基于网络药理学、转录组测序与实验验证探讨光甘草定抗食管癌细胞恶性表型及其作用机制

曹 勇[1,2], 唐 利[1,2], 宋雪琴[1,2], 李 燕[1,2], 黄 芳[1,2], 李明英[1,2], 丁志琴[3], 李若菲[3], 何雪妍[3], 王晓燕[1,2*]

(1. 西南医科大学附属医院医学实验中心, 四川 泸州 646000; 2. 分子肿瘤学泸州市重点实验室, 四川 泸州 646000; 3. 西南医科大学临床医学院, 四川 泸州 646000)

摘要: 本研究旨在探讨甘草提取物光甘草定抗食管癌恶性表型及分子机制。采用CCK-8、克隆形成、划痕实验及流式细胞术检测其对KYSE150和TE1食管癌细胞株的影响, 并结合转录组测序 (RNA-seq)、多平台药理学预测、蛋白相互作用 (PPI) 网络分析、免疫印迹 (WB) 验证、分子对接、细胞热迁移实验 (CETSA) 及数据库挖掘进行系统解析。结果显示, 光甘草定呈浓度依赖抑制食管癌细胞活力, KYSE150与TE1细胞48 h的IC_{50}分别为37.85和20.00 μmol·L^{-1}。5 μmol·L^{-1}光甘草定即可显著抑制克隆形成, 20 μmol·L^{-1}处理使细胞周期阻滞于G0/G1期 (比例分别达59.99%和56.68%), 24 h迁移率分别降至30%与25% ($P < 0.000\ 1$)。RNA-seq鉴定出2 104个差异表达基因, 主要富集于铁死亡、自噬及细胞周期通路等。网络药理学整合分析筛选出66个核心靶点, PPI网络拓扑分析锁定细胞周期蛋白A2 (CCNA2)、热休克蛋白90α (HSP90AA1)、周期素依赖性激酶2 (CDK2)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (MTOR) 等枢纽基因, 其中CCNA2与HSP90AA1在TCGA食管癌数据中协同肥胖显著影响患者预后。WB证实光甘草定可下调CCNA2、CDK2、周期素依赖性激酶1 (CDK1)、蜗牛家族转录抑制因子2 (SNAI2) 及磷酸化蛋白激酶B (p-AKT) 表达, 而HSP90AA1蛋白水平无明显变化。分子对接显示, 光甘草定通过氢键、π-烷基及π-阴离子相互作用稳定结合CCNA2活性口袋。CETSA证实光甘草定提高CCNA2热稳定性, 且蛋白酶体抑制剂MG132可阻断光甘草定诱导的CCNA2降解。DepMap与LinkedOmics数据库分析表明, CCNA2促进食管癌细胞增殖且与细胞周期进程相关。综上, 光甘草定抑制食管癌细胞增殖与迁移, 机制涉及细胞周期及上皮间质转化过程, CCNA2可为食管癌治疗的潜在靶点。

关键词: 食管癌; 光甘草定; 转录组学; 分子对接; 细胞周期蛋白A2

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)09-3413-11

Glabridin suppresses malignant phenotypes in esophageal cancer cells: Mechanisms revealed by network pharmacology, transcriptomics, and experimental validation

CAO Yong[1,2], TANG Li[1,2], SONG Xue-qin[1,2], LI Yan[1,2], HUANG Fang[1,2], LI Ming-ying[1,2], DING Zhi-qin[3], LI Ruo-fei[3], HE Xue-yan[3], WANG Xiao-yan[1,2*]

(*1. Experimental Medicine Center, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Luzhou Key Laboratory of Molecular Cancer, Luzhou 646000, China; 3. Department of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*)

Abstract: This study investigated the anti-malignant effects and molecular mechanisms of glabridin (GLA), a

收稿日期: 2026-01-14; 修回日期: 2026-03-20.
基金项目: 泸州市科技局科研项目 (2022-JYJ-157, 2024-SYF-153); 西南医科大学科研项目 (2023QN044, 2024ZKZ011, 2023401, 2023446).
*通讯作者 E-mail: wxyank@swmu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0059

licorice-derived flavonoid, in esophageal cancer. The effects of glabridin on the esophageal cancer cell lines KYSE150 and TE1 were evaluated using CCK-8 assays, colony formation assays, wound-healing assays, and flow cytometry. A systematic analysis was further conducted by integrating RNA sequencing, multi-platform pharmacological prediction, protein-protein interaction (PPI) network analysis, Western blot (WB) validation, molecular docking, cellular thermal shift assay (CETSA) and database mining. Glabridin concentration dependently suppressed cell viability, with 48-hour IC_{50} values of 37.85 and 20.00 μmol·L^{-1} in KYSE150 and TE1 cells, respectively. Notably, 5 μmol·L^{-1} inhibited colony formation, while 20 μmol·L^{-1} induced G0/G1 arrest (59.99% and 56.68% of cells) and reduced 24-hour migration rates to 30% and 25% (P < 0.000 1). Transcriptomics identified 2 104 differentially expressed genes enriched in ferroptosis, autophagy, and cell cycle pathways. Integrated analysis filtered 66 core targets. PPI network topology revealed cyclin A2 (CCNA2), heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), and mechanistic target of rapamycin kinase (MTOR) as hub genes, with CCNA2 and HSP90AA1 synergizing with obesity to affect prognosis in TCGA esophageal cancer cohorts. WB confirmed downregulation of CCNA2, CDK2, cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), snail family transcriptional repressor 2 (SNAI2), and phosphorylated protein kinase B (p-AKT), whereas HSP90AA1 protein levels remained unchanged. Molecular docking demonstrated stable binding of glabridin to the CCNA2 active pocket *via* hydrogen bonding, π-alkyl, and π-anion interactions. CETSA demonstrated that glabridin enhanced CCNA2 thermal stability, and the proteasome inhibitor MG132 blocked glabridin-induced CCNA2 degradation. DepMap and LinkedOmics Database analyses revealed that CCNA2 promotes esophageal cancer cell proliferation and is associated with cell cycle progression. Collectively, glabridin suppresses esophageal cancer cell proliferation and migration, potentially through modulation of the cell cycle and epithelial-mesenchymal transition (EMT) processes, and CCNA2 may represent a promising therapeutic target for esophageal cancer.

Key words: esophageal cancer; glabridin; transcriptomics; molecular docking; cyclin A2

食管癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 也是癌症相关死亡的第六大原因[1]。食管鳞状细胞癌和食管腺癌是食管癌的两种主要组织病理学亚型, 一半以上的食管癌病例发生在我国, 且以食管鳞癌为主, 食管癌已经构成我国公共卫生的重要挑战之一。顺铂、5-氟尿嘧啶、紫杉醇等一线化疗药物虽为指南推荐, 但毒副作用明显且耐药频发。因此, 发掘高效低毒的抗食管癌活性成分, 并阐明其分子机制, 对改善患者预后具有重要意义。

越来越多的中药提取物、中药单体成分和中药复方等被证实可通过抑制肿瘤细胞增殖转移、诱导细胞凋亡和逆转肿瘤耐药等发挥抗食管癌作用, 在临床治疗中具有良好的应用价值[2,3]。光甘草定 (glabridin, GLA) 是甘草中一种活性类黄酮成分, 具有抗氧化、抗菌、抗炎、调节免疫、保护心血管、抑制黑色素原等作用。据报道, 光甘草定在乳腺癌、肝癌、结直肠癌中具有显著的抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、诱导凋亡的作用[4-6]。然而, 光甘草定对食管癌细胞作用及其分子靶点网络尚不明确。基于此, 本研究整合细胞功能学、转录组学及网络药理学策略, 系统探索光甘草定抗食管癌活性: 通过CCK-8、克隆形成及划痕实验明确其对食管癌细胞增殖与迁移的抑制效应; 运用RNA-seq联合多平台药理学预测筛选核心靶点; 并结合分子对接与免疫印迹法验证关键靶点及下游通路, 旨在为光甘草定的临床转化提供实验依据和理论支撑。

材料与方法

药物和试剂 光草甘定 (纯度为99.85%) 和蛋白酶体抑制剂MG132 (纯度为99.90%) 购于美国MedChemExpress生物科技公司。胎牛血清、二甲基亚砜 (DMSO)、1640培养基、1%青霉素−链霉素购于美国Gibco公司; Cycletest Plus DNA细胞周期检测试剂盒 (货号: 340242) 购于美国BD公司; 主要抗体包括: 细胞周期蛋白A2 (cyclin A2, CCNA2) (货号: 18202-1-AP)、热休克蛋白90α (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1) (货号: 60318-1-Ig)、周期素依赖性激酶1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) (货号: 19532-1-AP)、周期素依赖性激酶2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) (货号: 10122-1-AP) 均购于武汉三鹰生物技术有限公司; 磷酸化蛋白激酶B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) (货号: 4060)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) (货号: 4691)、蜗牛家族转录抑制因子2 (snail family transcriptional repressor 2, SNAI2) (货号: 9585) 购自美国Cell Signaling Technology公司; β-肌动蛋白 (beta-

actin, β-actin) (货号: SC-47778) 购于圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、CCK-8 试剂盒 (货号: C0038)、ECL 显影液 (货号: P0018S) 和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (货号: P0010) 购自上海碧云天生物技术有限公司; Trizol 裂解液 (货号: R401-01)、逆转录试剂盒 (货号: R323-01)、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒 (货号: Q711-03)、总 RNA 提取试剂盒 (货号: RC112-01) 和 mRNA 文库制备试剂盒 (货号: NR611-01) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

主要仪器　CO_2 培养箱 (型号: 3111, 美国 Thermo 公司); 化学发光成像系统 (型号: FuSion Solo 7S, 法国 Vilber 公司); 多色流式细胞分析系统 (型号: FACS Verse, 美国 BD 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: QuantStudio 7 Flex, 美国 ABI 公司)。

细胞培养　人食管鳞状细胞癌 (KYSE150 和 TE1) 购于中国科学院上海细胞所。人食管鳞状细胞癌 (KYSE150 和 TE1) 细胞接种于完全培养基中, 置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养, 完全培养基由含 10% 胎牛血清、1% 青霉素–链霉素的 1640 培养基配制而成。

CCK-8 实验　取对数期细胞以每孔 3×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 培养贴壁后, 光甘草定 0、5、10、20、40、60 μmol·L^{-1} 浓度梯度组 (每组均设 8 个复孔) 分别处理 24 和 48 h。弃去原培养液, 每孔细胞均加含有 10% CCK-8 的培养液 100 μL, 置于 37 ℃培养箱孵育 1 h。用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度 (A) 值。细胞活性计算公式: 细胞活性 = ($A_{实验组} - A_{空白组}$) / ($A_{对照组} - A_{空白组}$) × 100%, 并分别计算光甘草定对细胞处理 24 和 48 h 的 IC_{50} 值。

克隆形成实验　取对数期细胞以每孔 3×10^2 个接种至 6 孔板, 待细胞贴壁后, 给含 0、5、10 μmol·L^{-1} 光甘草定完全培养基培养细胞。每隔 48 h 观察细胞并换液, 待形成肉眼可见的细胞克隆, 弃上清, PBS 缓冲液清洗细胞, 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 结晶紫染色 10 min, 蒸馏水洗涤细胞后拍照, 使用 Image J 软件统计数据, 计算各组克隆形成数。

流式细胞术检测细胞周期　取对数期细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养贴壁后进行药物处理。光甘草定 0、10、20 μmol·L^{-1} 浓度梯度组 (每组均设 3 个复孔) 分别处理 48 h, 收集各组细胞, 用预冷 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 然后用 1 mL 预冷 70% 乙醇 4 ℃过夜固定。PBS 洗涤 2 次, 在室温下用 50 μg·mL^{-1} 碘化丙啶 (PI) 染色细胞 15 min。通过 FACS Verse 流式细胞仪检测细胞内 PI 含量, 并用 modfit 软件分析不同时相细胞比例。

细胞迁移实验　划痕实验检测细胞迁移情况, 相应细胞接种至 96 孔培养板中, 待约 90% 汇合后, 用划痕器划痕, 用 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次去除漂浮细胞, 每孔加入 100 μL 含 0、10、20 μmol·L^{-1} 光甘草定的 1% FBS 的 1640 培养基, 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养, 后用显微镜观察拍照并记录结果。

转录组测序　细胞使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 采用文库制备试剂盒按照操作说明书进行文库制备, 并进行文库纯化及质控检测。合格文库在 Illumina NovaSeq 6000 平台进行双端 150 bp 测序。每个样本获得约 1.8×10^7～2×10^7 原始 reads。经 Trim Galore 去除接头序列及低质量 reads 后, 每个样本保留约 1.3×10^7～16×10^7 unique reads 用于下游分析。清洗前后的 reads 采用 FastQC (v0.12.1) 进行质量评估。通过质控的 clean reads 使用 HISAT2 (v2.2.1) 比对至人基因组 GRCh38, 并使用 samtools (v1.14) 将比对结果转换为 BAM 格式。基因层面的 reads 计数基于 featureCounts (v2.0.3) 并结合对应的基因组注释文件完成。差异表达分析采用 R 软件包 DESeq2。P 值使用 Benjamini-Hochberg 方法进行多重检验校正, fold change (FC) ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 的基因被定义为差异表达基因 (DEGs)。基因功能富集分析使用 clusterProfiler 包进行, 每组实验均设置 3 个生物学重复。

PCR 检测　细胞经 Trizol 裂解和总 RNA 提取后, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 试剂盒检测目标基因纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1)、酪氨酸蛋白激酶 KIT (tyrosine protein kinase kit, KIT)、HSP90AA1、哈维大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, HRAS)、CDK2、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin kinase, MTOR)、CCNA2 和丙糖磷酸异构酶 1 (triosephosphate isomerase 1, TPI1) 的 mRNA 表达水平。反应体系总量 20 μL, 反应程序包括 95 ℃预变性 3 min, 随后 40 个循环的 95 ℃变性 10 s 和 60 ℃退火延伸 30 s。β-Actin 作为内参基因, 基因表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。所有引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 引物序列如下 (5'-3'): FN1-F: CGGTGGCTGTCAGTCAAAG; FN1-R: AAACCTCGGCTTCCTCCATAA; KIT-F: CGTTCTGCTCCTACTGCTTCG; KIT-R: CCCACGCGGACTATTAAGTCT; HSP90AA1-F: AGGAGGTTGAGACGTTCGC; HSP90AA1-R: AGAGTTCGATCTTGTTTGTTCGG; HRAS-F: ATGACGGAATATAAGCTGGTGGT; HRAS-R: GGCACGTCTCCCCATCAATG; CDK2-F: CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA; CDK2-R: TTCATCCAGGGGAGGTACAAC; MTOR-F: ATGCTTGGAACCGGACCTG; MTOR-

R: TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT; CCNA2-F: CGCTGGCGGTACTGAAGTC; CCNA2-R: GAGGAACGGTGACATGCTCAT; TPI1-F: CTCATCGGCACTCTGAACG; TPI1-R: GCGAAGTCGATATAGGCAGTAGG; β-actin-F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC; β-actin-R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT。

免疫印迹实验 (Western blot, WB) 用RIPA裂解细胞, 提取总蛋白, 用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。用SDS-PAGE电泳将蛋白质分离并转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 一抗4 ℃孵育过夜, 用TBST洗涤3次, 与二抗室温孵育1 h, 再用TBST洗涤3次, 将膜蛋白与化学发光试剂充分接触后, 用FuSion-Solo 7S成像系统成像及软件进行分析。在蛋白酶体实验中, 细胞先用20 μmol·L^{-1}光甘草定处理24 h, 于处理18 h时加入3 μmol·L^{-1}蛋白酶体抑制剂MG132, 并持续孵育6 h后, 提取蛋白进行WB分析。

细胞热迁移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA) 将细胞裂解液均分为两管, 随后在室温下用20 μmol·L^{-1}光甘草定或DMSO处理1 h。之后将样品分装至PCR管中, 每管100 μL。这些PCR管被加热至特定温度 (37、42、47、52和57 ℃) 并维持3 min。加热后立即置于冰上冷却。随后对样品进行离心, 以分离沉淀的蛋白质和可溶性组分。取各样品等体积的上清液进行WB分析[7,8]。

靶点预测和蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 多个中药数据库收集光甘草定作用靶点, 截止时间为2025年10月20日, 在TCMSP数据库 (https://old.tcmsp-e.com//tcmsp.php)、HERB数据库 (http://herb.ac.cn/)、TCMIO数据库 (http://tcmio.xielab.net) 输入“glabridin”收集靶点, 在Pharmmapper数据库 (http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/) 中上传光甘草定的MOL2格式文件, 选择“human protein targets only (v2010, 2241)”预测作用靶点, 在BATMAN.TCM (http://bionet.ncpsb.org.cn/batmantcm/index.php/Home/Index) 中输入光甘草定的“PubChem_ CID/InChI”进行预测, 收集“score cutoff ⩾ 20”的预测靶点, 在Swiss Target Prediction数据库 (http://www.swisstargetprediction.ch/predict.php) 输入光甘草定的“SMILES”预测作用靶点, 综合所有作用靶点并利用UniProt蛋白质数据库 (https:// www.uniprot.org) 规范化处理。PPI网络构建: 将靶点导入STRING数据库 (https://cn.string-db.org/) 获取作用靶点的相互关系。选择物种为“Homo sapiens”, 作用阈值设定为“medium confidence” > 0.4, 默认其余设置, 产生PPI网络, 并导入Cytoscape_v3.9.1进行可视化处理并筛选核心靶点。

分子对接 从Pubchem数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) 中下载光甘草定SDF格式文件。从PDB数据库 (https://www.rcsb.org) 下载靶标蛋白CCNA2的PDB格式文件。使用AutoDock Tools软件处理光甘草定和CCNA2, 并转换为PDBQT格式。利用AutoDock Vina 1.5.6软件进行分子对接, 评估光甘草定与CCNA2之间的结合潜力, 利用PyMOL软件可视化光甘草定与CCNA2的相互作用关系, 并推导出其二维结构图。

数据库分析 UALCAN数据库 (https://ualcan.path.uab.edu/) 进行临床相关性分析, DepMap数据库 (https://depmap.org/portal/) 进行肿瘤细胞基因敲除和敲低功能分析, Linked Omics数据库 (https://www.linkedomics.org/) 进行相关基因及功能富集分析。

统计学方法 使用GraphPad Prism进行统计分析和绘图, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布的计量资料组间差异采用单因素方差分析, 不符合的则采用非参数检验, $P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

结果

1 光甘草定对食管癌细胞活力和克隆能力的影响

采用0、5、10、20、40、60 μmol·L^{-1}光甘草定处理食管癌细胞 (KYSE150和TE1), CCK-8法检测结果显示, 随着光甘草定浓度升高, 两株细胞的增殖活力均呈浓度依赖性下降 (图1A、B)。光甘草定作用于KYSE150和TE1细胞24 h的IC_{50}分别为46.64和28.82 μmol·L^{-1}, 48 h的IC_{50}分别为37.85和20.00 μmol·L^{-1}。为此选择10和20 μmol·L^{-1}为后续实验干预浓度。为评估光甘草定在较低浓度下长期作用对细胞增殖潜能的抑制效果, 采用5和10 μmol·L^{-1}光甘草定进行平板克隆实验。结果显示, 5 μmol·L^{-1}光甘草定可显著抑制两株细胞的集落形成能力 (图1C、D)。

2 光甘草定对食管癌细胞周期的影响

流式细胞术结果显示, 光甘草定可诱导KYSE150和TE1细胞发生G0/G1期阻滞。与对照组相比, KYSE150细胞G0/G1期比例从50.74%升至56.54% (10 μmol·L^{-1}) 和59.99% (20 μmol·L^{-1}); TE1细胞从41.88%升至48.33% (10 μmol·L^{-1}) 和56.68% (20 μmol·L^{-1}) (图2A、B)。

3 光甘草定对食管癌细胞迁移的影响

为评估光甘草定的抗迁移效应, 采用划痕实验检测不同药物浓度对食管癌细胞系KYSE150和TE1迁移能力的影响。结果显示, 光甘草定能显著抑制细胞

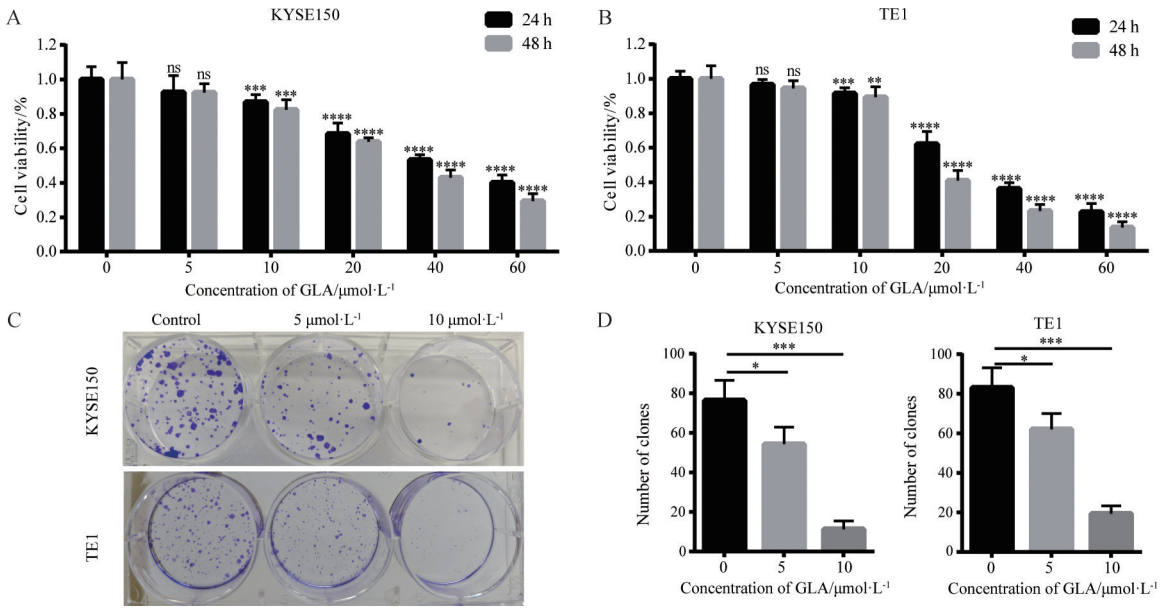


Figure 1　GLA inhibits proliferation and colony formation in esophageal cancer cells. A, B: Inhibitory effects of GLA on cell proliferation (CCK-8 assay) in KYSE150 (A) and TE1 (B) (n = 8); C, D: Suppression of colony formation by GLA in KYSE150 and TE1 (n = 3). $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control; ns: Not significant; GLA: Glabridin

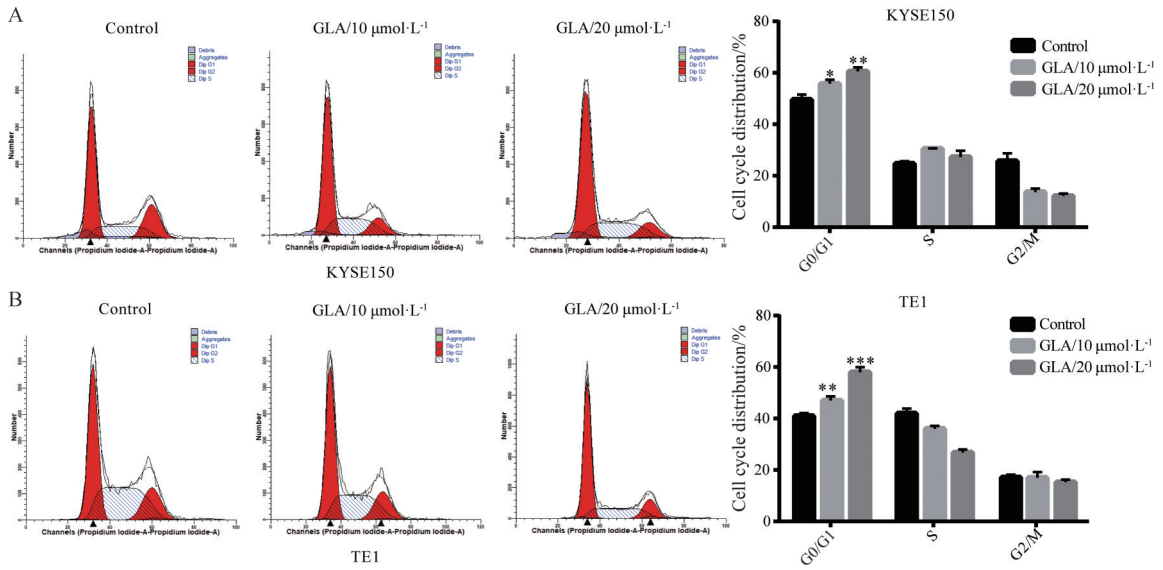


Figure 2　GLA induce G0/G1 cell arrest in esophageal cancer cells. Flow cytometry was used to detect the effect of GLA on the cell cycle of KYSE150 (A) and TE1 (B). n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control

迁移: 处理 24 h 后, 10 和 20 μmol·L^{-1} 组 KYSE150 细胞迁移率分别降至约 40% 和 30% ($P < 0.001$, $P < 0.000\ 1$), TE1 细胞相应降至约 50% 和 25% ($P < 0.001$, $P < 0.000\ 1$) (图 3A、B)。

4　光甘草定处理食管癌细胞前后的转录组学分析

为了探讨光甘草定抑制食管癌细胞恶性表型的潜在机制, 采用 RNA-seq 技术分析 KYSE150 细胞经光甘草定 (20 μmol·L^{-1}) 和对照组 (DMSO) 处理 48 h 后的转录组差异。经 FC ≥ 1.5 且 $P < 0.05$, 共鉴定 2 104 个差异基因, 包括 977 个上调和 1 127 个下调基因 (图 4A)。GO/KEGG 富集分析显示, 上调基因参与了高尔基囊泡运输、对拓扑不正确蛋白质的反应、铁死亡、自噬等。而下调基因参与了 DNA 复制、伤口愈合、细胞与细胞连接、细胞周期等 (图 4B、C)。

5　光甘草定影响食管癌细胞生物学功能核心靶点筛选

为系统鉴定光甘草定调控食管癌细胞功能的分子靶点, 本研究整合 HERB、TCMIO、TCMSP、PharmMapper、BATMAN 及 SwissTargetPrediction 六大

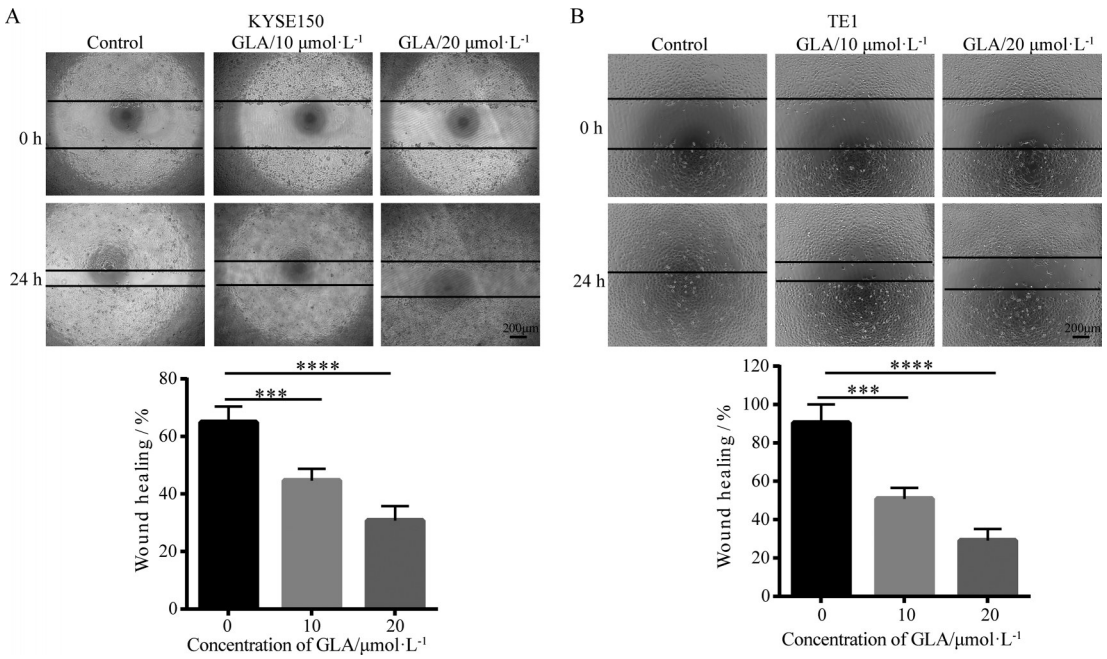


Figure 3 GLA inhibits migration in esophageal cancer cells. Suppression of wound healing by GLA in KYSE150 (A) and TE1 (B). Magnification = 4×, scale bar = 200 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control

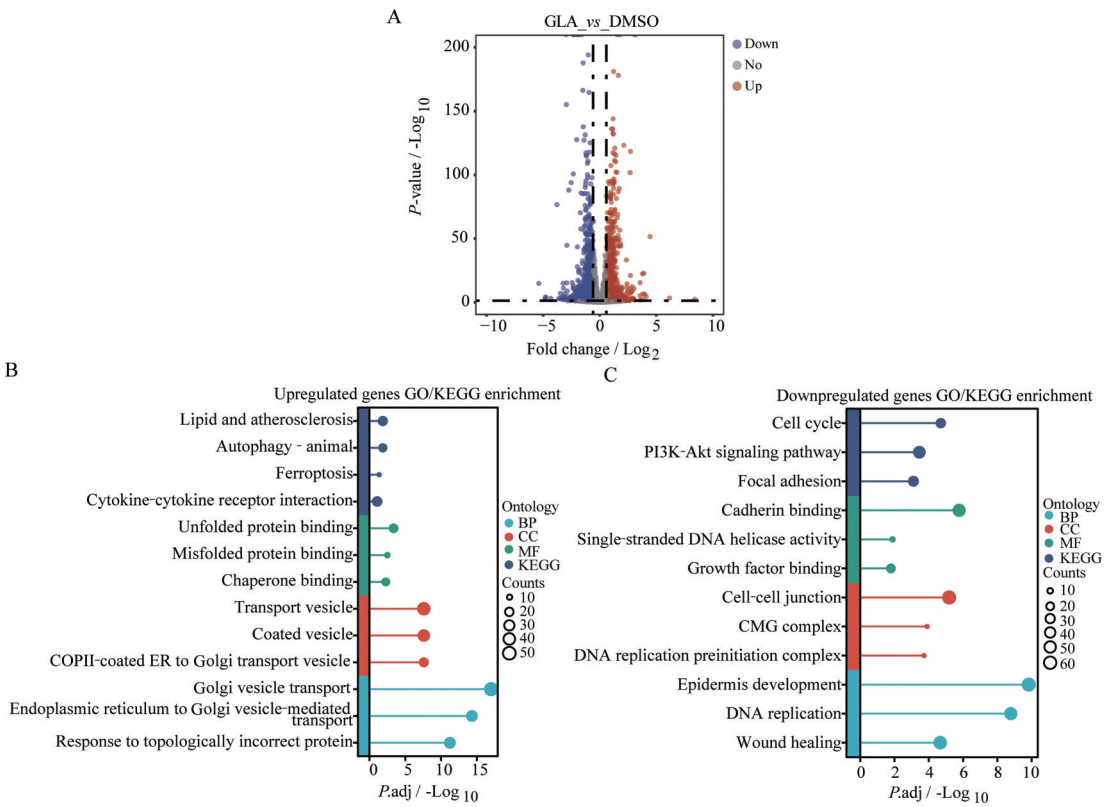


Figure 4 Transcriptomic profiling of esophageal cancer cells treated with GLA. A: Volcano plot of altered expressed genes after GLA; B: GO/KEGG enrichment analysis of upregulated genes; C: GO/KEGG enrichment analysis of downregulated genes

数据库的预测结果, 经去重后获得 426 个候选靶点。进而与 RNA-seq 差异表达基因集取交集, 筛选出 66 个重叠基因作为光甘草定抗食管癌的核心潜在靶点。功能富集分析显示, 这些靶点显著富集于蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、叶酸一碳单位代谢及 PI3K-AKT 信号通路等关键生物学过程 (图 5A)。通过 STRING 数据库构建蛋白互作网络并结合 Cytoscape 拓扑分析, 鉴定出 *FN1*、*KIT*、*HSP90AA1*、*HRAS*、*CDK2*、*MTOR*、*CCNA2*

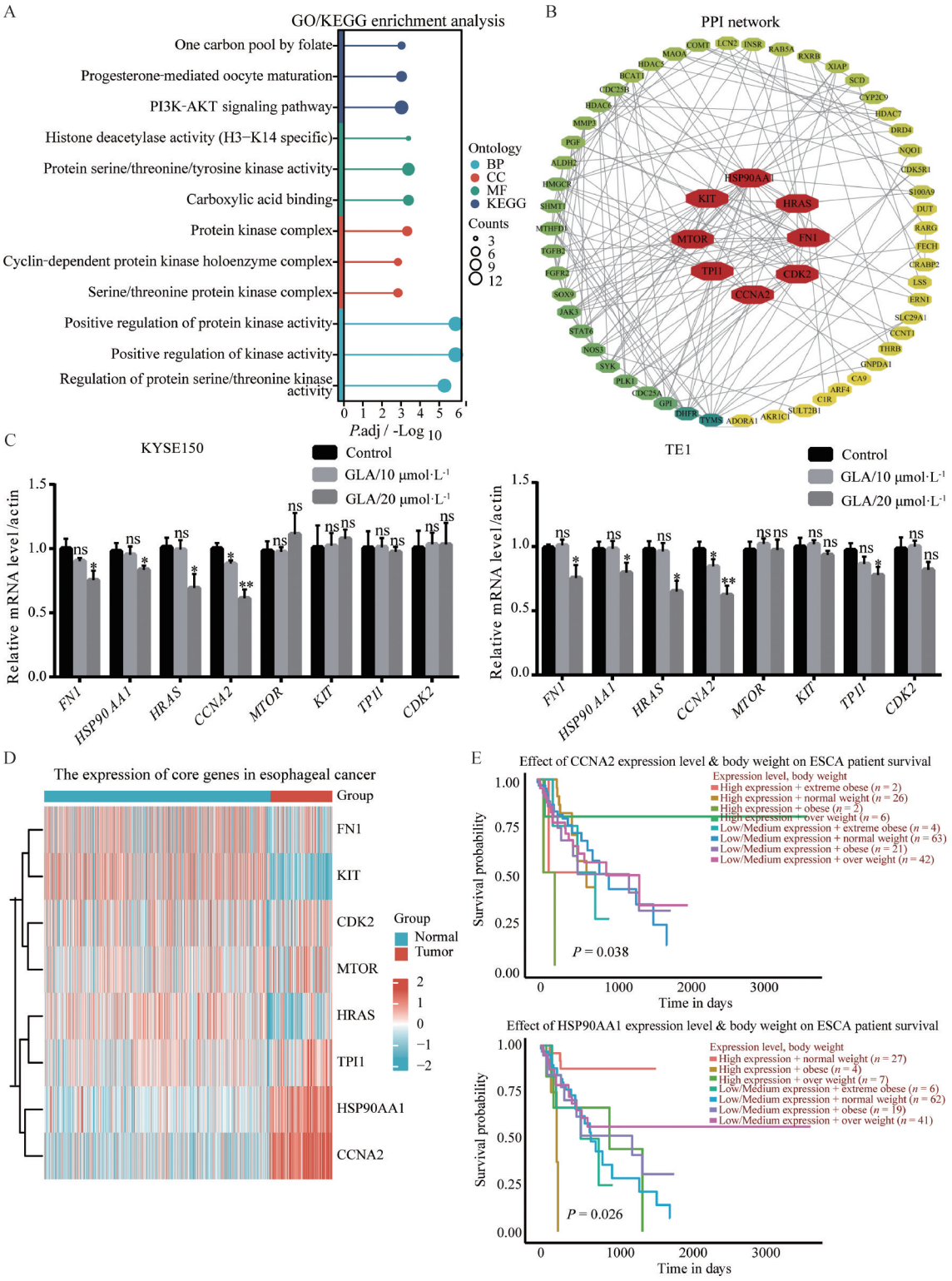


Figure 5　Screening of core targets for the regulation of GLA in esophageal cancer. A: GO/KEGG enrichment analysis of co-regulated genes; B: PPI network of co-regulated genes; C: The mRNA expression levels of eight hub genes (*FN1*, *KIT*, *HSP90AA1*, *HRAS*, *CDK2*, *MTOR*, *CCNA2*, and *TPI1*) were detected in KYSE150 and TE1 treated with GLA. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* control; D: The heatmap of the expression pattern of the core genes in esophageal cancer tissues, based on data retrieved from TCGA; E: Survival analysis of CCNA2 and HSP90AA1 in esophageal cancer using the UALCAN database. PPI: Protein-protein interaction; FN1: Fibronectin 1; HSP90AA1: Heat shock protein 90 alpha family class A member 1; HRAS: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog; CCNA2: Cyclin A2; MTOR: Mechanistic target of rapamycin kinase; KIT: Tyrosine protein kinase kit; TPI1: Triosephosphate isomerase 1; CDK2: Cyclin-dependent kinase 2

和 *TPI1* 为其中的枢纽基因 (图 5B)。RT-PCR 验证表明, 光甘草定处理可显著下调 KYSE150 和 TE1 细胞中 *FN1*、*HSP90AA1*、*HRAS* 及 *CCNA2* 的 mRNA 表达水平, 而对 *MTOR*、*KIT*、*TPI1* 和 *CDK2* 表达无明显影响 (图 5C)。临床相关性分析显示, CCNA2 和 HSP90AA1 在 TCGA 食管癌队列中显著高表达, 且二者与肥胖状态协同影响患者预后, 高表达合并肥胖可明显缩短生存期 (图 5D、E)。上述结果提示, 光甘草定可能通过调控 CCNA2、HSP90AA1 等关键分子发挥抗食管癌作用。

6 WB 和分子对接验证光甘草定调控潜在靶点和信号通路

为验证光甘草定对核心靶点及下游通路的调控作用, 采用不同浓度处理食管癌细胞 KYSE150 和 TE1。鉴于 CCNA2 与 CDK2、CDK1 存在明确的协同功能关系, 且 SNAI2 作为上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 关键转录因子, 受 PI3K/AKT/mTOR 通路调控, SNAI2 和 AKT 可解释观察到的迁移抑制现象, 为此本研究选择 HSP90AA1、CCNA2、CDK2、CDK1、SNAI2 及 AKT 进行 WB 验证。结果显示, 光甘草定可显著下调 CCNA2、CDK2、CDK1、SNAI2 及总 AKT 蛋白表达, 并抑制 AKT 磷酸化水平, 而 HSP90AA1 表达未见明显变化 (图 6A、B)。鉴于 CCNA2 在光甘草定处理后显著下调及其在食管癌中的临床重要性, 进一步通过分子对接分析光甘草定与 CCNA2 的结合模式。结果显示, 光甘草定可稳定嵌入 CCNA2 活性口袋, 其中 ILE-10 与其形成氢键, VAL-18、LEU-134、ALA-144 产生 π-烷基疏水作用, ASP-86 介导 π-阴离子相互作用, PHE-80 参与 π-sigma 相互作用 (图 6C)。CETSA 也表明, 20 μmol·L^{-1} 光甘草定处理可显著提高 CCNA2 的热稳定性 (图 6D)。此外, 蛋白酶体抑制剂 MG132 可阻断光甘草定诱导的 CCNA2 蛋白降解 (图 6E), 提示光甘草定可能通过蛋白酶体途径促进 CCNA2 降解。

7 CCNA2 能促进食管癌细胞增殖

为探究 CCNA2 的生物学功能, 本研究借助了 DepMap 数据库。该资源提供了超过一千种肿瘤细胞系中基因表达水平和基因效应评分 (gene effect score, GES)。GES 是基于高通量 RNAi 和 CRISPR 真实的基因敲除或敲低实验, 观察细胞增殖或存活的变化。结果显示, CCNA2 在 85% 的肿瘤细胞系中呈高表达, 敲低/敲除 CCNA2 可显著抑制 90% 以上癌细胞系的增殖。在食管癌细胞系中, CCNA2 的 GES 均低于−0.5, 其中 TE1 和 KYSE150 基因效应评分分别是−1.844 1 及−1.205 9, 提示 CCNA2 具有强效且广泛的促食管癌增殖作用 (图 7A、B)。LinkedOmics 数据库分析食管癌 CCNA2 相关基因显示, CCNA2 与 *PLK1*、*NCAPH*、*CCNB1*、*CDK1* 等周期相关基因呈正相关, 而与 *TTLL3*、*ITGA10*、*SPN52* 等基因负相关。功能富集显示主要参与细胞周期检查点、DNA 复制及胞质分裂等关键生物学过程 (图 7C、D)。综上, CCNA2 可通过调控细胞周期等生物学过程促进食管癌的增殖。

讨论

异常增殖与侵袭迁移是恶性肿瘤的核心特征, 抑制这些表型是改善患者预后的重要策略。本研究证实光甘草定能显著抑制食管癌细胞 KYSE150 和 TE1 的增殖与迁移能力, 该结果与光甘草定在肺癌、膀胱癌等肿瘤模型中的报道一致[9,10]。研究表明, 光甘草定可通过抑制紫杉醇代谢、提升瘤内药物浓度并下调环氧二十碳三烯酸水平来增强化疗敏感性[11]。同时, 它能协同他莫昔芬或紫杉醇分别增强对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及前列腺癌 DU145 细胞的抗增殖与促凋亡作用, 且在乳腺癌异种移植模型中证实无明显肝肾毒性[12]。提示光甘草定不仅具有直接的抗肿瘤活性, 还可作为化疗增敏剂, 展现出良好的临床应用潜力。

为阐明光甘草定抑制食管癌恶性表型的分子基础, 本研究构建了“转录组−靶点网络−临床验证”的分析框架。RNA-seq 显示 2 104 个差异基因中, 下调通路集中于 DNA 复制与细胞连接 (对应抗增殖/迁移表型), 而上调通路涉及铁死亡、自噬及囊泡运输, 提示其多途径协同的抗肿瘤机制, 并为铁死亡、自噬参与食管癌发生发展提供药物模型。通过整合六大药理学平台预测与实验数据, 筛选出 66 个高置信度靶点, 蛋白互作网络分析进一步锁定 FN1、KIT、HSP90AA1、HRAS、CDK2、MTOR、CCNA2、TPI1 八个枢纽基因, 这些分子在周期调控、信号转导与黏附功能中发挥核心节点作用[13-15]。尤为重要的是, 临床数据分析发现 CCNA2 与 HSP90AA1 在食管癌中显著高表达, 且与肥胖协同缩短生存期, 显示了该药物在肥胖相关食管癌亚群中的潜在治疗价值。

CCNA2 作为 G0/G1 期转换的核心驱动因子, 是调控细胞周期进程的关键节点[16]。基因功能网络分析显示 CCNA2 在食管癌细胞高表达, 且基因效应评分均低于−0.5, 提示 CCNA2 具有强效且广泛的促食管癌增殖作用。进一步揭示其与 PLK1、NCAPH、CCNB1、CDK1 等周期核心分子显著相关[17-20], 协同调控细胞周期检查点、DNA 复制及胞质分裂等恶性进程。WB 和分子对接结合, 光甘草定可浓度依赖性下调 CCNA2 蛋白表达, 并通过氢键、π-烷基及 π-阴离子作用嵌入 CCNA2 活性口袋, CETSA 也显示光甘草定能增强

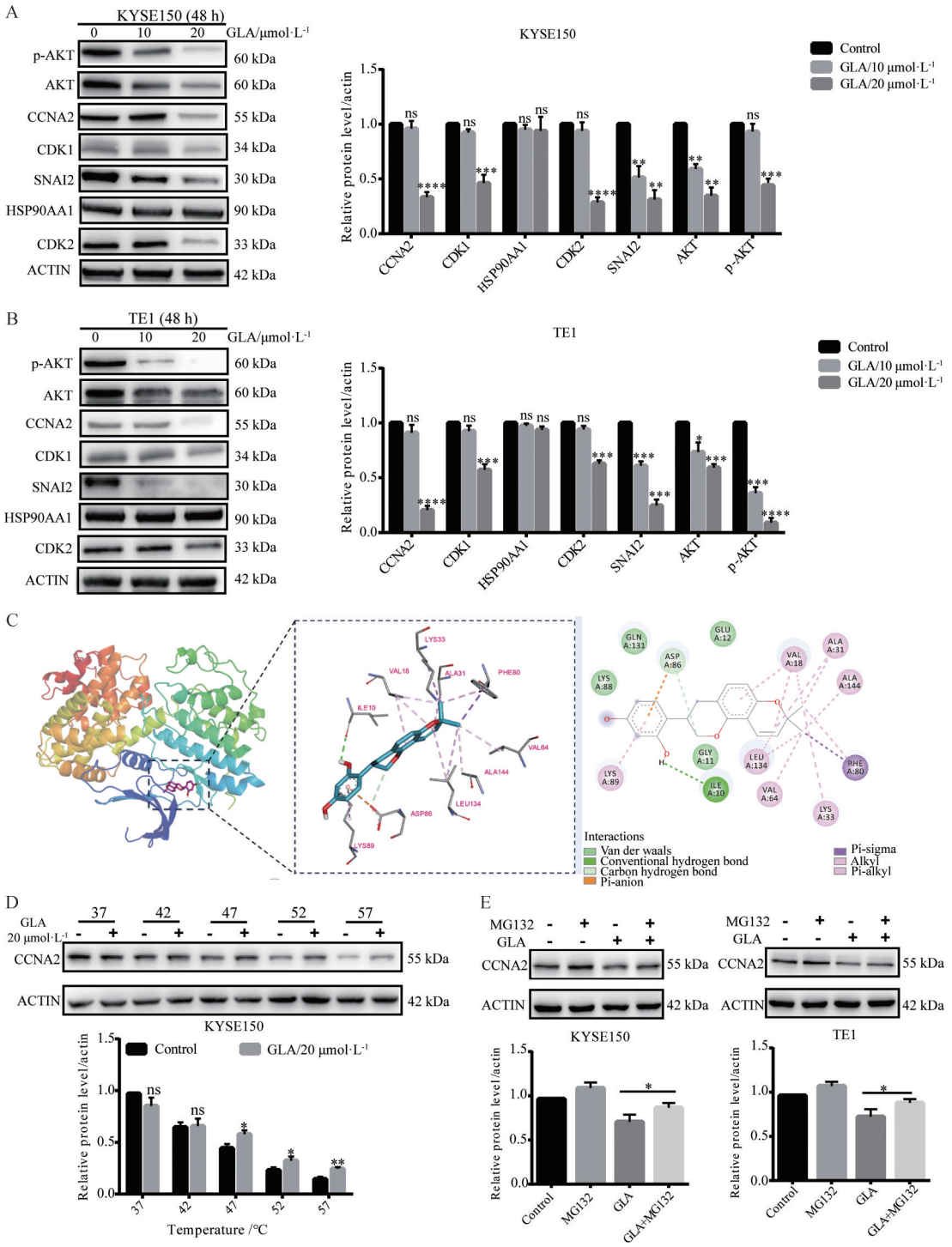


Figure 6　Regulation of potential targets and pathway by GLA in esophageal cancer cells. A, B: Western blot analysis of p-AKT, AKT, CCNA2, CDK1, SNAI2, HSP90AA1 and CDK2 in KYSE150 (A) and TE1 (B), with β-actin as a loading control (n = 3); C: Molecular docking models of GLA with CCNA2; D: CETSA performed on KYSE150 cell lysates treated with DMSO or GLA, with increasing melting temperature (37−57 ℃, interval temperature: 5 ℃) (n = 3). $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control; E: Effect of MG132 on GLA-induced CCNA2 protein degradation in KYSE150 and TE1, with β-actin as a loading control. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$

CCNA2 蛋白的热稳定性，并结合蛋白酶体抑制剂 MG132 可阻断光甘草定诱导的 CCNA2 蛋白降解，为其参与调控提供了较强证据。同时，CDK2、CDK1 的同步下调不仅强化了 G0/G1 阻滞效应，更可能通过干扰 CCNA2-CDK 复合物形成阻断周期进程，提示光甘草定影响 CCNA2-细胞周期轴，可能是抑制食管癌恶性表型潜在机制，而 CCNA2 可成为光甘草定发挥抑制食管癌恶性表型的潜在靶点。

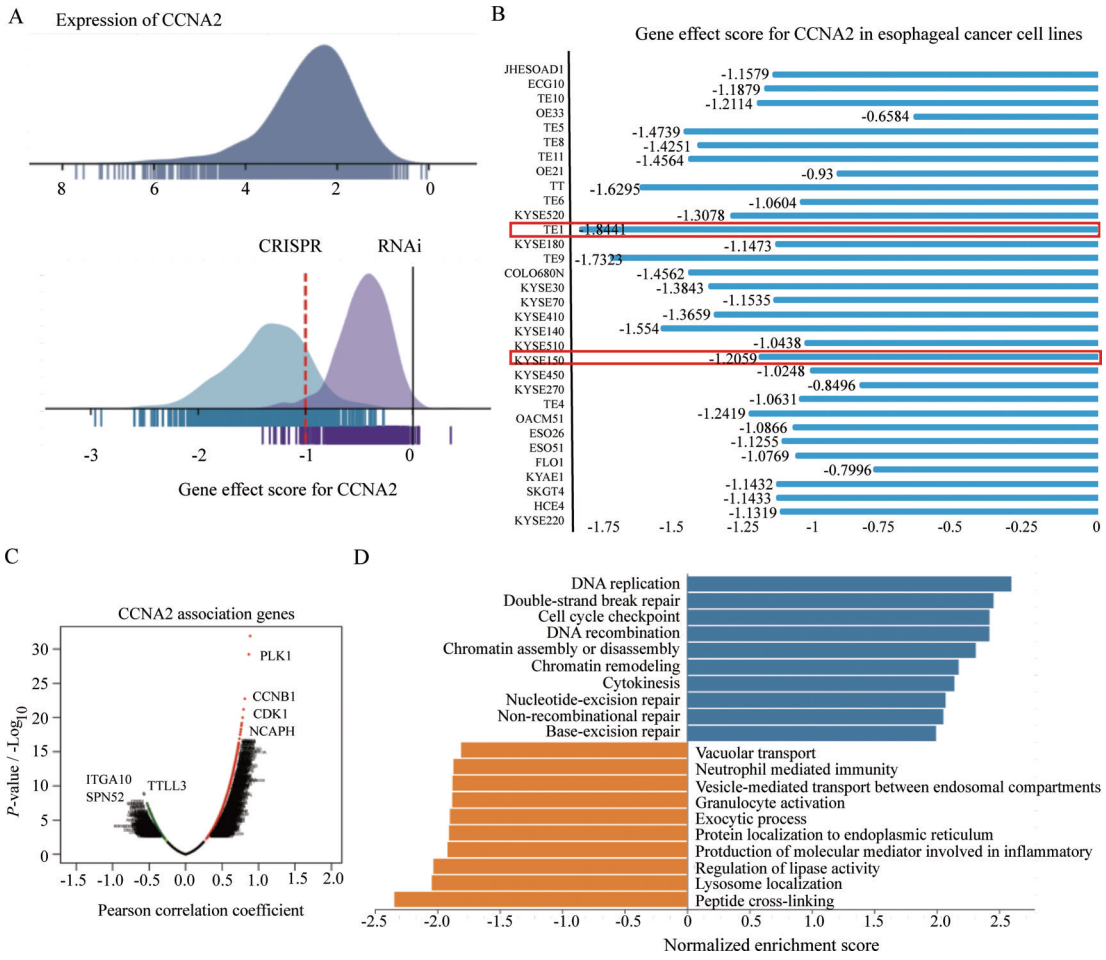


Figure 7 CCNA2 promotes the proliferation of esophageal cancer cells and is related to the cell cycle. A: DepMap analysis of the expression and the gene effect score (GES) of CCNA2 in cancer cell line encyclopedia collected cancer cell lines; B: Depmap analysis of GES of CCNA2 in esophageal cancer cell lines; C: Analysis of CCNA2-related genes in esophageal cancer using the LinkedOmics database; D: Functional enrichment analysis of CCNA2-related genes

PI3K/AKT/mTOR通路是调控细胞增殖、存活、代谢及EMT进程的核心信号轴, 其异常激活与多种肿瘤的发生发展及耐药密切相关[21,22]。既往研究提示, 光甘草定可通过调控AKT/NF-κB和AKT/GSK-3β通路减轻氧化应激诱导的骨丢失[23], 或通过PI3K/AKT/FOXO3A轴缓解IL-1β介导的细胞外基质降解[24]。本研究行光甘草定在食管癌中调控核心靶点GO/KEGG分析, 发现PI3K-AKT通路显著富集。WB结果显示, 光甘草定能显著下调AKT总蛋白及p-AKT活性水平, 同步下调SNAI2表达 (与EMT相关的关键转录因子)[25], SNAI2下调可直接削弱食管癌细胞迁移侵袭能力, 与划痕实验表型高度吻合。也与He等[9]在肺癌模型中报道的光甘草定通过下调N-钙黏蛋白、波形蛋白并上调E-钙黏蛋白抑制EMT的结论一致。Jamwal等[11]也进一步证实光甘草定上调E-钙黏蛋白与闭合蛋白及下调波形蛋白与锌指E盒结合同源蛋白1, 抑制恶性癌细胞的EMT特征。提示光甘草定抑制PI3K/AKT通路并下调EMT关键转录因子SNAI2可能是抑制食管癌细胞迁移的潜在机制。

综上所述, 本研究通过多组学整合与实验验证, 光甘草定抑制食管癌细胞增殖与迁移, 机制涉及细胞周期及EMT过程, CCNA2可为食管癌治疗的潜在靶点。然而, 研究仍存在一定局限性: 首先, 现有证据尚未完全确立CCNA2为光甘草定的直接结合靶点, 未来需借助表面等离子共振、微量热泳动等实验技术确证; 其次, 体内动物模型实验缺乏, 限制了对其疗效与安全性的全面评估; 最后, 肥胖状态与CCNA2协同作用的机制需进一步通过代谢组分析与免疫微环境研究予以解析。后续工作将聚焦于以上方向, 以推动光甘草定的临床转化应用。

作者贡献: 曹勇负责实验设计、数据分析和文章撰写; 宋雪琴和李明英参与实验操作、数据整理及图表绘制; 李燕和黄芳分析转录组学测序数据; 唐利完成分子对接和网络药理学分析; 丁志琴、李若菲和何雪妍参与整体实验; 王晓燕负责

研究的整体指导、文章审阅及修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

[1] Wei H, Zhao D, Zhi Y, et al. RTN4IP1 contributes to ESCC *via* regulation of amino acid transporters [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e2406220.

[2] Liu W, Zhang J, Wu M, et al. Ponicidin triggered ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing the SLC7A11/glutathione/GPX4 signalling axis [J]. Phytomedicine, 2025, 143: 156925.

[3] Han L, Xiang X, Fu Y, et al. Periplcymarin targets glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation of esophageal squamous cell carcinoma: Implication in anti-cancer therapy [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155539.

[4] Wang F, Yuan C, Lu Y, et al. Glabridin inhibits proliferation and migration in hepatocellular carcinoma by regulating multi-targets [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 338: 119022.

[5] Yuan C, Lin Z, Zhang L, et al. Glabridin from *Glycyrrhiza glabra* L. exhibits anti-triple-negative breast cancer effects by regulating various cell cycle genes [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73: 24055-24075.

[6] Li T, Li H, Xia W, et al. Investigation of the effects of glabridin on the proliferation, apoptosis, and migration of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620 and its mechanism based on reverse virtual screening and proteomics [J]. Oxid Med Cell Longev, 2023, 2023: 1117431.

[7] Wang C, Shi J, Rao Q, et al. Obtain substance of anti-glioblastoma from *Erigeron breviscapus* through fragment-based target research (FBTR): An efficient strategy for pharmacology investigation and optimization of natural products [J]. J Pharm Anal, 2025, 15: 101366.

[8] Xu Y, Blevins H, Biby S, et al. Mechanistic characterization of a small molecule as a direct NLRP3 inhibitor *via* binding to the NACHT domain [J]. J Med Chem, 2025, 68: 24260-24271.

[9] He BL, Li SZ, Li YQ, et al. Effects of glabridin on malignant biological behaviors of lung adenocarcinoma A549 cells and its molecular mechanism [J]. Chin J Cancer Biother (中国肿瘤生物治疗杂志), 2023, 30: 672-680.

[10] Yang Z, Bi Y, Xu W, et al. Glabridin inhibits urothelial bladder carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo* by inducing cell apoptosis and cell cycle arrest [J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101: 581-592.

[11] Jamwal A, Chand J, Dash A, et al. Glabridin plays dual action to intensify anti-metastatic potential of paclitaxel *via* impeding CYP2C8 in liver and CYP2J2/EETs in tumor of an orthotopic mouse model of breast cancer [J]. Chem Biol Interact, 2023, 382: 110605.

[12] Lin H, Ai D, Liu Q, et al. Natural isoflavone glabridin targets PI3Kγ as an adjuvant to increase the sensitivity of MDA-MB-231 to tamoxifen and DU145 to paclitaxel [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2024, 236: 106426.

[13] Zhou J, Cheng A, Guo J, et al. Targeting PRDX2 to inhibit tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer: The role of FN1 and the PI3K/AKT/SP1 pathway [J]. J Transl Med, 2025, 23: 434.

[14] Knudsen ES, Witkiewicz AK, Sanidas I, et al. Targeting CDK2 for cancer therapy [J]. Cell Rep, 2025, 44: 116140.

[15] Li Y, Dong M, Qin H, et al. Mulberrin suppresses gastric cancer progression and enhances chemosensitivity to oxaliplatin through HSP90AA1/PI3K/AKT axis [J]. Phytomedicine, 2025, 139: 156441.

[16] DeMayo FJ. Cell-cycle machinery is critical in regulating uterine steroid hormone for embryo implantation and development [J]. J Clin Invest, 2024, 134: e186194.

[17] Mouery RD, Lukasik K, Hsu C, et al. Proteomic analysis reveals a PLK1-dependent G2/M degradation program and a role for AKAP2 in coordinating the mitotic cytoskeleton [J]. Cell Rep, 2024, 43: 114510.

[18] Jiang F, Fei H, Yang L, et al. Integrated analysis and experimental validation of E2F2 as a potential prognostic biomarker and its oncogenic roles in serous ovarian cancer [J]. Front Mol Biosci, 2025, 12: 1661558.

[19] Jiang Q, Liu X, Yu W, et al. Integrated analysis reveals survival-related genes promoting cholangiocarcinoma progression *via* G2/M cell cycle, with validation of cyclin B1 in tumor proliferation [J]. Sci Rep, 2025, 15: 41352.

[20] Zhou Q, Wu F, Chen Y, et al. *Reynoutria multiflora* (Thunb.) Moldenke and its ingredient suppress lethal prostate cancer growth by inducing CDC25B-CDK1 mediated cell cycle arrest [J]. Bioorg Chem, 2024, 152: 107731.

[21] Hao C, Wei Y, Meng W, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors for hormone receptor-positive advanced breast cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2025, 132: 102861.

[22] Ganesan K, Xu C, Wu J, et al. Ononin inhibits triple-negative breast cancer lung metastasis by targeting the EGFR-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Sci China Life Sci, 2024, 67: 1849-1866.

[23] Tipbunjong C, Khimmaktong W, Hengpratom T, et al. Glabridin alleviates oxidative stress-induced osteoporosis by targeting the Akt/NF-κB and Akt/GSK-3β pathways [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26: 2949.

[24] Lou L, Zhu Z, Xu L, et al. Glabridin mitigates osteoarthritis progression through modulation of the PI3K/AKT/FOXO3A autophagy axis [J]. Phytomedicine, 2025, 148: 157359.

[25] Wu A, Li S, Feng C, et al. Fn14 controls the SIRT2-mediated deacetylation of SLUG to inhibit the metastasis of epithelial ovarian cancer [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e2501552.