

本文引用: 彭珂平, 田桂湘, 彭书旺, 宾东华, 左巧娟, 谭焱, 谢海清. 汉防己甲素干预 HIF-1 $\alpha$ /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.

## 汉防己甲素干预 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴抑制口腔鳞癌侵袭潜能的机制研究

彭珂平<sup>1</sup>, 田桂湘<sup>2\*</sup>, 彭书旺<sup>1</sup>, 宾东华<sup>1</sup>, 左巧娟<sup>1</sup>, 谭焱<sup>2</sup>, 谢海清<sup>2</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011

**[摘要]** **目的** 探讨汉防己甲素(tetrandrine, TET)对口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)细胞侵袭潜能的影响及其相关机制。**方法** 将 OSCC 细胞随机分为 4 组: 对照组(不加药物处理)、低剂量组(10  $\mu\text{mol/L}$  TET)、中剂量组(20  $\mu\text{mol/L}$  TET)、高剂量组(30  $\mu\text{mol/L}$  TET)。采用 MTT 法、划痕实验和 Transwell 实验分别测定各组细胞的活力、迁移及侵袭能力。对 OSCC 细胞分别转染缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1, PD-1)及程序性细胞死亡蛋白 1 配体(programmed cell death ligand 1, PD-L1)模拟物及抑制剂, 均连续转染 24 h。采用 RT-qPCR 检测正常口腔上皮细胞、OSCC 细胞以及转染 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 模拟物及抑制剂 OSCC 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 mRNA 表达水平。通过 Western blot 检测各组细胞中纤维连接蛋白(Fibronectin)、波形蛋白(Vimentin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 以及 PD-L1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, 低、中、高剂量组细胞活力、迁移及侵袭能力均被显著抑制( $P<0.05$ ), HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 mRNA 显著上调( $P<0.05$ ), Fibronectin、Vimentin、HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 蛋白水平随剂量增加逐渐下降( $P<0.05$ ), E-cadherin 蛋白水平随剂量增加逐渐上升( $P<0.05$ )。转染 HIF-1 $\alpha$  模拟物细胞的 HIF-1 $\alpha$  相对表达量及穿膜细胞数高于转染 HIF-1 $\alpha$  抑制剂细胞( $P<0.05$ ), 转染 PD-1 模拟物细胞的 PD-1 相对表达量及穿膜细胞数高于转染 PD-1 抑制剂细胞( $P<0.05$ ), 转染 PD-L1 模拟物细胞的 PD-L1 相对表达量及穿膜细胞数高于转染 PD-L1 抑制剂细胞( $P<0.05$ )。**结论** TET 可能通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴, 从而抑制 OSCC 细胞活力、迁移及侵袭能力, 有望作为辅助治疗 OSCC 的新药。

**[关键词]** 汉防己甲素; 口腔鳞癌; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 程序性细胞死亡蛋白 1; 程序性细胞死亡蛋白 1 配体; 侵袭

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.006

## Mechanism of tetrandrine intervention on HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 axis in inhibiting the invasion potential of oral squamous cell carcinoma

PENG Keping<sup>1</sup>, TIAN Guixiang<sup>2\*</sup>, PENG Shuwang<sup>1</sup>, BIN Donghua<sup>1</sup>, ZUO Qiaojuan<sup>1</sup>, TAN Yan<sup>2</sup>, XIE Haiqing<sup>2</sup>

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

2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of tetrandrine (TET) on the invasion potential of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and its related mechanism. **Methods** OSCC cells were randomized into control (no drug treatment), low-dose (10  $\mu\text{mol/L}$  TET), medium-dose (20  $\mu\text{mol/L}$  TET), and high-dose (30  $\mu\text{mol/L}$  TET) groups. The cell viability, migration, and invasion

**[收稿日期]** 2023-05-09

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金青年项目(2021JJ40869); 湖南省卫生健康委科研课题项目(202207012427, 202206032424)。

**[第一作者]** 彭珂平, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 耳鼻喉头颈外科学。

**[通信作者]** \* 田桂湘, 女, 博士, 副主任医师, E-mail: 121526545@qq.com。

abilities in each group were determined by MTT, scratch test, and Transwell assay separately. OSCC cells were respectively transfected with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), programmed cell death protein 1 (PD-1), and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) mimics and inhibitors for 24 h continuously. RT-qPCR was used to determine the mRNA expression levels of HIF-1 $\alpha$ , PD-1, and PD-L1 in normal oral epithelial cells, OSCC cells, and OSCC cells transfected with HIF-1 $\alpha$ , PD-1, and PD-L1 mimics and inhibitors. Western blot was used to check the protein expression levels of Fibronectin, Vimentin, E-cadherin, HIF-1 $\alpha$ , PD-1, and PD-L1 in cells of each group. **Results** Compared with control group, the cell viability, migration, and invasion abilities were significantly inhibited in low-dose, medium-dose, and high-dose groups ( $P<0.05$ ), which showed an obvious up-regulation in mRNA levels of HIF-1 $\alpha$ , PD-1, and PD-L1 ( $P<0.05$ ). The protein levels of Fibronectin, Vimentin, HIF-1 $\alpha$ , PD-1, and PD-L1 in low-dose, medium-dose and high-dose groups gradually decreased with the increased dose ( $P<0.05$ ), while the protein level of E-cadherin was gradually increased ( $P<0.05$ ). The relative expression level of HIF-1 $\alpha$  and the number of transmembrane cells in cells transfected with HIF-1 $\alpha$  mimic were higher than those in cells transfected with HIF-1 $\alpha$  inhibitor ( $P<0.05$ ); the relative expression level of PD-1 and the number of transmembrane cells in cells transfected with PD-1 mimic were higher than those in cells transfected with PD-1 inhibitor ( $P<0.05$ ); and the relative expression level of PD-L1 and the number of transmembrane cells in cells transfected with PD-L1 mimic were higher than those in cells transfected with PD-L1 inhibitor ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TET may inhibit the cell viability, migration, and invasion abilities of OSCC by inhibiting HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 axis, and is expected to serve as a new adjuvant treatment for OSCC.

[**Keywords**] tetrandrine; oral squamous cell carcinoma; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; programmed cell death protein 1; programmed cell death protein 1 ligand; invasion

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是一种口腔恶性肿瘤,因其在口腔恶性肿瘤中的发病率高达 90%,且具较高的侵袭性和转移能力,对人类健康造成严重威胁<sup>[1]</sup>。目前,针对 OSCC 的治疗手段主要包括手术切除、放射治疗和化学药物治疗等,可以有效除去病灶,杀灭体内的癌细胞,改善术后生存质量和延长生存期。但由于 OSCC 靠近上呼吸道和颅脑等关键部位,常规手术治疗无法彻底清除中晚期已转移的癌组织;同时,放射治疗和化学药物治疗对患者的不良反应较大,难以满足患者的需求。因此,针对 OSCC 探索新的疗法对改善患者预后具有重要意义。在临床应用中,与不良反应明显的化学药物治疗相比,中药具有药性温和、毒性低的优势<sup>[2]</sup>。汉防己甲素(tetrandrine, TET)是从汉防己根中分离出来的一种生物碱,具有良好的镇痛作用,常用于治疗硅沉着病(矽肺)、心脑血管以及免疫性疾病<sup>[3]</sup>。近年来,TET 的抗肿瘤作用得到了广泛的研究。如 LUAN 等<sup>[4]</sup>研究报道,TET 可以在肺癌、结肠癌、膀胱癌等多种癌症中发挥抗癌活性。然而,关于 TET 对 OSCC 的治疗作用及其机制尚无定论。程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1, PD-1)是免疫球蛋白 B7 超家族成员,程序性细胞死亡蛋白 1 配体(programmed cell death ligand 1, PD-L1)与免疫系统抑制密切相关,能抑制 T 细胞活化及特定细胞因子分泌,对肿瘤免疫逃逸起重要

作用<sup>[5]</sup>。既往研究指出,PD-L1 及 PD-1 可介导肿瘤发生发展过程,与肿瘤分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移存在密切关联<sup>[6-7]</sup>。为了探讨 TET 对 OSCC 侵袭潜能的影响及其机制,本研究通过体外细胞实验研究 TET 经 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴对 OSCC 细胞的细胞活性、迁移及侵袭的影响,为后期分析该药物对 OSCC 的治疗机制提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 主要药物与试剂

TET(湖北威德利化学科技有限公司,批号:518-34-3);人正常口腔上皮细胞系 HOEC、OSCC 细胞系 SCC25(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CP-H203、CL-0569);RPMI-1640 培养基、胎牛血清、胰酶、GAPDH 抗体(美国赛默飞科技有限公司,批号:2643863、12483020、2425734、Y1379805);MTT、DMEM 培养基、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )抗体、PD-1 抗体、PD-L1 抗体、山羊抗兔二抗(美国英杰生命技术有限公司,批号:2765711、2436820、WL3457364、YA3804591、2003463、2277758);DMSO(上海卡迈舒生物科技有限公司,批号:2714422);PBS(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:2524465)。

### 1.2 主要仪器

MCO-5AC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(山东欧莱博医疗器械

有限公司);MH-2型微型振荡仪(广州越特科学仪器有限公司);CKX53型倒置显微镜(日本奥林巴斯有限公司);DYCP-31DN型电泳仪(北京鑫诺宸仪器仪表有限公司);TE70XP型半干电转膜仪(美国Hoefer公司);ZF-258型凝胶成像仪(上海嘉鹏仪器设备公司);Q1000型PCR仪(济南千司生物技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及分组

将HOEC和OSCC细胞分别在DMEM和RPMI-1640培养基中培养,添加10%的胎牛血清、1%青霉素和链霉素混合抗生素,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。采用胰酶对80%及以上融合率的细胞消化传代。以对数期的细胞作为实验对象。以不添加TET处理的细胞作为对照组;添加10μmol/L TET的细胞作为低剂量组;添加20μmol/L TET的细胞作为中剂量组;添加30μmol/L TET的细胞作为高剂量组。吸取5×10<sup>5</sup>个对数生长期的SCC25细胞,接种于6孔板(6份),当其生长至80%融合度时进行转染,按Lipofectamine 2000试剂说明书,根据实验目的,分别转染HIF-1α模拟物、HIF-1α抑制剂;PD-1模拟物、PD-1抑制剂;HIF-1α模拟物、PD-L1抑制剂。每组均连续转染24h。

### 2.2 MTT法检测细胞活力

将OSCC细胞置于96孔板(1.5×10<sup>4</sup>个/孔)中进行传代,保证细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24h,将TET溶液加入每孔,使其浓度分别为0、5、10、20、40、50μmol/L,每个浓度级设3个复孔,于培养箱内分别培养24、48、72h后,加入50μL的MTT溶液,培养2h后分别加入DMSO(150μL/孔)溶解沉淀,然后通过振荡使沉淀充分溶解;采用酶联免疫检测仪测出每孔吸光度(optical density, OD)值,波长为490nm,读取每组OD值并计算平均值。计算公式如下:细胞存活率(%)=(药物组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)×100%。

### 2.3 划痕实验检测细胞的迁移能力

将细胞接种在6孔板(5×10<sup>6</sup>个/孔)中培养。待细胞融合度达到90%时,采用无菌塑料头迅速在细胞上划出宽度均一的痕迹,用PBS洗涤除去悬浮的细胞。然后对细胞进行药物干预,干预完成后继续在培养箱中培养各组细胞。在0、48h时间点下,拍摄照片,从而判定各组细胞划痕愈合率。计算公式如下:划痕愈合率(%)=(愈合面积/划痕面积)×100%。

### 2.4 Transwell实验检测细胞的侵袭能力

Transwell实验可评估细胞的侵袭能力,细胞如突破Matrigel胶转移至多孔膜下表面,即为细胞具有侵袭能力。细胞转染24h后用胰酶消化并计数,将细胞接种于Matrigel胶包被的Transwell小室,孔板下室加入含有15%胎牛血清的培养基,常规培养48h后,将Transwell小室取出,取出其中的培养液,并用PBS冲洗干净,孔板下室细胞通过甲醛固定30min,通过0.1%结晶紫染色15min,在显微镜下随即选取5个视野记录穿膜细胞数。

### 2.5 RT-qPCR检测HIF-1α、PD-1、PD-L1表达水平

通过RNA提取试剂盒对待测细胞进行RNA提取,并依照说明书逆转录得到cDNA链。通过PCR仪以cDNA链为模板进行扩增。反应条件如下:94℃4min,94℃32s,62℃32s,75℃3min,共40个循环。基因表达值以2<sup>-ΔΔCt</sup>法<sup>[8]</sup>计算,以GAPDH作为内参基因。HIF-1α正向序列:5'-ACTTGGCAACCTTGGATTGG-3',反向序列:5'-ATCTCCGTCCTCAACCTCT-3';PD-1正向序列:5'-TAGAAATACCATTTGACCCA-3',反向序列:5'-CCATTACTGGGTATATACCC-3';PD-L1正向序列:5'-TCACTTGTAATTCTGGGAGC-3',反向序列:5'-CTTTGAGTTGTATCTTGGATG;GAPDH正向序列:5'-GAGAGTGCCCACTCCTGCCA-3',反向序列:5'-CTCAGTGA GCCTCCTCTGCT-3'。

### 2.6 Western blot检测相关蛋白表达水平

取各组OSCC细胞,在4℃下12000r/min离心10min(离心半径10cm),加入裂解液裂解后,加入Loading Buffer缓冲液,选择蛋白质定量法(波长为562nm)检测各组蛋白含量,然后进行灌胶上样操作。取适量样本与SDS样品缓冲液混合,加热煮沸5min,然后4℃12000r/min离心10min(离心半径10cm)后取上清液,进行电泳分离。根据胶的大小剪取膜和滤纸,在转膜前,先用甲醇浸泡PVDF膜3s,然后选择半干法转至PVDF膜。将膜置于封闭缓冲液中1h,在室温下进行摇动以封闭。加入一抗纤维连接蛋白(Fibronectin)(1:500)、波形蛋白(Vimentin)(1:1000)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(1:2000)、HIF-1α(1:1000)、PD-1(1:100)、PD-L1(1:500)和GAPDH(1:1000)在4℃下过夜,加入IgG二抗(1:2000),37℃孵育1h,取出胶片,浸入显色液中1min,清洗后显影,并通过Image-Pro Plus软件进行分析,以GAPDH为内参,计算各蛋白的相对表达水平。



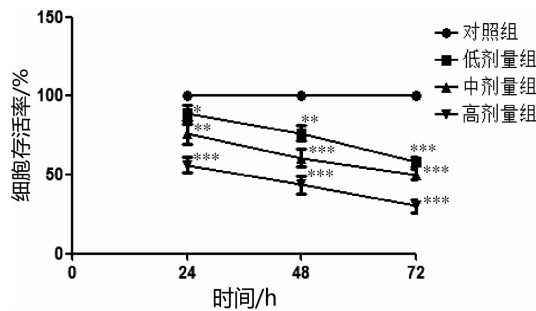
### 2.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行分析。数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TET 抑制 OSCC 细胞活力

细胞经过 24、48、72 h 培养后,随着药物作用时间的增加以及 TET 浓度的增加,OSCC 细胞存活率降低( $P < 0.05$ )。详见图 1。

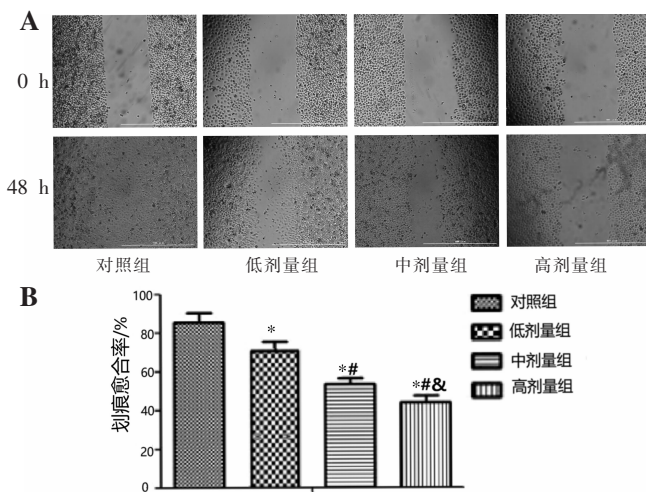


注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 TET 对 OSCC 细胞活力的影响

### 3.2 TET 抑制 OSCC 细胞的迁移能力

与对照组比较,低、中、高剂量组细胞的愈合率显著降低( $P < 0.05$ ),且随剂量增加,细胞愈合率逐渐降低( $P < 0.05$ )。详见图 2。



注:A 为划痕实验细胞迁移图(标尺 100  $\mu\text{m}$ , $\times 40$ );B 为各组细胞划痕愈合率比较。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组相比,<sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 TET 对 OSCC 细胞迁移能力的影响

### 3.3 TET 抑制 OSCC 细胞的侵袭能力

与对照组比较,低、中、高剂量组的穿膜细胞数

显著降低( $P < 0.05$ ),且随剂量增加逐渐降低( $P < 0.05$ );Fibronectin 和 Vimentin 蛋白显著下调( $P < 0.05$ ),且随剂量增加逐渐下调( $P < 0.05$ );E-cadherin 蛋白显著上调( $P < 0.05$ ),且随剂量增加逐渐上调( $P < 0.05$ )。详见图 3—4。

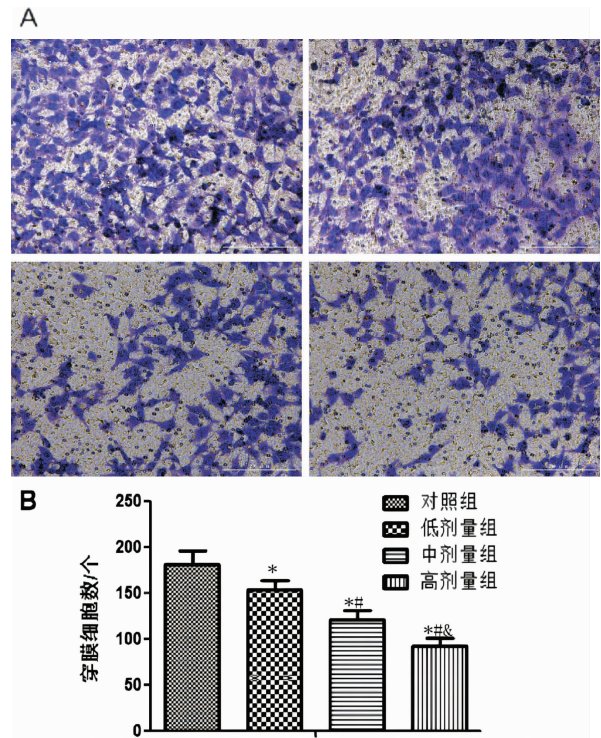


图 3 TET 对 OSCC 细胞侵袭能力的影响

注:A 为各组细胞侵袭染色图(0.1%结晶紫染色,标尺 50  $\mu\text{m}$ , $\times 100$ );B 为各组细胞侵袭数比较。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组相比,<sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

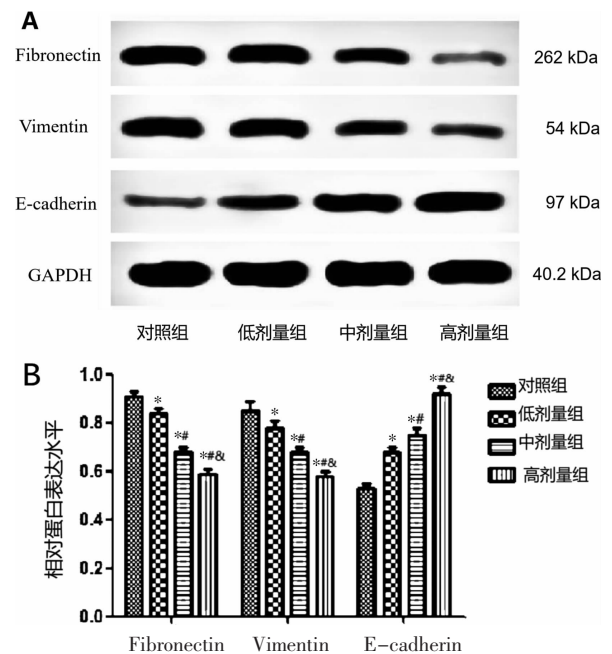


图 4 各组上皮间质转化相关蛋白相对表达水平比较

注:A 为蛋白条带图;B 为各组蛋白相对表达水平。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组相比,<sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.4 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 在 OSCC 细胞系中的表达水平

与正常口腔上皮细胞比较,OSCC 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 和 PD-L1 显著上调( $P<0.05$ )。详见图 5。

### 3.5 TET 抑制 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平

与对照组比较,低、中、高剂量组 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 及 PD-L1 蛋白的表达量明显下降( $P<0.05$ ),且随剂量增加,蛋白的表达量逐渐降低( $P<0.05$ )。详见图 6。

### 3.6 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 表达对 OSCC 细胞的侵袭能力的影响

转染 HIF-1 $\alpha$  模拟物细胞的 HIF-1 $\alpha$  相对表达量及穿膜细胞数高于转染 HIF-1 $\alpha$  抑制剂细胞( $P<0.05$ ),转染 PD-1 模拟物细胞的 PD-1 相对表达量及穿膜细胞数高于转染 PD-1 抑制剂细胞( $P<0.05$ ),转染 PD-L1 模拟物细胞的 PD-L1 相对表达量及穿膜细胞数高于转染 PD-L1 抑制剂细胞( $P<0.05$ )。详见图 7—8。

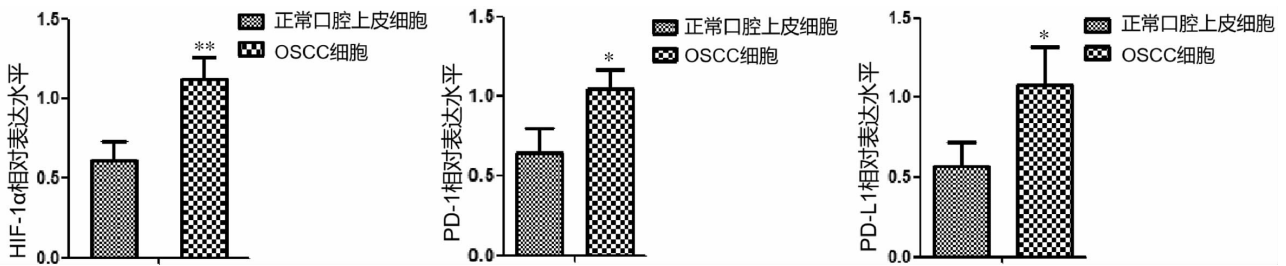


图 5 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 在正常口腔上皮细胞及 OSCC 细胞系中的表达差异

注:与正常口腔上皮细胞相比,\* $P<0.05$ 。

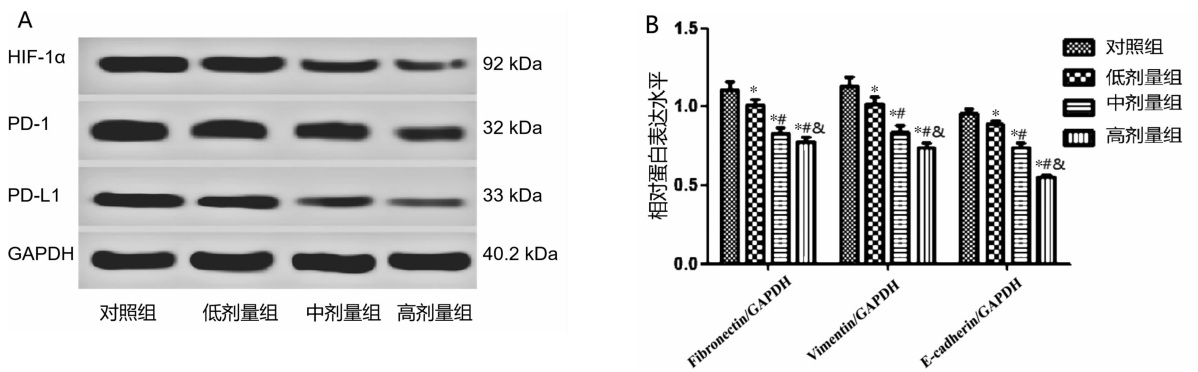


图 6 各组 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 及 PD-L1 蛋白的表达结果比较

注:A 为各组蛋白条带图;B 为各组蛋白相对表达水平。与对照组相比,\* $P<0.05$ ;与低剂量组相比,# $P<0.05$ ;与中剂量组相比,& $P<0.05$ 。

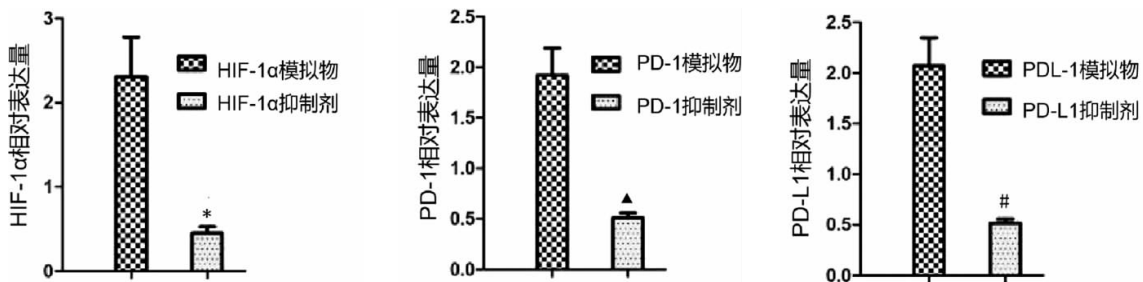


图 7 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 在转染模拟物及抑制剂细胞中的表达差异

注:与 HIF-1 $\alpha$  模拟物相比,\* $P<0.05$ ;与 PD-1 模拟物相比,▲ $P<0.05$ ;与 PD-L1 模拟物相比,# $P<0.05$ 。

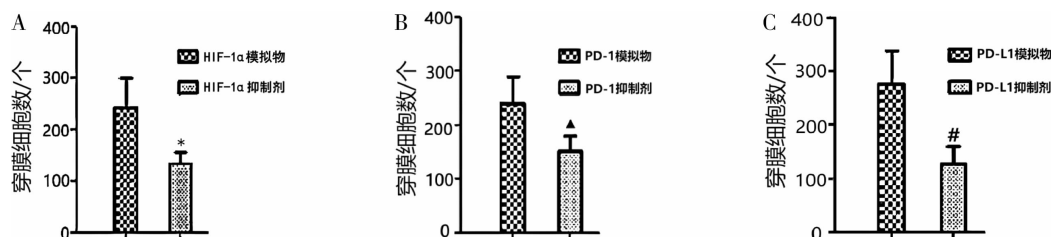


图8 转染 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 模拟物及抑制剂对 OSCC 细胞侵袭能力的影响

注:A 为在转染 HIF-1 $\alpha$  模拟物及抑制剂 OSCC 细胞系中的穿膜细胞数量;B 为在转染 PD-1 模拟物及抑制剂 OSCC 细胞系中的穿膜细胞数量;C 为在转染 PD-L1 模拟物及抑制剂 OSCC 细胞系中的穿膜细胞数量。与 HIF-1 $\alpha$  模拟物相比,\* $P<0.05$ ;与 PD-1 模拟物相比,▲ $P<0.05$ ;与 PD-L1 模拟物相比,# $P<0.05$ 。

## 4 讨论

OSCC 是全球第六大常见的上皮恶性肿瘤,有较高的发病率和死亡率<sup>[9-11]</sup>。由于此病早期症状隐匿,易被忽视,且具有较强的侵袭性,容易发生淋巴结转移及局部侵袭,导致手术难以彻底清除,从而影响治疗效果<sup>[12-14]</sup>。近年来,对 OSCC 的诊断和治疗取得了重大进步,但是 OSCC 患者的预后仍然不理想,5 年生存率仅为 50%,仍然严重威胁人类健康<sup>[15]</sup>。因此,寻找新的药物对辅助 OSCC 的治疗意义重大。

TET 是一种天然产物,具有多种生物活性,包括抗炎、抗氧化和抗肿瘤等作用<sup>[16]</sup>。近年研究显示,TET 作为一种天然的抗肿瘤物质,可抑制舌鳞癌细胞的生长<sup>[17]</sup>。癌细胞的活力可以反映恶性肿瘤细胞的增殖速度,癌细胞活力越大,则其增殖潜力越大。在本研究中,通过 MTT 实验发现,细胞经过 24、48、72 h 培养后,随着作用时间的加长以及 TET 浓度的增加,OSCC 细胞活力越来越低,TET 显著降低了 OSCC 细胞的活力。这一结果与既往研究报道的 TET 可以显著抑制子宫内膜癌细胞活力的结果相类似<sup>[18]</sup>。肿瘤细胞发生迁移、侵袭等行为通常可以作为肿瘤恶化的标志。本研究通过细胞迁移和侵袭实验,发现 TET 可以抑制 OSCC 细胞的迁移和侵袭能力,且随着 TET 剂量的增加,细胞愈合率、穿膜细胞数显著降低,高剂量组低于中剂量组与低剂量组,中剂量组低于低剂量组,提示 TET 或存在抑制 OSCC 细胞迁移与侵袭的能力。在本研究中,发现经低、中、高剂量 TET 干预后,细胞中 E-cadherin 蛋白水平显著上调,而 Vimentin 和 Fibronectin 蛋白水平显著下调。以上结果说明 TET 可以通过抑制上皮间质转化从而抑制 OSCC 细胞的侵袭能力,与黄晏军等<sup>[19]</sup>报道的 TET

可以有效抑制三阴性乳腺癌的细胞增殖和迁移的发现相类似。

张雅莉等<sup>[20]</sup>发现,PD-1 及 PD-L1 在宫颈癌组织中过表达,且与患者肿瘤分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移密切相关。有研究表明,HIF-1 $\alpha$  过表达与癌症及其转移、放射治疗和化学药物治疗耐药性以及患者死亡率上升有关,且抑制 HIF-1 $\alpha$  活性可显著抑制血管生成和肿瘤生长<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,转染 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 抑制剂细胞穿膜细胞数显著低于转染 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1、PD-L1 模拟物细胞,表明 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 和 PD-L1 表达上调可增强 OSCC 细胞侵袭能力,进一步证实了 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴相关指标变化对 OSCC 的影响。本研究从 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴入手,分析了 TET 对 OSCC 细胞的影响,TET 处理 OSCC 细胞后,HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达显著下调,提示 TET 可能通过下调 HIF-1 $\alpha$ 、PD-1 和 PD-L1 表达,抑制 OSCC 细胞侵袭。

综上所述,本研究通过体外细胞实验初步探索了 TET 在 OSCC 细胞中的抗癌功效,发现 TET 可以抑制 OSCC 细胞活性及迁移侵袭能力,并揭示其可能通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /PD-1/PD-L1 轴来抑制 OSCC 细胞的侵袭。但其具体作用机制还有待更深入地探索与分析。

## 参考文献

- [1] HASEGAWA K, FUJII S, MATSUMOTO S, et al. YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. The Journal of Pathology, 2021, 253(1): 80-93.
- [2] 郑佳露, 郑金洲, 顾 贤, 藤龙补中汤联合化疗治疗晚期结直肠癌疗效研究[J]. 陕西中医, 2023, 44(8): 1042-1046.
- [3] 龚妙添, 杨桂生, 黄仕尧. 汉防己甲素调控 Chk1 基因对宫颈癌



- 细胞增殖、凋亡及放射敏感性的影响[J]. 河北医药, 2021, 43(20): 3078-3081, 3086.
- [4] 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.
- [5] VANGURI R S, LUO J, AUKERMAN A T, et al. Multimodal integration of radiology, pathology and genomics for prediction of response to PD-(L)1 blockade in patients with non-small cell lung cancer[J]. Nature Cancer, 2022, 3(10): 1151-1164.
- [6] 蔡正凤, 景晓莉, 张梦岚, 等. PD-L1、MMP-3 在老年食管鳞癌组织中的表达及其相关性[J]. 中国医师杂志, 2021, 23(11): 1682-1685.
- [7] 陈辅叶, 刘永红, 董国娟, 等. PD-L1 表达、CD8+TIL 密度与食管鳞癌临床病理特征及预后的关系[J]. 海南医学, 2023, 34(1): 76-81.
- [8] LIN J, DING Q, ZHANG G Y, et al. Study on PI3k gene expression in breast cancer samples and its association with clinical factors and patient survival[J]. Cellular and Molecular Biology, 2022, 67(4): 321-327.
- [9] SUN S, WANG J, LIU J, et al. miR-302b suppresses tumor metastasis by targeting Frizzled 6 in OSCC[J]. Journal of Dental Research, 2021, 100(7): 739-745.
- [10] BUGSHAN A, FAROOQ I. Oral squamous cell carcinoma: Metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis[J]. F1000Research, 2020, 9: 229.
- [11] 李 凯, 马 锴. 口腔鳞癌中 EIF3e 和 MMP-12 的表达意义[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1505-1508, 1513.
- [12] 刘倩峰, 杨佩璇, 庞 超, 等. miR-7-5P 在口腔鳞癌中表达及其调控 CDK-10 信号通路对细胞增殖、凋亡与周期的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(6): 1432-1436.
- [13] GUO Y B, CHEN B B, PEI X H, et al. Radix stephaniae tetrandrine: An emerging role for management of breast cancer[J]. Current Pharmaceutical Design, 2020, 26(1): 25-36.
- [14] DIAO P F, JIANG Y, LI Y Y, et al. Immune landscape and subtypes in primary resectable oral squamous cell carcinoma: Prognostic significance and predictive of therapeutic response[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021, 9(6): e002434.
- [15] SAIDAK Z, LAILLER C, TESTELIN S, et al. Contribution of genomics to the surgical management and study of oral cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2021, 28(11): 5842-5854.
- [16] XU Q, WANG C, ZHOU J X, et al. Loss of TET reprograms Wnt signaling through impaired demethylation to promote lung cancer development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(6): e2107599119.
- [17] 牛 兵, 王国芳, 李坤阳, 等. TET 对舌鳞癌细胞 SCC9 生长、运动和裸鼠体内成瘤的影响及机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(5): 796-801, 809.
- [18] SHANG W Q, ZHANG J, SONG H B, et al. Mechanism of tetrandrine against endometrial cancer based on network pharmacology[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2021, 15: 2907-2919.
- [19] 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.
- [20] 张雅莉, 李西川, 张 莉, 等. 宫颈鳞癌组织 FOXP3、PD-1、PD-L1 蛋白表达及其临床意义[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2022, 42(6): 16-22.
- [21] COWMAN S J, KOH M Y. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment[J]. Trends in Cancer, 2022, 8(1): 28-42.
- [22] ALBADARI N, DENG S S, LI W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2019, 14(7): 667-682.

(本文编辑 周 旦)