

本文引用: 龚裕伟, 井鑫森, 苏朴承, 黄俊达, 吕璐璐. 异槲皮素诱导巨噬细胞 M1 型极化抑制肝癌细胞自噬及迁移侵袭的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1240-1248.

异槲皮素诱导巨噬细胞 M1 型极化抑制肝癌细胞 自噬及迁移侵袭的机制研究

龚裕伟¹, 井鑫森¹, 苏朴承², 黄俊达³, 吕璐璐^{4*}

1. 华中科技大学, 湖北 武汉 430074; 2. 南方医科大学, 广东 广州 510000; 3. 华南理工大学, 广东 广州 510000;

4. 合源生物科技(天津)有限公司, 天津 300384

〔摘要〕 目的 探究异槲皮素(Qct)通过调控巨噬细胞极化和肿瘤细胞自噬对肝癌的抑制作用。方法 采用佛波酯和白细胞介素-4 诱导人单核细胞株 THP-1 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)极化, 分别以 5、10、15、20 ng/mL Qct 处理诱导后的 THP-1 细胞。CCK-8 法检测细胞活性, 流式细胞术检测 CD86 和 CD206 表达, qRT-PCR 检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、精氨酸酶-1(Arg-1)的 mRNA 表达量。将肝癌 SMMC-7721 细胞随机分为 4 组并进行相应处理: 对照组(细胞培养液)、Qct 组(含 20 ng/mL Qct 细胞培养液)、TAM(TAM 培养液上清)、Qct+TAM 组(20 ng/mL Qct 共培养的 TAM 的培养液上清)。CCK-8 法检测各组细胞活力, Transwell 小室评价细胞迁移与侵袭能力, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, Western blot 检测 Beclin-1 蛋白、p62 泛素化蛋白及微管相关蛋白 1 轻链 3B II 型(LC3-II)/微管相关蛋白 1 轻链 3 I 型(LC3-I)蛋白表达水平, 免疫荧光染色检测自噬标志物 LC3 表达, 透射电子显微镜检测自噬体形成。结果 与对照组比较, 不同浓度 Qct 处理 TAM 后其存活率未发生变化($P>0.05$), CD86 表达及 iNOS、TNF- α 的 mRNA 表达量升高($P<0.01$), 而 CD206 表达及 TGF- β 、Arg-1 的 mRNA 表达量降低($P<0.01$)。对照组、Qct 组和 TAM 组 SMMC-7721 细胞存活率, 迁移数目与侵袭数目, 细胞凋亡率, Beclin-1、p62 蛋白表达, LC3-II/LC3-I 比值, 自噬体数目差异均无统计学意义($P>0.05$); 与 TAM 组比较, Qct+TAM 组 SMMC-7721 细胞存活率下降($P<0.01$), 迁移数目与侵袭数目减少($P<0.01$), 细胞凋亡率增加($P<0.01$), LC3-II/LC3-I 比值降低($P<0.01$), p62 蛋白表达增加($P<0.01$), Beclin-1 蛋白表达下降($P<0.01$), 细胞内自噬体减少($P<0.01$)。结论 Qct 调控 TAM 的 M1 型极化, 进而抑制肝癌细胞增殖、迁移与侵袭能力, 促进其凋亡, 其机制可能与调控细胞自噬相关。

〔关键词〕 肝癌; 异槲皮素; 巨噬细胞极化; 肿瘤相关巨噬细胞; 自噬; M1/M2 极化

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.006

Mechanism of isoquercetin-induced M1 polarization of macrophages in inhibiting autophagy, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells

GONG Yuwei¹, JING Xinmiao¹, SU Pucheng², HUANG Junda³, LYU Lulu^{4*}

1. Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 3. South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 4. Heyuan Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300384, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the inhibitory effects of isoquercetin (Qct) on hepatocellular carcinoma (HCC) through the regulation of macrophage polarization and tumor cell autophagy. **Methods** Human monocytic cell line THP-1 was induced to

〔收稿日期〕2025-03-24

〔基金项目〕天津市科技计划项目(24ZYCGSY00420)。

〔通信作者〕* 吕璐璐, 女, 博士, 副高级工程师, E-mail: lylulu@juventas.cn。

polarize into tumor-associated macrophage (TAM) using phorbol ester and interleukin-4. The induced THP-1 cells were then treated with Qct at concentrations of 5, 10, 15, and 20 ng/mL respectively. Cell viability was assessed by CCK-8 assay, and the expressions of CD86 and CD206 was determined by flow cytometry. The mRNA expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), and arginase-1 (Arg-1) were measured by qRT-PCR. Hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells were randomly divided into four groups and treated accordingly: control group (cell culture medium), Qct group (cell culture medium containing 20 ng/mL Qct), TAM group (supernatant from TAM culture), and Qct+TAM group (supernatant from TAM culture co-cultured with 20 ng/mL Qct). Cell viability in each group was evaluated using the CCK-8 assay, while cell migration and invasion capabilities were assessed using Transwell chambers. Apoptosis was examined by Annexin V-FITC/PI double staining, and the protein expression levels of Beclin-1, p62 ubiquitinated protein, and microtubule-associated protein 1 light chain 3B type II (LC3-II)/microtubule-associated protein 1 light chain 3 type I (LC3-I) were measured by Western blot. Autophagy marker LC3 expression was checked by immunofluorescence staining, and autophagosome formation was observed using transmission electron microscopy. **Results** Compared with the control group, the survival rate of TAMs treated with different concentrations of Qct remained unchanged ($P>0.05$). The expression of CD86 and the relative mRNA expression levels of iNOS and TNF- α increased ($P<0.01$), while the expression of CD206 and the relative mRNA expression levels of TGF- β and Arg-1 decreased ($P<0.01$). No statistically significant differences were observed in the cell survival rate, migration count, invasion count, apoptosis rate, Beclin-1 and p62 protein expressions, LC3-II/LC3-I ratio, or autophagosome count of SMMC-7721 cells among the control, Qct, and TAM groups ($P>0.05$). Compared with the TAM group, the Qct+TAM group exhibited a decrease in SMMC-7721 cell survival rate ($P<0.01$), a reduction in migration and invasion counts ($P<0.01$), an increase in apoptosis rate ($P<0.01$), a decrease in the LC3-II/LC3-I ratio ($P<0.01$), an increase in p62 protein expression ($P<0.01$), a decrease in Beclin-1 protein expression ($P<0.01$), and a reduction in intracellular autophagosomes ($P<0.01$). **Conclusion** Qct regulates the M1 polarization of TAMs, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion capabilities of hepatocellular carcinoma cells while promoting their apoptosis. The underlying mechanism may be related to the regulation of cellular autophagy.

[**Keywords**] hepatocellular carcinoma; isoquercetin; macrophage polarization; tumor-associated macrophage; autophagy; M1/M2 polarization

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种临床常见的恶性肿瘤。在我国,HCC发病率占肝脏肿瘤的90%^[1]。我国是全球HCC的高发国家之一,约占全球HCC发病率的50%以上^[2]。目前,治疗方法主要包括手术、化疗、放疗和免疫疗法,但这些治疗方法仅对30%~40%的患者有效^[3],且预后差、耐药、5年生存率低等问题依然存在,HCC仍然是一个严峻的公共卫生问题,需要加强相关预防、诊断和治疗措施的深入研究^[2-3]。

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)极化状态和细胞自噬在HCC的发展和治理中扮演关键角色^[4-5]。TAM极化是指巨噬细胞在肿瘤微环境中的表型和功能改变,在HCC中,TAM可以极化为两种不同的亚型:M1型和M2型巨噬细胞^[6]。巨噬细胞极化M1型标志物CD86、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因表达增加表明发生M1型极化;而M2型标志物CD206、转化生长因子- β (transforming growth factor-

β , TGF- β)和精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)基因表达增加表明发生M2型极化^[7]。M1型巨噬细胞具有抗肿瘤和抗炎作用;而M2型巨噬细胞具有抗炎和免疫调节作用,在HCC中数量增加,其产生的生长因子和细胞因子可促进HCC细胞的增殖、侵袭和转移,抑制M2型巨噬细胞的极化可阻断HCC发展^[8]。细胞自噬作为一种细胞内的自我降解过程,在HCC治疗中也具有重要作用,抑制细胞自噬可以增加HCC细胞对化疗药物的敏感性,促进肿瘤细胞的凋亡^[9-10]。研究表明,抑制自噬可以增强HCC细胞对放疗和靶向治疗的敏感性,减少肿瘤的耐药性^[11-12]。因此,细胞自噬调控剂可能成为HCC治疗的潜在药物靶点。

异槲皮素(isoquercetin, Qct)为槲皮素苷类衍生物,能够通过影响肿瘤血管生成和调节血管生成抑制因子(vasohibins, VASH)的表达抑制肿瘤生长和血管化^[13]。在结直肠癌模型中,Qct通过上调VASH1和下调VASH2,减少肿瘤血管的数量,显示出与抗血管生成药物贝伐珠单抗相似或更强的效果^[14]。此

外, Qct 的抗癌作用还与其抗炎^[15]、抗氧化应激^[16]和调节凋亡^[17]等有关。然而, Qct 调控巨噬细胞极化和肿瘤细胞自噬发挥抗癌作用的报道鲜见。本研究深入探讨 Qct 通过调控巨噬细胞极化和肿瘤细胞自噬发挥 HCC 抑制的作用, 为将其开发为高效且安全的临床抗癌药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人单核细胞株 THP-1、人 HCC 细胞 SMMC-7721 系(阿尔法生物细胞库, 批号: D4571、D1457)。

1.2 主要仪器

酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司, 型号: AMR-100); 实时荧光定量 PCR 系统(美国 AB-Systems Instruments 生物仪器公司, 型号: ABI7800); 微量移液器(德国 Brand 公司, 型号: BR705808); 高精度分光光度计(美国艾默生公司, 型号: FG4551C); 荧光显微镜(日本佳能公司, 型号: E78 Ci-8L); Odyssey CLx 成像仪器(美国 LI-COR Biosciences 公司, 型号: Odyssey CLx); BD 流式细胞仪(美国 BD 公司, 型号: BD 2000C)。

1.3 主要试剂

Qct(上海源叶生物科技有限公司, 批号: B20527); 佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)、白细胞介素(interleukin, IL)-4(德国西格玛公司, 批号: D20027、D54012); CCK-8 试剂盒(北京京诺单独生物公司, 批号: B120520); Trizol 试剂(中国碧云天生物有限公司, 批号: A45792); RNA 反转录试剂盒、RNA 实时荧光定量试剂盒(上海普洛麦格有限公司, 批号: D0417、D0444); Transwell 透明小室(美国康宁公司, 批号: KL5792); Annexin V-FITC/PI 双染色凋亡试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号: E606336]; Matrigel 高效包被胶(美国 Corning Incorporated 公司, 批号: 354234); BCA 法蛋白检测通用试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司, 批号: PA115]; CD86-APC 抗体(美国 Merk 公司, 批号: W4785); CD206-PE 抗体(美国 Abcam 公司, 批号: G4235); 微管相关蛋白 1 轻链 3B II 型(microtubule-associated protein 1 light chain 3B type II, LC3-II)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: E4541); 微管相关蛋白 1 轻链 3 I 型(microtubule-associated

protein 1 light chain 3-I, LC3-I)抗体(美国 Sigma 公司, 批号: W4577); Beclin-1 蛋白抗体、p62 泛素化蛋白抗体(美国 Abcam 公司, 批号: ab62557、ab91526); β -actin 抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号: SAB560020); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(北京福伯生物公司, 批号: F1481)。

1.4 THP-1 肿瘤相关巨噬细胞的诱导^[18]

将细胞密度调整为 5×10^5 个/mL 后, 取 110 μ L 细胞接种于 6 孔板中, 并在每孔中加入终浓度为 50 ng/mL 的 PMA。将细胞放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱中诱导 36 h, 去除培养液, 用 4 $^{\circ}$ C 的 PBS 清洗细胞 3 次。将培养液更换为含有终浓度为 20 ng/mL 的 IL-4 的培养液, 并继续在培养箱中诱导 96 h。用胰酶消化细胞, 并收集细胞用于后续实验。

1.5 检测方法

1.5.1 CCK-8 法 收集诱导后的 TAM, 吸取密度为 1×10^5 个/mL 的细胞 100 μ L 接种于 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件培养箱内培养 24 h。弃上层培养液, 换用浓度分别为 5、10、15、20 ng/mL 的 Qct 处理细胞 18 h, 以 PBS 处理的 TAM 作为对照组, 每组样本设置 5 个复孔进行生物学重复。在 18 h 后, 每孔加入 11 μ L 的 CCK-8 工作检测试剂, 放回培养箱中继续培养 6 h, 然后使用酶标仪检测 450 nm 处各孔细胞的光密度(optical density, OD)值。

1.5.2 流式细胞术 收集 TAM 细胞, 经 4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤 3 次后培养基重悬。室温下血清封闭 40 min, 加入 CD86-APC 抗体(1:500)、CD206-PE 抗体(1:600), 室温下在黑暗环境孵育 35 min, 用 4 $^{\circ}$ C PBS 洗涤细胞 3 次后再次用培养基重悬。采用 APC、PE 荧光通道于 BD 流式细胞仪检测巨噬细胞极化标志物 CD86、CD206 蛋白的表达水平。

1.5.3 qRT-PCR 检测 收集 TAM, 根据试剂制造商的说明, 使用 Trizol 试剂提取总 RNA。调整 RNA 浓度后, 使用试剂盒将其转化为 cDNA。使用 RNA 实时荧光定量试剂盒测定基因表达量。引物序列如下。iNOS 正向: 5'-AGAACCCAGCACCTTGGAC-3', 反向: 5'-CACAGGACGAGGAGGAGAT-3'; TNF- α 正向: 5'-CCCAAGACACAGTTCCCTA-3', 反向: 5'-GAGACCGCAGTCCGTCTAAG-3'; TGF- β 正向: 5'-CTCTCATAGCCGCTGGCTTC-3', 反向: 5'-C CTCAAT-

GCCTAGAGGCTG-3'; Arg-1 正向: 5'-CAGTACCAGCGGAGTATAGTGA-3', 反向: 5'-TGTGGAAGGTG GCATTGAAGA-3'; GAPDH 正向: 5'-CCTGTCCTG-GATAAGACCAAGTT-3', 反向: 5'-CTCCTGTTCATA-GATGTCAGCGAT-3'。

1.5.4 细胞共培养体系建立 根据实验结果, 本研究选择 20 ng/mL Qct 用于后续实验。取胰酶消化后对数生长期的人 HCC 细胞 SMMC-7721, 以 7×10^3 个/孔细胞密度接种于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 并在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。将上层培养液弃掉, 分别向 SMMC-7721 细胞中加入新鲜培养液或不同条件处理后的 TAM 培养液上清液。TAM 培养液上清液制备方法如下。THP-1 细胞加入 50 ng/mL 的 PMA, 将细胞放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中诱导 36 h, 去除培养液, 用 4 °C 的 PBS 清洗细胞 3 次。将培养液更换为含有终浓度为 20 ng/mL 的 IL-4 的培养液, 并继续在培养箱中诱导 96 h, 其上清液即为 TAM 培养液上清液。处理 20 h 后, 采用 CCK-8 试剂检测各组 SMMC-7721 细胞的增殖活性。

1.5.5 分组及处理 对照组: SMMC-7721 细胞给予正常细胞完全培养液培养 20 h; Qct 组: SMMC-7721 细胞给予含终浓度为 20 ng/mL Qct 细胞完全培养液培养 20 h; TAM 组: SMMC-7721 细胞给予相同体积 TAM 培养液上清液培养 20 h; Qct+TAM 组: SMMC-7721 细胞给予相同体积 20 ng/mL Qct 共培养的 TAM 的培养液上清液培养 20 h。

1.5.6 Transwell 小室检测 细胞侵袭检测时, 取 24 孔板, 放置 Transwell 小室, 紫外消毒 40 min。用 1:8 稀释的 Matrigel 包被小室上室, 37 °C 下使 Matrigel 凝胶化 30 min 后, 进行基底膜水化。消化细胞后, 用含 BSA 的无血清培养基重悬, 调整细胞密度至 5×10^5 /mL, 取 100 μL 细胞悬液加入小室上室, 下室加入 600 μL 含血清培养基。放入培养箱孵育 30 min, 弃去上室 Matrigel 胶, 加入 600 μL 完全培养基, 继续培养 12~24 h。用棉签轻轻擦去上室细胞, PBS 冲洗两次, 室温固定 30 min, 最后染色、晾干、拍照。细胞迁移检测则不进行 Matrigel 胶包被, 其余步骤相同, 实验重复 3 次。

1.5.7 Annexin V-FITC/PI 检测 用 PBS 缓冲液洗涤 SMMC-7721 细胞, 使用胰酶将细胞从培养皿中

解离。用结合缓冲液将 Annexin V-FITC 和 PI 按照 1:10 和 1:50 的比例稀释。取 100 μL 细胞悬液, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀。在室温下避光孵育 15 min。加入 400 μL Binding Buffer, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。通过 BD 流式细胞仪检测细胞凋亡分布, Annexin V-FITC 阳性且 PI 阴性表示早期凋亡细胞, Annexin V-FITC 阳性且 PI 阳性表示晚期凋亡或坏死的细胞, Annexin V-FITC 阴性且 PI 阳性表示已经死亡的细胞。通过分析不同细胞群体的比例, 了解细胞凋亡的情况。

1.5.8 Western blot 检测 使用 RIPA 裂解缓冲液系统裂解培养 SMMC-7721 细胞以分离蛋白质。使用 M-PER 哺乳动物蛋白提取试剂提取总蛋白。取等体积蛋白样品并在 4%~12% 聚丙烯酰胺凝胶上分离, 转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉和 0.1% Tween-20 封闭膜 0.5 h, 然后与一抗 LC3-I (1:500)、Beclin-1 (1:1 000)、p62 (1:500)、β-actin (1:500) 在 4 °C 孵育过夜。用 HRP 结合的二抗 (1:10 000) 处理膜 1 h。使用化学发光底物和 BioMax 胶片检测蛋白。

1.5.9 免疫荧光染色 收集 SMMC-7721 细胞, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 通透, 5% 胎牛血清白蛋白缓冲液阻断, 加入 LC3 抗体孵育过夜, PBS 洗涤后加入二抗孵育, 再次洗涤后用 DAPI 染色细胞核, 抗褪色封片剂封闭后覆盖玻片, 荧光显微镜下观察并获取图像。

1.5.10 透射电子显微镜检测 收集 SMMC-7721 细胞, 用戊二醛固定细胞样品, 将固定液滴加到细胞样品上, 室温下保持 1 h。用 1% 锇酸固定细胞样品, 滴加固定液, 保持 1 h。进行乙醇梯度脱水, 将样品依次放入 50%、70%、80%、90% 乙醇中, 每个梯度中保持 15 min。在 100% 乙醇中脱水 3 次, 每次 20 min。用丙酮梯度脱水, 将样品依次放入 50%、70%、80%、90% 丙酮中, 每个梯度中保持 15 min。在 100% 丙酮中脱水 3 次, 每次 20 min。用包埋剂进行置换, 将样品依次放入丙酮:包埋剂=1:2、纯包埋剂中各浸渍 4 h。进行切片, 制作超薄切片, 厚度 50 nm 左右。将切片放在铜网上进行染色, 用醋酸铀和柠檬酸铅染色液进行染色。在透射电子显微镜下观察细胞中的自噬体及其形态。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 20 统计学软件进行数据统计和分

析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间数据比较采用 *LSD-t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力比较

与对照组比较,不同浓度(5、10、15、20 ng/mL) Qct 处理 TAM 细胞 18 h 后,细胞活力无明显改变 ($P > 0.05$)。详见图 1。

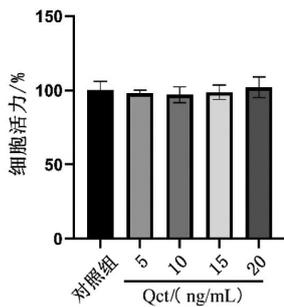


图 1 Qct 对 THP-1 诱导的 TAM 活性的影响
Fig.1 Effects of Qct on the activity of THP-1 induced TAM

2.2 各组 TAM 极化相关指标比较

与对照组比较,不同浓度(5、10、15、20 ng/mL) Qct 处理 TAM 细胞 18 h 后,CD86 表达升高、CD206 表达下降 ($P < 0.01$);与 20 ng/mL Qct 比较,5、10、15 ng/mL Qct 处理 TAM 细胞 18 h 后,CD86 表达下降、CD206 表达升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较,不同浓度(5、10、15、20 ng/mL)Qct 处理 TAM 细胞 18 h 后,TAM 细胞内 iNOS、TNF- α mRNA 表达量升高, TGF- β 、Arg-1 mRNA 表达量降低 ($P < 0.01$)。详见图 2—4。

2.3 各组 SMMC-7721 细胞活力及存活率比较

与对照组比较,不同浓度(5、10、15、20 ng/mL) Qct 处理 SMMC-7721 细胞 18 h 后,各处理组之间细胞存活率未见明显变化 ($P > 0.05$)。20 ng/mL Qct 干预 SMMC-7721 细胞 18 h 后,对照组、Qct 组、TAM 组细胞存活率比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组、Qct 组、TAM 组比较,Qct+TAM 组细胞存活率下降 ($P < 0.01$)。详见图 5。

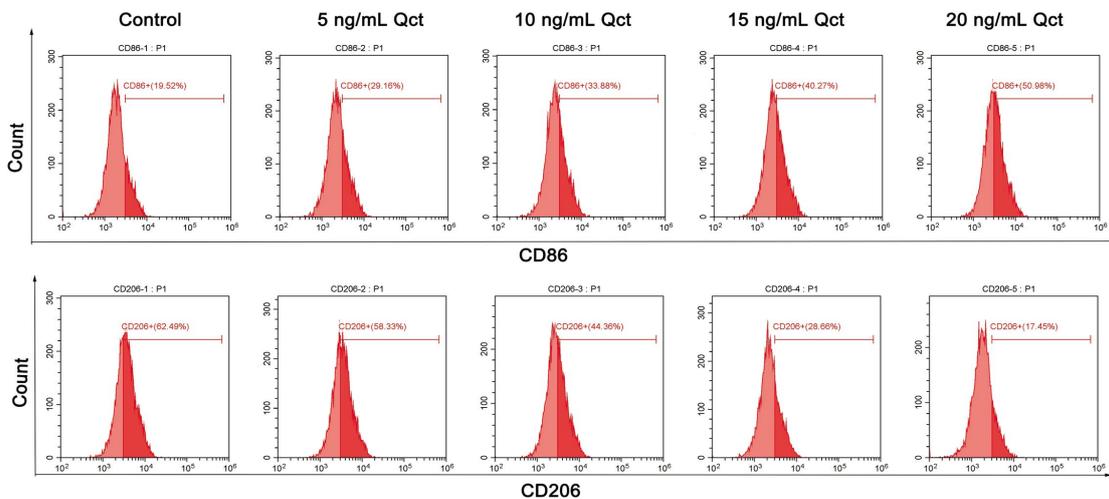


图 2 各组 CD86 和 CD206 表达情况比较

Fig.2 Comparison of CD86 and CD206 expressions among different groups

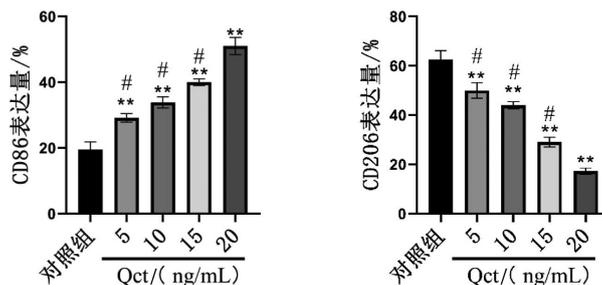


图 3 各组 CD86 和 CD206 表达量比较

Fig.3 Comparison of CD86 and CD206 expression levels among different groups

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与 Qct 20 ng/mL 比较,# $P < 0.05$ 。

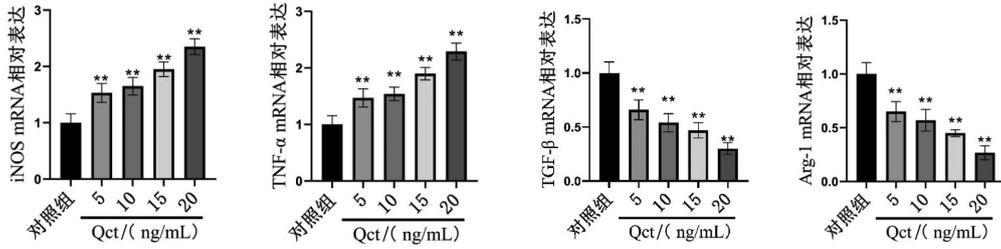


图 4 各组 iNOS、TNF-α、TGF-β、Arg-1 mRNA 表达量比较

Fig.4 Comparison of mRNA expression levels of iNOS, TNF-α, TGF-β, and Arg-1 among different groups

注:与对照组比较,**P<0.01。

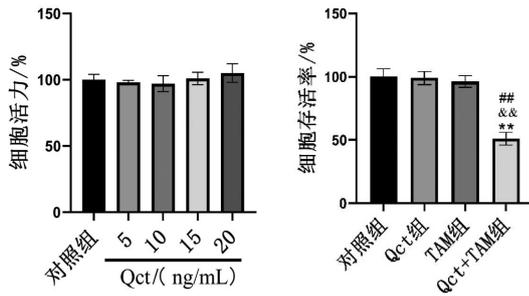


图 5 各组细胞活力及存活率比较

Fig.5 Comparison of cell viability and survival rate among different groups

注:与对照组比较,**P<0.01;与 Qct 组比较,®P<0.01;与 TAM 组比较,®P<0.01。

2.4 各组 SMMC-7721 细胞迁移与侵袭能力比较

对照组、Qct 组、TAM 组 SMMC-7721 细胞迁移数目与侵袭数目比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组、Qct 组、TAM 组比较,Qct+TAM 组细胞迁移数目与侵袭数目减少 ($P<0.01$)。详见图 6。

2.5 各组 SMMC-7721 细胞凋亡情况比较

对照组、Qct 组、TAM 组 SMMC-7721 细胞凋亡率比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组、Qct 组、TAM 组比较,Qct+TAM 组细胞凋亡率升高 ($P<0.01$)。详见图 7。

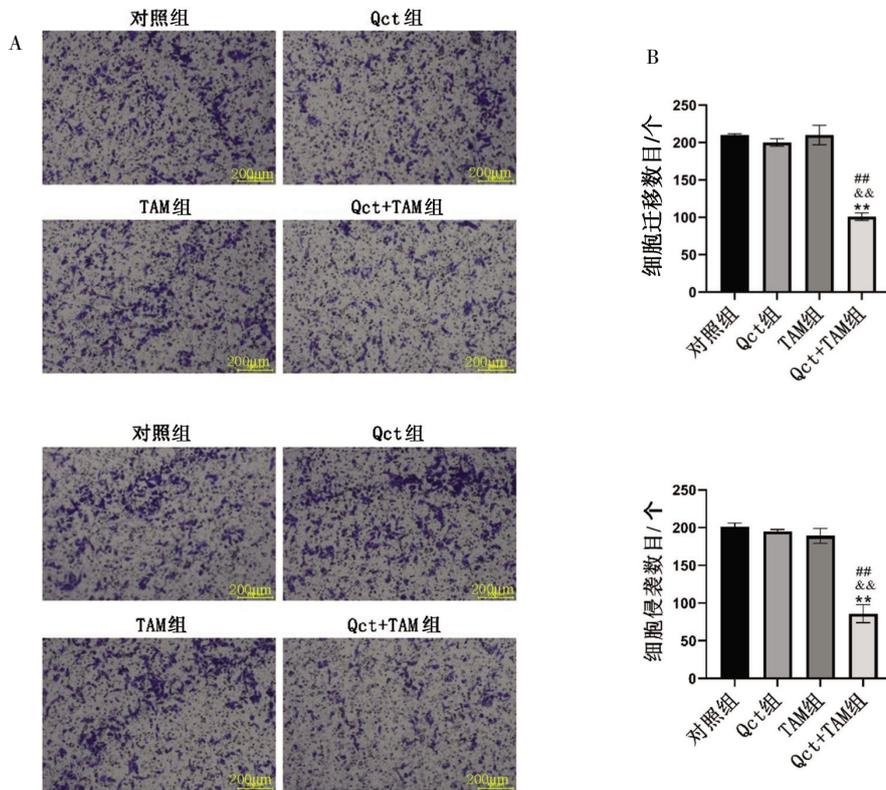


图 6 各组细胞迁移与侵袭能力比较

Fig.6 Comparison of cell migration and invasion abilities among different groups

注:A.结晶紫染色图($\times 100$);B.各组细胞迁移与侵袭数目比较。与对照组比较,**P<0.01;与 Qct 组比较,®P<0.01;与 TAM 组比较,®P<0.01。

2.6 各组 SMMC-7721 细胞自噬相关指标比较

对照组、Qct 组、TAM 组 SMMC-7721 细胞中 Beclin-1、p62 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 比值比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$); SMMC-7721 细胞内均可观察到绿色荧光标记的 LC3 蛋白, 各组间绿色荧光分布差异不显著; SMMC-7721 细胞内均可见多

个单层膜或双层膜结构的自噬体, 各组间自噬体数目变化不明显。与对照组、Qct 组、TAM 组比较, Qct+TAM 组细胞中 Beclin-1 蛋白减少、p62 蛋白增加、LC3-II/LC3-I 比值降低 ($P<0.01$); 细胞内绿色荧光标记的 LC3 蛋白则明显减弱; 细胞中自噬体的数目明显减少。详见图 8—10。

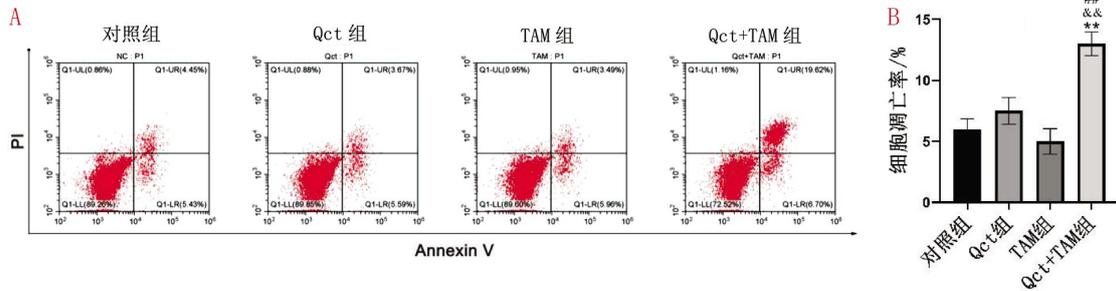


图 7 各组细胞凋亡情况比较

Fig.7 Comparison of cell apoptosis among different groups

注: A. 流式细胞图; B. 各组细胞凋亡率比较。与对照组比较, $**P<0.01$; 与 Qct 组比较, $^{##}P<0.01$; 与 TAM 组比较, $^{##}P<0.01$ 。

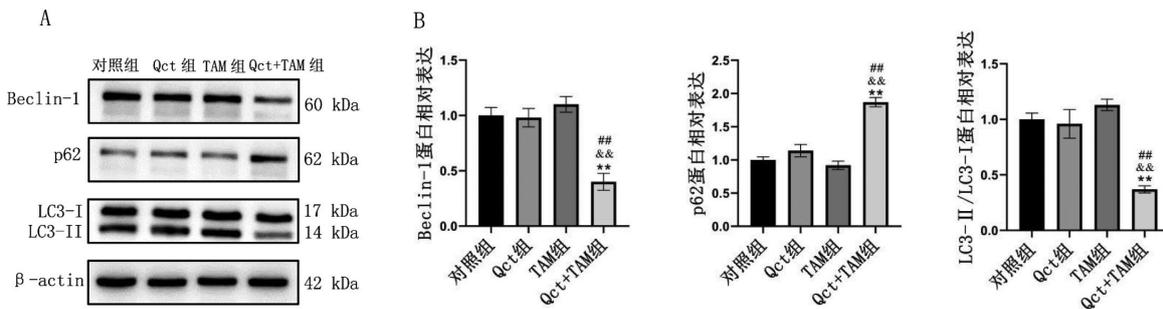


图 8 各组细胞自噬相关蛋白 Beclin-1、p62、LC3-II/LC3-I 表达水平比较

Fig.8 Comparison of expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1, p62, and LC3-II/LC3-I, among different groups

注: A. 各组细胞蛋白条带图; B. 各组 Beclin-1、p62、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平比较。与对照组比较, $**P<0.01$; 与 Qct 组比较, $^{##}P<0.01$; 与 TAM 组比较, $^{##}P<0.01$ 。

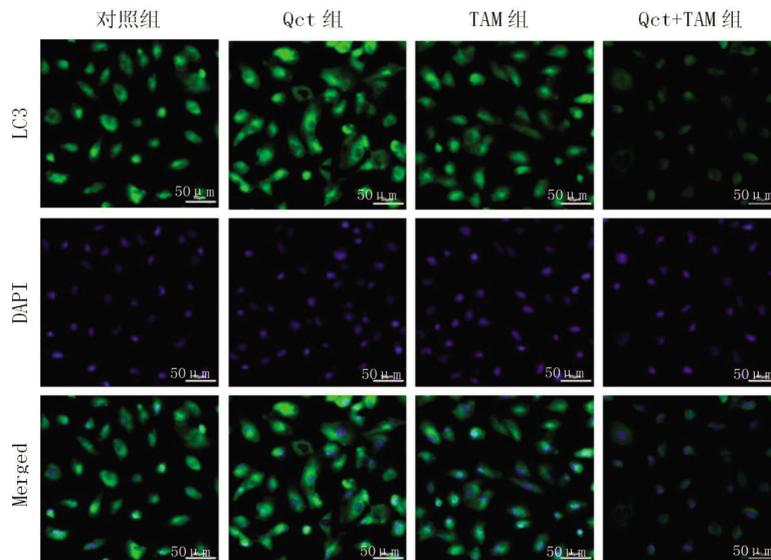


图 9 各组细胞自噬相关 LC3 蛋白免疫荧光图 ($\times 400$)

Fig.9 Immunofluorescence images of autophagy-related LC3 protein in each group of cells ($\times 400$)

注: 绿色荧光标记 LC3, 蓝色荧光标记细胞核。

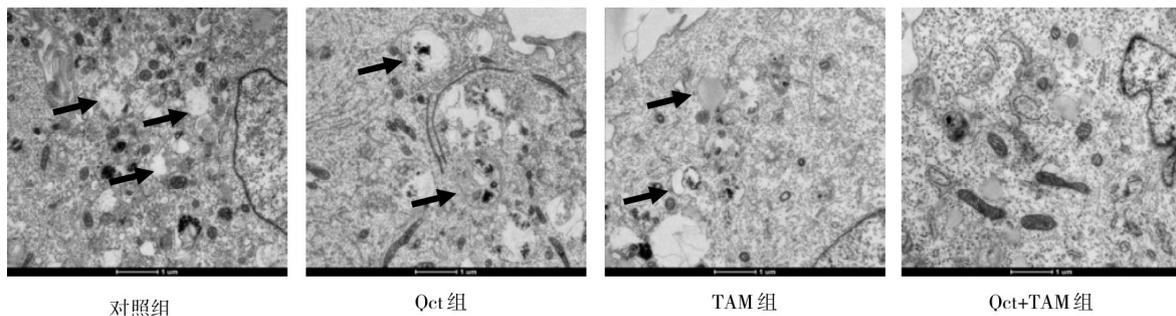


图 10 各组细胞自噬体透射电子显微镜图($\times 10\ 000$)

Fig.10 Transmission electron microscopy image of autophagosomes in each group of cells ($\times 10\ 000$)

注:黑色箭头示自噬小体。

3 讨论

HCC 是一种具有高度侵袭性和快速增殖能力的恶性肿瘤,其发生和发展与多种因素密切相关,其中细胞自噬在 HCC 的进程中扮演复杂的角色^[19]。细胞自噬作为一种细胞内的自我降解机制,在维持细胞内稳态、清除受损的细胞器和异常蛋白质以及调节能量代谢等方面发挥关键作用^[20]。在 HCC 细胞中,存在异常的细胞自噬现象^[9-10]。这种异常的自噬活动可能与 HCC 细胞对营养和能量的高需求有关。由于 HCC 细胞的快速生长和分裂需要大量的营养物质和能量支持,其可能通过增强自噬过程获取额外的营养物质,从而满足快速增殖的需求^[19-20]。此外,自噬在 HCC 细胞中的异常激活还可能与肿瘤微环境中的多种因素相互作用,进一步影响肿瘤的生物行为^[11-12]。在探索 HCC 治疗策略的过程中,天然产物及其衍生物因其潜在的抗癌活性而受到广泛关注。槲皮素是一种具有多种生物活性的天然黄酮类化合物,然而,其在临床应用面临生物利用度低和体内代谢过程复杂的挑战,在一定程度上限制了其作为抗癌药物的潜力。Qct 作为槲皮素的一种衍生物,具有更好的生物利用度和稳定性。研究表明,Qct 能够激活 YAP 蛋白,进而促进巨噬细胞向 M2 型极化^[14]。巨噬细胞的极化状态在肿瘤免疫中起着至关重要的作用,M2 型巨噬细胞通常与肿瘤的促进和免疫抑制相关,而 Qct 通过调节巨噬细胞的极化状态,可能有助于调节机体的免疫反应,从而为 HCC 的治疗提供一种新的策略。

本研究结果表明,经过不同浓度的 Qct 干预 TAM 后,巨噬细胞极化 M1 型标志 CD86 蛋白、iNOS

和 TNF- α mRNA 表达量增加,而 M2 型标志 CD206 蛋白、TGF- β 和 Arg-1 mRNA 表达量下降。以上结果说明 Qct 能促进 TAM 向 M1 型分化。通过进一步检测发现,经 Qct 干预后的 TAM M1 型极化培养上清液可抑制 HCC SMMC-7721 细胞活性、转移及侵袭能力,促进细胞凋亡。Qct 还显示出对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用,可通过抗炎、抗氧化应激和抗凋亡机制减轻损伤^[16]。Qct 通过改善线粒体膜电位和减少细胞色素 C 介导的胱天蛋白酶-9、胱天蛋白酶-3 途径的激活,有效减少细胞凋亡^[15]。在结直肠癌模型中,Qct 通过调节血管生成抑制因子 VASH1 和 VASH2 的表达,减少肿瘤血管化,从而抑制肿瘤生长^[13]。进一步研究发现,Qct 介导巨噬细胞 M1 型极化抗癌机制与抑制细胞自噬有关,经 Qct 干预后的 TAM M1 型极化培养上清液可抑制 HCC SMMC-7721 细胞的自噬水平,表现为 LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin-1 蛋白表达下降,p62 蛋白表达增加。免疫荧光及电镜结果表明,LC3 蛋白及自噬体数目减少。Qct 诱导的 M1 型极化 TAM 可抑制 SMMC-7721 细胞的自噬,Qct 通过诱导巨噬细胞 M1 型极化,抑制肝癌细胞自噬,进而抑制其迁移和侵袭能力。Qct 作为天然的抗氧化剂和抗炎剂,能调节巨噬细胞极化和 HCC 细胞自噬,可能成为 HCC 治疗的有效药物^[21]。

综上所述,Qct 通过介导 TAM 的 M1 型极化进而抑制 HCC 细胞自噬水平,进一步诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞的迁移与侵袭能力。本研究为 Qct 治疗 HCC 提供了理论依据,但 Qct 抑制 HCC 的具体机制仍需进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024年版)[J]. 协和医学杂志, 2024, 15(3): 532-559.
- [2] 万鹏夏, 沈鸣雁, 韩琳秋, 等. 肝癌经导管动脉化疗栓塞术后胃肠道反应管理的证据总结[J]. 介入放射学杂志, 2024, 33(4): 438-442.
- [3] 魏哲文, 毕新宇. 肝癌转化治疗临床应用中的共识和争议[J]. 中国普通外科杂志, 2025, 34(1): 47-53.
- [4] KEAWVILAI P, KUEANJINDA P, KLOMSING J, et al. Coculturing liver cancer cells and monocytes in spheroids conditions monocytes to adopt tumor-associated macrophage phenotypes that favor tumor growth via cholesterol metabolism [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2024, 115(2): 344-357.
- [5] MANTOVANI A, MARCHESI F, DI MITRI D, et al. Macrophage diversity in cancer dissemination and metastasis [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2024, 21: 1201-1214.
- [6] 邸亮, 郭庆良, 赵晓飞, 等. 肿瘤相关巨噬细胞外泌体调控肝癌细胞生长、转移及衰老的功能[J]. 西部医学, 2024, 36(6): 793-798.
- [7] DARYA G H, ZARE O, KARBALAEI-HEIDARI H R, et al. Enzyme-responsive mannose-grafted magnetic nanoparticles for breast and liver cancer therapy and tumor-associated macrophage immunomodulation [J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2024, 21(4): 663-677.
- [8] 周月媛. GDF15 通过 CD48 介导肿瘤相关巨噬细胞亚型转变促进肝癌免疫逃逸的作用及其机制研究[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2023.
- [9] 向雨晨, 彭鹏, 文君, 等. 自噬在癌症治疗中的双面性及自噬诱导剂的治疗进展[J]. 湖北医药学院学报, 2020, 39(5): 504-509.
- [10] 柳卓, 谭小宁, 翦慧颖, 等. 基于网络药理学和生物信息学探讨并验证槲皮素治疗肝癌的靶点和机制[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(11): 1904-1911.
- [11] CHAO X J, QIAN H, WANG S G, et al. Autophagy and liver cancer [J]. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2020, 26(4): 606-617.
- [12] WEN Z K, QI J X, RUAN Q Q, et al. Formosanin C induces autophagy-mediated cell death in hepatocellular carcinoma through activating DUSP1/AMPK/ULK1/Beclin1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 138: 156404.
- [13] DA SILVA D C, ORFALI G D C, SANTANA M G, et al. Anti-tumor effect of isoquercetin on tissue vasohibin expression and colon cancer vasculature [J]. *Oncotarget*, 2022, 13: 307-318.
- [14] 戴淑颖, 刘恹, 孙霖, 等. 异槲皮素通过激活 YAP 蛋白对巨噬细胞极化表型的影响[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2444-2449.
- [15] 曹衡. 异槲皮素对心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡的作用及其机制研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
- [16] 梁苏东. 异槲皮素预处理对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [17] PENG C W, LI H L, MAO Q L, et al. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced cleavage of heat shock protein 90 to prevent glutathione peroxidase 4 degradation via chaperone-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156286.
- [18] MA D H, ZHANG Y, CHEN G H, et al. miR-148a affects polarization of THP-1-derived macrophages and reduces recruitment of tumor-associated macrophages via targeting SIRP α [J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 8067-8077.
- [19] QIAN H, CHAO X J, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: A review [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2021, 82: 100973.
- [20] YANG C L, GUO Y L, WU Z Z, et al. Comprehensive analysis of cuproptosis-related genes in prognosis and immune infiltration of hepatocellular carcinoma based on bulk and single-cell RNA sequencing data [J]. *Cancers*, 2022, 14(22): 5713.
- [21] 房仙颖, 章祎唯, 萧伟, 等. 异槲皮素的制备及研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(4): 708-717.

(本文编辑 周旦)