



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250213
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250213
China Journal of General Surgery, 2025, 34(10):2180-2190.

· 基础研究 ·

基于网络药理学与细胞实验的山柰酚抗结直肠癌作用机制研究

仲富瑞, 杨华

(四川省自贡市第四人民医院 普通外科, 四川 自贡 643000)

摘要

背景与目的: 结直肠癌 (CRC) 发病率持续上升, 晚期患者疗效有限, 迫切需要开发新的抗肿瘤药物。山柰酚是一种天然黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎及抗癌活性。本研究结合网络药理学与实验验证, 系统探讨山柰酚抗CRC的关键靶点及潜在机制。

方法: 通过 SwissTargetPrediction、SEA、PharmMapper、TargetNet 等数据库筛选山柰酚潜在靶点, 从 GeneCards、OMIM、CTD、DrugBank 数据库获取 CRC 相关靶点, 取交集构建“化合物-靶点-疾病”网络。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件分析蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 并筛选核心靶点, 进一步进行 GO 与 KEGG 富集分析。采用人 CRC HCT-116 细胞进行 CCK-8、克隆形成、划痕、Transwell 实验及 Western blot 检测, 验证山柰酚对细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡相关蛋白表达的影响。

结果: 共筛得山柰酚作用靶点 492 个、CRC 相关靶点 5 078 个, 交集 269 个。PPI 分析鉴定出 Akt1、HSP90AA1、ESR1、SRC、CASP3、NFKB1 等 53 个核心靶点。GO 分析提示这些靶点主要参与细胞应激反应、凋亡与氧化应激调控; KEGG 分析显示主要涉及化学致癌-受体活化、催乳素、雌激素及 PI3K/Akt 信号通路。细胞实验证实山柰酚能明显抑制 HCT-116 细胞的增殖、克隆形成、迁移与侵袭能力 (均 $P<0.05$), 呈浓度依赖关系, 并下调 Bcl-2 和 cyclin D1、上调 Bax 的表达 (均 $P<0.05$)。

结论: 山柰酚可通过多靶点、多通路协同作用抑制 CRC 细胞的增殖、迁移与侵袭, 并诱导凋亡, 其机制可能与调控 PI3K/Akt 及雌激素信号通路等密切相关。本研究为山柰酚作为 CRC 潜在治疗药物提供了理论依据与实验支持。

关键词

结直肠肿瘤; 山柰酚类; 网络药理学; 细胞增殖; 细胞凋亡; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.3

Mechanisms of kaempferol against colorectal cancer based on network pharmacology and cellular experiments

ZHONG Furui, YANG Hua

(Department of General surgery, Zigong Fourth People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract

Background and Aims: Colorectal cancer (CRC) has a high incidence and mortality rate, and the effectiveness of current therapies for advanced cases remains limited. Kaempferol, a natural flavonoid

基金项目: 四川省自贡市重点科技计划基金资助项目 (2022ZCYGY12)。

收稿日期: 2025-04-15; **修订日期:** 2025-07-25。

作者简介: 仲富瑞, 四川省自贡市第四人民医院主治医师, 主要从事普外科基础与临床方面的研究。

通信作者: 杨华, Email: yanghua_dc@126.com

compound, exhibits antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties. This study aimed to elucidate the key molecular targets and underlying mechanisms of kaempferol against CRC through an integrated approach combining network pharmacology and experimental validation.

Methods: Potential targets of kaempferol were identified via SwissTargetPrediction, SEA, PharmMapper, and TargetNet databases, and CRC-related targets were retrieved from GeneCards, OMIM, CTD, and DrugBank. The intersection targets were used to construct a compound-target-disease network. Protein-protein interaction (PPI) analysis using the STRING database and Cytoscape software identified core targets, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. In vitro experiments with human CRC HCT-116 cells evaluated cell proliferation (CCK-8 assay), colony formation, migration (scratch assay), invasion (Transwell assay), and expression of apoptosis- and cell cycle-related proteins (Western blot).

Results: A total of 492 kaempferol targets and 5 078 CRC-related targets were obtained, with 269 overlapping targets identified as potential therapeutic candidates. PPI network analysis revealed 53 core targets, including Akt1, HSP90AA1, ESR1, SRC, CASP3, and NFKB1. GO analysis indicated enrichment in cellular stress response, apoptosis regulation, and oxidative stress processes; KEGG pathways were primarily related to chemical carcinogenesis-receptor activation, prolactin, estrogen, and PI3K/Akt signaling. Experimental validation demonstrated that kaempferol markedly inhibited HCT-116 cell proliferation, colony formation, migration, and invasion in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$), accompanied by downregulation of Bcl-2 and cyclin D1 and upregulation of Bax (all $P < 0.05$).

Conclusion: Kaempferol exerts anti-CRC effects through multi-target and multi-pathway mechanisms, including inhibition of proliferation, migration, and invasion, and induction of apoptosis, potentially via modulation of the PI3K/Akt and estrogen signaling pathways. These findings provide theoretical and experimental evidence supporting kaempferol as a promising candidate for CRC therapy.

Key words

Colorectal Neoplasms; Kaempferols; Network Pharmacology; Cell Proliferation; Apoptosis; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.3

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 起病隐匿, 其致死率在恶性肿瘤中排第三位, 且发病率仍持续上升, 每年新发病例数以百万计, 严重影响患者的生活质量并造成显著的经济负担^[1], CRC 目前主要的治疗手段包括手术切除、放射治疗以及化学治疗等^[2], 然而许多患者确诊时已达到中晚期, 导致手术效果欠佳, 一旦进展到晚期或术后复发、转移, 治疗主要依赖化疗与靶向治疗以缓解疾病, 但是, 部分患者对目前临床使用的化疗药产生耐药以及严重的副作用^[2-4], 因此, 迫切需要寻找新的防治药物。近年来, 植物来源的天然产物在癌症治疗中的潜力引起了广泛关注^[5], 山柰酚 (kaempferol) 作为一种多酚类化合物, 已被证实展现出抗肿瘤、抗氧化和抗炎等多重生物活性^[6-9],

已有研究表明山柰酚能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活, 促进宫颈癌细胞的凋亡, 并促进肺癌细胞自噬^[10-11]。目前关于山柰酚在 CRC 中的研究相对不足, 亟须进行系统研究, 进一步探讨其在 CRC 治疗中的作用。

网络药理学是一种新型研究方法, 它从系统水平分析药物多靶点治疗疾病机制, 其优势在于能够整合多种数据源, 有效定位靶点, 并建立“化合物-靶点-疾病”生物网络, 揭示药物与靶点之间复杂的网络关系, 从而为药物的作用机制提供理论支持^[12]。本研究利用网络药理学研究方法对山柰酚与 CRC 相关靶点进行分析, 并联合基础实验探究山柰酚对 CRC 的抗肿瘤作用及初步作用机制, 旨在揭示山柰酚在 CRC 治疗中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 山柰酚的作用靶点筛选

山柰酚是在许多植物中都存在的天然黄酮类化合物,在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 中检索山柰酚 (kaempferol),保存它的 3D 格式并上传至 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>)、SEA 数据库 (<https://sea.bkslab.org>)、TargetNet 数据库 (<http://targetnet.scbdd.com/home/index>)、PharmMapper 数据库 (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>) 和 SuperPRED 数据库 (<https://prediction.charite.de/index.php>),预测和收集各数据库中山柰酚靶点,去重后作为山柰酚靶最终作用靶点。

1.2 CRC 的作用靶点筛选

分别通过 Genecard 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)、CTD 数据库 (<https://ctdbase.org>) 和 DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>) 以“Colorectal Cancer”为关键词检索 CRC 的作用靶点。将四个数据库获得的 CRC 作用靶点合并后删除重复项,获得 CRC 作用的最终靶点。

1.3 山柰酚治疗 CRC 的潜在靶点筛选

通过 bioinformatics 平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 得到山柰酚作用靶点和 CRC 靶点的交集,代表了山柰酚治疗 CRC 的潜在靶点。利用 Cytoscape 3.10.1 软件构建化合物-交集靶点-疾病网络。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

将得到山柰酚治疗 CRC 的潜在靶点 (交集靶点) 导入到 String 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 中,将 Organisms 设置为“Homo sapiens”,minimum required interaction score 设置为 0.4,隐藏网络中未连接的节点,其他参数设置为默认值,并进行 PPI 分析^[13]。使用 Cytoscape 3.10.1 软件绘制网络图,使用软件中 Centiscape 2.2 插件进行拓扑分析来衡量节点的重要性,包括度、介数和贴近度三个参数,将三个参数均大于其平均值的靶点作为山柰酚治疗 CRC 的核心靶点。

1.5 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 在线数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对之前获得的可能作用靶点进行 GO 富集分析

和 KEGG 富集分析,以 $P < 0.05$ 为阈值,将其按 P 值升序进行排序,选取排序居 10 位的生物学过程和前 10 的 KEGG 通路,通过 bioinformatics 平台进行分析,将生物体设置“Homo sapiens”,然后分别绘制 P 值最小的 10 个分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC)、生物过程 (biological process, BP) 的 GO 分析条形图和气泡图进行可视化^[14]。

1.6 细胞实验

1.6.1 材料 人 CRC 细胞株 HCT-116 由西南医科大学附属医院中心实验室提供。高糖 DMEM 培养基和胎牛血清购自上海中乔新舟生物科技有限公司,山柰酚、结晶紫购于上海麦克林生化科技有限公司,CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、一抗 Bcl-2、Bax、cyclin D1、GAPDH 及二抗均购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.6.2 细胞培养 将人 CRC 细胞株 HCT-116 置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养液中放于恒温培养箱 (5% CO₂、37 °C) 中常规传代培养,维持细胞处于对数生长期。

1.6.3 实验分组 将处于对数生长期的 HCT-116 细胞随机分为对照组和山柰酚处理组,山柰酚处理组分别予以含不同浓度山柰酚 (25、50、100 μmol/L) 的培养液处理,对照组给予含等量二甲基亚砜 (DMSO) 的培养液处理。

1.6.4 CCK-8 法检测山柰酚对 CRC 细胞增殖能力的影响 将 HCT-116 细胞接种于 96 孔板中,分组及干预方法同上,培养 24、48、72 h 后,在实验结束前 2 h 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL 培养 2 h,再用酶标仪 450 nm 处测定吸光度 (OD) 值,计算细胞活力。

1.6.5 检测山柰酚对 CRC 细胞的细胞克隆形成的影响 取对数生长期的 HCT-116 细胞,以约 1 000 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,细胞分组及干预同上,置于培养箱中连续培养 10 d 左右,然后以 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗后结晶紫染色 15 min,双蒸水漂洗后置于空气中干燥,最后拍照计数。

1.6.6 划痕试验检测山柰酚对 CRC 细胞迁移能力的影响 采用划痕试验检测山柰酚对 HCT-116 细胞的迁移能力的影响。取对数生长期细胞配制成细胞悬液,铺于 6 孔板中培养,待细胞基本长满后,在每孔底部划出 3 条均匀竖线, PBS 洗涤 2 次后于倒置显微镜下观察作为 0 时状态,并标记每个观察

点,再更换为含不同浓度山柰酚的完全培养基继续培养,于不同时间(24、48 h)在倒置显微镜下拍照,记录同一个观察点划痕宽度的变化,计算各组细胞的相对迁移率。

1.6.7 Transwell 实验检测山柰酚对 CRC 细胞侵袭能力的影响 采用Transwell小室侵袭实验检测山柰酚对肿瘤细胞侵袭能力的影响,无菌条件下 Matrigel 于冰浴融化,用 DMEM 培养液稀释成 1 g/L,取 50 μ L 铺于 Transwell 上室,Transwell 下室每孔加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,上室加入人 CRC 细胞 HCT-116,调整细胞浓度为 4×10^5 /mL,每孔 50 μ L,分组后加入不同浓度的山柰酚及溶媒 DMSO 对上室细胞进行干预。培养 24 h 后,去除上室中培养液,用棉签轻轻擦去上层中的细胞,4% 多聚甲醛中固定 20 min, PBS 洗涤 2 次,结晶紫染色 15 min,再用 PBS 洗涤,在倒置显微镜下拍照计数穿过小室的细胞。

1.6.8 Western blot 检测山柰酚对 CRC 细胞凋亡相关蛋白及细胞周期相关蛋白表达的影响 取对数生长期的 HCT-116 细胞接种于 6 孔板,置于细胞培养箱中培养 24 h 后,更换为含有不同浓度山柰酚的完全培养基,48 h 后收集细胞并将各组细胞裂解,按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白,使用 BCA 法测量蛋白浓度并定量。将定量后的各实验组和对照组分别取等量总蛋白上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜上,将膜置于用 PBST 配制的含 5% 脱脂奶粉的蛋白封闭液中封闭 2 h,一抗孵育过夜(4 $^{\circ}$ C)。次日 PBST 避光漂洗 3 次后二抗室温孵育 1.5 h, PBST 漂洗 3 次,最后使用 ECL 化学发光试剂盒进行曝光,凝胶成像系统分析。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 软件对实验数据进行绘图与统计分析,并在进行统计分析前,对实验数据进行正态性和方差齐性检验,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 山柰酚的潜在作用靶点预测

将通过 PubChem 获得的山柰酚 3D 结构上传至

SwissTargetPrediction 数据库、SEA 数据库、TargetNet 数据库、PharmMapper 数据库和 Super-PRED 数据库获取山柰酚有效靶点 100 个、66 个、123 个、198 个和 121 个。去除重复靶点后,共获得山柰酚靶点 492 个。

2.2 CRC 的靶点预测及共同靶点筛选

分别从 GeneCard、OMIM、CTD、Drugbank 数据库获取 CRC 疾病相关靶点 4 684 个、502 个、29 个和 75 个,去除重复后得到 CRC 相关靶点共 5 078 个。Venn 图显示山柰酚靶点和 CRC 相关靶点有 269 个共同的靶点,表明这些靶点可能是山柰酚治疗 CRC 的潜在靶点(图 1)。

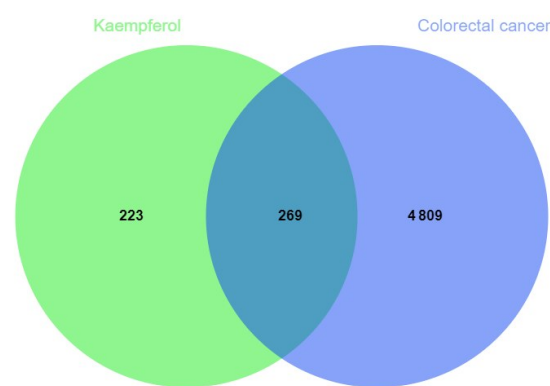


图1 山柰酚作用靶点与 CRC 相关靶点交集

Figure 1 Intersection of kaempferol targets and colorectal cancer-related targets

2.3 化合物-交集靶点-疾病网络构建

利用 Cytoscape 软件构建了一个化合物-交集靶点-疾病网络来描述山柰酚和潜在靶标与疾病之间的相互作用(图 2)。网络图包括 271 个节点,538 条边。其中棕黄色菱形表示山柰酚,绿色椭圆形表示交集靶点,紫色矩形表示疾病。

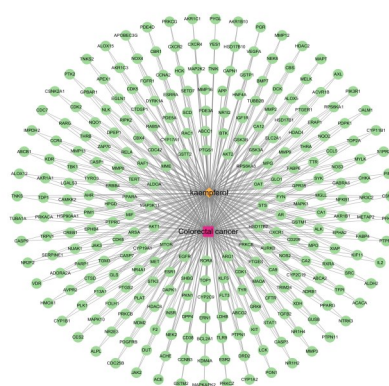


图2 化合物-交集靶点-疾病网络

Figure 2 Compound-intersecting targets-disease network

2.4 PPI网络的构建

用String数据库结合Cytoscape软件构建了269个靶点的PPI网络,去除无连接线的节点后,该网络图包含267个节点,3 504条边(图3)。基于Centiscape 2.2插件对PPI网络进行拓扑分析,得到所有靶基因的Degree值、Betweenness值和Closeness值。笔者根据拓扑数据对PPI网络进行了筛选,筛选Degree、Betweenness和Closeness值大于平均值的靶点作为核心靶点(53个)。其PPI网络图见图4,该网络包含53个节点,784条边。其中颜色越深,节点越大表明其Degree值越大。根据Degree值排名前10位的靶基因(Aat1、HSP90AA1、ESR1、EGFR、SRC、CASP3、NFKB1、MAPK3、PPARG、MMP9)作为山柰酚治疗CRC的关键作用靶点。

2.5 共同靶点GO生物功能分析和KEGG通路富集分析

通过bioinformatics平台对之前获得的山柰酚可能作用于CRC的53个核心靶基因靶点进行GO生物功能分析和KEGG通路富集分析,获得靶基因参与的信号通路和生物学过程。共富集了2 994个 $P < 0.05$ 的GO术语,包括1 913个BP术语、80个CC术语和173个MF术语,其中BP主要集中于细胞对化学应激反应、细胞凋亡、活性氧反应、氧化应激反应等。CC主要集中于膜筏、膜微域、膜区等, MF主要集中于核受体活性、配体激活转录因子活性、转录辅激活因子结合等。将BP、CC和MF富集程度排名前10的术语绘制成柱状图(图5),此结果证实山柰酚可通过调控多种生物学途径发挥对CRC的治疗作用。以 $P < 0.05$ 为筛选条件,共筛选出156条丰富的信号通路,将其中富集程度排名前10的通过绘制成气泡图,KEGG通路富集分析结果显示,前列腺癌(prostate cancer)、化学致癌-受体活化(chemical carcinogenesis-receptor activation)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、催乳素信号通路(prolactin signaling pathway)、人乳头

瘤病毒感染(human papillomavirus infection)、内分泌抵抗(endocrine resistance)、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)、乙型肝炎(hepatitis B)等是山柰酚的主要作用通路(图6),由此可见,山柰酚可能通过多个信号通路发挥抗CRC及多种恶性肿瘤的作用,且其作用靶点可能为多种疾病的共同靶点。

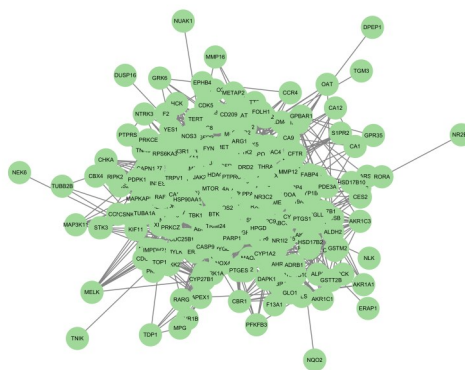


图3 交集靶点PPI网络

Figure 3 PPI network of intersecting targets

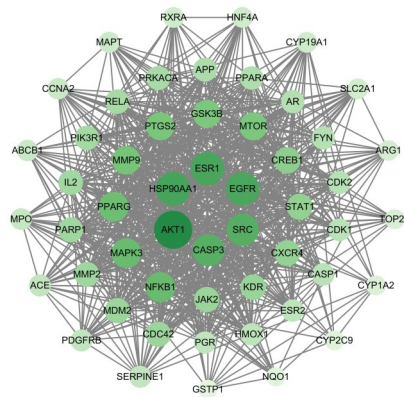


图4 核心靶点PPI网络

Figure 4 PPI network of core targets

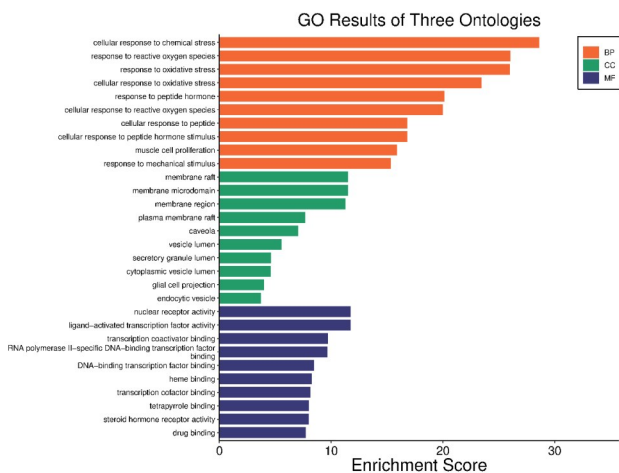


图5 GO分析结果

Figure 5 Results of GO enrichment analysis

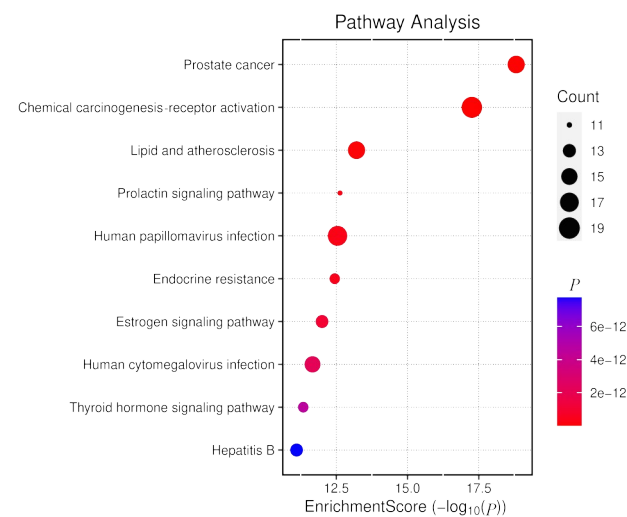


图6 KEGG分析结果

Figure 6 Results of KEGG pathway enrichment analysis

2.6 细胞实验结果

2.6.1 山柰酚对HCT-116细胞增殖的影响 与对照组比较, 各山柰酚处理组的HCT-116细胞的增殖

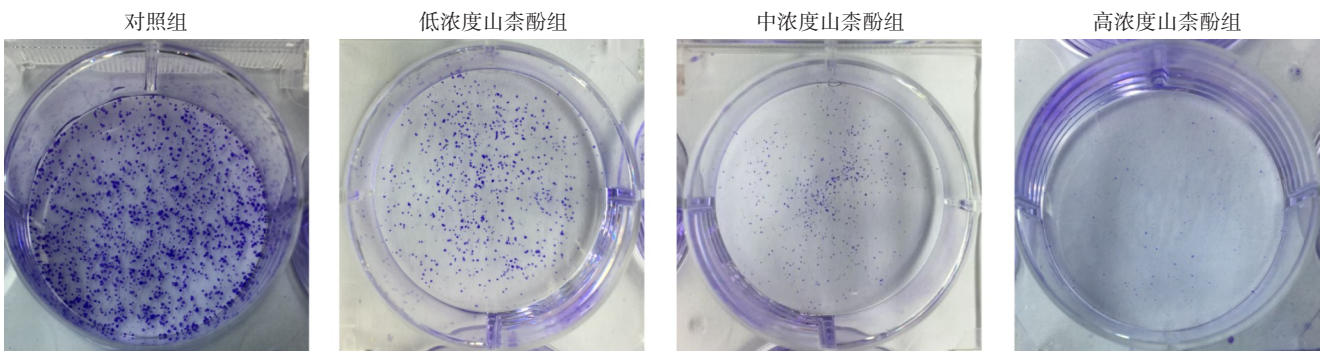


图8 各组HCT-116细胞的克隆形成能力检测

Figure 8 Detection of colony formation ability of HCT-116 cells in each group

活力均明显降低, 且呈明显的时间与浓度依赖性 (均 $P<0.05$) (图7)。

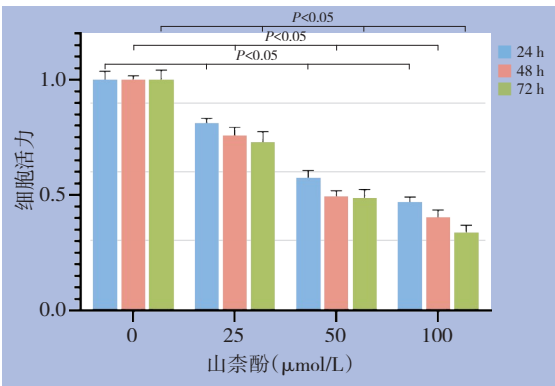


图7 各组HCT-116细胞增殖能力检测

Figure 7 Detection of proliferative capacity of HCT-116 cells in each group

2.6.2 山柰酚对HCT-116细胞克隆形成的影响 与对照组比较, 各浓度山柰酚处理组的细胞克隆形成数目均明显减少, 呈明显浓度依赖性 (均 $P<0.05$)。培养结束时, 对照组、低、中、高浓度山柰酚组HCT-116细胞克隆形成数目分别为 $(1\,578.6 \pm 48.8)$ 个、 (89.0 ± 5.0) 个、 (26.0 ± 2.0) 个、 (12.3 ± 1.5) 个 (图8)。

2.6.3 山柰酚对HCT-116细胞迁移能力的影响 与对照组比较, 各山柰酚处理组HCT-116细胞迁移数均明显减少, 且呈明显的时间与浓度依赖性 (均 $P<0.05$)。对照组、低、中、高浓度山柰酚组HCT-116细胞相对迁移率在24 h分别为 $(100.00 \pm 0.95)\%$ 、 $(59.52 \pm 1.43)\%$ 、 $(33.33 \pm 1.90)\%$ 、 $(19.05 \pm 1.19)\%$, 在48 h分别为 $(100.00 \pm 3.57)\%$ 、 $(60.71 \pm 2.38)\%$ 、 $(40.48 \pm 1.79)\%$ 、 $(37.50 \pm 2.96)\%$ (图9)。

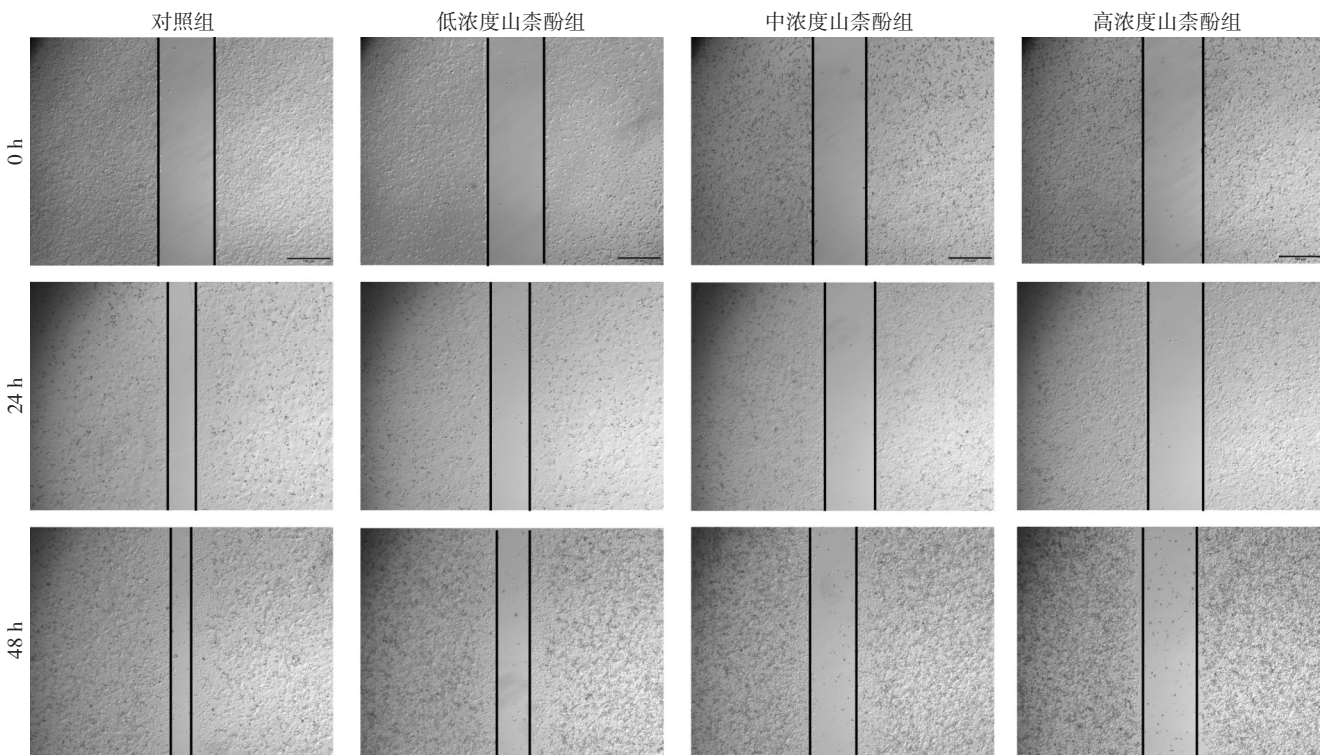


图9 各组HCT-116细胞迁移能力检测

Figure 9 Detection of migration ability of HCT-116 cells in each group

2.6.4 山柰酚对人CRC HCT-116细胞侵袭能力的影响 与对照组比较，各山柰酚处理组HCT-116细胞穿过Transwell小室的细胞数目均明显减少，并呈明显的浓度依赖性（均 $P<0.05$ ）。各组细胞处理24 h

后，对照组、低、中、高浓度山柰酚组穿过Transwell小室的HCT-116细胞数目分别为 (226.7 ± 15.6) 个、 (88.3 ± 3.1) 个、 (56 ± 2.0) 个、 (24.0 ± 1.0) 个（图10）。

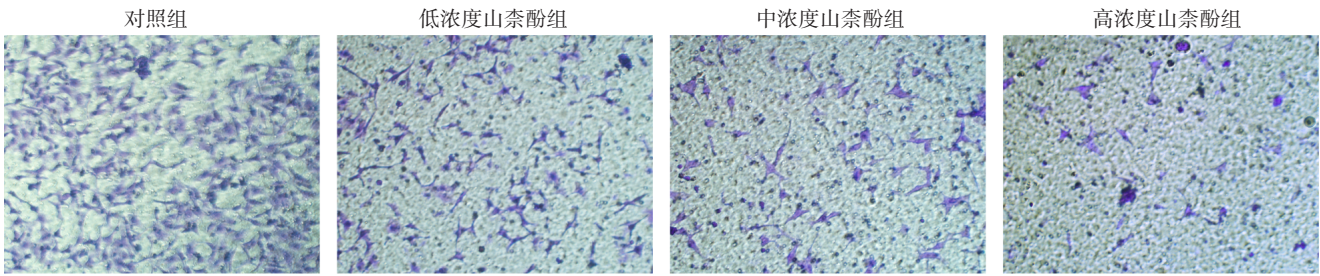


图10 各组HCT-116细胞侵袭能力检测

Figure 10 Detection of invasion ability of HCT-116 cells in each group

2.6.5 山柰酚对细胞凋亡相关蛋白及细胞周期相关蛋白表达的影响 各组细胞处理48 h后，Western blot实验结果显示，各山柰酚处理组HCT-116细胞中抗凋亡Bcl-2蛋白的表达明显下调、促凋亡蛋白

Bax表达明显上调，周期相关蛋白cyclin D1表达明显下调，并呈明显的浓度依赖性（均 $P<0.05$ ）（图11）。

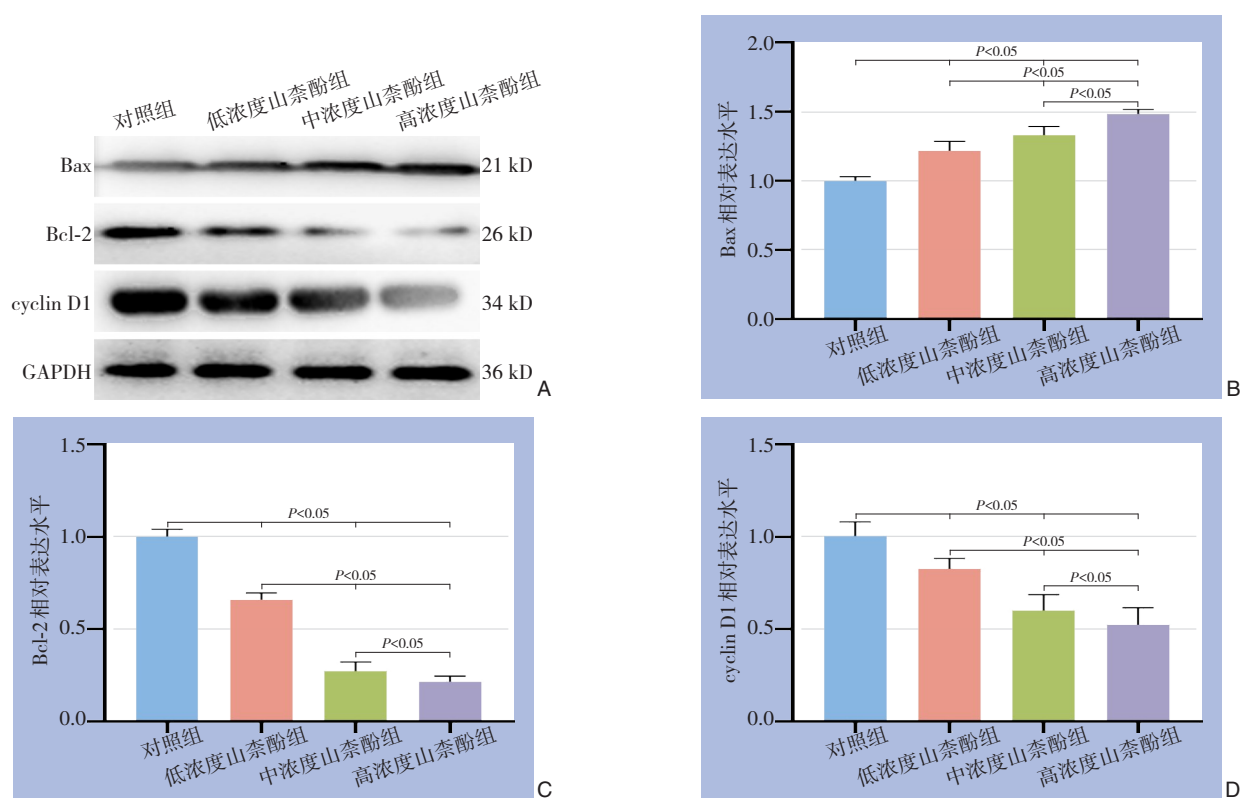


图 11 各组 HCT-116 细胞 Bax、Bcl-2、cyclin D1 蛋白表达水平

Figure 11 Expression levels of Bax, Bcl-2, and cyclin D1 proteins in HCT-116 cells of each group

3 讨论

山柰酚是一种天然黄酮类化合物,来源于常见果蔬和传统中药,具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种药理活性,并与多种癌症的发展密切相关^[15-18],因此,山柰酚在 CRC 的治疗中展现出广泛的应用潜力。本研究通过整合网络药理学与实验的方式,结合生物信息学分析和细胞实验,旨在筛选和验证山柰酚的潜在靶点,进一步探讨其抗 CRC 的机制,从而为临床应用提供理论支持。

首先,通过网络药理学分析,本研究预测了山柰酚的靶点,并与 CRC 相关靶点进行比较。结果显示,山柰酚与多个核心靶点相交,构建了化合物-交集靶点-疾病网络,结果显示山柰酚与发现 CRC 相关的共同靶点达 269 个,这为山柰酚作为 CRC 治疗药物的潜力提供了重要依据。这一结果不仅揭示了山柰酚的多靶点特性,也可能反映其抗肿瘤效果的复杂性,靶点的多样性可能与山柰酚在不同信号通路中的调控作用相关,进而影响细胞的增殖、迁移及凋亡等生物学过程^[19],从而为 CRC 的治疗提供新的思路与选择。

基于 PPI 网络及拓扑参数分析,本研究筛选出 53 个核心靶点,并识别出 Akt1、HSP90AA1、ESR1、EGFR、SRC、CASP3、NFKB1、MAPK3、PPARG、MMP9 等作为山柰酚治疗 CRC 的关键靶点。这些靶点在癌症信号转导、细胞增殖和凋亡等生物学过程中的作用,为深入理解山柰酚的抗癌机制提供了重要线索。其中, Akt1 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可促进 NF- κ B、 β -catenin 表达,从而抑制细胞凋亡^[20]。Akt 其作为 PI3K/Akt 信号通路的核心分子,在许多类型的癌症中起着关键作用,其异常活化与肿瘤细胞的生长、凋亡和转移密切相关^[21-22],故推测其在 CRC 的发生发展中发挥重要作用,能促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡来影响 CRC 的发生、发展过程。本研究中, CCK-8 与细胞克隆实验进一步证实山柰酚能显著抑制 HCT-116 细胞的相对活力,并抑制肿瘤细胞的克隆形成;此外,通过 Western blot 分析了 Bcl-2 基因家族蛋白的表达情况, Bcl-2 家族是细胞凋亡的主要调控因素^[23],且本研究 PPI 网络中预测的关键靶点 Akt1、HSP90AA1、ESR1、EGFR、NFKB1 与 Bax/bcl-2 的调控密切相关,如通过 PI3K/Akt 通路磷酸化并抑制促

凋亡蛋白, 增强 Bcl-2 的抗凋亡作用, 同时抑制 Bax 的激活; NFkB1 作为转录因子, 上调 Bcl-2 等抗凋亡基因的表达, 抑制 Bax 介导的凋亡^[24]。Western blot 结果显示经山柰酚处理后, Bcl-2 表达明显下调和 Bax 表达明显上调, 这与网络药理学预测的关键靶点作用机制高度吻合, 提示山柰酚可能通过抑制 Bcl-2 的表达和促进 Bax 表达来诱导肿瘤细胞发生凋亡。

另外, SRC 作为另一核心靶点, 在 CRC 中常因突变或过表达导致细胞侵袭转移能力增强^[25-26]。本研究细胞迁移与侵袭实验结果中, 证实山柰酚能显著抑制 CRC 细胞的迁移和侵袭能力, 可能与 SRC 的调控直接相关, 类似机制在乳腺癌的研究中亦有报道, SRC 能介导溶酶体酶组织蛋白酶 S 和明胶酶 MMP-9 的协同作用过程降低肿瘤侵袭和转移潜能^[27]。

细胞增殖的基础是细胞周期的有序进行, 细胞周期是细胞生命活动的基本过程, 其调控的异常与肿瘤的发生密切相关, 值得注意的是, cyclin D1 是细胞周期 G1/S 期转换的关键调控蛋白, 其通过与 CDK4/6 结合形成复合物, 磷酸化 Rb 蛋白, 促使细胞进入 DNA 合成阶段。在 CRC 中, cyclin D1 的异常高表达常导致细胞周期失控, 驱动肿瘤细胞过度增殖^[28]。同时, cyclin D1 的表达调控常受上游信号分子 (如 Akt、MAPK) 影响^[29], 而网络药理学分析提示山柰酚的核心靶点 Akt1 可能通过 PI3K/Akt 通路间接调控 cyclin D1。本研究通过 KEGG 通路富集显示, 山柰酚可能通过化学致癌-受体活化、催乳素信号通路及雌激素信号通路发挥抗癌作用。化学致癌-受体活化通路涉及外源性致癌物代谢酶 (如 CYP1A1) 的调控, 提示山柰酚可能通过抑制致癌物活化或增强解毒机制预防 CRC 发生^[30]。GO 功能分析进一步支持山柰酚对细胞凋亡、周期调控及迁移的干预作用, 与实验数据中 Bcl-2/Bax 失衡和 cyclin D1 下调的结果相呼应, 且与已有山柰酚在乳腺癌中研究结论一致^[31]。本研究数据进一步支持这一推测: 山柰酚在抑制 HCT-116 细胞增殖的同时, 显著降低 HCT-116 肿瘤细胞克隆形成能力, 表明其可能通过多靶点协同阻断肿瘤干性维持。这一结果与山柰酚处理显著下调了 CRC 细胞中 cyclin D1 的表达水平的结果一致。此外, 与同类黄酮化合物 (如柚皮素) 相比, 山柰酚表现出更广泛的靶点覆盖 (269 个交集靶点),

尤其是对 HSP90AA1 的调控可能增强其抗癌特异性。HSP90AA1 作为分子伴侣蛋白, 在 CRC 中常通过稳定致癌蛋白 (如 MET、EGFR) 促进肿瘤进展^[32], 山柰酚对该靶点的抑制作用为开发新型 HSP90 抑制剂提供了理论依据。

综上所述, 本研究揭示了山柰酚可能通过多靶点、多通路协同作用抑制 CRC 进展, 其机制涉及细胞周期阻滞、凋亡诱导及转移抑制等生物学过程, 为山柰酚作为 CRC 治疗药物的开发提供了重要的理论依据和实验支持。然而本研究仍存在局限性, 如数据库选择及潜在模型误差等均可对研究结果产生影响, 山柰酚相关抗肿瘤具体机制还有待深入以及尚未在动物模型中验证其体内疗效, 在未来的研究中, 拟进一步探究关键靶点和信号通路之间的相互作用及上下游调控关系, 并通过构建信号通路调控网络、分子对接、基因敲除/过表达实验验证关键靶点的功能性关联, 明确各通路在山柰酚抗 CRC 过程中的协同关系, 深入阐释其作用机制。

作者贡献声明: 仲富瑞负责课题设计, 完成实验及数据资料分析, 撰写论文; 杨华参与课题设计、收集数据, 修改论文, 并负责拟定写作思路, 指导撰写文章并最后定稿。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708.
 - [2] Xu R, Du A, Deng X, et al. tsRNA-GlyGCC promotes colorectal cancer progression and 5-FU resistance by regulating SPIB[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1):230. doi:10.1186/s13046-024-03132-6.
 - [3] Chen L, Sun K, Qin W, et al. LIMK1 m6A-RNA methylation recognized by YTHDC2 induces 5-FU chemoresistance in colorectal cancer via endoplasmic reticulum stress and stress granule formation[J]. Cancer Lett, 2023, 576:216420. doi:10.1016/j.canlet.2023.216420.
 - [4] 徐昆明, 许云华, 陈锡光, 等. 转移性结直肠癌抗 EGFR 治疗耐药机制研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(6):996-1011. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.06.016.
- Xu KM, Xu YH, Chen XG, et al. Review of research progress on mechanism of resistance to anti-EGFR therapy in metastatic

- colorectal cancer[J]. *China Journal of General Surgery*, 2024, 33(6): 996–1011. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.06.016.
- [5] González-Vallinas M, González-Castejón M, Rodríguez-Casado A, et al. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives[J]. *Nutr Rev*, 2013, 71(9):585–599. doi:10.1111/nure.12051.
- [6] Li S, Wang S, Zhang L, et al. Research progress on pharmacokinetics, anti-inflammatory and immunomodulatory effects of kaempferol[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 152:114387. doi:10.1016/j.intimp.2025.114387.
- [7] 肖美灵, 易嘉宁, 阳孝琛, 等. 山柰酚治疗乳腺癌机制的网络药理学与生物信息学分析及机制相关预后模型构建[J]. *中国普通外科杂志*, 2024, 33(11): 1854–1865. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.012.
- Xiao ML, Yi JN, Yang XC, et al. Network pharmacology and bioinformatics analysis of the mechanism of kaempferol in the treatment of breast cancer and construction of a mechanism-related prognostic model[J]. *China Journal of General Surgery*, 2024, 33(11):1854–1865. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.012.
- [8] Periferakis A, Periferakis K, Badarau IA, et al. Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15054. doi: 10.3390/ijms232315054.
- [9] Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential[J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2277. doi:10.3390/molecules24122277.
- [10] Kashafi E, Moradzadeh M, Mohamadxani A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 573–577. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.061.
- [11] Wang R, Deng Z, Zhu Z, et al. Kaempferol promotes non-small cell lung cancer cell autophagy via restricting Met pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155090. doi: 10.1016/j.phymed.2023.155090.
- [12] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116306. doi: 10.1016/j.jep.2023.116306.
- [13] Gu H, Zhang Y, Sun J, et al. Exploring the effect and mechanism of action of Jinlida granules (JLD) in the treatment of diabetes-associated cognitive impairment based on network pharmacology with experimental validation[J]. *Ann Med*, 2025, 57(1): 2445181. doi:10.1080/07853890.2024.2445181.
- [14] Khairy A, Ghareeb DA, Celik I, et al. Forecasting of potential anti-inflammatory targets of some immunomodulatory plants and their constituents using in vitro, molecular docking and network pharmacology-based analysis[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 9539. doi: 10.1038/s41598-023-36540-3.
- [15] Alrumaihi F, Almatroodi SA, Alharbi HOA, et al. Pharmacological potential of kaempferol, a flavonoid in the management of pathogenesis via modulation of inflammation and other biological activities[J]. *Molecules*, 2024, 29(9): 2007. doi: 10.3390/molecules29092007.
- [16] Heo JR, Lee GA, Kim GS, et al. Phytochemical-induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and differentiation in malignant melanoma cells[J]. *Phytomedicine*, 2018, 39: 100–110. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.006.
- [17] Crocetto F, di Zazzo E, Buonerba C, et al. Kaempferol, myricetin and fisetin in prostate and bladder cancer: a systematic review of the literature[J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3750. doi: 10.3390/nu13113750.
- [18] Qattan MY, Khan MI, Alharbi SH, et al. Therapeutic importance of kaempferol in the treatment of cancer through the modulation of cell signalling pathways[J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8864. doi: 10.3390/molecules27248864.
- [19] Wendlocha D, Kubina R, Krzykawski K, et al. Selected flavonols targeting cell death pathways in cancer therapy: the latest achievements in research on apoptosis, autophagy, necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis[J]. *Nutrients*, 2024, 16(8): 1201. doi:10.3390/nu16081201.
- [20] Wang B, Zhao CH, Sun G, et al. IL-17 induces the proliferation and migration of glioma cells through the activation of PI3K/Akt1/NF- κ B-p65[J]. *Cancer Lett*, 2019, 447: 93–104. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.008.
- [21] van der Ploeg P, Uittenboogaard A, Thijs AMJ, et al. The effectiveness of monotherapy with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in ovarian cancer: a meta-analysis[J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 163(2):433–444. doi:10.1016/j.ygyno.2021.07.008.
- [22] Sabbah DA, Hajjo R, Bardaweel SK, et al. Targeting the PI3K/AKT signaling pathway in anticancer research: a recent update on inhibitor design and clinical trials (2020–2023) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2024, 34(3): 141–158. doi: 10.1080/13543776.2024.2338100.
- [23] Strasser A, Vaux DL. Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1):13–20. doi:10.1038/cdd.2017.145.
- [24] 何亚琴, 苏进达, 赵少辉, 等. 结直肠癌细胞中 NF- κ B 活化与 TRAF6, CCR5 及 PTEN/PI3K 通路的关系及作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(10): 1363–1372. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2022.10.012.
- He YQ, Su JD, Zhao SH, et al. Association of NF- κ B activation

- with TRAF6, CCR5 and PTEN/PI3K pathway and its role in colorectal cancer cells[J]. China Journal of General Surgery, 2022, 31(10):1363-1372. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.10.012.
- [25] Zhang S, Yang Z, Bao W, et al. SNX10 (sorting nexin 10) inhibits colorectal cancer initiation and progression by controlling autophagic degradation of SRC[J]. Autophagy, 2020, 16(4): 735-749. doi:10.1080/15548627.2019.1632122.
- [26] Chen J, Elfiky A, Han M, et al. The role of Src in colon cancer and its therapeutic implications[J]. Clin Colorectal Cancer, 2014, 13(1): 5-13. doi:10.1016/j.clcc.2013.10.003.
- [27] Gautam J, Banskota S, Lee H, et al. Down-regulation of cathepsin S and matrix metalloproteinase-9 via Src, a non-receptor tyrosine kinase, suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(9): 1-14. doi: 10.1038/s12276-018-0135-9.
- [28] Kim J, Brunetti B, Kumar A, et al. Inhibition of glutaminase elicits senolysis in therapy-induced senescent melanoma cells[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(12):902. doi:10.1038/s41419-024-07284-3.
- [29] Yan T, Hu GS, Wang AH, et al. Paris saponin VII induces cell cycle arrest and apoptosis by regulating Akt/MAPK pathway and inhibition of P-glycoprotein in K562/ADR cells[J]. Phytother Res, 2018, 32(5):898-907. doi:10.1002/ptr.6029.
- [30] Mescher M, Haarmann-Stemmann T. Modulation of CYP1A1 metabolism: From adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options[J]. Pharmacol Ther, 2018, 187: 71-87. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.012.
- [31] Kim SH, Hwang KA, Choi KC. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models[J]. J Nutr Biochem, 2016, 28:70-82. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.027.
- [32] Santos LS, Silva VR, de Castro MVL, et al. New ruthenium-xanthoxyl complex eliminates colorectal cancer stem cells by targeting the heat shock protein 90 chaperone[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(12):832. doi:10.1038/s41419-023-06330-w.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 仲富瑞, 杨华. 基于网络药理学与细胞实验的山柰酚抗结直肠癌作用机制研究[J]. 中国普通外科杂志, 2025, 34(10): 2180-2190. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250213

Cite this article as: Zhong FR, Yang H. Mechanisms of kaempferol against colorectal cancer based on network pharmacology and cellular experiments[J]. Chin J Gen Surg, 2025, 34(10): 2180-2190. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.250213



微信扫一扫
关注该公众号

敬请关注《中国普通外科杂志》官方微信平台

《中国普通外科杂志》官方公众微信正式上线启动(订阅号: ZGPTWKZZ), 我们将通过微信平台定期或不定期推送本刊的优秀文章、工作信息、活动通知以及国内外最新研究成果与进展等。同时, 您也可在微信上留言, 向我们咨询相关问题, 并对我们的工作提出意见和建议。《中国普通外科杂志》公众微信号的开通是在移动互联网时代背景下的创新求变之举, 希望能为广大读者与作者带来更多的温馨和便利。

欢迎扫描二维码, 关注《中国普通外科杂志》杂志社官方微信服务平台。

中国普通外科杂志编辑部