

# 芒柄花黄素调节RhoA/ROCK信号通路对口腔鳞状细胞癌SCC-25细胞增殖、侵袭及凋亡的影响

李昊阳 王哲 冒符荣 颜承曦\*  
(无锡口腔医院口腔颌面外科, 无锡 214000)

**摘要** 该文旨在探究芒柄花黄素调节RhoA/ROCK信号通路对口腔鳞状细胞癌(OSCC) SCC-25细胞增殖、侵袭及凋亡的影响。用不同浓度芒柄花黄素干预人OSCC细胞系 SCC-25后, 采用CCK-8实验筛选芒柄花黄素最佳干预浓度。将SCC-25细胞随机分为正常组、芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组、芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组, 用芒柄花黄素、空载质粒和RhoA过表达质粒分组干预后通过 Western blot实验检测各组细胞 RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达情况; 利用 CCK-8、克隆形成实验检测各组细胞增殖情况; 用流式细胞实验检测各组 SCC-25细胞凋亡情况; 采用 Transwell、Western blot实验分别检测各组细胞侵袭和上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白表达情况; 皮下接种 SCC-25细胞制备 OSCC 移植瘤裸鼠, 以同样方法分组后用芒柄花黄素、空载质粒和 RhoA 过表达质粒分组干预, 测定各组裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积; 利用 Western blot实验分别检测各组裸鼠移植瘤 EMT 和 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白表达情况。与正常组比较, 芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组细胞活力、集落形成数、细胞侵袭数、移植瘤的瘤体质量与体积以及 RhoA、ROCK1、ROCK2、N-cadherin 与 Vimentin 蛋白表达水平均降低 ( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、E-cadherin 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ )。与芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组细胞活力、集落形成数、细胞侵袭数量、移植瘤的瘤体质量与体积以及 RhoA、ROCK1、ROCK2、N-cadherin 与 Vimentin 蛋白表达水平均升高 ( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、E-cadherin 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ ); 芒柄花黄素+pcDNA组各指标无明显变化 ( $P>0.05$ )。芒柄花黄素可抑制 RhoA/ROCK 信号通路激活, 进而阻碍 OSCC 细胞增殖、EMT 和侵袭, 促进其凋亡。

**关键词** 芒柄花黄素; RhoA/ROCK; 口腔鳞状细胞癌; 增殖; 侵袭; 凋亡

## Impacts of Formononetin on the Proliferation, Invasion, and Apoptosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell SCC-25 by Regulating RhoA/ROCK Signaling Pathway

LI Haoyang, WANG Zhe, MAO Furong, YAN Chengxi\*

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Wuxi Stomatological Hospital, Wuxi 214000, China)

**Abstract** This study aims to discuss the impacts of formononetin on the proliferation, invasion, and apoptosis of OSCC (oral squamous cell carcinoma) cells by regulating RhoA/ROCK signaling pathway. After intervention of the human OSCC cell line SCC-25 with different concentrations of formononetin, CCK-8 experiments were performed to screen for the optimal intervention concentration of formononetin. SCC-25 cells were randomly assigned into normal group, formononetin group, formononetin+pcDNA group, and formononetin+pcDNA-RhoA

收稿日期: 2025-03-18

接受日期: 2025-06-17

\*通信作者。Tel: 18751569918, E-mail: 479218770@qq.com

Received: March 18, 2025

Accepted: June 17, 2025

\*Corresponding author. Tel: +86-18751569918, E-mail: 479218770@qq.com

group. After grouping and intervention with formononetin, empty vector plasmids and RhoA overexpression plasmids, Western blot experiments were performed to detect the RhoA/ROCK signaling pathway related proteins in each group. CCK-8 and clone formation experiments were conducted to detect cell proliferation in each group. Flow cytometry experiments were conducted to detect apoptosis of SCC-25 cells in each group. Transwell and Western blot experiments were conducted to detect the invasion and EMT (epithelial-mesenchymal transition) related proteins in each group. OSCC transplanted tumor nude mice were prepared by subcutaneous inoculation of SCC-25 cells, and were grouped using the same method and intervened with formononetin, empty vector, and RhoA overexpression plasmids, and the mass and volume of transplanted tumors in nude mice were measured in each group. Western blot experiments were conducted to detect the EMT and RhoA/ROCK signaling pathway related proteins in transplanted tumors of nude mice in each group. Compared with the normal group, the cell viability, colony formation number, number of cell invasions, tumor mass and volume of transplanted tumors, RhoA, ROCK1, ROCK2, N-cadherin, and Vimentin protein expression levels in the formononetin group and formononetin+pcDNA group were lower ( $P<0.05$ ), while the cell apoptosis rate and E-cadherin protein expression level were higher ( $P<0.05$ ). Compared with the formononetin group, the cell viability, colony formation number, number of cell invasions, tumor mass and volume of transplanted tumors, RhoA, ROCK1, ROCK2, N-cadherin, and Vimentin protein expression levels in the formononetin+pcDNA-RhoA group were higher ( $P<0.05$ ), while the cell apoptosis rate and E-cadherin protein expression level were lower ( $P<0.05$ ); there were no great changes in the indicators of the formononetin+pcDNA group ( $P>0.05$ ). Formononetin can inhibit the activation of RhoA/ROCK signaling pathway, thereby hindering the proliferation, EMT, and invasion of OSCC cells, and promoting their apoptosis.

**Keywords** formononetin; RhoA/ROCK; oral squamous cell carcinoma; proliferation; invasion; apoptosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔黏膜鳞状上皮细胞发生癌变并出现恶性增殖现象引发的严重疾病,作为一种常见的头颈部恶性肿瘤,具有高侵袭和高转移倾向,难以治愈且致死率较高<sup>[1-2]</sup>。RhoA/ROCK是介导恶性肿瘤发生与进展的重要信号通路,研究显示,RhoA基因突变后过表达是胃癌的致病因素,可通过调控细胞迁移/黏附介导胃癌的发病过程<sup>[3]</sup>,抑制RhoA/ROCK通路激活可抑制缺氧条件下结肠癌肿瘤的生长和转移<sup>[4]</sup>,激活RhoA/ROCK可促进和维持OSCC细胞的恶性增殖,并与OSCC患者的不良预后相关<sup>[5]</sup>,由此可知,抑制RhoA/ROCK信号通路的活化具有潜在的OSCC治疗作用。芒柄花黄素是来自于红车轴草、黄芪等植物的异黄酮类化合物,作为Bax激动剂具有抗癌作用<sup>[6]</sup>,可抑制乳腺癌细胞的增殖、集落形成和侵袭<sup>[7]</sup>,还可诱导咽鳞状细胞癌细胞死亡并抑制其裸鼠体内移植瘤生长<sup>[8]</sup>,另有研究表明,芒柄花黄素可通过下调RhoA表达抑制胰腺肿瘤的异常血管形成<sup>[9]</sup>,因而推测芒柄花黄素可能通过抑制RhoA/ROCK2信号通路激活来治疗OSCC。本文以芒柄花黄素干预OSCC细胞及其

移植瘤裸鼠,探究其调节RhoA/ROCK信号通路对OSCC细胞增殖、侵袭及凋亡的影响,为芒柄花黄素应用于OSCC的治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验细胞与动物 BALB/c-nu裸鼠均购自江苏华创信诺医药科技有限公司,生成许可证号为SCXK(苏)2020-0009,24只裸鼠(SPF级、雄性、6周龄、体质量为19~22 g)均于SPF级动物独立实验室内进行常规饲养,使用许可证号为SYXK(苏)2022-0011,室内湿度、温度分别设为55%~65%、21~24 °C,室内每天保持12 h光照并维持良好通风。本实验符合无锡口腔医院实验动物福利伦理审查要求(2024伦审第68号)。

人OSCC细胞系SCC-25(货号:CC-Y1775)购自上海酶研生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 芒柄花黄素(纯度:98.99%,货号:HY-N0183)、基底膜基质胶、结晶紫染色试剂、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、HRP-二抗(驴抗兔)、CCK-8试剂盒均购自美国MCE公司;β-actin、RhoA、ROCK2、N-cadherin、

ROCK1、E-cadherin和Vimentin一抗(兔源抗人)均购自美国CST公司。

PS300B通用型稳定电源+SE300miniVE小型一体化垂直电泳与转印仪购自美国Hoefer公司; HT2酶标仪购自奥地利Anthos公司; CytoFLEX流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司; EVOS™ M7000倒置显微成像系统购自美国ThermoFisher Scientific公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 芒柄花黄素体外实验最佳干预浓度筛选** 细胞培养: 用39 °C温水浴快速解冻SCC-25细胞, 以DMEM/F12培养基(含10%胎牛血清、0.5 mmol/L丙酮酸钠、400 ng/mL氢化可的松、1%青/链霉素双抗)洗涤后接种在T25培养瓶内, 接种密度为 $1 \times 10^5$ /mL, 并放入进行恒温培养箱中培养, 培养箱内维持37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 当培养瓶底部贴壁生长的SCC-25细胞融合度约为80%时进行传代, 比例为1:3~1:2, 取传代2次的SCC-25细胞进行实验。

SCC-25细胞接种在96孔板中, 接种密度为 $1 \times 10^4$ /孔, 培养至融合度约为70%时用0、5、10、20、30、40  $\mu$ mol/L芒柄花黄素干预<sup>[8]</sup>, 0  $\mu$ mol/L芒柄花黄素干预细胞设为对照组, 同时设置不接种细胞液不进行药物干预的空白对照组, 每组设6个重复孔, 48 h后弃培养基, 用含CCK-8(10  $\mu$ L/孔)的新鲜培养基继续常规培养2 h, 在酶标仪内振荡混匀后测定各干预组细胞吸光度(*D*), 计算各组细胞活力, 计算公式: 细胞活力(%)=[(*D*<sub>药物干预组</sub>-*D*<sub>空白对照组</sub>)/(*D*<sub>对照组</sub>-*D*<sub>空白对照组</sub>)] $\times$ 100%。

**1.2.2 体外分组处理SCC-25细胞** SCC-25细胞接种在24孔板中, 接种密度为 $1 \times 10^4$ /孔, 培养至融合度约为70%时, 将其随机分为4组, 每组6个重复孔, 将细胞进行正常培养、不做药物干预及质粒转染的组设为正常组, 将细胞用20  $\mu$ mol/L芒柄花黄素干预的组设为芒柄花黄素组, 将细胞用20  $\mu$ mol/L芒柄花黄素干预的同时转染空载质粒的组设为芒柄花黄素+pcDNA组, 将细胞用20  $\mu$ mol/L芒柄花黄素干预的同时转染RhoA过表达质粒的组设为芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组, 药物干预及质粒转染细胞均处理48 h。

**1.2.3 体外检测各组细胞RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达情况** 将1.2.2中分组处理后的各组SCC-25细胞置于RIPA裂解液内, 4 °C下裂解提取总蛋白, 于沸水浴内变性后以每组30  $\mu$ g蛋白量上样, 通过电泳(110 V、90 min)分离后进行全

湿式电转, 封闭(37 °C、2 h)蛋白非特异抗原位点, 4 °C下孵育 $\beta$ -actin(1:1 000)、RhoA(1:1 000)、ROCK1(1:1 000)、ROCK2(1:1 000)一抗进行抗原抗体特异性结合, 37 °C下孵育HRP-二抗(1:2 000)后通过ECL进行蛋白显色, 拍摄蛋白图像后定量其灰度值, 用 $\beta$ -actin作为内参蛋白校正并量化各组RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白相对表达水平。

**1.2.4 体外检测各组细胞增殖与凋亡** CCK-8实验: 将SCC-25细胞接种在96孔板中, 接种密度为 $1 \times 10^4$ /孔, 培养至融合度约为70%时按照“1.2.2”中方法进行分组处理, 然后以“1.2.1”项中CCK-8实验方法检测各组SCC-25细胞活力。

克隆形成实验: 用胰酶消化(37 °C、5 min)分组处理后的各组SCC-25细胞后进行收集, 用PBS洗涤(37 °C、1 min)后制为单细胞悬液, 进行细胞计数后稀释, 以每组110个细胞的接种量将各组SCC-25细胞分组接种在24孔板中, 培养2周后弃培养基, 用PBS洗涤1次细胞集落, 用4%多聚甲醛固定(37 °C、10 min)后行结晶紫染色(37 °C、10 min), 显微成像后对各组细胞集落形成数进行定量。

流式细胞实验: 用胰酶消化(37 °C、5 min)分组处理后的各组SCC-25细胞后进行收集, 用PBS洗涤(37 °C、1 min)后制为单细胞悬液, 进行细胞计数后稀释, 以每组 $5 \times 10^5$ 个的细胞量进行Annexin V-FITC/PI双染, 用PBS洗涤(37 °C、1 min)后进行流式细胞实验, 在流式细胞仪内检测后通过FlowJo软件定量各组SCC-25细胞凋亡率。

**1.2.5 体外检测各组细胞侵袭及EMT相关蛋白表达情况** Transwell实验: 用胰酶消化(37 °C、5 min)分组处理后的各组SCC-25细胞后进行收集, 用无血清DMEM/F12培养基洗涤后制为单细胞悬液, 进行细胞计数后稀释, 以每组 $5 \times 10^5$ 个细胞的接种量将各组SCC-25细胞分组接种在24孔Transwell小室(上层用基质胶进行提前包被), 加入不含血清的DMEM/F12培养基培养小室上层内各组SCC-25细胞, 同时于小室下层加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基, 24 h后PBS洗涤小室下层细胞, 用4%多聚甲醛固定(37 °C、10 min)后行结晶紫染色(37 °C、10 min), 显微成像后对各组细胞侵袭数量进行定量。

Western blot实验: 将收集的分组处理后的各组SCC-25细胞置于RIPA内, 4 °C下裂解提取总蛋

白,以“1.2.3”中Western blot实验方法检测各组SCC-25细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白N-cadherin、Vimentin、E-cadherin的相对表达水平。

1.2.6 OSCC移植瘤裸鼠制备、分组与药物干预  
OSCC移植瘤裸鼠制备:用胰酶消化(37℃、5 min)分组处理后的各组SCC-25细胞后进行收集,用无血清DMEM/F12培养基洗涤后制为单细胞悬液,进行细胞计数后将细胞浓度调整为 $5\times 10^6/\text{mL}$ ,皮下注射到裸鼠右腋(100  $\mu\text{L}/\text{只}$ ),7天后皮下触及到肿块且约黄豆大小,即表示OSCC移植瘤裸鼠制备成功<sup>[10]</sup>,共成功制备24只。

分组与药物干预:将OSCC移植瘤裸鼠随机分为正常组、芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组、芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组,每组6只。芒柄花黄素组裸鼠每隔一天灌胃10 mg/kg芒柄花黄素(溶于生理盐水,灌胃5 mL/kg)<sup>[8]</sup>,芒柄花黄素+pcDNA组裸鼠以同样方式灌胃10 mg/kg芒柄花黄素的同时每隔一天瘤内注射100  $\mu\text{g}$ 空载质粒(溶于生理盐水,注射体积100  $\mu\text{L}$ ),芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组裸鼠以同样方式灌胃10 mg/kg芒柄花黄素的同时每隔一天瘤内注射100  $\mu\text{g}$  RhoA过表达质粒,正常组裸鼠以同样方式灌胃与瘤内注射生理盐水,持续干预3周。

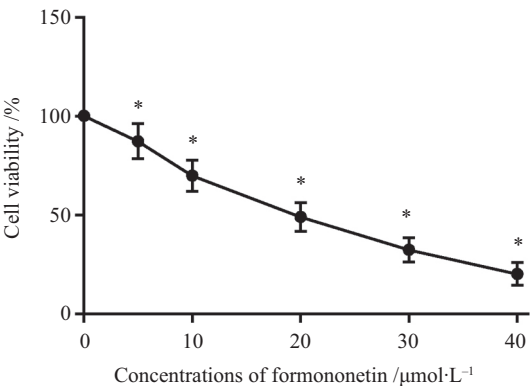
1.2.7 检测裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积以及EMT和RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达情况  
对药物干预结束后的各组OSCC移植瘤裸鼠进行安乐死,剪开右腋部位皮肤取出移植瘤,拍照后用电子天平测定其瘤体质量,用游标卡尺测定瘤体最长轴和最短轴长度分别作为瘤体长( $L$ )和宽( $W$ ),计算瘤体体积

( $V$ ),计算公式:  $V=(L\times W^2)/2$ 。  
于冰上分别剪取各组OSCC移植瘤的新鲜瘤体组织置于RIPA内,冰水浴内高速研磨匀浆后提取总蛋白,以“1.2.3”中Western blot实验方法检测各组移植瘤RhoA/ROCK信号通路及EMT相关蛋白的相对表达情况。

1.3 统计分析  
本研究采用SPSS 26.0软件进行统计学分析,实验数据均为计数资料并以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,事后两两进一步比较行SNK- $q$ 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果  
2.1 芒柄花黄素对SCC-25细胞活力的影响  
0、5、10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素干预24 h后,SCC-25细胞活力分别为(100.00 $\pm$ 0.06)%、(87.24 $\pm$ 8.87)%、(69.86 $\pm$ 7.95)%、(48.90 $\pm$ 7.23)%、(32.28 $\pm$ 6.14)%、(20.10 $\pm$ 5.75)%,细胞活力可随芒柄花黄素干预浓度的升高而逐渐降低,其中20  $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素干预24 h后SCC-25细胞活力降低至接近原来的一半(图1)。因而选择20  $\mu\text{mol/L}$ 的芒柄花黄素干预SCC-25细胞24 h进行后续体外实验。

2.2 芒柄花黄素对SCC-25细胞RhoA/ROCK信号通路的调控作用  
与正常组比较,芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组细胞RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ );与芒柄花黄素组比较,芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组细胞RhoA、ROCK1、ROCK1蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ),芒柄花黄素+pcDNA组细



\* $P<0.05$ ,与0  $\mu\text{mol/L}$ 芒柄花黄素比较。  
\* $P<0.05$  compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  formononetin.

图1 不同浓度芒柄花黄素对SCC-25细胞活力的影响  
Fig.1 Effect of different concentrations of formononetin on the cell viability of SCC-25 cells

胞RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )(图2)。

### 2.3 芒柄花黄素调节RhoA/ROCK信号通路对SCC-25细胞增殖、凋亡及其相关蛋白表达的影响

与正常组比较, 芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组细胞活力、集落形成数以及PCNA与Bcl-2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组细胞活力、集落形成数以及PCNA与Bcl-2蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 芒柄花黄素+pcDNA组细胞活力、集落形成数、细胞凋亡率以及Bax、PCNA与Bcl-2蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )(图3~图6)。

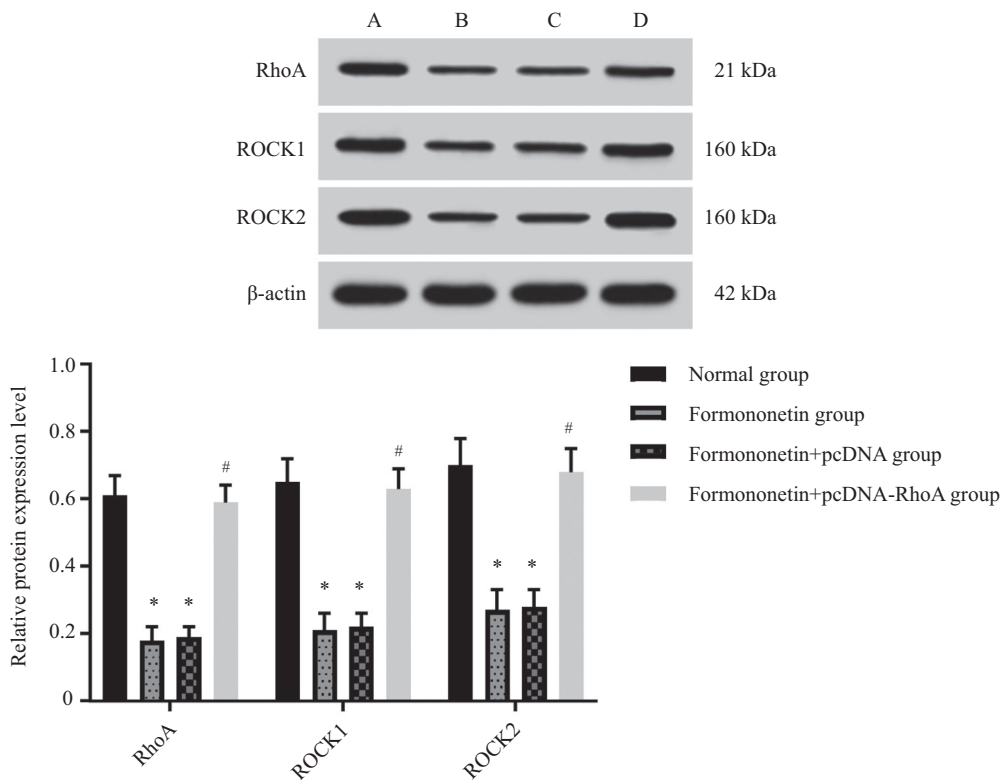
### 2.4 芒柄花黄素调节RhoA/ROCK信号通路对SCC-25细胞侵袭和EMT的影响

与正常组比较, 芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组细胞侵袭数量以及N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), E-cadherin蛋白表达水

平升高( $P<0.05$ )。与芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组细胞侵袭数量以及N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), E-cadherin蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 芒柄花黄素+pcDNA组细胞侵袭数量以及N-cadherin、Vimentin、E-cadherin蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )(图7和图8)。

### 2.5 芒柄花黄素调节RhoA/ROCK信号通路对SCC-25裸鼠移植瘤生长及EMT的影响

与正常组比较, 芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积以及N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ), E-cadherin蛋白表达水平升高( $P<0.05$ )。与芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积以及N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), E-cadherin蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 芒柄花黄素+pcDNA组裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积以及N-cadherin、Vimentin、E-cadherin蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )(图9~图11)。

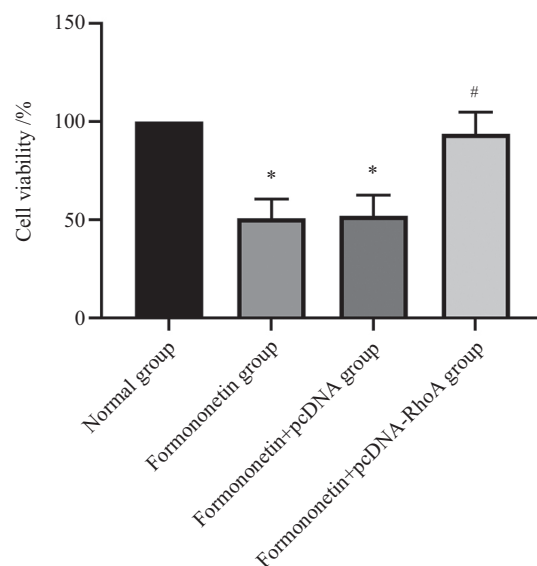


A: 正常组; B: 芒柄花黄素组; C: 芒柄花黄素+pcDNA组; D: 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组。\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

A: normal group; B: formononetin group; C: formononetin+pcDNA group; D: formononetin+pcDNA-RhoA group. \* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图2 Western blot检测SCC-25细胞RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达情况

Fig.2 Western blot detection of RhoA/ROCK signaling pathway related protein expression of SCC-25 cells

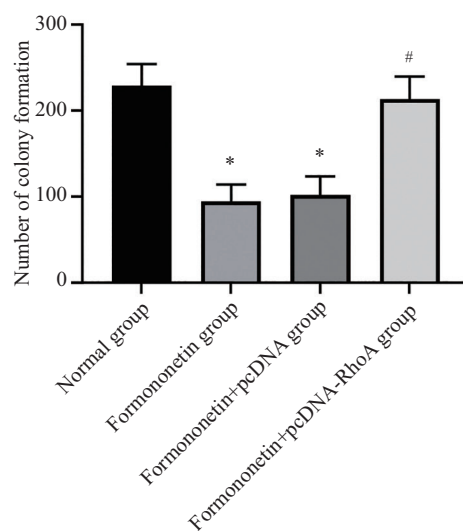
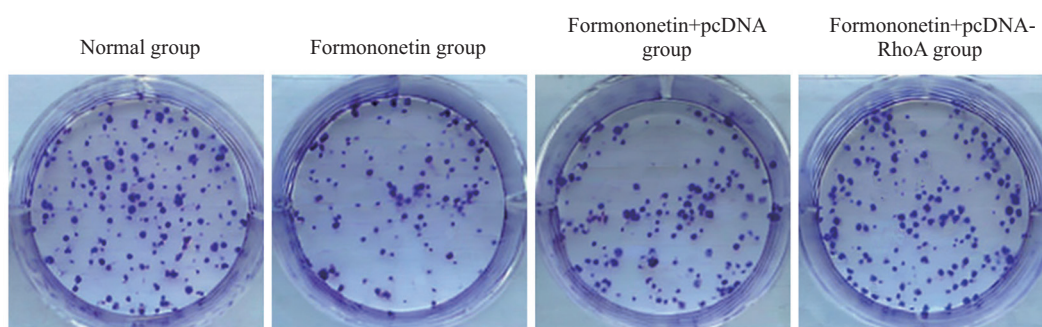


\* $P < 0.05$ , 与正常组比较; # $P < 0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

\* $P < 0.05$  compared with the normal group; # $P < 0.05$  compared with the formononetin group.

图3 各组SCC-25细胞活力

Fig.3 Cell viability of SCC-25 in each group

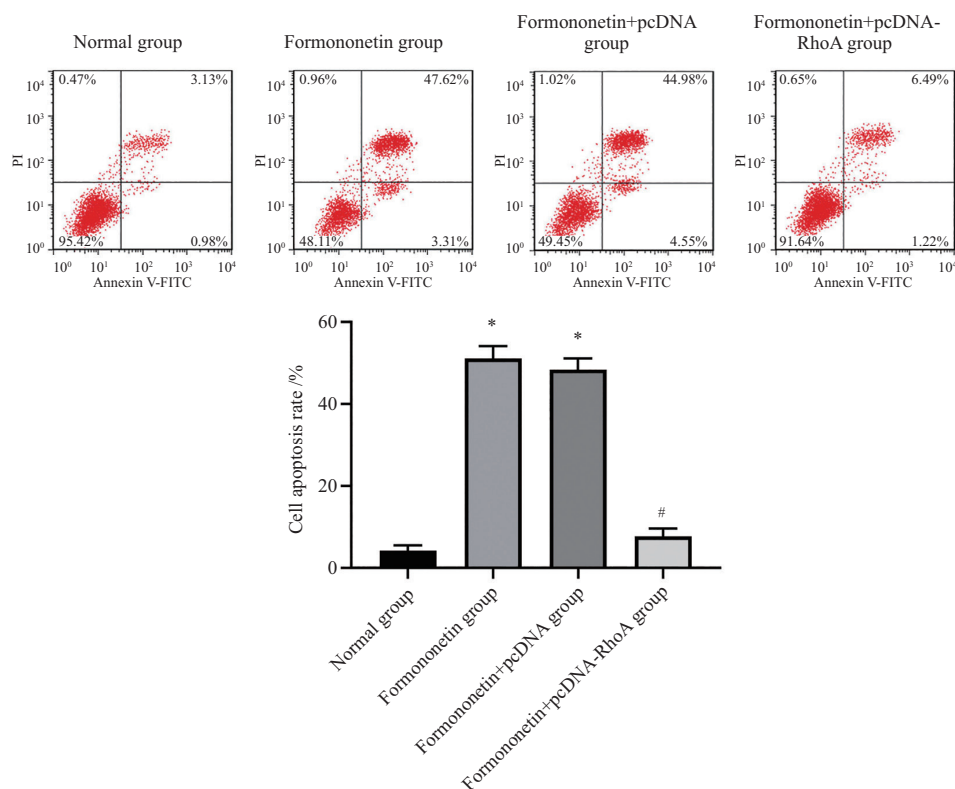


\* $P < 0.05$ , 与正常组比较; # $P < 0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

\* $P < 0.05$  compared with the normal group; # $P < 0.05$  compared with the formononetin group.

图4 克隆形成实验检测各组SCC-25细胞集落形成情况

Fig.4 Cloning formation experiment to detect the colony formation of SCC-25 cells in each group

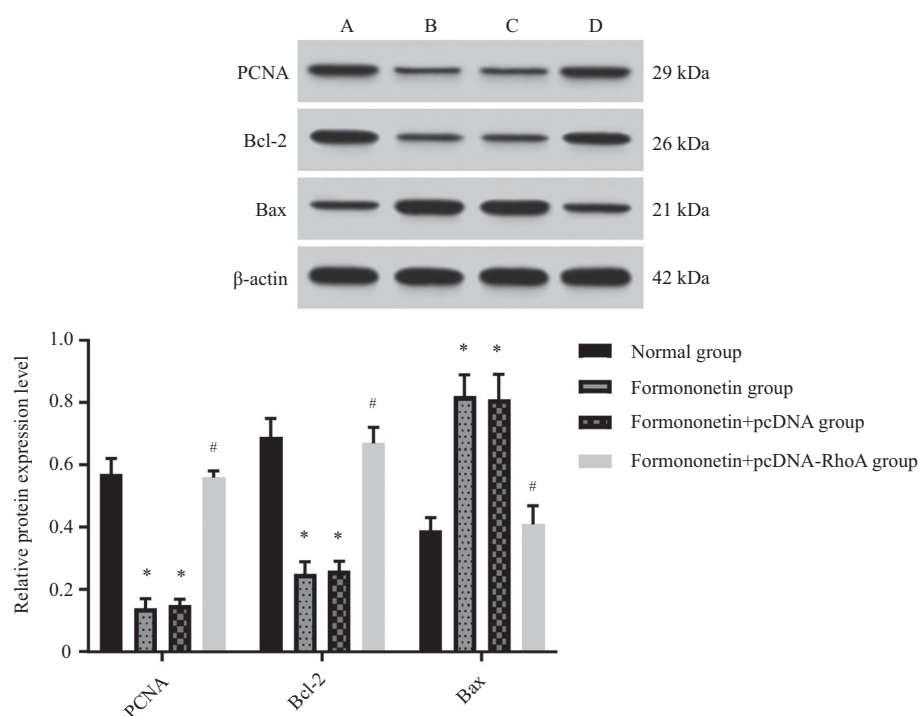


\* $P < 0.05$ , 与正常组比较; # $P < 0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

\* $P < 0.05$  compared with the normal group; # $P < 0.05$  compared with the formononetin group.

图5 流式细胞术检测各组SCC-25细胞凋亡率

Fig.5 Flow cytometry detection of apoptosis rate of SCC-25 cells in each group

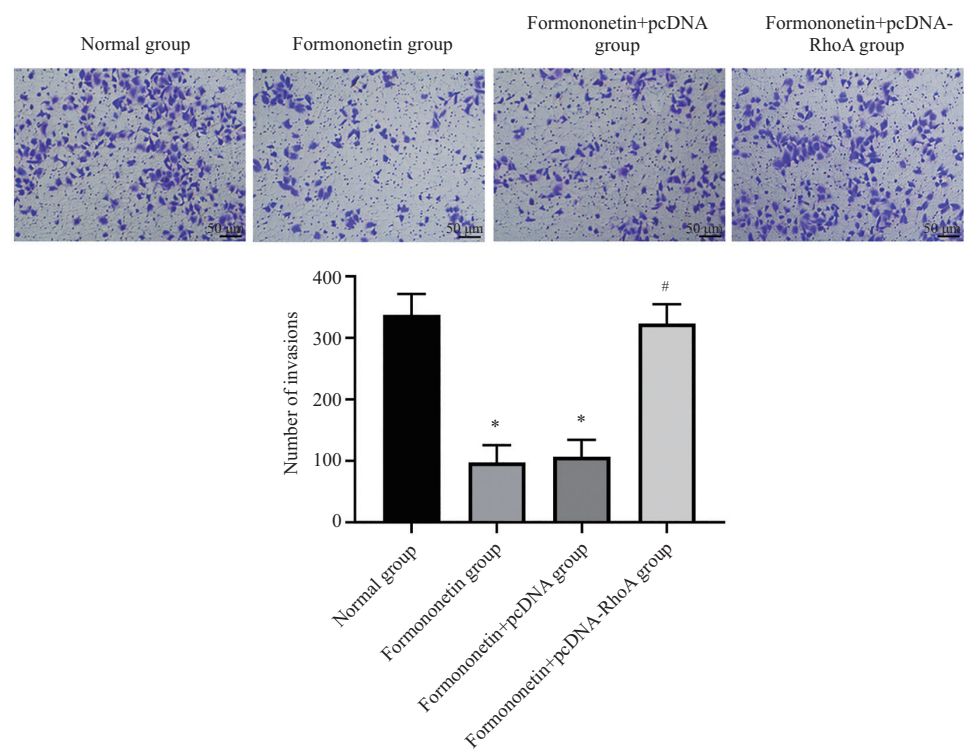


A: 正常组; B: 芒柄花黄素组; C: 芒柄花黄素+pcDNA组; D: 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组。\* $P < 0.05$ , 与正常组比较; # $P < 0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

A: normal group; B: formononetin group; C: formononetin+pcDNA group; D: formononetin+pcDNA-RhoA group. \* $P < 0.05$  compared with the normal group; # $P < 0.05$  compared with the formononetin group.

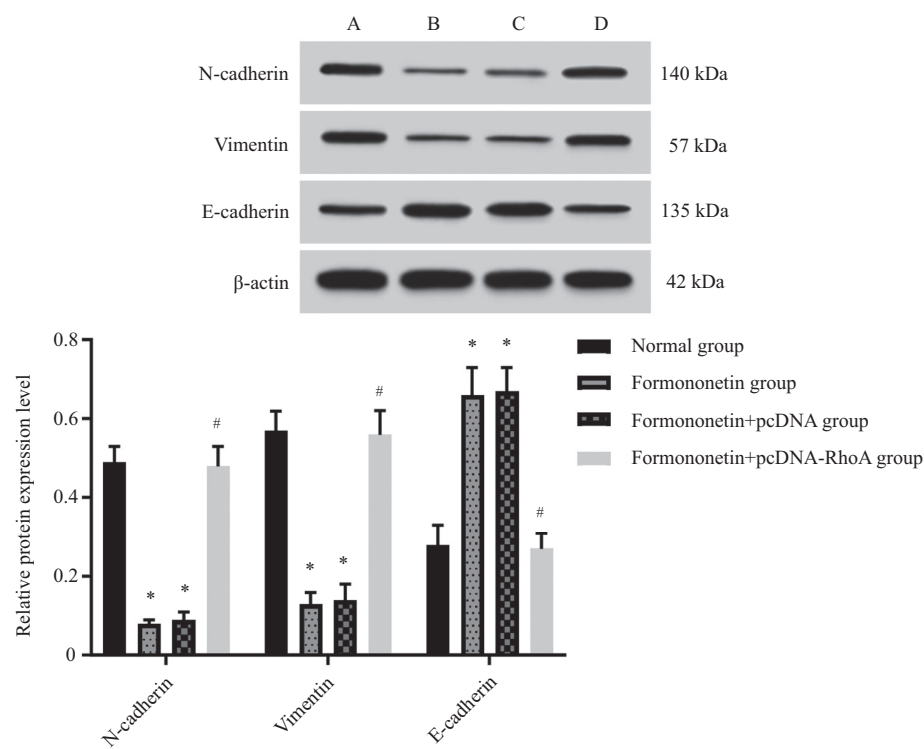
图6 Western blot检测SCC-25细胞增殖、凋亡相关蛋白表达情况

Fig.6 Western blot detection of proliferation and apoptosis related protein expression of SCC-25 cells



\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。  
\* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图7 Transwell实验检测各组SCC-25细胞侵袭情况  
Fig.7 Transwell experiment detects the invasion of SCC-25 cells in each group



A: 正常组; B: 芒柄花黄素组; C: 芒柄花黄素+pcDNA组; D: 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组。\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。  
A: normal group; B: formononetin group; C: formononetin+pcDNA group; D: formononetin+pcDNA-RhoA group. \* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图8 Western blot检测SCC-25细胞EMT相关蛋白表达情况  
Fig.8 Western blot detection of EMT related protein expression of SCC-25 cells

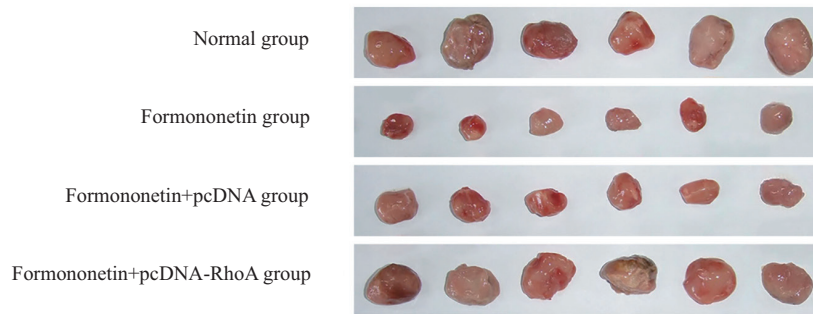
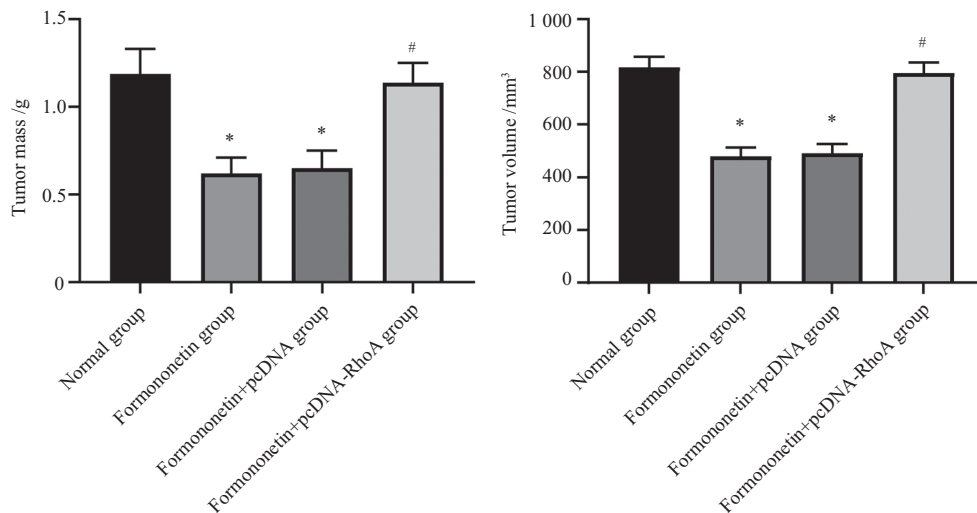


图9 各组SCC-25裸鼠移植瘤的瘤体图像

Fig.9 Tumor images of SCC-25 nude mouse transplanted tumors in each group



\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。

\* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图10 各组SCC-25裸鼠移植瘤的瘤体质量、体积

Fig.10 Tumor mass and volume of SCC-25 nude mouse transplanted tumors in each group

## 2.6 芒柄花黄素对SCC-25裸鼠移植瘤RhoA/ROCK信号通路的调控作用

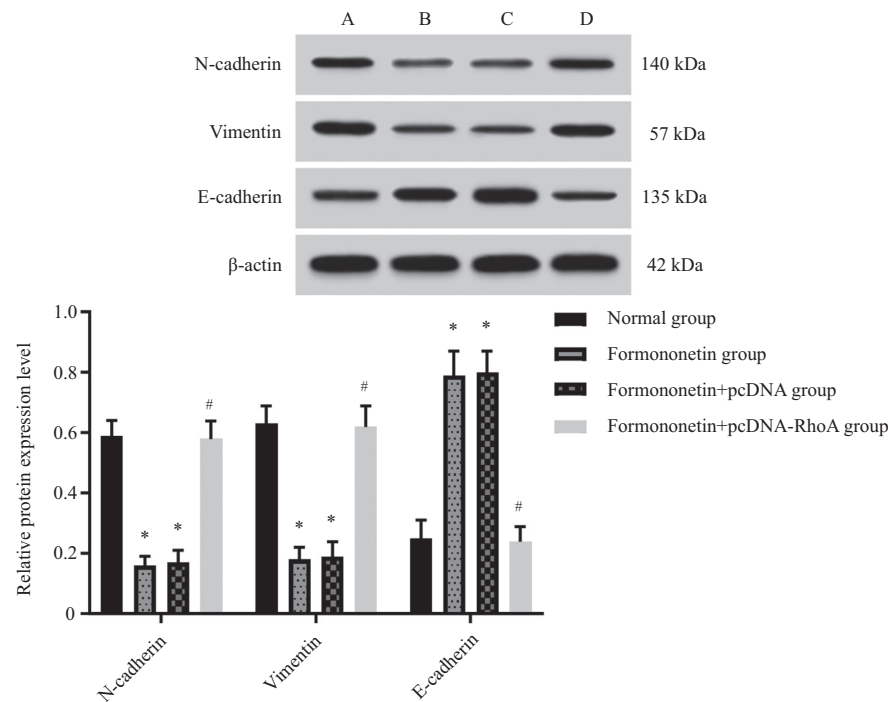
与正常组比较, 芒柄花黄素组、芒柄花黄素+pcDNA组裸鼠移植瘤RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ); 与芒柄花黄素组比较, 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组裸鼠移植瘤RhoA、ROCK1、ROCK1蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), 芒柄花黄素+pcDNA组裸鼠移植瘤RhoA、ROCK1、ROCK1蛋白表达水平无明显变化( $P>0.05$ )(图12)。

## 3 讨论

OSCC的主流治疗方法是手术切除联合放疗、化疗, 但患者手术后OSCC常会复发, 有时还会发生转移, 且放疗和化疗均面临癌细胞耐药性的挑战, 因此OSCC患者预后近年来一直没有特别明显的改善, 因此还需积极探寻更有效的OSCC治疗方法来改善患者

预后<sup>[11-13]</sup>。芒柄花黄素是一种天然异黄酮, 表现出明显的抗癌活性, 可用于治疗前列腺癌<sup>[14]</sup>, 能通过多个靶点、生物过程和信号通路诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[15]</sup>, 并可以剂量依赖性方式抑制甲状腺状癌细胞的增殖、克隆形成、EMT、迁移、侵袭、血管生成和干性<sup>[16]</sup>, 还可在宫颈癌细胞中引起相当大的细胞毒性并诱导其凋亡<sup>[17]</sup>, 但芒柄花黄素在OSCC中的抗癌作用及机制目前还没有被明确阐释。本研究结果显示, 芒柄花黄素可降低人OSCC细胞系SCC-25细胞活力、集落形成数、细胞侵袭数量, 提高SCC-25细胞凋亡率, 降低OSCC移植瘤裸鼠的瘤体质量与体积, 上调E-cadherin蛋白表达并下调N-cadherin与Vimentin蛋白表达, 表明芒柄花黄素可抑制OSCC细胞增殖、EMT与侵袭, 促进其凋亡, 还可延缓其裸鼠体内肿瘤生长, 最终对OSCC细胞发挥明显抗癌作用。

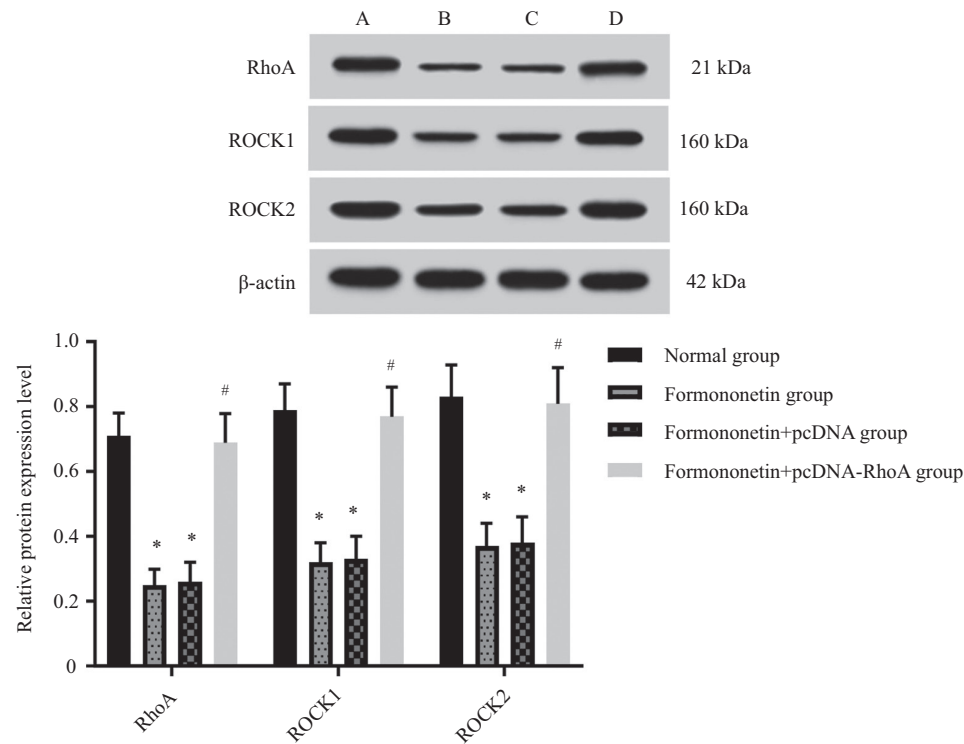
RhoA/ROCK信号通路在癌症发生发展中具有



A: 正常组; B: 芒柄花黄素组; C: 芒柄花黄素+pcDNA组; D: 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组。\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。  
A: normal group; B: formononetin group; C: formononetin+pcDNA group; D: formononetin+pcDNA-RhoA group. \* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图11 Western blot检测SCC-25裸鼠移植瘤EMT相关蛋白表达情况

Fig.11 Western blot detection of EMT related protein expression in SCC-25 nude mouse transplanted tumors



A: 正常组; B: 芒柄花黄素组; C: 芒柄花黄素+pcDNA组; D: 芒柄花黄素+pcDNA-RhoA组。\* $P<0.05$ , 与正常组比较; # $P<0.05$ , 与芒柄花黄素组比较。  
A: normal group; B: formononetin group; C: formononetin+pcDNA group; D: formononetin+pcDNA-RhoA group. \* $P<0.05$  compared with the normal group; # $P<0.05$  compared with the formononetin group.

图12 Western blot检测SCC-25裸鼠移植瘤RhoA/ROCK信号通路蛋白表达情况

Fig.12 Western blot detection of RhoA/ROCK signaling pathway protein expression in SCC-25 nude mouse transplanted tumors

重要调控作用,其异常激活可促进恶性肿瘤的发生、生长和转移<sup>[18]</sup>,阻止RhoA/ROCK信号通路激活可有效抑制卵巢癌的EMT和侵袭<sup>[19]</sup>,还可抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭<sup>[20]</sup>,且FERNÁNDEZ-PAREJO等<sup>[5]</sup>研究表明RhoA/ROCK信号通路可通过调控核糖体生物发途径维持OSCC细胞的再生增殖样状态,由此可知,RhoA/ROCK是治疗OSCC的潜在靶标。本研究结果显示,芒柄花黄素可降低SCC-25细胞及其移植瘤裸鼠RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达水平,进而提示RhoA/ROCK信号通路与芒柄花黄素对OSCC细胞的抗癌作用有关;过表达RhoA可减弱芒柄花黄素单独干预对OSCC细胞增殖、EMT与侵袭的抑制作用,消除其对OSCC细胞凋亡的促进作用,拮抗其对OSCC移植瘤裸鼠体内肿瘤生长的延缓作用,最终逆转芒柄花黄素对OSCC细胞的抗癌作用,揭示芒柄花黄素抑制OSCC细胞增殖与侵袭以及诱导其凋亡是通过下调RhoA表达实现的。

总之,本研究证实了芒柄花黄素可在体内外抑制OSCC细胞的EMT和增殖,阻碍其体外侵袭,延缓OSCC移植瘤裸鼠体内肿瘤生长,芒柄花黄素对OSCC细胞起到上述抗癌作用的药理机制可能是阻止RhoA/ROCK信号通路活化传导,本研究证实了芒柄花黄素对OSCC的治疗潜力,并初步阐释了其药理机制,为芒柄花黄素应用于OSCC的治疗提供了更多科学资料与理论基础,有利于芒柄花黄素的临床应用。但本研究对于芒柄花黄素抑制RhoA/ROCK信号通路的具体机制并没有研究清楚,存在一定不足,还需网络药理学、分子对接实验来进行深入探讨,另外,芒柄花黄素用于临床转化还需要探讨其毒性,通过临床实验探寻到合理的体内应用剂量。

### 参考文献 (References)

- [1] ZHI Y, WANG Q, ZI M, et al. Spatial transcriptomic and metabolomic landscapes of oral submucous fibrosis-derived oral squamous cell carcinoma and its tumor microenvironment [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(12): e2306515-36.
- [2] ZHANG J, NI Z, ZHANG Y, et al. DAZAP1 phase separation regulates mitochondrial metabolism to facilitate invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(22): 3818-33.
- [3] OH S Y, JANG G, KIM J, et al. Identification of new pathogenic variants of hereditary diffuse gastric cancer [J]. *Cancer Res Treat*, 2024, 56(4): 1126-35.
- [4] DU K, WANG P, LIU J, et al. Activation of RhoA/ROCK2 signaling by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in promoting tumor growth and metastasis in human colon cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2024, 15(1): 237-49.
- [5] FERNÁNDEZ-PAREJO N, LORENZO-MARTÍN L F, GARCÍA-PEDRERO J M, et al. VAV2 orchestrates the interplay between regenerative proliferation and ribogenesis in both keratinocytes and oral squamous cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 4060-75.
- [6] JIA W D, BAI X, MA Q Q, et al. Synthesis, molecular docking studies of formononetin derivatives as potent Bax agonists for anticancer activity [J]. *Nat Prod Res*, 2025, 39(3): 423-37.
- [7] LIU H, WANG Z, LIU Z. Formononetin restrains tumorigenesis of breast tumor by restraining STING-NF- $\kappa$ B and interfering with the activation of PD-L1 [J]. *Discov Med*, 2024, 36(182): 613-20.
- [8] OH J S, KIM T H, PARK J H, et al. Formononetin induces apoptotic cell death through the suppression of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B phosphorylation in FaDu human head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 700-10.
- [9] CHEN Y, JIN H, WEN W, et al. Targeting RhoA expression with formononetin and salvianolic acid B to mitigate pancreatic cancer-associated endothelial cells changes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 336: 118711-47.
- [10] 郭红燕, 吴福焱, 王少文. USP11调节IGF2BP3介导口腔鳞状细胞癌细胞增殖和侵袭机制研究[J]. 实用口腔医学杂志 (GUO H Y, WU F Y, WANG S W. USP11 mediates the proliferation and invasion of OSCC cells via regulation of IGF2BP3 expression [J]. *J Pract Stomatol*), 2024, 40(3): 377-84.
- [11] SUR S, DAVRAY D, BASU S, et al. Novel insights on oral squamous cell carcinoma management using long non-coding RNAs [J]. *Oncol Res*, 2024, 32(10): 1589-612.
- [12] TIAN Q, JIANG L, DAI D, et al. Impact of postoperative radiotherapy on the prognosis of early-stage (pt1-2n0m0) oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(15): 1754-65.
- [13] HARLEY R J, IHEAGWARA U K, FARAJI F, et al. Postoperative radiotherapy and survival in oral cavity squamous cell carcinoma with mandibulectomy [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2024, 150(3): 233-9.
- [14] LI J, HUANG Z, WANG P, et al. Therapeutic targets of formononetin for treating prostate cancer at the single-cell level [J]. *Aging*, 2024, 16(12): 10380-401.
- [15] MA G, PANG X, RAN Y, et al. *In silico* and *in vivo* verification of the mechanism of formononetin in treating hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Med*, 2024, 56(1): 2404550-63.
- [16] YU H, QU J, GOU H, et al. Formononetin suppresses the malignant progression of papillary thyroid carcinoma depending on downregulation of CBX4 [J]. *Exp Ther Med*, 2024, 28(6): 456-65.
- [17] JIANG P, JIANG W, LI X, et al. Combination of formononetin and sulforaphane natural drug repress the proliferation of cervical cancer cells via impeding PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2024, 196(10): 6726-44.
- [18] CHEN X, CHENG G, ZHU L, et al. Alarmin S100A8 imparts chemoresistance of esophageal cancer by reprogramming cancer-associated fibroblasts [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(6): 101576-601.
- [19] SUN X, GUO Y. Chemerin enhances migration and invasion of OC cells via CMKLR1/RhoA/ROCK-mediated EMT [J]. *Int J Endocrinol*, 2024, 2024: 7957018-28.
- [20] TUCCI F A, PENNISI R, RIGIRACCILO D C, et al. Loss of NUMB drives aggressive bladder cancer via a RHOA/ROCK/YAP signaling axis [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 10378-401.