

• 药理与临床 •

蟾蜍它灵对人头颈部鳞状细胞癌的影响及作用机制

安雪菁¹, 崔齐晓¹, 赵盈¹, 何小鹏², 潘钊海¹, 李德芳¹, 王玉良^{3,4*}, 郑秋生^{1*}

1. 滨州医学院中医学院, 山东省高等学校 中药活性成分生物合成与靶点发现特色实验室, 山东 烟台 264003

2. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700

3. 滨州医学院烟台附属医院 口腔颌面外科, 山东 烟台 264100

4. 滨州医学院口腔医学院, 山东 烟台 264003

摘要:目的 探讨蟾蜍它灵对人头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)的影响及其潜在的作用机制。方法 采用CCK-8法和克隆形成实验,考察蟾蜍它灵对人舌鳞癌Cal-27细胞和人咽鳞癌FaDu细胞活力及增殖的影响;采用流式细胞术检测蟾蜍它灵对Cal-27和FaDu细胞周期分布的影响;采用Western blotting检测蟾蜍它灵对Cal-27和FaDu细胞内细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)和细胞周期蛋白D1(cyclin D1)表达的影响。构建裸鼠异种移植瘤模型,进一步验证蟾蜍它灵的体内抗肿瘤作用。通过蛋白质组学检测经蟾蜍它灵处理后的Cal-27细胞内差异表达的蛋白,并分析其发挥抗肿瘤作用的信号通路;采用Western blotting检测蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/真核翻译起始因子2 α 亚基(eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)信号通路相关蛋白的表达。结果 体外实验结果显示,蟾蜍它灵可显著降低Cal-27和FaDu细胞的活力($P<0.01$ 、 0.001),并抑制其增殖($P<0.01$ 、 0.001),诱导细胞周期阻滞于G₀/G₁期($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),下调FaDu细胞内CDK4和cyclin D1的蛋白表达($P<0.05$ 、 0.001),下调Cal-27细胞内CDK4蛋白表达($P<0.05$)。体内实验结果显示,蟾蜍它灵可显著抑制荷瘤小鼠体内肿瘤的生长($P<0.01$ 、 0.001)。蛋白质组学和IPA分析表明蟾蜍它灵能引起内质网应激,上调Cal-27和FaDu细胞内p-PERK和p-eIF2 α 的表达水平($P<0.05$ 、 0.001)。结论 蟾蜍它灵可通过诱导内质网应激,激活EIF2信号通路,诱导HNSCC细胞阻滞于G₀/G₁期,进而抑制肿瘤细胞的增殖和荷瘤小鼠体内肿瘤的生长。

关键词: 蟾蜍它灵; 头颈部鳞状细胞癌; 细胞增殖; 周期阻滞; 内质网应激; EIF2信号通路

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)04-1325-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.04.012

Effect and mechanism of bufotalin on growth of human head and neck squamous cell carcinoma

AN Xuejing¹, CUI Qixiao¹, ZHAO Ying¹, HE Xiaojuan², PAN Zhaohai¹, LI Defang¹, WANG Yuliang^{3,4}, ZHENG Qiusheng¹

1. Featured Laboratory for Biosynthesis and Target Discovery of Active Components of Traditional Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Binzhou medical university, Yantai 264003, China

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264100, China

4. College of Stomatology, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of bufotalin on growth of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods** The effect of bufotalin on viability and proliferation of Cal-27 and FaDu cells were observed by

收稿日期: 2025-11-10

基金项目: 国家中医药管理局科技司-山东省卫生健康委员会共建中医药科技项目(GZY-KJS-SD-2023-094)

作者简介: 安雪菁, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床与基础研究。E-mail: 15053598093@163.com

*通信作者: 郑秋生, 教授, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床与基础研究。E-mail: zqsy@sohu.com

王玉良, 副教授, 主要从事口腔颌面外科学的临床研究。E-mail: wangyuliang121@126.com

CCK-8 method and plate clone formation experiment. The effect of bufotalin on cell cycle distribution of Cal-27 and FaDu cells were detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect the effect of bufotalin on expressions of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and cyclin D1 in Cal-27 and FaDu cells. To further explore the anti-tumor effects of bufotalin *in vivo*, a xenograft tumor model of HNSCC was established in nude mice. Proteomics technology was applied to identify differentially expressed proteins in bufotalin-treated Cal-27 cells, and the associated signaling pathways underlying its anti-tumor effect were analyzed. Western blotting was performed to assess the expressions of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) signaling pathway related proteins. **Results** *In vitro* experimental results showed that bufotalin significantly reduced the viability of Cal-27 and FaDu cells ($P < 0.01, 0.001$), inhibited their proliferation ($P < 0.01, 0.001$), induced cell cycle arrest in G₀/G₁ phase ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), down-regulated the protein expressions of CDK4 and cyclin D1 in FaDu cells ($P < 0.05, 0.001$), and down-regulated the protein expression of CDK4 in Cal-27 cells ($P < 0.05$). The *in vivo* experimental results showed that bufotalin could significantly inhibit the growth of tumors in tumor bearing mice ($P < 0.01, 0.001$). Proteomics and IPA analysis showed that bufotalin could induce endoplasmic reticulum stress and up-regulate the expression levels of p-PERK and p-eIF2 α in Cal-27 and FaDu cells ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Bufotalin could induce endoplasmic reticulum stress, activate EIF2 signaling pathway, and induce the arrest of HNSCC cells in G₀/G₁ phase, thereby inhibiting tumor cell proliferation and tumor growth in tumor-bearing mice.

Key words: bufotalin; head and neck squamous cell carcinoma; cell proliferation; cycle arrest; endoplasmic reticulum stress; EIF2 signaling pathway

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是一种由鳞状上皮覆盖且原发部位在口腔、咽喉部位的恶性肿瘤^[1]。其发病较为隐匿, 早期症状不明显, 临床上超过 60% 的患者在确诊时已处于 III 期或 IV 期, 这一阶段的患者常出现复发和转移, 死亡率极高。相关的研究数据显示, HNSCC 患者的中位生存期仅为 10 个月^[2]。不仅如此, HNSCC 因发病位置特殊, 其原发部位、病理类型以及解剖关系的复杂程度在全身各处肿瘤中居于首位。此外, HNSCC 对口腔颌面部器官的外观及功能损伤严重, 给患者造成了极大的功能障碍, 还会造成容貌破坏, 极大影响了患者的生活质量。目前, HNSCC 的治疗主要包括手术切除、放化疗以及免疫治疗。即便 HNSCC 的诊疗手段已经取得了很大的进步, 但仍有 50% 左右的患者出现了不同程度的复发和远处转移, 患者的 5 年存活率较低, 仅为 50% 左右^[3]。传统的手术及放化疗不仅存在一定的局限性, 还往往容易导致术后颌面部功能损伤, 以及放化疗带来的不良反应限制了治疗效果。鉴于 HNSCC 治疗现状, 寻找更有效的治疗策略尤为迫切。

利用天然产物防治肿瘤在中国及其他亚洲国家已经有上千年历史, 天然活性成分的抗肿瘤作用十分明显, 显示出较高生物活性且不良反应轻微等优良特性^[4-5], 近年来, 从天然产物中寻找抗肿瘤活性成分, 依然成为肿瘤治疗研究的热门方向^[6]。蟾酥 *Bufo venenum* 是一种具有攻毒杀虫止痒功效的传统中药, 临床实践表明蟾酥对多种肿瘤均有较好的抑制作用, 但蟾酥毒副作用较强, 服用方式不

当或服用剂量不合适可能严重影响患者的身体健康。为了更加安全有效地利用蟾酥, 我国科技工作者对蟾酥的有效成分进行了分离和研究, 发现了蟾蜍它灵 (bufotalin)、蟾毒灵 (bufalin)、远华蟾蜍精 (telocinobufagin)^[7] 等多种具有抗肿瘤活性的组分。蟾蜍它灵作为蟾酥中的一种固醇内酯类的化合物, 对恶性黑色素瘤、肝癌等多种恶性肿瘤具有良好的抑制作用^[8], 但其对 HNSCC 的影响及作用机制还未见报道。因此, 本研究考察蟾蜍它灵对 HNSCC 的影响及调控机制, 为蟾酥作为抗肿瘤药物的进一步开发提供依据。

1 材料

1.1 细胞

人舌鳞癌 Cal-27 细胞 (货号 CL-0265) 和人咽鳞癌 FaDu 细胞 (货号 CL-0083) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 动物

SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠, 4 周龄, 体质量 18~20 g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 生产许可证号 SCXK (苏) 2022-0019。动物饲养于滨州医学院 SPF 级动物实验中心, 相对湿度 10%~60%, 温度 22 °C, 照明模式采用 12 h 明暗循环。动物实验方案均通过滨州医学院伦理委员会审批 (伦理许可号 2023-421)。

1.3 药品与试剂

蟾蜍它灵 (批号 HY-N0878, 质量分数为 99.82%) 购自美国 MedChemExpress 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 BS350A) 购自 Biosharp 公司; 胎牛

血清(批号 A5256701)购自美国 Gibco 公司;DMEM 培养基(批号 PM150210)、MEM 培养基(批号 PM150411)、青霉素-链霉素混合液(批号 PB180120)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D001071)、RIPA 高效裂解液(批号 R0010)、BCA 蛋白试剂盒(批号 PC0020)、细胞周期检测试剂盒(批号 CA1510)购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白酶抑制剂 PMSF(批号 ST506)购自碧云天生物技术有限公司;细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)抗体(批号 ab108357)购自英国 Abcam 公司;蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)抗体(批号 20582-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;p-PERK 抗体(批号 PC3330)购自艾比玛特医药科技有限公司;细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)抗体(批号 92G2)、真核翻译起始因子 2 α 亚基(eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)抗体(批号 9722)、p-eIF2 α 抗体(批号 3398)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 14C10)、山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)、山羊抗小鼠二抗(批号 SA00001-1)购自美国 CST 公司;天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒(批号 C010-2-1)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒(批号 C009-2-1)购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器

Forma 311 型细胞培养箱、Micro21R 型台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司);Axioscope 光学显微镜(北京普瑞赛司仪器有限公司);Infinite 200 pro 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);FACSCanto™ II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);1653312 型制胶板、1658001 型电泳槽及电泳系统、Mini Tran-Bolt 湿转槽(美国 Bio-Rad 公司);5200C 型化学发光仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

Cal-27 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 完全培养基, FaDu 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 MEM 完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 细胞贴壁生长至 70%~80%融合状态时, 进行后续实验。

2.2 给药溶液的制备

取蟾蜍它灵粉末 1 mg, 溶解于 249.935 μ L DMSO 中, 充分混匀后得到浓度为 9 mmol/L 的蟾蜍它灵母液, 于-80 °C 避光保存。使用时, 取出解冻, 并用完全培养基稀释成相应浓度的给药溶液。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力

将生长状态良好的 Cal-27 与 FaDu 细胞, 按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。培养过夜后, 显微镜下确认细胞贴壁均匀且融合度适宜, 再进行给药处理。设置对照组和蟾蜍它灵(22.5、45.0、90.0、180.0、360.0 nmol/L)组, 对照组加入 100 μ L 完全培养基, 各给药组加入 100 μ L 不同浓度的蟾蜍它灵溶液, 作用 24 h 后, 弃上清, 加入 100 μ L 按培养基-CCK-8 试剂(20:1)比例配制的工作液, 37 °C 孵育 1 h, 在酶标仪 450 nm 测定吸光度(A)值, 分析不同浓度药物下 2 种细胞的活力。

2.4 克隆形成实验

取对数生长期的 Cal-27 与 FaDu 细胞, 常规消化计数后, 分别按 2000 个/孔和 500 个/孔接种至 12 孔板, 待细胞贴壁后, 加入终浓度为 22.5、45.0、90.0 nmol/L 的蟾蜍它灵处理 24 h, 对照组加入等体积的完全培养基, 弃上清, 更换为新鲜完全培养基继续培养 7~14 d。待孔内出现较大但互不黏连的细胞团时, 终止培养。吸去培养液, PBS 清洗 2 次, 用 4%多聚甲醛于室温固定 15 min, 再以 PBS 清洗 2 次, 随后每孔加入 1%结晶紫染液 1 mL, 室温染色 10 min。弃染液, 用 PBS 冲净残色, 将 12 孔板倒扣晾干后, 观察集落形成数量及大小, 并拍照记录。

2.5 流式细胞术检测细胞周期分布

将处于对数生长期的 Cal-27 与 FaDu 细胞, 消化处理后进行计数, 调整细胞密度至 2×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中。待细胞充分贴壁后, 加入终浓度为 22.5、45.0、90.0 nmol/L 的蟾蜍它灵处理 24 h, 对照组加入等体积的完全培养基。收集各组细胞, 使用 PBS 清洗并重悬, 再次离心后, 以 1 mL 预冷 70%乙醇重悬固定, 4 °C 静置过夜。次日, 用 PBS 洗去乙醇, 200 目筛网滤过后, 用 100 μ L RNase A 溶液重悬, 37 °C 金属浴孵育 30 min。随后加入 400 μ L PI 染色液混匀, 4 °C 避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测细胞周期中的 DNA 含量变化。

2.6 Western blotting 检测 CDK4、cyclin D1、PERK、p-PERK、eIF2 α 和 p-eIF2 α 蛋白表达

将对数生长期的 Cal-27 与 FaDu 细胞接种于 10

cm 培养皿中, 细胞融合度达到 70%时加入终浓度为 22.5、45.0、90.0 nmol/L 的蟾蜍它灵处理 24 h, 对照组加入等体积的完全培养基。用预冷的 PBS 清洗 2 次, 用细胞刮收集细胞于离心管中, 加入含磷酸酶抑制剂及 PMSF 的 RIPA 裂解液, 在冰上裂解提取总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白浓度后, 加入 loading buffer 于 100 °C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶于室温封闭 2 h; TBST 洗膜 3 次, 加入一抗, 于 4 °C 孵育 12 h; TBST 洗膜 3 次, 加入二抗, 于室温孵育 30 min; TBST 洗膜 3 次, 加入显影液进行曝光显影, 采用 Image J 软件测定条带灰度值。

2.7 蛋白质组学分析

2.7.1 样品制备 将 Cal-27 细胞经常规消化并计数后, 以 1×10^6 个/皿接种于 10 cm 培养皿中。待细胞融合度达到 70%时, 加入终浓度为 45 nmol/L 的蟾蜍它灵处理 24 h, 对照组加入等体积的完全培养基。用预冷的 PBS 清洗 2 次, 用细胞刮收集细胞于离心管中, 用预冷的 PBS 清洗 2 次并尽量去除残留液体, 离心后所得细胞沉淀于液氮中速冻 10 min, 随后转移至 -80 °C 冰箱中保存备用。

2.7.2 样品分析 提取细胞蛋白并测定浓度后, 依次进行蛋白质酶解、肽段除盐等步骤, 随后采用非标记定量 (Label-Free) 策略对 2 组样本进行蛋白质组学分析。具体流程如下: 建立蟾蜍它灵组与对照组的特异性蛋白数据库, 并借助相关软件完成搜库; 针对检测到的肽段与蛋白质信息实施质控筛选; 结合京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路注释和基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释对相关蛋白进行标注; 开展蛋白质定量分析; 基于定量结果筛选蟾蜍它灵组与对照组间的差异表达蛋白; 对差异表达蛋白的生物学功能及亚细胞定位进行统计分析; 对差异表达蛋白进行功能与通路富集分析; 进一步应用 IPA 软件对关键差异表达蛋白进行深入通路解析。

2.8 体内实验

2.8.1 造模、分组与给药 15 只 BALB/c 裸鼠适应性喂养 1 周后进行荷瘤小鼠造模: 在裸鼠侧腹 sc 100 μ L Cal-27 细胞 (1×10^7 个), 接种后持续观察, 待肿瘤体积接近 100 mm³ 时, 将裸鼠随机分为对照组和蟾蜍它灵低、高剂量 (100、200 μ g/kg) 组, 每组 5 只。各给药组 ip 蟾蜍它灵, 对照组 ip 含 0.1%

DMSO 的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 16 d。每隔 1 d 用游标卡尺测量裸鼠瘤体的体积, 并称量裸鼠体质量, 绘制各组裸鼠肿瘤体积生长曲线以及体质量变化曲线。给药 16 d 后, 所有裸鼠吸入异氟烷麻醉, 眼眶取血后, 断颈处死裸鼠, 分离瘤体及组织用于后续实验。

2.8.2 血清肝功能的检测 血液于室温静置 30 min 使其充分凝固, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 并转移到新的无菌 EP 管中, 按照试剂盒说明书检测 AST 和 ALT 活性。

2.8.3 肝、肺、肾组织的苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 各组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 流水冲洗后依次经过 70%、80%、90%、95%、100% 乙醇梯度脱水各 40 min; 组织于二甲苯中透化, 常规包埋, 4 μ m 连续切片, 60 °C 烤片 1 h。将切片依次浸入二甲苯 I、II 中各 10 min 以彻底脱蜡, 随后经梯度乙醇 (100%、95%、85%、70%) 水化, 用蒸馏水冲洗。苏木素染色 30 s 后流水清洗, 1% 盐酸乙醇分化, 再次用流水冲洗, 并用返蓝液反蓝 1 min, 伊红复染 3 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 于倒置显微镜下观察并拍摄。

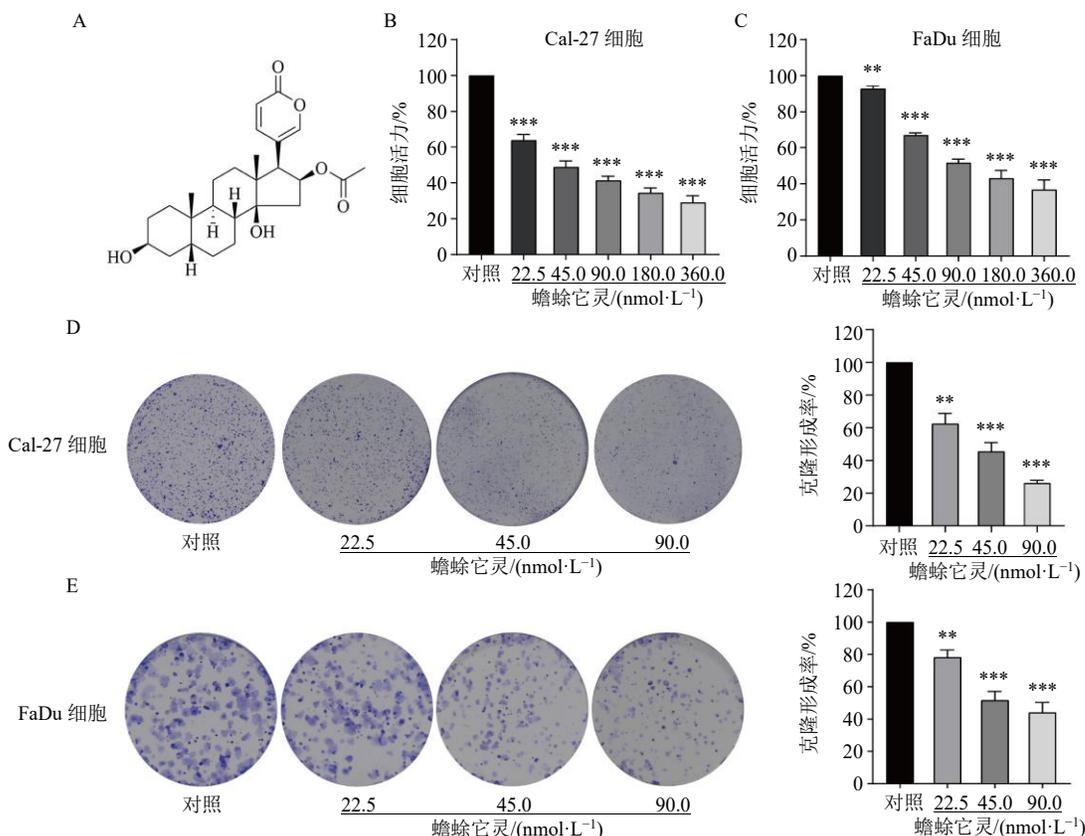
2.9 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析或 *t* 检验进行统计学差异比较。

3 结果

3.1 蟾蜍它灵显著抑制 Cal-27 和 FaDu 细胞活性

为了研究蟾蜍它灵对 Cal-27 和 FaDu 细胞增殖的影响, 以 22.5、45.0、90.0、180.0、360.0 nmol/L 梯度浓度的蟾蜍它灵分别处理上述 2 种细胞, 培养 24 h 后采用 CCK-8 法检测细胞活力。结果如图 1-A~C 所示, 经蟾蜍它灵处理后, 细胞活力随药物浓度升高而显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 蟾蜍它灵对 Cal-27 和 FaDu 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 52.02、136.20 nmol/L。鉴于两者 IC₅₀ 差异较大, 后续实验以 Cal-27 细胞的 IC₅₀ 为参照, 选取 22.5、45.0、90.0 nmol/L 作为蟾蜍它灵的给药浓度。随后, 通过克隆形成实验评估蟾蜍它灵对 Cal-27 与 FaDu 细胞克隆能力的影响。结果如图 1-D、E 所示, 与对照组比较, 蟾蜍它灵各给药组克隆形成数量显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈浓度相关性, 表明蟾蜍它灵能够抑制 Cal-27 和 FaDu 细胞的增殖。



A-蟾蜍它灵的化学结构; B、C-蟾蜍它灵分别处理 Cal-27、FaDu 细胞 24 h 后, CCK-8 法检测细胞活力; D、E-蟾蜍它灵分别处理 Cal-27、FaDu 细胞后对克隆形成的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

A-structure of bufotalin; B, C-after treating Cal-27 and FaDu cells with bufotalin for 24 h, cell viability was detected by CCK-8 assay; D, E-effect of bufotalin on clone formation after treating Cal-27 and FaDu cells separately; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 1 蟾蜍它灵抑制 Cal-27 和 FaDu 细胞的增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Bufotalin inhibited proliferation of Cal-27 and FaDu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

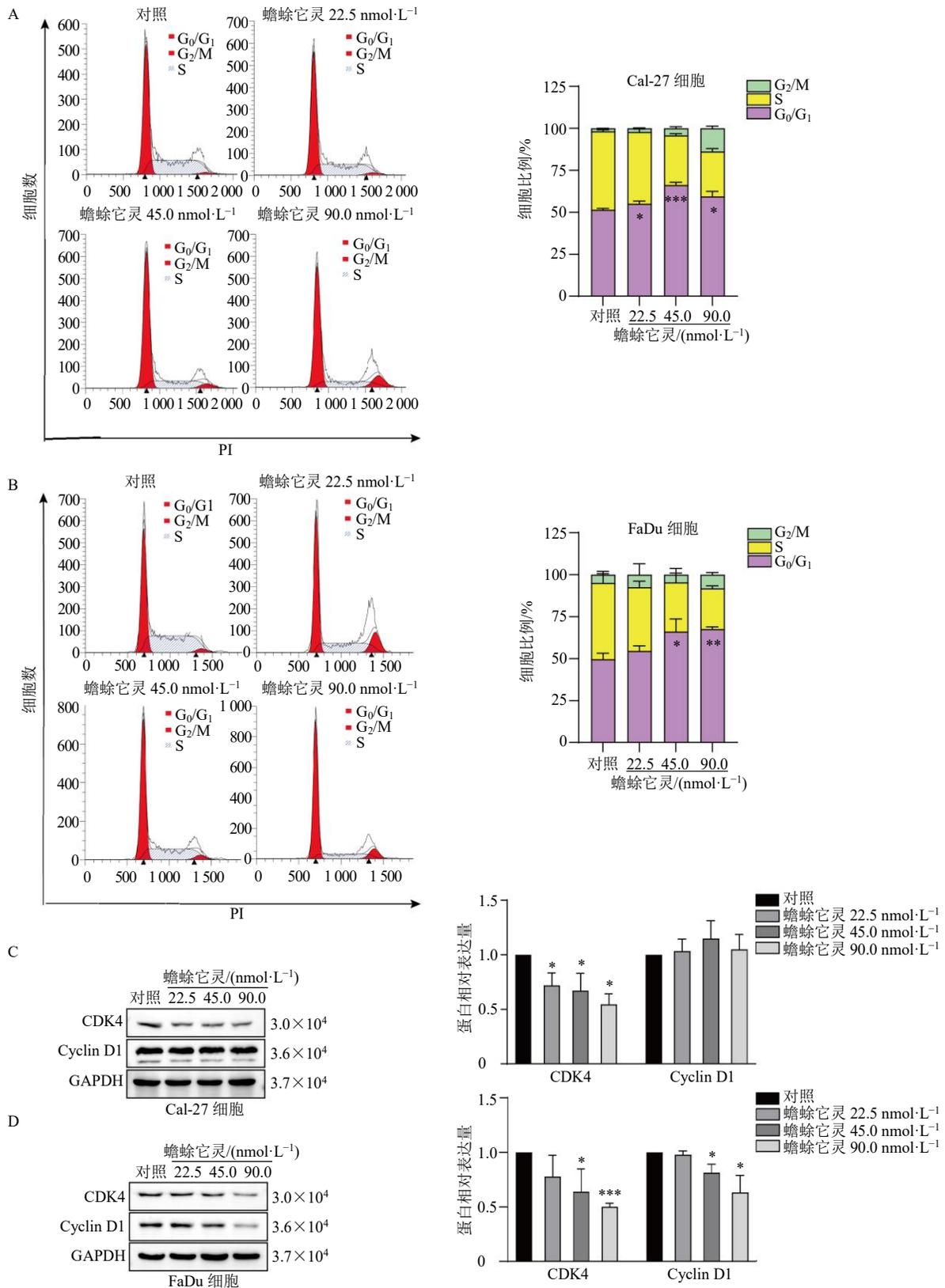
3.2 蟾蜍它灵诱导 Cal-27 和 FaDu 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期

为了探究蟾蜍它灵抑制 Cal-27 和 FaDu 细胞增殖的机制, 采用流式细胞术分析细胞周期分布。结果如图 2-A、B 所示, 与对照组比较, 蟾蜍它灵各给药组 G₀/G₁ 期的 Cal-27 和 FaDu 细胞比例均明显上升 ($P < 0.05$ 、0.001), 而 S 期的 Cal-27 和 FaDu 细胞比例则显著减少 ($P < 0.05$ 、0.001), 表明蟾蜍它灵可以诱导 Cal-27 和 FaDu 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 蟾蜍它灵各给药组 Cal-27 细胞内 CDK4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 图 2-C), 而 Cyclin D1 蛋白表达水平无显著变化。由于细胞中 CDK4 和 Cyclin D1 是以复合物的形式协同发挥作用, 因此, 当只有 CDK4 的表达下调时, 也能导致细胞出现周期阻滞。在 FaDu 细胞中, 45.0、90.0 nmol/L 蟾蜍它灵显著下调 CDK4 和 Cyclin D1 的蛋白表达 ($P <$

0.05、0.001, 图 2-D)。以上结果表明, 蟾蜍它灵可通过下调 Cal-27 和 FaDu 细胞内 CDK4 的表达, 诱导细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。

3.3 蟾蜍它灵显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长

通过构建 Cal-27 细胞的异种移植瘤模型, 进一步验证蟾蜍它灵的体内抗肿瘤活性。如图 3-A~C 所示, 与对照组比较, 蟾蜍它灵可显著抑制荷瘤小鼠体内肿瘤体积的增长 ($P < 0.01$ 、0.001), 但对荷瘤小鼠体质量无明显影响。本研究观察到蟾蜍它灵高剂量组的瘤体大小存在一定的组内差异, 这可能与异种移植模型中肿瘤生长的个体异质性及对药物反应的敏感性不同有关。HE 染色结果 (图 3-D) 表明, 给予蟾蜍它灵治疗后, 肝、肺和肾这 3 个器官无明显形态变化, 并且各组血清中 AST 和 ALT 活性无显著差异 (图 3-E、F), 表明蟾蜍它灵对荷瘤裸鼠的肝、肺和肾组织无明显毒性, 对肝功能无明显影响。

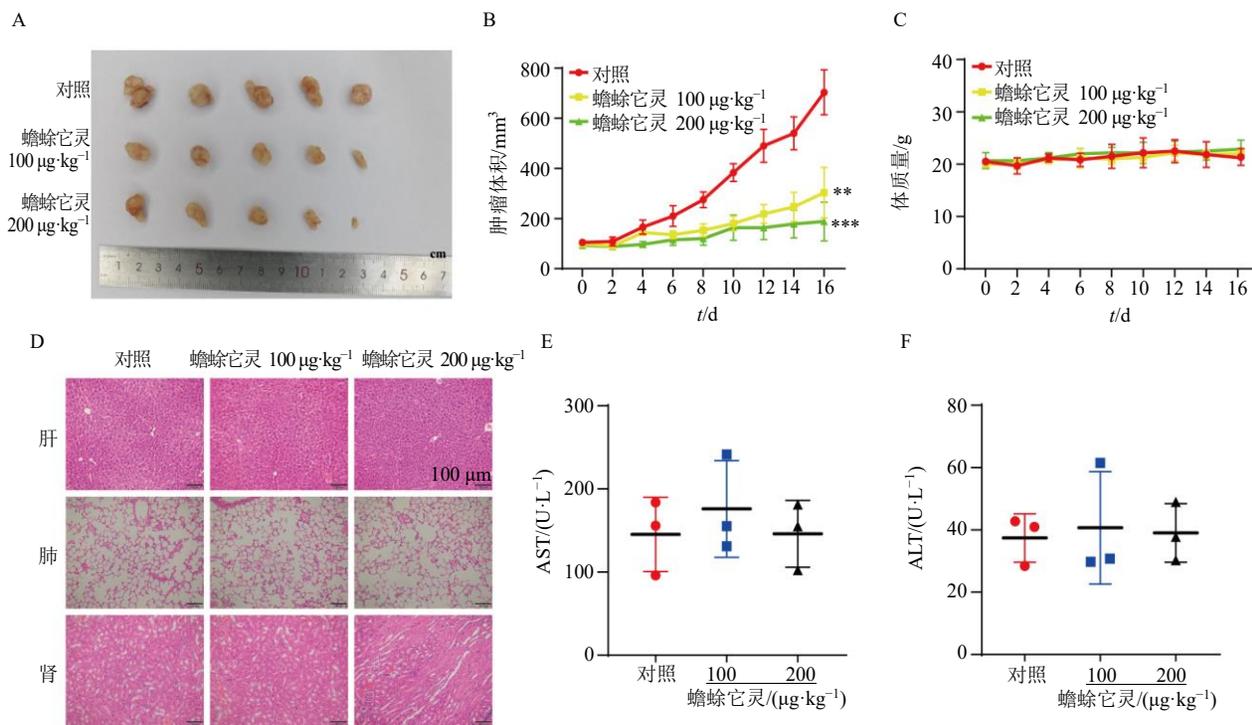


A、B-蟾蜍它灵对 Cal-27 和 FaDu 细胞周期分布的影响；C、D-蟾蜍它灵对 Cal-27 和 FaDu 细胞 CDK4、cyclin D1 蛋白表达的影响。

A, B-effect of bufotalin on cell cycle distribution of Cal-27 and FaDu cells; C, D-effect of bufotalin on expressions of CDK4 and cyclin D1 proteins in Cal-27 and FaDu cells.

图 2 蟾蜍它灵诱导 Cal-27 和 FaDu 细胞周期阻滞 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Bufotalin induced cell cycle arrest of Cal-27 and FaDu cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-各组肿瘤形态; B-各组肿瘤体积变化; C-各组体质量变化; D-各组肝、肺、肾组织 HE 染色结果 (×200); E、F-各组血清中 AST 和 ALT 活性。

A-tumor morphology of each group; B-changes in tumor volume in each group; C-changes in body weight of each group; D-HE staining results of liver, lung and kidney tissues in each group (×200); E, F-activities of AST and ALT in serum of each group.

图3 蟾蜍它灵抑制裸鼠异种移植瘤的生长 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Bufotalin inhibited growth of xenograft tumors in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 蟾蜍它灵处理的 Cal-27 细胞中差异表达蛋白及富集功能分析

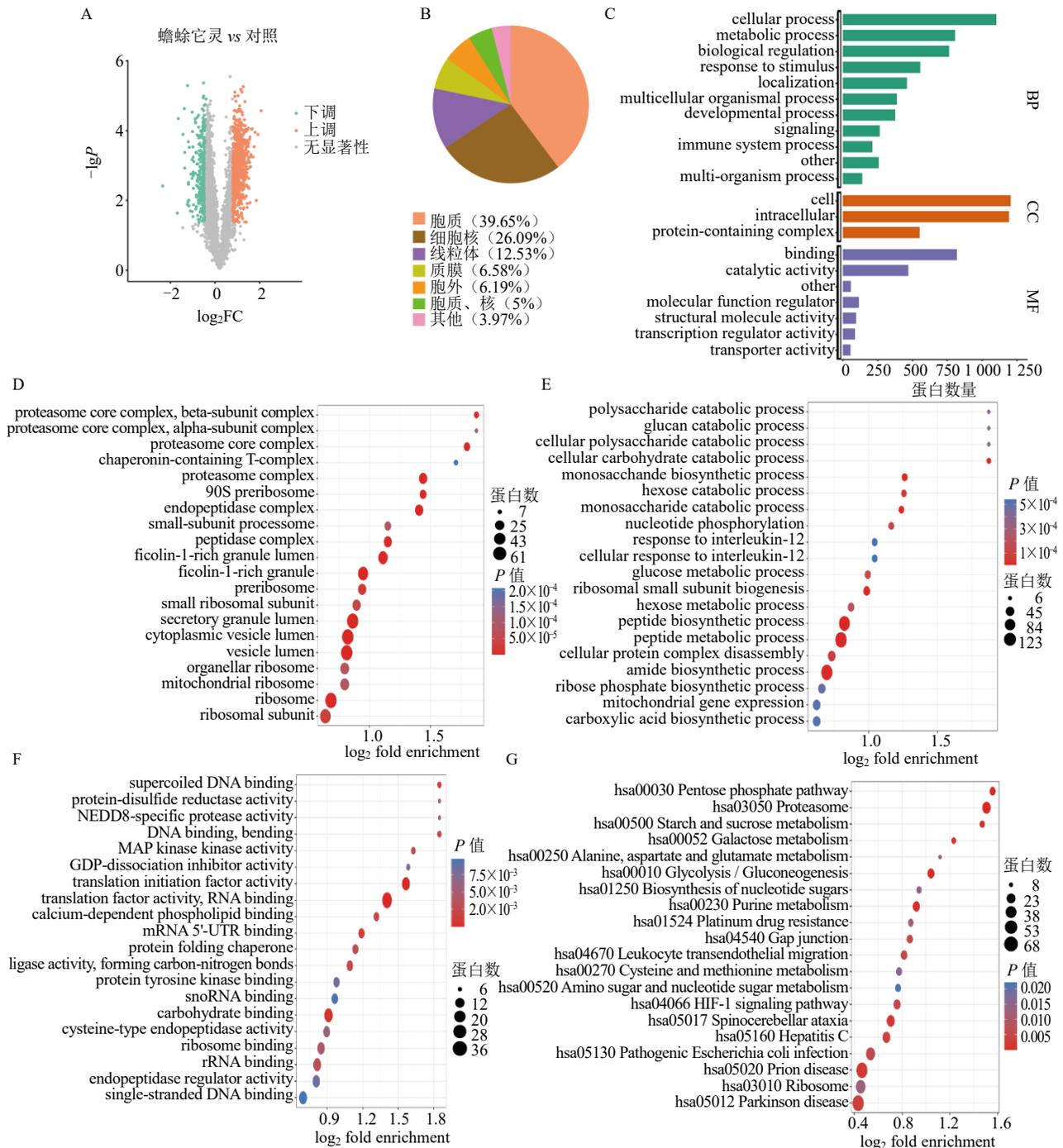
为了研究蟾蜍它灵抑制 HNSCC 细胞生长的分子机制, 利用蛋白质质谱分析对蟾蜍它灵处理的 Cal-27 细胞内的差异表达蛋白进行筛选分析, 通过使用差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 以及 $P < 0.05$ 作为显著差异的阈值。如图 4-A 所示, 在蟾蜍它灵处理的 Cal-27 细胞中, 有 1261 个显著差异表达蛋白, 其中显著上调的蛋白有 787 个, 显著下调的蛋白有 474 个。亚细胞定位与 GO 二级注释显示, 在亚细胞层面, 上述差异表达蛋白主要富集于细胞质与细胞核 (图 4-B); 从功能层面来看, 主要集中于细胞过程、代谢过程、生物调节、蛋白复合体、细胞结合及催化活性等 (图 4-C)。

进一步富集分析结果显示, 在细胞组分方面, 上述差异表达蛋白在核糖体、核糖体前体、核糖体亚基、细胞器核糖体、蛋白酶体复合物等结构中存在显著富集 (图 4-D); 在生物学过程方面, 显著富集于核糖体小亚基生物合成、细胞蛋白质合成分

解、含蛋白质复合物的拆卸、核糖体生物发生、核糖体大亚基生物合成、细胞周期等过程 (图 4-E); 在分子功能方面, 显著富集于翻译起始因子活性、翻译因子活性 RNA 结合、mRNA 5'-UTR 结合、核糖体结合等功能 (图 4-F)。通过对差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析可知, 上述差异表达蛋白与蛋白酶体、核糖体、帕金森病以及多种糖类和氨基酸的代谢等信号通路相关 (图 4-G)。分析显示有 19 个差异表达蛋白显著富集于细胞周期通路, 提示细胞周期进程可能是蟾蜍它灵发挥抗肿瘤作用的信号通路之一。综上, 蟾蜍它灵可能通过对细胞核糖体的功能、mRNA 的翻译及氨基酸、多肽、蛋白质的合成代谢产生影响, 进而发挥阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞生长的作用。

3.5 蟾蜍它灵通过内质网应激-EIF2 信号通路发挥抗肿瘤作用

为了进一步探究蟾蜍它灵抑制 HNSCC 细胞生长的分子机制, 使用 IPA 软件分析蟾蜍它灵处理的 Cal-27 细胞内的差异表达蛋白, 发现 EIF2 信号通



A-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的火山图；B-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白亚细胞定位的饼图；C-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的 GO 注释分类图；D-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的细胞组分富集分析结果；E-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的生物学过程富集分析结果；F-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的分子功能富集分析结果；G-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的 KEGG 富集分析结果。

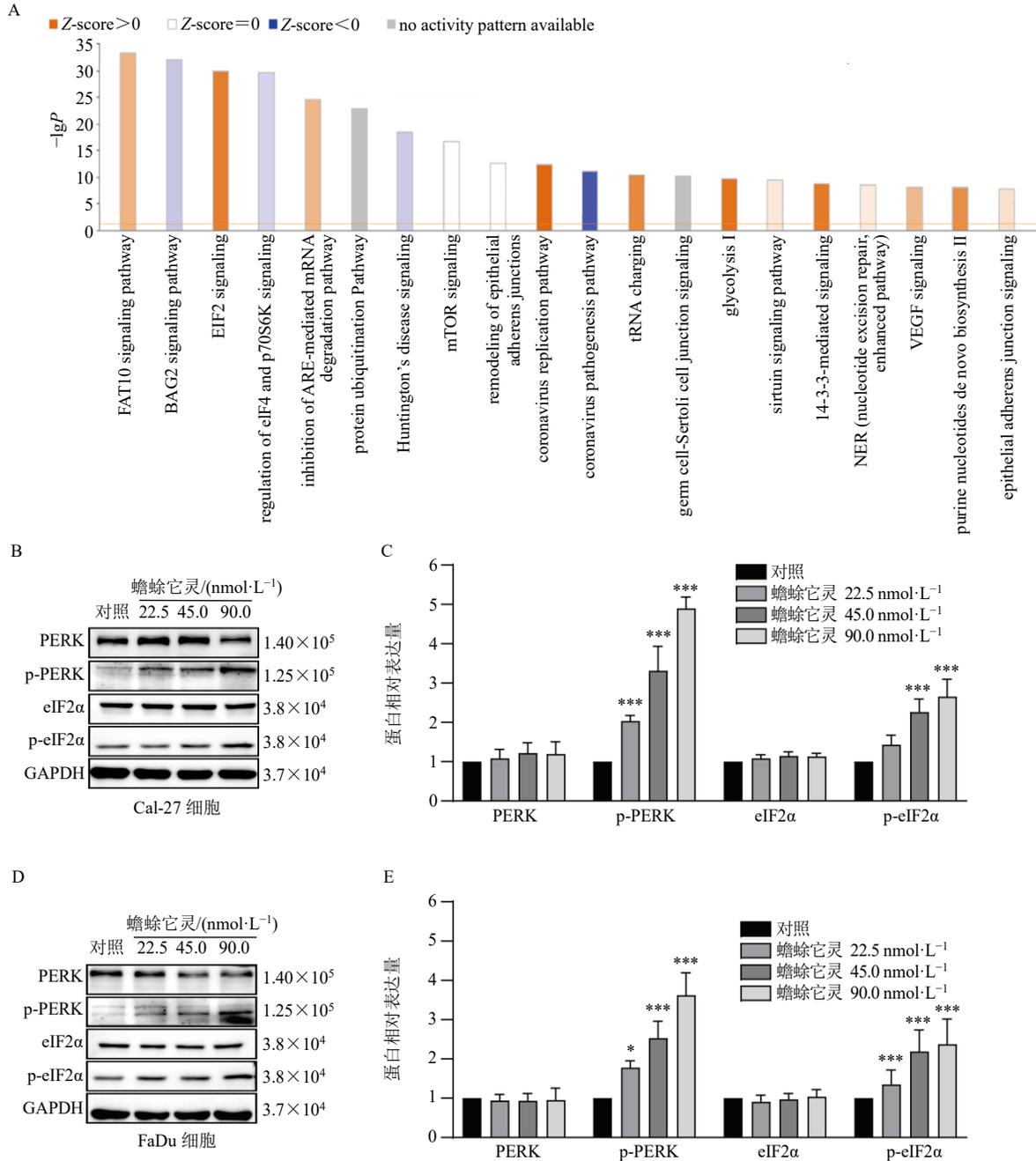
A-volcanic diagram of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; B-Pie chart of subcellular localization of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; C-GO annotation classification diagram of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; D-cell components enrichment analysis results of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; E-biological processes enrichment analysis results of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; F-molecular function enrichment analysis results of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; G-KEGG enrichment analysis results of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group.

图 4 蟾蜍它灵处理 Cal-27 细胞中的差异表达蛋白及功能富集分析

Fig. 4 Differential expression proteins and functional enrichment analysis in Cal-27 cells treated with bufotalin

路被显著激活 (图 5-A)。在 EIF2 信号通路中, 其核心调控位点 eIF2 α 的磷酸化是通路激活的关键标志, 而 PERK 是促进 eIF2 α 磷酸化的方式之一。因此, 利用 Western blotting 检测 Cal-27 与 FaDu 细胞内 eIF2 α 、PERK 表达及其磷酸化水平的变化。如图 5-B~E 所示, 与对照组比较, 除蟾蜍它灵低剂量组

p-eIF2 α 水平无明显变化外, 各给药组 p-PERK 和 p-eIF2 α 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), 而 PERK 和 eIF2 α 的表达量无明显变化。以上结果表明, 蟾蜍它灵可通过诱发 Cal-27 与 FaDu 细胞的内质网应激, 促进 PERK 和 eIF2 α 的磷酸化, 从而使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 发挥抗肿瘤作用。



A-蟾蜍它灵组和对照组 Cal-27 细胞中差异表达蛋白的 IPA 结果; B~E-蟾蜍它灵对 Cal-27 和 FaDu 细胞 PERK、p-PERK、eIF2 α 和 p-eIF2 α 蛋白表达的影响。

A-IPA result of differentially expressed proteins in Cal-27 cells between bufotalin group and control group; B-E-effect of bufotalin on expressions of PERK, p-PERK, eIF2 α and p-eIF2 α proteins in Cal-27 and FaDu cells.

图 5 蟾蜍它灵通过激活内质网应激-EIF2 信号通路发挥抗肿瘤作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Bufotalin exerts antitumor effects by activating endoplasmic reticulum stress-EIF2 signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

蟾蜍它灵是从蟾酥中提取分离的一种蟾毒二烯内酯类单体,具有多靶点抗肿瘤活性,可通过阻滞细胞周期、诱导凋亡与自噬、抑制 Na^+/K^+ -三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶等机制,对食管癌、肝癌、肺癌、胃癌、白血病、皮肤癌等多种癌细胞产生显著的生长抑制和促分化作用^[9]。本研究对蟾蜍它灵处理后的 Cal-27 和 FaDu 细胞进行活力检测、克隆形成实验以及流式细胞术检测,发现蟾蜍它灵可以显著阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期,进而抑制 HNSCC 细胞的增殖和荷瘤小鼠体内肿瘤的生长。

细胞周期的调控对于遏制肿瘤恶性进展具有重要意义,通过影响细胞周期来抑制肿瘤的不良进展,是目前抗肿瘤药物开发的一种重要途径^[10]。细胞周期涵盖细胞从一次有丝分裂完成到下一次有丝分裂完成的全过程,分为间期和分裂期^[11]。细胞分裂间期包括 DNA 合成前期 (G_1 期)、DNA 合成期 (S 期) 与 DNA 合成后期 (G_2 期)。细胞周期由 3 个蛋白质家族之间相互作用发挥调控功能,包括 cyclins、CDKs、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclins dependent kinase inhibitors, CKIs) ^[12-13]。其中, cyclins 和 CDKs 是细胞周期发展调控最关键的 2 个蛋白,磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Wnt/ β -catenin、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) /p38、PERK/eIF2 α 等多个信号通路^[14-15]均可通过影响 cyclins 和 CDKs 的表达水平,进而发挥调控细胞周期的作用。

为了进一步了解蟾蜍它灵抗 HNSCC 的分子机制,对蟾蜍它灵处理后的 Cal-27 细胞内差异表达蛋白进行 IPA 分析,并结合 GO 和 KEGG 的分析结果,发现蟾蜍它灵可能通过内质网应激-eIF2 信号通路发挥抗肿瘤作用。mRNA 翻译起始机制在包括真核生物在内的整个自然界的蛋白质合成过程中占据着关键地位^[16]。其中, eIF2 翻译起始复合体能够整合各类与应激相关的信号,以此对细胞内的全局 mRNA 翻译进行调控^[17]。在细胞内部,存在 4 种面对不同应激而被激活的激酶,分别为双链 RNA 依赖性蛋白激酶 (protein kinase R, PKR)、PERK (内质网应激)、一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (general

control nonderepressible 2, GCN2) 和血红素调节抑制因子 (heme-regulated inhibitor, HRI), 它们可以将 eIF2 α 发生磷酸化^[18], 进而直接参与到细胞内信使 RNA 的翻译调控之中。PERK/eIF2 α 通路在其他癌症中起着介导抵抗与生存等作用。在口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 中, EGFR 可通过激活 PERK-eIF2 α -葡萄糖调节蛋白 94 (glucose-regulated protein 94, GRP94) 轴来介导放射抵抗^[19]; 在头颈部鳞癌中, 阿托伐他汀对 PERK/eIF2 α 通路的激活则会削弱预期的放射增敏效果, 产生代谢保护作用^[20]; 在食管鳞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 中, 内质网应激及其触发的保护性自噬更是癌细胞应对放射治疗的重要防御手段, 抑制自噬能显著增强疗效^[21]。PERK/eIF2 α 通路在其他癌症类型中同样被证实是诱导保护性自噬的关键上游机制^[22]。本研究证实蟾蜍它灵通过激活 PERK/eIF2 α 信号通路, 在 HNSCC 细胞中诱导内质网应激与细胞周期阻滞。

此外, 蟾蜍它灵可能会对细胞内核糖体的功能、蛋白质合成代谢等过程产生影响, 而 PERK 正是调节蛋白质合成代谢过程的一种重要方式^[23]。因此, 采用 Western blotting 对蟾蜍它灵处理后细胞内 PERK、p-PERK、eIF2 α 和 p-eIF2 α 蛋白的表达水平进行检测。结果表明, 蟾蜍它灵可引起 Cal-27 和 FaDu 细胞内质网应激, 导致 p-PERK 表达水平显著升高; 过度表达的 p-PERK 使 eIF2 α 磷酸化水平增加, 使细胞内蛋白质合成速率降低, 致使 HNSCC 细胞周期被阻滞于 G_0/G_1 期, 进而抑制 HNSCC。

尽管本研究已经证明蟾蜍它灵与 HNSCC 细胞内质网应激及周期阻滞之间的关联性, 但是本研究尚存在一定局限性, 如缺乏利用 PERK 抑制剂或 siRNA 敲低进行功能挽救, 来验证是否逆转 p-eIF2 α 磷酸化以及缓解细胞周期阻滞, 以确立确切的因果关系。蟾蜍它灵在 Cal-27 与 FaDu 2 种 HNSCC 细胞中均能有效引发 G_0/G_1 期细胞周期阻滞, 但在 2 种细胞中 cyclin D1 的响应不一致, 推测可能是由于其起源部位与遗传背景的不同, Cal-27 细胞源于舌癌, FaDu 细胞源于下咽癌。这种在面对相同药物压力时表现出的替代性路径的现象, 在肿瘤异质性的差异化治疗反应中是一种常见表现^[24]。然而在本实验中没有对其进行深入研究, 其背后的机制值得在未来研究中深入探讨。

综上,蟾蜍它灵对 HNSCC 细胞增殖具有显著的抑制作用,其潜在机制可能为通过诱导头颈部鳞癌细胞内质网应激,引起 PERK 磷酸化升高;PERK 磷酸化水平的增加进而引发 eIF2 α 磷酸化水平提升,导致肿瘤细胞内蛋白质合成速率降低,促使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,发挥其对 HNSCC 细胞的抑制作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Johnson D E, Burtneß B, Leemans C R, *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92.
- [2] von Witzleben A, Wang C, Laban S, *et al.* HNSCC: Tumour antigens and their targeting by immunotherapy [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2103.
- [3] Li H X, Gong Y W, Yan P J, *et al.* Revolutionizing head and neck squamous cell carcinoma treatment with nanomedicine in the era of immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1453753.
- [4] 葛超, 吕梦迪, 张自由, 等. 基于天然产物的铂类和芳基金属抗癌药物研究进展 [J]. *无机化学学报*, 2020, 36(4): 597-606.
- [5] Akter R, Afrose A, Rahman M R, *et al.* A comprehensive analysis into the therapeutic application of natural products as SIRT6 modulators in Alzheimer's disease, aging, cancer, inflammation, and diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4180.
- [6] 黄菊, 张玮扬, 邹灿, 等. 甘草黄酮类成分抗肿瘤研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(4): 1456-1466.
- [7] 黄东宇, 杨璐铭, 钟映琪, 等. 蟾酥活性成分及其药理作用的研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(1): 124-136.
- [8] 邬晓宇, 丁海花, 朱学军. 抗肿瘤药物蟾毒灵的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(7): 139-143.
- [9] Zhang W, Jiang B P, Liu Y X, *et al.* Bufotalin induces ferroptosis in non-small cell lung cancer cells by facilitating the ubiquitination and degradation of GPX4 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 75-84.
- [10] Matthews H K, Bertoli C, de Bruin R A M. Cell cycle control in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 74-88.
- [11] Akaike Y, Chibazakura T. Aberrant activation of cyclin A-CDK induces G₂/M-phase checkpoint in human cells [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(1): 84-96.
- [12] Engeland K. Cell cycle regulation: P53-p21-RB signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(5): 946-960.
- [13] Wang Z X. Cell cycle progression and synchronization: An overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2579: 3-23.
- [14] Sun E J, Wankell M, Palamuthusingam P, *et al.* Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1639.
- [15] Xu Y L, Gu X H, Shan S, *et al.* Isovalerylsiramycin I suppresses small cell lung cancer proliferation via ATR/CHK1 mediated DNA damage response and PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP mediated ER stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 230(Pt 1): 116557.
- [16] Sonneveld S, Verhagen B M P, Tanenbaum M E. Heterogeneity in mRNA translation [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(8): 606-618.
- [17] Fer E, Yao T, McGrath K M, *et al.* The origins and evolution of translation factors [J]. *Trends Genet*, 2025, 41(7): 590-600.
- [18] Szaruga M, Janssen D A, de Miguel C, *et al.* Activation of the integrated stress response by inhibitors of its kinases [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5535.
- [19] Zhang M, Han N, Jiang Y J, *et al.* EGFR confers radioresistance in human oropharyngeal carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress signaling PERK-eIF2 α -GRP94 and IRE1 α -XBP1-GRP78 [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(12): 6234-6246.
- [20] Feng J, Pathak V, Byrne N M, *et al.* Atovaquone-induced activation of the PERK/eIF2 α signaling axis mitigates metabolic radiosensitisation [J]. *Cell Commun Signal*, 2025, 23(1): 164.
- [21] Wang C, Li T K, Zeng C H, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy enhances the anticancer effect of iodine-125 seed radiation on esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Radiat Res*, 2020, 194(3): 236-245.
- [22] Zhang Q C, Pan Z H, Liu B N, *et al.* Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human lung cancer cells through an endoplasmic reticulum stress-mediated mechanism [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4): 539-550.
- [23] Mazzolini L, Touriol C. PERK-olating through cancer: A brew of cellular decisions [J]. *Biomolecules*, 2025, 15(2): 248.
- [24] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley D B, *et al.* Cancer drug resistance: An evolving paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 714-726.

[责任编辑 李亚楠]