DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20260421.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20260421.1906.004

P4HA2在口腔鳞状细胞癌中的临床表达及相关机制

杨 杰[1],王新诚[2],尉 娜[3],王长磊[1],王 鑫[4],迟增鹏[5]✉
(1.山东第二医科大学附属医院口腔科,山东 潍坊 261053;2.山东第二医科大学口腔医学院,山东 潍坊 261000;3.青岛市黄岛区中心医院查体科,山东 青岛 266000;4.青岛大学附属青岛市海慈医院/青岛市中医医院针灸科,山东 青岛 266000;5.青岛市黄岛区中心医院口腔科,山东 青岛 266000)

[**摘要**] **目的**:探究脯氨酰4-羟化酶亚基α2(Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2,P4HA2)在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)中的表达情况,并分析其对OSCC细胞迁移、侵袭和增殖能力的影响及潜在机制。**方法**:通过临床回顾分析2020年6月~2022年6月于山东第二医科大学附属医院口腔科手术切除的54例OSCC组织和癌旁组织,分析肿瘤组织中P4HA2的表达及与临床特征的相关性。同时,基于生物数据平台对*P4HA2* mRNA在OSCC中的表达特征及其与OSCC患者预后的情况进行补充分析;Western blot分析P4HA2在OSCC细胞系中的表达情况,并以此构建*P4HA2*敲低和过表达质粒模型,结合细胞表型实验分析其对癌细胞迁移、侵袭和增殖能力的影响;并结合Western blot实验分析P4HA2对TGF-β/Smad信号通路分子蛋白表达的影响。**结果**:在OSCC组织中P4HA2表达增高,且其表达与T分期、N分期、分化及临床分期相关;生物数据平台补充分析显示,*P4HA2* mRNA在OSCC组织中的表达高于正常组织,且其高表达可降低OSCC患者预后。敲低*P4HA2*表达后,OSCC细胞迁移、侵袭和增殖能力降低,凋亡能力增高;过表达*P4HA2*后,OSCC细胞的生物学能力逆转。敲低*P4HA2*表达后,OSCC细胞P4HA2、TGF-β、p-Smad、MMP-2蛋白表达降低,p27蛋白表达增高;过表达*P4HA2*后,OSCC细胞P4HA2、TGF-β、p-Smad、MMP-2蛋白表达增高,p27蛋白表达降低。**结论**:P4HA2在OSCC中高表达并影响患者预后,并可能通过上调TGF-β/Smad信号通路分子蛋白表达对OSCC细胞的迁移、侵袭和增殖能力产生促进作用。

[**关键词**] P4HA2;口腔鳞状细胞癌;TGF-β/Smad信号通路;侵袭;迁移;增殖
[**中图分类号**] R739.8 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 2097-5953(2026)21-1641-10

Clinical expression and mechanism of P4HA2 in oral squamous cell carcinoma

YANG Jie[1], WANG Xincheng[2], WEI Na[3], WANG Changlei[1], WANG Xin[4], CHI Zengpeng[5]✉
(1. *Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University, Weifang* 261053, *China*; 2. *School of Stomatology, Shandong Second Medical University, Weifang* 261000, *China*; 3. *Department of Physical Examination, Qingdao Huangdao District Central Hospital, Qingdao* 266000, *China*; 4. *Department of Acupuncture and Moxibustion, the Affiliated Qingdao Haici Hospital of Qingdao University/Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital, Qingdao* 266000, *China*; 5. *Department of Stomatology, Qingdao Huangdao District Central Hospital, Qingdao* 266000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Shandong Province Medical and Health Science and Technology Development Project* (202408020578); *Weifang City Science and Technology Development Project* (2023YX044)
[*Author*]: *YANG Jie, Associate Chief Physician, Master's Supervisor, E-mail*:13791691773@163.com.
[*Correspondence to*]: *CHI Zengpeng, E-mail*:*kqczp*6013@163.com.
Received: 2026-01-20 *Revised*: 2026-04-13 *JHMU*, 2026;32(21):1641-1650

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To investigate the expression of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2 (P4HA2) in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and the effect of OSCC cells migration, invasion, proliferation, and potential mechanism. Methods: A total of 54 cases of OSCC tissues and adjacent tissues resected in the Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Sec-

[基金项目]山东省医药卫生科技发展计划项目(202408020578);潍坊市科技发展计划项目(2023YX044)
[作者简介]杨杰,副主任医师,硕士生导师,E-mail:13791691773@163.com。
[通讯作者]迟增鹏,E-mail:kqczp6013@163.com。
[收稿日期]2026-01-20 [修回日期]2026-04-13 网络出版时间:2026-04-22 10:54:54

ond Medical University from June 2020 to June 2022 were retrospectively analyzed. The expression of P4HA2 in OSCC tissues and its relationship with the clinicopathological characteristics of OSCC patients were analyzed. Meanwhile, based on the biological data platform, a comprehensive analysis was conducted on the expression characteristics of *P4HA2* mRNA in OSCC and its correlation with the prognosis of OSCC patients. Western blot was used to verify the expression of P4HA2 in OSCC cell lines, and P4HA2 knockdown and overexpression plasmid models were constructed accordingly. Cell scratch test, Transwell invasion test, CCK-8 proliferation test, colony formation test and flow cytometry were used to analyze the effects of OSCC cells on migration, invasion and proliferation. Western blot were used to analyze the effect of P4HA2 on the expression of TGF-β/Smad signaling pathway molecules. **Results**: Compared to on was related to differentiation degree, T stage, N stage, and clinical stage. Biological data platform showed that the expression level of *P4HA2* mRNA in OSCC tissues was higher than that in normal tissues, and its high expression could reduce the prognosis of OSCC patients. After knockdown of *P4HA2* expression, the migration, invasion and proliferation of OSCC cells were decreased, and the apoptosis ability was increased. After overexpression of *P4HA2*, the migration, invasion and proliferation of OSCC cells were increased, and the apoptosis was decreased. The expression of P4HA2, TGF-β, p-Smad, and MMP-2 proteins in OSCC cells decreased, while the expression of p27 protein increased after *P4HA2* knockdown. After overexpression of *P4HA2*, the expressions of P4HA2, TGF-β, p-Smad, and MMP-2 proteins in OSCC cells were increased, and the expression of p27 protein was decreased. **Conclusion**: P4HA2 is highly expressed in OSCC and affects the prognosis of patients. P4HA2 may promote the migration, invasion and proliferation of OSCC cells by up-regulating the expression of TGF-β/Smad signaling pathway molecules.

[**Key words**] P4HA2; Oral squamous cell carcinoma; TGF-β/Smad signaling pathway; Invasion; Migration; Proliferation

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)作为头颈部高发恶性肿瘤,其全球患病率及转移风险均处于较高水平[1]。当前,受老龄化、烟草、酒精以及HPV感染等因素影响,该疾病的流行呈现上升态势[2]。流行病学数据显示,全球口腔癌年新增病例接近40万例,约占全部恶性肿瘤病例的2%[3]。该疾病具有局部浸润特性,常伴随区域淋巴结转移且术后易复发[4]。虽然临床诊疗技术持续革新,但患者的生存率仍不理想。因此,深入探究其致病机理,不仅有助于开发新的诊断标志物,更能为精准治疗提供关键靶点。

脯氨酰-4-羟化酶亚基α2(Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha2,P4HA2)作为关键的催化亚基,在胶原蛋白的生物合成、细胞外基质稳态以及多种生理和病理过程中扮演着核心角色[5]。研究表明,P4HA2可通过多种作用机制参与肿瘤的发生、发展[6]。此外有研究指出,P4HA2能够促进B细胞淋巴瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移能力[7,8]。近年来,P4HA2在头颈部肿瘤中的潜在作用逐渐受到关注。尽管P4HA2的促癌作用已在多种恶性肿瘤中得到广泛证实,但P4HA2在OSCC中的研究较少,且OSCC中该基因的表达模式、与临床病理特征的关联性及其调控肿瘤细胞恶性生物学行为的具体分子机制尚不明确。

基于此,本研究通过整合公共数据库样本与山东第二医科大学附属医院临床样本,系统分析P4HA2在OSCC组织中的表达情况,并采用体外细胞模型进一步探究该基因对OSCC细胞生物学能力的调控作用。以期为评估P4HA2作为OSCC治疗靶点的潜在价值提供实验依据,同时将有助于揭示OSCC发生、发展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本 将山东第二医科大学附属医院口腔科2020年6月~2022年6月行OSCC根治手术的54例肿瘤组织和癌旁组织石蜡切片纳入本研究进行分析。样本包含男性患者32例,女性患者22例,平均年龄为52.3岁。术后所有患者接受每6个月1次的电话随访,随访至2025年6月,记录每例患者的生存状况、是否出现肿瘤复发情况及生存时间。本研究获得医院临床研究伦理审批通过(No:SDSMU-2025-ky-363)。

1.1.2 主要试剂与细胞 OSCC细胞系(CAL-27、SCC-15、SCC-9和HN30)和口腔黏膜上皮细胞为山东第二医科大学馈赠。DMEM培养基、PBS缓冲液、胰酶(美国Gibco公司,货号:11965118、003002、15050065);胎牛血清(美国MCE公司,货号:HY-T1000);BCA试剂盒(美国Thermo公司,货号:A55865);Matrigel基质胶(美国Corning公司,货号:354234);P4HA2抗体(货号:AG4407)、TGF-β(货号:AF0297)、Smad2(货号:AF1300)、p-Smad2(货号:AF2545)、MMP-2(货号:AF1420)、p27(货号:AP027);CCK-8试剂盒(美国MCE公司,货号:HY-K0301);P4HA2敲低质粒sh-P4HA2及过表达质粒pcDNA3.1- P4HA2由维真生物科技有限公司构建。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 本研究采用Envision两步法对组织样本进行免疫组化染色，具体步骤包括组织脱蜡、梯度乙醇脱水、热诱导抗原修复、血清封闭、一抗（兔抗人P4HA2）和二抗（羊抗兔IgG）孵育、DAB显色以及苏木精复染。本研究采用双盲评估方法，由2名病理科医师独立进行染色结果判读。评估过程中的量化评分标准：染色深度分为4级（0＝阴性，1＝弱，2＝中等，3＝强），染色比例分为5级（0＝阴性，1＝＜10%，2＝10%～50%，3＝50%～80%，4＝≥80%）。最终得分通过染色深度与染色比例的乘积计算得出，总分范围为0～12分。基于总分值，蛋白表达被划分为低表达：分值≤4分和高表达：分值＞4分[9]。

1.2.2 生物信息学分析 基于GEPIA 3.0[10]和UALCAN[11]数据库分析*P4HA2*在OSCC中表达。在GEPIA3.0数据库中，通过“Expression DIY”模块输入基因“*P4HA2*”并选择“OSCC”，可快速获得其在癌与正常组织中表达差异的箱式图及统计学显著性，并利用“Survival Analysis”模块分析其表达与患者总生存期的关联。在UALCAN数据库中的“Enter gene symbol”项目栏中输入“*P4HA2*”，并在“TCGA dataset”中选择“OSCC”。选择“Expression”选择项分析*P4HA2*在OSCC中的mRNA表达情况。此外，通过从Kaplan-Meier Plotter[12]数据库中收集OSCC组织中*P4HA2*表达及与患者预后相关信息，补充分析OSCC组织中*P4HA2*表达对OSCC患者预后的影响。

1.2.3 细胞培养和转染 HN30、CAL-27、SCC-15和SCC-9 4种OSCC细胞系均使用含青-链霉素及10%FBS的DMEM完全培养基进行培养；而口腔黏膜上皮细胞则采用添加0.2 ng/mL重组表皮生长因子的角质细胞无血清培养基[13]。所有细胞在细胞培养箱中培养，定期更换培养基，并在细胞融合度达到80%～90%时进行传代操作。本实验通过构建特异性shRNA转染CAL-27细胞建立P4HA2敲低模型（sh-P4HA2组），并设置非靶向shRNA转染组（sh-NC组）作为阴性对照；同时采用pcDNA3.1-P4HA2质粒转染SCC-9细胞构建过表达模型（P4HA2组），并以空载体转染组（Vector组）作为平行对照。

1.2.4 CCK-8细胞增殖实验 采用胰蛋白酶对各实验组细胞进行消化处理，经充分重悬进行细胞计数后，吸取100 μL接种至96孔培养板中。分别在培养0、24、48及72 h后，向各孔加入10 μL CCK-8溶液，随后置于避光条件下孵育2 h。使用酶标仪记录$OD_{450\,nm}$值，并基于检测结果构建细胞增殖曲线。

1.2.5 平板克隆实验 将转染后的细胞于6孔板铺板，随后置于恒温细胞培养箱内培养10～14 d。待细胞克隆形成可见时，采用PBS缓冲溶液进行冲洗处理。终止培养时先吸弃原有培养基，采用4%多聚甲醛溶液固定细胞20 min，继以0.1%结晶紫染液处理20～30 min，经PBS缓冲液温和冲洗后自然干燥，最终计数各孔细胞克隆数量。

1.2.6 细胞划痕实验 将转染完成的细胞以6孔板为载体进行培养，待细胞生长至80%融合时，用含丝裂霉素C的无血清培养基处理细胞1 h。于无血清培养基培养24 h，采用200 μL移液器吸头与培养板保持垂直角度实施划痕操作，并用PBS缓冲液清除脱落的细胞残渣。各孔内补充含10%FBS的DMEM培养基继续培养，在细胞培养0 h和48 h的时间点观察划痕区域并拍照记录。

1.2.7 Transwell侵袭实验 在Transwell上下室分别加入100 μL细胞悬液（细胞密度10^5个/mL）和600 μL含10%FBS的培养基，放入细胞培养箱内培养24 h，培养结束后，甲醇固定25 min，0.5%结晶紫染色10 min，然后拭去未侵袭的细胞，采用倒置显微镜拍照观察。

1.2.8 Western blot实验 由BCA法进行蛋白浓度测定后，经过SDS-PAGE凝胶电泳分离，将蛋白转移至膜上，使用快速封闭液室温摇床孵育20 min。在4 ℃环境下孵育一抗（P4HA2、TGF-β、Smad2、p-Smad2、MMP-2及p27均为1∶1 000；GAPDH，1∶5 000）过夜，TBST洗膜3次。室温下孵育二抗1 h，再次进行洗膜。最后，使用ECL试剂盒进行曝光显影。测定蛋白条带的灰度值，并计算蛋白的相对表达量。

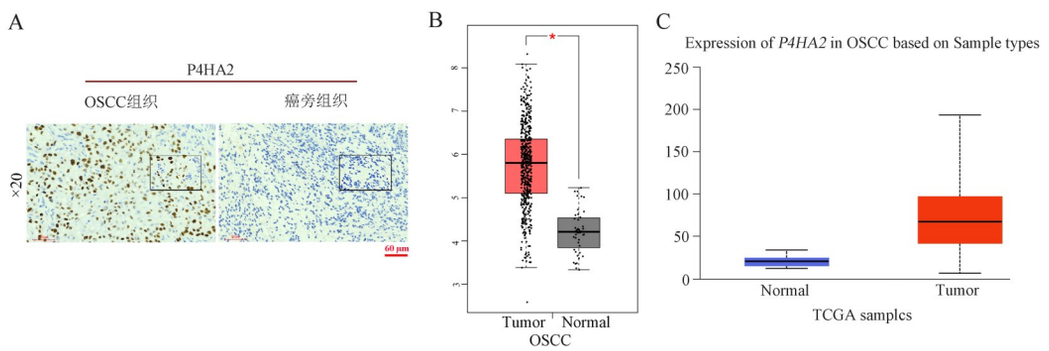
1.3 统计学处理

本研究采用GraphPad Prism 9.0、ImageJ和SPSS 16.0等专业统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用独立样本t检验或单因素方差分析进行组间比较；计数资料的分析则选用χ^2检验。统计分析以$P<0.05$为差异具有统计学意义。所有细胞表型实验独立重复3次。

2　结果

2.1　P4HA2在OSCC组织中的表达情况

在OSCC组织中，P4HA2主要表达于细胞核中。相较于癌旁组织，P4HA2在OSCC组织中的蛋白表达增加（$P<0.01$）（图1A、表1）。基于GEPIA3.0及UALCAN数据库补充分析显示，OSCC组织*P4HA2* mRNA相对表达高于癌旁组织（$P<0.05$）（图1B、C）。



A：P4HA2在OSCC组织中高表达（免疫组化）；B、C：基于GEPIA3.0及UALCAN数据平台补充验证OSCC组织中*P4HA2* mRNA表达情况

图1　P4HA2在OSCC组织中的表达情况

Fig 1　Expression of P4HA2 in OSCC tissues

表1　P4HA2在OSCC组织中的表达情况[n=54，n(%)]

Tab 1　Expression of P4HA2 in OSCC tissues[n=54，n(%)]

表达情况	OSCC组织	癌旁组织
高表达	33(61.11)	5(9.26)
低表达	21(38.89)	49(90.74)
χ^2	31.83	
P	<0.001	

2.2　P4HA2的表达与OSCC临床病理特征的关系

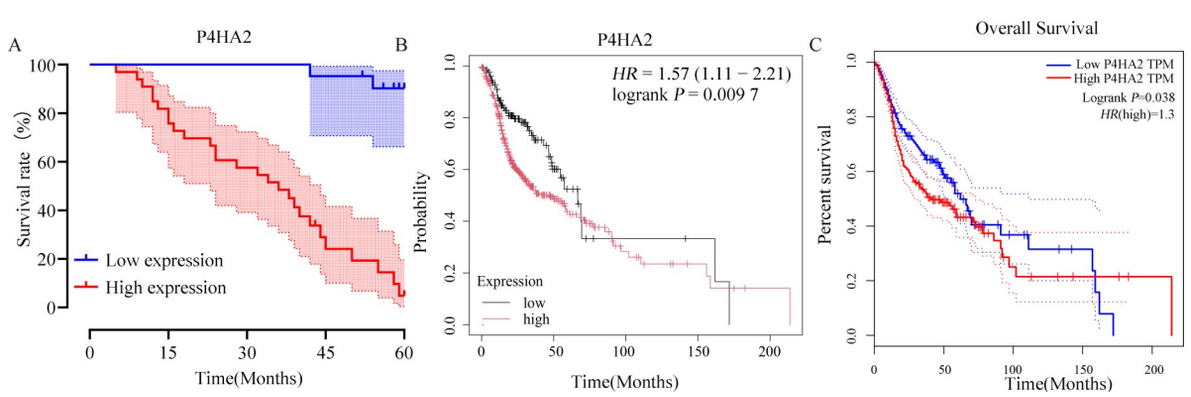
将54例OSCC患者根据免疫组化结果分为P4HA2高、低表达组。结果显示：与P4HA2低表达组比较，P4HA2高表达组均在中低分化、T_3～T_4期、淋巴结存在转移、临床分期Ⅲ～Ⅳ期方面比例较高（$P<0.01$）。而在性别、年龄、肿瘤位置及肿瘤直径方面的比较，无明显统计学意义（$P>0.05$）（表2）。

2.3　P4HA2高表达与OSCC患者预后不良有关

Kaplan-Meier生存分析结果显示，P4HA2高表达组患者总体生存率低于低表达组（$P<0.001$，图2A）。此外，基于GEPIA3.0及Kaplan-Meier Plotter数据平台补充分析表明，*P4HA2*高表达组较低表达组患者的5年生存率低（$P<0.05$）（图2B、C）。单因素和多因素Cox回归分析结果表明，P4HA2为OSCC患者生存预后的独立影响因子（$P<0.001$）（表3）。

2.4　P4HA2在OSCC细胞系中的表达情况

Western blot实验结果表明，与人口腔黏膜上皮细胞相比，P4HA2在CAL-27、SCC-15、SCC-9和HN30细胞中表达均升高（$P<0.05$）。其中P4HA2



A：Kaplan-Meier生存分析P4HA2表达与OSCC患者生存预后的关系；B：基于GEPIA3.0数据平台补充分析*P4HA2*表达与OSCC患者生存预后的关系；C：基于Kaplan-Meier Plotter数据平台补充分析*P4HA2*表达与OSCC患者生存预后的关系

图2　P4HA2表达与OSCC患者生存预后的关系

Fig 2　Relationship between P4HA2 expression and survival prognosis of OSCC patients

表2 P4HA2表达与OSCC临床病理特征的关系[n(%)]

Tab 2 Relationship between P4HA2 expression and clinical pathological characteristics of OSCC[n(%)]

临床特征		P4HA2		χ^2	P
		高表达组(n=33)	低表达组(n=21)		
性别	男	17(51.52)	15(71.43)	2.11	0.15
	女	16(48.48)	6(28.57)		
年龄/岁	≥60	4(12.12)	6(28.57)	2.30	0.13
	<60	29(87.88)	15(71.43)		
肿瘤位置	舌	21(63.64)	8(38.10)	4.10	0.25
	唇	8(24.24)	7(33.33)		
	颊	2(6.06)	4(19.05)		
	牙龈	2(6.06)	2(9.52)		
肿瘤直径/cm	>1	18(54.55)	11(52.38)	0.02	0.88
	≤1	15(45.45)	10(47.62)		
分化程度	中低分化	31(93.94)	3(14.29)	24.29	<0.001
	高分化	2(3.03)	18(85.71)		
T分期	T_3～T_4	30(90.91)	5(23.81)	25.34	<0.001
	T_1～T_2	3(9.09)	16(76.19)		
N分期	N+	27(81.82)	4(19.05)	20.68	<0.001
	N_0	6(18.18)	17(80.95)		
临床分期	Ⅰ～Ⅱ	5(15.15)	15(71.43)	17.43	<0.001
	Ⅲ～Ⅳ	28(84.85)	6(28.57)		

表3 OSCC患者预后的影响因素

Tab 3 Factors influencing the prognosis of OSCC patients

影响因素	单因素分析		P	多因素分析		P
	HR	95%CI		HR	95%CI	
年龄	1.24	0.71～2.73	0.31	—	—	—
性别	0.69	0.38～1.65	0.56	—	—	—
肿瘤位置	1.31	0.83～3.01	0.82	—	—	—
临床分期	3.66	1.52～7.67	0.004	1.52	0.91～3.22	0.16
分化程度	1.58	0.96～3.41	0.09	—	—	—
T分期	1.14	0.69～2.04	0.47	—	—	—
N分期	2.91	1.40～5.99	0.008	1.61	0.97～3.56	0.10
肿瘤直径	0.61	0.31～1.26	0.76	—	—	—
P4HA2表达	7.14	2.07～18.22	<0.001	6.12	1.94～16.38	<0.001

在CAL-27细胞中表达最高,在SCC-9细胞中表达最低(图3)。故选取CAL-27细胞构建P4HA2表达敲低细胞模型,将细胞分为sh-NC和sh-P4HA2组;SCC-9细胞构建P4HA2过表达细胞模型,将细胞分为Vector和P4HA2组。

2.5 P4HA2表达对OSCC细胞迁移能力的影响

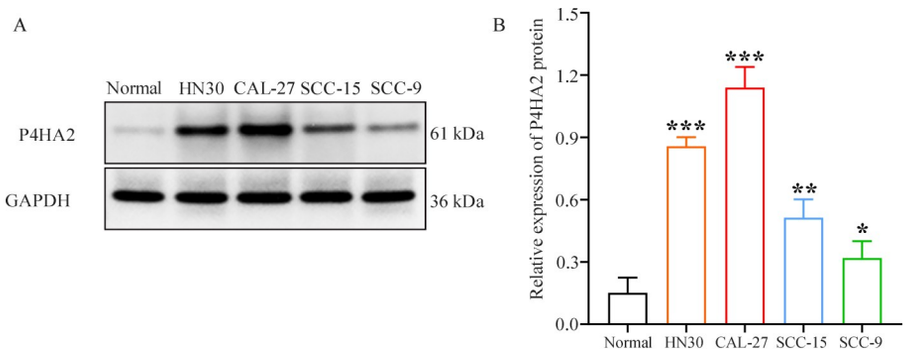
细胞划痕实验结果表明,相较于sh-NC组,敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组的划痕相对愈合面积降低;相较于Vector组,过表达P4HA2后P4HA2组的划痕相对愈合面积增高(P<0.01)(图4)。

2.6 P4HA2表达对OSCC细胞侵袭能力的影响

Transwell实验结果表明,相较于sh-NC组,敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组的穿膜细胞数降低;相较于Vector组,P4HA2组的穿膜细胞数增高(P<0.01)(图5)。

2.7 P4HA2表达对OSCC细胞增殖能力的影响

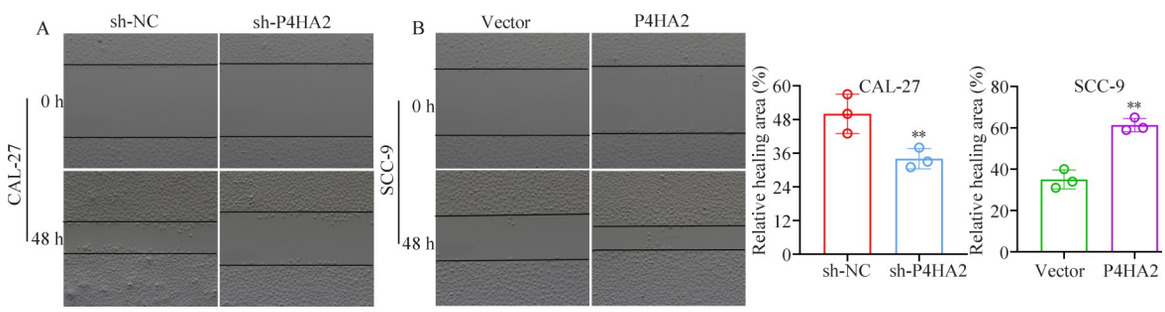
CCK-8增殖实验结果表明,相较于sh-NC组,敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组24、48、72 h的OD值降低;相较于Vector组,过表达P4HA2后P4HA2组24、48、72 h的OD值增高(P<0.01)(图6)。



A：P4HA2在正常对照细胞及OSCC细胞系中的蛋白表达情况；B：P4HA2在正常对照细胞及OSCC细胞系中的相对表达量；与Normal组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图3　P4HA2在OSCC细胞系中的表达情况

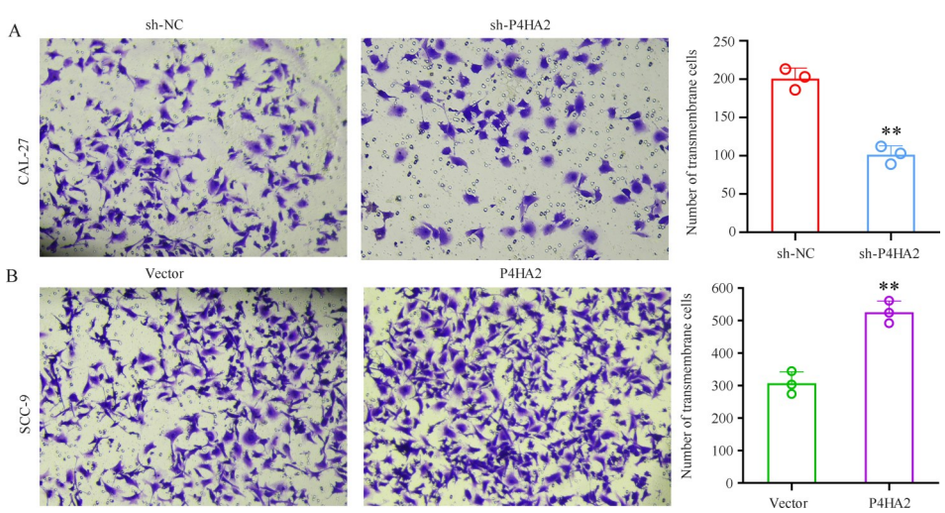
Fig 3　Expression of P4HA2 in OSCC cells



A：敲减P4HA2对OSCC细胞迁移能力的影响；B：过表达P4HA2对OSCC细胞迁移能力的影响；$^{**}P<0.01$

图4　P4HA2表达对OSCC细胞迁移能力的影响

Fig 4　Effect of P4HA2 expression on the migration ability of OSCC cells



A：敲减P4HA2对OSCC细胞侵袭能力的影响；B：过表达P4HA2对OSCC细胞侵袭能力的影响；$^{**}P<0.01$

图5　P4HA2表达对OSCC细胞侵袭能力的影响

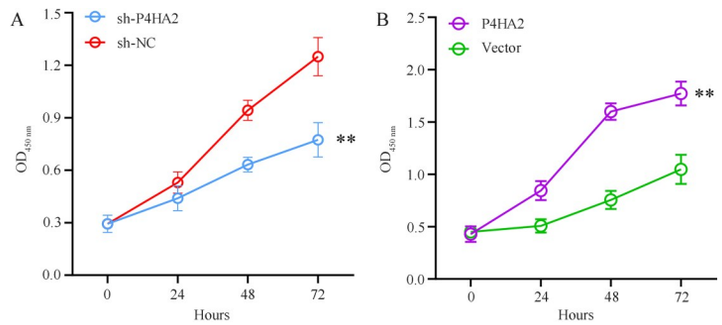
Fig 5　The influence of P4HA2 expression on the invasion ability of OSCC cells

2.8　P4HA2表达对OSCC细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验结果表明，相较于sh-NC组，敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组的克隆形成数降低；相较于Vector组，P4HA2组的克隆形成数增高（$P<0.01$）（图7）。

2.9　P4HA2表达对OSCC细胞凋亡能力的影响

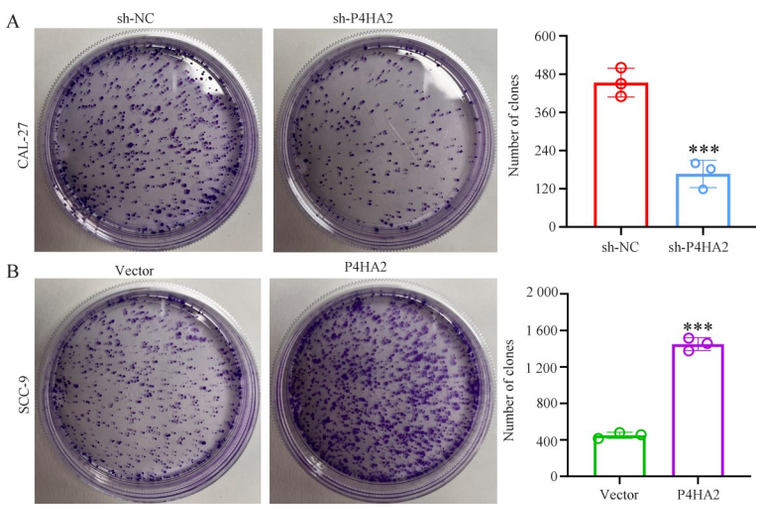
流式细胞术实验结果表明，相较于sh-NC组，敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组的细胞凋亡率增高；相较于Vector组，过表达P4HA2后P4HA2组的细胞凋亡率降低（$P<0.01$）（图8）。



A:敲减P4HA2对OSCC细胞增殖能力的影响;B:过表达P4HA2对OSCC细胞增殖能力的影响;$^{**}P<0.01$

图6　P4HA2表达对OSCC细胞增殖能力的影响

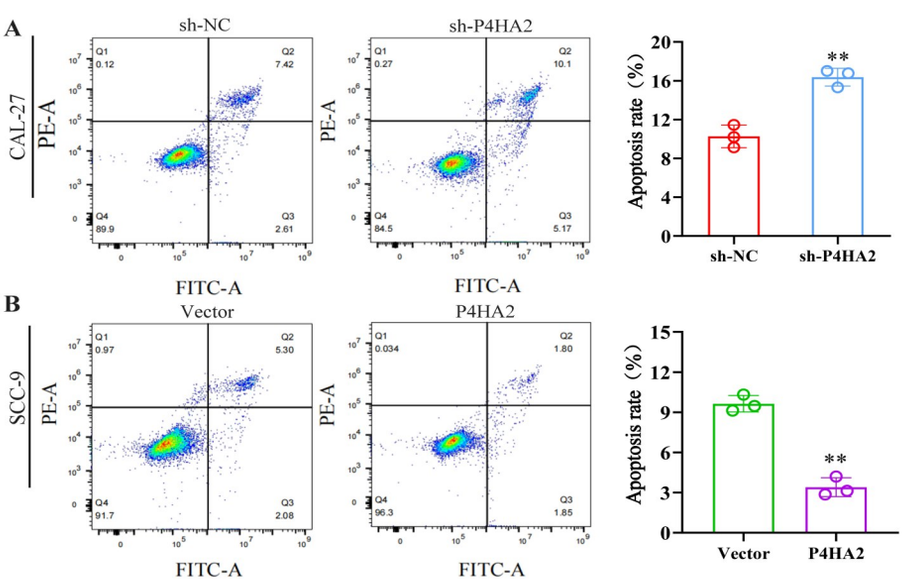
Fig 6　The effect of P4HA2 expression on the proliferation ability of OSCC cells



A:敲减P4HA2对OSCC细胞克隆形成能力的影响;B:过表达P4HA2对OSCC细胞克隆形成能力的影响;$^{***}P<0.001$

图7　P4HA2表达对OSCC细胞克隆形成能力的影响

Fig 7　Effect of P4HA2 expression on the clonogenic ability of OSCC cells



A:敲减P4HA2对OSCC细胞凋亡能力的影响;B:过表达P4HA2对OSCC细胞凋亡能力的影响;$^{**}P<0.01$

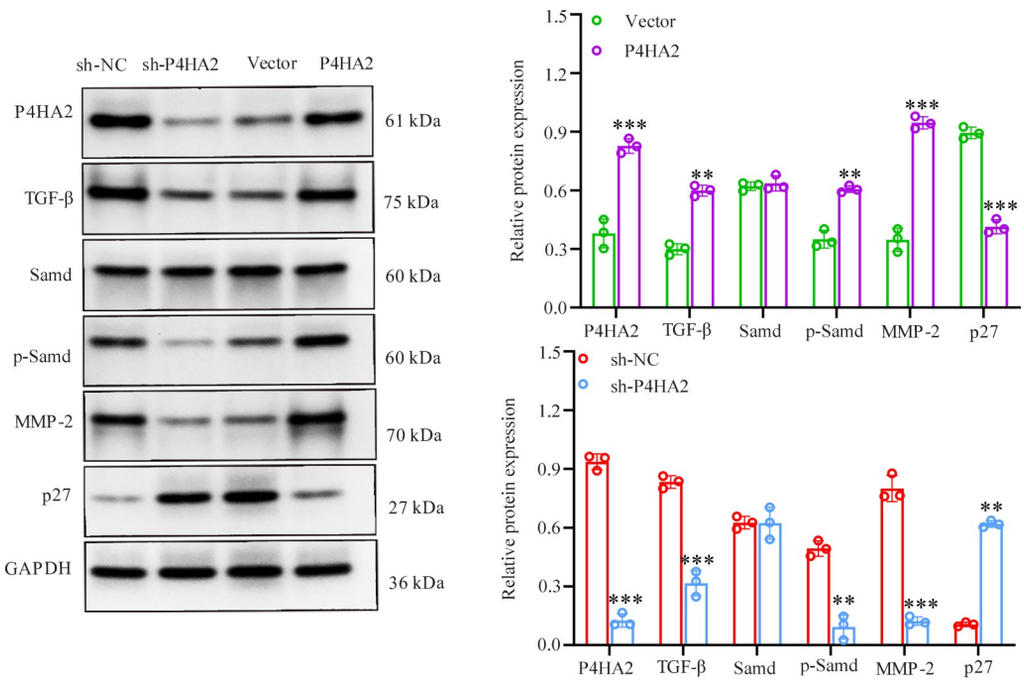
图8　P4HA2表达对OSCC细胞凋亡能力的影响

Fig 8　Effect of P4HA2 expression on the apoptotic capacity of OSCC cells

2.10　P4HA2表达对TGF-β/Smad信号通路信号蛋白表达的影响

Western blot数据显示,相较于sh-NC组,敲低P4HA2表达后sh-P4HA2组P4HA2、TGF-β、p-Smad和MMP-2蛋白表达降低,p27蛋白表达增高,Smad蛋白表达无明显变化;相较于Vector组,

过表达P4HA2后P4HA2、TGF-β、p-Smad和MMP-2蛋白表达增高，p27蛋白表达降低，Smad蛋白表达无明显变化（图9）。



$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$

图9　P4HA2表达对TGF-β/Smad信号通路信号蛋白表达的影响

Fig 9　Effect of P4HA2 expression on the expression of signaling proteins in the TGF-β/Smad signaling pathway

3　讨论

OSCC作为头颈部高发肿瘤类型，其好发区域包括舌体、口底、齿龈以及颊黏膜等解剖部位[14]。该肿瘤易表现出术后复发倾向和远处转移特性，同时临床治疗中易出现药物抵抗现象[15]。当前诊疗技术主要采用以手术切除的方式，但患者5年生存率仍维持在较低水平[16]。鉴于此，深入探究新型生物分子靶点在OSCC诊疗中的应用价值具有重要的科学意义和临床转化前景。

研究表明，P4HA2蛋白在胃肠道等恶性肿瘤中呈现过度表达现象，并与肿瘤的进展存在相关性[17]。且P4HA2蛋白在发生转移的黑色素瘤中表达明显增高，可参与调控黑色素瘤细胞的迁移能力[18]。此外有研究指出，P4HA2还可作为甲状腺乳头状癌、脑胶质瘤等多种肿瘤的预后因素[19,20]。在本研究中，免疫组化结果表明，P4HA2在OSCC组织中高表达，且UALCAN及GEPIA 3.0数据库补充验证表明，*P4HA2*在OSCC组织中高表达；此外，Western blot实验结果表明，相较于口腔黏膜上皮细胞，P4HA2在OSCC细胞系中同样高表达。本研究结果与既往研究结果一致，提示P4HA2高表达可能与OSCC的发生、发展相关。基于此，本研究进一步分析P4HA2与OSCC临床病理特征及预后的关系显示，P4HA2高表达与分化程度、T分期、N分期及临床分期相关；且其高表达可降低OSCC患者预后。以上结果及单因素和多因素Cox分析结果表明，P4HA2与OSCC临床病理特征及预后相关，且P4HA2是OSCC患者预后独立影响因素。

此外，P4HA2还可作为直接靶点经由Wnt/β-catenin信号来调节肝细胞癌的恶性行为，与肝癌的发生、发展关联密切[21]。而在肺腺癌中，P4HA2的高表达可进一步激活mTOR信号通路促进结其癌细胞的增殖和迁移[22]。在直肠癌中，P4HA2可介导SP1进而促进癌细胞增殖和侵袭[23]。本研究结果表明，在敲低*P4HA2*表达后，OSCC细胞的迁移、侵袭和增殖能力降低，凋亡能力增高；而过表达*P4HA2*后，OSCC细胞的以上表型能力则出现逆转。本研究结果与既往研究相似，提示P4HA2高表达可对OSCC细胞的迁移、侵袭和增殖能力起促进作用，对凋亡能力起抑制作用。

TGF-β/Smad信号通路是一种高度保守的分子机制，通过调节细胞增殖、凋亡、分化、运动、谱系特异性和干细胞稳态影响癌症发生、发展[24]。TGF-β的异常表达常发生于病理状态，尤其是在癌症晚期中，

TGF-β的活化可促进肿瘤的发生,包括转移和化疗耐药[25]。在该信号通路中,TGF-β家族的细胞因子首先与TβRⅠ和TβRⅡ受体结合。具有激酶活性的TβRⅠ进一步磷酸化Smad2/3蛋白,活化的Smad2/3可以与Smad4结合,最终完成Smad多聚体的形成,然后转位到细胞核内调节基因转录[26]。研究证明,激活TGF-β/Smad信号通路可促进膀胱癌进展[27]。而抑制TGF-β/Smad通路有助于降低结直肠癌细胞活力,抑制其转移和肿瘤生长[28]。在本研究中,敲低P4HA2使TGF-β和p-Smad2表达降低;但过表达P4HA2后,OSCC细胞中以上蛋白表达则出现逆转。本研究结果与Feng等[29]报道相似,提示P4HA2高表达可通过上调TGF-β/Smad信号通路,促进OSCC细胞增殖、迁移、侵袭,抑制细胞凋亡发生。

MMP-2作为一种重要的Ⅳ型胶原酶,在肿瘤微环境中通过特异性降解基底膜的主要成分—Ⅳ型胶原和层黏连蛋白,成为调控癌症进展的关键分子[30]。研究表明,TGF-β1可经由TGF-β1/Smad信号转导途径发挥作用,并通过诱导Smad蛋白的磷酸化激活,进而显著调控MMP-2的转录表达,进影响肿瘤细胞的侵袭和转移[31]。有丝分裂抑制因子p27作为CDKIs家族成员,可通过抑制DNA复制抑制肿瘤细胞的增殖[32]。研究表明,沉默HOXC6可通过TGF-β/Smad信号通路抑制宫颈癌细胞的上皮-间质转化,并通过上调p27蛋白表达抑制癌细胞活力[33]。本研究结果表明,敲低P4HA2使TGF-β和p-Smad表达降低,MMP-2蛋白表达下调,p27蛋白表达上调;而过表达P4HA2使TGF-β和p-Smad表达增高,MMP-2蛋白表达上调,p27蛋白表达下调。该结果与以上研究结果相一致。提示P4HA2高表达可通过上调TGF-β/Smad信号通路,进而上调MMP-2蛋白表达及下调p27蛋白表达,促进OSCC细胞增殖、迁移、侵袭,抑制细胞凋亡发生。

此外本研究尚存在局限性:(1)本研究虽得出P4HA2高表达与不良预后及临床分期相关的结论,但由于存在单中心、小样本局限性,致使统计学功效可能受限。后续将在此基础上进一步采用多中心及大样本量的方式补充研究;(2)同时,本研究缺乏体内实验数据(如裸鼠皮下成瘤模型)的支持,对于在生理病理环境下缺乏说服力。本课题组后续将在此基础上进一步完善体内研究,完善研究结论。

综上所述,P4HA2在OSCC中高表达并影响患者预后,并可能过上调TGF-β/Smad信号通路分子蛋白表达对OSCC细胞的迁移、侵袭和增殖能力产生促进作用。

作者贡献度说明:

杨杰、迟增鹏:负责选题、设计,执行研究和论文撰写;王新诚、尉娜:负责数据分析、论文修改;王长磊、王鑫:负责研究结果的分析,解释和论文修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Tan Y, Wang Z, Xu M, et al. Oral squamous cell carcinomas: State of the field and emerging directions[J]. Int J Oral Sci, 2023, 15(1): 44.

2 Li C, Dong X, Li B. Tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1485174.

3 Huang S, Zhang J, Qiao Y, et al. CHRDL1 inhibits OSCC metastasis *via* MAPK signaling-mediated inhibition of MED29[J]. Mol Med, 2024, 30(1): 187.

4 Xue N, Wang Y, Wang Z, et al. Trends in immunotherapy for oral squamous cell carcinoma [J]. Cell Oncol (Dordr), 2025, 48(5): 1159-1179.

5 Shi R, Liu Y, Yu R. Targeting collagen Prolyl 4-hydroxylase for cancer treatment[J]. Med Oncol, 2025, 43(2): 99.

6 Shi R, Gao S, Zhang J, et al. Collagen prolyl 4-hydroxylases modify tumor progression [J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 2021, 53(7): 805-814.

7 Li Q, Liu Y, Wu J, et al. P4HA2 hydroxylates SUFU to regulate the paracrine Hedgehog signaling and promote B-cell lymphoma progression [J]. Leukemia, 2024, 38(8): 1751-1763.

8 Li H, Liu J, Jiao Y, et al. Single-cell and spatial transcriptomics reveal P4HA2-mediated radiotherapy resistance mechanisms in breast cancer [J]. Theranostics, 2026, 16(5): 2192-2220.

9 张学颖, 陈冲, 张伟, 等. TOP2A在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与肿瘤进展的相关性研究[J]. 口腔生物医学, 2025, 16(6): 330-335.
Zhang XY, Chen C, Zhang W, et al. The upregulated expression of TOP2A in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumor progression [J]. Oral Biomed, 2025, 16(6): 330-335.

10 Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102.

11 Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform[J]. Neoplasia, 2022, 25: 18-27.

12 耿华, 李磊, 杨杰, 等. 过氧化物还原酶-4在口腔鳞状细胞癌中的表达及对癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 口腔疾病防治, 2025, 33(4): 278-288.

Geng H, Li L, Yang J, et al. Expression of peroxiredoxin 4 in oral squamous cell carcinoma and its effects on cancer cell proliferation, migration, and invasion[J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2025, 33(4): 278-288.

13 秦欢，王洁，杨杰，等. Polo样激酶4调控口腔鳞状细胞癌侵袭、增殖和凋亡的分子机制研究[J]. 中国癌症杂志，2025，35(4)：365-375.
Qin H, Wang J, Yang J, et al. Mechanistic study on PLK4 regulation of invasion, proliferation and apoptosis in oral squamous cellcarcinoma[J]. China Oncol, 2025, 35(4): 365-375.

14 余丽，周铁军，吴晓，等. 微小RNA-302a-3p靶向溶酶体相关膜蛋白5抑制口腔鳞状细胞癌侵袭转移的研究[J]. 华西口腔医学杂志，2025，43(4)：547-558.
Yu L, Zhou TJ, Wu X, et al. miR-302a-3p targeting lysosomal-associated membrane protein 5 inhibits the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma [J]. West China J Stomatol, 2025, 43(4): 547-558.

15 Mivehchi H, Eskandari-Yaghbastlo A, Ghazanfarpour M, et al. Microenvironment-based immunotherapy in oral cancer: A comprehensive review[J]. Med Oncol, 2025, 42(5): 140.

16 Radaic A, Kamarajan P, Cho A, et al. Biological biomarkers of oral cancer[J]. Periodontol 2000, 2024, 96(1): 250-280.

17 Zhang K, Ni X, Wang C, et al. Brusatol inhibits gastric cancer by targeting P4HA2 and supressing glycolysis-driven histone lactylation [J]. Phytomedicine, 2026, 150: 157585.

18 Kaluz S, Zhang Q, Kuranaga Y, et al. Targeting HIF-activated collagen prolyl 4-hydroxylase expression disrupts collagen deposition and blocks primary and metastatic uveal melanoma growth[J]. Oncogene, 2021, 40(33): 5182-5191.

19 Wu F, Liu Q, Zhang J, et al. Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 acts as a TRIM21 ubiquitination substrate to promote papillary thyroid cancer progression *via* the glycolytic pathway[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 395.

20 Zhang M, Zhou Z, Liu Z, et al. Exploring the potential biomarkers for prognosis of glioblastoma *via* weighted gene co-expression network analysis[J]. Peer J, 2022, 10: e12768.

21 商玲，姜雯迪，张俊丽，等. P4HA2通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进肝癌的发生和发展[J]. 南方医科大学学报，2022，42(5)：665-672.
Shang L, Jiang WD, Zhang JL, et al. P4HA2 promotes occurrence and progression of liver cancer by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2022, 42(5): 665-672.

22 Jin E, Wang S, Chen D, et al. P4HA2 activates mTOR *via* hydroxylation and targeting P4HA2-mTOR inhibits lung adenocarcinoma cell growth[J]. Oncogene, 2024, 43(24): 1813-1823.

23 Dang X, Chen X, Liang Z, et al. P4HA2 promotes tumor progression and is transcriptionally regulated by SP1 in colorectal cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2024, 25(1): 2361594.

24 Xin X, Cheng X, Zeng F, et al. The role of TGF-β/SMAD signaling in hepatocellular carcinoma: From mechanism to therapy and prognosis[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(4): 1436-1451.

25 Shi X, Yang J, Deng S, et al. TGF-β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 135.

26 Tu S, Huang W, Huang C, et al. Contextual regulation of TGF-β signaling in liver cancer[J]. Cells, 2019, 8(10): 1235.

27 Shi H, Xie J, Wang K, et al. LINC01451 drives epithelial-mesenchymal transition and progression in bladder cancer cells *via* LIN28/TGF-β/Smad pathway[J]. Cell Signal, 2021, 81: 109932.

28 Xia YZ, Shan GF, Yang H, et al. Cisatracurium regulates the CXCR4/let-7a-5p axis to inhibit colorectal cancer progression by suppressing TGF-β/SMAD2/3 signalling[J]. Chem Biol Interact, 2021, 339: 109424.

29 Feng J, Li Y, He F, et al. RBM15 silencing promotes ferroptosis by regulating the TGF-β/Smad2 pathway in lung cancer[J]. Environ Toxicol, 2023, 38(4): 950-961.

30 Wolosowicz M, Prokopiuk S, Kaminski TW. The complex role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(24): 13691.

31 Cao W, Wang Q, Huang C. Let-7a inhibits tumor metastasis by regulating TGF-β/Smad signaling in the colorectal adenocarcinoma cell line LS-174T[J]. Anticancer Res, 2021, 41(8): 3801-3808.

32 Huang Y, Lu H, Liu Y, et al. Micropeptide hSPAR regulates glutamine levels and suppresses mammary tumor growth *via* a TRIM21-P27KIP1-mTOR axis[J]. Embo J, 2025, 44(5): 1414-1441.

33 Zhang F, Ren CC, Liu L, et al. HOXC6 gene silencing inhibits epithelial-mesenchymal transition and cell viability through the TGF-β/smad signaling pathway in cervical carcinoma cells[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 204.

[本文编辑] 朱金月