

## 基于网络药理学探讨栀子苷抗结肠癌的作用机制

李玉<sup>1</sup>, 尚琳琳<sup>2</sup>, 冯若琳<sup>2</sup>, 杨鹏<sup>3</sup>, 李宗伟<sup>1\*</sup>

(1. 安徽医科大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230032;

2. 山西大学 生命科学学院, 山西 太原 030006;

3. 山西大学 生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

**摘要:** 栀子苷是药食同源中药栀子的主要有效成分, 因具有抗炎、抗菌、降血糖、抗抑郁、抗氧化、免疫调节、抗肿瘤等药理活性而备受关注。然而, 栀子苷在结肠癌(Colon cancer, CRC)细胞中的靶点和作用机制尚不明确。本文主要通过网络药理学进行栀子苷与CRC共同靶点的筛选, 构建栀子苷与CRC的靶蛋白互作网络, 采用R语言包进行生物功能(Gene Ontology, GO)和通路(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析, 发现栀子苷发挥抗CRC作用与肿瘤细胞衰老密切相关。采用药物亲和反应靶点稳定性(Drug affinity responsive target stability, DARTS)联合质谱探究栀子苷调控CRC细胞衰老的潜在作用靶点, 并通过分子对接预测栀子苷与靶蛋白的具体结合位点。结果发现栀子苷能够通过靶向结合脯氨酸异构酶1A(FKBP prolyl isomerase 1A, FKBP1A)发挥抗CRC的作用。细胞功能实验证实栀子苷可以显著诱导CRC细胞衰老。研究结果表明栀子苷可能通过靶向结合FKBP1A从而诱导CRC细胞衰老, 这为栀子苷用于CRC治疗的研究和开发提供了理论依据和参考。

**关键词:** 栀子苷; 结肠癌; 细胞衰老; 网络药理学; 作用靶点; 分子对接

中图分类号: Q5; R97

文献标志码: A

文章编号: 0253-2395(2024)05-1097-11

## To Explore the Mechanism of Geniposide Against Colon Cancer Based on Network Pharmacology

LI Yu<sup>1</sup>, SHANG Linlin<sup>2</sup>, FENG Ruolin<sup>2</sup>, YANG Peng<sup>3</sup>, LI Zongwei<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

3. Key Laboratory of Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** Geniposide is the main bioactive ingredient of traditional Chinese medicine *Gardenia jasminoides*. It has attracted substantial attention due to its pharmacological activities such as anti-inflammatory, antibacterial, hypoglycemic, antidepressant, antioxidant, immune modulation, and anti-tumor. However, the target and underlying mechanism of geniposide in colon cancer (CRC) cells remained elusive. Herein, we mainly screened the common targets of geniposide and CRC via network pharmacology, and constructed the target protein interaction network, and utilized the R package to perform enrichment analysis of biological functions (GO) and pathways (KEGG). The results indicated that the anti-CRC effect of geniposide is closely associated with cellular senescence. Drug affinity responsive target stability (DARTS) combined with mass spectrometry analysis was conducted to explore the potential targets of geniposide in regulating CRC cell senescence. Moreover, molecular docking was utilized to predict the specific binding sites

收稿日期: 2024-05-09; 接受日期: 2024-07-01

基金项目: 国家自然科学基金(82270217)

作者简介: 李玉(1999-), 女, 安徽六安人, 硕士, 研究方向为抗肿瘤活性成分挖掘和机制研究。E-mail: 1584933900@qq.com

\* 通信作者: 李宗伟(LI Zongwei), E-mail: lizongwei@ahmu.edu.cn

引文格式: 李玉, 尚琳琳, 冯若琳, 等. 基于网络药理学探讨栀子苷抗结肠癌的作用机制[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2024, 47(5): 1097-1107. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2024113

of geniposide and target proteins. We revealed that geniposide exerted anti-CRC effects by directly targeting FKBP prolyl isomerase 1A (FKBP1A). Cell function experiments further confirmed that geniposide significantly induced CRC cell senescence. Altogether, these results demonstrated that geniposide may trigger CRC cell senescence by targeting FKBP1A, which provides a theoretical basis and reference for the research and development of geniposide for CRC treatment.

**Key words:** geniposide; colon cancer; cellular senescence; network pharmacology; targets; molecular docking

## 0 引言

结肠癌(CRC)是全球最常见的恶性肿瘤,发病率高居第三,死亡率位列第二,约占所有恶性肿瘤相关死亡的10%<sup>[1]</sup>。近年来,我国CRC的发病率和死亡率表现出明显上升趋势,严重危及患者生命健康。CRC的治疗方法主要包括手术、化疗、放疗和靶向治疗等,化疗是普遍采用的基石治疗策略。耐药性和毒副作用严重限制了化疗对CRC的治疗效果<sup>[2]</sup>。因此,亟需开发具有抗癌活性且毒副作用低的新型抗肿瘤药物。天然产物以其资源丰富、明确的抗肿瘤活性、免疫调节活性、对正常组织低毒性以及不易产生耐药性等优势,成为抗肿瘤药物开发的资源宝库<sup>[3]</sup>。从天然产物中获取安全有效的预防和治疗肿瘤的活性成分已成为目前研究的热点<sup>[4-5]</sup>。

梔子是茜草科梔子属灌木植物,其果实是一种重要的药食同源的中药,具有护肝、利胆、降压、镇静、降糖等功效<sup>[6]</sup>。梔子苷(Geniposide)是一种环烯醚萜苷类化合物,是梔子的主要生物活性成分之一<sup>[6]</sup>。在中国药典中,梔子苷已被确定为梔子原药材的质量控制指标。梔子苷具有抗炎、降血糖、抗菌、抗抑郁、抗氧化、免疫调节等药理作用<sup>[7]</sup>。近年来梔子苷的抗肿瘤作用引起了人们的极大兴趣。梔子苷具有安全性好、生物利用度高及较好的抗肿瘤活性。研究表明,梔子苷对多种肿瘤细胞具有抑制作用,其作用机制涉及抑制细胞增殖<sup>[8]</sup>、诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>、抑制肿瘤侵袭和转移<sup>[9]</sup>、逆转肿瘤耐药<sup>[10]</sup>等多个环节。溃疡性结肠炎是一种特发性炎症性肠病,与CRC的罹患风险密切相关<sup>[11]</sup>。研究表明,梔子苷在体内外通过抑制促炎细胞因子的产生和肠道黏膜损伤从而发挥抗溃疡性结肠炎的作用<sup>[11]</sup>。梔子苷通过下调白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-10(IL-10)以及程序性细胞死亡蛋白

-1(PD-1)的表达从而显著抑制小鼠原位结肠癌的生长<sup>[12]</sup>。然而,梔子苷在CRC细胞中的胞内靶点和潜在作用机制仍不明确。

本研究通过网络药理学预测了梔子苷用于CRC治疗的信号通路、靶点和分子机制,采用药物亲和反应靶点稳定性(DARTS)联合质谱初步确定梔子苷发挥抗CRC作用的具体胞内靶点,结合分子对接手段分析梔子苷与关键靶点之间的相互作用位点,利用DepMap数据库分析CRC细胞中该关键靶点的基因依赖性,并通过细胞功能实验检测梔子苷对CRC细胞衰老的影响。本研究结果不仅为探索梔子苷的深度利用及结肠癌的营养干预提供依据,也为以梔子苷为基础的抗结肠癌药物的开发提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞HCT-8购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。梔子苷购于成都普思生物科技股份有限公司;RPMI-1640培养基购于Gibco公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;噻唑蓝(MTT)、蛋白酶K、快速银染试剂盒、BCA(Bicinchoninic Acid Assay)蛋白浓度测定试剂盒和细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒均购于碧云天生物技术公司。组织细胞固定液购于武汉赛维尔生物科技有限公司。EdU细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅(中国,国华);台式高速冷冻离心机(德国,Eppendorf);电子天平(美国,Ohaus);二氧化碳细胞培养箱(美国,Thermo);倒置荧光显微镜(日本,Nikon);小型冷冻高速离心机(德国,Eppendorf);细胞培养超净工作台(中国,力申);酶标仪(美国,BioTek)。

### 1.3 栀子苷作用靶点的获取

从中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)、Swiss Target 数据库中获取栀子苷的分子式和相关信息,通过 Super-PRED、Swiss Target Prediction、SEA (Similarity Ensemble Approach)、TargetNet、PharmMapper 数据库检索栀子苷的潜在作用靶点,并利用 UniProt 将蛋白与基因进行转化。

### 1.4 CRC 相应靶基因的获取

通过 DisGeNET、Genecards、在线人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)检索人类结肠癌的靶基因,删除重复数据,获得与 CRC 相关的靶基因。

### 1.5 栀子苷与 CRC 靶点网络的建立

将栀子苷靶点与结肠癌靶点映射取交集,绘制韦恩图,运用 Cytoscape 3.10.0 软件进行处理,建立栀子苷与结肠癌靶点网络。

### 1.6 蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与分析

将交集靶点运用 String 11.0、Cytoscape 3.10.0 软件绘制进行分析,构建 PPI 网络模型。使用 cytoHubba 插件进行网络拓扑分析和节点中心性分析,以连通度为指标筛选中心蛋白互作,剔除边缘蛋白,绘制 PPI 关系图。

### 1.7 靶点通路及基因依赖性分析

用可视化和集成发现数据库(the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID)在线分析工具,将上述筛选得到的共同靶点进行生物功能(GO)和通路(KEGG)的富集分析。设定阈值  $P < 0.05$ ,获得与栀子苷的抗 CRC 作用相关的信号通路,采用 pathview 包将分析结果进行可视化。运用 DepMap 在线数据库获得结肠癌细胞系的基因依赖性。

### 1.8 DARTS

将 HCT-8 细胞接种于 10 cm 培养皿中,待细胞密度约为 90%,收集细胞置于冰上进行裂解提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白浓度。将总蛋白调整至  $6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,将总蛋白等体积均分至 2 个艾本德(Eppendorf, EP)管中,分别加入等体积的磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)和栀子苷,栀子

苷终浓度为  $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,摇床上室温孵育 1 h。加入终浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K,室温孵育 10 min。加入  $5\times$  loading buffer,  $100^\circ\text{C}$  加热 5 min。进行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,采用快速银染试剂盒进行银染,显现出清晰条带后,终止显色并加入超纯水保存。将银染胶条寄至上海拜谱生物公司进行蛋白质酶解、液相色谱质谱联用技术(Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)分析和数据库检索,获得的差异蛋白并进行 GO 富集分析。

### 1.9 分子对接

从 PubChem 获取配体分子的 2D 结构,下载 sdf 格式文件,使用 OpenBabel-3.1.1 软件转化为蛋白质结构数据库(Protein Data Bank, PDB)格式文件。蛋白质的 PDB 文件可从 AlphaFold Protein Structure Database 中搜索 UniProt ID 获取。在 AutoDock Tools-1.5.7 软件中对小分子和蛋白去水、加氢。随后设置参数和对接配体,分析配体与蛋白质受体之间的亲和力。选择低结合能结果导出为 pdbqt 文件。在 pymol 中打开结果文件,将氢键可视化,标注具体对接位点。

### 1.10 EdU 实验

将 HCT-8 细胞接种于 12 孔板中,待贴壁细胞生长至 50% 融合度时,采用不同浓度栀子苷处理细胞 24 h。弃去培养基,每孔加入 1 mL 的  $50 \mu\text{mol}/\text{L}$  EdU 培养基继续培养 2 h,使用 PBS 清洗三次。每孔加入  $400 \mu\text{L}$  的组织细胞固定液,室温孵育 30 min。吸弃固定液后,每孔加入  $400 \mu\text{L}$  的  $2 \text{ mg}/\text{mL}$  甘氨酸,并于室温摇床孵育 5 min 后,吸弃甘氨酸溶液。每孔加入  $800 \mu\text{L}$  的体积分数为 0.5% Triton X-100 进行通透,PBS 清洗三次后,加入 EdU 细胞增殖检测试剂盒的  $800 \mu\text{L}$  染色工作液,于室温脱色摇床避光孵育 30 min。PBS 清洗三次后,采用荧光显微镜观察并保存图像。

### 1.11 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

将 HCT-8 细胞铺入 6 孔板中,待贴壁细胞生长至 70% 融合度时,采用不同浓度栀子苷处

理细胞 24 h。弃去培养基,用 PBS 清洗三次,加入 1 mL 组织细胞固定液固定 10 min。吸弃固定液,用 PBS 清洗三次。每孔加入 500  $\mu$ L 的细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒检测液,进行  $\beta$ -半乳糖苷酶染色,使用保鲜膜包裹 6 孔板,置于 37  $^{\circ}$ C 无 CO<sub>2</sub> 的培养箱中过夜孵育。PBS 清洗三次后,于显微镜下观察并保存图像。

### 1.12 数据分析

采用 Graphpad Prism 8.0 进行统计学分析,采用 *t* 检验进行差异分析,用平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。

## 2 结果

### 2.1 槲子苷和 CRC 共同靶点的筛选

从 TCMS 数据库和 Swiss Target 数据库中获取槲子苷的分子式、作用靶点和 CRC 靶点等相关信息,我们分别检索到 728 个槲子苷的作用靶点和 20 716 个 CRC 的靶点。通过 Venny 网站分析处理槲子苷和 CRC 的共同作用的靶点,共发现 308 个基因是槲子苷和 CRC 的交集靶基因(图 1)。

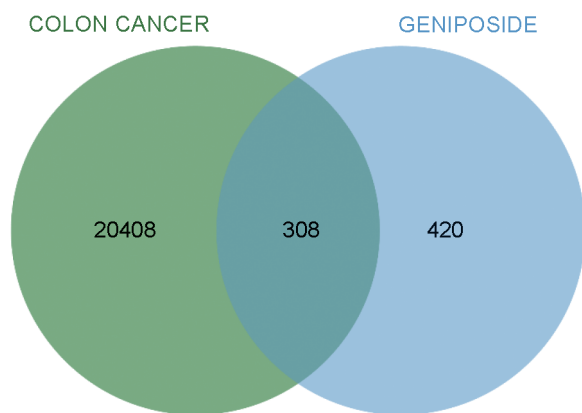


图 1 槲子苷和 CRC 作用靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the targets of geniposide and CRC

### 2.2 交集基因的蛋白质相互作用(PPI)网络构建

蛋白质相互作用(PPI)和多蛋白复合物在所有生物体的细胞信号转导过程中发挥着核心作用。在人类中,PPI 和多蛋白复合物的失调与疾病的发生发展密切相关。PPI 包括参与转录和翻译、细胞间黏附和通讯、蛋白质合成和降解、细胞周期控制等细胞信号转导过程中的细胞内结构蛋白的相互作用以及多蛋白复合物等<sup>[13]</sup>。因此,对细胞的 PPI 网络进行系统研

究,可以更好地理解细胞信号通路。

根据靶基因节点连通度(degree 值)为筛选指标,通过 String 数据库,将共同靶点生成 PPI 网络;导入 Cytoscape 软件进一步构建筛选得到的 50 个节点的可视化交互网络(图 2)。节点的颜色表示它们在网络中的重要性,颜色越深代表着基因越重要。因此,分析结果表明槲子苷在 CRC 中的潜在靶点可能与抗凋亡蛋白 BCL2、肿瘤坏死因子 TNF、蛋白激酶 AKT1 等有关。

### 2.3 GO 和 KEGG 富集分析

采用 DAVID 数据库进一步富集分析了槲子苷与 CRC 交集的 308 个潜在靶点,进行 GO 和 KEGG 富集分析。以  $P < 0.05$  为筛选条件,运用 R 软件对生物学途径(BP)和分子功能(MF)基因富集数排名前 5 的条目绘制气泡图。GO 分析结果显示,槲子苷的抗 CRC 作用主要涉及离子平衡调控、衰老、程序性细胞死亡、细胞周期、细胞分化、一氧化氮合成酶调控活性、凋亡信号通路、脂肪酶激活、蛋白激酶活性以及分子功能调控等方面(图 3)。

将 KEGG 富集分析得到的 134 条通路按照肿瘤调控途径进行排序,绘制前 8 条通路的条形图(图 4)。KEGG 富集通路分析结果显示,槲子苷的抗 CRC 的作用靶点主要涉及肿瘤中心碳代谢通路、肿瘤生成相关受体激活、p53 信号通路、化疗耐药、细胞周期、叉头框转录因子 O(Forkhead Box O, FOXO)信号通路、活性氧以及细胞衰老等途径。这些结果表明槲子苷的抗 CRC 作用与细胞衰老密切相关。因此,本研究主要聚焦槲子苷对 CRC 细胞衰老的影响。

### 2.4 DARTS 实验明确槲子苷在 CRC 细胞中的潜在作用靶点

药物亲和反应靶点稳定性(DARTS)是一种鉴定和研究蛋白质与小分子相互作用的方法,主要的优势是不需要对小分子进行任何结构修饰即可鉴定出小分子的靶点<sup>[14]</sup>。DARTS 的原理为小分子与靶蛋白结合时会稳定靶蛋白的结构,使其对蛋白酶产生耐受,通过检测靶蛋白的稳定性变化从而揭示细胞中的药物分子与靶标的相互作用<sup>[14]</sup>。为了探究槲子苷的抗肿瘤机制,我们采用了 DARTS 策略来鉴定槲子苷在 CRC 细胞中的靶蛋白(图 5(a))。通过

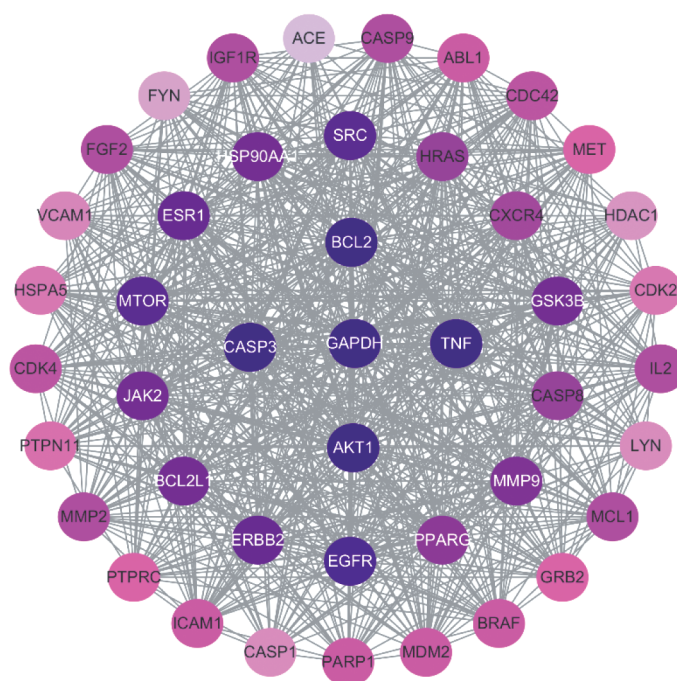


图2 栀子苷与结肠癌核心靶点PPI网络图

Fig. 2 PPI network diagram of core targets of geniposide and CRC

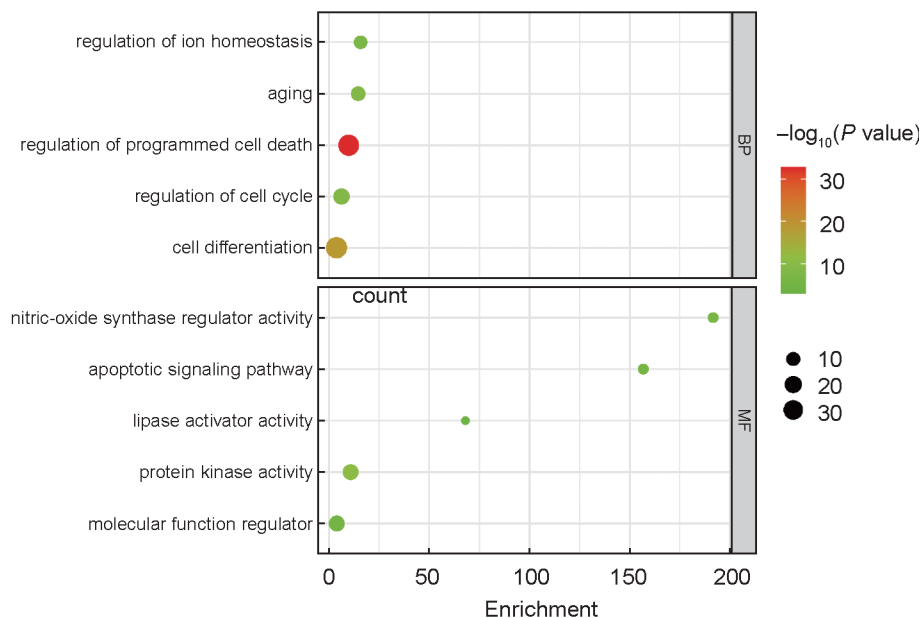


图3 GO富集分析结果

Fig. 3 Results of GO enrichment analysis

SDS-PAGE 凝胶电泳检测栀子苷作用于 CRC 细胞的靶蛋白,将电泳后的凝胶进行银染处理 (图 5(b))。对照组和加药组的蛋白条带进行酶解后,通过 LC-MS/MS 分析、数据库检索分析,获得 84 个差异蛋白。鉴于 FKBP 脯氨酸异构酶 1A (FKBP1A) 在肿瘤中高表达且与细胞衰老密切相关<sup>[15-16]</sup>,因此,选取了 FKBP1A 作为

栀子苷在 CRC 细胞中的潜在靶点。

### 2.5 DepMap 数据库分析 CRC 细胞中 FKBP1A 的基因依赖性

DepMap 在线数据库旨在系统地鉴定癌细胞生存所需基因并分析肿瘤对关键基因的依赖性,从而揭示与肿瘤脆弱性相关的潜在靶点<sup>[17]</sup>。通过对来自 DepMap 数据集的 CRISPR

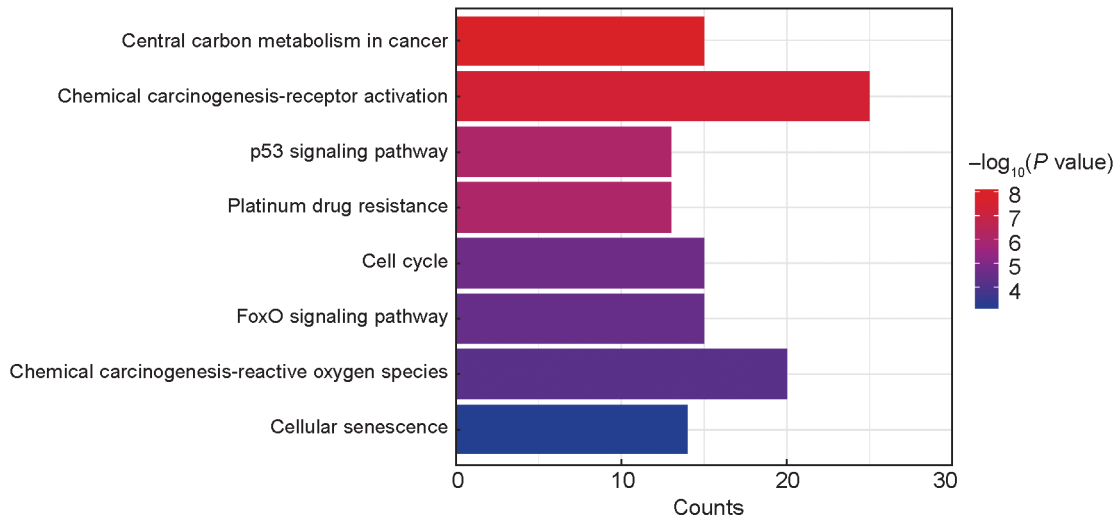


图4 KEGG通路富集分析

Fig. 4 Analysis of KEGG pathway enrichment

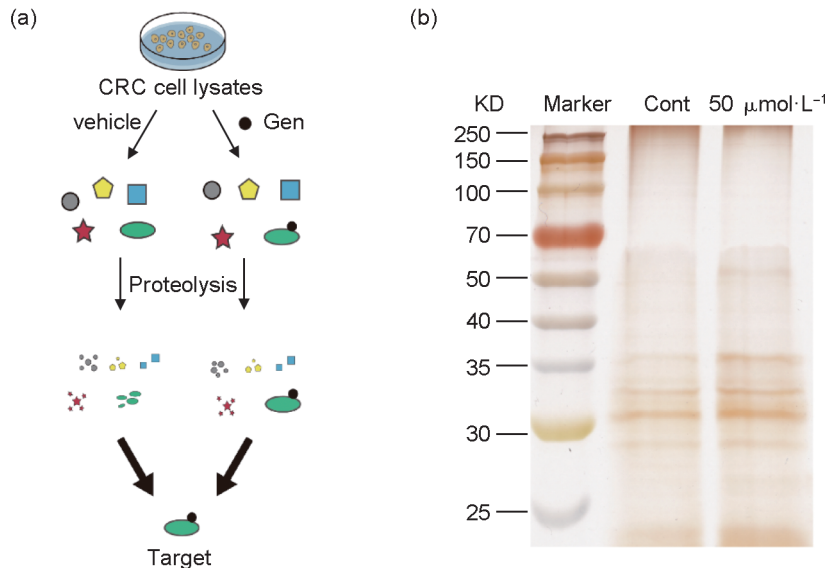


图5 DARTS实验鉴定栀子苷在CRC细胞中的作用靶点

(a)采用DARTS实验鉴定栀子苷结合蛋白的示意图;(b)银染结果鉴定栀子苷的结合蛋白

Fig. 5 DARTS experiment was performed to identify the target of geniposide in CRC cells

(a) Schematic diagram of using DARTS experiment to identify geniposide-binding proteins; (b) Silver staining results of geniposide-binding proteins

和 siRNA 数据进行了全面分析,重点聚焦 FKBP1A 在 CRC 细胞中的基因依赖性。利用 DepMap 数据库提取了 FKBP1A 的依赖性得分, -1 分表示基因具有致死性,而 0 分表示基因对肿瘤细胞生存没有明显的影响。结果显示,在 DepMap 的 CRISPR 和 siRNA 数据集中 FKBP1A 发生显著富集(图 6(a), (b)),表明了 FKBP1A 是 CRC 细胞生存的必需基因,FKBP1A 可作为 CRC 的潜在靶点。

## 2.6 栀子苷与 FKBP1A 的分子对接

研究表明,FKBP1A 在胃癌、结肠癌、头颈鳞癌等多种肿瘤中高表达,已成为肿瘤进展和预后的重要因素<sup>[18]</sup>。据报道,FKBP1A 与肿瘤发生、转移、化疗耐药以及细胞衰老等过程密切相关<sup>[15-16, 18-19]</sup>。采用 AutoDock 软件将栀子苷与 FKBP1A 靶点进行分子对接。结果显示,栀子苷与 FKBP1A 靶点之间具有较强的结合能力,可以与 FKBP1A 的 PRO-16、ARG-18、GLU-

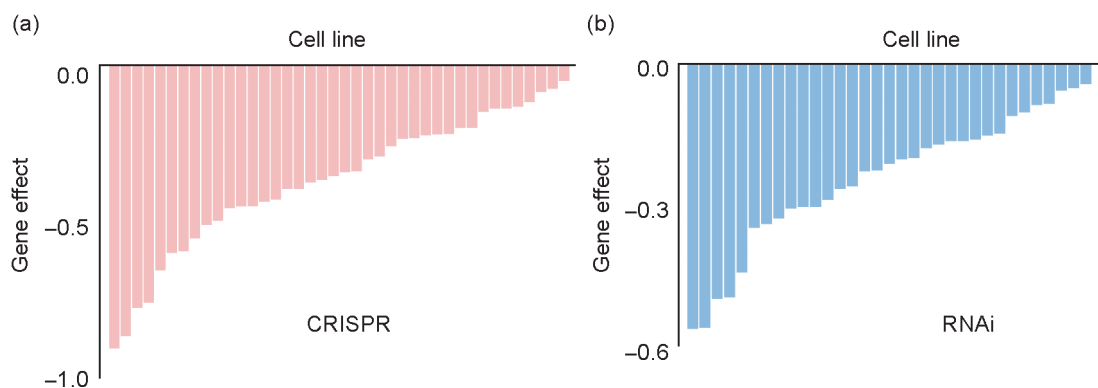


图6 通过DepMap数据库中的CRISPR-Cas9筛选(a)和RNAi筛选(b)分析FKBP1A在CRC细胞系中的基因依赖性  
 Fig. 6 Analysis of gene dependence of FKBP1A in CRC cell lines by CRISPR-Cas9 screening (a) and RNAi screening (b) via DepMap database

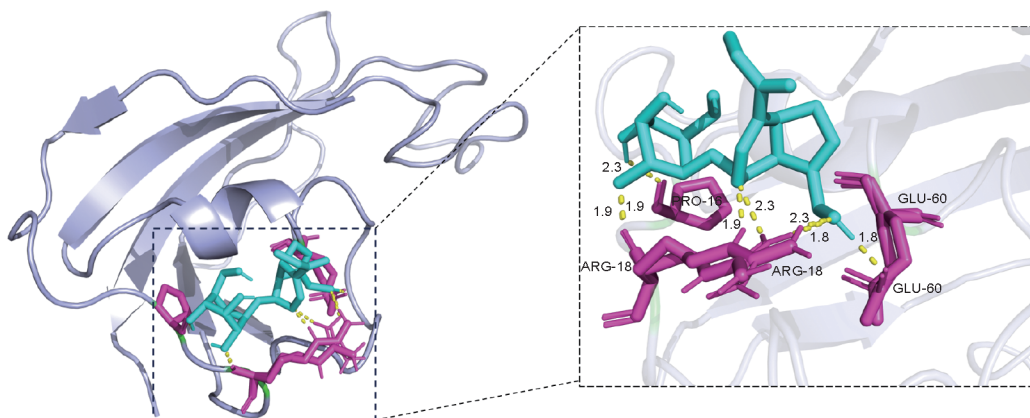


图7 FKBP1A和栀子苷的分子对接结果  
 Fig. 7 Molecular docking results of FKBP1A and geniposide

60位点形成氢键(图7)。这些结果表明,栀子苷可能通过与FKBP1A的PRO-16、ARG-18、GLU-60位点结合从而发挥抗CRC的作用。

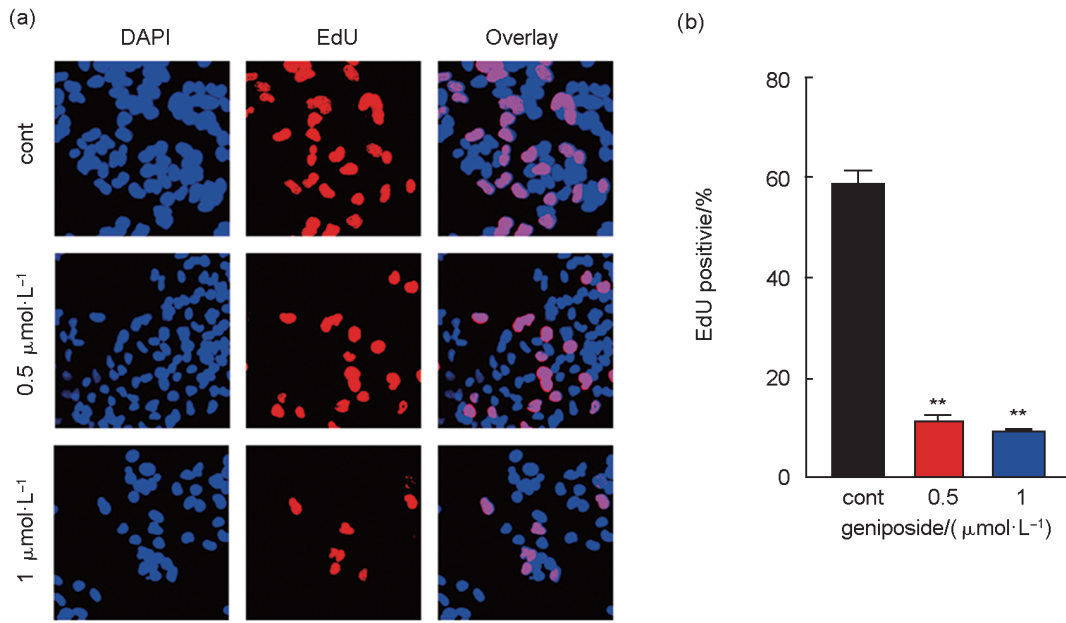
### 2.7 栀子苷诱导CRC细胞衰老

EdU是一种胸腺嘧啶类似物,可以整合进入正在合成的DNA中,通过与染料反应发出荧光,从而真实地反映细胞增殖的情况<sup>[3]</sup>。EdU结果显示,相较于对照组,栀子苷处理组红色荧光明显减少,且栀子苷对CRC细胞增殖的抑制作用具有浓度依赖性(图8(a),(b))。研究表明,衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)的阳性染色可作为细胞衰老特异性的标志物<sup>[20]</sup>。为了探究栀子苷是否影响CRC细胞衰老,我们采用不同浓度栀子苷处理CRC细胞24 h,并检测对 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的影响。随着栀子苷浓度的增加,HCT-8细胞中SA- $\beta$ -gal阳性染色的比例逐渐增大,这表明栀子苷能够以浓度依赖性方式诱导CRC细胞衰老(图9(a),(b))。

### 3 讨论

CRC是一种致死率较高的癌症之一,迫切需要开发新型、安全且更有效的抗肿瘤策略。天然产物已成为抗肿瘤新药研发的重要资源。现有文献表明,天然产物及其衍生物占美国食品和药物管理局批准的癌症治疗药物的近53%<sup>[3]</sup>。栀子苷是一种环烯醚萜苷类化合物,是从栀子果实中提取的有效成分之一,具有抗炎镇痛、抗氧化、降糖降脂、保肝、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[6]</sup>。然而,栀子苷在CRC中的靶点和分子机制尚未明确。

网络药理学是一门新兴科学,它融合了系统生物学、药理学、计算机科学和生物信息学,主要使用网络成分分析来表征生物系统之间复杂的相互作用,从而确定肿瘤治疗中的协同效应<sup>[21]</sup>。作为一种探索药物与疾病关系的新策略,网络药理学系统地预测和解释小分子或



\*\*表示  $P < 0.01$ , 比例尺代表  $100 \mu\text{m}$ ; \*\*  $P < 0.01$ , Scale bars represent  $100 \mu\text{m}$

图8 栀子苷对结肠癌细胞增殖的抑制作用

(a) 不同浓度的栀子苷处理HCT-8细胞24 h, 经过EdU和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色后进行荧光显微镜观察;(b)是(a)的定量统计图

Fig. 8 Geniposide inhibits the proliferation of CRC cells

(a) HCT-8 cells were treated with different concentrations of geniposide for 24 h. After EdU and DAPI staining, the cells were observed under fluorescence microscope. (b) Cell viability was calculated from (a)

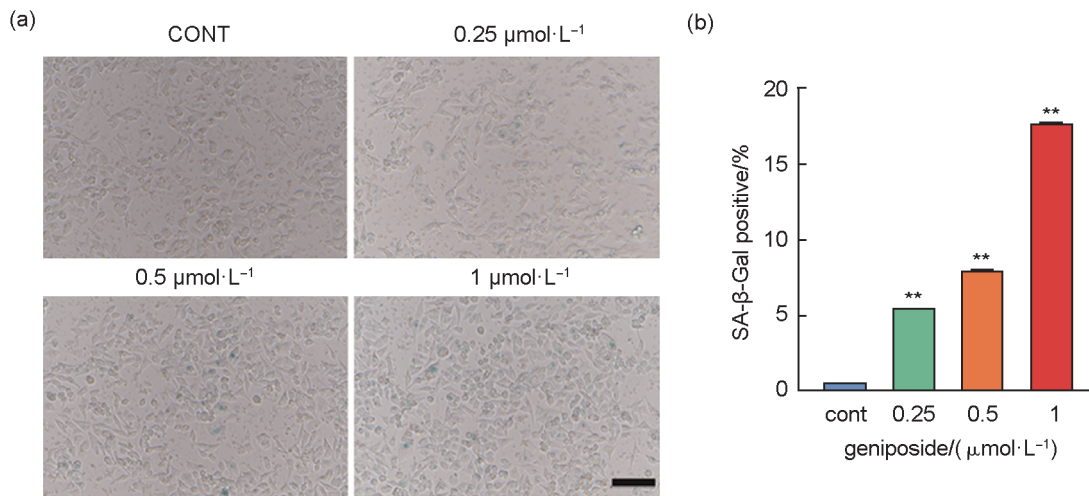


图9 栀子苷诱导结肠癌细胞衰老

(a)采用不同浓度栀子苷处理HCT-8细胞24 h, 经过β-半乳糖苷酶染色后进行光学显微镜观察。比例尺代表  $100 \mu\text{m}$ 。(b)是根据β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数目的定量统计图

Fig. 9 Geniposide triggers cellular senescence in CRC cells

(a) HCT-8 cells were treated with various concentrations of geniposide for 24 h. After β-galactosidase staining, the cells were observed under microscope. Scale bars represent  $100 \mu\text{m}$ . (b) The statistical results of positive senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) staining cells

中药化合物与多种疾病的相互作用机制<sup>[21]</sup>。网络药理学在阐明小分子和疾病之间的作用

机制的应用已得到充分证明<sup>[21-22]</sup>。本研究旨在通过网络药理学获取栀子苷和CRC的作用

靶点,利用生物信息学分析发现栀子苷发挥抗CRC作用的分子机制与细胞衰老密切相关。运用DARTS联合质谱确定栀子苷诱导CRC细胞衰老的胞内靶点,并通过细胞实验证实栀子苷通过诱导CRC细胞衰老发挥抗肿瘤作用,为栀子苷的深度开发及CRC的营养干预提供依据。

细胞衰老是一种以不可逆的生长停滞和细胞功能改变为特征的细胞状态,其基本特征包括细胞周期抑制蛋白p16和p53的上调,SA- $\beta$ -gal活性升高,以及核纤层蛋白Lamin B1的下调等。细胞衰老被认为是一种有效的肿瘤抑制机制,诱导肿瘤细胞衰老可以作为癌症治疗的一种新型极具前景的策略。在化疗药物浓度明显低于临床剂量的情况下可诱导肿瘤细胞衰老,从而为降低化疗毒副作用提供了希望<sup>[23]</sup>。驱动肿瘤细胞进入衰老表型可以使得肿瘤细胞对化疗药物重新敏感<sup>[24]</sup>。此外,通过诱导肿瘤细胞进入衰老状态,再采用选择性杀伤衰老肿瘤细胞的药物,从而实现肿瘤精准治疗<sup>[25]</sup>。我们的研究发现,栀子苷可以有效诱导CRC细胞衰老。在后续研究中,我们将筛选高效化合物进行选择性清除栀子苷诱导的衰老CRC细胞,从而开发基于栀子苷的CRC精准治疗策略。

作为免疫亲和蛋白FKBP(FK506结合蛋白)家族重要成员,FKBP1A在肿瘤发生和发展过程中发挥重要作用,是肿瘤治疗的潜在靶点<sup>[15-16, 18-19]</sup>。研究表明,FKBP1A可通过与溶质载体家族3成员2(SLC3A2)蛋白发生相互作用从而促进乳腺癌细胞化疗耐药,靶向干预FKBP1A与SLC3A2之间的相互作用可诱导乳腺癌细胞发生铁死亡<sup>[19]</sup>。FKBP1A蛋白作为免疫抑制药物的受体,调控着免疫细胞与肿瘤细胞的细胞间信号转导,从而驱动肿瘤恶性进展<sup>[26]</sup>。FKBP1A的高表达与肝癌组织的造血免疫细胞(包括B细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞)的浸润呈现正相关,被认为是肝癌免疫细胞浸润的潜在预后靶点<sup>[27]</sup>。敲低FKBP1A的表达可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路来诱导肝癌细胞自噬并抑制肝癌细胞生长<sup>[28]</sup>。此外,FKBP1A在细胞衰老过程中扮演着重要角色<sup>[15-16]</sup>。

DARTS实验结果揭示了,栀子苷在CRC细胞中的潜在作用靶点为FKBP1A。分子对接结果进一步表明,栀子苷可能通过与FKBP1A的PRO-16、ARG-18、GLU-60位点结合从而发挥诱导CRC细胞衰老的作用。考虑到肿瘤细胞衰老在肿瘤治疗中的重要作用,在今后工作中我们将深入探究栀子苷靶向FKBP1A诱导CRC细胞衰老的分子机制。

综上所述,本研究阐明了栀子苷抗CRC的关键作用靶点及信号通路,揭示了栀子苷通过靶向结合FKBP1A从而诱导CRC细胞衰老的潜在可能,但栀子苷调控FKBP1A诱导CRC细胞衰老的具体机制还有待深入研究。本研究的开展为栀子苷用于CRC治疗的研究提供了依据和参考。

#### 参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, *et al.* Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, **74**(3): 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.
- [2] COMBÈS E, ANDRADE A F, TOSI D, *et al.* Inhibition of Ataxia-telangiectasia Mutated and RAD3-related (ATR) Overcomes Oxaliplatin Resistance and Promotes Antitumor Immunity in Colorectal Cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, **79**(11): 2933-2946. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2807.
- [3] 付荣. 燕麦生物碱中抗结肠癌活性成分发现及作用机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2020. DOI: 10.27284/d.cnki.gsxiu.2020.000036.  
FU R. The Bioactive Agent from Avenanthramides and Molecular Mechanism of Anti-colorectal Cancer Effects [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020. DOI: 10.27284/d.cnki.gsxiu.2020.000036.
- [4] MANN J. Natural Products in Cancer Chemotherapy: Past, Present and Future[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(2): 143-148. DOI: 10.1038/nrc723.
- [5] ZHANG D D, CHAPMAN E. The Role of Natural Products in Revealing NRF2 Function[J]. *Nat Prod Rep*, 2020, **37**(6): 797-826. DOI: 10.1039/c9np00061e.
- [6] 陈榕, 何梓炫, 颜焯, 等. 栀子及其主要成分的药理及毒性作用研究进展[J]. *中草药*, 2023, **54**(18): 6092-6105. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.027.  
CHEN R, HE Z X, YAN Y, *et al.* Research Progress on

- Pharmacological and Toxic Effects of Gardeniae Fructus and Its Main Components[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, **54**(18): 6092–6105. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.027.
- [7] HABTEMARIAM S, LENTINI G. Plant-derived Anti-cancer Agents: Lessons from the Pharmacology of Geniposide and Its Aglycone, Genipin[J]. *Biomedicines*, 2018, **6**(2): 39. DOI: 10.3390/biomedicines6020039.
- [8] HU L J, ZHAO J J, LIU Y, *et al.* Geniposide Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Diffuse Large B-cell Lymphoma Cells by Inactivating the HCP5/miR-27b-3p/MET Axis[J]. *Int J Med Sci*, 2020, **17**(17): 2735–2743. DOI: 10.7150/ijms.51329.
- [9] ZHANG C, WANG N, TAN H Y, *et al.* Direct Inhibition of the TLR4/MyD88 Pathway by Geniposide Suppresses HIF-1 $\alpha$ -independent VEGF Expression and Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, **177**(14): 3240–3257. DOI: 10.1111/bph.15046.
- [10] HUANG H F, ZHANG X N, HUANG Z X, *et al.* Geniposide Reverses Multidrug Resistance *in vitro* and *in vivo* by Inhibiting the Efflux Function and Expression of P-glycoprotein[J]. *Exp Ther Med*, 2017, **13**(2): 437–442. DOI: 10.3892/etm.2016.4011.
- [11] ZHANG Z C, LI Y X, SHEN P, *et al.* Administration of Geniposide Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Mice *via* Inhibition of Inflammation and Mucosal Damage[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **49**: 168–177. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.05.033.
- [12] KIMURA Y, SUMIYOSHI M, TANIGUCHI M. Geniposide Prevents Tumor Growth by Inhibiting Colonic Interleukin-1 $\beta$  and Monocyte Chemoattractant Protein-1 *via* Down-regulated Expression of Cyclooxygenase-2 and Thymocyte Selection-associated High Mobility Box Proteins TOX/TOX2 in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-treated Mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, **118**: 110077. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110077.
- [13] LU H Y, ZHOU Q D, HE J, *et al.* Recent Advances in the Development of Protein-protein Interactions Modulators: Mechanisms and Clinical Trials[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 213. DOI: 10.1038/s41392-020-00315-3.
- [14] HWANG H Y, KIM T Y, SZÁSZ M A, *et al.* Profiling the Protein Targets of Unmodified Bio-active Molecules with Drug Affinity Responsive Target Stability and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry[J]. *Proteomics*, 2020, **20**(9): e1900325. DOI: 10.1002/pmic.201900325.
- [15] 孙洋, 王炼, 赵萌, 等. 胃癌中FKBP1A高表达的预后价值及其靶向PI3K/AKT对糖代谢的调控作用[J]. 中国癌症杂志, 2023, **33**(8): 726–739. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.08.002.
- SUN Y, WANG L, ZHAO M, *et al.* The Prognostic Value of High Expression of FKBP1A in Gastric Cancer and the Regulatory Effect of Targeted PI3K/AKT on Glucose Metabolism[J]. *China Oncol*, 2023, **33**(8): 726–739. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.08.002.
- [16] LOU D F, XING X Y, LIANG Y Y. Dendrobine Modulates Autophagy to Alleviate Ox-LDL-induced Oxidative Stress and Senescence in HUVECs[J]. *Drug Dev Res*, 2022, **83**(5): 1125–1137. DOI: 10.1002/ddr.21937.
- [17] PACINI C, DEMPSTER J M, BOYLE I, *et al.* Integrated Cross-study Datasets of Genetic Dependencies in Cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1661. DOI: 10.1038/s41467-021-21898-7.
- [18] CAI S Y, CHEN Z Y, TANG H, *et al.* Upregulated FKBP1A Suppresses Glioblastoma Cell Growth *via* Apoptosis Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(23): 14935. DOI: 10.3390/ijms232314935.
- [19] CHEN Z H, LI R X, FANG M, *et al.* Integrated Analysis of FKBP1A/SLC3A2 Axis in Everolimus Inducing Ferroptosis of Breast Cancer and Anti-proliferation of T Lymphocyte[J]. *Int J Med Sci*, 2023, **20**(8): 1060–1078. DOI: 10.7150/ijms.84872.
- [20] YANG P, LIAN Q, FU R, *et al.* Cucurbitacin E Triggers Cellular Senescence in Colon Cancer Cells *via* Regulating the miR-371b-5p/TFAP4 Signaling Pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(9): 2936–2947. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c07952.
- [21] NOGALES C, MAMDOUH Z M, LIST M, *et al.* Network Pharmacology: Curing Causal Mechanisms Instead of Treating Symptoms[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, **43**(2): 136–150. DOI: 10.1016/j.tips.2021.11.004.
- [22] SHANG L R, WANG Y C, LI J X, *et al.* Mechanism of Sijunzi Decoction in the Treatment of Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, **302**(Pt A): 115876. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115876.
- [23] GORDON R R, NELSON P S. Cellular Senescence and Cancer Chemotherapy Resistance[J]. *Drug Resist Updat*, 2012, **15**(1-2): 123–131. DOI: 10.1016/j.drug.2012.01.002.
- [24] SUN Y, COPPÉ J P, LAM E W F. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted?[J]. *Trends Mol Med*, 2018, **24**(10): 871–885. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.08.002.
- [25] XUE W, ZENDER L, MIETHING C, *et al.* Senescence

- and Tumour Clearance is Triggered by P53 Restoration in Murine Liver Carcinomas[J]. *Nature*, 2007, **445** (7128): 656–660. DOI: 10.1038/nature05529.
- [26] WATCHARANURAK P, MUTIRANGURA A, AKSORNKITTI V, *et al.* The High FKBP1A Expression in WBCS as a Potential Screening Biomarker for Pancreatic Cancer[J]. *Sci Rep*, 2024, **14**(1): 7888. DOI: 10.1038/s41598-024-58324-z.
- [27] LI Z G, CUI Y, DUAN Q C, *et al.* The Prognostic Significance of *FKBP1A* and Its Related Immune Infiltration in Liver Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(21): 12797. DOI: 10.3390/ijms232112797.
- [28] YE W, SHI Z H, ZHOU Y L, *et al.* Autophagy-related Signatures as Prognostic Indicators for Hepatocellular Carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2022, **12**: 654449. DOI: 10.3389/fonc.2022.654449.