

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research穿心莲内酯调节 *miR* - 218 - 5p/*SOX5* 影响
口腔鳞状细胞癌细胞上皮间质转化的研究Research of andrographolide modulates epithelial - mesenchymal transition in oral
squamous cell carcinoma by *miR* - 218 - 5p/*SOX5* pathways张芳英^a, 黄新帮^b, 黄迪^c,
曾以旺^a, 黄根生^c(赣州市人民医院, a. 药剂科; b. 口腔颌面外科;
c. 口腔科, 江西 赣州 341000)ZHANG Fang - ying^a,
HUANG Xin - bang^b,
HUANG Di^c, ZENG Yi - wang^a,
HUANG Gen - sheng^c(a. Department of Pharmacy;
b. Department of Maxillofacial Surgery;
c. Department of Stomatology, Ganzhou
People's Hospital, Ganzhou 341000,
Jiangxi Province, China)

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划基金资助项目 (SKJP220236690)

作者简介: 张芳英 (1988 -), 女, 主管药师, 主要从事临床药学、基础医学方面的工作和研究

通信作者: 黄根生, 副主任医师
MP: 15879748676

E - mail: zfy50062@163.com

摘要:目的 探讨穿心莲内酯调节微小 RNA (*miR*) - 218 - 5p/SRY - box 转录因子 5 (*SOX5*) 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化 (EMT) 的影响。
方法 将 CAL - 27 细胞分为空白组 (常规培养)、穿心莲内酯组 (15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯处理)、穿心莲内酯 + inhibitor NC 组 (15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 转染 inhibitor NC 处理)、穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor 组 (15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 转染 *miR* - 218 - 5p inhibitor 处理)、穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - NC 组 (15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 共转染 *miR* - 218 - 5p inhibitor 和 si - NC 处理) 和穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - *SOX5* 组 (15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 共转染 *miR* - 218 - 5p inhibitor 和 si - *SOX5* 处理)。用定量逆转录聚合酶链反应 (qRT - PCR) 检测 *miR* - 218 - 5p 与 *SOX5* mRNA 的相对表达水平; 用 5 - 乙炔基 - 2' - 脱氧尿苷 (EdU) 法检测细胞增殖能力, 用 Transwell 法检测细胞侵袭能力, 用蛋白质印迹法检测 EMT 相关蛋白的相对表达水平。
结果 经过不同时间处理后, 空白组、穿心莲内酯组、穿心莲内酯 + inhibitor NC 组和穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor 组中 *miR* - 218 - 5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 2.76 ± 0.48 、 2.69 ± 0.50 和 1.19 ± 0.17 , *SOX5* mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09 、 0.36 ± 0.07 、 0.35 ± 0.05 和 0.93 ± 0.18 。与空白组相比, 穿心莲内酯组的 *miR* - 218 - 5p 相对表达水平显著上调, *SOX5* mRNA 相对表达水平显著下调 (均 $P < 0.05$)。空白组、穿心莲内酯组、穿心莲内酯 + inhibitor NC 组、穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor 组、穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - NC 组和穿心莲内酯 + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - *SOX5* 组的增殖率分别为 $(62.76 \pm 8.14)\%$ 、 $(23.58 \pm 2.87)\%$ 、 $(25.12 \pm 3.64)\%$ 、 $(51.29 \pm 9.12)\%$ 、 $(50.76 \pm 8.29)\%$ 和 $(34.18 \pm 6.83)\%$, 侵袭个数分别为 (154.23 ± 17.24) 、 (67.13 ± 9.37) 、 (72.81 ± 11.28) 、 (125.36 ± 18.74) 、 (118.15 ± 19.80) 和 (80.44 ± 12.13) 个, E - 钙黏蛋白 (E - cadherin) 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 2.62 ± 0.43 、 2.56 ± 0.47 、 1.47 ± 0.27 、 1.51 ± 0.23 和 2.24 ± 0.43 , 神经钙黏蛋白 (N - cadherin) 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.41 ± 0.08 、 0.39 ± 0.06 、 0.83 ± 0.17 、 0.86 ± 0.15 和 0.51 ± 0.10 , 波形蛋白 (Vimentin) 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.49 ± 0.07 、 0.46 ± 0.09 、 0.85 ± 0.16 、 0.88 ± 0.17 和 0.55 ± 0.11 。与空白组相比, 穿心莲内酯组的增殖率、侵袭个数及 N - cadherin 与 Vimentin 相对表达水平均显著降低, E - cadherin 相对表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$)。
结论 穿心莲内酯可抑制口腔鳞状细胞癌的增殖、侵袭和 EMT, 其机制可能与上调 *miR* - 218 - 5p 从而靶向抑制 *SOX5* 的表达有关。

关键词: 穿心莲内酯; 口腔鳞状细胞癌; 增殖; 侵袭; 上皮间质转化**DOI:** 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.19.012**中图分类号:** R28**文献标志码:** A**文章编号:** 1001 - 6821 (2025) 19 - 2767 - 07

Abstract: Objective To investigate the effects of andrographolide on microRNA (*miR*) - 218 - 5p/RY box transcription factor 5 (SOX5) on the proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transformation (EMT) of oral squamous cell carcinoma cells. **Methods** CAL - 27 cells were divided into the following groups: blank group (conventional culture), andrographolide group (treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide), andrographolide + inhibitor NC group (treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and transfected with inhibitor NC), andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor group (treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and transfected with *miR* - 218 - 5p inhibitor), andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - NC group (treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and co - transfected with *miR* - 218 - 5p inhibitor and si - NC), and andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5 group (treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and co - transfected with *miR* - 218 - 5p inhibitor and si - SOX5). The relative expression levels of *miR* - 218 - 5p and SOX5 mRNA were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT - PCR), cell proliferation ability was measured using the 5 - ethynyl - 2' - deoxyuridine (EdU) assay, cell invasion ability was assessed by Transwell assay, and the relative expression levels of EMT - related proteins were determined by Western blotting. **Results** After different treatment periods, the relative expression levels of *miR* - 218 - 5p in blank group, andrographolide group, andrographolide + inhibitor NC group and andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor group were 1.00 ± 0.11 , 2.76 ± 0.48 , 2.69 ± 0.50 and 1.19 ± 0.17 , respectively; the relative expression levels of SOX5 mRNA were 1.00 ± 0.09 , 0.36 ± 0.07 , 0.35 ± 0.05 and 0.93 ± 0.18 , respectively. Compared with the blank group, the andrographolide group showed statistically significantly upregulated *miR* - 218 - 5p relative expression levels and statistically significantly reduced SOX5 mRNA relative expression levels (all $P < 0.05$). The proliferation rates in blank group, andrographolide group, andrographolide + inhibitor NC group, andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor group, andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - NC group and andrographolide + *miR* - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5 group were $(62.76 \pm 8.14)\%$, $(23.58 \pm 2.87)\%$, $(25.12 \pm 3.64)\%$, $(51.29 \pm 9.12)\%$, $(50.76 \pm 8.29)\%$ and $(34.18 \pm 6.83)\%$, respectively; the number of invasive cells were (154.23 ± 17.24) , (67.13 ± 9.37) , (72.81 ± 11.28) , (125.36 ± 18.74) , (118.15 ± 19.80) and (80.44 ± 12.13) , respectively; the relative expression levels of E - cadherin were 1.00 ± 0.12 , 2.62 ± 0.43 , 2.56 ± 0.47 , 1.47 ± 0.27 , 1.51 ± 0.23 and 2.24 ± 0.43 , respectively; the relative expression levels of N - cadherin were 1.00 ± 0.11 , 0.41 ± 0.08 , 0.39 ± 0.06 , 0.83 ± 0.17 , 0.86 ± 0.15 and 0.51 ± 0.10 , respectively; the relative expression levels of Vimentin were 1.00 ± 0.08 , 0.49 ± 0.07 , 0.46 ± 0.09 , 0.85 ± 0.16 , 0.88 ± 0.17 and 0.55 ± 0.11 , respectively. Compared with blank group, andrographolide group showed statistically significantly decreased proliferation rate, number of invasive cells and relative expression levels of N - cadherin and Vimentin, while demonstrating statistically significantly increased relative expression levels of E - cadherin (all $P < 0.05$). **Conclusion** Andrographolide inhibits the proliferation, invasion, and EMT in oral squamous cell carcinoma, potentially through upregulating *miR* - 218 - 5p and subsequently targeting the suppression of SOX5 expression.

Key words: andrographolide; oral squamous cell carcinoma; proliferation; invade and attack; epithelial mesenchymal transformation

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔恶性肿瘤中最常见的类型,约占口腔恶性肿瘤的90%左右,具有高复发性和转移性,多数患者发现时已处于晚期^[1]。目前主要采用根治性手术切除、放疗、化疗或综合治疗方式,但5年总体生存率仍低于50%^[2]。顺铂等化疗药物缺乏特异性,存在全身性的药物不良反应;同时,OSCC的肿瘤异质性增加了药物对肿瘤细胞的耐药性,影响其治疗效果^[3]。因

此,探索OSCC发生发展的机制,寻找有效的治疗靶点,开发新型低毒性治疗药物至关重要。穿心莲内酯是一种天然的二萜内酯类化合物,对多种肿瘤细胞具有抑制作用^[4]。但穿心莲内酯对口腔鳞状细胞癌的作用机制还需进一步研究。已有研究揭示上皮间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)是影响癌细胞增殖、侵袭行为的关键^[5]。因此,本研究分析穿心莲内酯通过调控微小RNA(micro, *miR*) - 218 - 5p/

SRY-box 转录因子 5 (SRY-box transcription factor 5, SOX5) 轴对口腔鳞状癌细胞增殖、侵袭和 EMT 的影响,为穿心莲内酯作为 OSCC 潜在治疗药物的开发提供理论依据。

材料与方法

1 材料

细胞 人口腔上皮细胞系 HOEC,人胚肾细胞系 293T,口腔鳞状细胞癌细胞系 HSC-4、CAL-27、SCC-9 和 SCC-15,均购自上海雅吉生物科技有限公司。

药品与试剂 穿心莲内酯,规格:每瓶 100 mg,纯度: >98.50%,批号:GN107181-1,购自美国 GlpBio 公司;细胞计数-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、Triton X-100 试剂盒、Lipo6000™ 转染试剂、逆转录试剂盒、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 增殖检测试剂盒和 Transwell 小室,均由上海碧云天生物技术股份有限公司生产;辣根过氧化物酶标记抗体、SOX5、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin) 及波形蛋白 (Vimentin) 抗体,均由英国 Abcam 公司生产。

仪器 QuanStudio 6 荧光定量聚合酶链 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 反应仪、Multiskan Sky High 酶标仪,均为美国 Thermo 公司产品;Nikon Eclipse TS100 倒置显微镜、Eclipse Ti-SR 荧光显微镜,均为日本尼康公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[6]

将 HOEC、HSC-4、CAL-27、SCC-9、SCC-15 及 293T 细胞培养于含有 10% 胎牛血清培养基中,放入 37℃、5% CO₂ 的培养箱中正常培养。转染方法:取生长状况良好的 CAL-27 细胞,以每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板,待约 80% 细胞贴壁后,根据 Liopfectamie3000 转染说明书进行转染,用 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 法检测转染效率,收集转染成功的细胞用于后续实验。

2.2 细胞分组与处置方法

将细胞分为空白组 (正常培养不做任何处理)、穿心莲内酯组 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯处理)、穿心莲内酯 + inhibitor NC 组 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 转染 inhibitor NC 处理)、穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor 组 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 转染 miR-218-5p inhibitor 处理)、穿心莲内酯 + miR-218-5p

inhibitor + si-NC 组 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 共转染 miR-218-5p inhibitor 和 si-NC 处理, si-NC 序列为 5'-GCUAUGACCAACCUAGAGAAATT-3')、穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor + si-SOX5 组 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯 + 共转染 miR-218-5p inhibitor 和 si-SOX5 处理, si-SOX5 序列为 5'-UUUCUCUAGGUUGGUCAUAGCTT-3')。

2.3 qRT-PCR 法检测 miR-218-5p 和 SOX5 相对表达水平^[7]

按 TRizol 试剂说明书提取细胞总 RNA,用逆转录试剂盒将总 RNA 反转录为互补 DNA,分别以 U6 和 GAPDH 为内参进行 PCR 扩增。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达水平。引物序列如下,miR-218-5p: 上游 5'-GGCCTTGCTTGATCTAACC-3',下游 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6: 上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; SOX5: 上游 5'-AACAAACACAGATCCCCATTG-3',下游 5'-ACACCGTAAGTGCTCTGGATA-3'; GAPDH: 上游 5'-TTTAAGTCTGTAAAGTGGATAT-3',下游 5'-GGTGAATCATAT-TGGAACA-3'。

2.4 生物信息学分析法和双荧光素酶基因报告实验法验证 miR-218-5p 和 SOX5 的关系^[8]

用 TargetScan 数据库^[9] 预测 miR-218-5p 与 SOX5 之间是否存在互补位点。将预测的含有 miR-218-5p 结合位点的 SOX5 片段以及突变序列片段扩增并克隆至 pGL3 质粒中构建野生型和突变型载体 WT/MUT-SOX5。随后将细胞 (3×10^5) 接种于 24 孔板中,分别转染至 mimics NC 和 miR-218-5p mimics 中,48 h 后检测细胞中的荧光素酶活性。

2.5 CCK-8 实验法检测 CAL-27 细胞的存活率^[6]

取处于对数生长期的 CAL-27 细胞,以每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板培养,分别用 0、5、10、15、20 和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯处理 CAL-27 细胞 48 h 后,用 CCK-8 试剂盒处理 CAL-27 细胞 1 h,用酶标仪检测光密度值,计算细胞存活率。

2.6 WB 法检测 SOX5 及 EMT 相关蛋白相对表达水平^[10]

将处理后的细胞与裂解液 400 μL 共孵育提取总蛋白,依次电泳、转膜、封闭,加入一抗 (Vimentin、SOX5、E-cadherin 和 N-cadherin, 1:1 000),在 4℃ 下孵育过夜,清洗后,加入对应的二抗 (1:5 000),常温孵育 1 h,清洗后显色,用 Image J 软件进行条带灰

度分析。

2.7 EdU 实验法检测细胞增殖能力^[11]

将细胞以每孔 1×10^3 接种于 96 孔板,贴壁后,按试剂盒说明书步骤每孔加入 EdU 溶液(终浓度 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 37°C 孵育 2 h,洗脱后用 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛室温固定细胞 10 min,清洗后加入 $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Triton X-100,室温孵育 10 min,清洗后用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI) 染细胞核,在荧光显微镜下,对每视野下 EdU 阳性细胞计数。

2.8 Transwell 实验法检测细胞侵袭能力^[12]

将 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液 $200 \mu\text{L}$ 加入已包被好基质胶的 Transwell 上室中,培养 24 h 后去除培养基,经固定、染色、清洗后室温晾干,在倒置显微镜下拍照并统计侵袭细胞数。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 miR-218-5p 和 SOX5 在人口腔上皮细胞与口腔鳞状细胞癌细胞中的相对表达水平

空白组细胞不做任何处理,穿心莲内酯组细胞用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯处理,穿心莲内酯 + inhibitor NC 组细胞用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯和转染 inhibitor NC 处理,穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor 组细胞用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯和转染 miR-218-5p inhibitor 处理,穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor + si-NC 组细胞用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯和共转染 miR-218-5p inhibitor 和 si-NC 处理,穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor + si-SOX5 组细胞用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 穿心莲内酯和共转染 miR-218-5p inhibitor 和 si-SOX5 处理。

HOEC、HSC-4、CAL-27、SCC-9 和 SCC-15 组中 miR-218-5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 、 0.62 ± 0.12 、 0.27 ± 0.04 、 0.45 ± 0.07 和 0.38 ± 0.06 , SOX5 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 1.79 ± 0.21 、 3.87 ± 0.46 、 2.91 ± 0.39 和 3.12 ± 0.42 。与 HOEC 细胞相比,miR-218-5p 在 HSC-4、CAL-27、SCC-9 和 SCC-15 细胞中的相对表达水平均显著降低,SOX5 mRNA 在 HSC-4、CAL-27、SCC-9 和 SCC-15 细胞中的相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$); CAL-27 细胞中的

miR-218-5p 和 SOX5 mRNA 相对表达水平差异最显著,故后续以 CAL-27 细胞进行实验。

2 miR-218-5p 与 SOX5 靶向关系的验证

用 TargetScan 数据库预测互补位点,发现 miR-218-5p 与 SOX5 之间存在互补配对序列,初步数据表明,SOX5 是 miR-218-5p 的候选靶点,见图 1。mimics NC 和 miR-218-5p mimics 与 WT-SOX5 共转染的荧光素酶相对活性为 1.00 ± 0.11 和 0.57 ± 0.08 ,与 Mut-SOX5 共转染的荧光素酶相对活性为 1.00 ± 0.10 和 0.98 ± 0.12 。与 mimics NC 相比,WT-SOX5 与 miR-218-5p mimics 共转染时,荧光素酶活性显著降低($P < 0.001$),而 Mut-SOX5 与 miR-218-5p mimics 共转染时,荧光素酶活性在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。mimics NC 和 miR-218-5p mimics 的 miR-218-5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09 和 3.21 ± 0.62 ,SOX5 mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 和 0.28 ± 0.05 ,SOX5 蛋白的相对表达水平为 1.00 ± 0.12 和 0.34 ± 0.06 。与 mimics NC 相比,miR-218-5p mimics 的 miR-218-5p 相对表达水平显著升高,SOX5 mRNA 和蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$)。

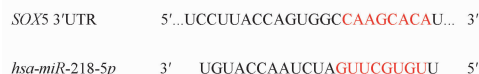


图1 miR-218-5p 与 SOX5 的靶向关系

Figure 1 Targeting relationship between miR-218-5p and SOX5

3 穿心莲内酯通过调控 miR-218-5p 抑制 SOX5 mRNA 和蛋白的表达

0、5、10、15、20 和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯处理 CAL-27 细胞 48 h 后,CAL-27 细胞存活率分别为 $(99.56 \pm 6.85)\%$ 、 $(91.39 \pm 7.08)\%$ 、 $(74.61 \pm 7.52)\%$ 、 $(54.78 \pm 7.47)\%$ 、 $(46.23 \pm 6.62)\%$ 和 $(41.87 \pm 5.08)\%$,半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 $18.71 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,选择 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯进行后续实验。与空白组相比,穿心莲内酯组的 miR-218-5p 相对表达水平显著升高,SOX5 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与穿心莲内酯组相比,穿心莲内酯 + inhibitor NC 组的 miR-218-5p 及 SOX5 mRNA 和蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与穿心莲内酯 + inhibitor NC 组相比,穿心莲内酯 + miR-218-5p inhibitor 组的 miR-218-5p

相对表达水平显著降低,SOX5 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$)。结果见表 1。

4 穿心莲内酯通过调控 miR - 218 - 5p/SOX5 轴影响口腔鳞状癌细胞的增殖、侵袭及上皮间质转化

与空白组相比,穿心莲内酯组的细胞增殖率、侵袭个数、N - cadherin 及 Vimentin 蛋白相对表达水平均显著降低,E - cadherin 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$);与穿心莲内酯组相比,穿心莲内酯 + inhibitor NC 组的细胞增殖率、侵袭个数、E - cadherin、N - cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达水平均在统计学上差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);与穿心莲内酯 + inhibitor NC 组相比,穿心莲内酯 + miR - 218 - 5p inhibitor 组的细胞增殖率、侵袭个数、N - cadherin 及 Vimentin 蛋白相对表达水平均显著升高,E - cadherin 蛋白相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$);与穿心莲内酯 + miR - 218 - 5p inhibitor 组相比,穿心莲内酯 + miR - 218 - 5p inhibitor + si - NC 组的细胞增殖率、侵袭个数、E - cadherin、N - cadherin 和 Vimentin 蛋白相对表达水平均在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与穿心莲内酯 + miR - 218 - 5p inhibitor +

si - NC 组相比,穿心莲内酯 + miR - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5 组的细胞增殖率、侵袭个数、N - cadherin 及 Vimentin 蛋白相对表达水平均显著降低,E - cadherin 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$),见表 2 和图 2。

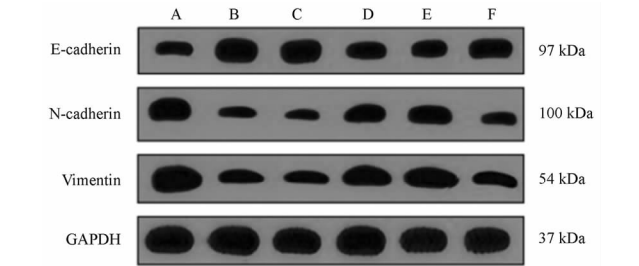


图 2 用蛋白质印迹法检测各组细胞中 EMT 相关蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of EMT - related proteins in cells from each group were detected by Western blotting A:Blank group; B: Andrographolide group; C: Andrographolide + inhibitor NC group; D: Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor group; E: Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - NC; F: Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5.

表 1 各组细胞中 miR - 218 - 5p 及 SOX5 mRNA 和蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the relative expression levels of miR - 218 - 5p, SOX5 mRNA and SOX5 protein in different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	miR - 218 - 5p	SOX5 mRNA	SOX5 protein
Blank	8	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.15
Andrographolide	8	2.76 ± 0.48 ***	0.36 ± 0.07 ***	0.41 ± 0.08 ***
Andrographolide + inhibitor NC	8	2.69 ± 0.50	0.35 ± 0.05	0.43 ± 0.09
Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor	8	1.19 ± 0.17 ###	0.93 ± 0.18 ###	0.87 ± 0.16 ###

Blank group: Normal culture; Andrographolide group: Treatment with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide; Andrographolide + inhibitor NC group: Co - treatment with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and inhibitor NC; Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor group: Co - treatment with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and miR - 218 - 5p inhibitor; Compared with blank group, *** $P < 0.001$; Compared with andrographolide + inhibitor NC group, ### $P < 0.001$.

表 2 各组细胞增殖率、侵袭能力及上皮间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cell proliferation rates, invasion capabilities and relative expression levels of epithelial - mesenchymal transition (EMT) - related proteins in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Rate of increase (%)	Invasion number (pcs)	E - cadherin	N - cadherin	Vimentin
Blank	8	62.76 ± 8.14	154.23 ± 17.24	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.08
Andrographolide	8	23.58 ± 2.87 ***	67.13 ± 9.37 ***	2.62 ± 0.43 ***	0.41 ± 0.08 ***	0.49 ± 0.07 ***
Andrographolide + inhibitor NC	8	25.12 ± 3.64	72.81 ± 11.28	2.56 ± 0.47	0.39 ± 0.06	0.46 ± 0.09
Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor	8	51.29 ± 9.12 ###	125.36 ± 18.74 ###	1.47 ± 0.27 ###	0.83 ± 0.17 ###	0.85 ± 0.16 ###
Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - NC	8	50.76 ± 8.29	118.15 ± 19.80	1.51 ± 0.23	0.86 ± 0.15	0.88 ± 0.17
Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5	8	34.18 ± 6.83 $\Delta\Delta\Delta$	80.44 ± 12.13 $\Delta\Delta\Delta$	2.24 ± 0.43 $\Delta\Delta\Delta$	0.51 ± 0.10 $\Delta\Delta\Delta$	0.55 ± 0.11 $\Delta\Delta\Delta$

Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - NC: Co - treatment of $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and co - transfection with miR - 218 - 5p inhibitor and si - NC; Andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - SOX5: Co - treatment of $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ andrographolide and co - transfection with miR - 218 - 5p inhibitor and si - SOX5; Compared with blank group, *** $P < 0.001$; Compared with andrographolide + inhibitor NC group, ### $P < 0.001$; Compared with andrographolide + miR - 218 - 5p inhibitor + si - NC group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

讨 论

由于环境、种族特异性、遗传易感性等高危因素,口腔鳞状细胞癌的发病率、患病率和其他流行病学特征存在差异性,具有局部侵袭性强,易于颈部淋巴结转移的特点,因此,深入研究口腔鳞状细胞癌进展的分子机制并探索更有效的治疗方法至关重要^[13]。穿心莲内酯为植物穿心莲的有效活性成分之一,可用于抗肿瘤、抗炎等治疗^[14]。有研究表明,穿心莲内酯可下调缺氧诱导因子-1 α 及其介导的血管内皮生长因子A表达,抑制肝癌细胞增殖^[15],但其对口腔鳞状细胞抑制作用的具体机制尚未完全明确。*miR-218-5p*是一种抑癌基因,在各种生物学过程中起着关键的调节作用,已有研究证实,*miR-218-5p*在OSCC细胞中表达下调,上调其表达可以促进肿瘤细胞增殖^[16]。*SOX5*是一种转录因子,具有高迁移率族(high mobility group, HMG)结构域和卷曲螺旋结构域,可以直接与DNA或其他蛋白质结合,从而调节基因的表达,其异常表达与肝细胞癌、乳腺癌和非小细胞肺癌等恶性进展相关^[17]。本研究发现,OSCC细胞中*miR-218-5p*呈低表达,*SOX5*呈高表达,且二者之间存在靶向关系,穿心莲内酯处理后可以显著上调OSCC细胞中*miR-218-5p*相对表达水平,抑制*SOX5* mRNA相对表达水平,当抑制*miR-218-5p*基因时,*SOX5*基因表达显著升高,二者呈负相关。表明穿心莲内酯并非直接作用于*SOX5*,而是通过上调肿瘤抑制因子*miR-218-5p*,进而间接抑制癌基因*SOX5*的表达,从而发挥其抑制肿瘤发展的作用。

EMT是肿瘤细胞完成迁移、侵袭的关键步骤,能够直接促进肿瘤细胞在原发位点向远端的转移,并浸润到其他组织器官,当肿瘤细胞发生EMT时,相关标志分子Vimentin和N-cadherin表达均上调,共同参与细胞运动及黏附等生物学过程,E-cadherin负责维持细胞极性和上皮组织完整性,其表达下调是导致肿瘤细胞远端转移的重要因素^[18-19]。有研究报道,穿心莲内酯抑制CAL-27细胞迁移和侵袭的作用可能与其调控EMT标志性蛋白表达有关,*miR-218-5p*可以通过抑制Ras同源基因家族成员A(Ras homolog gene family member A, RhoA)蛋白抑制OSCC细胞的EMT及肿瘤发展,与本研究结果具有一致性^[20-21]。在本研究中,穿心莲内酯可显著抑制CAL-27细胞中上述EMT相关标志蛋白表达,通过干扰*miR-218-5p*和*SOX5*基因发现,抑制*miR-218-5p*基因的表达会

减轻穿心莲内酯对CAL-27细胞的抑制作用,进一步抑制*SOX5*基因的表达可以减弱*miR-218-5p*基因对穿心莲内酯的影响。揭示了穿心莲内酯对*miR-218-5p/SOX5*的调控可能是其抑制OSCC细胞侵袭、增殖的潜在机制。研究发现,*miR-218-5p*低表达可以激活OSCC细胞CD44/ROCK等促癌信号通路,加剧肿瘤的侵袭性^[22];同时,*miR-218-5p*、*SOX5*与磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(protein kinase B/mammalian target of rapamycin, AKT/mTOR)等肿瘤发生与发展的信号通路密切相关^[23-24]。表明穿心莲内酯调控*miR-218-5p/SOX5*轴可能通过多途径发挥抗OSCC作用。尽管本研究取得了一定结果,但仍存在一定局限性,如缺少体内相关研究证据;EMT是由一个由多条信号通路共同调控的复杂过程,与PI3K、AKT/mTOR等信号通路密切相关,虽有证据表明*miR-218-5p/SOX5*轴与上述信号通路密切相关,但缺少穿心莲内酯通过*miR-218-5p/SOX5*轴影响下游信号通路的直接证据,未来有待进一步研究。

本研究提示:穿心莲内酯可通过上调*miR-218-5p*表达,抑制*SOX5*表达,进而调控EMT相关标志物表达,抑制OSCC细胞增殖和侵袭。揭示了*miR-218-5p/SOX5*轴在OSCC EMT过程中的关键作用,为OSCC的增殖与侵袭提供了新视角。这一发现不仅丰富了穿心莲内酯抗肿瘤作用的机制研究,也为OSCC的治疗提供了新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] 张帅源,秦硕,李光辉,等. 口腔鳞状细胞癌外周血循环肿瘤细胞检测及其临床意义[J]. 华西口腔医学杂志, 2021, 39(5): 591-597.
- [2] XIANG Z, WEI X, ZHANG Z, et al. Efficacy, safety and single-cell analysis of neoadjuvant immunochemotherapy in locally advanced oral squamous cell carcinoma: A phase II trial[J]. *Nat Commun.* 2025, 16(1):3968.
- [3] ZHOU Y, WANG L, LIU M, et al. Oral squamous cell carcinoma: Insights into cellular heterogeneity, drug resistance, and evolutionary trajectories[J]. *Cell Biol Toxicol.* 2025, 41(1):101.
- [4] 张铃枝,王楠,杨丽芳,等. 穿心莲内酯对胰腺癌细胞顺铂敏感性的作用机制研究[J]. 世界中医药, 2022, 17(2):187-191.
- [5] 陶冶,肖锋,杨文字,等. 沉默*circ-NDRG1*对口腔鳞状细胞癌细胞恶性生物学行为的作用机制研究[J]. 皖南医学院学报, 2024, 43(3):210-215.
- [6] 孙琪瑄,孙森,张运平,等. 竹节香附素A通过调节凋亡和上皮细胞间充质转化抑制口腔癌CAL27细胞生长和迁移[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(8):1304-1310.

- [7] 牛海英,赵刚,苏姗娜,等. *miR-218-5p* 靶向 *PDE7A* 调节人非小细胞肺癌 A549 细胞的糖酵解[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2024,31(6):592—597.
- [8] KHALIFA A, IBRAHIM H I M, SHEIKH A, *et al.* Probiotic-fermented camel milk attenuates neurodegenerative symptoms *via* *SOX5/miR-218* axis orchestration in mouse models[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(3):357.
- [9] MCGEARY S E, LIN K S, SHI C Y, *et al.* The biochemical basis of microRNA targeting efficacy[J]. *Science*. 2019, 366(6472):eaav1741.
- [10] 王小叶,程明涵,盛光丽,等. 虫草素靶向 *HDAC7* 介导上皮细胞-间充质转化改善肺纤维化[J]. 药学报,2024,59(6):1627—1638.
- [11] 彭亚楠,单丽芳,姜俊玲,等. 白花蛇舌草提取物调控微小 RNA-340 对肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 河北中医,2024,46(12):2035—2042.
- [12] 安艳晓,焦晗亮,祁艳卫,等. *LncRNA PSMA3-AS1* 调节 *miR-186-5p/SOX4* 轴对神经母细胞瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国癌症防治杂志,2024,16(6):715—721.
- [13] ZHANG Y, WANG A, ZHANG X, *et al.* *lncRNA LINC01296* promotes oral squamous cell carcinoma development by binding with *SRSF1* [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6661520. 2021-06-11 [2025-05-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34195277/>.
- [14] 王先薇,林浩,陈宗军,等. 穿心莲内酯抗肿瘤作用机制研究[J]. 陕西中医,2024,45(11):1570—1575.
- [15] SHI L, ZHANG G, ZHENG Z, *et al.* Andrographolide reduced VEGFA expression in hepatoma cancer cells by inactivating *HIF-1 α* : The involvement of *JNK* and *MTA1/HDCA* [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273(1):228—236.
- [16] ZHAO Y, YAO R. Long non-coding RNA *HOXA-AS3* promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma through sponging microRNA *miR-218-5p* [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):8724—8737.
- [17] 王可楹,郑军,刘佳瑞,等. *SOX5* 和 *PrPc* 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 实用口腔医学杂志,2020,36(4):601—604.
- [18] 程学云,胡光耀,刘红丽,等. 巴马汀抑制人口腔癌 KB 细胞迁移、侵袭及上皮间充质转化的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(12):1749—1753.
- [19] 刘光涛,张玉琳,赵海娇. 缬草酸对口腔癌 KB 细胞恶性生物学行为的影响及其机制研究[J]. 解剖科学进展,2023,29(6):647—650.
- [20] 吕艳利,巴凯,方政,等. 穿心莲内酯对口腔鳞状细胞癌体内外抑制作用的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2022,38(20):2479—2484.
- [21] 谢耕耘,安晓燕,王佳. *CircBICD2* 调节 *miR-218-5p/RhoA* 轴对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡和上皮间质转化的影响[J]. 实用口腔医学杂志,2024,40(1):97—103.
- [22] LI X, HE J, Shao M, *et al.* Downregulation of *miR-218-5p* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of *CD44-ROCK* signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(1):646—654.
- [23] MONTI N, ANTINORI D, PROIETTI S, *et al.* miRNAs from zebrafish embryo extracts inhibit breast cancer invasiveness and migration by modulating *miR-218-5p/PI3K* pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(8):3812.
- [24] 韩成美,柳梅,任维鑫,等. *miR-485-5p* 介导 *SOX5* 基因表达对肝细胞肝癌细胞活力及迁移侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(5):710—715. (收稿日期 2025-05-06)

· 科学文摘 ·

铜中毒的纳米医学策略:代谢重编程与肿瘤免疫治疗

引自:ZHOU M, *et al.* Poly(2-Oxazoline)-Based Functional Peptide Mimics: Eradicating MRSA Infections and Persists while Alleviating Antimicrobial Resistance [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(16):6412—6419.

天津中医药大学李英鹏团队结合铜死亡(cuproptosis)对肿瘤细胞代谢重编程的调控,总结了铜死亡与肿瘤代谢及免疫调控之间的联系,结合铜死亡对于代谢重编程和免疫激活的影响,讨论了纳米制剂在铜死亡靶向治疗中的应用。此外,研究者讨论了铜纳米制剂如何与免疫检查点抑制、光热治疗及化学动力学治疗等多种治疗方式协同,优化临床个体化治疗策略并进一步增强抗肿瘤效果,为铜死亡作为肿瘤代谢和免疫治疗之间的调控工具提供指导,最终推动肿瘤免疫治疗的发展。