

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.202440445

· 基础研究 ·

毛兰素对口腔鳞状细胞癌细胞增殖和凋亡的影响及机制

王瑞瑞^{1,2}, 谢李³, 王基栋¹

1. 中南大学湘雅医学院附属常德医院(常德市第一人民医院)口腔颌面外科,湖南 常德(415000); 2. 中南大学湘雅三医院放射科,湖南 长沙(410013); 3. 湖南省肿瘤医院/湘雅医学院附属肿瘤医院头颈外科,湖南 长沙(410013)

【摘要】 目的 探讨毛兰素(Erianin)对人口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)细胞增殖和凋亡的影响,为OSCC的临床治疗提供研究基础。方法 使用0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的毛兰素处理OSCC细胞CAL27和SCC9;采用CCK-8和软琼脂集落形成实验检测毛兰素对OSCC细胞增殖的抑制作用。通过蛋白免疫印迹法(Western blot)分析毛兰素在OSCC细胞中对抗凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-超大(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)及凋亡蛋白裂解型半胱天冬酶3(cleaved-Caspase 3, c-Caspase 3)表达的影响。通过caspase 3活性检测试剂盒,进一步分析毛兰素在OSCC细胞中的促凋亡效应。通过质粒转染构建过表达Mcl-1的CAL27细胞,并通过Western blot和caspase 3活性测定分析Mcl-1对毛兰素作用于CAL27细胞的影响。获得湖南省肿瘤医院动物实验伦理委员会审批,构建CAL27裸鼠移植瘤模型并随机分为两组($n=5$),给药组腹腔注射毛兰素(25 mg/kg),对照组注射磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。利用免疫组化方法检测肿瘤组织中Ki67和Mcl-1的表达水平。结果 毛兰素呈剂量依赖性抑制CAL27和SCC9细胞的增殖,并下调了Mcl-1的蛋白表达,而对Bcl-2和Bcl-xL的影响较小。此外,毛兰素诱导OSCC细胞发生凋亡,表现为c-Caspase 3蛋白表达水平增加,caspase 3的活性增强($P<0.001$)。过表达Mcl-1则可以抑制毛兰素诱导的c-Caspase 3蛋白水平的增加及caspase 3活性水平。体内实验结果与体外一致,毛兰素处理后,CAL27细胞在裸鼠体内的生长受到抑制($P<0.001$),肿瘤组织中增殖相关分子Ki67及抗凋亡分子Mcl-1的表达水平下调($P<0.001$)。结论 毛兰素具有较好的抗肿瘤效果,能够有效抑制OSCC细胞的增殖并促使其凋亡,其机制可能涉及下调促存活蛋白Mcl-1的表达水平。

【关键词】 口腔鳞状细胞癌; 毛兰素; 天然化合物; 促存活蛋白; 髓样细胞白血病-1; 细胞凋亡; 细胞增殖; 抗肿瘤机制

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2025)03-0186-09

【引用著录格式】 王瑞瑞, 谢李, 王基栋. 毛兰素对口腔鳞状细胞癌细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 口腔疾病防治, 2025, 33(3): 186-194. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.202440445.

Effects and mechanisms of Erianin on proliferation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells
WANG Ruirui^{1,2}, XIE Li³, WANG Jidong¹. 1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Changde Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University (The First People's Hospital of Changde City), Changde 415000, China; 2. Department of Radiology, the 3rd Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China; 3. Department of Head and Neck Surgery, Hunan Cancer Hospital/the Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Changsha 410013, China

Corresponding author: WANG Jidong, Email: wangjidong0212@163.com, Tel: 86-15674266308

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Erianin on cell proliferation and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, providing a research foundation for the clinical treatment of OSCC. **Methods** Eri-



微信公众号

【收稿日期】 2024-11-12; **【修回日期】** 2025-01-21

【基金项目】 湖南省自然科学基金项目(2024JJ9261)

【作者简介】 王瑞瑞, 硕士研究生, Email: 228311106@csu.edu.cn

【通信作者】 王基栋, 主治医师, 硕士, Email: wangjidong0212@163.com, Tel: 86-15674266308

arin was applied to OSCC cells (CAL27 and SCC9) at concentrations of 0, 2.5, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$. The inhibitory effect of Erianin on OSCC cell proliferation was evaluated using CCK-8 and soft agar colony formation assays. Western blotting (WB) was employed to analyze the expression levels of anti-apoptotic proteins B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), and apoptotic protein cleaved-Caspase 3 (c-Caspase 3) in OSCC cells. Caspase 3 activity was further assessed using a caspase 3 activity detection kit to examine the pro-apoptotic effect of Erianin in OSCC cells. Mcl-1 overexpression was induced in CAL27 cells via plasmid transfection, and the influence of Mcl-1 on the effects of Erianin in CAL27 cells was analyzed by WB and caspase 3 activity measurement. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Hunan Cancer Hospital. A CAL27 xenograft mouse model was established and randomly divided into two groups ($n = 5$): the treatment group received intraperitoneal injection of Erianin (25 mg/kg), while the control group was injected with phosphate-buffered saline (PBS) as the vehicle. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression levels of Ki67 and Mcl-1 in the tumor tissues. **Results** Erianin inhibited the proliferation of CAL27 and SCC9 cells in a dose-dependent manner and downregulated the protein expression of Mcl-1, with minimal effects on Bcl-2 and Bcl-xL. Furthermore, Erianin induced apoptosis in OSCC cells, as evidenced by increased expression of c-Caspase 3 and enhanced caspase 3 activity ($P < 0.001$). Overexpression of Mcl-1 inhibited the Erianin-induced increase in c-Caspase 3 protein levels and caspase 3 activity. *In vivo* results were consistent with the *in vitro* findings. After Erianin treatment, CAL27 cell growth in nude mice was suppressed ($P < 0.001$), and the expression levels of the proliferation marker Ki67 and the anti-apoptotic protein Mcl-1 in the tumor tissues were downregulated ($P < 0.001$). **Conclusion** Erianin exhibits potent anti-tumor effects, effectively inhibiting the proliferation of OSCC cells and inducing apoptosis. The underlying mechanism may involve the downregulation of the pro-survival protein Mcl-1.

【Key words】 oral squamous cell carcinoma; Erianin; natural compounds; pro-survival proteins; myeloid cell leukemia-1; cell apoptosis; cell proliferation; anti-tumor mechanism

J Prev Treat Stomatol Dis, 2025, 33(3): 186-194.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from the Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2024JJ9261).

口腔癌主要包括舌、牙龈、颊黏膜、口底、硬腭等部位^[1]。90%的口腔癌是口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC),主要风险因素是嚼槟榔、吸烟和长期饮酒^[2]。目前,OSCC患者的早期标准治疗是手术,晚期是手术联合化疗、放疗或靶向治疗^[3]。尽管治疗方法不断迭代和完善,并在一定程度上提高了OSCC患者的生活质量,但总体生存率并未提高,晚期OSCC患者5年生存率仍然小于50%^[4]。此外,癌细胞的耐药性也限制了OSCC的治疗疗效^[5-6]。因此,寻找可能的前景药物对于提高OSCC的治疗效果至关重要。

毛兰素(Erianin, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$)是一种从石斛中提取的天然二苄基化合物。具有解热镇痛、抗血管生成、抗氧化和抗糖尿病的活性^[7-9]。随着研究的深入,毛兰素在多种癌症中的抗肿瘤活性已在研究中得到广泛验证。例如,在胰腺癌中,毛兰素有效抑制了胰腺癌细胞的增殖和迁移,并促进细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成,从而诱导细胞凋亡。进一步机制研究发现,毛兰素是通过调控蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/叉

头盒蛋白O1(forkhead box O1, FOXO1)和凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)/c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)信号通路,抑制胰腺癌细胞增殖^[10]。此外,毛兰素还通过触发铁死亡机制,抑制肺癌细胞的干性特征,并显著增强其对化疗的敏感性^[11]。Chen等^[12]评估了毛兰素对OSCC的影响,并观察到细胞周期停滞、细胞凋亡和自噬增加,Luo等^[13]发现毛兰素能显著抑制蛋白棕榈酰硫酯酶1(protein-palmitoyl thioesterase 1, PPT1)和雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)信号的转达来发挥抗肿瘤作用,田绣云^[14]从OSCC癌细胞内铁死亡视角出发,揭示了毛兰素可能通过抑制铁死亡相关蛋白NF-E2相关因子2(NF-E2-related factor 2, Nrf2),血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)及谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的表达来发挥抗肿瘤的积极作用。尽管这些研究已初步揭示了毛兰素在OSCC治疗中的潜力,但其深层次的作用机制

及其在生物体内的抗肿瘤活性,仍是一个亟待全面探讨与阐明的课题。因此,本研究旨在以 OSCC 细胞系 CAL27 和 SCC9 为模型,评估毛兰素对 OSCC 增殖和存活的影响,并初步探讨其在 OSCC 中的抗肿瘤作用及潜在分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞系及实验动物

CAL27、SCC9 细胞购自美国生物标准品资源中心(American type culture collection, ATCC, Manassas, VA),并根据制造商的说明,将细胞培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,待细胞融合度达到 80% 时进行传代。每 2 个月进行一次细胞遗传学检测。6 周龄 SPF 级雌性裸鼠 10 只,平均体重 20 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证:SCXK(湘)2021-0002。动物实验经湖南省肿瘤医院动物实验伦理委员会审查通过(审批号:2023-236)。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、DMEM/F12 培养基和双抗生素(青霉素和链霉素, P/S)(C2910-0500、C3130-0500、C3420-0100, VivaCell, 中国);PBS(G4202-500ML, Servicebio, 中国);一抗兔单克隆髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)抗体(5453s, Cell Signaling Technology, 美国),一抗兔单克隆 cleaved-Caspase 3 抗体(9664, Cell Signaling Technology, 美国),一抗兔单克隆 B 细胞淋巴瘤-超大(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)抗体(2764s, Cell Signaling Technology, 美国),一抗兔单克隆 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(4223, Cell Signaling Technology, 美国),抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶标记抗体(7076, Cell Signaling Technology, 美国),抗兔 IgG-辣根过氧化物酶标记抗体(7074, Cell Signaling Technology, 美国), β -actin 抗体(A5316, Sigma, 美国),Ki67 抗体(ab16667, Abcam, 英国);毛兰素(HY-N0517, MedChemexpress, 美国);Cell Counting Kit-8(CCK-8)(HY-K0301, MedChemexpress, 美国);RIPA Buffer(89900, Thermo Fisher Scientific, 美国);BCA 蛋白定量试剂盒(23225, Thermo Fisher Scientific, 美国);caspase 3 assay kit(ab39383, Abcam, 英国);Mcl-1 质粒(RC200521, OriGene, 美国);pCMV-Myc 质粒(VT1064, 优宝生物, 中国)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 实验检测毛兰素处理后 OSCC 细胞活力水平 将 OSCC 细胞 CAL27 和 SCC9(2×10^3 个细胞/孔)分别接种到 96 孔板中,并用毛兰素处理(0、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$)24 h 后,将 CCK-8 加入每个孔中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 避光孵育 1~2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度,并根据 OD 值计算每株细胞的 IC_{50} 值。细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)] $\times 100\%$ 。实验孔:含 OSCC 细胞、培养基、CCK-8 溶液和 Erianiin;对照孔:含 OSCC 细胞、培养基、CCK-8 溶液,不含 Erianiin;空白孔:含培养基、CCK-8 溶液,不含 OSCC 细胞、Erianiin。

1.3.2 软琼脂集落形成实验检测毛兰素对 OSCC 的抑制作用 将 OSCC 细胞 CAL27 和 SCC9(8×10^3 个细胞/孔)分别悬浮于 1 mL 含 10% FBS 的 0.3% 琼脂溶液中,接种至含不同浓度毛兰素(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)和 0.6% 琼脂基底的 6 孔板中,在室温下水平放置 10 min,待上层琼脂凝固后移入培养箱,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 2 周,期间静置。最后用显微镜观察并统计克隆形成情况。

1.3.3 Western blot 实验检测目的分子(Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1、c-Caspase 3、 β -actin)的蛋白表达水平 将 OSCC 细胞 CAL27 和 SCC9 分别用毛兰素(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h 之后,使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液中的蛋白浓度。取等质量的蛋白样品,通过变性不连续十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,并转膜至硝酸纤维素膜。将膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h,随后与特异性一抗(Bcl-xL, 1:1 000; Bcl-2, 1:1 000; Mcl-1, 1:1 000; c-Caspase 3, 1:1 000; β -actin, 1:10 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。之后,用 1 \times TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。接着,将膜与二抗(mouse/rabbit IgG HRP, 1:10 000)在室温下孵育 1 h,再用 1 \times TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后,通过化学发光法检测目的分子(Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1、c-Caspase 3、 β -actin)的蛋白表达水平。

1.3.4 caspase 3 活性检测证明毛兰素促进 OSCC 细胞凋亡 将 CAL27 细胞用毛兰素(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)/顺铂(5 $\mu\text{mol/L}$)处理后,收集细胞并用 PBS 洗涤,随后使用 caspase 3 assay kit 提供的裂解缓冲液裂解细胞。离心后取上清液,加入反应缓冲

液和 caspase 3 底物 (DEVD-AFC), 在荧光酶标仪中测定 400 nm 激发和 505 nm 发射的荧光强度, 以检测 caspase 3 活性水平。为了评估毛兰素处理对 caspase 3 活性的影响, 顺铂 (5 $\mu\text{mol/L}$) 作为阳性对照组, 0 $\mu\text{mol/L}$ 毛兰素作为阴性对照组进行比较。

1.3.5 质粒转染构建过表达 Mcl-1 的 CAL27 细胞
将 Mcl-1 质粒转染到 CAL27 细胞中, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染。按照推荐比例将 Mcl-1 质粒与 Lipofectamine 2000 混合 [目的质粒 (μg): Lipofectamine 2000 (μL) = 1:2], 静置 5~20 min 以形成转染复合物, 然后将其加入至 CAL27 细胞培养基中, 继续培养 48 h。以 pCMV- Myc 质粒为阴性对照, 按上法转染。转染后, 使用 Western blot 方法检测 Mcl-1 的表达。

1.3.6 构建异种移植瘤模型体内验证毛兰素的抗肿瘤作用
将 CAL27 (2×10^6) 细胞接种于 6 周龄雌性裸鼠右侧腋下, 建立异种移植瘤裸鼠模型。每 2 d 检测一次肿瘤体积和裸鼠体重。当肿瘤体积达到 100 mm^3 时, 将已形成肿瘤的小鼠随机分为两组 ($n = 5$)。给药治疗组腹腔注射毛兰素 (PBS 为溶剂, 25 mg/kg , 2 d/次), 对照组小鼠给予等量的 PBS 注射。肿瘤体积根据以下公式确定: 长 \times 宽 \times 宽/2 (mm^3)。达到实验终点后 (本实验终点为对照组裸鼠肿瘤体积达到 800 mm^3), 将裸鼠安乐死, 取出肿瘤组织, 称重, 用 4% 多聚甲醛固定, 随后进行免疫组化分析。

1.3.7 免疫组织化学分析检测异种移植肿瘤组织中 Ki67 和 Mcl-1 的表达水平
将肿瘤组织切片进行脱蜡并用二甲苯和乙醇再水化, 然后浸入 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH=6.0) 中煮沸 10 min 以实现抗原回收。用 ddH_2O 洗涤 3 次后, 将载玻片放置于含 3% 双氧水孵育 10 min 以淬灭过氧化物酶。然后用 50% 山羊血清白蛋白封闭 1 h, 封闭完成后, 去

除上述封闭液, 在组化圈内滴加配好的一抗稀释液 (Ki67, 1:200; Mcl-1, 1:100), 将切片小心平放于孵育盒 (湿盒) 内, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第二天, 吸去一抗, 玻片用 PBS 洗涤, 洗涤过程于脱色摇床上进行, 每次 5 min, 洗 3 次。洗涤干净后, 用相应的二抗在室温下孵育 50 min。最后使用二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色液观察, 苏木精用于复染, 脱水封片后可用显微镜观察玻片。Ki67 阳性信号主要位于细胞核内, 表现为细胞核染色; Mcl-1 阳性信号主要位于细胞质中, 表现为细胞质染色, 阳性表达均呈棕褐色。

1.4 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析。数据以均值 \pm 标准差表示。两组间比较采用独立样本 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。

2 结果

2.1 毛兰素在体外抑制口腔鳞状细胞癌细胞的活力

CCK-8 结果显示, 随着毛兰素浓度的增加, CAL27 和 SCC9 细胞的活力逐渐下降, 且两者均表现出明显的剂量依赖性。在 CAL27 细胞中, 毛兰素的 IC_{50} 值为 6.645 $\mu\text{mol/L}$ (图 1a), 而在 SCC9 细胞中, IC_{50} 值为 5.094 $\mu\text{mol/L}$ (图 1b)。这些结果表明, 毛兰素对 OSCC 细胞的活力具有浓度依赖性抑制作用。

随着毛兰素浓度的增加, OSCC 细胞系的克隆形成能力逐渐受到抑制 (图 2a)。其中, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的毛兰素能够使克隆形成效率下降超过 50%, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 的毛兰素几乎完全阻断了 CAL27 (图 2b) 和 SCC9 (图 2c) 细胞的非依赖性停泊生长。这些结果表明, 毛兰素显著抑制了 OSCC 细胞的增殖,

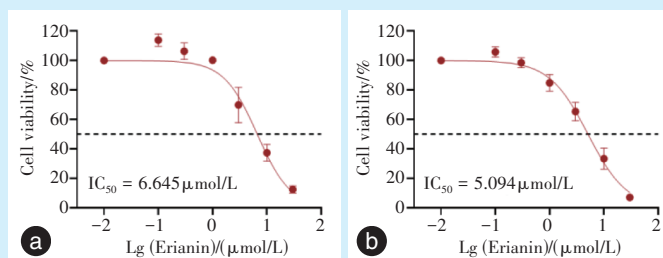
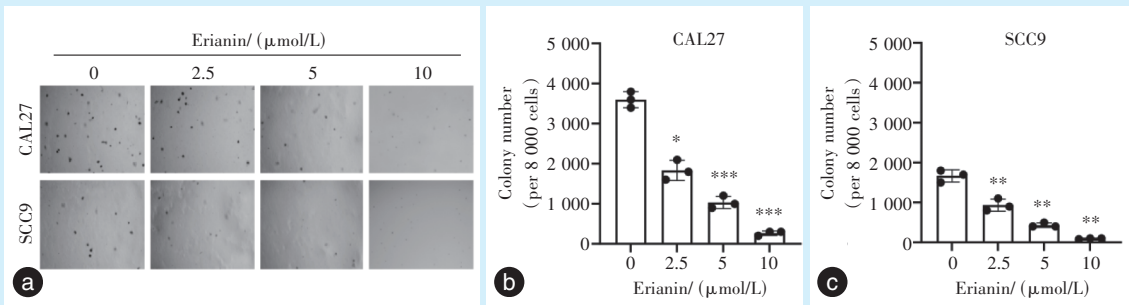


Figure 1 Cell viability of CAL27 and SCC9 cells treated with Erianin were detected by CCK-8

图1 CCK-8检测毛兰素处理CAL27和SCC9细胞后的细胞活力水平

a: CAL27 cells were treated with different concentrations of Erianin, cell viability was assessed using the CCK-8 assay, and the IC_{50} value was calculated; b: SCC9 cells were treated with different concentrations of Erianin, cell viability was assessed using the CCK-8 assay, and the IC_{50} value was calculated. Erianin inhibited the proliferation of CAL27 and SCC9 cells



a: CAL27 and SCC9 cells were treated with different concentrations of Erianin, and soft agar colony formation assays were performed; b-c: the data obtained from figure 2a were subjected to statistical analysis, comparing the 2.5, 5, and 10 μmol/L treatment groups with the control group (0 μmol/L). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 2 Colony formation ability of CAL27 and SCC9 cells treated with Erianin were assessed by soft agar assay

图2 软琼脂实验检测毛兰素处理CAL27和SCC9细胞后的集落形成能力

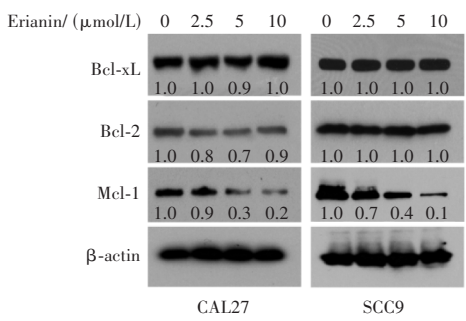
且具有明显的剂量依赖性。

2.2 毛兰素抑制 Mcl-1 的蛋白表达并促进口腔鳞状细胞癌细胞的凋亡

通过 Western blot 检测促存活蛋白 Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1 在毛兰素处理后的表达情况,结果显示毛兰素处理后的 OSCC 细胞中,抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达呈浓度依赖性下降,而 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表

达未见明显变化(图3)。

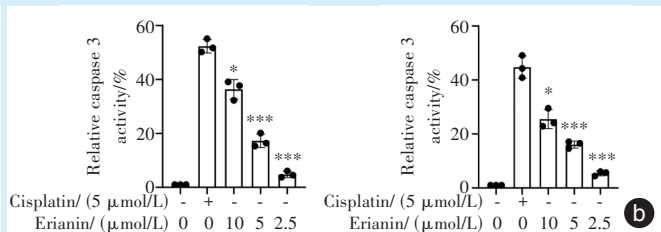
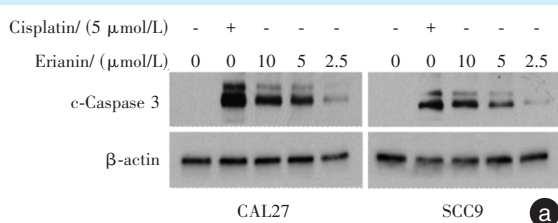
为了进一步证明毛兰素促进 OSCC 细胞凋亡,检测毛兰素处理后的 CAL27 和 SCC9 细胞中,c-Caspase 3 的蛋白表达情况以及 caspase 3 的活性。结果表明 c-Caspase 3 的蛋白表达情况呈浓度依赖性上升(图 4a),同时 caspase 3 的活性随着毛兰素浓度的升高显著增加(图 4b),进一步表明毛兰素可能通过内



The CAL27 and SCC9 cells were treated with different concentrations of Erianin, and the whole cell lysates (WCE) were subsequently collected for Western blot analysis to detect the expression levels of Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 and β-actin proteins (β-actin as a loading control). Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; Mcl-1: myeloid cell leukemia-1

Figure 3 Protein expression levels of Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, and β-actin in CAL27 and SCC9 cells treated with Erianin were assessed by Western blot analysis

图3 Western blot 实验检测毛兰素处理CAL27和SCC9细胞后 Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1 和 β-actin 的蛋白表达水平



a: CAL27 and SCC9 cells were treated with different concentrations of Erianin, and whole cell lysates (WCE) were subsequently collected for Western blot analysis to detect the expression levels of c-Caspase 3 and β-actin proteins (β-actin as a loading control), with the Cisplatin group (5 μmol/L) as a positive control and 0 μmol/L Erianin group as a negative control; b: CAL27 (left) and SCC9 (right) cells were treated with different concentrations of Erianin, and then caspase 3 activity was measured using a caspase 3 activity assay kit. The results were subjected to statistical analysis, with the Cisplatin group (5 μmol/L) as a positive control and 0 μmol/L Erianin group as a negative control. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

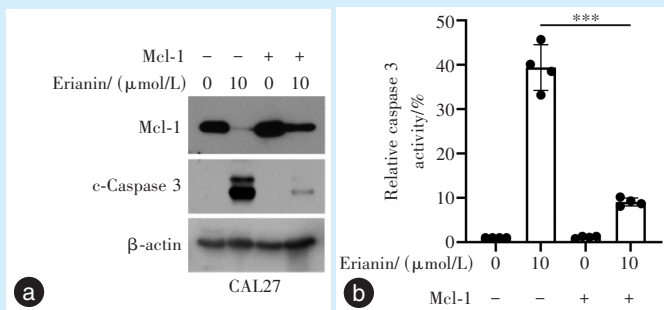
Figure 4 Effects of Erianin treatment on c-Caspase 3 and caspase 3 expression levels in CAL27 and SCC9 cells

图4 毛兰素对CAL27和SCC9细胞中c-Caspase 3和caspase 3表达水平的影响

源性途径诱导细胞凋亡。

此外,还使用了过表达 Mcl-1 的 CAL27 细胞以探讨 Mcl-1 在毛兰素诱导凋亡中的作用。结果显示,

过表达 Mcl-1 显著抑制了毛兰素诱导的 c-Caspase 3 蛋白水平的增加(图 5a),并且 caspase 3 活性也受到明显抑制(图 5b)。



a: the CAL27 cells were transfected with Mcl-1 overexpression plasmid(RC200521) and treated with different concentrations of Erianin. Whole cell lysates (WCE) were subsequently collected for Western blot analysis to detect the expression levels of Mcl-1, c-Caspase 3, and β-actin (used as a loading control), with pCMV - Myc plasmid (VT1064) as the negative control; b: the CAL27 cells were transfected with Mcl-1 overexpression plasmid (RC200521) and treated with various concentrations of Erianin. Caspase 3 activity was then measured using a caspase 3 activity assay kit. The data were analyzed statistically, with pCMV - Myc

plasmid (VT1064) used as the negative control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Mcl-1: myeloid cell leukemia-1

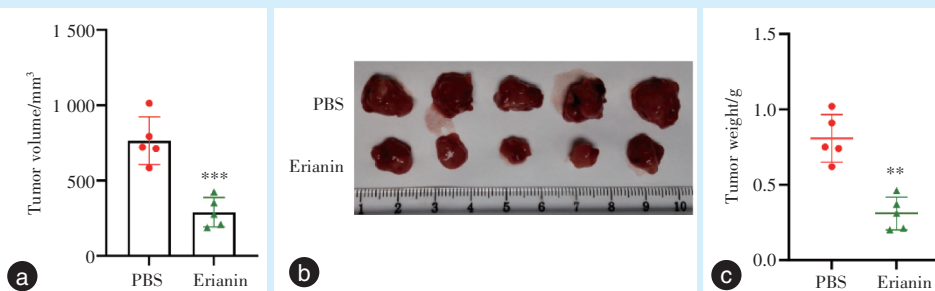
Figure 5 Effect of Mcl-1 overexpression on Erianin-induced c-Caspase 3 and caspase 3 expression levels

图5 过表达 Mcl-1 对毛兰素诱导的 c-Caspase 3 及 caspase 3 表达水平的影响

2.3 毛兰素在体内可抑制口腔鳞状细胞癌细胞生长

使用 CAL27 细胞构建异种移植瘤模型,与对照组相比,毛兰素处理组的肿瘤体积(图 6a)、肿瘤大小(图 6b)、肿瘤重量(图 6c)和肿瘤细胞增殖(Ki67

染色,图 7a 上、图 7b 左)均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IHC 染色表明毛兰素处理可以降低 Mcl-1 的蛋白质表达水平(图 7a 下、图 7b 右)。这些数据表明,毛兰素在体内对 OSCC 细胞具有显著的抑制作用,其作用可能与 Mcl-1 蛋白表达水平的降低密切相关。



a - c: the xenograft tumor model was constructed using CAL27 cells that were randomly divided into two groups ($n = 5$), and the effects of Erianin on tumor volume (a), tumor size (b), and tumor weight (c) were assessed. The PBS group, which received PBS injection, served as the negative control. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 6 Inhibitory effects of Erianin on tumor proliferation and volume changes in an oral squamous cell

carcinoma nude mouse model

图6 毛兰素处理对口腔鳞状细胞癌裸鼠模型中肿瘤增殖与体积变化的抑制作用

3 讨论

OSCC 作为最常见且致命的疾病之一,一直是全球范围内严重的公共卫生挑战^[15]。该疾病本质上具有高度侵袭性,且通常被认为难以治愈,这也导致了其较高的死亡率和不良预后^[16]。研究表明,OSCC 的发病率在世界范围内呈上升趋势^[17]。

因此,深入研究 OSCC 的发病机制,探索新的治疗药物及有效的靶向治疗策略具有重要的临床意义。

近年来,具有抗炎、抗氧化药理活性的中医药及其天然产物一直是研究的热点^[18]。天然产物疗法在各种肿瘤中也取得了一定的进展,如葫芦素 B

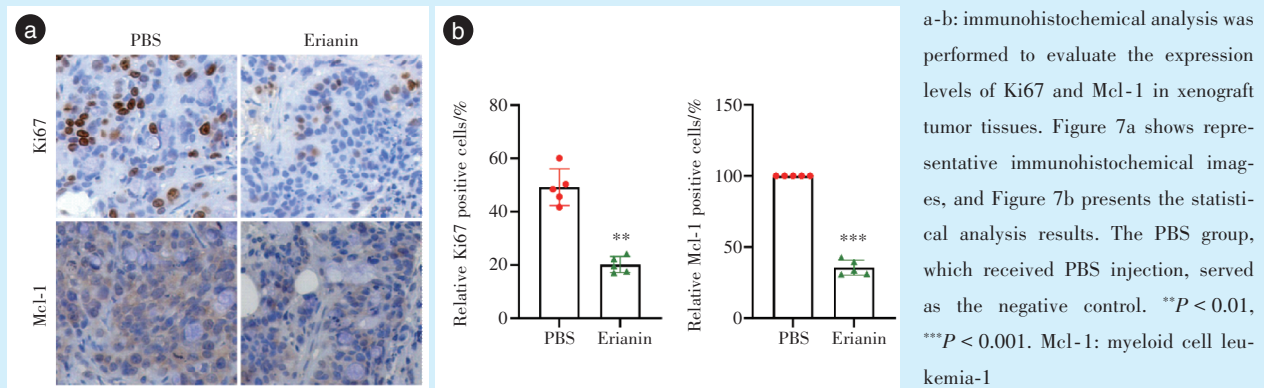


Figure 7 Immunohistochemistry analysis of the effects of Erianin on Ki67 and Mcl-1 protein expression in xenograft tumor tissues

图7 免疫组织化学检测毛兰素对异种移植肿瘤组织中Ki67及Mcl-1蛋白表达水平的影响

(CuB) 在鼻咽癌中通过抑制肿瘤细胞迁移和侵袭,阻滞细胞周期发挥抗肿瘤作用^[19];柠檬内酯(nimbolide)是一种提取自印楝树的一种天然产物,通过调节AKT等信号通路克服细胞保护性自噬的屏蔽作用,从而促进OSCC细胞凋亡^[20];伊拉霉素(Ilamycin E)可通过激活内质网应激,增加C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)表达、下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达来促进细胞凋亡,以时间和剂量依赖性的方式在三阴性乳腺癌中表现出强大的抗癌活性^[21]。因此,研究天然产物在肿瘤发生发展中的抑制作用为癌症治疗提供了更多的潜在治疗剂,对于抗肿瘤具有重要的意义。

毛兰素是从一种被收录于《神农本草经》中的药用兰科植物石斛中提取的天然化合物。越来越多的证据证明毛兰素对多种癌症有潜在治疗作用,包括肝癌、膀胱癌^[22]、乳腺癌^[23]、结直肠癌^[24]等。现有研究表明,毛兰素的水溶性低,具有良好的肠道吸收性,大部分可透过血脑屏障^[25],这一特点对于临床应用具有重要的作用。据研究报告,毛兰素与磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT途径和细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)信号通路均存在一定的关系,以此发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[26-28]。在本研究中观察到,毛兰素抑制了CAL27和SCC9细胞的活力水平,并且对这两种细胞的软琼脂克隆形成能力也表现出了明显的抑制作用。在体内实验中,与对照组相比,给予毛兰素处理也能显著地抑制肿瘤细胞的生长,进一步支持了毛兰素作为潜在抗肿瘤药物的有效性。

这些结果与现有文献中关于毛兰素能够抑制多种人类肿瘤细胞生长的研究一致。例如,毛兰素通过抑制细胞迁移并诱导肺癌细胞死亡来发挥其抗癌活性^[29]。另有研究表明,毛兰素通过调节PISK/AKT信号通路抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖,诱导细胞周期停滞并促进细胞凋亡^[23]。还有研究报告,毛兰素通过诱导铁死亡来抑制胶质瘤干细胞的恶性表型^[30]。鉴于毛兰素具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,进一步探讨了其对OSCC细胞凋亡的影响。本研究结果显示,毛兰素以剂量依赖的方式促进了caspase 3剪切体的形成,并增强了caspase 3的活性。以上发现提示,毛兰素不仅能抑制OSCC细胞的增殖,还能在一定程度上诱导OSCC细胞凋亡。

抗凋亡的Bcl-2家族成员,包括Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w和Mcl-1等,在调控内源性凋亡过程中起着至关重要的作用^[31]。作为Bcl-2家族的核心成员,Mcl-1在多种肿瘤中常常过度表达,并且被认为是化疗和放疗耐药的关键因素之一^[32-33]。Mcl-1定位于线粒体^[34],并能够与促凋亡的Bcl-2家族成员(如Bax、Bak、Bim、Puma、Noxa和Bid等)相互作用,通过拮抗这些促凋亡蛋白的作用,抑制由细胞毒性刺激引发的凋亡反应^[35]。肿瘤细胞在发生凋亡之前,Bcl-2家族促存活蛋白的下调是常见的分子事件之一。本研究发现毛兰素处理OSCC细胞后,未显著改变Bcl-2和Bcl-xL的表达水平,但有效且明显地以剂量依赖的方式抑制了Mcl-1的表达,提示毛兰素在诱导凋亡过程中具有一定的选择性和靶向性。此外,本研究显示,过表达Mcl-1可以显著抑制毛兰素诱导的c-Caspase 3蛋白水平,并且

caspase 3 活性也受到明显抑制。总之,这些发现揭示了毛兰素通过选择性抑制 Mcl-1 来促进 OSCC 细胞的凋亡,且 Mcl-1 在毛兰素诱导的凋亡过程中起着重要的调控作用。这为进一步阐明毛兰素的抗肿瘤机制提供了新的见解,同时也为开发靶向 Mcl-1 的治疗策略提供了理论依据。尽管毛兰素下调 OSCC 中 Mcl-1 表达的现象已被观察到,但其作用于 Mcl-1 并导致其表达下调的具体分子机制,诸如是通过直接干扰 Mcl-1 的转录、翻译过程,还是通过调节上游信号通路间接影响,仍需更为深入和细致的探讨。本研究不仅为毛兰素在 OSCC 治疗中的潜在应用价值提供了实验依据,并进一步揭示了其抗肿瘤的分子机制。

[Author contributions] Wang RR performed the research, analyzed the data and wrote the article. Xie L designed the research study and revised the article. Wang JD conceptualized and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- Paré A, Joly A. Oral cancer: risk factors and management[J]. *Presse Med*, 2017, 46(3): 320-330. doi:10.1016/j.lpm.2017.01.004.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. doi:10.3322/caac.21660.
- 曹显, 陈佳琳, 张锐, 等. RAD54L 在口腔鳞状细胞癌中的表达及功能研究[J]. *口腔疾病防治*, 2024; 32(11): 853-862. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.202440243.
- Cao X, Chen JL, Zhang R, et al. Study on expression and function of RAD54L in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2024; 32(11): 853 - 862. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.202440243.
- 田亮亮, 南欣荣. NLR 对局晚期口腔鳞状细胞癌患者术前尼妥珠单抗联合新辅助化疗疗效预测价值研究[J]. *口腔疾病防治*, 2024, 32(5): 359-366. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2024.05.005.
- Tian LL, Nan XR. The value of NLR in predicting the efficacy of preoperative nimotuzumab combined with neoadjuvant chemotherapy for local advanced oral squamous cell carcinoma[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2024, 32(5): 359 - 366. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2024.05.005.
- Zhu W, Wang J, Liu X, et al. lncRNA CYTOR promotes aberrant glycolysis and mitochondrial respiration via HNRNPC-mediated ZEB1 stabilization in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 703. doi:10.1038/s41419-022-05157-1.
- Schmitz S, Ang KK, Vermorken J, et al. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(3): 390-404. doi:10.1016/j.ctrv.2013.09.007.
- Su C, Zhang P, Liu J, et al. Erianin inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase - induced tumor angiogenesis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 521-528. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.090.
- Lam Y, Ng TB, Yao RM, et al. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in dendrobium plants[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 841752. doi:10.1155/2015/841752.
- Ma L, Li M, Zhang Y, et al. Recent advances of antitumor leading compound erianin: mechanisms of action and structural modification[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 261: 115844. doi: 10.1016/j.ej-mech.2023.115844.
- Liu R, Qiu M, Deng X, et al. Erianin inhibits the progression of pancreatic cancer by directly targeting AKT and ASK1[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 348. doi:10.1186/s12935-024-03533-9.
- Ly J, Wang Z, Liu H. Erianin suppressed lung cancer stemness and chemotherapeutic sensitivity via triggering ferroptosis[J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(2): 479-486. doi:10.1002/tox.23832.
- Chen YT, Hsieh MJ, Chen PN, et al. Erianin induces apoptosis and autophagy in oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(1): 183-200. doi:10.1142/S0192415X2050010X.
- Luo Q, Li X, Gan G, et al. PPT1 reduction contributes to erianin-induced growth inhibition in oral squamous carcinoma cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 764263. doi: 10.3389/fcell.2021.764263.
- 田绣云. 石斛提取物毛兰素对口腔癌细胞的作用及机制研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2023.
- Tian XY. Effect and mechanism of erianin from dendrobium extract on oral cancer cells [D]. Bengbu: Bengbu Medical College, 2023.
- Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, et al. Oral diseases: a global public health challenge[J]. *Lancet*, 2019, 394(10194): 249-260. doi:10.1016/S0140-6736(19)31146-8.
- Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3.
- Du M, Nair R, Jamieson L, et al. Incidence trends of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers: global burden of disease 1990-2017 [J]. *J Dent Res*, 2020, 99(2): 143 - 151. doi: 10.1177/0022034519894963.
- Yan X, Yao C, Fang C, et al. Rocaglamide promotes the infiltration and antitumor immunity of NK cells by activating cGAS - STING signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2): 585-598. doi:10.7150/ijbs.65019.
- Huang S, Cao B, Zhang J, et al. Induction of ferroptosis in human nasopharyngeal cancer cells by cucurbitacin B: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 237. doi:10.1038/s41419-021-03516-y.
- Sophia J, Kowshik J, Dwivedi A, et al. Nimbolide, a neem limonoid inhibits cytoprotective autophagy to activate apoptosis via modulation of the PI3K/Akt/GSK-3 β signalling pathway in oral cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1087. doi:10.1038/s41419-018-1126-4.

- [21] Zhou W, Fang H, Wu Q, et al. Ilamycin E, a natural product of marine actinomycete, inhibits triple-negative breast cancer partially through ER stress-CHOP-Bcl-2[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1723-1732. doi:10.7150/ijbs.35284.
- [22] Xiang Y, Chen X, Wang W, et al. Natural product erianin inhibits bladder cancer cell growth by inducing ferroptosis *via* NRF2 inactivation[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 775506. doi: 10.3389/fphar.2021.775506.
- [23] Xu Y, Fang R, Shao J, et al. Erianin induces triple-negative breast cancer cells apoptosis by activating PI3K/Akt pathway[J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(6): BSR20210093. doi:10.1042/BSR20210093.
- [24] Miao Q, Deng WQ, Lyu WY, et al. Erianin inhibits the growth and metastasis through autophagy - dependent ferroptosis in KRASG13D colorectal cancer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 204: 301-312. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.05.008.
- [25] Yan L, Zhang Z, Liu Y, et al. Anticancer activity of erianin: cancer - specific target prediction based on network pharmacology[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 862932. doi: 10.3389/fmolb.2022.862932.
- [26] Zhang HQ, Xie XF, Li GM, et al. Erianin inhibits human lung cancer cell growth *via* PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4511-4525. doi:10.1002/ptr.7154.
- [27] Yang L, Hu Y, Zhou G, et al. Erianin suppresses hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of PI3K/AKT, p38 and ERK MAPK signaling pathways[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7): BSR20193137. doi:10.1042/BSR20193137.
- [28] Wang Y, Chu F, Lin J, et al. Erianin, the main active ingredient of dendrobium chrysotoxum lindl, inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and *in vitro* experimental verification[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114399. doi:10.1016/j.jep.2021.114399.
- [29] Chen P, Wu Q, Feng J, et al. Erianin, a novel dibenzyl compound in dendrobium extract, inhibits lung cancer cell growth and migration *via* calcium/calmodulin - dependent ferroptosis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 51. doi:10.1038/s41392-020-0149-3.
- [30] Mansuer M, Zhou L, Wang C, et al. Erianin induces ferroptosis in GSCs *via* REST/LRSAM1 mediated SLC40A1 ubiquitination to overcome TMZ resistance[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 522. doi: 10.1038/s41419-024-06902-4.
- [31] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(7): 395 - 417. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- [32] Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9): 1414-1424. doi:10.1038/cdd.2011.17.
- [33] Kapoor I, Bodo J, Hill BT, et al. Targeting BCL-2 in B-cell malignancies and overcoming therapeutic resistance[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 941. doi:10.1038/s41419-020-03144-y.
- [34] Wang H, Guo M, Wei H, et al. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 67. doi: 10.1186/s13045-021-01079-1.
- [35] Maurer U, Charvet C, Wagman AS, et al. Glycogen synthase kinase -3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1[J]. *Mol Cell*, 2006, 21(6): 749-760. doi:10.1016/j.molcel.2006.02.009.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)



Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Copyright © 2025 by Editorial Department of Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases



官网