

基于网络药理学与体外实验探讨高良姜素对口腔鳞状细胞癌的作用机制

魏恺辰¹, 李 爽¹, 李欣雨¹, 赵彦鑫¹, 任 蓁^{2*}

1. 黑龙江中医药大学 第一临床医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: **目的** 基于网络药理学与体外实验探讨高良姜素对口腔鳞状细胞癌的作用机制。**方法** 通过 SwissTargetPrediction 数据库筛选高良姜素潜在作用靶点, 结合 GeneCards 与 OMIM 数据库获取口腔鳞状细胞癌相关靶点; 通过构建药物-疾病靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络以识别核心靶点; 使用 R 软件包 clusterProfiler 进行富集分析; 通过生存和诊断价值分析确定核心靶点; 利用基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析对关键靶点、通路进行可视化。通过体外实验验证高良姜素对 CAL-27 细胞的细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭, Western blotting 法检测的相关蛋白表达水平。**结果** 网络药理学分析共得到 59 个高良姜素抗口腔鳞状细胞癌相互作用靶点; 经 PPI 网络拓扑分析筛选得到前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3B)、雌激素受体 α (ESR1)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、髓细胞白血病 1 (MCL1)、Src 酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 8 个关键靶点。GO 和 KEGG 富集分析显示, 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路被确定为高良姜素抗口腔鳞状细胞癌作用的主要靶向通路。使用 R 软件根据预后和诊断价值进一步得到核心基因 *GSK3B*、*ESR1*、*PARP1*; KEGG 检索发现, 核心靶点 GSK3B 位于 PI3K/Akt 信号通路下游。CCK-8 与 Transwell 试验实验显示, 高良姜素能够有效抑制 CAL-27 细胞增殖、侵袭与迁移; 流式细胞术结果显示, 高良姜素以浓度相关性方式促进 CAL-27 细胞凋亡 ($P < 0.01$)。蛋白免疫印迹分析结果显示, 高良姜素组 CAL-27 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-GSK3B/GSK3B 蛋白表达均较对照组显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 加入 PI3K 激活剂 740Y-P 后, 与高良姜素组比较, 高良姜素+740Y-P 组 p-PI3K、p-Akt、p-GSK3B 和凋亡相关蛋白水平被有效逆转 ($P < 0.05$)。**结论** PI3K/Akt/GSK3B 信号通路可能是高良姜素发挥抗口腔鳞状细胞癌作用的关键途径。

关键词: 高良姜素; 口腔鳞状细胞癌; 细胞凋亡; 网络药理学; 体外实验; 糖原合成酶激酶 3 β ; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路

中图分类号: R287.7

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)10-2468-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.10.007

Mechanism of action of galangin on oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and *in vitro* experiments

WEI Kaichen¹, LI Shuang¹, LI Xinyu¹, ZHAO Yanxin¹, REN Zhen²

1. The First Clinical Medical College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of action of galangin on oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** The potential targets of galangin were screened through the SwissTargetPrediction database, and the related targets of oral squamous cell carcinoma were obtained by combining the GeneCards and OMIM databases. To identify core targets by construct a drug-disease target protein interaction (PPI) network. Enrichment analysis was conducted using the R software package clusterProfiler. The core targets were determined through survival and diagnostic value analysis. Key targets and pathways were visualized using GO and KEGG enrichment analysis. The cell proliferation, apoptosis, migration and invasion of CAL-27 cells by galangin were verified through *in vitro* experiments, and the expression levels of related proteins were detected by

投稿日期: 2025-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373537)

作者简介: 魏恺辰, 硕士, 研究方向为药食同源中药的研究和中西医结合护理研究。E-mail: 1536392630@qq.com

*通信作者: 任 蓁, 副教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为主要从事亚健康人群的辨证施护、药食同源中药的研究和中西医结合护理研究。

E-mail: 18646301160@163.com

Western blotting. **Results** A total of 59 interaction targets of galangin against oral squamous cell carcinoma were obtained through network pharmacological analysis. Through PPI network topology analysis and screening, a total of 8 key targets such as PTGS2, GSK3B, ESR1, PARP1, EGFR, MCL1, SRC, and MMP9 were obtained. GO and KEGG enrichment analyses revealed that the PI3K/Akt signaling pathway was identified as the primary targeted pathway for the anti-oral squamous cell carcinoma effect of galangin. The core genes GSK3B, ESR1, and PARP1 were further obtained based on prognosis and diagnostic value using R software. KEGG search revealed that the core target GSK3B is located downstream of the PI3K/Akt signaling pathway. The CCK-8 and Transwell assay experiments showed that galangin could effectively inhibit the proliferation, invasion and migration of CAL-27 cells. The results of flow cytometry showed that galangin promoted apoptosis of CAL-27 cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.01$). The results of Western blotting analysis showed that the protein expressions of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and p-GSK3B/GSK3B in CAL-27 cells of the galangin group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05, 0.01$). After the addition of PI3K activator 740Y-P, compared with the galangin group, the levels of p-PI3K, p-Akt p-GSK3B and apoptosis-related proteins in the galangin + 740Y-P group were effectively reversed ($P < 0.05$). **Conclusion** The PI3K/Akt/GSK3B signaling pathway may be the key way for galangin to exert its anti-oral squamous cell carcinoma effect.

Key words: galangin; oral squamous cell carcinoma; apoptosis; network pharmacology; *in vitro* experiment; GSK3B; PI3K/Akt signaling pathway

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部的常见恶性肿瘤, 约占口腔癌总病例的 90%。流行病学研究显示, 2022 年全球口腔鳞状细胞癌新增病例约 39 万例, 相关死亡病例达 19 万例, 且年轻人发病率逐渐攀升, 疾病负担日益加重^[1]。口腔鳞状细胞癌发病与生活环境、饮食习惯、吸烟酗酒、咀嚼槟榔以及人乳头瘤病毒感染等因素密切相关^[2]。目前口腔鳞状细胞癌治疗方式仍以手术切除为主, 并在术后辅以放化疗、免疫治疗等综合治疗。尽管这些方案取得一定进展, 但由于放化疗引起的不良反应以及化疗药物耐药性的存在, 使口腔鳞状细胞癌患者 5 年生存率仍维持在 50%~60%^[3]。此外, 口腔鳞状细胞癌具有高度侵袭性和转移性, 多数患者确诊时已进展至晚期, 导致该病死亡率高居不下。因此, 开发毒性低、疗效好的新型药物具有重要意义。

高良姜素是从姜科植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 干燥根茎中提取的一种天然黄酮类化合物, 也是高良姜的最主要活性成分。研究显示, 高良姜素具有包括抗过敏、抗氧化、抗炎、器官保护以及抗糖尿病等多重药理活性^[4-5]。近年来, 随着高良姜素研究的深入, 其抗肿瘤作用逐渐被揭示。高良姜素可通过不同作用机制对肝癌、乳腺癌、肺癌及结肠癌等恶性肿瘤细胞产生抑制作用, 通过调控多种靶点及通路发挥广谱抗肿瘤效应^[6]。目前关于高良姜素在口腔鳞状细胞癌中的作用的研究仍然有限, 其是否同样通过多靶点调控机制发挥作用、具体涉及哪些关键靶点与信号通路, 尚未形成清晰认识。

网络药理学是在系统生物学和计算机技术快

速发展基础上整合了传统药理学、生物信息学、化学信息学和网络生物学等多学科领域的一种新兴研究方法^[7]。其核心优势在于突破“单一成分-单一靶点”的传统研究模式, 通过大数据分析预测药物潜在作用靶点, 构建“成分-靶点-疾病”互作网络, 进而从系统层面解析药物调控疾病的整体分子机制。这一研究思路虽源于多成分中药的机制解析, 但其系统整合、网络分析的核心逻辑, 同样适用于探索单一天然活性成分的多靶点调控特性。基于以上背景, 本研究旨在通过整合网络药理学和体外实验验证的综合方法, 阐明高良姜素治疗口腔鳞状细胞癌的潜在药理机制, 以期对中药活性成分抗肿瘤研究提供新见解, 并为后续高良姜素的临床应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高良姜素 (质量分数>95%, 四川精萃天成药科技有限公司, 货号 TC1248); 胎牛血清 (美国 Sigma 公司, 货号 12103C); CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C0037、P0010S); FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司, 货号 556547); B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (Bcl-2) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 GB113375); 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、纽蛋白 (Vinculin) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 60225、66305); 磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 货号 AF3242); 蛋白激酶 B (Akt) 抗体 (美国 Bimake 公司, 货号 A5031); Bcl-2 同源拮抗剂/致死蛋白

(Bak)、磷酸化 Akt (p-Akt) 抗体 (美国 CST 公司, 货号 3814S、4058S); 糖原合酶激酶-3 β (GSK3B)、磷酸化 GSK3B (p-GSK3B) 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 货号 ET1607-71、ET1607-60); 山羊抗兔 IgG 二抗 (英国 Abcam 公司, 批号 b150077)。

1.2 高良姜素潜在靶点的获取

从 PubChem 数据库检索高良姜素的化学结构信息, 对其分子结构进行比对验证。随后, 基于该化合物的 CAS 编号及二维结构图, 采用 ChemDraw 软件构建其三维结构模型, 并导出为 sdf 格式文件。将此文件上传至 SwissTarget Prediction 平台进行潜在靶点预测, 最终通过 UniProt 数据库将获得的 Uniprot ID 转换为 Geneofficial ID。

1.3 口腔鳞状细胞癌潜在靶点的获取

以 “oral squamous cell carcinoma” 为关键词, 通过 GeneCards 与 OMIM 数据库检索口腔鳞状细胞癌相关靶点。将 2 个数据库的结果进行整合并删除重复项后, 利用 UniProt 数据库将相关靶标的蛋白名称逐一转化为标准化基因名称, 缺少基因名称的靶点被排除在外。

1.4 药物 - 疾病共同靶点的获取

将 1.1 和 1.2 项下获得的高良姜素和口腔鳞状细胞癌潜在靶点利用 Venny 2.1.0 平台绘制韦恩图以得到高良姜素治疗口腔鳞状细胞癌的候选靶点用于后续分析。

1.5 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建

将药物与疾病的交叉靶点导入至 STRING 数据库以获得 PPI 网络, 将指定格式文件下载并上传至 Cytoscape 3.9.0 软件对网络进行美化及拓扑参数分析, 进而筛选关键作用靶点。

1.6 核心靶点的富集分析

基因本体 (GO) 是一种用于研究单个基因在生物体不同生物学层级中功能的分类体系; 而京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库则通过提供基因参与生物信号通路的实验与预测证据, 揭示其在生命过程中的潜在作用^[8]。使用 KEGG rest API 获取最新的 KEGG Pathway 的基因注释, 以此作为背景, 将基因映射到背景集合中, 使用 R 软件包 clusterProfiler 进行富集分析, 以获得基因集富集的结果。选择物种为 “homo sapiens”, 设定最小基因集为 5, 最大基因集为 5 000, $P < 0.05$, GO 与 KEGG 结果分别以气泡图和圈图进行展示。

1.7 基于临床价值的核心基因筛选

为探究关键基因的临床意义, 本研究整合了来自 TCGA 和 GTEx 数据库的口腔鳞状细胞癌组织与正常口腔黏膜上皮组织的基因表达数据, 采用统一经 TPM 格式处理的 RNA-seq 数据进行后续分析。基于样本临床信息, 利用 R 4.4.1 软件中的 stats 包、car 包、survival 包、pROC 程序包进行 Kaplan-Meier 生存分析和 ROC 诊断分析, 并通过 ggplot2 包对所有分析结果进行可视化呈现。

1.8 基于 KEGG 通路映射的高良姜素调控 PI3K/Akt 信号通路核心靶点分析

通过 KEGG 网站中的 KEGG Mapper 工具对 PI3K/Akt 信号通路进行可视化分析, 从而标注出其作用过程中的核心靶点。

1.9 细胞系与细胞培养

人舌鳞癌细胞系 CAL-27 及人正常口腔黏膜上皮细胞系 HOK 购自北京北纳创联生物技术研究。细胞均培养于含标准血清和双抗的 DMEM 培养基中, 同时放置于细胞培养箱, 细胞始终保持在生长期。将高良姜素溶解于终浓度为 0.1% 的二甲基亚砜中, 制备 200 $\mu\text{mol/L}$ 储备液用于后续分析。细胞实验设置如下分组: 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素); 高良姜素组 (依据 CCK-8 实验结果, 选定 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续机制研究); 在通路验证实验中, 增设高良姜素 (20 $\mu\text{mol/L}$) + PI3K 通路激活剂 740Y-P (10 $\mu\text{g/mL}$) 组。

1.10 细胞活力测定

将 CAL-27 和 HOK 细胞均匀接种至 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 向细胞中加入不同浓度 (0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 的高良姜素处理细胞 48 h。待处理结束后, 用含有 10 μL CCK-8 试剂的新鲜 DMEM 培养基替换旧培养基并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续孵育 2 h。使用酶标仪测量 490 nm 处吸光度 (A) 值。以 lgC 作横坐标, 抑制率为纵坐标, GraphPad Prism 软件进行非线性回归分析, 拟合细胞活力与药物浓度之间的剂量 - 反应曲线进而计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

1.11 Tranwell 检测

将细胞悬于 100 μL 培养基中并接种于未包被基质胶的 Transwell 上室, 下室加入 650 μL 含 30% 血清的培养基, 置于培养箱中培养, 用棉签拭去膜上表面未迁移细胞, 甲醇固定 5 min, Giemsa 染色 10 min 计数, 每孔随机选取至少 5 个视野 ($\times 100$)

计算平均值。侵袭实验方法同上,但需预先在上室膜表面包被 50 μ L 2.5 mg/mL 基质胶。最后,于显微镜下随机选取 5 个视野,并利用 Image J 软件对迁移/侵袭细胞进行计数^[9-10]。

1.12 细胞凋亡检测

细胞经高良姜素处理 48 h 后, PBS 清洗 2 次,经胰酶消化、收集并离心,最后用 500 μ L 1 $\times$ 结合缓冲液重悬;随后加入 5 μ L FITC 标记的 Annexin V 与 5 μ L 碘化丙啶,轻柔混匀后于室温避光反应 30 min,于 1 h 内通过流式细胞仪进行凋亡检测^[11]。

1.13 Western blotting 检测

细胞经处理后,通过裂解、离心提取蛋白。定量后取样行电泳、转膜及封闭处理,随后加入一抗孵育,次日加入二抗继续孵育,再次洗涤后用 ECL 工作液显影,并使用 Vinculin 作为内参计算相对表达。实验中所涉及的抗体及稀释比例: Bcl-2 (1:1 000)、Bak (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:1 000)、GSK3B (1:1 000)、p-GSK3B (1:1 000)、Vinculin (1:10 000)、IgG 二抗 (1:5 000)。

1.14 统计学分析

使用 GraphPrism 8.0.2 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。对于两组间比较,使用独立样本 *t* 检验;而对于多组间比较,则应用单因素方差分析并辅以 Bonferroni 事后检验。

2 结果

2.1 药物靶点与疾病靶点的鉴定

通过 SwissTargetPrediction 数据库确定了 100 个与高良姜素活性相关的靶点;同时,通过 GeneCards 数据库初步获得了 10 062 个与口腔鳞状

细胞癌相关的靶点。为了缩小与口腔鳞状细胞癌相关的潜在靶点范围,根据大于等于相关性评分中位数 2 倍的关联评分进一步鉴定出 1 726 个靶点。此外,通过 OMIM 数据库获得了 469 个与口腔鳞状细胞癌相关的靶基因。通过合并消除重复项后,最终得到 2 028 个与口腔鳞状细胞癌发病机制相关的靶点。通过韦恩图交叉得到 59 个用作高良姜素治疗口腔鳞状细胞癌的潜在靶点,见图 1。

2.2 高良姜素治疗口腔鳞状细胞癌核心靶点的预测

为了更详细地分析潜在靶点,将 59 个交叉靶点导入 STRING 网站构建 PPI 网络。根据网络参数可知,该网络包括 59 个节点和 406 条边,所有靶点均相互作用,不存在无关节点,见图 2A。将此网络导入 Cytoscape 软件根据节点 degree 值对 PPI 网络进行分析,见图 2B。使用 cytoHubba 插件进一步得到高良姜素作用于口腔鳞状细胞癌的 8 个核心靶点,包括前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、GSK3B、雌激素受体 α (ESR1)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、髓细胞白血病 1 (MCL1)、Src 酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9),见图 2C。

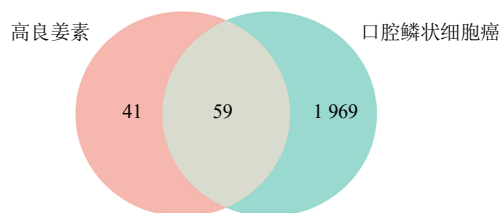
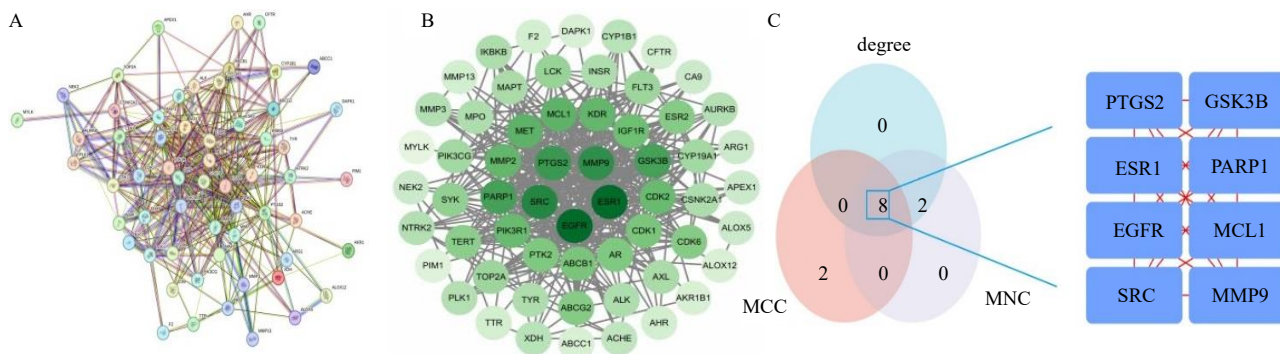


图 1 高良姜素与口腔鳞状细胞癌的交集靶点

Fig. 1 Intersection target of galangin and oral squamous cell carcinoma



A-交集靶点的 PPI 网络, B-Cytoscape 软件构建的 PPI 网络, C-核心靶点。

A-PPI network of intersection targets, B-PPI network constructed by Cytoscape software, C-core targets.

图 2 核心基因筛选与 PPI 网络构建

Fig. 2 Core gene screening and PPI network construction

2.3 核心靶点的功能富集分析

GO 富集分析共得到 1 754 个 GO 条目, 包括 1 000 个 BP、338 个 CC、416 个 MF。在排除 $P > 0.05$ 的富集结果并根据计数值进行排序后, 对各模块前 10 个条目进行可视化展示。BP 主要包括对化

学刺激的响应、细胞死亡调控、程序性细胞死亡、凋亡过程、对含氧化合物的反应等; CC 主要涉及细胞质、质膜部分、核染色体、蛋白激酶复合物等; MF 则主要包含催化活性、药物结合、ATP 结合、蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性等。见图 3。

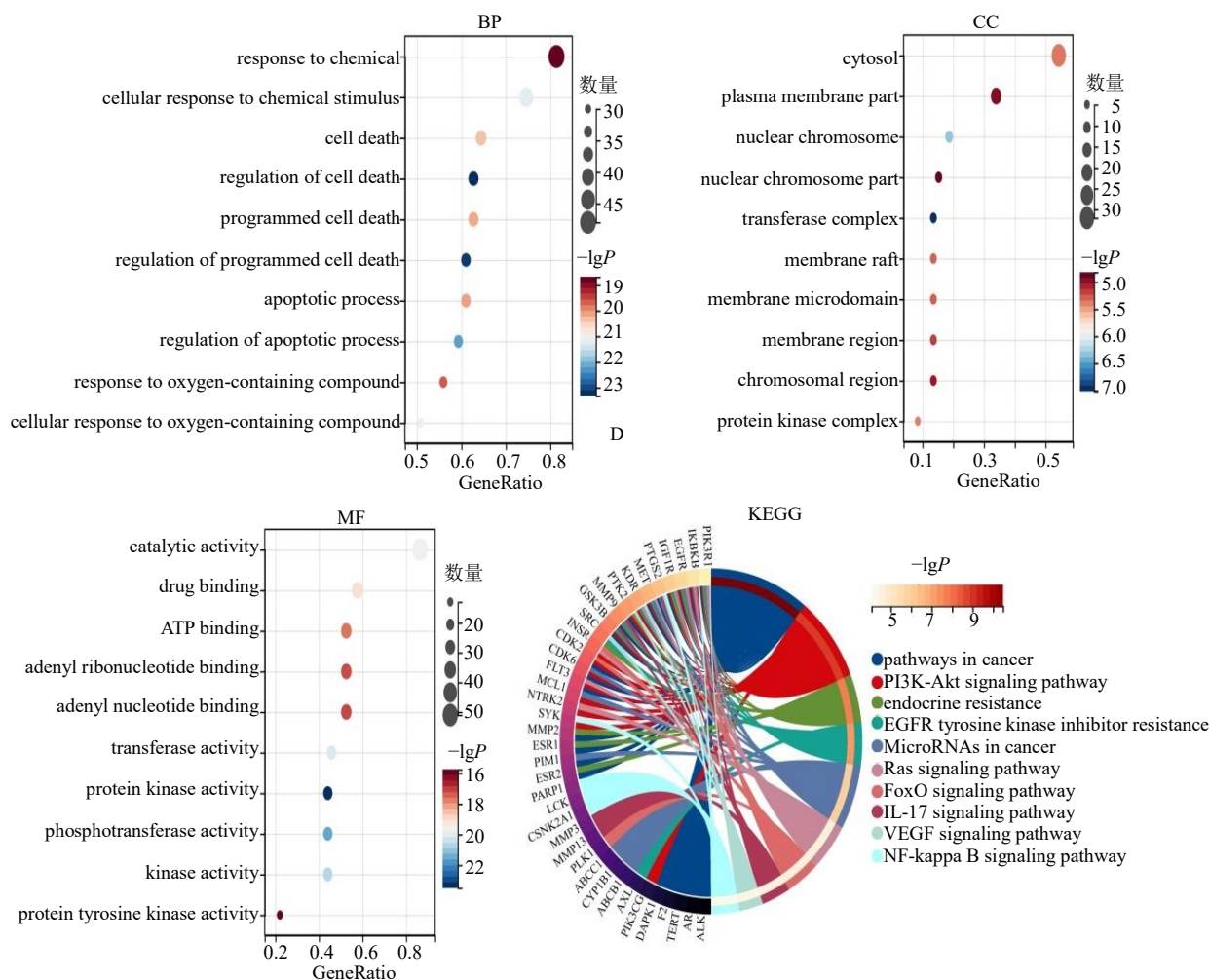


图 3 GO 和 KEGG 富集分析
Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis

此外, 根据 KEGG 富集分析筛选 $P < 0.05$ 的通路后共得到 180 条显著富集的 KEGG 通路, 按数值排序后选取前 10 位通路进行可视化展示。可以发现, 高良姜素作用于口腔鳞状细胞癌的相关信号通路主要包括癌症通路、PI3K/Akt 信号通路等。

2.4 关键基因的表达、预后水平及诊断价值

通过网络药理学分析获得 8 个核心基因后, 通过 Kaplan-Meier 分析 (图 4) 和 ROC 诊断曲线 (图 5) 对上述基因临床意义进行评估。Kaplan-Meier 分析结果显示, 仅 *PTGS2*、*GSK3B*、*ESR1*、*PARP1* 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。ROC 诊断曲线显示 *GSK3B*、*ESR1*、*PARP1*、*SRC*、*MMP9* 具有较好的

诊断效能 ($AUC > 0.8$)。因此, 最终确定 *GSK3B*、*ESR1*、*PARP1* 为核心基因。

2.5 KEGG 预测信号通路

通过 KEGG 网站对核心通路 PI3K/Akt 信号通路进行检索, 发现核心靶点 *GSK3B* 位于该信号通路下游 (图 6)。推测高良姜素可能通过调控 PI3K/Akt/*GSK3B* 通路在口腔鳞状细胞癌中发挥作用。

2.6 高良姜素对 HOK、CAL-27 细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示, 随着高良姜素浓度升高, HOK 细胞的存活率未见显著变化, 而 CAL-27 细胞的活性呈浓度相关性下降趋势 ($P < 0.01$), 表明高良姜素对正常口腔黏膜上皮细胞几乎无毒性

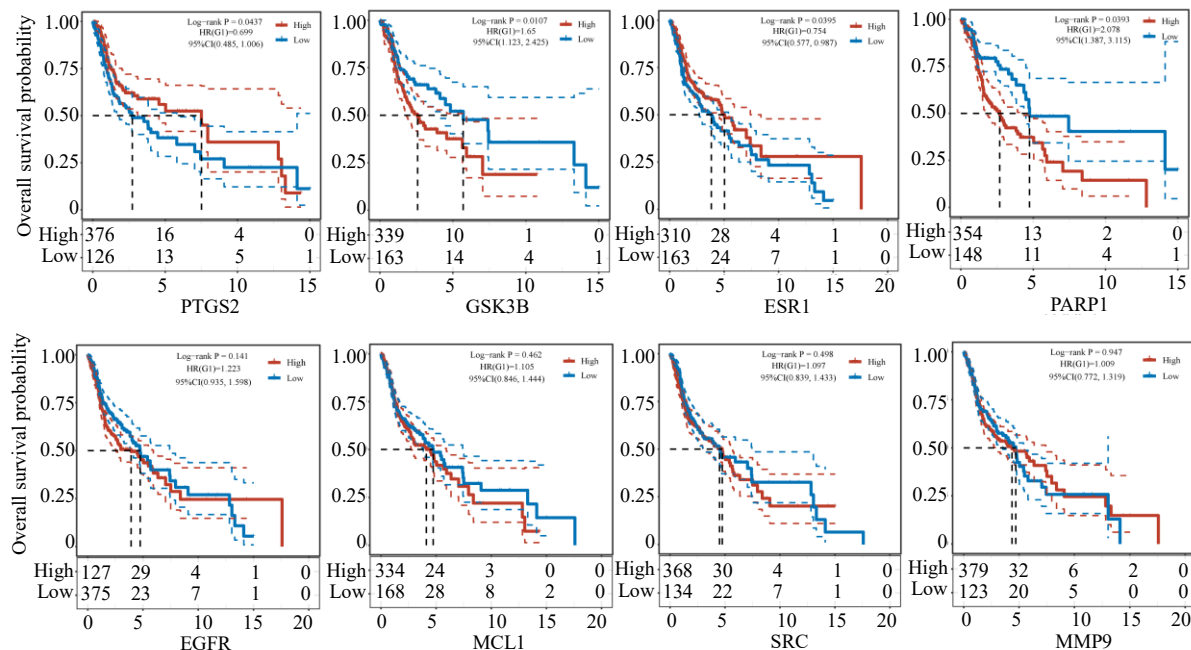


图 4 核心靶点的预后价值分析
Fig. 4 Prognostic value analysis of core targets

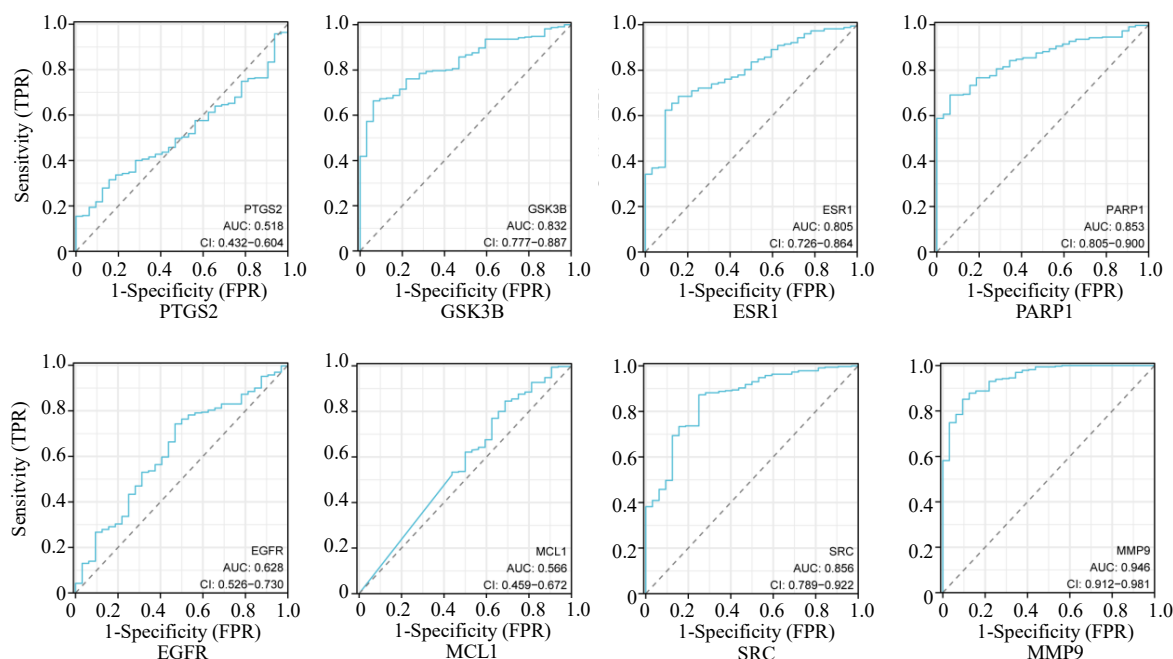


图 5 核心靶点的诊断价值分析
Fig. 5 Analysis of the diagnostic value of core targets

作用,但对 CAL-27 细胞具有抑制作用,见图 7。此外, CAL-27 细胞在 48 h 的半数抑制浓度为 13.25 $\mu\text{mol/L}$,本研究在后续实验中,采用 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 进行机制研究。

2.7 高良姜素对 CAL-27 细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 实验结果显示,与对照组相比,高良

姜素组细胞迁移和侵袭速率明显减慢 ($P<0.01$),表明高良姜素能够显著抑制 CAL-27 细胞的迁移与侵袭,见图 8。

2.8 高良姜素对 CAL-27 细胞凋亡的影响

结果显示,高良姜素组细胞凋亡率显著高于对照组 ($P<0.01$),且早期 (Q2-4) 和晚期 (Q2-2)

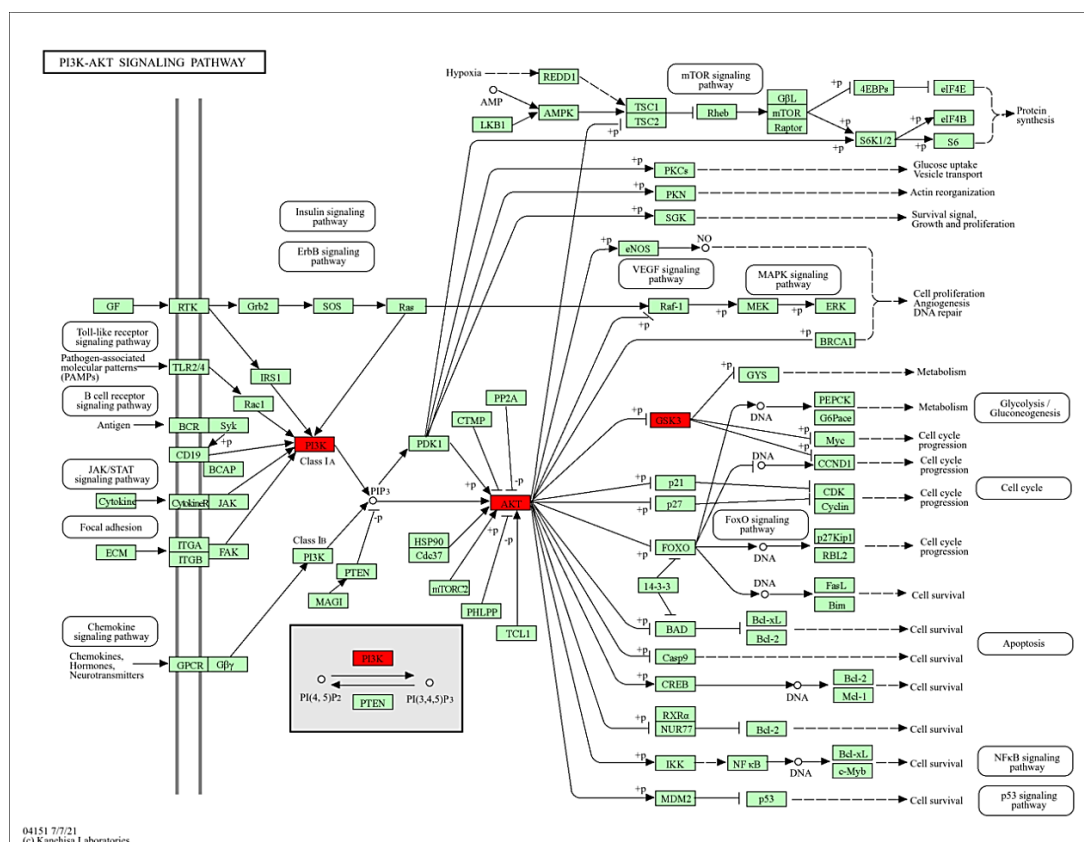


图 6 高良姜素在口腔鳞状细胞癌中作用的关键通路图谱

Fig. 6 Key pathway map of galangin's role in oral squamous cell carcinoma

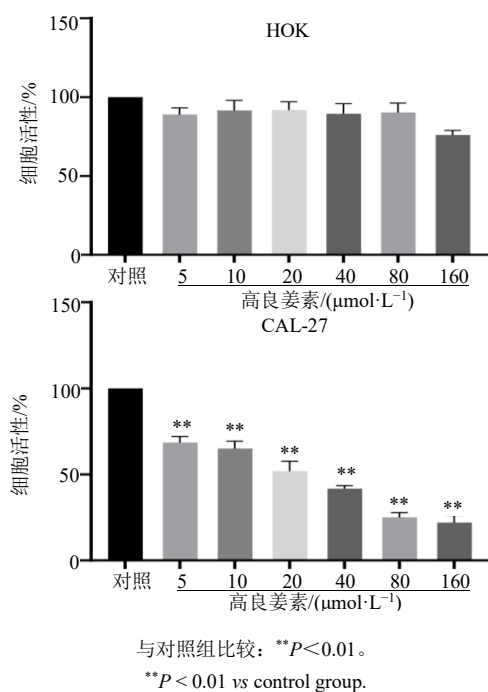


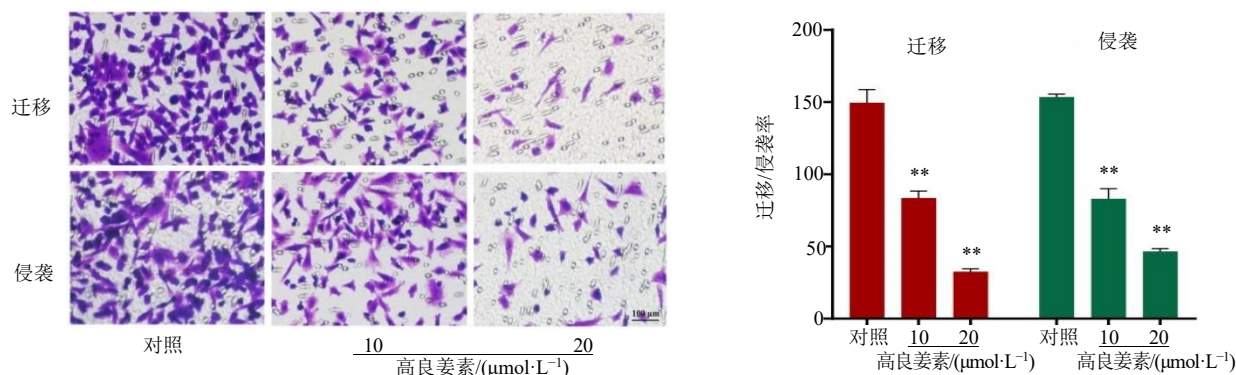
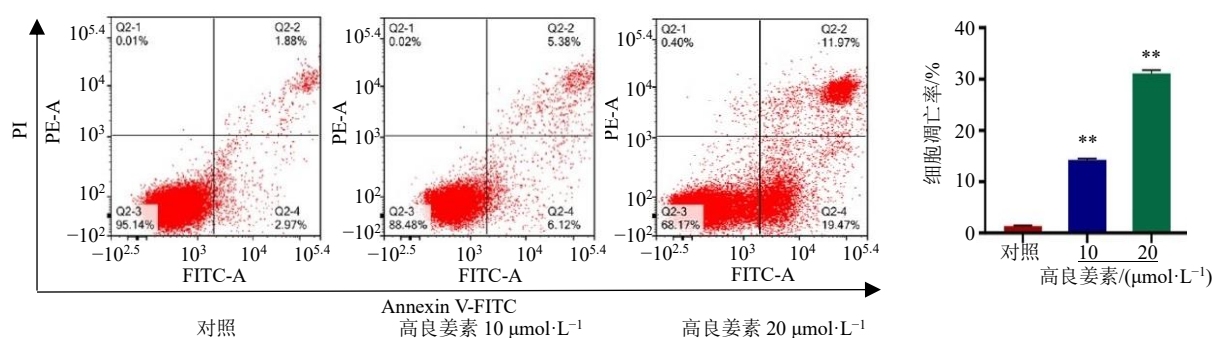
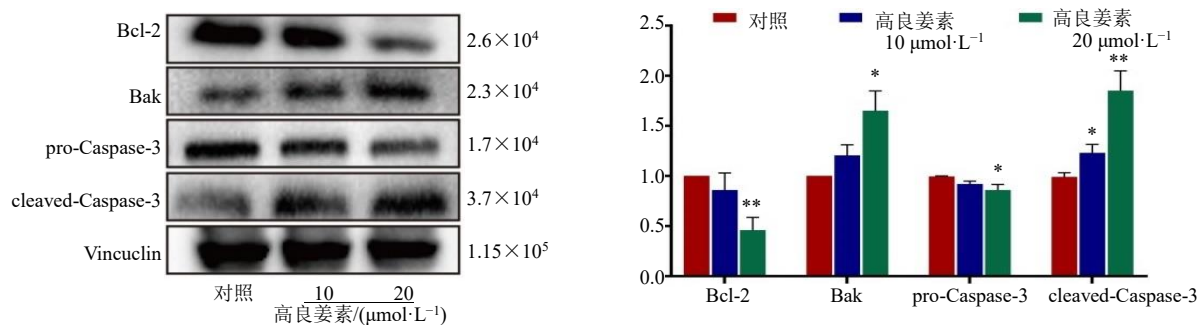
图 7 高良姜素对 CAL-27 和 HOK 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of galangin on the proliferation of CAL-27 and HOK cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

凋亡性 CAL-27 细胞比例以浓度相关性增加, 见图 9。Western blotting 分析结果进一步表明, 高良姜素作用 48 h 后, 高良姜素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 CAL-27 细胞中 Bak 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01); 而高良姜素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 Bcl-2 和 pro-Caspase-3 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 见图 10。这些结果证实高良姜素能够通过调节凋亡相关蛋白表达诱导 CAL-27 细胞凋亡。

2.9 高良姜素对 CAL-27 细胞 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路的影响

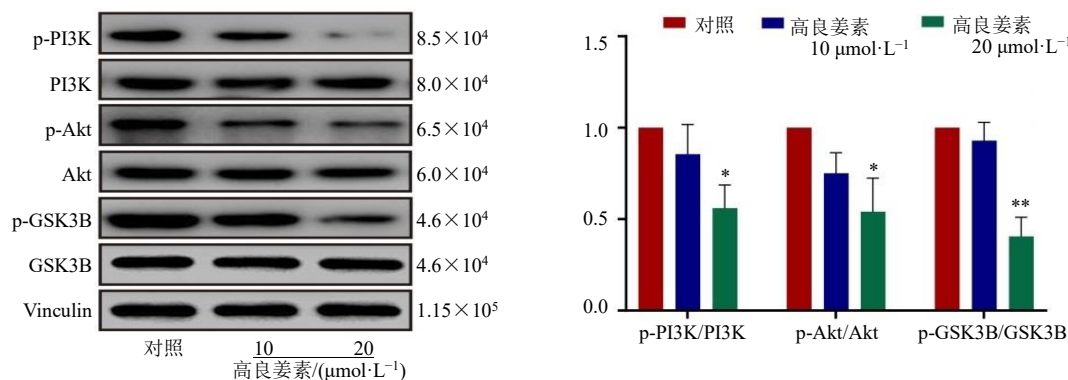
基于 KEGG 通路分析预测高良姜素可能通过调节 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路影响口腔鳞状细胞癌进程。为了验证该机制, 研究通过 Western blotting 检测高良姜素处理 48 h 后该通路关键蛋白的表达水平。结果显示, 与对照组相比, 高良姜素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组磷酸化 PI3K、Akt、GSK3B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明高良姜素可能通过抑制 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路的激活从而在 CAL-27 细胞中发挥抑制作用, 见图 11。

图 8 高良姜素对 CAL-27 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Effect of galangin on the migration and invasion of CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 9 高良姜素对 CAL-27 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 9 Effect of galangin on the apoptosis of CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 10 高良姜素对 CAL-27 细胞凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 10 Effect of galangin on apoptosis-related proteins in CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.10 高良姜素通过 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路诱导 CAL-27 细胞凋亡

为了进一步确认高良姜素对 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路的抑制作用,通过添加 PI3K 激活剂进行实验。结果显示,与高良姜素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,

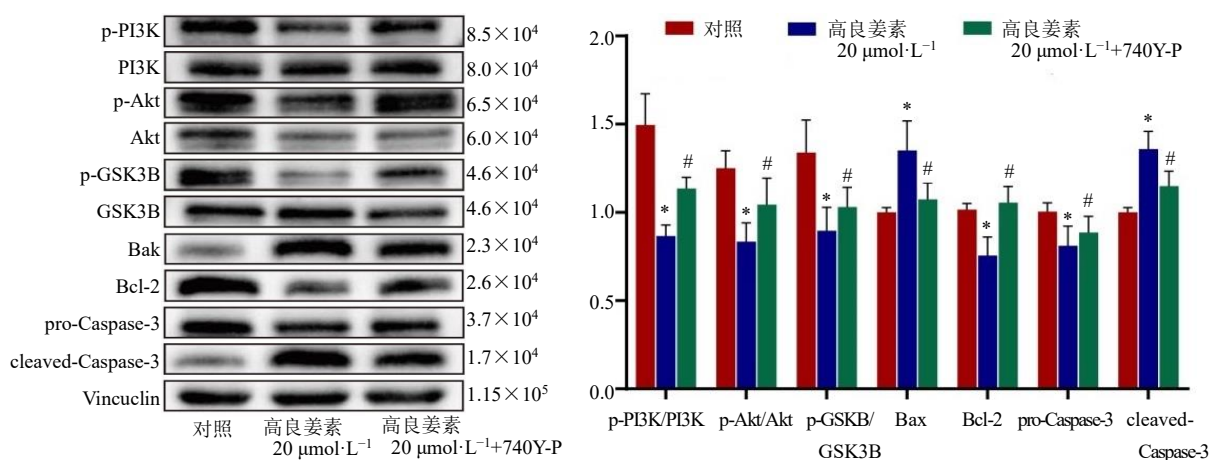
高良姜素+740Y-P 组 p-PI3K、p-Akt、p-GSK3B、Bcl-2、pro-Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。充分证实了高良姜素可通过抑制 PI3K/Akt/GSK3B 通路的促凋亡作用,见图 12。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 11 高良姜素对 CAL-27 细胞 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 Effect of galangin on the PI3K/Akt/GSK3B signaling pathway in CAL-27 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高良姜素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs galangin 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 12 PI3K 激活剂 740Y-P 对 PI3K/Akt/GSK3B 信号相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of PI3K activator 740Y-P on the expression of PI3K/Akt/GSK3B signal-related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

近年来,随着烟草、酒精和槟榔等物质的滥用,全球多地区口腔鳞状细胞癌的发病率和死亡率均呈现上升趋势^[12]。尽管目前口腔鳞状细胞癌的诊断与治疗已取得显著进展,但由于诊断延误、肿瘤转移和复发等因素,患者预后仍然很差^[13]。因此,探索替代治疗方案以改善现有问题具有重要临床意义。《本草纲目》记载高良姜性辛温无毒,主治霍乱吐泻、心脾冷痛,具有温胃健脾、调理脾虚寒症之功效。在中医理论中,口腔鳞状细胞癌归属于“牙岩”“舌岩”范畴,其病机与脾运失司、阴虚血瘀密切相关^[14]。因此,温补脾肾、调和气血的整体调理原则可能通过恢复机体阴阳平衡、改善内环境稳

态,从而增强机体自身抗癌能力对口腔鳞状细胞癌治疗具有协同作用。高良姜素作为高良姜的主要活性成分之一,不仅具有代谢调节、神经保护作用^[15],还具备较强的抗肿瘤作用。现有证据显示,高良姜素抗癌潜力可能源于抑制细胞增殖、降低细胞活力、防止细胞侵袭、增强细胞毒性和破坏克隆生成能力^[16]。

基于上述背景,本研究首先采用网络药理学方法系统性预测高良姜素抗口腔鳞状细胞癌的潜在机制,确定了 59 个高良姜素抗口腔鳞状细胞癌重叠靶点。对重叠靶点的 GO 分析结果表明,高良姜素可能通过调控凋亡过程、含氧化合物反应及响应化学刺激等生物学功能发挥抗口腔鳞状细胞癌作

用。KEGG 通路分析显示, PI3K/Akt 信号通路参与多种细胞功能, 在正常生理状态和病理条件下均发挥重要作用, 尤其是对促进肿瘤的发生与发展具有重要贡献^[17]。大量研究证实天然产物可通过靶向 PI3K/Akt 信号通路发挥抗肿瘤作用^[18]。在口腔鳞状细胞癌中, PI3K/Akt 通路参与细胞凋亡、增殖、侵袭、转移及放化疗耐药性密切相关^[19]。PI3K/Akt 通路的异常激活常见于侵袭性癌症, 尤其是编码 PI3K p110 α 催化亚基的 PIK3CA 基因突变, 该突变存在于多种恶性肿瘤并促进肿瘤发生^[20]。此外, 研究证实 PI3K/Akt 通路激活参与口腔鳞状细胞癌的病因学过程, 尤其在烟草暴露相关的病例中作用显著^[21]。这些研究共同证实 PI3K/Akt 通路异常激活促进口腔鳞状细胞癌肿瘤发生。目前针对该通路已开发出一系列抗癌药物, 临床前与临床数据均证实其疗效^[22]。

此外, 本研究通过 PPI 网络筛选出 8 个关键靶点, 并结合生物信息学分析其在口腔鳞状细胞癌的诊断与预后价值, 最终确定 GSK3B、ESR1、PARP1 为高良姜素干预口腔鳞状细胞癌的潜在核心靶点。已有研究报道, GSK3B 作为糖原合成酶激酶 3 β 表达, 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键抑制因子, 其在肿瘤细胞中的表达通常被抑制^[23]。Mishra 等^[24]研究发现 GSK3B 在口腔鳞状细胞癌中表达上调并可促进肿瘤细胞异常增殖。PARP1 是一种广泛存在于真核细胞中的核酶, 在 DNA 损伤修复、细胞凋亡、表观遗传调控等过程中发挥核心作用, 其功能与癌症发生、治疗及耐药性密切相关^[25]。ESR1 已被确定与肿瘤疾病相关^[26-27]。本研究数据也显示, 其高表达与较好的预后相关。综上, GSK3B、ESR1、PARP1 可能是高良姜素抗口腔鳞状细胞癌的潜在治疗靶点, 这些结果也为后续实验验证提供了重要理论依据。

在网络药理学预测的基础上, 本研究通过体外实验验证高良姜素对口腔鳞状细胞癌细胞的抑制作用。首先采用 CCK-8 法检测不同浓度高良姜素对 CAL-27 细胞增殖的影响。Bcl-2 家族包含促凋亡蛋白 (如 Bax、Bak) 和抑制蛋白 (如 Bcl-2、Bcl-xL), 在应激条件下促凋亡蛋白被激活, 导致线粒体外膜通透性改变, 促使细胞色素 C 释放至胞质, 与 Apaf-1 结合形成凋亡小体并激活 Caspase-9, 进而激活 Caspase-3, 最终导致细胞死亡^[28]。为进一步探讨其作用机制, 本研究通过流式细胞术检测细胞凋亡。

结果发现, 高良姜素可显著诱导 CAL-27 细胞发生凋亡, 且呈浓度相关性; Western blotting 实验进一步显示, 高良姜素可下调 Bcl-2、pro-Caspase-3 表达水平, 上调 Bak、Cleaved-caspase-3 水平, 表明其通过调控 Bcl-2 家族蛋白诱导线粒体凋亡途径。

值得注意的是, 上述网络药理学预测提示 PI3K/Akt 信号通路为高良姜素作用的关键通路, 而 GSK3B 是该通路下游重要节点分子。PI3K/Akt/GSK3B 信号通路在多种癌症中已被证实可调控细胞增殖、凋亡及侵袭。本研究发现, 高良姜素处理后 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 及 p-GSK3B/GSK3B 的表达水平均显著下降, 表明高良姜素可抑制 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路活化。为进一步验证高良姜素的作用机制依赖于 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路, 本研究在加入 PI3K 激动剂后发现, 高良姜素对通路蛋白及凋亡相关蛋白的抑制作用被显著逆转, 这一结果明确证实高良姜素通过抑制 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路诱导口腔鳞状细胞癌细胞凋亡。

综上所述, 本研究利用网络药理学和细胞实验证实高良姜素可通过抑制细胞增殖、转移并诱导细胞凋亡来发挥抗口腔鳞状细胞癌作用, 其机制可能与抑制 PI3K/Akt/GSK3B 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Lalremtluangi R, Dangore-Khasbage S. Non-habit-related oral squamous cell carcinoma: A review [J]. *Cureus*, 2024, 16(2): e54594.
- [3] Ling Z H, Cheng B, Tao X A. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: Challenges and opportunities [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(7): 1548-1561.
- [4] Hassanein E H M, Abd El-Maksoud M S, Ibrahim I M, *et al.* The molecular mechanisms underlying anti-inflammatory effects of galangin in different diseases [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(7): 3161-3181.
- [5] Zhang F, Yan Y, Zhang L M, *et al.* Pharmacological activities and therapeutic potential of galangin, a promising natural flavone, in age-related diseases [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155061.
- [6] Singh D, Saini A, Singh R, *et al.* Galangin, as a potential anticancer agent [J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2022, 32(3): 331-343.
- [7] 毛永馨, 周莉, 秦菲, 等. 基于数据挖掘、网络药理学、

- 分子模拟和实验验证探究中药治疗糖尿病足溃疡用药规律及作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5559-5572.
- [8] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data [J]. *Protein Sci*, 2022, 31(1): 47-53.
- [9] 乔小改, 蔡大军, 张庆. 微小RNA-101及髓细胞白血病因子-1在子痫前期中的表达及对胎盘滋养层细胞的影响 [J]. 实用妇产科杂志, 2022, 38(10): 774-778.
- [10] 赵康容, 孙爱琴, 林琼, 等. 蛋白质精氨酸甲基转移酶5促进人卵巢癌HO8910细胞迁移 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2020, 30(5): 430-434.
- [11] 郭佳, 冯素亚, 路学文. HOXA1通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路影响口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡及侵袭能力 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2020, 39(2): 203-207.
- [12] Hirsch J M, Sandy R, Hasseus B, *et al.* A paradigm shift in the prevention and diagnosis of oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2023, 52(9): 826-833.
- [13] Kim M J, Ahn K. Prognostic factors of oral squamous cell carcinoma: The importance of recurrence and pTNM stage [J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2024, 46(1): 8.
- [14] Jiang D, Xiao F Y, Liu L H, *et al.* Effects of traditional Chinese medicine anticancer decoction combined with basic chemotherapy and nursing intervention on oral cancer patients after surgery and its effect on tumor markers and immune function [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 6341381.
- [15] 孟王桃, 陈超, 姚楠楠, 等. 高良姜素调节Shh/Ptch1信号通路改善阿尔茨海默病大鼠认知障碍 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(4): 866-874.
- [16] Tuli H S, Sak K, Adhikary S, *et al.* Galangin: A metabolite that suppresses anti-neoplastic activities through modulation of oncogenic targets [J]. *Exp Biol Med*, 2022, 247(4): 345-359.
- [17] Peng Y, Wang Y Y, Zhou C, *et al.* PI3K/Akt/mTOR pathway and its role in cancer therapeutics: Are we making headway? [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 819128.
- [18] Tewari D, Patni P, Bishayee A, *et al.* Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 1-17.
- [19] Wu T, Jiao Z, Li Y X, *et al.* HPRT1 promotes chemoresistance in oral squamous cell carcinoma via activating MMP1/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cancers*, 2022, 14(4): 855.
- [20] Liu D L, Li L, Zhang J F, *et al.* Berberine promotes apoptosis and inhibits the migration of oral squamous carcinoma cells through inhibition of the RAGE/PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2025, 187: 118147.
- [21] Shukla P, Dange P, Mohanty B S, *et al.* ARID2 suppression promotes tumor progression and upregulates cytokeratin 8, 18 and beta-4 integrin expression in TP53-mutated tobacco-related oral cancer and has prognostic implications [J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(12): 1908-1917.
- [22] Ediriweera M K, Tennekoon K H, Samarakoon S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 147-160.
- [23] Zhu M C, Zhang Y H, Xiong P, *et al.* Circ-GSK3B up-regulates GSK3B to suppress the progression of lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(11): 1761-1772.
- [24] Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 20.
- [25] Peng X P, Pan W Y, Jiang F, *et al.* Selective PARP1 inhibitors, PARP1-based dual-target inhibitors, PROTAC PARP1 degraders, and prodrugs of PARP1 inhibitors for cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 186: 106529.
- [26] Li Z Q, Wu Y, Yates M E, *et al.* Hotspot ESR1 mutations are multimodal and contextual modulators of breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(7): 1321-1339.
- [27] Zhang Y Y, Cheng J X, Zhong C, *et al.* ESR1 regulates the obesity and metabolism-differential gene MMAA to inhibit the occurrence and development of hepatocellular carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 899969.
- [28] 郑云鹏, 李旭阳, 蔡丙杰, 等. lncRNA LEF1-AS1通过靶向miR-612调控皮肤鳞状细胞癌细胞株增殖、凋亡、迁移侵袭的体外实验研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(6): 415-423.

[责任编辑 高源]