

基于网络药理学、分子对接技术和实验验证探究羽扇豆醇对肝癌 HepG2 细胞的作用机制

王 琦¹, 杨志剑², 孙佳杨¹, 罗雅馨¹, 杨冰宇¹, 穆浩然¹, 卜 明^{3*}, 纪 慧^{1*}

1. 齐齐哈尔医学院 基础医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2. 齐齐哈尔医学院附属第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161041

3. 齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接技术和实验验证探究羽扇豆醇对肝癌 HepG2 细胞的作用机制。**方法** 采用网络药理学对羽扇豆醇作用靶点进行筛选, 构建靶点网络及蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 对羽扇豆醇抗肝癌潜在的作用靶点及相关通路进行预测。采用 MTT 法检测羽扇豆醇对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制活性, 采用酶标仪检测细胞内 Ca^{2+} 浓度, 流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测细胞内细胞的凋亡情况、线粒体膜电位、活性氧水平的变化情况; 通过 Western blotting 法检测羽扇豆醇对钙调蛋白 (CaM)、兰尼碱受体 (RyR)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt C)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 蛋白表达水平的影响。**结果** 通过网络药理学预测, 得出羽扇豆醇与肝癌有 134 个共同靶点; KEGG 富集分析结果显示羽扇豆醇治疗肝癌潜在靶点主要富集在化学致癌-受体激活、钙信号通路、PI3K/Akt 信号通路等信号通路; MTT 结果显示, 与对照组相比, 羽扇豆醇组 HepG2 细胞的活性明显降低, 呈时间-浓度相关趋势; 羽扇豆醇能够抑制肝癌细胞 HepG2 集落形成; 采用 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇作用 HepG2 细胞 48 h 后, HepG2 细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高, 总凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 线粒体膜电位均显著降低, 活性氧水平均显著升高; 此外, HepG2 细胞经过羽扇豆醇处理后, 细胞内 RyR、CaM、Cyt C、Bax 的表达水平上升, p-PI3K、p/Akt、Bcl-2 蛋白的表达水平下降。**结论** 羽扇豆醇可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖, 减少集落形成, 其机制可能是钙离子浓度升高, 激活 PI3K/Akt 信号通路从而介导线粒体凋亡。

关键词: 羽扇豆醇; 肝癌; 网络药理学; 分子对接; 钙离子浓度; 线粒体凋亡

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)05-1122-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.05.005

Mechanism of lupeol on hepatocellular carcinoma HepG2 cells based on network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification

WANG Qi¹, YANG Zhijian², SUN Jiayang¹, LUO Yaxin¹, YANG Bingyu¹, MU Haoran¹, BU Ming³, JI Hui¹

1. College of Basic Medical, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

2. The First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161041, China

3. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

Abstract: Objective To investigate the targets and mechanisms of lupeol on hepatocellular carcinoma HepG2 cells based on network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification. **Methods** Network pharmacology was employed to screen the potential targets of lupeol, construct target networks and protein-protein interaction (PPI) networks, and predict the potential targets and related pathways of lupeol in anti-liver cancer activity. The inhibitory effect of lupeol on the proliferation of HepG2 liver cancer cells was assessed using the MTT assay. Intracellular Ca^{2+} concentration was measured using a microplate reader. Flow cytometry and confocal laser microscopy were used to detect changes in cell apoptosis, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species (ROS) levels. Western blotting was performed to examine the effects of lupeol on the expression levels of calmodulin

收稿日期: 2025-03-04

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动金项目 (LBH-QY24003)

作者简介: 王 琦 (2005—), 女, 本科, 主要从事天然药物抗肿瘤作用研究。

*通信作者: 卜 明, 副教授。E-mail: buming@qmu.edu.cn

纪 慧, 教授。E-mail: jihui0068@163.com

(CaM), ryanodine receptor (RyR), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt C), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), serine-threonine kinase (Akt), and mammalian target of rapamycin (mTOR). **Results** Network pharmacology analysis predicted 134 common targets between lupeol and liver cancer. KEGG enrichment analysis revealed that the potential targets of lupeol in liver cancer treatment were mainly enriched in pathways such as chemical carcinogenesis-receptor activation, calcium signaling pathway, and PI3K/Akt signaling pathway. MTT results demonstrated that compared to the control group, the viability of HepG2 cells in the lupeol group significantly decreased in a time- and concentration-dependent manner. Lupeol inhibited the colony formation of HepG2 cells. After treating HepG2 cells with 50, 75, and 100 $\mu\text{mol/L}$ lupeol for 48 hours, intracellular Ca^{2+} concentration, total apoptosis rate, and ROS levels significantly increased, while mitochondrial membrane potential significantly decreased. Additionally, after lupeol treatment, the expression levels of RyR, CaM, Cyt C, and Bax in HepG2 cells were upregulated, while the expression levels of p-PI3K, p-Akt, and Bcl-2 were downregulated. **Conclusion** Lupeol inhibits the proliferation and colony formation of HepG2 liver cancer cells. Its mechanism may involve increased intracellular Ca^{2+} concentration, activation of the PI3K/Akt signaling pathway, and induction of mitochondrial apoptosis.

Key words: lupeol; carcinoma; network pharmacology; molecular docking; calcium ion concentration; mitochondrial apoptosis

肝癌在全球恶性肿瘤中的发病率和死亡率持续处于高位,早期症状不明显、病情发展快且治疗选择有限。目前常用的治疗手段包括手术、化疗和放疗,虽能有效治疗病症,但往往伴随明显的不良反应,且复发率较高。探索天然产物中的新型抗肝癌药物具有重要的研究价值。

植物提取羽扇豆醇具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等生物活性,其在抗肝癌方面的潜在作用机制逐渐成为研究焦点。唐泽严等^[1]研究表明羽扇豆醇能够通过介导半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 活化抑制人肝癌 Huh-7 细胞的增殖,激活凋亡基因的表达,促进细胞凋亡,同时,羽扇豆醇能够抑制 c-Jun miR-21 通路,通过启动子活性调控作用下调该通路下游靶基因基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达,以此抑制 Huh-7 细胞的侵袭转移。史春雨等^[2]研究发现,羽扇豆醇可通过增加 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中 p38 和丝裂原活化蛋白激酶 1 基因和蛋白,降低细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、c-Jun 和 c-骨髓细胞瘤基因 (c-MYC) mRNA 和蛋白水平,诱导肝癌 HepG2、Huh7 细胞凋亡。刘博佳等^[3]实验证明羽扇豆醇可能通过调控上皮-间充质转化过程抑制肝癌细胞侵袭转移。研究表明羽扇豆醇抗肝癌主要通过其活化 ERK 信号通路,以及促 p-ERK 蛋白表达抑制肝癌细胞增殖、诱导肝癌细胞凋亡和抑制肝癌细胞迁移、侵袭等^[4-5]。羽扇豆醇在抗肝癌作用机制的研究中尚不全面,而在运用网络药理学结合分子对接技术整合多源数据,系统地探索药物作用机制与疾病发生发展的内在联系,是一种全面、深入解析羽扇豆醇对 HepG2 细胞作用机制的有效手段。

传统药物研究往往聚焦于单一靶点,网络药理学则是从整体网络角度出发,通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络,全面分析药物各化学成分与多个作用靶点之间的复杂关系,以及疾病相关基因的关联。在此基础上,分子对接技术能够直观地展示药物分子与靶点之间的结合细节,为解释药物的作用机制提供分子层面的依据。许多研究表明网络药理学与分子对接技术有助于深入理解药物在体内的作用全貌,避免因单靶点研究而忽略药物的整体功效^[6-7]。两者相互补充、协同作用,为药物研究开辟了新的途径,有望推动药物研发取得更多突破。

钙离子在细胞中具有多方面重要作用,可作为第二信使,进一步激活下游的信号分子,如钙调蛋白等,引发细胞的各种生理反应,进而调控细胞的生长、增殖与分化,这些过程对维持生命的正常运转至关重要。在肌肉收缩方面,骨骼肌以及心肌的收缩过程都高度依赖钙离子。在细胞分泌活动中,钙离子同样发挥着精准的调控作用。从胰岛 β 细胞分泌胰岛素来维持血糖平衡,到神经元释放神经递质实现信息传递,每一个环节都离不开钙离子的参与^[8-11]。线粒体作为细胞的“能量工厂”,在细胞凋亡中扮演着关键角色。钙离子浓度的变化对细胞线粒体凋亡的影响尤为显著。正常情况下,细胞内的钙离子浓度维持在一个相对稳定的水平,当细胞受到凋亡诱导因素刺激时,钙离子稳态被打破,细胞外的钙离子大量内流,同时细胞内钙库(如内质网)也会释放钙离子,导致细胞内钙离子浓度急剧升高。过高的钙离子浓度会使线粒体膜的通透性发生改变,引发线粒体膜电位的下降,线粒体释放细胞色素 C 等凋亡相关因子,这些因子进一步激活胱天蛋

白酶家族,启动细胞凋亡的级联反应,最终导致细胞走向凋亡^[11-12]。

本研究通过网络药理学以及分子对接技术深入研究羽扇豆醇在抗肝癌中的作用机制,探讨羽扇豆醇作用肝癌细胞后钙离子浓度变化对线粒体凋亡的影响,通过揭示钙离子介导的线粒体凋亡机制,有望找到新的治疗靶点,开发出更有效的治疗手段。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞(批号 TCH-C196)购自泉州海星生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

羽扇豆醇(质量分数>98%)由齐齐哈尔医学院药学院药物化学研究室提供;DMEM 培养基(批号 CM10013)购自中科迈晨(北京)科技有限责任公司;胎牛血清(批号 086-150)购自维森特生物技术(南京)有限公司;MTT 试剂盒(批号 E606334)购自广州赛维儿生物科技有限公司;Fluo-4/AM 荧光探针(批号 S1056)购自;EDTA(批号 A011015)购自安徽泽升科技股份有限公司;Ionomycin(批号 56092-81-0)购自上海吉至生化科技有限公司;AO/EB 试剂盒(批号 E607308)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号 KGA107)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;JC-1 试剂盒(批号 abs50016)购自北京爱必信生物技术有限公司;活性氧检测试剂盒(批号 CA1410)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA 试剂盒(批号 E112-01)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;RIPA 裂解液(批号 20115E)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;4%多聚甲醛固定液(批号 BL539A)购自合肥白鲨生物科技有限公司;结晶紫水溶液(批号 RS1062)购自金克隆(北京)生物技术有限公司;钙调蛋白(CaM)抗体(批号 35944T)、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)抗体(批号 3498S)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(批号 5023S)、细胞色素 C(Cyt C)抗体(批号 4280S)、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(批号 5174S)、蛋白激酶 B(Akt)抗体(批号 9272S)、磷酸化的 Akt(p-Akt)抗体(批号 4060S)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抗体(批号 4249S)、磷酸化的 PI3K(p-PI3K)抗体(批号 4228S)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;2 型兰尼碱受体(RyR2)抗体(批号 19765-1-AP)、山羊抗兔 IgG 二抗(批号 RGAR001)购自武

汉三鹰生物有限公司;ECL 显色试剂盒(批号 36208ES)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.3 仪器

Heracell™ VIOS 160iCO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);Epoch 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);LSM 880 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);PowerPac 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);WB-600Auto 全自动蛋白印迹成像仪(广州博鹭腾生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 羽扇豆醇药物靶点获取

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PharmMapper 数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)、SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>)预测出与羽扇豆醇所对应的作用靶位,并通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化处理。

2.2 肝癌疾病靶点获取

以“liver cancer”为关键词,在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)和在线人类孟德尔遗传资料库(OMIM, <http://OMIM.org/>)中对肝癌靶点进行检索。利用 Venny 平台对羽扇豆醇靶点与肝癌靶点取交集,获取羽扇豆醇治疗肝癌的潜在靶点信息。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析和核心靶点获取

基于 2.2 项下获得的交集靶点数据,采用 STRING 数据库构建 PPI 网络,并利用其功能模块进行分析。将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,结合“Network Analyzer”工具及 Centiscape 2.2 插件对网络进行拓扑分析,筛选核心靶点并绘制 PPI 网络图。

2.4 基因本体(GO)功能富集及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

基于 2.3 项下筛选的核心靶点,利用 Metascape 平台进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。通过微生信平台对 GO 以及 KEGG 富集结果按 *P* 值排序,分析生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF),并绘制通路富集气泡图。

2.5 分子对接

从 PubChem 数据库获取羽扇豆醇的 3D 分子结构,并通过 AutoDockTools 软件对其进行预处理。同时,从 PDB 数据库中提取相关靶蛋白结构,运用 PyMOL 软件去除原蛋白结构中的配体分子和非蛋

白组分, 随后使用 AutoDockTools 软件进行加氢、电荷分配及总电荷计算等操作。对接完成后, 采用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化呈现。

2.6 细胞培养及 MTT 法检测细胞活力

HepG2 细胞在含 10% FBS 及 1% 双抗 (青霉素 - 链霉素) 的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。将处于对数生长期的 HepG2 细胞以每孔 3×10^3 个接种于 96 孔板, 待细胞完全贴壁后弃去培养基。实验设对照组及 5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇组, 每孔加入 150 μL 相应含药培养基, 对照组加入等体积 DMEM 培养基。分别干预 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 弃去培养液, 加入 150 μL DMSO, 振荡混匀后于 490 nm 波长下测定吸光度 (A) 值。采用 SPSS 25.0 软件计算羽扇豆醇对 HepG2 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.7 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定

将 HepG2 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后进行实验分组, 包括对照组及羽扇豆醇 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 组。干预 48 h 后弃去培养基, PBS 洗涤, 加入 Fluo-4/AM 染色液, 室温避光孵育 20 min。使用酶标仪检测荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 530 nm, 计算细胞内 Ca^{2+} 浓度。

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot F - F_{\min} / F_{\max} - F$$

$[\text{Ca}^{2+}]$ 为细胞内钙离子浓度, K_d 为 Fluo-4 与 Ca^{2+} 的解离常数 3.45×10^{-7} ; F 为实验测得的荧光强度; $F_{\min}$ 为无 Ca^{2+} 时的最小荧光强度; $F_{\max}$ 为 Ca^{2+} 饱和时的最大荧光强度

2.8 细胞凋亡检测

按 2.7 项下方法进行细胞培养及分组。干预 48 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒染色, 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测, 数据通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析。

2.9 AO/EB 染色观察细胞凋亡

按 2.7 项下方法进行细胞培养及分组。干预 48 h 后, PBS 洗涤, 加入 5 μL AO/EB 染色液, 室温避光孵育 5 min, 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.10 线粒体膜电位测定

按 2.7 项下方法进行细胞培养及分组。干预 48 h 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μL JC-1 工作液, 37 °C 孵育 20 min, 弃上清, 用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次, 重悬后于激光共聚焦显微镜下观察拍照 ($\times 400$) 或

流式细胞仪检测, 数据通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析。

2.11 活性氧测定

按 2.7 项下方法进行细胞培养及分组。培养 48 h 后, 加入 500 μL DCFH-DA 染液, 37 °C 避光孵育 20 min, 无血清培养基洗涤 3 次, 激光共聚焦显微镜观察拍照 ($\times 400$) 或流式细胞仪检测, 数据通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析。

2.12 Western blotting 检测蛋白表达水平

按照 2.7 项下方法进行细胞培养及分组。采用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量和变性处理。蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 于 4 °C 过夜孵育。洗涤后, 加入二抗 (1:2 000) 孵育 1.5 h, 洗涤后进行 ECL 显影, 凝胶成像仪成像, Image J 软件分析。

3 结果

3.1 羽扇豆醇治疗肝癌潜在作用靶点

通过 PharmMapper、SwissTargetPrediction 数据库, 共预测出 142 个羽扇豆醇的潜在作用靶点; 同时, 以 “liver cancer” 为关键词, 在 GeneCards 和在线人类孟德尔遗传资料库中共获得 16 729 个肝癌相关的靶点。对羽扇豆醇靶点与肝癌靶点取交集, 筛选出 134 个共同靶点, 作为羽扇豆醇治疗肝癌的潜在作用靶点, 如图 1 所示。

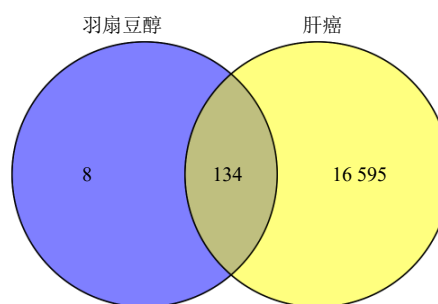


图 1 羽扇豆醇靶点与肝癌疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of lupeol targets and liver cancer disease targets

3.2 PPI 网络分析和核心靶点获取

基于 3.1 项下获得的交集靶点数据, 采用 STRING 数据库构建 PPI 网络, 并利用 Cytoscape 3.9.1 软件, 结合 “Network Analyzer” 工具及 Centiscape 2.2 插件对网络进行拓扑分析, 筛选核心靶点并绘制 PPI 网络图, 见图 2。根据度 (degree) 值排序, 排名前 10 的核心靶点依次为 ESR1、PTGS2、CYP3A4、

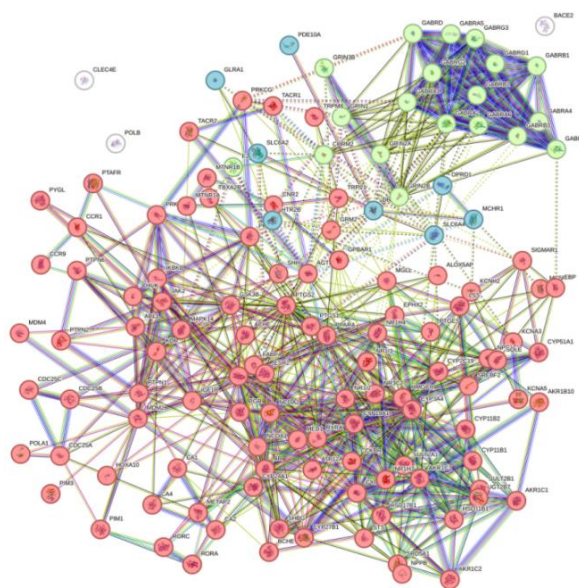


图 2 PPI 网络
Fig. 2 PPI network

表 1 羽扇豆醇治疗肝癌核心靶点互作的拓扑学参数

Table 1 Topological parameters of core target interaction of lupeol in treatment of liver cancer

编号	中文名称	英文名称	degree 值	介数中间性	接近中心性
1	雌激素受体 1	ESR1	40	0.11	0.57
2	前列腺素内过氧化物合酶 2	PTGS2	37	0.13	0.58
3	细胞色素 P450 3A4	CYP3A4	34	0.06	0.52
4	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶	HMGCR	30	0.05	0.49
5	细胞色素 P450 19A1	CYP19A1	27	0.03	0.48
6	过氧化物酶体增殖物激活受体 α	PPARA	26	0.05	0.51
7	细胞色素 P450 17A1	CYP17A1	26	0.02	0.46
8	谷氨酸离子型受体 N-甲基-D-天冬氨酸 2B 亚基	GRIN2B	25	0.07	0.48
9	丝裂原活化蛋白激酶 14	MAPK14	24	0.05	0.47
10	中介体复合物亚基 1	MED1	24	0.04	0.48

PI3K (PDB ID: 4OYS)、Akt (PDB ID: 3O96) 和 mTOR (PDB ID: 3JBZ), 将蛋白预处理, 使用 AutoDockTools 对接完成后, 采用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化呈现 (图 5、表 2)。

分子对接分析结果显示, 羽扇豆醇与 CaM、PI3K、Akt 及 mTOR 蛋白的结合自由能分别为 -40.46 、 -42.67 、 -43.68 、 -40.87 kJ/mol, 均显著低于标准值 (-20.93 kJ/mol)。进一步分析表明, 羽扇豆醇通过氢键与上述靶蛋白中的关键氨基酸残基形成稳定相互作用, 且表现出良好的蛋白结合位点嵌

入特性, 证实其与 CaM、PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白均具有稳固的结合能力。

3.3 GO 及 KEGG 通路富集分析

基于 3.2 项下筛选的前 10 位核心靶点, 利用 Metascape 平台进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 共获得 218 个 GO 条目和 50 条 KEGG 通路。通过微生信平台对富集结果作图, GO 功能富集结果见图 3。KEGG 富集分析的气泡图见图 4。结果显示, 羽扇豆醇在肝癌治疗中主要作用于化学致癌-受体激活、钙信号通路及 PI3K/Akt 信号通路等。因此, 本研究将进一步探讨细胞内 Ca^{2+} 浓度变化与 PI3K/Akt 信号通路之间的关系, 以揭示其介导细胞凋亡的潜在机制。

3.4 分子对接

从 PubChem 数据库获取羽扇豆醇的 3D 分子结构, 并通过 AutoDockTools 软件对其进行预处理。同时, 从 PDB 数据库中提取钙信号通路以及 PI3K/Akt 信号通路相关靶蛋白结构: CaM (PDB ID: 4FG8)、

入特性, 证实其与 CaM、PI3K、Akt 和 mTOR 蛋白均具有稳固的结合能力。

3.5 羽扇豆醇对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 不同浓度羽扇豆醇作用于 HepG2 细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖抑制率显著升高, 并呈现浓度 - 时间相关性。羽扇豆醇对 HepG2 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 (123.85 ± 1.22) 、 (73.48 ± 1.05) 、 (63.92 ± 1.03) $\mu\text{mol/L}$ 。为减少实验药物取样误差, 后续实验中选择 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 作为羽扇豆醇的给药浓度。

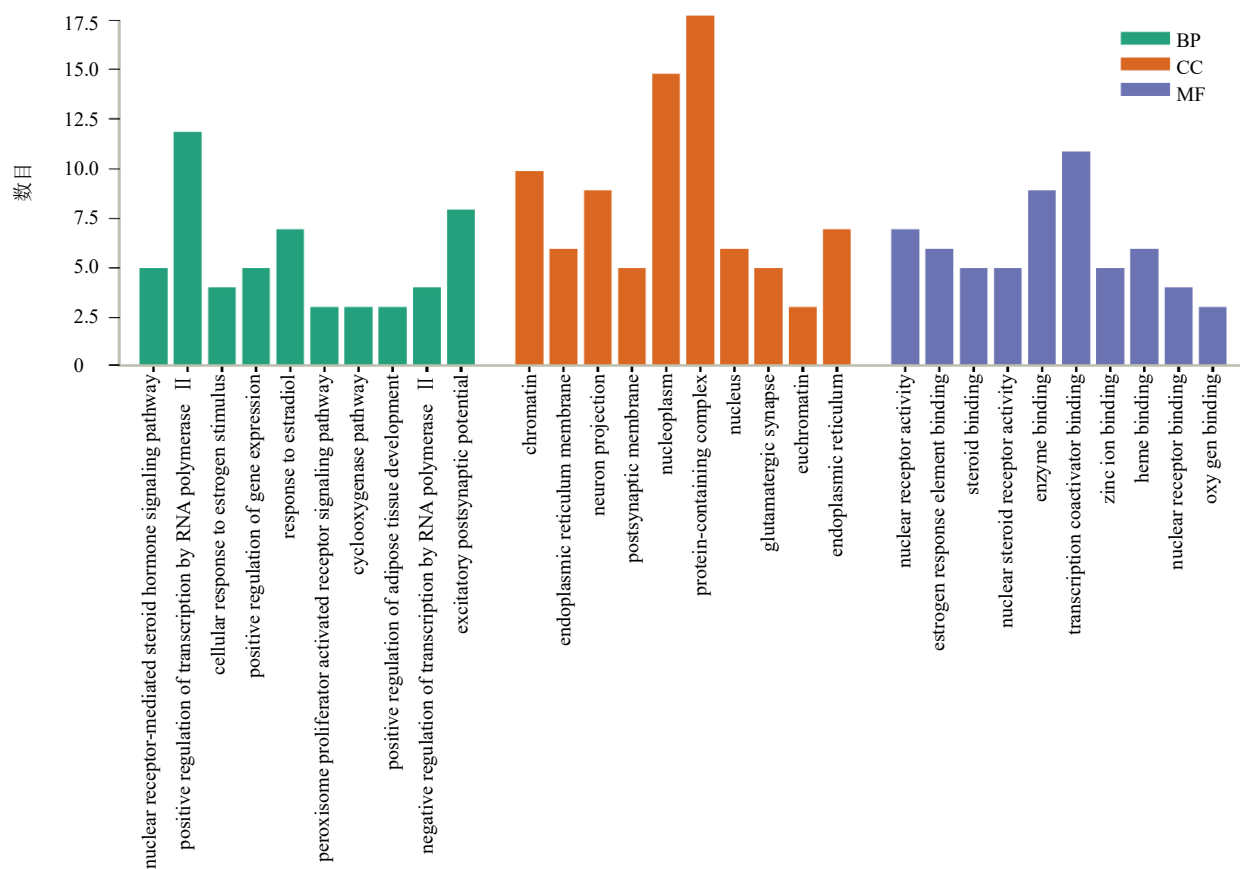


图 3 GO 富集分析柱状图

Fig. 3 Histogram of GO enrichment analysis

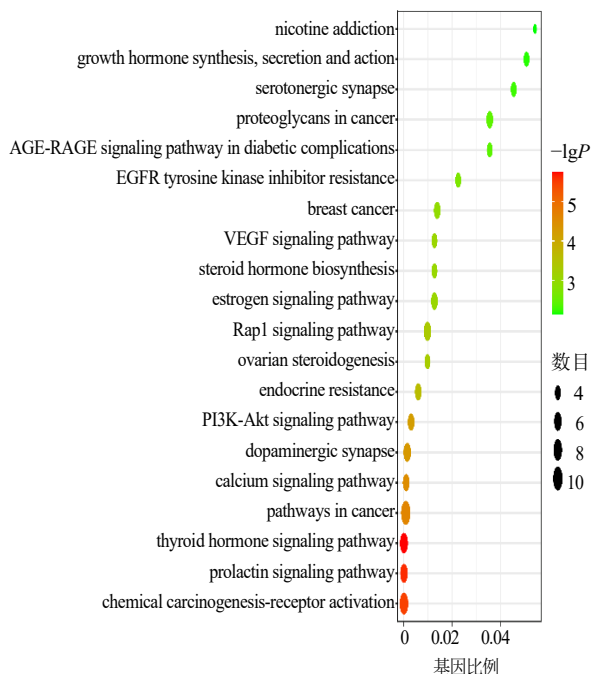


图 4 KEGG 通路气泡图

Fig. 4 KEGG pathway bubble diagram

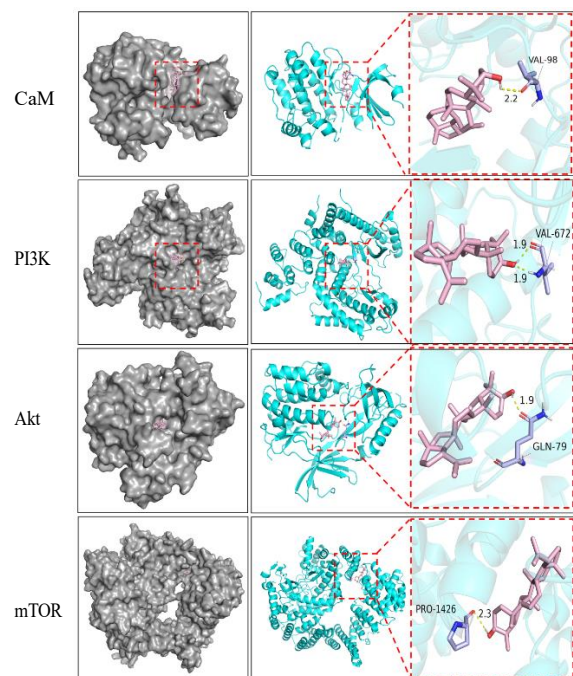


图 5 羽扇豆醇与相关蛋白分子对接 3D 可视化图

Fig. 5 Molecular docking 3D visualization of lupeol

表 2 羽扇豆醇与靶点结合能

Table 2 Binding energy of Lupeol and target site

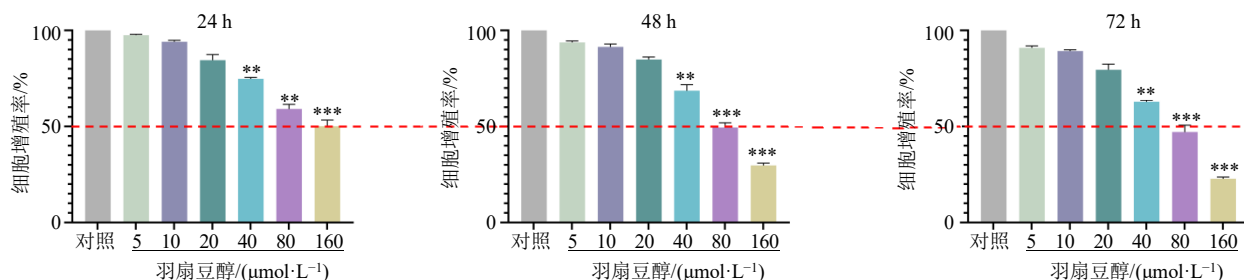
蛋白	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
CaM	4FG8	-40.46
PI3K	4OYS	-42.67
Akt	3O96	-43.68
mTOR	3JBZ	-40.87

3.6 羽扇豆醇对 HepG2 细胞内 Ca²⁺浓度的影响

如图 7 所示,当羽扇豆醇浓度为 75 μmol/L 时, Ca²⁺浓度显著升高。Ca²⁺主要来源于内质网释放至细胞质,其浓度升高可能导致调控线粒体功能,进而引发细胞凋亡等一系列细胞生理反应。

3.7 羽扇豆醇对 HepG2 细胞的凋亡影响

流式细胞术结果(图 8)显示,与对照组相比,



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 6 羽扇豆醇对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Inhibition rate of lupeol on the proliferation of HepG2 cells in liver cancer ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

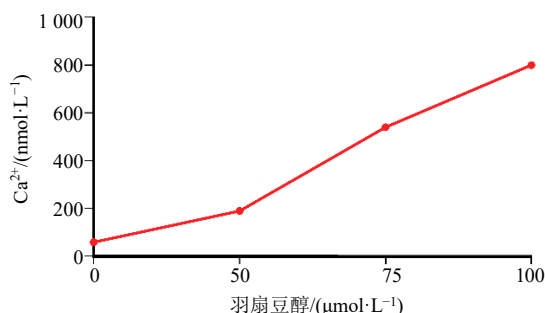


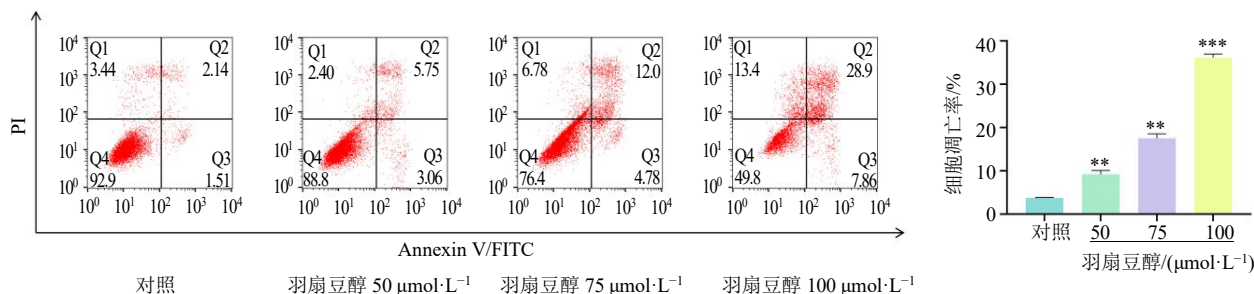
图 7 羽扇豆醇对 HepG2 细胞内 Ca²⁺浓度的影响

Fig. 7 The influence of lupeol on Ca²⁺ concentration in HepG2 cells

随着羽扇豆醇浓度升高, HepG2 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), 呈现浓度相关性。AO/EB 染色结果(图 9)显示, 对照组 HepG2 细胞形态正常, 细胞核呈均匀绿色染色; 随着羽扇豆醇浓度增加, 凋亡细胞数量逐渐增多, 细胞皱缩, 染色呈橙红色。

3.8 线粒体膜电位测定

流式细胞术结果(图 10)显示, 随羽扇豆醇浓度升高, HepG2 细胞线粒体膜电位显著下降。激光共聚焦显微镜下观察(图 11), 对照组细胞呈红色; 随浓度增加, 绿色细胞增多, 红色细胞减少, 表明线粒体膜电位随给药浓度升高逐渐降低。

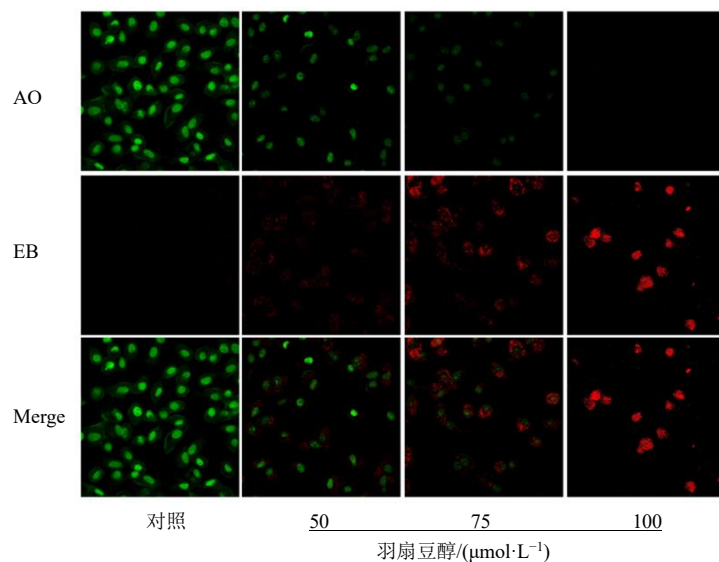
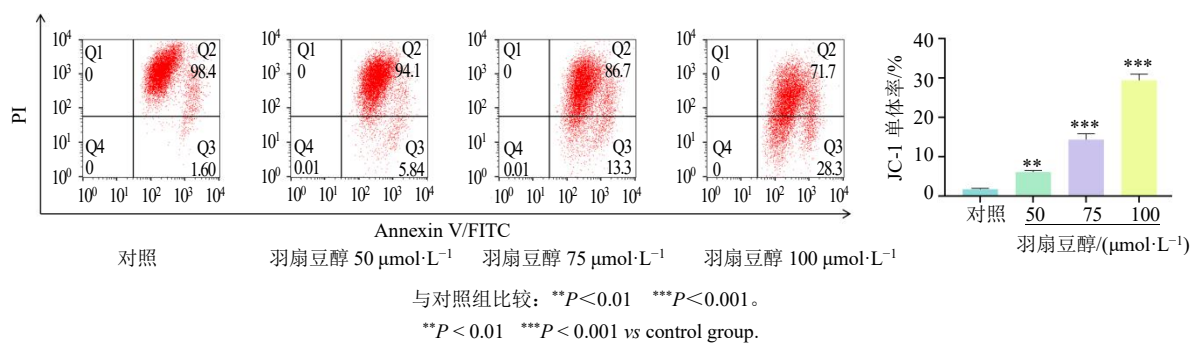
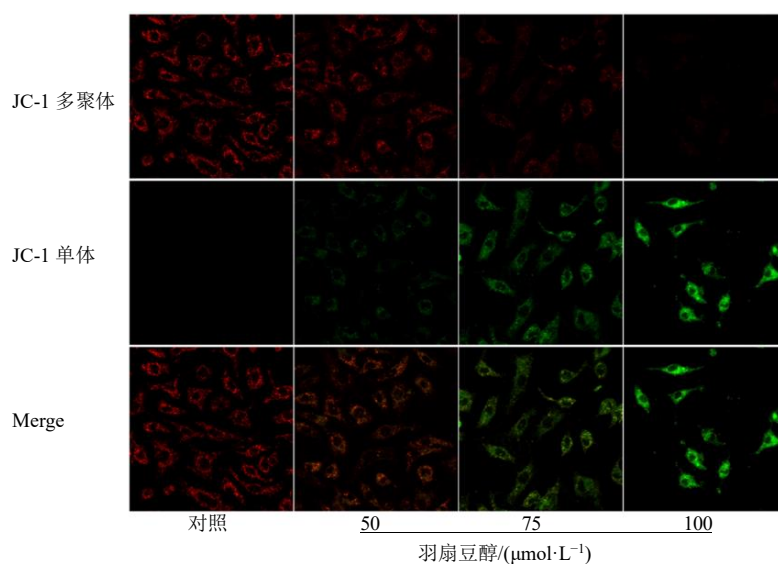


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 8 流式细胞术观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞的凋亡影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of lupeol on the apoptosis of HepG2 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 9 镜下观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞凋亡的影响 (免疫荧光, $\times 400$)Fig. 9 Effect of lupeol on the apoptosis of HepG2 cells under the microscope (immunofluorescence, $\times 400$)图 10 流式细胞术观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 10 Effect of lupeol on the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)图 11 镜下观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 (免疫荧光, $\times 400$)Fig. 11 Observe the effect of lupeol on the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells under the microscope (immunofluorescence, $\times 400$)

3.9 活性氧测定

流式细胞术结果(图 12)显示,与对照组相比,HepG2 细胞内活性氧水平随羽扇豆醇浓度升高显著增加,呈现浓度相关性。激光共聚焦显微镜下观察(图 13),对照组绿色荧光较弱,羽扇豆醇组随浓度升高绿色荧光逐渐增强,表明 HepG2 细胞活性氧水平呈浓度相关性升高。

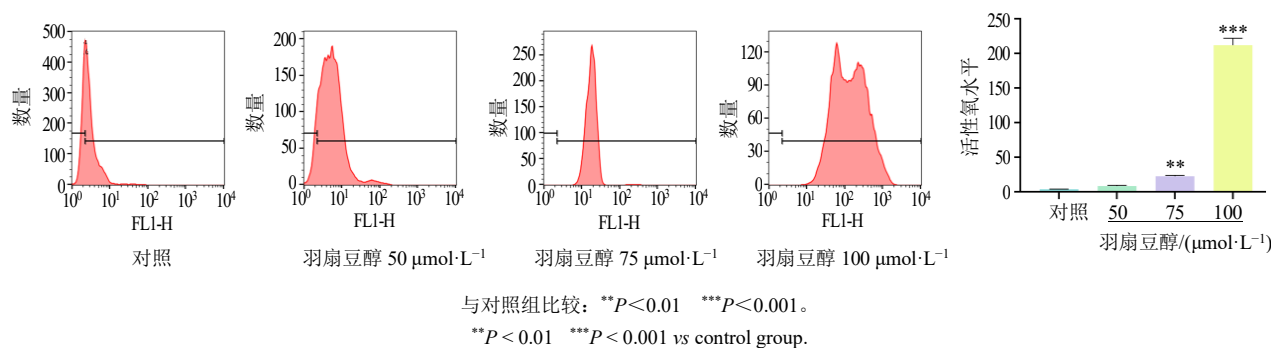


图 12 流式细胞术观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞活性氧水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 12 Effect of lupeol on the reactive oxygen species level in HepG2 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

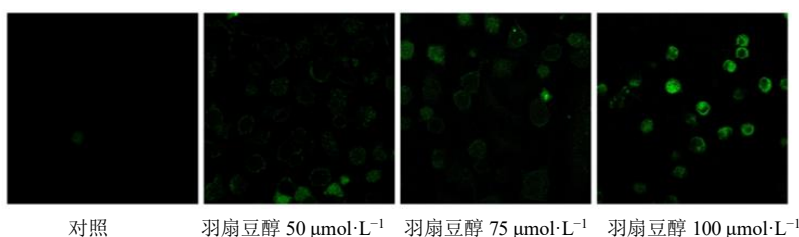


图 13 镜下观察羽扇豆醇对 HepG2 细胞活性氧水平的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 13 Effect of lupeol on the reactive oxygen species level in HepG2 cells under the microscope (immunofluorescence, $\times 400$)

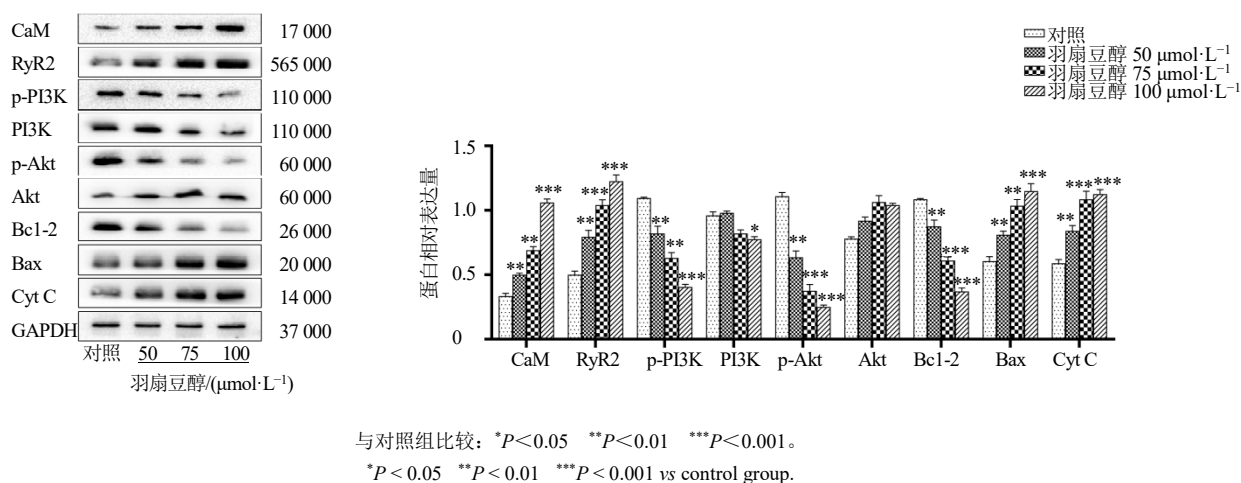


图 14 羽扇豆醇对 HepG2 细胞中钙信号通路以及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 14 The effects of lupeol on calcium signaling pathway and PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.10 Western blotting 检测羽扇豆醇对 HepG2 细胞中钙信号通路及 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达水平的影响

结果显示,经不同浓度羽扇豆醇处理 48 h 后,CaM、RyR2、Bax 和 Cyt C 显著升高($P < 0.01$ 、 0.001),而 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 显著下降($P < 0.01$ 、 0.001),见图 14。

4 讨论

肿瘤细胞增殖能力强、具备侵袭转移特性，并且能够凭借多种复杂机制规避凋亡信号传导，这些要素均为评判肿瘤恶性程度的关键指标^[13-14]。故而，以此为切入点探寻高效的抗肿瘤药物，已然成为当前肿瘤研究领域的重中之重与核心任务。

羽扇豆醇作为天然抗肿瘤药物中的研究热点，过往众多研究者通过传统药物研究方法对其抗肿瘤机制进行了验证与阐述。本研究利用网络药理学中靶点预测、GO 富集分析以及 KEGG 通路富集分析等手段对羽扇豆醇抗肝癌作用进行预测与筛选，发现了一条全新的羽扇豆醇抗肿瘤机制，即通过调控钙离子浓度变化影响 PI3K/Akt 信号通路的信号传导，进而发挥抗肿瘤作用。同时，采用分子对接技术进行验证，结果显示羽扇豆醇与钙信号通路、PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白 CaM、PI3K、Akt、mTOR 有出色的结合能力（均小于 -20.93 kJ/mol）。根据对接结果可观察到，CaM 蛋白中羽扇豆醇羟基位与氨基酸残基 VAL-98（缬氨酸 98 号残基）的羧基通过氢键结合。PI3K 蛋白中羽扇豆醇上白色氢原子与氨基酸残基 VAL-672（缬氨酸 672 号残基）上红色氧原子通过氢键连接，羽扇豆醇上氧原子与 VAL-672 上蓝色氮原子相结合，羽扇豆醇结合位点具有亲水性及电负性特性，有利于与蛋白特定残基相互作用，氮原子也可能参与静电或其他弱相互作用，从而影响药物-蛋白结合的特异性。Akt 与 mTOR 蛋白中羽扇豆醇上氧原子与氨基酸残基 GLN-79（谷氨酰胺 79 号残基）、PRO-1426（脯氨酸 1426 号残基）上氧原子之间形成氢键，这有利于药物分子稳定地结合到靶点蛋白上，增强药物与靶点的亲和力，对药物发挥疗效至关重要。在 3D 口袋大模型中可观察到，羽扇豆醇均嵌入蛋白质口袋中，再一次证明了其结合的稳定性。

值得注意的是，线粒体在细胞生理过程中扮演着关键角色，线粒体不仅作为细胞的能量工厂，更是细胞内氧化损伤的敏感靶点^[15]。肿瘤细胞中普遍存在氧化还原异常的现象，这会致使线粒体功能受损，活性氧水平升高，最终诱导细胞凋亡^[16]。钙离子浓度的变化对线粒体功能有着显著影响，同时 PI3K/Akt/mTOR 信号通路也与线粒体的代谢和功能调节密切相关^[17-18]。药物对肿瘤细胞具有毒性作用的一个主要原因就是诱导肿瘤细胞产生大量活性氧而引起肿瘤细胞发生氧化应激效应^[19]。同时，过

量的活性氧能够增加线粒体的通透性，从而降低线粒体的膜电位，导致细胞凋亡的发生。基于此结果，本研究针对钙离子浓度与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路之间的关系，开展体外实验评价，深入验证羽扇豆醇的抗肿瘤机制，探究羽扇豆醇是否通过影响这一关系，间接调控线粒体状态，从而发挥抗肿瘤作用。激光共聚焦和流式细胞术结果显示，羽扇豆醇作用于 HepG2 细胞后，细胞总凋亡率升高，细胞内的 ROS 水平显著增加，线粒体膜电位下降，并呈现浓度依赖性地诱导 HepG2 细胞凋亡。

内质网是细胞内主要的钙库，当 RyR 激活后，可刺激内质网释放钙离子进入胞质中，从而增加细胞内 Ca^{2+} 浓度， Ca^{2+} 作为第二信使，与 CaM 结合，形成 Ca^{2+} -CaM 复合物激活 CaM 激酶，从而与下游效应分子相互作用，间接调控 PI3K/Akt 信号通路； Ca^{2+} -CaM 复合物还可直接激活 PI3K，激活的 PI3K 催化磷脂酰肌醇二磷酸转化三磷酸肌醇，进而招募 Akt 到细胞膜上，启动 PI3K/Akt 信号通路^[20-22]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是最重要的细胞内途径之一，调节生存、细胞生长、分化、细胞代谢和细胞骨架重组反应一系列信号，包括生长因子受体酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体信号^[23-26]。在肿瘤的治疗中，PI3K/Akt/mTOR 信号通路已成为研究的热点。本研究 Western blotting 实验结果显示，HepG2 细胞中 CaM 和 RyR 蛋白表达上调，导致内质网钙离子释放增加，细胞内钙离子浓度升高。钙离子信号激活钙离子依赖性激酶，进而抑制 PI3K/Akt 信号通路（p-PI3K 和 p-Akt 表达下调）。PI3K/Akt 通路抑制导致线粒体膜通透性转换孔开放增加，促进 Cyt C 释放到细胞质中。同时，羽扇豆醇处理导致 Bcl-2 蛋白表达下调，Bax 蛋白表达上调，Bax 寡聚并插入线粒体膜，进一步改变线粒体膜通透性，释放 Cyt C，最终激活 Caspase 级联反应，诱导细胞凋亡。结果表明羽扇豆醇对人 HepG2 细胞的影响可能与钙离子浓度升高介导 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

综上所述，羽扇豆醇在体外可以显著抑制 HepG2 细胞增殖，并诱导细胞凋亡，其作用机制可能与钙离子浓度升高激活 PI3K/Akt/mTOR 通路从而介导线粒体凋亡途径有关。但是在本研究中未对其他肝癌细胞系进行研究，且对线粒体凋亡途径研究不够深入，因此，羽扇豆醇治疗肝癌的作用机制还需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 唐泽严, 杨小彤, 周旭, 等. 羽扇豆醇抑制人肝癌 Huh-7 细胞增殖机制研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(9): 1521-1525.
- [2] 史春雨, 陈红红, 景婷, 等. 羽扇豆醇对肝癌细胞的作用及其机制研究 [J]. 微循环学杂志, 2022, 32(1): 19-26.
- [3] 刘博佳, 宁青, 钟荣玲, 等. 羽扇豆醇对人肝癌细胞 HepG2 和 SK-HEP-1 侵袭、转移的影响及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 6028-6035.
- [4] 金丽杰, 刘欢, 刘莎莎, 等. 羽扇豆醇抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞自噬的实验研究 [J]. 中药材, 2022, 45(2): 422-426.
- [5] 张玲莉, 邱振鹏, 彭燕. 羽扇豆醇对人高转移肝癌 HCCLM3 增殖影响的机制研究 [J]. 中国药师, 2015, 18(6): 897-901.
- [6] 王雨阳, 刘朋, 张忠, 等. 基于网络药理学探究桑黄多酚的体外抗肿瘤作用及其机制 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(11): 68-77.
- [7] 赵方圆, 李侯希尔, 吴家慧, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨瓦草皂苷的抗肿瘤机制 [J]. 中南药学, 2024, 22(10): 2663-2669.
- [8] 陈思远, 琚昊, 王永侠. 线粒体钙稳态与 ATP 生成双向调节机制的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(9): 76-81.
- [9] Llewelyn Roderick H, Berridge M J, Bootman M D. Calcium-induced calcium release [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(11): R425.
- [10] Berridge M J, Bootman M D, Llewelyn Roderick H. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(7): 517-529.
- [11] Slusarski D C, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis [J]. *Dev Biol*, 2007, 307(1): 1-13.
- [12] 张帅, 崔隽, 沈萍萍. 细胞凋亡中的钙离子调控 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(6): 785-790.
- [13] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [14] Honoki K, Tsujiuchi T, Kishi S, *et al*. Revisiting 'hallmarks of cancer' in sarcomas [J]. *J Cancer*, 2024, 15(7): 1786-1804.
- [15] Xu D M, Li L R, Liu L C, *et al*. Polychlorinated biphenyl quinone induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(9): 1063-1072.
- [16] Ren Y Q, Wang R Z, Weng S Y, *et al*. Multifaceted role of redox pattern in the tumor immune microenvironment regarding autophagy and apoptosis [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 130.
- [17] Zhang J R, Shen S Y, Zhai M Y, *et al*. Augmented microglial endoplasmic reticulum-mitochondria contacts mediate depression-like behavior in mice induced by chronic social defeat stress [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5199.
- [18] 邓思琦, 曾乐冰, 郭常怡, 等. 基于网络药理学和实验验证探究 17-羟-岩大戟内酯 B 通过 PI3K-Akt 信号通路介导线粒体凋亡途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(12): 3065-3075.
- [19] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova M K, *et al*. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7698.
- [20] Tokumitsu H, Sakagami H. Molecular mechanisms underlying Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase signal transduction [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11025.
- [21] He Y, Sun M M, Zhang G G, *et al*. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [22] Khezri M R, Jafari R, Yousefi K, *et al*. The PI3K/Akt signaling pathway in cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic interventions [J]. *Exp Mol Pathol*, 2022, 127: 104787.
- [23] Liu P X, Cheng H L, Roberts T M, *et al*. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 627-644.
- [24] Engelman J A. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 550-562.
- [25] Goldar S, Khaniani M S, Derakhshan S M, *et al*. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2129-2144.
- [26] Spangle J M, Roberts T M, Zhao J J. The emerging role of PI3K/Akt-mediated epigenetic regulation in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(1): 123-131.

【责任编辑 金玉洁】