

## 基于网络药理学、分子对接技术和实验验证探究 17-羟-岩大戟内酯 B-4 对膀胱癌 T24 细胞的作用机制

李 旭<sup>1</sup>, 马立威<sup>2</sup>, 荣 华<sup>2</sup>, 石鑫敏<sup>2</sup>, 刘吉成<sup>2\*</sup>

1. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

**摘要:** **目的** 通过网络药理学、分子对接技术和实验验证探究 17-羟-岩大戟内酯 B-4 (HJB-4) 对膀胱癌 T24 细胞的作用机制。**方法** 运用网络药理学对 HJB-4 的作用靶点进行筛选, 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并进行分子对接验证。采用 CCK-8 检测 HJB-4 对膀胱癌 T24 细胞的增殖抑制活性, 采用流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测细胞凋亡情况, 采用 JC-1 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位变化情况; Western blotting 检测 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、Bcl-2 相互作用细胞死亡介质 (Bim)、细胞色素 C (Cyt-C)、裂解化半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved-Caspase-3) cleaved Caspase-9、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路相关蛋白表达水平。**结果** 通过网络药理学预测, 共获取 315 个共同靶点; GO 分析和 KEGG 通路富集分析结果显示 HJB-4 可能通过丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、PI3K/Akt 通路及凋亡途径等发挥作用。分子对接显示 HJB-4 与核心靶点的结合能均小于 -7.0 kcal/mol。体外实验结果显示, HJB-4 以增加细胞增殖抑制率、细胞凋亡率 ( $P < 0.05$ 、0.01)。HJB-4 (1.0、2.0、4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 JC-1 单体的比值增加 ( $P < 0.01$ )。Western blotting 实验结果发现, HJB-4 能下调凋亡蛋白 Bcl-2、p-PI3K、p-Akt 表达, 上调促凋亡蛋白 Bax、Cyt-C、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 的表达水平 ( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** HJB-4 通过多靶点抑制膀胱癌 T24 细胞增殖, 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 诱导线粒体功能障碍, 激活内源性凋亡通路, 从而发挥抗膀胱癌作用。

**关键词:** 17-羟-岩大戟内酯 B-4; 膀胱癌; 网络药理学; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 蛋白激酶 B; 线粒体功能障碍

中图分类号: R287.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)03-0606-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.007

## Mechanism of 17-hydroxy-jolkinolide B-4 on bladder cancer T24 cells based on network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification

LI Xu<sup>1</sup>, MA Liwei<sup>2</sup>, RONG Hua<sup>2</sup>, SHI Xinmin<sup>2</sup>, LIU Jicheng<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

2. Institute of Medical Sciences, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

**Abstract: Objective** To investigate the targets and mechanisms of HJB-4 on bladder cancer T24 cells based on network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification. **Methods** Network pharmacology was employed to screen the potential targets of HJB-4, construct a PPI network, conduct GO function and KEGG pathway enrichment analysis, and perform molecular docking verification. Cell viability was detected by CCK-8 assay. Flow cytometry and confocal laser microscopy were used to detect changes in cell apoptosis, mitochondrial membrane potential levels. Western blotting was performed to examine the effects of HJB-4 on the expression levels of Bcl-2, Bax, Bim, Cyt-C, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3, and PI3K/Akt pathway. **Results** Network pharmacology analysis predicted 315 common targets between HJB-4 and bladder cancer. GO and KEGG enrichment analysis indicated that HJB-4 may exert its effects through pathways such as the MAPK signaling pathway, PI3K/Akt pathway, and apoptosis pathway. Molecular docking demonstrated that the binding energy of between HJB-4 and core targets was all

收稿日期: 2026-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174207); 齐齐哈尔医学科学院项目 (QMSI2023B-05); 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目 (2023-KYYWF-0857)

作者简介: 李 旭, 男, 硕士, 研究方向为天然药物抗肿瘤。E-mail: lx940762297@163.com

\*通信作者: 刘吉成, 男, 教授, 博士研究生导师。E-mail: jcliu@qmu.edu.cn

below  $-7.0$  kcal/mol. The results of the *in vitro* experiments showed that HJB-4 increased the inhibition rate of cell proliferation and the apoptosis rate ( $P < 0.05, 0.01$ ). The ratio of JC-1 monomers in the HJB-4 (1.0, 2.0, 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) groups increased ( $P < 0.01$ ). The results of the Western blotting experiment revealed that HJB-4 could down-regulate the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2, p-PI3K, and p-Akt, and up-regulate the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax, Cyt-C, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-3 ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** HJB-4 inhibits the proliferation of bladder cancer T24 cells through multiple targets, induces mitochondrial dysfunction, activates the intrinsic apoptosis pathway, and suppresses cell migration, thereby exerting anti-bladder cancer effects.

**Key words:** HJB-4; bladder cancer; network pharmacology; PI3K; Akt; mitochondrial dysfunction

膀胱癌是世界十大肿瘤之一，也是一种最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一，其严重威胁着人类的生命与健康<sup>[1]</sup>。目前，膀胱癌的治疗方法主要包括手术治疗、放疗、化疗、免疫治疗等，但晚期膀胱癌仍缺乏有效的治疗手段，导致患者预后差，死亡率高<sup>[2]</sup>。因此，其治疗面临高复发与耐药挑战，亟需开发新型高效药物。狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 为大戟科多年生草本植物，主要分布于我国东北、华北等地<sup>[3]</sup>。最早始载于《神农本草经》，根部入药，有毒，民间有用于治疗皮肤、结核、肿瘤等病<sup>[4]</sup>。岩大戟内酯 B 是狼毒大戟的主要成分，17-羟-岩大戟内酯 B (HJB) -4 以 HJB 为先导结构，通过酯化引入查尔酮连接臂并融合杂环结构而以增强活性<sup>[5-7]</sup>。本研究探究 HJB-4 对膀胱癌 T24 细胞的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人膀胱癌 T24 细胞株购买自中国科学院细胞库。将 T24 细胞接种于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件在细胞培养箱中进行培养，取对数生长期 T24 细胞进行实验。

### 1.2 药品与试剂

HJB-4 (质量分数  $> 98\%$ ) 由齐齐哈尔医学院药学院药化教研室合成，其结构式见图 1。药物以 DMSO 溶解为 10 mmol/L 储备液，室温保存。

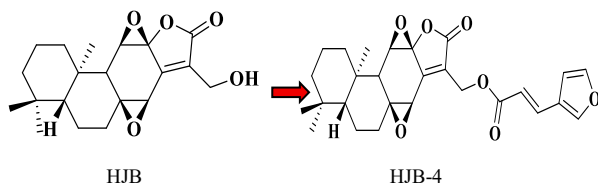


图 1 HJB 和 HJB-4 结构式

Fig. 1 HJB and HJB-4 structural formulas

DMEM 培养液 (批号 GUMD-B303) 购自江苏海星生物科技有限公司; 胎牛血清 (批号 FBP-C520) 购自江苏海星生物科技有限公司; 青霉素 - 链霉素

溶液 (批号 GUSA-R0002) 购自江苏海星生物科技有限公司; 胰酶消化液 (批号 A208250412)、CCK-8 试剂 (批号 C0038) Tris 6.8 (A137250418)、Tris 8.8 (A134250414)、APS (A039B250414) TBST (A118250213)、ECL 显色试剂盒 (批号 P0018AM) 均购自上海碧云天生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号 3498S)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (批号 2772S)、裂解化半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved-Caspase-3, 批号 9662S)、Caspase-9 (批号 9506S)、Bcl-2 相互作用细胞死亡介质 (Bim) 抗体 (批号 2933S)、细胞色素 C (Cyt-C) 抗体 (批号 12963S)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 抗体 (批号 4292S)、蛋白激酶 B (Akt) 抗体 (批号 4691S)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶 (p-PI3K) 抗体 (批号 4228S)、磷酸化蛋白激酶 B (P-Akt) 抗体 (批号 13038S) 均购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (批号 500CSA2115)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (批号 500CSA2108) 购自苏州康何欣生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒 (批号 abs50001) 购自 Abcam 公司、BCA 蛋白测定试剂盒 (批号 20C08A48) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 仪器

EM208S 型电子显微镜 (荷兰飞利浦公司);  $\text{CO}_2$  恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司); FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); 电泳仪 (北京君仪公司)。

## 2 方法

### 2.1 HJB-4 药物靶点获取

使用 ChemDraw 20.0 绘制 HJB-4 化学结构，保存为 MDL MolFile 格式。将结构文件上传至 Pharm Mapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 和 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行 HJB-4 靶点预测。

## 2.2 膀胱癌疾病靶点获取

以“bladder cancer”为关键词，在 Gene Cards (<https://www.Genecards.org/>) 和 OMIM (<http://OMIM.org/>) 数据库中对膀胱癌靶点进行检索，为了获取高相关性疾病靶点，在 GeneCards 中设置“relevance score>20”作为筛选阈值。利用 Venny 平台对 HJB-4 靶点与膀胱癌靶点取交集，获取 HJB-4 作用膀胱癌的核心靶点。

## 2.3 蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析和核心靶点获取

将获得的共有靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行制图分析，通过度 (degree) 值排名，结合“network analyzer”工具及 Centiscape 2.2 插件对网络进行拓扑分析，计算每个节点的拓扑参数，包括 degree 值、介数中心性和接近中心性。选取 degree 值排名前 20 位的靶点作为核心靶点并绘制 PPI 网络图。

## 2.4 基因本体 (GO) 功能富集及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

进入 Metascape 官网 (<https://metascape.org/>)。将交集靶点列表 (Symbol 格式) 粘贴到输入框。物种选择“Homo sapiens”，进行 GO 和 KEGG 分析。下载结果表格，筛选  $P<0.01$  且数量  $\geq 3$  的条目，分别取生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 和 KEGG 靠前的条目绘制条形图。

## 2.5 分子对接

获取 HJB-4 的 3D 分子结构，根据结构式图片，在 ChemDraw 中绘制出化合物结构，依次点击菜单栏：Edit→Copy As→SMILES。Cactus (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>) 在线转换。在输入框粘贴 SMILES，选择输出格式为 PDB，点击“Translate”下载 PDB 文件。获取蛋白质的 3D 分子结构：从 PDB 数据库中提取相关靶蛋白结构，运用 PyMOL 软件去除原蛋白结构中的配体分子和非蛋白组分，随后使用 Auto Dock Tools 软件进行加氢、电荷分配及总电荷计算等操作。对接完成后采用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化呈现。

## 2.6 CCK-8 法检测 T24 细胞株的增殖活性

将处于对数期细胞稀释至  $1.0 \times 10^4$  个细胞/mL 的浓度。之后将 200  $\mu$ L 细胞悬液接种到 96 孔细胞培养板中，并继续培养 24 h。采用 0 (对照)、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00  $\mu$ mol/L HJB-4 处理细胞，处理时间分别为 24、48、72 h。空白组只有培养基

无细胞。处理结束后，在各孔中添加 20  $\mu$ L CCK-8 试剂，随后将细胞培养板重新放置在 37  $^{\circ}$ C 的培养箱中，孵育 2 h 后，利用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

## 2.7 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡率

在细胞生长对数阶段，以  $5.0 \times 10^5$  个细胞/mL 的细胞悬液浓度放至 6 孔细胞培养板中，培养孵育 24 h。在此过程中，将 0、1.00、2.00、4.00  $\mu$ mol/L HJB-4 处理细胞 24 h 后，收集、洗涤细胞，加入提前制备好的 Annexin V-FITC、PI 染液吹打均匀，在室温条件下，将细胞悬液置于暗处孵育 30 min，通过流式细胞仪检测，定量分析细胞凋亡的比例，评估不同浓度 HJB-4 对细胞凋亡的影响。

## 2.8 吖啶橙/溴乙锭染色 (AO/EB) 法观察细胞凋亡形态

依据 2.7 项下所描述的细胞分组策略，对细胞进行相应的药物处理和培养。使用磷酸盐缓冲液对细胞进行 2 次洗涤，参考 AO/EB 试剂盒说明书，向 6 孔板中分别加入 AO、EB 染液各 5  $\mu$ L，在加入染液后，将细胞培养板轻轻摇匀，以确保染液与细胞充分接触。将培养板放置于 4  $^{\circ}$ C 的冰箱中，在避光条件下孵育 15 min。采用共聚焦显微镜对各实验组细胞的凋亡特征进行详细的观察，记录细胞形态的变化，并通过拍摄获取细胞凋亡的显微照片。

## 2.9 JC-1 染色法检测线粒体膜电位变化

按照 2.7 项下细胞分组方法进行分组。在评估线粒体膜电位的变化时，依照 JC-1 试剂盒的步骤进行实验操作。首先，对细胞进行洗涤，洗涤步骤完成后，向细胞中添加稀释的 JC-1 染色液，之后在 37  $^{\circ}$ C 条件下进行 20 min 孵育，孵育时间完成后，使用  $1 \times$  Buffer 溶液对细胞进行洗涤，采用流式细胞仪对细胞样本的线粒体膜电位变化定量分析。

## 2.10 Western blotting 法检测线粒体凋亡途径相关蛋白的表达

根据 2.7 项下细胞分组方法，对细胞进行药物处理。首先对各组细胞进行收集，放置冰浴上，加入细胞裂解液，持续 30 min 裂解细胞。随后，在低温条件下高速离心 20 min 提取细胞总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白样品的浓度。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对适量变性后蛋白样品进行分离。电泳完成后，电转将蛋白质从凝胶转移到聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 上，再使用快速

封闭液对 PVDF 膜进行封闭处理, 持续 15 min, 以减少非特异性结合。然后使用三乙醇胺缓冲盐水 (TBST) 对 PVDF 膜进行 3 次洗涤。之后将膜放置在适宜浓度的一抗中, 4 °C 条件下孵育过夜。次日再次使用 TBST 洗涤膜, 然后加入适宜浓度二抗, 在室温下孵育 2 h。孵育完成后, 再次洗涤膜, 使用 ECL 发光液进行显色反应。最后利用 Bio-Rad Chemi Doc TM Touch Imaging System 对膜进行曝光, 以捕获蛋白质条带的图像。使用 Image J V 1.8.0 图像分析软件对条带的灰度值进行测量, 并通过比较各组间的灰度值差异, 评估不同浓度药物处理对细胞蛋白表达的影响。

### 2.11 统计学分析

本研究使用 SPSS 17.0 软件处理和分析收集到的数据, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 检验标准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 HJB-4 治疗膀胱癌潜在作用靶点

合并 PharmMapper 和 SwissTargetPrediction 数据库结果, 去重后获得 HJB-4 靶点 357 个。以 “bladder cancer” 为关键词, 在 Gene Cards 和 OMIM 资料库中共获得 11 509 个膀胱癌相关的靶点。对 HJB-4 靶点与膀胱癌靶点取交集, 筛选出 315 个共同靶点, 作为 HJB-4 治疗膀胱癌的潜在作用靶点, 见图 2。

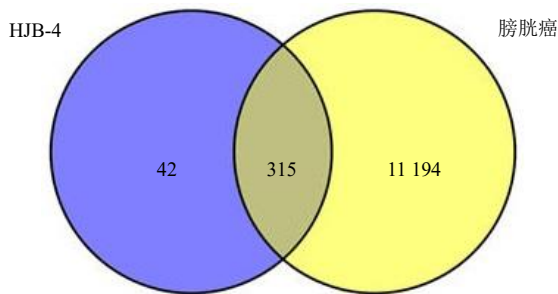


图 2 HJB-4 靶点与膀胱癌疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the HJB-4 target and bladder cancer disease targets

### 3.2 PPI 网络分析和核心靶点获取

将 3.1 项下获得的交集靶点通过数据库 STRING 进行分析, 将共同基因靶点上传至数据库中筛出 HJB-4 治疗膀胱癌的核心靶点, 并导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行制图分析, 见图 3。通过 degree 值排名, 排在前 20 位的分别为蛋白激酶 B1

(Akt1)、白蛋白 (ALB)、表皮生长因子受体 (EGFR)、热休克蛋白 90 $\alpha$  型 1 (HSP90AA1)、雌激素受体 1 (ESR1)、Src 酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、HSP90AB1、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPARG), 见表 1。

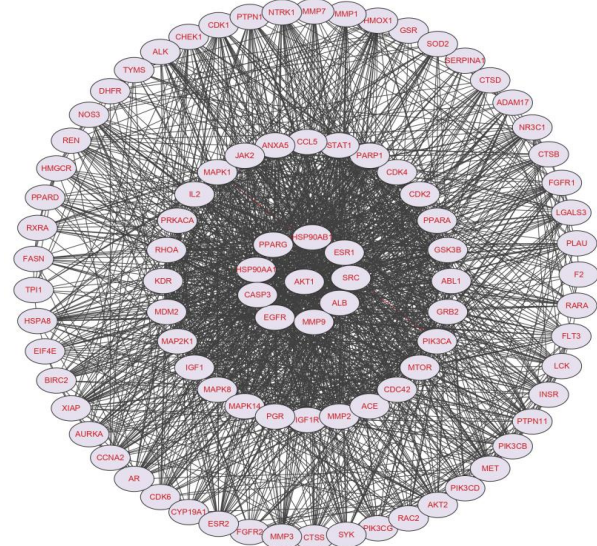


图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI network

表 1 HJB-4 治疗膀胱癌核心靶点 (排名前 20 位)

Table 1 Core Targets of HJB-4 for bladder cancer (top 20)

靶点	degree 值	介数中心性	接近中心性	拓扑系数
Akt1	151	0.079 653	0.658 120	0.132 016
ALB	141	0.102 442	0.643 006	0.129 713
EGFR	124	0.045 593	0.617 234	0.145 054
HSP90AA1	118	0.047 847	0.612 326	0.144 739
ESR1	115	0.052 393	0.605 108	0.146 348
SRC	113	0.044 745	0.596 899	0.151 255
CASP3	110	0.022 351	0.598 058	0.160 626
MMP9	108	0.041 798	0.588 910	0.153 710
HSP90AB1	103	0.032 980	0.595 745	0.152 242
PPARG	100	0.035 339	0.587 786	0.150 033
IGF1	91	0.015 405	0.565 138	0.175 900
GSK3B	88	0.018 323	0.567 219	0.168 903
MTOR	84	0.013 872	0.561 020	0.184 852
RHOA	80	0.009 591	0.542 254	0.183 424
MMP2	76	0.010 042	0.543 210	0.189 923
MAPK1	75	0.012 345	0.544 170	0.182 898
CDC42	74	0.007 546	0.538 462	0.187 050
STAT1	72	0.012 344	0.538 462	0.191 270
PIK3CA	70	0.005 074	0.518 519	0.203 626
MDM2	69	0.007 467	0.536 585	0.194 028

### 3.3 GO 及 KEGG 通路富集分析

使用 Metascape 对 315 个交集靶点进行 GO 及 KEGG 通路富集分析, 获得 152 个 GO 富集条目, 其中 BP 260 个、CC 56 个、MF 92 个, BP 主要富集在信号转导、蛋白质磷酸化、细胞凋亡的负调控、蛋白质水解等; CC 主要集中在细胞质、细胞液、细

胞核、细胞质膜等; MF 主要集中在蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、蛋白质结合等, 见图 4。如图 5 所示, HJB-4 治疗膀胱癌的核心靶点主要富集到磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路, 其中以 PI3K/Akt 信号通路最为显著。

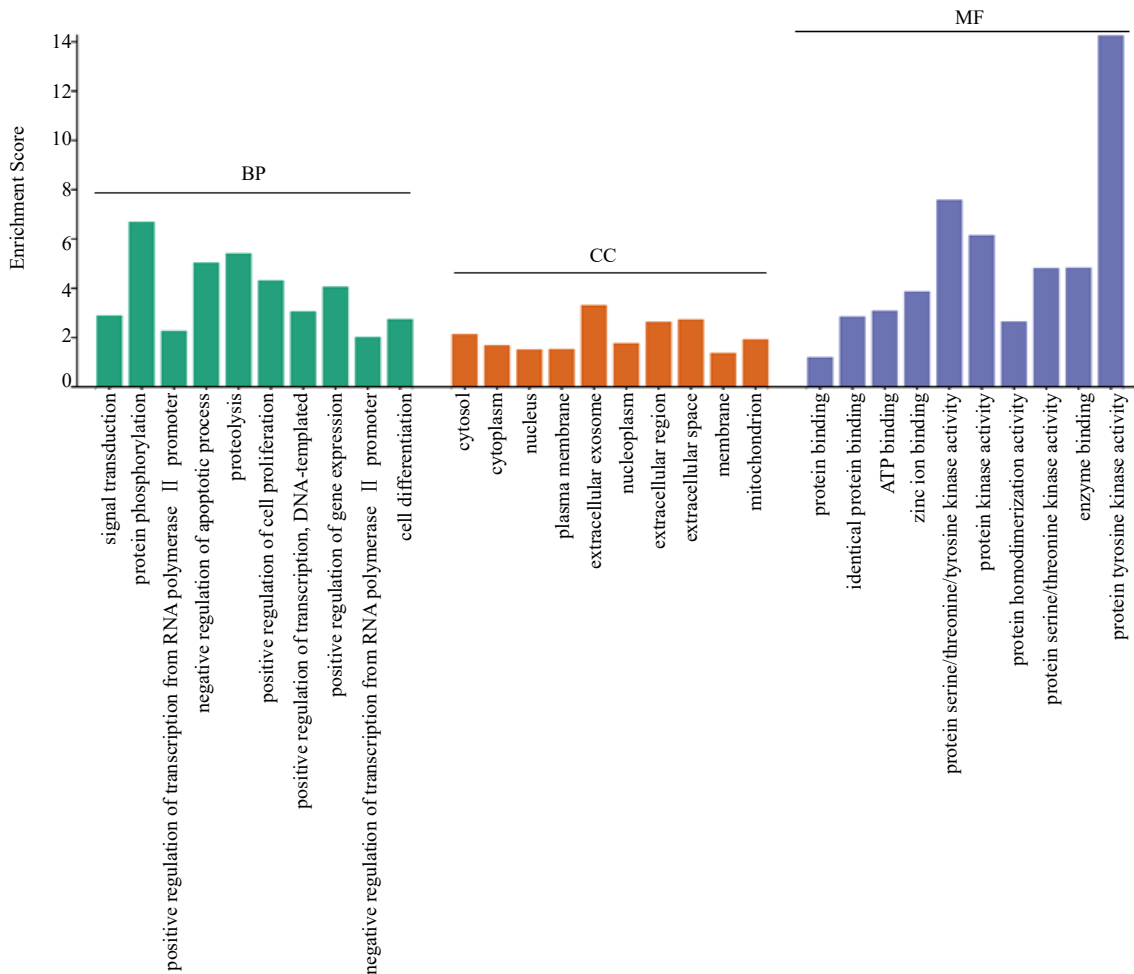


图 4 GO 富集分析  
Fig. 4 GO Enrichment analysis

### 3.4 分子对接

根据筛选获得得分较高作用靶点 Akt1、ABL、EGFR、MTOR、PIK3CA, 从 RCSB PDB 数据库获取核心靶点蛋白的三维晶体结构。选用分辨率较高 (通常优于 2.5 Å, 1 Å=0.1 nm)、含有天然活性配体且无缺失突变的结构。利用 AutoDock Tools 对蛋白进行预处理: 去除水分子 (保留关键水分子除外)、加氢、计算 Gasteiger 电荷、修复侧链并进行能量最小化, 以稳定构象, 再利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 使用 Pymol 软件对结果进行可视化分析。通常认为结合能低于 -7.0 kcal/mol (1 cal=

4.2 J) 具有强烈的结合活性。如表 2、图 6 所示, Akt1 靶点的中活性成分结合分数较低, 表明二者具有较强的结合能力, 潜在生物活性高。

### 3.5 HJB-4 对 T24 细胞增殖的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 药物作用 24、48、72 h 后, T24 细胞增殖抑制率呈时间相关性显著升高 ( $P < 0.01$ )。HJB-4 作用 T24 细胞 24 h 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $(2.428 \pm 0.084) \mu\text{mol/L}$ 。故后期选用 HJB-4 干预的浓度设置为 1.0、2.0、4.0  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 3.6 HJB-4 对 T24 细胞凋亡的影响

AO/EB 双染色法结果显示, 与对照组比较,

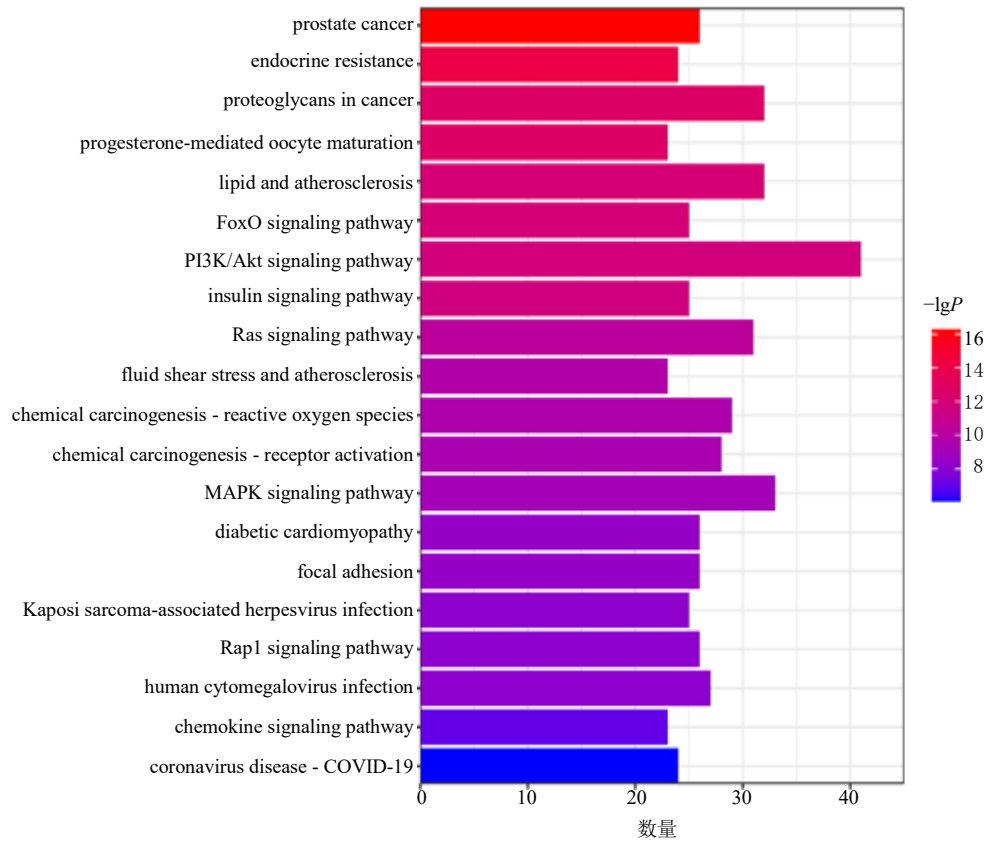


图 5 KEGG 通路富集分析图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis diagram

表 2 分子对接优化模型对接结果

Table 2 Optimization model of molecular docking results

靶点	结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )	靶点	结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )
Akt1	-11.6	mTOR	-9.2
	-9.2		-8.1
ALB	-8.7	PIK3CA	-9.0
	-8.5		-9.1
EGFR	-9.1		
	-8.5		

HJB-4 (1.0、2.0、4.0 μmol/L) 组细胞形态发生改变, 细胞膜破裂, 细胞核皱缩, 细胞变小, 凋亡细胞数量增加, 见图 8。Annexin V-FITC/PI 法结果显示, 与对照组比较, HJB-4 (1.0、2.0、4.0 μmol/L) 细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.01), 见图 9。

### 3.7 HJB-4 对 T24 细胞线粒体膜电位的影响

与对照组相比, HJB-4 (1.0、2.0、4.0 μmol/L) 组 JC-1 单体的比值增加 ( $P < 0.01$ ), 见图 10。

### 3.8 HJB-4 对凋亡及信号通路蛋白表达的影响

与对照组比较, HJB-4 (1.0、2.0、4.0 μmol/L) 组 Bcl-2 的蛋白表达水平都显著降低, Bim、Cyt-C、

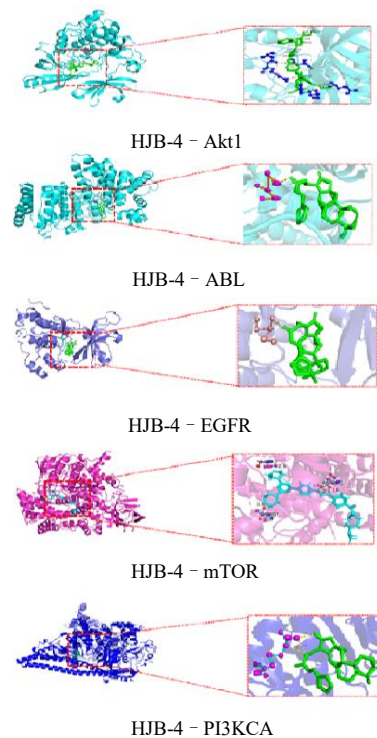
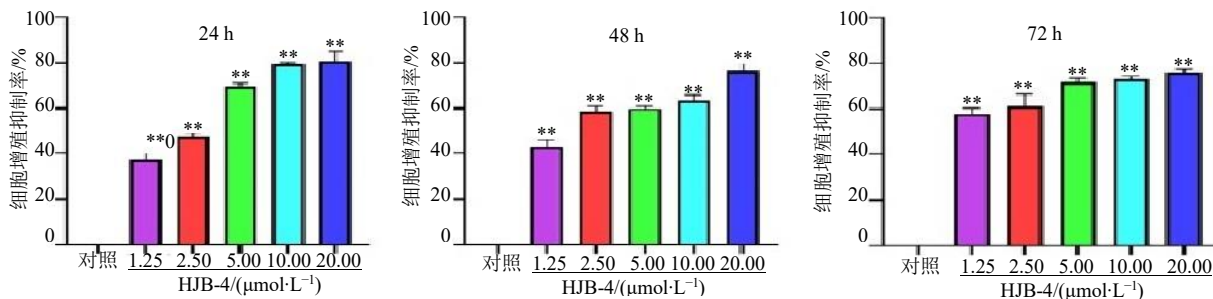


图 6 分子对接模拟图

Fig. 6 Molecular docking simulation diagram



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 7 HJB-4 对 T24 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Inhibitory effect of HJB-4 on the proliferation of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

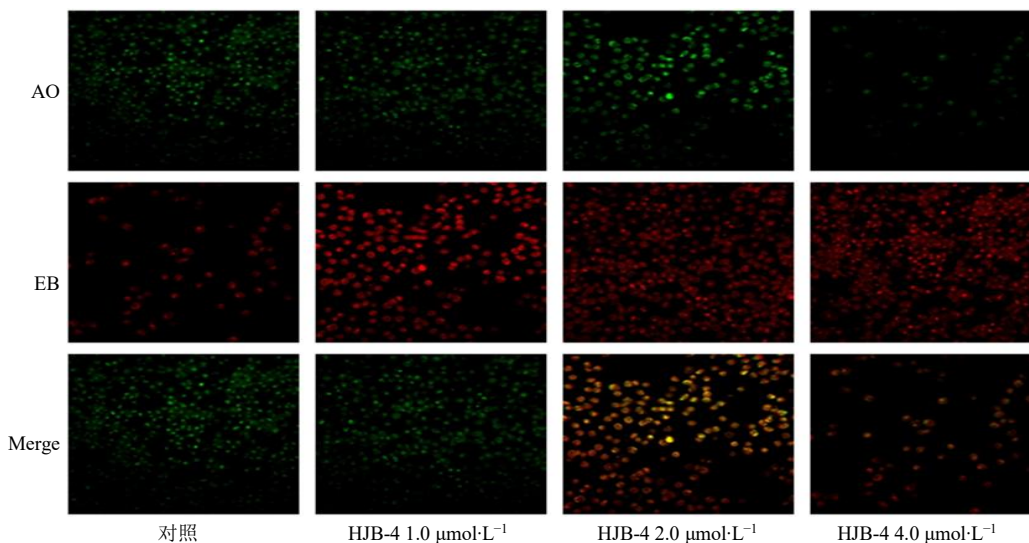
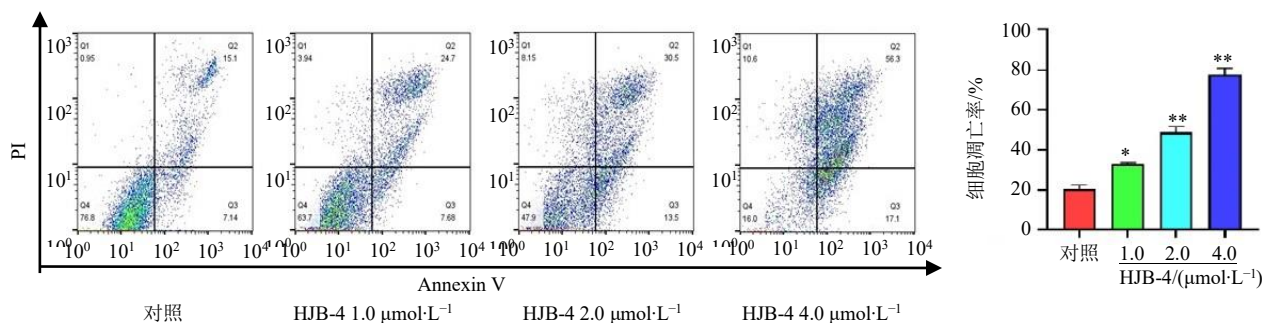


图 8 镜下观察 HJB-4 对 T24 细胞凋亡的影响 (免疫荧光,  $\times 200$ )

Fig. 8 Observation of the effect of HJB-4 on T24 cell apoptosis under the microscope (immunofluorescence,  $\times 200$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 9 流式细胞术观察 HJB-4 对 T24 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Flow cytometry observation of the effect of HJB-4 on apoptosis of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); HJB-4 (2.0、4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 cleaved Caspase-9 显著升高, p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); HJB-4 (4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 Bax 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 11。

#### 4 讨论

本研究通过体外实验证实, 新型化合物 HJB-4 能够显著抑制膀胱癌 T24 细胞的增殖、诱导其凋亡和线粒体膜电位发生改变, 提示 HJB-4 具有一定的抗膀胱癌潜力。网络药理学分析预测 HJB-4 可能通

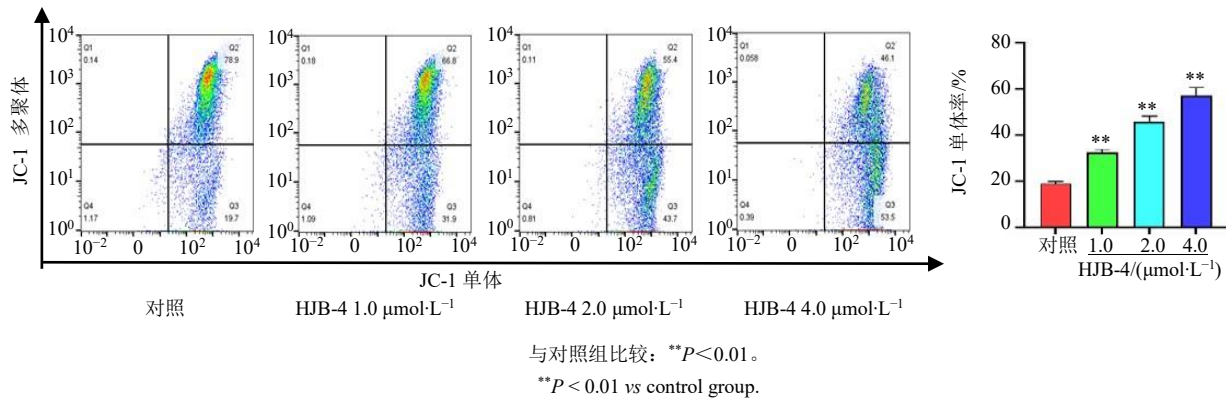


图 10 流式细胞术观察 HJB-4 对 T24 细胞线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Flow cytometry observation of the effect of HJB-4 on the mitochondrial membrane potential of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

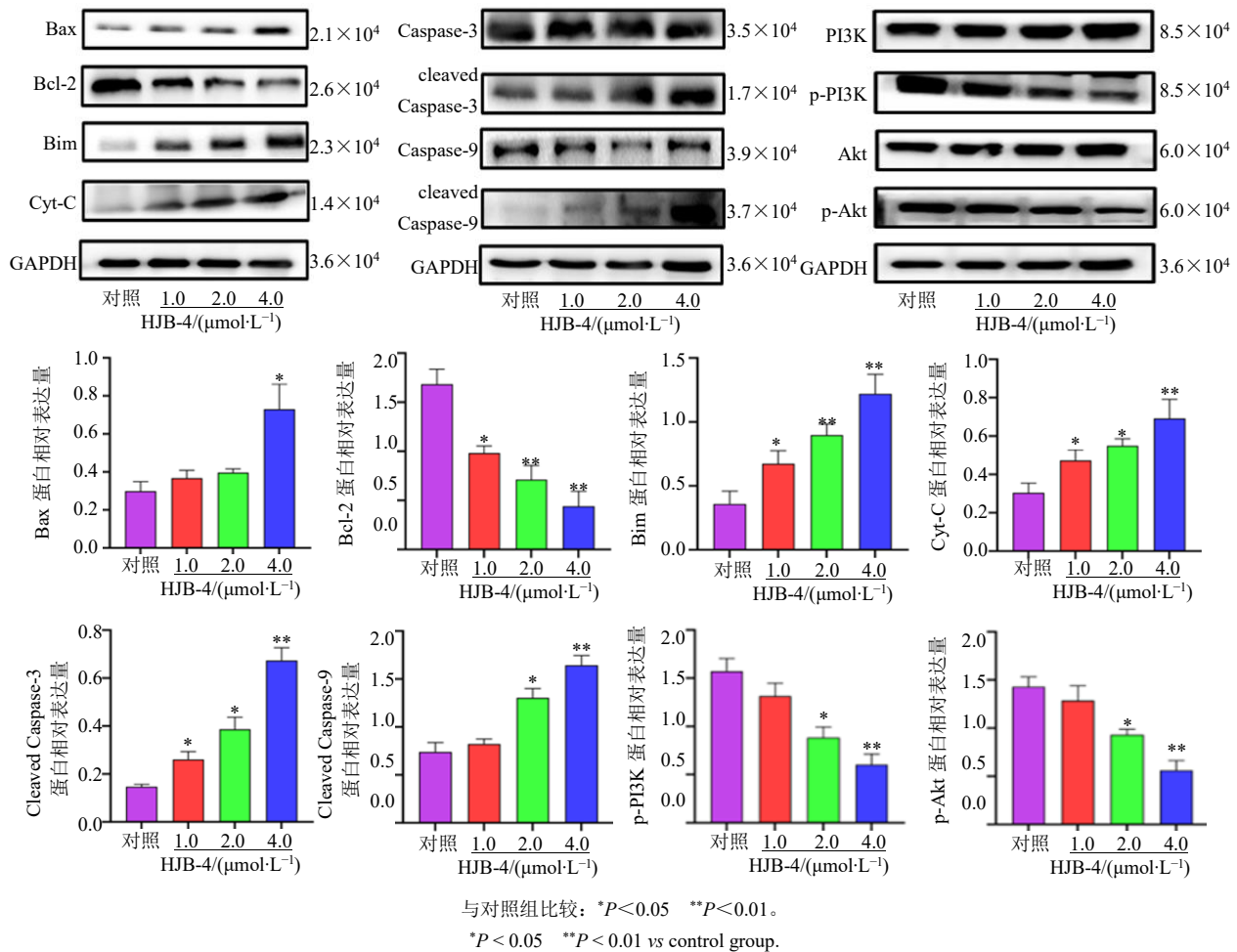


图 11 HJB-4 对 T24 细胞凋亡及信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of HJB-4 on apoptosis of T24 cells and the expression of proteins related to signaling pathways ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

过调控 PI3K/Akt、MAPK 等多个信号通路发挥抗肿瘤作用。基于此,本研究验证了 HJB-4 对 PI3K/Akt 通路的影响。结果显示, HJB-4 处理可显著降低 p-PI3K、p-Akt 的蛋白表达水平, 而其非磷酸化蛋白 (PI3K、Akt) 表达量无明显变化, 说明其抑制该信

号通路的发生, 从而引发连锁反应, 发挥抗肿瘤作用。线粒体凋亡途径关键蛋白 (Bax/Bcl-2 比值上调、细胞色素 C 释放、Caspase-3/9 活化) 亦发生显著改变。抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 而促凋亡蛋白 Bax、Cyt-C、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 的表达

均显著上调。这表明 HJB-4 可能通过破坏线粒体膜稳定性,促使 Cyt-C 释放至胞质,进而激活 Caspase 级联反应,最终诱导细胞凋亡<sup>[8-14]</sup>。HJB-4 对线粒体膜电位的破坏作用明显,提示其可能直接作用于线粒体膜或相关调控蛋白<sup>[15]</sup>。线粒体凋亡途径的抑制作用可能与线粒体功能障碍密切相关<sup>[16-21]</sup>。值得注意的是,与母体化合物 HJB 相比,HJB-4 在 17 位引入的查尔酮连接臂和杂环结构可能显著增强了其生物活性和靶向特异性。这一结构修饰可能提高了化合物与靶点的结合亲和力,或改善了其细胞穿透能力<sup>[22-23]</sup>。实验结果显示,HJB-4 对 T24 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 (2.428±0.084) μmol/L,显示出较强的增殖抑制活性,提示 17 位结构修饰可能是其药效增强的关键。

综上所述,本研究揭示了 HJB-4 对膀胱癌 T24 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用,并提示其可能与抑制 PI3K/Akt 磷酸化及破坏线粒体功能有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder cancer: Current challenges and future directions [J]. *Medicina*, 2021, 57(8): 749.

[2] 侯子珍,莫淳皓,陈传健,等. 动脉导管内化疗治疗高危非肌层浸润性膀胱癌的有效性和安全性 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2026, 41(1): 46-53.

[3] 破巴尖参,嘎务,仁青加. 狼毒大戟的研究现状及其藏医临床应用分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(9): 4291-4296.

[4] 马玉坤,汤拓,张鲁平,等. 岩大戟内酯 B 对 HeLa 细胞增殖的影响及其凋亡机制研究 [J]. *中国医药科学*, 2025, 15(5): 13-16.

[5] Pan L C, Xu X H, Zhang N-N, *et al.* HJB-1, a 17-hydroxy-jolkinolide B derivative, inhibits LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 474-480.

[6] Yang L, Shi W Y, Li D H, *et al.* Study on the mechanism of 17-hydroxy-jolkinolide B on anaplastic thyroid cancer cell [J]. *Am J Med Sci*, 2025, 369(3): 405-412.

[7] Xu X H, Liu N, Zhang Y X, *et al.* The protective effects of HJB-1, a derivative of 17-hydroxy-jolkinolide B, on LPS-induced acute distress respiratory syndrome mice [J]. *Molecules*, 2016, 21(1): 77.

[8] 环天. Bcl-2 增强 CAR-T 细胞抗肿瘤研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.

[9] 陈骢,郝健淇,彭皓宁,等. BCL-2 家族凋亡调控作用及其介导的抗肿瘤药物治疗后耐药的研究进展 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2023, 30(1): 140-148.

[10] 杜钢军,王莉莉,王敏伟,等. 抗肿瘤新生血管形成作用的靶点 Bcl-2 蛋白 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004(4): 317-320.

[11] 雷小楠. HCCS 通过 Caspase-BCL2-BAX 通路调控肾细胞癌增殖与凋亡的研究 [D]. 西安: 西安医学院, 2025.

[12] 郭倩倩,王若宇,卢林竹,等. 鼠妇 miRNA-2863 调控 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. *中草药*, 2024, 55(24): 8445-8456.

[13] 徐丽君,韩毛毛,郑畅. 晚期胃癌患者参一胶囊联合化疗治疗前后血清 Bcl-2、Bax、Fas 与预后的相关性 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2024, 16(11): 2046-2049.

[14] 张永跟,颜小飞,刘锋,等. 黄芪多糖调控 Bcl-2/Bax 信号通路抑制卵巢腺癌 Caov-3 细胞生长的实验研究 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2024, 43(5): 54-58.

[15] 赵强. ERK1/2 信号通路对衰老心肌缺血损伤的影响和调控机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.

[16] 李雁冰,王记委,刘晓琴,等. 灵孢多糖对过氧化氢致 SH-SY5Y 细胞凋亡及线粒体功能障碍的调控 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(25): 4041-4047.

[17] 韦堂莉. 基于诱导线粒体损伤并协同增强抗肿瘤作用的新型铂(IV)前药 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2024.

[18] 鲁天绮. 树突状细胞 TFAM 缺失导致线粒体功能障碍并增强抗肿瘤免疫的机制研究 [D]. 成都: 四川大学, 2022.

[19] 刘雪,卢静静,宋娟丽. STX4 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与调控卵巢癌细胞内质网-线粒体接触及促进迁移、侵袭的实验研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2025, 40(6): 18-21.

[20] 穆毅,宫玉龙,邓凯,等. 奈达铂通过激活氧化应激和 Caspase-9 介导的线粒体凋亡抑制黑色素瘤细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. *陕西医学杂志*, 2025, 54(11): 1456-1462.

[21] 朱加猛,孙龙和,孙倩男,等. 线粒体核糖体蛋白 S35 对结肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的调控作用及机制研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2025, 29(2): 24-31.

[22] 张玉洋. 刺激响应型氮杂环类化合物的合成、性质及应用 [D]. 合肥: 安徽大学, 2016.

[23] Mi Y Q, Zhang J J, Chen Y, *et al.* New synthetic chitosan derivatives bearing benzenoid/heterocyclic moieties with enhanced antioxidant and antifungal activities [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 249: 116847.

[责任编辑 高源]