

王浆酸对人结肠癌SW620细胞增殖的抑制作用及其网络药理学分析

刘雅鑫¹, 刘健¹, 李祯¹, 曹占鸿¹, 白浩楠¹, 安昱¹, 房星宇¹, 杨擎¹, 李辉², 李娜¹

(1. 长春中医药大学 吉林省人参科学研究院中药分子药理实验室, 吉林 长春 130117;

2. 吉林省前卫医院肛肠科, 吉林 长春 130012)

[摘要] **目的:** 基于网络药理学探讨王浆酸(10-HDA)对人结肠癌SW620细胞增殖和迁移的影响, 阐明其相关分子机制。**方法:** 利用中药系统药理学(TMSCP)数据库和中医药综合数据库(TCMID)以关键词“蜂王浆”进行检索得到10-HDA等活性成分及对应靶点, 采用Swiss Target Prediction数据库预测小分子靶点。采用GeneCards数据库和在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库以关键词“Colon Cancer”获得靶点, 利用String数据库和Cytoscape 3.8.0软件构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络, 筛选核心靶点; 利用Metascape数据库对基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路进行富集分析, 筛选特有成分10-HDA进行体外活性实验。将生长状态良好的人结肠癌SW620细胞分为对照组和不同剂量(1、5、10、15和20 mmol·L⁻¹) 10-HDA组, 采用MTT法检测各组细胞活性并计算细胞存活率。SW620细胞分为对照组、低剂量(5 mmol·L⁻¹) 10-HDA组、中剂量(10 mmol·L⁻¹) 10-HDA组和高剂量(15 mmol·L⁻¹) 10-HDA组, Hoechst33342染色法观察各组细胞形态表现, 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率, 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率, 生化法检测各组细胞中总抗氧化能力(T-AOC)和超氧化物歧化酶(SOD)活性, Western blotting法检测各组细胞中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(Caspase-9)、糖原合成酶激酶3β(GSK3β)、β-连环蛋白(β-catenin)和细胞周期蛋白D1(CyclinD1)蛋白表达水平。**结果:** TCMSP数据库筛选得到蜂王浆6种活性成分, 10-HDA治疗结肠癌核心靶点28个。GO功能富集分析主要涉及细胞增殖和细胞凋亡等信号通路; KEGG信号通路富集分析涉及细胞周期、前列腺癌、细胞衰老和p53等信号通路, GSK3β/β-catenin信号通路与细胞周期有密切关联。与对照组比较, 5、10、15和20 mmol·L⁻¹ 10-HDA组细胞存活率呈剂量依赖性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 不同剂量10-HDA组细胞中凋亡细胞数明显增多, 细胞划痕愈合率明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中和高剂量10-HDA组细胞中S期细胞百分率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 不同剂量10-HDA组细胞中T-AOC和SOD活性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 低剂量10-HDA组细胞中Bcl-2蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), GSK3β蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 与对照组比较, 中和高剂量10-HDA组细胞中Bax、Caspase-3、Caspase-9和GSK3β蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2、β-catenin和CyclinD1蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。**结论:** 10-HDA可明显抑制结肠癌细胞增殖和迁移, 并可促进结肠癌细胞的凋亡和氧化水平, 其作用机制可能与激活GSK3β/β-catenin信号通路有关。

[关键词] 王浆酸; 结肠肿瘤; SW620细胞; 细胞凋亡; 糖原合成酶激酶3β; β-连环蛋白

[中图分类号] R735.3 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-02-19

[基金项目] 吉林省卫健委科技能力提升项目(2022JC009)

[作者简介] 刘雅鑫(1995—), 女, 吉林省榆树市人, 在读硕士研究生, 主要从事中药分子药理学方面的研究。

[通信作者] 李辉, 医师(E-mail: doctor_hui@hotmail.com);

李娜, 研究员, 博士研究生导师(E-mail: lhaln@hotmail.com)

Inhibitory effect of royal jelly acid on proliferation of human colon cancer SW620 cells and its network pharmacological analysis

LIU Yaxin¹, LIU Jian¹, LI Zhen¹, CAO Zhanhong¹, BAI Haonan¹, AN Yu¹, FANG Xingyu¹,
YANG Qing¹, LI Hui², LI Na¹

(1. Laboratory of Molecular Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Department of Anorectology, Qianwei Hospital, Jilin Province, Changchun 130012, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of royal jelly acid (10-HDA) on the proliferation and migration of the human colon cancer SW620 cells based on the network pharmacology, and to clarify its related molecular mechanism. **Methods:** The active ingredients such as 10-HDA and their corresponding targets were retrieved by using the keyword “royal jelly” from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) Database and the Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID); the small molecule targets were predicted by the Swiss Target Prediction Database. The GeneCards Database and the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Database were used to obtain the targets with the keyword “Colon Cancer”; the protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using the String Database and Cytoscape 3.8.0 Software to screen the core targets; the Gene Ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were analyzed by Metascape Database; the specific ingredient 10-HDA was screened for the *in vitro* activity experiments. The human colon cancer SW620 cells with good growth status were divided into control group and different doses (1, 5, 10, 15, and 20 mmol·L⁻¹) of 10-HDA groups. The viabilities of the cells in various groups were detected by MTT method and the survival rates of the cells were calculated. The SW620 cells were divided into control group, low dose (5 mmol·L⁻¹) of 10-HDA group, middle dose (10 mmol·L⁻¹) of 10-HDA group, and high dose (15 mmol·L⁻¹) of 10-HDA group; Hoechst33342 staining method was used to observe the morphology of the cells in various groups; cell scratch test was used to detect the scratch healing rates of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the percentages of the cells at different cell cycles in various groups; biochemical method was used to detect the activities of total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (Caspase-3), cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-9 (Caspase-9), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), β -catenin, and cyclin D1 proteins in the cells in various groups. **Results:** Six active ingredients of royal jelly were screened out by the TCMSP Database, and 28 core targets of 10-HDA in the treatment of colon cancer were obtained. The GO function enrichment analysis mainly included the signaling pathways such as cell proliferation and apoptosis. The KEGG signaling pathway enrichment analysis included the cell cycle, prostate cancer, cell senescence, and p53 signaling pathways; the GSK3 β / β -catenin signaling pathway was closely related to the cell cycle. Compared with control group, the viabilities of the cells in 5, 10, 15, and 20 mmol·L⁻¹ 10-HDA groups were decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the numbers of apoptotic cells in different doses of 10-HDA groups were significantly increased, and the scratch healing rates of the cells were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the percentages of the cells at S phase in middle and high doses of 10-HDA groups were significantly increased

($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the activities of T-AOC and SOD in the cells in different doses of 10-HDA groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with control group, the expression level of Bcl-2 protein in the cells in low dose of 10-HDA group was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of GSK3 β protein was significantly increased ($P < 0.05$); compared with control group, the expression levels of Bax, Caspase-3, Caspase-9, and GSK3 β proteins in the cells in middle and high doses of 10-HDA groups were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression levels of Bcl-2, β -catenin, and CyclinD1 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** 10-HDA can significantly inhibit the proliferation and migration of the colon cancer cells and promote the apoptosis and oxidation levels of the colon cancer cells, and its mechanism may be related to the activation of the GSK3 β / β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS 10-Hydroxydec-2-enoic acid; Colon neoplasm; SW620 cells; Apoptosis; Glycogen synthase kinase 3 β ; β -catenin

结肠癌是人体消化系统最常见的恶性肿瘤,也是导致癌症第二大常见死亡原因^[1]。尽管结肠癌的治疗已经取得很大的进展,但其早期检出率仍相对较低,治疗手段以化疗为主^[2],尚无可靠的治疗方案。研究^[3-4]显示:通过抑制细胞增殖、诱导氧化应激和阻断细胞周期,可以促进肿瘤细胞凋亡。蜂王浆是药食同源的保健食品,王浆酸(10-hydroxydec-2-enoic acid, 10-HDA)作为蜂王浆的特有活性成分,其含量占蜂王浆脂肪酸50%以上^[5],具有预防和治疗消化道肿瘤的功效^[6-9],近年来受到广泛关注。有关10-HDA对人结肠癌SW620细胞的生长抑制作用目前国内外尚未见报道。网络药理学可依靠强大的数据搜索能力来解释疾病和药物的关系^[10]。本研究采用网络药理学方法预测10-HDA抗人结肠癌的生物学基础,以人结肠癌SW620细胞作为研究对象,探讨10-HDA对SW620细胞增殖和迁移的抑制作用,阐明10-HDA抗结肠癌的作用机制,为研制10-HDA预防和治疗结肠癌的新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、主要试剂和仪器 人结肠癌SW620细胞(美国培养物集存库,批号:CBP60036)。10-HDA(上海源叶生物科技有限公司,批号:J31M9H62449),噻唑蓝(multiple table tournament, MTT)和二甲基亚砷(北京金宏达生物科技有限公司,批号:0793和J200016),聚偏二氟乙烯膜(英国MILLOPORE公司,批号:CVWP2932A),总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成

生物科技有限公司,批号:A001-3和A-015-2-1)。蛋白电泳仪(美国奥复公司,型号:PS300B),转膜仪(美国Bio-Rad公司,型号:04113R115669),凝胶成像仪(美国Aplegen公司,型号:CA94588-8552),B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cysteinyI aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶9(cysteinyI aspartate specific proteinase-9, Caspase-9)、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)和超敏ECL化学发光检测试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:50599-2-Ig、26593-1-AP、66470-2-Ig、10380-1-AP、22104-1-AP、51067-2-AP、26939-1-AP和P0018S)。

1.2 蜂王浆化学成分的筛选 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, TMSCP)(<https://old.tcm-sp.com/tcm-sp.php>)和中医药综合数据库(Traditional Chinese Medicines Integrated Database, TCMID)(<http://www.megabionet.org/tcmid/>)中检索获得蜂王浆活性成分。药代动力学特性包括药物吸收、分布、代谢和排泄(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, ADME),其中ADME是影响生物活性的关键因素。采用2个ADME相关参数,即口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和药物相似度(drug similarity, DL),筛选蜂王浆潜在的有效成分,根

据 TCMCP 数据库建议, 口服给药后, OB 值 $\geq 30\%$ 被视为吸收良好, DL 值 ≥ 0.18 表明可用于药物开发。因此以 OB $\geq 30\%$ 和 DL ≥ 0.18 , 在小分子药物靶点在线平台 Swiss Target Prediction 中数据库获取 10-HDA 等小分子靶点, 在蛋白质分析 (Universal Protein, UniProt) 数据库中进行标准基因名转换。

1.3 结肠癌相关靶点的收集 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和在线人类孟德尔遗传 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库 (<https://omim.org/>) 中获得结肠癌靶点。以“Colon Cancer”为检索词, 候选靶点重整后作为蜂王浆防治结肠癌的潜在作用靶点。

1.4 蛋白-蛋白相作 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建和拓扑分析 靶点间 PPI 网络通过 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 获得, 并使用 Cytoscape 3.8.2 软件生成药物-疾病靶点网络。使用内置 CytoNCA 分析插件, 通过以下拓扑参数评估网络节点中心性特性: 度中心性 (degree centrality, DC)、调节中心性 (betweenness centrality, BC) 和接近中心性 (closeness centrality, CC), 得到 PPI 文件导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制 PPI 网络图。

1.5 基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析 利用 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 对核心靶点进行富集分析, 获取 GO 和 KEGG 富集通路, 得到相应的生物过程 (biological processes, BP)、细胞组成 (cell composition, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和 KEGG 信号通路, 筛选条件 $P < 0.05$ 。利用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制气泡图, 对前 10 位生物学过程信号通路进行可视化处理。

1.6 MTT 法检测不同剂量 10-HDA 组 SW620 细胞存活率 取处于对数生长期无污染的人结肠癌 SW620 细胞, 以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种至 96 孔细胞培养板中, 加入不同剂量 (1、5、10、15 和 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10-HDA, 药物组均设 6 个平行, 对照组给予培养液, 培养 24 h, 每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续孵育 4 h 后加入 $150 \mu\text{L}$

DMSO 终止反应。在波长 490 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值, 计算各组细胞存活率。细胞存活率 = 给药组平均 A 值 / 对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

1.7 Hoechst33342 染色法观察各组细胞形态表现 将处于对数生长期无污染的人结肠癌 SW620 细胞分为对照组, 低剂量 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10-HDA 组、中剂量 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10-HDA 组和高剂量 ($15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 10-HDA 组, 以 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔细胞培养板中, 分别进行给药处理, 培养箱孵育 24 h 后, 将培养液弃掉, PBS 缓冲液冲洗 2 次, 每孔加入 Hoechst33342 染色液 1 mL, 染色 30 min 后采用荧光显微镜观察各组细胞形态表现。

1.8 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率 将人结肠癌 SW620 细胞以 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种至 6 孔细胞培养板中, 24 h 细胞贴壁后更换为低浓度 (0.5%) 血清。当细胞密度达到 90% 汇合后, 使用 $200 \mu\text{L}$ 移液管的尖端在 6 孔细胞培养板中进行划痕, 加入 PBS 缓冲液除去划伤的细胞后加入 DMEM 培养液。在实验开始及实验 12、24 和 48 h 分别采用倒置显微镜观察拍照。采用 Image J 软件统计划痕面积, 计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 不同时间点划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.9 流式细胞术检测各组不同细胞周期细胞百分率 取处于对数期的人结肠癌 SW620 细胞, 以 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔细胞培养板中, 按照“1.7”中的方法进行分组和给药处理, 继续培养 24 h。胰酶消化后, PBS 缓冲液冲洗 2 次, 再用 70% 预冷乙醇重悬细胞, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定 24 h, $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 添加 PI 染色液 $500 \mu\text{L}$ 吹打混匀, 在暗室内反应 30 min, 用 200 目筛网过滤, 在 488 nm 波长处采用流式细胞术检测, 采用 ModFit 5.0 软件分析不同细胞周期细胞百分率。

1.10 生化法检测各组细胞中 T-AOC 和 SOD 活性 细胞分组和给药处理按“1.7”步骤中的方法进行, 按试剂盒说明要求进行操作, 检测各组细胞中 T-AOC 和 SOD 活性 (单位分别为 $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.11 Western blotting 法检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、GSK3 β 、 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白表达水平 取处于对数期且状态良

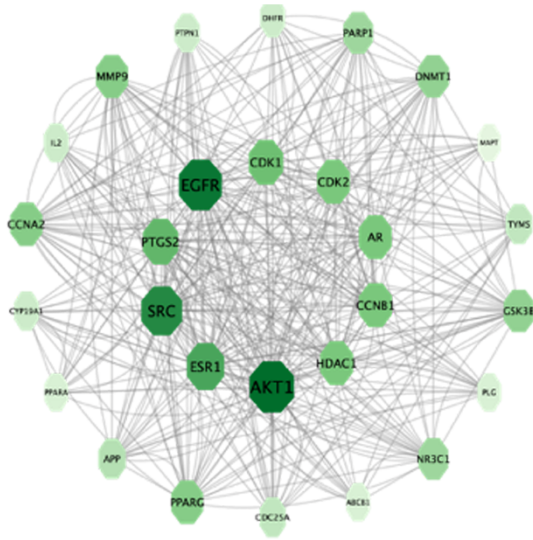


图3 PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagrams

结合、蛋白激酶结合、核受体活性和一氧化氮合酶调节活性等。见图4。

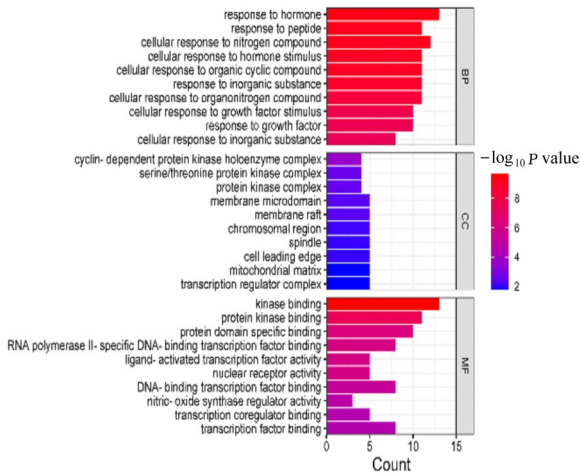


图4 靶点基因GO富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis on target genes

2.5 核心靶点KEGG信号通路富集分析 KEGG富集分析结果显示：蜂王浆抗结肠癌的潜在作用机制显著富集在细胞周期、前列腺癌、细胞衰老和p53信号通路等。因此选取显著性较高的细胞周期信号通路，而GSK3β/β-catenin与细胞周期进程有密切关联，由此验证相关蛋白水平的表达，见图5。结合核心靶点以及对KEGG信号通路的分析，最终选取活性成分10-HDA作用于人结肠癌SW620细胞进行后续实验。

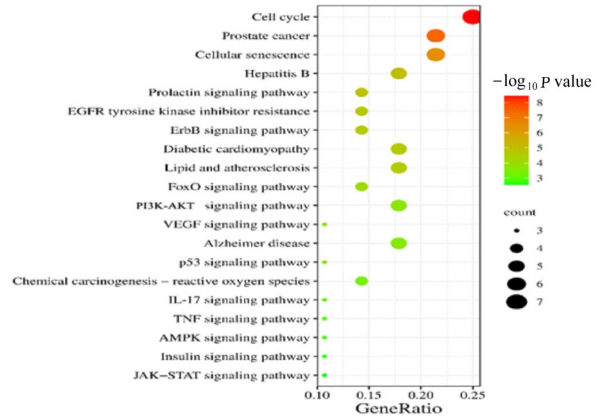


图5 KEGG信号通路富集分析

Fig. 5 KEGG signaling pathway enrichment analysis

2.6 各组细胞存活率 培养24 h后，与对照组比较，5、10、15和20 mmol·L⁻¹ 10-HDA组细胞存活率呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表1。

表1 各组细胞存活率

Tab. 1 Survival rates of cells in various groups

($n=7, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

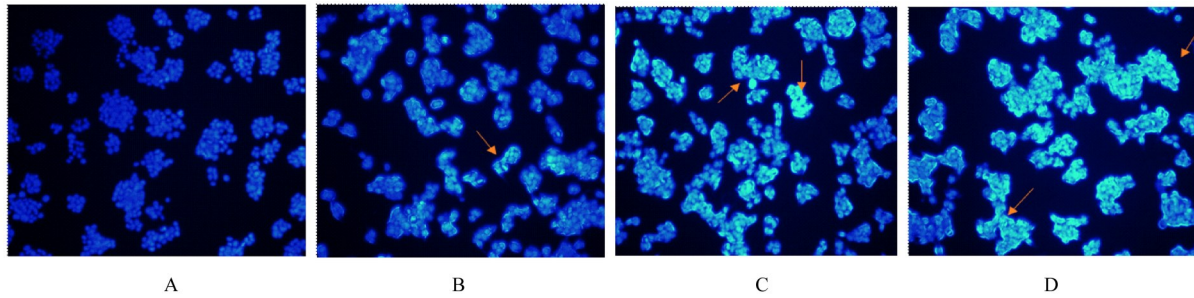
Group	Survival rate
Control	100.00 ± 1.00
10-HDA (mmol·L ⁻¹)	
1	97.33 ± 0.15
5	90.89 ± 0.02*
10	77.74 ± 0.01**
15	56.91 ± 0.01**
20	45.38 ± 0.01**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

2.7 各组细胞凋亡形态表现 Hoechst33342染色结果显示：与对照组比较，不同剂量10-HDA组细胞中细胞核呈现明亮的蓝色凋亡特征的凋亡细胞数明显增多；与低剂量10-HDA组比较，中和高剂量10-HDA组细胞中凋亡细胞数明显增多。见图6。

2.8 各组细胞划痕愈合率 与对照组比较，各时间点不同剂量10-HDA组细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，且随着10-HDA剂量升高，细胞划痕愈合率逐渐降低。见图7和表2。

2.9 各组不同细胞周期细胞百分率 与对照组比较，低剂量10-HDA组G₀/G₁期和S期细胞百分率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，中和高剂量



A: Control group; B: Low dose of 10-HDA group; C: Middle dose of 10-HDA group; D: High dose of 10-HDA group. Arrows indicated apoptotic cells.

图6 各组细胞凋亡形态表现(Hoechst33342, $\times 100$)

Fig. 6 Morphology of apoptosis of cells in various groups (Hoechst33342, $\times 100$)

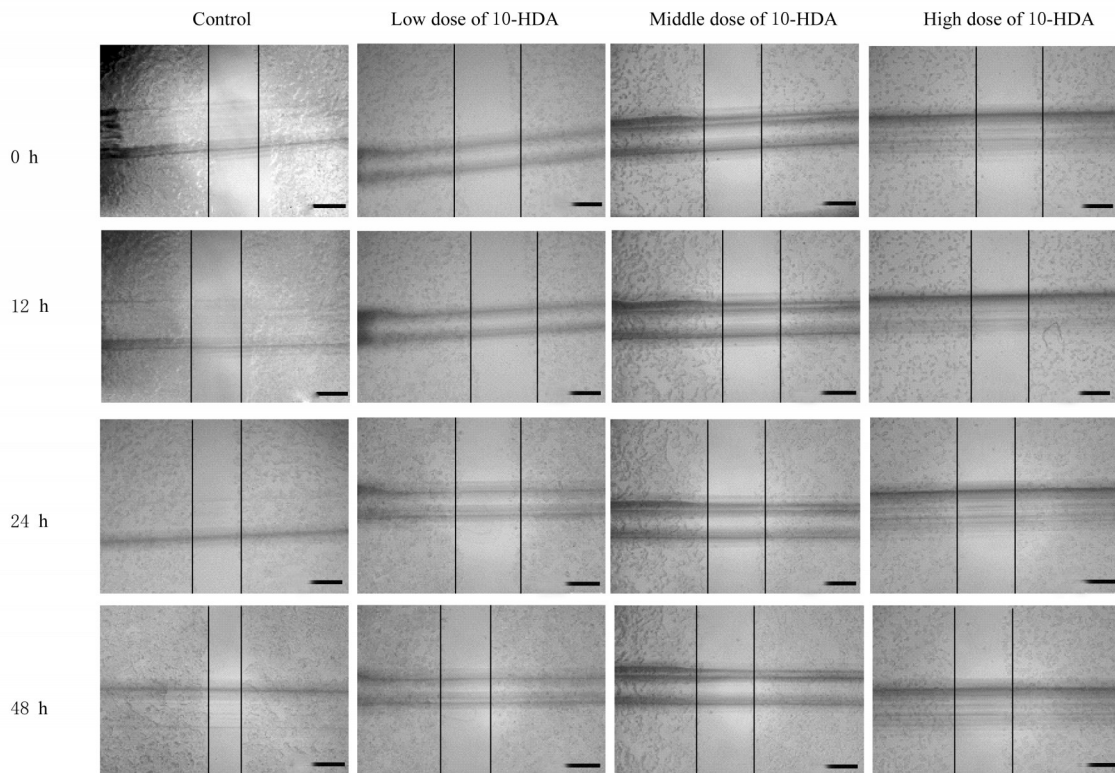


图7 细胞划痕实验检测各组细胞迁移情况(Bar=200 μm)

Fig. 7 Migration of cells in various groups detected by cell scratch test (Bar=200 μm)

10-HDA 组 G_0/G_1 期细胞百分率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), S 期细胞百分率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见表 3 和图 8。

2.10 各组细胞中 T-AOC 和 SOD 活性 与对照组比较, 不同剂量 10-HDA 组细胞中 T-AOC 和 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与低剂量 10-HDA 组比较, 中和高剂量 10-HDA 组 T-AOC 和 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.11 各组细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、GSK3 β 、 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白表达水平 与对照组比较, 低剂量 10-HDA 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), GSK3 β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 中和高剂量 10-HDA 组细胞中 Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 GSK3 β 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Bcl-2、 β -catenin 和 CyclinD1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。见图 9 和表 5。

表2 各组细胞划痕愈合率

Tab. 2 Scratch healing rates of cells in various groups
($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Scratch healing rate		
	(t/h) 12	24	48
Control	11.99±0.06	24.72±0.06	47.98±0.01
10-HDA			
Low dose	9.61±0.03*	13.71±0.04*	25.62±0.02**
Middle dose	4.43±0.04*	7.76±0.04*	8.87±0.04**
High dose	1.64±0.01*	2.81±0.01**	5.95±0.03**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

表4 各组细胞中 T-AOC 和 SOD 活性

Tab. 4 Activities of T-AOC and SOD in cells in various groups
($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	T-AOC	SOD
	$[m_B/(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})]$	$[\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})]$
Control	0.37±0.03	22.72±0.23
10-HDA		
Low dose	0.22±0.02**	15.02±6.03*
Middle dose	0.14±0.02** Δ	14.10±3.82** Δ
High dose	0.11±0.03** Δ	10.12±3.30** Δ

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with low dose of 10-HDA group.

表3 各组不同细胞周期细胞百分率

Tab. 3 Percentages of cells at different cell cycles in various groups
($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Percentage of cells		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	51.37±2.16	43.47±0.81	5.16±1.44
10-HDA			
Low dose	49.92±9.90	45.96±9.10	4.12±0.57
Middle dose	43.20±5.14*	53.92±1.74*	2.88±1.17
High dose	36.15±0.56**	58.60±0.98**	5.25±1.89

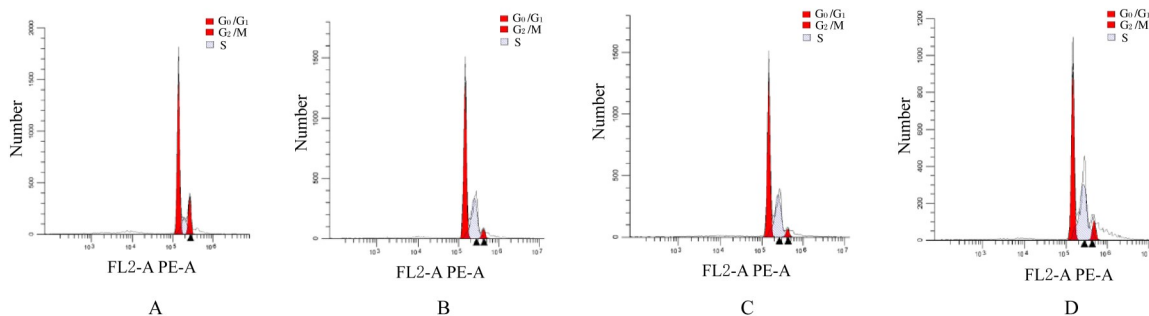
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

3 讨论

结肠癌是危害人类健康的第三大常见恶性肿瘤^[11]。2023年美国国家癌症统计数据^[12]显示：2022年美国约有15.2万例结肠癌新发病例和5.2万因结肠癌死亡病例。在发展中国家结肠癌发病率也逐年升高^[13]。结肠癌的治疗手段除手术治

疗外，还有化学疗法、免疫疗法和放射疗法等^[14-15]，因抗肿瘤药物毒性和耐药性的影响^[16-17]，开发新型抗结肠癌药物非常必要。蜂王浆具有滋补、益肝和健脾功效，10-HDA是蜂王浆的重要质量评价指标，其在蜂王浆中的含量不少于1.4%^[6]。随着对10-HDA研究的深入，其抗肿瘤作用已成为研究热点。因此，本研究通过网络药理学方法探讨10-HDA与结肠癌的内在联系，进而揭示10-HDA抗结肠癌的作用机制。

本研究通过TCMSP等数据库，共检索得到10-HDA、叶酸和花柄花黄素等6种蜂王浆有效活性成分；通过筛选核心靶点和KEGG信号通路富集分析得到核心特有成分10-HDA。本研究中，利用拓扑分析获得28个核心靶点，其中AKT1被认为是癌症发展过程中的主要参与者，参与细胞增殖和凋亡等生物过程^[18]；EGFR在某些癌症中高表达，参与癌症的发展，包括细胞增殖和转移^[19]，此外还有MMP9等靶点；表明10-HDA可能通过



A: Control group; B: Low dose of 10-HDA group; C: Middle dose of 10-HDA group; D: High dose of 10-HDA group.

图8 各组不同细胞周期细胞百分率

Fig. 8 Percentages of cells at different cell cycles in various groups

靶向以上靶点影响结肠癌发展进程。研究^[20]显示:肿瘤是一类细胞周期性疾病,细胞周期调控细胞生长全过程,在生命活动中起重要的作用,若细胞周期调控紊乱,细胞增殖异常,则诱发肿瘤。为了进一步研究10-HDA的生物功能以及在信号通路中的作用,对10-HDA的核心靶点进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析,结果显示:10-HDA的作用主要涉及细胞增殖和细胞生物合成等相关生物学过程,细胞周期信号通路与10-HDA作用于结肠癌关系最为密切。

本研究结果显示:与对照组比较,不同剂量10-HDA组细胞存活率明显降低,细胞增殖能力下降,诱导SW620细胞凋亡,且细胞划痕愈合率明显降低,表明10-HDA可抑制SW620细胞迁移能力,具有预防结肠癌转移扩散的作用。研究^[21-22]表明:在癌症发展过程中阻断细胞周期可抑制细胞增殖。本研究中流式细胞术检测结果显示:与对照组比较,不同剂量10-HDA组细胞中G₀/G₁期细胞百分率明显降低,S期细胞百分率明显升高,表明10-HDA具有抑制结肠癌细胞增殖的作用,使SW620细胞发生S期阻滞,进而诱导SW620细胞凋亡。

氧化应激在慢性疾病中发挥重要作用^[23]。研究^[24-26]显示:为了维持细胞稳态,线粒体中多种抗氧化酶参与调节氧化还原平衡。SOD是机体一种重要抗氧化酶,可清除自由基使细胞免遭攻击,对于肿瘤细胞可通过调节T-AOC和SOD活性来增加氧化应激。本研究结果显示:与对照组比较,不同剂量10-HDA组细胞抗氧化活性降低,提示10-HDA可以增强SW620细胞氧化应激,加速细胞凋亡,从而达到预防和治疗结肠癌的作用。

线粒体是参与机体能量代谢和细胞凋亡过程的细胞器,受到不良刺激可导致细胞死亡^[27-28]。研究^[29-30]显示:在内源性线粒体途径中Bcl-2蛋白家族中的Bcl-2和Bax对细胞凋亡起到重要调控作用,细胞色素C释放到胞质中可激活Caspase-9,进而使Caspase-3发生裂解导致细胞凋亡。本研究结果表明:10-HDA可下调Bcl-2蛋白表达水平及上调Bax、Caspase-3和Caspase-9蛋白表达水平,通过调控线粒体依赖性凋亡途径促进SW620细胞凋亡。

β -catenin在癌症发展过程中起重要作用,研究^[31-33]显示:GSK3 β / β -catenin信号通路参与细胞增殖过程,其作用机制与激活 β -catenin触发下游的

靶基因进而促进癌细胞的增殖、转移和侵袭有关。CyclinD1作为G₁/S期特异性周期蛋白,在肿瘤细胞中高度表达^[34]。为了明确10-HDA诱导细胞凋亡的机制,本研究进一步采用Western blotting法检测GSK3 β / β -catenin信号通路相关蛋白表达水平,结果显示:与对照组比较,10-HDA组细胞中GSK3 β 蛋白表达水平明显升高,同时 β -catenin和CyclinD1蛋白表达水平明显降低,提示10-HDA抑制SW620细胞增殖和促进其凋亡的作用可能与激活GSK3 β / β -catenin通路有关。

综上所述,本研究通过网络药理学方法联合体外实验深入研究了10-HDA抗结肠癌的潜在机制,结果表明:10-HDA可抑制SW620细胞增殖和迁移,将细胞增殖阻滞在S期,增强细胞氧化应激水平并加速细胞凋亡,其作用机制与激活GSK3 β / β -catenin信号通路有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘雅鑫参与数据搜集、整理和分析及论文撰写,刘健、白浩楠、安昱和房星宇参与实验前期可行性分析和资料收集,李祯和曹占鸿参与后期数据处理和论文校对,杨擎参与论文撰写指导,李辉参与论文审校和相关疾病临床方向的指导,李娜参与论文最终审校和论文修改。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] ZHANG X J, LIU Z Z, CHEN S P, et al. A new discovery: total Bupleurum saponin extracts can inhibit the proliferation and induce apoptosis of colon cancer cells by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114742.
- [3] 董梁,张敬,缪柯.川芎内酯抑制结肠癌细胞的生长和肿瘤干细胞样特性[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(12): 2742-2750.
- [4] 孙红霞,刘春旭,安学俊,等.北五味子多糖对人膀胱癌T24细胞增殖和凋亡的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(5): 1216-1222.
- [5] FAN P, SHA F F, MA C, et al. 10-hydroxydec-2-enoic acid reduces hydroxyl free radical-induced damage to vascular smooth muscle cells by rescuing protein and energy metabolism[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 873892.
- [6] ALBALAWI A E, ALTHOBAITI N A, ALRDAHE S S, et al. Anti-tumor effects of queen bee acid

- (10-hydroxy-2-decenoic acid) alone and in combination with cyclophosphamide and its cellular mechanisms against Ehrlich solid tumor in mice [J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 7021.
- [7] JOVANOVIĆ M M, ŠEKLIĆ D S, RAKOBRADOVIĆ J D, et al. Royal jelly and trans-10-hydroxy-2-decenoic acid inhibit migration and invasion of colorectal carcinoma cells[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2022, 60(2): 213-224.
- [8] YANG Y C, CHOU W M, WIDOWATI D A, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 202.
- [9] 刘晓冉, 朱娜, 李辉, 等. 王浆酸的药理作用研究进展[J]. *特产研究*, 2020, 42(4): 85-88.
- [10] 汪洛卉, 刘墨祎, 王鹤霖, 等. 基于锦灯笼对白血病作用机制的网络药理学和分子对接技术的生物信息学分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(1): 74-83.
- [11] HAO Y, CHEN Y, HE X, et al. Polymeric nanoparticles with ROS-responsive prodrug and platinum nanozyme for enhanced chemophotodynamic therapy of colon cancer[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(20): 2001853.
- [12] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [13] ZHOU J C, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Colorectal cancer burden and trends: comparison between China and major burden countries in the world[J]. *Chung Kuo Yen Cheng Yen Chiu*, 2021, 33(1): 1-10.
- [14] MORII Y, TSUBAKI M, TAKEDA T, et al. Perifosine enhances the potential antitumor effect of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells harboring the PIK3CA mutation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 898: 173957.
- [15] ZHANG C H, CHEN L, BAI Q, et al. Nonmetal graphdiyne nanozyme-based ferroptosis-apoptosis strategy for colon cancer therapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2022, 14(24): 27720-27732.
- [16] WANG J Y, CHANG H K, SU M, et al. The potential mechanisms of cinobufotalin treating colon adenocarcinoma by network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 934729.
- [17] ZHANG Y, CHEN H G, ZHAO C, et al. Research progress on anti-hepatocellular carcinoma mechanism of active ingredients of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(14): 3395-3406.
- [18] TSAI P J, LAI Y H, MANNE R K, et al. Akt: a key transducer in cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1): 76.
- [19] LI X, ZHAO L, CHEN C, et al. Can EGFR be a therapeutic target in breast cancer?[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(5): 188789.
- [20] 方翌, 郭旭鸿, 魏丽慧, 等. 八宝丹阻滞人结肠癌细胞周期抑制结肠癌细胞生长[J]. *福建中医药*, 2023, 54(1): 25-28.
- [21] MA L, LI X, ZHAO X P, et al. Oxaliplatin promotes siMAD2L2-induced apoptosis in colon cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 629.
- [22] CAI R, ZHOU Y P, LI Y H, et al. Baicalin blocks colon cancer cell cycle and inhibits cell proliferation through miR-139-3p upregulation by targeting CDK16[J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(1): 189-203.
- [23] 胡乃华. 石斛多糖通过改善肠道屏障功能、调节肠道微生物群、减少氧化应激和炎症反应改善右旋糖酐-硫酸钠诱导的小鼠结肠炎[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(1): 41.
- [24] 王继凤, 刘晓冉, 隋欣, 等. 基于cAMP/PKA/CREB信号通路独参汤对衰老模型大鼠认知功能障碍的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(4): 865-873.
- [25] SUN H N, XIE D P, REN C X, et al. Ethyl β -carboline-3-carboxylate increases cervical cancer cell apoptosis through ROS-p38 MAPK signaling pathway[J]. *In Vivo*, 2022, 36(3): 1178-1187.
- [26] 刘俊秀, 周佳, 律广富, 等. 参红补血颗粒对气滞血瘀型血管内皮功能障碍小鼠血管内皮的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(6): 1437-1447.
- [27] LIU T F, HAN Y W, ZHOU T, et al. Mechanisms of ROS-induced mitochondria-dependent apoptosis underlying liquid storage of goat spermatozoa [J]. *Aging*, 2019, 11(18): 7880-7898.
- [28] TAO S C, LI J Y, WANG H, et al. Anti-colon cancer effects of *Dendrobium officinale kimura & migo* revealed by network pharmacology integrated with molecular docking and metabolomics studies [J]. *Front Med*, 2022, 9: 879986.
- [29] 陈小忠, 王培, 谢明祥, 等. 下调SLP-2基因表达抑制脑胶质瘤细胞增殖及诱导凋亡的机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(1): 55-59.
- [30] LIU A H, ZUO Z F, LIU L L, et al. Down-regulation of NTSR3 inhibits cell growth and metastasis, as well as the PI3K-AKT and MAPK signaling pathways in colorectal cancer[J]. *Biochimie Biol Cell*, 2020, 98(5): 548-555.
- [31] ZHANG C H, LIU H, ZHAO W L, et al. G3BP1

- promotes human breast cancer cell proliferation through coordinating with GSK-3 β and stabilizing β -catenin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(11): 1900-1912.
- [32] LI K, ZHANG J W, TIAN Y H, et al. The Wnt/ β -catenin/VASP positive feedback loop drives cell proliferation and migration in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(11): 2258-2274.
- [33] SONG Q, HAN Z, WU X, et al. β -Arrestin1 promotes colorectal cancer metastasis through GSK-3 β / β -catenin signaling-mediated epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 650067.
- [34] ERES N, BELLMUNT J. Regulatory proteins of the cell cycle: alterations in the cyclin D1 pathway as a paradigm. Findings in breast cancer [J]. *Med Clin*, 1998, 111(15): 592-596.