

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.03.002

❖ 基础医学研究 ❖

转录-蛋白质组联合分析白藜芦醇通过 EMT 抑制口腔鳞状细胞癌的转移机制

杨清^{1,2}, 王治林^{1,3}, 钟越^{1,2}, 钟晓武⁴, 邱亚⁵, 李丽华^{1,2}

(川北医学院, 1. 附属医院口腔科; 2. 口腔医学院, 四川南充 637000; 3. 日本东北大学院齿学研究科创新合作交流中心, 日本宫城 仙台 197-0804; 川北医学院附属医院, 4. 检验科; 5. 科技创新中心, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 基于转录组和蛋白质组联合探讨白藜芦醇(RSV)治疗口腔鳞状细胞癌(OSCC)的分子机制。**方法:** 体外培养口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞并分为对照组与 RSV 组, 对两组进行转录组和蛋白质组联合分析, 筛选干预 OSCC 的关键靶点和相关信号通路。将细胞分为空白对照组、RSV 50 $\mu\text{mol/L}$ 组及 RSV 100 $\mu\text{mol/L}$ 组, 通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测各组核心差异基因/蛋白, 即神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、上皮细胞钙黏素(E-cadherin)和基质金属蛋白酶-9(MMP9)的 mRNA 表达水平。**结果:** RSV 处理 HSC-3 细胞后, 转录组分析显示, RSV 组共有 422 个差异表达基因, 其中上调 276 个, 下调 146 个, 差异表达基因主要富集在上皮间充质转化(EMT)信号通路等。蛋白质组分析表明 RSV 组共有 644 个差异表达蛋白, 其中上调 342 个, 下调 302 个。通过转录组-蛋白质组联合对比, 得到 117 个交集靶点, 包括 EMT 信号通路中 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 等。RT-qPCR 结果表明, RSV 上调 E-cadherin mRNA 的表达水平($P < 0.05$), 下调 N-cadherin、Vimentin 和 MMP9 的 mRNA 表达水平($P < 0.05$), 与转录组结果一致。Western blot 结果表明, RSV 处理后可增加 E-cadherin 的蛋白表达水平($P < 0.05$), 降低 N-cadherin、Vimentin 和 MMP9 的蛋白表达水平($P < 0.05$), 且与 RSV 浓度正相关($P < 0.05$), 与蛋白质组结果一致。**结论:** RSV 通过调节 HSC-3 细胞 EMT 信号通路分子 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 的表达, 抑制口腔鳞状细胞癌的转移。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌; 白藜芦醇; 转录组; 蛋白质组; 上皮间充质转化

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A

Transcription-proteome analysis of the mechanism of resveratrol inhibiting the metastasis of oral squamous cell carcinoma

YANG Qing^{1,2}, WANG Zhi-lin^{1,3}, ZHONG Yue^{1,2}, ZHONG Xiao-wu⁴, QIU Ya⁵, LI Li-hua^{1,2}

(1. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. College of Stomatology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 3. Innovation Cooperation and Exchange Center, Tohoku National University of Dentistry, Sendai 197-0804, Miyagi, Japan; 4. Department of Clinical Laboratory; 5. Science and Technology Innovation Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To explore the molecular mechanism of resveratrol (RSV) in the treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) based on the combination of transcriptome and proteome. **Methods:** Oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells were cultured in vitro and divided into the control group and RSV group. Combined transcriptome and proteome analysis was performed in control group and RSV group to screen key targets and related signaling pathways for intervention in OSCC. The cells were divided into blank control group, RSV 50 $\mu\text{mol/L}$ group, and RSV 100 $\mu\text{mol/L}$ group, mRNA expression levels of core differential genes/proteins, namely neural cadherin (N-cadherin), Vimentin, epithelial cadherin (E-cadherin) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results:** After RSV treatment of HSC-3 cells, transcriptome analysis showed that there were 422 differentially expressed genes in RSV group, of which 276 were up-regulated and 146 were down-regulated. Differentially expressed genes were mainly concentrated in epithelial mesenchymal transformation (EMT) signaling pathway. Proteomic analysis showed that there were 644 differentially expressed proteins in RSV group, of which 342 were up-regulated and 302 were down-regulated. By combining transcriptome-proteome comparisons, 117 intersection targets were identified, including E-cadherin, N-cadherin, MMP9 and Vimentin in EMT signaling pathways. The results of RT-qPCR showed that RSV up-regulated the expression of E-cadherin mRNA and down-regula-

基金项目: 四川省大学生创新创业科研基金项目(S202210634077); 四川省南充市应用技术与开发专项项目(20YFZJ0090)

作者简介: 杨清(1998 -), 女, 硕士研究生, 住院医师。E-mail: 1171052609@qq.com

通讯作者: 李丽华, 教授。E-mail: angel_li77@163.com

ted the expression of N-cadherin, Vimentin and MMP9 mRNA, which was consistent with the transcriptomic results. Western blot experiment results showed that RSV treatment increased the protein expression level of E-cadherin and decreased the protein expression level of N-cadherin, Vimentin and MMP9, which was positively correlated with RSV concentration and consistent with proteomic results. **Conclusion:** RSV inhibits the metastasis of oral squamous cell by regulating the expression of EMT signaling pathway molecules E-cadherin, N-cadherin, MMP9 and Vimentin in HSC-3 cells.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma; Resveratrol; Transcriptome; Proteome; Epithelial mesenchymal transition

作为全球第七大常见癌症,口腔癌的发病率和死亡率逐年增加,2022 年有新发病例超过 10 万例,新死亡病例超 5 万例^[1]。口腔癌中 90% 为鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC), 占有恶性肿瘤的 2% ~ 3%^[2]。近年来 OSCC 的生存率略有提高,但由于复发和转移等因素,晚期患者的预后仍较差^[3]。目前 OSCC 标准化的治疗仍然以手术切除辅助放化疗为主,手术治疗会造成颌面部较大面积缺损,导致患者身体和心理严重创伤。早期口腔癌(I 期和 II 期)可通过手术或放化疗治疗,但对于晚期口腔癌(III 期和 IV 期),即使是手术、放疗和化疗相结合,也难以取得令人满意的疗效^[4]。鉴于传统治疗方法在 OSCC 治疗中的局限性,开发新型、高效、低毒的治疗药物迫在眉睫。多酚类是一种天然提取物,已被证明对 OSCC 具有化学预防和抗肿瘤作用^[5]。白藜芦醇(resveratrol, RSV)是一种天然的多酚类化合物,主要存在于一些天然的植物水果中,研究发现 RSV 具有抑制肿瘤生长、抑制炎症反应、抗氧化应激、抗菌抗病毒、促进骨愈合等多种生物学功能^[6]。本课题组前期研究^[7]通过网络药理学和分子对接技术,发现 RSV 对 OSCC 细胞具有明显抑制作用。然而 RSV 治疗 OSCC 具体作用机制尚不明确。本研究拟用 RSV 处理口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞后,通过转录组-蛋白质组联合分析,筛选 RSV 干预 OSCC 发生发展的关键靶点和相关信号通路,再利用 RT-qPCR 和 Western blot 技术进行实验验证,初步探索 RSV 治疗 OSCC 过程可能干预的基因、蛋白质和潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

白藜芦醇(北京索莱宝科技有限公司);人舌鳞癌细胞株 HSC-3(广州吉妮欧生物科技有限公司);MMP-9、GAPDH 一抗及二抗 IgG(杭州华安生物公司);E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 一抗(武汉菲恩生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RSV 处理 HSC-3 后提取细胞总 RNA 将 HSC-3 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种到 24 孔板中,当细胞密度达到 60% ~ 80% 时实验组加入 RSV

(50 $\mu\text{mol/L}$),每组重复 3 孔。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h,取出置于冰上。弃去培养基,用预冷的 PBS 快速冲洗 3 次,加入 1 mL 的 Trizol 裂解液,用细胞刮板快速收集细胞,轻轻吹打并混匀,直至形成清澈透明的液体,转移到无酶试管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏待分析。

1.2.2 转录组文库的构建和测序 以片段 mRNA 为模版,随机寡核苷酸为引物,在 M-MuLV 逆转录酶系统中合成第一条 cDNA 链,然后用 RNaseH 消化 RNA,在 DNAPolymerase I 系统中以 dNTP 为起始原料合成第二条 cDNA 链。纯化的双链 cDNA 的末端被切除,加 A 尾,并与测序配体连接。使用 AMPure XP beads 挑选约 250 ~ 300 bp 的 cDNA,进行 PCR 扩增,并使用 AMPure XP 重新纯化 PCR 产物,以获得最终的转录本文库。在 Illumin 测序平台上使用新一代测序对构建的文库进行配对测序。

1.2.3 差异表达基因及功能富集分析 使用 Tophat2 软件计算每个基因的表达水平,与参考基因组数据比较,进行差异表达基因分析。必须同时满足显著性 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{差异表达倍性})| > 1$,则可称为差异表达基因(DEGs)。使用 Ggplots2 软件绘制差异表达基因的火山图,对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.2.4 RSV 处理 HSC-3 后提取细胞总蛋白 参考 1.2.1 设置 RSV 处理组与空白对照组,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h,移至冰上。弃去原培养基,用预冷的 PBS 快速清洗细胞 3 次,加入 3 mL PBS,用细胞刮刀收集细胞,反复吹打混匀,转移到 10 mL 离心管中,16 000 g 离心 3 min,弃去上层 PBS,将细胞沉淀转移到 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

1.2.5 样本处理及质谱检测 将反应溶液(pH 为 8.5/10 mM TCEP/40 mM CAAs)添加到样品中,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵 1 h。添加酶使得其与蛋白的质量比例为 1:50,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜,后进行酶切法。次日添加三氟乙酸以终止酶切,并使用 SDB 脱盐塔进行脱盐,转速 16 000 \times g 离心 20 min;将在转速 16 000 \times g 下离心 15 min 的上清液进行干燥和冷冻在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用,随后采集样本进行 TMT 标记。用 Sep-PakC18 将已标注的等分样本进行混合并脱盐。然后,采用高 pH 值反向色谱法对其进行分离,经真空干燥后,将样本贮存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏以备检验。使用 Q Exactive

Plus 质谱仪和 EASY-nLC 1200 液相色谱系统采集质谱数据。

1.2.6 质谱数据分析 利用 Andromeda 数据库检索算法,在 MaxQuant 软件中(V1.6.6)检索质谱数据。在 Uniprot 数据库中搜索,搜索参数如下:元素类型选择 TMT,可变修饰选择氧化(M)和乙酰基(蛋白质的 N 端)固定修饰选 Carbamidomethyl(C),酶切选择 Trypsin/P。根据 1% FDR 对蛋白质和多肽序列进行筛选,剔除抗体库中的蛋白质、杂质蛋白以及个别修饰多肽等蛋白质信息。对搜索库中的蛋白质定量数据进行归一化处理,可对不同样本中的同一蛋白质进行定量比较。蛋白质表达定量完成后,对表达数据进行统计分析,找出样本间表达水平存在显著差异的蛋白质(DEPs)。用 $|\log_2(\text{差异表达倍数})| > 1$ 和 $P < 0.05$ 的方法筛选出差异显著的蛋白质。

1.2.7 RT-qPCR 检测 mRNA 表达 HSC-3 细胞体外培养,分别给予 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 RSV 作用 24 h,同时设置空白对照组;利用 Trizol 法提取总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 检测目标基因表达,以 GAPDH 作为内参,进行 RT-qPCR 分析。实验均重复 3 次。见表 1。

表 1 各基因引物序列

| 基因 | 正向引物(5'-3') | 反向引物(5'-3') |
|------------|----------------------|-----------------------|
| E-cadherin | CTGAGAACGAGGCTAACG | TTCACATCCAGCACATCC |
| N-cadherin | CTGGGACGTATCTGATGAC | TGATGATGTCCCCAGTCTCA |
| MMP9 | TCCTCATCCTCGAAATGGCC | GGGACCGACAGATCGTCATC |
| Vimentin | CCAGGCAAAGCAGGAGTC | CGAAGGTGACGACCCATT |
| GAPDH | GGAGTCCACTGGCGTCTCA | GTCATGAGTCTCCACGATAAC |

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达 将各组细胞加

入 RIPA 裂解液并在冰上孵育 45 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 $\times g$ 离心 10 min 提取蛋白质。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。总蛋白与上样缓冲液混合后进行 SDS-PAGE 电泳。常规凝胶处理后,将蛋白质转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入适当浓度的 GAPDH、N-cadherin、E-cadherin、vimentin 及 MMP9 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜 3 次,加入二抗 IgG,室温孵育 1 h。洗膜 3 次后用 ECL 化学发光显影,Bio-Rad 凝胶成像系统观察蛋白质表达,使用 Image J 软件对目标条带进行统计分析。实验重复 3 次。

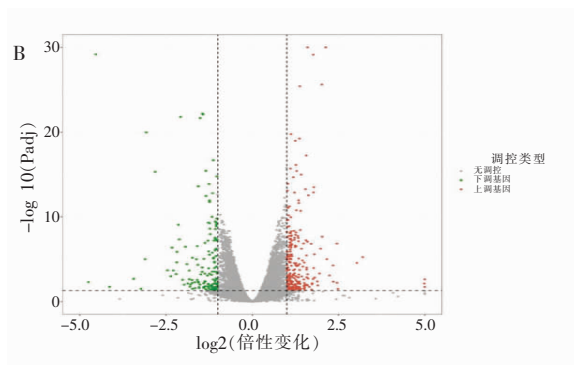
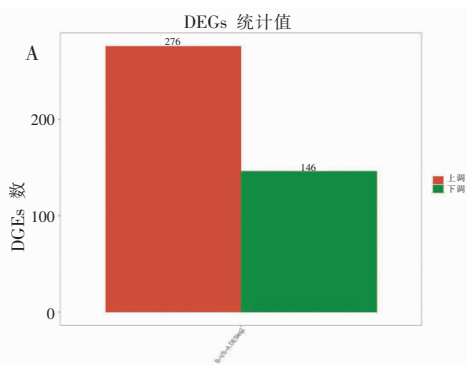
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行处理与分析。组间比较采用方差分析,方差齐性时,用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,两两比较则用 LSD-*t* 检验;方差不齐时,采用 Kruskal Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV 干预 HSC-3 细胞的转录组分析

2.1.1 差异表达基因分析 根据基因表达差异分析的结果,绘制差异表达基因的统计图和火山图,RSV 组与空白对照组相比,共有 DEGs 422 个,其中上调 276 个,下调 146 个,暗示这些 DEGs 可能参与 OSCC 的发生发展过程。结果显示,CDH1 基因(编码 E-钙黏蛋白)表达上调,CDH2(编码 N-钙黏蛋白)、MMP9(基质金属蛋白酶 9)和波形蛋白(Vimentin)均下调表达,暗示上皮-间充质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition,EMT)在 RSV 干预 HSC-3 过程中发挥重要作用。见图 1 及表 2。



火山图中的每一个点表示一个基因,横坐标为基因差异倍数的 \log_2 值,纵坐标为统计学显著性的 $-\log_{10}$ 值。横坐标绝对值越大,表达量在两样品间的表达量倍数差异越大;纵坐标值越大,表明差异表达越显著。红色代表上调,绿色代表下调,灰色代表非差异表达基因。

图 1 差异表达基因的统计图和火山图

A. 差异表达基因的统计图;B. 差异表达基因的火山图。

表 2 差异表达基因

| 基因 ID | 代号 | 差异倍数 | P 值 | Bonferroni 校正 P 值 |
|-----------------|-----------------|--------|--------|-------------------|
| ENSG00000167995 | BEST1 | -4.745 | 0.001 | 0.005 |
| ENSG00000140465 | CYP1A1 | -4.533 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000285130 | NA | -4.135 | 0.004 | 0.018 |
| ENSG00000158301 | ARMCX5-GPRASP2 | -3.432 | <0.001 | 0.002 |
| ENSG00000254870 | ATP6V1G2-DDX39B | -3.221 | 0.008 | 0.031 |
| ENSG00000105141 | CASP14 | -3.105 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000138061 | CYP1B1 | -3.067 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000130600 | HI9 | -2.812 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000109101 | FOXN1 | -2.454 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000170558 | CDH2 | -2.358 | <0.001 | 0.001 |
| ENSG00000100985 | MMP9 | -2.322 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000187650 | VIMENTIN | -2.285 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000204103 | MAFB | -2.202 | <0.001 | 0.001 |
| ENSG00000087245 | MMP2 | -2.186 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000257949 | TEN1 | -2.139 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000134339 | SAA2 | 2.019 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000065320 | NTN1 | 2.028 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000128510 | CPA4 | 2.129 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000261832 | CLN3 | 2.162 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000188293 | IGFL1 | 2.239 | <0.001 | 0.001 |
| ENSG00000105929 | ATP6V0A4 | 2.342 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000148677 | ANKRD1 | 2.350 | 0.001 | 0.004 |
| ENSG00000274272 | NA | 2.454 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000197405 | C5AR1 | 2.457 | 0.001 | 0.006 |
| ENSG00000233493 | TMEM238 | 2.484 | 0.008 | 0.032 |
| ENSG00000178033 | CALHM5 | 3.033 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000135917 | SLC19A3 | 3.203 | <0.001 | <0.001 |
| ENSG00000039068 | CDH1 | 4.985 | 0.001 | 0.007 |
| ENSG00000152767 | FARP1 | 5.163 | <0.001 | 0.002 |
| ENSG00000284431 | NA | 6.013 | 0.004 | 0.018 |

2.1.2 差异表达基因的 GO 富集分析 Gene Ontology (GO) 数据库的主要功能是对基因功能进行注释,主要有三大分支:细胞成分 (Cellular component, CC), 分子功能 (Molecular function, MF) 和生物过程 (Biological process, BP)。对 RSV 干预 HSC-3 细胞后的差异表达基因进行 GO 功能富集分析,共获得 121 个 GO 富集条目,BP、CC 和 MF 富集分条目数分别是 89、16 和 16 条。主要富集的 MF 包括 NADH 脱氢酶转移、氧化还原酶活性、肝素结合、信号受体配体活性、清道夫受体活性等;主要富集的 CC 为细胞外基质、线粒体、氧化还原酶复合体、脱氢酶复合体、基底膜等。主要富集的 BP 包括细胞外基质组织反应、线粒体 ATP 合成偶联电子运转、氧化磷酸化、皮质类固醇反应、糖皮质激素反应等。见图 2A-C。

2.1.3 差异表达基因的 KEGG 通路分析 通过 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集,可分析基因产物的功能及其在细胞中的代谢途径。结果显示,RSV 抑制 HSC-3 的 DEGs 的富集通路共 348 条,基因主要富集于上皮间充质转化、维生素的消化与吸收过程、咖啡因代谢通路、溶酶体、糖基化途径、B 细胞受体信号通路、内分泌抵抗、雌激素信号通路、细胞色素 P450 代谢通路和 cGMP-PKG 信号通路等。见图 2D。

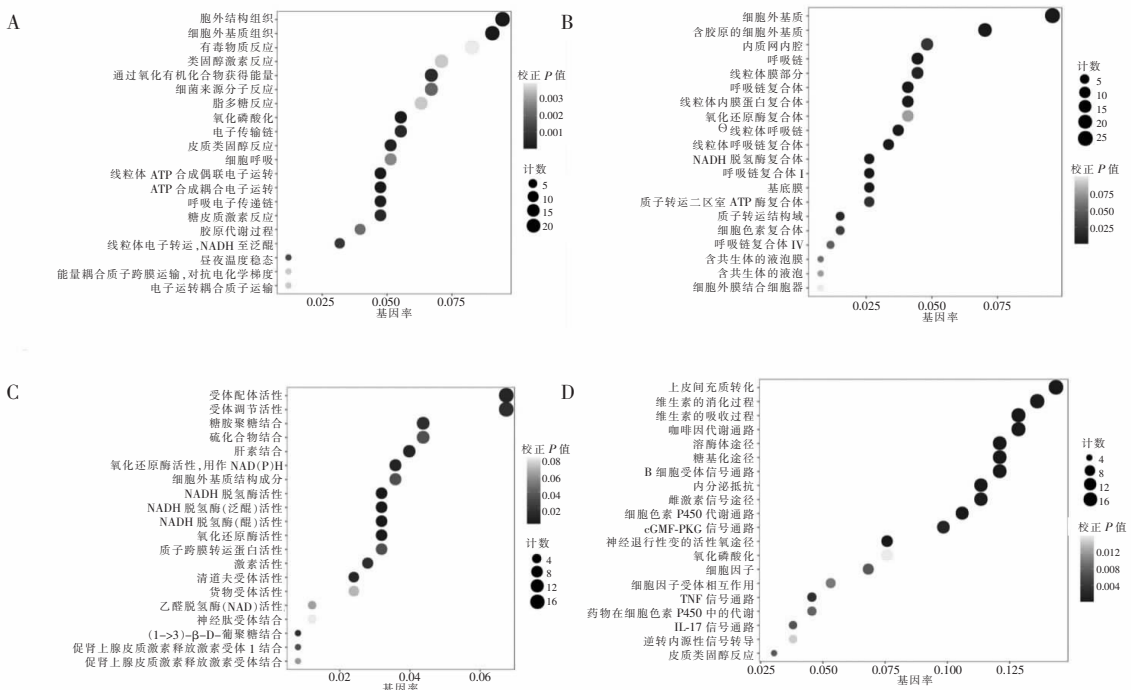


图 2 差异表达基因 GO 注释分析及 KEGG 富集分析

A. 差异表达基因 GO 注释分析 BP 气泡图; B. 差异表达基因 GO 注释分析 CC 气泡图; C. 差异表达基因 GO 注释分析 MF 气泡图; D. 差异表达基因的 KEGG 富集分析气泡图。

2.2 RSV 干预 HSC-3 细胞的蛋白质组分析

RSV 组与空白对照组相比,共有 644 个差异蛋白质 DEPs,上调的蛋白有 342 个,下调的蛋白有 302

个,选取上调、下调各前 10 位部分 DEPs。其中,N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 表达下调,E-cadherin 表达上调,与转录组结果一致。见图 3 及表 3。

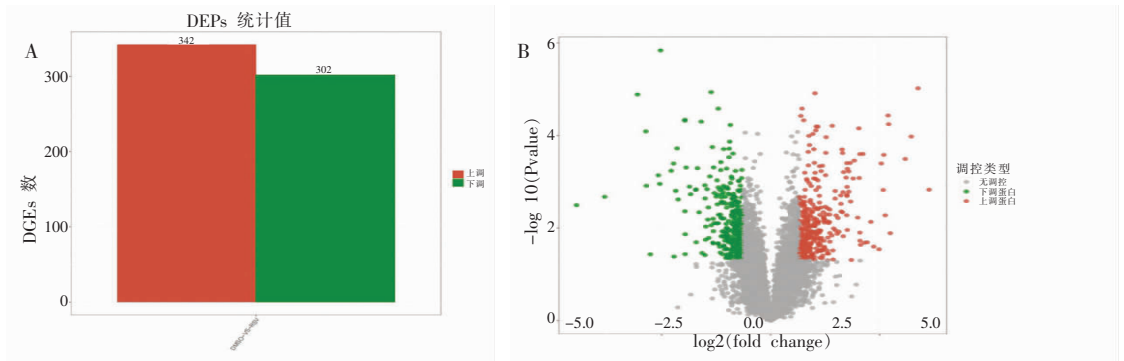


图 3 差异表达蛋白统计图和火山图

A. 差异表达蛋白的统计图;B. 差异表达蛋白的火山图。

表 3 差异表达蛋白

| 蛋白 | 差异倍数 | P 值 | Bonferroni 校正的 P 值 |
|------------|--------|--------|--------------------|
| IL1B | -1.781 | 0.003 | 0.093 |
| MMP9 | -1.523 | 0.002 | 0.081 |
| RRM2 | -1.452 | 0.001 | 0.073 |
| GJB3 | -1.221 | <0.001 | 0.018 |
| KMT5A | -1.145 | <0.001 | 0.025 |
| H1-2 | -1.140 | 0.001 | 0.072 |
| VIMENTIN | -1.104 | 0.037 | 0.201 |
| N-CADHERIN | -1.030 | 0.001 | 0.059 |
| KIF20A | -1.018 | 0.001 | 0.069 |
| P4HA1 | -1.011 | <0.001 | 0.010 |
| TNFRSF9 | 1.014 | <0.001 | 0.045 |
| ALOX5 | 1.032 | 0.002 | 0.073 |
| ADIPOR1 | 1.037 | <0.001 | 0.037 |
| CFB | 1.050 | 0.005 | 0.102 |
| CLU | 1.076 | <0.001 | 0.024 |
| MATN2 | 1.082 | <0.001 | 0.024 |
| CPA4 | 1.097 | 0.013 | 0.137 |
| PCLAF | 1.234 | <0.001 | 0.042 |
| E-CADHERIN | 1.289 | <0.001 | 0.025 |
| SLC1A4 | 1.351 | <0.001 | 0.018 |

2.3 转录-蛋白质组联合分析

转录组与蛋白质组单独分析结果发现,EMT 是 RSV 治疗 OSCC 的关键通路之一。因此,进行转录-蛋白质组联合分析,发现转录组的 DEGs 和蛋白质组的 DEPs 共有 117 个交集基因/蛋白,其中包括 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 由此可见,EMT 相关蛋白可能在 RSV 抑制 OSCC 发生发展的过程中起关键作用。见图 4A。

2.4 核心差异基因和差异蛋白的表达验证

RSV 处理 HSC-3 细胞后,RT-qPCR 结果验证,RSV 上调 E-cadherin mRNA 的表达,下调 N-cadherin、Vimentin 和 MMP9 的 mRNA 表达($P < 0.05$),与转录组测序结果一致。Western blot 结果表明,RSV 药物干预以剂量依赖的方式抑制 HSC-3 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 的活性,提高 E-cadherin 的蛋白表达水平,降低 N-cadherin、Vimentin 和 MMP9 的蛋白表达水平($P < 0.05$),与蛋白质组结果相对应。见图 4B-D。

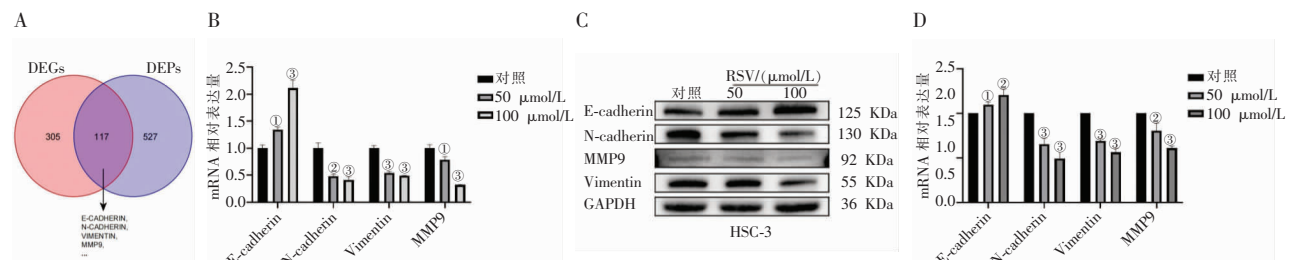


图 4 转录-蛋白质组联合分析及关键靶点的实验验证

A. 转录组与蛋白质组联合分析韦恩图;B. RSV 对核心差异基因的 mRNA 表达水平影响;C-D. 各处理组中蛋白表达情况比较。① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;③ $P < 0.001$,与对照组比较。

3 讨论

RSV 作为一种多酚类物质,具有显著的抗肿瘤作用。研究表明 RSV 通过抑制 CBX7/Akt 和 p16 级联的激活,诱导细胞凋亡,调节某些信号通路来抑制 OSCC 细胞迁移相关基因的表达,如迁移相关的基因 MMP2、Twist 和 Snail2 等,从而减弱细胞的迁徙能力^[8]。其次,RSV 可辅助光动力治疗,抑制细胞的氧气消耗,进一步加强自噬细胞的死亡,从而提高自噬细胞的死亡率^[9];还可通过诱导细胞周期阻滞,来抑制 OSCC 细胞的增殖。RSV 调控 OSCC 细胞中磷酸化-CDC2 (tyr15)、细胞周期蛋白 A2 和细胞周期蛋白 B1 的表达,诱导细胞周期阻滞在 G2/M 期,增强凋亡细胞的百分比,从而减少癌细胞的增殖^[10]。本研究经过转录-蛋白质组联合分析,发现在差异表达基因和差异表达蛋白之间 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 对应靶点的上下调情况一致,揭示了白藜芦醇可能通过调节以上 4 个靶点调控 EMT,从而抑制口腔鳞癌细胞 HSC-3 的转移。

EMT 是上皮细胞在物理、化学和生物因素的影响下获得间充质细胞表型的过程,上皮细胞会发生重大变化,包括细胞极性消失、细胞骨架退化、粘附性降低,并获得侵袭、抗凋亡等生物特性^[11]。Horny 等^[12]在细胞实验中发现,EMT 与 OSCC 癌细胞的侵袭和转移扩散密切相关。上皮间充质转化的常见标志物有 Vimentin、N-cadherin、MMPs 和 E-cadherin; EMT 过程会导致 Vimentin、MMPs 和 N-cadherin 这些标志物表达水平升高,而 E-cadherin 表达水平降低^[13-16]。EMT 过程在 OSCC 癌细胞扩散、转移中发挥着重要作用。李秀等^[17]发现 OSCC 细胞膜中 E-cadherin 的表达明显低于正常组织,随着 OSCC 分化程度的降低,E-cadherin 的阳性表达率呈下降趋势。随着 OSCC 的发展,细胞膜上的 E-cadherin 逐渐被水解,细胞间的连接复合体不断被破坏,细胞间的粘附能力降低,肿瘤细胞容易发生侵袭和转移。相反,N-cadherin 促进细胞运动和迁移,与 E-cadherin 有拮抗作用^[18]。在低分化、高临床分期和淋巴结转移的 OSCC 组织中,N-cadherin 蛋白表达明显高于高分化、低临床分期和无淋巴结转移的 OSCC 组织^[19]。研究^[20]发现通过 Vimentin 表达升高能致使细胞间黏附力下降,侵袭性增强,促进 OSCC 的发生和发展。MMPs 属于明胶酶类,长期以来一直与实体瘤的侵袭、转移和血管生成有关^[21]。因此,抑制上皮间充质转化过程,特别是通过调控 Vimentin、N-cadherin、MMPs 和 E-cadherin 四个靶点,或将成为控制 OSCC 癌细胞转移的有效手段。

本研究中,RT-qPCR 和 Western Blot 实验验证了转录-蛋白质组联合分析的结果,即 RSV 上调 E-cadherin,下调 N-cadherin、Vimentin 和 MMP9 表达。其中,E-cadherin 作为钙黏素家族成员,其表达下调可致肿瘤细胞黏附功能异常,引发浸润与转移^[22]。RSV 可调节 E-cadherin,抑制如 TGF- β 、PI3K/Akt 等的信号通路促进 EMT,阻碍肿瘤细胞由上皮向间质转化,限制迁移与侵袭^[23-24]。此外,RSV 可调节转录因子,如抑制 Snail、Zeb 等,这些转录因子通常结合 E-cadherin 启动子区域抑制转录,RSV 的抑制作用解除了这种转录抑制,上调 E-cadherin 表达,强化细胞黏附,最终抑制肿瘤转移与浸润^[25]。因此,RSV 可通过上调 E-cadherin 的表达来抑制 OSCC 的转移。神经钙黏蛋白(N-cadherin)也是经典的钙黏蛋白超家族成员之一,其异常高表达可促进肿瘤的浸润和转移。RSV 可通过干预细胞信号通路来调控 N-cadherin 等相关蛋白的表达。例如,RSV 能够抑制乳腺癌细胞中 PI3K/Akt 信号通路的激活,从而减少 N-cadherin 的表达,阻碍乳腺癌细胞从上皮状态向间质状态转化,进而降低癌细胞的侵袭和转移能力^[26]。此外,RSV 还能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活,下调 N-cadherin 等间质标记物,阻止癌细胞的侵袭和转移^[27]。综上,RSV 能通过下调 N-cadherin 的表达来抑制 OSCC 的转移。基质金属蛋白酶-9(MMP9)可以降解细胞外基质,从而促进肿瘤细胞的扩散和转移。RSV 能够抑制 NF- κ B 的激活,减少其向细胞核内移动,降低 MMP9 的转录水平,达到抑制肿瘤细胞转移和浸润的目的^[27]。例如在乳腺癌细胞的 Transwell 侵袭实验中,RSV 显著降低了穿过小室膜的细胞数量,同时细胞培养液中 MMP9 的浓度也降低^[28],这表明 RSV 可通过降低 MMP9 的表达来抑制肿瘤细胞突破基底膜,从而限制肿瘤的浸润和转移。故 RSV 可通过下调 MMP9 的表达抑制 OSCC 的转移。波形蛋白(Vimentin)由间充质细胞中的 III 型中间纤维组成。研究^[29]表明,RSV 能够阻断 TGF- β /Smad 通路的信号转导,减少 Vimentin 的合成。此外,RSV 对 STAT3 和 PI3K/Akt 通路的抑制也有助于降低 Vimentin 的表达,增强细胞间的黏附,从而协同抑制癌细胞的转移和浸润^[30]。因此推测 RSV 还可以通过下调 Vimentin 的表达抑制 OSCC 的转移。

综上,RSV 可通过调控 E-cadherin、N-cadherin、MMP9 和 Vimentin 等关键靶点抑制 EMT 生物过程,从而抑制口腔鳞癌细胞的扩散与转移。

参考文献

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics

- 2022;GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA*,2024,74(3):229-263.
- [2] Shrestha AD, Vedsted P, Kallestrup P, *et al.* Prevalence and incidence of oral cancer in low- and middle-income countries: a scoping review[J]. *European Journal of Cancer Care*,2020,29(2):e13207.
- [3] Magnes T, Wagner S, Kiem D, *et al.* Prognostic and predictive factors in advanced head and neck squamous cell carcinoma[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2021,22(9):4981.
- [4] Zhang SK, Zheng R, Chen Q, *et al.* Oral cancer incidence and mortality in China,2011[J]. *Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu*,2015,27(1):44-51.
- [5] Cardona-Mendoza A, Olivares-Niño G, Díaz-Báez D, *et al.* Chemopreventive and anti-tumor potential of natural products in oral cancer[J]. *Nutrition and Cancer*,2022,74(3):779-795.
- [6] Chimento A, De Amicis F, Sirianni R, *et al.* Progress to improve oral bioavailability and beneficial effects of resveratrol[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2019,20(6):1381.
- [7] 陈虹君,雷奇,王治林,等.基于网络药理学和分子对接的白藜芦醇治疗口腔鳞状细胞癌的机制研究[J].*口腔疾病防治*,2024,32(3):178-187.
- [8] Chen L, Xia JS, Wu JH, *et al.* Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma cells proliferation while promoting apoptosis through inhibition of CBX7 protein[J]. *Environmental Toxicology*,2020,35(11):1234-1240.
- [9] Tao Y, Liu Y, Dong Z, *et al.* Cellular hypoxia mitigation by dandelion-like nanoparticles for synergistic photodynamic therapy of oral squamous cell carcinoma[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*,2022,14(39):44039-44053.
- [10] Yu XD, Yang JL, Zhang WL, *et al.* Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest[J]. *Tumour Biology*,2016,37(3):2871-2877.
- [11] Wu QQ, Zhao M, Huang GZ, *et al.* Fibroblast activation protein (FAP) overexpression induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in oral squamous cell carcinoma by down-regulating dipeptidyl peptidase 9 (DPP9)[J]. *OncoTargets and Therapy*,2020,13:2599-2611.
- [12] Horny K, Sproll C, Peiffer L, *et al.* Mesenchymal - epithelial transition in lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma is accompanied by ZEB1 expression[J]. *Journal of Translational Medicine*,2023,21(1):267.
- [13] Zeng YT, Liu XF, Yang WT, *et al.* REX1 promotes EMT-induced cell metastasis by activating the JAK2/STAT3-signaling pathway by targeting SOCS1 in cervical cancer[J]. *Oncogene*,2019,38(43):6940-6957.
- [14] Wang M, Estrella JS, Katz MH, *et al.* Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in treated pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Pancreas*,2019,48(10):1367-1372.
- [15] Guerra E, Trerotola M, Relli V, *et al.* Trop-2 induces ADAM10-mediated cleavage of E-cadherin and drives EMT-less metastasis in colon cancer[J]. *Neoplasia*,2021,23(9):898-911.
- [16] 陈虹,潘琦文,李建湘,等. RNAi 沉默 N-cadherin 通过 MEK-ERK 信号通路抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭、迁移及上皮-间质转化过程[J]. *西部医学*,2022,34(8):1140-1146.
- [17] 李秀,聂敏海,刘旭倩,等. E-钙粘蛋白、 β -连环素和基质金属蛋白酶-7 与口腔鳞状细胞癌分化程度的关系[J]. *西南医科大学学报*,2020,43(2):124-129.
- [18] Chandolia B, Rajliwal JP, Bajpai M, *et al.* Prognostic potential of N-cadherin in oral squamous cell carcinoma via immunohistochemical methods[J]. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan*,2017,27(8):475-478.
- [19] 戴思远,蒋婕,韩端,等. 口腔鳞状细胞癌中乙酰肝素酶、E-cadherin、N-cadherin 的表达及其意义[J]. *中华全科医学*,2022,20(6):948-951,1079.
- [20] 叶婷婷,陈蔚华,裴婧,等. NEK2 与 EMT 相关分子在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *上海口腔医学*,2023,32(6):640-644.
- [21] Wang H, Wu JX, Chen XP, *et al.* Expression and clinical significance of MMP-28 in bladder cancer[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*,2020,19:1533033820974017.
- [22] Ignacio Casal J, Bartolomé RA. Beyond N-cadherin, relevance of cadherins 5,6 and 17 in cancer progression and metastasis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2019,20(13):3373.
- [23] Zaib S, Hayyat A, Ali N, *et al.* Role of mitochondrial membrane potential and lactate dehydrogenase A in apoptosis[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*,2022,22(11):2048-2062.
- [24] Sun X, Xu Q, Zeng L, *et al.* Resveratrol suppresses the growth and metastatic potential of cervical cancer by inhibiting STAT3Tyr705 phosphorylation[J]. *Cancer Medicine*,2020,9(22):8685-8700.
- [25] Singla RK, Sai CS, Chopra H, *et al.* Natural products for the management of castration-resistant prostate cancer: special focus on nanoparticles based studies[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*,2021,9:745177.
- [26] Kundu S, Sarkar S, Acharya Chowdhury A. Anti-leukemic attributes of natural compounds targeting autophagy: a closer look into the molecular mechanisms[J]. *Nutrition and Cancer*,2024,76(3):236-251.
- [27] Sim DY, Sohng JK, Jung HJ. Anticancer activity of 7,8-dihydroxyflavone in melanoma cells via downregulation of α -MSH/cAMP/MITF pathway[J]. *Oncology Reports*,2016,36(1):528-534.
- [28] Tang B, Zhu J, Wang Y, *et al.* Targeted xCT-mediated ferroptosis and protumoral polarization of macrophages is effective against HCC and enhances the efficacy of the anti-PD-1/L1 response[J]. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*,2023,10(2):e2203973.
- [29] Wang J, Huang P, Pan X, *et al.* Resveratrol reverses TGF- β 1-mediated invasion and metastasis of breast cancer cells via the SIRT3/AMPK/autophagy signal axis[J]. *Phytotherapy Research*,2023,37(1):211-230.
- [30] Yuan L, Zhou M, Huang D, *et al.* [Corrigendum] Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial-mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*,2022,26(6):354.

(收稿日期:2024-10-09)

修回日期:2024-11-22)