

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.005

· 基础研究 ·

牛蒡子苷元调控Notch/Hes-1信号通路对口腔鳞状细胞癌HSC-3细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

任丽洁, 刘孟媛, 史冠忠, 唐亮(沧州医学高等专科学校 口腔系, 河北 沧州 061000)

[摘要] **目的:**探究牛蒡子苷元(ARC)通过调控Notch/Hes-1信号通路对口腔鳞状细胞癌(OSCC)HSC-3细胞增殖、凋亡和侵袭的影响及其机制。**方法:**使用不同质量浓度的ARC处理人HSC-3细胞, CCK-8法检测ARC对细胞增殖活力的影响, 以选择适宜的药物浓度。将HSC-3细胞分为对照组、ARC-L组(10 mg/L ARC)、ARC-M组(20 mg/L ARC)、ARC-H组(40 mg/L ARC)和ARC-H+Jagged1/FC组(40 mg/L ARC+1.2 μg/mL Jagged1/FC)。采用EdU法检测细胞增殖能力, 划痕愈合实验、Transwell实验和流式细胞术分别检测细胞的迁移、侵袭能力及细胞周期和细胞凋亡率, WB法检测增殖(c-Myc、cyclin D1)、凋亡(BAX、Bcl-2、survivin)、EMT(E-cadherin、vimentin、Snail)及Notch/Hes-1通路(Notch 1、Hes-1、NICD)相关蛋白的表达水平。**结果:**与0 mg/L相比, 10~80 mg/L的ARC均能显著降低HSC-3细胞增殖活力(均 $P<0.05$)。与对照组相比, ARC-L组、ARC-M组和ARC-H组HSC-3细胞EdU阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数、S期和G2/M期细胞占比及c-Myc、cyclin D1、Bcl-2、survivin、vimentin、Snail、Notch 1、Hes-1和NICD蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$), 细胞凋亡率、G0/G1期细胞占比及BAX、E-cadherin的蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$), 且呈浓度梯度依赖性。同时使用Notch激动剂Jagged1/FC, 则可部分逆转ARC对HSC-3细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及相关蛋白表达的作用(均 $P<0.05$)。**结论:**ARC可能通过抑制Notch/Hes-1信号通路抑制OSCC细胞HSC-3增殖和侵袭并促进细胞凋亡。

[关键词] 牛蒡子苷元; 口腔鳞状细胞癌; HSC-3细胞; 增殖; 凋亡; 侵袭; Notch/Hes-1信号通路

[中图分类号] R739.85; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)04-0351-08

Effects of arctigenin on the proliferation, apoptosis, and invasion of oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells by regulating the Notch/Hes-1 signaling pathway

REN Lijie, LIU Mengyuan, SHI Guanzhong, TANG Liang (Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of arctigenin (ARC) on the proliferation, apoptosis and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) HSC-3 cells by regulating the Notch/Hes-1 signaling pathway and its mechanism. **Methods:** Human HSC-3 cells were treated with different mass concentrations of ARC, and the effect of ARC on cell proliferation was detected by CCK-8 method to select the appropriate drug concentration. HSC-3 cells were divided into the control group, the ARC-L group (10 mg/L ARC), the ARC-M group (20 mg/L ARC), the ARC-H group (40 mg/L ARC), and the ARC-H+Jagged1/FC group (40 mg/L ARC+1.2 μg/mL Jagged1/FC). Cell proliferation ability was detected by EdU assay, and cell migration and invasion abilities, cell cycle and apoptosis rate were detected by scratch healing assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. The expression levels of proliferation (c-Myc, cyclin D1), apoptosis (BAX, Bcl-2, survivin), EMT (E-cadherin, vimentin, Snail) and Notch/Hes-1 pathway (Notch1, Hes-1, NICD) related proteins were detected by Western blot. **Results:** Compared with 0 mg/L, 10-80 mg/L of ARC significantly decreased the proliferation vitality of HSC-3 cells (all $P<0.05$). Compared with the control group, the EdU positive rate, scratch healing rate, invasion cell number, proportions of S phase and G2/M phase cells, and the expressions of c-Myc, cyclin D1, Bcl-2, survivin, vimentin, Snail, Notch 1, Hes-1, and NICD proteins of HSC-3 cells decreased significantly in the ARC-L, ARC-M, and ARC-H groups (all $P<0.05$); the apoptosis rate, the proportion of G0/G1 phase cells, and the expressions of BAX and E-cadherin proteins increased significantly (all $P<0.05$), and were concentration gradient dependent. Simultaneous use of Notch agonist Jagged1/FC partially reversed the effects of ARC on the proliferation, migration, invasion, apoptosis and the expressions of related proteins of HSC-3 cells (all $P<0.05$). **Conclusion:** ARC may inhibit the proliferation and invasion of OSCC HSC-3 cells and promote cell apoptosis by inhibiting the

[基金项目] 河北省卫健委2022年度医学科学研究课题(No. 20220373)

[作者简介] 任丽洁(1978—), 女, 学士, 讲师, 主要从事口腔肿瘤的基础研究。E-mail: pktjarz@163.com

[通信作者] 唐亮, E-mail: lgovrouiya367@163.com

Notch/Hes-1 signaling pathway.

[Key words] arctigenin (ARC); oral squamous cell carcinoma (OSCC); HSC-3 cell; proliferation; apoptosis; invasion; Notch/Hes-1 signal pathway

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(4): 351-358. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.005]

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔最常见的恶性肿瘤,主要影响因素是吸烟,过量饮酒、嚼槟榔等也会导致 OSCC。虽然 OSCC 在治疗方面取得了技术进步,但随着诊断的延迟、生存率不断下降,研发新的 OSCC 治疗方法十分重要^[1]。牛蒡子苷元(arctigenin, ARC)是一种在中草药中发现的具有生物活性的二苜基丁内酯木脂素,具有抗病毒、抗菌、抗炎、免疫调节和抗肿瘤等活性。研究^[2]发现,ARC 通过参与多种分子机制和信号通路发挥抗肿瘤作用。Notch 信号通路是一种进化保守,与细胞增殖、分化和存活相关的信号通路。Notch 信号通路成分在癌症中表达上调,其信号的异常激活能导致 OSCC 的进展与转移^[3]。Hes-1 是一种转录因子,对细胞周期停滞、分化和凋亡发挥重要作用, Hes-1 是 Notch 信号通路的下游靶点,受 Hedgehog 和 Wnt 信号通路的调节,可能在癌症中发挥致癌作用^[4]。研究^[5]表明, LINC01355 的敲低能通过抑制 Notch 信号减少 Notch 1、JAG-1 和 Hes-1 的表达,进而抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,增强 CD8⁺ T 细胞的抗肿瘤活性。阿尔皮素能诱导 Notch 通路失活,显著降低人 OSCC 细胞 CAL-27 和 TCA-8113 细胞的增殖能力及细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)水平,上调 G1 期细胞的数量和 miR-211-5p 的表达,增加 P-p53、p21 和 c-PARP 水平,抑制 OSCC 细胞的增殖^[6]。目前,ARC 对 OSCC 的作用机制尚不清楚。本文基于 Notch/Hes-1 信号通路,探讨 ARC 对 OSCC 细胞 HSC-3 增殖、凋亡和侵袭的影响,旨在为将来 ARC 应用于 OSCC 的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人 HSC-3 细胞(BH0297)购自上海语纯生物科技有限公司。ARC(A0546)购自成都曼思特生物科技有限公司,Notch/Hes-1 通路激动剂 Jagged1/FC(HY-P70399)购自 MCE 公司,EdU 细胞增殖检测试剂盒(E-CK-A375)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,Hoechst 染色试剂盒(G3680)购自北京索莱宝科技有限公司,c-Myc(ab32072)、cyclin D1(ab16663)、BAX(ab32503)、Bcl-2(ab182858)、survivin(ab76424)、E-cadherin(ab231303)、vimentin(ab8978)、Snail(ab216347)、Notch 1(ab52627)、Hes-1(ab108937)、NICD(notch intracellular domain)、GAPDH(ab8245)抗体和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG

(ab150077)均购自美国 Abcam 公司。

1.2 CCK-8 法检测不同质量浓度的 ARC 对 HSC-3 细胞增殖活力的影响

将 HSC-3 细胞在含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素 G 和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞汇合度达 80%~90% 时进行传代培养。

将对数生长期的 HSC-3 细胞与不同质量浓度(0、5、10、20、40 和 80 mg/L)的 ARC 共同培养 24、48 和 72 h,每孔中加入 10 μL 的 CCK-8 试剂反应 1 h,上酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度(D)值,依据公式“细胞存活率=(实验组 D 值-空白对照孔 D 值)/(对照组 D 值-空白对照孔 D 值)×100%。”计算细胞存活率,以筛选适合的 ARC 浓度进行后续实验。

1.3 细胞分组及处理

将 HSC-3 细胞分为对照组、ARC 低剂量组(ARC-L 组)、ARC 中剂量组(ARC-M 组)、ARC 高剂量组(ARC-H 组)和 ARC-H+Jagged1/FC 组。ARC-L、ARC-M 和 ARC-H 剂量组细胞分别使用 10、20 和 40 mg/L 的 ARC 处理 24 h,ARC-H+Jagged1/FC 组细胞使用 40 mg/L 的 ARC 和含 1.2 μg/mL 的 Jagged1/FC 培养液^[7]共同处理 24 h,对照组细胞给予等量的生理盐水处理 24 h。

1.4 EdU 法检测 ARC 对 HSC-3 细胞增殖的影响

将各组细胞与 50 μmol/L 的 EdU 于 37 °C 下培养 2 h,在 4% 甲醛溶液中固定 30 min,加入 1×ApoloR 反应混合物(400 μL)和 DAPI 中染色 30 min。荧光显微镜下观察 EdU 阳性细胞,随机选择 5 个视野进行观察,依据公式“阳性细胞率=EdU 阳性细胞数/细胞总数×100%”计算 EdU 阳性细胞率。

1.5 划痕愈合实验检测 ARC 对 HSC-3 细胞迁移的影响

将各组 HSC-3 细胞接种在六孔板(1×10⁶ 个/孔)中,培养 24 h 后,用无菌移液器吸头对细胞单层进行机械破坏,形成线性划痕。在光学显微镜下观察 0、24 h 的划痕愈合情况,并依据公式“划痕愈合率=(0 h 时划痕距离-24 h 时划痕距离)/0 h 时划痕距离×100%”计算细胞的划痕愈合率。

1.6 Transwell 小室法检测 ARC 对 HSC-3 细胞侵袭的影响

将 200 μL 密度为 1×10⁵ 个/mL 的 HSC-3 细胞接种在预铺有基质胶的 Transwell 上室中,下室中加

入 500 μ L 含有 10% FBS 的完全培养基用作化学引诱剂。培养 24 h 后,取出小室用棉签轻轻去除残留在上室面的细胞,用 4% 多聚甲醛溶液固定下室的细胞,再用 0.1% 结晶紫溶液中染色 15 min,在光学显微镜下在至少五个随机视野中计数侵袭细胞数。

1.7 流式细胞术检测 ARC 对 HSC-3 细胞的细胞周期及凋亡的影响

细胞周期检测:用胰蛋白酶消化各组 HSC-3 细胞,离心、PBS 洗涤,将细胞在 70% 乙醇溶液中固定过夜。用 PBS 洗涤细胞后,在 500 μ L PI 染色液中室温下遮光反应 15 min。使用流式细胞仪分析细胞周期分布情况。

细胞凋亡检测:将各组 HSC-3 细胞接种到 6 孔板中,培养 24 h。胰蛋白酶消化细胞后,将 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 溶液在黑暗中加入细胞中染色 10 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 WB 法检测凋亡、EMT 及 Notch/Hes-1 信号通路相关蛋白的表达

采用 RIPA 裂解缓冲液裂解各组细胞,提取总蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。样品经 10% SDS-PAGE 分离后,将蛋白质条带转移到 PVDF 膜上,在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h,加入稀释比例均

为 1:1 000 的 c-Myc、cyclin D1、BAX、Bcl-2、survivin、E-cadherin、vimentin、Snail、Notch 1、Hes-1、NICD 和 GAPDH 一抗,在 4 $^{\circ}$ C 下培养过夜。次日,洗膜后加入稀释比例为 1:2 000 的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,室温中反应 1 h,洗膜后 ECL 显影,利用 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。实验数据采用 SPSS 20.0 进行统计分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 ARC 显著抑制 HSC-3 细胞的增殖活力

CCK-8 法检测结果(表 1)显示,与 0 mg/L 组相比,10、20、40 和 80 mg/L 的 ARC 均显著降低 HSC-3 细胞存活率(均 $P<0.05$);5 mg/L 的 ARC 虽降低 HSC-3 细胞的存活率,但差异比较无统计学意义($P>0.05$);80 mg/L 的 ARC 处理后,HSC-3 细胞的存活率最低。因此,选择 10、20 和 40 mg/L 的 ARC 进行后续实验。

表 1 不同质量浓度 ARC 对 HSC-3 细胞增殖活力的影响

组 别	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
0 mg/L 组	98.23 $\pm$ 5.47	96.64 $\pm$ 5.97	95.27 $\pm$ 4.14
5 mg/L 组	94.62 $\pm$ 5.02	92.58 $\pm$ 5.03	91.39 $\pm$ 5.08
10 mg/L 组	85.49 $\pm$ 4.76*	84.16 $\pm$ 3.92*	83.07 $\pm$ 4.24*
20 mg/L 组	74.38 $\pm$ 3.15*	72.65 $\pm$ 3.01*	71.84 $\pm$ 3.65*
40 mg/L 组	62.34 $\pm$ 3.24*	60.51 $\pm$ 2.74*	58.79 $\pm$ 2.27*
80 mg/L 组	53.81 $\pm$ 2.83*	52.06 $\pm$ 2.48*	51.17 $\pm$ 2.09*
<i>F</i> 值	107.446	115.653	136.182
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

与 0 mg/L 组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 ARC 可显著降低 HSC-3 细胞的增殖能力和增殖相关蛋白的表达

EdU 法、WB 法检测结果(图 1、表 2)显示,与对照组相比,ARC-L 组、ARC-M 组和 ARC-H 组 HSC-3 细胞 EdU 阳性率、c-Myc 和 cyclin D1 的蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$);与 ARC-H 组相比,ARC-H+Jagged1/FC 组 HSC-3 细胞 EdU 阳性率、c-Myc 和 cyclin D1 的蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$)。结果表明,ARC 可显著降低 HSC-3 细胞的增殖活力,而同时应用 Jagged1/FC 则可部分逆转 ARC 对细胞的增殖抑制作用。

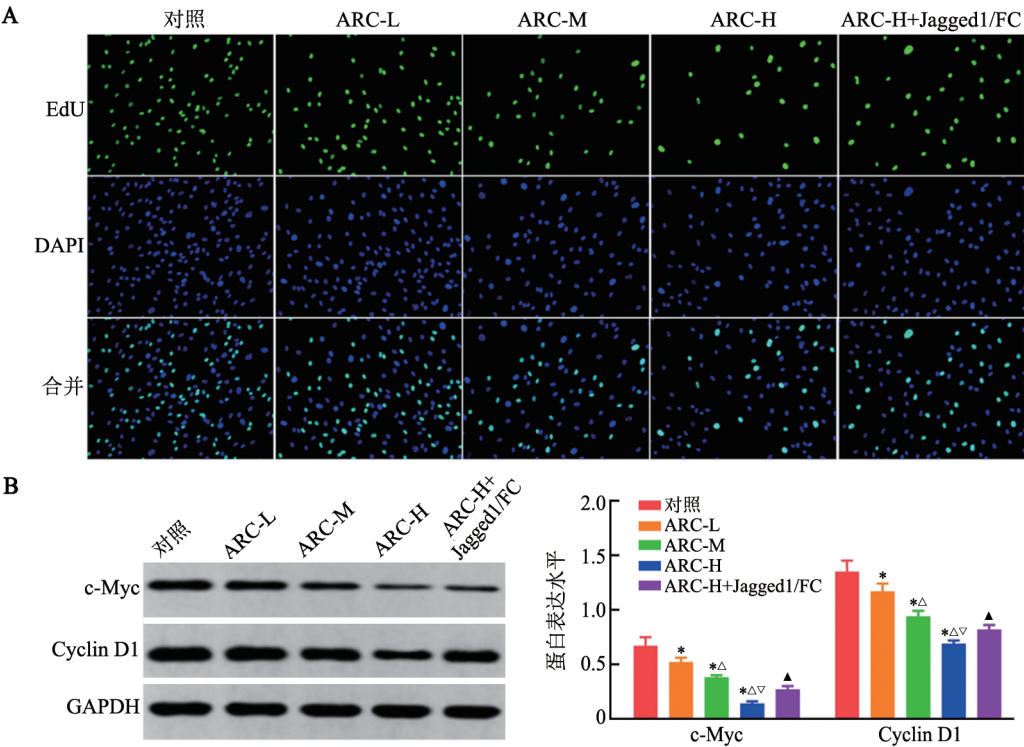
2.3 ARC 可显著降低 HSC-3 细胞的迁移和侵袭能力

划痕愈合实验和 Transwell 实验检测结果(图 2、表 2)显示,与对照组相比,ARC-L 组、ARC-M 组和 ARC-H 组 HSC-3 细胞的划痕愈合率和侵袭细胞数均显著降低(均 $P<0.05$),且呈浓度梯度依耐性;与 ARC-H 组相比,ARC-H+Jagged1/FC 组 HSC-3 细胞的划痕愈合率和侵袭细胞数显著增加(均 $P<0.05$)。结果表明,ARC 可显著降低 HSC-3 细胞的迁移及侵袭能力,而同时使用 Jagged1/FC 则可部分逆转 ARC 对细胞迁移及侵袭的抑制作用。

2.4 ARC可将HSC-3细胞周期阻滞于G0/G1期

流式细胞术检测结果(表3)显示,与对照组相比,ARC-L组、ARC-M组和ARC-H组G0/G1期细胞占比均显著升高(均 $P<0.05$),S期和G2/M期细胞占比均显著降低(均 $P<0.05$),且呈浓度梯度依赖性;

与ARC-H组相比,ARC-H+Jagged1/FC组G0/G1期细胞占比显著降低($P<0.05$),S期和G2/M期细胞占比显著升高(均 $P<0.05$)。结果表明,ARC可将HSC-3细胞周期阻滞于G0/G1期,而同时应用Jagged1/FC则可部分逆转ARC对细胞周期的抑制作用。



A:EdU法检测各组细胞的增殖(绿色荧光代表的是处于S期的细胞,蓝色荧光标记的是细胞核; $\times 200$);B:WB法检测各组细胞c-Myc和cyclin D1的蛋白表达水平。与对照组比较,* $P<0.05$;与ARC-L组比较, $\Delta P<0.05$;与ARC-M组比较, $\nabla P<0.05$;与ARC-H组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

图1 ARC对HSC-3细胞增殖及相关蛋白表达的影响

表2 ARC对HSC-3细胞EdU阳性率、迁移和侵袭的影响

组别	EdU阳性细胞率/%	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个
对照组	51.47 $\pm$ 3.42	82.42 $\pm$ 5.37	174.35 $\pm$ 13.64
ARC-L组	44.68 $\pm$ 3.05*	70.36 $\pm$ 5.02*	152.84 $\pm$ 12.31*
ARC-M组	36.75 $\pm$ 2.41 Δ	51.83 $\pm$ 3.79 Δ	117.62 $\pm$ 10.08 Δ
ARC-H组	24.36 $\pm$ 1.05 $\Delta\nabla$	26.45 $\pm$ 1.68 $\Delta\nabla$	74.59 $\pm$ 5.86 $\Delta\nabla$
ARC-H+Jagged1/FC组	32.85 $\pm$ 2.04 $\blacktriangle$	43.27 $\pm$ 2.13 $\blacktriangle$	92.17 $\pm$ 6.15 $\blacktriangle$
F值	102.942	193.086	100.437
P值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,* $P<0.05$;与ARC-L组比较, $\Delta P<0.05$;与ARC-M组比较, $\nabla P<0.05$;与ARC-H组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

2.5 ARC对HSC-3细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

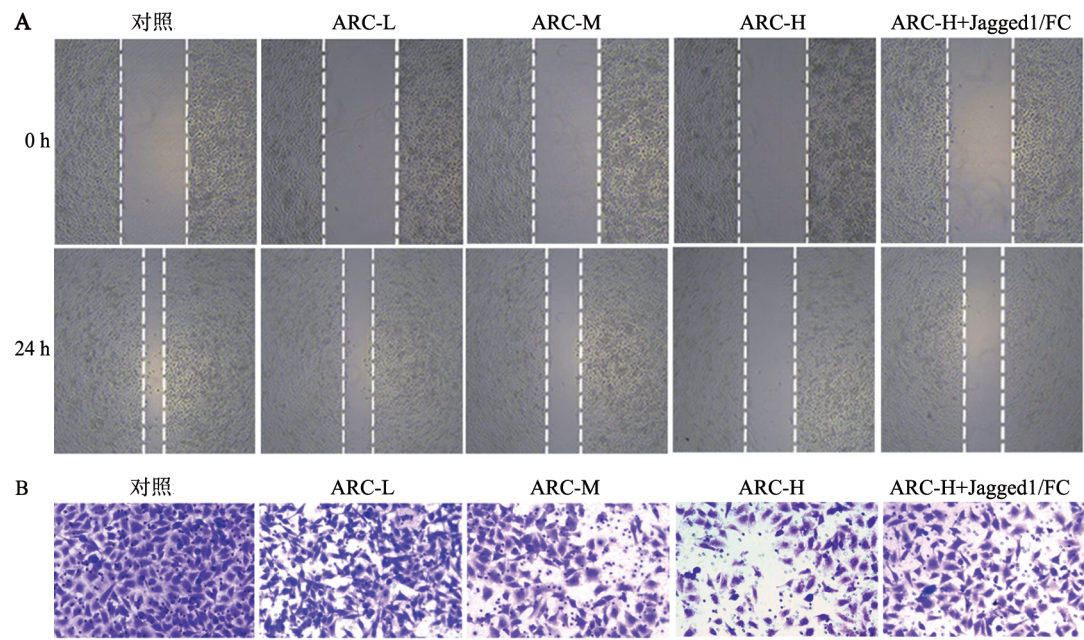
流式细胞术、WB法检测结果(表3、图3)显示,与对照组相比,ARC-L组、ARC-M组和ARC-H组HSC-3细胞凋亡率和BAX蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$),Bcl-2和survivin的蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$),且呈浓度梯度依赖性;与

ARC-H组相比,ARC-H+Jagged1/FC组HSC-3细胞凋亡率和BAX蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$),Bcl-2和survivin的蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$)。结果表明,ARC可促进HSC-3细胞凋亡,而同时应用Jagged1/FC则可部分逆转ARC对细胞凋亡的促进作用。

2.6 ARC 对 HSC-3 细胞 EMT 和 Notch 1/Hes-1 通路相关蛋白表达的影响

WB法检测结果(图4)显示,与对照组相比,ARC-L组、ARC-M组和ARC-H组HSC-3细胞中E-cadherin表达水平显著升高(均 $P<0.05$),vimentin、Snail、Notch 1、Hes-1和NICD蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.05$),且呈浓度梯度依赖性;与ARC-H组相比,

ARC-H+Jagged1/FC组HSC-3细胞中E-cadherin表达水平显著降低($P<0.05$),vimentin、Snail、Notch 1、Hes-1和NICD蛋白表达水平均显著升高(均 $P<0.05$)。结果表明,ARC可抑制HSC-3细胞中EMT和Notch 1/Hes-1通路活化,而同时应用Jagged1/FC则可部分逆转ARC对EMT和Notch 1/Hes-1通路活化的抑制作用。



A:划痕愈合实验检测细胞的迁移能力(×40);B:Transwell小室法检测细胞的侵袭能力(结晶紫染色,×200)。

图2 ARC对HSC-3细胞侵袭和迁移能力的影响

表3 ARC对HSC-3细胞周期和凋亡率的影响

组别	细胞周期占比/%			细胞凋亡率/%
	G0/G1	S	G2/M	
对照组	24.68±1.34	58.07±4.13	17.25±1.19	4.61±0.56
ARC-L组	36.93±2.67*	49.23±3.28*	13.84±1.02*	13.47±1.02*
ARC-M组	54.23±4.19* [△]	37.45±2.14* [△]	8.32±0.74* [△]	28.31±2.74* [△]
ARC-H组	73.94±6.03* ^{△▽}	20.47±1.65* ^{△▽}	5.59±0.61* ^{△▽}	41.65±3.93* ^{△▽}
ARC-H+Jagged1/FC组	59.13±4.86 [▲]	34.81±2.01 [▲]	7.06±0.52 [▲]	34.92±3.05 [▲]
F值	128.907	158.318	200.269	208.526
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,* $P<0.05$;与ARC-L组比较,[△] $P<0.05$;与ARC-M组比较,[▽] $P<0.05$;与ARC-H组比较,[▲] $P<0.05$ 。

3 讨论

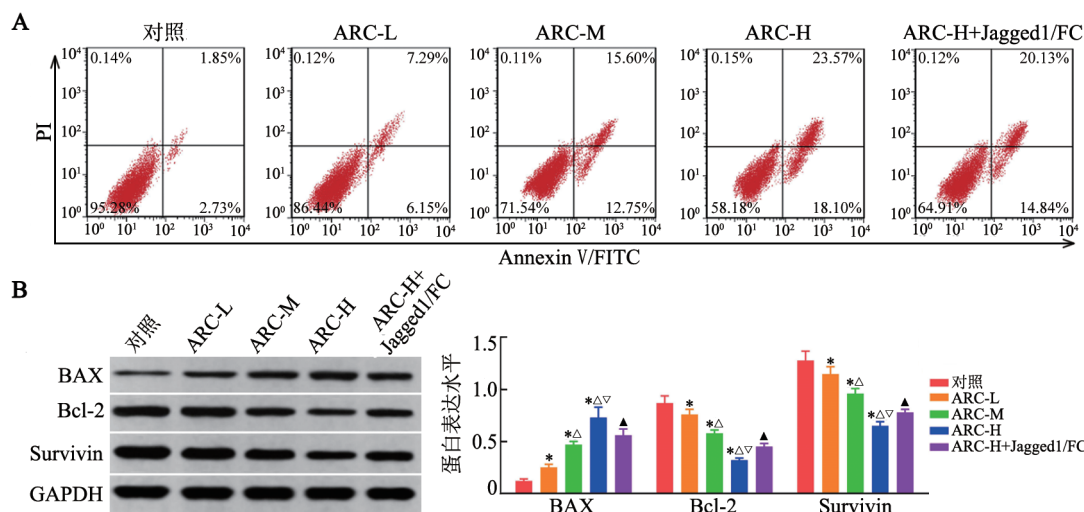
OSCC是最常见的头颈部恶性肿瘤,其发病率极高,严重威胁人类的健康,目前尚缺乏强有力的治疗策略,因此开发新的有效治疗药物迫在眉睫^[8]。ARC是从牛蒡中提取的一种天然木脂素化合物^[9],因其抗炎、抗氧化、免疫调节、抗多发性硬化、抗肿瘤的特性而引起研究人员的注意。研究^[10]显示,ARC能有效

抑制肿瘤细胞的增殖和转移,调节细胞周期,促进细胞凋亡。

细胞异常增殖是肿瘤发生发展的标志之一。c-Myc是常见的细胞增殖的癌基因,调控多种生物学过程,包括细胞生长和分化,以及肿瘤的发生发展,在大多数恶性肿瘤中,c-Myc的失调与肿瘤侵袭性相关^[11]。Cyclin D1为一种重要的细胞周期驱动因子,其高表达与肿瘤细胞的增殖密切相关^[12]。本研究

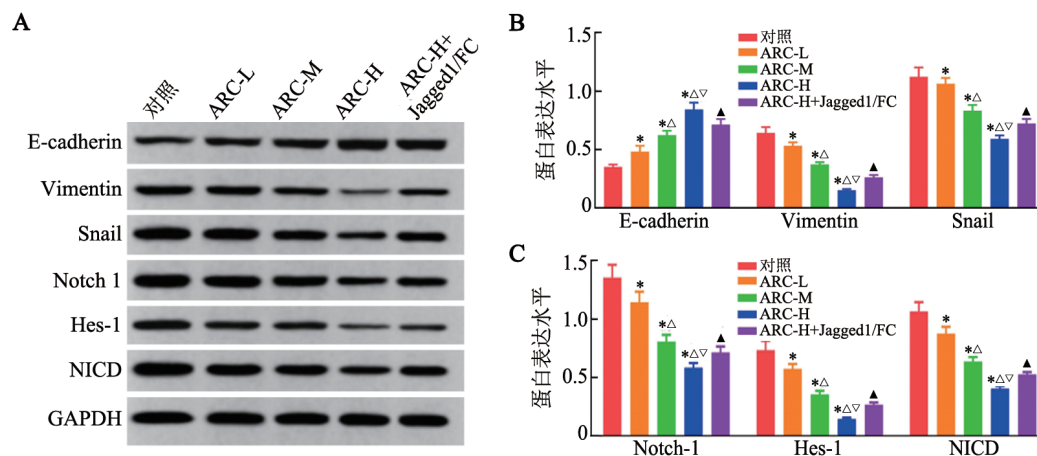
ARC处理后,HSC-3细胞EdU阳性率、细胞侵袭数、划痕愈合率、S期和G2/M期细胞占比及c-Myc和cyclin D1的蛋白表达显著降低,G0/G1期细胞占比显

著升高,表明ARC能调节细胞增殖相关蛋白表达和细胞周期,从而调控HSC-3细胞的增殖、迁移和侵袭。



A: 流式细胞术检测细胞凋亡水平; B: WB法检测细胞凋亡相关蛋白的表达水平。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与ARC-L组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与ARC-M组比较, $^{\nabla}P < 0.05$; 与ARC-H组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图3 ARC对HSC-3细胞凋亡相关蛋白的影响



A: WB法检测各组细胞EMT及Notch 1/Hes-1通路相关蛋白的表达; B: EMT相关蛋白表达数据分析图; C: Notch 1/Hes-1通路相关蛋白表达数据分析图。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与ARC-L组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与ARC-M组比较, $^{\nabla}P < 0.05$; 与ARC-H组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图4 ARC对HSC-3细胞EMT及Notch 1/Hes-1通路相关蛋白表达的影响

细胞凋亡是通过效应胱天蛋白酶的活性对数千种蛋白质进行蛋白水解切割而催化的细胞死亡,靶向肿瘤细胞中的凋亡途径是一种有效的抗肿瘤策略^[13]。Survivin是一种抗凋亡因子,在肿瘤中大量表达,在促进肿瘤细胞存活、抑制细胞凋亡方面具有重要作用^[14]。Bcl-2和BAX在细胞凋亡调控过程中起重要作用,BAX具有促细胞凋亡作用,Bcl-2可抑制细胞凋亡^[15]。EMT是一种细胞的生物学过程,上皮样细胞转化为间充质样细胞,并获得侵袭与迁移的潜力。EMT与肿瘤发生发展关系密切^[16]。Snail、

Slug、Twist和Zeb因子可协调EMT进程,它们可以上调间充质标志物vimentin和N-cadherin的表达,并下调E-cadherin的表达,促进肿瘤细胞的转移;E-cadherin在维持上皮细胞黏附方面起着至关重要的作用,其异常表达和/或功能丧失是肿瘤进展的主要因素;Snail是一种调节EMT的重要转录因子,能够调节N-cadherin、vimentin和E-cadherin的表达,促进耐药性、肿瘤复发和转移^[17]。据报道,OSCC组织中N-cadherin、vimentin表达显著升高,E-cadherin表达显著下降^[18]。ZHANG等^[19]的研究结

果表明,有核梭杆菌能通过调节MIR4435-2HG/miR-296-5p/Akt2/Snail信号通路,在口腔上皮细胞中触发EMT,上调N-cadherin、vimentin和Snail的表达,下调E-cadherin的表达,提高细胞迁移能力,从而促进OSCC的进展。本研究中ARC干预后,HSC-3细胞凋亡率和BAX、E-cadherin表达均显著升高,Bcl-2和survivin、vimentin、Snail蛋白表达均显著降低,结果表明ARC能通过调节凋亡相关因子及EMT过程调控细胞迁移和侵袭,抑制OSCC的进展。

越来越多的证据表明,细胞信号通路的异常激活,如Notch、Wnt和Hedgehog通路,发生在OSCC的发展和转移过程中。Notch信号通路和其他通路之间的关联已被证明可以增强OSCC的侵袭性^[20]。Notch信号转导由两个相邻的细胞启动,Notch活化后NICD被释放到细胞质中。然后,NICD进入细胞核并激活靶基因Hes-1、Hey-1、cyclin D1和p21,从而介导细胞的分化、增殖、迁移和凋亡和细胞周期;阻断Notch信号通路,能抑制下游靶基因表达,进而抑制细胞增殖^[21]。HE等^[22]研究表明,lncRNA NEAT1可在体外通过激活VEGF-A和Notch信号通路促进细胞增殖和EMT进程并抑制细胞凋亡,增强侵袭和迁移,加速OSCC的进展。LIU等^[23]研究表明,miR-133a通过与CTBP2结合抑制Notch信号通路诱导细胞凋亡,抑制OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭,进而抑制OSCC的进展。本研究中ARC干预HSC-3细胞后,Notch 1、Hes-1和NICD蛋白表达水平均显著降低;使用Notch/Hes-1通路激动剂Jagged1/FC则部分逆转了ARC对OSCC HSC-3细胞增殖和侵袭的抑制作用。研究结果表明,ARC能通过抑制Notch/Hes-1信号通路抑制细胞增殖和EMT过程,促进细胞凋亡,从而抑制OSCC的发展。

综上所述,ARC可能通过抑制Notch/Hes-1信号通路激活,抑制HSC-3细胞的EMT过程,从而抑制细胞的增殖、迁移和侵袭能力,促进细胞凋亡,抑制OSCC的进展。本文初步探讨了ARC对OSCC的治疗作用及其机制,今后还需采用其他OSCC细胞系进行更多的体内及体外实验,深入探究ARC对OSCC的治疗作用及其机制。

【参考文献】

- [1] DIVYA B, VASANTHI V, RAMADOSS R, *et al.* Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma arising from oral submucous fibrosis: A systematic review[J]. *J Cancer Res Ther*, 2023, 19(3): 537-542. DOI: 10.4103/jcrt.jcrt_1467_21.
- [2] SHABGAH A G, SUKSATAN W, ACHMAD M H, *et al.* Arctigenin, an anti-tumor agent; a cutting-edge topic and up-to-the-minute approach in cancer treatment[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174419[2023-10-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34391770/>. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174419.
- [3] PANDEY A, BHUVANADAS S, JOSEPH J P, *et al.* Notch signalling: a potential therapeutic pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(12): 2159-2168. DOI: 10.2174/1871530321666210421125231.
- [4] 张伟,胡志,付桥,等. miR-124通过调节Jagged1/Notch信号通路影响肾细胞癌OS-RC-2细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(8): 732-740. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.08.005.
- [5] ZOU C, WU S Y, WEI H G, *et al.* LINC01355 contributes to malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma and cytotoxic T cell infiltration via activating Notch signaling pathway[J/OL]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 1830790[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8331309/>. DOI: 10.1155/2021/1830790.
- [6] GUO Y J, CHEN Y, LIU H L, *et al.* Alpinetin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation via miR-211-5p upregulation and Notch pathway deactivation[J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(5): 757-767. DOI: 10.1080/01635581.2019.1651878.
- [7] 华毛,刘浩明,张莉,等. 五味子素通过调控鼻咽癌细胞上皮间质转化过程影响其化疗敏感性的作用研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(11): 2018-2022. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.211114.
- [8] FAN T F, WANG X N, ZHANG S, *et al.* NUPR1 promotes the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by activating TFE3-dependent autophagy[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 130[2023-10-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35462576/>. DOI: 10.1038/s41392-022-00939-7.
- [9] LIU C, SUN Z R, WANG M M, *et al.* Arctigenin attenuates paraquat-induced human lung epithelial A549 cell injury by suppressing ROS/p38 mitogen-activated protein kinases-mediated apoptosis[J/OL]. *World J Emerg Med*, 2022, 13(5): 373-378[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9420658/>. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2022.086.
- [10] WU D, JIN L L, HUANG X, *et al.* Arctigenin: pharmacology, total synthesis, and progress in structure modification[J/OL]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37(1): 2452-2477[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9481144/>. DOI: 10.1080/14756366.2022.2115035.
- [11] LIU M, YAO B, GUI T, *et al.* PRMT5-dependent transcriptional repression of c-Myc target genes promotes gastric cancer progression[J/OL]. *Theranostics*, 2020, 10(10): 4437-4452[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150477/>. DOI: 10.7150/thno.42047.
- [12] LIANG Q, YAO Q J, HU G Y. CyclinD1 is a new target gene of tumor suppressor miR-520e in breast cancer[J]. *Open Med*, 2019, 14: 913-919. DOI: 10.1515/med-2019-0108.
- [13] CARNEIRO B A, EL-DEIRY W S. Targeting apoptosis in cancer therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395-417. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- [14] 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. DOI: 10.1002/med.21547.
- [15] GITEGO N, AGIANIAN B, MAK O W, *et al.* Chemical modulation of cytosolic BAX homodimer potentiates BAX activation and

- apoptosis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8381. DOI: 10.1038/s41467-023-44084-3.
- [16] LENG RAND J, PASTUSHENKO I, VANUYTVEN S, *et al.* Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer[J]. *Nature*, 2023, 620(7973):402-408. DOI: 10.1038/s41586-023-06372-2.
- [17] PAUL M C, SCHNEEWEIS C, FALCOMATÀ C, *et al.* Non-canonical functions of SNAIL drive context-specific cancer progression[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):1201. DOI: 10.1038/s41467-023-36505-0.
- [18] 叶婷婷, 陈蔚华, 裴婧, 等. NEK2 与 EMT 相关分子在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *上海口腔医学*, 2023, 32(6): 640-644. DOI: 10.19439/j.sjos.2023.06.014.
- [19] ZHANG S W, LI C, LIU J C, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of the lncRNA MIR4435-2HG/miR-296-5p/Akt2/SNAI1 signaling pathway[J/OL]. *FEBS J*, 2020, 287(18): 4032-4047[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7540502/>. DOI: 10.1111/febs.15233.
- [20] PATNI A P, HARISHANKAR M K, JOSEPH J P, *et al.* Comprehending the crosstalk between Notch, Wnt and Hedgehog signaling pathways in oral squamous cell carcinoma - clinical implications[J/OL]. *Cell Oncol*, 2021, 44(3): 473-494[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/5066016/>. DOI: 10.1007/s13402-021-00591-3.
- [21] ZENG C, SHAO Z B, WEI Z B, *et al.* The NOTCH-HES-1 axis is involved in promoting Th22 cell differentiation[J/OL]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 7[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7901075/>. DOI: 10.1186/s11658-021-00249-w.
- [22] HE K, ZHU Z B, SHU R, *et al.* lncRNA NEAT1 mediates progression of oral squamous cell carcinoma via VEGF-A and Notch signaling pathway[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 261[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7542398/>. DOI: 10.1186/s12957-020-02028-x.
- [23] LIU W, SHI X M, WANG B L. MicroRNA-133a exerts tumor suppressive role in oral squamous cell carcinoma through the Notch signaling pathway via downregulation of CTBP2[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(1): 62-72. DOI: 10.1038/s41417-020-00289-y.
- [收稿日期] 2023-10-20 [修回日期] 2024-03-06
[本文编辑] 党瑞山