金宁方中 β- 谷甾醇增进槲皮素诱导肺癌 A549 细胞凋亡作用

俞杞泉[1#]，叶玉涵[2#]，吕春明[2]，张泽良[1]，杨 扬[2*]，韩素静[3]
（1. 上海中医药大学附属龙华医院胸外科，上海 200032；2. 上海中医药大学科技实验中心，上海 201203；
3. 上海中医药大学附属龙华医院老年医学科，上海 200032）

摘要：目的 探讨 β- 谷甾醇联合槲皮素对 A549 细胞抑制作用以及机制。**方法** 将 A549 细胞分为对照组、槲皮素组、槲皮素＋β- 谷甾醇组、雌二醇组、雌二醇＋槲皮素组以及雌二醇＋槲皮素＋β- 谷甾醇组。采用细胞存活率检测 A549 细胞的抑制作用。采用流式细胞技术和免疫荧光法检测肺癌细胞的促凋亡情况。应用免疫印迹法检测磷脂酰肌醇 3- 激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）/ 蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路的调控作用。**结果** 槲皮素可抑制 A549 细胞生存率且具量效关系（$P < 0.05$）；雌二醇可促进 A549 细胞生长；与槲皮素组或槲皮素＋β- 谷甾醇比较，雌二醇＋槲皮素＋β- 谷甾醇组更抑制 A549 细胞增殖，提高细胞凋亡比例及 caspase-3 的表达水平（$P < 0.05$）；促进 mTOR 和 Akt 磷酸化，减少 PI3K 磷酸化。**结论** 在雌二醇干预下，β- 谷甾醇联合槲皮素对 A549 细胞有抑制作用，其机制可能通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对细胞凋亡起促进作用。

关键词： β- 谷甾醇；槲皮素；非小细胞肺癌 A549 细胞
中图分类号： R33 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188（2024）03-0276-09
DOI：10.13683/j.wph.2024.03.007

The effect of β-sitosterol in Jinning decoction on enhancing quercetin induced apoptosis of A549 cells of lung cancer

YU Qiquan[1#], YE Yuhan[2#], LYU Chunming[2], ZHANG Zeliang[1], YANG Yang[2*], HAN Sujing[3]
（*1. Department of Thoracic Surgery, Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;*
2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Science and Technology Experiment Center, Shanghai 201203, China;
3. Department of Geriatric Medicine, Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China）

Abstract: ***Objective*** To investigate the inhibitory effect of β-sitosterol on quercetin in A549 cells and its mechanism. ***Methods*** The A549 cells were divided into control group, quercetin group, quercetin＋β-sitosterol group, estradiol group, estradiol＋quercetin group, and estradiol＋quercetin＋β-sitosterol group. The cell survival rate the inhibitory effects of A549 cell. The flow cytometry and immunofluorescence methods were used to determine the pro-apoptotic effect of on lung cancer cells. Western blotting was used to the regulatory effects of phosphoinositide 3-kinase（PI3K）/protein kinase B（Akt）/ mammalian target of rapamycin（mTOR） signaling pathway. ***Results*** Quercetin could inhibit the survival rate of A549 cells with dose-response relationship（$P<0.05$）. Estradiol promoted the growth of A549 cells. Compared with quercetin group or quercetin＋β-sitosterol group, estradiol＋quercetin＋β-sitosterol group more inhibited the proliferation of A549 cells, increased the proportion of apoptosis and the expression level of caspase-3（$P<0.05$）, promoted the phosphorylation of mTOR and AKT, and decreased the phosphorylation of PI3K. ***Conclusions*** Under the intervention of estradiol, β-sitosterol combined with quercetin inhibited A549 cells, the mechanism of which may be through the PI3K/Akt/mTOR pathway of apoptosis.

Key words: β-sitosterol; quercetin; A549 cell of non-small cell lung cancer

收稿日期：2023-04-27；**修回日期：**2023-12-20
作者简介：俞杞泉，博士，研究方向：中西医结合治疗肺部疾病。
通信作者：杨扬，研究员，研究方向：中药药理。
基金项目：上海市卫生健康委员会中医药科研项目（2020JP005）

肺癌是一种常见的、高发病率的恶性肿瘤，其中超过 85% 为非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）[1]。研究表明，NSCLC 患者中有 53% 女性和 15% 男性不吸烟，提示有其他因素可能导致女性 NSCLC 发展 [2]。另有研究提示雌二醇与 NSCLC 的发病存在一定相关性 [3]。通过前期网络药理学研究，发现“金宁方”中槲皮素与 β- 谷甾醇可能为复方抗肿瘤的有效成分 [4]。本研究模拟雌二醇高水平条件，探讨 β- 谷甾醇联合槲皮素对 NSCLC A549 细胞的抑制、增殖作用及其他作用机制，以期为临床进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞株与传代

人 NSCLC 细胞 A549 细胞购自大连美仑生物技术有限公司，A549 细胞培养于杜尔贝科改良 eagle 培养基（Dulbecco's modified eagle medium，DMEM）高糖完全培养基，于 37 ℃、5% 二氧化碳和 95% 湿度条件下培养。试验前密切观察细胞生长情况，细胞贴壁生长密度达到 85% ～ 90% 时，通过胰酶消化并传代，继续培养。适时冻存与复苏，用于后续试验。

1.2 材料与仪器

DMEM 高糖培养液（MA011-2-Jun-24H）、青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺（100X，PWL62）、槲皮素（N1126AS）、β- 谷甾醇（J0902A）、雌二醇（20220841）、胰蛋白酶（MA0233-Dec-16H）、细胞计数试剂盒 -8（cell counting kit-8，CCK-8，MA0218-3-Jan-aH）、Annexin V- 荧光素异硫氰酸酯（fluorescein isothiocyanate，FITC）细胞凋亡检测试剂盒（70076S）、放射免疫沉淀法（radio immunoprecipitation assay，RIPA）裂解液（MA0151-Jun-08D）、十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）凝胶试剂盒（MA0382-Apr-08F）、增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）高敏化学发光试剂盒（MA0186-1-Sep-17G）均购自大连美仑生物技术有限公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，1832595）购自 Gibco 公司；Annexin A1 Antibody（abs115415）购自爱必信生物科技有限公司；甲醇（100182-201906）购自国药集团化学试剂有限公司；磷脂酰肌醇 3- 激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K，4257）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt，13857）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR，2983）和磷酸化（phosphorylation，p-PI3K（5536）、Phospho-Akt（4060S）、p-mTOR（4691）、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH，5174S）等一抗以及羊抗兔二抗（6990）均购自 Cell Signaling Technology 公司；乳酸脱氢酶（lactic acid dehydrogenase，LDH）测定试剂盒（011223230814）购自南京建成生物工程研究所。生物安全柜 ESCO-AC2-4S1 购自新加坡 ESCO 公司；倒置显微镜 Olympus-CX31 购自日本 Olympus 公司；冷冻离心机 Eppendorf-5810R 购自德国 Eppendorf 公司；自动细胞计数仪 Countstar 购自中国艾力特生物科技公司；多功能酶标仪 Molecular Devices-Spectra Max 190 购自美国 MD 公司。

1.3 方法

1.3.1 雌二醇浓度筛选

取对数生长 A549 细胞加入胰酶消化制成细胞悬液，以 1×10^4/ 孔接种于 96 孔板，在 37 ℃、5% 二氧化碳条件下培养，24 h 后加入梯度浓度的雌二醇，雌二醇诱导浓度分别为 0、0.004、0.02、0.1 和 0.5 μmol/L[5] 处理 48 h，每组设 6 个孔，设未接种的 6 个孔为空白对照，采用 CCK-8 检测各组细胞活力，通过多功能酶标仪在 450 nm 处测定光密度（optical density，OD）值，并计算细胞存活率，细胞存活率＝（$OD_{样本}-OD_{空白}$）/（$OD_{对照}-OD_{空白}$）×100%，选择最佳诱导浓度。

1.3.2 槲皮素与 β- 谷甾醇浓度筛选

取对数生长 A549 细胞加入胰酶消化制成细胞悬液，以 1×10^4/ 孔接种于 96 孔板，37 ℃、5% 二氧化碳培养条件下培养 24 h 后，加入梯度浓度的槲皮素或 β- 谷甾醇，槲皮素或 β- 谷甾醇终浓度均分别为 0、

1.25、2.5、5、10、20、40 和 80 μmol/L[6—7] 处理 48 h，每组设 6 个孔，设未接种的 6 个孔作为空白对照，采用 CCK-8 检测各组细胞活力，并计算细胞存活率，通过正交试验确定 β- 谷甾醇与槲皮素联用的最佳浓度；再通过 Graphpad 软件拟合槲皮素在有 / 无 β- 谷甾醇联用情况下作用于最佳诱导浓度的雌二醇诱导 A549 细胞的抑制曲线，并计算半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）。

1.3.3 分组

NSCLC 细胞株 A549 接种于培养于 6 孔板，2.5×10^5/ 孔及 4 ml/ 孔，培养 24 h 后，根据所加溶液分为 6 组。对照组加入 1 ml 培养液，槲皮素组加入 1 ml 最终浓度槲皮素溶液，槲皮素＋β- 谷甾醇组（加入 500 μl 最终浓度槲皮素溶液和 500 μl 终浓度最终浓度 β- 谷甾醇溶液），雌二醇组（加入 1 ml 最终浓度雌二醇溶液），雌二醇＋槲皮素组（加入 500 μl 最终浓度雌二醇溶液和 500 μl 最终浓度槲皮素溶液），雌二醇＋槲皮素＋β- 谷甾醇组（加入 200 μl 最终浓度雌二醇溶液、400 μl 最终浓度槲皮素溶液和 400 μl 最终浓度 β- 谷甾醇溶液）。

1.3.4 CCK8 法检测细胞存活率

将各组 A549 细胞采用 CCK-8 法检测细胞存活率，按照试剂盒说明书操作。设未干预孔为对照孔，无细胞等体积培养液空为空白孔，计算各组细胞存活率。

1.3.5 细胞活性检测

收集各组细胞培养上清样本，根据 LDH 测定试剂盒标准步骤进行测定细胞活性。

1.3.6 细胞凋亡检测

将 A549 细胞培养于 6 孔培养板中，通过不含乙二胺四乙酸胰酶消化制成单细胞悬液。用 Annexin V-FITC 与碘化丙啶（proply iodide，PI）染色标记凋亡细胞，采用流式细胞仪进行检测与细胞成像。通过 IDEAS 软件进行分析，获得各组的细胞凋亡比例及典型的细胞成像结果。

1.3.7 Caspase-3 的免疫荧光成像

将 A549 细胞培养于 6 孔培养板中，用冰甲醇固定 15 min，5% FBS 白蛋白封闭 1 h 后加入 caspase-3（1 ： 800）抗体，在 4 ℃下孵育 24 h，清洗后加入荧光抗体后再孵育 1 h，后加入 Hoechest 4 μg/ml 标记细胞核。通过高内涵成像技术获得高通量细胞成像，并通过 MetaXpress 软件进行图像分析，定量分析成像视野中的细胞数量与 caspase-3 平均荧光面积。

1.3.8 免疫印迹法（western blotting，WB）检测 PI3K 通路蛋白表达

将 A549 细胞培养于 6 孔培养板中，在细胞样本中加入 RIPA 裂解液，收集各组细胞裂解后的蛋白样本，提取总蛋白，并通过二喹啉甲酸测定蛋白浓度。运用 WB 分别检测各组样本中 PI3K 通路的 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR 的蛋白表达水平，采用 Image J 软件对各组蛋白条带进行灰度值分析。

1.4 统计学分析

所有数据均使用 GraphPad Prism7 软件进行统计并进行图表制作。计量资料采用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，多组间采用单因素方差分析，两两组间采用 Tukey's 检验进行分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌二醇、槲皮素以及 β- 谷甾醇的浓度筛选

雌二醇随浓度增加，A549 细胞存活率上升；浓度在 0.02 μmol/L 下，存活率达到峰值（$P<0.001$），见表 1，故雌二醇最终选取浓度 0.02 μmol/L。

槲皮素随浓度增加，A549 细胞存活率降低，浓度在 5 ～ 80 μmol/L 槲皮素与 0 μmol/L 比较（$P<0.001$），差异具有统计学意义。β- 谷甾醇在受试浓度范围中对 A549 存活率均无明显差异，见表 2。

2.2 槲皮素与 β- 谷甾醇联用对 A549 细胞存活率的影响

槲皮素组与槲皮素＋β- 谷甾醇组抑制 A549 细胞的 IC_{50} 值分别为（70.11±8.48）μmol/L 与（36.55±9.94）μmol/L。

2.3 槲皮素与 β- 谷甾醇联用对 LDH 的作用

与对照组比较，槲皮素组 LDH 明显升高（$P<$

表 1 雌二醇对 A549 细胞存活率影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The effect of estradiol on survival rate of A549 cells ($\bar{x}\pm s$)

雌二醇浓度/μmol·L^{-1}	存活率/%	OD值
0	100.00±10.55	0.252±0.027
0.004	132.07±19.37***	0.305±0.107
0.02	149.74±.995***	0.377±0.015
0.1	128.06±4.54***	0.323±0.011
0.5	125.05±2.74***	0.315±0.007

注：与对照组相比，***P<0.001。

Note: *vs* control group, ***P<0.001.

表 2 槲皮素 /β- 谷甾醇对 A549 细胞存活率影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of quercetin/β-sitosterol on survival rate of A549 cells ($\bar{x}\pm s$)

槲皮素/β-谷甾醇浓度/μmol·L^{-1}	存活率/%	OD值
0	100.00±2.37/100.00±3.26	0.207±0.005/0.221±0.008
1.25	100.93±7.91/95.14±1.37	0.209±0.016/0.210±0.003
2.5	95.54±6.80/95.82±3.15	0.197±0.014/0.212±0.008
5	90.92±3.06*/93.37±4.62	0.188±0.006/0.206±0.11
10	80.33±2.98***/93.50±4.61	0.166±0.006/0.206±0.11
20	77.67±3.92***/96.54±4.54	0.160±0.008/0.213±0.11
40	67.97±2.71***/104.46±1.68	0.140±0.006/0.231±0.004
80	47.32±1.36***/104.46±1.68	0.098±0.003/0.236±0.037

注：与对照组相比，*P < 0.05，***P < 0.001。

Note: *vs* control group, *P < 0.05, ***P < 0.001.

0.001）；与雌二醇组比较，雌二醇＋槲皮素组 LDH 明显升高（P < 0.01）；槲皮素＋ β- 谷甾醇组、雌二醇＋槲皮素＋ β- 谷甾醇组 LDH 均明显升高，见表 3。

2.4 各组对 A549 细胞凋亡

各组细胞凋亡率均无促进效应。与对照组比较，

表 3 槲皮素联用 β- 谷甾醇对 A549 细胞的 LDH 作用

Table 3 The effect of LDH in A549 cell supernatant by combination of quercetin and β-sitosterol

组别	LDH/U·L^{-1}
对照组	130.42±22.80
槲皮素组	294.42±89.09***
槲皮素＋β-谷甾醇组	311.77±56.06
雌二醇组	141.00±14.92
雌二醇＋槲皮素组	307.58±62.53$^{\#\#}$
雌二醇＋槲皮素＋β-谷甾醇组	326.13±46.20

注：与对照组相比，***P < 0.001；与雌二醇组相比，$^{\#\#}P$ < 0.01。

Note: *vs* control group, ***P < 0.001; *vs* estradiol group, $^{\#\#}P$ < 0.01.

槲皮素＋ β- 谷甾醇组、雌二醇＋槲皮素＋ β- 谷甾醇组细胞凋亡率增加，见表 4、图 1。

2.5 槲皮素联合 β- 谷甾醇对 caspase-3 表达的影响

与槲皮素组比较，雌二醇＋槲皮素组平均细胞数量明显降低。与 β- 谷甾醇联用后槲皮素减少细胞数量的效应明显增强（P < 0.05），见表 5。β- 谷甾醇＋槲皮素组增加了 A549 细胞中 caspase-3 的表达面积与荧光强度（P < 0.05）。雌二醇＋ β- 谷甾醇＋槲皮素组则进一步增加细胞中 caspase-3 的表达面积与荧光强度，见图 2、表 5。

2.6 槲皮素与 β- 谷甾醇联用对 PI3K 信号通路的影响

雌二醇＋槲皮素＋ β- 谷甾醇组提高 PI3K 信号通路中 p-mTOR 和 p-Akt 水平，槲皮素＋ β- 谷甾醇组 p-mTOR 增强，p-Akt 水平降低，且 PI3K 蛋白水平较明显增加，p-PI3K/PI3K 的比值下降，见表 6。

3 讨论

槲皮素是黄酮类黄酮亚类的一种活性天然产物，

表 4 槲皮素与 β- 谷甾醇联用对 A549 细胞凋亡比例检测

Table 4 Detection of apoptosis ratio of quercetin and quercetin combined with β-sitosterol on A549 cells

组别	凋亡率/%	Annexin-V-FITC/%	Annexin-V-FITC/PI/%	PI/%
对照组	7.67	5.11	1.10	1.46
槲皮素组	8.75	6.82	0.35	1.58
槲皮素＋β-谷甾醇组	7.87	4.03	0.69	3.15
雌二醇组	7.48	4.65	0.77	2.06
雌二醇＋槲皮素组	11.1	4.79	1.31	5.00
雌二醇＋槲皮素＋β-谷甾醇组	12.68	2.56	1.49	8.63

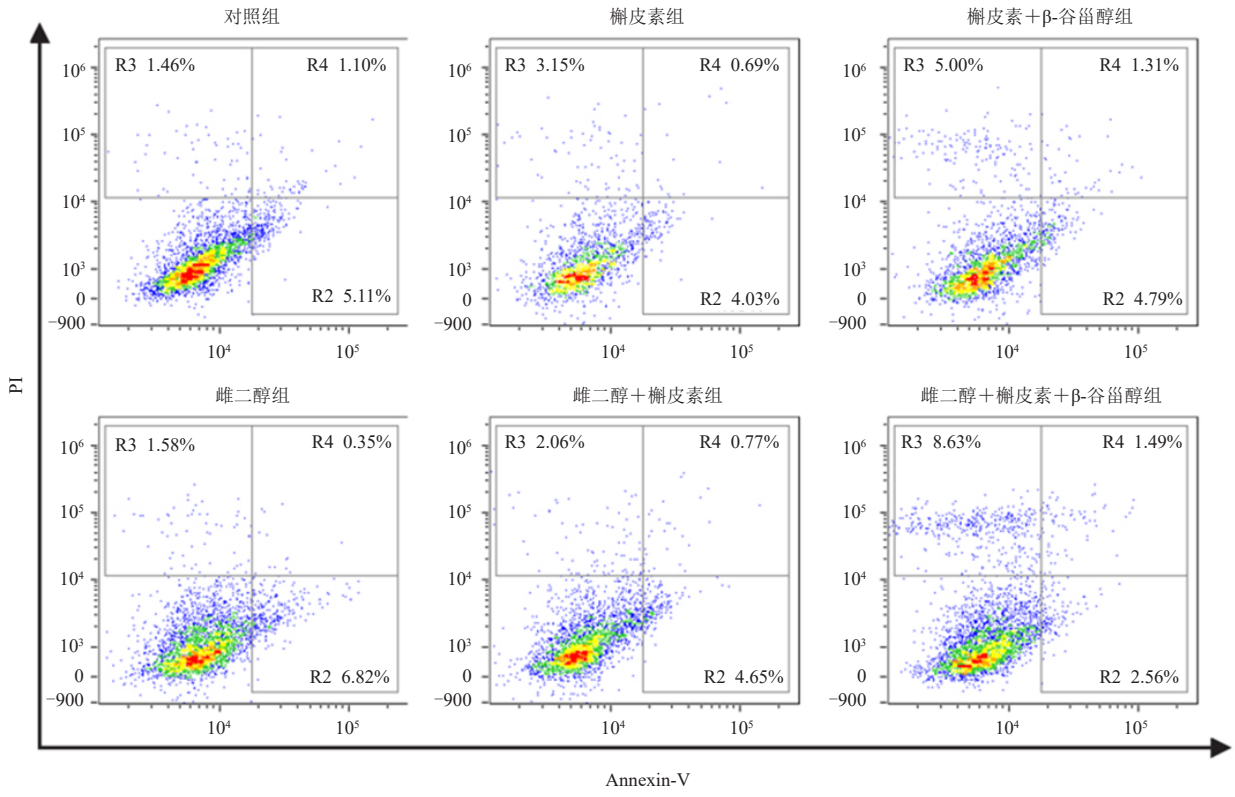


图 1 槲皮素与 β- 谷甾醇联用对于 A549 细胞凋亡的影响

Figure 1 Effect of quercetin and β-sitosterol on apoptosis of A549 cells

表 5 槲皮素联合 β- 谷甾醇对 A549 细胞株数量及 caspase-3 表达的影响

Table 5 Effect of quercetin combined with β-sitosterol on the number of A549 cell lines and the expression of caspase-3

组别	平均细胞数量/个	平均荧光面积	平均荧光强度/$\times10^{-5}$
对照组	124.80±53.60	181.23±62.74	8.38±3.01
槲皮素组	94.09±41.66	175.78±74.30	8.21±3.88
槲皮素+β-谷甾醇组	63.19±36.48$^{▲▲▲}$	283.68±80.35$^{▲▲▲}$	13.62±4.11$^{▲▲▲}$
雌二醇组	131.63±38.06	247.91±74.83	11.75±3.85
雌二醇+槲皮素组	62.57±44.79	269.66±60.51	13.10±3.13
雌二醇+槲皮素+β-谷甾醇组	40.73±22.63$^{▲}$	299.12±83.38$^{\#\#}$	14.75±4.25$^{\#\#}$

注：与雌二醇组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与槲皮素组相比，$^{▲}P<0.05$，$^{▲▲▲}P<0.001$，$^{▼▼}P<0.01$，$^{▼▼▼}P<0.001$。

Note: *vs* control group, $^{\#\#}P<0.01$; *vs* quercetin group, $^{▲}P<0.05$, $^{▲▲▲}P<0.001$, $^{▼▼}P<0.01$, $^{▼▼▼}P<0.001$.

较多草药中含有槲皮素，包括紫胡根、青根和连翘等[5]。有研究表明，槲皮素可抑制人 NSCLC、肝癌以及乳腺癌的癌细胞的增殖[8—10]。其抗肿瘤靶通路包括 PI3K/Akt/mTOR[11—12]，其中作为 PI3K 抑制剂具有潜在抗肿瘤成药性[13]。文献[14]报道，槲皮素的活性效应表现为抑制 p-PI3K，PI3K 通路作为调控细胞物质代谢与能量代谢的关键信号通路，在抗肿瘤领域被广泛研究。另一方面，较高的雌激素水平可能与 NSCLC 的发生发展有关[15—17]，雌激素受体的下游信号同样受 PI3K 调控。有研究表明，β- 谷甾

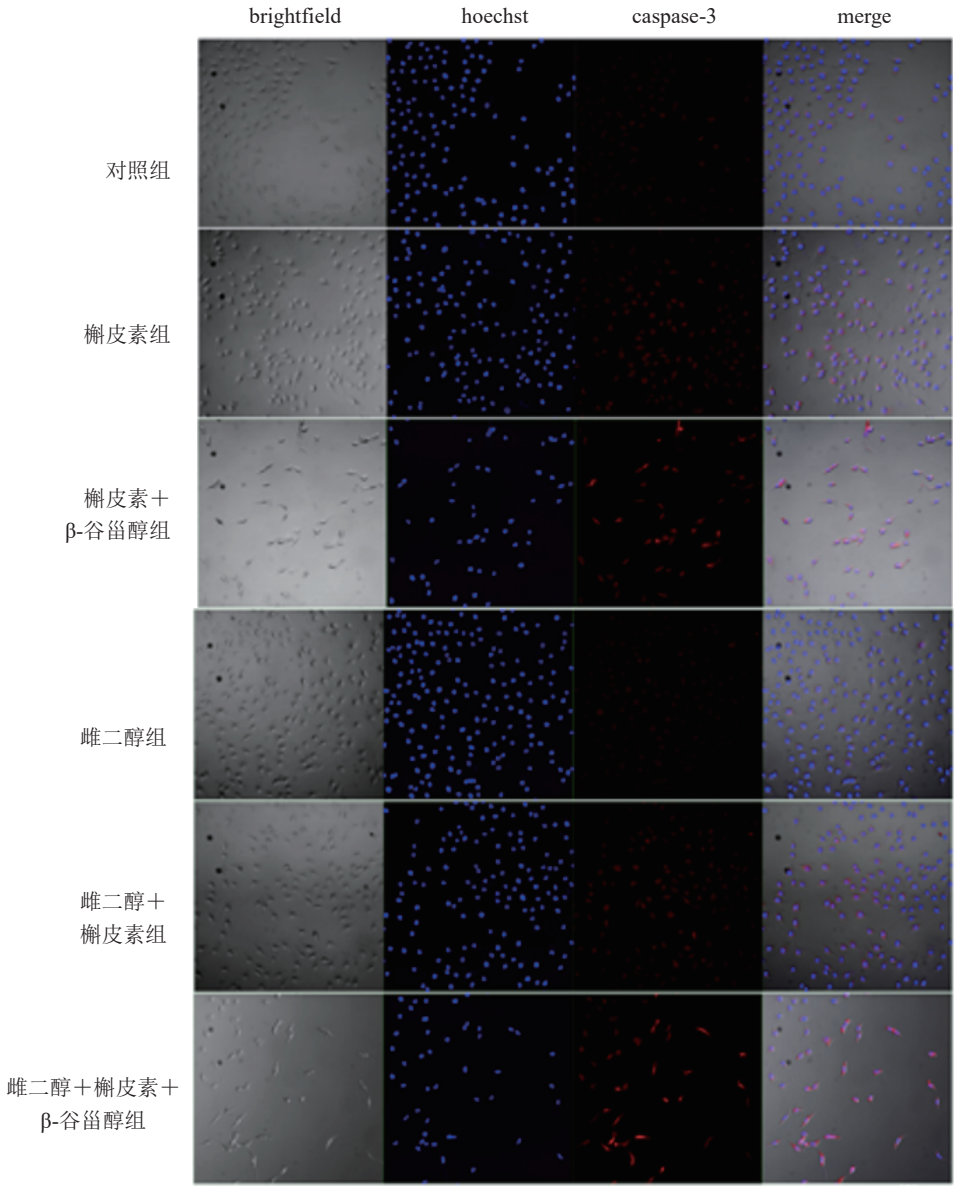


图 2　槲皮素与 β- 谷甾醇对于 A549 细胞株 caspase-3 激活的效应

Figure 2　Effect of quercetin and β-sitosterol on caspase-3 activation in A549 cell line

醇可减少雌二醇诱导的去卵巢、无胸腺裸鼠 MCF-7 乳腺癌细胞生长，且可降低小鼠血浆中雌二醇水平，且槲皮素与 β- 谷甾醇联用具有增强对三阴性乳腺癌细胞的细胞毒性和 DNA 损伤的作用，以达到更好的抗肿瘤作用 [18]。β- 谷甾醇作为雌激素结构类似物，本研究结果显示，通过 PI3K 信号通路与槲皮素协同效应，特别在较高水平雌二醇肿瘤细胞生长环境下，联用 β- 谷甾醇后槲皮素能够进一步抑制 p-PI3K 比例，但对于下游信号通路 p-Akt 及 p-mTOR 表现为促进作用。这一现象可能与 β- 谷甾醇是雌激素结构类似物有关。p-PI3K 减少影响下游 Akt 抑制，可能导致负反馈信号的丢失和 PI3K 下游 Akt 独立的促生长信号的激活 [19]。与本研究结果一致。

在较高水平雌二醇细胞培养条件下，联用 β- 谷甾醇后槲皮素能明显降低 NSCLC A549 的细胞存活率，并通过拟合与计算，较大程度降低肿瘤细

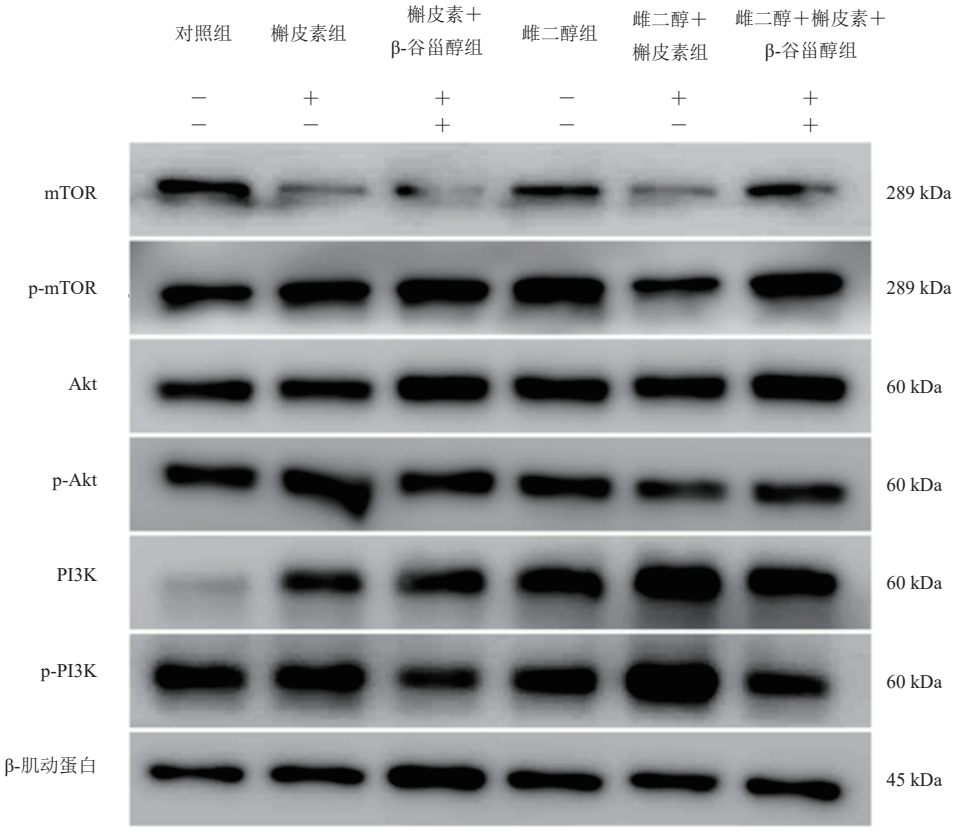


图 3　WB 检测各组细胞蛋白表达量

Figure 3　The protein expression of each group detected by WB

表 6　槲皮素联合 β- 谷甾醇对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

Table 6　Effects of quercetin combined with β-sitosterol on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

组别	p-mTOR/mTOR	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K
对照组	0.66±0.01	0.98±0.34	2.10±0.93
槲皮素组	1.87±0.49	1.05±0.12	1.10±0.55
槲皮素＋β-谷甾醇组	2.03±0.46	0.88±0.18	1.00±0.48
雌二醇组	0.87±0.23	1.10±0.17	1.03±0.54
雌二醇＋槲皮素组	1.12±0.40	1.39±0.07	0.67±0.04
雌二醇＋槲皮素＋β-谷甾醇组	1.44±1.04	1.17±0.18	0.62±0.02

胞的 IC_{50}，浓度从（76.54±15.28）μmol/L 降低至（36.55±9.94）μmol/L。由于 β- 谷甾醇与雌二醇结构相似，已有文章表明 β- 谷甾醇是植物雌激素 [20]。β- 谷甾醇与槲皮素均为中药复方中的活性化合物，以上结果显示，槲皮素与 β- 谷甾醇联用能扩大槲皮素的抗肿瘤效应。细胞增殖水平下降与细胞死亡率上升均可能导致细胞存活率降低 [21]。通过检测细胞培养上清中 LDH 的水平，可反应活性化合物对于肿瘤细胞的杀伤作用。当质膜受损时，LDH 被迅速释放至细胞培养上清液中 [22]。LDH 检测中，在雌二醇诱导条件下，联用 β- 谷甾醇与单用槲皮素并未显示出明显的统计学差异，仅表现为程度改变，由于细胞凋亡与坏死质膜呈现方式不同，凋亡会使质膜皱缩，而坏死会使质膜破损，其释放出 LDH 的差异较大 [23]。提示槲皮素和 β- 谷甾醇对 A549 细胞有诱导凋亡作用。细胞膜翻转、膜通透性增进以及细胞核溶解等表型特征均为细胞凋亡的特征性表现，细胞存活率的降低可能由槲皮素与 β- 谷甾醇对肿瘤细胞的诱导凋亡的作用导致。进一步通过量化成像分析流式技术对两化合物共同诱导细胞凋亡的多种表型特征进

行观测，同样发现两者联用具有增强细胞凋亡作用。

由于 caspase-3 介导细胞凋亡的最终执行环节，通过高内涵成像分析槲皮素与 β- 谷甾醇能够协同促进 caspase-3 在肺癌细胞中的表达及活化，caspase-3 的高表达可能是因 PI3K/Akt/mTOR 通路被激活，从而发挥更有效的抗肿瘤效应。由此，我们进一步证明在较高雌二醇水平下，β- 谷甾醇能明显提高槲皮素的抗肿瘤效应；而在联用 β- 谷甾醇条件下槲皮素对于 A549 细胞的 IC_{50} 仍达到 (36.55±9.94) μmol/L，说明作为细胞毒性药物的作用浓度仍较高。

4 结论

在雌二醇干预下，β- 谷甾醇联用槲皮素对 A549 细胞有抑制作用，其作用机制可能通过 PI3K/Akt/mTOR 通路实现对细胞凋亡的促进作用。未来希望通过更深入的相关研究，探索临床复方药物组合机理，从而进一步增强疗效，降低其细胞毒性，为复方的临床应用提供参考。

参考文献：

[1] 徐威, 禚孝丽, 刘磊, 等. Kirsten大鼠肉瘤病毒基因同源物突变非小细胞肺癌内科治疗现状与展望[J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(2): 111-116.

[2] Young MJ, Chen YC, Wang SA, *et al*. Estradiol-mediated inhibition of Sp1 decreases miR-3194-5p expression to enhance CD44 expression during lung cancer progression[J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 3.

[3] Song S, Tang H, Quan W, *et al*. Estradiol initiates the immune escape of non-small cell lung cancer cells via ERβ/SIRT1/FOXO3a/PD-L1 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 107: 108629.

[4] Wu Chunxiao, Yu Qiquan, Shou Weizhen, *et al*. Identification of molecular mechanism of the anti-lung cancer effect of Jin Ning Fang using network pharmacology and its experimental verification[J]. All Life, 2022, 15: 745-759.

[5] 冯昊, 曹伯雄, 昝自亮, 等. 17β-雌二醇联合苯并芘异常激活人肺腺癌A549细胞中AHR/PD-L1轴[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(7): 1174-1180.

[6] 李畅. 槲皮素通过诱导铁死亡抑制A549细胞增殖的作用及机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.

[7] 周玲玉, 徐彩, 王乐琴, 等. β-谷甾醇对人肺癌A549细胞增殖及凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(7): 865-867.

[8] Zhao X, Wang J, Deng Y, *et al*. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism[J]. Phytother Res, 2021, 35(9): 4727-4747.

[9] Dong Y, Yang J, Yang L, *et al*. Retracted: quercetin inhibits the proliferation and metastasis of human non-small cell lung cancer cell line: the key role of src-mediated fibroblast growth factor-inducible 14(Fn14)/nuclear factor κB(NF-κB) pathway[J]. Med Sci Monit, 2022, 28: e937325.

[10] Guo H, Ding H, Tang X, *et al*. Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1/AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 *in vitro*[J]. Thorac Cancer, 2021, 12(9): 1415-1422.

[11] Erdogan S, Turkekul K, Dibirdik I, *et al*. Midkine downregulation increases the efficacy of quercetin on prostate cancer stem cell survival and migration through PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 793-805.

[12] Zalpoor H, Nabi-Afjadi M, Forghaniesfidvajani R, *et al*. Quercetin as a JAK-STAT inhibitor: a potential role in solid tumors and neurodegenerative diseases[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 60.

[13] Tu H, Ma D, Luo Y, *et al*. Quercetin alleviates chronic renal failure by targeting the PI3k/Akt pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6538-6558.

[14] Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer[J]. Breast Cancer, 2018, 25(4): 392-401.

[15] Smida T, Bruno TC, Stabile LP. Influence of estrogen on the NSCLC microenvironment: a comprehensive picture and clinical implications[J]. Front Oncol, 2020, 10: 137.

[16] Gong W, Song J, Chen X, *et al*. Estrogen-related receptor-α mediates puromycin aminonucleoside-induced mesangial cell apoptosis and inflammatory injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(5): F906-F913.

[17] Maitra R, Malik P, Mukherjee TK. Targeting estrogens and various estrogen-related receptors against non-small cell lung cancers: a perspective[J]. Cancers(Basel), 2021, 14(1): 80.

[18] Ju YH, Clausen LM, Allred KF, *et al*. β-Sitosterol, β-sitosterol

glucoside, and a mixture of β-Sitosterol and β-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *in vitro* and in ovariectomized athymic mice[J]. J Nutr, 2004, 134(5): 1145-1151.

[19] Ghomlaghi M, Hart A, Hoang N, *et al*. Feedback, crosstalk and competition: ingredients for emergent non-linear behaviour in the PI3K/mTOR signalling network[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6944.

[20] Hanson AM, Kittilson JD, Sheridan MA. Environmental estrogens inhibit insulin-like growth factor(IGF) receptor mRNA expression, IGF binding, and IGF signaling *ex vivo* in rainbow trout(Oncorhynchus mykiss)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2023, 330: 114125.

[21] Kirkland JL, Tchkonia T. Cellular senescence: a translational perspective[J]. EBioMedicine, 2017, 21: 21-28.

[22] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095497.

[23] D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(6): 582-592.

(编辑：沈佳婕)

(上接第247页)

[16] Osadnik CR, Tee VS, Carson-Chahhoud KV, *et al*. Non-invasive ventilation for the management of acute hypercapnic respiratory failure due to exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 7(7): CD004104.

[17] 胡玲, 余阗, 郭华, 等. 双水平气道正压治疗慢性阻塞性肺疾病合并呼吸衰竭的临床疗效分析[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(5): 336-340.

[18] 吴瑶, 邱晓娟, 宋康, 等. 两种通气模式治疗COPD合并Ⅱ型呼吸衰竭对CRP、IL-8及IL-27的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(6): 1032-1035.

[19] 王翠, 施敏骅. 经鼻高流量氧疗治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重合并Ⅱ型呼吸衰竭的临床疗效观察[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2021, 20(11): 807-812.

[20] Cortegiani A, Longhini F, Madotto F, *et al*. High flow nasal therapy versus noninvasive ventilation as initial ventilatory strategy in COPD exacerbation: a multicenter non-inferiority randomized trial[J]. Crit Care, 2020, 24(1): 692.

[21] Lee MK, Choi J, Park B, *et al*. High flow nasal cannulae oxygen therapy in acute-moderate hypercapnic respiratory failure[J]. Clin Respir J, 2018, 12(6): 2046-2056.

[22] Di Mussi R, Spadaro S, Stripoli T, *et al*. High-flow nasal cannula oxygen therapy decreases postextubation neuroventilatory drive and work of breathing in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Crit Care, 2018, 22(1): 180.

[23] Thille AW, Muller G, Gacouin A, *et al*. Effect of postextubation high-flow nasal oxygen with noninvasive ventilation *vs* high-flow nasal oxygen alone on reintubation among patients at high risk of extubation failure: a randomized clinical trial[J]. J Am Med Assoc, 2019, 322(15): 1465-1475.

[24] 中华医学会呼吸病学分会呼吸危重症医学学组, 中国医师协会呼吸医师分会危重症医学工作委员会. 成人经鼻高流量湿化氧疗临床规范应用专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(2): 83-91.

[25] 戴百章, 任朝凤, 郑勤玲, 等. 慢性阻塞性肺病急性加重患者膈肌影像变化[J]. 临床放射学杂志, 2015, 34(3): 386-388.

[26] 刘仁红. 体外膈肌起搏在AECOPD患者中的应用效果[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(80): 20-21.

(编辑：王 佳)