

基于网络药理学、分子对接及细胞实验探究高良姜素诱导肝细胞癌凋亡的作用机制

古丽加马力·卡哈尔, 谢汶辰, 潘思润, 王 晗*, 鲁 琰*

海南医科大学基础医学院, 热带转化医学教育部重点实验室和海南省肿瘤发生和干预重点实验室, 海南 海口 571199

摘要: 目的 基于网络药理学、分子对接及细胞实验探究高良姜素诱导肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 凋亡的作用机制。方法 利用 SwissTargetPrediction 与 PharmMapper 数据库预测高良姜素的潜在作用靶点; 从 GeneCards、TTD 与 OMIM 数据库获取 HCC 相关靶点。二者取交集后, 通过 STRING 数据库构建蛋白质-相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并利用 DAVID 平台对交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。采用 AutoDock Vina 对高良姜素与核心靶点进行分子对接验证。体外培养人肝癌 PLC/PRF/5 细胞, 通过 CCK-8 法与流式细胞术分别检测高良姜素对细胞活力与凋亡的影响, 并利用 Western blotting 检测表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)-磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路及凋亡相关蛋白表达。结果 网络药理学分析共获得高良姜素与 HCC 的共同作用靶点 142 个。PPI 网络分析显示, EGFR、Akt 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 等蛋白可能是其核心作用靶点。GO 与 KEGG 分析提示, 高良姜素可能主要通过调控 PI3K/Akt 等信号通路影响细胞进程。分子对接结果表明, 高良姜素与 EGFR 等靶点具有较强的结合能力。体外实验证实, 高良姜素能显著抑制 PLC/PRF/5 细胞活力并诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$ 、 0.001), 显著下调 p-EGFR 和 p-Akt 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 显著上调 cleaved Caspase-3 和 Caspase-9 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 高良姜素可能通过抑制 EGFR-PI3K/Akt 信号通路, 诱导 HCC 细胞凋亡, 从而发挥抗 HCC 的作用。

关键词: 高良姜素; 肝细胞癌; 网络药理学; 凋亡; EGFR-PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)02-0564-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.02.016

Mechanism of galangin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology, molecular docking and cell experiment

Gulijiamali Kahaer, XIE Wenchen, PAN Sirun, WANG Han, LU Yan

Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education & Hainan Provincial Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention, School of Basic Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of galangin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) based on network pharmacology, molecular docking and cell experiment. **Methods** Potential targets of galangin were predicted using SwissTargetPrediction and PharmMapper databases, HCC-related targets were collected from GeneCards, TTD and OMIM databases. The intersection of these targets was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network via STRING database, followed by gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of intersected targets using DAVID platform. Molecular docking of galangin with core targets was validated using AutoDock Vina. Human hepatocellular carcinoma PLC/PRF/5 cells were cultured *in vitro*, and the effects of galangin on cell viability and apoptosis were assessed using CCK-8 assay and flow cytometry. Western blotting was used to detect the expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR)-

收稿日期: 2025-10-28

基金项目: 海南省重点研发项目 (ZDYF2024SHFZ118); 海南医科大学学术提升计划项目 (XSTS2025070); 海南医科大学大学生创新创业训练计划项目 (202511810008, X202511810068)

作者简介: 古丽加马力·卡哈尔, 硕士研究生, 研究方向为中药抗肿瘤分子机制研究。E-mail: 1317413591@qq.com

*通信作者: 王 晗, 教授, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: xiaohanzi2801@163.com

鲁 琰, 副研究员, 从事中药抗肿瘤分子机制研究。E-mail: luyan@muh.edu.cn

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and apoptosis-related proteins. **Results** Network pharmacology analysis identified 142 common targets between galangin and HCC. PPI network analysis revealed that proteins such as EGFR, Akt and cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3) may serve as core targets. GO and KEGG analyses suggested that galangin primarily influenced cellular processes by regulating PI3K/Akt signaling pathway. Molecular docking results indicated galangin had strong binding affinity with targets such as EGFR. *In vitro* experiments confirmed that galangin significantly inhibited PLC/PRF/5 cells viability and induced apoptosis ($P < 0.01, 0.001$), significantly down-regulated p-EGFR and p-Akt protein expressions ($P < 0.05$), and significantly up-regulated cleaved Caspase-3 and Caspase-9 protein expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Galangin may exert its anti-HCC effects by inhibiting EGFR-PI3K/Akt signaling pathway and inducing apoptosis in HCC cells.

Key words: galangin; hepatocellular carcinoma; network pharmacology; apoptosis; EGFR-PI3K/Akt signaling pathway

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球范围内最常见的原发性肝脏恶性肿瘤^[1]。流行病学数据显示, HCC 的年发病率高居全球恶性肿瘤第 6 位, 而致死率则位列第 3, 患者 5 年生存率普遍低于 20%, 凸显了其侵袭性强、预后差的临床特点^[2]。全球约 80% 的 HCC 病例集中分布于亚洲与非洲地区^[3], 其发生与乙型肝炎病毒慢性感染、膳食黄曲霉毒素暴露等区域性高危因素密切相关, 揭示了其独特的病因学背景^[4-5]。当前, HCC 的临床管理策略包括手术切除、局部消融、经动脉化疗栓塞、分子靶向治疗及免疫治疗等, 虽已形成多元化格局, 但仍面临显著局限。这些疗法的应用与疗效高度依赖于肿瘤分期和患者肝脏功能储备^[6-7]。对于早期患者, 根治性手术虽为首选, 但术后复发率居高不下^[7]; 对于占据诊断时多数比例的中晚期患者, 现有治疗手段疗效有限, 且常伴随耐药性及治疗相关不良反应, 严重制约了患者的长期生存与生活质量^[8-9]。因此, 深入探索 HCC 的发病机制, 并致力于发掘高效、低毒的新型治疗药物, 已成为改善临床预后、破解当前治疗困境的核心挑战^[6,10]。

从天然产物中寻找具有抗肿瘤活性的先导化合物是药物研发的重要途径之一。高良姜素是从高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 根茎中提取的天然黄酮类活性成分^[11-13], 传统用于温胃散寒、消食止痛。现代药理学研究表明, 其独特的化学结构 (特别是 3,5,7-位酚羟基) 赋予其卓越的抗氧化与抗炎能力^[11]。进一步研究发现, 高良姜素具有诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期等直接抗肿瘤作用^[12-13]。初步研究虽已提示高良姜素具有抗肿瘤潜力, 然而其抗 HCC 的具体机制仍未明确。值得注意的是, HCC 的发展与持续的氧化应激及慢性炎症密切相关^[14]。高良姜素能够协同抑制这 2 个关键致病环节, 凸显了其多靶点作用的独特优势, 也使其成为极具开发潜力的抗 HCC 候选分子^[15-16]。因此, 系统阐明其药理

机制, 将为开发高效低毒的 HCC 治疗新策略提供关键的理论基础。

基于此, 本研究整合网络药理学、分子对接与体外细胞实验, 系统探究高良姜素抗 HCC 的潜在作用靶点与信号通路^[17-20]。首先, 通过网络药理学构建“药物-成分-靶点-疾病”网络, 从系统层面预测其整体调控机制; 继而, 利用分子对接技术在原子水平模拟高良姜素与关键靶蛋白的结合模式与亲和力, 阐明其相互作用的分子基础; 最终, 通过体外细胞实验对理论预测进行验证, 考察药物对 HCC 细胞增殖、凋亡等表型的影响。本研究通过多层次证据链的相互印证, 旨在阐明高良姜素诱导 HCC 细胞凋亡的作用机制, 为拓展 HCC 治疗路径提供新视角和实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 PLC/PRF/5 细胞由海南省肿瘤发生和干预重点实验室保存。

1.2 药品与试剂

高良姜素 (批号 114199, 质量分数为 99.99%)、仑伐替尼 (批号 360652)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体 (批号 264373)、p-EGFR 抗体 (批号 263709)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 263673)、p-Akt 抗体 (批号 395375)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体 (批号 688964) 购自美国 MedChemExpress 公司; DMEM 高糖培养基 (批号 6125276) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (批号 M24SQ10243101) 购自浙江美森细胞科技有限公司; 0.25% 胰蛋白酶 (批号 A383250727)、青霉素-链霉素溶液 (批号 080421211018)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 A202250409)、蛋白上样缓冲液 (批号 Z928250226) 购自上海碧云天生物科技有限公

司; CCK-8 试剂盒(批号 20241231-1)购自深圳默鸿科技有限公司; PBS 缓冲液(批号 2510B0083851)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 GP2412024)、转印滤纸(批号 FZ2025901)、彩色预染蛋白 Marker(批号 MPC2505081)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AC24091008)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; PI3K 抗体(批号 00123655)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)抗体(批号 00176971)、Caspase-9 抗体(批号 00163571)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 20001471)购自武汉三鹰生物技术有限公司; ECL 化学发光液(批号 12025113AZ)合肥白鲨科技有限公司。

1.3 仪器

NU-5700 型二氧化碳培养箱、MB-102 型蛋白恒温金属浴组件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Ts2/*型倒置式生物显微镜(日本尼康公司); Cytation 5 型酶标仪、Tanon 5200 型免疫印迹化学发光系统、Vortex Genie2 型震荡混悬系统(上海天能科技有限公司); SPRING-R20(i+)型超纯水制造仪器、Mini-PROTEAN® Tetra cell 型蛋白免疫印迹电泳系统、Mini Trans Blot cell 型蛋白免疫印迹转膜系统(美国 Bio-Rad 公司); Thermo Mixer® C 型平衡摇床(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 高良姜素作用靶点的筛选 从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)检索并下载高良姜素的二维(2D)化学结构。将该 2D 结构文件提交至 SwissTargetPrediction 在线平台(<http://www.swisstargetprediction.ch>),以预测其相关作用靶点^[21-24]。同时,从 PubChem 数据库获取高良姜素的三维(3D)结构,并上传至 PharmMapper(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>)服务器进行互补性靶点预测。在 PharmMapper 中,将靶点集参数设定为“human protein targets only”,专一筛选人类蛋白靶点。对预测结果进行筛选,仅保留标准化打分(normalized fit score)不低于 0.9 的条目,并通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org>)将所得靶点统一转换为标准基因名称。合并 2 个数据库的预测结果并去重,得到高良姜素的潜在基因靶

点集合。

2.1.2 HCC 疾病相关靶点的收集 以“hepatocellular carcinoma”为关键词,系统检索 OMIM(www.omim.org)、GeneCards(www.genecards.org)与 TTD(<https://db.idrblab.net/ttd/>)3 大数据库,并限定物种为“人类”。合并 3 个数据库的检索结果并去重,得到 HCC 的潜在靶点。

2.1.3 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建与分析 将高良姜素作用靶点与 HCC 疾病靶点取交集,获得候选基因。运用 Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络^[25]。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建与核心靶点筛选 将候选基因列表导入 STRING(www.string-db.org)在线数据库,相互作用置信度阈值设为>0.4。将获得的 PPI 网络数据导入 Cytoscape 软件进行拓扑学分析,利用内置网络分析工具计算各节点的连接度值^[26],基于连接度值对潜在核心靶点进行优先级排序。

2.1.5 基因本体(gene ontology, GO)功能与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析 采用 R 语言 ClusterProfiler 软件包对筛选所得基因集进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析^[27]。GO 功能注释涵盖生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)与分子功能(molecular function, MF)3 个范畴。所有分析结果均通过微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)进行可视化^[28]。

2.1.6 化合物核心靶点与疾病核心靶点的分子对接 为验证高良姜素与 HCC 核心靶点间的相互作用,选取节点度值较高且参与 HCC 相关 KEGG 通路的蛋白质作为受体,开展分子对接验证。首先,从 PubChem 数据库获取高良姜素的二维结构,通过 ChemBio2D 软件转化为三维结构;其次,自 PDB 蛋白质结构数据库下载对应蛋白的三维晶体结构;随后,运用 PyMOL 软件去除蛋白质结构中的水分子及原始配体^[26],并使用 AutoDockTools 将蛋白与配体分子文件统一转换为 pdbqt 格式;最后,采用 AutoDock Vina(<https://autodock-vina.readthedocs.io/en/latest/index.html>)完成分子对接计算,评估结合能并分析对接结果。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 细胞培养 PLC/PRF/5 细胞用含 10%胎牛血

清和 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基, 于 37 ℃、5%CO₂ 的恒温培养箱中培养, 选取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 PLC/PRF/5 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h。分别用含 1、2、4、8、16、32、64、128、256 μ mol/L 高良姜素或 1、10、15、20、25、30、40、50 μ mol/L 仑伐替尼的新鲜培养液处理细胞, 另设置不给药的对照组和不接种细胞不给药的空白组。作用 48 h 后, 吸去各孔内液体, 每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 试剂的基础培养液, 继续孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 PLC/PRF/5 细胞, 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 75% 时, 弃去原有培养基, 分别加入含 20 μ mol/L 高良姜素或 8 μ mol/L 仑伐替尼的新鲜培养基继续培养 24 h, 另设置不给药的对照组。培养结束后, 收集细胞上清液, 用 PBS 轻柔冲洗细胞 3 次。加入胰蛋白酶消化细胞, 将消化后的细胞与收集的细胞上清液混合后离心, 并用预冷的 PBS 洗涤 3 次。以 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 避光条件下室温孵育 15 min; 再加入 5 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液, 避光孵育 5 min。于 1 h 内使用流式细胞仪进行检测分析。

2.2.4 Western blotting 检测 EGFR-PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达 按“2.2.3”项下方法进行给药, 培养 24 h 后, 收集细胞, 加入裂解液提取总蛋白并使用 BCA 法进行定量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶于室温封闭 1 h, 加入一抗, 4 ℃孵育过夜。TBST 洗涤后, 加入 HRP 标记的二抗, 于室温孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂显影。

2.2.5 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析与图表绘制。以单因素方差分析及非参数检验进行多组间的结果比较; 以 t 检验进行两组间的结果比较。

3 结果

3.1 高良姜素潜在靶点的筛选

从 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 获得 105 个潜在靶点,

从 PharmMapper 数据库获得 293 个潜在靶点, 对所得靶点进行去重整合后, 共得到 360 个高良姜素的潜在作用靶点, 用于后续分析。

3.2 HCC 疾病相关靶点的筛选

从 OMIM 数据库收集到 289 个靶点, 从 GeneCards 数据库 (设定评分阈值 > 1) 获取 1 688 个靶点, 从 TTD 数据库中获得 1 个靶点。合并所有数据库的检索结果并去除重复项后, 最终共得到 1 909 个的 HCC 潜在疾病靶点, 用于后续分析。

3.3 “药物-成分-靶点-疾病”网络的构建

利用 JVenn 工具将 360 个高良姜素潜在作用靶点与 1 909 个 HCC 相关疾病靶点进行取交集分析, 获得 142 个共同作用靶点 (图 1)。借助 Cytoscape 软件将交集靶点构建成可视化互作网络 (图 2)。在该网络中, 节点分别代表高良姜素、HCC 及其作用靶点, 边则表征它们之间的相互作用关系。该网络拓扑结构直观地揭示了高良姜素可通过多靶点、协同性的方式发挥抗 HCC 作用。

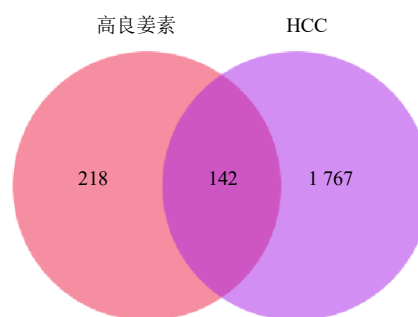


图 1 高良姜素与 HCC 共有靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of shared targets between galangin and HCC

3.4 PPI 网络的构建

为识别高良姜素抗 HCC 的核心作用靶点, 将筛选出的 142 个共同靶点导入 STRING 数据库, 构建了 PPI 网络 (图 3)。该网络表现出较高的平均节点度值与聚类系数, 提示其内部蛋白相互作用关系稳定且连接紧密。进一步利用 Cytoscape 软件的 Centiscape 插件进行拓扑分析, 并依据度值这一关键指标, 筛选出 7 个核心靶点, 分别为热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class a member 1, HSP90AA1)、EGFR、Akt1、CASP3、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、白蛋白 (albumin, ALB) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)。这些靶点有较高

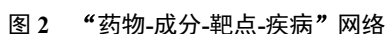


图 3 PPI 网络

的度值, 在 PPI 网络中居于枢纽地位, 表明它们很可能是高良姜素发挥抗 HCC 作用的关键靶点。

3.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

为阐明潜在靶点的生物学功能,对 142 个候选基因进行 GO 功能富集分析(图 4)。在 BP 类别中,显著富集的通路主要涉及激酶活性的正调控、PI3K 信号传导、蛋白质自磷酸化、细胞对化学及氧化应激的反应、对氧水平降低及有毒物质的反应等。在

CC 类别中,靶点显著富集于膜筏、膜微区、囊泡腔、分泌颗粒腔、蛋白激酶复合体、黏着斑以及转移含磷基团的转移酶复合体等结构。在 MF 类别中,跨膜受体蛋白激酶活性(包括酪氨酸激酶及丝氨酸/苏氨酸激酶活性)、核受体活性、配体激活的转录因子活性、组蛋白激酶活性,以及与转录调控相关的结合功能(如转录共激活因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合)显示出高度相关性。以上结果表明,高良姜素可能通过调控激酶活性、应激反应及核受体相关信号通路,进而影响 HCC 的生物学进程。

为系统解析高良姜素抗HCC的潜在作用通路,将142个作用靶点导入微生信平台进行KEGG通路富集分析,并绘制气泡图(图5)。结果显示,共同作用靶点富集到167条通路,其中显著性排名前10的包括癌症中的蛋白聚糖、脂质与动脉粥样硬化、PI3K/Akt信号通路、前列腺癌、FoxO信号通路、化学致癌作用-活性氧类、孕酮介导的卵母细胞成熟、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、内分泌抵抗以及化学致癌作用-受体激活等。提示高良姜素可能通过调控包括PI3K/Akt、FoxO和MAPK在内的多条信号通路,参与细胞增殖、凋亡、氧化应激及代谢等多种生物学过程,从而发挥其抗HCC作用。

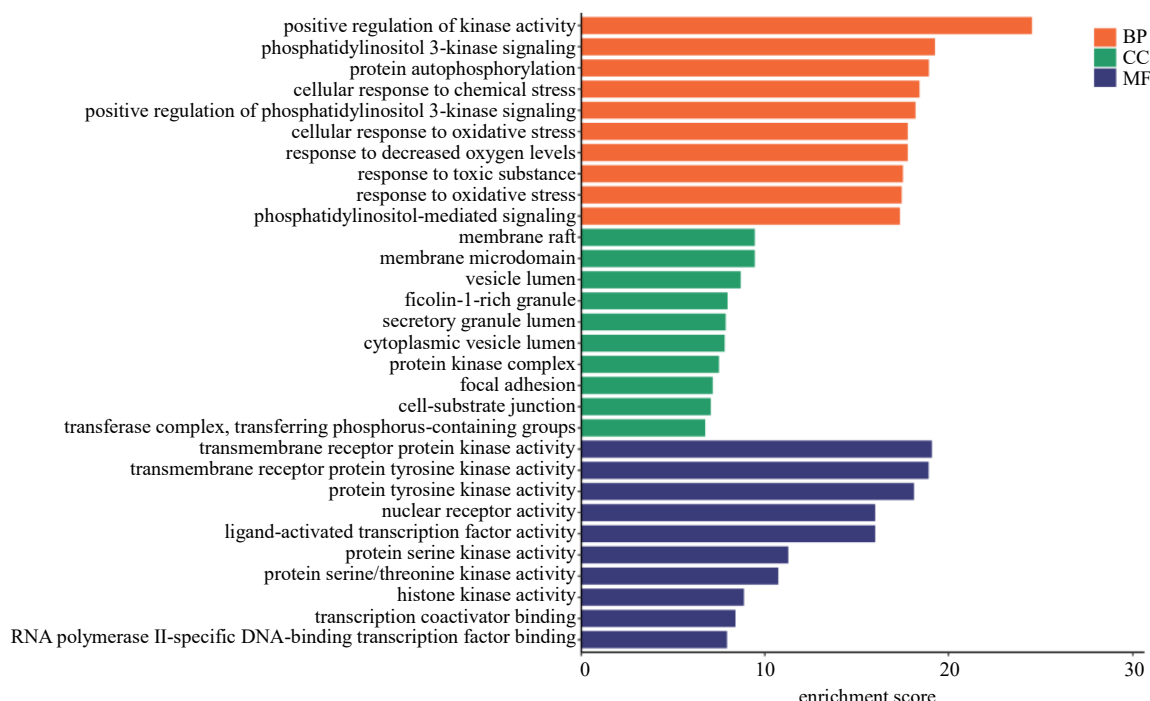


图 4 候选基因 GO 功能分析结果

Fig. 4 Go function analysis results of candidate genes

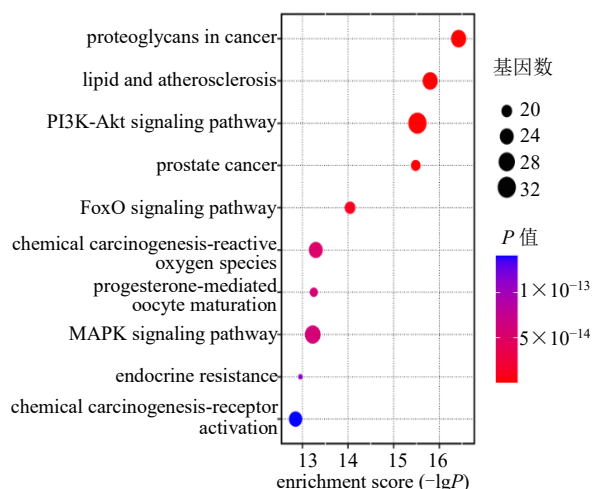


图 5 候选基因 KEGG 通路分析结果

Fig. 5 KEGG pathway analysis results for candidate genes

3.6 分子对接验证

为验证高良姜素抗 HCC 的作用机制, 基于 PPI 分析获得的核心靶点进行分子对接验证。高良姜素与各核心靶点的结合能见表 1, 结合能低于 -5 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol) 表明配体与受体间具有良好亲和力。选取每组对接构象中结合能最优的结果进行可视化 (图 6)。

表 1 高良姜素与核心靶点的结合能

Table 1 Binding energy of galangin with core targets

核心靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
Akt1	-6.8
CASP3	-7.1
EGFR	-8.7
HSP90AA1	-8.9

1 kcal·mol⁻¹ = 4.182 kJ·mol⁻¹.

分子对接结果显示, 4 组复合物的结合能均低于 -5 kcal/mol, 提示高良姜素与各靶蛋白均可有效结合。其中, 高良姜素与 Akt1 和 CASP3 未观察到特异性次级键相互作用, 仅展示整体对接构象; 高良姜素与 EGFR 和 HSP90AA1 均形成稳定氢键网络 (高良姜素可与 EGFR 的 THR-205、GLU-206、ALA-208 残基结合, 高良姜素可与 HSP90AA1 的 LEU-48、ASN-51、ASP-93 残基形成氢键)。以上结果从结构层面揭示了高良姜素与核心靶点之间的相互作用模式, 为其多靶点抗 HCC 机制提供了理论依据。

3.7 细胞实验结果

3.7.1 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞活力及形态的影响 如图 7-A、B 所示, 高良姜素和仑伐替尼处理 PLC/PRF/5 细胞 48 h 后, 显著抑制细胞活力 ($P <$

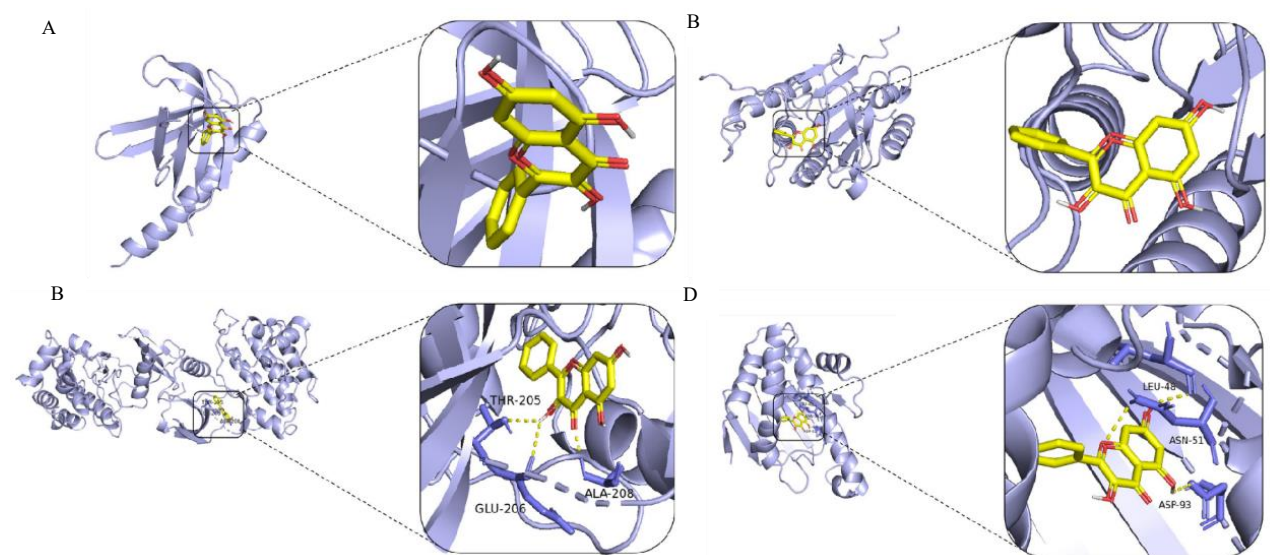
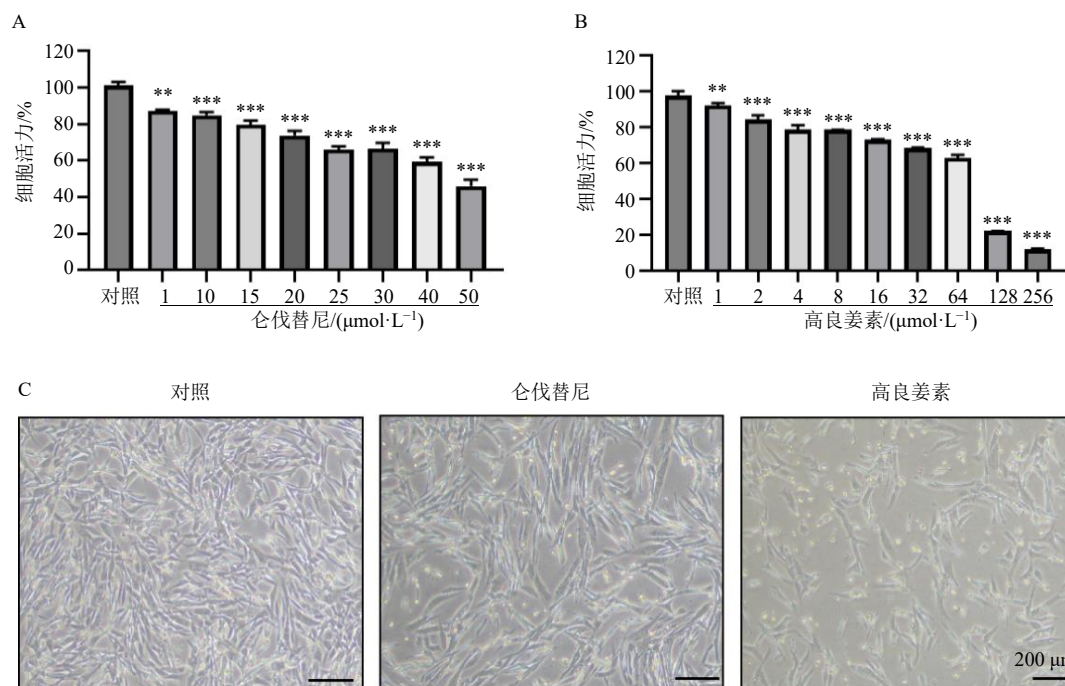


图 6 高良姜素与核心靶点的分子对接图

Fig. 6 Molecular docking of galangin with core targets



A-仑伐替尼对 PLC/PRF/5 细胞活力的影响; B-高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞活力的影响; C-仑伐替尼和高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞形态的影响 ($\times 40$); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

A-effect of lenvatinib on viability of PLC/PRF/5 cells; B-effect of galangin on viability of PLC/PRF/5 cells; C-effects of lenvatinib and galangin on morphology of PLC/PRF/5 cells ($\times 40$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 7 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞活力及形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 7 Effects of galangin on viability and morphology of PLC/PRF/5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.01、0.001), 且呈剂量相关性。表明高良姜素在体外实验中表现出较强的抗 HCC 增殖活性。如图 7-C 所示, 与对照组比较, 各给药组细胞形态均发生

显著的病理改变。经 $20 \mu\text{mol/L}$ 高良姜素或 $8 \mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼处理后, PLC/PRF/5 细胞的密度显著降低, 并出现典型的凋亡形态特征: 细胞普遍皱缩、变圆,

伪足回缩，导致细胞间隙增大、贴壁能力丧失，悬浮细胞及细胞碎片明显增多。这些形态学变化与 CCK-8 法检测到的细胞活力下降趋势高度吻合，从直观层面共同证实了高良姜素对 HCC 细胞增殖的抑制作用。

3.7.2 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞凋亡的影响 如图 8 所示，与对照组比较，各给药组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$)，表明高良姜素能够有效诱导 HCC 细胞凋亡。

3.7.3 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞中 EGFR-PI3K/Akt 通路及凋亡相关蛋白表达的影响 如图 9

所示，与对照组比较，高良姜素组 p-EGFR、p-PI3K 及 p-Akt 的蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.05$)，而总蛋白水平未发生明显改变，表明高良姜素特异性抑制了 EGFR-PI3K/Akt 信号通路的磷酸化激活过程。与对照组比较，高良姜素组凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 和 Caspase-9 的表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，提示细胞凋亡程序被有效激活。上述结果表明，高良姜素可能通过抑制 EGFR 及其下游 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化，解除其对凋亡过程的抑制作用，进而促进 Caspase-9 的活化并最终激活凋亡执行蛋白 Caspase-3，诱导细胞凋亡。

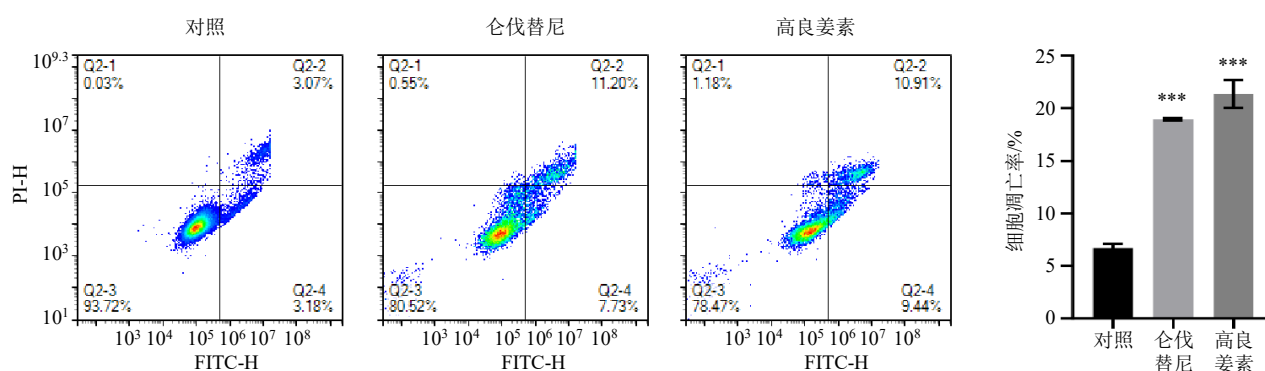


图 8 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of galangin on apoptosis of PLC/PRF/5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

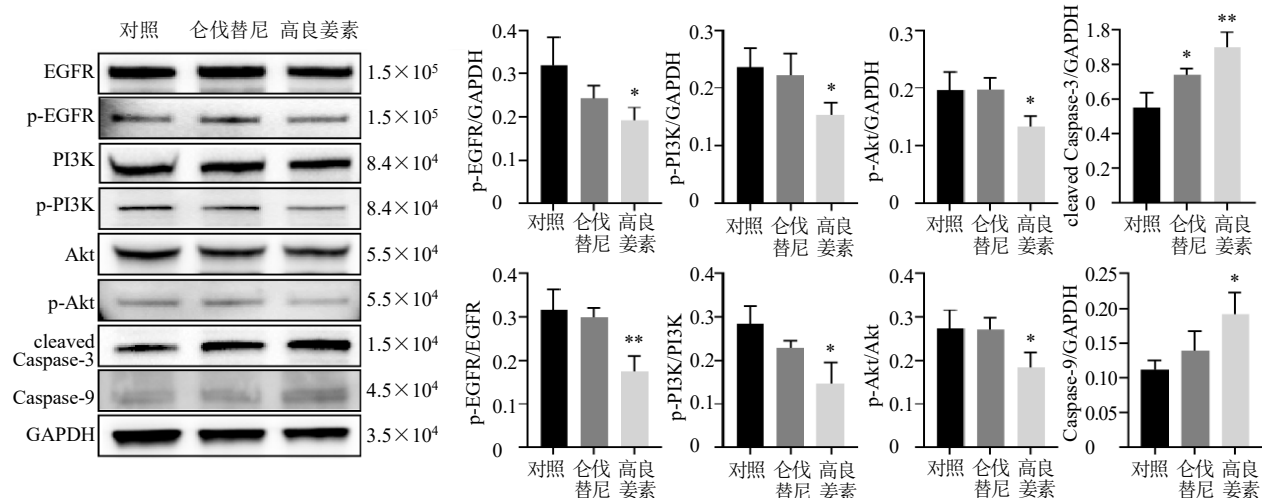


图 9 高良姜素对 PLC/PRF/5 细胞中 EGFR-PI3K/Akt 通路及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of galangin on expressions of EGFR-PI3K/Akt pathway and apoptosis-related proteins in PLC/PRF/5 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

HCC 作为一种全球性的重大健康挑战，其发病机制复杂、临床预后差，与多条信号通路的异常调控密切相关^[2]。在众多参与 HCC 发生发展的分子通

路中，EGFR 及其下游的 PI3K/Akt 信号轴被认为处于核心地位，在调控细胞存活、增殖与凋亡中发挥关键作用^[11]。EGFR 属于受体酪氨酸激酶家族，在与配体结合后发生二聚化及自身磷酸化（如 Y1068

位点), 形成活化形式的 p-EGFR, 进而募集并激活下游信号分子。其中, PI3K/Akt 是 EGFR 信号传递的重要通路之一, 活化的 Akt 通过其 Thr308 与 Ser473 位点的磷酸化被完全激活, 进一步调控包括凋亡抑制蛋白、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 等在内的多种下游效应分子, 从而促进细胞生存、增殖及代谢重编程, 驱动 HCC 的恶性进展^[7]。本研究基于网络药理学方法, 预测高良姜素抗 HCC 的潜在作用靶点, KEGG 通路富集分析进一步提示其药理作用可能与 PI3K/Akt 信号通路密切相关。分子对接结果显示, 高良姜素与 EGFR 等核心靶点具有良好的结合活性, 从理论层面支持了其对上述信号通路的干预潜力。为验证该预测, 本研究通过体外细胞实验证实, 高良姜素可有效抑制 HCC 细胞增殖并诱导其凋亡。在蛋白水平上, 高良姜素能够显著抑制 PLC/PRF/5 细胞中 EGFR 及 Akt 的磷酸化, 表现为 p-EGFR 与 p-Akt 蛋白表达明显下调, 其作用模式与典型的通路抑制剂相似。由此推测, 高良姜素可能通过干扰 EGFR-PI3K/Akt 信号通路的正常传导, 进而激活 Caspase-3 等凋亡执行蛋白, 最终诱导细胞程序性死亡。此外, 分子对接亦提示高良姜素与 HSP90AA1 靶点之间可形成稳定结合, 提示该靶点可能参与其作用机制, 值得在后续研究中予以重点关注。尽管本研究初步揭示了高良姜素抗 HCC 的潜在机制与抑制 EGFR-PI3K/Akt 通路密切相关, 其具体分子机制及信号动态响应过程仍有待进一步阐明。

综上, 本研究整合网络药理学、分子对接及实验验证, 初步揭示了高良姜素抗 HCC 的潜在作用机制与抑制 EGFR-PI3K/Akt 信号通路密切相关, 为阐释高良姜素抗 HCC 的药理机制提供了可靠的理论依据与实验支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 江宁, 李旭初, 黄慧瑶, 等. T 细胞免疫受体单抗联合疗法于晚期肝细胞癌一线治疗中的应用与挑战: 基于两项 II 期临床研究结果的述评 [J]. 肝癌电子杂志, 2024, 11(4): 6-12.
- [2] 曹梦迪, 陈万青. GLOBOCAN 2022 全球癌症统计数据解读 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2024, 16(6): 1-5.
- [3] 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.
- [4] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [5] McGlynn K A, Petrick J L, El-Serag H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 73(Suppl 1): 4-13.
- [6] Zhou Y, Wang Z, Ren S, et al. Mechanism of action of protopanaxadiol ginsenosides on hepatocellular carcinoma and network pharmacological analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 548-557.
- [7] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [8] Tabrizian P, Jibara G, Shrager B, et al. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: Patterns, treatments, and prognosis [J]. *Ann Surg*, 2015, 261(5): 947-955.
- [9] Zhu Y J, Zheng B, Wang H Y, et al. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(5): 614-622.
- [10] Finn R S, Qin S K, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894-1905.
- [11] Wu Y Z, Luo J H, Xu B J. Insights into the anticancer effects of galangal and galangin: A comprehensive review [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156085.
- [12] Matsuda H, Morikawa T, Ando S, et al. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action [J]. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11(9): 1995-2000.
- [13] Zhang W J, Lan Y, Huang Q L, et al. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK [J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(3): 447-455.
- [14] Zheng J J, Wang S Y, Xia L, et al. Hepatocellular carcinoma: Signaling pathways and therapeutic advances [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 35.
- [15] Zhang H T, Luo H, Wu J, et al. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(27): 3377-3384.
- [16] 刘小飞, 林开文. 海南姜科植物药用价值研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2024, 30(5): 383-389.
- [17] 王晓晴, 孙允红, 赵方舒, 等. 高良姜素的药理作用及机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(8): 115-120.
- [18] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm

- in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [19] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 696-703.
- [20] Uppathi P, Rajakumari S, Saritha K V. Molecular docking: An emerging tool for target-based cancer therapy [J]. *Crit Rev Oncog*, 2025, 30(1): 1-13.
- [21] Shoemaker R H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(10): 813-823.
- [22] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, *et al.* The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.1.30.33.
- [23] Amberger J S, Bocchini C A, Scott A F, *et al.* OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1038-D1043.
- [24] 王与菲, 张海婧, 吴练秋. 基于网络药理学对黄连抗结直肠癌作用机制的分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(1): 136-146.
- [25] 郭紫文, 王艳, 陶伟伟, 等. 基于网络药理学、分子对接及细胞实验验证探讨藏红花素改善阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4712-4723.
- [26] 王紫柠, 蒲浩, 王清如, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨丹皮酚对酒精性肝病小鼠的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6644-6656.
- [27] 廖春红, 李凤珍, 刘霞, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨当归四逆加吴茱萸生姜汤治疗子宫内膜异位症的分子机制 [J]. 广西医学, 2024, 46(10): 1545-1554.
- [28] 曹寒晶, 王煦焱, 高腾, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨沙棘治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(8): 2154-2163.

[责任编辑 李亚楠]