂盒(C0038)、DAPI染色液(C1005)、caspase-3抗体 (AC031)、PARP抗体(AP102)、VEGF抗体(AV202)、 5× EMSA/Gel-Shift结合缓冲液(GS005)购自碧云天 生物技术公司; RNAiso Plus (9109)、Prime ScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) (RR036A)、 SYBR[®] Premix Ex Taq TM II(DRR820)购自宝生物工 程(大连)有限公司; β-actin抗体(CW0096A)购自北京 康维世纪生物技术有限公司; c-Myc抗体(9402S)购 自Cell Signaling Technology公司; Rb抗体(C-15)、YY1 抗体(H-10)、KRAS抗体(F234)均购自Santa Cruz Biotechnology公司。

1.1.3 仪器 3110型水套式CO₂培养箱购自Thermo 公司; SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台购自苏州 净化; CFX96型实时定量PCR仪、Western blot蛋白 电泳系统、Chemi Doc XRS+型化学发光成像仪、 iMark型酶标仪购自Bio-Rad公司; BX51+DP70荧光 显微镜购自Olympus公司; FACS Calibur型流式细胞 仪购自BD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建 以HeLa细胞基因组DNA为模板, 利用特异性引物 F1: 5'-CCG GAA TTC CAC AGG ACA AGG ATG CGG TTT G-3'和R1: 5'-CGC GGA TCC CCT CTG CCT CTC GCT GGA ATT AC-3'(F和 R分别代表上下游引物,下划线标注酶切位点)扩增 c-Myc启动子-484~+34片段, 插入经EcoR I和BamH I 双酶切的pGluc Basic质粒中,以构建含P1、P2启动 子和NHE III₁序列的野生型*c-Myc*启动子报告质粒c-Myc-WT-Gluc。利用引物F2: 5'-TGC TCT AGA CTC TCC TCA CTC TCC CCA TAA GC-3'和R2: 5'-TGC TCT AGA AGG TGG G GA GGA GAC TCA GC-3′(下划线标注Xba I酶切位点, 加粗代表突变碱基) 分别与引物F1和R1配对扩增c-Myc启动子片段,双 酶切后共同插入到EcoR I和BamH I双酶切的pGluc Basic质粒中,以构建Pu27序列突变的c-Myc启动子 报告质粒c-Myc-Mut-Gluc。

1.2.2 细胞活力检测 分别取生长状态良好的对数 期Hep-2和MCF-7细胞,以2 000个细胞/孔的比例接 种到96孔培养板中。经过夜培养后,分别加入不同浓 度的槲皮素(0、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L) 进行处理,每个浓度设置3个平行重复。处理72 h后, 每孔加入含10% CCK-8的培养液溶液,37 °C孵育1 h 后用酶标仪在450 nm和630 nm处测定吸光度(D)值。 每组实验重复3次。细胞活力按照如下公式计算:细 胞活力=[D₄₅₀(处理组)-D₆₃₀(处理组)]/[D₄₅₀(对照组)-

D₆₃₀(对照组)]。

1.2.3 细胞周期检测 分别取生长状态良好的对数期Hep-2和MCF-7细胞接种到6孔培养板中。经过夜培养后,用不同浓度的槲皮素(0、50 μmol/L、100 μmol/L)进行处理。处理72 h后,经胰蛋白酶消化,将细胞收集到1.5 mL离心管内,用预冷PBS洗涤2次,加入预冷70%乙醇,吹打混匀,4 °C下固定30 min,再用预冷PBS洗涤2次,加入0.5 mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液(含100 μg/mL RNase和50 μg/mL PI), 重悬细胞,37 °C避光染色30 min,用流式细胞仪在488 nm激发波长处检测荧光信号,利用Flow JO 7.6.5软件定量分析细胞周期各阶段细胞所占比例并制图。实验独立重复3次。

1.2.4 细胞Annexin V/PI染色 分别取生长状态良 好的对数期Hep-2和MCF-7细胞接种到6孔培养板中。 经过夜培养后,用100 μmol/L槲皮素处理细胞,以 DMSO为对照。处理72 h后,收集所有漂浮和贴壁细 胞,用PBS重悬后通过计数测定细胞密度,各取1×10⁵ 细胞/mL经药物处理细胞按照Annexin V-FITC Apoptosis Assay试剂盒说明书进行Annexin V-FITC和PI染 色,用流式细胞仪进行细胞检测,使用Flow JO 7.6.5 软件分析实验数据并制图。实验独立重复3次。

1.2.5 细胞DAPI染色 将生长状态良好的Hep-2 和MCF-7细胞接种于预先放置有无菌盖玻片的12孔 培养板中。经过夜培养后,用100 μmol/L槲皮素处 理细胞,以DMSO为对照。处理72 h后,吸去培养液, 加入0.5 mL 0.4 %多聚甲醛固定液,室温固定10 min; 用PBS洗涤3次后,加入0.2 mL DAPI染色液,室温染 色5 min;去除染色液,用PBS洗涤3次,取出附着有染 色细胞的盖玻片,反扣在滴加有抗荧光淬灭封片液 的载玻片上,用荧光显微镜观察细胞核形态并拍照。

1.2.6 免疫印迹 将生长状态良好的Hep-2和MCF-7 细胞接种到6孔培养板中。经过夜培养后,用不同浓 度的槲皮素(0、50 μmol/L、100 μmol/L)进行处理。 处理72 h后,收集细胞,PBS洗涤3次,用含蛋白酶抑 制剂的RIPA细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白并用 BCA法测定蛋白浓度,将不同处理组的蛋白浓度调 整一致,加入适量5×SDS上样缓冲液,混匀后沸水浴 5 min使蛋白变性。根据目的蛋白大小,选择8%~15% 的SDS-PAGE凝胶进行电泳,利用湿转法将蛋白转 至硝酸纤维素膜。含有蛋白的硝酸纤维素膜经5% 的脱脂奶粉室温封闭1 h,与一抗4 °C孵育过夜,用 TBST漂洗后再与二抗室温孵育1h,最后用ECL发光 液对目的蛋白进行显影,以β-actin作为实验内参。

1.2.7 报告基因检测 将生长状态良好的MCF-7细胞接种在24孔板中。过夜培养后,利用Lipofectamine 2000分别将*c-Myc*启动子报告质粒c-Myc-WT-Gluc 及Pu27序列突变报告质粒 c-Myc-Mut-Gluc转染 MCF-7细胞。转染24 h后,以不同浓度槲皮素处理转染细胞,以DMSO作为阴性对照,每组设3个重复。药物处理48 h后,收集细胞培养液,利用Secrete-Pair[™] Gaussia Luciferase Assay Kit检测荧光素酶(Gluc)活性。每个样品重复测定3次,结果取平均值。

1.2.8 实时定量PCR 将生长状态良好的Hep-2和 MCF-7细胞接种到6孔培养板中。经过夜培养后,用不 同浓度的槲皮素(0、50 μmol/L、100 μmol/L)进行处理。 处理72 h后,吸去培养液,用PBS洗涤1次,参照RNAiso Plus说明书提取总RNA。取500 ng的总RNA,用Prime ScriptTM RT Master Mix试剂盒反转录成cDNA。参照 SYBR[®] Premix Ex Taq TM II说明书配制20 μL反应体 系,每个样品设置3个重复,以β-actin作为内参,然 后按照标准程序进行实时定量PCR反应。使用Bio-Rad CFX Manager V1.1.308.1111软件采用ΔΔCT法进 行实验数据分析。将阴性对照组的mRNA表达量设 定为1,计算各个靶基因的相对表达量。实验至少重 复3次,所用引物序列见表1。

1.2.9 凝胶迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 合成5'端FAM标记的*c-Myc*启动子 G4形成序列Pu27寡核苷酸FAM-PU27(5'-FAM-TGG GGA GGG TGG GGA GGG TGG GGA AGG),用 ddH₂O稀释到100 µmol/L。取20 µL FAM-Pu27用 180 µL含50 mmol/L KCl的TE缓冲液稀释,90 °C退 火5 min,缓慢冷却至室温,后4 °C保存。收集对数生 长期的Hep-2细胞,按照细胞核与细胞质蛋白提取试

剂盒(P0027)说明书中的标准步骤提取核蛋白。取2 μL 退火的FAM-Pu27与不同浓度的槲皮素(0、1 μmol/L、 4 μmol/L、8 μmol/L)稀释到10 μL PBS溶液中, 混匀 后室温孵育5 min, 加入4 μL 5× EMSA结合缓冲液混 匀, 样品分为2组, 一组加入40 pmol/L核蛋白, 另一组 不添加, 最后用PBS溶液将反应体系补齐20 μL, 混匀 后37 ℃孵育1 h。样品中加入2 μL EMSA上样缓冲液, 用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶在0.5× TBE电泳液中 60 V冰浴电泳3 h。电泳结束后, 剥离凝胶, 用成像 仪获取电泳结果。

1.2.10 数据处理 利用SigmaPlot 10进行制图和 数据分析。实验数据采用x±s表示。使用t检验检测 组间差异, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞生长的影响

槲皮素化学名为3,3',4',5,7-五羟基黄酮(图1A), 广泛存在于各种农作物和野生植物中,具有多种生 物活性,如抗氧化、抗炎、抗病毒等,其中抗癌活 性备受关注,但其抗癌机制目前仍不完全清楚。研 究报道, 槲皮素是一种天然G4配体, 能够结合并稳 定G4核酸结构[16]。G4形成序列多见于癌基因的启 动子区,对癌基因转录具有抑制作用,因此,我们推 测, 槲皮素可能通过结合并稳定癌细胞中的G4, 从而 抑制癌基因转录和癌细胞生长。为验证这一设想, 我们首先检测了槲皮素对癌细胞生长的影响。将 Hep-2和MCF-7细胞接种到96孔板中,培养至贴壁 后,用不同浓度的槲皮素(0、25 μmol/L、50 μmol/L、 100 µmol/L)进行处理, 以等量DMSO作为阴性对照, 处理72 h后,用CCK-8法检测细胞活力。结果如图 1B所示, 槲皮素显著抑制两种癌细胞的生长, 并呈 现浓度依赖性。进一步检测槲皮素对细胞周期的影

Table 1 Primer sequence		
基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer $(5' \rightarrow 3')$	Reverse primer $(5' \rightarrow 3')$
hTERT	GAG CTG TAC TTT GTC AAG GTG GAT G	TTT GAT GAT GCT GGC GAT GAC
KRAS	ACT GGG GAG GGC TTT CTT TGT	CCT GTC TTG TCT TTG CTG ATG TTT C
VEGF	CAC CCA CCC ACA TAC ATA CA	CTC AAG TCC ACA GCA GTC AA
Rb	CTC TCG TCA GGC TTG AGT TTG	GAC ATC TCA TCT AGG TCA ACT GC
YY1	GGA ATA CCT GGC ATT GAC CTC T	ACA TCT TTG TGC AGC CTT TAT GAG
c-Myc	GTC AAG AGG CGA ACA CAC AAC	TTG GAC GGA CAG GAT GTA TGC
β-actin	GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATC AC	TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T

表1 引物序列

响,将Hep-2和MCF-7细胞接种到6孔培养板中,用不 同浓度的槲皮素(0、50 μmol/L、100 μmol/L)处理72 h, 经固定和PI染色后,用流式细胞仪分析细胞周期各 时相细胞比例。结果如图1C所示,与对照组相比,槲 皮素处理的Hep-2细胞S期和G₂/M期细胞比例显著 增加,槲皮素处理的MCF-7细胞S期细胞比例也明显 增加,结果表明,槲皮素能够将癌细胞细胞周期阻滞 在S期。上述细胞生长检测和细胞周期分析结果证 实,槲皮素能够通过阻滞癌细胞周期抑制肿瘤分裂 发挥抗癌作用。

2.2 槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞的诱导凋亡作用 为进一步检测槲皮素的抗癌活性,我们检测了 槲皮素是否诱导癌细胞调亡。首先利用Annexin V (AV)-FITC/PI双染法进行分析, AV-FITC和PI染色分 别能够检测细胞调亡过程中细胞膜磷脂酰丝氨酸外 翻和膜完整性,结合流式细胞仪分析,可定性和定量 地分析活细胞(AV⁻/PI⁻)、早期凋亡细胞(AV⁺/PI⁻)、 晚期凋亡细胞(AV⁻/PI⁻)和死细胞(AV⁻/PI⁺)。将Hep-2 和MCF-7细胞接种到6孔板中,用100 μmol/L槲皮 素处理,用DMSO作对照。72 h后收集所有细胞进 行Annexin V-FITC和PI染色,然后用流式细胞仪检 测细胞凋亡情况。结果如图2A所显示,对于Hep-2 细胞,槲皮素处理导致活细胞比例由90.36%下降到 53.80%,而凋亡细胞比例由5.41%上升到30.86%。



A: 槲皮素的化学结构; B: CCK-8法检测槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞生长的影响; C: 流式细胞术检测槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞周期的影响。 *P<0.05, 与对照组相比。

A: the chemical structure of quercetin; B: cell growth analysis of quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by CCK-8; C: cell cycle analysis of quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by flow cytometry. *P < 0.05 compared with control group.

图1 槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞生长的影响

Fig.1 Effect of quercetin on the growth of Hep-2 and MCF-7 cells



A: AV-FITC/PI双染法检测槲皮素诱导Hep-2和MCF-7细胞凋亡作用; B: DAPI染色法检测槲皮素对Hep-2和MCF-7细胞核的影响; C: 免疫印迹实验检测槲皮素对凋亡相关蛋白的影响。

A: apoptotic analysis of quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by V-FITC/PI staining and flow cytometry; B: apoptotic analysis of quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by DAPI staining; C: apoptosis related proteins analysis of quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by Western blot.

图2 槲皮素诱导Hep-2和MCF-7细胞凋亡



对于MCF-7细胞, 槲皮素处理导致活细胞比例由 94.58%下降到59.35%, 而凋亡细胞比例由4.29%上 升到36.98%, 结果说明槲皮素诱导癌细胞发生凋亡。 利用DAPI染色荧光观察100 µmol/L槲皮素处理72 h 后, Hep-2和MCF-7细胞核的形态变化。结果(图2B) 发现, 对照组细胞略呈卵圆形, 染色质分布比较均 匀, 而槲皮素处理组细胞核形态变得不规则, 染色质 分布不均, 并呈现高度凝缩和边缘化, 表现出细胞凋 亡典型的核形态变化。进一步通过免疫印迹实验检 测凋亡相关蛋白caspase状态鉴定槲皮素的诱导凋亡 作用。细胞凋亡主要通过caspase依赖性途经调控。 正常状态下, caspase蛋白以无活性前体形式存在, 当 细胞接受凋亡信号刺激后, caspase蛋白通过同性或 者异性切割形成两个不同大小亚基并聚合形成异二 聚体而活化,活化的caspase蛋白如caspase-3通过切 割细胞内其他蛋白如PARP,从而破坏细胞结构并引 起细胞凋亡,这是一个不可逆的调控过程。因此可 以通过检测caspase蛋白及其主要靶蛋白的状态鉴定 细胞凋亡。结果(图2C)显示,与对照组相比,在槲皮 素处理的Hep-2细胞中, caspase-3和PARP均出现明 显的切割条带,而在槲皮素处理的caspase-3缺失型 细胞MCF-7中, PARP也出现明显的切割条带。以上 结果均表明,槲皮素能够诱导Hep-2和MCF-7细胞发 生凋亡,同时说明,槲皮素的抗癌活性不仅表现在抑 制肿瘤细胞生长,还具有细胞毒性作用,直接诱导癌 细胞死亡。

2.3 槲皮素对含G4形成序列的*c-Myc*启动子转录 调控作用的影响

细胞学实验证实槲皮素能够抑制Hep-2和MCF-7 细胞生长,并诱导细胞凋亡,表现出较好的抗肿瘤 活性。而目前对于槲皮素的抗肿瘤分子机制还不 十分清楚。除了靶向激酶的蛋白靶标,槲皮素被证 实对特殊核酸具有较高的亲和性,能够结合并稳定 G4结构^[16]。目前已在*c-Myc*^[19]、*Bcl-2*^[20]、*KRAS*^[21]、 *hTERT*^[22]等多个肿瘤相关基因启动子区发现G4,并 调控这些基因的转录表达。因此,G4可能是新的抗 肿瘤靶点。我们推测,槲皮素可能通过结合G4影 响受G4调控的肿瘤相关基因的转录表达发挥抗肿 瘤作用。*c-Myc*是第一个被发现启动子区存在G4的 癌基因,其P1启动子上游具有核酸酶超敏元件NHE III₁,负责调控85%~90%的c-Myc转录。在NHE III₁ 元件中存在G4形成序列Pu27,实验证实Pu27在体内 体外均能够形成G4,并对c-Myc的转录具有明显的 抑制作用^[19]。因此, *c-Myc*启动子是研究G4转录调 控作用的良好模型。我们首先利用*c-Myc*启动子报 告质粒检测槲皮素是否通过G4发挥作用。通过克 隆包含P1、P2启动子和NHE III₁元件的*c-Myc*启动 子片段,构建*c-Myc*启动子荧光素酶报告质粒和Pu27 序列突变报告质粒(图3A),分别转染MCF-7细胞,用 不同浓度槲皮素处理,检测荧光素酶报告基因活性。 结果如图3B所示,槲皮素显著抑制野生型*c-Myc*启 动子调控的荧光素酶报告基因表达,而对Pu27序列 突变的*c-Myc*启动子调控的荧光素酶报告基因表达 没有抑制作用,说明槲皮素通过稳定G4抑制*c-Myc* 启动子的转录活性,提示槲皮素可能通过稳定G4抑 制癌基因表达。

2.4 槲皮素对受G4调控肿瘤相关基因表达的影响

荧光素酶报告基因检测结果提示,槲皮素可 能通过稳定G4抑制癌基因表达。我们进一步通过 实时定量PCR检测槲皮素对6种已经证实受G4调



A: c-Myc启动子报告质粒模式图,在荧光素酶报告基因上游插入c-Myc启动子-484~+34片段,其中包含P1、P2启动子和NHE III₁元件,序列为野 生型和突变型Pu27(突变碱基加粗显示)。下划线标注酶切位点,加粗代表突变碱基。B: 荧光素酶报告基因活性检测槲皮素对c-Myc启动子转录 调控作用的影响。*P<0.05,与对照组相比。

A: schematic diagram of *c-Myc* promoter reporter onstruct. The *c-Myc* promoter -484 + 34 fragment was inserted upstream of luciferase reporter gene, which contains P1, P2 promoter and NHE III₁ element. Sequences were wild type and mutant Pu27 (mutant bases coarsening display). The underline means restriction site, the bold means mutant bases. B: reporter assays to determine the effect of quercetin on *c-Myc* promoter-mediated transcription. **P*<0.05 compared with control group.

图3 槲皮素对c-Myc启动子调控的荧光素酶报告基因表达的影响

Fig.3 Effect of Quercetin on c-Myc promoter regulated Gluc in Hep-2 cells in vitro

控的肿瘤相关基因 *c-Myc*^[19]、*KRAS*^[21]、*hTERT*^[22]、 *VEGF*^[25]、*Rb*^[26]和*YYI*^[27]转录的影响。结果(图4A)显示,与对照组相比,在槲皮素处理的Hep-2细胞中,癌 基因*KRAS、YY1和c-Myc*的mRNA水平显著降低, 抑癌基因*Rb*的mRNA水平几乎不受影响,而*hTERT* 和*VEGF*的mRNA水平有所升高;在槲皮素处理的 MCF-7细胞中,癌基因*KRAS、VEGF、YY1和c-Myc*的 mRNA水平显著降低,*hTERT*和*Rb*的mRNA水平则显 著升高;结果证实,槲皮素能够抑制部分受G4调控的肿瘤相关基因的转录表达。为验证实时定量PCR结果,我们通过免疫印迹检测槲皮素对上述G4调控的肿瘤相关基因蛋白质水平的表达量的影响。结果(图4B)发现,与实时定量PCR结果相似,与对照组相比,在槲皮素处理的Hep-2细胞中,癌基因c-Myc、KRAS和YY1蛋白质水平的表达量显著降低,抑癌基因Rb蛋白质水平的表达量几乎不受影响,而VEGF蛋





实时定量PCR(A)和免疫印迹实验(B)检测槲皮素对受G4调控的肿瘤相关基因表达的影响。*P<0.05, 与对照组相比。 Expression analysis of G4-regulated tumor-associated genes in quercetin treated Hep-2 and MCF-7 cells by Real-time PCR (A) and Western blot (B). *P<0.05 compared with control group.

图4 槲皮素对受G4调控肿瘤相关基因表达的影响

Fig.4 Effect of quercetin on the expression of G4-regulated tumor-associated genes in Hep-2 and MCF-7 cells in vitro



图5 槲皮素对G4-Pu27与核蛋白相互结合的影响 Fig.5 Effect of quercetin on the binding of G4-Pu27 with nuclear proteins *in vitro*

白质水平的表达量有所升高;在槲皮素处理的MCF-7 细胞中,癌基因c-Myc、KRAS、VEGF和YY1蛋白质 水平的表达量显著降低,Rb蛋白质水平的表达量则 显著升高。这些结果证实,槲皮素能够抑制*c-Myc、 KRAS*和*YY1*等受G4调控癌基因的表达,槲皮素可能 通过抑制这些癌基因表达发挥抗肿瘤作用。

2.5 槲皮素对G4-Pu27与核蛋白相互结合的影响

G4结构由于具有高度的稳定性,对基因复制和 转录形成阻碍。G4结构的稳定性及其生物学功能 除了与G4形成序列、离子环境等因素有关外,还与 其所结合蛋白紧密关联。目前已经发现数十种G4 结合蛋白,能够稳定或者解旋G4结构,并对基因表 达具有调控作用^[28]。我们进一步检测槲皮素对G4 结合蛋白作用的影响。首先合成5′端具有荧光标签 FAM的寡核苷酸链Pu27(FAM-Pu27),并提取Hep-2 细胞核蛋白,进行EMSA实验检测槲皮素对FAM-Pu27与G4结合蛋白相互结合的影响。结果如图5所 示,在右侧不添加核蛋白的实验组,迁移最快的条 带是形成分子内G4结构的FAM-Pu27;迁移较慢的 是结合有槲皮素的FAM-Pu27条带,可能由于结合槲 皮素数量的不同而存在不同迁移速率的条带,而且 随着槲皮素浓度升高条带亮度显著增强,说明槲皮 素能够与Pu27所形成的G4直接结合。其中的杂带 可能是形成分子间G4结构的FAM-Pu27条带,由于 参与形成分子间G4的FAM-Pu27寡核苷酸链数目的 不同而出现多条不同的条带。在左侧添加核蛋白的 实验组,迁移最快的FAM-Pu27 G4条带显著减少,并 出现了迁移缓慢的高分子量条带,说明核蛋白中G4 结合蛋白与FAM-Pu27结构相结合,但随着槲皮素 浓度的增加,G4结合蛋白与FAM-Pu27的结合条带 信号逐渐减弱,说明槲皮素能够抑制G4结合蛋白与 FAM-Pu27的结合。因此,槲皮素抑制受G4调控癌 基因的转录表达可能还与其能够抑制G4结合蛋白 与G4核酸的结合有关。

3 讨论

槲皮素由于具有较好的抗癌活性而备受关注, 但其抗癌机制目前还不完全清楚。我们的实验结果 发现, 槲皮素能够显著抑制肿瘤细胞Hep-2和MCF-7 的增殖, 并将细胞周期阻滞在S期; 此外, 槲皮素还诱 导Hep-2和MCF-7细胞凋亡, 表现出磷脂酰丝氨酸外 翻、细胞膜通透性增加、染色质凝集、caspase3活 化等典型细胞凋亡特征, 这些结果证实, 槲皮素具有 良好的抗癌作用。分子机制研究发现, 槲皮素具有 良好的抗癌作用。分子机制研究发现, 槲皮素能够 抑制*KRAS、c-Myc、YYI*等受G4调控的癌基因表达, 并结合*c-Myc*启动子G4-Pu27, 抑制核蛋白中的G4结 合蛋白或者G4解旋酶与其结合。这些结果提示, 槲 皮素可能通过G4配体的作用方式, 促进G4结构形 成, 并抑制G4解旋酶对其解旋, 从而引起受G4调控 的癌基因表达下调, 最终抑制肿瘤细胞生长并诱导 细胞凋亡。

细胞增殖检测显示, 槲皮素能够显著抑制Hep-2 和MCF-7细胞的生长,并存在浓度依赖性。Badziul 等^[29]也报道了槲皮素显著抑制喉癌细胞Hep-2生长, 与欧前胡素联用效果更佳明显。Aghapour等^[30]也发 现,槲皮素抑制MCF-7细胞的生长。Nguyen等[31]还 报道, 槲皮素通过调控Foxo3a抑制三阴性乳腺癌细 胞MDA-MB-231的生长。Hashemzaei等^[32]报道, 槲皮 素在体内显著抑制MCF-7和CT-26细胞移植瘤的生 长。此外, Zhu等^[33]报道, 槲皮素抑制肺癌细胞A549 和H1975的增殖,并在体内抑制A549移植瘤的生长。 Yang等[34]报道, 槲皮素通过抑制血管生成而抑制前列 腺癌细胞PC-3以及PC-3移植瘤的生长。Shen等^[35]发 现, 槲皮素还通过影响PI3K/Akt信号通路抑制胃癌干 细胞的生长。这些研究表明, 槲皮素能够在体内外抑 制多种类型癌细胞的生长,提示槲皮素具有良好的抗 癌活性,抑制癌细胞生长可能是槲皮素发挥抗癌活 性的主要方式,而槲皮素抑制癌细胞生长既与其抑 制激酶活性从而影响细胞增殖调控相关信号通路有 关,也与其稳定G4结构抑制癌基因表达有关。

流式细胞仪检测发现, 槲皮素诱导Hep-2和MCF-7 细胞周期停滞在S期。Carrasco-Torres等[36]报道, 槲 皮素单独处理诱导肝癌细胞HuH7和HepG2停滞在 G₁期,而与马来酸酐衍生物联用则将细胞阻滞在S 期。Nguyen等[31]发现, 经槲皮素处理的乳腺癌MDA-MB-231细胞S期细胞比例增加了3倍,而G₁期则减少 了30%,也证明槲皮素主要将细胞阻滞在S期。Srivastava等[37]报道, 槲皮素处理导致白血病细胞Nalm6 的细胞周期停滞在S期。槲皮素将细胞周期阻滞在S 期可能与其G4配体活性相关。在S期DNA复制过程 中, DNA双链解旋为单链, G4形成序列有机会形成 G4结构。而G4结构具有很强的稳定性, 槲皮素的结 合进一步稳定G4结构,使得DNA复制复合物中的解 旋酶不能正常解旋G4,引起DNA复制停滞,从而导 致细胞分裂停滞在S期。也有研究发现, 槲皮素将癌 细胞阻滞在G₀/G₁期^[38]或者G₂/M期^[39],这可能与细胞 类型和状态,以及槲皮素影响周期调控蛋白表达等 有关。

细胞凋亡检测发现, 槲皮素处理导致Hep-2和 MCF-7细胞出现磷脂酰丝氨酸外翻、细胞膜通透性 增加、染色质凝集、caspase3活化等典型细胞凋亡 特征, 证明槲皮素诱导Hep-2和MCF-7细胞凋亡。研

究报道,槲皮素能够诱导多种癌细胞凋亡。Kim等^[40] 发现, 槲皮素通过抑制丝裂原活化蛋白激酶MAPKs 和TRPM7通路诱导胃癌细胞AGS凋亡。Liu等[4]发 现, 槲皮素处理前列腺癌细胞PC-3引起促调亡蛋白 Bax和caspase-3、caspase-8和caspase-9活化,表明槲 皮素通过线粒体信号通路诱导前列腺癌细胞PC-3周 亡。槲皮素通过p38^{MAPK}通路抑制Twist的表达,进 而调控p16和p21诱导乳腺癌细胞MCF-7调亡^[42]。 Jung等^[43]报道, 槲皮素促进死亡受体DR5表达增强 TRAIL引起的细胞凋亡。这些研究表明, 槲皮素能 够通过多种途径激活死亡受体通路或者线粒体信 号通路诱导癌细胞凋亡,诱导癌细胞凋亡是槲皮素 发挥抗癌作用的重要途径。对于槲皮素诱导癌细 胞凋亡的机制,除了与其作为激酶抑制剂影响多条 参与细胞生长调控相关的重要信号通路有关,如 PI3K/Akt/mTOR等通路,还与其结合G4核酸有关。 在细胞复制或转录过程中, 槲皮素结合并稳定核 酸G4结构,引起DNA复制断裂或者损伤,激活p53、 ATM/ATR等信号通路启动细胞凋亡程序引起细胞 死亡[37]。

报告基因检测发现, 槲皮素显著抑制c-Mvc启 动子调控的荧光素酶报告基因表达,而对G4形成序 列Pu27突变的c-Myc启动子调控的荧光素酶报告基 因表达失去抑制作用,说明槲皮素可能通过G4调控 基因表达。利用实时定量PCR和免疫印迹检测发 现, 槲皮素显著抑制受G4调控癌基因c-Myc、KRAS 和YYI的内源性表达。Tawani等[44]比较了9种代表性 黄酮类化合物与c-Myc启动子G4-Pu24T的相互作用, 发现槲皮素与Pu24T相互结合的亲和力最高。细胞 检测发现, 槲皮素下调c-Mvc基因表达并诱导细胞 凋亡。Tawani等^[44-45]还发现, 槲皮素与c-Myc启动子 G4-Pu24T和人端粒序列G4-TEL7直接结合。这些研 究结果表明, 槲皮素通过诱导G4结构形成或稳定G4 抑制癌基因表达发挥抗肿瘤作用。研究报道,多种 G4配体如喹唑啉衍生物QPB-15e^[46]、口服防腐剂洗 必泰[47]、萘四羧酸二酰亚胺[48]等分别抑制受G4调控 基因c-Myc、KRAS和Bcl-2的表达,并表现出抗肿瘤 活性。这些研究说明, 通过诱导G4结构形成或稳定 G4抑制癌基因表达可能是G4配体的普遍抗癌作用 机制。

EMSA电泳结果显示, 槲皮素与Pu27直接结合, 并且结合条带随槲皮素浓度升高而增强, 提示槲皮

素通过结合并稳定G4抑制癌基因表达发挥抗癌作 用。槲皮素与G4的结合可能与其平面化学结构有 关。槲皮素的化学结构是中央三碳链连接两个苯环 形成C6-C3-C6基本碳骨架,外围3、5、7、3'和4'位 含有5个羟基,相互形成分子内氢键,形成平面结构。 Sun等^[16]发现, 槲皮素通过嵌入并与G4末端四联体 堆积的方式与G4单体结合;通过沟槽结合与二联体 G4结合。Tawani等^[44]通过对槲皮素与G4-Pu24T复 合物的结构解析,发现槲皮素堆叠在G4-Pu24T的5' 和3'G-四联体两侧, 通过π-π堆积作用稳定Pu24T的 G4结构。槲皮素也通过π-π堆积嵌入人端粒G4序列 TEL7所形成的分子间G4的T1pT2和G6pT7位^[45]。这 些研究提示, 槲皮素主要以2个槲皮素分子堆叠在3 个平行四联体两侧的"三明治"的形式与G4结合。此 外, 槲皮素通过螯合二价或三价金属离子形成金属 络合物,形成复杂的平面结构,更加适宜嵌入G4或 与G4堆叠,并表现出比槲皮单体更好的抗氧化和抗 肿瘤活性^[49]。此外, EMSA结果显示, 槲皮素能够抑 制核蛋白与G4-Pu27结合。G4具有很强的稳定性, 会阻碍DNA复制和RNA转录等核酸代谢过程。细 胞中存在许多G4结合蛋白能够稳定或者解旋G4以 适应DNA复制和修复、RNA转录和翻译、端粒结 构稳定等重要生理活动。我们之前报道, G4解旋酶 G4R1能够通过解旋G4调控YYI基因的转录表达^[27]。 Li等^[50]报道, 解旋酶CHD2和CHD7能够解旋BAP1基 因启动子的G4结构,并调控BAPI的表达。因此,G4 结合蛋白对于受G4调控基因的表达也具有重要作 用。而我们发现, 槲皮素能够抑制核蛋白与G4结合, 但机制还不清楚,目前也没有相似的报道,推测可 能是由于槲皮素堆叠在G4两侧,导致G4结构更加紧 密,使得结合蛋白无法与G4侧面的沟槽结合。基因 表达检测和EMSA结果提示, 槲皮素可能通过结合 并稳定G4和阻止G4解旋酶结合和解旋2种方式抑制 受G4调控基因的表达。

总之,本研究证实,槲皮素通过结合G4抑制癌 基因表达发挥抗癌作用,也提示槲皮素是一个多靶 点药物,既靶向蛋白激酶调控多种信号通路,又直接 靶向G4核酸调控基因表达。目前槲皮素的抗癌活 性已经得到广泛研究,其在体内外对多种癌细胞具 有良好的杀伤抑制作用,对正常细胞几乎无害,有望 开发为新型抗肿瘤药物。但是槲皮素的临床应用还 面临一些障碍,主要是作用机制尚不清楚,此外槲皮 素具有不溶、生物利用度低、体内代谢降解快等特性^[51],因此,还需继续在槲皮素的作用机制、结构修饰、剂型开发等方面深入研究。

参考文献 (References)

- Sultana B, Anwar F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. Food Chem 2008; 108(3): 879-84.
- 2 Aguirre L, Arias N, Macarulla MT, Gracia A, Portillo MP. Beneficial effects of quercetin on obesity and diabetes. Open Nutraceuticals J 2011; 4(1): 189-98.
- 3 Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, *et al.* Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. Molecules 2017; 22(2): 209-21.
- 4 Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. Mol Nutr Food RES 2008; 52(5): 507-26.
- 5 Brito AF, Ribeiro M, Abrantes AM, Pires AS, Teixo RJ, Tralhão JG, *et al.* Quercetin in cancer treatment, along or in combination with conventional therapeutics? Curr Med Chem 2015; 22(26): 3025-39.
- 6 Boly R, Gras T, Lamkami T, Guissou P, Serteyn D, Kiss R, *et al.* Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. Int J Oncol 2011; 38(3): 833-42.
- 7 Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 2000; 351(Pt 1): 95-105.
- 8 Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, *et al.* Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. Mol Cell 2000; 6(4): 909-19.
- 9 Russo M, Milito A, Spagnuolo C, Carbone V, Rosén A, Minasi P, et al. CK2 and PI3K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia. Oncotarget 2017; 8(26): 42571-87.
- 10 Bruning A. Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. Anticancer Agents Med Chem 2013; 13(7): 1025-31.
- 11 Zhang C, Wang R, Zhang G, Gong D. Mechanistic insights into the inhibition of quercetin on xanthine oxidase. Int J Biol Macromol 2018; 112: 405-12.
- 12 Pratheeshkumar P, Budhraja A, Son YO, Wang X, Zhang Z, Ding S, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR-2 regulated AKT/mTOR/ P70S6K signaling pathways. PLoS One 2012; 7(10): e47516.
- 13 Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouskova B, Ulrichova J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. Phytother Res 2012; 26(11): 1746-52.
- 14 Primikyri A, Sayyad N, Quilici G, Vrettos EI, Lim K, Chi SW, et al. Probing the interaction of a quercetin bioconjugate with Bcl-2 in living human cancer cells with in-cell NMR spectroscopy. FEBS Lett 2018; 592(20): 3367-79.
- 15 Carvalho D, Paulino M, Polticelli F, Arredondo F, Williams RJ, Abin-Carriquiry JA. Structural evidence of quercetin multi-target

bioactivity: a reverse virtual screening strategy. Eur J Pharm Sci 2017; 106: 393-403.

- Sun H, Tang Y, Xiang J, Xu G, Zhang Y, Zhang H, et al. Spectroscopic studies of the interaction between quercetin and G-quadruplex DNA. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16(13): 3586-9.
- 17 Kwok CK, Merrick CJ. G-quadruplexes: prediction, characterization, and biological application. Trends Biotechnol 2017; 35(10): 997-1013.
- 18 Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2002; 1: 383-93.
- 19 Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(18): 11593-8.
- 20 Dai J, Dexheimer TS, Chen D, Carver M, Ambrus A, Jones RA, et al. An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/ antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. J Am Chem Soc 2006; 128(4): 1096-8.
- 21 Cogoi S, Xodo LE. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. Nucleic Acids Res 2006; 34(9): 2536-49.
- 22 Palumbo SL, Ebbinghaus SW, Hurley LH. Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by Gquadruplex-interactive ligands. J Am Chem Soc 2009; 131: 10878-91.
- 23 Rodriguez R, Miller KM, Forment JV, Bradshaw CR, Nikan M, Britton S, *et al.* Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. Nat Chem Biol 2012; 8(3): 301-10.
- 24 Gauthier LR, Granotier C, Hoffschir F, Etienne O, Ayouaz A, Desmaze C, *et al.* Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. Cell Mol Life Sci 2012; 69(4): 629-40.
- 25 Sun D, Guo K, Rusche JJ, Hurley LH. Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents. Nucleic Acids Res 2005; 33(18): 6070-80.
- 26 Xu Y, Sugiyama H. Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb). Nucleic Acids Res 2006; 34(3): 949-54.
- 27 Huang W, Smaldino PJ, Zhang Q, Miller LD, Cao P, Stadelman K, et al. Yin Yang 1 contains G-quadruplex structures in its promoter and 5'-UTR and its expression is modulated by G4 resolvase 1. Nucleic Acids Res 2012; 40(3): 1033-49.
- 28 Brázda V, Hároníková L, Liao JC, Fojta M. DNA and RNA quadruplex-binding proteins. Int J Mol Sci 2014; 15(10): 17493-517.
- 29 Bądziul D, Jakubowicz-Gil J, Paduch R, Głowniak K, Gawron A. Combined treatment with quercetin and imperatorin as a potent strategy for killing HeLa and Hep-2 cells. Mol Cell Biochem 2014; 392(1/2): 213-27.
- 30 Aghapour F, Moghadamnia AA, Nicolini A, Kani SNM, Barari L, Morakabati P, et al. Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun 2018; 500(4): 860-5.

- 31 Nguyen LT, Lee YH, Sharma AR, Park JB, Jagga S, Sharma G, et al. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triplenegative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. Korean J Physiol Pharmacol 2017; 21(2): 205-13.
- 32 Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, *et al.* Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo*. Oncol Rep 2017; 38(2): 819-28.
- 33 Zhu XY, Ma PJ, Peng D, Wang Y, Wang DJ, Chen XZ, et al. Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B kinase. Cancer Med 2016; 5(11): 3156-65.
- 34 Yang F, Jiang X, Song L, Wang H, Mei Z, Xu Z, et al. Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth *in vitro* and *in vivo*. Oncol Rep 2016; 35(3): 1602-10.
- 35 Shen X, Si Y, Wang Z, Wang J, Guo Y, Zhang X. Quercetin inhibits the growth of human gastric cancer stem cells by inducing mitochondrial-dependent apoptosis through the inhibition of PI3K/ Akt signaling. Int J Mol Med 2016; 38(2): 619-26.
- 36 Carrasco-Torres G, Baltiérrez-Hoyos R, Andrade-Jorge E, Villa-Treviño S, Trujillo-Ferrara JG, Vásquez-Garzón VR. Cytotoxicity, oxidative stress, cell cycle arrest, and mitochondrial apoptosis after combined treatment of hepatocarcinoma cells with maleic anhydride derivatives and quercetin. Oxid Med Cell Longev 2017; 2017: 2734976.
- 37 Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, *et al.* Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. Sci Rep 2016; 6: 24049.
- 38 Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. J Cell Biochem 2009; 106(1): 73-82.
- 39 Yeh SL, Yeh CL, Chan ST, Chuang CH. Plasma rich in quercetin metabolites induces G₂/M arrest by upregulating PPAR-γ expression in human A549 lung cancer cells. Planta Med 2011; 77(10): 992-8.
- 40 Kim MC, Lee HJ, Lim B, Ha KT, Kim SY, So I, et al. Quercetin induces apoptosis by inhibiting MAPKs and TRPM7 channels in AGS cells. Int J Mol Med 2014; 33(6): 1657-63.
- 41 Liu KC, Yen CY, Wu RS, Yang JS, Lu HF, Lu KW, *et al.* The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of human prostate cancer PC-3 cells. Environ Toxicol 2014; 29(4): 428-39.
- 42 Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. PLoS One 2015; 10(10): e0141370.
- 43 Jung YH, Heo J, Lee YJ, Kwon TK, Kim YH. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5. Life Sciences 2010; 86: 351-7.
- 44 Tawani A, Mishra SK, Kumar A. Structural insight for the recognition of G-quadruplex structure at human c-myc promoter sequence by flavonoid quercetin. Sci Rep 2017; 7(1): 3600.
- 45 Tawani A, Kumar A. Structural insight into the interaction of flavonoids with human telomeric sequence. Sci Rep 2015; 5: 17574.
- 46 Li Z, Liu C, Huang C, Meng X, Zhang L, He J, *et al.* Quinazoline derivative QPB-15e stabilizes the c-myc promoter G-quadruplex and inhibits tumor growth *in vivo*. Oncotarget 2016; 7(23): 34266-76.

- 47 Calabrese DR, Zlotkowski K, Alden S, Hewitt WM, Connelly CM, Wilson RM, *et al.* Characterization of clinically used oral antiseptics as quadruplex-binding ligands. Nucleic Acids Res 2018; 46(6): 2722-32.
- 48 Gunaratnam M, Collie GW, Reszka AP, Todd AK, Parkinson GN, Neidle S. A naphthalene diimide G-quadruplex ligand inhibits cell growth and down-regulates BCL-2 expression in an imatinibresistant gastrointestinal cancer cell line. Bioorg Med Chem 2018; 26(11): 2958-64.
- 49 Dolatabadi JE. Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA. Int J Biol Macromol 2011; 48(2): 227-33.
- 50 Li Y, Zhang X, Gao Y, Shi J, Tang L, Sui G. G-quadruplexes in the BAP1 promoter positively regulate its expression. Exp Cell Res 2018; 369(1): 147-57.
- 51 Massi A, Bortolini O, Ragno D, Bernardi T, Sacchetti G, Tacchini M, et al. Research progress in the modification of quercetin leading to anticancer agents. Molecules 2017; 22(8): pii: E1270.