

肿瘤多学科研究专题

淫羊藿素对人舌鳞癌细胞 CAL-27 增殖、
凋亡、迁移及侵袭的影响曹华娇¹, 傅玲玲², 冯红超^{1,2}

(1. 贵州医科大学 口腔医学院, 贵州 贵阳, 550001;

2. 贵州省贵阳市口腔医院 口腔颌面外科, 贵州 贵阳, 550002)

摘要: 目的 探索淫羊藿素对人舌鳞癌细胞 CAL-27 的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及可能作用机制。方法 分别采用 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的淫羊藿素干预人舌鳞癌细胞 CAL-27。采用 CCK-8 法及克隆形成实验检测细胞增殖; 采用划痕实验检测细胞迁移; 采用流式细胞术检测细胞凋亡; 采用 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭。采用分子对接预测淫羊藿素与舌鳞癌目的基因结合效果, 采用逆转录-实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 进行验证。结果 淫羊藿素对 CAL-27 细胞作用 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 33.37 $\mu\text{mol/L}$, 48 h IC_{50} 为 15.57 $\mu\text{mol/L}$ 。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度淫羊藿素相比, 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CAL-27 细胞克隆形成率降低, 细胞凋亡率升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。淫羊藿素浓度增加时, CAL-27 的迁移、侵袭数呈淫羊藿素剂量依赖性抑制; 细胞内 *AR*、*ESR1*、*PRKACA*、*PTGS2* 的相对表达量呈淫羊藿素剂量依赖性减少。结论 淫羊藿素可抑制人舌鳞癌细胞 CAL-27 的增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡, 其机制可能与淫羊藿素影响细胞 CAL-27 的 *AR*、*ESR1*、*PRKACA* 的表达有关。

关键词: 淫羊藿素; 舌鳞状细胞癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭; 机制

中图分类号: R 739.86; R 446.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2023)14-001-08. DOI: 10.7619/jcmp.20231057

Effects of icaritin on proliferation, apoptosis, migration
and invasion of human tongue squamous cell CAL-27CAO Huajiao¹, FU Lingling², FENG Hongchao^{1,2}

(1. School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550001;

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guiyang Stomatological Hospital in Guizhou Province, Guiyang, Guizhou, 550002)

Abstract: Objective To explore the effect of icaritin on proliferation, apoptosis, migration and invasion of human tongue squamous cell CAL-27 and its possible mechanism. **Methods** Human tongue squamous cell CAL-27 was treated with icaritin at concentrations of 0, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay and clonal formation assay; cell migration was detected by scratch test; the apoptosis was detected by flow cytometry; the Transwell assay was used to detect cell migration and invasion. Molecular docking was used to predict the binding effect of icaritin to the target gene of tongue squamous cell carcinoma, which was verified by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** The median inhibitory concentration (IC_{50}) of icaritin on CAL-27 cells was 33.37 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h and 15.57 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ concentration of icaritin, the clonal formation rate of CAL-27 cells at 40 $\mu\text{mol/L}$ concentration was significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.001$). When icaritin concentration increased, the number of CAL-27 for migration and invasion was dose-dependently inhibited; the relative expression levels of *AR*, *ESR1*, *PRKACA* and *PTGS2* decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Icaritin can inhibit the proliferation, migration, invasion and apoptosis of human tongue squamous cell CAL-27, and the mechanism may be related to the effect of icaritin on the expression of *AR*, *ESR1* and *PRKACA* in cell CAL-27.

Key words: icaritin; tongue squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis; migration; invasion; mechanism

收稿日期: 2023-04-03 修回日期: 2023-05-23

基金项目: 2022 年贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzwkj2022-431)

通信作者: 冯红超, E-mail: hcfeng@gzu.edu.cn

舌鳞状细胞癌(TSCC)简称舌鳞癌,是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,其发生率占口腔鳞癌的50%~60%^[1]。舌体淋巴引流丰富且舌运动频繁,舌鳞癌颈淋巴结转移率较高,患者的5年存活率较低^[2-4]。舌鳞癌的主要治疗方法是多模式治疗,目前中草药治疗的相关研究仍在持续进行中。淫羊藿抗肿瘤作用较为广泛^[5-6],研究^[7-9]表明,其主要成分淫羊藿素、脱水淫羊藿素也具有抗舌鳞癌作用。作者查阅文献过程中发现,淫羊藿素与脱水淫羊藿素的分子式及分子名称存在一定争议,有研究^[10-11]认为淫羊藿素对应分子式为 $C_{21}H_{22}O_7$,水解脱去一分子 H_2O 后变为脱水淫羊藿素,对应分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$;也有研究^[12]认为,淫羊藿素分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$;还有研究^[13]认为,脱水淫羊藿素分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$ 。本研究基于查阅文献及分子对接结果选取分子式为 $C_{21}H_{22}O_7$ 的淫羊藿素进行实验,拟通过分子对接揭示淫羊藿素抗舌鳞癌的药效及可能的作用机制,以期为治疗人舌鳞癌提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞来源

人口腔鳞癌细胞系 CAL-27 来自贵州医科大学头颈鳞癌生物学实验室。

1.2 主要试剂与仪器

淫羊藿素($C_{21}H_{22}O_7$, CAS: 521-45-9; CAT. NO. II0330, 北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清、双抗(青霉素 10 000 U/mL, 链霉素 10 mg/mL, 以色列 BI); 基质胶(货号 0827045, 上海诺娃医药科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(CAT. No: KGA107, Lot. No. 2 020407, 南京凯基生物科技有限公司); Navios 流式细胞仪(美国 Beckman); 超微量分光光度计(型号 NanoDrop 2000, 美国 Thermo)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养: 将人口腔鳞癌细胞系 CAL-27 培养于高糖 DMEM 培养基中, 在培养基中添加 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素, 放入 37 °C 恒温和 CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱内培养。每 2~3 d 换 1 次液, 每 5 d 传 1 次代, 细胞生长汇合度为 80%~90% 时, 用磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻漂洗 2 次, 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化 5 min, 镜下观察细胞变圆后, 用含 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化, 将细胞

轻轻吹打成单细胞悬液, 转移至 15 mL 离心管中, 以 1 000 转/min 离心 5 min, 去掉上清液后重悬计数, 根据后续实验调整成需要的细胞密度。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞增殖能力: 将对数生长期人舌鳞癌细胞 CAL-27 以每孔 3 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 设置实验组、对照组和空白组, 每组 5 个复孔。待 24 h 后细胞贴壁、细胞状态良好, 加入淫羊藿素, 淫羊藿素的终浓度分别为 0(对照组)、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ (实验组), 继续培养 24、48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 酶标仪测试 450 nm 波长处的吸光度值, 并计算细胞的抑制率, 抑制率(%) = (对照孔吸光度 - 实验孔吸光度)/(对照孔吸光度 - 空白孔吸光度) \times 100%。

1.3.3 光镜下细胞形态学观察: 取对数生长期的 CAL-27 单细胞悬液, 以每孔 50 000 个细胞的密度接种至 6 孔板中, 加入培养液, 24 h 后加入淫羊藿素, 终浓度分别为 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 48 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3.4 平板克隆形成实验: 取对数生长期的 CAL-27 单细胞悬液, 以每孔 500 个细胞的密度接种至 65 mm 培养皿中, 加入完全培养基至 3 mL, “十”字轻轻晃动使细胞分散均匀。将培养皿放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 1 周, 每 3 d 更换 1 次培养基, 至单个细胞集落细胞数量 \geq 50 个时终止培养。PBS 轻柔清洗 2 次后, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.4% 结晶紫染色 15 min, 双蒸水清洗 2 次后干燥, 拍照, 计数。

1.3.5 划痕实验: 将生长状态良好的 CAL-27 细胞以每孔 3×10^6 个细胞的密度接种至 6 孔板中, 每组设 3 个复孔, 待细胞汇合度达 100%, 用 100 μL 移液枪枪头垂直底部横线划直线, 形成一段宽度约 3 mm 的无细胞空白区域, PBS 洗去划落的细胞, 分别加入淫羊藿素终浓度为 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的不含血清的 DMEM 培养基。选取划痕区域均匀一致的位置做好标记并拍照, 继续培养 12、24、36 h 后选取同一区段进行观察及拍照, 最后用 Image J 软件分析药物作用后划痕愈合情况。

1.3.6 Transwell 迁移及侵袭实验: 8~11 mg/mL 基质胶解冻分装后用冷的不含胎牛血清完全培养基以 1:8 比例稀释。侵袭实验需提前取 100 μL 稀释好的基质胶置于 24 孔板 Transwell 上室内, 置于培养箱中孵育 2 h。将密度为每孔 1×10^4 个细胞的 CAL-27 接种于上室, 在下室内放入含

1%胎牛血清的完全培养基 600 μL , 培养 24 h 后加入淫羊藿素, 继续 48 h 后取出培养板, 用棉签轻轻擦去小室内的基质胶, PBS 漂洗 3 次后, 将小室依次置于多聚甲醛及结晶紫中 15 min, PBS 漂洗 3 次, 干燥后于显微镜下随机选取 3 个视野进行拍照及计数。

1.3.7 流式细胞术检测 CAL-27 细胞凋亡情况: 取对数生长期的 CAL-27 单细胞悬液, 以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种至 6 孔板中, 药物干预 48 h, 消化完成后, 将上清液、PBS 漂洗液和细胞悬液收集至同一个离心管中, 以 1 000 转/min 离心 5 min, 计数, 取 5×10^5 个细胞, PBS 洗涤 2 遍, 弃上清液, 加入 500 μL 结合缓冲液混匀, 再依次加入 5 μL Annexin V-FITC, 5 μL PI 混合, 避光孵育 15 min 后, 采用流式细胞仪上样检测, 用 FlowJo 10.6.2 软件分析计算 CAL-27 细胞凋亡率。

1.3.8 分子对接预测药物作用效果: 根据课题组淫羊藿抗舌鳞癌的网络药理学分析, 淫羊藿抗舌鳞癌可能主要与 AR、ESR1、PRKACA、PTGS2 共 4 个靶基因相关。因此, 本实验在 RSCB PDB 数据库查询并下载 AR、ESR1、PRKACA、PTGS2 的 3D 结构; TCMSP 数据库中下载淫羊藿素分子结构 MOL 文件; 在 Discovery Studio (2019) 软件中对淫羊藿素与 4 个靶基因大分子进行化学结合能的计算及半柔性对接。

1.3.9 逆转录-实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测: 以 GAPDH 作为内参, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。提取细胞样本总 RNA, 逆转录 cDNA, 利用 qPCR 法检测各组细胞中 ESR1、PTGS2、PRKACA、AR 基因表达情况。为了减少误差, 所有检测样本均做 3 个平行复孔, 检测完成

后, 取 3 个平行复孔的平均值作为该样本的最终检测数值。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 检测所用引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
AR	F: CAGCAGCAGCAGCAAGAGACTAG R: CCTCATCCAGGACCAGGTAGCC
ESR1	F: CCTCTCATCCTCTCCACATCAG R: GCATCTCCAGCAGCAGGTCATAG
PRKACA	F: TCGCAGACCAGCCATCCAG R: GTTCCGCAGCAGGTCCTTCAAG
PTGS2	F: GGGTTGCTGGTGGTAGGAATGTTT R: CTGGTATTTTCATCTGCCTGCTCTGG
GAPDH	F: TCCTGGAAGGACTCATGACC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

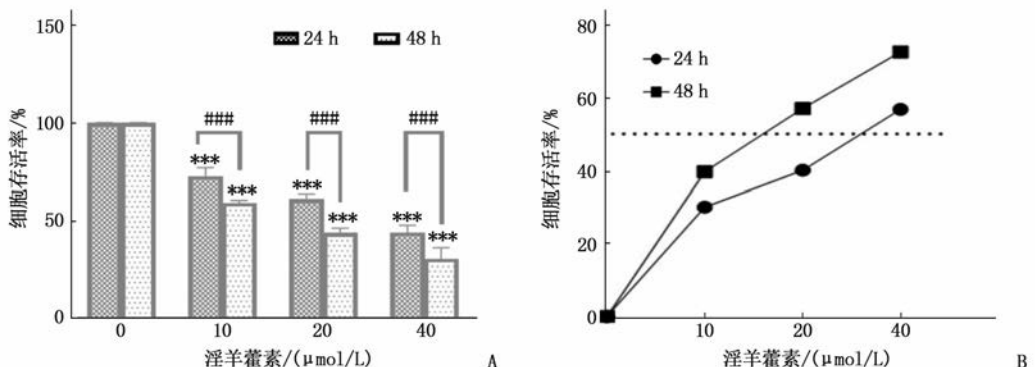
1.4 统计学分析

使用 SPSS 25.0 和 Graphpad prism 9.0 软件分析数据, 符合正态分布的数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组内比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 检测不同浓度淫羊藿素对 CAL-27 细胞增殖的抑制作用

处理 24、48 h 的细胞存活率均随淫羊藿素剂量增加而降低 ($P < 0.001$), 见图 1A; 在同一时间点, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素相比, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素细胞存活率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 同一浓度下, 与处理 24 h 比较, 48 h 的细胞存活率降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。淫羊藿素对 CAL-27 细胞作用 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 33.37 $\mu\text{mol/L}$, 48 h IC_{50} 为 15.57 $\mu\text{mol/L}$, 见图 1B。



A: CAL-27 细胞存活率随淫羊藿素浓度变化柱形图; B: CAL-27 抑制率随淫羊藿素浓度变化折线图。

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, *** $P < 0.001$; 两者比较, ### $P < 0.001$ 。

图 1 淫羊藿素作用于 CAL-27 24、48 h 后的变化

2.2 光镜下细胞形态学观察

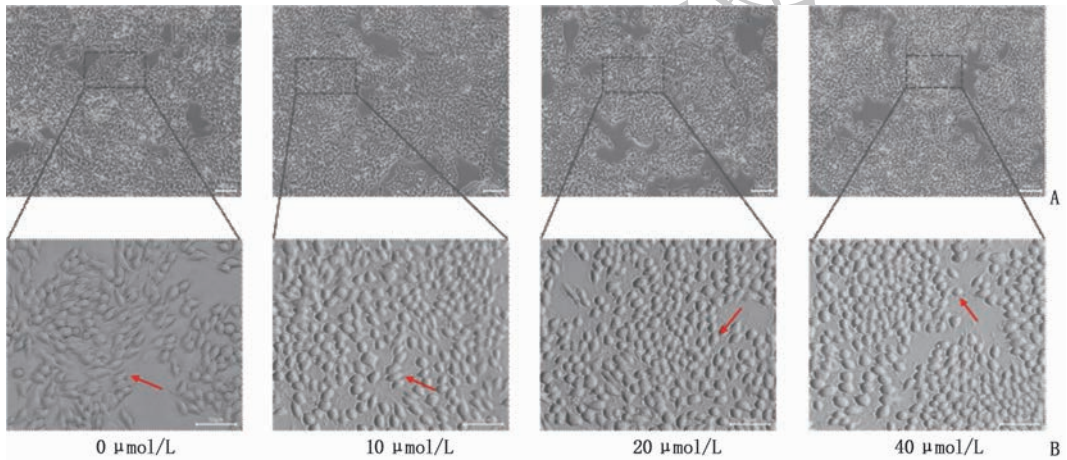
倒置显微镜下观察细胞形态发现,不同浓度淫羊藿素干预 48 h 后, CAL-27 细胞生长受到抑制,且对形态学影响较为明显,见图 2。

0 μmol/L 浓度的细胞贴壁伸展,稍呈梭形,伪足较长;经淫羊藿素影响后,细胞逐渐皱缩,伪足变短,形态不规则,随着药物浓度的升高,形态变化越来越明显,在 40 μmol/L 浓度时最为明显,细胞稍呈圆形。

2.3 克隆形成实验检测细胞增殖情况

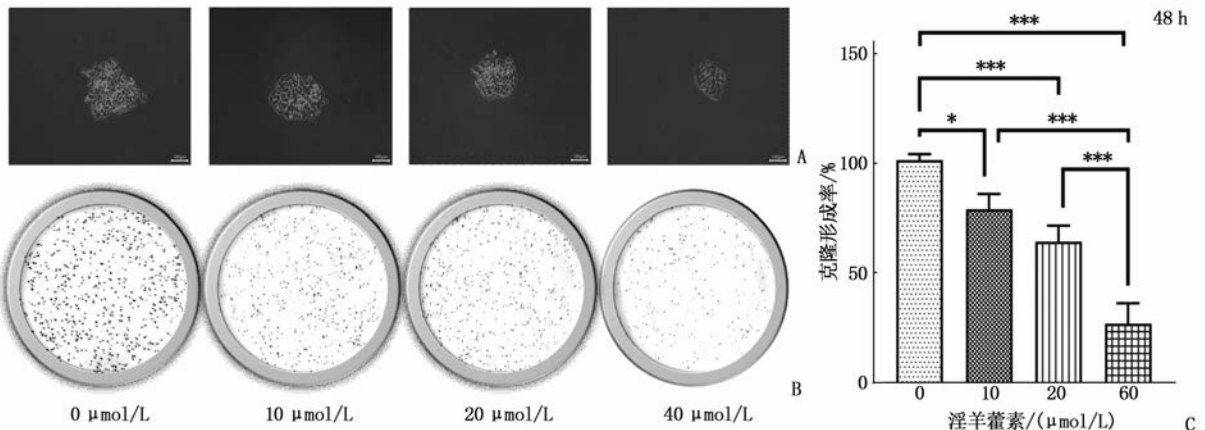
不同浓度淫羊藿素处理 CAL-27 后,细胞增殖

受到显著抑制,形成的单克隆集落大小呈逐渐变小趋势,见图 3A。与 0 μmol/L 组比较,淫羊藿素浓度为 20 μmol/L 时细胞集落减少,当淫羊藿素浓度为 40 μmol/L 时几乎不存在细胞集落,见图 3B。克隆形成实验显示,10 μmol/L 浓度的克隆形成率为(79.20 ± 5.74)%, 低于 0 μmol/L 组的(101.00 ± 2.26)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 0 μmol/L 组克隆形成率比较, 20 μmol/L 浓度的克隆形成率(64.73 ± 5.98)% 和 40 μmol/L 浓度的克隆形成率(27.33 ± 7.69)% 均降低,差异有统计学意义($P < 0.001$), 见图 3C。



A: 放大倍数为 100 倍,比例尺为 100 μm; B: 放大倍数为 200 倍,比例尺为 50 μm。

图 2 CAL-27 细胞经淫羊藿素干预 48 h 后形态学变化



A: 淫羊藿素处理 48 h 后, CAL-27 单克隆集落形态观察,比例尺为 100 μm; B: 淫羊藿素处理 48 h 后, CAL-27 的克隆形成。

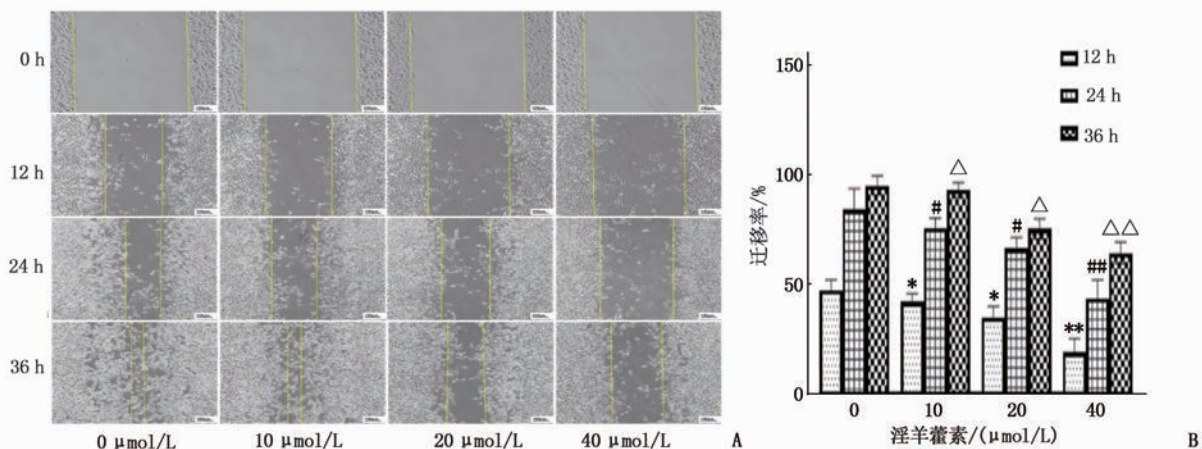
C: 淫羊藿素处理 48 h 后,各组克隆形成率。两者比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 CAL-27 的克隆形成实验

2.4 划痕实验

CAL-27 经过不同浓度的淫羊藿素分别作用 1 224、36 h 后,细胞水平向内迁移,见图 4A。随着时间的推移,迁移愈合面积越来越大,36 h 时 0 μmol/L 浓度和 10 μmol/L 浓度的划痕恢复接近

100%, 而 20 μmol/L 浓度和 40 μmol/L 浓度划痕未能完全愈合。在 0、12、24、36 h 时,与 0 μmol/L 浓度比较, 10、20、40 μmol/L 浓度的划痕区域迁移率呈下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4B。



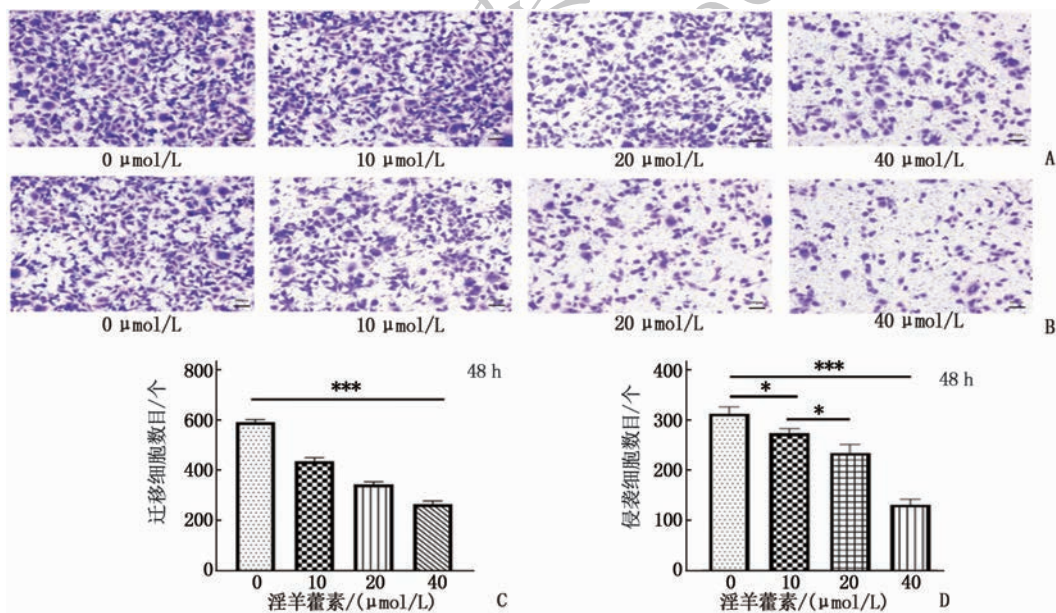
A: 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞 12、24、36 h 后划痕镜下表现, 比例尺为 100 μm; B: 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞 12、24、36 h 后细胞迁移率柱形图。12 h 时, 与 0 μmol/L 浓度比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 24 h 时, 与 0 μmol/L 浓度比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 36 h 时, 与 0 μmol/L 浓度比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

图 4 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞的划痕实验

2.5 Transwell 迁移及侵袭实验

CAL-27 细胞经过不同浓度的淫羊藿素作用 48 h 后, 随着药物浓度的增加, 迁移和侵袭穿过小室的细胞逐渐减少, 见图 5A、5B。CAL-27 迁移穿

过小室的细胞数目呈淫羊藿素剂量依赖性减少 ($P < 0.001$); CAL-27 侵袭穿过小室的细胞数目呈淫羊藿素剂量依赖性减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 见图 5C、5D。



A: CAL-27 细胞各组迁移图, 比例尺为 100 μm; B: CAL-27 细胞各组侵袭图, 比例尺为 100 μm; C: 各浓度淫羊藿素干预细胞迁移数目统计分析; D: 各浓度淫羊藿素干预细胞侵袭数目统计分析。两者比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞 48 h 后的迁移和侵袭结果

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

淫羊藿素干预人舌鳞癌细胞 CAL-27 48 h 后, 随着药物浓度的增加, 凋亡细胞比例增加, 见图 6A。0 μmol/L 浓度细胞凋亡率为 (4.96 ± 1.92)%, 10 μmol/L 浓度细胞凋亡率为 (10.15 ± 2.16)%, 20 μmol/L 浓度细胞凋亡率为 (28.96 ± 4.65)%, 40 μmol/L 浓度细胞凋亡率为 (45.20 ±

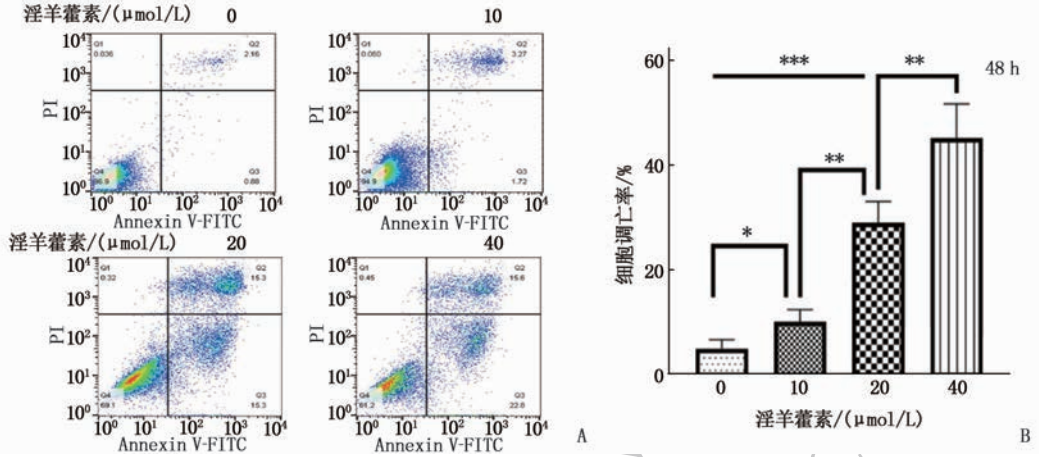
6.80)%。CAL-27 细胞凋亡率呈淫羊藿素剂量依赖性增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。

2.7 淫羊藿素与 AR、ESR1、PRKACA、PTGS2 进行分子对接

淫羊藿素与 AR (1XOW)、ESR1 (7BAA)、PRKACA (5N1F)、PTGS2 (5F19) 进行分子对接的结合能依次为: -69.457 9、-48.798 2、

0 kcal/mol。结合能数值越低,氢键结合数目越多,则舌鳞癌受体与淫羊藿素之间的结合活性越高,结合构象越稳定,潜在效果就越好。其中,

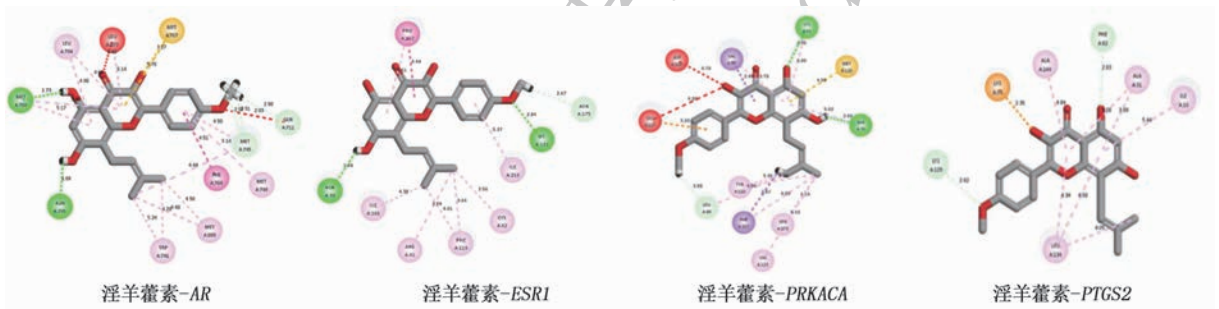
AR、ESR1、PRKACA 与淫羊藿素对接有 2 个氢键,而 PTGS2 与淫羊藿素的对接没有氢键的结合,见图 7。



A: 流式凋亡图; B: 细胞凋亡率柱形图。两者比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

流式图中 4 个象限: 左下象限代表正常细胞群; 左上象限代表机械损伤细胞群; 右上象限代表晚期凋亡细胞; 右下象限代表早期凋亡细胞; 细胞凋亡率为右上和右下细胞占比之和。

图 6 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞 48 h 后的凋亡结果



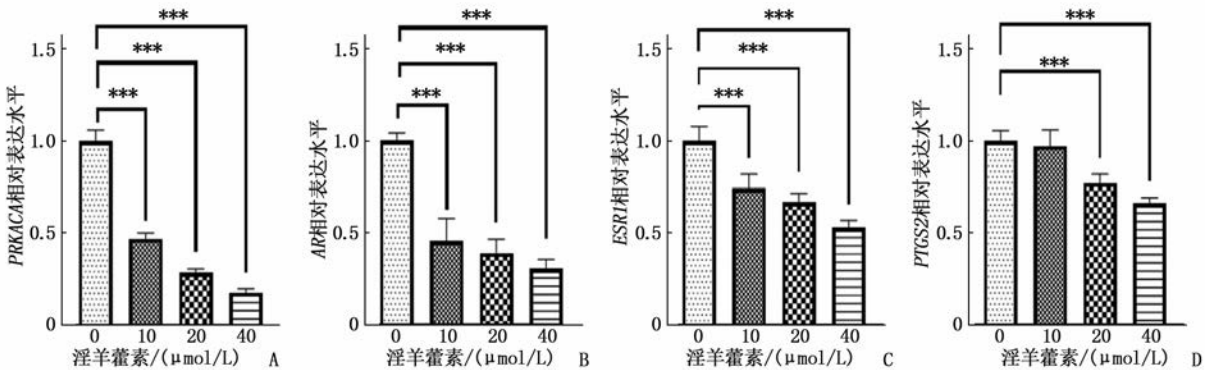
绿色节点及虚线表示经典氢键结合。

图 7 淫羊藿素与人舌鳞癌靶点分子对接二级结构图

2.8 RT-qPCR 实验

分别采用 0、10、20、40 μmol/L 浓度的淫羊藿素处理 CAL-27 48 h 后,检测 AR、ESR1、PRKACA、PTGS2 的表达情况。与 0 μmol/L 浓度比较, AR、

ESR1、PRKACA、PTGS2 的相对表达量呈淫羊藿素浓度依赖性降低; 但 0 μmol/L 浓度和 10 μmol/L 浓度的 PTGS2 的相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 8。



A: 干预 48 h 后 PRKACA 的相对表达量; B: 干预 48 h 后 AR 的相对表达量; C: 干预 48 h 后 ESR1 的相对表达量;

D: 干预 48 h 后 PTGS2 的相对表达量。两者比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 8 淫羊藿素干预 CAL-27 细胞 48 h 后 AR、ESR1、PRKACA、PTGS2 的相对表达量

3 讨论

舌鳞癌预后较差,淋巴结阳性、肿瘤浸润深度和淋巴结比率升高是影响存活率的重要预后因素^[14]。目前,舌鳞癌治疗方式以手术为主,辅助放疗、生物治疗和康复治疗等进行综合序列治疗^[15]。研究^[16-17]表明,天然化合物如淫羊藿素、白皮杉醇、姜黄素、醋酸棉酚等在舌鳞癌的治疗中起着越来越重要的作用。淫羊藿素又名阿可拉定,有研究^[18]表明,其可抑制多条肿瘤增殖信号通路,提高免疫系统对肿瘤的杀伤。目前已完成晚期肝癌治疗的III期临床试验,与其他药物的联合应用对晚期或三阴性乳腺癌的临床实验一致,均显示出明确的临床疗效和良好的安全性^[19-21]。

本研究采用不同浓度的淫羊藿素干预人舌鳞癌细胞 CAL-27,通过 CCK-8 测试、克隆形成实验、细胞形态学观察、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验检测淫羊藿素对舌鳞癌增殖、凋亡、迁移、侵袭等生物学性能的影响。本研究结果表明,随着药物浓度的增加,CAL-27 生长受到的抑制越来越显著,且呈时间和剂量依赖性。结合划痕实验及 Transwell 迁移、侵袭实验发现,细胞向四周移动的能力逐渐降低,且流式细胞术检测和 RT-qPCR 实验表明随着淫羊藿素浓度的增加,细胞凋亡率越来越高。

结合本课题组对淫羊藿抗舌鳞癌作用的网络药理学和分子对接分析中发现,AR、ESRI、PRKACA、PTGS2 可能为淫羊藿素作用于舌鳞癌的 4 个最佳靶点。4 个靶点抗肿瘤作用为:AR 被认为在癌症发生中有促进作用,可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并被认为是一种潜在的头颈鳞状细胞癌预后标记物^[22-24];研究^[25]表明,AR 阳性的口腔鳞癌患者可能具有低生存率、高复发率的风险。ESRI 在转录上调调节参与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和转移。研究^[26-28]表明,ESRI 参与了乳腺癌、前列腺癌等癌症的病理过程,在头颈鳞癌中被报道为潜在的预后化学标志物。PRKACA 被报道^[29]与心血管疾病、肾上腺皮质肿瘤以及乳腺癌、纤维板层状肝细胞癌等多种癌症相关。研究^[30]表明,DNAJBI-PRKACA 基因融合能与 β -连环蛋白相互作用,显著促进肿瘤的发生;研究^[31]表明,PRKACA 可以通过其下游底物的磷酸化来调节细胞活动,从而减少细胞内的自噬,并诱导细

胞增殖。PTGS2 在肿瘤发病过程中也起着至关重要的作用,其与结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、卵巢癌等多种癌症相关^[32-35]。生物信息学分析^[36]表明,PTGS2 作为头颈癌免疫调节网络的关键节点之一,在不久的将来可能成为新的治疗靶点。

为进一步探究淫羊藿对舌鳞癌的作用机制,本实验通过 qPCR 实验检测 AR、ESRI、PRKACA、PTGS2 mRNA 的相对表达量,发现随着药物浓度的增加,其相对表达量均呈现不同程度的降低,且下降程度以 AR 最为显著,其次为 PRKACA,变化幅度最小的为 PTGS2,变化趋势与分子对接结合能绝对值大小依次排序:AR(1XOW) > PRKACA(5N1F) > ESRI(7BAA) = PTGS2(5F19)。

综上所述,淫羊藿素可促进人舌鳞癌细胞凋亡,并抑制舌鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,具体机制可能与淫羊藿素和人舌鳞癌细胞内 AR、ESRI、PRKACA 的特异性结合,进而影响目的基因的表达式有关,但其具体调控作用机制尚不明确,还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 吴开柳,李思毅,张陈平. 舌鳞状细胞癌淋巴结转移的特点和评估处理[J]. 国际口腔医学杂志, 2015, 42(1): 119-122.
- [2] 夏晓芳,张文颖,袁海花,等. 术前预后营养指数对首次行根治性手术的口腔鳞状细胞癌患者预后的预测价值[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(8): 6-10.
- [3] SHI J X, DONG Y, JIANG W Y, et al. MRI-based peritumoral radiomics analysis for preoperative prediction of lymph node metastasis in early-stage cervical cancer: a multi-center study[J]. Magn Reson Imaging, 2022, 88: 1-8.
- [4] 许刚,唐春梅,赵会杰. 口腔颌面部鳞状细胞癌患者不同原发灶部位与颈部 I、II、III、IV、V 区转移的相关性[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(9): 116-118.
- [5] ZHOU M, ZHENG W, SUN X G, et al. Comparative analysis of chemical components in different parts of Epimedium Herb[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 198: 113984.
- [6] ARIEF Z M, MUNSHI A H, SHAWL A S. Evaluation of medicinal value of Epimedium elatum on the basis of pharmacologically active constituents, Icaritin and Icariside-II[J]. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 2015, 28(5): 1665-1669.
- [7] LEI K, MA B, SHI P, et al. Icaritin mitigates the growth and invasion ability of human oral squamous cell carcinoma via inhibiting toll-like receptor 4 and phosphorylation of NF- κ B P65[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 299-307.
- [8] YANG J G, ZHANG J, CHEN X J, et al. Stable loading and delivery of icaritin using PEG-PCL micelles for effective treatment of oral squamous cell carcinoma[J]. Curr Drug Deliv,

- 2021, 18(7): 975–983.
- [9] 杨建光. 淫羊藿素抗口腔鳞状细胞癌的作用及机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [10] 王大伟, 邓秀兰, 牛建昭, 等. 淫羊藿素和脱水淫羊藿素对人类乳腺癌细胞 T47D 增殖和细胞周期的影响[J]. 北京中医药, 2009, 28(8): 637–640.
- [1] NGUYEN V S, SHI L, WANG S C, *et al.* Synthesis of icaritin and β -anhydroicaritin mannich base derivatives and their cytotoxic activities on three human cancer cell lines[J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2017, 17(1): 137–142.
- [2] YU Z, GUO J F, HU M Y, *et al.* Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4816–4828.
- [3] XIE Y Z, XIE L, CHEN A L, *et al.* Anti-HIV/SIV activity of icariin and its metabolite anhydroicaritin mainly involve reverse transcriptase [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 884: 173327.
- [4] FAISAL M, DHANANI R, ULLAH S, *et al.* Prognostic outcomes of treatment naïve oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC): a comprehensive analysis of 14 years [J]. *Eur Arch Oto Rhino Laryngol*, 2021, 278(8): 3045–3053.
- [5] 潘朝斌. 舌鳞癌的临床综合序治疗研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(5): 273–280.
- [6] MEHTA K A, PATEL K A, KUNNUMAKKARA A B, *et al.* Curbing the deregulation of glycosylation in tongue carcinoma cells with natural compounds [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(13): 1717–1723.
- [7] 陈思宇, 付帅, 吴勇. 醋酸棉酚对人舌鳞癌 Cal-27 细胞侵袭性作用的实验研究[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(11): 12–17.
- [18] 周鑫. 阿可拉定联合常规方案治疗晚期恶性实体肿瘤疗效的相关性研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2019.
- [9] 周鑫, 赵卫红, 赵晓, 等. 阿可拉定联合常规方案治疗晚期非小细胞肺癌的疗效和安全性评价[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(3): 219–222.
- [0] ZHAO X Q, LIN Y, JIANG B J, *et al.* Icaritin inhibits lung cancer-induced osteoclastogenesis by suppressing the expression of IL-6 and TNF- α and through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(10): 1004–1011.
- [1] 玉雪. 阿可拉定对三阴性乳腺癌的抑制作用及机制研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2017.
- [22] ZHANG Y, PAN T C, ZHONG X X, *et al.* Androgen receptor promotes esophageal cancer cell migration and proliferation via matrix metalloproteinase 2 [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 5859–5864.
- [23] WU T F, LUO F J, CHANG Y L, *et al.* The oncogenic role of androgen receptors in promoting the growth of oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Oral Dis*, 2015, 21(3): 320–327.
- [24] RADES D, SEIBOLD N D, SCHILD S E, *et al.* Androgen receptor expression: prognostic value in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Al*, 2013, 189(10): 849–855.
- [25] ADNAN Y, ALI S M A, AWAN M S, *et al.* Hormone receptors AR, ER, PR and growth factor receptor Her-2 expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with overall survival, disease-free survival and 10-year survival in a high-risk population [J]. *PLoS One*, 2022, 17(5): e0267300.
- [26] CARASU M, BIDARD F C, CALLENS C, *et al.* ESR1 mutations: a new biomarker in breast cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(7): 599–611.
- [27] KWON S, AHN S H, JEONG W J, *et al.* Estrogen receptor α as a predictive biomarker for survival in human papilloma-virus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 240.
- [28] VERMA A, SCHWARTZ N, COHEN D J, *et al.* Estrogen signaling and estrogen receptors as prognostic indicators in laryngeal cancer [J]. *Steroids*, 2019, 152: 108498.
- [29] TURNHAM R E, SCOTT J D. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology [J]. *Gene*, 2016, 577(2): 101–108.
- [30] KASTENHUBER E R, LALAZAR G, HOULIHAN S L, *et al.* DNAJB1-PRKACA fusion kinase interacts with β -catenin and the liver regenerative response to drive fibrolamellar hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(50): 13076–13084.
- [31] YANG F, XIE H Y, YANG L F, *et al.* Stabilization of MORC2 by estrogen and antiestrogens through GPER1-PRKACA-CMA pathway contributes to estrogen-induced proliferation and endocrine resistance of breast cancer cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1061–1076.
- [32] ZAPPAVIGNA S, COSSU A M, GRIMALDI A, *et al.* Anti-inflammatory drugs as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2605.
- [33] KUNZMANN A T, MURRAY L J, CARDWELL C R, *et al.* PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22(9): 1490–1497.
- [34] ZHANG Z L. miR-124-3p suppresses prostatic carcinoma by targeting PTGS2 through the AKT/NF- κ B pathway [J]. *Mol Biotechnol*, 2021, 63(7): 621–630.
- [35] YE Y, WANG X P, JESCHKE U, *et al.* COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 301(6): 1365–1375.
- [36] FENG B H, SHEN Y, PASTOR HOSTENCH X, *et al.* Integrative analysis of multi-omics data identified EGFR and PTGS2 as key nodes in a gene regulatory network related to immune phenotypes in head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(14): 3616–3628.