

槲皮素介导miR-21/PTEN信号轴抑制乳腺癌细胞 ABCC2表达改善药物吸收的研究

蔡轶伦¹ 林乐颖¹ 杨旺¹ 黄依翎¹ 付文涛¹ 陈雅雯¹ 雷辰霞¹ 祝珊珊^{1,2*}

(¹厦门医学院药学院, 厦门 361026; ²厦门医学院生物酶催化与药物合成创新中心, 厦门 361026)

摘要 该文探讨了槲皮素(querctetin, Que)靶向miR-21/PTEN信号调节乳腺癌细胞增殖、凋亡以及抑制ABCC2表达改善药物吸收的影响。将乳腺癌MCF-7细胞分为4个大组: miR-21转染组、Que加药处理组、miR-21联合Que处理组、sh-PTEN转染组。采用CCK-8法检测细胞增殖活性; Western blot法检测PTEN、AKT、p-AKT、ABCC2、E-cadherin和vimentin的表达水平; qRT-PCR检测ABCC2、PTEN、E-cadherin和vimentin的mRNA表达水平; 免疫荧光检测E-cadherin和vimentin表达水平; 流式细胞术检测细胞凋亡和罗丹明123的吸收情况。结果显示: (1) 与NC组相比, miR-21组MCF-7细胞活性显著增强($P<0.01$), PTEN和E-cadherin的表达水平下降, p-AKT、vimentin以及ABCC2的表达水平显著上升($P<0.01$), 细胞迁移能力增强; (2) 与Control组相比, Que抑制miR-21的表达, 可逆转miR-21诱导的PTEN、E-cadherin下调表达和ABCC2、vimentin的上调表达, 促进细胞凋亡, 抑制细胞迁移; Que能改善miR-21对罗丹明123的吸收抑制作用, 增强阿霉素对MCF-7的细胞毒性, Que对ABCC2的表达调控与激活PTEN的表达有关。该研究发现Que介导miR-21/PTEN信号促进乳腺癌MCF-7细胞凋亡, 抑制细胞迁移和耐药, 促进药物吸收。

关键词 槲皮素; miR-21; PTEN; 乳腺癌细胞MCF-7; ABCC2; 罗丹明123

Quercetin Mediated miR-21/PTEN Signal Axis Inhibits the Expression of ABCC2 in Breast Cancer Cells and Improves Drug Absorption

CAI Yilun¹, LIN Leying¹, YANG Wang¹, HUANG Yiling¹, FU Wentao¹,

CHEN Yawen¹, LEI Chenxia¹, ZHU Shanshan^{1,2*}

(¹School of Pharmacy, Xiamen Medical University, Xiamen 361026, China;

²Xiamen Medical College Innovation Center for Enzyme Catalysis and Drug Synthesis, Xiamen 361026, China)

Abstract This study investigated the effects of Que (quercetin) on regulating breast cancer cell proliferation and apoptosis by targeting the miR-21/PTEN signaling pathway, as well as its role in inhibiting ABCC2 expression to improve drug uptake. MCF-7 breast cancer cells were divided into four main groups: miR-21 transfection group, Que treatment group, miR-21 combined with Que treatment group, and sh-PTEN transfected group. Cell proliferation activity was assessed using the CCK-8 assay. Western blot was performed to detect the expression levels of PTEN, AKT, p-AKT, ABCC2, E-cadherin, and vimentin. mRNA expression levels of ABCC2, PTEN, E-cadherin,

收稿日期: 2025-09-23 接受日期: 2026-01-08

福建省自然科学基金(批准号: 2024J011398, 2024Y9712)、厦门市卫生指导性项目(批准号: 3502Z20244ZD1139)、厦门医学院大学生创新创业项目(批准号: 202512631064、202512631044、202512631046、202512631072)资助的课题

*通信作者。Tel: 0592-5984852, E-mail: yeshan2005xy@c163.com

Received: September 23, 2025 Accepted: January 8, 2026

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2024J011398, 2024Y9712), the Xiamen Health Guidance Project (Grant No.3502Z20244ZD1139), and the Innovation and Entrepreneurship Program for College Students of Xiamen Medical University (Grant No.202512631064, 202512631044, 202512631046, 202512631072)

*Corresponding author. Tel: +86-592-5984852, E-mail: yeshan2005xy@c163.com

and *vimentin* were measured by qRT-PCR. Immunofluorescence was used to examine the expression of E-cadherin and vimentin. Cell apoptosis and rhodamine 123 uptake were analyzed by flow cytometry. The results showed that: (1) compared with the NC group, the miR-21 group exhibited significantly enhanced MCF-7 cell viability ($P < 0.01$), decreased expression levels of PTEN and E-cadherin, and significantly increased levels of p-AKT, vimentin, and ABCC2 ($P < 0.01$), along with enhanced cell migration; (2) compared with the control group, Que inhibited miR-21 expression, reversed the miR-21-mediated downregulation of PTEN and E-cadherin and upregulation of ABCC2 and vimentin, promoted apoptosis, and suppressed cell migration; furthermore, Que attenuated the inhibitory effect of miR-21 on rhodamine 123 uptake and enhanced the cytotoxicity of doxorubicin against MCF-7 cells; the regulatory effect of Que on ABCC2 expression was associated with the activation of PTEN expression. This study reveals that Que mediates the miR-21/PTEN signaling pathway to promote apoptosis, attenuate cell migration and drug resistance, and improve drug uptake in breast cancer MCF-7 cells.

Keywords quercetin; miR-21; PTEN; breast cancer cell MCF-7; ABCC2; rhodamine 123

乳腺癌仍然是一个威胁全球女性健康的主要疾病,其复杂的发病机制和多样的临床表现给有效治疗和预防带来了重大障碍^[1]。虽然目前对乳腺癌的认识和治疗水平有所提高,但由于缺乏有效的治疗方案,乳腺癌死亡率仍占女性死亡总数的15%左右,约九成乳腺癌患者死亡归因于肿瘤转移及其并发症^[2-3]。研究发现,手术联合药物治疗对于乳腺癌的复发和转移有一定的疗效,但是耐药性及频繁肿瘤转移的发生仍然是乳腺癌治疗的主要挑战^[4]。

槲皮素(quercetin, Que)是一种黄酮类化合物,具有显著的抗氧化、抗病毒、抗肿瘤和抗炎特性。前期研究显示,Que能激活抑癌基因PTEN表达并诱导乳腺癌细胞凋亡、抑制PI3K/AKT和JNK信号通路^[5]。这些信号通路相关蛋白的异常缺失或激活与肿瘤细胞耐药关键因子ABC-转运蛋白的表达息息相关,其中,ATP结合盒转运蛋白C亚家族[ATP-binding cassette (ABC) transporters C, ABCC]具有将药物泵出体内的功能,它的高表达会导致药物外排作用增加^[6]。Que可调控ABCC2的上游信号通路PTEN和PI3K/AKT,而对ABCC2的调控作用目前研究仍不清晰。

多项研究显示,微小RNA(microRNA, miRNA)能通过与靶基因的mRNA 3'端非翻译区完全或部分的匹配结合,促使靶基因降解或者抑制其翻译过程^[7]。已有研究表明,miR-21在肝癌细胞中对PTEN基因表达具有显著调节作用^[8]。PTEN正是miRNA-21的靶基因之一,研究发现miR-21在肿瘤中能调控PTEN的基因和蛋白表达。本研究将结合前期研究结果,探索Que是否调控miR-21/PTEN信号通路参与乳腺癌MCF-7细胞的增殖凋亡、转移及耐药

蛋白的表达和药物吸收,探讨Que改善乳腺癌细胞耐药转移和药物吸收作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

本研究所用细胞乳腺癌MCF-7来自本实验室冻存,经过生工生物工程(上海)股份有限公司STR序列检测无误。

1.2 实验材料

细胞培养所用的培养基高糖DMEM和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自江苏美伦生物科技有限公司;青霉素/链霉素、CCK-8细胞增殖检测试剂购自北京兰博立德生物有限公司;槲皮素(quercetin)、罗丹明123(rhodamine 123, Rdm123)、阿霉素(doxorubicin)和维拉帕米(verapamil, 使用时用DMSO将其溶解成100 mmol/L母液)购自MCE公司;PTEN基因敲除质粒LV-GFP-PTEN1156(sh-PTEN1)、LV-GFP-PTEN1361(sh-PTEN2)及对照组质粒LV-GFP,以及miR-21-NC、miR-21、miR-21-inhibitor根据序列信息由上海吉玛生物工程有限公司合成。实验所用一抗:ABCC2(#4446)(美国CST公司)、 β -actin(66009-1-Ig)、上皮钙黏素(E-cadherin)(20874-1-AP)、丝氨酸/苏氨酸激酶B(AKT)(10176-2-AP)、Phospho-AKT(Ser473)(66444-1-Ig)(Proteintech公司)、第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源蛋白(PTEN)(ab267787)、波形蛋白(vimentin)(ab92547)抗体(英国Abcam公司)。实验所用二抗:HRP-Goat anti Rabbit/mouse(美国Proteintech公司)。荧光二抗:山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor® 488)(ab150077)和山

羊抗小鼠 IgG H&L(Alexa Fluor® 594)(ab150116)(英国 Abcam 公司)。凋亡试剂购自上海碧云天生物科技有限公司。miR-21 表达检测试剂购自美国 ThermoFisher Scientific 公司。

1.3 主要仪器

荧光倒置显微镜 DMi8 以及激光共聚焦显微镜 SP8 购自德国 Leica 公司; 多功能酶标仪 Pro1000 购自瑞士 Tecan 公司; 荧光定量 PCR 仪器 light96 购自瑞士 Roche 公司; 化学发光成像仪 Touch ImagerS 购自易亨特生命科学(上海)有限公司; 流式细胞仪 FC500 购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.4 细胞培养

人乳腺癌 MCF-7 细胞复苏后用高糖 DMEM(含 10% 胎牛血清以及 1% 青/链霉素), 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内培养。

1.5 细胞转染及实验分组

将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于 6 cm 细胞皿, 培养 24 h, 按照上海碧云天生物科技有限公司 Lipo8000™ 转染试剂说明书方法, 按以下分组进行实验(miR-21-5P 以及抑制剂和阴性对照的序列详见表 1):

- (1) miR-21 转染分组: ① NC 组; ② miR-21 组; ③ miR-21 inhibitor 组; 转染时间 48 h;
- (2) Que 加药实验分组: ① 未加药(Control) 组; ② 60 μmol/L Que 处理(Que) 组, 处理 24 h;
- (3) Que 联合 miR-21 处理组: ① NC 组; ② miR-21 组; ③ 60 μmol/L Que 处理(Que) 组; ④ 60 μmol/L Que+miR-21(Que+miR-21) 组;
- (4) sh-PTEN 转染组: ① LV-GFP(Ctrl); ② sh-PTEN1; ③ sh-PTEN2; ④ Que+sh-PTEN1; ⑤ Que+sh-PTEN2。

1.6 CCK-8 法检测细胞活性

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 37 °C 胰酶消化 5 min 后, 按照每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板(每组设置 3 个复孔), 进行细胞转染, 将转染 0 h 设为对

照, 按照 CCK-8 试剂盒说明书, 按照转染 miR-21 后 24 h、48 h、72 h、96 h, 或 Que(0、30、60、90、120 μmol/L) 处理及 doxorubicin(0、1、2、4、6、8 μmol/L), 或 60 μmol/L Que 联合 doxorubicin(0、1、2、4、6、8 μmol/L) 加药 24 h 后, 加入 10 μL CCK-8 溶液, 将其放置酶标仪上并检测其细胞活性。细胞活力 = $[(D_{\text{实验组}} - D_{\text{无细胞对照}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{无细胞对照}})] \times 100\%$ 。

1.7 细胞 RNA 提取以及 qRT-PCR 检测基因表达

MCF-7 细胞消化 (37 °C、5 min) 后传代至 6 cm 细胞皿, 根据实验分组处理完成后, 利用 Trizol 试剂提取细胞内的总 RNA, 并按照反转录试剂盒说明书步骤将其反转成 cDNA, 进行 qRT-PCR 实验, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组目的 mRNA 相对表达量。其中, miRNA-21 表达按照 ThermoFisher Scientific 公司的 Taqman microRNA 试剂说明书进行实验处理和检测。其他引物均委托上海生工生物工程股份有限公司合成, 具体引物序列见表 2。

1.8 Western blot

将 MCF-7 细胞根据实验分组处理后, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入 RIPA 裂解液于冰上裂解后超声破碎细胞提取蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 按照每孔 30 μg 蛋白量上样于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 转膜, 分别加入 ABCC2(1:3 000)、PTEN(1:5 000)、E-cadherin(1:3 000)、vimentin(1:5 000)、AKT(1:1 000)、p-AKT(1:1 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后, 加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, 加入 ECL 显影液显影, 使用 BioAnaly 软件分析条带灰度值。

1.9 免疫荧光实验

待 MCF-7 细胞长满后, 将其传代至 3.5 cm 共聚焦玻璃皿, 根据实验分组处理后, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 10 mmol/L 甘氨酸通透 5 min, 2% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 加入 E-cadherin 和 vimentin 一抗 (1:300) 于 4 °C 孵育过夜。后用 PBS 洗涤 3 次 (5 min/次), 加入荧光二抗 (1:500), 室温孵育 1 h, 最后加入含 DAPI 的防荧光淬灭剂孵育 15 min (室温)。

表 1 miR-21 及其抑制剂序列

Table 1 The sequences of miR-21 and the inhibitor

miRNA 和小干扰 RNA miRNA and siRNA	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
miR-21	UCA AGU CAC UAG UGG UUC CGU UUA G
miR-21 inhibitor	UCA ACA UCA GUC UGA UAA GCU A
NC inhibitor	CAG UAC UUU UGU GUA GUA CAA

表2 引物序列

Table 2 The sequences of gene primer

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>GAPDH</i> sense	TGA CCA CAG TCC ATG CCA TCA C
<i>GAPDH</i> anti-sense	CGC CTG CTT CAC CAC CTT CTT
<i>E-cadherin</i> sense	CGA GTG CCA ACT GGA CCA TTC A
<i>E-cadherin</i> anti-sense	TCC TCT TCT CCG CCT CCT TCT T
<i>Vimentin</i> sense	CGA CGC CAT CAA CAC CGA GTT
<i>Vimentin</i> anti-sense	TGC CAG AGA CGC ATT GTC AAC A
<i>PTEN</i> sense	GCT GGA AAG GGA CGA ACT GGT G
<i>PTEN</i> anti-sense	ACA GGT AAC GGC TGA GGG AAC T
<i>ABCC2</i> sense	TCT TCT TCC TGA CGA CCA ACC A
<i>ABCC2</i> anti-sense	CAC ACT CTG ACC TGC TGC TAT G

在激光共聚焦显微镜(Leica, SP8)下采集图片。

1.10 流式细胞凋亡检测

待MCF-7细胞长满后,传代至6孔板。细胞根据实验分组处理后,用PBS洗涤,37 °C胰酶消化成单细胞悬液,随后,每组细胞分别加入FITC和PI染液,避光染色15 min,于流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.11 流式细胞术检测罗丹明123(Rdm123)细胞内吸收情况

待MCF-7细胞长满后,传代至6孔板。细胞根据实验分组转染处理,加药前用含钙离子的HBSS液(北京索莱宝生物科技有限公司)洗涤2次后,加入100 μmol/L Rdm123于37 °C细胞培养箱避光孵育10 min;其中100 μmol/L verapamil组在Rdm123染色前加入并37 °C孵育2 h。取出细胞后,仍用HBSS液洗涤3次,37 °C胰酶消化细胞5 min, PBS重悬细胞。流式细胞仪上机分析Rdm123在细胞内的荧光强度。

1.12 显微荧光法检测Rdm123荧光值

将MCF-7按照2.7实验方法加药处理后,取出细胞,将其置于荧光倒置显微镜(Leica, DMI8)成像。利用显微成像软件(Leica Application Suite X)分析各组荧光值。

1.13 Transwell实验

将MCF-7按照2.7实验方法加药处理后,在室温条件下取出细胞,用4%多聚甲醛染色20 min,再用0.01%结晶紫染色10 min。随后用磷酸盐缓冲液清洗,于倒置显微镜(Leica, DMI8)下拍照。根据各组迁移细胞计数并分析。

1.14 数据统计

本实验采用GraphPad Prism 6软件进行统计学

分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析。采用 t 检验法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验独立重复3次及以上。

2 结果

2.1 上调miR-21表达可促进MCF-7细胞活性

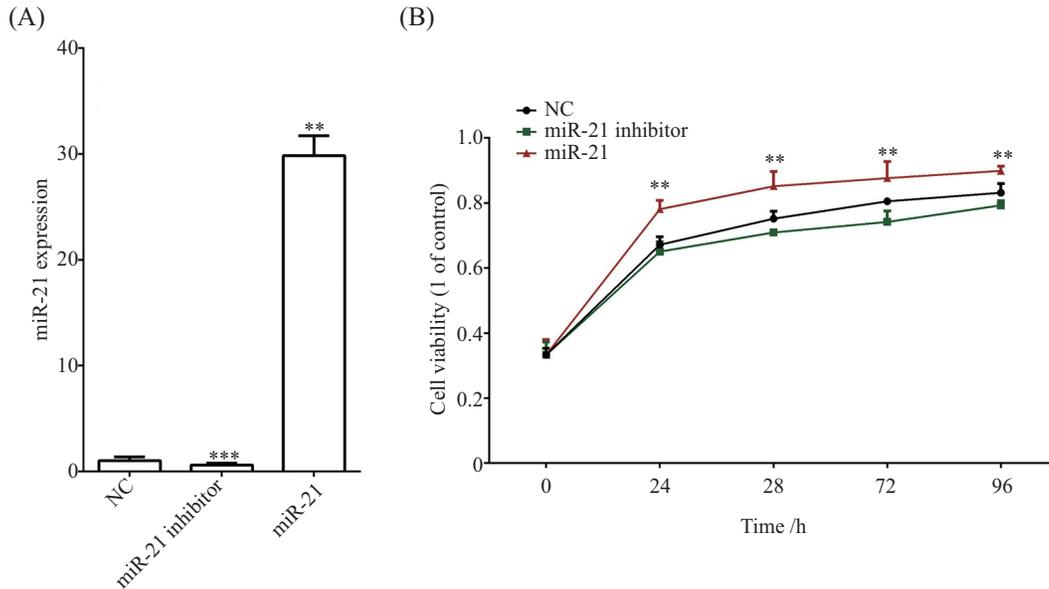
如图1A所示:与阴性对照NC组比较,miR-21过表达组显著提高miR-21在MCF-7细胞的表达水平($P < 0.01$),miR-21敲减组(miR-21 inhibitor组)显著降低miR-21的表达水平($P < 0.01$)。其中,随着时间推移,高表达miR-21的MCF-7细胞活性与阴性对照组相比明显增强($P < 0.01$),低表达miR-21的细胞活性减弱($P < 0.01$),如图1B所示。

2.2 miR-21表达对PTEN、p-AKT蛋白表达的影响

如图2所示:与对照组NC相比,miR-21过表达促进p-AKT蛋白表达($P < 0.01$),抑制PTEN的蛋白表达($P < 0.01$),miR-21敲减后降低p-AKT表达水平,促进PTEN的表达。

2.3 miR-21表达对肿瘤上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程标记蛋白表达的影响

如图3A~图3C所示:与对照组NC比较,miR-21过表达促进vimentin蛋白和mRNA表达($P < 0.01$),抑制E-cadherin的蛋白和基因表达($P < 0.01$)。免疫荧光结果如图3D显示:miR-21过表达后E-cadherin蛋白表达水平降低,vimentin蛋白表达水平升高,抑制miR-21表达能逆转上述现象。Transwell实验结果如图3E和图3F所示:miR-21表达可促进细胞迁移,相反,抑制miR-21的表达后,细胞迁移率则下降。

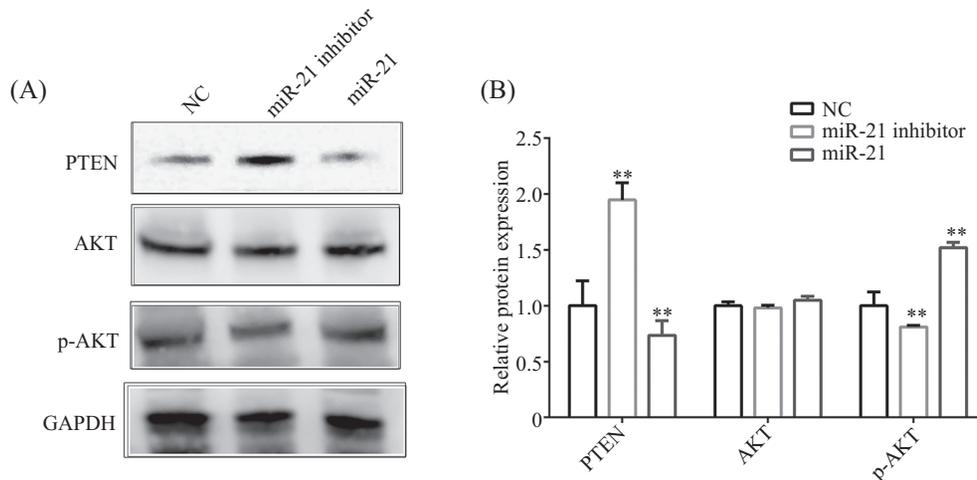


A: 转染 miR-21 后, qRT-PCR 检测 miR-21 在 MCF-7 细胞内的表达水平; B: miR-21 表达水平对 MCF-7 细胞活性的时间梯度作用。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 NC 组相比。

A: qRT-PCR was used to detect gene expression level of miR-21 in MCF-7 cells after transfection. B: the effect of miR-21 expression on MCF-7 cell viability. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC group.

图1 miR-21 表达促进 MCF-7 细胞增殖活性

Fig.1 Upregulate of miR-21 increases the proliferation of MCF-7 cells



A: Western blot 法检测 PTEN、AKT 及磷酸化 AKT (p-AKT) 蛋白的表达情况; B: 以 GAPDH 为内参的 PTEN、AKT 及 p-AKT 蛋白相对表达量。** $P < 0.01$, 与 NC 组比较。

A: Western blot was taken to detect PTEN, AKT and p-AKT protein expression; B: relative protein expression levels of PTEN, AKT and p-AKT with GAPDH as the internal reference. ** $P < 0.01$ compared with NC group.

图2 miR-21 表达对 PTEN、AKT 以及 p-AKT 蛋白表达的影响

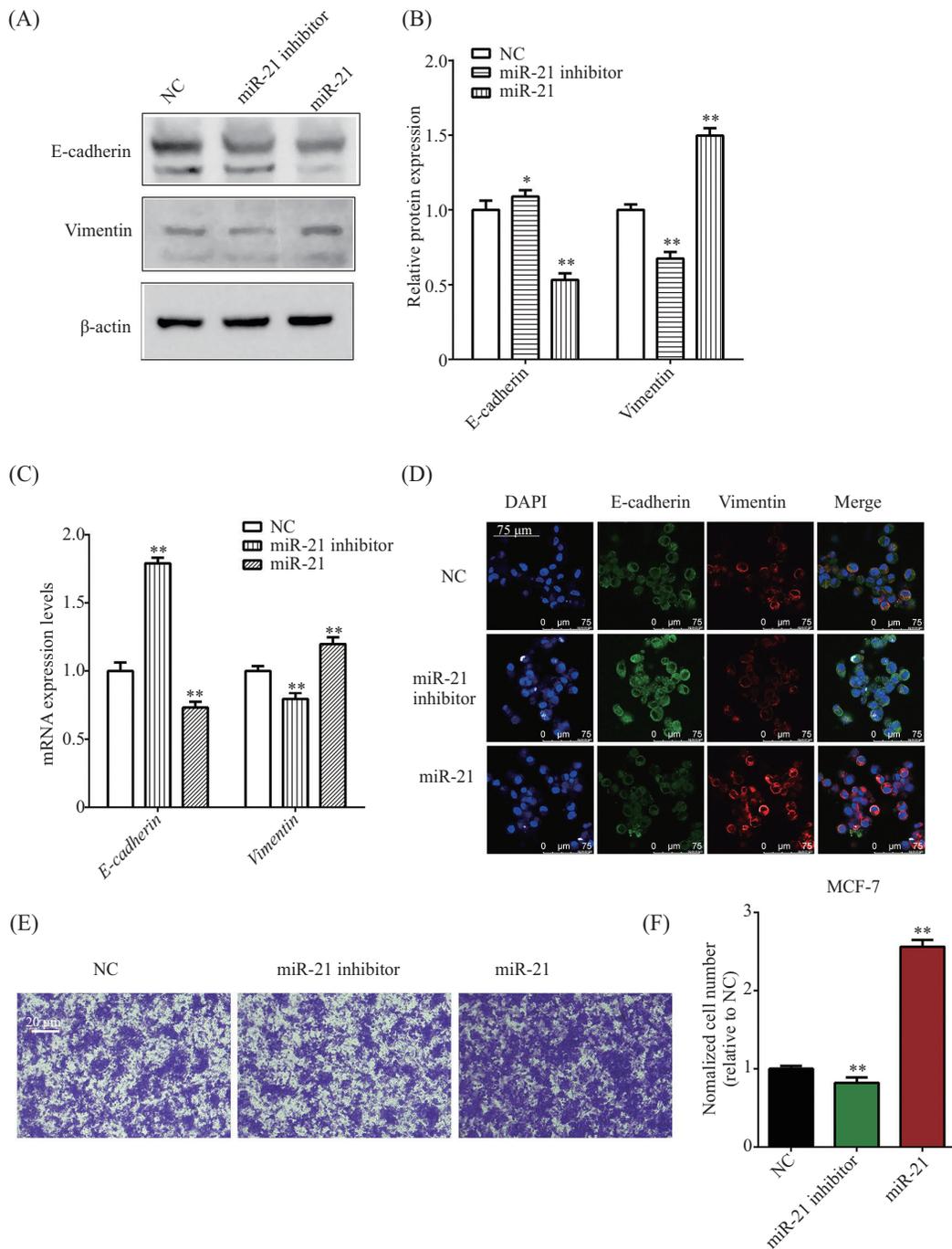
Fig.2 Effects of miR-21 on PTEN, AKT and p-AKT expression

2.4 miR-21 表达对 MCF-7 细胞内 ABCC2 表达的影响

结果如图 4A~图 4C 所示: 与对照 NC 组比较, miR-21 过表达促进 ABCC2 蛋白和 mRNA 表达 ($P < 0.01$), miR-21 敲减后抑制 ABCC2 的蛋白和基因表达。

2.5 Quercetin 对 miR-21 表达的影响

如图 5 所示: 与 Control 组相比, 随着不同浓度 Que 处理, MCF-7 细胞的 miR-21 表达水平呈梯度下降 ($P < 0.01$), 其中 $60 \mu\text{mol/L}$ Que 处理 MCF-7 细胞后 miR-21 表达水平降低了近一半。因此, 后续实验将采用 $60 \mu\text{mol/L}$ Que 处理细胞。



A: Western blot检测E-cadherin和vimentin的蛋白表达水平; B: 以 β -actin为内参, E-cadherin和vimentin的相对蛋白表达量; C: qRT-PCR分析E-cadherin和vimentin的mRNA水平; D: 免疫荧光实验检测E-cadherin和vimentin的表达水平; E: Transwell检测miR-21表达水平对MCF-7细胞迁移能力的影响; F: 相对细胞迁移数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC组相比。

A: Western blot was used to detect the protein expression of E-cadherin and vimentin; B: relative protein expression levels of E-cadherin and vimentin with β -actin as the internal reference; C: qRT-PCR was used to analysis the mRNA levels of E-cadherin and vimentin; D: immunofluorescence assay was used to detect the expression of E-cadherin and vimentin; E: Transwell assay was used to investigate the effect of miR-21 expression level on the migration; F: relative cell migration number. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with NC group.

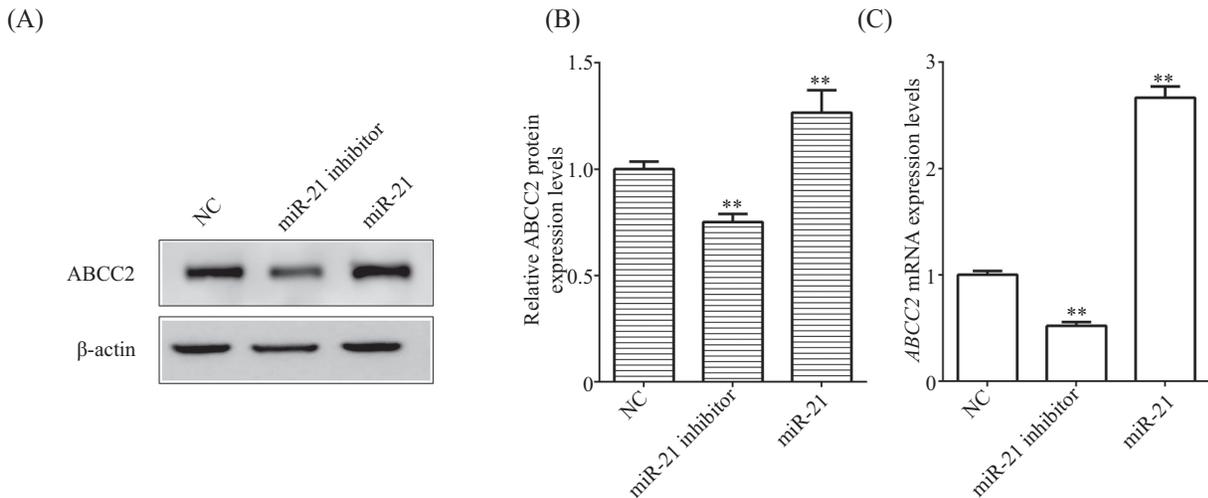
图3 miR-21过表达促进MCF-7细胞迁移

Fig.3 miR-21 promotes the migration of MCF-7 cells

2.6 Quercetin可逆转过表达miR-21诱导的MCF-7细胞凋亡和迁移

如图6A和图6B所示: 与NC组相比, miR-21

对MCF-7细胞凋亡无影响, Que组显著促进MCF-7细胞凋亡($P < 0.05$); 与miR-21组相比, miR-21+Que组显著促进MCF-7细胞的凋亡($P < 0.05$)。细胞迁

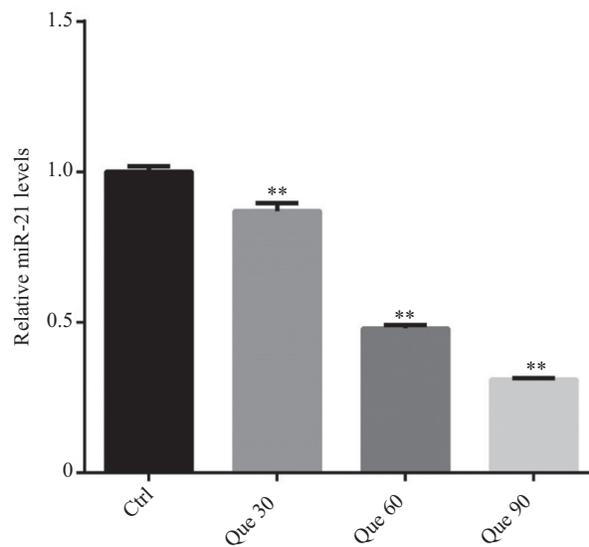


A: Western blot检测ABCC2蛋白表达水平; B: 以 β -actin为内参, ABCC2相对蛋白表达量; C: qRT-PCR检测ABCC2的mRNA水平。*** $P < 0.01$, 与NC组相比。

A: Western blot was used to detect ABCC2 expression; B: the relative protein expression of ABCC2 normalized to β -actin; C: qRT-PCR was used to detect mRNA levels of ABCC2. *** $P < 0.01$ compared with NC group.

图4 miR-21表达对ABCC2蛋白和基因表达的影响

Fig.4 Effects of miR-21 on ABCC2 expression in MCF-7 cells



Ctrl: 对照; Que 30: 30 mmol/L Que; Que 60: 60 mmol/L Que; Que 90: 90 mmol/L Que; *** $P < 0.01$, 与对照组相比。

Ctrl: Control; Que 30: 30 mmol/L Que; Que 60: 60 mmol/L Que; Que 90: 90 mmol/L Que; *** $P < 0.01$ compared with Control group.

图5 槲皮素对miR-21表达水平的影响

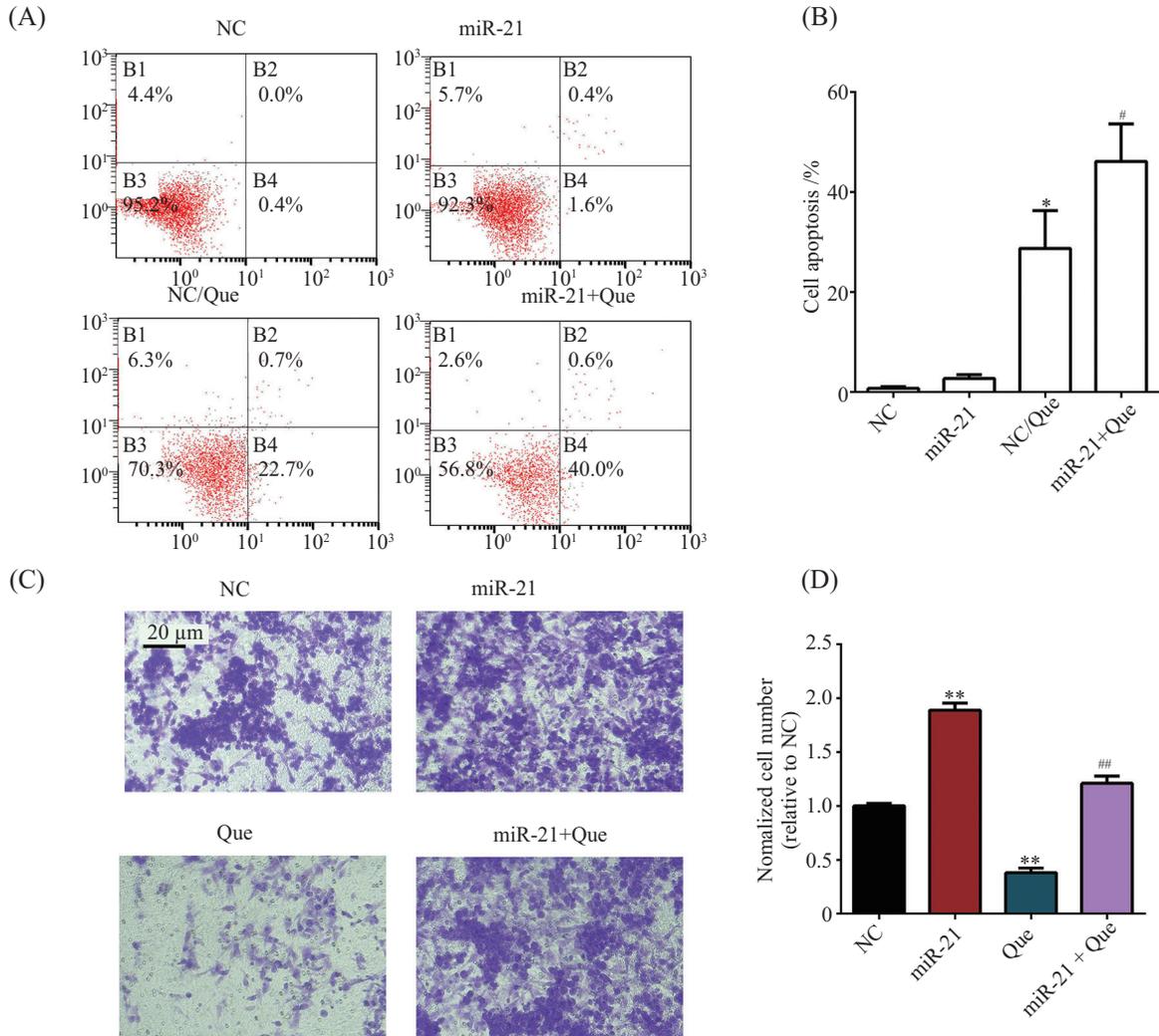
Fig.5 Effects of quercetin on the expression of miR-21

移如图6C和图6D所示: 与NC组相比, 单独Que处理显著抑制MCF-7细胞迁移($P < 0.01$); 与miR-21组相比, miR-21+Que组显著抑制MCF-7细胞迁移($P < 0.01$)。

2.7 Quercetin可逆转过表达miR-21引起的蛋白表达水平变化

结果(图7A~图7C)所示: 与miR-21组相比, Que+miR-21组的ABCC2蛋白表达水平显著下降

($P < 0.01$), PTEN蛋白表达水平显著上升($P < 0.01$); qRT-PCR结果与Western blot结果一致, Que处理后逆转miR-21过表达引起的PTEN和ABCC2基因水平变化。免疫荧光实验结果(图7D)显示: Que处理miR-21过表达的MCF-7细胞, 与miR-21组相比, vimentin蛋白表达荧光信号减弱, E-cadherin蛋白表达荧光信号增强, 说明Que处理miR-21过表达的MCF-7细胞后, 可逆转miR-21诱导MCF-7细胞内蛋白表达水平



A、B: 流式细胞术检测细胞凋亡情况; C、D: Transwell实验检测细胞迁移能力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与miR-21组相比。

A,B: flow cytometry was used to analysis the cell apoptosis and apoptosis rates; C,D: Transwell assay was used to investigate the cell migration. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with miR-21 group.

图6 槲皮素可逆转过表达miR-21诱导的MCF-7细胞凋亡

Fig.6 Quercetin reverses apoptosis induced by overexpression of miR-21 in MCF-7 cells

的变化。

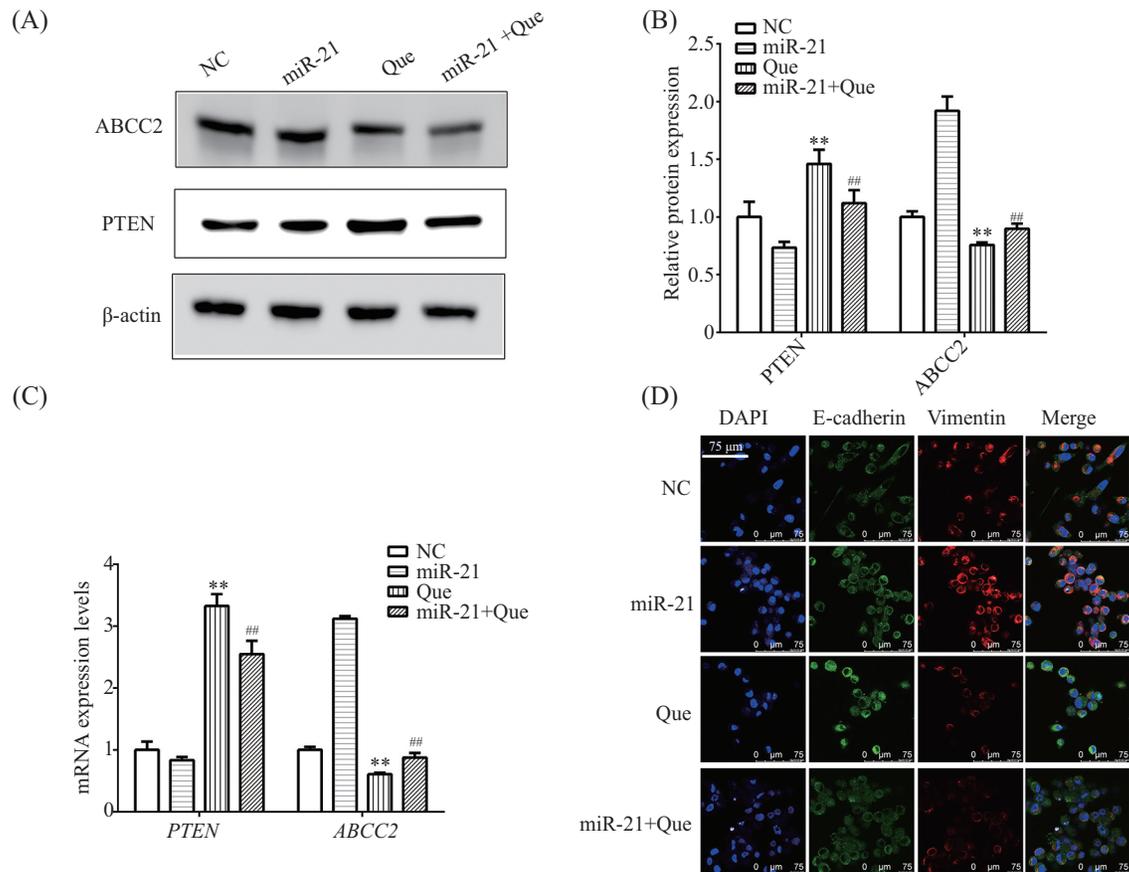
2.8 Quercetin可促进MCF-7细胞对药物的吸收作用

与NC组相比, 单独Que组能促进Rdm123的吸收; 与miR-21组相比, Que+miR-21组, Rdm123吸收量增加, 说明Que能逆转miR-21导致的药物吸收利用低的现象($P < 0.01$), 如图8A和图8B所示。此外, 采用Que与doxorubicin联合处理检测细胞活性, 结果如图8C所示, Que可增强doxorubicin在MCF-7细胞内的药物活性。荧光数据同流式细胞结果一致, 这表明miR-21促进ABCC2表达后提高细胞对药物的外排作用, 而采用Que处理后的细胞药物吸收能力增强

($P < 0.01$), 实验结果见图8D。

2.9 PTEN敲除对ABCC2表达的影响

在MCF-7细胞中敲低PTEN后, Western blot实验结果显示PTEN敲低后ABCC2的表达水平上升, 而Que与PTEN敲低共处理后ABCC2表达水平回归, 如图9A和图9B所示。qRT-PCR结果显示细胞内PTEN表达水平降低后, ABCC2基因表达水平升高, 同时E-cadherin基因表达水平下降, vimentin基因表达水平上升($P < 0.01$), Que与PTEN敲低共处理后, ABCC2的mRNA表达水平回归到原始水平, E-cadherin的mRNA表达水平升高, vimentin表达水平下降($P < 0.01$), 如图9B所示。



A: Western blot检测PTEN和ABCC2的蛋白表达水平; B: PTEN和ABCC2相对 β -actin的蛋白表达水平; C: qRT-PCR检测PTEN和ABCC2的mRNA表达水平; D: 免疫荧光法检测E-cadherin和vimentin的表达。** $P < 0.01$, 与NC组相比, # $P < 0.01$, 与miR-21组相比。

A: Western blot was used to detect PTEN and ABCC2 protein expression levels; B: protein expression levels of PTEN and ABCC2 relative to β -actin; C: qRT-PCR was used to detect PTEN and ABCC2 mRNA levels; D: immunofluorescence assay was used to detect the expression of E-cadherin and vimentin. ** $P < 0.01$ compared with NC group; # $P < 0.01$ compared with miR-21 group.

图7 槲皮素逆转过表达miR-21引起的细胞蛋白表达水平变化

Fig.7 Quercetin reverses apoptosis induced by overexpression of miR-21 in MCF-7 cells

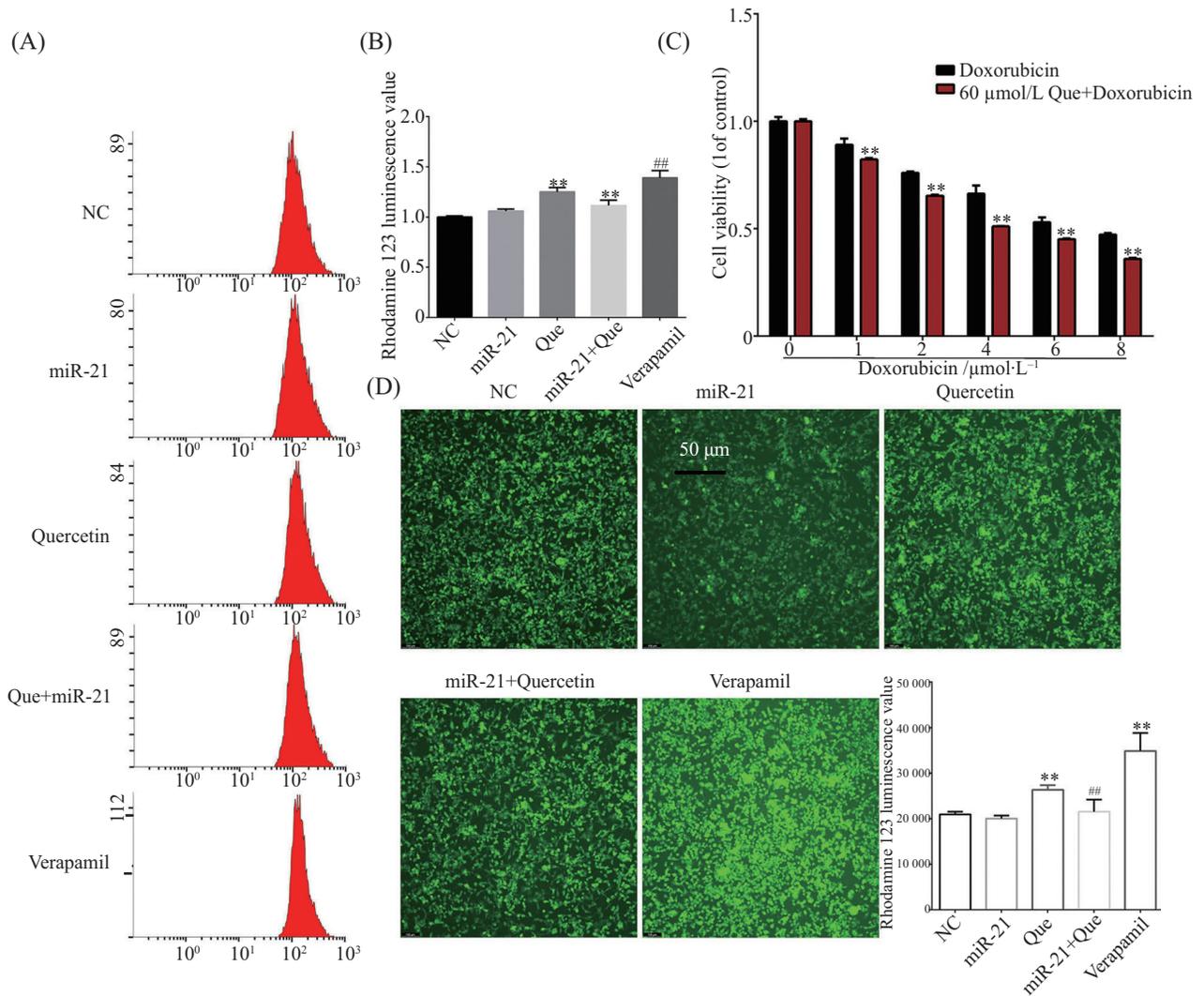
3 讨论

近年来,天然化合物槲皮素(Que)的抗肿瘤活性研究取得显著进展。作为植物来源的黄酮类化合物,Que在炎症领域及肿瘤防治领域特别是在乳腺癌细胞中展现出独特的药理学特性^[9-10]。Que的抗癌作用体现在:抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移,抑制细胞存活和增殖有关的信号分子的表达,调节细胞凋亡和细胞周期进程,减少肿瘤的体积,并逆转肿瘤细胞耐药^[11-12]。其作用可通过各种细胞信号机制和抑制致癌物激酶活性实现,例如槲皮素能通过调节BAX/BCL-2和抑制PI3K-AKT通路调控乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231的凋亡^[13]。

肿瘤细胞中PI3K的异常激活往往伴随着肿瘤抑制基因PTEN的缺失,进而导致PI3K/AKT通路异常活化和ABC转运蛋白上调,最终增强肿瘤细胞的

耐药性^[14]。研究表明,30%的原发性乳腺肿瘤和25%的转移性乳腺肿瘤与PTEN的缺失有关;PTEN是一种肿瘤抑制因子,参与多种信号通路调控,在肿瘤耐药性的形成(包括药物吸收减少和药物流出增加)和抗凋亡过程中发挥重要作用^[15-16]。miR-21作为一类重要的非编码RNA,能够通过碱基互补配对的方式,在转录后水平调控乳腺癌患者血清PTEN基因的表达,miR-21与PTEN的关系是此消彼长的,miR-21能够通过结合PTEN的3'UTR抑制其表达^[17-18]。

本研究中,我们利用细胞转染技术过表达miR-21后发现:PTEN的mRNA及蛋白表达水平下降,p-AKT蛋白水平上升;上皮细胞标志物E-cadherin的表达水平下降,间质标记物vimentin表达水平升高;MCF-7细胞迁移能力增强。与此同时,多药耐药蛋白ABCC2水平随着miR-21的过表达而升高。这说明,



A、B: 流式细胞术检测MCF-7细胞内罗丹明123的吸收情况; C: CCK-8检测Que与doxorubicin联合作用对MCF-7细胞增殖活性的影响; D: 罗丹明123在MCF-7细胞内的荧光值。** $P < 0.01$, 与NC组比较; ## $P < 0.01$, 与miR-21组比较。

A,B: flow cytometry was used to analysis of rhodamine123 absorption; C: CCK-8 assay was used to detect the effect of quercetin combined with doxorubicin on the viability of MCF-7 cells; D: fluorescence detection of rhodamine 123 absorption value. ** $P < 0.01$ compared with NC group; ## $P < 0.01$ compared with miR-21 group.

图8 不同方法检测罗丹明123在MCF-7细胞的吸收作用

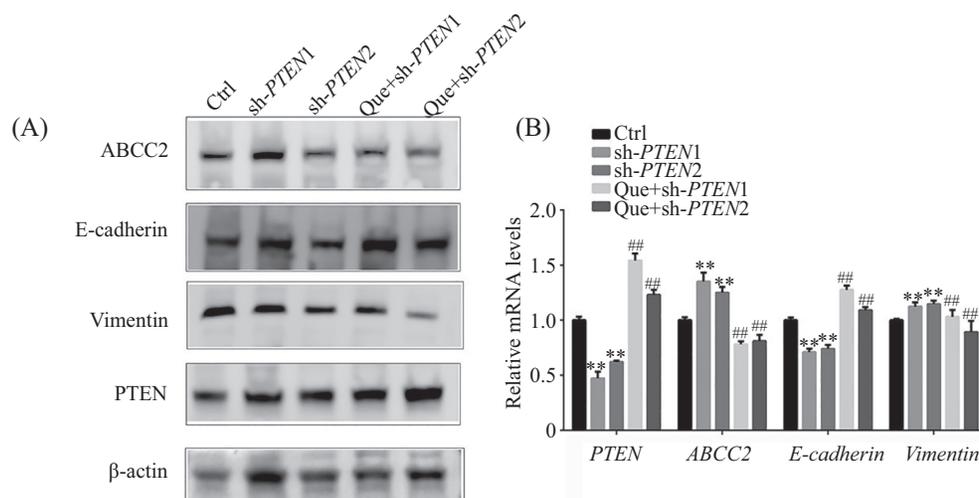
Fig.8 Different methods for detecting rhodamine 123 absorption in MCF-7 cells

miR-21可能通过抑制PTEN的表达、促进p-AKT表达诱导ABCC2表达。

ABCC2属于ABC-转运蛋白超家族成员之一,也叫多药耐药蛋白,该家族成员的功能之一是促进癌细胞药物排放从而减少细胞内药物的积累^[19]。随着对肿瘤耐药的深入研究,研究人员发现多药耐药蛋白的高表达是导致肿瘤药物治疗效果减弱的原因之一,如何抑制耐药转运蛋白的表达将是肿瘤综合化疗迫切需要解决的问题。

本研究中我们发现Que能抑制miR-21表达,在miR-21过表达的乳腺癌MCF-7细胞加入Que处理后,

PTEN、E-cadherin表达水平上升,ABCC2和vimentin表达水平下降,此外,Que能显著促进miR-21处理后的MCF-7细胞凋亡,抑制细胞迁移,这提示Que在乳腺癌MCF-7细胞中的作用正好与miR-21相反。多药耐药蛋白的表达可抑制药物吸收,诱导药物外排。ABCC2属于多药耐药蛋白超家族成员之一,其高表达可能引发细胞对药物的吸收作用降低^[6]。为了验证miR-21诱导ABCC2的表达是否引起MCF-7细胞对药物吸收作用降低,我们将多药耐药蛋白抑制剂维拉帕米(verapamil)作为阳性对照组,MCF-7细胞对Rdm123的吸收值作为检测各组药物吸收实验



A: 采用Western blot检测ABCC2、E-cadherin、vimentin和PTEN的蛋白表达水平; B: qRT-PCR检测PTEN、ABCC2、E-cadherin和vimentin的mRNA表达水平。** $P < 0.01$, 与Ctrl组比较; # $P < 0.01$, 与sh-PTEN1组或sh-PTEN2组比较。

A: Western blot was used to analysis protein expression of ABCC2, E-cadherin, vimentin and PTEN; B: qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of PTEN, ABCC2, E-cadherin, and vimentin. ** $P < 0.01$ compared with Ctrl group; # $P < 0.01$ compared with sh-PTEN1 group or sh-PTEN2 group.

图9 PTEN敲除对ABCC2表达的影响

Fig.9 The effect of PTEN knockdown on ABCC2

的依据, 药物吸收实验结果显示, 与对照组相比, 多药耐药蛋白抑制剂 verapamil能显著促进 Rdm123 的吸收, 而Que处理的MCF-7细胞对Rdm123的吸收能力也显著增强, 并逆转由miR-21导致的MCF-7细胞对Rdm123吸收作用降低的现象。这也反映miR-21促进ABCC2的表达可能导致细胞对Rdm123的吸收作用低, 而Que协同处理后抑制这一作用, 提升了对Rdm123的吸收能力。同时, Que增强doxorubicin对MCF-7细胞毒作用, 降低细胞活性, 说明槲皮素可能具有增强化疗药对肿瘤细胞的疗效。

此外, 通过敲低MCF-7细胞中的PTEN的表达, 发现ABCC2表达水平上升, 而E-cadherin表达水平下降和vimentin表达水平上升; 敲低PTEN后细胞与Que共处理后, 上述蛋白表达改变可被逆转。这提示Que可通过调控PTEN进而影响ABCC2表达。

综上所述, Que调控miR-21在乳腺癌治疗中具有重要意义。在抗细胞增殖方面, 通过靶向miR-21, Que能够有效减弱乳腺癌细胞活性, 促进细胞凋亡。在降低耐药蛋白表达上, Que可下调miR-21, 促进PTEN和E-cadherin表达, 减少ABCC2和vimentin的蛋白水平。E-cadherin和vimentin是细胞上皮-间质转化的关键蛋白, E-cadherin为细胞间连接和细胞完整性提供了支持, 其高表达有助于维持细胞正常结构与功能, 利于药物摄取。而这种作用的发生与miR-21/PTEN信号轴密不可分。研究表明, PTEN作

为抑癌基因, 可抑制PI3K/AKT信号通路, 促进细胞凋亡并抑制增殖, PTEN的低表达也与肿瘤细胞耐药息息相关, 同时, miR-21与PTEN的关系是此消彼长的^[20-21]。miR-21抑制PTEN表达, 削弱其抑癌功能, 减弱MCF-7细胞药物吸收能力。Que通过抑制miR-21表达, 减少其对PTEN的抑制, 使PTEN表达水平升高, 重新激活PTEN介导的抑癌信号通路, 从而诱导乳腺癌细胞凋亡、抑制耐药蛋白表达, 从而发挥对乳腺癌细胞的抑制作用。上述结果表明, Que具备调节miR-21过表达引起的异常蛋白表达的能力, 有效逆转miR-21过表达引发的乳腺癌MCF-7细胞内蛋白表达紊乱, 有利于提高药物的摄取量、减少肿瘤细胞药物外排, 具有显著的抗肿瘤药理学作用。

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74: 229-63.
- [2] PARK S, KIM J, CHO Y, et al. Promotion of tumorigenesis by miR-1260b-targeting CASP8: potential diagnostic and prognostic marker for breast cancer [J]. Cancer Sci, 2022, 113(6): 2097-108.
- [3] SARHANGI N, HAJJARI S, HEYDARI S F, et al. Breast cancer in the era of precision medicine [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 10023-37.
- [4] GUO J, HUI B, GONG T, et al. Overexpression of C19orf48 correlates with poor prognosis in breast cancer [J]. Afr Health Sci, 2023, 23(2): 274-82.

- [5] 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(ZHU S S, YU W Y, BI L W, et al. Quercetin induces apoptosis of human breast cancer cells by activating PTEN and inhibiting PI3K/AKT and JNK signaling pathways [J]. Chinese Journal of Cellular and molecular Immunology), 2022, 38(8): 714-20.
- [6] WANG Y, GAN X, CHENG X, et al. ABCC2 induces metabolic vulnerability and cellular ferroptosis via enhanced glutathione efflux in gastric cancer [J]. Clin Transl Med, 2024, 14(8): e1754.
- [7] 杨旸, 康春生. miRNA-21与肿瘤相关研究新进展[J]. 中国肿瘤临床(YANG S, KANG C S. Recent advances in the research on the relationship between miRNA-21 and cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology), 2011, 38(6): 357-60.
- [8] MENG F, HENSON R, JANEK H W, et al. microRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. Gastroenterology, 2007, 133(2): 647-58.
- [9] 李琼, 张沙沙. 槲皮素调节JAK2/STAT3信号通路对荨麻疹大鼠免疫炎症反应的影响[J]. 中国细胞生物学学报(LI Q, ZHANG S S. Effect of quercetin on immune inflammatory response in urticaria rats by regulating the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2024, 40(3): 499-505.
- [10] YANG Y, WANG Y Y, JIANG Q C. Research progress on pharmacological effects of quercetin [J]. Spec Econ Anim Plant, 2020, 23(5): 24-8.
- [11] CHAN C Y, LIEN C H, LEE M F, et al. Quercetin suppresses cellular migration and invasion in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [J]. Biomedicine, 2016, 6: 12-4.
- [12] HASHEMZAIE M, FAR A D, YARI A, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncol Rep, 2017, 38: 819-28.
- [13] DUO J, YING G G, WANG G W, et al. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation [J]. Mol Med Rep, 2012, 5(6): 1453-6.
- [14] CRETALLE D, DIGIACOMO G, GIOVANNETTI, et al. PTEN alterations as a potential mechanism for tumor cell escapes from PD-1/PD-L1 inhibition [J]. Cancers, 2019, 11(9): 1318.
- [15] HUANG F, ZHANG L, WU D S, et al. PTEN regulates BCRP/ABCG2 and the side population through the PI3K/Akt pathway in chronic myeloid leukemia [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e88298.
- [16] GAO X, QIN T, MAO J, et al. PTENP1/miR-20a/PTEN axis contributes to breast cancer progression by regulating PTEN via PI3K/AKT pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 256.
- [17] ALI S A, ABDULRAHMAN Z F A, FARAIDUN H N. Circulatory miRNA-155, miRNA-21 target PTEN expression and activity as a factor in breast cancer development [J]. Cell Mol Biol, 2020, 66(7): 44-50.
- [18] 郑传会, 林莉, 汪霞, 等. Wnt/ β -catenin信号通路在miR-21介导的非小细胞肺癌顺铂耐药性中的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版)(ZHENG C H, LIN L, WANG X, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in miR-21-mediated cisplatin [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University, Medical Sciences), 2026, 46(2): 238-48.
- [19] AMAWI H, SIM H M, TIWARI A K, et al. ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer [J]. Adv Exp med Biol, 2019, 1141: 549-80.
- [20] XU X, TANG Y Y, LIANG X, et al. PTEN suppresses renal cell carcinoma proliferation and migration via inhibition of the PI3K/AKT pathway [J]. World J Surg Oncol, 2025, 23(1): 42.
- [21] 王慧玲, 武亚琴, 孙瑾, 等. 微小RNA-325-3p调控第10号染色体上缺失与张力蛋白同源的磷酸酯酶基因/蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白通路介导乳腺癌阿霉素耐药的机制[J]. 中华实验外科杂志(WANG H L, WU Y Q, SUN J, et al. The mechanism of miRNA-325-3P regulate PTEN/AKT/mTOR signaling pathway of doxorubicin resistance in breast cancer [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery), 2025, 42(7): 1252-6.