

木犀草素对口腔鳞状细胞癌迁移、侵袭、增殖和凋亡的影响

杨 杰¹, 嵇学武², 王 鑫³, 刘伽伽⁴, 曲会娟⁴, 王 婧^{1*}

1. 山东第二医科大学附属第一医院 口腔科, 山东 潍坊 266000

2. 山东第二医科大学附属诸城市人民医院 口腔科, 山东 诸城 262200

3. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

4. 山东第二医科大学口腔医学院, 山东 潍坊 261053

摘要: **目的** 探讨木犀草素对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 恶性表型干预作用及相关机制。**方法** 于在线数据库中检索木犀草素与 OSCC 的交集靶点并导入 R 软件开展富集分析。并由 Cytoscape 软件根据交集靶点度值筛选核心靶点。经 UALCAN 数据库对核心靶点在 OSCC 组织中的表达进行进一步分析。通过 CCK-8、Transwell、平板集落形成、划痕与流式实验分别测定木犀草素对细胞活性、侵袭、增殖、迁移与凋亡能力的影响; 由 Western blotting 实验检测蛋白的相对表达量; 最后通过裸鼠成瘤实验观察木犀草素对裸鼠成瘤情况、肿瘤质量及相关靶点蛋白表达的影响。**结果** 收集到木犀草素与 OSCC 交集靶点 277 个, 前 3 位核心靶点为 Src 酪氨酸激酶 (SRC)、磷脂酰肌醇-3 激酶调节亚单位 1 (PIK3R1) 与蛋白激酶 B (AKT1)。相比正常组织, OSCC 组织内 SRC、PIK3R1 与 AKT1 的 mRNA 高表达 ($P < 0.05$)。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析结果显示, 交集基因于信号通路 PI3K/Akt 上富集。相较于对照组, 木犀草素组细胞的细胞活性、增殖、迁移和侵袭能力受抑, 凋亡能力提高, 且具有药物浓度相关性 ($P < 0.05$)。相较于对照组, 木犀草素组 SRC、PIK3R1、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达随药物浓度呈相关性降低 ($P < 0.05$)。木犀草素对裸鼠成瘤、肿瘤质量大小具有抑制作用。同时, 与对照组比较, 木犀草素组瘤体的 SRC、PIK3R1、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** 木犀草素可降低 SRC 与 PIK3R1 蛋白表达, 同时下调 PI3K/Akt 轴使 OSCC 细胞侵袭、迁移与增殖能力受抑, 促进细胞凋亡。

关键词: 木犀草素; 口腔鳞状细胞癌; PI3K/Akt 信号通路; Src 酪氨酸激酶; 磷脂酰肌醇-3 激酶调节亚单位 1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)06-1497-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.06.011

Effects of luteolin on migration, invasion, proliferation, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma

YANG Jie¹, ZHUO Xuewu², WANG Xin³, LIU Jiajia⁴, QU Huijuan⁴, WANG Jing¹

1. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University, Weifang 266000, China

2. Department of Stomatology, Zhucheng People's Hospital Affiliated to Shandong Second Medical University, Zhucheng 262200, China

3. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

4. School of Stomatology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of luteolin on the malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The intersection targets of luteolin and OSCC were searched in the online database and imported into R software for enrichment analysis. The core targets were screened by Cytoscape software according to the degree value of intersection targets. The expression of core targets in OSCC tissues was further analyzed by UALCAN database. The effects of luteolineolin on cell viability, invasion, proliferation, migration and apoptosis were determined by CCK-8, Transwell, plate colony formation, scratch and flow cytometry. The relative protein expression was detected by Western blotting. The effect of luteolin on tumor formation, tumor weight and the expression of related target proteins in nude mice were observed. **Results** A total of 277 intersection targets between

收稿日期: 2024-11-05

基金项目: 山东省医药卫生科技项目 (202308020503); 潍坊市科技发展计划项目 (2022YX047)

作者简介: 杨 杰, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面部恶性疾病的诊治。E-mail: 13791691773@163.com

*通信作者: 王 婧, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事疾病的诊疗及干预。E-mail: mdhdhsk@163.com

luteolin and OSCC were collected, and the top three core targets were SRC, PIK3R1, and AKT1. Compared with normal tissues, the mRNA expressions of SRC, PIK3R1 and AKT1 in OSCC tissues were higher ($P < 0.05$). KEGG enrichment analysis indicated cross-gene enrichment in the PI3K/Akt signaling pathway. Compared with the control group, the cell activity, proliferation, migration and invasion ability of the luteolin group were inhibited, and the apoptosis ability was increased ($P < 0.05$). The luteolin group had significantly lower protein expression levels of SRC, PIK3R1, p-PI3K, and p-Akt than the control group ($P < 0.05$). Luteolin inhibited tumor formation and tumor weight in nude mice ($P < 0.05$). Meanwhile, the protein expression of SRC, PIK3R1, p-PI3K and p-Akt in luteolin group was lower than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Luteolin reduces the expression of SRC and PIK3R1 proteins, weakens the PI3K/Akt signaling pathway, and then inhibits the invasion, migration and proliferation of OSCC cells, and induces cell apoptosis.

Key words: luteolin; oral squamous cell carcinoma; PI3K/Akt; SRC; PIK3R1

在多种头颈部恶性肿瘤中, 口腔鳞状细胞癌(OSCC)有着极高的发生率, 严重威胁人类健康^[1-2]。目前, 联合治疗是治疗该肿瘤的主流方案, 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不断的被尝试, 然而患者的死亡率仍比较高, 5 年生存率通常不超过 60%^[4]。因此, 研究应用于治疗 OSCC 的药物具有重要意义。

木犀草素集多种生物学功能于一体, 如抗过敏、抗氧化、抗菌、抗炎, 属于天然黄酮类化合物, 近年来其抗肿瘤效应引起了人们的广泛关注^[5-6]。数据显示, 木犀草素的抗癌效果理想, 而且作用面较广, 主要通过使细胞周期阻滞, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制细胞侵袭、增殖和转移等方法实现^[7-8]。然而, 目前关于其对 OSCC 的作用及相关机制尚不完全明确。

为验证木犀草素对 OSCC 细胞的产生发展影响, 本研究以 OSCC 细胞的迁移、侵袭、增殖和凋亡能力为切入点, 探讨其干预 OSCC 细胞生物学行为, 并分析其中潜在机制, 为现阶段治疗 OSCC 的方案提供新思路。

1 材料

1.1 细胞和动物

本实验所用的人 OSCC 细胞株 CAL-27 细胞为山东第二医科大学口腔医学实验室馈赠。实验所用的裸鼠购于济南朋悦公司 [动物生产许可证号为 SCXK (鲁) 2022-0006], 裸鼠均为 4 周龄的雌鼠, 体质量为 (20.0 ± 2.0) g, 共 12 只。本实验已通过山东第二医科大学动物伦理委员会审批 (No: 2024SDL673)。

1.2 试剂

木犀草素 (批号 HY-N0162R-1mg, 质量分数 $\geq 99.5\%$, 美国 MCE 生物科技公司) 购自广州市齐云生物技术公司; 磷酸盐 (PBS) 缓冲液、0.25% 胰酶消化液、DMEM 培养基 (批号 10010031、15050057、

11965092) 均购于赛默飞公司; 胎牛血清 (FSP500) 购于 ExCellBio 公司; 青霉素-链霉素双抗 (批号 15140-122) 购于 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒、基质胶 (批号 C0038、C0372)、4% 多聚甲醛 (POM, 批号 P1110) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 超敏化学发光显色试剂 (批号 SW2050) 购自碧云天生物技术公司; RIPA 蛋白裂解液 (批号 20-188) 购于德国默克公司; 非受体酪氨酸蛋白激酶 (SRC, 批号 ab109381)、磷脂酰肌醇 3-激酶调控亚基 (PIK3R1, 批号 ab40755), 英国 Abcam 公司; 丝氨酸和苏氨酸激酶 (Akt)、磷脂酰肌醇 3 (PI3K)、磷酸化 Akt、磷酸化 PI3K (批号: 9272、4292、4060、4228) 抗体均购自美国 CST 公司; IgG 二抗 (I5256) 购自美国 Sigma Aldrich 公司。

1.3 仪器

Sorvall ST 16R 二氧化碳细胞恒温培养箱、MR23i 台式低温离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); 高压蒸汽灭菌锅 (山东威斯顿设备有限公司); -80°C 超低温冰箱 (济南江雪医疗器械有限公司); PowerPac HC 蛋白电泳设备 (美国 Bio-Rad 公司); CKX53 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 木犀草素-OSCC 核心靶点获取及生物信息学分析

根据 TCMSP、Pubchem、Swiss target prediction、GeneCards、TTD 与 OMIM 数据库获取木犀草素-OSCC 交集靶点。并将木犀草素-OSCC 靶点导入至 STRING 分析平台进行分析后导出为 tsv 格式文件。通过 Cytoscape 软件对上传的数据进行分析, 并根据度值筛选出核心靶点。然后使用 UALCAN 数据库探究核心靶点于正常组织及 OSCC 组织内的 mRNA 表达量 ($|\log FC| > 1$ 与 $P < 0.05$ 为基因具有显著性)。

2.2 富集分析

用 R 语言包及 Bioconductor 插件进行基因本体

(GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 使用 ClusterProfiler 等处理数据和分析数据, 对木犀草素潜在的抗 OSCC 靶点进行 GO 功能分析, 分为生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组成 (CC) 部分; KEGG 富集分析可对药物交集靶点所富集的信号进行获取及数据可视化展示^[9]。

2.3 药物配制

取 20 mg 木犀草素置于 873.4 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 中, 震荡溶解, 配成 $80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中储存, 加药时将母液溶于 DMEM 培养基稀释到目标质量浓度。将 1% 青霉素-链霉素双抗和 10% 胎牛血清加入细胞培养的 DMEM 培养基当中。

2.4 CCK-8 实验

取处于对数生长期的 CAL-27 细胞接种 (每孔 4×10^3 个细胞) 96 孔板, 然后转移到培养箱内进行 1 d 的培养, 将含有浓度为 0、10、20、40、 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素的培养基分别加入其中, 进行 2 d 的干预, 按照每组 5 孔的标准设复孔, 同时设置调零孔。进行 24、48 h 的培养后, 将 CCK-8 试剂加入各孔当中, 每孔 $10\text{ }\mu\text{L}$, 进行 2 h 的培养, 用酶标仪对 450 nm 处的吸光度 (A) 值进行测量, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{木犀草素}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})^{[10]}$$

2.5 实验分组

将 CAL-27 细胞在 DMEM 完全培养液中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养, 待细胞生长至合适密度时消化传代。以预实验结果为参考, 设立对照组和木犀草素低、中、高剂量 (10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 为后续实验研究做好准备。

2.6 平板集落形成实验

处于对数生长期的 CAL-27 细胞的接种至 6 孔板 (每孔 0.5×10^3 个细胞), 进行 24 h 的培养, 用含木犀草素 (质量浓度为 0、10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的完全培养基继续进行 6~10 d 培养, 待显微镜观察显示对照组细胞形成大量集落, 结束培养, 固定, 通过结晶紫 (CV) 染色, 借助显微镜拍照记录, 同时统计数量。

2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取对照组、木犀草素低、中、高浓度 (10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 CAL-27 细胞, 用各质量浓度的木犀草素进行预处理, 再用消化酶消化, 最后用 PBS 溶液洗涤, 确保细胞不会因为消化液残留而发生损伤, 离心后用流式细胞仪进行检测。

2.8 划痕实验检测细胞迁移情况

用 6 孔板完成处于对数生长期 CAL-27 细胞的接种 (每孔 4×10^5 个细胞) 并进行 24 h 的培养, 当细胞完全融合后, 将孔板中轴划线 (用枪头侧), 弃培养基, 依次加入含各浓度 (0、10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 木犀草素的完全培养基每孔 2 mL, 每组 3 个重复孔, 2 d 后在显微镜下对划痕恢复状态进行观察, 拍照记录, 每组随机选择 5 个划痕视野, 以图像分析仪测量划痕宽度, 划痕越宽表明细胞迁移能力越弱。

2.9 Transwell 实验检测细胞侵袭情况

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内对 Matrigel 基质胶 (原置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内) 进行解冻, 按照 1:8 的比例加入不含血清成分 DMEM 培养基, 予以稀释, 将 0.1 mL 已稀释基质胶均匀铺布于 Transwell 上室, 移入培养箱内, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 0.5 h 水化处理。取呈对数生长阶段的 CAL-27 细胞, 依次将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液和 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的完全培养基加入上室和下室。实验分为对照组、木犀草素低、中、高浓度 (10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 根据分组加入对应浓度木犀草素进行 2 d 的干预, 取出 Transwell 小室, 将培养基吸出, PBS 洗 2 次, 分别用 4% 多聚甲醛和 0.1% 结晶紫进行固定和染色, 将小室正面的未穿膜的细胞用棉签擦去, 用显微镜进行观察记录。每组选取 5 个视野, 采用 Image J 软件对穿膜细胞进行计数。

2.10 Western blotting 实验检测相关蛋白表达

不同浓度木犀草素 (0、10、20、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 CAL-27 细胞 48 h 后, 加入适量 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂混合液室温孵育 30 min, 将六孔板每孔 3×10^4 个细胞移至 EP 管中进行离心, 收集上清, 上清液中蛋白浓度用 BCA 法进行测定, 将制备的蛋白溶液 (Loading buffer 与蛋白样品体积比例为 1:4) 充分混匀后, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下处理 10 min 使蛋白变性。在制好的 SDS-PAGE 凝胶上样孔中加入蛋白样液, 两边加入预染蛋白 Marker, 分离蛋白后移至 PVDF 膜, 用 TBST 溶液反复清洗, 加入至脱脂奶粉中封闭 2 h, 洗 3 次, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用对应的一抗孵育过夜。第 2 天回收一抗后, TBST 洗 3 遍, 在室温下放入相关二抗, 实施 120 min 孵育, 同时由 TBST 清洗 3 遍, 再显影, Image J 分析结果。

2.11 裸鼠成瘤实验

取对数期生长的 CAL-27 细胞, 经胰酶消化和 PBS 清洗后, 以 2.0×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液向每只

裸鼠右前腋下注射 100 μL ，待瘤体体积长至 50 mm^3 后，按照每组 6 只进行分组。木犀草素组：ip 注射 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 木犀草素（预试验确定剂量，木犀草素的配制方法为：取 100 mg 木犀草素置于 1 mL DMSO 中，溶解成 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液，保存备用，后用 PBS 稀释成 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）；对照组：ip 注射等量 PBS。每周记录裸鼠体质量及肿瘤长径及短径，3 周后处死裸鼠，拍照、收集肿瘤并称体质量^[11]。将木犀草素组及对照组剥离的瘤体组织统一研磨成浆，提取蛋白后，通过 Western blotting 实验分析相关靶点蛋白的相对表达量。

2.12 统计学分析

全部数值的统计分析通过软件 GraphPad Prism 完成，呈现形式为 $\bar{x} \pm s$ ，2 组组间数据行 t 检验，多组间相比行单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异显著性。各组实验皆独立实施 3 次。

3 结果

3.1 木犀草素-OSCC 核心靶点获取及生物信息学分析

通过 GeneCards、OMIM、TTD 数据库合并删

除重复值，与疾病相关靶点共 4 875 个靶点。通过 TCMSP 数据库获得木犀草素相关靶点 393 个，木犀草素-OSCC 交集靶点为 277 个。通过 Cytoscape 软件对交集靶点度值实施分析，结果显示，排列前 3 的靶点基因分别为 *SRC*、*PIK3R1* 和 *AKT1*（表 1）。通过数据库 UALCAN 对核心基因在正常组织、癌组织内的 mRNA 表达量分析，结果显示：*AKT1*、*SRC* 与 *PIK3R1* 于 OSCC 组织内表达水平高于正常组织（ $P < 0.05$ ，图 1）。

表 1 关键靶点信息

Table 1 Target information

靶基因	靶蛋白	度值
<i>SRC</i>	Src 酪氨酸激酶（Src tyrosine kinase）	31
<i>PIK3R1</i>	磷脂酰肌醇-3 激酶调节亚单位 1（phosphatidylinositol-3kinase regulatory subunit 1）	30
<i>AKT1</i>	蛋白激酶 B（protein kinase B）	29
<i>EGFR</i>	表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor）	27
<i>ESR1</i>	雌激素受体基因 1（estrogen receptor gene 1）	24

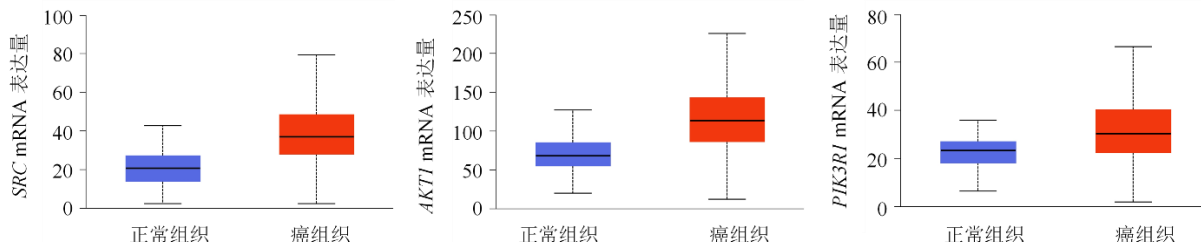


图 1 木犀草素-OSCC 核心靶点在正常和癌组 mRNA 表达量

Fig. 1 Luteolin-OSCC core target mRNA expression in normal and cancer groups

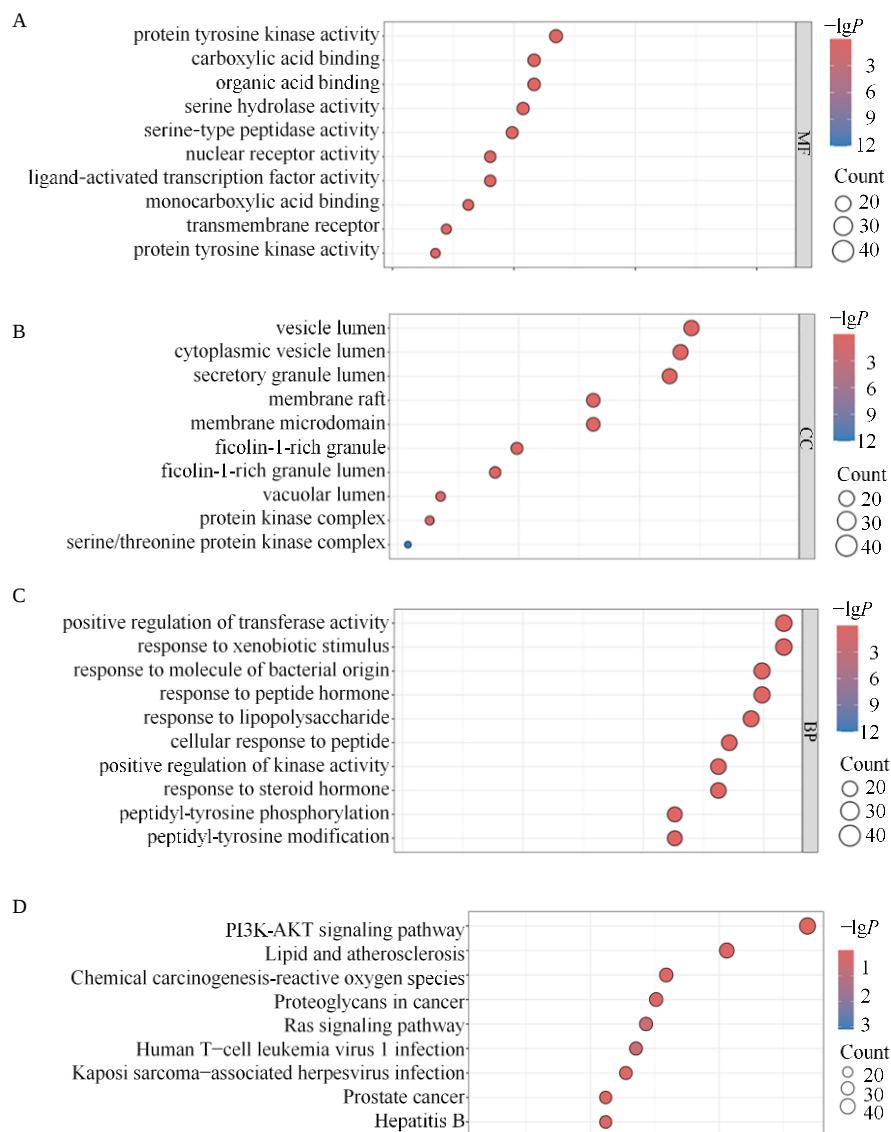
3.2 GO 和 KEGG 富集分析

经 GO 富集分析发现，交集基因所富集的 BP 主要包括外界刺激的反应（response to xenobiotic stimulus，富集的基因数为 46），转移酶活性的正向调节（positive regulation of transferase activity，富集的基因数为 46）等；富集的 CC 有囊腔（vesicle lumen，富集的基因数为 38），细胞质囊腔（cytoplasmic vesicle lumen，富集的基因数为 37）等；MF 主要富集在羧酸结合（carboxylic acid binding，富集的基因数为 24）、有机酸结合（organic acid binding，富集的基因数为 24）、蛋白酪氨酸激酶活性（protein tyrosine kinase activity，富集的基因数为 26）等（图 2-A~C）。经 KEGG

通路富集分析发现，交集基因所富集通路以 PI3K/Akt 信号途径（PI3K/Akt signaling pathway，富集的基因数为 47）为主（图 2-D）。

3.3 木犀草素影响 OSCC 细胞增殖和凋亡

CCK-8 实验显示，各质量浓度木犀草素组处理的 CAL-27 细胞活力呈浓度相关下降，其中 24 h IC_{50} 为 42.88 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，48 h IC_{50} 为 28.84 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ （图 3-A），故此选择 0、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为实验的对照、低、中、高浓度。平板集落形成实验结果表明，木犀草素各组较对照组集落形成数量减少（ $P < 0.05$ 、0.01），且随木犀草素质量浓度升高而集落数量呈浓度相关性降低（图 3-B）。而流式实验结果表



A~C:GO 功能分析木犀草素治疗 OSCC 的潜在靶点; D-KEGG 分析木犀草素治疗 OSCC 的潜在靶点。

A—C: GO function analysis of OSCC targets treated with luteolin; D-KEGG function analysis of the targets of luteolin treatment for OSCC.

图 2 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 2 GO and KEGG enrichment analysis

明,相较于对照组,木犀草素各组细胞凋亡数量上升,且随木犀草素浓度升高细胞凋亡率呈药物浓度相关性上升(图 3-C)。

3.4 木犀草素影响 OSCC 细胞迁移和侵袭

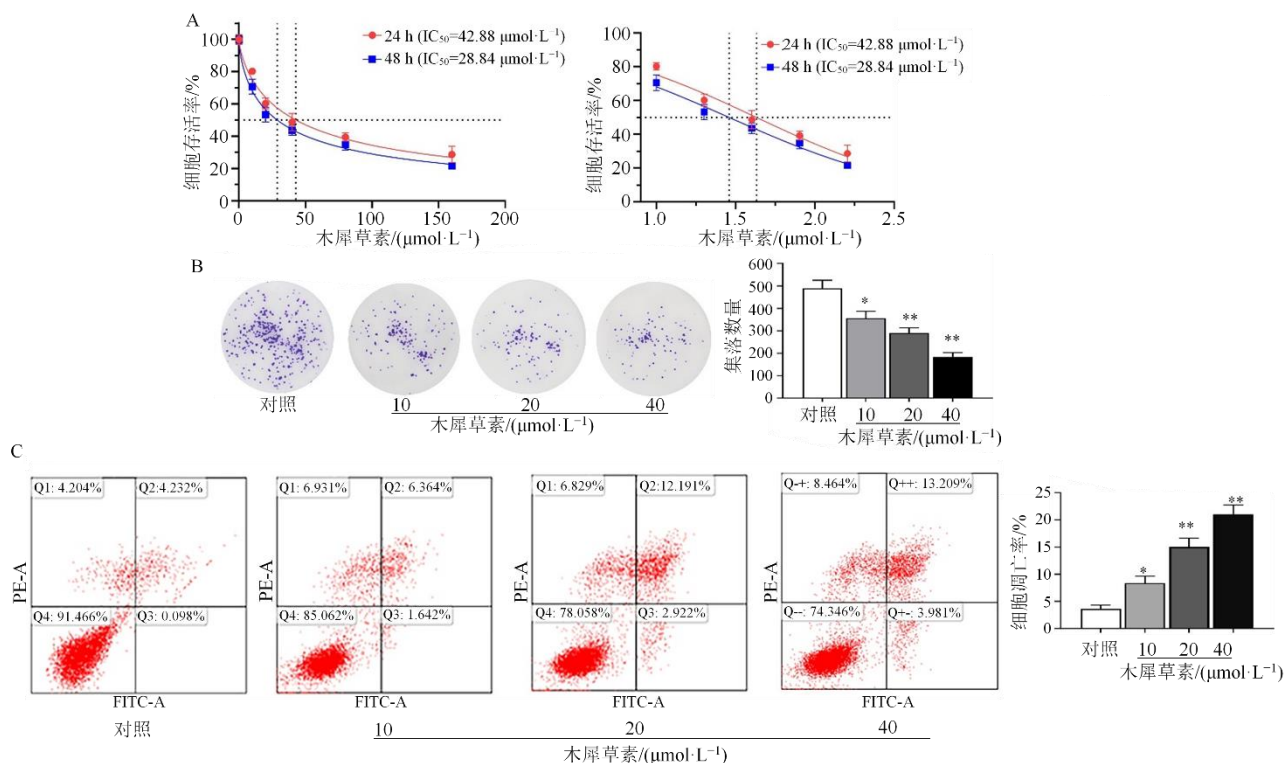
划痕实验结果表明,木犀草素各组较对照组划痕愈合面积小,且随木犀草素浓度升高而愈合面积愈小(图 4-A)。而 Transwell 实验数据显示,相较于对照组,木犀草素各组穿膜细胞数减少($P < 0.05$),且随木犀草素浓度升高穿膜细胞数量呈药物浓度相关性降低(图 4-B)。

3.5 Western blotting 实验分析蛋白的相对表达量

与对照组比较,加入木犀草素后,细胞 PI3K 及 Akt 蛋白水平无明显改变,p-PI3K 及 p-Akt 及 SRC、PIK3R1 蛋白水平下降。且随着木犀草素的浓度升高,蛋白表达呈浓度相关性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、0.01,图 5)。

3.6 木犀草素对裸鼠成瘤实验的影响

为进一步验证木犀草素对 OSCC 的抑制效果,本课题还进行了裸鼠成瘤实验。种瘤后第 7 天时,木犀草素组和对照组肿瘤体积约在 50 mm³,随后分组 ip 给

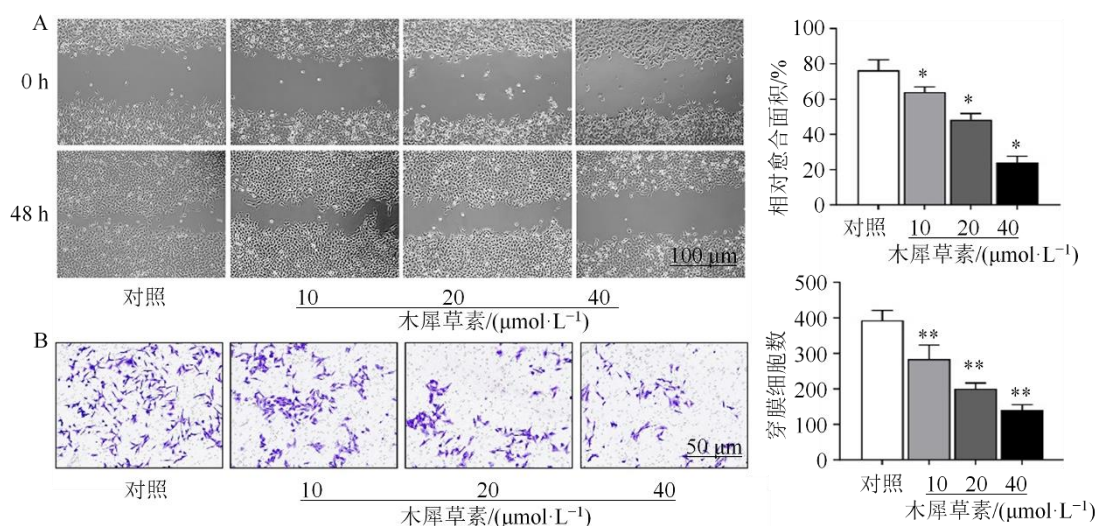


A-CCK-8 法分析木犀草素对 OSCC 细胞增殖的影响；B-平板克隆形成实验分析木犀草素对 OSCC 克隆形成能力的影响；C-流式细胞术分析木犀草素对 OSCC 细胞凋亡的影响；与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

A- CCK-8 assay was used to analyze the effect of luteolin on the proliferation of OSCC cells; B- Plate colony formation assay was used to analyze the effect of luteolin on OSCC colony formation ability; C- Flow cytometry was used to analyze the effect of luteolin on the apoptosis of OSCC cells; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

图 3 木犀草素影响 OSCC 细胞增殖和凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Luteolin affects OSCC cell proliferation and apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

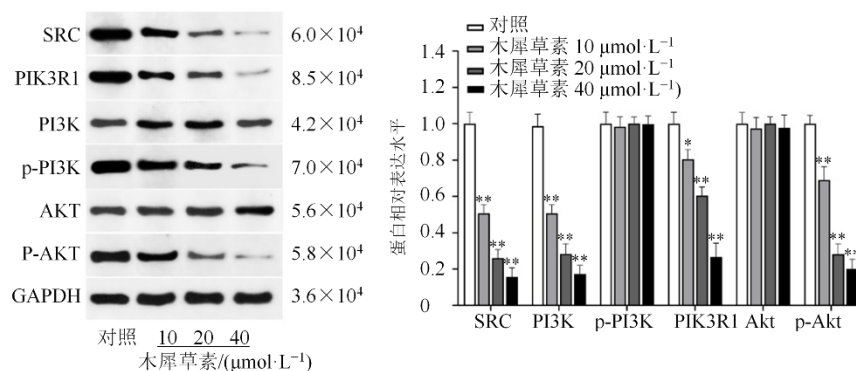
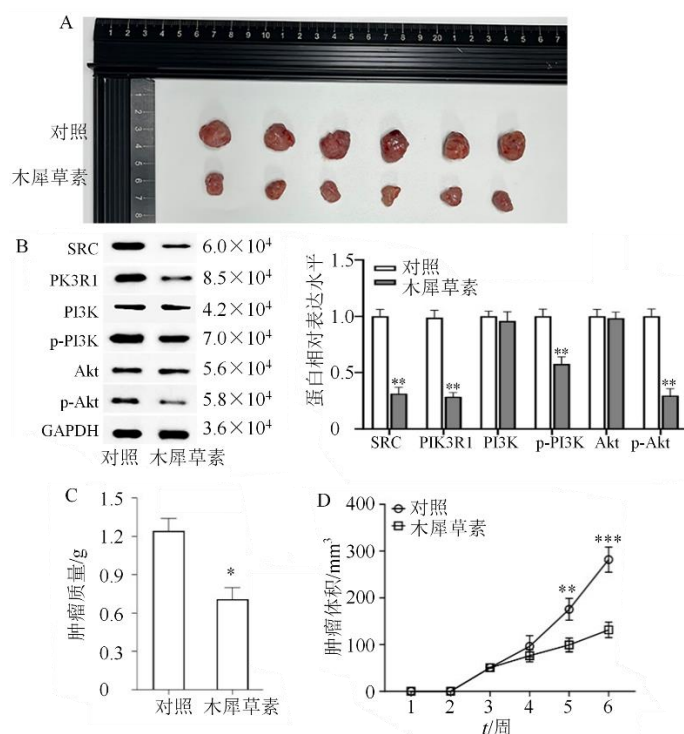


A-划痕实验分析木犀草素对 OSCC 细胞迁移能力的调控 ($\times 100$)；B-Transwell 实验分析木犀草素对 OSCC 细胞侵袭能力的影响 ($\times 200$)；与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

A- Scratch test was used to analyze the migration ability of OSCC cells regulated by luteolin ($\times 100$); B- Transwell test was used to analyze the effect of luteolin on the invasion of OSCC cells ($\times 200$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

图 4 木犀草素影响 OSCC 细胞迁移和侵袭 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Luteolin affects OSCC cell migration and invasion ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 5 Western blotting 实验分析蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 5 Analysis of protein expression by Western blotting experiment ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A-木犀草素对 OSCC 裸鼠成瘤的影响; B-Western blotting 检测对照组和木犀草素组肿瘤组织中 SRC、PIK3R1、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的相对表达量; C-木犀草素对裸鼠肿瘤质量的影响; D-木犀草素对裸鼠肿瘤体积的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
A- Effect of luteolin on the tumorigenesis of OSCC cells in nude mice; B-Relative expression of SRC, PIK3R1, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt protein in tumor tissues of control group and luteolin group was detected; C- Effect of luteolin on tumor weight in nude mice; D- Effect of luteolin on tumor volume in nude mice; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 6 木犀草素对裸鼠成瘤实验的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 6 Effect of luteolin on tumor formation in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

药, 1 周后对照组肿瘤体积开始大于木犀草素组, 3 周后, 处死裸鼠, 对照组裸鼠肿瘤大于木犀草素组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 通过 Western blotting 实验对对照组及木犀草素组裸鼠的瘤体组

织进行分析, 结果表明, 与对照组比较, 木犀草素组瘤体组织中 PI3K 及 Akt 蛋白表达不变, SRC、PIK3R1、p-PI3K 及 p-Akt 蛋白的相对表达量降低 ($P < 0.05$, 图 6)。

4 讨论

中医药在预防肿瘤术后复发、改善预后、提高生存率等方面具有一定优势^[12]。木犀草素(3',4',5,7-四羟基黄酮)具有对肿瘤细胞迁移、增殖等能力进行干预的功能。其作为类黄酮广泛存在于多种植物当中,临床实践证明,其在多种肿瘤(如宫颈癌、肝癌、胃癌等)当中具有出色的抗癌效果,可诱导癌细胞凋亡,阻滞肿瘤细胞的周期进展^[7, 13-14]。已有研究表明,木犀草素可通过直接或间接介导多种信号通路参与肿瘤细胞的恶性表型,进而影响恶性肿瘤的发生发展。Fasoulakis 等^[15]研究表明,木犀草素可通过降低 Akt/mTOR 信号通路调节基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达,进而抑制三阴性乳腺癌的增殖和转移。Li 等^[16]研究表明,木犀草素还可直接与 KDM4C 结合,并通过抑制:蛋白磷酸酶 2A 催化亚基 α /Yes 相关蛋白 1(PPP2CA/YAP)信号轴来降低卵巢癌的恶性表型。同时,木犀草素通过靶向作用于肝细胞生长因子/肝细胞生长因子受体/蛋白激酶(BHGF/MET/Akt)通路而抵抗非小细胞肺癌细胞对奥希替尼的获得性耐药^[17]。此外,木犀草素还可通过下调牛痘相关激酶 1 进而激活 p53 信号通路卵巢癌细胞增殖受抑^[18]。

本研究通过结合数据库对木犀草素作用于 OSCC 的靶点展开预测,结果表明,对 OSCC 具有疗作用的关键核心靶点包括 SRC、PIK3R1 与 AKT1。AKT1 为 Akt 家族成员,在哺乳动物的细胞内分布,同时和肿瘤细胞的形成有关。激活态 AKT1 蛋白经对自身下游靶基因的表达施以级联调控,激活和细胞增殖、迁移、分化、侵袭与凋亡有关的致癌程序^[19]。Src 家族蛋白激酶属于络氨酸蛋白激酶,能够对肿瘤细胞所表现的生物学行为进行干预^[20]。Src 对肿瘤细胞转移和侵袭的调控是通过对细胞-基质连接、细胞间黏附、细胞骨架等信号通路进行介导达到的^[21]。此外,临床研究结果显示,OSCC 细胞的侵袭和运动能力可与 Src 存在显著关联^[22]。PIK3R1 在 PI3K 信号途径中起着核心作用^[23]。相关研究证实,此基因与自身编码的蛋白 p85 α ,在肝细胞癌(HCC)、前列腺癌(PCa)等诸多恶性肿瘤内,PIK3R1/p85 α 表达相较正常肝组织明显较高^[24]。仍有研究显示,PIK3R1 的减少能够抑制癌细胞生长,可归因于其可使细胞周期 G₂/M 期细胞停滞、凋亡细胞数量上升^[25]。本研究经 Western blotting 实验表

明,相较于对照组,各木犀草素干预组细胞的 SRC、PIK3R1 蛋白的相对表达量降低,且随木犀草素浓度呈相关性降低,证明木犀草素可调控 OSCC 细胞 SRC 及 PIK3R1 蛋白靶点表达。

此外,本研究经对靶点富集分析发现,木犀草素对 OSCC 的干预作用和 PI3K/Akt 途径存在联系。此信号途径在肿瘤发展中发挥关键的作用,同时和对肿瘤相关生物学活动具有调节功能的其他信号通路也有显著联系。研究表明,PI3K/Akt 途径活化,可提升癌细胞的增殖、侵袭与迁移,同时对肿瘤的恶性进程施以抑制^[26-27]。且有研究证实,癌细胞被 PI3K/Akt 信号传导激活后,侵袭性会增强。同时激活后的 Akt 信号与临床癌症病人术后复发以及不良预后关联密切。活化的 Akt 可激活 PI3K/Akt 途径下游级联反应,对下游靶点施以磷酸化,抑制癌细胞凋亡,同时可使下游底物 mTOR 活化,加速细胞增殖,增强化疗药物耐受程度^[26]。现今,以 PI3K/Akt 信号轴及下游不同途径为目标的抑制剂正处于临床试验阶段^[27]。因此,本研究通过采用 CCK-8 实验、平板集落形成实验、Transwell 侵袭实验、划痕实验与流式细胞仪实验对木犀草素作用于 OSCC 细胞侵袭、增殖、迁移与凋亡活性的状况展开分析。结果证实,木犀草素具有诱导 OSCC 细胞凋亡,下降侵袭、迁移、增殖能力的作用。同时,通过 Western blotting 实验分析 PI3K/Akt 信号通路蛋白 PI3K、p-PI3K、Akt 及 p-Akt 表达,结果发现木犀草素能显著抑制 CAL-27 细胞的 p-PI3K 及 p-Akt 的蛋白表达。提示木犀草素可抑制信号途径 PI3K/Akt 的活化,对 OSCC 细胞迁移、侵袭与增殖施以抑制,对细胞凋亡进行诱导。此外,通过动物实验进一步进行验证木犀草素可对 OSCC 的抑制作用。

综上所述,木犀草素对 OSCC 细胞的活力具有明显的抑制效果,其抗癌机制可能是通过下调 SRC、PIK3R1 靶点蛋白及 PI3K/Akt 信号通路有关。本研究为中药成分抗 OSCC 多靶点、多路径作用机制研究提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭超杰, 张佳佳, 曾洁, 等. PLOD1 在口腔鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其意义 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(4): 1035-1043.

- Guo C J, Zhang J J, Zeng J, et al. Expressions of PLOD1 in oral squamous cell carcinoma tissue and cells and their significances [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2024, 50(4): 1035-1043.
- [2] Saikia P J, Pathak L, Mitra S, et al. The emerging role of oral microbiota in oral cancer initiation, progression and stemness [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1198269.
- [3] Sharma Y K, Gawande M, Reche A, et al. Circulating tumor cells in oral cancer [J]. Cureus, 2024, 16(1): e51684.
- [4] Radaic A, Kamarajan P, Cho A, et al. Biological biomarkers of oral cancer [J]. Periodontol 2000, 2024, 96(1): 250-280.
- [5] Çetinkaya M, Baran Y. Therapeutic potential of luteolin on cancer [J]. Vaccines (Basel), 2023, 11(3): 554.
- [6] 姜亚玲, 李文渊, 冯爽, 木犀草素的结构修饰及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6889-6902.
- Jiang Y L, Li W Y, Feng S, et al. Research progress on structural modification and biological activity of luteolin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6889-6902.
- [7] Rocchetti M T, Bellanti F, Zadorozhna M, et al. Multifaceted role of luteolin in cancer metastasis: EMT, angiogenesis, ECM degradation and apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8824.
- [8] Rath P, Chauhan A, Ranjan A, et al. Luteolin: A promising modulator of apoptosis and survival signaling in liver cancer [J]. Pathol Res Pract, 2024, 260: 155430.
- [9] 卢俊伟, 祝璟哲, 陈鸿儒, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探究木犀草素治疗宫颈癌的分子机制 [J]. 实用临床医药杂志, 2024, 28(16): 26-33.
- Lu J W, Zhu J Z, Chen H R, et al. Molecular mechanism of luteolin in treatment of cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. J Clin Med Pract, 2024, 28(16): 26-33.
- [10] 何静, 严如根, 金国钰, 等. 冬凌草甲素体内外抗卵巢癌活性及相关机制研究 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2023, 58(4): 480-489.
- He J, Yan R G, Jin G Y, et al. Anti-ovarian cancer activity of oridonin *in vitro* and *in vivo* and its related mechanism [J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2023, 58(4): 480-489.
- [11] 骆泽潭, 赵睿, 张银亮, 等. 木犀草素通过 Akt/GSK3 β /catenin 通路对人肝癌细胞 Hep3B 增殖侵袭转移的影响及机制 [J/OL]. 海南医学院学报: 1-13. [2025-03-22]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20240927.004>.
- Luo Z T, Zhao R, Zhang Y L, et al. The effect and mechanism of luteolin on the proliferation, invasion and metastasis of human hepatoma cell Hep3B through the Akt/GSK3 β /catenin pathway [J/OL]. J Hainan Medical University: 1-13. [2025-03-22]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20240927.004>.
- [12] 高宇, 马云飞, 陈宇晗, 等. 胰腺癌肿瘤微环境的中医药治疗进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(8): 4799-4801.
- Gao Y, Ma Y F, Chen Y H, et al. Progress of traditional Chinese medicine treatment of pancreatic tumor microenvironment [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(8): 4799-4801.
- [13] Rauf A, Wilairatana P, Joshi P B, et al. Revisiting luteolin: An updated review on its anticancer potential [J]. Heliyon, 2024, 10(5): e26701.
- [14] 王松, 陈娟娟, 赵院霞, 基于网络药理学和靶向验证探讨木犀草素治疗结肠癌的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 788-794.
- Wang S, Chen J J, Zhao Y X, et al. Effect and mechanism of luteolin in treatment of colon cancer based on network pharmacology and targeted validation [J]. Drug Clin, 2023, 38(4): 788-794.
- [15] Fasoulakis Z, Koutras A, Syllaios A, et al. Breast cancer apoptosis and the therapeutic role of luteolin [J]. Chirurgia (Bucur), 2021, 116(2): 170-177.
- [16] Li Y Z, Hu Y R, Yang L L, et al. Luteolin directly binds to KDM4C and attenuates ovarian cancer stemness via epigenetic suppression of PPP2CA/YAP axis [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 160: 114350.
- [17] Huang G D, Liu X N, Jiang T, et al. Luteolin overcomes acquired resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer cells by targeting the HGF-MET-Akt pathway [J]. Am J Cancer Res, 2023, 13(9): 4145-4162.
- [18] Chang X, Tamauchi S, Yoshida K, et al. Downregulating vaccinia-related kinase 1 by luteolin suppresses ovarian cancer cell proliferation by activating the p53 signaling pathway [J]. Gynecol Oncol, 2023, 173: 31-40.
- [19] Glaviano A, Foo A S C, Lam H Y, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 138.
- [20] 边婧, 于学蓉, 张宁馨, 等. Src 在口腔鳞状细胞癌侵袭和转移中的研究进展 [J]. 癌症进展, 2023, 21(5): 477-480.
- Bian J, Yu X R, Zhang N X, et al. Research progress of Src in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Prog, 2023, 21(5): 477-480.

- [21] Pelaz S G, Tabernero A. Src: Coordinating metabolism in cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(45): 4917-4928.
- [22] 李军, 陈伟程, 徐若竹, 等. Src 在舌鳞状细胞癌组织中的表达及对舌鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(18): 2349-2354.
Li J, Chen W C, Xu R Z, et al. Expression of Src in tongue squamous cell carcinoma tissue and its effects on proliferation, migration and invasion of the carcinoma [J]. *J Pract Med*, 2021, 37(18): 2349-2354.
- [23] Gupta I, Gaykalova D A. Unveiling the role of PIK3R1 in cancer: A comprehensive review of regulatory signaling and therapeutic implications [J]. *Semin Cancer Biol*, 2024, 106/107: 58-86.
- [24] 姚楠, 孙景秋, 郭冰沁, 等. PIK3R1 在人原发性肝细胞癌中的表达及其与肿瘤上皮间质转化关系 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2023, 48(5): 570-573.
Yao N, Sun J Q, Guo B Q, et al. Expression of PIK3R1 in human primary hepatocellular carcinoma and its correlation with epithelial mesenchymal transformation [J]. *J Bengbu Med Coll*, 2023, 48(5): 570-573.
- [25] Liu Y E, Wang D, Li Z J, et al. Pan-cancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5924.
- [26] He Y, Sun M M, Zhang G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [27] Chen Y, Chen S, Chen K, et al. Magnolol and 5-fluorouracil synergy inhibition of metastasis of cervical cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR and EMT pathways [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 16(1): 94-105.
- [28] Yu L, Wei J, Liu P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69-94.
- [29] Vanhaesebroeck B, Perry M W D, Brown J R, et al. PI3K inhibitors are finally coming of age [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(10): 741-769.

[责任编辑 齐静雯]