基于网络药理学及实验验证探讨砂生槐子总生物碱抗肝细胞癌的潜在靶点及作用机制

陈永娟[1]，程雅青[1#]，马 妍[1]，徐泽林[1]，章 勇[3]，张发斌[1*]，胡春晖[2*]

1. 青海大学 医学院 公共卫生系，青海 西宁 810001
2. 青海大学 药学院，青海 西宁 810001
3. 青海大学 临床医学院，青海 西宁 810001

摘 要：目的 探讨砂生槐子总生物碱（TA-SM）抗肝细胞癌（HCC）的潜在作用靶点和作用机制。**方法** 采用网络药理学方法筛选 TA-SM 抗 HCC 的候选靶点与富集通路，构建相关网络，利用分子对接技术揭示砂生槐子中 6 种主要生物碱成分与潜在靶点的结合活性。体外以 Huh-7、HepG2 细胞为模型，CCK-8 法检测 TA-SM 对 2 种细胞增殖的抑制效应，并借助 Western blotting 及实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）实验测定磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B（PI3K-Akt）信号通路中相关蛋白与基因的表达。体内构建 HepG2 裸鼠异种移植瘤模型，评价 TA-SM 对小鼠体质量与肿瘤体积的影响；通过 Western blotting、qRT-PCR、免疫组化与免疫荧光评估 PI3K-Akt 通路变化；TUNEL 检测肿瘤细胞凋亡；苏木精-伊红（HE）染色评估主要脏器毒性。**结果** 网络药理学分析显示 TA-SM 治疗 HCC 的核心靶点 38 个；基因本体（GO）富集 654 条，京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集 162 条通路，涉及癌症通路、PI3K-Akt 信号通路及内分泌抵抗等；分子对接显示 6 种生物碱与 PI3K-Akt 通路关键靶点结合能均＜−20.93 kJ·mol^{-1}。体外实验显示 TA-SM 在 1～64 μg·mL^{-1} 范围内对 Huh-7 与 HepG2 细胞呈浓度相关性增殖抑制，并下调 PI3K、Akt1、糖原合成酶激酶-3β（GSK3β）、p-Akt、p-GSK3β、p-Caspase-9 的蛋白及 mRNA 表达，上调 Caspase-9 的蛋白及 mRNA 表达。体内实验显示 TA-SM 抑制移植瘤生长且对主要脏器无明显毒性；能显著下调 PI3K、Akt1、GSK3β、p-Akt、p-GSK3β、p-Caspase-9 的蛋白及基因表达（P＜0.05），升高 Caspase-9 表达（P＜0.05）；TUNEL 染色结果显示索拉非尼组、TA-SM 组肿瘤细胞凋亡率均较对照组显著升高（P＜0.001），TA-SM 组诱导肿瘤细胞凋亡的能力显著优于索拉非尼。**结论** 基于网络药理学筛选提示 TA-SM 可能通过多靶点、多通路发挥抗 HCC 作用，其中 PI3K-Akt 信号通路为关键机制之一；体外与体内实验结果共同支持 TA-SM 通过抑制 PI3K-Akt 通路、促进 Caspase-9 相关凋亡从而抑制 HCC 生长的作用机制。

关键词：网络药理学；砂生槐子总生物碱；肝细胞癌；PI3K-Akt 信号通路；裸鼠异种移植瘤模型

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376(2026)11 - 3940 - 19

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.11.012

Study on potential target and effect of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* in anti-hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and experimental verification

CHEN Yongjuan[1], CHENG Yaqing[1], MA Yan[1], XU Zelin[1], ZHANG Yong[3], ZHANG Fabin[1], HU Chunhui[2]

1. Department of Public Health, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China
2. School of Pharmacy, Qinghai University, Xining 810001, China
3. School of Clinical Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract: Objective To explore the potential target and mechanism of total alkaloids of *Sophora moorcroftiana* (TA-SM) against hepatocellular carcinoma. **Methods** Firstly, the network pharmacology method was used to screen the candidate targets and

收稿日期：2026-05-03

基金项目：青海省科技厅科技援青合作专项（2024-QY-201）

作者简介：陈永娟，硕士研究生，研究方向为慢性病防治。E-mail: 17716004704@163.com

#共同第一作者：程雅青，硕士研究生，研究方向为慢性病防治。E-mail: YS231053001463@qhu.edu.cn

***通信作者：**张发斌，教授，硕士生导师，研究方向为慢性病防治与地方病。E-mail: qhmczfb@126.com

胡春晖，博士，教授，博士生导师，研究方向为物理药剂。E-mail: chunhuihu@qhu.edu.cn

enrichment pathways of TA-SM against HCC, and the related network was constructed. The molecular docking technique was used to suggest the binding activity of six main alkaloid components of *Sophora moorcroftiana* with potential targets. *In vitro*, Huh-7 and HepG2 cells were used as models. CCK-8 method was used to detect the inhibitory effect of TA-SM on the proliferation of Huh-7 and HepG2 cells. Western Blotting and qRT-PCR experiments were used to determine the expression of related proteins and genes in the PI3K-Akt signaling pathway. The effect of TA-SM on the weight and tumor volume of mice was evaluated by constructing HepG2 xenograft tumor model in nude mice. The changes of PI3K-Akt pathway were evaluated by Western blotting, qRT-PCR, immunohistochemistry and immunofluorescence. Apoptosis of tumor cells was detected by TUNEL. The main organ toxicity was evaluated by HE staining. **Results** Network pharmacology analysis showed that there were 38 core targets of TA-SM in the treatment of HCC. There were 654 GO enrichment and 162 KEGG enrichment pathways, involving cancer pathway, PI3K-Akt signaling pathway and endocrine resistance. Molecular docking showed that the binding energy of the six alkaloids to the key targets of the PI3K-Akt pathway was less than −20.93 kJ·mol^{-1}. *In vitro* experiments showed that TA-SM inhibited the proliferation of Huh-7 and HepG2 cells in a concentration-dependent manner in the range of 1–64 μg·mL^{-1}, and down-regulated the protein and mRNA expression of PI3K, Akt1, GSK3β, p-Akt, p-GSK3β and p-Caspase-9, and up-regulated the protein and mRNA expression of Caspase-9. *In vivo* experiments showed that TA-SM inhibited the growth of transplanted tumors and had no obvious toxicity to major organs. PI3K, Akt1, GSK3β, p-Akt, p-GSK3β, p-Caspase-9 protein and gene expression were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and Caspase-9 expression was increased ($P < 0.05$). TUNEL staining results showed that the apoptosis rate of tumor cells in sorafenib group and TA-SM group was significantly higher than that in Saline group ($P < 0.001$), and the ability of TA-SM group to induce apoptosis of tumor cells was significantly better than that of sorafenib group. **Conclusion** Based on network pharmacology screening, it is suggested that TA-SM may play an anti-HCC role through multiple targets and multiple pathways, among which PI3K-Akt signaling pathway is one of the key mechanisms. The results of *in vitro* and *in vivo* experiments support that TA-SM inhibits the growth of hepatocellular carcinoma by inhibiting the PI3K-Akt pathway and promoting Caspase-9-related apoptosis.

Key words: network pharmacology; total alkaloids of *Sophora moorcroftiana* (Wallich.) Benth.ex Baker; hepatocellular carcinoma; PI3K-Akt signaling pathway; nude mouse xenograft tumor model

肝细胞癌（HCC）作为原发性肝癌的主要类型，其占比高达 90%，占所有新报告肿瘤的近 9%[1]，被列为全球第 6 大最常见的癌症和第 3 大最常见的癌症相关死亡原因[2]。在全球范围内，其发病率呈不断上升的趋势，且与其他常见癌症的死亡率下降相反，HCC 的死亡率每年持续增加 2%～3%[3]。该疾病具有发病隐匿、术后复发率高、临床预后不佳等显著特征[4-5]。尽管当前医疗技术水平不断提升，HCC 患者的整体预后仍不理想，5 年生存率仍低于 10%[6]。对于早期 HCC 患者，治疗方案主要以手术切除、局部消融治疗及肝移植为主[7]，然而，在中国肝癌患者群体中，绝大多数患者确诊时已处于疾病中晚期阶段，往往错失了手术治疗的机会[8]。基于此，经动脉化疗栓塞（TACE）、动脉放射性栓塞（TARE）和全身治疗是实现疾病控制的合适选择[9]。但是上述治疗方法均存在一定局限性，对机体创伤较大、不良反应明显。

天然活性物质具有活性强、低毒、安全性好等优势[10]，且天然产物具有多组分、多通道、多靶点的药理作用[11]。根据中国 2024 年颁布的《原发性肝癌诊疗指南》，中医药干预已被纳入原发性肝癌的规范化治疗体系当中[12]。近年来，大量临床研究结果表明，中药在肝癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的治疗中均表现出良好成效，凸显出巨大的开发潜力与广阔的应用前景。

砂生槐是西藏高原特有的多年生灌木，具有极强的耐旱能力，同时具备防风固沙、保持水土的生态功能[13]。砂生槐子中提取的总生物碱是其主要活性成分，具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫等多种药理作用[14]，可用于肝癌[15]、肺癌[16]、结肠癌[17]及消化不良[18]等病症的治疗，属于极具开发价值的药用植物资源。已有研究证实，砂生槐种子的乙醇提取物具有显著的肝脏保护特性[19]。本课题组前期借助高效液相色谱-二极管阵列检测器（HPLC-DAD）定量分析系统，成功实现了苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱及槐定碱 4 种生物碱的同步分离与鉴定[20]，随后进一步优化了这 4 种生物碱的提取工艺[21-22]，并建立了其体内含量的检测方法[23]。也有研究发现，苦参碱不仅在乳腺癌细胞[24]、卵巢癌细胞[25]和结直肠癌细胞[26]等多种肿瘤中发挥抗肿瘤作用，还可通过诱导肝癌细胞凋亡，显著抑制肝癌的发生。氧化苦参碱被广泛用于治疗病毒性肝炎[27]，还可以通过下

调纤维化因子的表达来减轻肝损伤[28]。槐果碱可通过抑制肝纤维化相关基因的表达，缓解肝纤维化程度，进而降低 HCC 的进展风险[29]。槐定碱衍生物可以通过下调丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）通路，抑制肝癌细胞的迁移与侵袭[30]，通过激活转录因子 3（ATF3）介导的铁死亡抑制肝癌细胞增殖[31]。

网络药理学是在人工智能与大数据技术快速发展背景下，药物系统研究领域涌现的一门新兴前沿学科，网络药理学揭示了多个组分、靶点和信号通路之间的相互作用[33]，将药物、靶点与疾病三者有机整合，从整体层面阐明中药干预疾病的作用机制，具有系统性、关联性及预测性的鲜明特征，能够为综合药理机制的研究提供重要思路[34]。此外，网络药理学方法已用于构建“复合基因/蛋白质/通路-疾病”生物网络[35]，基于网络视角阐述生物系统、药物以及疾病间的复杂关系。分子对接借助计算机模拟活性分子和靶点蛋白的相互作用，融合网络药理学，成为阐释中药药效基础与治疗分子内在机制的可行路径[36]。

本研究主要借助网络药理学方法，探索砂生槐子总生物碱（TA-SM）抗 HCC 的主要作用靶点及作用机制，进一步挖掘 TA-SM 在现代医学中的价值，为 HCC 的早期预防、靶向治疗和后续临床应用提供新的理论依据和实践指导。

1 材料

1.1 动物

18 只 Balb/c 雌性裸鼠，4 周龄，体质量（13.60±0.75）g，购自江苏华创信诺医药科技有限公司。实验动物生产许可证号 SCXK（苏）2020-0009。实验通过青海大学医学院伦理审查，伦理学审查批号 PJ-202502-14。所有裸鼠饲养在中国科学院西北高原生物研究所 SPF 级实验室中。

1.2 细胞

人肝癌细胞 Huh-7 和 HepG2 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司，STR 鉴定正确，细菌、真菌及支原体检测结果均合格。

1.3 药物

砂生槐子采购于西藏林芝地区，经青海大学医学院药学院杨仕斌副教授鉴定为豆科槐属砂生槐 *Sophora moorcroftiana*（Wallich.）Benth.ex Baker 干燥种子[21]。本课题组前期已采用高效液相色谱法（HPLC）对藏药砂生槐子中 4 种生物碱含量进行鉴定，氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱和苦参碱的质量分数分别为 59.37、0.99、0.26、15.35 μg·g^{-1}[20]。

1.4 试剂

DMEM 培养基（货号 PM150210）、胰酶（货号 Pb180225）、胎牛血清（货号 164210-50）、青霉素-链霉素溶液（货号 WH1021D241）、磷酸盐缓冲液（PBS，货号 PB180327）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。CCK-8 试剂（货号 E-CK-A362）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。高效 RIPA 裂解液（货号 R0010）、二甲基亚砜（货号 D806645）、20×TBST 缓冲液（货号 T1082）、30%制胶液（货号 A1010）、1.5 M tris-Hcl（货号 T1010）、10% SDS（货号 S1010）购自北京索莱宝科技有限公司。异丙醇（货号 I811932）购自天津市科密欧化学试剂有限公司。氯仿（货号 C805076）购自河北一品制药股份有限公司。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（货号 P0015L）、磷酸酶抑制剂混合物 A（货号 P1082）、QuickBlockTM 封闭液（货号 P0220）购自上海碧云天生物技术有限公司。PageRuler™ 预染蛋白（货号 26617）购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司。电泳干粉（货号 G2018-1L）、转膜干粉（货号 G2017-1L）购自赛维尔生物科技有限公司。索拉非尼（SOR，货号 S828599）、10%过硫酸铵（APS，货号 A801037）购自麦克林生化科技股份有限公司；四甲基乙二胺（TEMED，货号 T8030），德国默克集团。辣根过氧化物酶（HRP）化学发光底物（货号 WBKLS0100）购自德国默克集团。磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K）抗体、丝氨酸和苏氨酸激酶 1（Akt1）抗体、糖原合成酶激酶-3β（GSK3β）抗体、胱天蛋白酶-9（Caspase-9）抗体、p-Akt 抗体、p-GSK3β 抗体、p-Caspase-9 抗体、HRP-山羊抗兔 IgG 二抗（货号 82796-4-RR、80457-1-RR、82061-1-RR、10380-1-AP、80455-1-RR、67558-1-lg、80346-1-RR、SA00001-2），购自武汉三鹰公司。

1.5 仪器

PH-min CO_2 恒温孵育箱，上海有丰科学仪器有限公司；DMI1 倒置生物显微镜，徕卡显微系统（上海）有限公司；GHH-1 数显恒温水浴锅，常州市国旺仪器制造有限公司；VORTEX-5 涡旋混合器，海门其林贝尔仪器公司；ST16R 台式冷冻离心机，赛默飞世尔科技有限公司；SCIENTZ-IID 超声细胞粉碎仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；HNDKT200-1 恒温振荡型干式金属浴，上海达洛汗诺仪器有限公司；1658004 垂直电泳仪、1703810 转

印槽，美国 BIO-RAD 公司；SK-0108-S 智能脱色摇床，北京大龙兴创实验仪器有限公司；Spark 酶标仪，帝肯（上海）实验器材有限公司；Light Cycler 480 II 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）仪，上海罗氏制药有限公司。

2　方法

2.1　网络药理学预测 TA-SM 治疗 HCC 的作用机制

2.1.1　相关数据库及软件　物种选择“Homo sapiens”。中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php，Version 2.3）；UniProt（https://www.uniprot.org）；STRING（https://cn.string-db.org）；PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）；GeneCards（https://www. genecards.org）；PharmGKB（https:// www.pharmgkb.org/）；SwissTargetPrediction（https:// swisstargetprediction. ch/）；PharmMapper（https://www.lilab-ecust.cn/）；CTD（https://ctdbase.org/）；OMIM（https://www.omim.org/）；DisGeNET（https:// disgenet.com/）；DAVID（https://davidbioinformatics. nih.gov）；TTD（https://ttd.idrblab.cn/）；微生信平台（https://www.bioinformatics.com.cn/）；殷赋云计算平台（https://cloud.yinfotek.com/）；PDB（https://www.rcsb.org）。

2.1.2　TA-SM 治疗 HCC 潜在靶点筛选　以砂生槐子 6 种主要生物碱（苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱、金雀花碱）为对象，通过 TCMSP 和 PubChem 数据库获取其 SMILES 号，经 SwissTargetPrediction 预测靶点，PharmMapper、CTD 数据库补充靶点，通过 Uniprot 数据库标准化靶点名称合并去重得到 TA-SM 相关靶点；同时以“hepatoma”“hepatocellular carcinoma”为关键词，在 TCMSP（筛选的基因数目只有 74 个，所以全部纳入）、Genecards（Relevance score≥20）、OMIM（纳入了检索词匹配疾病官方名称的所有靶点）、CTD（Inference Score≥20）、TTD（Target Type：Clinical trial target）、PharmGKB（筛选的基因数目只有 37 个，所以全部纳入）、DisGeNET（Score≥0.5）数据库检索并去重获得 HCC 相关靶点，最终通过微生信在线平台取两者交集，得到 TA-SM 治疗 HCC 的潜在作用靶点。

2.1.3　TA-SM 与 HCC 共同作用靶点的蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络构建及核心靶点分析　将该共同作用靶点输入 STRING 数据库，参数“organism”设置为“homo sapiens”，参数“minimum required interaction score”设置为“medium confidence（0.900）”，参数“network displayoptions”设置为“hide disconnected nodes in the network”，其余参数设置均为系统默认。运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络，再通过该软件 CytoNCA 和 CytoHubba 插件进行拓扑分析，选择 CytoNCA 插件中 Score 值位居前 50 的靶点，CytoHubba 插件以高于介数中心性（BC）、紧密中心性（CC）、度（Degree）值、Eigenvector centrality（特征向量中心性）4 个值的中位数为标准筛选核心靶标蛋白，构建可视化网络。

2.1.4　通路富集分析及“疾病-通路-靶点-成分-药物”网络构建　利用 DAVID 数据库对上述核心潜在靶点进行基因本体（GO）富集和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，选取前 10 个基因功能及前 30 条信号通路进行可视化，同时构建“Network”和“Type”文件，导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“疾病-通路-靶点-成分-药物”互作网络。

2.1.5　分子对接　将 TA-SM 中 6 种生物碱与 PI3K-Akt 通路关键靶蛋白进行分子对接：从 Pubchem 获取生物碱 3D 结构（MOL），经殷赋云平台转为 PDB 格式；从 PDB 库下载分辨率＜2.5 Å（1 Å＝0.1 nm）的核心靶点蛋白晶体结构，用 PyMOL 2.5.0 去除配体、水分子并加氢；以 AutoDockTools 1.5.7 转为 PDBQT 格式，参照原配体设置对接参数，选取结合自由能最低构象。结合能≤0 kJ·mol^{-1} 为可自发结合，≤−20.93 kJ·mol^{-1} 为衔接性较好，≤−29.26 kJ·mol^{-1} 为结合活性极强；最后用 PyMOL 2.5.0 可视化对接结果并做结合能热图分析。

2.2　TA-SM 抗 HCC 的体外研究

2.2.1　细胞培养　将细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖基础培养基中，置于恒温培养箱（37 ℃、5% CO_2）中进行培养。

2.2.2　细胞毒性实验　Huh-7 和 HepG2 细胞系以每孔 8×10^3 接种于 96 孔培养板，培养 24 h 后，配制不同质量浓度（1、2、4、8、16、32、64 μg·mL^{-1}）的含药培养基，每孔添加 100 μL，放入 37 ℃、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中继续培养 24 h 后，每孔添加 10 μL CCK-8 试剂，在 37 ℃、避光环境下孵育 1 h 后，利用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度（A）值，计算半数抑制浓度（IC_{50}）值。

$$细胞存活率=(A_{实验}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

2.2.3　Western blotting 实验　配制 TA-SM 浓度为

2、4、8 μg·mL^{-1} 的含药培养基，取对数生长期 Huh-7、HepG2 细胞，按 1×10^6 的密度接种于培养皿，置于 37 ℃、5% CO_2培养箱中常规培养，待细胞融合度达 80%时，对照组以完全培养基培养 24 h。PBS 洗涤后，裂解 15 min，离心后取上清。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，以 20 μg 总蛋白计算上样量，每孔上样 4 μL，样品煮沸变性后进行电泳，先 90 V 电泳 30 min，再 120 V 电泳至溴酚蓝距胶下缘 0.5 cm。PVDF 膜经甲醇活化，按海绵垫-滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵垫顺序组装转膜夹，200 mA 恒流冰上转膜 90 min。转膜后用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，磷酸化蛋白改用 QuickBlock™封闭液封闭 15～30 min。一抗 PI3K、Akt1、GSK3β、Caspase-9、p-Akt、p-GSK3β、p-Caspase-9、GAPDH（1∶30 000、1∶20 000、1∶30 000、1∶8 000、1∶25 000、1∶5 000、1∶5 000、1∶40 000）4 ℃孵育 12～18 h，室温平衡 30 min 后回收一抗，1×TBST 洗膜 5 次，每次 6 min。羊抗兔 IgG-HRP 二抗 1∶10 000 稀释，室温孵育 1 h，TBST 洗膜 5 次共 30 min。避光配制并滴加化学发光液，曝光显影，采用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

2.2.4 qRT-PCR 实验 利用荧光染料或探针，使其与扩增的 DNA 或 RNA 分子结合发出荧光信号。采用 ΔRn 阈值计算循环阈值（C_t 值），结合标准曲线实现对目标序列的量化。见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

序列	引物序列
PI3K	Forward: CCCCTCCATCAACTTCTTCA
	Reverse: CGGTTGCCTACTGGTTCAAT
Akt1	Forward: ATGAACGACGTAGCCATTGTG
	Reverse: TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
GSK3β	Forward: GCGAAGGCAACAGTCGCT
	Reverse: CTTGGTGGTTTTGTATTCGATGAC
Caspase-9	Forward: CGAAGGCGATAGTTTGGCTCC
	Reverse: GGGACTGCAGGTCTTCAGA
GAPDH	Forward: CGGGAAACTGTGGCGTGAT
	Reverse: CAAAGGTGGAGGAGTGGGT

取对数生长期的 Huh-7 和 HepG2 细胞按适宜密度接种于培养皿，置于 37 ℃、5% CO_2培养箱培养，待细胞融合度达 80%时更换含药培养基（TA-SM 浓度为 2、4、8 μg·mL^{-1}），对照组加入等体积溶剂，各组细胞继续培养 24 h。吸出旧培养基，再用 PBS 清洗 2 次，随后添加 2 mL 的 RNAiso Plus 裂解液，置于冰上静置 5 min，吹打脱壁后转移至无酶 EP 管；加 200 μL 氯仿涡旋混匀，室温静置 5 min，4 ℃、13 000 r·min^{-1} 离心 15 min，收集上层 RNA 相加等体积异丙醇，室温静置 10 min 后离心弃上清，加 1 mL 无水乙醇洗涤离心后，吸干乙醇通风橱风干 30～60 min，加 20～40 μL 无酶水溶解，−80 ℃保存。清洗定量板 3 次，测定 mRNA 浓度（A_{260}/A_{280}≈2.0 合格）并计算 1 000 ng mRNA 体积，冰上配制逆转录体系，按 37 ℃ 15 min→85 ℃ 5 s→4 ℃获得 cDNA；稀释后配制 qRT-PCR 体系，Roche 仪器中反应（预变性 95 ℃ 30 s，扩增 95 ℃ 15 s、60 ℃ 30 s 40 个循环，溶解 60 ℃ 1 min，降温 50 ℃ 30 s），$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

2.3 TA-SM 抗 HCC 的体内研究

2.3.1 人源肿瘤细胞系异种移植模型的建立[37] 将生长良好的 HepG2 细胞调整密度至每毫升 5.0×10^7 个细胞，冰浴下将基质胶与细胞悬液按 1∶1 混匀，无菌条件下向裸鼠腋下 sc 100 μL（含 2×10^6～5×10^6 个细胞）复合物，待接种区域肿块体积达 60～80 mm^3 即模型建立成功。

2.3.2 动物分组及给药 待裸鼠皮下移植瘤体积达到 100 mm^3 后，采用 Excel 随机数法完成动物分组；分组由 2 名实验人员协作完成，1 人负责动物编号、1 人执行分组操作，全程实现分组隐匿，避免人为选择偏倚。随机将小鼠分为 3 组即模型组、SOR 组、TA-SM 组，每组 6 只，组间裸鼠体质量及肿瘤体积无统计学差异（P＞0.05）。模型组给予等体积 0.9%氯化钠溶液、SOR 组给药剂量为 50 mg·kg^{-1} [38]、TA-SM 组给药剂量为 50 mg·kg^{-1}。3 组统一 ig 给药，给药频率为每 2 天给药 1 次，连续干预 14 d（共计 7 次给药）。本实验中 TA-SM 与 SOR 均以 0.25%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）作为给药溶媒。称取定量 TA-SM 粉末，加入 0.25% CMC-Na，涡旋 5 min，现配现用，单次配制药液置于 4 ℃冷藏环境避光保存，配制后 24 h 内使用完毕。

2.3.3 肿瘤检测 对实验裸鼠的健康、行为及精神状况等进行观察。每次给药前测量记录裸鼠的体质量和肿瘤体积。给药 2 周后对裸鼠实施安乐死，解剖获取心、肝、脾、肺、肾，并完整剥离肿瘤组织并拍照、称质量。裸鼠体质量、肿瘤体积测量、病理切片阅片、荧光及蛋白灰度定量等所有指

标检测环节，均采用单盲设计，检测人员不清楚动物分组信息，最大限度降低测量偏倚，计算肿瘤体积（V）。

V=0.5×长径×短径^2

（1）动物排除标准：造模后肿瘤体积偏差＞20%、实验期间出现外伤、进食饮水异常、活动障碍的裸鼠予以剔除，本实验无剔除样本；（2）动物脱落与死亡情况：整个给药及观测周期内，18 只实验裸鼠无死亡、无自然脱落，所有动物样本均完成指标检测；（3）人道终点：裸鼠体质量下降＞15%、肿瘤体积＞2 000 mm^3、精神萎靡且无法自主进食，一旦触及标准立即实施安乐死。本次实验所有动物均未达到人道终点，动物生存状态良好。

2.3.4　组织石蜡包埋与切片制作　将剖取的心、肝、脾、肺、肾及肿瘤组织用固定液固定 48 h（分 2 次各 24 h），PBS 漂洗后，经 75%、85%、95%、100%乙醇梯度脱水（各 40 min，重复 1 次），二甲苯透明，熔蜡箱浸蜡 1 h，与石蜡一同注入模具，冷却凝固成蜡块。石蜡切片机将蜡块连续切片（厚度 5 μm），保证切面与刀口平行、刀具倾斜 15°；切片漂浮捞片、晾干后，68 ℃烘烤 1 h，最后 37 ℃过烤处理。

2.3.5　免疫组织化学染色　对石蜡切片进行脱蜡处理后，将其放入含 EDTA 抗原修复液的微波炉中，依次以中火、中高火、高火各处理 5 min 完成抗原修复；随后在室温下用 3%过氧化氢避光孵育 25 min，经 PBS 清洗 3 次阻断内源性过氧化物酶，滴加 3% BSA 封闭，加入一抗（1∶200）在 4 ℃环境中过夜孵育，次日添加二抗（1∶200）并于室温孵育 50 min；之后用 PBS 清洗切片，加入 DAB 显色液进行显色反应，再用苏木素对细胞核复染，经梯度乙醇脱水、中性树胶封片后，通过显微镜观察切片并分析，计算平均光密度。

平均光密度＝累计光密度/阳性面积

2.3.6　免疫荧光染色　用二甲醚、乙醇对石蜡切片脱蜡后，放入含 EDTA 抗原修复液的微波炉，依次中火、中高火、高火各处理 5 min 完成抗原修复；在组织周边画圈并滴加自发荧光淬灭剂作用 5 min，接着加入 TritonX-100 通透液作用 30 min，再用 1% BSA 溶液孵育 30 min 进行封闭；添加一抗 4 ℃过夜孵育，次日加二抗室温孵育 50 min，PBS 清洗后滴加 DAPI 染液室温避光孵育 10 min 复染细胞核，再次 PBS 清洗后封片，最终在荧光显微镜下拍照分析，并计算阳性面积百分比。

阳性面积百分比＝荧光阳性面积/总面积

2.3.7　Western blotting 检测肿瘤组织中 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白的表达　先将动物组织从−80℃冰箱取出冰上解冻，剪碎后转移至 EP 管称质量，按每 20 mg 组织加 200 μL RIPA 裂解液的比例，提前配制 RIPA∶PMSF＝100∶1 的预冷含磷酸酶抑制剂裂解液备用；将组织碎块用预冷 PBS 冲洗 3～5 次、滤纸吸干水分后，加研磨珠研磨，再加入预冷裂解液冰上裂解 30 min，最后 4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 15 min 收集上清液，随后对该上清液进行浓度检测及定量分析。

2.3.8　qRT-PCR 检测肿瘤组织中 PI3K-Akt 信号通路相关基因的表达　将肿瘤组织提前解冻，清洗表面血迹后称质量，取 100 mg 肿瘤组织碎块放入新 EP 管，添加适量 RNAiso Plus 裂解液（肿瘤质量∶裂解液体积＝1∶9），置于组织研磨仪中研磨成匀浆；将 EP 管置于 4 ℃充分裂解，4 ℃、14 000 r·min^{-1} 离心 10 min，吸取上清液至新 EP 管，进行 mRNA 的提取、定量、逆转录及 PCR 反应。

2.3.9　TUNEL 染色　PBS 清洗组织切片，4%多聚甲醛固定 10～30 min；再次用 PBS 洗涤，室温下 0.1% Triton X-100 处理切片 5～10 min 以实现渗透化；按试剂盒说明书孵育 TdT 酶，结合 DNA 的 3'-OH 末端并添加荧光标记 dUTP；孵育后用 PBS 彻底清洗切片以减少背景信号；避光干燥切片，抗荧光淬灭封片剂封片，荧光显微镜观察并获取图像，最后用 Image J 软件对荧光信号定量分析。

凋亡阳性细胞百分比＝荧光阳性面积/总面积

2.3.10　苏木精-伊红（HE）染色　按照“2.3.4”项的步骤，组织经石蜡包埋切片得样本切片；用二甲苯及梯度乙醇脱蜡，蒸馏水清洗 2 遍并吸干；苏木素染液染色 5 min，冲洗吸干；盐酸乙醇分化 30 s，水中浸泡 15 min 后吸干；伊红染液染色 2 min，染色后对切片脱水；最后显微镜观察并拍照分析。

2.4　统计学分析

采用 SPSS 28.0 和 GraphPad Prism10.1.2 软件进行统计分析，对于正态分布的连续变量，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），多组间比较采用 Dunnett 法检验。对于非正态分布数据，使用 Mann-Whitney 或 Kruskal-Wallis 检验确定各组之间的显著差异。P＜0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TA-SM 抗 HCC 的网络药理学与分子对接

以苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱、氧化槐果碱、金雀花碱为关键词，从数据库中获得 TA-SM 作用靶点 362 个；通过 TCMSP、Genecards、OMIM、DisGeNET 等数据库筛选并去重，得到 HCC 相关靶点 17 189 个；取两者交集，获得共同靶点 354 个。为探究砂生槐子活性成分抗 HCC 机制，将交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络并可视化，经 Cytohubba 与 CytoNCA 插件拓扑分析取交集，获得 38 个核心作用靶点（表 2），其中 TP53、ESR1、Akt1 等作用显著。随后通过 DAVID 对核心靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析：GO 富集得到 654 个显著条目，将所有条目按从小到大顺序排列，再按照 FDR 方法进行 *P* 值校正，保证 FDR *P*＜0.05。选取生物过程（BP）、分子功能（MF）和细胞成分（CC）各排列前 10 条目进行可视化（图 1-A），涉及基因表达、凋亡、酶结合等多个生物过程；对核心作用靶点进行 KEGG 通路富集分析筛选出 162 条通路有意义（*P*＜0.05），按照 *P* 值从小到大筛选出 30 条通路进行可视化（图 1-B），主要富集癌症通路、PI3K-Akt 通路、内分泌抵抗通路等，提示 TA-SM 通过多靶点、多通路协同发挥抗 HCC 作用，其中 PI3K-Akt 信号通路可能是 TA-SM 治疗 HCC 的关键通路。

表 2 TA-SM 治疗 HCC 的核心靶点

Table 2 Core targets of TA-SM in treatment of HCC

序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点
1	TP53	11	SMAD2	21	AR	31	GRB2
2	ESR1	12	MAPK3	22	CCND1	32	STAT1
3	Akt1	13	CASP3	23	RELA	33	MAPK14
4	MYC	14	BCL2L1	24	HSP90AA1	34	PPARG
5	CTNNB1	15	IL6	25	EGFR	35	HSPA8
6	SMAD3	16	CASP9	26	MDM2	36	TGFB1
7	CREBBP	17	TNF	27	HSP90AB1	37	ICAM1
8	MAPK1	18	IL1B	28	GSK3B	38	PIK3R1
9	BCL2	19	IFNG	29	XIAP		
10	HDAC1	20	SRC	30	JAK2		

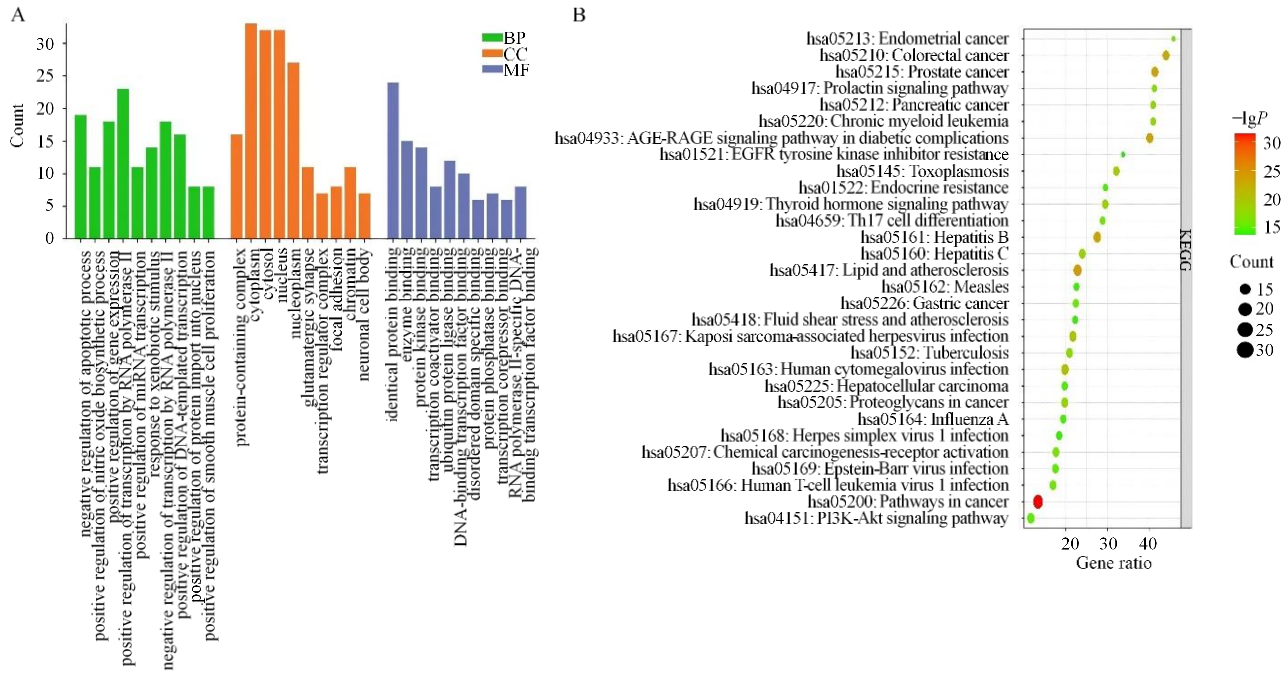
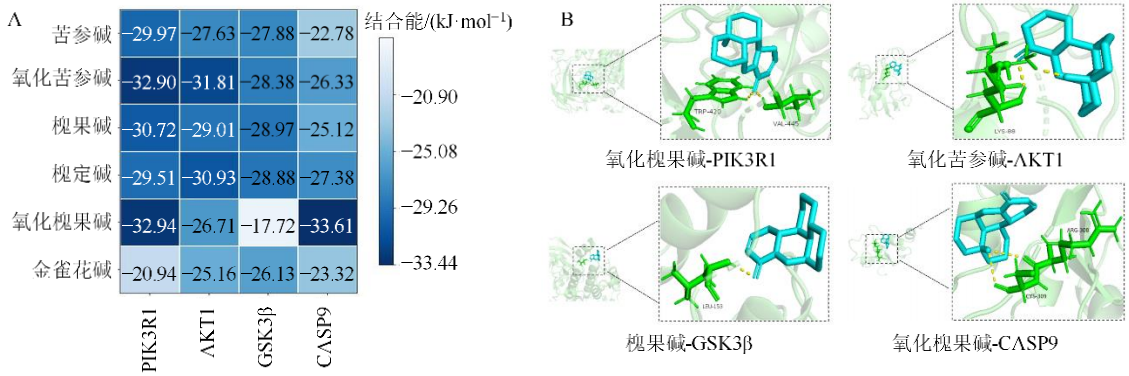


图 1 TA-SM 抗 HCC 核心靶点 GO (A) 与 KEGG (B) 富集分析

Fig. 1 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of TA-SM anti-HCC core targets

整合上述研究得到的前 30 条 KEGG 通路、HCC 及其潜在作用靶点、TA-SM 及 6 种主要生物碱成分，构建“疾病-通路-靶点-成分-药物”网络图，包括 392 个节点、1 037 条边。度（degree）值分析显示 TP53（degree＝47）、Akt1（degree＝33）、SRC（degree＝32）、ESR1（degree＝29）等具有较重要的作用，IL6（degree＝26）、PIK3R1（degree＝19）、GSK3β（degree＝13）、CASP9（degree＝12）是相对重要的核心靶点，体现 TA-SM 抗 HCC 的“多成分、多途径”特性；根据 KEGG 结果，最终选取 PI3K-Akt 信号通路及该通路中的 PIK3R1、Akt1、GSK3β、CASP9 蛋白进行后续研究。将砂生槐子 6 种主要生物碱与 PI3K-Akt 通路关键蛋白（PIK3R1、Akt1、GSK3β、CASP9）进行分子对接，得到 24 组结果（图 2-A），结果显示所有结合能均小于 0 kJ·mol^{-1}，提示 TA-SM 可与受体蛋白自发稳定结合。采用 PyMOL 对蛋白与生物碱的最优结合构象可视化，展示了整体与局部结合模式。氧化槐果碱与 PIK3R1 蛋白上的 TRP-420 和 VAL-445 氨基酸残基形成氢键作用，结合能为−32.94 kJ·mol^{-1}；氧化苦参碱与 Akt1 蛋白上的 LYS-88 氨基酸残基形成氢键作用，结合能为−31.81 kJ·mol^{-1}；槐果碱与 GSK3β 蛋白上的 LEU-153 氨基酸残基形成氢键作用，结合能−28.97 kJ·mol^{-1}；氧化槐果碱和 CASP9 蛋白上的 CYS-309 和 ARG-308 氨基酸残基形成氢键作用，结合能为−33.60 kJ·mol^{-1}，结合能均较低，结合稳定。见图 2-B。



A-6 种活性成分与 PI3K-Akt 通路关键靶点对接结合能热图；B-代表性成分-靶点三维结合模式。

A-Heatmap of docking binding energy between six active components and key targets of PI3K-Akt signaling pathway; B-three-dimensional binding mode diagram of representative component-target complexes.

图 2　砂生槐子活性成分与关键蛋白分子对接验证

Fig. 2　Construction of molecular docking verification of active components from *S. moorcroftiana* and key proteins

3.2　TA-SM 抗 HCC 的体外研究

采用 CCK-8 法检测 TA-SM 对 Huh-7 和 HepG2 细胞增殖的影响。结果（图 3）显示，作用 24 h 后，细胞生长抑制率呈质量浓度相关性；低浓度（1、2、4 μg·mL^{-1}）对 2 种细胞抑制作用相近，8 μg·mL^{-1} 时对 Huh-7 抑制率（49.89%）高于 HepG2（39.26%）；4～64 μg·mL^{-1} 范围内对 Huh-7 抑制作用逐步减弱，但整体仍优于 HepG2。经非线性拟合得 TA-SM 对 Huh-7 和 HepG2 2 种细胞的 IC_{50} 分别为 8.328 μg·mL^{-1}［95%置信区间（CI）：7.63～9.08 μg·mL^{-1}］和 12.36 μg·mL^{-1}（95% CI：10.26～16.45 μg·mL^{-1}），后续实验选用质量浓度为 2、4、8 μg·mL^{-1}。

为探究 TA-SM 抑制人肝癌 Huh-7 和 HepG2 细胞的分子机制，采用 Western blotting 检测 TA-SM 作用 24 h 后 PI3K-Akt 通路相关蛋白表达。TA-SM

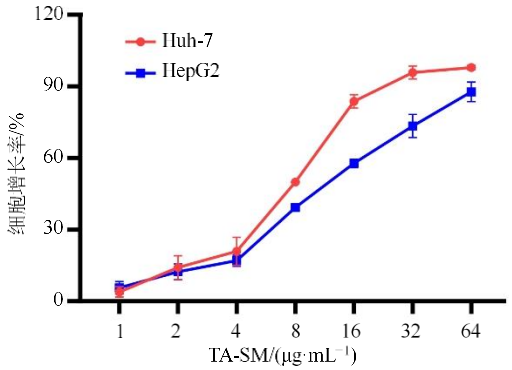
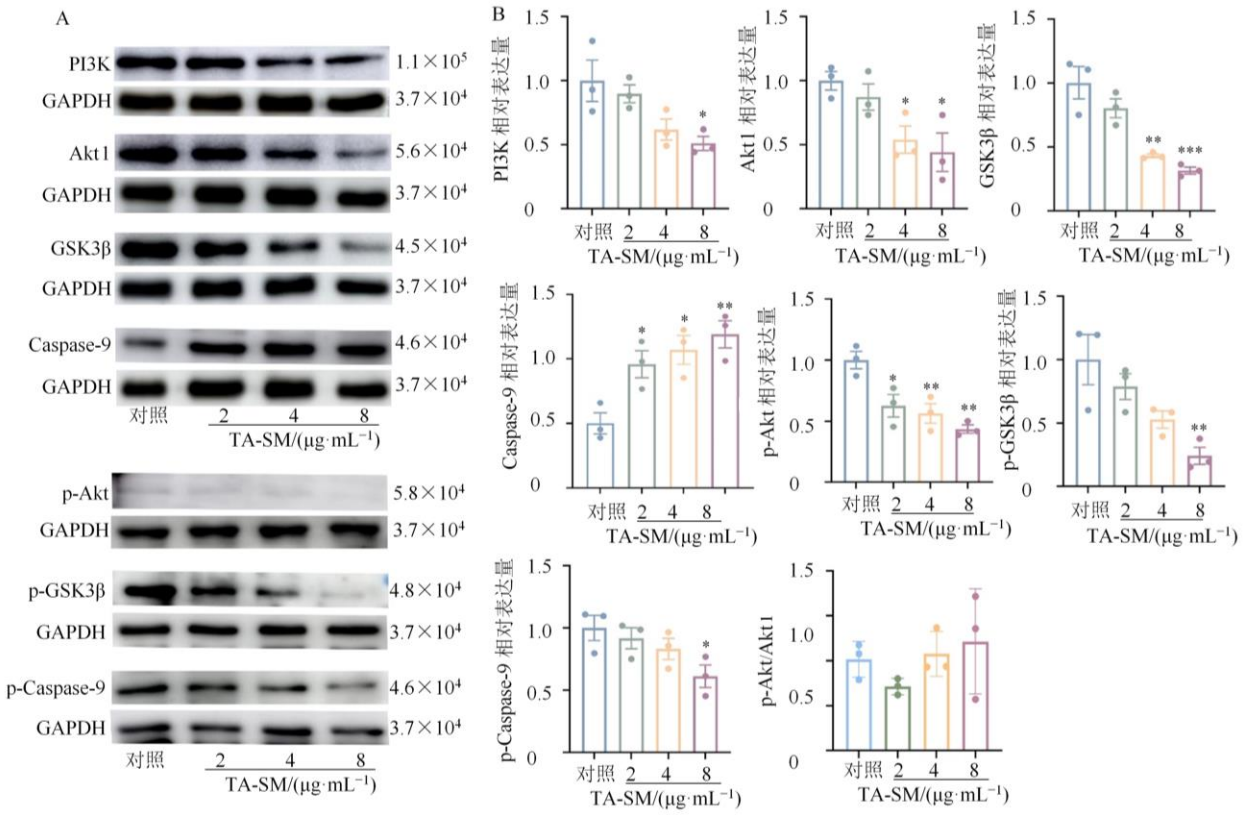


图 3　TA-SM 对 Huh-7 和 HepG2 细胞增殖能力的影响

Fig. 3　Effect of TA-SM on proliferative capacity of Huh-7and HepG2

作用于 Huh-7 细胞（图 4）和 HepG2 细胞（图 5）时，除 Caspase-9 蛋白的相对表达量上调（P＜0.05、



A-TA-SM 作用于 Huh-7 细胞的电泳条带；B-电泳条带定量图；与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$。

A-TA-SM acted on electrophoretic bands of Huh-7 cells; B-electrophoresis band quantitative map; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 4 TA-SM 对 Huh-7 细胞 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

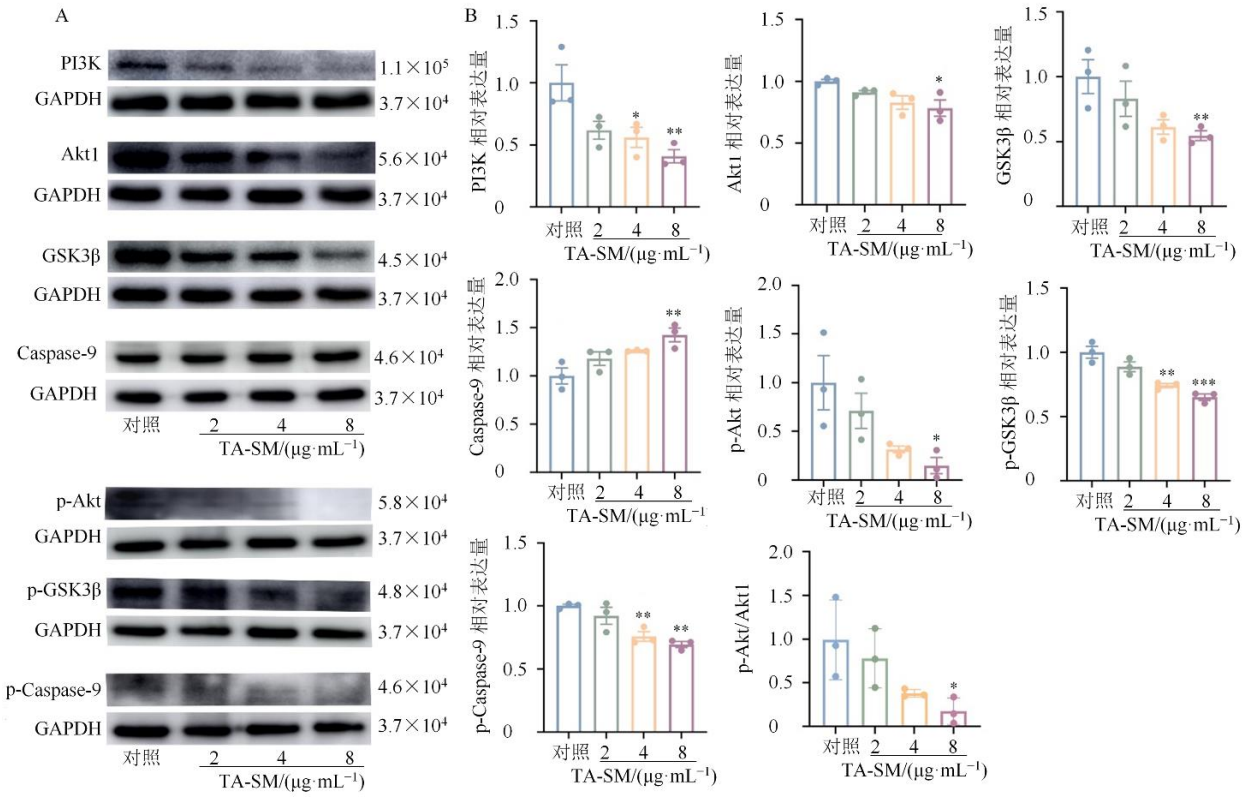
Fig. 4 Effect of TA-SM on protein expression levels in PI3K-Akt signaling pathway of Huh-7 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

0.01）之外，PI3K、GSK3β、p-GSK3β 和 p-Caspase-9 蛋白的相对表达量均呈质量浓度相关性下调趋势（$P<0.05$、0.01、0.001）。Huh-7 细胞中 p-Akt/Akt1 的值大于 1，表明 TA-SM 通过磷酸化途径发挥抗 HCC 作用，而 HepG2 细胞中 p-Akt/Akt1 的值小于 1，表明 TA-SM 通过调节 Akt1 总蛋白水平来发挥抗 HCC 的作用。以上实验结果提示，TA-SM 可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路抑制 HCC 进展。

进一步验证 TA-SM 对 2 种不同肝癌细胞的 PI3K-Akt 信号通路的影响，通过 qRT-PCR 实验，检测不同浓度 TA-SM 作用 24 h 后 2 种肝癌细胞（Huh-7、HepG2）中 PI3K-Akt 通路相关基因的 mRNA 表达（图 6）。TA-SM 可使 2 种细胞中 *PI3K*、*Akt1*、*GSK3β* mRNA 表达显著下调（$P<0.05$、0.01、0.001），*Caspase-9* mRNA 表达上调；其中 Huh-7 细胞中 Akt1、HepG2 细胞中 PI3K 均呈明显剂量相关性降低（$P<0.05$、0.01、0.001）。提示 TA-SM 可能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路，发挥抗肝癌细胞生长与存活的作用。

3.3 TA-SM 抗 HCC 的体内研究

为评估 TA-SM 对裸鼠一般状况的影响，构建动物模型，定期记录各组裸鼠体质量及肿瘤体积。结果表明，自给药首日起，各组裸鼠体质量均呈上升趋势（图 7-A），组间差异无统计学意义（$P>0.05$），提示 TA-SM 对裸鼠一般状况无明显不良影响。模型组肿瘤体积随时间快速增大，SOR 组与 TA-SM 组肿瘤生长速率显著降低，其中 TA-SM 组对肿瘤增殖的抑制作用最为显著（$P<0.001$），小鼠体质量混合设计双因素重复测量 ANOVA 结果显示给药第 6～16 天 3 组小鼠体质量无显著差异；仅在第 18、20 天，模型组体质量显著高于 SOR 组及 TA-SM 组（$P<0.05$、0.01），而两给药组间全程无体质量差异，2 种给药方案仅引起小鼠轻微、末期出现的体质量下降，无明显全身性不良反应（图 7-B）。裸鼠安乐死后剥离肿瘤组织，按分组排列并拍照，同时对肿瘤质量及体积进行定量统计，实体肿瘤标本显示各组间肿瘤大小存在明显差异。双因素重复测量 ANOVA 结果提示第 6、8 天 3 组肿瘤体积无

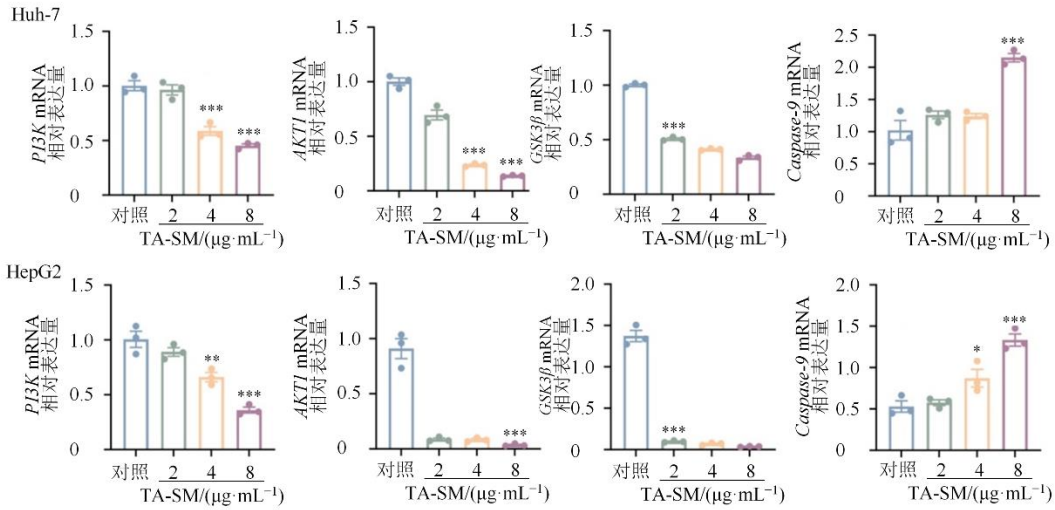


A-TA-SM 作用于 HepG2 细胞的电泳条带；B-电泳条带定量；与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

A-TA-SM acted on electrophoretic bands of HepG2 cells; B-electrophoresis band quantitative map; $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 5　TA-SM 对 HepG2 细胞 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 5　Effect of TA-SM on protein expression levels in PI3K-Akt signaling pathway of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

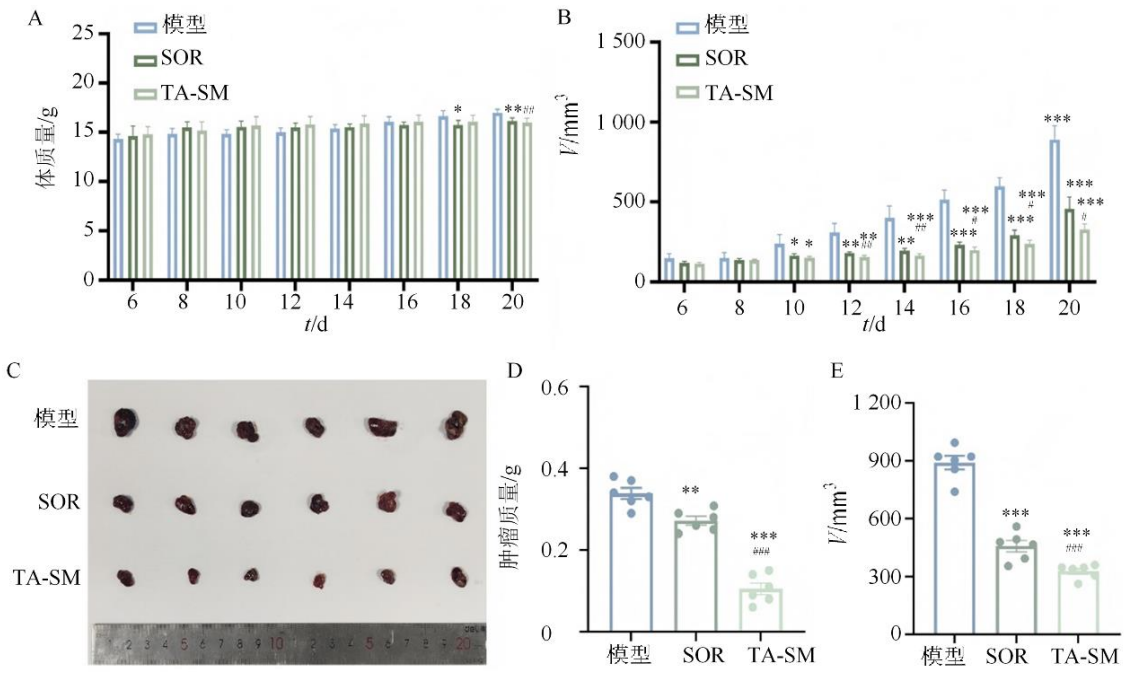


与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 6　TA-SM 对 Huh-7 细胞和 HepG2 细胞 PI3K-Akt 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 6　Effects of TA-SM on mRNA expression of PI3K-Akt signaling pathway-related genes in Huh-7 cells and HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



A-造模期间各组裸鼠的体质量变化定量；B-造模期间各组裸鼠的肿瘤体积变化定量；C-药物干预后的肿瘤实体；D-肿瘤质量统计分析；E-肿瘤体积统计分析；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与 SOR 组比较，$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$。

A-quantitative map of body weight changes of nude mice in each group during modeling; B-quantitative map of tumor volume changes in nude mice during modeling; C-tumor entity images after drug intervention; D-statistical analysis of tumor quality; E-statistical analysis of tumor volume; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* model group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* SOR group.

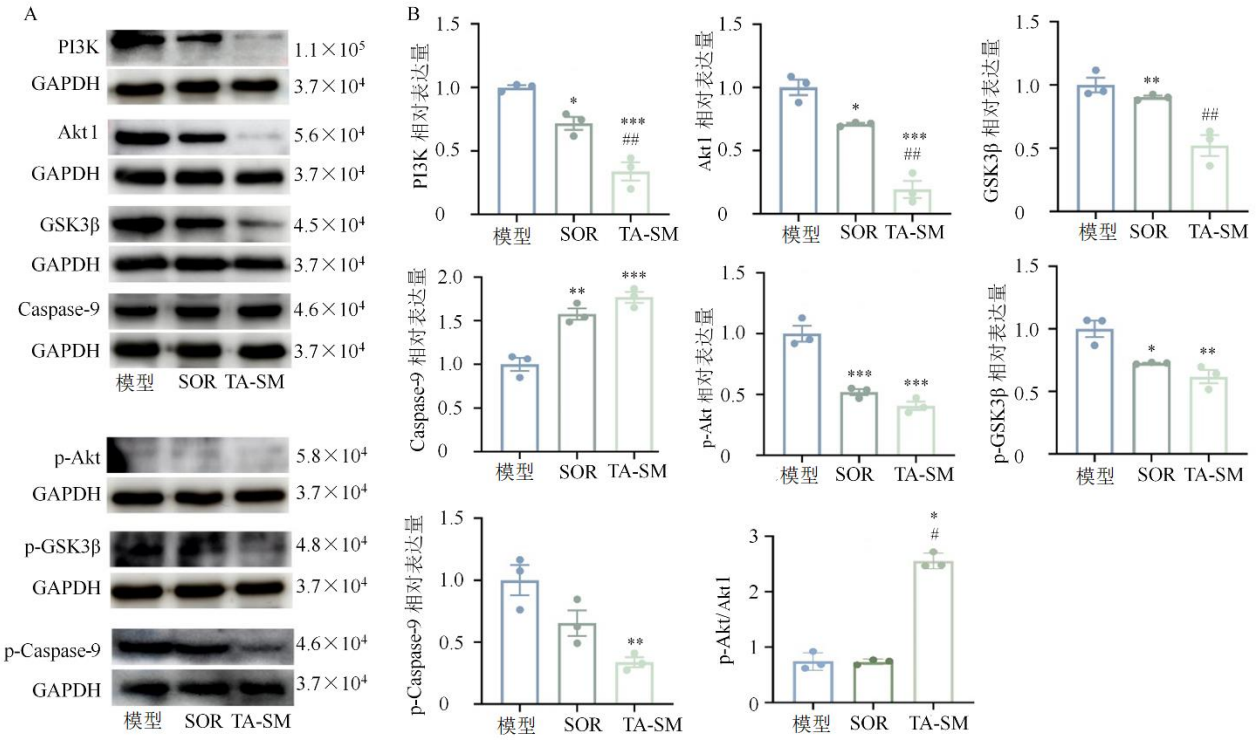
图 7 TA-SM 对裸鼠移植瘤模型体质量及肿瘤生长的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Fig. 7 Effects of TA-SM on body weight and tumor growth in nude mice xenograft model ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

统计学差异；第 10 天起 SOR、TA-SM 组肿瘤体积显著低于模型组（$P<0.05$）；自第 12 天至实验终点，3 组两两比较均存在显著差异（$P<0.01$、0.001），SOR 及 TA-SM 均可显著抑制体内肿瘤增殖，且 TA-SM 给药组抗肿瘤效果更优、时间相关性更强（图 7-C）。定量分析表明，与模型组相比，SOR 组和 TA-SM 组肿瘤质量均显著降低（$P<0.01$、0.001）；与 SOR 组相比，TA-SM 组肿瘤质量进一步显著下降（$P<0.001$）（图 7-D），肿瘤体积变化趋势与肿瘤质量一致（图 7-E）。上述结果证实，TA-SM 可显著抑制肿瘤生长，且对裸鼠体质量无明显影响。

分别采用 Western blotting、qRT-PCR、免疫组织化学及免疫荧光实验，检测裸鼠肿瘤组织中 PI3K、Akt1、GSK3β、Caspase-9 及其磷酸化蛋白（p-Akt、p-GSK3β、p-Caspase-9）的表达水平。Western blotting 结果显示（图 8），不同药物干预后，PI3K、Akt1、GSK3β、p-Akt、p-GSK3β 及 p-Caspase-9 蛋白表达均呈下降趋势，Caspase-9 表达上调。其中 TA-SM 组 Akt1 相对表达量为（0.19±0.12），下调最为显著（$P<0.001$）。与模型组相比，SOR 组与 TA-SM 组上述蛋白表达差异均具有统计学意义（$P<0.05$、0.01、0.001）；与 SOR 组相比，TA-SM 组 PI3K、Akt1 及 GSK3β 蛋白水平差异具有统计学意义（$P<0.01$）。小鼠肿瘤组织中，TA-SM 给药组 p-Akt/Akt1 值显著高于模型组与 SOR 组（$P<0.05$），比值＞1，说明在体内肿瘤微环境中，TA-SM 主要通过调控 Akt 蛋白磷酸化修饰调控通路活性。

qRT-PCR 结果（图 9）显示，与模型组比较，SOR 组及 TA-SM 组 *PI3K*、*Akt1*、*GSK3β* mRNA 表达均显著下调（$P<0.05$、0.01、0.001），TA-SM 组 *Caspase-9* mRNA 表达显著上调（$P<0.05$）；与 SOR 组相比，TA-SM 可进一步下调 *GSK3β* mRNA 表达（$P<0.01$），而对 *PI3K*、*Akt1*、*Caspase-9* mRNA 表达的影响无统计学差异（$P>0.05$）。上述结果与体外实验一致，提示 TA-SM 可能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路发挥抗 HCC 作用。免疫组化结果显示（图 9-B、C），与模型及 SOR 组相比，TA-SM 处理后 PI3K、Akt1、GSK3β、p-Akt、p-GSK3β 及 p-Caspase-



A-肿瘤组织中 PI3K-Akt 通路关键蛋白免疫印迹；B-肿瘤组织中 PI3K-Akt 通路关键蛋白定量结果；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$；与 SOR 组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$。

A-Immunoblotting of key proteins in PI3K-Akt pathway in tumor tissues; B-quantitative results of key proteins in PI3K-Akt pathway in tumor tissues; $^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* model group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* SOR group.

图 8　肿瘤组织中 PI3K-Akt 通路关键蛋白的表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 8　Expression levels of key proteins in PI3K-Akt pathway in tumor tissues ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

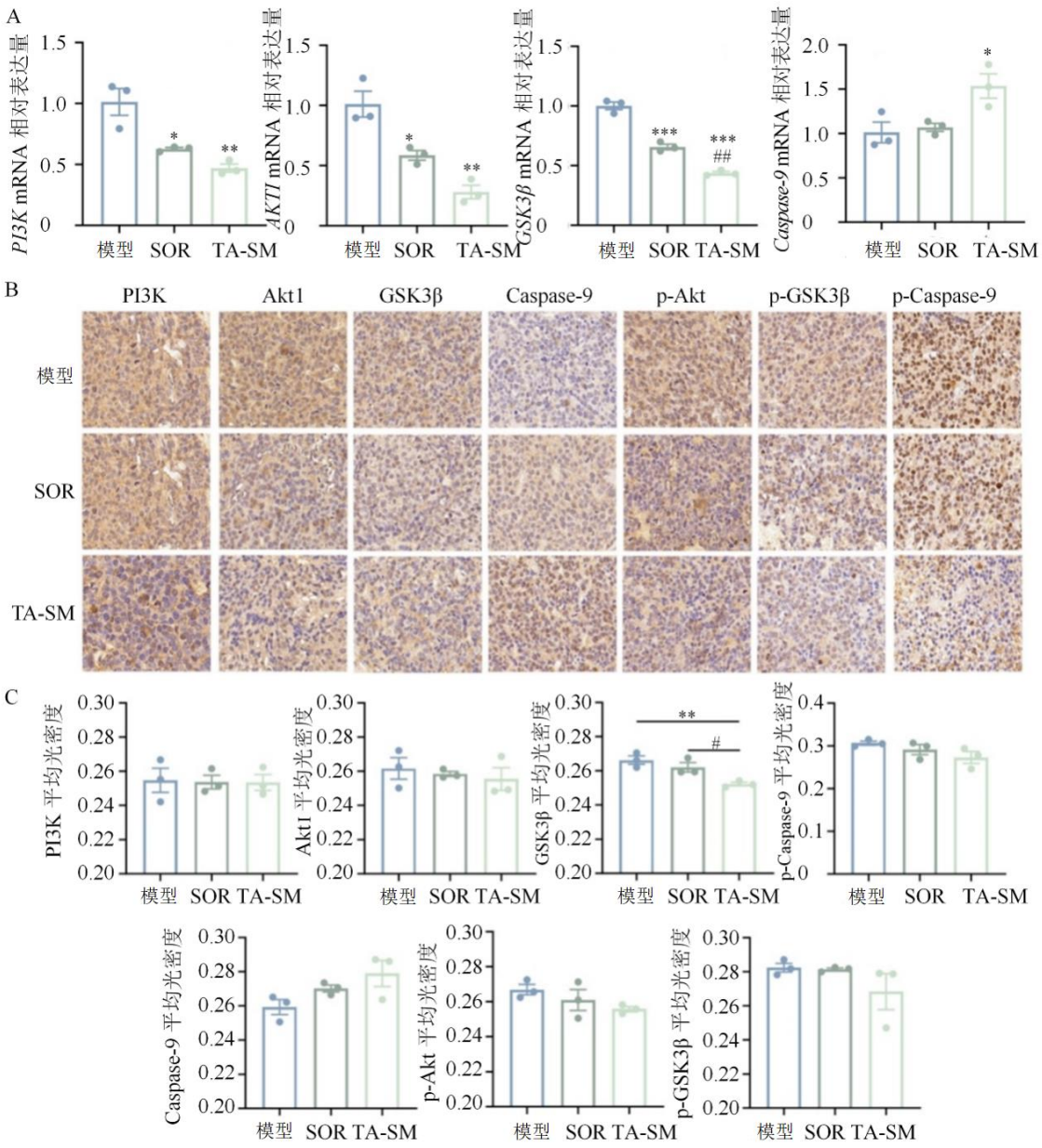
9 蛋白阳性表达水平均降低，Caspase-9 蛋白表达水平升高；其中仅 GSK3β 蛋白表达差异具有统计学意义（$P<0.05$），其余蛋白差异均无统计学意义（$P>0.05$）。上述结果提示 TA-SM 可通过调控 PI3K-Akt 信号通路发挥抗 HCC 作用。

免疫荧光结果（图 10）显示，与模型组相比，TA-SM 组肿瘤组织中 PI3K、Akt1、GSK3β、p-Akt、p-GSK3β 及 p-Caspase-9 荧光强度减弱、表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001），而 Caspase-9 表达显著升高（$P<0.01$）。与 SOR 组相比，TA-SM 组仅 Caspase-9 表达差异具有统计学意义（$P<0.05$）。提示 TA-SM 可能通过调控 PI3K-Akt 通路抑制肝癌进展，Caspase-9 为其关键作用靶点。

为探究 TA-SM 对肿瘤组织细胞凋亡的影响（图 11-A、B），采用 TUNEL 染色检测。与模型组相比，TA-SM 组裸鼠肿瘤细胞凋亡率显著升高（$P<0.001$）；SOR 组凋亡率略有上升，且差异有统计学意义。与 SOR 组相比，TA-SM 组肿瘤细胞凋亡率同样显著升高（$P<0.001$）。提示 TA-SM 可通过促进 HepG2 细胞凋亡发挥抗 HCC 作用。采用石蜡包埋及 HE 染色观察 TA-SM 对小鼠主要脏器的组织学影响（图 11-C）。结果显示，各处理组肝脏、肾脏、脾脏、心脏及肺组织结构完整，细胞排列有序，无明显炎症浸润、水肿、凋亡及坏死等病理改变。表明 TA-SM 在发挥抗 HCC 作用的同时，对主要脏器无明显组织学损伤，体内生物安全性良好。

4　讨论

网络药理学作为融合药理学、生物信息学和计算机科学的交叉学科[39]，为揭示中药（复方）的整体调控机制提供了有效方法[40]。本研究借助网络药理学先筛选得到 354 个 TA-SM 与 HCC 的交集靶点及 38 个核心靶点，提示 TA-SM 的抗 HCC 作用并非依赖于单一靶点，而是通过调控一个复杂的网络系统，具有高度的靶向性与生物相关性。这提示 TA-SM 可能通过促进癌细胞凋亡、调控关键基因转录等来抑制肿瘤生长。此外，靶点主要分布于细胞质、细胞核等部位，并涉及酶结合、蛋白激酶结合等分子功能，这表明 TA-SM 可能通过与多种酶及调控



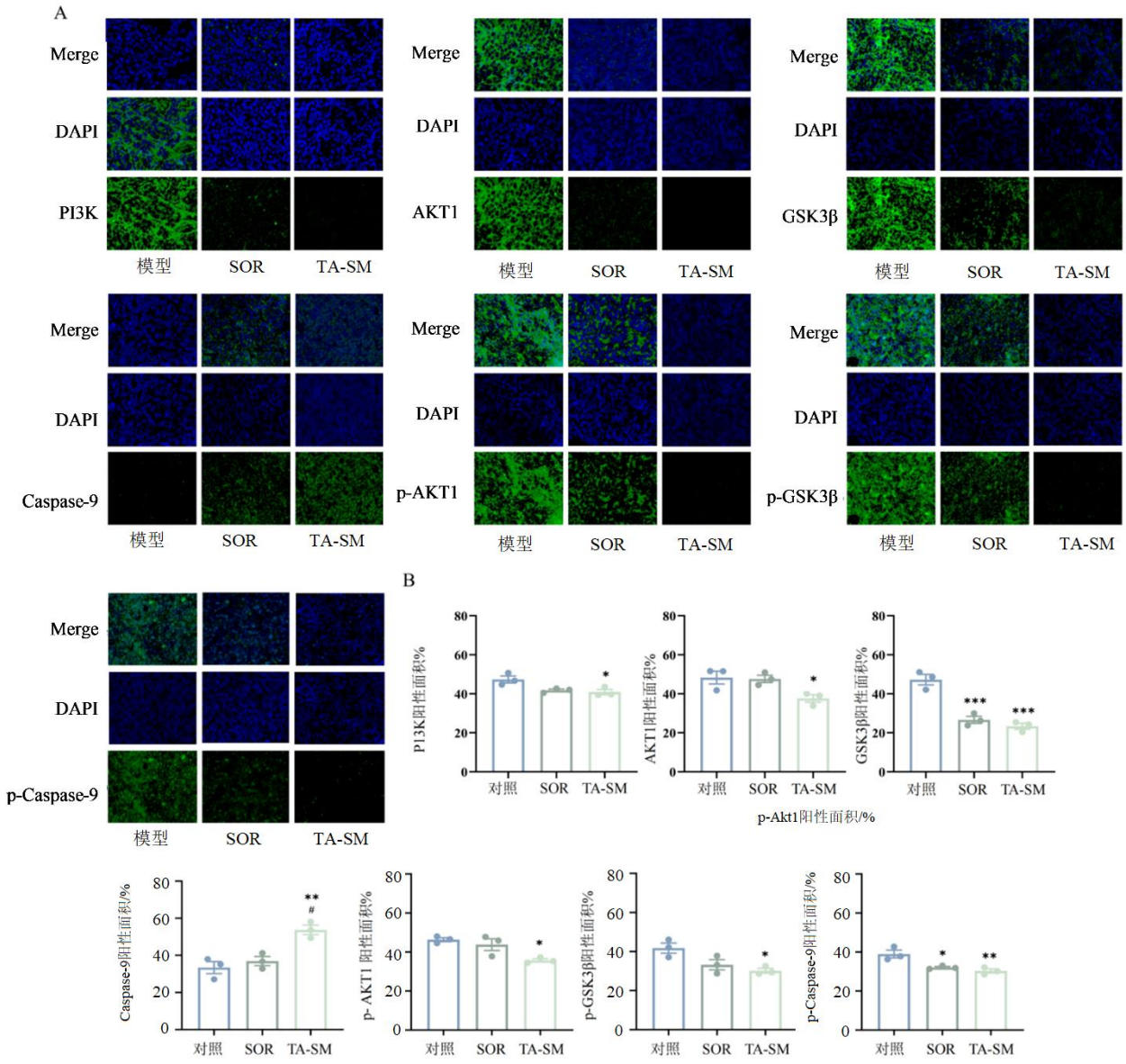
A-*PI3K*、*Akt1*、*GSK3β*、*Caspase-9* mRNA 的相对表达量；B-肿瘤组织中 PI3K-Akt 通路关键蛋白免疫组化切片（×100）；C-定量结果；与模型组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与 SOR 组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$。

A-Relative expression of *PI3K*, *Akt1*, *GSK3β*, and *Caspase-9* mRNA; B-PI3K-Akt pathway key protein immunohistochemical sections (×100); C-quantitative results in tumor tissues; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* model group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* SOR group.

图 9 肿瘤组织中 PI3K-Akt 信号通路相关基因 mRNA 的表达水平及关键蛋白免疫组化分析（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 9 mRNA expression level of PI3K-Akt signaling pathway related genes and immunohistochemical analysis of key proteins in tumor tissues ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

蛋白相互作用影响癌细胞的信号转导与稳态来发挥作用，进一步展现了中药复方“多成分、多靶点、多途径”的治疗特征[41]。KEGG 通路富集分析进一步将机制聚焦于多条信号通路，提示这些通路在 TA-SM 抗 HCC 过程中起到关键作用，细胞存活、增殖、代谢与生长等进程会受 PI3K-Akt 信号轴的调控[42]。分子对接结果显示，6 种 SM 生物碱与 PI3K-Akt 通路中关键靶点的结合能均小于 0，提示它们能够自发、稳定地与靶点蛋白结合，具有较高的结合活性。值得注意的是，分子对接技术通常基于蛋白质的静态晶体结构进行，难以模拟生理条件下蛋白质构象的动态变化、溶剂效应及全细胞环境的影响，



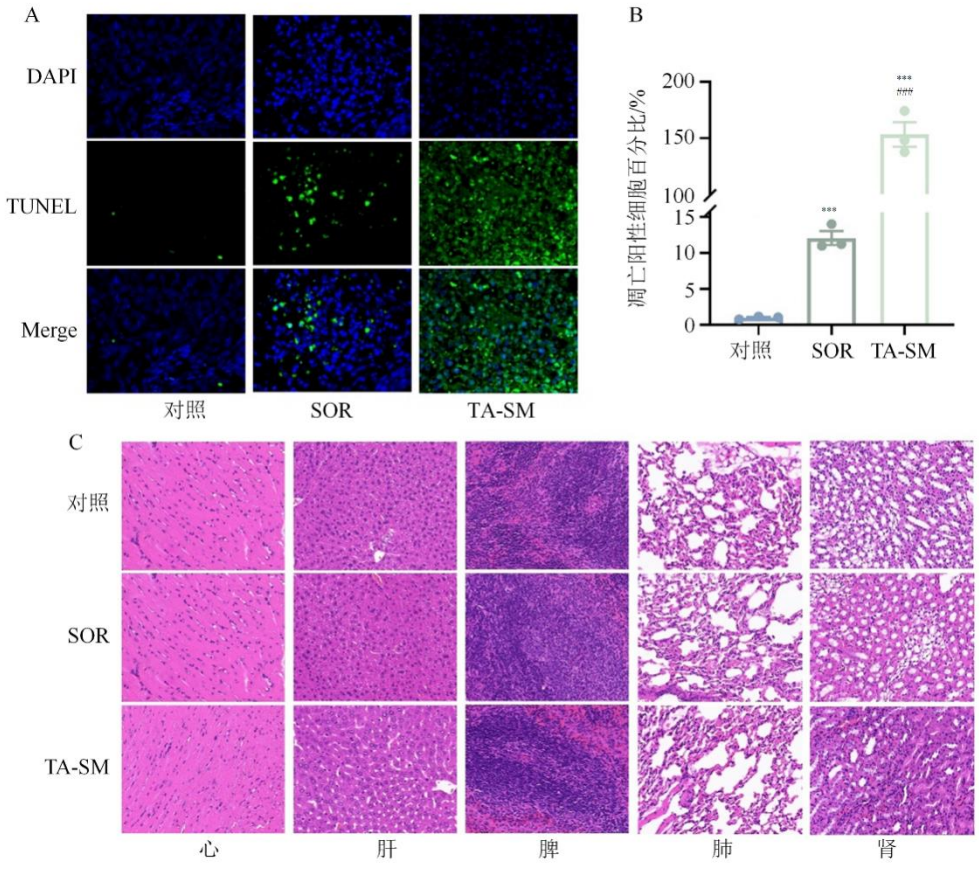
A-肿瘤组织中 PI3K-Akt 通路关键蛋白免疫荧光切片；B-定量结果；与模型组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$；与 SOR 组比较：$^{\#}P<0.05$。
A-Immunofluorescence section; B-quantitative results of key proteins in PI3K-Akt pathway in tumor tissues; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* model group; $^{\#}P < 0.05$ *vs* SOR group.

图 10　肿瘤组织中 PI3K-Akt 信号通路关键蛋白免疫荧光分析（$\bar{x} \pm s$，$n=3$，×100）

Fig. 10　Immunofluorescence analysis of key proteins in PI3K-Akt signaling pathway in tumor tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, ×100)

因此，对接结果仅能提供初步的结合可能性参考，缺乏分子动力学模拟对结合稳定性与过程的深入分析，更亟待通过定点突变、表面等离子共振等实验手段对预测的结合位点与亲和力进行直接验证。

CCK-8 实验结果显示，TA-SM 在较低质量浓度下有效抑制 Huh-7 和 HepG2 细胞的生长，且呈质量浓度相关性，对 Huh-7 细胞的 IC_{50} 值（8.328 μg·mL^{-1}）。低于 HepG2 细胞（12.360 μg·mL^{-1}），提示 TA-SM 的抗增殖能力可能存在细胞类型特异性。TA-SM 能有效抑制 PI3K-Akt 通路的活性，这与众多天然产物及合成化合物抗肿瘤机制的研究趋势相符[43-45]。PI3K-Akt 通路是调控细胞存活、增殖、代谢和凋亡的关键途径，其异常活化与肿瘤的发生、发展、耐药性及预后不良紧密相关。TA-SM 对 p-Akt（Ser473）水平的抑制是通路被抑制的直接标志，这与许多研究结论相似。例如，姜黄素衍生物和白藜芦醇等均



A-肿瘤组织 TUNEL 染色切片；B-定量结果；C-TA-SM 对裸鼠各脏器的影响；与模型组比较：$^{***}P<0.001$；与 SOR 组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$。
A-Tumor tissue TUNEL staining sections; B-quantitative results; C-effects of TA-SM on organs of nude mice; $^{***}P < 0.001$ *vs* model group; $^{\#\#\#}P < 0.01$ *vs* SOR group.

图 11 TA-SM 对裸鼠肿瘤细胞凋亡的调控作用及其对主要脏器的影响（$\bar{x} \pm s$，n=3，×100）

Fig. 11 Regulation of TA-SM on tumor cell apoptosis and its effect on major organs in nude mice ($\bar{x} \pm s$, n=3, ×100)

可通过下调 p-Akt 水平，诱导 HCC 细胞凋亡和周期阻滞[46-47]。TA-SM 不仅抑制了 Akt 的磷酸化激活，还同步下调了其上游调控因子 PI3K 以及下游效应因子 GSK3β 的总蛋白及 mRNA 表达，提示 TA-SM 可能从基因转录到蛋白翻译及翻译后修饰多个层面实现对这条通路的“多靶点”抑制。半胱氨酸蛋白酶（Caspases）家族是调控细胞凋亡的重要分子，被当作细胞凋亡的关键枢纽[48]。Akt 活性的抑制会干扰 X 连锁凋亡抑制蛋白（XIAP），进而促进线粒体内的 Cyt c 和 Apaf-1 相互作用形成凋亡小体，引起 Caspase-9 活化[49]，从而导致细胞凋亡。经 TA-SM 处理后，Caspase-9 表达水平上调，其磷酸化水平发生下调，共同提示线粒体途径的凋亡（即内源性凋亡）通路被激活。本研究中 Caspase-9 表达及其磷酸化状态的变化趋势，构成了“抑制生存信号（PI3K-Akt）→激活凋亡执行（Caspase-9）”的完整因果链条。类似机制在其他研究中也曾有报道，例如灵芝多糖可通过抑制 Akt 磷酸化进而激活 Caspase-9 与 Caspase-3，最终诱导肝癌细胞凋亡[50]。通过构建人源肝癌 HepG2 细胞系裸鼠异种移植模型，TA-SM 能显著抑制 HCC 肿瘤生长，且对正常细胞的毒性作用较弱，具备良好的体内耐受性，这一特征与理想抗肿瘤药物“精准靶向、低毒高效”[51-53]的研发理念高度契合，也与近年天然产物衍生物的研究趋势一致，即通过特异性调控肿瘤相关通路，在发挥抗肿瘤作用的同时降低对正常组织的损伤[54-57]。TA-SM 通过下调 PI3K 和 Akt 蛋白及其磷酸化水平，抑制下游增殖相关基因（如 GSK3β）的表达，上调凋亡相关基因（如 Caspase-9）的表达，与 Wei 等[58]发现的天然化合物通过抑制 PI3K-Akt 通路发挥抗 HCC 作用的结果相符，提示 TA-SM 可能成为该通路的新型特异性抑制剂。TUNEL 染色实验结

果揭示，TA-SM 可以通过促进 HepG2 细胞凋亡抑制 HCC 的发生发展，而 TA-SM 诱导 HepG2 细胞凋亡的效应，与 PI3K-Akt 通路抑制密切相关，体现了其“抑制增殖、诱导凋亡”的多维度抗肿瘤特征。通过 HE 染色实验可以看出，所有处理组各脏器的组织结构完整，未观察到炎症细胞浸润、细胞水肿或组织坏死等病理性异常现象，表明 TA-SM 在体内的生物安全性良好。

本研究通过实验发现 TA-SM 可以通过作用于 PI3K-Akt 通路来促进肝癌细胞的凋亡，从而抑制 HCC 的发生发展。

本研究仍存在多处不足。首先网络药理学与分子对接预测存在不确定性，二者均为计算机模拟分析，仅能作为前期靶点与通路的初步筛选手段，预测结果仍需更多实验进一步验证；动物实验模型存在局限性，仅采用人肝癌细胞系构建裸鼠皮下移植瘤模型，细胞、动物模型与人体临床病理环境存在差异，且不能充分反映肝脏原位微环境和免疫背景；体内实验剂量设计较为单一，未设置梯度给药剂量，无法明确药物的剂量-效应关系。后续研究将完善体内实验研究，同时拓展多种信号通路探究，全面评价 TA-SM 的药效与安全性，为其临床转化提供更充分的实验依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Abdelhamed W, El-Kassas M. Hepatocellular carcinoma recurrence: Predictors and management [J]. Liver Res, 2023, 7(4): 321-332.

[2] Nierengarten M B. Global cancer statistics 2022: The report offers a view on disparities in the incidence and mortality of cancer by sex and region worldwide and on the areas needing attention [J]. Cancer, 2024, 130(15): 2568.

[3] Wang W Y, Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Genes Dis, 2020, 7(3): 308-319.

[4] Jiang L L, Liang R, Luo Q, et al. Targeting FTO suppresses hepatocellular carcinoma by inhibiting ERBB3 and TUBB4A expression [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 226: 116375.

[5] Zheng S H, Gu Y X, Qi W Y, et al. Traditional Chinese medicine for liver cancer treatment: Network pharmacology research [J]. Curr Top Med Chem, 2025, 25(26): 3027-3041.

[6] Zhou J, Bai L, Luo J, et al. Anlotinib plus penpulimab versus sorafenib in the first-line treatment of unresectable hepatocellular carcinoma (APOLLO): A randomised, controlled, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2025, 26(6): 719-731.

[7] Chen W Q, Chiang C L, Dawson L A. Efficacy and safety of radiotherapy for primary liver cancer [J]. Chin Clin Oncol, 2021, 10(1): 9.

[8] Zhou H Y, Song T Q. Conversion therapy and maintenance therapy for primary hepatocellular carcinoma [J]. Biosci Trends, 2021, 15(3): 155-160.

[9] Cerreto M, Cardone F, Cerrito L, et al. The new era of systemic treatment for hepatocellular carcinoma: From the first line to the optimal sequence [J]. Curr Oncol, 2023, 30(10): 8774-8792.

[10] 徐兴阳, 徐宁, 李久明, 等. 天然产物中抗肿瘤活性成分研究新进展 [J]. 内蒙古民族大学学报 (自然科学版), 2022, 37(1): 26-29.
Xu X Y, Xu N, Li J M, et al. Research progress of antitumor active ingredients in natural products [J]. J Inn Mong Minzu Univ Nat Sci, 2022, 37(1): 26-29.

[11] Song L, Zhang W, Tang S Y, et al. Natural products in traditional Chinese medicine: Molecular mechanisms and therapeutic targets of renal fibrosis and state-of-the-art drug delivery systems [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 116039.

[12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 肥胖症诊疗指南 (2024 年版) [J]. 中华消化外科杂志, 2024, 23(10): 1237-1260.
Medical Administration Department, National Health Commission, People’s Republic of China. Guideline for diagnosis and treatment of obesity (2024 edition) [J]. Chin J Dig Surg, 2024, 23(10): 1237-1260.

[13] Yin X, Yang D N, Liu Y M, et al. *Sophora moorcroftiana* genome analysis suggests association between sucrose metabolism and drought adaptation [J]. Plant Physiol, 2023, 191(2): 844-848.

[14] 赵年寿, 纪鹏, 魏彦明, 等. 砂生槐生物碱成分测定、提取工艺及生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9): 1614-1620.
Zhao N S, Ji P, Wei Y M, et al. Research progress in the determination, extraction process and biological activity of alkaloids from *Sophora moorcroftiana* [J]. Nat Prod Res Dev, 2020, 32(9): 1614-1620.

[15] Huang Z C, Li H W, Li Q H, et al. Matrine suppresses liver cancer progression and the Warburg effect by regulating the circROBO1/miR-130a-5p/ROBO1 axis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(10): e23436.

[16] Zhang H, Chen L L, Sun X P, et al. Matrine: A promising natural product with various pharmacological activities [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 588.

[17] Du Q, Lin Y D, Ding C P, et al. Pharmacological activity of matrine in inhibiting colon cancer cells VM formation, proliferation, and invasion by downregulating Claudin-9 mediated EMT process and MAPK signaling pathway [J]. Drug Des Dev Ther, 2023, 17: 2787-2804.

[18] Yuan R Y, Dongzhi Z, Guo W, et al. Hepatoprotective effect of *Sophora moorcroftiana* (Benth.) Benth.Ex baker seeds *in vivo* and *in vitro* [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45(6): 2535-2544.

[19] Yuan R Y, Gui M G, Huang S, et al. *Sophora moocroftiana* seeds ethanol extract regulates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis via ROS/TXNIP pathway to amelioration of NAFLD *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1622178.

[20] 胡春晖, 张发斌, 丁李, 等. 高效液相色谱法测定藏药砂生槐子中 4 种生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 430-434.
Hu C H, Zhang F B, Ding L, et al. HPLC determination of four alkaloids in Tibetan medicine *Sophora moorcroftiana* seeds [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(3): 430-434.

[21] 胡春晖, 杨涛, 李永平, 等. 砂生槐子总生物碱纯化工艺的优化 [J]. 中成药, 2016, 38(10): 2157-2162.
Hu C H, Yang T, Li Y P, et al. Optimization of the purification of total alkaloids from *Sophora moorcroftiana* seeds [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(10): 2157-2162.

[22] 胡春晖, 张发斌. Box-Behnken 响应面法优化砂生槐子中总生物碱的提取工艺 [J]. 中成药, 2016, 38(9): 2063-2066.
Hu C H, Zhang F B. Optimization of extraction process of total alkaloids from *Sophora Japonica* by box-behnken response surface methodology [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(9): 2063-2066.

[23] 甘雪辉, 胡春晖, 都涛, 等. 砂生槐子总生物碱水剂和生物黏附片的 pH 转换两步溶出实验及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 702-709.
Gan X H, Hu C H, Du T, et al. Study on pH conversion two-step dissolution and pharmacokinetics of total alkaloids from *Sophora moocrorftiana* aqueous solution and biological adhesive tablets [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(4): 702-709.

[24] Chen L, Xia Y T, Min L L, et al. Sophoridine inhibits proliferation and migration by targeting PIM1 in breast cancer [J]. Pharm Biol, 2025, 63(1): 503-523.

[25] Chen X Q, Song Y L. Integrating network pharmacology and Mendelian randomization to explore potential targets of matrine against ovarian cancer [J]. Technol Health Care, 2024, 32(6): 3889-3902.

[26] Meng T, Gao Z J, Fang X J, et al. Matrine functions as a tumor inhibitor to influence proliferation, metastasis and glycolysis in colorectal cancer via depending on METTL14-mediated m6A methylation of MEX3A [J]. Mol Cell Biochem, 2026, 481(3): 1387-1400.

[27] Lou D, Fang Q, He Y H, et al. Oxymatrine alleviates high-fat diet/streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in C57BL/6 J mice by modulating oxidative stress, inflammation and fibrosis [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116491.

[28] Wu J, Jin X Q, Li W H, et al. A proteomics-based study of the mechanism of oxymatrine to ameliorate hepatic fibrosis in mice [J]. J Chromatogr B, 2024, 1247: 124280.

[29] Yang Y, Sun M Y, Li W D, et al. Rebalancing TGF-β/Smad7 signaling via Compound Kushen Injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(7): e410.

[30] 吴黎川, 谈振凯, 覃业浩, 等. 槐定碱衍生物抑制肝癌细胞迁移与侵袭研究 [J]. 广西师范大学学报 (自然科学版), 2025, 43(2): 207-220.
Wu L C, Tan Z K, Qin Y H, et al. Sophoridine derivative against liver cancer cell migration and invasion [J]. J Guangxi Norm Univ Nat Sci Ed, 2025, 43(2): 207-220.

[31] Tian K P, Wei J R, Wang R, et al. Sophoridine derivative 6j inhibits liver cancer cell proliferation via ATF3 mediated ferroptosis [J]. Cell Death Discov, 2023, 9: 296.

[32] 王华真, 何磊, 孟祥宇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术对三物黄芩汤治疗肝癌的机制分析及实验观察 [J]. 世界科学技术–中医药现代化, 2024, 26(3): 819-828.
Wang H Z, He L, Meng X Y, et al. A network pharmacology-and molecular docking-based analysis of the anti-hepatoma mechanisms of Sanwu Huangqin Decoction with experimental validation [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2024, 26(3): 819-828.

[33] Zhou W B, Liu Y Y, Gao Y Q, et al. Integrating proteomics, metabolomics, and network pharmacology to investigate the mechanism of *Cordyceps sinensis* in the treatment of COPD rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2025, 266: 117076.

[34] Zhai Y Y, Liu L, Zhang F Q, et al. Network pharmacology: A crucial approach in traditional Chinese medicine research [J]. Chin Med, 2025, 20(1): 8.

[35] Bisht A, Tewari D, Kumar S, et al. Network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation to elucidate the mechanism of anti-aging action of *Tinospora*

cordifolia [J]. Mol Divers, 2024, 28(3): 1743-1763.

[36] Jiao X Y, Jin X, Ma Y Y, et al. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine [J]. Comput Biol Chem, 2021, 90: 107402.

[37] 卢迪. 可利霉素对 HepG2 肝癌细胞生物学活性及荷瘤小鼠免疫-凋亡相关蛋白表达的影响 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2025.
Lu D. The effect of carrimycin on the biological activity of HepG2hepatoma cells and the expression of immune-apoptosis related proteins in tumor-bearing mice [D]. Baise, Youjiang Medical University of Nationalities, 2025.

[38] Lin Z Y, Niu Y, Wan A, et al. RNA m6A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy [J]. EMBO J, 2020, 39(12): EMBJ2019103181.

[39] 严志宏, 葛浩宇, 罗珍, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 网络药理学的九制黄精与生黄精对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症反应的抑制作用差异研究 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(12): 3551-3569.
Yan Z H, Ge H Y, Luo Z, et al. Study on differences in inhibitory effects of nine-processed *Polygonatum cyrtonema* and raw *Polygonatum cyrtonema* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells based on UPLC-Q-TOF-MS/MS network pharmacology [J]. Drug Eval Res, 2025, 48(12): 3551-3569.

[40] 安若凡, 高艳华, 毛樱潞, 等. 基于 UPLC-Orbitrap-MS/MS、GNPS 分子网络、网络药理学的开心散治疗抑郁症-阿尔茨海默病共病物质基础研究 [J]. 中草药, 2025, 56(21): 7690-7699.
An R F, Gao Y H, Mao Y L, et al. Material basis of Kaixinsan in treating depression-Alzheimer's disease comorbidity based on UPLC-Orbitrap-MS/MS, GNPS molecular networking, and network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(21): 7690-7699.

[41] Yang Y J, Jiang B, Shi L J, et al. The potential of natural herbal plants in the treatment and prevention of non-small cell lung cancer: An encounter between ferroptosis and mitophagy [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 346: 119555.

[42] Shamsan E, Almezgagi M, Gamah M, et al. The role of PI3k/Akt signaling pathway in attenuating liver fibrosis: A comprehensive review [J]. Front Med, 2024, 11: 1389329.

[43] 李瑞梅, 李雨晨, 杨芳, 等. 蟾毒灵通过抑制 PI3K/Akt 信号通路治疗肝细胞癌 [J]. 中国药理学通报, 2026, 42(3): 452-460.
Li R M, Li Y C, Yang F, et al. Bufalin treats hepatocellular carcinoma through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2026, 42(3): 452-460.

[44] 夏宇阳, 李扬, 何启旺, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探究葛根素改善肌少症小鼠骨骼肌细胞衰老与线粒体功能障碍的机制 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(1): 144-155.
Xia Y Y, Li Y, He Q W, et al. Mechanism of puerarin in improving skeletal muscle cell senescence and mitochondrial dysfunction in mice with sarcopenia based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. Drug Eval Res, 2026, 49(1): 144-155.

[45] Zhu M T, Sun Y P, Su Y, et al. Luteolin: A promising multifunctional natural flavonoid for human diseases [J]. Phytother Res, 2024, 38(7): 3417-3443.

[46] Esmaeli M, Dehabadi M D, Ghanbari A. Molecular targets and therapeutic implications of curcumin in hepatocellular carcinoma: A comprehensive literature review [J]. Cancer Cell Int, 2025, 25(1): 335.

[47] Karatayli E, Sadiq S C, Schattenberg J M, et al. Curcumin and its derivatives in hepatology: Therapeutic potential and advances in nanoparticle formulations [J]. Cancers, 2025, 17(3): 484.

[48] Li J, Wang J L, Gan C Y, et al. Caspase sensors based on NanoLuc [J]. J Biotechnol, 2022, 357: 100-107.

[49] 王燕, 张曙, 章建国, 等. SEMA5A 对肝细胞癌增殖及凋亡的影响及可能机制 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(7): 397-405.
Wang Y, Zhang S, Zhang J G, et al. Effect of SEMA5A on cell proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma and possible mechanism [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2023, 30(7): 397-405.

[50] 葛洋, 高航, 覃云鹏, 等. 灵芝多糖通过 Akt/mTOR 通路调控肝母细胞瘤细胞凋亡及自噬的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(9): 2432-2441.
Ge Y, Gao H, Qin Y P, et al. Regulation of apoptosis and autophagy in hepatoblastoma cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides through Akt/mTOR pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2025, 50(9): 2432-2441.

[51] 李丹, 许梢华, 李木兰, 等. 基于刺激响应性的微针治疗肿瘤的研究进展 [J]. 药学学报, 2025, 60(12): 3730-3741.
Li D, Xu S H, Li M L, et al. Advances in microneedle therapy for tumor treatment based on stimulus responsiveness [J]. Acta Pharm Sin, 2025, 60(12): 3730-3741.

[52] Liu K F, Li M J, Li Y D, et al. A review of the clinical

efficacy of FDA-approved antibody-drug conjugates in human cancers [J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 62.

[53] Wang R L, Hu B H, Pan Z Y, et al. Antibody-Drug Conjugates (ADCs): Current and future biopharmaceuticals [J]. J Hematol Oncol, 2025, 18(1): 51.

[54] Dong Y L, Fan H, Zhang Z, et al. Berberine ameliorates DSS-induced intestinal mucosal barrier dysfunction through microbiota-dependence and Wnt/β-catenin pathway [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4): 1381-1397.

[55] Jiang Z Y, Yan M J, Qin Y M, et al. Quercetin alleviates ulcerative colitis through inhibiting CXCL8-CXCR1/2 axis: A network and transcriptome analysis [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1485255.

[56] Yang F J, Gao R M, Luo X X, et al. Berberine influences multiple diseases by modifying gut microbiota [J]. Front Nutr, 2023, 10: 1187718.

[57] Mei D, Tan W S D, Wong W S F. Pharmacological strategies to regain steroid sensitivity in severe asthma and COPD [J]. Curr Opin Pharmacol, 2019, 46: 73-81.

[58] Wei Q, Ren Y, Zheng X, et al. Ginsenoside Rg3 and sorafenib combination therapy relieves the hepatocellular carcinomaprogression through regulating the HK2-mediated glycolysis and PI3K/Akt signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 13919-13928.

[责任编辑 齐静雯]