

基于网络药理学及实验验证探讨去甲汉黄芩素促进口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的作用机制

郑华艳

宁波市鄞州儿童口腔医院 口腔科, 浙江 宁波 315199

摘要: **目的** 采用网络药理学结合实验验证方法探索去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌的抗肿瘤活性及靶点。**方法** 采用网络药理学方法分析去甲汉黄芩素及口腔鳞状细胞癌的靶点。使用 STRING 和 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用 (PPI) 网络。基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析生物学功能。采用分子对接和 CETSA 验证去甲汉黄芩素与其关键靶标之间的结合能力。MTT 和吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 法检测去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞增殖以及凋亡的影响。免疫蛋白印迹法检测相关蛋白的表达。**结果** 去甲汉黄芩素与口腔鳞状细胞癌共有 71 个重叠靶点; 分别涉及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 (Akt)、氧化应激以及凋亡通路中相关基因; 其中前 5 位的 Hub 基因为表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 1 (ESR1)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)。分子对接结果显示, 去甲汉黄芩素与 EGFR 的结合力最强 (-6.6 kcal/mol); CETSA 实验和 Kaplan-Meier 生存曲线结果显示, EGFR 对口腔鳞状细胞癌患者生存影响最大。实验验证结果显示, 去甲汉黄芩素以剂量相关性性地降低口腔鳞状细胞癌细胞活性, IC_{50} 为 $15 \mu\text{mol/L}$ 。AO/EB 染色分析显示, 去甲汉黄芩素诱导口腔鳞状细胞癌细胞发生程序性凋亡来抑制癌细胞的活力, 且与 Bax 水平的增加和 Bcl-2 水平的降低相关。**结论** 去甲汉黄芩素可能通过调控 EGFR 的表达进而影响 PI3K/Akt、氧化应激以及凋亡途径诱导口腔鳞状细胞癌细胞凋亡。

关键词: 去甲汉黄芩素; 口腔鳞状细胞癌; 网络药理学; 凋亡; 表皮生长因子受体; 雌激素受体 1; 非受体酪氨酸激酶; 前列腺素内过氧化物酶 2; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)11-2690-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.006

Mechanism of norwogonin induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through network pharmacology and experimental validation

ZHENG Hua-yan

Department of Stomatology, Ningbo Yinzhou Children's Stomatology Hospital, Ningbo 315199, China

Abstract: **Objective** To investigate the antitumor activity and target of norwogonin in oral squamous cell carcinoma by network pharmacology combined with experimental verification. **Methods** The target of norwogonin and oral squamous cell carcinoma was analyzed by network pharmacology. Build a protein interaction (PPI) network using STRING and Cytoscape software. GO and KEGG enrichment analyze biological functions. Molecular docking and CETSA were used to verify the binding ability between norwogonin and its key targets. MTT and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) methods were used to detect the effects of norwogonin on the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. The expression of related proteins was detected by Immunowestern blotting. **Results** A total of 71 overlapping targets between norwogonin and oral squamous cell carcinoma, implicated in the PI3K/Akt, oxidative stress, and apoptosis signaling pathways, respectively. The top five Hub genes identified in this study are EGFR, ESR1, SRC, PTGS2, and MMP9. The molecular docking results showed that the binding force between norwogonin and EGFR was the strongest (-6.6 kcal/mol). The results of CETSA test and Kaplan-Meier survival curve showed that EGFR had the greatest impact on the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. The experimental results showed that the activity of oral squamous cell carcinoma was decreased dose-dependent with IC_{50} of $15 \mu\text{mol/L}$. AO/EB staining analysis showed that norwogonin induced programmed apoptosis of oral squamous cell cancer cells to inhibit cancer cell viability, which was associated with increased Bax levels and decreased Bcl-2 levels. **Conclusions** Norwogonin may affect PI3K/Akt, oxidative stress and apoptosis pathway to induce apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells by regulating EGFR expression.

Key words: norwogonin; oral squamous cell carcinoma; network pharmacology; apoptosis; EGFR; ESR1; SRC; PTGS2; MMP9

收稿日期: 2023-07-26

作者简介: 郑华艳, 女, 主治医师, 主要研究领域为重要在口腔鳞癌中的作用。E-mail: 645705973@qq.com

口腔鳞状细胞癌是最常见的头颈部癌症之一,在全球范围内普遍存在,严重威胁人类健康^[1]。现阶段较为明确的口腔鳞状细胞癌致病诱因是吸烟、人乳头瘤病毒(HPV)以及鼻咽等;同时,饮酒被认为是口腔鳞状细胞癌的独立危险因素之一^[2]。目前,关于口腔鳞状细胞癌的治疗依然以联合治疗为主,即手术、化疗、放疗以及免疫治疗等^[3]。尽管有许多不同的化疗方案和分子靶向治疗的不断的被尝试,但口腔鳞状细胞癌的总 5 年生存率仅保持在 50%~60%^[4]。虽然,对于不能接受手术切除的口腔鳞状细胞癌患者,放化疗以及免疫治疗可能使其生存期延长约 15%,但在应用该治疗方案时会出现多种不良反应以及耐药性^[5]。因此,非常需要有效的治疗口腔鳞状细胞癌药物。

去甲汉黄芩素是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的根中分离出具有药理活性的黄酮^[6]。黄芩是一种用于治疗流感和癌症的传统中草药。但由于去甲汉黄芩素在天然植物中含量较低,其生物学活性的研究报道有限^[7]。随着对其生物学作用进行深入探究,发现去甲汉黄芩素具有抗氧化和抗缺氧的作用。同时,去甲汉黄芩素具有的多种生物学活性逐渐被报道。Wang 等^[8]报道,去甲汉黄芩素通过线粒体介导的凋亡、自噬诱导和 G₂/M 周期阻滞抑制人结肠癌细胞生长。Jing 等^[9]发现去甲汉黄芩素减轻缺氧诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡。然而,现阶段关于去甲汉黄芩素在口腔鳞状细胞癌中的作用以及潜在作用机制尚未明确。

1 资料与方法

1.1 去甲汉黄芩素靶点基因的筛选

将“去甲汉黄芩素”导入 PubChem 网站获取 SMILE 结构,将该结构通过 Swiss 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、SuperPred 数据库(<https://prediction.charite.de/index.php>)分别预测去甲汉黄芩素的潜在作用靶点基因。

1.2 口腔鳞状细胞癌靶点基因的获取

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)选择关键词“oral squamous cell carcinoma”筛选口腔鳞状细胞癌的相关靶点。

1.3 “成分-靶点-疾病”网络的构建和拓扑属性分析

将去甲汉黄芩素和口腔鳞状细胞癌的共同靶点导入 String 平台(<https://string-db.org/>)构建“成

分-靶点-疾病”的蛋白质相互作用(PPI)网络,过滤条件被选择为“智人”,最终构建 PPI 网络图,以“节点”信息为目标,节点之间的关系用“边”表示,将 PPI 网络输入 Cytoscape 软件进行拓扑结构分析,创建可视化显示,分析出核心度最高的部分蛋白,最终预测出潜在的核心靶点。

1.4 基因表达谱交互分析(GEPIA)

GEPIA 是多维癌症基因组学数据集,其整合了来自癌症基因组图谱(TCGA)和基因型-组织表达项目(GTEX, <http://gepia.cancer-pku.cn/>)的大量数据。采用 GEPIA 法对口腔鳞状细胞癌组织以及癌旁组织中的不同基因表达进行方差分析。

1.5 基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)的富集分析

利用注释、可视化和集成 R 包“ClusterProfiler”进行 GO 功能和 KEGG 途径富集分析。GO 功能分析主要用于描述所鉴定基因可能具有的功能类型,包括细胞功能(CC)、分子功能(MF)、生物过程(BP)。KEGG 富集分析用于获得去甲汉黄芩素在口腔鳞状细胞癌的潜在信号通路,将 $P < 0.05$ 作为筛选阈值。

1.6 分子对接

将小分子的质子化状态设置为 pH=7.4,并使用 Open Babel 将化合物扩展为 3D 结构。使用 Autodock Vina(1.2.0)进行分子对接。选取最优结合构象分析相互作用。最后,通过 PyMOL 生成蛋白-配体相互作用图。

1.7 Kaplan-Meier 生存曲线的绘制

Kaplan-Meier 生存曲线可用于评估不同基因对不同癌症的预后影响(<http://kmplot.com>)。根据 5 个 Hub 基因的表达水平将口腔鳞状细胞癌样品分为 2 组(低表达组和高表达组)。总生存期(OS)被认为是至死亡的时间或自口腔鳞状细胞癌初始诊断的末次随访时间。

2 实验验证

2.1 试剂

去甲汉黄芩素购自上海源叶生物科技有限公司(质量分数≥98%,货号 B50295)。将去甲汉黄芩素溶于无菌二甲亚砜(DMSO,赛维生物有限公司,货号 GC203002-100 mL)中,储存在-20℃。

2.2 细胞培养及细胞活性检测

口腔鳞状细胞癌细胞系 CAL-27、SCC-4 细胞

购自北纳生物有限公司。将细胞在 37 ℃、98%湿度、5% CO₂ 下维持在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM, 美国 Gibco 公司) 中。通过 MTT (Biosharp 生物技术有限公司, 货号 BS86) 测定法评估去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞毒性作用。口腔鳞状细胞癌在不同浓度 (0、5、10、15、30、50 μmol/L) 的去甲汉黄芩素刺激下, 使用酶标仪 (赛默飞世尔公司) 在 490 nm 处取吸光度 (A) 来测定细胞活性。

2.3 吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 染色

将细胞密度为 1×10⁶ 个细胞/mL 的 CAL-27 和 SCC-4 细胞置于含有无菌盖玻片的 6 孔板中并生长 24 h。将细胞暴露于去甲汉黄芩素 15 μmol/L 中 24 h。然后, 将 30 μL 细胞培养物置于载玻片上, 并分别用 AO/EB (源叶生物科技有限公司, 货号 R20292-100T) 染色。然后将载玻片用盖玻片覆盖并在 PH-YGD 荧光显微镜 (中国凤凰光学有限公司) 下, 随机选择 5 个位置进行拍照。

2.4 细胞热转移实验

采用 10 μg/mL 去甲汉黄芩素处理 CAL-27 细胞 1 h 后, 用含有蛋白酶抑制剂 PBS 悬浮 CAL-27 细胞。将 DMSO 和去甲汉黄芩素组的口腔鳞状细胞癌细胞分成 9 个 PCR 管 (赛维尔生物有限公司, 货号 PCR-0803-FC), 在不同温度下 (43、46、49、52、55、58、61、64、67 ℃) 加热 3 min, 立即放入液氮中冷却。将所有样品接受 3 个冻融循环后, 离心 (12 000 r/min, 20 min)。取上层清液用于免疫蛋白印记分析。

2.5 免疫蛋白印迹检测

使用 RIPA (碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013 K) 与苯甲磺酰氟 (PMSF) 和磷酸酶抑制剂 (美国 Abcam 公司, 货号 ab 201112) 提取细胞中的总蛋白质。使用 BCA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013 K) 检测蛋白质浓度。每个泳道添加样品中含有 30 μg 总蛋白, 并且使用 RIPA 将每个样品体积相同。蛋白质在 8%~15% SDS-PAGE (中国雅酶生物医药科技有限公司, 货号 PG112) 凝胶上分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF, 中国雅酶生物医药科技有限公司, 货号 WJ001) 膜上。室温下, 在 5% BSA 中孵育 2 h 后, 将膜与相应的一抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、表皮生长因子受体 (EGFR) (中国正能生物技术有限公司, 货号 R22708、381702、201012-6H11)、

β-actin (赛维尔生物技术有限公司, 货号 GB15003) 在 4 ℃ 孵育过夜。用 1×TBST 洗涤 3 次 (10 min); 然后与二抗 (中国正能生物技术有限公司) 在室温孵育 1 h。使用 β-actin 作为参照测量每种靶蛋白的相对表达。

2.6 统计学分析

所有实验均重复 3 次, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。采用 GraphPad Prism 8.0 处理数据, 组间比较用 Student's t 检验。

3 结果

3.1 基于网络药理学分析口腔鳞状细胞癌与去甲汉黄芩素潜在靶点

为了获取有效化合物的靶基因, 根据有效成分 SMLIE 结构使用 Swiss 数据库 (probability>0) 和 SuperPred 数据库 (probability>60%) 对潜在靶基因进行检索预测, 并取交集处理。所有成分基因取并集共得到 137 个候选基因, 即去甲汉黄芩素的潜在靶点基因。

为了获取口腔鳞状细胞癌潜在靶基因, 根据关键词 “oral squamous cell carcinoma” 在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库分别得到各自靶基因^[10]。其中口腔鳞状细胞癌在 GeneCards 数据库得到了 3 255 个靶点基因, OMIM 数据库得到了 763 个靶点基因, 取并集共得到 3 826 个靶点基因, 即口腔鳞状细胞癌表型的潜在靶点基因。将去甲汉黄芩素靶基因和口腔鳞状细胞癌靶基因相互映射得到交集基因即去甲汉黄芩素抗口腔鳞状细胞癌的潜在靶基因, 共得到 71 个靶点基因, 见图 1。



图1 去甲汉黄芩素和口腔鳞状细胞癌交集靶点 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of intersection target of norwogonin and oral squamous cell carcinoma

3.2 成分-疾病-靶点网络图的构建

将去甲汉黄芩素抗口腔鳞状细胞癌的潜在靶基因导入 String 数据库构建 PPI 网络, 共有节点 70 个, 边 2 498 条。经过网络拓扑属性分析, 该网络的 degree 平均值为 71.37, 节点平均介数为 16.69, 边的平均介数为 1.43, 全局聚类系数为 0.74, 平均

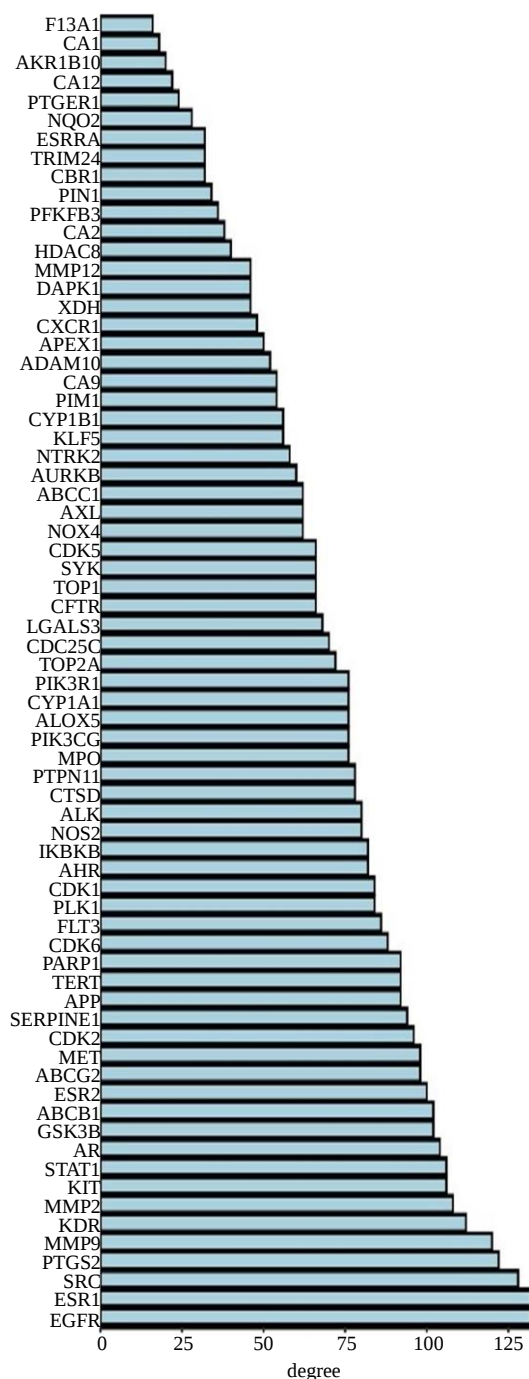


图 2 PPI 网络中 70 个基因 degree 值

Fig. 2 Degree values of 70 genes in PPI network

紧密度为 0.001, 见图 2。degree 值排名前 10 位的基因为去甲汉黄芩素治疗口腔鳞状细胞癌的潜在高置信靶基因, 即表皮生长因子受体 (EGFR)、雌激素受体 1 (ESR1)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、激酶插入结构域受体 (KDR)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、KIT 基因、信号转导和转

录激活因子 1 (STAT1)、雄激素受体 (AR), 见图 3。而 EGFR、ESR1、SRC、PTGS2、MMP9 的 degree 值排名前 5 位, 分别为 132、132、128、122、120。

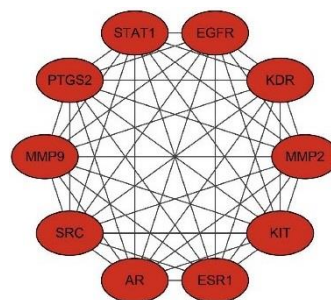


图 3 核心靶点

Fig. 3 Core target

3.3 Hub 基因的表达以及患者预后的关系

使用 GEPIA 数据库来确定口腔鳞状细胞癌中 EGFR、ESR1、SRC、PTGS2、MMP9 mRNA 表达水平 (图 4)。其中以口腔鳞状细胞癌组织 330 例以及癌旁组织 21 例作为研究对象。与癌旁组织相比, 癌组织 EGFR、SRC、PTGS2、MMP9 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而 ESR1 mRNA 表达没有显著差异。

除 Hub 基因在口腔鳞状细胞癌组织中的表达结果外, 使用 Kaplan-Meier 方法评价不同表达的 EGFR、SRC、PTGS2、MMP9 对口腔鳞状细胞癌患者预后的影响。如图 5 所示, 具有 EGFR 低表达组的患者具有比高表达组更好的 OS, 而其他基因 (SRC、PTGS2、MMP9) 的表达与 OS 之间没有显著相关性。

3.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

将去甲汉黄芩素治疗口腔鳞状细胞癌的 70 个潜在靶基因进行功能富集并将结果可视化。GO 注释分析中 BP 包括蛋白质自身磷酸化 (protein autophosphorylation)、对氧化应激的反应 (response to oxidative stress) 等; MF 包括跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity) 等; CC 包括转移酶复合物 (transferase complex)、转移含磷基团 (transferring phosphorus-containing groups)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物 (serine/threonine protein kinase complex) 等。KEGG 通路分析 70 个潜在靶基因涉及幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 (epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection) 等通路, 见

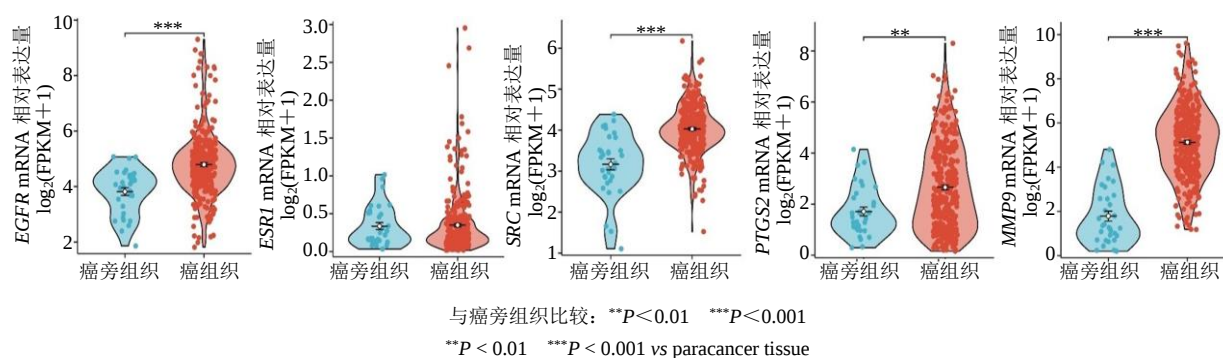


图4 Hub基因在口腔鳞状细胞癌中的表达

Fig. 4 Expression of Hub gene in oral squamous cell carcinoma

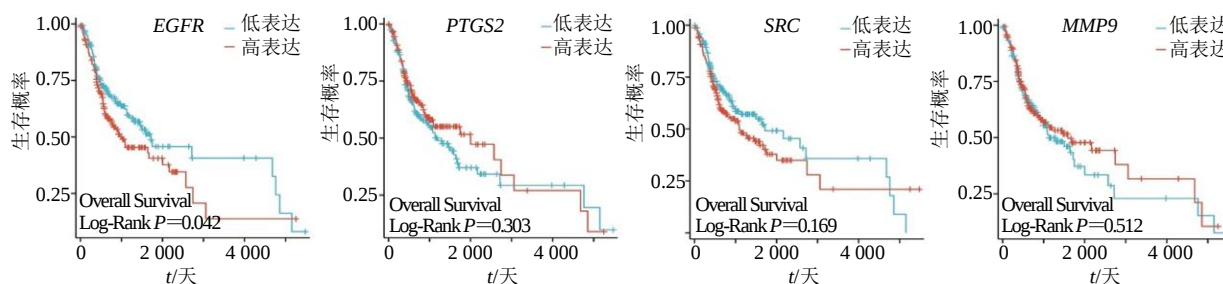


图5 Hub基因对口腔鳞状细胞癌患者生存的影响

Fig. 5 Effect of Hub gene on survival of patients with oral squamous cell carcinoma

图6。

3.5 去甲汉黄芩素直接靶向 EGFR

通过 AutoDockTools 进行去甲汉黄芩素与 EGFR 间的分子对接 (图 7)。发现 EGFR 与去甲汉黄芩素结合能较高 (-6.6 kcal/mol , $1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$), 说明 EGFR 可能与去甲汉黄芩素的关系更密切。此外, 细胞热位移实验进一步验证去甲汉黄芩素与 EGFR 之间的相互作用。结果显示, 随着温度升高, 与 DMSO 组相比, 去甲汉黄芩素处理的 CAL-27 细胞中的 EGFR 变得更稳定。表明去甲汉黄芩素可能直接结合口腔鳞状细胞癌细胞中的 EGFR (图 8)。

3.6 去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞活性的影响

去甲汉黄芩素在 0、5、10、15、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 分别作用 CAL-27、SCC-4 细胞 24h 后, 通过 MTT 方法检测去甲汉黄芩素对 CAL-27、SCC-4 细胞活性的影响。结果表明, 去甲汉黄芩素显著抑制口腔鳞状细胞癌细胞活性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 且呈浓度相关性 (图 9), CAL-27、SCC-4 细胞的 IC_{50} 为 15 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.7 去甲汉黄芩素对细胞凋亡的影响

AO/EB 染色结果表明, 去甲汉黄芩素使口腔鳞

状细胞癌细胞发生凋亡 ($P < 0.05$), 而 DMSO 组细胞未显示凋亡迹象 (图 10)。为了证实该分子确实诱导细胞凋亡的结果, 采用蛋白质印迹测定方法检测口腔鳞状细胞癌细胞中 DMSO 组和去甲汉黄芩素组中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的情况。结果显示, 去甲汉黄芩素使口腔鳞状细胞癌细胞中的 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$) (图 11)。

4 讨论

口腔鳞状细胞癌是一种严重威胁人类健康的疾病, 因其发病位置特殊, 影响患者的生活质量。手术主要用于早期治疗^[11]; 而联合治疗 (化疗和放疗) 通常用于预防复发以及提高口腔鳞状细胞癌的治疗效果, 现阶段关于口腔鳞状细胞癌的联合治疗往往伴随着不良反应^[12]。因此, 开发新的口腔鳞状细胞癌治疗药物以降低口腔鳞癌的发病率以及死亡率是非常必要的。

现阶段表明, 中药单体对于肿瘤细胞的活性抑制作用有着明显的优势^[13], 因为其抑制和杀死肿瘤细胞的同时还能够减少放疗和化疗的不良反应^[14]; 并且还可提高癌症患者的生活质量和提高免疫力, 减轻临床症状, 延长生存时间^[15]。去甲汉黄芩素是已报道具有抗癌以及抗氧化的中药单体之一^[6-8]。

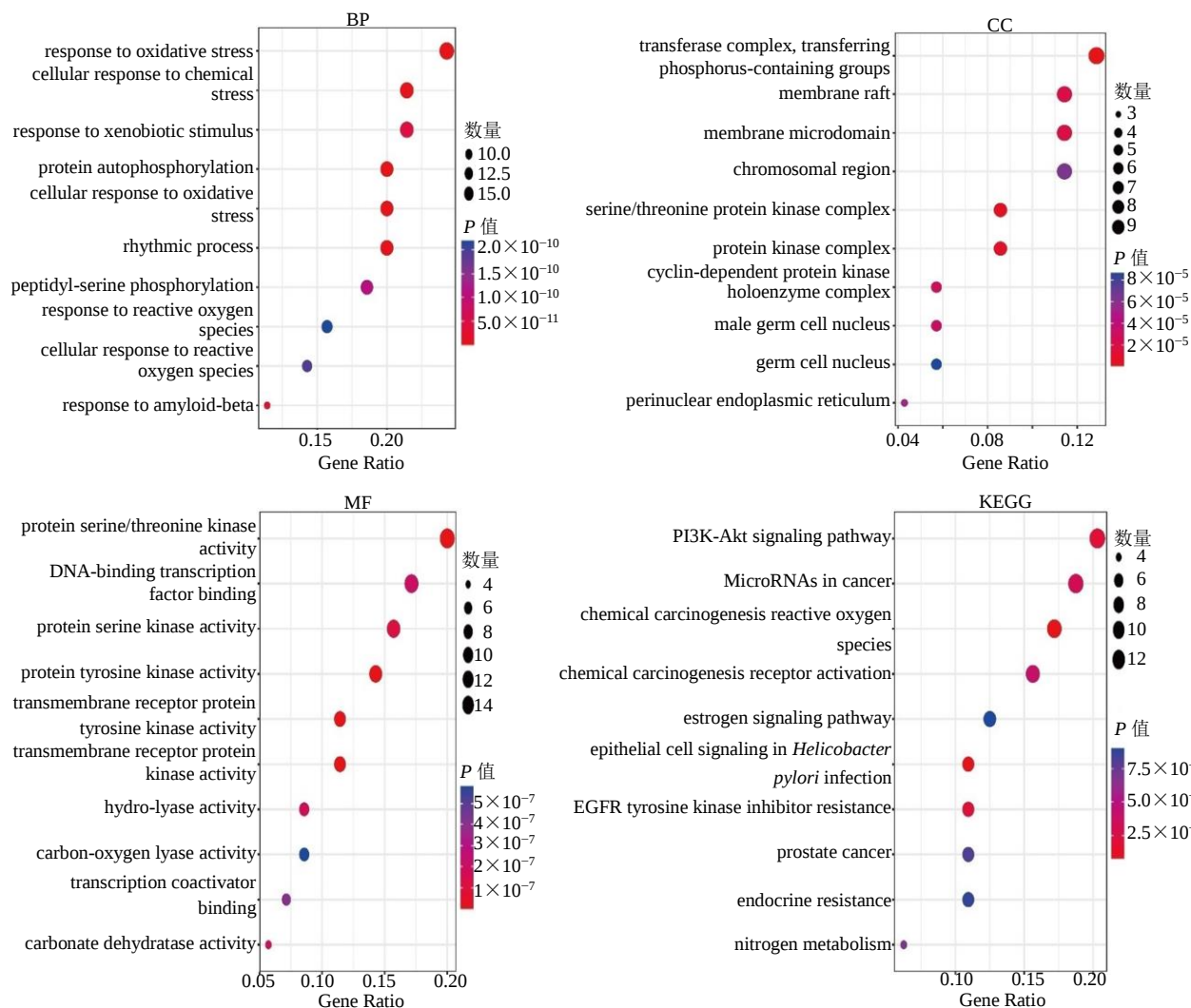


图 6 GO 功能和 KEGG 通路分析

Fig. 6 GO function and KEGG path analysis

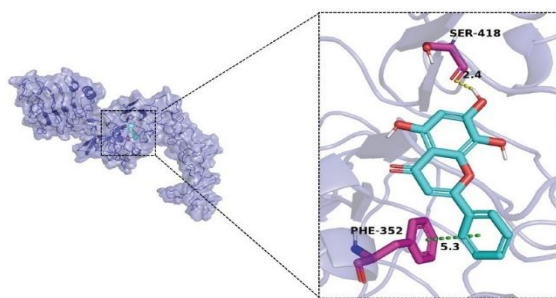


图 7 去甲汉黄芩素与 EGFR 对接构象

Fig. 7 Docking conformation of norwogonin and EGFR

通过整合网络分析,发现去甲汉黄芩素与口腔鳞状细胞癌相关的作用靶点作用于多个信号通路,主要是 EGFR、ESR1、SRC、PTGS2、MMP9,这些潜在的核心靶基因可能在口腔鳞状细胞癌的发展中起关键作用。Sinto 等^[16]报道,吉非替尼和

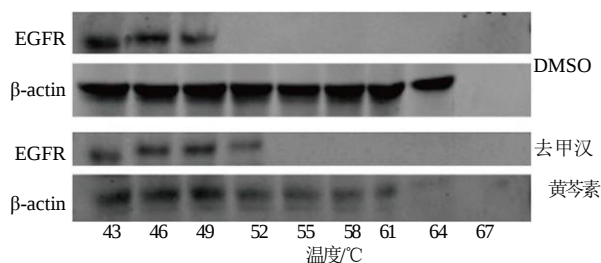


图 8 各组 EGFR 蛋白凝胶电泳图

Fig. 8 EGFR protein gel electrophoresis of each group

Bay11-7085 联合治疗通过调控 EGFR/核因子-κB (NF-κB) 信号轴使吉非替尼耐药口腔鳞状细胞癌细胞增敏。Tiwari 等^[17]发现 miRNA-125a 通过靶向雌激素相关受体 α 抑制口腔鳞癌细胞的增殖和侵袭。Li 等^[18]提出漆黄素通过抑制 Met/Src 信号通路抑制口腔鳞状细胞癌恶性增殖。Aparnadevi 等^[19]发现

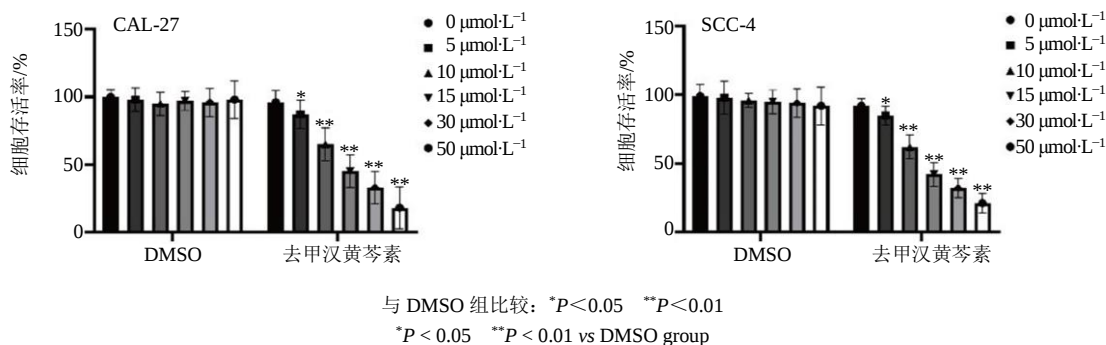


图 9 去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Effect of norwogonin on the activity of oral squamous cell carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

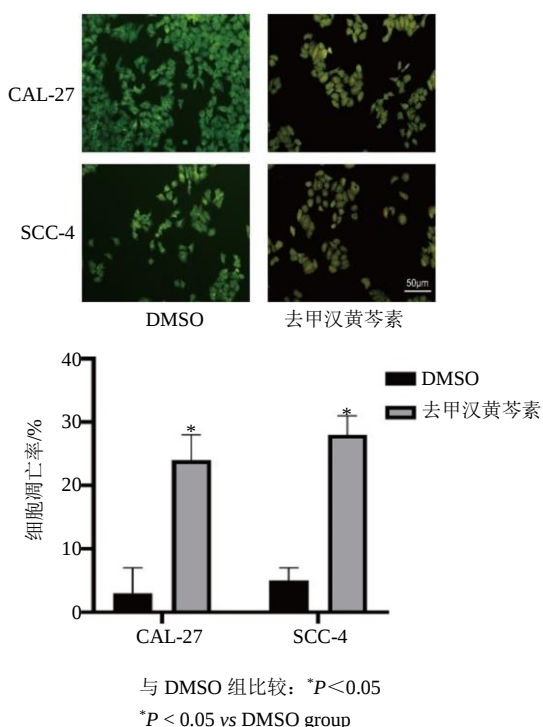


图 10 去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 10 Effect of norwogonin on apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

PTGS2 能够参与口腔黏膜下纤维化和口腔鳞状细胞癌病理生理学过程。Allen 等^[20]报道 MMP9 是一

种潜在的头颈部鳞状细胞癌侵袭因素之一。上述基因与炎症、细胞增殖、侵袭、血管生成等相关，与口腔鳞癌的发生发展密切相关。

本研究中，KEGG 富集分析表明在 71 个共同的目标主要是磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 (Akt)，氧化应激以及细胞凋亡信号通路。说明去甲汉黄芩素可能通过 PI3K-Akt 信号通路抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖，使口腔鳞癌细胞中的程序性凋亡相关蛋白 Bax 表达上调，而 Bcl-2 表达下调。在以往的研究中报道，口腔鳞状细胞癌的凋亡中 PI3K/Akt 信号通路起着至关重要的作用。PI3K/Akt 信号转导通路的下游分子 mTOR 在肿瘤发生中起着至关重要的作用^[21]，尤其是在口腔鳞状细胞癌细胞侵袭、转移以及血管生成中，磷酸化的 mTOR (p-mTOR) 过表达与口腔鳞状细胞癌预后不良相关^[22]。通路富集分析结果表明，氧化应激相关通路也参与了去甲汉黄芩素抗口腔鳞状细胞癌的生物过程。氧化应激及其诱导氧化损伤为口腔鳞状细胞癌形成的重要因素^[22]。

在本研究中，网络药理学确定了去甲汉黄芩素和口腔鳞状细胞癌靶向的 71 个靶基因。通过网络药理学的整合，发现这些基因多富集于 PI3K/Akt、氧化应激以及细胞凋亡相关通路。同时，从复杂网

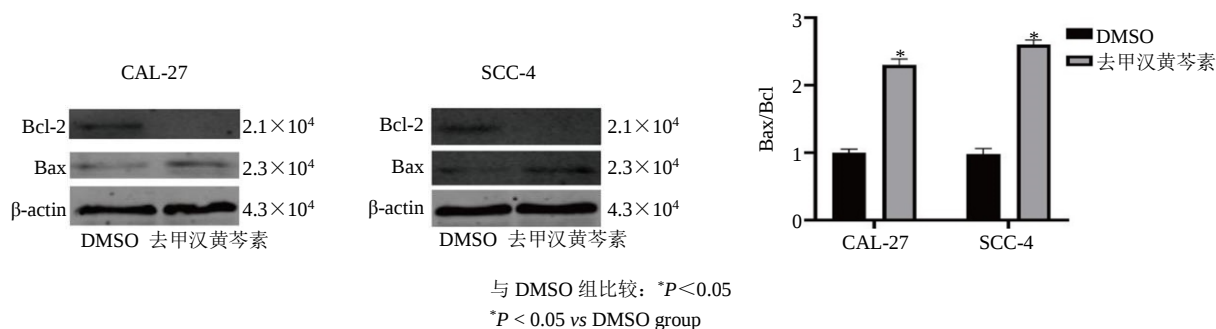


图 11 去甲汉黄芩素对口腔鳞状细胞癌细胞 Bax/Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 11 Effect of norwogonin on expression of Bax/Bcl-2 protein in oral squamous cell carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

络中获得的 5 个核心靶点 EGFR、ESR1、SRC、PTGS2、MMP9。此外,对于 Hub 基因进行分析时发现,EGFR 的异常表达与口腔鳞状细胞癌患者预后明确关系。分子对接的结果进一步揭示了去甲汉黄芩素对 EGFR 表现出优异的亲和力,是去甲汉黄芩素抗口腔鳞状细胞癌的重要靶点。以上的结果阐明了去甲汉黄芩素治疗口腔鳞癌的潜在作用以及机制,为开发治疗口腔鳞癌的新药提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mohapatra P, Mohanty S, Ansari S A, et al. CMTM6 attenuates cisplatin-induced cell death in OSCC by regulating AKT/c-Myc-driven ribosome biogenesis [J]. *FASEB J*, 2022, 36 (10): e22566.
- [2] Gao L, Li Y, Yu C, et al. Oncogenic KPNA2 serves as a biomarker and immune infiltration in patients with HPV positive tongue squamous cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 847793.
- [3] Gao L, Yu L, Li C M, et al. Karyopherin $\alpha 2$ induces apoptosis in tongue squamous cell carcinoma CAL-27 cells through the p53 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3357-3362.
- [4] Jiang Y, Li T, Wu Y, et al. GPR39 Overexpression in OSCC promotes YAP-sustained malignant progression [J]. *J Dent Res*, 2020, 99(8): 949-958.
- [5] He S, Zhang W, Li X, et al. Oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived exosomal MiR-221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2164-2174.
- [6] Choi H J, Song H H, Lee J S, et al. Inhibitory effects of norwogonin, oroxylin A, and mosloflavone on enterovirus 71 [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(5): 552-558.
- [7] Jing L L, Fan X F, Jia Z P, et al. Convergent synthesis of moslosooflavone, isowogonin and norwogonin from chrysin [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(3): 387-388.
- [8] Wang Z, Zhang Q, Zhou L, et al. Norwogonin flavone suppresses the growth of human colon cancer cells via mitochondrial mediated apoptosis, autophagy induction and triggering G₂/M phase cell cycle arrest [J]. *J BUON*, 2020, 25(3): 1449-1454.
- [9] Jing L, Gao R, Zhang J, et al. Norwogonin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 18.
- [10] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [11] Feng X, Luo Q, Zhang H, et al. The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 81.
- [12] Chen X, Liu Q, Chen Y, et al. Carboxylesterase 2 induces mitochondrial dysfunction via disrupting lipid homeostasis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Metab*, 2022, 65: 101600.
- [13] Tang B, Dong Y. Network pharmacology and bioinformatics analysis on the underlying mechanisms of baicalein against oral squamous cell carcinoma [J]. *J Gene Med*, 2023, 25(6): e3490.
- [14] Zhang L, Ling Z, Hu Z, et al. Huanglianjiadu Decoction as an effective treatment for oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 553.
- [15] Hou F, Liu Y, Cheng Y, et al. Exploring the mechanism of *Scutellaria baicalensis* Georgi efficacy against oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and molecular docking analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5597586.
- [16] Sinto M S, Thomas S, Kannan S. Combinatorial treatment with gefitinib and Bay11-7085 sensitizes primary gefitinib-resistant OSCC cells by influencing the EGFR- NF κ B signaling axis [J]. *Med Oncol*, 2021, 38(9): 110.
- [17] Tiwari A, Shivananda S, Gopinath K S, et al. Withdrawal: MicroRNA-125a reduces proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by targeting estrogen-related receptor α : Implications for cancer therapeutics [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(15): 5581.
- [18] Li Y S, Qin X J, Dai W. Fisetin suppresses malignant proliferation in human oral squamous cell carcinoma through inhibition of Met/Src signaling pathways [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5678-5683.
- [19] Aparnadevi P, Nirmal R M, Veeravarmal V, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2022, 14 (Suppl 1): S769-S773.
- [20] Allen J L, Hames R A, Mastroianni N M, et al. Evaluation of the matrix metalloproteinase 9 (MMP9) inhibitor andecaliximab as an anti-invasive therapeutic in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2022, 132: 106008.
- [21] Wang J, Jiang C, Li N, et al. The circEPSTI1/mir-942-5p/LTBP2 axis regulates the progression of OSCC in the background of OSF via EMT and the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 682.
- [22] Zhang X, Dong Y, Zhao M, et al. ITGB2-mediated metabolic switch in CAFs promotes OSCC proliferation by oxidation of NADH in mitochondrial oxidative phosphorylation system [J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12044-12059.

[责任编辑 高源]