

藁本内酯调节 HIF-1 α /Notch1 信号通路对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡和上皮 - 间质转化的影响

郭广宇¹, 刘海鹏²

1. 郑州大学第五附属医院 口腔科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第五附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

摘要:目的 探讨藁本内酯调节缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/神经源性基因 Notch 同源蛋白 1 (Notch1) 信号通路对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡和上皮 - 间质转化的影响。方法 将 CAL-27 细胞分为对照组、藁本内酯 (25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 组、顺铂组、藁本内酯+HIF-1 α 激活剂 (CoCl₂) 组。通过 CCK-8、克隆形成、流式细胞术、Transwell 小室实验、划痕实验评估细胞功能; Western blotting 检测增殖细胞核抗原 (PCNA)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、裂解的胱天蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、蜗牛家族转录抑制因子 (Snail)、HIF-1 α 、Notch1 蛋白表达情况。结果 藁本内酯可显著降低 CAL-27 细胞存活率 ($P < 0.05$), 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 99.67 $\mu\text{mol/L}$, 且对正常 HacaT 细胞无明显毒性。体外实验表明, 藁本内酯能显著抑制细胞增殖、迁移、侵袭并诱导凋亡, 同时下调 PCNA、Cyclin D1、N-cadherin、Vimentin、Snail、HIF-1 α 及 Notch1 蛋白表达, 上调 cleaved Caspase-3、Bax/Bcl-2 及 E-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性。CoCl₂ 可逆转藁本内酯对上述指标的调控作用。结论 藁本内酯可能通过抑制 HIF-1 α /Notch1 通路抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖和上皮 - 间质转化进程, 并诱导细胞凋亡。

关键词: 藁本内酯; 口腔鳞状细胞癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 神经源性基因 Notch 同源蛋白 1; 上皮 - 间质转化

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2026)03 - 0571 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.003

Effect of ligustilide on proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma by mediating HIF-1 α /Notch1 signaling pathway

GUO Guangyu¹, LIU Haipeng²

1. Department of Stomatology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacy, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the effect of ligustilide on the proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma cells by regulating HIF-1 α /Notch1 signaling pathway. **Methods** CAL-27 cells were divided into the control group, ligustilide (25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) group, cisplatin group, and ligustilide + HIF-1 α activator (CoCl₂) group. Cellular functions were evaluated using CCK-8, colony formation, flow cytometry, Transwell, and wound healing assays, and the protein levels of PCNA, Cyclin D1, Bcl-2, Cleaved Caspase-3, Bax, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail, HIF-1 α , and Notch1 were determined by Western blotting. **Results** Ligustilide inhibited the survival rate of CAL-27 cells, IC₅₀ was 99.67 $\mu\text{mol/L}$, while showing no significant cytotoxicity toward normal HacaT cells. *In vitro* experiments demonstrated that ligustilide significantly suppressed proliferation, migration, and invasion, and induced apoptosis of CAL-27 cells. It also downregulated the protein levels of PCNA, Cyclin D1, N-cadherin, Vimentin, Snail, HIF-1 α , and Notch1, while upregulated cleaved Caspase-3, Bax/Bcl-2 and E-cadherin ($P < 0.05$), and it shows a concentration-related pattern. The regulatory effects of ligustilide on the aforementioned indicators were reversed by CoCl₂. **Conclusion** Ligustilide may inhibit the proliferation and epithelial-mesenchymal transition process of oral squamous cell

收稿日期: 2025-12-24

基金项目: 郑州大学第一附属医院学科培育项目 (2025XKPY020)

作者简介: 郭广宇, 男, 研究方向为口腔医学。E-mail: hpliu2017@163.com

carcinoma cells and induce cell apoptosis by suppressing the HIF-1 α /Notch1 pathway.

Key words: ligustilide; oral squamous cell carcinoma; HIF-1 α ; Notch1; epithelial-mesenchymal transition

口腔鳞状细胞癌是头颈部最常见的恶性肿瘤, 占有口腔癌病例的 90% 以上^[1-2]。据统计, 全球每年新发病例约 37 万, 死亡病例约 17 万, 仍是严峻的公共卫生挑战^[3]。尽管手术、放疗、化疗等综合治疗手段不断进步, 口腔鳞状细胞癌仍但因高侵袭性、易复发及易耐药等特性, 患者总体预后不佳, 5 年生存率 50%~70%, 伴淋巴结转移的患者生存期不超过 1 年^[4-5]。目前口腔鳞状细胞癌的疗法主要是以手术为主、辅以放化疗的三联疗法, 然而 28% 的患者术后 3 年内出现复发, 这凸显了对更有效、低毒新疗法的迫切需求^[6]。研究显示, 藁本内酯对肺癌^[7]、膀胱癌^[8]、急性髓系白血病^[9]等多种肿瘤细胞活性具有抑制作用。既往报道指出, 在缺氧条件下, 藁本内酯可抑制口腔癌细胞 (TW2.6) 的迁移并诱导 Caspase 依赖性细胞死亡^[10]。此外, 肿瘤微环境缺氧可激活缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 进而驱动肿瘤代谢重编程、血管生成及转移等多重恶性事件^[11]。HIF-1 α 可通过激活神经源性基因同源蛋白 (Notch) 加速肿瘤进展, 抑制 HIF-1 α /Notch 通路可抑制胰腺导管腺癌细胞的恶性表型^[12-13]。因此, 本研究旨在探讨藁本内酯对口腔鳞状细胞癌细胞的影响, 并深入分析其与 HIF-1 α /Notch1 信号通路间的调控关系, 以期藁本内酯作为口腔鳞状细胞癌潜在治疗或辅助药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

口腔鳞状细胞癌细胞系 CAL-27、人永生化角质形成细胞 Hacat 购自武汉尚恩生物技术有限公司。藁本内酯 (质量分数 $\geq 98\%$, 货号 HY-N0401)、顺铂 (质量分数 99.30%, 货号 HY-17394) 购自美国 MCE 公司; HIF-1 α 激活剂 (CoCl₂, 货号 60818) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; CCK-8 试剂 (货号 abs50003) 购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司; 细胞凋亡试剂盒 (货号 C1062S) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 增殖细胞核抗原 (PCNA, 货号 ab92552)、细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1, 货号 ab134175)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2, 货号 ab182858)、裂解的胱天蛋白酶-3 (cleaved Caspase-3, 货号 ab32042)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax, 货号 ab32503)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin, 货号 ab40772)、N-钙黏蛋

白 (N-cadherin, 货号 ab76011)、波形蛋白 (Vimentin, 货号 ab92547)、蜗牛家族转录抑制因子 (Snail, 货号 ab216347)、HIF-1 α (货号 ab179483)、Notch1 (货号 ab52627)、Ki67 (货号 ab16667) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 一抗 (货号 ab8227)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗 (货号 ab49900) 购自英国 abcam 公司; ECL 化学发光底物 (货号 36223ES76) 购自上海翌圣生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及藁本内酯给药浓度筛选

CAL-27 和 Hacat 细胞均培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基中, 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。待细胞生长至对数期时, 消化传代, 分别使用 0 (对照)、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol/L 藁本内酯处理^[14], 并培养 24 h, 同时设置不加细胞的空白组, 培养结束后, 向每孔加入 CCK-8 试剂, 继续孵育 4 h。使用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率, 并通过拟合剂量效应曲线得出半数抑制浓度 (IC₅₀)。依据 IC₅₀ 结果, 筛选出后续实验所需的藁本内酯给药浓度。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.3 细胞分组与药物处理

将 CAL-27 细胞随机分为对照 (0.1% DMSO) 组、藁本内酯 (25.0、50.0、100.0 μ mol/L) 组、顺铂 (100.0 μ mol/L) 组^[15]、藁本内酯 (100.0 μ mol/L) + CoCl₂ (100.0 μ mol/L CoCl₂) 组^[16], 孵育 24 h。

1.4 CCK-8

收集各组细胞, 向每孔加入 CCK-8 试剂, 继续孵育 4 h。最后, 使用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的 A 值, 并计算细胞存活率。

1.5 克隆形成实验

取对数生长期 CAL-27 细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化后以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下常规培养 2 周。弃去培养基, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min。用 0.5% 结晶紫溶液染色 15 min。以流水轻柔漂洗, 晾干并对肉眼可辨细胞集落 (通常 > 50 个细胞) 计数。

1.6 流式细胞术

严格依据试剂盒说明书, 使用流式细胞术检测细胞凋亡水平。收集处理 48 h 后的各组 CAL-27 细

胞, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 随后重悬于结合缓冲液中。依次加入膜联蛋白 V-FITC 与碘化丙啶 (PI) 混合均匀, 避光孵育, 放入流式细胞仪分析。

1.7 Transwell 小室实验

通过 Transwell 小室实验评估细胞迁移、侵袭能力。侵袭实验使用基质胶预铺的 Transwell 小室, 而迁移实验则使用未铺胶的普通小室。将 3×10^4 个用无血清培养基重悬的细胞接种于上室, 下室则加入含 10% 胎牛血清培养基作为化学引诱物, 37 °C 孵育 24 h。取出小室, 固定穿透膜的细胞, 并使用 0.5% 结晶紫染色, 晾干后于显微镜下随机选取视野计数。

1.8 划痕实验

将 CAL-27 细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 至形成致密单层。随后, 使用 100 μ L 无菌移液器枪头垂直于板底制造划痕。分别于划痕后 0、24 h, 在显微镜下拍摄划痕区域图像, 以划痕宽度变化量化细胞迁移。

1.9 Western blotting 实验

各组细胞经相应药物处理 24 h 后, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 随后在含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解以提取总蛋白, 全程冰上操作。BCA 法定量蛋白后, 取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离, 并转至 PVDF 膜。经 5% 脱脂牛奶封闭后, 膜与相应的一抗 (PCNA、Cyclin D1、cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、HIF-1 α 、Notch1、 β -actin) 及 HRP 标记的二抗依次孵育。使用 ECL 化学发光底物于 UVP ChemStudio 成像系统下显影, 并通过 ImageQuant 5.2 软件对条带灰度值进行定量分析。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 的形式报告数据。Graphpad Prism 9 软件用于计算

IC₅₀。采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验进行多组检差异比较。

2 结果

2.1 藁本内酯给药浓度确定

如表 1 所示, 藁本内酯对 HacaT 细胞存活率均未产生显著抑制作用, 表明其对正常细胞毒性较低。与对照组相比, 藁本内酯 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol/L 组 CAL-27 细胞存活率逐渐下降 ($P < 0.05$)。通过拟合剂量效应曲线, 计算得出藁本内酯对 CAL-27 细胞的 IC₅₀ 为 99.67 μ mol/L。基于此, 后续实验选用 25.0、50.0、100.0 μ mol/L 作为藁本内酯给药浓度。

表 1 不同浓度藁本内酯对 HacaT 和 CAL-27 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Impact of ligustilide on survival rate of HacaT and CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ (μ mol·L ⁻¹)	HacaT 细胞 存活率/%	CAL-27 细胞 存活率/%
对照	0	100.00 \pm 2.96	100.00 \pm 4.02
藁本内酯	12.5	99.12 \pm 3.59	88.61 \pm 8.36*
	25.0	98.06 \pm 4.15	75.23 \pm 7.49*
	50.0	97.21 \pm 6.23	63.58 \pm 6.17*
	100.0	95.43 \pm 5.61	52.81 \pm 5.02*
	200.0	93.64 \pm 5.32	33.67 \pm 3.41*

与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

2.2 藁本内酯对 CAL-27 细胞增殖、凋亡的影响

与对照组比较, 藁本内酯各浓度组细胞存活率、克隆形成率降低, 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性。与藁本内酯 100.0 μ mol/L 组相比, 藁本内酯 + CoCl₂ 组细胞存活率、克隆形成率升高, 细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.05$), 见图 1、2 和表 2。

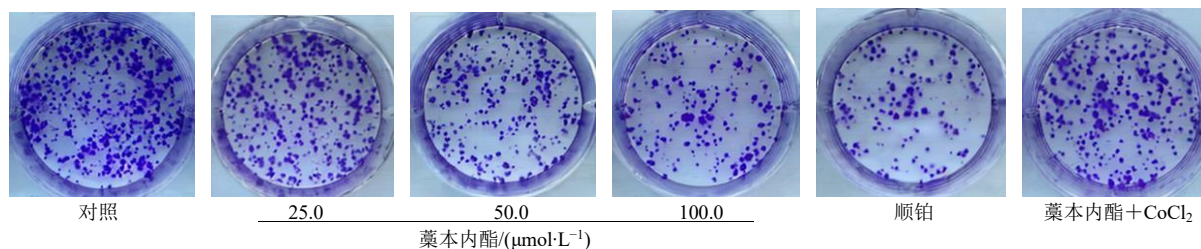


图 1 各组 CAL-27 细胞克隆形成结果 (×40)

Fig. 1 Results of colony formation of CAL-27 cell clones in each group (×40)

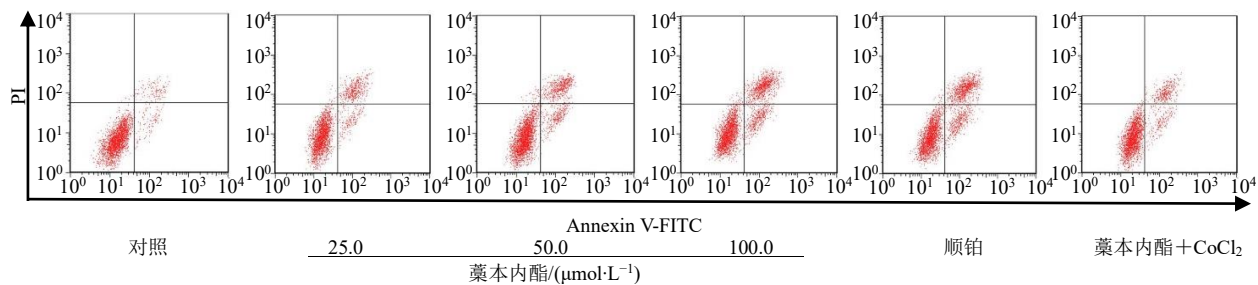


图 2 各组 CAL-27 细胞凋亡结果

Fig. 2 Results of apoptosis in each group of CAL-27 cells

表 2 各组 CAL-27 细胞增殖、凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Growth and apoptosis of each group of CAL-27 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	克隆形成率/%	细胞凋亡率/%
对照	—	100.00±3.78	51.63±5.21	3.67±0.41
藜本内酯	25.0	73.29±7.35*	37.25±3.82*	17.23±1.85*
	50.0	61.57±6.22*#	26.47±2.49*#	28.11±2.92*#
	100.0	50.32±5.14*##&	15.23±1.67*##&	39.37±4.03*##&
顺铂	100.0	48.79±4.93*##&	13.81±1.42*##&	40.69±4.15*##&
藜本内酯+CoCl ₂	100.0+100.0	80.11±7.12@	39.21±3.28@	13.45±1.42@

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与藜本内酯 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$; 与藜本内酯 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与藜本内酯 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ligustilide 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ vs ligustilide 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs ligustilide 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

2.3 藜本内酯对 CAL-27 细胞迁移、侵袭的影响

与对照组比较, 藜本内酯各浓度组迁移及侵袭细胞数、愈合划痕率显著降低 ($P < 0.05$); 与藜本内酯 100.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组相比, 藜本内酯+CoCl₂ 组迁移及侵袭细胞数、愈合划痕率显著增加 ($P < 0.05$), 见图 3、4 和表 3。

2.4 藜本内酯对细胞凋亡相关蛋白的影响

与对照组相比, PCNA、Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达显著降低, cleaved Caspase-3、Bax、Bax/Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性。与藜本内酯 100.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组相比, 藜本内酯+CoCl₂

组 PCNA、Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达显著升高, cleaved Caspase-3、Bax、Bax/Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 5、表 4。

2.5 藜本内酯对 CAL-27 细胞上皮-间质细胞转化的影响

与对照组比较, 藜本内酯各浓度组 E-cadherin 蛋白表达升高, N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与藜本内酯 100.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组相比, 藜本内酯+CoCl₂ 组 E-cadherin 蛋白表达显著降低, N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 6、表 5。

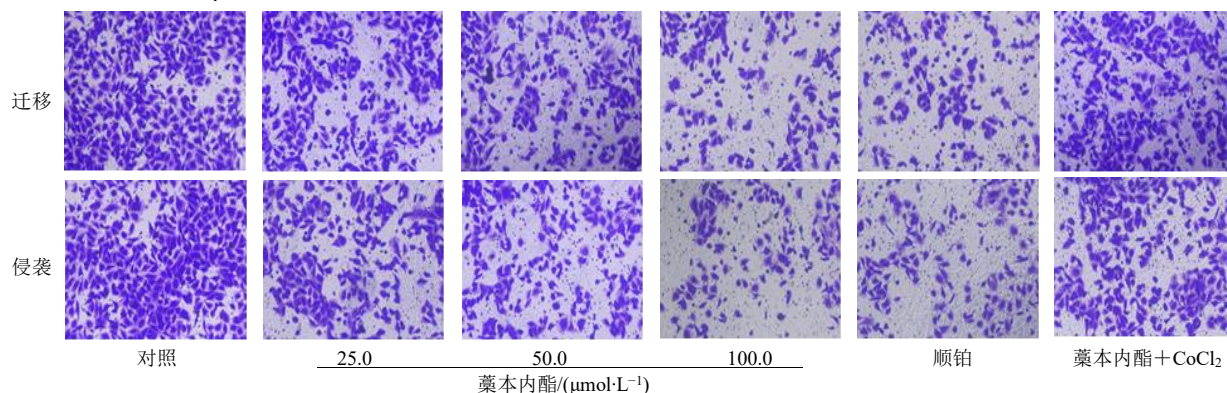


图 3 各组 CAL-27 细胞迁移侵袭图 (Transwell 小室法, $\times 200$)

Fig. 3 Migratory and invasive graphs of each group of CAL-27 cell lines (Transwell chamber, $\times 200$)

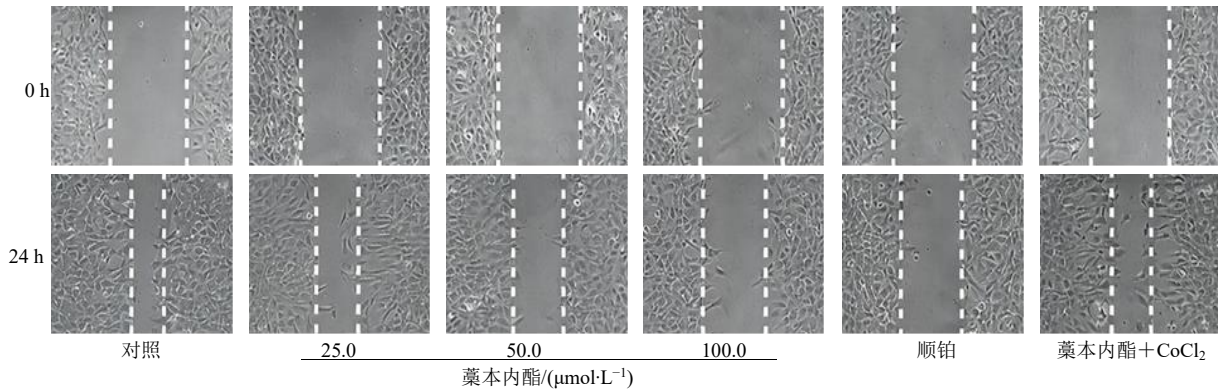


图 4 各组 CAL-27 细胞划痕图 (×200)

Fig. 4 Wound healing assay results of each group of CAL-27 cell lines (×200)

表 3 各组 CAL-27 细胞迁移和侵袭情况 (x̄ ± s, n = 6)

Table 3 Migration and invasion of each group of CAL-27 cell lines (x̄ ± s, n = 6)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	划痕愈合率/%
对照	—	293.74 ± 30.25	276.43 ± 29.11	61.23 ± 6.15
藜本内酯	25.0	231.52 ± 24.06*	213.42 ± 21.16*	49.38 ± 5.16*
	50.0	173.64 ± 18.27*#	152.34 ± 16.08*#	37.25 ± 4.03*#
	100.0	122.71 ± 13.05*##&	103.21 ± 11.24*##&	25.48 ± 2.61*##&
顺铂	100.0	120.63 ± 12.16*##&	101.34 ± 10.16*##&	23.69 ± 2.42*##&
藜本内酯 + CoCl ₂	100.0 + 100.0	236.24 ± 24.21@	225.67 ± 23.14@	52.75 ± 5.33@

与对照组比较: *P < 0.05; 与藜本内酯 25.0 μmol·L⁻¹ 组比较: #P < 0.05; 与藜本内酯 50.0 μmol·L⁻¹ 组比较: &P < 0.05; 与藜本内酯 100.0 μmol·L⁻¹ 组比较: @P < 0.05。

*P < 0.05 vs control group; #P < 0.05 vs ligustilide 25.0 μmol·L⁻¹ group; &P < 0.05 vs ligustilide 50.0 μmol·L⁻¹ group; @P < 0.05 vs ligustilide 100.0 μmol·L⁻¹ group.

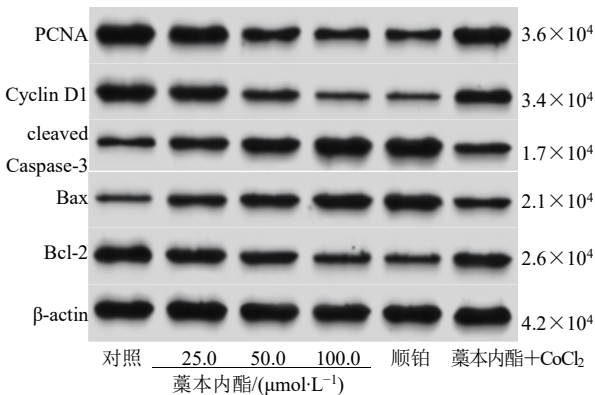


图 5 各组 CAL-27 细胞凋亡相关蛋白条带图

Fig. 5 Expression bar graphs of apoptosis-related protein in each group of CAL-27 cell lines

2.6 藜本内酯对 CAL-27 细胞 HIF-1α/Notch1 信号通路的影响

与对照组比较, 藜本内酯各浓度组 HIF-1α、Notch1 蛋白表达显著降低 (P < 0.05); 与藜本内酯 100.0 μmol/L 组相比, 藜本内酯 + CoCl₂ 组 HIF-1α、Notch1 蛋白表达均显著升高 (P < 0.05), 见图 7、

表 6。

3 讨论

目前口腔鳞状细胞癌多采用以手术为主的综合治疗策略, 但患者术后常出现咀嚼、吞咽等功能障碍, 严重影响生活质量。因此, 开发安全有效的口腔鳞状细胞癌治疗药物对于提升患者生存质量具有重要意义。

天然植物化学成分因其良好的生物安全性与多靶点特性, 在肿瘤防治中显示出广阔前景。藜本内酯已在多种肿瘤模型中显示出抗肿瘤活性^[17-19]。本研究探讨了藜本内酯通过调控 HIF-1α/Notch1 信号通路对 CAL-27 细胞增殖、凋亡及上皮间质细胞转化的影响。本研究首先评估了藜本内酯对口腔鳞状细胞癌细胞 CAL-27 及人永生角质形成细胞 Hacat 的毒性作用。结果显示, 藜本内酯在 12.5~200.0 μmol/L 对 Hacat 细胞无明显毒性, 但对 CAL-27 细胞表现出增殖抑制效应, IC₅₀ 为 99.67 μmol/L。据此, 后续实验设定藜本内酯给药浓度为 25.0、50.0、100.0 μmol/L, 并进行机制探讨。结果显示,

表 4 各组 CAL-27 细胞凋亡相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Expression of apoptosis-related protein in each group of CAL-27 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量					
		PCNA	Cyclin D1	cleaved Caspase-3	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
对照	—	1.15±0.12	1.01±0.11	0.32±0.03	0.28±0.04	1.06±0.11	0.26±0.03
藁本内酯	25.0	0.91±0.09*	0.70±0.07*	0.61±0.06*	0.54±0.05*	0.85±0.09*	0.64±0.08*
	50.0	0.58±0.06*#	0.46±0.05*#	0.95±0.11*#	0.73±0.07*#	0.63±0.06*#	1.16±0.12*#
	100.0	0.39±0.04*##&	0.22±0.03*##&	1.19±0.13*##&	0.95±0.10*##&	0.31±0.03*##&	3.06±0.29*##&
顺铂	100.0	0.36±0.04*##&	0.20±0.02*##&	1.21±0.14*##&	0.97±0.09*##&	0.29±0.03*##&	3.34±0.32*##&
藁本内酯+CoCl ₂	100.0+100.0	0.96±0.10@	0.75±0.08@	0.57±0.06@	0.48±0.05@	0.81±0.08@	0.59±0.07@

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与藁本内酯 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$; 与藁本内酯 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与藁本内酯 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ligustilide 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ vs ligustilide 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs ligustilide 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

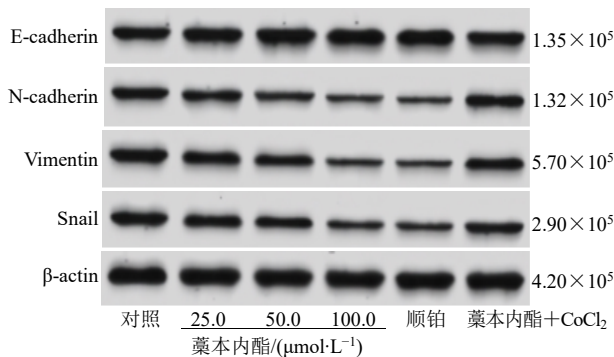


图 6 各组 CAL-27 细胞 EMT 标志蛋白表达条带图

Fig. 6 Expression bar graphs of EMT biomarker protein in each group of CAL-27 cell lines

表 5 各组 CAL-27 细胞上皮间质细胞转化标志蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Expression of Epithelial-mesenchymal transition biomarker protein in each group of CAL-27 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量			
		E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	Snail
对照	—	0.55±0.05	0.53±0.06	0.61±0.07	0.65±0.07
藁本内酯	25.0	0.68±0.06*	0.42±0.04*	0.50±0.05*	0.53±0.06*
	50.0	0.82±0.07*#	0.31±0.03*#	0.38±0.04*#	0.41±0.04*#
	100.0	0.95±0.09*##&	0.20±0.02*##&	0.26±0.03*##&	0.30±0.03*##&
顺铂	100.0	0.97±0.08*##&	0.18±0.02*##&	0.24±0.02*##&	0.27±0.03*##&
藁本内酯+CoCl ₂	100.0+100.0	0.65±0.06@	0.45±0.05@	0.53±0.05@	0.56±0.06@

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与藁本内酯 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$; 与藁本内酯 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与藁本内酯 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$ 。

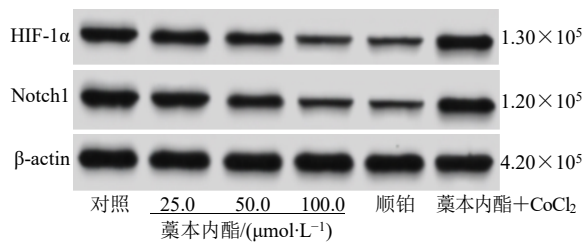
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ligustilide 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ vs ligustilide 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs ligustilide 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

环节。此过程中, 上皮标志物 E-cadherin 表达下调, 细胞连接解体, 进而细胞获得迁移与侵袭能力; 与此同时, 间质标志物 N-cadherin 与 Vimentin 表达则上调, 赋予细胞间充质表型。关键转录因子 Snail 作

藁本内酯可显著抑制 CAL-27 细胞存活与克隆形成能力, 通过流式细胞术表明, 藁本内酯以浓度相关方式显著促进 CAL-27 细胞凋亡。Western blotting 检测发现藁本内酯处理可显著升高 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白水平。既往研究证实, Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡途径的核心调控者, Bax/Bcl-2 升高该途径被激活, cleaved Caspase-3 表达上调则表明凋亡已进入执行阶段^[20]。由此推测, 藁本内酯可能通过重塑 Bcl-2 家族蛋白平衡并激活 Caspase-3 依赖性凋亡通路, 诱导口腔鳞状细胞癌细胞凋亡。

上皮-间质细胞转化是肿瘤侵袭转移的核心

为上皮间质细胞转化的“主开关”, 可直接抑制 E-cadherin 等上皮基因的转录, 驱动上皮间质细胞转化进程^[21-22]。本研究发现, 藁本内酯干预后, CAL-27 细胞中 E-cadherin 蛋白表达升高, N-cadherin、

图 7 各组 CAL-27 细胞 HIF-1 α 、Notch1 蛋白条带图Fig. 7 Protein expression bar graphs of HIF-1 α and Notch1 in each group of CAL-27 cell lines表 6 各组 CAL-27 细胞 HIF-1 α 、Notch1 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 6 Protein expression of HIF-1 α and Notch1 in each group of CAL-27 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量	
		HIF-1 α	Notch1
对照	—	0.83 \pm 0.08	0.96 \pm 0.10
藁本内酯	25.0	0.67 \pm 0.07*	0.71 \pm 0.07*
	50.0	0.53 \pm 0.06*#	0.56 \pm 0.06*#
	100.0	0.26 \pm 0.03*#&	0.31 \pm 0.04*#&
顺铂	100.0	0.23 \pm 0.03*#&	0.28 \pm 0.03*#&
藁本内酯+CoCl ₂	100.0+100.0	0.70 \pm 0.07@	0.75 \pm 0.08@

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与藁本内酯 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$; 与藁本内酯 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$; 与藁本内酯 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: @ $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ligustilide 25.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ vs ligustilide 50.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; @ $P < 0.05$ vs ligustilide 100.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

Vimentin、Snail 蛋白表达下降, 表明藁本内酯可有效逆转口腔鳞状细胞癌细胞的上皮-间质细胞转化进程, 为干预肿瘤转移提供了理论依据。

研究表明, HIF-1 α 是多种癌症生物学进程的关键调控因子^[23-24]。下调 HIF-1 α 可抑制口腔鳞状细胞癌淋巴结转移^[25]。此外, HIF-1 α 正向调控 Notch1 信号^[16], 其通路激活可显著促进前列腺癌细胞的增殖与侵袭^[26]。本研究发现, 藁本内酯能够以浓度相关地方式显著抑制 CAL-27 细胞中 HIF-1 α 、Notch1 蛋白表达, 提示其可通过调控该通路发挥抗肿瘤作用。为进一步评估藁本内酯的潜在治疗价值, 本研究以一线化疗药物顺铂作为阳性对照。结果显示, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 藁本内酯在抑制细胞增殖、促进凋亡、逆转上皮-间质细胞转化以及下调 HIF-1 α /Notch1 通路方面的效果与顺铂相当, 表明藁本内酯具备治疗口腔鳞状细胞癌的潜力。机制验证方面, 采用 HIF-1 α 激活剂 CoCl₂ 进行联合干预, 发现 CoCl₂

可显著逆转藁本内酯对 CAL-27 细胞恶性表型的抑制作用, 进一步确认了 HIF-1 α /Notch1 通路为藁本内酯作用的关键靶点。

综上, 藁本内酯通过抑制 HIF-1 α /Notch1 通路抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖和上皮-间质细胞转化进程, 并诱导细胞凋亡, 为其作为口腔鳞状细胞癌潜在治疗或辅助药物提供了坚实的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen C C, Chen C Y, Chou L F, *et al.* Corylin attenuates oral squamous cell carcinoma progression through c-Myc inhibition [J]. *J Dent Sci*, 2025, 20(4): 2322-2331.
- [2] Badwelan M, Muaddi H, Ahmed A, *et al.* Oral squamous cell carcinoma and concomitant primary tumors, what do we know? A review of the literature [J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(4): 3721-3734.
- [3] González-Moles M Á, Aguilar-Ruiz M, Ramos-García P. Challenges in the early diagnosis of oral cancer, evidence gaps and strategies for improvement: A scoping review of systematic reviews [J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4967.
- [4] Shahinas J, Hysi D. Methods and risk of Bias in molecular marker prognosis studies in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Dis*, 2018, 24(1-2): 115-119.
- [5] Chai A W Y, Lim K P, Cheong S C. Translational genomics and recent advances in oral squamous cell carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 61: 71-83.
- [6] Blatt S, Krüger M, Sagheb K, *et al.* Tumor recurrence and follow-up intervals in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(23): 7061.
- [7] Geng P Y, Zhao J H, Li Q, *et al.* Z-Ligustilide combined with cisplatin reduces PLPP1-mediated phospholipid synthesis to impair cisplatin resistance in lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(23): 17046.
- [8] Yin L Q, Ying L, Guo R, *et al.* Ligustilide induces apoptosis and reduces proliferation in human bladder cancer cells by NF κ B1 and mitochondria pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 101(6): 1252-1261.
- [9] Chen Z G, Zhu Q, Qi X Y, *et al.* Dual role of Nrf2/HO-1 pathway in Z-ligustilide-induced ferroptosis against AML cells [J]. *Phytomedicine*, 2024, 124: 155288.
- [10] Hsu R J, Peng K Y, Hsu W L, *et al.* Z-Ligustilide induces c-Myc-dependent apoptosis via activation of ER-stress signaling in hypoxic oral cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 824043.
- [11] Liang Y, Su T T, Zhu S J, *et al.* *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* normalizes tumor blood vessels by HIF-1 α to

- anti-tumor metastasis in colon cancer [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156562.
- [12] 沈新辉. 基于“阳化气, 阴成形”理论探讨加味济生肾气汤调控 HIF-1 α /VEGF/Notch1 信号通路治疗肝癌机制研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2023.
- [13] Zhang Y L, Liu Q F, Yang S, *et al.* Knockdown of LRRN1 inhibits malignant phenotypes through the regulation of HIF-1 α /Notch pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 23: 51-64.
- [14] 郝凯凯, 王晓敏, 刘峥, 等. 藜本内酯调节 RhoA/ROCK 信号通路对食管癌细胞生物学行为的影响 [J]. *天津医药*, 2024, 52(11): 1164-1170.
- [15] Puengsurin D, Buranapraditkun S, Leewansangtong C, *et al.* Effects of chrysin on oral squamous cell carcinoma *in vitro* [J]. *Eur J Dent*, 2023, 17(3): 797-803.
- [16] 李闯, 张正攀, 叶劲松, 等. ZBP-89 通过 HIF-1 α /Notch1 通路对肝癌干细胞干性的调控作用 [J]. *解剖科学进展*, 2021, 27(5): 596-600.
- [17] Wu Y, Rong L, Zhang S F, *et al.* Ligustilide inhibits the PI3K/Akt signalling pathway and suppresses cholangiocarcinoma cell proliferation, migration, and invasion [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2025, 20(2): 200-212.
- [18] Alshehri A F, Khodier A E, Al-Gayyar M M. Antitumor activity of ligustilide against ehrlich solid carcinoma in rats via inhibition of proliferation and activation of autophagy [J]. *Cureus*, 2023, 15(6): e40499.
- [19] 王敏, Hideki Hayashi, 刘建勋, 等. 藜本内酯对神经干细胞/祖细胞的增殖作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6261-6267.
- [20] Phongsuwichetsak C, Suksrichavalit T, Chatupheeraphat C, *et al.* *Diospyros rhodocalyx* Kurz induces mitochondrial-mediated apoptosis via BAX, Bcl-2, and caspase-3 pathways in LNCaP human prostate cancer cell line [J]. *PeerJ*, 2024, 12: e17637.
- [21] Tomecka P, Kunachowicz D, Górczyńska J, *et al.* Factors determining epithelial-mesenchymal transition in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8972.
- [22] Ren L L, Fang Z R, Xu J J, *et al.* Matrine inhibits breast cancer cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition through regulating the LINC01116/miR-9-5p/ITGB1 axis [J]. *Balkan Med J*, 2025, 42(1): 54-65.
- [23] Wang Y, Wu D, Gai J X, *et al.* Elevated VAMP8 expression promotes cervical cancer progression by enhancing autophagy via HIF-1 pathway [J]. *BMC Med*, 2025, 23(1): 544.
- [24] Wu Y J, Zeng Y, Wu Y, *et al.* HIF-1 α -induced long noncoding RNA LINC02776 promotes drug resistance of ovarian cancer by increasing polyADP-ribosylation [J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70244.
- [25] Li Y X, Li B, Yang K, *et al.* PER3 suppresses tumor metastasis of oral squamous cell carcinoma by promoting HIF-1 α degradation [J]. *Transl Oncol*, 2025, 52: 102258.
- [26] Wu K, Wu M H, Yang H, *et al.* Hypoxia promotes conversion to a stem cell phenotype in prostate cancer cells by activating HIF-1 α /Notch1 signaling pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(7): 2138-2152.

[责任编辑 高源]