# 槲皮素联合木犀草素对大肠癌细胞凋亡和 β－catenin 及其靶基因的作用

邬世威，陈锦芳，师子曼，胡兵*
（上海中医药大学附属龙华医院中医肿瘤研究所肿瘤科，上海 200032）

**摘要**　目的：研究槲皮素和木犀草素及其联合使用对 CT26 大肠癌细胞增殖和细胞凋亡的作用及机制。方法：实验分为对照组、槲皮素组（QCT）、木犀草素组（LTL）和联合组（QCT＋LTL），分别给予等体积 DMSO、槲皮素、木犀草素及槲皮素联合木犀草素处理 CT26 细胞。CCK－8（Cell Counting Kit－8）法检测细胞增殖；Annexin－FITC/PI 双染，流式细胞仪检测细胞凋亡；酶底物试剂盒检测 Caspases 活性；Western blot 法检测 β－catenin 及其下游 c－Myc、Cyclin D1 和 Survivin 的蛋白表达水平。结果：与对照组比较，槲皮素和木犀草素治疗可抑制 CT26 细胞增殖，诱导细胞凋亡，伴随 Caspase－3、Caspase－8 和 Caspase－9 活性增强，同时还可抑制 β－catenin、c－Myc、Cyclin D1 及 Survivin 蛋白表达（$P<0.05$，$P<0.01$）。槲皮素和木犀草素联合可增强对 CT26 细胞的作用。结论：槲皮素和木犀草素可抑制 CT26 大肠癌生长，诱导细胞凋亡，两药联合作用显著优于单药，其机制与下调 β－catenin、c－Myc、Cyclin D1 及 Survivin 表达，活化 Caspase－3、Caspase－8 和 Caspase－9 相关。

**关键词**　槲皮素；木犀草素；大肠癌；细胞增殖；细胞凋亡；β－catenin
**中图分类号**：R285.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392（2025）01－0014－06
**DOI**：10.19664/j.cnki.1002－2392.250003

大肠癌约占所有癌症的 10%，是导致癌症死亡的第二大原因[1]。大肠癌的传统治疗方法包括手术治疗、放化疗、靶向治疗等，近年来中医药治疗大肠癌的优势被逐渐发掘[2]。课题组前期研发的抗癌复方藤龙补中汤（专利号：ZL200910197565）治疗大肠癌疗效显著，通过体内外实验证明藤龙补中汤能够抑制大肠癌细胞的生长和转移，并能促进肿瘤细胞凋亡[3－4]。藤梨根和龙葵是藤龙补中汤中的君药，槲皮素（Quercetin，QCT）和木犀草素（Luteolin，LTL）分别为藤梨根和龙葵的主要成分之一[5－6]，本研究进一步探索槲皮素和木犀草素及其联合使用对大肠癌细胞增殖和凋亡的作用。

## 1　材料与方法

### 1.1　细胞株

小鼠 CT26 大肠癌细胞，购于中国科学院细胞库，培养于含 10% 胎牛血清，1% 双抗的 RPMI－1640 培养基，细胞培养箱 37 ℃、5% $CO_2$、饱和湿度条件下连续培养，取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2　药物与试剂

槲皮素（纯度 98.03%；货号：HY－18085；批号：114402）、木犀草素（纯度 99.01%；货号：HY－NO162；批号：107169）均购于美国 MCE 公司；RPMI－1640 培养基（货号：C11875500BT）、双抗（货号：15140－122）、胎牛血清（货号：10270－106）和 0.25% 胰蛋白酶（货号：25200－072）均购于美国 Gibco 公司；Cell Counting Kit－8（CCK－8）试剂盒（货号：C0039）、Caspase－3 活性检测试剂盒（货号：C1116）、Caspase－8 活性检测试剂盒（货号：C1152）、Caspase－9 活性检测试剂盒（货号：C1158）均购于碧云天公司；FITC Annexin Ⅴ Apoptosis Detection Kit Ⅰ细胞凋亡检测试剂盒（货号：556547）购于美国 BD 公司；β－连环蛋白（β－catenin，货号：51067－2－AP）、GAPDH 抗体（货号：60004－1－Ig）购于 proteintech 公司；Cyclin D1 抗体（货号：BS9827M）、Survivin 抗体（货号：BS1771）购于美国 Bioworld 公司；c－Myc 抗体（货号：18583）购于美国 CST 公司。

**收稿日期**：2024－01－26　　**修回日期**：2024－06－01
**基金项目**：国家自然科学基金项目（82074352）；龙华医院科技创新项目（CX202052）
**作者简介**：邬世威（1997－），男，硕士研究生，研究方向：中西医结合肿瘤基础与临床。
*通信作者：胡兵（1971－），男，博士，研究员，主任医师，博士生导师，研究方向：肿瘤生物学与抗癌中药作用及机制。

1.3 主要仪器

Forma Steri - Cycle i160 $CO_2$ 培养箱,美国 Thermo 公司;HYC - 391 4 ℃医用冷藏冰箱、DW - 25L262、-20 ℃医用冷藏冰箱,青岛海尔公司;TDL - 5C 低速台式离心机,中国安亭公司;Cellometer Auto1000 细胞计数仪,美国 Nexcelom 公司;Synergy HTX 酶标仪,美国 Bio Tek 公司;ChemiDoc MP 全能型成像系统、165 - 8000 蛋白垂直电泳系统,美国 Bio - Rad 公司;DxFLEX 流式细胞分析仪,美国 Beckman Coulter 公司;5804R 台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司。

1.4 CCK - 8 法检测细胞增殖

取处于对数生长期的 CT26 细胞,胰酶常规消化,每孔 $5 \times 10^3$ 细胞均匀接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,槲皮素组和木犀草素组分别加入 0、20、40、80、160、320、640、1 280 μmol/L 槲皮素和木犀草素,每个浓度 3 个复孔,药物作用 48 h 后,更换含 10% CCK - 8 试剂的培养基,孵育 2 h 后酶标仪 450 nm 处检测各孔光密度(OD)值,按公式计算细胞存活率,细胞存活率 = [(实验组 OD - 调零孔 OD)/(对照组 OD - 调零孔 OD)] × 100%。

检测槲皮素联合木犀草素对 CT26 细胞增殖的作用。通过计算得到槲皮素和木犀草素的 $IC_{50}$,取对数生长期的 CT26 细胞,常规胰酶消化,每孔均匀接种 $3 \times 10^3$ 细胞于 96 孔板并培养 24 h 后,槲皮素组、木犀草素组、联合组分别加入槲皮素($IC_{50}$)、木犀草素($IC_{50}$)、槲皮素($IC_{50}$)联合木犀草素($IC_{50}$),对照组加入等体积 DMSO,共 4 组,每组 3 个复孔,药物作用48 h 后,用 CCK - 8 法检测并计算细胞存活率。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 $2 \times 10^5$ 对数生长期的 CT26 细胞均匀接种于 6 孔板中,培养 24 h,槲皮素组、木犀草素组、联合组分别加入槲皮素、木犀草素、槲皮素联合木犀草素,对照组加入等体积 DMSO,作用 48 h,吸取细胞培养基,常规胰酶消化后收集细胞至细胞培养基,低速离心,弃上清,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用预先调配好的 1 × 结合缓冲液重悬细胞,调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^5$/mL,取 100 μL 细胞悬液,避光操作加入 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL PI,轻晃匀后避光室温孵育 15 min 后,每管加入 1 × 结合缓冲 400 μL,流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.6 酶底物试剂盒检测 Caspases 活性

将 $2 \times 10^5$ 对数生长期的 CT26 细胞均匀接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,槲皮素组、木犀草素组、联合组分别加入槲皮素、木犀草素、槲皮素联合木犀草素,对照组加入等体积 DMSO,作用 48 h 后,吸取细胞培养基,常规胰酶消化后收集细胞至细胞培养基,低速离心,弃上清,每孔细胞加入 200 μL 裂解液,重悬后冰上裂解 15 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,将蛋白上清转移到预冷离心管中,Bradford 法测定蛋白浓度。取 Caspase - 3 的底物 Ac - DEVD - pNA(2 mmol/L)、Caspase - 8 的底物 Ac - IETD - pNA(2 mmol/L)、Caspase - 9 的底物 Ac - LEHD - pNA(2 mmol/L),设置反应体系如下:检测缓冲 40 μL + 待测样品 50 μL + 底物 10 μL,按比例混匀后 37 ℃孵育 120 min,酶标仪检测 OD405 光密度。

1.7 Western blot 法检测相关蛋白表达水平

收取不同药物处理后的 CT26 细胞,加入配置好的 RIPA 裂解液,置于冰上裂解 30 min,随后用刮子将细胞刮入 EP 管,4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min,离心完成后,把上清转移到预冷的离心管中,采用 BCA 法测定蛋白样品中的蛋白浓度,加入上样缓冲液,100 ℃煮样 10 min,使蛋白变性。在 SDS - PAGE 凝胶中电泳,电转法将总蛋白质转移至 PVDF 膜,转膜完成后用快速封闭液封闭 15 min,加入一抗 β - catenin(1∶1 000)、c - Myc(1∶1 000)、Cyclin D1(1∶1 000)、Survivin(1∶1 000)、GAPDH(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入二抗(1∶10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 4 次,滴加化学发光检测试剂,全能成像系统扫描获得图像。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料采用单因素方差分析或 $t$ 检验比较组间差异,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

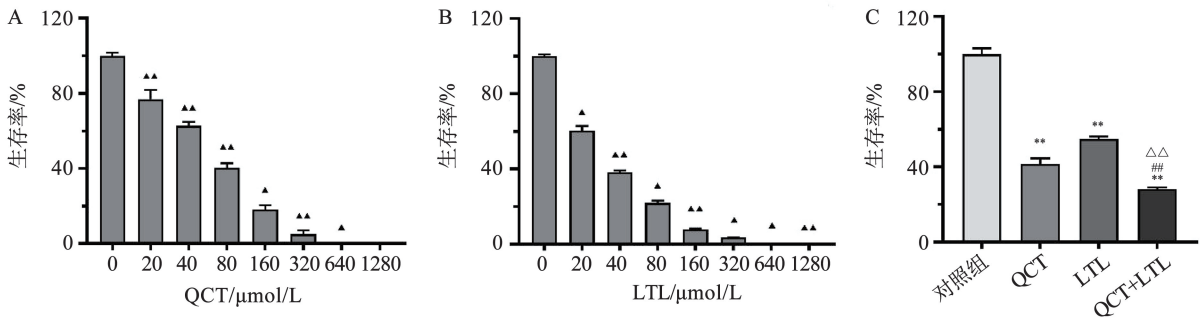
## 2 结果

2.1 对 CT26 细胞增殖的影响

采用 CCK - 8 法检测细胞增殖。结果显示槲皮素和木犀草素都能对 CT26 细胞增殖产生抑制作用,且药物浓度在 20 ~ 1 280 μmol/L 呈剂量依赖性($P < 0.05$,$P < 0.01$),图 1A,1B。槲皮素 $IC_{50}$ 为 57.59 μmol/L,木犀草素 $IC_{50}$ 为 27.97 μmol/L,两药联合对 CT26 细胞增殖的抑制作用显著优于单独用药组($P < 0.01$),图 1C。

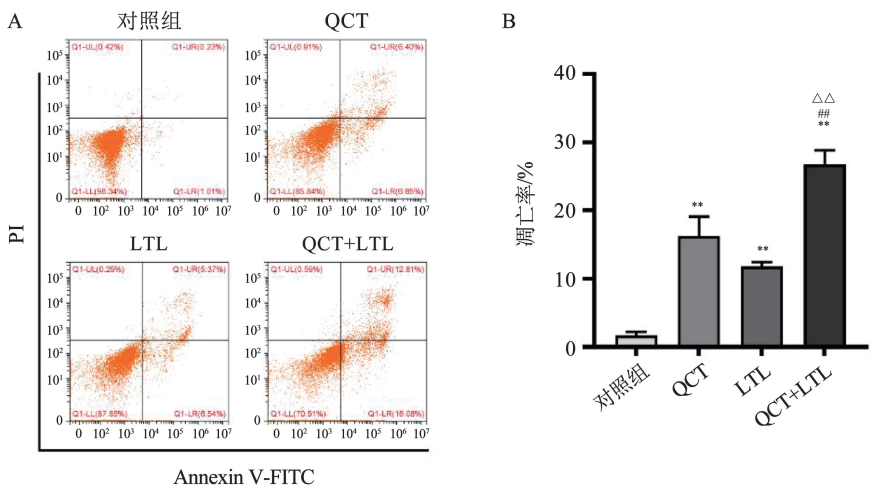
2.2 对 CT26 细胞凋亡的影响

结果显示,槲皮素和木犀草素都能促进 CT26 细胞凋亡,两药联合的促凋亡作用较单独用药更为明显($P < 0.01$),图 2。




注：A. 槲皮素对 CT26 细胞增殖的影响；B. 木犀草素对 CT26 细胞增殖的影响；C. 槲皮素（$IC_{50}$）联合木犀草素（$IC_{50}$）对 CT26 细胞增殖作用的影响。与 0 μmol/L 组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$；与对照组比较，**$P<0.01$；与槲皮素组（QCT）比较，##$P<0.01$；与木犀草素组（LTL）比较，△△$P<0.01$。

图 1　槲皮素、木犀草素及联合用药对细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$）




注：A. 流式细胞仪检测；B. 细胞凋亡分析。与对照组比较，**$P<0.01$；与槲皮素组（QCT）比较，##$P<0.01$；与木犀草素组（LTL）比较，△△$P<0.01$。

图 2　槲皮素联合木犀草素对 CT26 细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$）

## 2.3　对 CT26 细胞 Caspases 活性的影响

实验结果表明，槲皮素和木犀草素能够增加 CT26 细胞中 Caspase－3、Caspase－8 和 Caspase－9 的活性（$P<0.01$），槲皮素联合木犀草素较单独用药的作用显著增强（$P<0.05$，$P<0.01$），表 1。

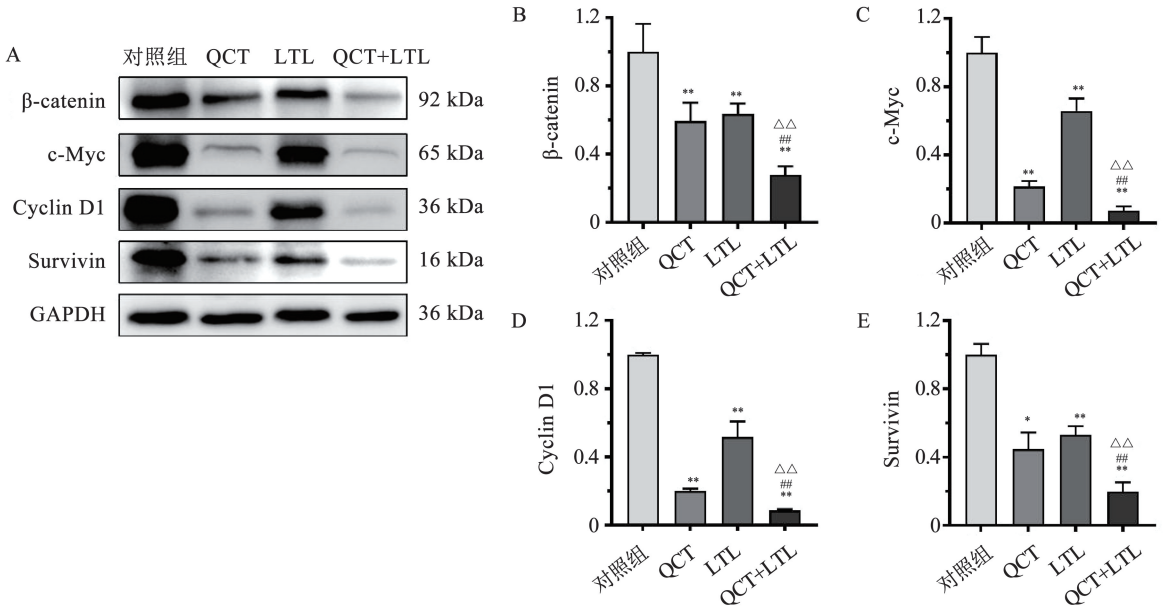
**表 1　槲皮素联合木犀草素对 CT26 细胞 Caspases 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**

| 组别 | Caspase－3 | Caspase－8 | Caspase－9 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 3.09 ± 0.53 | 0.34 ± 0.29 | 1.50 ± 0.29 |
| 槲皮素组 | 8.66 ± 2.38** | 2.15 ± 0.54** | 3.10 ± 0.62** |
| 木犀草素 | 10.44 ± 2.85** | 2.55 ± 0.58** | 4.95 ± 0.38** |
| 槲皮素联合木犀草素组 | 19.94 ± 4.22**△△## | 3.75 ± 0.48**△# | 6.39 ± 0.63**△# |

注：与对照组比较，**$P<0.01$；与槲皮素组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与木犀草素组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$。

## 2.4　对 β－catenin 及其靶基因表达影响

槲皮素和木犀草素能够降低 CT26 细胞中 β－catenin 蛋白的表达水平（$P<0.01$），槲皮素联合木犀草素对 CT26 细胞中 β－catenin 蛋白表达抑制作用显著强于单药作用（$P<0.01$）。槲皮素和木犀草素能够抑制 c－Myc、Cyclin D1 和 Survivin 的表达水平（$P<0.05$，$P<0.01$），槲皮素联合木犀草素对 c－Myc、Cyclin D1 和 Survivin 蛋白表达的抑制作用比单药更为明显（$P<0.05$，$P<0.01$），见图 3。




注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与槲皮素组（QCT）比较，$^{\#\#}P<0.01$；与木犀草素组（LTL）比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

图 3 槲皮素联合木犀草素对 CT26 细胞 β－catenin、c－Myc、Cyclin D1 及 Survivin 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

## 3 讨论

大肠癌在中医可以归为“癥瘕”“积聚”“肠覃”等范畴，多为正气不足，脾虚失运，湿热毒邪踞结于肠，久聚成积。藤龙补中汤君药藤梨根具有清热解毒、祛风除湿、利尿止血的功效，龙葵则能清热解毒，利水消肿。现代研究发现藤梨根富含多种三萜类、酚类、黄酮类化合物，龙葵中的主要活性成分则是甾体皂苷、生物碱、酚类和多糖，都具有广泛的药理活性，包括抗肿瘤、抗氧化、抗炎等，能够通过抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡、抗肿瘤转移等对大肠癌、肺癌、肝癌、胃癌等多种癌症起到治疗作用[7－10]。藤梨根的提取物能够抑制 c－Myc等信号通路，改善肠道菌群组成，调节免疫反应，对体内外大肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭产生抑制作用，促进大肠癌细胞凋亡，抑制大肠癌的进展[11－12]。龙葵的活性成分能够通过 Caspase 相关途径诱导大肠癌细胞凋亡，体内外抑制大肠癌细胞生长和转移、阻滞细胞周期，发挥治疗作用[13－14]。本课题组在前期研究中也发现，藤梨根可抑制大肠癌细胞的悬浮增殖和失巢凋亡；龙葵可抑制大肠癌细胞黏附、迁移和侵袭的能力[15－16]，为进一步阐明藤梨根和龙葵的抗大肠癌作用机制，本研究观察了二者主要活性成分的抗大肠癌作用。研究结果表明，藤梨根和龙葵的主要成分槲皮素、木犀草素，能够对大肠癌细胞增殖起到抑制作用，同时诱导细胞凋亡。

细胞增殖是指细胞分裂引起的细胞数量增加，是一个受到严格调控的过程，许多不同的蛋白质控制着细胞周期检查点。细胞基因突变导致持续的增殖信号，是肿瘤的重要标志之一。细胞凋亡是一种细胞程序性死亡，涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用，通过细胞凋亡清除肿瘤细胞是临床控制癌症的主要方法[17－19]。Caspase 家族在细胞凋亡中发挥着关键作用，活化 Caspase 信号会驱动细胞凋亡的程序性执行，其中 Caspase－3、Caspase－8、Caspase－9 与细胞凋亡关系密切[20]。Caspase－8 是死亡受体通路凋亡激活的标志性物质，Caspase－9 是线粒体通路凋亡激活的标志性物质，二者均可激活下游的 Caspase－3 从而诱发细胞凋亡。本研究结果显示槲皮素和木犀草素可以活化 Caspase－3、Caspase－8 和 Caspase－9，提示槲皮素和木犀草素可通过死亡受体和线粒体通路激发 CT26 大肠癌细胞凋亡。

β－catenin 作为一种多功能蛋白，广泛存在于各种类型的细胞，并且参与这些细胞的增殖、分化和凋亡等。经典的 Wnt/β－catenin 通路在成人肠道的腺体底部被激活，以维持肠道干细胞增殖。然而，Wnt/β－catenin 途径的失调在推动结肠癌细胞生长、侵袭和生存方面起着重要作用。在小鼠肠道肿瘤模型和人大肠癌癌细胞系中 β－catenin 表达的敲除，减少了大肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭，以及异种移植瘤的生长和小鼠转移瘤的形成，并且 β－catenin 的调控基因 Myc、Cyclin D1 等表达水平也明显降低。c－Myc、Cyclin D1、Survivin 等蛋白，在抑制细胞增殖和促进细胞凋亡中同样起着重要作用[21－24]。

c – Myc 属于 Myc 家族,是人类肿瘤中常见的激活癌蛋白之一,抑制 β – catenin/c – Myc 信号通路介导的糖酵解,靶向 c – Myc 能够有效抑制癌细胞的增殖,干预大肠癌的发生[25-28]。Cyclin D1 是细胞周期的重要调节因子,在决定细胞增殖失控的癌症发病机制中发挥重要作用。Cyclin D1 在癌组织中普遍过表达,是影响大肠癌预后的不良因素,激活 Cyclin D1 可促进大肠癌细胞的增殖[29-31]。Survivin 具有抑制细胞凋亡的作用,可能与其直接或间接抑制 Caspase 的能力有关。β – catenin 的表达增加了 Survivin 的表达,并对紫外线诱导的细胞凋亡具有保护作用。而抑制 Survivin 的表达,下调了 Bcl2 和 ki67 的表达水平,缩小了大肠癌移植裸鼠肿瘤的体积,并降低其重量,显著增强了对大肠癌细胞生长的抑制作用,并诱导了细胞凋亡[32-34]。本研究结果显示,槲皮素和木犀草素可抑制 β – catenin 及其下游靶基因 c – Myc、Cyclin D1 和 Survivin 表达,提示 β – catenin 通路可能参与槲皮素和木犀草素对大肠癌的作用。

本研究结果表明,槲皮素联合木犀草素对大肠癌细胞的增殖具有抑制作用,促进细胞凋亡,具有良好的抗肿瘤潜力,为进一步探讨槲皮素和木犀草素的抗大肠癌作用提供了依据;后续研究可考虑观察槲皮素和木犀草素体内抗肿瘤药理学、毒理学和成药性等。

综上,槲皮素和木犀草素能够抑制大肠癌 CT26 细胞增殖,诱导细胞凋亡,同时抑制 β – catenin 及其下游靶基因 c – Myc、Cyclin D1 和 survivin 的蛋白表达,并活化 Caspase – 3、Caspase – 8 和 Caspase – 9。槲皮素联合木犀草素使用能显著抑制大肠癌细胞增殖,促进细胞凋亡,对 β – catenin 及其下游靶基因表达和 Caspases 的作用明显优于单独用药。

**参考文献:**


[1] CIARDIELLO F, CIARDIELLO D, MARTINI G, et al. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(4): 372 – 401.

[2] WANG K L, CHEN Q, SHAO Y Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis[J]. Biomedecine Pharmacother, 2021, 133: 111044.

[3] 李淼,王双双,郑佳露,等. 藤龙补中汤对 SW620 大肠癌转移和 Wnt/β – catenin 通路蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(7): 4083 – 4085.

[4] 黄晓伟,郑佳露,王双双,等. 藤龙补中汤对 CT26 大肠癌细胞生长和凋亡的作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 165 – 168.

[5] 邬世威,陈锦芳,胡兵. 藤梨根抗癌成分及其作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(5): 160 – 163.

[6] CHEN J F, WU S W, SHI Z M, et al. Exploring the components and mechanism of *Solanum nigrum* L. for colon cancer treatment based on network pharmacology and molecular docking[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1111799.

[7] WANG L Y, HOU J Y, WANG J X, et al. Regulatory roles of HSPA6 in Actinidia chinensis Planch. root extract (acRoots) – inhibited lung cancer proliferation[J]. Clin Transl Med, 2020, 10(2): e46.

[8] GAO Z W, DENG G H, LI Y J, et al. Actinidia chinensis Planch prevents proliferation and migration of gastric cancer associated with apoptosis, ferroptosis activation and mesenchymal phenotype suppression[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 126: 110092.

[9] CHEN X F, DAI X F, LIU Y H, et al. Solanum nigrum linn.: an insight into current research on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 918071.

[10] NAWAZ A, JAMAL A, ARIF A, et al. *In vitro* cytotoxic potential of *Solanum nigrum* against human cancer cell lines[J]. Saudi J Biol Sci, 2021, 28(8): 4786 – 4792.

[11] HUANG J B, JIANG T, KANG J Y, et al. Synergistic effect of Huangqin Decoction combined treatment with *Radix Actinidiae chinensis* on DSS and AOM – induced colorectal cancer[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 933070.

[12] HU W L, WU C C, YUAN C C, et al. Ethanol extracted from *Radix* of *Actinidia chinensis* inhibits human colon tumor through inhibiting notch – signaling pathway[J]. J Cancer, 2021, 12(3): 622 – 629.

[13] YAN X, LI M, CHEN L, et al. α – Solanine inhibits growth and metastatic potential of human colorectal cancer cells[J]. Oncol Rep, 2020, 43(5): 1387 – 1396.

[14] NI X F, CHEN J J, LU F Y, et al. Anti – cancer effect of α – solanine by down – regulating S100P expression in colorectal cancer cells[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2018, 13(2): 240 – 247.

[15] 胡兵,沈克平,史秀峰,等. 藤梨根对 RKO 结肠癌细胞失巢凋亡的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 242 – 245.

[16] 胡兵,安红梅,沈克平,等. 龙葵对人结肠癌 RKO 细胞粘附、移动和侵袭的影响[J]. 中药材, 2013, 36(6): 958 – 961.

[17] HANAHAN D. Hallmarks ofcancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31 – 46.

[18] KASHYAP D, GARG V K, GOEL N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: role in cancer development and prognosis[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021, 125: 73 – 120.

[19] CARNEIRO B A, EL – DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(7): 395 – 417.

[20] KESAVARDHANA S, SUBBARAO MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 567 – 595.

[21] BIAN J, DANNAPPEL M, WANC H, et al. Transcriptional regulation of Wnt/β – catenin pathway in colorectal cancer[J]. Cells, 2020, 9(9): 2125.

[22] PENGK S, KOU L L, YU L, et al. Histone demethylase JMJD2D interacts with β – catenin to induce transcription and activate colorectal cancer cell proliferation and tumor growth in mice[J]. Gastroenterology, 2019, 156(4): 1112 – 1126.

[23] ZHANG Y, WANG X. Targeting the Wnt/β – catenin signaling pathway in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 165.

[24] YU F Y, YU C H, LI F F, et al. Wnt/β-catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 307.
[25] DHANASEKARAN R, DEUTZMANN A, MAHAUAD-FERNANDEZ W D, et al. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(1): 23-36.
[26] FATMA H, MAURYA S K, SIDDIQUE H R. Epigenetic modifications of c-MYC: role in cancer cell reprogramming, progression and chemoresistance[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 83: 166-176.
[27] WANG H B, YANG W J, QIN Q, et al. E3 ubiquitin ligase MAGI3 degrades c-Myc and acts as a predictor for chemotherapy response in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 151.
[28] FANG Y, SHEN Z Y, ZHAN Y Z, et al. CD36 inhibits β-catenin/c-Myc-mediated glycolysis through ubiquitination of GPC4 to repress colorectal tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3981.
[29] MONTALTO F I, AMICISF D. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J]. Cells, 2020, 9(12): 2648.
[30] JUN S Y, KIM J, YOON N, et al. Prognosticpotential of cyclin D1 expression in colorectal cancer[J]. J Clin Med, 2023, 12(2): 572.
[31] ZHU X J, LUO C, LIN K, et al. Overexpression of DJ-1 enhances colorectal cancer cell proliferation through the cyclin-D1/MDM2-p53 signaling pathway[J]. Biosci Trends, 2020, 14(2): 83-95.
[32] SHOJAEI F, YAZDANI-NAFCHI F, BANITALEBI-DEHKORDI M, et al. Trace of survivin in cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 2019, 28(4): 365-372.
[33] MARTÍNEZ-GARCÍA D, MANERO-RUPÉREZ N, QUESADA R, et al. Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer[J]. Med Res Rev, 2019, 39(3): 887-909.
[34] CAI Y P, MA W, HUANG X J, et al. Effect of survivin on tumor growth of colorectal cancer in vivo[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 13267-13272.

# Effects of Quercetin Combined with Luteolin on Colorectal Cancer Cell Apoptosis and β-catenin and its Target Genes

WU Shiwei, CHEN Jinfang, SHI Ziman, HU Bing

(*Department of Oncology, Institute of Traditional Chinese Medicine in Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 200032, *China*)

**Abstract** Objective: To investigate the effects and mechanisms of quercetin and luteolin, both individually and in combination, on the proliferation and apoptosis of CT26 colorectal cancer cells. Methods: CT26 cells were treated with equal volumes of DMSO (control group), quercetin (quercetin group), luteolin (luteolin group), and a combination of quercetin and luteolin (combined group). Cell proliferation was assessed using the CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay. Cell apoptosis was detected by Annexin-FITC/PI double staining and flow cytometry. Caspase activities were measured using enzyme substrate kits. The protein expression levels of β-catenin and its downstream targets c-Myc, Cyclin D1, and Survivin were analyzed by Western blot. Results: Compared with the control group, treatment with quercetin and luteolin inhibited the proliferation of CT26 cells and induced apoptosis, accompanied by increased activities of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9. Furthermore, the treatments inhibited the expression of β-catenin, c-Myc, Cyclin D1, and Survivin proteins ($P<0.05$, $P<0.01$). The combination of quercetin and luteolin enhanced these effects on CT26 cells. Conclusion: Quercetin and luteolin inhibit the growth of CT26 colorectal cancer cells and induce apoptosis. The combined effect of these two agents is significantly greater than that of each agent alone. The mechanism is related to the downregulation of β-catenin, c-Myc, Cyclin D1, and Survivin expression, and the activation of Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9.

**Key words** Quercetin; Luteolin; Colorectal cancer; Cell proliferation; Cell apoptosis; β-catenin