

5-羟色胺受体2C通过G $\alpha_{q/11}$ -Yes相关蛋白信号通路调控口腔鳞状细胞癌的作用研究

张真语 黄梅 崔浩 孙思露 罗小波 江路 江宇辰

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 口腔疾病国家临床医学研究中心

中国医学科学院口腔黏膜癌变与防治创新单元 四川大学华西口腔医院口腔黏膜病科 成都 610041

[摘要] 目的 探究5-羟色胺受体2C (HTR2C) 通过G $\alpha_{q/11}$ -Yes相关蛋白 (YAP) 信号通路对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 进展的调控作用。方法 利用TCGA数据库分析HTR2C在OSCC与正常口腔组织中的表达情况及其与患者总生存率的关系。通过免疫组织化学染色在OSCC肿瘤组织芯片中检测HTR2C表达水平, 并分析其与临床病理特征的相关性。构建HTR2C敲低的HN12和UM1细胞系, 通过细胞计数试剂盒 (CCK)-8、克隆形成、划痕和Transwell实验评估HTR2C敲低或其抑制剂Puerarin对OSCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响。采用蛋白质印迹 (Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应和免疫荧光检测HTR2C-G $\alpha_{q/11}$ -YAP信号通路相关蛋白的表达及激活状态。利用裸鼠OSCC皮下移植瘤模型验证HTR2C对OSCC生长的调控作用。结果 HTR2C在OSCC组织中显著高表达, 其高表达与患者不良预后显著相关 ($P<0.05$)。体外实验表明, 敲低HTR2C或使用Puerarin显著抑制OSCC细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力 ($P<0.01$), 且Puerarin呈剂量依赖性抑制作用。机制研究发现, HTR2C敲低后通过减少黏着斑激酶和丝切蛋白的磷酸化, 抑制YAP在Tyr357位点的磷酸化, 促进YAP Ser127位点磷酸化, 从而抑制YAP的转录活性, 降低其下游靶基因CYR61、CTGF和AURKA的表达 ($P<0.05$)。体内实验证实, 通过Puerarin抑制HTR2C的表达, 可显著抑制OSCC移植瘤的生长 ($P<0.0001$), 这一作用是通过调控YAP信号通路实现的。结论 OSCC中HTR2C的高表达与患者不良预后显著相关, HTR2C可能经激活G $\alpha_{q/11}$ -YAP信号通路, 调控OSCC细胞的增殖、迁移、侵袭以及体内成瘤能力。本研究提示, HTR2C可能是OSCC治疗的潜在靶点, 但仍需进一步的临床研究加以验证。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 5-羟色胺受体2C; G $\alpha_{q/11}$ -Yes相关蛋白信号通路; Yes相关蛋白; Puerarin; 肿瘤进展

[中图分类号] R739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2026228



本文链接

OSID码

Regulation of the progression of oral squamous cell carcinoma by 5-hydroxytryptamine receptor 2C via the G $\alpha_{q/11}$ -Yes-associated protein signaling pathway

Zhang Zhenyu, Huang Mei, Cui Hao, Sun Silu, Luo Xiaobo, Jiang Lu, Jiang Yuchen

State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Chinese Academy of Medical Sciences Research Unit of Oral Carcinogenesis and Management & Dept. of Oral Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82002888)

Correspondence: Jiang Yuchen, Email: jiangyuchen16@126.com

[收稿日期] 2025-02-18; **[修回日期]** 2025-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (82002888)

[第一作者] 张真语, 硕士, Email: zhenyuzhang7@outlook.com

[通信作者] 江宇辰, 助理研究员, 博士, Email: jiangyuchen16@126.com

com

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effect of 5-hydroxytryptamine receptor 2C (HTR2C) on oral squamous cell carcinoma (OSCC) through the G $\alpha_{q/11}$ -Yes-associated protein (YAP) signaling pathway. **Methods** The TCGA database was used to analyze the expression of HTR2C in OSCC and normal oral tissues

and its relationship with the overall survival rate of patients. The expression level of HTR2C was detected in OSCC tumor microarrays through immunohistochemistry, and the correlation between HTR2C and clinicopathological features was analyzed. HTR2C knockdown HN12 and UM1 cell lines were constructed, and the effects of HTR2C knockdown or its inhibitor (Puerarin) on the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells were evaluated through cell counting kit-8, colony formation, wound healing, and Transwell assays. Western blot analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction, and immunofluorescence were used to detect the expression and activation of the HTR2C- $G_{\alpha_{q11}}$ -YAP signaling pathway. The effect of HTR2C on the growth of OSCC was verified by using a subcutaneous xenograft model of OSCC in nude mice. **Results** HTR2C was significantly overexpressed in OSCC tissues, and its high expression was significantly associated with the poor prognosis of patients ($P<0.05$). *In vitro* experiments demonstrated that the knockdown of HTR2C or use of Puerarin significantly inhibited the proliferation and clonal formation, migration, and invasion abilities of OSCC cells ($P<0.01$), and the inhibitory effect of puerarin was dose-dependent. Mechanism studies showed that HTR2C knockdown inhibited YAP phosphorylation at Tyr357 and promoted YAP phosphorylation at Ser127 by reducing the phosphorylation of focal adhesion kinase and Cofilin, thereby inhibiting YAP transcriptional activity and decreasing the expression of its downstream target genes CYR61, CTGF, and AURKA ($P<0.05$). *In vivo* experiments confirmed that inhibiting the expression of HTR2C by using Puerarin could significantly inhibit the growth of OSCC xenograft tumors ($P<0.0001$). This effect was achieved by regulating the YAP signaling pathway. **Conclusion** The high expression of HTR2C in OSCC was significantly associated with poor prognosis. HTR2C may regulate the proliferation, migration, invasion, and tumorigenesis of OSCC cells by activating the $G_{\alpha_{q11}}$ -YAP signaling pathway. This study suggests that HTR2C may be a potential therapeutic target for OSCC. However, further clinical research is needed to validate its findings.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; 5-hydroxytryptamine receptor 2C; $G_{\alpha_{q11}}$ -Yes-associated protein signaling pathway; Yes-associated protein; Puerarin; tumor progression

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是全球第七大常见恶性肿瘤, 年发病人数超过 50 万^[1]。HNSCC 患者的病死率较高, 为近 50%^[1]。HNSCC 包括多个解剖部位的鳞状上皮恶性肿瘤, 其中口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是最常见的亚型, 也是最具侵袭性和致死性的肿瘤之一^[2]。目前, 手术和放化疗仍是 OSCC 的主要治疗手段^[3], 但患者术后复发率和转移风险依然较高, 晚期患者 5 年生存率仅为 30%; 超过 20% 的患者确诊时已发生区域淋巴结转移或局部进展期疾病, 严重影响患者的预后^[4]。

近年来, 选择性靶向异常信号分子[如表皮生长因子受体家族 (epidermal growth factor receptors, EGFRs) 等]以治疗肿瘤的新型治疗方法正在逐渐兴起^[5-6]。然而, 这些疗法的有效性受到基因不稳定性、信号传导失衡或药物毒性等因素的限制, 疗效有限^[7-9]。因此, 深入解析 OSCC 的分子病理机制对发现新靶点、开发新的靶向治疗策略具有重要意义。

G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors,

GPCRs) 是 7 次跨膜蛋白的大家族, 其异常表达与多种肿瘤的发生和进展密切相关。GPCRs 类靶点已广泛应用于药物研发, 目前约 34% 的美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准药物为 GPCRs 靶点药物^[10-12]。先前研究^[13]显示, GPCRs 在 OSCC 中的异常表达可能通过激活 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) /具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 通路促进肿瘤进展, 如 GPR39 在 OSCC 中的作用; 多种 GPCRs 在 OSCC 中显著高表达, 其中 3 种 5-羟色胺受体 (5-hydroxytryptamine receptor, HTR) 家族成员 (HTR2C、HTR1D、HTR7) 在 OSCC 中表达显著上调, 且 HTR2C 的表达上调最为明显。值得注意的是, HTR2C 的激动剂盐酸氯卡色林曾于 2012 年被 FDA 批准用于身体质量指数 (body mass index, BMI) ≥ 27 kg/m² 的超重或肥胖患者以减少食物摄入, 但后续发现其可能与癌症发病风险增加相关, 已于 2020 年撤市^[14-15]。HTR2C 的长期异常表达或激活可能与肿瘤的发生和进展相关。既往研究^[16-20]发现, 在乳腺癌、结直

肠癌和肝细胞癌中存在HTR2C的异常高表达,并通过不同的分子机制促进肿瘤的恶性进展,但HNSCC(包括OSCC)中尚无相关报道。基于本团队的前期研究结果,笔者提出假说,OSCC中HTR2C的异常高表达可能通过某种分子机制,调控肿瘤细胞的增殖和转移。

YAP/TAZ信号通路已被证实在多种恶性肿瘤中异常激活^[21]。GPCRs可通过其偶联的Gα蛋白调控YAP/TAZ的激活,并以依赖或非依赖Hippo信号通路的方式发挥作用。在本研究中,笔者假设HTR2C通过Gα_{q/11}介导的YAP信号通路激活,调控OSCC细胞的生长、迁移和侵袭。为验证这一假设,本研究首先探讨了HTR2C在OSCC中的表达特点以及其与临床预后指标的相关性,其次通过体外实验分析下调HTR2C的表达对OSCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并进一步解析HTR2C调控OSCC细胞生物学行为的分子机制。最后,笔者在裸鼠OSCC移植瘤模型中初步验证了HTR2C对OSCC生长的调控作用。

1 材料和方法

1.1 数据库分析

为评估HTR2C在OSCC中的表达水平及其与患者预后的关系,本研究利用癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库进行分析。从TCGA数据库获取342例OSCC和32例正常口腔组织的信使RNA(messenger RNA, mRNA)表达数据,分析HTR2C表达水平差异。结合随访数据,绘制Kaplan-Meier生存曲线,比较HTR2C高/低表达组的生存差异。

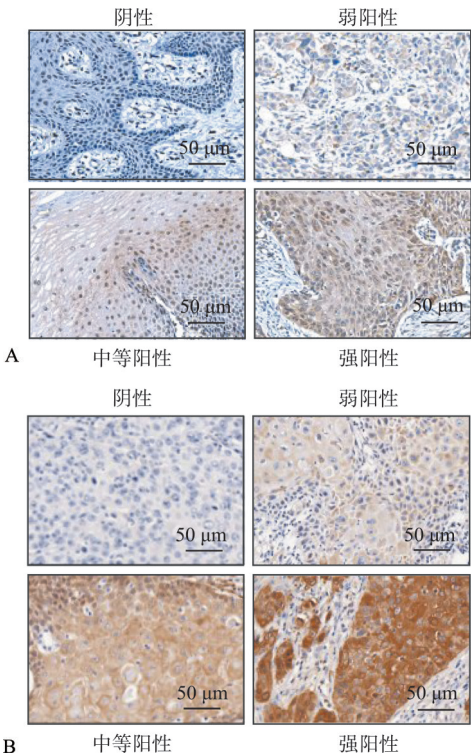
1.2 临床样本

使用国家人类遗传资源共享服务平台的OSCC组织芯片(芯片编号:HOraC060PG01)。样本包括46例术前未经局部或全身化疗、放疗及靶向治疗的OSCC患者及5例配对正常组织(距肿瘤边缘5 cm)。

1.3 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)

将临床样本、动物实验中收集的肿瘤组织进行组织包埋、切片。石蜡切片(4 μm)经脱蜡、水化、抗原修复后,临床样本用HTR2C、YAP一抗,动物肿瘤组织用YAP、Ki67一抗,4℃孵育过夜,二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,显微镜下观察结果。半定量评分系

统评估染色强度(0分:阴性,1分:弱阳性,2分:中等阳性,3分:强阳性),如图1所示。



A: IHC 染色结果中HTR2C表达的4种情况代表图; B: IHC 染色结果中YAP表达的4种情况代表图。

图 1 OSCC及对照组织中HTR2C与YAP的IHC染色结果代表图

Fig 1 Representative IHC staining of HTR2C and YAP in OSCC and control tissues

1.4 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色

将动物实验中收集的心、肝、脾、肺、肾组织进行组织包埋、切片,石蜡切片经脱蜡、水化后用HE染色。切片经0.1%盐酸乙醇分色后用伊红复染,并在梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片,显微镜下观察组织形态。

1.5 细胞培养

OSCC细胞系(HN12、Cal27、UM1、HN4)购自美国ATCC细胞库,在含10%胎牛血清和1%抗生素的杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)中培养。为研究HTR2C在OSCC细胞中的生物学功能,本研究使用HTR2C敲低慢病毒感染HN12和UM1细胞,构建HTR2C敲低稳转株,构建好的细胞系分为对照组(Ctrl)和敲低组(sh1、sh2)。

1.6 蛋白质印迹(Western blot, WB)

本研究通过WB检测多种细胞中HTR2C等蛋

白表达情况。分别收集 OSCC 细胞、HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞、Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞蛋白,用放射免疫沉淀法 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解缓冲液提取 OSCC 细胞蛋白,二喹啉甲酸蛋白定量法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 试剂盒定量。样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后转移至聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂奶封闭。含 OSCC 细胞蛋白的膜与 HTR2C 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体孵育;含 HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞蛋白的膜分别与 HTR2C、YAP、p-YAP (Ser127、Tyr357)、黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)、p-FAK (Tyr397)、丝切蛋白 (Cofilin)、磷酸化-Cofilin (Ser3)、 β -actin 抗体孵育;Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞蛋白分别与 HTR2C、YAP、p-YAP (Ser127)、 β -actin 抗体孵育;随后通过辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联二抗和增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂显色检测。

1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞生长至 80%~90% 汇合度,提取细胞总 RNA 并逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA),SYBR Green 法检测 YAP、富含半胱氨酸的血管生成诱导因子 61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61, CYR61)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、极光激酶 A (aurora kinase A, AURKA) mRNA 水平,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参。

1.8 细胞增殖实验

细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8 法分别检测 HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞、Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞活力,于 0、24、48、72、96 h 分别加入 CCK-8 溶液,测定 450 nm 处的吸光度值。

1.9 克隆形成实验

6 孔板中分别接种 HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞、Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞,每孔 700 个细胞,培养 2 周后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤,4% 多聚

甲醛固定,并用 0.1% 结晶紫染色。清洗后计数克隆数目。

1.10 划痕实验

HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞、Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞分别接种于 12 孔板并培养至单层,用无菌吸头划痕后去除脱落细胞,无血清培养 24 h,测量划痕宽度变化。

1.11 细胞侵袭实验

Transwell 小室 (孔径 8 μ m) 用于细胞侵袭实验。小室中加入 200 μ g/mL 的 Matrigel 涂层,HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞、Puerarin 处理后的 HN12 和 UM1 细胞分别置于无血清培养基中,下室为含 10% 胎牛血清的培养基,培养 48 h 后固定并染色,计数迁移细胞数。

1.12 细胞免疫荧光

HTR2C 敲低及对照的 HN12 和 UM1 细胞接种于爬片中培养过夜,4% 多聚甲醛固定后 Triton X-100 通透,牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭。随后与 YAP 一抗孵育并加二抗标记,4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 封片,荧光显微镜观察。

1.13 动物实验

裸鼠背部皮下接种 HN12 细胞,肿瘤体积达 150 mm³ 后分为实验组和对照组,实验组给予 HTR2C 抑制剂 (Puerarin, 200 mg/kg),对照组给予等体积生理盐水,每日腹腔注射。当最大肿瘤体积接近 2 000 mm³ 或肿瘤最大径接近 2 cm 时终止实验。

1.14 统计学分析

数据以均值 $\pm$ 标准差表示,GraphPad Prism 9 进行 *t* 检验、单因素方差分析或 Pearson 相关性分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTR2C 在 OSCC 中高表达并与患者的不良预后相关

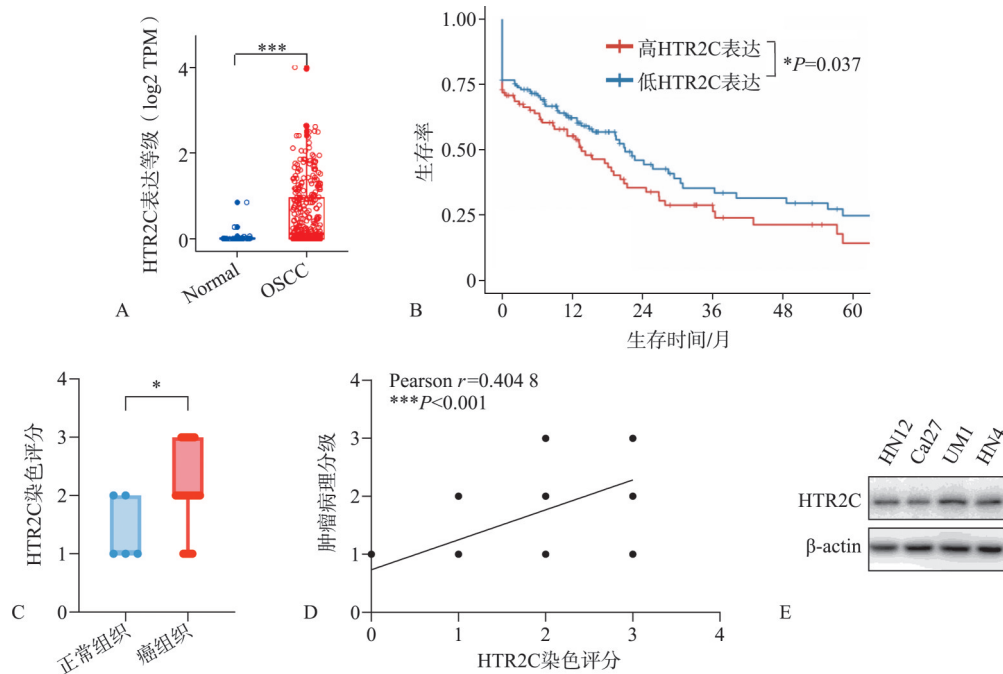
利用 TCGA 数据库分析结果表明,HTR2C 在 OSCC 组织中的表达显著高于正常口腔组织 (图 2A)。进一步结合患者的随访数据,Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,HTR2C 高表达患者的总体生存率显著低于低表达患者 (图 2B)。

为验证上述发现,使用 IHC 分析了 46 例 OSCC 组织芯片,结果显示 OSCC 组织中

HTR2C 的染色评分显著高于正常口腔黏膜组织, 差异具有统计学意义 (图 2C)。进一步的统计分析表明, HTR2C 表达水平与 OSCC 患者的临床病理分级呈显著正相关 (Pearson $r=0.404\ 8$,

$P<0.001$; 图 2D)。上述数据与数据库分析结果一致。

WB 结果表明, HTR2C 在 4 种 OSCC 细胞系中均有表达 (图 2E)。



A: 通过 TCGA 数据库评估 OSCC 组织和正常对照组织中 HTR2C 表达差异; B: 使用 TCGA 数据库数据绘制的 Kaplan-Meier 生存曲线; C: 组织芯片中 HTR2C 在 OSCC 组织和正常对照组织中的表达差异; D: 组织芯片中 HTR2C 表达情况与 OSCC 病理等级的相关性; E: WB 检测 OSCC 细胞系 HTR2C 的表达水平 ($n=3$); 与对照组相比, *为 $P<0.05$, ***为 $P<0.001$ 。

图 2 OSCC 组织中 HTR2C 的表达及其与预后的相关性

Fig 2 Expression of HTR2C in OSCC and its correlation with prognosis

2.2 下调 HTR2C 表达显著抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

WB 分析显示, 与对照组相比, sh 组细胞的 HTR2C 蛋白表达水平降低 (图 3A)。功能学实验进一步证实, HTR2C 的表达下调能够显著抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。CCK-8 和克隆形成实验结果表明, HN12 和 UM1 细胞的增殖能力显著减弱 (图 3B、C)。划痕实验显示, sh 组细胞的迁移能力明显下降 (图 3D), 而 Transwell 实验则表明下调 HTR2C 显著削弱了细胞的侵袭能力 (图 3E)。以上数据明确表明, HTR2C 在促进 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭中发挥了关键作用。

2.3 下调 HTR2C 表达可抑制 $G\alpha_{q/11}$ -YAP 信号通路的激活

IHC 分析发现, OSCC 组织中 YAP 染色评分显著高于正常组织 (图 4A), 且 YAP 表达水平与临床病理分级呈正相关 (Pearson $r=0.35$, $P<$

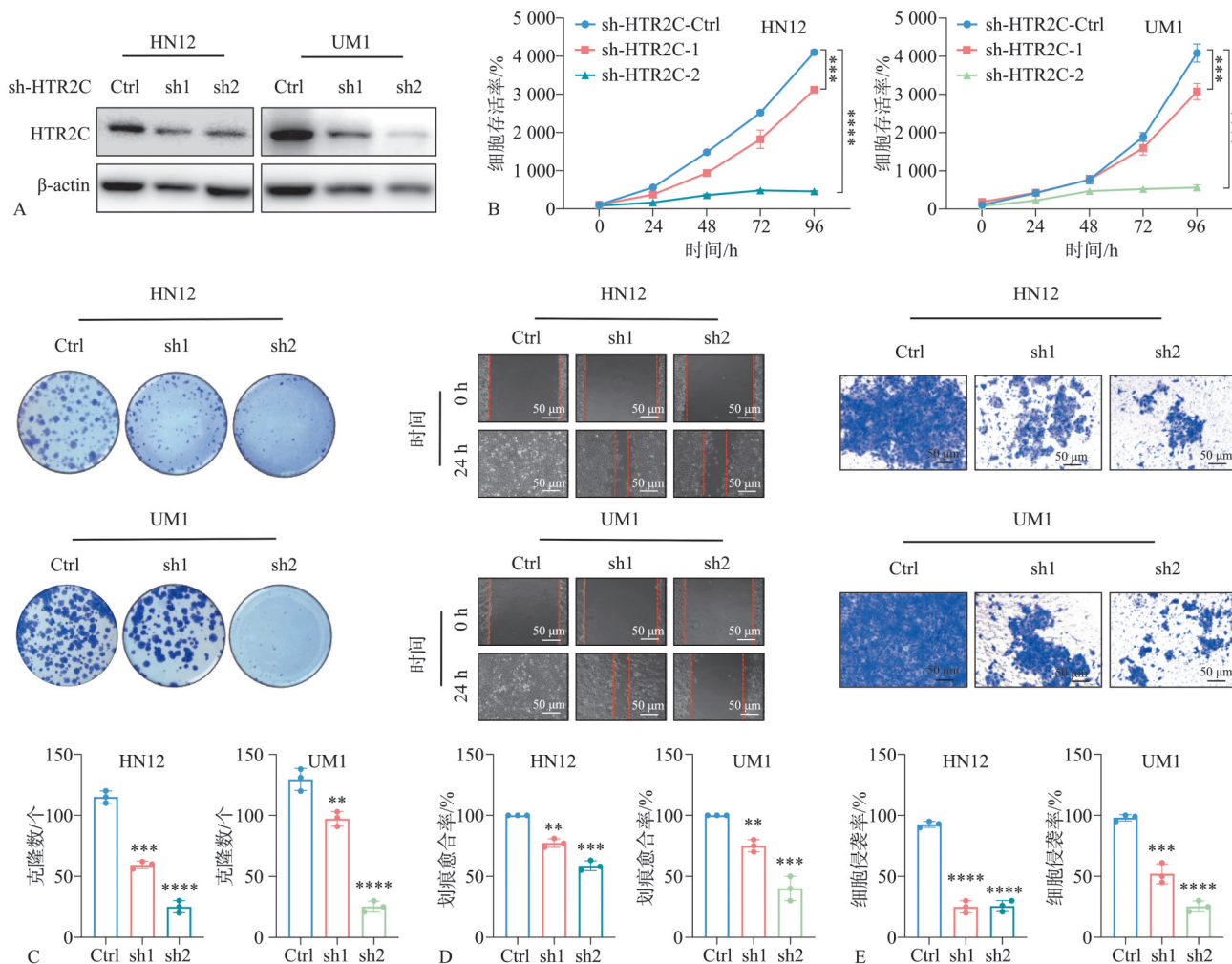
$0.000\ 1$, 图 4B), 同时与 HTR2C 表达水平呈显著正相关 (Pearson $r=0.122\ 0$, $P=0.034\ 1$, 图 4C)。进一步研究显示, HTR2C 表达水平下降后, YAP 蛋白总表达水平下降, Tyr357 位点磷酸化水平降低, 而 Ser127 位点磷酸化水平升高 (图 4D); 同时, YAP 的核/浆比例降低 (图 4F), 其下游靶基因 CTGF、CYR61 和 AURKA 的 mRNA 表达水平显著下降 (图 4E)。此外, HTR2C 表达受抑导致 $G\alpha_{q/11}$ -YAP 通路中关键分子节点^[22]FAK 的 Tyr397 位点和 Cofilin 的 Ser3 位点磷酸化水平降低 (图 4D)。以上研究结果提示, HTR2C 可能通过 $G\alpha_{q/11}$ -RhoA-FAK 和 $G\alpha_{q/11}$ -RhoA-pCofilin 信号通路激活 YAP, 并影响 OSCC 细胞的恶性生物学行为。

2.4 HTR2C 抑制剂在体外显著抑制 OSCC 细胞的恶性进展

在体外实验中, 不同浓度 (5~1 000 $\mu\text{mol/L}$) 的 Puerarin 均降低了 HN12 和 UM1 细胞的存活率, 并呈剂量依赖性 (图 5A)。高浓度药物可能会导

致脱靶效应或非特异性的毒性, 本研究选择 50、100 μmol/L 浓度的 Puerarin 用于后续实验研究。WB 结果显示, 使用 Puerarin 处理后, HN12 和 UM1 的 HTR2C 表达水平降低, 且 YAP 在 Ser127 位点磷酸化水平升高, 提示 Puerarin 可抑制 YAP 的激活 (图 5B)。克隆形成实验表明, Puerarin 显

著抑制 OSCC 细胞的增殖能力, 且 100 μmol/L 组效果优于 50 μmol/L 组 (图 5C)。划痕实验显示, Puerarin 显著抑制细胞迁移能力, 且 100 μmol/L 浓度组效果更明显 (图 5D)。Transwell 实验进一步证实, Puerarin 对细胞侵袭能力的抑制作用同样具有浓度依赖性 (图 5E)。



A: WB 检测 HN12 和 UM1 细胞中 HTR2C 表达情况 ($n=3$); B: HN12 和 UM1 细胞的 CCK-8 实验 ($n=3$); C: HN12 和 UM1 细胞克隆形成实验结果和统计分析 ($n=3$); D: HN12 和 UM1 细胞划痕试验结果和统计分析 ($n=3$); E: HN12 和 UM1 细胞 Transwell 侵袭实验结果和统计分析 ($n=3$)。与对照组相比, **为 $P<0.01$, ***为 $P<0.001$, ****为 $P<0.0001$ 。

图 3 体外敲低 HTR2C 可显著抑制 OSCC 细胞增殖和迁移侵袭

Fig 3 Knocking down HTR2C *in vitro* can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of OSCC cells

2.5 HTR2C 抑制剂在体内有效抑制 OSCC 移植瘤的生长

在裸鼠异种移植瘤模型 (图 6A) 中, 与生理盐水对照组相比, 腹腔注射 HTR2C 抑制剂 (Puerarin, 每天 200 mg/kg) 可以显著抑制肿瘤体积增长 (图 6B、C), 同时不造成小鼠体重降低 (图 6D), 对小鼠主要器官无明显毒性作用 (图 6F)。IHC 分析显示, HTR2C 抑制剂处理组

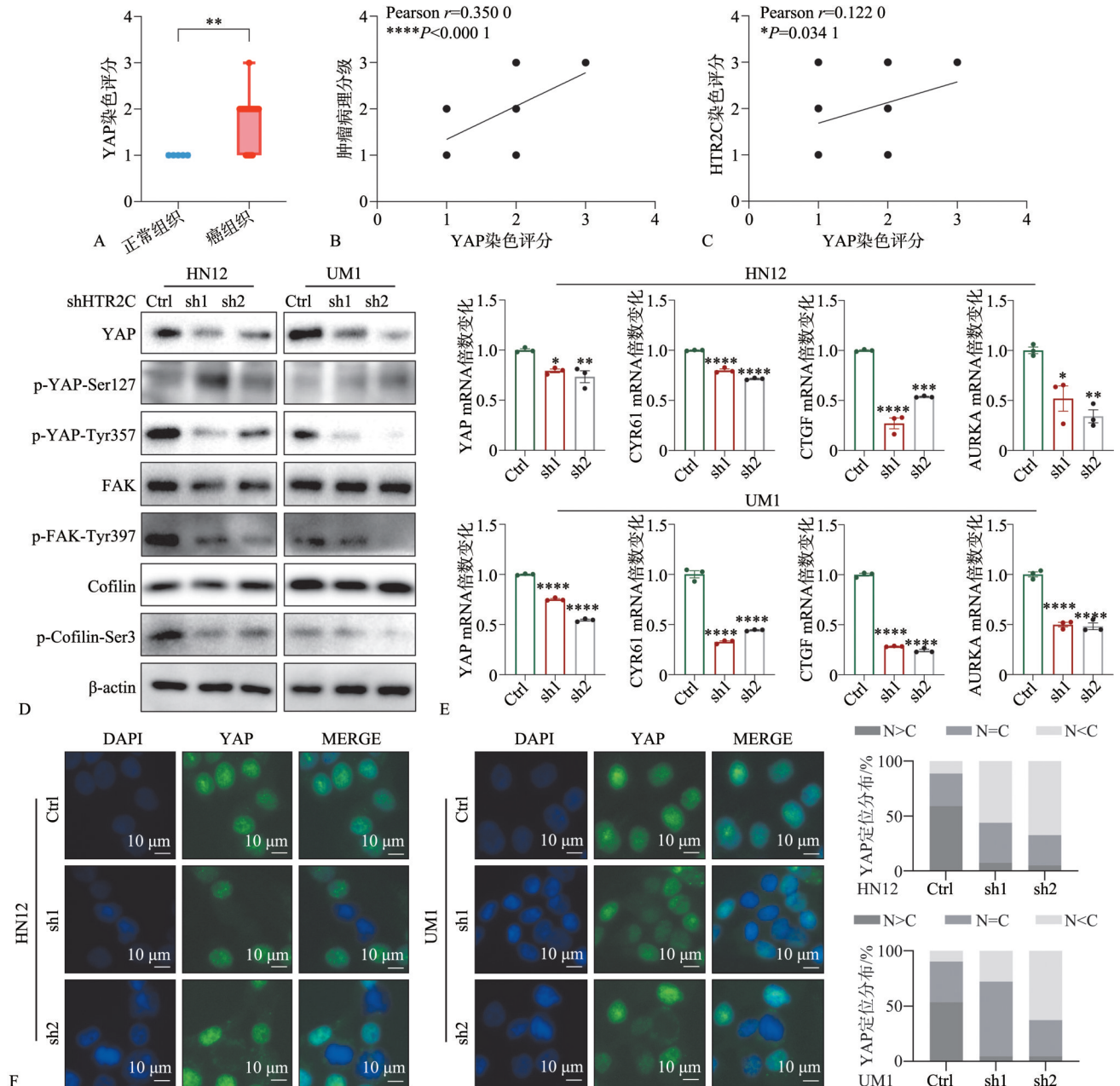
的 OSCC 移植瘤组织中 YAP 表达呈核阳性的细胞比例明显下降, 且 Ki-67 阳性的细胞数量也明显减少 (图 6E)。

3 讨论

5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 是一种多功能生物胺, 在中枢神经系统和外周系统中

发挥多种生物学功能，例如分别扮演神经递质、外周激素以及细胞有丝分裂原等角色^[23-26]。其在精神疾病病理生理学中的关键地位已被广泛研究，尤其是在抑郁症、焦虑症和精神分裂症中。此

外，5-HT作为外周激素，调控胃肠道功能、血管生成、骨代谢和免疫反应等多种生理过程^[27-29]。最近，5-HT及其受体在肿瘤发生和进展中的作用引起了广泛关注。



A: 组织芯片中YAP在OSCC组织和正常对照组织中的表达差异; B: 组织芯片中YAP表达情况与OSCC病理等级的相关性; C: 组织芯片中YAP表达情况与HTR2C表达情况的相关性; D: WB检测HN12和UM1细胞中YAP信号通路蛋白水平 ($n=3$); E: qRT-PCR检测HN12和UM1细胞中YAP信号通路mRNA表达水平 ($n=3$); F: 细胞免疫荧光实验检测HN12和UM1细胞中YAP蛋白的核质分布情况及统计分析 ($n=3$)。与对照组相比, *为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$; ****为 $P<0.0001$ 。

图4 HTR2C可通过激活 $G\alpha_{q11}$ -YAP信号通路促进OSCC细胞的恶性进展

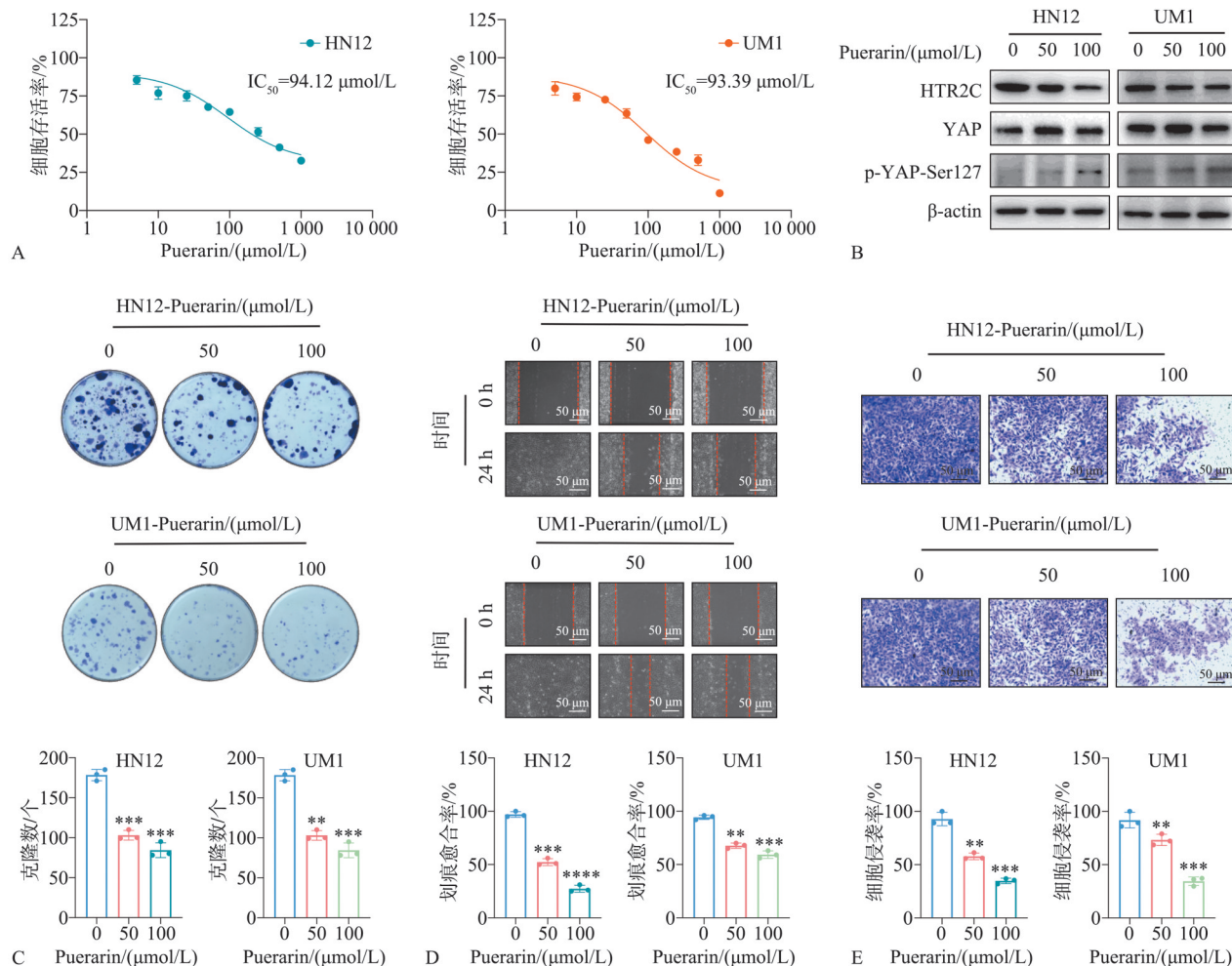
Fig 4 HTR2C promotes the malignant progression of OSCC cells by activating $G\alpha_{q11}$ -YAP signaling pathway

本研究系统探讨HTR2C在OSCC中的作用，揭示其通过 $G\alpha_{q11}$ -YAP信号通路促进肿瘤进展的机制。结果表明，HTR2C在OSCC组织中高表达，

并且其高表达与患者的不良预后显著相关。通过体外和体内实验证实，HTR2C在OSCC细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤生长中的关键作用。HTR2C敲

低或其抑制剂 (Puerarin, 又称NPI-031G, 化学式为 $C_{21}H_{20}O_9$, 是一种异黄酮类小分子化合物, 为 HTR2C 的潜在抑制剂^[30]) 处理, 均能显著抑制

OSCC 细胞的恶性生物学行为, 提示 HTR2C 可能是 OSCC 治疗的潜在靶点, 但需要进一步的临床研究加以佐证。



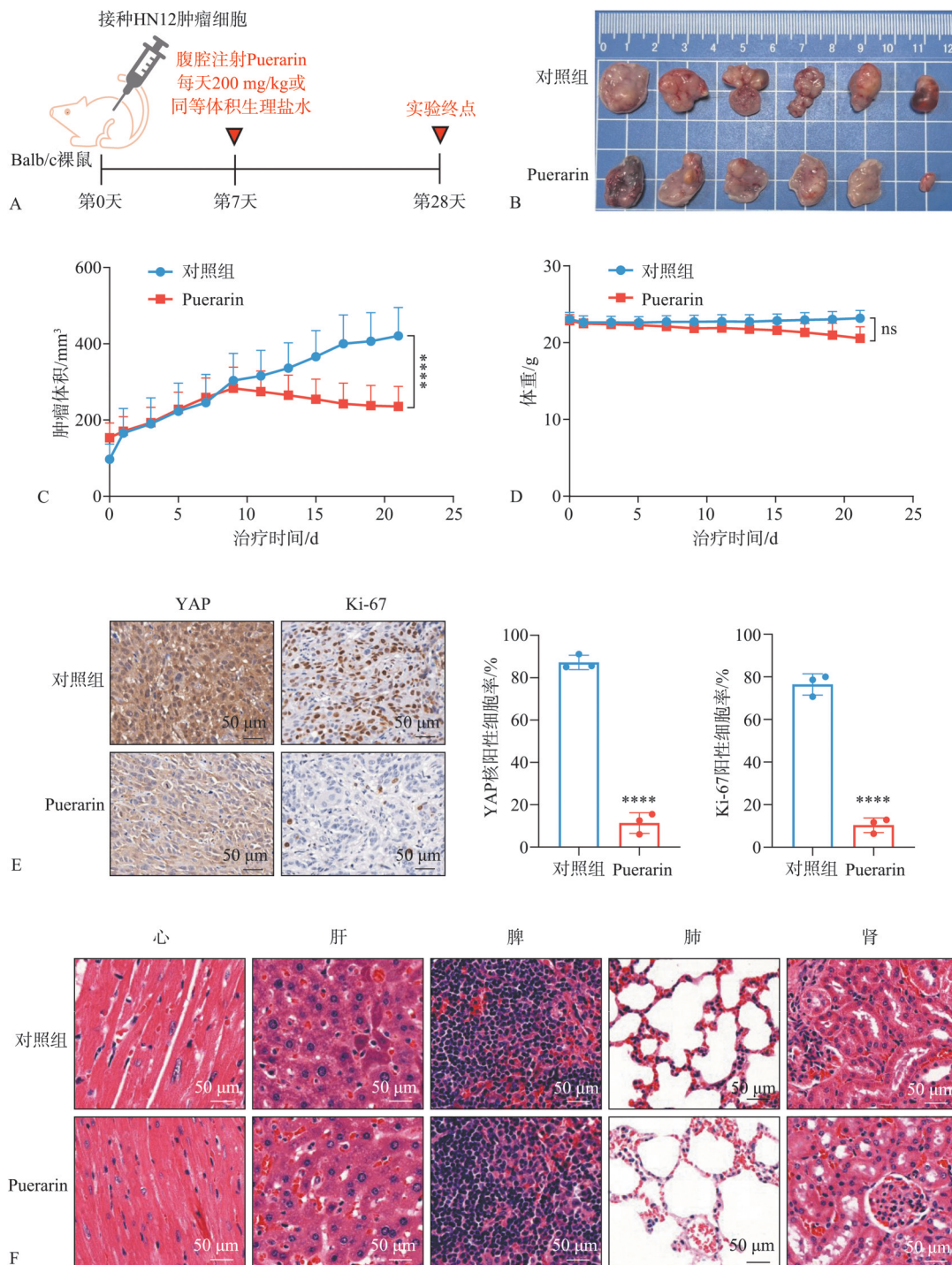
A: HTR2C 抑制剂抑制 HN12 和 UM1 细胞生长的 IC₅₀ 实验; B: WB 检测 HTR2C 抑制剂处理对细胞蛋白表达的影响 ($n=3$); C: HTR2C 抑制剂处理 HN12 和 UM1 细胞克隆形成实验结果及统计分析 ($n=3$); D: HTR2C 抑制剂处理 HN12 和 UM1 细胞划痕试验结果及统计分析 ($n=3$); E: HTR2C 抑制剂处理 HN12 和 UM1 细胞 Transwell 侵袭实验结果及统计分析 ($n=3$)。与对照组相比, **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$; ****为 $P<0.0001$ 。

图 5 HTR2C 抑制剂显著抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭

Fig 5 HTR2C inhibitor significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of OSCC cells

近年来, HTR2C 在肿瘤中的作用逐渐受到关注。已有研究^[16-20]表明, HTR2C 的高表达与乳腺癌、结直肠癌和肝细胞癌等多种恶性肿瘤的进展密切相关。在乳腺癌中, HTR2C 通过 JAK/STAT3/ERK 和腺苷酸环化酶/PKA 信号通路调控糖酵解和线粒体代谢, 并通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[16-18]。本研究发现, HTR2C 通过调控 $G\alpha_{q/11}$ -YAP 信号通路, 激活 YAP 的核易位, 并上调其下游靶基因 (CYR61、CTGF 和 AURKA) 的表达, 从而促进 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

此外, 下调 HTR2C 的表达可以降低 FAK 和 Cofilin 的磷酸化水平, 抑制 YAP 的激活, 进而抑制 OSCC 细胞的恶性表型。本研究系统阐明了 HTR2C 在 OSCC 中的致癌作用, 并揭示了其通过 $G\alpha_{q/11}$ -YAP 信号通路参与 OSCC 细胞的恶性生物学行为 (图 7)。此外本研究发现, HTR2C 抑制剂在体外能够剂量依赖性地抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 同时在裸鼠皮下移植瘤模型中显著抑制肿瘤生长, 这一结果进一步支持了 HTR2C 在 OSCC 中的促癌作用, 并提示针对 HTR2C 的抑制可能成为 OSCC 治疗的新策略。



A: 动物实验模式图; B: 对照组与给药组的肿瘤白光照片; C: 对照组与给药组的肿瘤体积随治疗时间的变化曲线 ($n=6$); D: 对照组与给药组的小鼠体重随治疗时间的变化曲线 ($n=6$); E: 对照组与给药组的肿瘤中YAP和Ki-67的IHC染色结果及统计分析 ($n=3$, 细胞数1 000~1 500个); F: 对照组与给药组的心、肝、脾、肺、肾的HE染色结果。与对照组相比, ****为 $P<0.0001$, ns为差异无统计学意义。

图6 HTR2C抑制剂在体内有效抑制OSCC移植瘤的生长

Fig 6 HTR2C inhibitor effectively inhibited the growth of subcutaneous xenograft tumors *in vivo*

GPCRs及其下游信号通路近年来成为抗肿瘤靶向治疗的重要研究方向。 $G\alpha_{q/11}$ -YAP信号轴通过整合GPCRs与Hippo通路的分子调控网络,在多种恶性肿瘤中发挥核心作用,参与调控肿瘤发生、

转移及耐药等恶性生物学进程。已有研究表明,GPCRs通过 $G\alpha_{q/11}$ 调控YAP/TAZ信号轴在多种恶性肿瘤中发挥促癌作用,例如GPR39在OSCC中的作用^[13]。在胃癌和结直肠癌中,GPCRs家族成员

CXCR7和ETAR,亦通过Gα_{q/11}-YAP轴驱动肿瘤发生和进展。HTR2C作为GPCR家族成员,属于HTR受体家族中的2C亚型,主要偶联Gα_{q/11}蛋白。本研究进一步拓展GPCRs在OSCC中的功能,揭示HTR2C作为Gα_{q/11}偶联受体,通过激活YAP信号通路调控OSCC进展的机制。

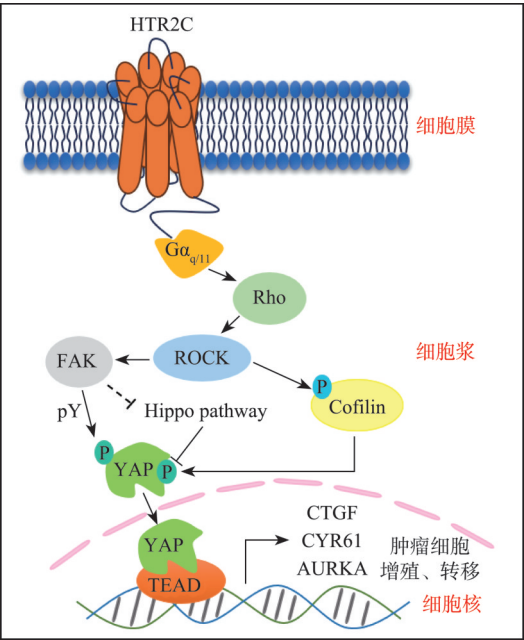


图 7 OSCC中HTR2C调控Gα_{q/11}-YAP信号通路的模式图

Fig 7 Schematic diagram of HTR2C in the regulation of the Gα_{q/11}-YAP signaling pathway in OSCC

尽管本研究系统揭示HTR2C在OSCC中的促癌作用及其潜在靶向治疗价值,但存在以下局限性。首先,本实验仅表明HTR2C可通过激活Gα_{q/11}-RhoA-FAK和Gα_{q/11}-RhoA-pCofilin信号通路,提升这2条通路上关键分子节点FAK和Cofilin的Tyr397位点和Ser3位点的磷酸化水平,调节YAP活性,促使其入核并激活下游靶基因(如CTGF、CYR61和AURKA)表达,但并未通过挽救或回补实验进一步明确分子机制。第二,OSCC具有高度的异质性,不同患者对HTR2C抑制的响应可能存在差异,本研究主要基于细胞系和裸鼠移植瘤模型,未来需进一步结合大规模临床样本及原位肿瘤模型验证HTR2C在不同患者群体中的作用。第三,HTR2C除通过Gα_{q/11}-YAP通路调控肿瘤进展外,可能还涉及其他信号通路,如ERK/MAPK、PI3K/AKT等^[16,19],未来需进一步解析HTR2C所参与调控的OSCC中其他潜在信号网络。

综上,本研究首次阐明了HTR2C在OSCC中的作用,并揭示了其通过Gα_{q/11}-YAP信号通路参与

肿瘤进展的机制。HTR2C的敲低或其抑制剂均显著抑制OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭,同时HTR2C的抑制剂在体内抑制肿瘤生长。这一发现为将HTR2C作为OSCC治疗的潜在靶点提供了理论依据。然而,HTR2C的信号调控网络仍需进一步探索,未来研究可聚焦于开发特异性的HTR2C小分子抑制剂,并评估其在临床转化中的可行性。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

[1] Mody MD, Rocco JW, Yom SS, et al. Head and neck cancer[J]. Lancet, 2021, 398(10318): 2289-2299.

[2] Chow LQM. Head and neck cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 382(1): 60-72.

[3] Tan YH, Wang ZH, Xu MT, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions[J]. Int J Oral Sci, 2023, 15(1): 44.

[4] Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 92.

[5] Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papilloma-virus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial[J]. Lancet, 2019, 393(10166): 40-50.

[6] Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study[J]. Lancet, 2019, 394(10212): 1915-1928.

[7] Xiang M, Holsinger FC, Colevas AD, et al. Survival of patients with head and neck cancer treated with definitive radiotherapy and concurrent cisplatin or concurrent cetuximab: a surveillance, epidemiology, and end results-medicare analysis[J]. Cancer, 2018, 124(23): 4486-4494.

[8] Zandberg DP, Cullen K, Bentzen SM, et al. Definitive radiation with concurrent cetuximab vs. radiation with or without concurrent cytotoxic chemotherapy in older patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: analysis of the SEER-

- medicare linked database[J]. *Oral Oncol*, 2018, 86: 132-140.
- [9] Long B, Brém E, Koyfman A. Oncologic emergencies: immune-based cancer therapies and complications[J]. *West J Emerg Med*, 2020, 21(3): 566-580.
- [10] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(2): 79-94.
- [11] Smith JS, Pack TF, Inoue A, et al. Noncanonical scaffolding of $G_{\alpha i}$ and β -arrestin by G protein-coupled receptors[J]. *Science*, 2021, 371(6534): eaay 1833.
- [12] Vecchio EA, White PJ, May LT. The adenosine A2B G protein-coupled receptor: recent advances and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 198: 20-33.
- [13] Jiang Y, Li T, Wu Y, et al. GPR39 overexpression in OSCC promotes YAP-sustained malignant progression[J]. *J Dent Res*, 2020, 99(8): 949-958.
- [14] Smith SR, Weissman NJ, Anderson CM, et al. Multi-center, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(3): 245-256.
- [15] Sharretts J, Galescu O, Gomatam S, et al. Cancer risk associated with lorcaserin-the FDA's review of the CAMELLIA-TIMI 61 trial[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(11): 1000-1002.
- [16] Sola-Penna M, Paixão LP, Branco JR, et al. Serotonin activates glycolysis and mitochondria biogenesis in human breast cancer cells through activation of the Jak1/STAT3/ERK1/2 and adenylate cyclase/PKA, respectively[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(2): 194-208.
- [17] Nakayama J, Tan L, Li Y, et al. A zebrafish embryo screen utilizing gastrulation identifies the HTR2C inhibitor pizotifen as a suppressor of EMT-mediated metastasis[J]. *Elife*, 2021, 10: e70151.
- [18] Zhan DD, Wang X, Zheng YF, et al. Integrative dissection of 5-hydroxytryptamine receptors-related signature in the prognosis and immune microenvironment of breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1147189.
- [19] Lin TC, Soorneedi A, Guan YX, et al. *Turicibacter* fermentation enhances the inhibitory effects of *An-trodia camphorata* supplementation on tumorigenic serotonin and Wnt pathways and promotes ROS-mediated apoptosis of Caco-2 cells[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1203087.
- [20] Wang H, Liu J. Exploration of sorafenib influences on gene expression of hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 577000.
- [21] Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 783-803.
- [22] Feng X, Arang N, Rigracciolo DC, et al. A platform of synthetic lethal gene interaction networks reveals that the GNAQ uveal melanoma oncogene controls the hippo pathway through FAK[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(3): 457-472.e5.
- [23] Brodie BB, Shore PA. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1957, 66(3): 631-642.
- [24] Michaelson IA, Whittaker VP. The subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in guinea pig brain [J]. *Biochem Pharmacol*, 1963, 12: 203-211.
- [25] Zieher LM, DeRobertis E. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in rat brain[J]. *Biochem Pharmacol*, 1963, 12: 596-598.
- [26] Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008, 31(3): 187-199.
- [27] Zamani A, Qu Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(16): 2360-2365.
- [28] Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, et al. Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis [J]. *Nat Med*, 2010, 16(3): 308-312.
- [29] Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization[J]. *J Biol Chem*, 1948, 176(3): 1243-1251.
- [30] Lv JY, Shi SQ, Zhang BX, et al. Role of puerarin in pathological cardiac remodeling: a review[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178: 106152.

(本文编辑 张玉楠)