

基于网络药理学与分子对接探讨钩吻素甲对舌鳞状细胞癌增殖与凋亡的影响

赵昱倩¹, 周欢思¹, 金明静¹, 李艳萍², 王彬睿¹, 卢春花^{3*}

1. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁 530200

2. 广西国际壮医医院壮瑶医药研究实验室, 广西 南宁 530200

3. 南宁市第一人民医院医学实验中心, 广西 南宁 530021

摘要: **目的** 通过网络药理学和分子对接技术分析钩吻素甲 (GEL) 抗舌鳞状细胞癌 (TSCC) 的靶点及作用机制, 并通过实验验证 GEL 对人舌鳞癌 CAL27 细胞增殖、凋亡的影响及关键靶点的作用。 **方法** 运用网络药理学预测 GEL 和 TSCC 的共有靶点, 绘制蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 并进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 使用 Autodock vina 软件进行分子对接。通过 Incucyte S3 活细胞动态分析系统观察 GEL 作用下 CAL27 细胞形态, 并拟合半数抑制浓度 (IC₅₀) 值, 采用细胞增殖与活性检测-8 (CCK-8) 实验、平板克隆实验、细胞周期实验检测细胞增殖能力; 通过 Hoechst 33258 染色、Rhodamine 123 染色检测细胞凋亡情况, Western blotting 检测 B 淋巴瘤 2 基因相关 X 基因 (Bax)、B 淋巴瘤 2 基因 (Bcl-2)、含半胱氨酸的蛋白水解酶 3 基因 (Caspase-3) 蛋白表达。 **结果** 筛选出药物-疾病共有靶点 49 个, 核心靶点为雌激素受体 1 (ESR1)、含半胱氨酸的蛋白水解酶 3 基因 (CASP3)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、B 淋巴瘤 2 基因样 1 (BCL2L1)、非受体酪氨酸激酶 (SRC), KEGG 通路富集较高的为癌症途径、PI3K/Akt 通路等。分子对接结合良好, 其中 GEL 与 CASP3 和 BCL2L1 有强结合性。体外实验显示, GEL 可以抑制 CAL27 细胞增殖并阻滞细胞周期于 G₂/M 期, GEL 干预下 CAL27 细胞染色质固缩, 线粒体膜电位降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达增多, Bcl-2 蛋白表达降低。 **结论** GEL 通过多靶点、多途径抑制人舌鳞癌 CAL27 细胞增殖并促进其凋亡, 可能与激活 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路有关。

关键词: 钩吻素甲; 舌鳞状细胞癌; 网络药理学; 分子对接; 细胞凋亡; 增殖

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)01-0110-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.011

Effect of gelsemine on proliferation and apoptosis of tongue squamous cell carcinoma by network pharmacology and molecular docking

ZHAO Yuqian¹, ZHOU Huansi¹, JIN Mingjing¹, LI Yanping², WANG Binrui¹, LU Chunhua³

1. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Research Laboratory of Zhuang & Yao Medicine, Nanning 530200, China

3. Medical Experimental Center, the First People's Hospital of Nanning, Nanning 530021, China

Abstracts: Objective To investigate the targets and mechanism of action of GEL against tongue squamous cell carcinoma (TSCC) by network pharmacology and molecular docking techniques, and to verify the effects of GEL on the proliferation, apoptosis of human tongue squamous carcinoma CAL27 cells and the effects of key targets by experimental methods. **Methods** The shared targets of GEL and TSCC were predicted by network pharmacology, and the PPI network diagram was drawn. GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed, and molecular docking was performed using Autodock vina software. The cell morphology of CAL27 cells under GEL action was observed by Incucyte S3 live cell dynamic analysis system and the IC₅₀ value was fitted. The cell proliferation ability was detected by CCK-8 experiment, plate colony experiment and cell cycle experiment. The cell apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and Rhodamine 123 staining, and the expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 proteins was detected

收稿日期: 2024-06-04

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (2018GXNSFDA050009); 广西中医药大学博士启动基金项目 (2020BS034); 广西国际壮医医院引进人才科研启动基金项目 (GZ2021RC016)

作者简介: 赵昱倩 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事抗肿瘤药物作用机制研究。E-mail: z714676112@163.com

*通信作者: 卢春花, 博士, 研究员, 主要从事肿瘤相关功能基因及抗肿瘤药物作用机制研究。E-mail: chl-bb@163.com

by Western blotting. **Results** A total of 49 common targets were screened, including ESR1, CASP3, MMP-9, BCL2L1 and SRC, with the KEGG pathway enrichment being higher in cancer pathway, PI3K/Akt pathway, etc. The molecular docking was combined well, with GEL having a strong binding to CASP3 and BCL2L1. The *in vitro* experiment showed that GEL could inhibit the proliferation of CAL27 cells and block the cell cycle at the G₂/M phase. Under GEL intervention, the chromatin condensation of CAL27 cells was observed, the mitochondrial membrane potential was lowered, the expression of Bax, Caspase-3 proteins increased, and the expression of Bcl-2 protein decreased. **Conclusion** GEL can inhibit the proliferation of CAL27 cells through multiple targets and pathways, promote their apoptosis, and may be related to activating the Bax/Bcl-2/Caspase-3 pathway.

Key words: gelsemine; tongue squamous cell carcinoma; network pharmacology; molecular docking; apoptosis; proliferation

舌鳞状细胞癌 (TSCC) 作为一种常见的口腔癌类型, 约占口腔癌病例总数的 25%~40%^[1], 目前 TSCC 的主要治疗手段有手术治疗、放疗、化疗等, 但 TSCC 患者的 5 年生存率不足 50%, 药物耐受是导致 TSCC 预后不佳的常见原因之一^[2]。因此, 开发安全有效的药物, 是目前治疗 TSCC 的紧迫任务。

钩吻 *Gelsemium elegans* Benth. 为马钱科胡蔓藤属植物, 又名断肠草、胡蔓藤、大茶药等^[3], 具有良好的抗肿瘤、镇痛、调节免疫功能等多种作用^[4], 本课题组前期研究表明, 钩吻总碱对人肺腺癌 A549、SPCA1、人舌鳞癌 CAL27 等多株癌细胞具有抑制作用^[5]。钩吻素甲 (GEL) 是钩吻的有效单体成分之一, 具有含量高、毒性低^[6-7]的特点, 已有研究表明 GEL 对肝癌、结肠癌等肿瘤细胞具有抑制作用^[3, 8]。本研究通过网络药理学方法预测 GEL 抗 TSCC 的相关靶点, 并将核心靶点与 GEL 进行分子对接, 进一步应用 GEL 干预人舌鳞癌 CAL27 细胞以验证其作用机制, 旨在为 GEL 抗 TSCC 提供理论与实验依据。

1 材料

1.1 细胞与药物

人舌鳞癌 CAL27 细胞由本实验室保存, GEL (购自上海陶术科技有限公司, 批号 T5S0662, 质量分数: 99.81%)。

1.2 试剂

DMEM 培养液 (购自 Gibco 公司, 批号 8122600); 胎牛血清 (购自 TransSerum 公司, 批号 FS201-02); 二甲基亚砜 (DMSO, 购自 MP Biomedicals 公司); Hoechst 33258、Rhodamine 123、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、增强型细胞增殖与活性检测-8 (CKK-8) 试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (购自上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C1018、C2007、C1052、C0043、P0012A、P0018FS); Bax、

Bcl-2、Caspase-3/p17/p19、GAPDH 多克隆抗体 (批号分别为 50599-2-Ig、12789-1-AP、19677-1-AP、60004-1-Ig; 购自武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 仪器

Incucyte S3 活细胞动态功能分析系统 (美国 Sartorius 公司); BD FACSVia 全自动激光四色流式细胞仪 (美国 BD 公司); UVP Chem Studio 815 近红外双色荧光成像系统 (德国耶拿公司); SYNERGY H1M 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); MP Tetra CellMini 蛋白电泳系统 (美国伯乐公司); ACB-4E1 超净工作台 (新加坡 Esco 公司); CCL-240B-8 二氧化碳培养箱 (新加坡 Esco 公司); CKX53 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学与分子对接^[9]

2.1.1 药物-疾病共同靶点筛选 通过检索 PubChem 数据库, 输入 “gelsemine” 获取 GEL 的分子结构及 Canonical SMILES, 使用 SwissTargetPrediction 和 Pharmmapper 网站, 预测 GEL 的作用靶点。通过检索 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库, 输入 “Tongue squamous cell carcinoma”, 将物种设定为 “Homo sapiens”, 以 Relevance score ≥ 50 为条件, 筛选 GeneCards 数据库的数据, 汇总并删除重复基因得到 TSCC 的相关靶点, 使用 Venny 2.1.0 在线绘图工具绘制 Venn 图得到交集靶点。

2.1.2 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络模型并筛选核心靶点 把交集靶点导入 STRING 数据库中, 设定物种为 “Homo sapiens”, 置信度设为 “medium confidence” (>0.400), 分析交集靶点并构建其 PPI 网络模型。下载 TSV 数据, 而后使用 Cytoscape 3.10.1 软件将进行数据分析, 绘制 PPI 网络图, 并使用插件 Cytohubba 中 MCC 算法生成的数值为依据, 排名前 10 名为核心靶点。

2.1.3 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析 把交集靶点导入 Metascape 数据库, 设定物种为 “Homo Sapiens”。在 GO 数据库中分别进行生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞成分 (CC) 分析, 而后使用 KEGG 进行通路分析。利用微生信平台在线绘制技术, 对分析结果进行可视化展示。

2.1.4 药物-关键靶点分子对接 在 Pubchem 数据库搜索 GEL 的 3D 结构信息, 然后使用 OpenBabel 3.0 软件转化为 pdb 格式。从 PDB 数据库下载核心靶点蛋白质 3D 结构, 通过 PyMOL 软件删除水分子和小分子配体, 使用 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。

2.2 细胞实验

2.2.1 药物配制 精密称取 20 mg GEL 粉末, 在超净台中用 0.5 mL 无菌 DMSO 完全溶解, 加入 4.5 mL DMEM 完全培养基混匀, 得 $4\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (含 10% DMSO) 的 GEL 母液, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜除菌后, 每 2 mL GEL 母液混合 18 mL DMEM 完全培养基, 得 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (含 1% DMSO) 的 GEL 溶液, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。给药时, 添加 DMEM 完全培养基稀释 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GEL 溶液至相应浓度药液, DMSO 终体积分数均小于 1%。

2.2.2 细胞培养 人舌鳞癌 CAL27 细胞培养于含有 10% FBS、1% 青链霉素混合液的 DMEM 完全培养基, 并置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、含 5% CO_2 湿润空气的培养箱培养, 每 24 h 换液 1 次, 细胞生长至融合度达 80% 时进行传代处理。

2.2.3 活细胞动态分析 取对数生长期细胞, 将细胞悬液浓度调整至 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 100 μL 悬液均匀接种于 96 孔板, 培养 24 h 细胞贴壁后设置 9 个质量浓度 GEL (0、50、100、150、200、250、300、350、 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行药物干预, 每个质量浓度重复 3 次。加药后置于活细胞动态分析仪监测 48 h, 根据干预 48 h 的细胞融合度绘制融合度曲线图, 并拟合半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

2.2.4 分组及给药 以 GEL 作用 CAL27 细胞 48 h 的 IC_{50} 值为依据, 设置 GEL 低、中、高 3 个质量浓度 (150 、 250 、 $350\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组处理人舌鳞癌 CAL27 细胞, 并以完全培养基处理作为对照组。接种 CAL27 细胞于 96 孔板或 6 孔板, 细胞贴壁后按实验设置分组给药干预 24 h 或 48 h。

2.2.5 CCK-8 实验 取对数生长期细胞, 以 1×10^5

个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 每组重复 3 次, 培养 24 h 细胞贴壁后, 按 “2.2.4” 项下方法进行分组给药, 分别干预 24 h 或 48 h 后吸弃上清, 加入 100 μL 的 $1\times\text{CCK-8}$ 溶液 (90% DMEM+10% CCK-8 溶液), 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。

$$\text{增殖抑制率} = [1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{背景}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{背景}})]$$

2.2.6 克隆形成实验 取对数生长期细胞, 以 1×10^3 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 12 孔板, 每孔 1 mL, 每组设 3 个重复。培养 24 h 细胞贴壁后按 “2.2.4” 项下方法进行分组给药干预 48 h, 弃含药培养基, 加入完全培养基继续培养 7 d, 染色时吸除旧培养液, PBS 清洗 2 次, 无水乙醇固定 6 min, 结晶紫染色 6 min, 水洗去除结晶紫, 晾干后拍照并统计集落数。

2.2.7 细胞周期实验 取对数生长期细胞, 以 2.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔板每孔 2 mL, 培养 24 h 细胞贴壁后换 DMEM 培养基, 饥饿处理 24 h 同步细胞周期, 24 h 后按 “2.2.4” 项下方法进行分组给药干预 48 h, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 轻柔吹散避免细胞成团。使用预冷的 70% 乙醇重悬细胞, $4\ ^\circ\text{C}$ 固定过夜, PBS 洗涤 1 次, 按试剂盒说明处理样本, 流式细胞仪上机检测。使用 ModfitLT 5 软件分析各时期的细胞百分比。

2.2.8 Hoechst 33258 染色 取对数生长期细胞, 以 5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 12 孔板, 每孔 1 mL, 培养 24 h 细胞贴壁后, 按 “2.2.4” 项下方法进行分组给药干预 48 h。染色时吸除旧培养液, PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min, 0.2% Tirtion 透化 5 min, 每孔加入适量 Hoechst 33258 荧光染色液充分覆盖细胞, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光染色 8 min。弃染色液, PBS 洗涤 2 次, 荧光倒置显微镜下观察并拍照。

2.2.9 Rhodamine 123 染色 取对数生长期细胞, 以 2.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养 24 h 细胞贴壁后按 “2.2.4” 项下方法进行分组给药干预 48 h。处理结束后收集细胞至 EP 管, PBS 洗涤 2 次, 加入 Rhodamine 123, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min, 流式细胞仪上机检测, 使用 FlowJo10.8.1 软件分析探针荧光强度。

2.2.10 蛋白免疫印迹 取对数生长期细胞, 以 2.5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养 24 h 细胞贴壁且融合率达 60% 时, 按

“2.2.4”项下方法进行分组给药干预 48 h。收集细胞并使用 RIPA 裂解液提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度并制备样品。蛋白样品沸水浴中变性 10 min，取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，400 mA 恒流湿转 20 min 至 PVDF 膜，室温封闭 30 min，一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，二抗室温孵育 2 h，ECL 化学发光法显影。使用 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值，以 GAPDH 为内参蛋白，计算目的蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 相对表达。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行分析，以上数值均为进行 3 次生物学重复的 $\bar{x} \pm s$ ，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GEL 作用靶点筛选结果

在 SwissTargetPrediction 和 Pharmmapper 数据库中进行 GEL 的作用靶点筛选，共获得 303 个预测靶点。基于 OMIM、Genecards 数据库检索，去重后共获得疾病靶点 810 个。通过 Venny2.1.0 在线绘图工具绘制 Venn 图，筛选后获得药物-疾病共同靶点 49 个（图 1）。

3.2 GEL 和 TSCC 交集靶点的 PPI 分析

将上述 49 个共同靶点输入 STRING 数据库，构建 PPI 网络，将靶点相互作用网络导入 Cytoscape 3.10.1 软件，绘制 PPI 网络图。在网络图中，节点代表蛋白，线条数表示蛋白间的关联度，节点越大颜色越偏向红色则度值越大，说明基因作用越显著。由图可见，表皮生长因子受体（EGFR）、雌激素受体 1（ESR1）、含半胱氨酸的蛋白水解酶 3 基因（CASP3）、非受体酪氨酸激酶（SRC）、激酶插入区受体（KDR）等靶点的度值较高，在 PPI 网络中具有重要的联系作用（图 2-A）。

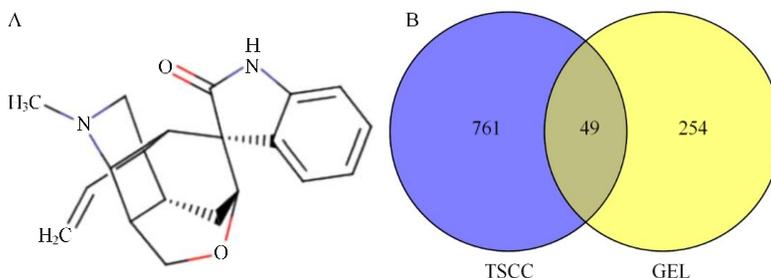


图 1 GEL 结构式 (A) 及 TSCC 与 GEL 的交集靶点 Venn 图 (B)

Fig. 1 Gelsemine structure (A) and Venn diagram (B) of intersection target of TSCC and GEL

3.3 核心靶点筛选

将 PPI 网络导入 Cytoscape 3.10.1 中，使用 Cytohubba 插件，通过 MCC 算法筛选出前 10 名作为核心靶点，其中前 5 位靶点为 ESR1、CASP3、基质金属蛋白酶-9（MMP-9）、B 淋巴细胞瘤 2 基因样 1（BCL2L1）、SRC（图 2B）。

3.4 GO 及 KEGG 富集分析

对 49 个共同靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。按照 *P* 值分别筛选 GO 功能中 BP、CC 和 MF 的前 10 条通路进行展示（图 3），主要涉及酪氨酸蛋白激酶活性、蛋白激酶活性、以醇基为受体的磷酸转移酶活性、激酶活性等生物过程。KEGG 信号通路分析中，按照 *P* 值降序排列，选取前 15 条通路（图 4），主要涉及癌症途径（Pathways in cancer）、PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、癌症中的蛋白多糖（Proteoglycans in cancer）、Ras 信号通路（Ras signaling pathway）、MAPK 信号通路（MAPK signaling pathway）等，这表明 GEL 抗 TSCC 的机制可能与上述信号通路有关。

3.5 分子对接

利用 AutoDock Vina 软件对筛选出的前 5 名核心靶点（ESR1、CASP3、MMP-9、BCL2L1、SRC）与 GEL 进行分子对接。结果显示 GEL 与 5 个核心靶蛋白的结合能分别为 -28.56、-33.18、-27.30、-36.96、-27.3 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。结合能越低，提示受体和配体之间的亲和力越高。普遍认为，结合能 $< -17.85 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明配体与受体之间有一定的结合性； $< -21.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表示结合性良好； $< -29.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 有强结合性^[10]。分子对接结果表明 GEL 和核心蛋白形成的构象能量低，尤其是与 CASP3 和 BCL2L1 有强结合性，与其余 3 个核心靶点结合性良好，筛选结果可靠，其分子对接模式见图 5。

3.6 GEL 对人舌鳞癌 CAL27 细胞形态的影响

随着培养时间延长，对照组肿瘤细胞生长状态

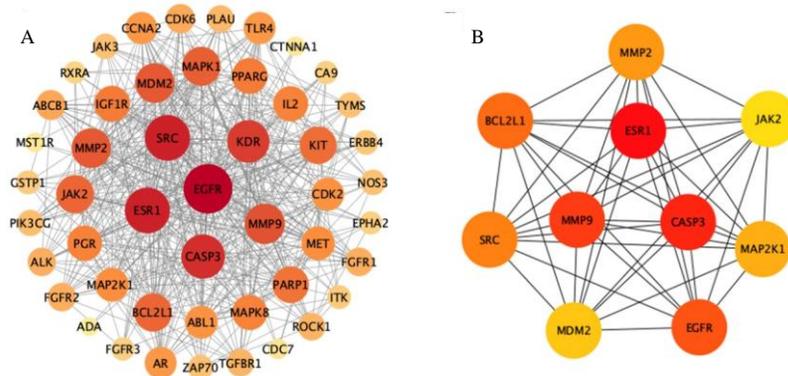


图 2 交集靶点 PPI 网络图 (A) 及核心靶点 (B)

Fig. 2 PPI network diagram (A) of intersection targets and core targets (B)

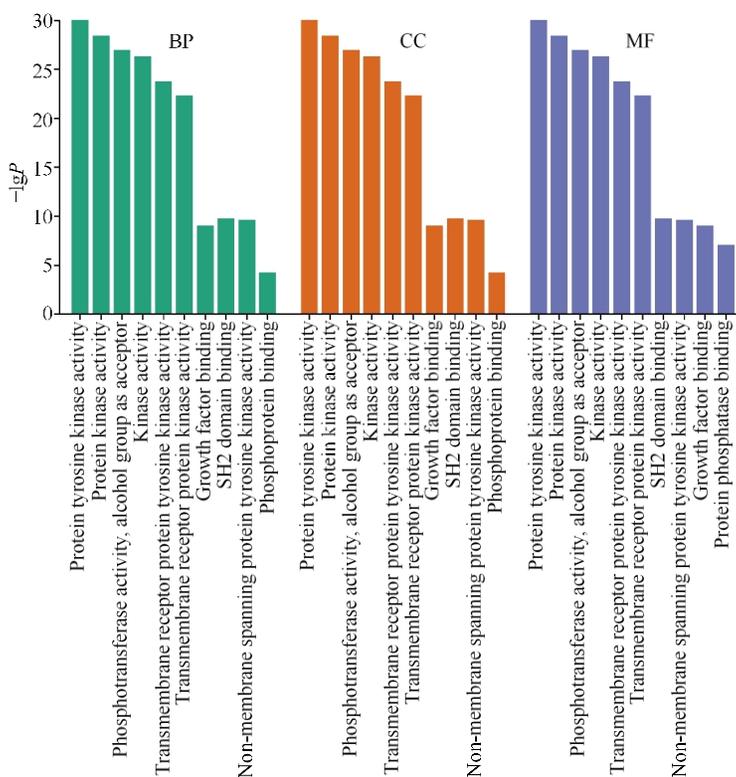


图 3 GEL 抗 TSCC 共有靶点 GO 分析

Fig. 3 GEL treatment of TSCC common target GO analysis

良好；实验组肿瘤细胞生长变缓或停止生长，细胞体积缩小，形态固缩，细胞贴壁不牢或脱落，根据各个浓度干预细胞 48 h 的细胞融合度拟合出 CAL27 的 IC_{50} 为 $285 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。低浓度 GEL 抑制 CAL27 细胞生长，高浓度 GEL 抑制细胞生长并促进其凋亡，作用效果呈剂量相关性与时相关性。选用 150、250、 $350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为 GEL 低、中、高质量浓度组，48 h 为作用时间，进行下述 GEL 抑制

CAL27 细胞作用及机制研究 (图 6-A)。

3.7 GEL 抑制人舌鳞癌 CAL27 细胞的增殖能力

GEL 干预 CAL27 细胞 24 和 48 h 后，细胞增殖均被抑制，作用 48 h 抑制效果更为明显；以 150、250、 $350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用 CAL27 细胞 48 h，抑制率约为 25%、50%和 70% (图 6-B)。

3.8 GEL 抑制人舌鳞癌 CAL27 细胞的克隆形成能力

与对照组比较，GEL 干预 CAL27 细胞后细胞

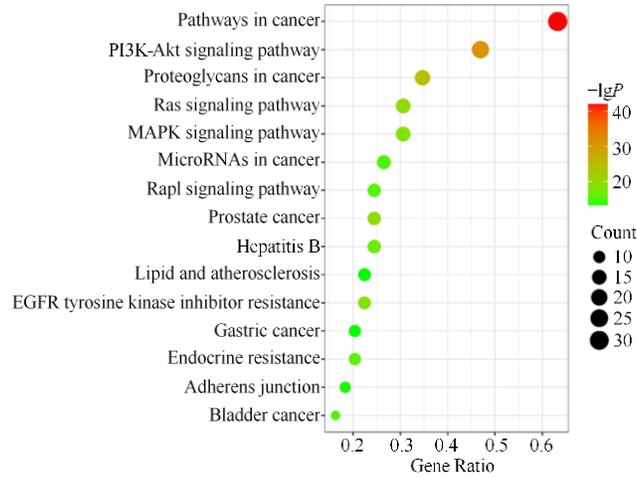


图 4 GEL 抗 TSCC 共有靶点 KEGG 通路分析

Fig. 4 Analysis of KEGG pathway, a common target of GEL therapy for TSCC

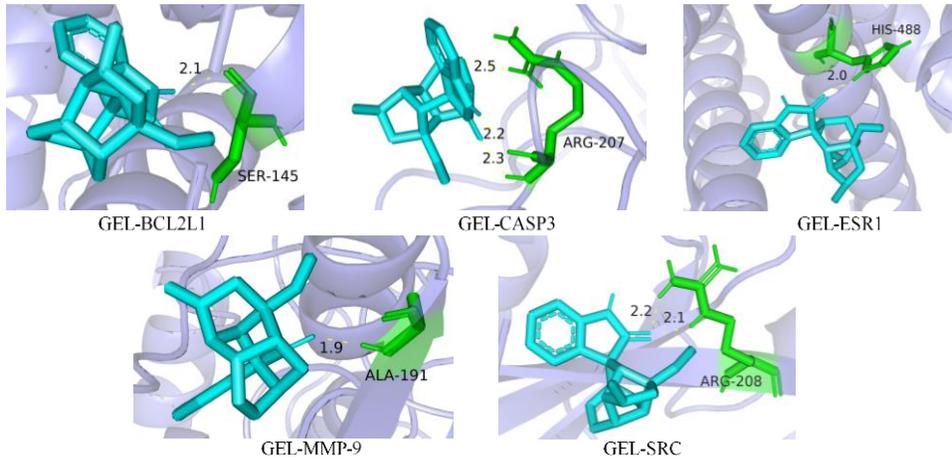


图 5 GEL 与核心靶点的分子对接模式图

Fig. 5 Molecular docking model diagram of GEL and core target

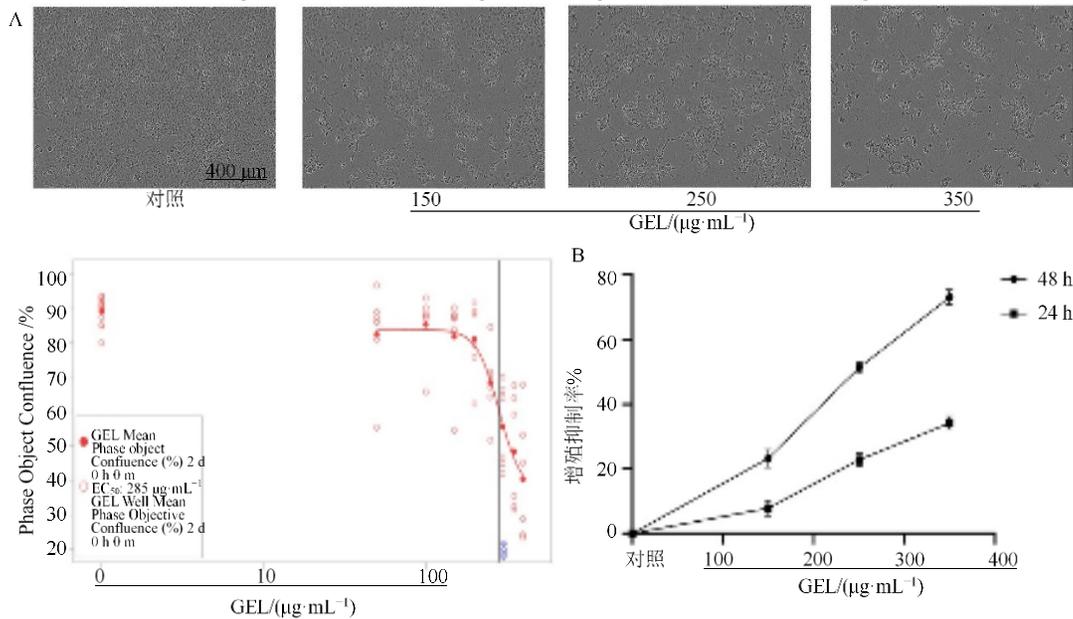


图 6 GEL 作用于 CAL27 细胞 48 h 细胞形态 (A) 及 CCK-8 实验检测 GEL 对细胞增殖的抑制率 (B) ($\times 10$)

Fig. 6 Cell morphology of CAL27 cells treated by GEL (A) for 48 h and inhibition rate of GEL on cell proliferation detected by CCK-8 assay (B) ($\times 10$)

集落形成抑制明显，且有浓度相关性，以 $350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GEL 对集落形成数量的抑制作用最强。GEL 作用下，CAL27 细胞的平均集落数由 82 个 ($0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 减少至 7 个 ($350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，见图 7。

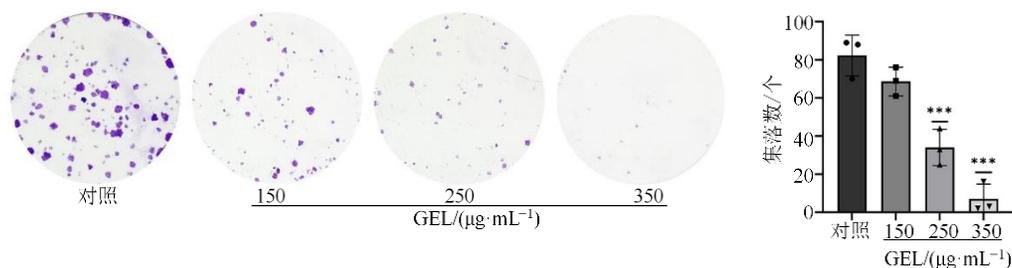
3.9 GEL 阻滞人舌鳞癌 CAL27 细胞的细胞周期

与对照组比较，(250 、 $350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) GEL 干预 CAL27 细胞 48 h 后， G_2/M 期比例显著增加 ($P < 0.001$)，S 期比例下降， G_0/G_1 期变化不明显，细胞周期受阻，

GEL 将 CAL27 细胞主要阻滞在 G_2/M 期 (图 8)。

3.10 GEL 促进人舌鳞癌 CAL27 细胞凋亡

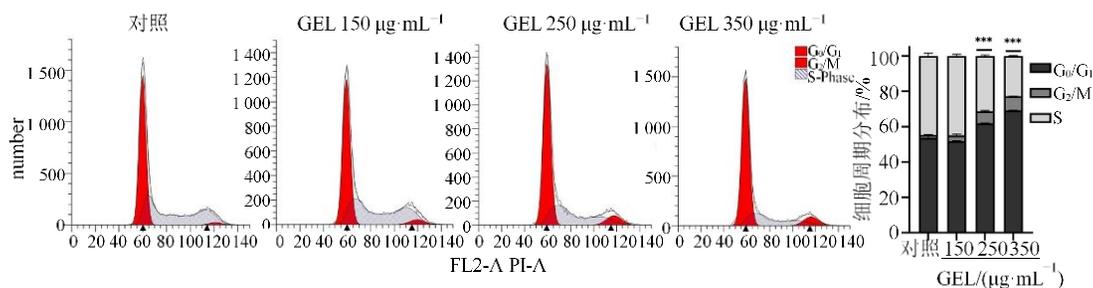
经 Hoechst 33258 染色后，对照组细胞形态完整，呈现边界清晰的椭圆形，细胞核形态规则，染色均匀；GEL 组细胞数目减少，细胞皱缩且边界不清，细胞核固缩或碎裂，着色深浅不匀，具有凝聚的高亮蓝色颗粒，且凋亡细胞随 GEL 浓度升高而增多，表明 GEL 能够诱导 CAL27 细胞发生凋亡 (图 9)。



与对照组比较: $***P < 0.001$ 。
 $***P < 0.001$ vs control group.

图 7 GEL 抑制 CAL27 细胞集落形成 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 GEL inhibits colony formation of CAL27 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: $***P < 0.001$ 。
 $***P < 0.001$ vs control group.

图 8 GEL 阻滞 CAL27 细胞周期 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 GEL inhibits cell cycle of CAL27 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

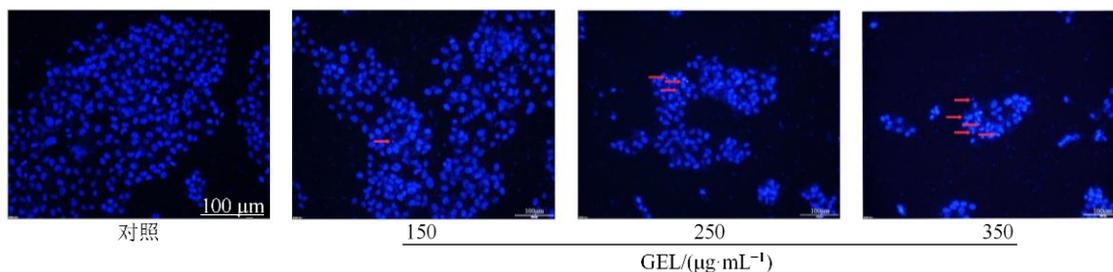


图 9 GEL 诱导 CAL27 细胞使其细胞核固缩 ($\times 20$)

Fig. 9 GEL induced chromatin contraction in CAL27 cells ($\times 20$)

3.11 GEL 诱导 CAL27 细胞线粒体膜电位丢失

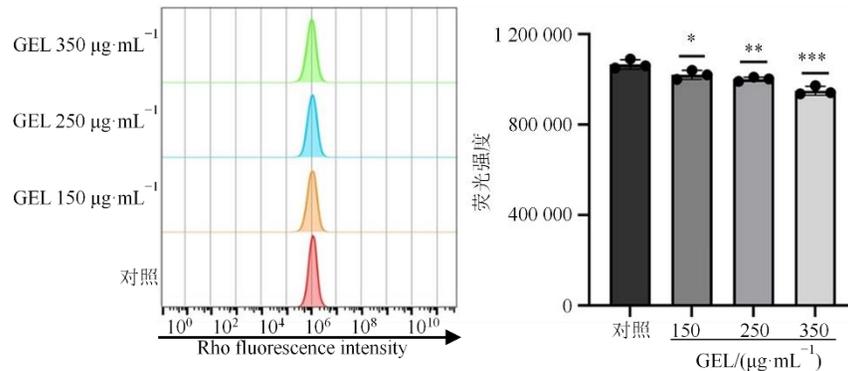
与对照组相比，GEL 处理组线粒体内 Rhodamine 123 荧光探针强度降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、

0.001)，且呈现浓度相关性。表明 GEL 通过诱导 CAL27 细胞线粒体膜电位降低，导致线粒体功能紊乱，提示细胞发生坏死或凋亡 (图 10)。

3.12 GEL 对人舌鳞癌 CAL27 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达的影响

与对照组相比, GEL 高浓度组舌鳞癌 CAL27 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P <$

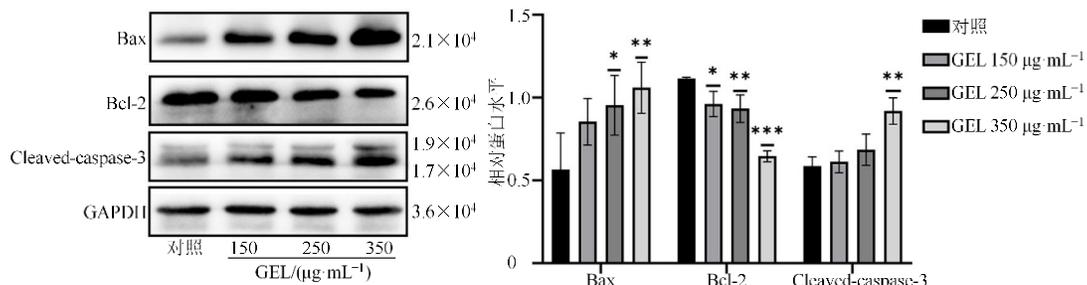
0.01、0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax/Bcl-2 值比例增高。表明 GEL 诱导 CAL27 细胞凋亡与激活 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路有关 (图 11)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 GEL 诱导 CAL27 细胞线粒体膜电位降低 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 GEL induced mitochondrial membrane potential reduction in CAL27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 11 GEL 诱导 CAL27 细胞 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平升高、Bcl-2 蛋白表达水平降低 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 GEL induced increased expression levels of Bax and Caspase-3 protein and decreased expression levels of Bcl-2 protein in CAL27 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

TSCC 是最广泛、最具侵袭性的口腔鳞状细胞癌 (OSCC) [11], 因其具有高度的局部侵袭性和早期向区域淋巴结转移的特点, 死亡率较高, 近年来 TSCC 的发病年龄呈现年轻化趋势 [12]。手术治疗辅以放疗是目前 TSCC 的主要治疗方式 [13], 但手术治疗会导致颌面畸形、言语障碍、进食困难等问题 [14], 临床上常用化疗药物为铂类、嘧啶类, 不良反应较大且易出现耐药问题 [15], 无法有效改善患者的预后和生存质量。因此, 探索治疗 TSCC 的新药物迫在眉睫。

钩吻在民间主要用于肝、胃、乳腺、甲状腺等癌症的晚期治疗 [16]。由于钩吻总碱的中毒剂量与有效治疗剂量相接近, 其应用非常受限。吡啶生物碱为钩吻抗肿瘤的有效成分, 包括钩吻素、GEL、钩吻素乙、钩吻素己等 [17], GEL 在钩吻总碱中占比较大 [6], 且毒性相比其他单体成分较弱 [7]。研究发现, GEL 对人肝癌细胞 HepG2、人胃癌细胞 MGC80-3、人食管癌细胞 TE-11 和人结肠癌细胞 SW480 均有抑制作用 [8]。但是目前尚无 GEL 抗 TSCC 的研究, 其抗肿瘤效果及具体机制尚未明确。

本研究聚焦 GEL 抗 TSCC 的作用机制, 通过

绘制 Venn 图获得药物-疾病共同靶点共 49 个, 经过 PPI 网络发现 GEL 作用于 CAL27 细胞的主要靶点包括 ESR1、CASP3、MMP-9、BCL2L1、SRC 等。ESR1 在乳腺组织中广泛表达, 并在乳腺癌等多种癌症中发挥关键作用^[18], 目前研究主要集中于耐药性乳腺癌的治疗^[19], 本研究通过网络药理学预测 ESR1 可能是抗 TSCC 的关键靶点之一, 为耐药性口腔癌的治疗提供线索。CASP3 是细胞凋亡途径的关键调节蛋白, 有研究显示油酸通过 Bcl-2/Caspase-3 通路介导 CAL27 细胞凋亡, 从而达到治疗 TSCC 的作用^[20]。MMP-9 在肿瘤侵袭、转移和进展中起着至关重要的作用^[21]。已有研究显示, 敲低 MMP-9 不仅通过抑制血管内皮细胞黏附及血管生成来抑制 OSCC 细胞增殖, 还通过抑制肿瘤转移相关 RhoC 和 Src 基因来抑制口腔癌细胞的侵袭和转移^[22]。BCL2L1 也称为 BCL-xL, 是 Bcl-2 家族蛋白中抗凋亡的成员之一, 且 BCL-xL 被确定为 Bax 激活反应的主要调节因子, 尤其是在实体瘤细胞系中^[23]。研究表明 BCL2L1 可以通过抑制 P53 的表达来抑制肝癌细胞中 Caspase-3/7 的表达, 同时沉默 BCL2L1 可显著抑制肝细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡^[24]。SRC 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在促进肿瘤生长、侵袭、血管生成和耐药性的形成中起着至关重要的作用^[25]。有研究表明, SRC 在 OSCC 中过度表达和高度激活, 是一种驱动 OSCC 进展的癌蛋白^[26]。

进一步对 GEL 和 TSCC 共同靶点进行信号通路富集分析, 结果显示 GEL 通过影响多条信号通路干预 TSCC, 其中 PI3K/Akt 通路可能是 GEL 治疗 TSCC 的关键通路。PI3K/Akt 通路参与包括增殖、凋亡和代谢等多种细胞过程^[27], 在 PI3K/Akt 通路中, TP53 可以激活促凋亡蛋白 Bax 并且促进其表达上调, 进而引起下游 CASP 级联反应, 导致细胞凋亡^[28]。并且 Akt 激活的磷酸化可以抑制 Bad 表达, 导致 Bcl-2 和 Bcl-xL 减少, 这两种调节途径均可以导致细胞凋亡^[29]。相关临床研究表明, 较高水平的 Bcl-2 与 TSCC 在内的多种肿瘤的不良预后有关^[30]。肿瘤细胞中 Bcl-2/Bax 值降低会触发 Caspase-9/3 的激活, 并随后促进线粒体介导的细胞凋亡^[31-32]。

基于以上预测分析, 以 CAL27 细胞为研究对象, 从抑制细胞增殖并促进细胞凋亡的角度验证 GEL 抗 TSCC 作用。细胞增殖方面, 通过 Incucyte S3 观察 GEL 干预影响 CAL27 细胞的形态, CCK-8

实验与平板克隆实验验证 GEL 以时间相关性与浓度相关性抑制 CAL27 细胞增殖, 并通过细胞周期实验证实 GEL 将 CAL27 细胞周期阻滞在 G₂/M 期。细胞凋亡方面, 通过 Hoechst 33258 染色观察发现 GEL 干预下 CAL27 细胞发生核固缩、碎裂, 采用流式细胞仪检测可见实验组线粒体内 Rhodamine 123 荧光探针强度降低, 提示 GEL 诱导 CAL27 细胞线粒体功能紊乱, 细胞发生坏死或凋亡。进一步验证 GEL 作用于 CAL27 细胞的主要凋亡相关靶点 CASP3 与 BCL2L1, Western blotting 显示随着 GEL 浓度的增加, CAL27 细胞中 Bax、Caspase-3 表达增加, Bcl-2 表达下降, 表明 GEL 诱导 CAL27 细胞凋亡与激活 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路有关。

本研究通过网络药理学和分子对接技术, 预测 ESR1、CASP3、MMP-9、BCL2L1、SRC 是 GEL 抗 TSCC 的关键靶点, 且 GEL 与 CASP3 有强结合性, 靶点功能主要集中于对肿瘤细胞增殖、侵袭、耐药及凋亡的影响。随后, 实验验证 GEL 抑制人舌鳞癌细胞 CAL27 细胞增殖并促进其凋亡, 进一步探讨关键靶点 CASP3 及其上下游靶点, 证实 GEL 通过激活 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路促进 CAL27 细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤活性。该研究将有助于明确 GEL 发挥抗肿瘤作用的具体机制, 并为 GEL 抗 TSCC 提供理论依据与潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吴开柳, 李思毅, 张陈平. 舌鳞状细胞癌颈淋巴结转移的特点和评估处理 [J]. 国际口腔医学杂志, 2015, 42(1): 119-122.
Wu K L, Li S Y, Zhang C P. Lymph node transfer characteristics and clinical assessment and treatment of early tongue squamous cell carcinoma [J]. Int J Stomatol, 2015, 42(1): 119-122.
- [2] Xue D F, Zhou X M, Qiu J X. Cytotoxicity mechanisms of plumbagin in drug-resistant tongue squamous cell carcinoma [J]. J Pharm Pharmacol, 2021, 73(1): 98-109.
- [3] 高明雅, 沈伟哉, 吴颜晖, 等. 钩吻生物碱单体对肝癌细胞体外抑制作用机制的初步研究 [J]. 中药材, 2012, 35(3): 438-442.
Gao M Y, Shen W Z, Wu Y H, et al. Study on anti-proliferation activity and the mechanisms of alkaloid monomers from *Gelsemium elegans* on HepG2 Cell in vitro [J]. J Chin Med Mater, 2012, 35(3): 438-442.
- [4] 宋恩峰, 张彩蝶. 钩吻现代功效研究进展 [J]. 现代中

- 药研究与实践, 2017, 31(5): 74-77.
- Song E F, Zhang C D. Research progress of *Gelsemium elegans* [J]. Res Pract Chin Med, 2017, 31(5): 74-77.
- [5] 金明静, 李艳萍, 周欢思, 等. 钩吻总碱对肺腺癌细胞增殖和凋亡作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(09): 30-38.
- Jin M J, Li Y P, Zhou H S, et al. Effects of total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cells [J]. China J Mod Med, 2024, 34(9): 30-38.
- [6] 王河山, 谌赛男, 许文, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同生长年限钩吻茎中 6 种生物碱的含量 [J]. 福建中医药, 2023, 54(1): 16-19.
- Wang H S, Chen S N, Xu W, et al. UPLC-MS/MS determination of six alkaloids in *Gelsemium elegans* stems with different growth years [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2023, 54(1): 16-19.
- [7] 易金娥, 袁慧. 钩吻毒素的研究进展 [J]. 湖南环境生物职业技术学院学报, 2003(1): 26-30.
- Yi J E, Yuan H. Research and development on enterotoxin of *Gelsemium elegans* Benth [J]. J Hunan Environ Biol Polytech, 2003(1): 26-30.
- [8] 黄静, 苏燕评, 俞昌喜, 等. 钩吻生物碱化合物体外抗消化系统肿瘤的活性 [J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 197-200.
- Huang J, Su Y P, Yu C X, et al. Cytotoxic effects of alkaloidal compounds from *Gelsemium elegans* Benth on the tumor cells of digestive system *in vitro* [J]. Strait Pharm J, 2010, 22(3): 197-200.
- [9] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12), 4204-4213.
- Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12), 4204-4213.
- [10] Liu J Q, Liu J, Tong X L, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to discover the potential pharmacological mechanism of Huai Hua San against ulcerative colitis [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3255-3276.
- [11] Gan R H, Lin L S, Zheng D P, et al. High expression of Notch2 drives tongue squamous cell carcinoma carcinogenesis [J]. Exp Cell Res, 2021, 399(1): 112452.
- [12] Majchrzak E, Szybiak B, Wegner A, et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: A review of the literature [J]. Radiol Oncol, 2014, 48(1): 1-10.
- [13] 潘朝斌. 舌鳞癌的临床综合序列治疗研究进展 [J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(5): 273-280.
- Pan C B. Research progress in comprehensive and sequential treatment of tongue squamous cell carcinoma [J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2018, 26(5): 273-280.
- [14] Zhu L S, Wang Y L, Li R, et al. Surgical treatment of early tongue squamous cell carcinoma and patient survival [J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5681-5685.
- [15] Suenaga N, Kuramitsu M, Komure K, et al. Loss of tumor suppressor CYLD expression triggers cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5194.
- [16] 迟德彪, 杨鸿轩, 郑有顺. 钩吻研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(2): 48-封三.
- Chi D B, Yang H X, Zheng Y S. Research progress of *Gelsemium elegans* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2001, 17(2): 48-封三.
- [17] 谢欣, 吴玉玲, 李想, 等. 有毒中药调控凋亡通路抑制肿瘤细胞增殖 [J]. 中药与临床, 2021, 12(05): 71-74+88.
- Xie Xin, Wu Yuling, Li Xiang, et al. Toxic traditional Chinese medicine regulate apoptosis-related pathways and inhibit tumor cell proliferation [J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2021, 12(05): 71-74+88.
- [18] Carausu M, Bidard F C, Callens C, et al. ESR1 mutations: A new biomarker in breast cancer [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2019, 19(7): 599-611.
- [19] 孔启超, 王伏生. 晚期乳腺癌 ESR1 基因突变患者内分泌治疗相关研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(1): 189-193.
- Kong Q C, Wang F S. Research progress of endocrine therapy in patients with ESR1 gene mutation in advanced breast cancer [J]. J Mod Oncol, 2024, 32(1): 189-193.
- [20] Jiang L, Wang W, He Q T, et al. Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of tongue squamous cell carcinomas [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11277.
- [21] Kalali D. The role of the Matrix metalloproteinase-9 gene in tumor development and metastasis: A narrative review [J]. Glob Med Genet, 2023, 10(2): 48-53.
- [22] Yin P P, Su Y, Chen S H, et al. MMP-9 knockdown inhibits oral squamous cell carcinoma lymph node metastasis in the nude mouse tongue-xenografted model through the RhoC/src pathway [J]. Anal Cell Pathol, 2021, 2021: 6683391.
- [23] Lopez A, Reyna D E, Gitego N, et al. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1199.
- [24] Kim Y J, Go Y H, Jeong H C, et al. TPX2 prompts mitotic survival via the induction of BCL2L1 through YAP1 protein stabilization in human embryonic stem cells [J].

- Exp Mol Med, 2023, 55(1): 32-42.
- [25] Caner A, Asik E, Ozpolat B. SRC signaling in cancer and tumor microenvironment [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1270: 57-71.
- [26] Zhou Q, Liu S S, Kou Y Y, et al. ATP promotes oral squamous cell carcinoma cell invasion and migration by activating the PI3K/AKT pathway via the P2Y2-src-EGFR axis [J]. ACS Omega, 2022, 7(44): 39760-39771.
- [27] Xue Y, Sun X Y, Fu J Y, et al. PI3K/AKT pathway-related microRNA variants in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2023, 70(10): e30545.
- [28] Liu Z Q, Ding Y, Ye N, et al. Direct activation of bax protein for cancer therapy [J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 313-341.
- [29] Wang W X, Zeng C, Feng Y Q, et al. The size-dependent effects of silica nanoparticles on endothelial cell apoptosis through activating the p53-caspase pathway [J]. Environ Pollut, 2018, 233: 218-225.
- [30] Guo Y J, Liu H L, Chen Y, et al. The effect of allicin on cell proliferation and apoptosis compared to blank control and Cis-platinum in oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 13183-13189.
- [31] Ma Z J, Lu L, Yang J J, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 821: 1-10.
- [32] Karmakar I, Haldar S, Chakraborty M, et al. Regulation of apoptosis through Bcl-2/Bax proteins expression and DNA damage by *Zanthoxylum alatum* [J]. Pharm Biol, 2016, 54(3): 503-508.

[责任编辑 齐静雯]