

本文引用: 左巧娟, 彭珂平, 肖艳波, 谭劲, 刘寻. 汉防己甲素对 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 通路的调控及其抑制口腔鳞癌 Warburg 效应、侵袭和迁移的作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(7): 1379-1386.

汉防己甲素对 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 通路的调控及其抑制口腔鳞癌 Warburg 效应、侵袭和迁移的作用研究

左巧娟, 彭珂平, 肖艳波, 谭劲*, 刘寻

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨汉防己甲素(TET)对组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)/希佩尔-林道蛋白(pVHL)/缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)通路的调控作用,并观察其对口腔鳞癌细胞(OSCC)侵袭、迁移及 Warburg 效应的影响。**方法** 选取 OSCC 细胞系的 CAL-27,首先采用 CCK-8 法检测不同浓度 TET 处理后细胞的增殖情况和细胞活力。随后将细胞分为对照组、TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组。对照组为正常培养的细胞,不进行任何处理;TET 组加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 TET 进行处理;抑制剂组加入 HDAC1 抑制剂 SAHA 进行处理;抑制剂+TET 组再加入 SAHA 预处理后加入 TET 进行处理。分别观察各组细胞的增殖情况;检测各组细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成量;采用 Transwell 侵袭实验和划痕试验检测各组细胞侵袭和迁移能力;采用 Western blot 和 qRT-PCR 方法检测 4 组细胞内糖酵解关键酶:己糖激酶 2(HK2)、乳酸脱氢酶 A(LDHA)、HDAC1、pVHL、HIF-1 α 的蛋白及 mRNA 表达水平。**结果** CCK-8 结果显示,5 $\mu\text{mol/L}$ 的 TET 处理效果较好,浓度升高细胞活力下降($P<0.05$);5 $\mu\text{mol/L}$ 的 TET 处理 CAL-27 细胞 24、48、72 h 后,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组细胞增殖抑制率随处理时间延长逐步升高;48、72 h 时间点,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组增殖抑制率显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组比较,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组葡萄糖消耗量和乳酸生产量,以及细胞侵袭和迁移能力均降低($P<0.05$);TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL 的 mRNA 表达量显著降低($P<0.05$),HK2、LDHA、HDAC1、pVHL、HIF-1 α 的蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。**结论** TET 能有效抑制口腔鳞癌 CAL-27 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,且能够下调 Warburg 效应关键指标及 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 通路相关蛋白的表达,提示 TET 的抗肿瘤作用可能与该通路的调控密切相关。

[关键词] 口腔鳞癌;汉防己甲素;细胞侵袭;去乙酰化酶 1;抗肿瘤

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.07.008

Regulation of tetrandrine on HDAC1/pVHL/HIF-1 α pathway and its effects on inhibiting Warburg effect, invasion, and migration in oral squamous cell carcinoma

ZUO Qiaojuan, PENG Keping, XIAO Yanbo, TAN Jin*, LIU Xun

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effects of tetrandrine (TET) on the histone deacetylase 1 (HDAC1)/von

[收稿日期]2026-01-08

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(82374530);湖南中医药大学校院联合基金项目(2024XYLH008);2025 年湖南省医学学科 B 类建设项目(中医五官科)(湘卫医发[2025]7 号)。

[通信作者]* 谭劲,男,博士,主任医师,E-mail:tanjinhu@aliyun.com。

Hippel-Lindau protein (pVHL)/hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) pathway, and to observe its effects on the invasion, migration, and Warburg effect of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. **Methods** CAL-27 cells from an OSCC cell line were selected. First, the CCK-8 assay was used to determine cell proliferation and viability after treatment with different concentrations of TET. Subsequently, the cells were divided into control group, TET group, vorinostat (SAHA) inhibitor group, and inhibitor+TET group. The control group consisted of normally cultured cells without any treatment. The TET group was treated with 5 μ mol/L TET. The inhibitor group was treated with the HDAC1 inhibitor SAHA. The inhibitor+TET group was pretreated with SAHA followed by TET treatment. Cell proliferation was observed in each group. Glucose consumption and lactate production were measured. Cell invasion and migration were assessed by Transwell invasion assay and wound healing assay. The protein and mRNA expression levels of key glycolytic enzymes, including hexokinase 2 (HK2), lactate dehydrogenase A (LDHA), HDAC1, pVHL, and HIF-1 α , were measured by Western blot and qRT-PCR in the four groups. **Results** The CCK-8 results showed that treatment with 5 μ mol/L TET exerted favorable effects, while cell viability decreased with increasing concentrations ($P<0.05$). After CAL-27 cells were treated with 5 μ mol/L TET for 24, 48, and 72 h, the cell proliferation inhibition rate gradually increased with prolonged treatment time. At 48 and 72 h, the proliferation inhibition rates in the TET group, SAHA group, and SAHA+TET group were significantly higher than that in the solvent control group ($P<0.05$). Compared with the control group, glucose consumption, lactate production, and cell invasion and migration abilities were all decreased in the TET group, inhibitor group, and inhibitor+TET group ($P<0.05$). Compared with the control group, the mRNA expression levels of HK2, LDHA, HDAC1, and pVHL were significantly decreased in the TET group, inhibitor group, and inhibitor+TET group ($P<0.05$), and the protein expression levels of HK2, LDHA, HDAC1, pVHL, and HIF-1 α were also significantly decreased in these groups ($P<0.05$). **Conclusion** TET can effectively inhibit the proliferation, invasion, and migration of CAL-27 OSCC cells, and downregulate key indicators of the Warburg effect and the expression of proteins related to the HDAC1/pVHL/HIF-1 α pathway, suggesting that the antitumor effects of TET may be closely associated with the regulation of this pathway.

[**Keywords**] oral squamous cell carcinoma; tetrandrine; cell invasion; deacetylase 1; anti-tumor

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)简称口腔鳞癌,是常见的头颈部恶性肿瘤,侵袭性强、预后差^[1]。其恶性进展与异常增殖、侵袭迁移等行为密切相关^[2]。在这些过程中,肿瘤细胞的代谢重编程“Warburg效应”扮演了关键角色。Warburg效应通过上调己糖激酶2、乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)等关键酶,不仅为OSCC快速增殖供能,其副产物乳酸所营造的酸性微环境,更有助于侵袭、迁移和免疫逃逸^[3]。因此,靶向该代谢途径成为潜在治疗策略。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α , HIF-1 α)是驱动Warburg效应的核心转录因子,在常氧环境下,HIF-1 α 经希佩尔-林道蛋白(von Hippel-Lindau protein, pVHL)复合体介导泛素化降解;而在肿瘤缺氧微环境中,HIF-1 α 稳定并激活糖酵解基因。组蛋白去乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)作为表观

遗传调控因子,可通过去乙酰化作用稳定HIF-1 α ,并可能抑制pVHL,从而强化这一通路^[4]。研究表明,HDAC1与HIF-1 α 在OSCC中均高表达且与不良预后相关,但HDAC1/pVHL/HIF-1 α 这一特定轴在OSCC中如何调控Warburg效应及恶性表型,尚不清楚^[4]。汉防己甲素(tetrandrine, TET)是一种具有广谱抗肿瘤活性的天然生物碱。在OSCC中,研究已证实TET可抑制细胞增殖^[5]。然而,TET是否通过调控上游的HDAC1/pVHL/HIF-1 α 通路来抑制OSCC的Warburg效应和侵袭迁移,仍属未知。基于此,本研究提出假设:TET可能通过抑制HDAC1,干扰pVHL对HIF-1 α 的降解平衡,进而下调HIF-1 α 及其下游糖酵解程序,最终抑制OSCC细胞的Warburg效应和恶性行为。本研究旨在利用CAL-27细胞模型初步探讨TET对该通路的影响及其与恶性表型的关联,为OSCC的代谢靶向治疗提供新思路。

1 材料

1.1 细胞系

人 OSCC 细胞系 CAL-27(货号:CL-0265,武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基(货号:11965092)、PBS 缓冲液(货号:10010023)、胰蛋白酶(货号:25200072)、胎牛血清(货号:A5670501)均购自美国 Gibco 公司;TET(货号:HY-13764)、伏立诺他(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)(货号:HY-10221)均购自美国 Med-ChemExpress LLC 公司;CCK-8 试剂盒(货号:C0037)、蛋白 Marker(货号:P0068)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012S)、乳酸检测试剂盒(货号:S0208S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;葡萄糖摄取荧光法测试盒(货号:E-BC-F041,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);Transwell 小室(货号:CLS3420,美国 Corning Incorporated 公司);兔抗人 HDAC1 多克隆抗体(货号:5356T)、兔抗人 pVHL 多克隆抗体(货号:68547S)、兔抗人 HIF-1 α 多克隆抗体(货号:3716S)、兔抗人 HK2 多克隆抗体(货号:2867T)、兔抗人 LDHA 多克隆抗体(货号:31202)、兔抗人 β -actin 多克隆抗体(货号:4967S)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;TRIzol RNA 提取试剂盒(货号:AG11701)、qRT-PCR 试剂盒(货号:AG11702)均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

1.3 主要仪器

全自动生化分析仪(型号:Cobas C701,瑞士 Roche Diagnostics 公司);蛋白质印迹电泳仪(型号:PowerPac HC,美国 Bio-Rad Laboratories 公司);实时荧光定量 PCR 仪(型号:LightCycler 96,瑞士 Roche Diagnostics 公司);倒置显微镜(型号:IX73,日本 Olympus Corporation 公司);多功能酶标仪(型号:Synergy LX,美国 BioTek Instruments 公司);组织包埋机(型号:EG1150H,德国 Leica Biosystems 公司);石蜡切片机(型号:RM2235,德国 Leica Biosystems 公司);超微量紫外分光光度计(型号:Nanodrop 2000,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 CAL-27 细胞培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞生长至对数期进行后续实验。每 2~3 d 传代 1 次。

2.2 实验分组及处理方法

(1)对照组:予以与药物组等体积溶剂处理的正常培养的 CAL-27 细胞,不含待测药物。(2)TET 组:CAL-27 细胞予以 5 μ mol/L TET 处理。(3)抑制剂(SAHA)组:CAL-27 细胞予以 1 μ mol/L HDAC1 抑制剂 SAHA 处理 1 h^[6]。(4)抑制剂+TET 组:CAL-27 细胞先以 1 μ mol/L SAHA 预处理 1 h,再加入 5 μ mol/L TET 共同处理。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活力

将 CAL-27 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,分别加入不同浓度(5、10、15、20 μ mol/L)的 TET 处理 24 h。根据 CCK-8 结果显示,5 μ mol/L TET 处理 24 h 对 CAL-27 细胞活力的抑制率低于 10%,在保证细胞活性的前提下,显示出该处理方式对增殖的显著抑制,符合后续机制研究的要求。确定浓度为 5 μ mol/L 后,向 CAL-27 细胞中加入 5 μ mol/L 的 TET 处理 24、48、72 h。在相应时间点,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值(OD 值),计算细胞活力和增殖抑制率。细胞活力(%)=(实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%;增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times$ 100%。

2.4 葡萄糖消耗和乳酸生成量检测

按照葡萄糖消耗检测试剂盒和乳酸检测试剂盒的说明书,分别检测 4 组细胞的葡萄糖消耗量和乳酸生成量。将细胞接种于 6 孔板中,培养至对数生长期后,按照分组进行处理,葡萄糖消耗量为培养 4~6 d 的培养基中葡萄糖含量的差值。收集培养 4 d 和 6 d 的细胞培养液,按照试剂盒步骤操作,用酶标仪测定吸光度,根据标准曲线计算葡萄糖消耗量和乳酸生成量。乳酸生成量计算公式:乳酸生成量(mmol/L)= $3 \times (D_{\text{样本}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{标准}} - D_{\text{空白}})$ 。

2.5 Transwell 侵袭实验

将 Transwell 小室的上室预先铺好 Matrigel 基质胶,将 4 组细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于上室,下室加入含 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基作为趋化剂。培养 24 h 后,取出小室,用棉签轻轻擦去上室未侵袭的细胞,用甲醇固定下室侵袭的细胞,结晶紫染色,在显微镜下随机选取 5 个视野,计数侵袭细胞数。

2.6 划痕试验

将细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 80%以上时,用 10 μ L 移液器枪头在细胞单层上划一条直线,用 PBS 冲洗 3 次,去除划下的细胞。按照分组加入相应的处理因素,分别在 0、24 h 拍照,用 ImageJ 软件测量划痕宽度,计算细胞迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times$ 100%。

2.7 qRT-PCR 检测 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 通路及糖酵解关键酶 mRNA 表达水平

用 TRIzol 试剂提取 4 组细胞的总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA,使用反转录试剂盒按照说明书进行操作。将 100 μ L 的 RNA 样品反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,25 μ L qRT-PCR 反应体系:DNA 模板 3 μ L、上游引物(20 μ mol/L)1 μ L、下游引物(20 μ mol/L)1 μ L、2 $\times$ TaqPCR Master Mix (0.1 U/ μ L)12.5 μ L,加双蒸水补足至 25 μ L。PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C/4 min,35 个循环的 94 $^{\circ}$ C/20 s,63 $^{\circ}$ C/20 s,72 $^{\circ}$ C/2 min,72 $^{\circ}$ C/5 min。以 GAPDH 为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量,所有引物均采用 PrimerBank 数据库设计,经 NCBI Primer-BLAST 验证特异性,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

2.8 Western blot 检测通路及糖酵解蛋白表达水平

收集 4 组细胞,用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取适量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(HK2、LDHA、HDAC1、pVHL、HIF-1 α ,1:1000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,用化学发光

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列	长度/bp
HK2	正向:5'-CCGAGATGGTGAAGATGCTG-3'	186
	反向:5'-GCTCTTGCTGTTCATGCTGT-3'	
LDHA	正向:5'-GACGACATCAAGGAGAAGGC-3'	142
	反向:5'-GGTGATGGTGATGGTGATGG-3'	
HDAC1	正向:5'-GAGCTGAGCTGAGCTGAGCT-3'	128
	反向:5'-GCTGAGCTGAGCTGAGCTGA-3'	
pVHL	正向:5'-CCGAGATGGTGAAGATGCTG-3'	154
	反向:5'-GCTGATGGTGATGGTGATGG-3'	
HIF-1 α	正向:5'-AGTGGACGACATCGACTTC-3'	173
	反向:5'-CCCGTAGATCTGCTCCTTGA-3'	
β -actin	正向:5'-CGTGAAAAGATGACCCAGAT-3'	210
	反向:5'-GAGGCATACAGGGACAGCAC-3'	

成像系统检测蛋白条带,以 β -actin 作为内参,用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值,计算目的蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件统计分析数据,KS 检验符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,事后组间两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TET 对 CAL-27 细胞增殖和活力的影响

不同浓度的 TET 处理 CAL-27 细胞 24 h 后,随着 TET 浓度的升高,细胞活力逐渐下降。当 TET 浓度为 5 μ mol/L 时,TET 组、抑制剂组细胞活力与对照组相比无显著差异($P>0.05$),而当 TET 浓度达到 10 μ mol/L 和 20 μ mol/L 时,各组细胞活力显著降低($P<0.05$),抑制剂+TET 组下降程度显著高于 TET 组、抑制剂组($P<0.05$)。5 μ mol/L 的 TET 处理 CAL-27 细胞 24、48、72 h 后,细胞增殖抑制率随处理时间延长逐步升高($P<0.05$);48、72 h 时间点,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组增殖抑制率显著高于对照组($P<0.05$)。详见图 1。

3.2 TET 对 CAL-27 细胞葡萄糖消耗和乳酸生成量的影响

与对照组相比,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组的葡萄糖消耗量和乳酸生成量均下降($P<0.05$);抑

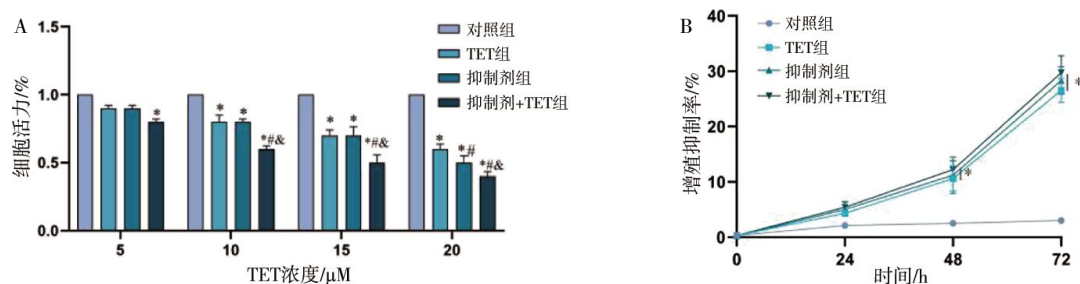


图1 不同浓度TET处理后细胞活力及细胞增殖检测($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.1 Measurement of cell viability and proliferation after treatment with different concentrations of TET ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.不同浓度TET处理下细胞活力;B.5 μmol/L TET处理后细胞增殖情况;与对照组比,* $P<0.05$;与TET组相比,# $P<0.05$;与抑制剂组相比,& $P<0.05$ 。

制剂+TET组的葡萄糖消耗量低于TET组、抑制剂组($P<0.05$),且乳酸生成量低于TET组、抑制剂组($P<0.05$);抑制剂组乳酸生成量低于TET组($P<0.05$)。详见图2。

3.3 TET对CAL-27细胞侵袭能力的影响

与对照组相比,TET组、抑制剂组、抑制剂+TET组的侵袭细胞数均减少($P<0.05$);抑制剂+TET组的侵袭细胞数低于TET组、抑制剂组($P<0.05$);抑制剂组的细胞侵袭数低于TET组($P<0.05$)。详见图3。

3.4 TET对CAL-27细胞迁移能力的影响

与对照组相比,TET组、抑制剂组、抑制剂+TET组的细胞迁移率均降低($P<0.05$);抑制剂+TET组的细胞迁移率低于TET组、抑制剂组($P<0.05$);抑

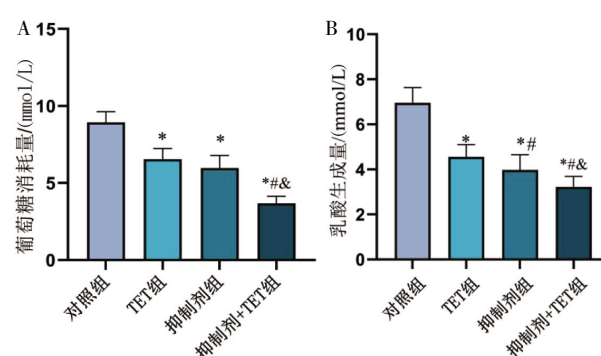


图2 各组CAL-27细胞葡萄糖消耗和乳酸生成量情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 Glucose consumption and lactate production in CAL-27 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A.细胞葡萄糖消耗量;B.细胞乳酸生成量;与对照组相比,* $P<0.05$;与TET组相比,# $P<0.05$;与抑制剂组相比,& $P<0.05$ 。

制剂组的细胞迁移率低于TET组($P<0.05$)。详见图4。

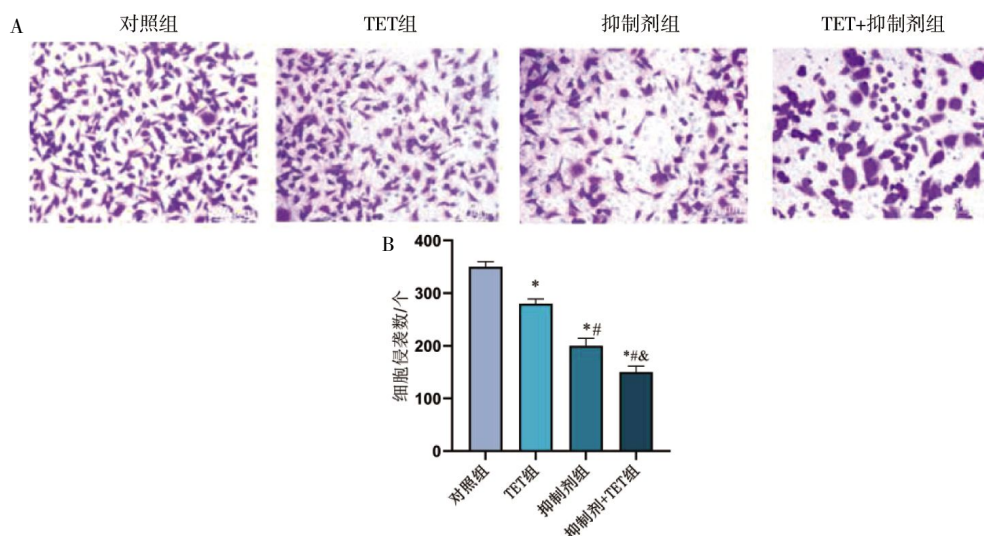


图3 各组Transwell侵袭实验细胞侵袭情况

Fig.3 Transwell invasion assay showing invasive capacity of CAL-27 cells in each group

注:A.细胞侵袭情况($\times 100$);B.细胞侵袭数量比较($\bar{x} \pm s, n=3$);与对照组相比,* $P<0.05$;与TET组相比,# $P<0.05$;与抑制剂组相比,& $P<0.05$ 。

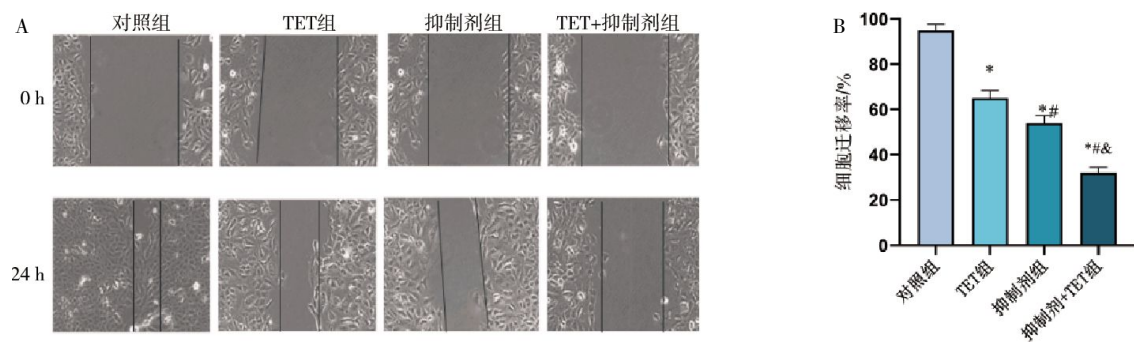


图 4 各组细胞划痕实验检测细胞迁移情况

Fig.4 Scratch wound healing assay showing cell migration in each group

注:A.细胞 0 h 和 24 h 细胞迁移情况($\times 100$);B.细胞迁移率比较($\bar{x} \pm s, n=3$);与对照组相比,* $P<0.05$;与 TET 组比,* $P<0.05$;与抑制剂组相比,* $P<0.05$ 。

3.5 CAL-27 细胞内糖酵解关键酶及 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 途径相关 mRNA 表达水平

qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组的 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);而 HIF-1 α mRNA 仅在抑制剂组、抑制剂+TET 组中下调($P<0.05$);TET 单独处理对其 mRNA 表达水平无显著影响($P>0.05$)。组间两两比较显示:抑制剂组 HK2、HIF-1 α mRNA 表达水平低于 TET 组($P<0.05$);抑制剂+TET 组 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL mRNA 表达水平均低于 TET 组与抑制剂组($P<0.05$),其 HIF-1 α mRNA 表达水平与抑制剂组差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 2。

3.6 CAL-27 细胞内糖酵解关键酶及 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 途径相关蛋白表达水平

与对照组相比,TET 组、抑制剂组、抑制剂+TET 组的 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL、HIF-1 α 蛋白表达量均显著降低($P<0.05$);抑制剂组的 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL、HIF-1 α 蛋白表达量低于 TET 组($P<0.05$);抑制剂+TET 组的 HK2、LDHA、HDAC1、pVHL、HIF-1 α 蛋白表达水平低于 TET 组与抑制剂组($P<0.05$)。详见图 5 及表 3。

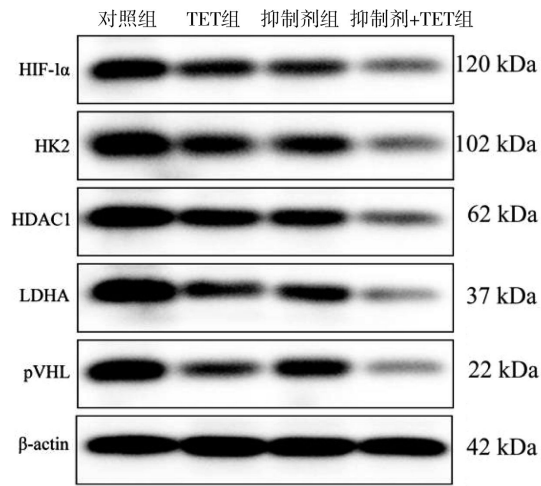


图 5 各组 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 途径相关蛋白电泳图

Fig.5 Western blot analysis of HDAC1/pVHL/HIF-1 α pathway-related proteins in each group

注:A.对照组;B. TET 组;C.抑制剂组;D.抑制剂+TET 组。

4 讨论

OSCC 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,Warburg 效应作为肿瘤细胞独特的代谢特征,肿瘤细胞主要依赖糖酵解而非有氧化来获取能量,这一过程中葡萄糖摄取和乳酸生成显著增加^[7]。TET 是从防己科植物粉防己的块根中提取的一种双苄基异

表 2 各组 CAL-27 细胞内糖酵解关键酶及 HDAC1/pVHL/HIF-1 α 途径相关 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 mRNA expression levels of key glycolytic enzymes and HDAC1/pVHL/HIF-1 α pathway-related genes in CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HK2	LDHA	HDAC1	pVHL	HIF-1 α
对照组	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.01
TET 组	0.84 $\pm$ 0.12*	0.82 $\pm$ 0.04*	0.78 $\pm$ 0.04*	0.87 $\pm$ 0.03*	0.98 $\pm$ 0.03
抑制剂组	0.68 $\pm$ 0.15*#	0.78 $\pm$ 0.05*	0.81 $\pm$ 0.06*	0.85 $\pm$ 0.06*	0.68 $\pm$ 0.05*#
抑制剂+TET 组	0.44 $\pm$ 0.14*##	0.36 $\pm$ 0.03*##	0.67 $\pm$ 0.05*##	0.66 $\pm$ 0.06*##	0.65 $\pm$ 0.04*

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与 TET 组相比,* $P<0.05$;与抑制剂组相比,* $P<0.05$ 。

表 3 各组 CAL-27 细胞内糖酵解关键酶及 HDAC1/pVHL/HIF-1α 通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of protein levels of glycolytic key enzymes and HDAC1/pVHL/HIF-1α pathway-related proteins in CAL-27 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	HK2	LDHA	HDAC1	pVHL	HIF-1α
对照组	1.22±0.03	0.68±0.05	0.98±0.06	1.10±0.04	0.96±0.04
TET 组	0.90±0.03*	0.58±0.04*	0.88±0.06*	0.98±0.01*	0.88±0.02*
抑制剂组	0.78±0.06*#	0.44±0.05*#	0.50±0.05*#	0.62±0.02*#	0.79±0.02*#
抑制剂+TET 组	0.47±0.02*##	0.32±0.04*##	0.42±0.03*##	0.28±0.01*##	0.55±0.02*##

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与 TET 组相比,# $P<0.05$;与抑制剂组相比,## $P<0.05$ 。

喹啉类生物碱,具有多种药理活性^[8]。

有研究表明,TET 在多种肿瘤细胞系中能够抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡以及抑制侵袭转移^[9]。本研究结果表明,TET 能够显著抑制 OSCC 细胞 CAL-27 的增殖,且抑制作用呈浓度和时间依赖性。选择对细胞活力无影响的 5 μmol/L TET,进一步研究发现,TET 能够抑制 CAL-27 细胞的侵袭和迁移能力。TET 具有广谱抗肿瘤效应,在乳腺癌、口腔鳞癌等多种肿瘤中均可通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制肿瘤侵袭、转移发挥抑癌作用^[5,10]。在本实验中,Transwell 侵袭实验和划痕试验结果显示,TET 对 OSCC 细胞侵袭和迁移能力的抑制作用,为 TET 在 OSCC 治疗中的应用提供了实验依据。

Warburg 效应是肿瘤细胞的一种代谢特征,表现为即使在有氧条件下,肿瘤细胞也主要依赖糖酵解获取能量,导致葡萄糖摄取增加和乳酸生成增多^[11]。Warburg 效应中,肿瘤细胞将摄取的葡萄糖大量转化为乳酸,Warburg 效应降低,糖酵解过程受到抑制,葡萄糖向乳酸的转化减少,乳酸生成量也会随之降低^[12]。本研究发现,TET 处理后,OSCC 细胞的葡萄糖摄取量和乳酸生成量均显著下降,表明 TET 能够调节 OSCC 细胞的 Warburg 效应,这是因为糖酵解途径中的关键酶,如己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶等的活性可能受到抑制,使得丙酮酸生成乳酸这一过程减弱,从而降低乳酸生成量^[13]。HDAC1/pVHL/HIF-1α 途径在肿瘤发生发展中发挥了重要作用,TET 对该途径的调控是本研究的核心发现。实验结果表明,TET 能够显著降低 HDAC1、pVHL 和 HIF-1α 的蛋白表达水平。HIF-1α 作为该途径的关键转录因子,是联系肿瘤代谢与侵袭转移的重要纽带^[14]。然而 TET 不会影响 HIF-1α mRNA 的表达,但

降低 HIF-1α 蛋白的表达水平,提示 TET 在蛋白水平上调节 HIF-1α 的表达。TET 通过抑制 HDAC1/pVHL/HIF-1α 途径,降低 HIF-1α 来减少对糖酵解关键酶基因的激活,抑制 Warburg 效应,最终削弱了 OSCC 细胞的侵袭转移能力^[15]。糖酵解关键酶 HK2 和 LDHA 在 Warburg 效应中起重要作用,它们的表达水平直接影响糖酵解的速率^[16]。TET 能够显著降低 HK2 和 LDHA 的蛋白和 mRNA 表达水平,进一步证实了 TET 对 OSCC 细胞糖酵解途径的抑制作用。HDAC1 通过去乙酰化作用调节基因的表达,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移^[17]。pVHL 作为一种肿瘤抑制蛋白,能够与 HIF-1α 结合,促进其降解,从而抑制肿瘤细胞的缺氧适应和侵袭转移能力^[18]。在正常氧环境下,pVHL 可与 HIF-1α 结合,促使其泛素化降解,维持 HIF-1α 低水平^[19];而在 TET 作用下,pVHL 和 HIF-1α 表达均下降,可能打破了这一调控平衡,使 HIF-1α 不能正常发挥对下游基因的转录激活作用,从而抑制了肿瘤细胞的侵袭转移^[20]。

综上所述,TET 可抑制 HDAC1/pVHL/HIF-1α 通路,进而阻断 OSCC 细胞的 Warburg 效应及侵袭转移。鉴于其与 HDAC1 抑制剂 SAHA 药效相似,推测 TET 可能通过该通路发挥抗肿瘤作用。本研究尚存局限:仅采用单浓度 TET 且缺乏遗传学回复实验。未来需补充剂量梯度考察、HDAC1 过表达/敲低模型及代谢流分析,并结合体内实验进一步验证该通路的因果机制。

参考文献

[1] González-Guevara M B, Linares-Vieyra C, Castro-García M E, et al. Carcinoma escamocelular bucal. Caso clínico y revisión de la literatura[J]. Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social, 2022, 60(1): 85-90.

- [2] Feller G, Khammissa R A G, Ballyram R, et al. Tumour genetic heterogeneity in relation to oral squamous cell carcinoma and anti-cancer treatment[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, 20(3): 2392.
- [3] Bose S, Zhang C, Le A. Glucose metabolism in cancer: The Warburg effect and beyond[M]//*The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. Cham: Springer International Publishing, 2021: 3–15.
- [4] Basheeruddin M, Qausain S. Hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α): An essential regulator in cellular metabolic control[J]. *Cureus*, 2024, 16(7): e63852.
- [5] 彭珂平, 田桂湘, 彭书旺, 等. 汉防己甲素干预 HIF-1 α /PD-1/PD-L1 轴抑制口腔鳞癌侵袭潜能的机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(11): 1971–1977.
- [6] Bolden J E, Peart M J, Johnstone R W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(9): 769–784.
- [7] 蔡钰峰, 刘婷, 李峰, 等. 人参皂苷 20 (S)-Rg3 通过调节 DN-MT3A/miR-603/HK2 信号通路抑制卵巢癌细胞 Warburg 效应[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(16): 3949–3955.
- [8] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 20–28.
- [9] Luan F, He X R, Zeng N. Tetrandrine: A review of its anti-cancer potentials, clinical settings, pharmacokinetics and drug delivery systems[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 72(11): 1491–1512.
- [10] 黄晏军, 刘莉, 肖东琴. 汉防己甲素对三阴性乳腺癌细胞体外生物学活性的影响及机制[J]. *山东医药*, 2022, 62(10): 10–14.
- [11] Johar D, Elmeharth A O, Khalil R M, et al. Protein networks linking Warburg and reverse Warburg effects to cancer cell metabolism[J]. *BioFactors*, 2021, 47(5): 713–728.
- [12] Pereira-Nunes A, Afonso J, Granja S, et al. Lactate and lactate transporters as key players in the maintenance of the Warburg effect[M]//*Tumor Microenvironment: The Main Driver of Metabolic Adaptation*. Cham: Springer International Publishing, 2020: 51–74.
- [13] Jiang J X, Roman J, Xu H, et al. An observation on enhanced extracellular acidification and lactate production induced by inhibition of lactate dehydrogenase A[M]//*Oxygen Transport to Tissue XLII*. Cham: Springer International Publishing, 2021: 163–167.
- [14] 易燕, 陈斐斐, 谭赞, 等. HIF-1 α /BNIP3 通路介导的糖酵解与氧诱导新生小鼠视网膜血管生成的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(2): 226–233.
- [15] Yang L D, Zeng L J, Wang Z J, et al. Differentiated embryo chondrocyte 1, induced by hypoxia-inducible factor 1 α , promotes cell migration in oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2022, 133(2): 199–206.
- [16] Mukhopadhyay D, Chakraborty B, Sarkar S, et al. Clinical implications of activation of the LIMD1-VHL-HIF1 α pathway during head-&-neck squamous cell carcinoma development[J]. *The Indian Journal of Medical Research*, 2024, 159(5): 479–493.
- [17] Jiang E H, Xu Z, Wang M, et al. Tumoral microvesicle-activated glycometabolic reprogramming in fibroblasts promotes the progression of oral squamous cell carcinoma[J]. *FASEB Journal*, 2019, 33(4): 5690–5703.
- [18] Zhu X M, Leboeuf M, Liu F, et al. HDAC1/2 Control Proliferation and Survival in Adult Epidermis and Pre-Basal Cell Carcinoma through p16 and p53[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2022, 142(1): 77–87, e10.
- [19] Schwalm M P, Menge A, Elson L, et al. Functional characterization of pathway inhibitors for the ubiquitin-proteasome system (UPS) as tool compounds for CRBN and VHL-mediated targeted protein degradation[J]. *ACS Chemical Biology*, 2025, 20(1): 94–104.
- [20] Hasegawa H, Kusumi Y, Asakawa T, et al. Expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (pVHL) characteristic of tongue cancer and proliferative lesions in tongue epithelium[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 381.

(本文编辑 苏 维)