·论著·一次研究·

靶向Nrf2协同异鼠李素抗乳腺癌的作用及机制研究

范东伟，王兴亮，方　俊，黄　诚

皖西卫生职业学院附属医院普外一科（安徽六安 237000）

【摘要】**目的** 探讨异鼠李素（ISO）对乳腺癌细胞活力和凋亡的影响及其作用机制。**方法** CCK-8实验检测ISO对MDA-MB-231细胞增殖活性的影响并计算半数抑制浓度（IC_{50}）；平板克隆形成和流式细胞术实验检测细胞增殖和凋亡；微阵列测序及生物信息学分析ISO处理后细胞差异表达基因及相关生物学功能。DCFH-DA荧光探针检测细胞内活性氧（ROS）水平，并测定丙二醛（MDA）与谷胱甘肽（GSH）含量；qRT-PCR及Western Blot检测Keap1-Nrf2信号通路蛋白表达；利用siRNA构建Nrf2干扰的MDA-MB-231细胞模型，ISO处理后观察上述指标的变化。**结果** ISO呈浓度依赖性抑制MDA-MB-231细胞活性（IC_{50}值为23.38 μmol/L），同时降低细胞增殖能力并诱导细胞凋亡。测序分析显示ISO的生物学功能与Keap1-Nrf2信号通路密切相关。ISO处理可显著升高MDA-MB-231细胞内ROS及MDA水平，并降低GSH含量；下调Keap1 mRNA和蛋白表达水平，并上调Nrf2、HO-1、GCLM及NQO1 mRNA和蛋白表达。敲低Nrf2联合ISO处理可进一步增强ROS积累，抑制细胞增殖，促进细胞凋亡，并削弱ISO对Keap1-Nrf2信号通路的激活作用。**结论** ISO通过诱导ROS积累抑制乳腺癌细胞恶性进展，但同时激活Keap1-Nrf2信号以削弱其细胞毒性。靶向抑制Nrf2能有效瓦解该防御机制，通过促进ROS积累协同增强ISO的抗肿瘤效应。

【关键词】异鼠李素；乳腺癌；活性氧；Nrf2；氧化应激

【中图分类号】R737.9　　【文献标识码】A

Synergistic effect of targeting Nrf2 in combination with isorhamnetin against breast cancer and its mechanism

FAN Dongwei, WANG Xingliang, FANG Jun, HUANG Cheng

Department of General Surgery Ward I, Affiliated Hospital of West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237000, Anhui Province, China

Corresponding author: HUANG Cheng, Email: huangcheng@wahvc.edu.cn

【Abstract】**Objective** To investigate the effects of isorhamnetin (ISO) on the viability and apoptosis of breast cancer cells and the underlying mechanisms. **Methods** The CCK-8 assay was used to evaluate the effect of ISO on the proliferative activity of MDA-MB-231 cells and to calculate the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Plate colony formation assay and flow cytometry were performed to detect cell proliferation and apoptosis. Microarray sequencing and bioinformatics analysis were conducted to identify differentially expressed genes and related biological functions after ISO treatment. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured using the DCFH-DA fluorescent probe, and the contents of malondialdehyde (MDA)

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202601163

基金项目：蚌埠医科大学科技项目（2024byzd261）；安徽省教育厅高校自然科学项目（2025AHGXZK30300）；安徽省卫生健康科研项目（AHWJ2023A30031）；六安市科技计划项目（2024lakjey20、2024lakjey09）

通信作者：黄诚，教授，主任医师，Email：huangcheng@wahvc.edu.cn

and glutathione (GSH) were determined. The expression of proteins in the Keap1-Nrf2 signaling pathway was assessed by qRT-PCR and Western Blot. An Nrf2-knockdown MDA-MB-231 cell model was established using siRNA, and the above indicators were re-evaluated following ISO treatment. **Results** ISO inhibited the viability of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner (IC_{50} = 23.38 μmol/L), reduced cell proliferation, and induced apoptosis. Sequencing analysis revealed that the biological functions affected by ISO were closely associated with the Keap1-Nrf2 signaling pathway. ISO treatment significantly increased intracellular ROS and MDA levels and decreased GSH content in MDA-MB-231 cells. It downregulated Keap1 mRNA and protein expression while upregulating the mRNA and protein expression of Nrf2, HO-1, GCLM, and NQO1. Knockdown of Nrf2 combined with ISO treatment further enhanced ROS accumulation, inhibited cell proliferation, promoted apoptosis, and weakened the activation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway by ISO. **Conclusion** ISO inhibits the malignant progression of breast cancer cells by inducing ROS accumulation, but simultaneously activates the Keap1-Nrf2 signaling pathway to attenuate its cytotoxicity. Targeted inhibition of Nrf2 effectively dismantles this defense mechanism, synergistically enhancing the antitumor effect of ISO by promoting ROS accumulation.

【Keywords】Isorhamnetin; Breast cancer; Reactive oxygen species; Nrf2; Oxidative stress

乳腺癌发病率在女性恶性肿瘤中位居首位，发病数占全球女性癌症病例的25%，癌症相关死亡占比约16.7%，已成为威胁全球女性健康的重大公共卫生挑战[1]。早期乳腺癌预后良好，多数患者可获得治愈，但转移性或晚期患者面临药物耐药、肿瘤免疫逃逸及缺乏有效治疗靶点等挑战，患者5年生存率仅31%[2-4]。

现有研究表明，黄酮类化合物是一类具有多样酚类结构的天然物质，广泛存在于水果、蔬菜和草药中，且在乳腺癌中展现出显著抗肿瘤活性[5]。异鼠李素（isorhamnetin，ISO）是一种从石斛、银杏叶、沙棘等植物中提取的黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗骨质疏松、抗菌及抗病毒等多种药理活性[6]。研究表明，ISO对乳腺癌的抑制作用与细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）的调控密切相关。一方面，ISO可通过上调细胞内ROS水平，将乳腺癌细胞周期阻滞于S期，有效抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡，进而发挥抗肿瘤效应[7]；另一方面，ISO能通过ROS介导的DNA损伤反应，激活AMPK信号、抑制mTOR/p70S6K信号通路，诱发乳腺癌细胞G2/M期周期阻滞与凋亡，逆转乳腺癌细胞对阿霉素的耐药特性[8]。此外，当ISO与自噬抑制剂氯喹联合使用时，可通过ROS介导的CaMKII/Drp1信号通路诱导线粒体过度分裂，实现对癌细胞的选择性杀伤[9]。目前，ISO介导ROS调控乳腺癌发生发展的具体机制仍缺乏系统性、深层次的探究。鉴于此，本研究聚焦ROS及其下游效应分子，深入剖析其介导ISO抗乳腺癌的具体作用机制，旨在为乳腺癌临床辅助治疗提供全新的理论依据与干预思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂：ISO（HPLC ≥ 98%，B21554）购自上海源叶生物科技有限公司；N-乙酰半胱氨酸（N-acetyl-L-cysteine，NAC）（纯度 > 99%，S0077）、CCK-8试剂盒（C0037）、ROS检测试剂盒（S0033S）、RIPA裂解液（P0013D）、BCA蛋白浓度测定试剂盒（P0010）、ECL化学发光试剂盒（P0018S）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；胎牛血清（A5256701）、DMEM培养基（11965092）、青霉素-链霉素（15140148）、Lipofectamine™ 3000转染试剂（L3000001）购自美国Gibco公司；磷酸盐缓冲盐水（phosphate buffered saline，PBS）（G4202）、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒（G1511）、TBST缓冲液（G0004）、siRNA-Nrf2（siNrf2）及阴性对照siRNA-NC（siNC）、PCR引物购自武汉赛维尔生物科技有限公司；丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量检测试剂盒（BC6415）、还原型谷胱甘肽（glutathione，GSH）含量检测试剂盒（BC1175）购自北京索莱宝科技有限公司；RNA-easy提取试剂（R701-01）、HiScript Ⅱ Q RT荧光定量PCR通用混合液（R223-01）、ChamQ通用SYBR qPCR预混液（Q711-02）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公

司：Keap1（10503-2-AP）、HO-1（10701-1-AP）、NQO1（11451-1-AP）抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；Nrf2（A0674）、GCLM（A11444）抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；GAPDH（ab8245）、Histone H3（ab1791）抗体、山羊抗兔IgG-HRP二抗（ab6721）购自美国Abcam公司。

主要仪器：酶标仪（Infinite F50）购自瑞士Tecan公司；数码相机（EOS R7）购自日本佳能公司；流式细胞仪（NovoCyte 2060R）购自艾森生物（杭州）有限公司；StepOnePlus™实时定量PCR仪（Step one plus）购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 细胞来源与培养

人乳腺癌细胞系MDA-MB-231购自中科院上海细胞库，培养于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基。将细胞置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中培养48~72 h进行传代，选取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3 CCK-8实验

取对数生长期细胞，消化后重悬，以5×10^3/孔的密度接种于96孔板中，在37 ℃、5% CO_2的培养箱中孵育24 h后，更换为含不同浓度ISO（0、1、5、10、20、50和100 μmol/L）的培养基，以仅含有细胞及培养基的孔作为对照组，以不含细胞仅添加细胞培养基的孔作为空白组，每组设置3个复孔。培养48 h后，向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液，在培养箱中继续孵育1 h。使用酶标仪在450 nm处测量吸光度（OD），计算细胞活力和半数抑制浓度（IC_{50}）。细胞活力（%）=［（$OD_{实验组}$-$OD_{空白组}$）/（$OD_{对照组}$-$OD_{空白组}$）］×100%。

1.4 平板克隆形成实验

将细胞以500个/孔接种在6孔板中，每组设置3个复孔。在培养箱中连续培养14 d，期间每3 d更换一次培养基。培养结束后，使用PBS洗涤3次，加入4%多聚甲醛固定20 min，0.1%结晶紫溶液染色15 min。再次洗涤、风干后使用数码相机拍照并用Image J软件计数克隆细胞数量并计算克隆形成率。克隆形成率（%）=克隆细胞数/接种细胞数×100%。

1.5 流式细胞术

将细胞以1×10^6/孔接种于6孔板中。孵育24 h后，按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书，用PBS洗涤后，将细胞重悬于1×结合缓冲液中，然后加入5 μL Annexin V/FITC和5 μL碘化丙啶溶液，在室温下避光孵育15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 mRNA微阵列和生物信息学分析

使用ISO处理MDA-MB-231细胞48 h后，使用RNA-easy提取试剂提取细胞总RNA，制备RNA样品，在Illumina HiSeq平台上进行全基因组测序。根据测序结果，使用R 4.5.2软件中的limma包分析差异表达基因，筛选标准为$|Log_2FC|>1$且$P<0.05$，并使用ggplot2包绘制火山图。在Enrichr数据库（http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/）中对差异表达基因进行基因本体论（gene ontology，GO）、京都基因和基因组（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）和WikiPathway信号通路分析，并使用R4.5.2软件的ggplot2、gground和tidyverse包对结果进行可视化分析。

1.7 细胞转染和分组

取对数生长期细胞，消化后以2×10^5个/孔接种于6孔板中，当细胞汇合度达到80%时，使用Lipofectamine™ 3000转染试剂分别将siNrf2或siNC转染至细胞，在37℃、5% CO_2下培养48 h后，收获瞬时转染细胞，并验证转染效率。siNrf2序列见附件表1。

1.8 ROS检测

将细胞以10^5个/孔接种于6孔板中，根据处理方式分为NC组、ISO组、NC + NAC（5 mmol/L[10]）组以及ISO + NAC组。处理细胞48 h后，按照ROS检测试剂盒说明，收获细胞并加入10 μmol/L DCFH-DA，37 ℃下避光孵育20 min，随后用无血清培养基洗涤3次以去除细胞外DCFH-DA。使用流式细胞仪检测各组细胞荧光强度，以量化细胞内ROS水平。

1.9 MDA和GSH检测

将细胞以10^5个/孔接种于6孔板中，ISO处理48 h后吸出培养基，通过反复冻融方式裂解细胞，按照MDA含量检测试剂盒和GSH含量检测试剂盒说明书检测细胞内MDA和GSH含量。

1.10 qRT-PCR

使用RNA-easy提取试剂提取细胞总RNA，随后用HiScript II Q RT荧光定量PCR通用混合液将RNA逆转录为cDNA，将ChamQ通用SYBR qPCR预混液及特异性引物在StepOnePlus™实时定量PCR仪中行qRT-PCR检测目的基因表达。反

应程序：95℃预变性 30 s，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火与延伸 30 s，共循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 的表达，以 GAPDH 作为归一化内参，引物序列见附件表 2。

1.11 Western Blot

使用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取总蛋白，随后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白质含量。每孔取 20 μg 蛋白质上样，通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质样品并转移到 PVDF 膜上。用 TBST 缓冲液洗涤后，室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h，再使用 TBST 洗涤膜后，分别加入以下一抗并在 4℃下孵育过夜：Keap1（1∶2 000）、Nrf2（1∶1 000）、HO-1（1∶5 000）、GCLM（1∶1 000）、NQO1（1∶1 000）、GAPDH（1∶5 000）及 Histone H3（1∶1 000）。TBST 洗涤后加入二抗（1∶3 000）在室温下继续孵育 2 h，通过 ECL 化学发光试剂盒可视化蛋白免疫反应条带，Image J 软件用于分析条带中目的蛋白相对表达量。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析，GraphPad Prism 10.1.2 软件制图。本研究所有体外实验均进行 3 次独立的重复实验，所有数据以均数和标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 ISO 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响

CCK-8 实验结果显示，5、10、20、50 和 100 μmol/L 的 ISO 显著抑制 MDA-MB-231 细胞的活力（图 1-A），MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} 值为 23.38 μmol/L（图 1-B）。基于初步结果，选择 10、20 和 30 μmol/L 作为后续实验的 ISO 浓度。

2.2 ISO 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

为探索 ISO 对乳腺癌细胞增殖能力的影响，使用平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。结果显示，与 0 μmol/L 相比，20 和 30 μmol/L ISO 显著抑制细胞克隆形成率（图 2-A）。随后，通过流式细胞术实验检测 ISO 对乳腺癌细胞凋亡能力的影响，结果显示，与 0 μmol/L 相比，10、20 和 30 μmol/L ISO 组细胞凋亡水平均显著升高（图 2-B）。

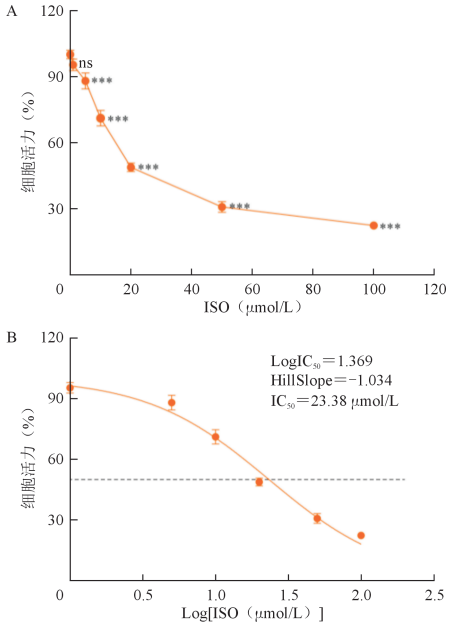


图 1 ISO 对乳腺癌细胞活力的影响

Figure 1. Effects of ISO on the viability of breast cancer cells

注：A.MDA-MB-231 细胞经不同浓度 ISO 处理 48 h 后的细胞活力；B.MDA-MB-231 细胞经不同浓度 ISO 处理 48 h 后的 IC_{50} 拟合曲线；与对照组（0 μmol/L 组）相比，$^{ns}P > 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

2.3 生物信息学分析结果

微阵列测序分析共筛选出 821 个差异表达基因，其中 359 个基因被 ISO 促进表达，462 个基因被抑制（图 3-A）。对筛选出的基因进行富集分析，GO 结果显示，生物过程、细胞组成和分子功能分别主要富集于细胞外基质组织、含胶原蛋白的细胞外基质及蛋白酪氨酸激酶激活剂活性等信号中（图 3-B 至 3-D）。KEGG 通路分析结果显示上述差异表达基因主要富集于细胞周期、Keap1-Nrf2 信号通路及 GSH 代谢等信号中（图 3-E）。WikiPathway 通路分析结果显示上述差异表达基因主要富集于 PPAR 信号通路、植物化学物诱导的 Nrf2 转录激活及癌症通路等信号中（图 3-F）。提示 ISO 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖和侵袭的潜在机制可能与细胞内氧化还原平衡有关。

2.4 ISO 诱导 ROS 积累并激活 Keap1-Nrf2 信号

本研究使用 ROS 清除剂 NAC 对 MDA-MB-231 细胞进行干预。流式细胞术结果显示，与 NC 组相比，ISO 组细胞 ROS 水平显著升高，单独 NAC 干预 ROS 水平无明显改变；ISO + NAC 联合干预组细胞 ROS 水平较 ISO 组显著下降（图 4-A 和 4-B）。CCK-8 结果显示，与 NC 组相比，ISO

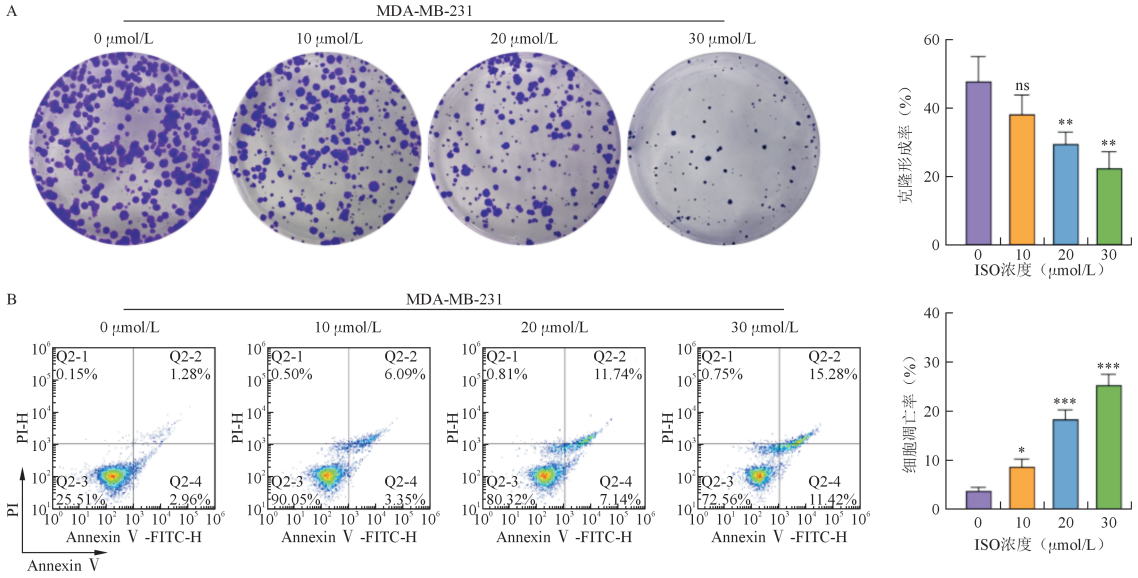


图2 ISO对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

Figure 2. Effects of ISO on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells

注：A. 不同浓度ISO对MDA-MB-231细胞克隆形成能力的影响与定量分析；B. 不同浓度ISO对MDA-MB-231细胞凋亡的影响与定量分析；与0 μmol/L相比，$^{ns}P>0.05$，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

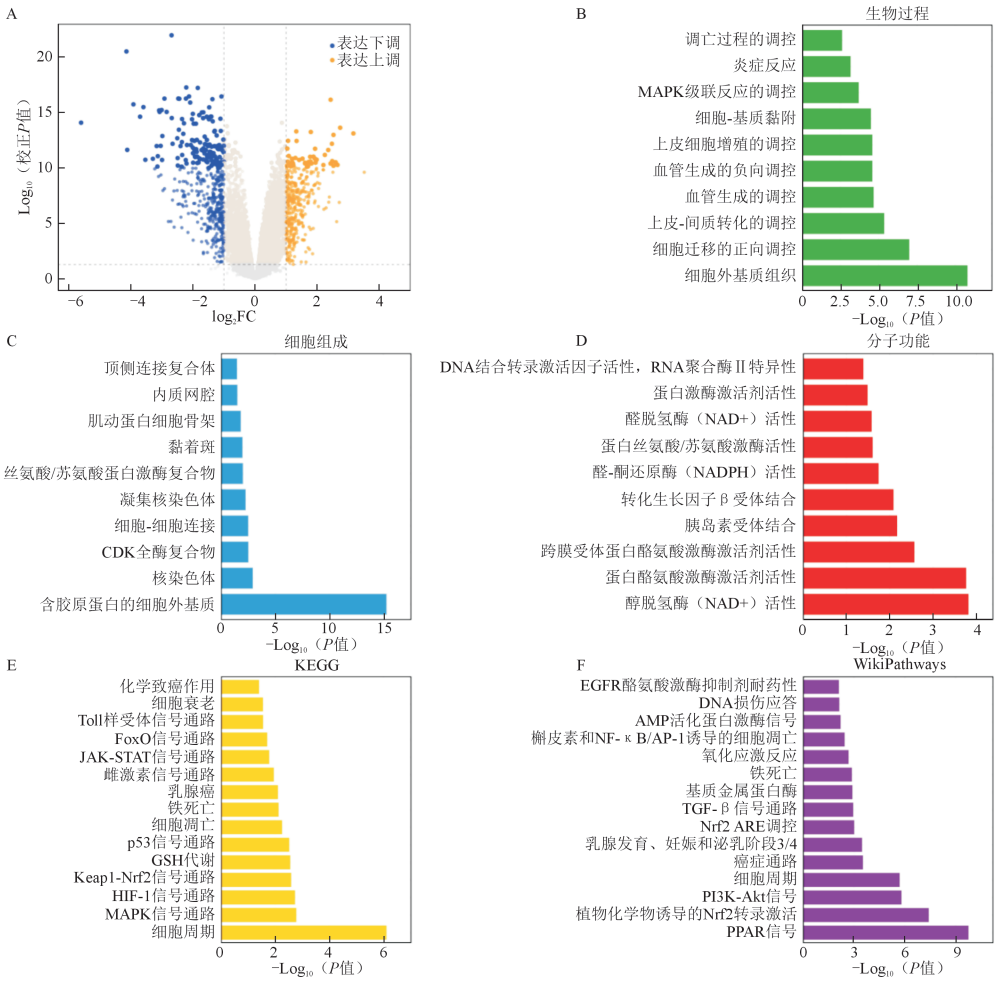


图3 ISO相关差异表达基因的功能富集分析结果

Figure 3. Functional enrichment analysis of ISO-related differentially expressed genes

注：A. ISO（ISO浓度为23.38 μmol/L）处理MDA-MB-231细胞前后差异表达基因火山图；B-D. GO富集分析结果；E. KEGG富集分析结果；F. WikiPathway富集分析结果。

组细胞活力显著降低，单独NAC处理对细胞活力无显著影响；ISO + NAC组细胞活力较ISO组明显回升（图4-C）。与0 μmol/L相比，10、20和30 μmol/L ISO使MDA-MB-231细胞中MDA含量显著升高，GSH含量显著下降，且呈浓度依赖性趋势（图4-D和4-E）。

qRT-PCR和Western Blot结果显示，与0 μmol/L相比，20和30 μmol/L ISO组细胞中Keap1 mRNA和蛋白表达水平显著降低，而Nrf2、HO-1、GCLM和NQO1 mRNA和蛋白表达水平显著升高（图4-F和4-G）。

2.5 敲低Nrf2增强ISO抗乳腺癌作用

为探究Nrf2在ISO抑制乳腺癌进展中的潜在作用，采用siNrf2转染MDA-MB-231细胞。qRT-PCR结果显示siNrf2#3敲低Nrf2效果更佳，后续实验均选用siNrf2#3进行（图5-A）。CCK-8与平板克隆形成实验结果显示，siNC + ISO组细胞活力和克隆形成率低于siNC组，siNrf2 + ISO组细胞活力和克隆形成率低于siNC + ISO组和siNrf2组（图5-B和5-C）。流式细胞术结果显示，siNC + ISO组细胞凋亡率高于siNC组，siNrf2 + ISO组细胞凋亡率高于siNC + ISO组和siNrf2组（图5-D）。

2.6 敲低Nrf2促进ISO诱导ROS积累并部分抑制Keap1-Nrf2信号

相较于siNC组，siNC+ISO组细胞ROS、MDA水平上升，GSH含量减少；siNrf2 + ISO组ROS、MDA水平显著高于siNC + ISO组与siNrf2组，GSH含量则显著低于2组（图6-A至6-D）。qRT-PCR和Western Blot结果显示，与siNC组相比，siNC + ISO组Keap1 mRNA和蛋白表达显著降低，Nrf2、HO-1、GCLM及NQO1 mRNA和蛋白表达显著升高；与siNC + ISO组相比，siNrf2 + ISO组Keap1 mRNA和蛋白表达显著升高，上述抗氧化相关分子mRNA和蛋白表达显著降低；与siNrf2组相比，siNrf2 + ISO组Keap1 mRNA和蛋白表达显著降低，Nrf2及其下游靶分子表达显著升高（图6-E和6-F）。提取各组MDA-MB-231细胞核蛋白后，Western Blot结果显示，与siNC组相比，siNC + ISO组细胞核蛋白内Nrf2表达升高，siNrf2组细胞核蛋白内Nrf2表达降低；且siNrf2 + ISO组细胞核蛋白内Nrf2表达介于siNC + ISO组与siNrf2组之间（图6-G）。

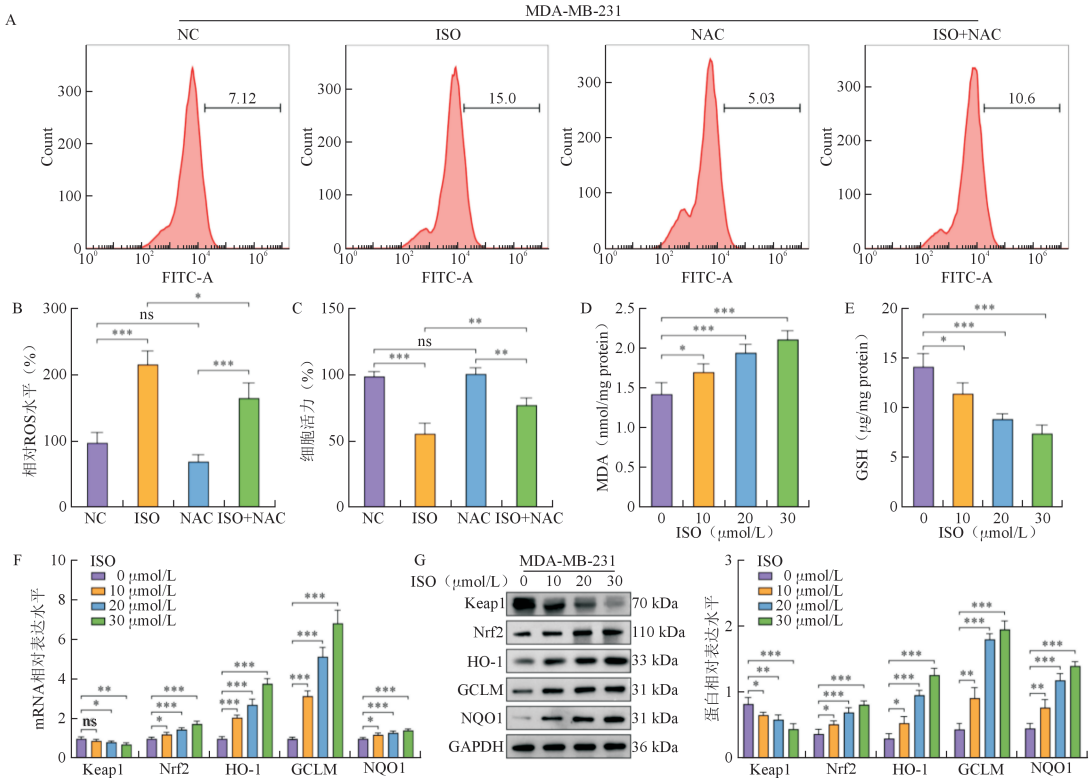


图4 ISO对乳腺癌细胞中ROS水平及Keap1-Nrf2信号通路的影响

Figure 4. Effects of ISO on ROS levels and Keap1-Nrf2 signaling pathway in breast cancer cells

注：A、B.ISO联合NAC对MDA-MB-231细胞ROS水平的影响与定量分析；C.ISO联合NAC对MDA-MB-231细胞活力的影响；D、E.不同浓度ISO对MDA-MB-231细胞中MDA、GSH含量的影响；F、G.不同浓度ISO对MDA-MB-231细胞中Keap1、Nrf2、HO-1、GCLM和NQO1 mRNA及蛋白表达的影响；图A-C中ISO浓度为23.38 μmol/L，NAC浓度为5 mmol/L；$^{ns}P > 0.05$，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

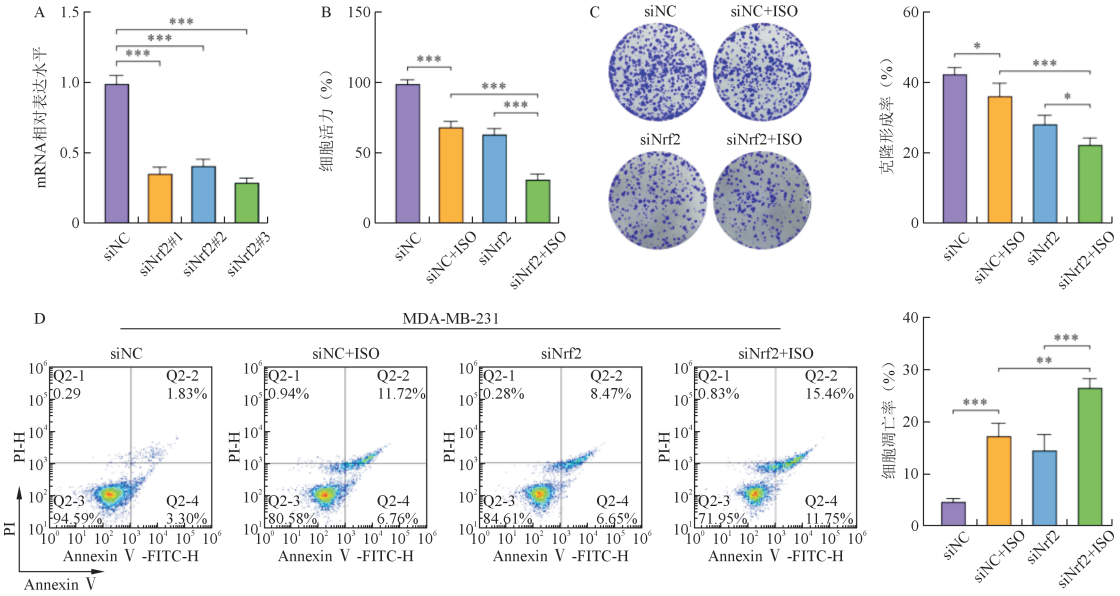


图5 敲低 Nrf2 联合 ISO 处理对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

Figure 5. Effects of Nrf2 knockdown combined with ISO treatment on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells

注：A.qRT-PCR 验证 Nrf2 敲低效果；B. 敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响；C. 敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响与定量分析；D. 敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞凋亡能力的影响及定量分析；ISO 浓度为 23.38 μmol/L；$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

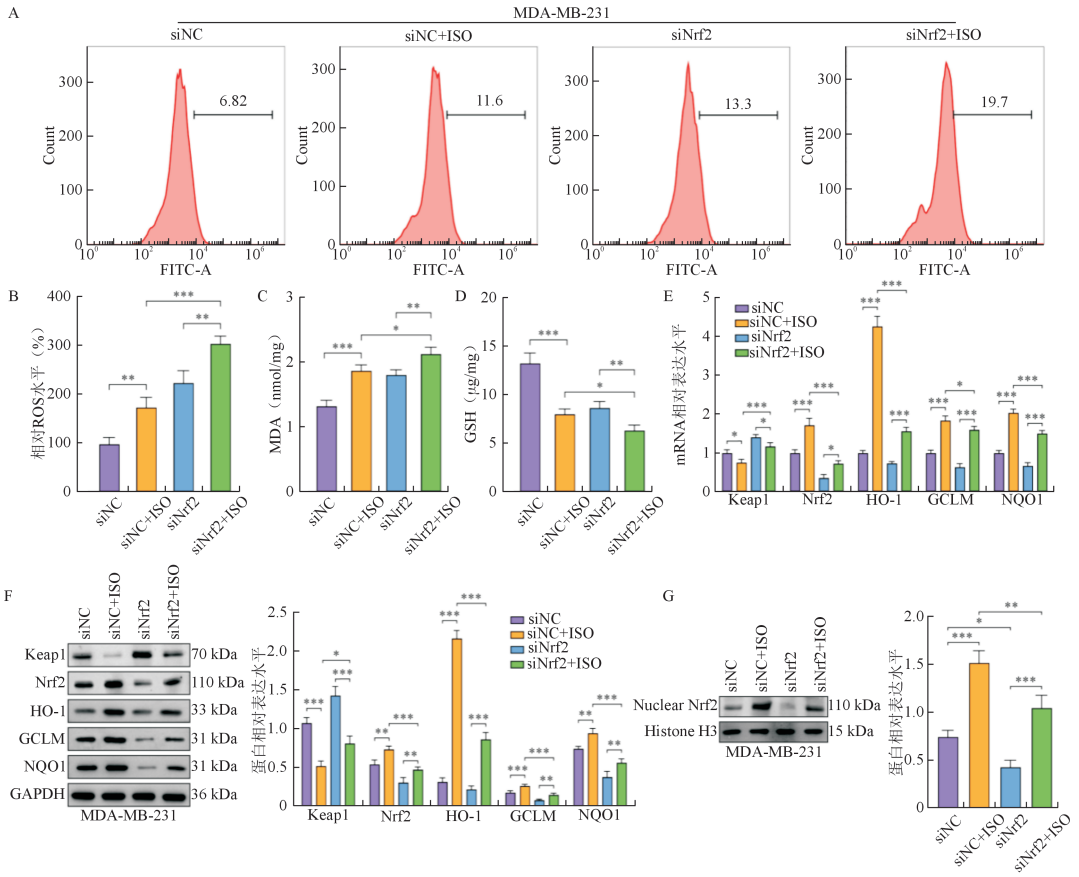


图6 敲低 Nrf2 促进 ISO 诱导 ROS 积累并部分抑制 Keap1-Nrf2 信号

Figure 6. Knockdown of Nrf2 promotes ISO-induced ROS accumulation and partially inhibits the Keap1-Nrf2 signaling

注：A、B. 敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞 ROS 水平的影响与定量分析；C、D. 敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞中 MDA、GSH 含量的影响；E、F.qRT-PCR 和 Western Blot 检测敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞中 Keap1、Nrf2、HO-1、GCLM 和 NQO1 mRNA 及蛋白表达影响；G.Western Blot 检测敲低 Nrf2 联合 ISO 对 MDA-MB-231 细胞核蛋白中 Nrf2 表达的影响；ISO 浓度为 23.38 μmol/L；$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

3 讨论

乳腺癌起病隐匿，早期临床表现不具备特异性，当病情进展至中晚期，易发生肿瘤转移，预后较差[11]。手术、放化疗、靶向及免疫治疗已广泛应用于临床，但患者晚期生存状况仍未得到根本改善。据统计，约20%~30%的原发性乳腺癌患者在确诊后2年内出现复发或转移，远处转移患者5年生存率仅为23%[12]。导致这一困境的核心原因在于肿瘤异质性和耐药性，提示现有治疗策略存在明显局限，亟需开发新型、高效的抗肿瘤药物[3-4]。近年来，研究发现源自植物的天然生物活性化合物以多靶点、低毒副作用的独特优势在肿瘤研究领域受到广泛关注[13]。本研究发现ISO以浓度依赖性趋势抑制乳腺癌细胞活力和增殖能力并诱导细胞凋亡，提示其具有成为乳腺癌靶向治疗候选药物的潜力。

ROS是一类具有高反应活性、不稳定且半衰期的含氧分子，主要由线粒体电子传递链、过氧化物酶体、NADPH氧化酶、脂氧合酶、环氧化酶及细胞色素P450等产生，极易与脂质、蛋白质及核酸等细胞组分相互作用，从而影响细胞功能[14]。在生理状态下，不同组织间氧环境存在显著差异，氧供需失衡及代谢异常均可诱导ROS产生[15]。相关研究表明，低至中等水平的ROS可促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭，而高水平的ROS则会导致生物分子结构损伤，进而引发细胞损伤和死亡[16]。因此，多种天然植物化合物被报道通过诱导细胞内ROS积累以诱导肿瘤细胞凋亡，发挥抗癌效应[17-18]。上述研究提示ISO可能通过类似机制抑制乳腺癌恶性进展。本研究结果显示，ISO能促进MDA-MB-231细胞内ROS积累，并伴随MDA升高和GSH下降，表明ISO诱导乳腺癌细胞内的氧化应激反应。

为进一步系统探索ISO在乳腺癌中的作用机制，本研究通过RNA微阵列测序分析ISO在乳腺癌中的生物学功能，发现ISO主要生物学功能与Keap1-Nrf2信号通路、GSH代谢及Nrf2响应植物化学物的转录激活相关。其中，Keap1-Nrf2信号通路是细胞对抗氧化应激的核心调控机制，通过动态调节ROS水平在维持细胞稳态与促进肿瘤发展之间发挥复杂作用[19]。在生理条件下，Keap1通过定期靶向Nrf2进行泛素依赖性降解，以保持较低的Nrf2水平；但在氧化应激时，Keap1的半胱氨酸残基发生修饰，导致其构象改变并抑制蛋白酶体降解机制，使新合成的Nrf2蛋白绕过Keap1易位到细胞核中，启动HO-1、GCLM和NQO1等抗氧化基因的表达[20-21]。ISO可以激活MDA-MB-231细胞的Keap1-Nrf2抗氧化信号轴，表现为Nrf2核转位及下游靶基因表达上调。从机制而言，长时间暴露于ROS会导致氧化应激，癌细胞在面对应激时往往通过激活抗氧化应激的细胞防御机制以保护组织和细胞免受氧化应激损伤[22]。因此，乳腺癌细胞可能通过激活Keap1-Nrf2信号启动自我保护，从而削弱ISO诱导的ROS在乳腺癌中的杀伤效果。Nrf2转录因子是抵抗氧化应激的关键调控因子[23]，在乳腺癌中常表现出异常激活，不仅赋予肿瘤细胞更强的抗氧化能力以促使其生长、增殖、转移及血管生成，还导致治疗抵抗，影响患者预后[24]。本研究结果证实，相比ISO单独干预，敲低Nrf2联合ISO处理能更有效地抑制乳腺癌细胞活力和增殖能力，诱导细胞凋亡，并进一步增强细胞内ROS积累。ISO作为应激源，初期诱导ROS积累，而存活的癌细胞则通过快速激活Keap1-Nrf2信号通路增强抗氧化能力，从而削弱ISO抗癌效果。敲低Nrf2可阻止这种适应性抵抗，恢复癌细胞对ISO的敏感性，抑制Nrf2可能成为乳腺癌治疗的潜在策略。

本研究存在一定局限性。首先，实验主要基于单一细胞系展开，其普适性尚需在MCF-7、SKBR-3等多种乳腺癌细胞模型中进行验证。其次，缺乏动物模型和临床样本进一步验证ISO在体内的肿瘤抑制效果、药代动力学特征、长期安全性以及对转移灶的抑制作用。最后，本研究聚焦于ROS/Keap1-Nrf2轴，而ISO能否通过调控铁死亡、自噬等其他细胞死亡途径或相关氧化应激通路影响乳腺癌进展，尚需进一步研究。

综上所述，ISO通过诱导ROS积累抑制乳腺癌细胞恶性生物学行为，并通过激活Keap1-Nrf2信号通路保护乳腺癌细胞免受ROS导致的氧化应激损伤，而敲降Nrf2联合ISO治疗能有效逆转该保护机制，发挥协同抗肿瘤效应。

附件见《医学新知》官网附录（https://yxxz.whuznhmedj.com/futureApi/storage/appendix/20260116 3.pdf）

伦理声明：不适用
作者贡献：实验操作、数据采集、论文撰写：范东伟、王兴亮；研究设计、数据分析、图像处理：方俊；研究指导、文章修改与审阅、经费支持：黄诚
数据获取：本研究中使用和（或）分析的数据可联系通信作者获取
利益冲突声明：无
致谢：不适用

参考文献

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(3): 229-263.
2 Wagle NS, Nogueira L, Devasia TP, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2025[J]. CA Cancer J Clin, 2025, 75(4): 308-340.
3 Wu GY, Xiao MZ, Hao WC, et al. Drug resistance in breast cancer: mechanisms and strategies for management[J]. Drug Resist Updat, 2025, 83: 101288.
4 Serrano García L, Jávega B, Llombart Cussac A, et al. Patterns of immune evasion in triple-negative breast cancer and new potential therapeutic targets: a review[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1513421.
5 Park MY, Kim Y, Ha SE, et al. Function and application of flavonoids in the breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7732.
6 Radenković N, Milenković D, Nikodijević D, et al. Isorhamnetin modulates drug-resistance-related biomarkers in colon cancer cells[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(13): 6208.
7 Wu Q, Kroon PA, Shao H, et al. Differential effects of quercetin and two of its derivatives, isorhamnetin and isorhamnetin-3-glucuronide, in inhibiting the proliferation of human breast-cancer MCF-7 cells[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(27): 7181-7189.
8 Yang T, Xiao Y, Liu S, et al. Isorhamnetin induces cell cycle arrest and apoptosis by triggering DNA damage and regulating the AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in doxorubicin-resistant breast cancer[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154780.
9 Hu J, Zhang Y, Jiang X, et al. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 225.
10 Zhou H, Li J, He Y, et al. SLC25A17 inhibits autophagy to promote triple-negative breast cancer tumorigenesis by ROS-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2024, 24(1): 85.
11 单慧明, 周靖宇, 徐德敏, 等. 磁共振成像影像组学模型预测乳腺癌患者化疗耐药性的价值分析[J]. 西部医学, 2026, 38(4): 558-564. [Shan HM, Zhou JY, Xu DM, et al. The value of MRI imaging model in predicting chemoresistance of breast cancer patients[J]. Medical Journal of West China, 2026, 38(4): 558-564.]
12 王嘉洛, 张莹莹. 脂滴包被蛋白基因家族作为乳腺癌免疫浸润相关预后标志物的分析[J]. 华西医学, 2026, 41(3): 460-467. [Wang JL, Zhang YY. Analysis of the PLIN gene family as prognostic biomarkers associated with immune infiltration in breast cancer[J]. Medical Journal of West China, 2026, 41(3): 460-467.]
13 Hashem S, Ali TA, Akhtar S, et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: exploring promising anti-cancer agents[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 113054.
14 An X, Yu W, Liu J, et al. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(8): 556.
15 Wang R, Liang L, Matsumoto M, et al. Reactive oxygen species and NRF2 signaling, friends or foes in cancer? [J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 353.
16 Ju S, Singh MK, Han S, et al. Oxidative stress and cancer therapy: controlling cancer cells using reactive oxygen species[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22): 12387.
17 Ni L, Zhu X, Zhao Q, et al. Dihydroartemisinin, a potential PTGS1 inhibitor, potentiated cisplatin-induced cell death in non-small cell lung cancer through activating ROS-mediated multiple signaling pathways[J]. Neoplasia, 2024, 51: 100991.
18 Liu J, Li SM, Tang YJ, et al. Jaceosidin induces apoptosis and inhibits migration in AGS gastric cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways[J]. Redox Rep, 2024, 29(1): 2313366.
19 Ghareghomi S, Habibi-Rezaei M, Arese M, et al. Nrf2 modulation in breast cancer[J]. Biomedicines, 2022, 10(10): 2668.
20 Adinolfi S, Patinen T, Jawahar Deen A, et al. The KEAP1-NRF2 pathway: targets for therapy and role in cancer[J]. Redox Biol, 2023, 63: 102726.
21 Chen F, Xiao M, Hu S, et al. Keap1-Nrf2 pathway: a key mechanism in the occurrence and development of cancer[J]. Front Oncol, 2024, 14: 1381467.
22 Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(12): 2345.
23 Panda H, Rowland NG, Krall CM, et al. NRF2 immunobiology in cancer: implications for immunotherapy and therapeutic targeting[J]. Oncogene, 2025, 44(39): 3641-3651.
24 Kumar H, Kumar RM, Bhattacharjee D, et al. Role of Nrf2 signaling cascade in breast cancer: strategies and treatment[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 720076.

收稿日期：2026 年 01 月 28 日 修回日期：2026 年 03 月 11 日
本文编辑：杨室淞 曹 越

引用本文：范东伟, 王兴亮, 方俊, 等. 靶向 Nrf2 协同异鼠李素抗乳腺癌的作用及机制研究[J]. 医学新知, 2026, 36(6): 640-648. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202601163.
Fan DW, Wang XL, Fang J, et al. Synergistic effect of targeting Nrf2 in combination with isorhamnetin against breast cancer and its mechanism[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2026, 36(6): 640-648. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202601163.