从计算模拟到实验验证:钩吻素子靶向 *CYP*19*A*1 抗胃癌机制

林海玲[1]，石凌飞[1]，詹英豪[1]，阙万才[1,2]

摘要：　目的　系统性探究传统中草药钩吻(*Gelsemium elegans*)的主要活性成分钩吻素子(KM)在胃癌的作用机制和抗肿瘤功效。　**方法**　综合运用靶点预测、癌症基因组图谱(TCGA)数据生物信息学分析及分子对接等计算机模拟方法,筛选 KM 的潜在靶点并构建胃癌预后风险模型。通过体外细胞功能实验,在胃癌细胞系(MKN28 和 AGS)中进行活力、增殖和凋亡评估,以验证 KM 的抗肿瘤效果。利用表面等离子共振(SPR)、qRT-PCR 和 Western-blot 分析,深入探究其与关键靶点 *CYP*19*A*1 相互作用和调控的分子机制。　**结果**　生物信息学分析和预后模型鉴定出 *CYP*19*A*1 是胃癌中与不良预后相关的关键潜在靶点和高风险因子。体外实验表明,KM 能显著抑制胃癌细胞 MKN28 和 AGS 的增殖和活力,并诱导其凋亡,即使在 *CYP*19*A*1 过表达的情况下,这些效应依然存在。机制上,研究证实 KM 能直接与 CYP19A1 蛋白结合,并在转录后水平下调其蛋白表达。　**结论**　本研究为 KM 抗胃癌的治疗潜力提供依据,*CYP*19*A*1 可能是 KM 发挥抗胃癌作用的关键靶点。

关键词：　钩吻素子；胃癌；*CYP*19*A*1；分子对接；细胞凋亡

文献标志码：　A　　**文章编号：**　1672-4194(2025)06-0351-10

胃癌(gastric cancer，GC)作为消化系统最常见的恶性肿瘤之一,是全球第五大常见癌症和第三大癌症相关死亡的主要原因[1]。2022 年,全球新增 GC 病例约 96.9 万,死亡人数约 66 万[2],给公共卫生系统带来了沉重负担。目前 GC 的治疗方式包括手术、放化疗、靶向治疗和免疫治疗[3]。然而,由于患者常在晚期或已发生转移时才被确诊,以手术为主的根治性治疗往往难以实施[4],晚期和复发胃癌患者仍普遍面临耐药及远期预后不良等问题[5-6]。因此,迫切需要发现和开发更有效、毒性更低的治疗策略,以改善 GC 患者的治疗结局。

钩吻(*Gelsemium elegans*)是马钱科(Loganiaceae)的一种剧毒植物,具有抗肿瘤[7]、免疫调节[8]、抗焦虑和镇痛[9]等药理活性。然而,其治疗剂量与中毒剂量非常接近,需要对其潜在的治疗应用进行审慎研究。钩吻的主要活性成分是生物碱,已鉴定出 120 多种,主要是吲哚类生物碱,包括蛇根精(sarpagine)类、甲基钩吻素乙(gelsedine)类、钩吻素甲(gelsemine)类、葫蔓藤乙素(humantenine)类、钩吻素子(koumine，KM)类以及育亨宾(yohimbane)类等[10]。这些生物碱的毒性差异显著,其中 KM 类生物碱表现出相对较低的毒性及显著的抗肿瘤潜力,使其成为备受关注的研究对象[11]。

收稿日期： 2025-08-07
资助项目： 国家自然科学基金面上项目(82373138)；福建省财政厅专项资金(2024CZ006)
作者单位： 1. 福建医科大学 附属协和医院药学部,福州　350001；
2. 福建医科大学 附属协和医院Ⅰ期临床试验研究室,福州　350001
作者简介： 林海玲,女,主管药师,医学硕士
通信作者： 阙万才. Email：wancaique@fjmu.edu.cn

KM 作为钩吻主要的活性成分,其细胞毒性活性已在多种人类癌细胞系中得到体外验证,包括结直肠癌(HCT116[12]，SW480[13])、乳腺癌(MCF-7[14])和肝细胞癌(Huh-7[15]),且研究进一步表明 KM 能有效抑制肝细胞癌细胞的增殖并诱导其凋亡[15]。然而,KM 对 GC 细胞系的潜在抗癌作用及其具体的分子机制仍有待进一步探索。

本研究旨在进一步探讨 KM 在 GC 中的潜在治疗作用及其机制,拟采用整合的计算机模拟方法,包括靶点预测、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG)数据库生物信息学分析及分子对接,筛选 KM 的潜在靶点,构建 GC 预后风险模型,并通过体外细胞功能实验验证 KM 的抗肿瘤效果。

1　材料与方法

1.1　数据获取与处理　相关数据来源于癌症基因组图谱(the cancer genome atlas，TCGA)数据库中胃腺癌(stomach adenocarcinoma，STAD)队列。获取 TCGA-STAD 队列数据后,剔除总生存率未知或负值的样本,最终保留 381 个样本(包括 30 个癌旁样本和 351 个 GC 组织样本)。数据预处理包括质量控制和标准化。

1.2　KM 的靶点预测　在 PubChem 中搜索 KM(CAS：1358-76-5),获取其化学结构和简化分子线性输入规范(simplified molecular input line entry system，SMILES)格式,使用 SwissTargetPrediction(http://www.swisstargetprediction.ch/)和 SuperPred(https://prediction.charite.de/index.php)

2 个独立的在线平台预测其潜在靶点。合并 2 个平台的结果，生成候选靶基因的初步列表。

1.3 蛋白-蛋白相互作用网络分析 为探究候选靶点间的功能关系，使用 STRING（v11.5）平台（https://string-db.org/）分析候选基因，并将最小相互作用置信度阈值设为 0.7。以 TSV 格式检索全面的相互作用数据，并将数据集导入 Cytoscape（v3.10.2）软件进行可视化。

1.4 基于特征基因的预后模型构建 从双数据库源中确定潜在靶基因后，采用 R 4.4.1 软件通过单变量 Cox 回归分析进行初步筛选，以评估其独立的预后相关性。随后，应用最小绝对收缩和选择算子（least absolute shrinkage and selection operator，Lasso）惩罚 Cox 回归[通过 glmnet（v4.1-6）软件包实现]来精炼基因选择过程，并采用十折交叉验证，以增强模型鲁棒性并减轻过拟合。最后整合所选基因的表达谱及其对应的回归系数构建预后模型。使用 ggplot2（v3.5.0）软件包绘制森林图。

1.5 特征基因分析与验证 将 TCGA-STAD 样本随机分为训练集（50%）和验证集（50%）。通过 surv_cutpoint 算法确定风险评分的最佳截断值。根据此截断值在 2 个子集中分出高风险和低风险亚组。采用 Kaplan-Meier 方法比较组间生存结果，并使用 ggplot2（v3.5.0）软件包绘制生存曲线。

1.6 差异表达与功能富集分析 为阐明 KM 的药理机制，对其潜在靶基因进行功能富集分析。首先使用 R 中的 org.Hs.eg.db（v3.2.0）软件包将基因符号转换为 Entrez ID。随后使用 clusterProfiler（v4.12.1）软件包进行基因本体论（gene ontology，GO）和 KEGG 通路分析，应用严格的显著性阈值（$P<0.05$ 和 $P_{校正}<0.05$），按 $P_{校正}$ 值升序对结果进行排序，确定最显著富集的通路。所有结果均使用 ggplot2（v3.5.0）软件包进行可视化。为探究与差异表达模型基因相关的潜在生物学通路，采用基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）算法鉴定高表达和低表达队列间的通路水平差异，采用 clusterProfiler（v4.12.1）软件包进行系统性通路探查，涵盖 KEGG 分子通路和 GO 功能类别。经多重检验校正后，显著性阈值设定为 $P_{校正}<0.05$，并使用 gseaplot2 工具直观解释富集模式。

1.7 细胞培养、处理与转染 MKN28 细胞（货号：HYCC10186，上海恒远生物科技有限公司）培养于含 10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，货号：35-081-CV，美国康宁公司）、1%青霉素-链霉素（penicillin-streptomycin，P/S，货号：PB180120，武汉普诺赛生命科技有限公司）和 1% GlutaMax（货号：PB180419，武汉普诺赛生命科技有限公司）的 RPMI 1640 培养基（货号：PM150110，武汉普诺赛生命科技有限公司）。AGS 细胞（货号：SCSP-5262，中国科学院细胞库）培养于含 10% FBS、1% P/S 和 1% GlutaMax 的 F-12K 培养基（货号：21127022，美国赛默飞世尔科技公司）。2 种细胞系均在 37 ℃、体积分数为 0.05 的 CO_2 湿润培养箱中维持，并在细胞汇合度达到 80%～90%时用胰蛋白酶消化传代。KM（货号：AB1609，成都埃法生物科技有限公司）的纯度≥98%（高效液相色谱仪验证），杂质主要为微量其他吲哚碱，无显著活性干扰。将 KM 溶于二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）配制成 10 mmol/L 储备液。实验时，将 KM 在培养基中稀释至 100、200 μg/mL 的终浓度，并按指定时间孵育细胞；对照组接受等体积的 DMSO。*CYP19A1* 过表达质粒 pcDNA3.1-*CYP19A1*、空载体对照 pcDNA3.1（上海天一中胜生物技术有限公司）。将细胞接种于 6 孔板中，在汇合度达到 60%～70%时使用 Lipofectamine 2000（货号：11668018，美国赛默飞世尔科技公司）按制造商方案进行转染。转染后 4～6 h 更换培养基，细胞再培养 48 h 后进行后续实验。

1.8 表面等离子共振（surface plasmon resonance，SPR）分析 使用 SPR 分析系统（Biacore T200，美国思拓凡公司），通过标准的胺偶联化学方法将重组人 CYP19A1 蛋白（货号：BK-DB1925，上海帛科生物技术有限公司）固定在 CM5 传感器芯片表面。将溶解于 HBS-EP＋运行缓冲液中的不同浓度的 KM（1、2、5、10、50、100 μmol/L）以 30 μL/min 的恒定流速注入芯片表面以监测结合过程，随后注入运行缓冲液以监测解离过程。实时记录响应单位（response unit，RU）。通过将传感器图数据拟合到 1∶1 Langmuir 结合模型，使用 Biacore 评估软件并遵循制造商指南，确定结合动力学和平衡解离常数（K_D）。

1.9 RNA 提取与 qRT-PCR 根据制造商方案，使用 Trizol 试剂（货号：abs60154，上海爱必信生物科技有限公司）从细胞中提取总 RNA，并使用分光光度计（NanoDrop2000，美国赛默飞世尔科技公司）评估 RNA 浓度和纯度。取 1 μg 总 RNA，使用逆转录试剂盒（货号：G3337-100，武汉赛维尔生物科技有限公司）逆转录为 cDNA。使用 PCR 扩增试剂盒（货号：G3326-15，武汉赛维尔生物科技有限公司）在实时 PCR 系统（7500 Fast，美国赛默飞世尔科技公司）上进行 qRT-PCR。所用引物为：*CYP19A1* 正

向 5′-TTGGAAATGCTGAACCCCAT-3′，反向 5′-CAAGAATCTGCCATGGGAAA-3′；*GAPDH* 正向 5′-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3′，反向 5′-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3′。循环条件包括初始变性后进行 40 个循环的变性、退火和延伸。以 *GAPDH* 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对 mRNA 表达量。每个样品分析 3 次。

1.10　Western-blot 分析　收集细胞并在冰上用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液（货号：P0013，上海碧云天生物技术有限公司）裂解 30 min。在 4 ℃下以 12 000 r/min 离心 30 min，收集上清液。使用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白检测试剂盒（货号：P0011，上海碧云天生物技术有限公司）测量蛋白浓度。每泳道取 30 μg 蛋白与上样缓冲液（货号：P0015，上海碧云天生物技术有限公司）混合，煮沸后通过 10% SDS-PAGE（BeyoGel™ Plus SDS-PAGE Hepes running buffer，货号：P0552，上海碧云天生物技术有限公司）分离，并使用湿转系统（VE-180，上海天能科技有限公司）和转渍缓冲液（货号：G2017-1L，武汉赛维尔生物科技有限公司）转移至 PVDF 膜（货号：IPVH00010，美国密理博公司）上。用 5%脱脂奶（货号：G2052，武汉赛维尔生物科技有限公司）在室温下封闭膜 1～2 h，在 4 ℃下与一抗孵育过夜：抗-CYP19A1（货号：ab35604，英国艾博抗公司，1∶1 000）和抗-GAPDH（货号：10494-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司，1∶5 000）。用 TBST 洗涤 3 次后，在室温下与 HRP 偶联的二抗（山羊抗兔 IgG，货号：SA00001-2，武汉三鹰生物技术有限公司，1∶5 000；或山羊抗鼠 IgG，货号：SA00001-1，武汉三鹰生物技术有限公司，1∶5 000）孵育 1～2 h。再次洗涤后，使用增强型化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）试剂（货号：36208ES76，上海翌圣生物科技有限公司）在化学发光成像系统（Tanon 5200，上海天能科技有限公司）上显影条带。使用 ImageJ 软件量化条带强度并以 GAPDH 为标准进行归一化。

1.11　CCK-8 实验检测细胞活力和增殖分析　将细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板的 100 μL 培养基中，贴壁过夜后用指定浓度的 KM 或 DMSO 处理。对于细胞活力评估，在处理 48 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂（货号：C0048M，上海碧云天生物技术有限公司）。对于增殖分析，在 0、48、96 h 加入 CCK-8 试剂，将板在 37 ℃、体积分数为 0.05 的 CO_2 条件下孵育 1.5 h，并使用酶标仪（Multiskan FC，美国赛默飞世尔科技公司）测量 450 nm 处的吸光度。每个条件设置 3 个重复孔，实验重复 3 次。

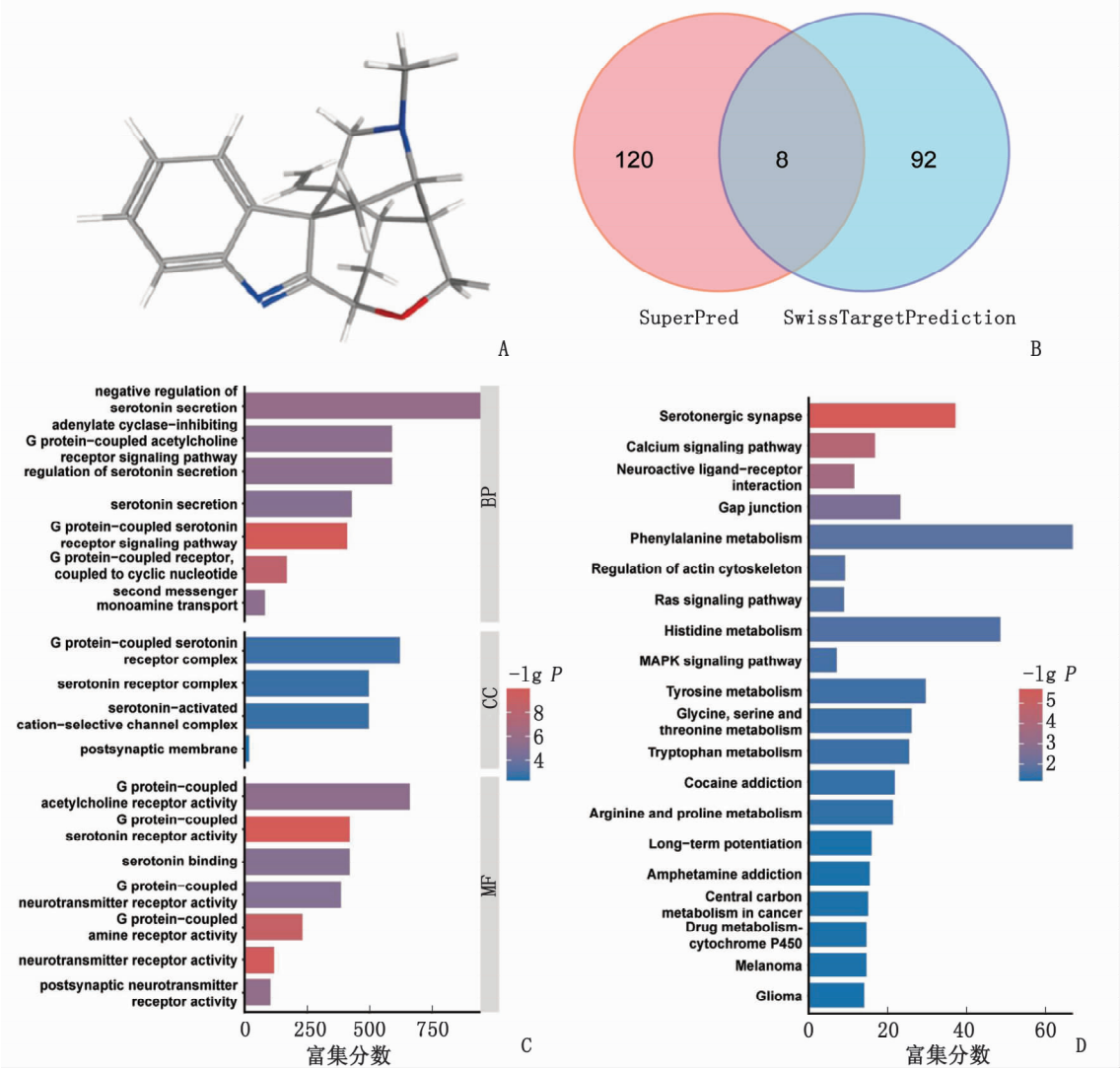
1.12　流式细胞术检测细胞凋亡　将接种于 6 孔板的细胞用 100 μg/mL 和 200 μg/mL 的 KM 或 DMSO 处理 48 h。通过不含乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetra-acetic acid，EDTA）的胰蛋白酶消化收集贴壁和悬浮细胞，用冰冷的 PBS 洗涤 2 次，并重悬于 1× Annexin V 结合缓冲液中。使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（货号：G1511-100T，武汉赛维尔生物科技有限公司）按制造商说明进行染色：加入 5 μL Annexin V-FITC，轻轻混合，在室温下避光孵育 15 min，再加入 5 μL PI 染色液，轻轻混合，避光孵育 5 min。立即使用流式细胞仪（FACS-Calibur，美国碧迪公司）分析染色后的细胞。使用 FlowJo 软件处理数据。Annexin V-FITC 阳性/PI 阴性的细胞归类为早期凋亡细胞，而 Annexin V-FITC 阳性/PI 阳性的细胞归类为晚期凋亡/坏死细胞。计算总凋亡率（包括早期凋亡和晚期凋亡）。

1.13　统计学处理　所有定量实验均独立进行至少 3 次。数据以 $\overline{X}\pm S$ 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）后行 Tukey's 事后检验。双侧检验，$P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2　结　果

2.1　KM 的靶点预测与通路富集分析　KM 的化学式为 $C_{20}H_{22}N_2O$，其化学结构如图 1A 所示。在线平台 SwissTargetPrediction 和 SuperPred 共鉴定出 220 个 KM 的潜在靶点，其中 8 个靶点为两者共有（图 1B）。对交集基因进行 GO 富集［分子功能（molecular function，MF）、细胞组分（cellular component，CC）和生物过程（biological process，BP）］和 KEGG 通路富集分析发现，“G 蛋白偶联受体”“钙信号通路和神经活性配体-受体相互作用”“MAPK 信号通路”等信号通路在 KM 靶基因中高度富集（图 1C、D）。

2.2　风险评分模型的构建与验证　为精炼基因选择，进行单变量生存分析，从中筛选出 23 个差别有统计学意义的差异表达基因（图 2A），其中 *NTRK3*（HR＝1.872，$P=0.014$）、*CYP19A1*（HR＝1.863，$P<0.001$）的高表达与更高的 GC 预后不良风险显著相关，相关性有统计学意义；其他基因如 *C5AR1*、*F2R* 和 *S1PR5* 等也有统计学意义（$P<0.05$）。使用



KM:钩吻素子;GO:基因本体论;KEGG:京都基因与基因组百科全书;BP:生物过程;CC:细胞组分;MF:分子功能。A:钩吻素子的化学结构式;B:SwissTargetPrediction 和 SuperPred 数据库预测的潜在靶点韦恩图;C:共有靶点的 GO 功能富集分析;D:KEGG 通路富集分析。

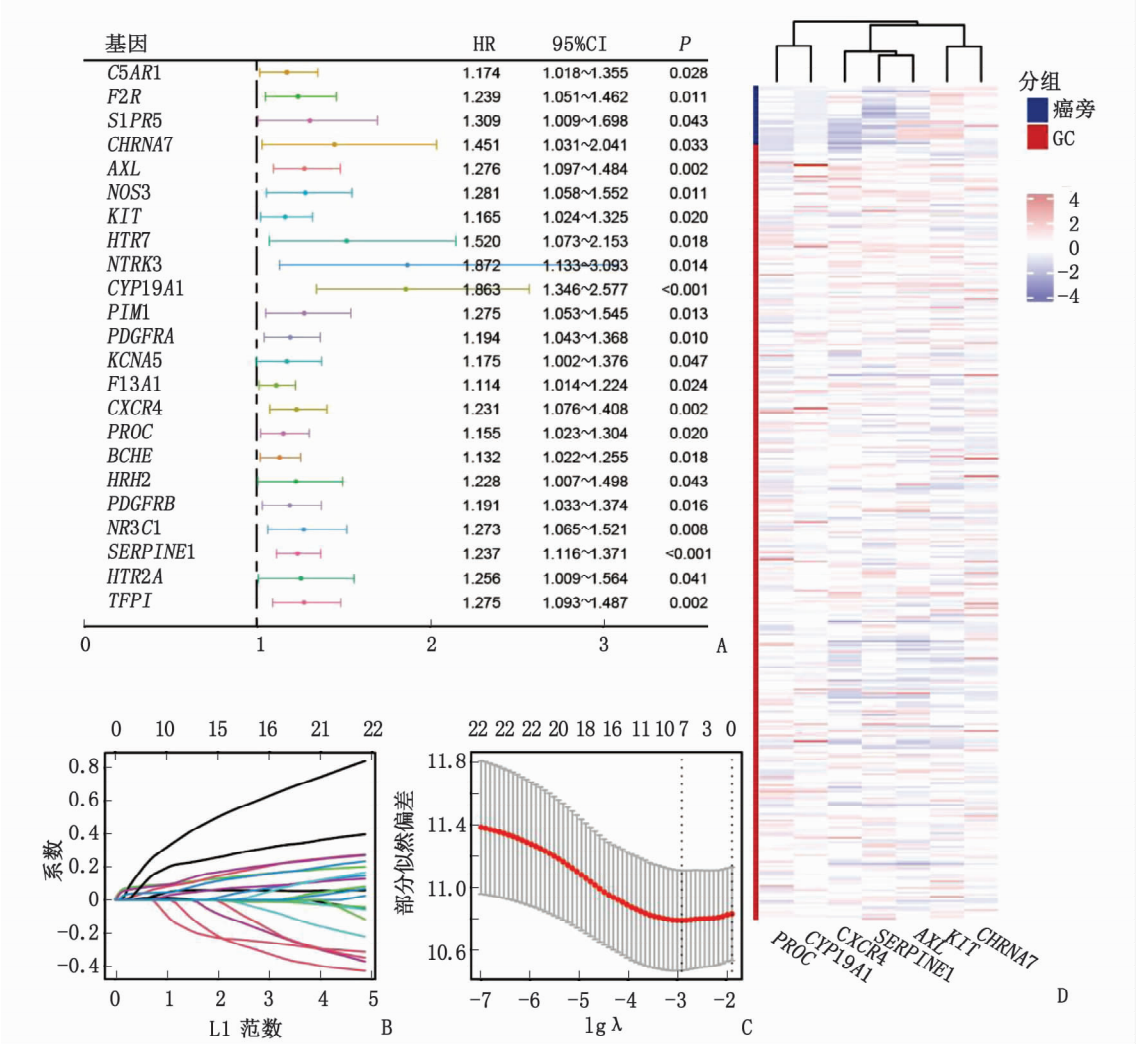
图 1 KM 的靶点预测与通路富集分析

Fig. 1 Target prediction and pathway enrichment analysis of KM

Lasso 分析进一步筛选出 7 个具有预后价值的基因(*SERPINE1*, *PROC*, *CXCR4*, *CYP19A1*, *KIT*, *AXL*, *CHRNA7*)用于构建生存风险模型(图 2B、C),其系数分别为 0.087 2、0.007 8、0.048 8、0.218 6、0.042 7、0.078 1 和 0.116 0。这 7 个特征基因在 GC 组织中的表达水平高于癌旁组织(图 2D)。

TCGA-STAD 队列的 GC 数据中,这 7 个基因在训练集和验证集的高风险组中均高表达,而在低风险组中低表达(图 3A、B)。生存分析表明,高风险组患者的总生存率显著低于低风险组,表明该模型具有良好的临床诊断价值(图 3C、D)。对 GC 组织与癌旁组织间差异表达基因的分析显示,在 GC 组织中有 2 999 个基因显著上调,421 个基因显著下调(图 3E)。GSEA 富集分析表明,"类固醇激素生物合成"信号通路在 GC 组织中显著下调(图 3F)。值得注意的是,在 GO 富集分析中,"免疫球蛋白介导的免疫应答""细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组织"等在 BP 类别中显著富集,而"含胶原蛋白的 ECM""ECM 结构成分"在 CC 和 MF 类别中富集(图 3G)。KEGG 通路的富集分析显示,"肌细胞中的细胞骨架""ECM-受体相互作用""补体与凝血级联"等通路显著富集(图 3H)。

2.3 KM 与 *CYP19A1* 相互作用及其对蛋白表达影响的研究 分子对接结果显示,KM 在 CYP19A1 蛋白结构的潜在活性位点口袋内稳定结合构象,表现出良好的结合能[$E_{binding}$ = (−28.53±2.13) kJ/mol,



GC：胃癌；Lasso：最小绝对收缩和选择算子。A：23 个与预后相关的候选基因的单变量 Cox 回归分析森林图；B、C：Lasso 回归分析的系数变化路径图(B)和部分似然偏差图(C)，用于筛选构建预后模型的最佳基因组合；D：7 个模型基因在 GC 组织和癌旁组织中的表达热图。

图 2　GC 预后基因筛选与模型验证

Fig. 2　Gene selection and model validation for GC prognosis

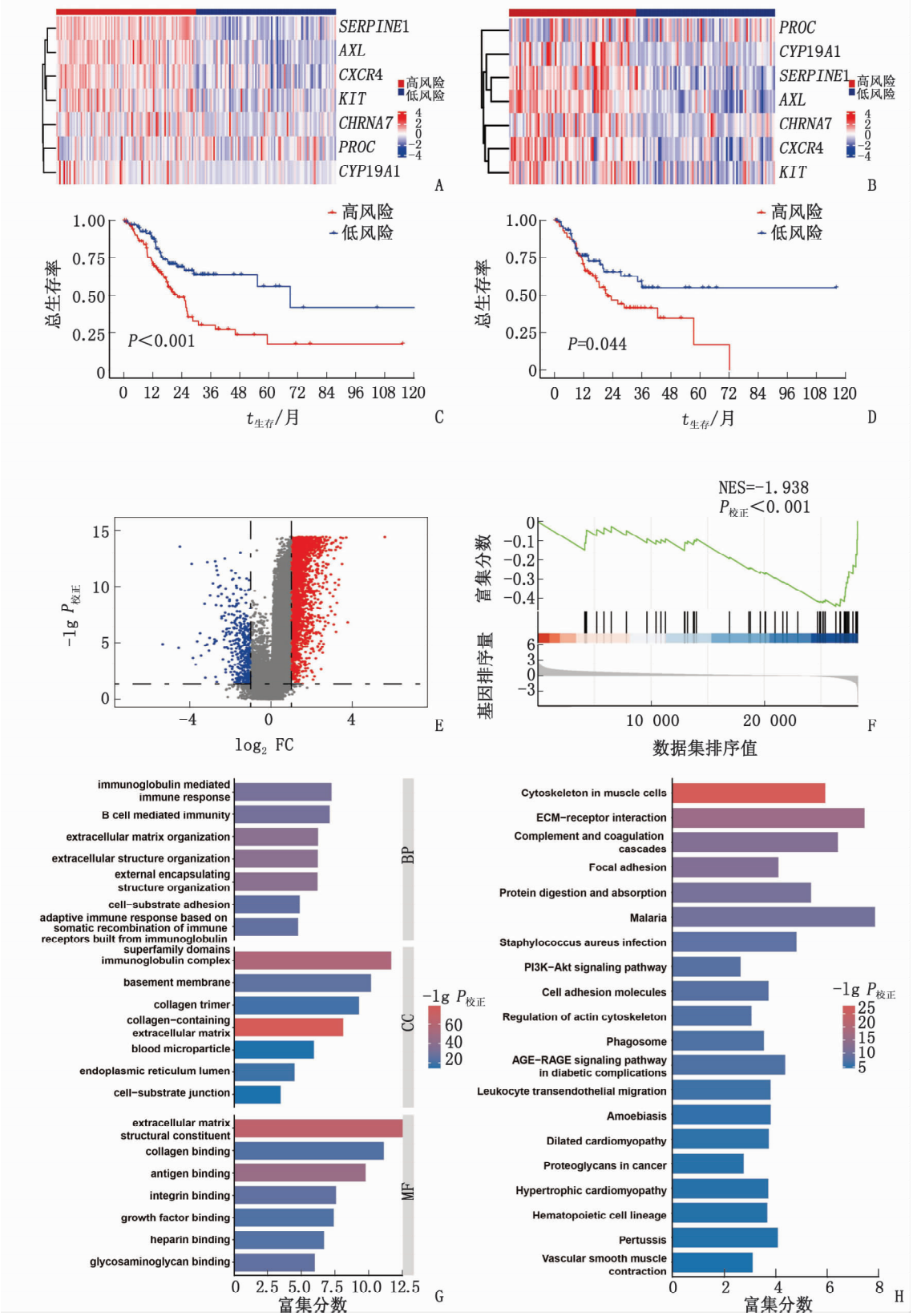
图 4A]。基于 *CYP*19*A*1 在 GC 预后模型中的高风险评分，以及其在肿瘤代谢与免疫调控中的关键作用，本研究选定 *CYP*19*A*1 作为后续机制探讨的核心靶点。

SPR 分析结果显示，KM 与 *CYP*19*A*1 以剂量依赖的方式直接结合(图 4B)，K_D 为(38.89 ± 2.10) μmol/L(图 4C)，从而证实了物理相互作用。qRT-PCR 结果显示，与对照组比较，用不同浓度的 KM(100、200 μg/mL)处理并未显著改变 *CYP*19*A*1 的 mRNA 表达水平(图 4D)。Western-blot 分析显示，KM 处理(100、200 μg/mL)导致 MKN28 和 AGS 细胞中的 CYP19A1 蛋白水平呈剂量依赖性降低(图 4E)。

2.4　靶向 *CYP*19*A*1 和 KM 处理在 GC 细胞中的功能效应　为进一步阐明 *CYP*19*A*1 在 GC 中的功能作用并评估 KM 的影响，使用 MKN28 和 AGS 细胞系建立 *CYP*19*A*1 过表达(OE-*CYP*19*A*1)的 GC 细胞模型，并在 mRNA 和蛋白水平均成功确认了过表达(图 5A、B)。功能性检测结果显示，KM 显著抑制 OE-Ctrl 和 OE-*CYP*19*A*1 细胞的活力及增殖(图 5C、D)。此外，流式细胞术分析表明，KM 处理显著诱导了 2 种细胞系的凋亡，但 *CYP*19*A*1 的过表达显著逆转了 KM 的促凋亡作用(图 5E)。

3　讨　论

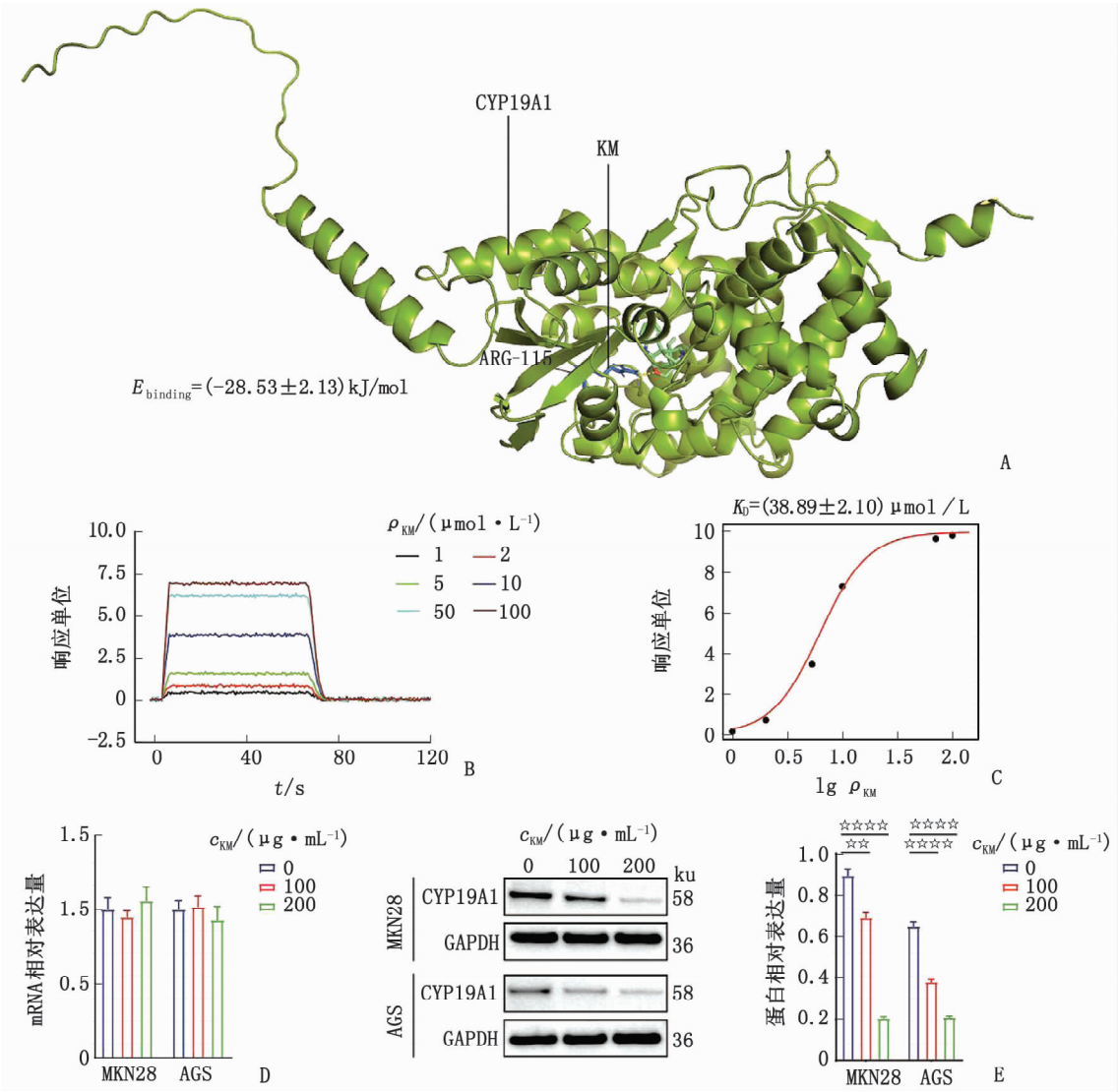
多数 GC 患者确诊时已进展至晚期，治疗方案选择有限、预后效果不佳[16-17]，亟须探索新的有效治疗策略。钩吻作为中医药典籍中记载的抗肿瘤药物，其活性成分 KM 已被分离鉴定，且展现出低毒、广谱的抗肿瘤潜力[18-21]。然而，KM 抗 GC 的具体



GC：胃癌；GSEA：基因集富集分析；GO：基因本体论；KEGG：京都基因与基因组百科全书；FC：差异倍数；NES：标准化富集分数；ECM：细胞外基质。A、B：7 个预后基因在训练集（A）和验证集（B）高、低风险组中的表达热图；C、D：训练集（C）和验证集（D）高、低风险组的 Kaplan-Meier 生存曲线分析；E：GC 与癌旁组织差异表达基因的火山图；F：GSEA 结果显示“类固醇激素生物合成”信号通路在 GC 中受抑制；G、H：高、低风险组间差异表达基因的 GO 功能富集分析（G）和 KEGG 通路富集分析（H）。

图 3 风险评分模型的验证及基因表达谱分析

Fig. 3 Validation of the risk-score model and gene expression profiles



n=3。KM：钩吻素子；SPR：表面等离子共振；K_D：平衡解离常数。A：分子对接模拟显示 KM 与 CYP19A1 蛋白活性位点的结合模式；B：SPR 分析显示不同浓度 KM 与 CYP19A1 蛋白的实时结合响应曲线；C：根据 SPR 数据计算得到的稳态结合亲和力曲线；D：qRT-PCR 法检测不同浓度 KM(0、100、200 μg/mL)处理后 MKN28 和 AGS 细胞中 *CYP*19*A*1 的相对 mRNA 表达水平；E：Western-blot 法及定量分析检测不同浓度 KM(0、100、200 μg/mL)处理后 MKN28 和 AGS 细胞中 CYP19A1 蛋白的表达水平。与对照组(0 μg/mL)比较，☆☆：P<0.01，☆☆☆☆：P<0.000 1。

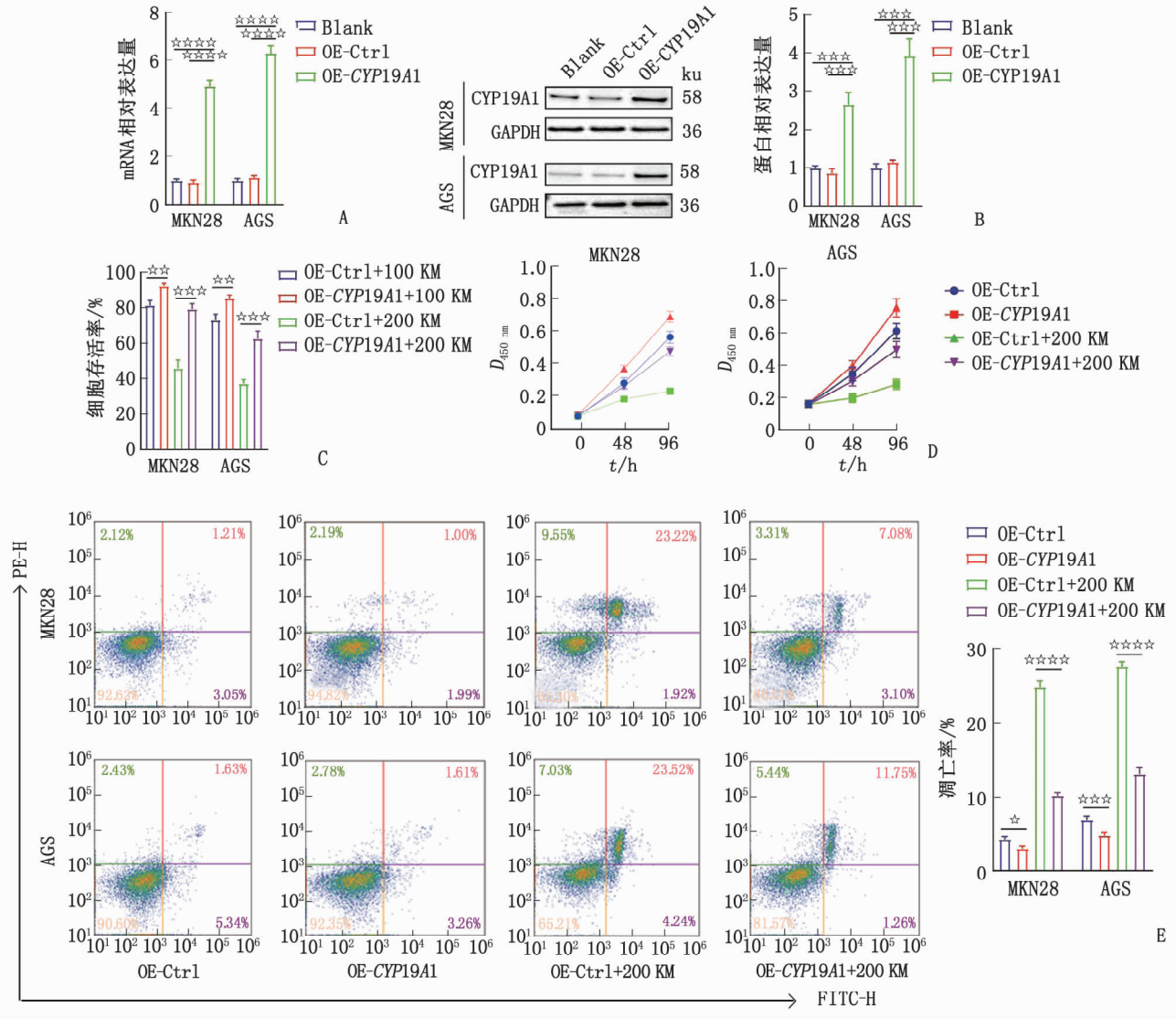
图 4　KM 与 *CYP*19*A*1 的相互作用及其对表达的影响

Fig. 4　Interaction between KM and *CYP*19*A*1 and its effect on expression

作用机制尚不明确。为此，本研究通过 TCGA 数据库初步筛选出 KM 的 220 个候选靶点，经生物信息学分析，进一步筛选出 *SERPINE*1、*PROC*、*CXCR*4、*CYP*19*A*1、*KIT*、*AXL* 和 *CHRNA*7 等 7 个关键预后基因。基于 TCGA-STAD 队列构建的预后风险模型显示，*CYP*19*A*1 贡献度最高(系数=0.218 6)，且该模型在训练集与验证集中均能有效区分患者预后(1、3、5 a 生存曲线 P 均<0.05)，具有良好的预测效能。

差异表达基因分析显示，GC 组织中有 2 999 个显著上调基因和 421 个下调基因。GSEA 富集分析表明“类固醇激素生物合成”信号通路显著下调，而 GO 和 KEGG 分析分别揭示了“免疫球蛋白介导的免疫应答”(BP)、“含胶原蛋白的 ECM”(CC)、“ECM-受体相互作用”以及“补体与凝血级联”(KEGG)通路显著富集。值得注意的是，作为类固醇代谢关键酶的 *CYP*19*A*1 高表达可能通过调节激素微环境和 ECM 重塑促进 GC 进展。分子对接结果显示，KM 与 CYP19A1 蛋白表现出较佳的结合能[$E_{binding}$=(−28.53 ±2.13) kJ/mol]。结合其在预后模型中的高风险权重及功能富集分析，提示 *CYP*19*A*1 可能是 KM 发挥抗 GC 作用的关键靶点。

芳香化酶是一种细胞色素 P450 家族酶，其中 *CYP*19*A*1 是其关键编码基因，主要在胎盘、卵巢、



$n=3$。GC:胃癌;KM:钩吻素子;OE-Ctrl:转染空载体的对照组;OE-*CYP*19*A*1:转染 *CYP*19*A*1 过表达质粒组。A、B:qRT-PCR 法(A)和 Western-blot 法(B)验证 MKN28 和 AGS 细胞中 *CYP*19*A*1 的过表达效率;C:CCK-8 法检测 KM(100、200 μg/mL)处理 48 h 后各组细胞的存活率;D:CCK-8 法检测 KM(200 μg/mL)处理后各组细胞在 0、48、96 h 的增殖情况;E:流式细胞术检测 KM(200 μg/mL)处理 48 h 后各组细胞的凋亡率及代表性散点图。组间比较,☆:$P<0.05$,☆☆:$P<0.01$,☆☆☆:$P<0.001$,☆☆☆☆:$P<0.0001$。

图 5 *CYP*19*A*1 过表达对于 GC 细胞对 KM 敏感性的影响

Fig. 5 Effect of *CYP*19*A*1 overexpression on the sensitivity of GC cells to KM

睾丸和脂肪组织中表达,能将雄激素转化为雌激素。研究表明,在结肠癌组织中,*CYP*19*A*1 与程序性死亡受体配体 1(programmed death-ligand 1, PD-L1)的表达呈正相关,抑制 *CYP*19*A*1 可通过 GPR30-AKT 信号通路下调 PD-L1、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)水平,从而增强 $CD8^+$ T 细胞介导的抗肿瘤免疫应答[22]。ZHOU 等[23]的研究揭示,*CYP*19*A*1 作为脂质代谢相关基因特征的一部分促进 GC 进展,与免疫治疗反应和预后显著相关,具有作为 GC 预后生物标志物的潜力。YANG 等[24]的临床前研究证实,芳香化酶抑制剂依西美坦可通过下调芳香化酶显著抑制 GC 细胞生长。此外,天然化合物熊果酸同样能够通过沉默 *CYP*19*A*1 表达抑制 GC 生长[25],进一步支持了芳香化酶作为 GC 治疗靶点的可行性。

本研究通过 SPR 技术评估了 KM 与靶蛋白 CYP19A1 的结合特性,软件拟合得到的平衡解离常数 K_D 为(38.89 ± 2.10)μmol/L,提示了高亲和力的靶向作用。Western-blot 结果显示,在 MKN28 和 AGS 细胞中,KM 处理导致 CYP19A1 蛋白水平呈剂量依赖性显著降低,提示 KM 与 CYP19A1 的直接结合与其蛋白水平下降相关,可能涉及转录后调控过程,从而影响其在 GC 细胞中的表达。为了

进一步阐明 *CYP*19*A*1 在 GC 中的功能作用并评估 KM 的效果，本研究建立了 *CYP*19*A*1 过表达（OE-*CYP*19*A*1 组）的 GC 细胞模型。在 MKN28 和 AGS 细胞中，过表达 *CYP*19*A*1 显著提高了其 mRNA 及其蛋白的表达水平。经 KM 处理的过表达 *CYP*19*A*1 的细胞存活率呈剂量依赖性显著增加，表明 *CYP*19*A*1 的高表达促进了 GC 细胞的增殖，削弱了 KM 对凋亡的促进作用。这一结果与在预后模型中发现 *CYP*19*A*1 为高风险基因（HR＝1.863，$P<0.001$）的结论一致，进一步支持了其促癌作用。

GSEA 富集分析显示，“类固醇激素生物合成”信号通路在 GC 组织中显著下调，而该通路关键酶 *CYP*19*A*1 的过表达可能通过激活雌激素受体（estrogen receptor，ER）信号，促进细胞增殖。KM 处理导致 CYP19A1 蛋白表达水平的下调，可能抑制雌激素生成，在一定程度上逆转其促癌作用。GO 和 KEGG 分析显示，*CYP*19*A*1 的高表达与“ECM-受体相互作用”和“补体与凝血级联”通路密切相关，*CYP*19*A*1 可能通过调节 ECM 成分（如胶原蛋白）影响肿瘤侵袭，并通过免疫抑制微环境（如 M0 巨噬细胞富集）促进免疫逃逸。GC 细胞通过激活 TGF-β1/Smad2/3 信号通路驱动癌症相关成纤维细胞（cancer-associated fibroblasts，CAFs）上调透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白 1（hyaluronan and proteoglycan link protein 1，HAPLN1）表达，而 CAFs 衍生的 *HAPLN*1 通过重塑 ECM 增强肿瘤迁移和侵袭性，从而显著加剧肿瘤的恶性进展[26]。

本研究结果初步提示，KM 通过与 *CYP*19*A*1 相互作用并下调 CYP19A1 蛋白水平，可能是其发挥抗 GC 作用的重要机制之一。目前的数据基于细胞实验，未来需要通过动物模型验证 KM 的体内疗效及其对 *CYP*19*A*1 的靶向性，重点研究 KM 介导的调控 *CYP*19*A*1 所涉及的精确信号通路，为 GC 治疗提供新的策略。同时，本研究的局限性在于未通过敲低或敲除 *CYP*19*A*1 进一步验证其在 KM 抗 GC 作用中的必要性。未来研究应利用成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9，CRISPR/Cas9）技术，明确 *CYP*19*A*1 在 KM 介导的抗肿瘤效应中的功能地位，以增强结论的可靠性。

综上所述，本研究通过生物信息学分析、预后建模和分子对接发现，KM 靶向 *CYP*19*A*1 并可能影响 GC 预后。功能实验证实 KM 可抑制 GC 细胞增殖并诱导凋亡，而 SPR 和 Western-blot 结果进一步揭示了 KM 以剂量依赖性方式直接结合并下调 CYP19A1 蛋白水平，提示其可能通过转录后调控机制发挥抗 GC 作用。

参考文献：

[1] SMYTH E C，NILSSON M，GRABSCH H I，et al. Gastric cancer[J]. Lancet，2020，396(10251)：635-648.

[2] 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.

[3] GUAN W L，HE Y，XU R H. Gastric cancer treatment：Recent progress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol，2023，16(1)：57.

[4] THRIFT A P，EL-SERAG H B. Burden of gastric cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2020，18(3)：534-542.

[5] JANJIGIAN Y Y，AJANI J A，MOEHLER M，et al. First-line Nivolumab plus chemotherapy for advanced gastric，gastroesophageal junction，and esophageal adenocarcinoma：3-year follow-up of the phase Ⅲ CheckMate 649 trial[J]. J Clin Oncol，2024，42(17)：2012-2020.

[6] ZHANG Y，HAN C，LI J，et al. Efficacy and safety for Apatinib treatment in advanced gastric cancer：A real world study[J]. Sci Rep，2017，7(1)：13208.

[7] LIN H L，LIU J P，TANG Y L，et al. Koumine alters immune barrier function by targeting TGFβ-mediated collagen deposition in gastric cancer[J]. Eur J Pharmacol，2025，1004：177954.

[8] LIN Y R，LIU Q，CHEN Z H，et al. The immunomodulatory effect of koumine on B cells under dependent and independent responses by T cells[J]. Eur J Pharmacol，2022，914：174690.

[9] XU Y，QIU H Q，LIU H，et al. Effects of koumine，an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth.，on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone[J]. Pharmacol Biochem Behav，2012，101(3)：504-514.

[10] SUN M X，CUI Y，LI Y，et al. Indole alkaloids from *Gelsemium elegans*[J]. Phytochemistry，2019，162：232-240.

[11] JIN G L，SU Y P，LIU M，et al. Medicinal plants of the genus *Gelsemium*（Gelsemiaceae，Gentianales）：A review of their phytochemistry，pharmacology，toxicology and traditional use[J]. J Ethnopharmacol，2014，152(1)：33-52.

[12] WANG L，XU H L，LIANG J W，et al. An integrated network，RNA sequencing，and experiment pharmacology approach reveals the active component，potential target，and mechanism of *Gelsemium elegans* in the treatment of colorectal cancer[J]. Front Oncol，2020，10：616628.

[13] XU Y K，YANG L，LIAO S G，et al. Koumine，humantenine，and yohimbane alkaloids from *Gelsemium elegans*[J]. J Nat Prod，2015，78(7)：1511-1517.

[14] ZHANG X H，CHEN Y，GAO B，et al. Apoptotic effect of koumine on human breast cancer cells and the mechanism involved[J]. Cell Biochem Biophys，2015，72(2)：411-416.

[15] YUAN Z H, LIANG Z G N, YI J N, et al. Koumine promotes ROS production to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation *via* NF-κB and ERK/p38 MAPK signaling[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 559.

[16] DESIDERIO J, CHAO J, MELSTROM L, et al. The 30-year experience: A Meta-analysis of randomised and high-quality non-randomised studies of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of gastric cancer[J]. Eur J Cancer, 2017, 79: 1-14.

[17] PILONIS N D, TISCHKOWITZ M, FITZGERALD R C, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: Approaches to screening, surveillance, and treatment[J]. Annu Rev Med, 2021, 72: 263-280.

[18] WANG L, CHEN S Y, GAO X, et al. Recent progress in chemistry and bioactivity of monoterpenoid indole alkaloids from the genus *Gelsemium*: A comprehensive review[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2023, 38(1): 2155639.

[19] SCHUN Y, CORDELL G A. Cytotoxic steroids of *Gelsemium sempervirens*[J]. J Nat Prod, 1987, 50(2): 195-198.

[20] SHOAIB R M, ZHANG J Y, MAO X F, et al. Gelsemine and koumine, principal active ingredients of *Gelsemium*, exhibit mechanical antiallodynia *via* spinal glycine receptor activation-induced allopregnanolone biosynthesis [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 161: 136-148.

[21] XU W B, TANG M H, LONG J Y, et al. Antinociceptive effect of gelsenicine, principal toxic alkaloids of *Gelsemium*, on prostaglandin E2-induced hyperalgesia in mice: Comparison with gelsemine and koumine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 681: 55-61.

[22] LIU L L, MO M, CHEN X H, et al. Targeting inhibition of prognosis-related lipid metabolism genes including *CYP*19*A*1 enhances immunotherapeutic response in colon cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 85.

[23] ZHOU X Y, MENG F Y, XIAO L M, et al. *CYP*19*A*1 promotes gastric cancer as part of a lipid metabolism-related gene signature related to the response of immunotherapy and prognosis[J]. BMC Med Genomics, 2023, 16(1): 228.

[24] YANG J C, CHANG N, WU D C, et al. Preclinical evaluation of exemestane as a novel chemotherapy for gastric cancer[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11): 7417-7426.

[25] MA W L, CHANG N, YU Y C, et al. Ursolic acid silences *CYP*19*A*1/aromatase to suppress gastric cancer growth[J]. Cancer Med, 2022, 11(14): 2824-2835.

[26] ZHANG T C, LI X, HE Y N, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived *HAPLN*1 promotes tumour invasion through extracellular matrix remodeling in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2022, 25(2): 346-359.

From Computational Modeling to Experimental Validation: Mechanism of Koumine Targeting *CYP*19*A*1 for Gastric Cancer Treatment

LIN Hailing[1], SHI Lingfei[1], ZHAN Yinghao[1], QUE Wancai[1,2]

1. Department of Pharmacy, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China;

2. Phase Ⅰ Clinical Trial Unit, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

ABSTRACT: **Objective** To systematically investigate the specific mechanism of action and antitumor efficacy of koumine (KM), the primary active component of the traditional herb *Gelsemium elegans*, in gastric cancer. **Methods** A combination of computational methods including target prediction, bioinformatics analysis of the cancer genome atlas (TCGA) data, and molecular docking was employed to screen potential targets of KM and construct a gastric cancer prognosis risk model. *In vitro* cellular function assays evaluated antitumor of KM effects by assessing viability, proliferation, and apoptosis in gastric cancer cell lines (MKN28 and AGS). Surface plasmon resonance (SPR), qRT-PCR, and Western-blot analysis were employed to elucidate molecular mechanisms of KM in the interaction and regulation with the key target *CYP*19*A*1. **Results** Bioinformatics analysis and the prognostic model identified *CYP*19*A*1 as a key potential target and a high-risk factor associated with poor prognosis in gastric cancer. *In vitro* experiments demonstrated that KM significantly inhibited proliferation and viability of MKN28 and AGS cells while inducing apoptosis; these effects persisted even in the presence of *CYP*19*A*1 overexpression. Mechanistically, KM was confirmed to directly bind CYP19A1 protein and downregulate its expression at the post-transcriptional level. **Conclusion** This study provides evidence for the therapeutic potential of KM against gastric cancer, with *CYP*19*A*1 likely serving as a key target mediating anti-cancer activity of KM.

KEY WORDS: koumine; gastric cancer; *CYP*19*A*1; molecular docking; apoptosis

（编辑：陈雨佳）