

基于网络药理学的灯盏花乙素抗乳腺癌机制研究及实验验证

田冲冲, 张琦, 刘开娜, 方晨曦, 包小波*

江苏医药职业学院药学院, 盐城 224005

摘要: 采用网络药理学和分子对接技术预测灯盏花乙素 (scutellarin, SCU) 抗乳腺癌的潜在靶点和作用机制, 并结合临床数据以及体外细胞实验进行验证。分别通过 SwissTargetPrediction 数据库、TargetNet 数据库以及 GeneCards、OMIM、TTD 数据库筛选 SCU 的潜在作用靶点和乳腺癌相关疾病靶点, 然后利用 Venny2.1.0 平台获得药物和疾病的交集靶标, 作为 SCU 干预乳腺癌的潜在治疗靶点; 通过 STRING 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件构建蛋白质-蛋白质互作网络并筛选关键靶点; 利用 DAVID 数据库对交集靶标进行基因本体 (GO) 功能富集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 利用 Autodock Vina 软件对排名前两位的核心靶点与 SCU 进行分子对接验证; 通过癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析核心靶基因在临床样本中的表达情况; 最后在细胞水平验证 SCU 对乳腺癌的抗增殖作用以及对前面获取的关键靶点和通路蛋白表达的影响。经数据库筛选得到 90 个 SCU 抗乳腺癌潜在靶点, 后续拓扑分析得到度值排名前 5 的关键靶点, 分别为 EGFR、TNF- α 、FCASP3、PTGS2 以及 MAPK14; KEGG 通路分析提示 SCU 抗乳腺癌主要涉及 C-型凝集素受体信号通路、凋亡信号通路、人巨细胞病毒感染、HIF-1 信号通路、IL-17 等多条信号通路; 分子对接结果显示 SCU 与关键靶点具有较强的结合能力; 临床样本分析显示与健康人群相比, 关键靶基因的表达均在乳腺癌患者中发生显著变化 ($P < 0.01$)。体外细胞实验表明, SCU 在 40~160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内以剂量依赖性的方式抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的增殖 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), Western blot 结果显示 SCU 上调了 MCF-7 细胞中 EGFR 的蛋白表达, 下调了 TNF- α 与 HIF-1 α 的蛋白表达。综上, SCU 干预乳腺癌具有多靶点、多通路的特点, 其作用机制可能与下调 TNF- α /HIF-1 α 、上调 EGFR 通路, 继而抑制细胞增殖有关, 从而为 SCU 临床研究和产品开发提供了理论依据和参考。

关键词: 灯盏花乙素; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; 体外细胞实验; 信号通路

中图分类号: R739.5 文献标志码: A

Mechanism of scutellarin on breast cancer based on network pharmacology and *in vitro* experiments

TIAN Chong-chong, ZHANG Qi, LIU Kai-na, FANG Chen-xi, BAO Xiao-bo*

Department of Pharmacy, Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng 224005, China

Abstract: Network pharmacology, molecular docking and experimental validation were employed to explore the

potential therapeutic targets and mechanisms of scutellarin (SCU) in the treatment of breast cancer. The targets of SCU were predicted through SwissTargetPrediction database and TargetNet database, and the potential anti-breast cancer targets of SCU were obtained by mapping them with the potential targets associated with breast cancer retrieved from GeneCards, OMIM, TTD databases. The STRING database was applied to construct the protein-protein interaction networks and topological analysis was performed by Cytoscape3.7.2 software. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of intersecting targets was carried out using the DAVID database. The building of SCU to key targets was validated through molecular docking study using Autodock Vina software. The expression of relevant target genes in Clinical case samples obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database were analyzed. At last, CCK-8 assay was performed to explore the anti-proliferative effect of SCU under different concentrations and the effects of SCU on the protein expression of TNF- α , EGFR and HIF-1 α signaling pathway in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells were examined by Western blot. As a result, a total of 90 potential targets were screened out, and 5 key targets were obtained after topological analysis, among which EGFR, TNF, CASP3, PTGS2, and MAPK14 are closely related to the anti-breast cancer effect of SCU. Multiple signaling pathways such as C-type lectin receptor signaling pathway, Apoptosis, Human cytomegalovirus infection, HIF-1 signaling pathway and IL-17 signaling pathway were involved in the anti-breast cancer effect of SCU. Molecular docking results showed that SCU has an excellent binding effect with key target proteins EGFR and TNF. The results of clinical samples revealed that the key target genes were significantly changed in breast cancer patients compared with the healthy population. *In vitro* cell experiments showed that SCU (40-160 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Further western blot assay confirmed SCU up-regulated EGFR protein expression and down-regulated TNF- α and HIF-1 α protein expression. In conclusion, SCU exerts anti-cancer effect through multiple targets and signal pathways. This study provided a theoretical basis and reference for the exploration of SCU on clinical research and product development.

Key words: scutellarin; breast cancer; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* cellular experiment ; signaling pathway

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤。据《2020 全球癌症报告》显示，乳腺癌已成为全球第一大癌，同时也是女性癌症死亡的第一位癌种^[1]。随着人口的增长，全球乳腺癌的发病率呈逐年上升趋势，且发病年龄逐渐年轻化。虽然随着乳腺癌诊疗水平的提高，乳腺癌 5 年生存率已经提高到 90%，但庞大的发病基数以及不到 1% 的 30 年生存率^[2]，使乳腺癌已然成为一个严峻的健康和社会问题。

目前乳腺癌的常规治疗方式包括手术治疗、放射治疗（放疗）、化学药物治疗（化疗）、内分泌治疗以及分子靶向治疗。传统的放、化疗在杀死肿瘤细胞的同时不可避免地也会带来一些严重不良反应，如骨髓抑制、神经毒性等^[3]，限制了其临床应用。靶向治疗药物虽然减少了传统疗法的不良反应，但由于肿瘤细胞的异质性，耐药性不可避免地产生，导致了疾病进展和治疗失败^[4]。因此，研究高效、安全的新型抗肿瘤药物仍是乳腺癌治疗领域亟待解决的重要问题。

灯盏花乙素（scutellarin, SCU）是从菊科属植物短葶飞蓬全草灯盏细辛中提取出的一种黄酮类物质，具有消炎止痛、散寒解表、活血通络等多种药理活性，临床应用主要用于缺血性脑血管疾病、冠心病、心绞痛等的治疗^[5]。此外，SCU 还具有明显的抗肿瘤作用。Yang 等^[6]证实 SCU 可通过靶向 P53 通路抑制结肠癌细胞的生长并诱导其凋亡。SCU 还能通过抑制 PTEN/PI3K 通路抑制胃癌的生长和 EMT 过程^[7]。此外，SCU 也可通过抑制肿瘤血管生成、缓解 TNF- α 诱导的血管内皮屏障破坏、上调 PTEN 等机制抑制黑色素瘤^[8]、乳腺癌^[9]以及肾癌^[10]等的生长和转移。除了直接作用外，SCU 还可通过协同诱导凋亡和抑制肿瘤血管生成、下调 AKT/mTOR 通路、抑制 PKM2 等机制增加肿瘤对化疗药物的敏感性间接发挥抗肿瘤作用^[11-13]。提示 SCU 可通过“多通路、多靶点”发挥抗肿瘤作用。网络药理学是从系统层面揭示药物在机体内调节网络的一门新兴学科，通过构建“疾病-靶点-药物”之间的复杂网络，可以预测药物的作用机制，尤其适合于多通路、多靶点药物的作用机制预测^[14]。我们前期已经证实 SCU 可在体内外水平抑制乳腺癌细胞的增殖^[11]，但其抑制乳腺癌的关键潜在靶点和作用机制尚未完全阐明，仍需要更系统、深入地探索。考虑到 SCU“多通路、多靶点”的作用特点，为全面评价 SCU 抗乳腺癌的机制，本研究拟通过网络药理学系统的揭示 SCU 抗乳腺癌的潜在通路和靶点，并通过分子对接以及体外实验验证，以期为其抗肿瘤机制的深入研究及临床应用提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

MCF-7 细胞株（批号：SCSP-531，中科院上海细胞库）；胎牛血清（批号：26110074）、DMEM 培养基（批号：11965092）（美国 Gibco 公司）；0.25%胰酶（批号：BL512A, Biosharp 生物科技公司）；灯盏花乙素（批号：WKQ-0000642，纯度 \geq 99%，四川维克奇生物科技有限公司）；CCK-8 试剂盒（批号：C6005，苏州新赛美生物科技有限公司）；蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂（批号分别为：C600386、C500017，生工生物工程公司）；脱脂牛奶（批号：AR0176）、蛋白 Marker（批号：AR1113）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号：AR0197A）、

RIPA 裂解液（批号：AR0105）、5×上样缓冲液（批号：AR1112-10）、TBST 缓冲液（批号：AR0193-10）、SDS-PAGE（批号：AR0048）、ECL 化学发光液（批号：AR1191）（武汉博士德公司）；Anti- β -actin 抗体（批号：AC026）、Anti-EGFR 抗体（批号：A11351）、Anti-TNF- α 抗体（批号：A24214）、Anti-HIF-1 α 抗体（批号：A22041）、HRP 标记羊抗兔 IgG（批号：AS080）（武汉 ABclonal 公司）。

Forma™ Series 3 Water Jacketed 细胞培养箱（赛默飞世尔科技公司）；ST 16R 台式高速冷冻离心机（赛默飞世尔科技公司）；SW-CJ-1D 医用超净工作台（江苏苏净集团有限公司）；DMi8 倒置荧光显微镜（德国 LEICA 公司）；EPS 300 电泳仪（上海天能生命科学有限公司）；Tanon 5200 Multi 全自动化学发光成像仪（上海天能生命科学有限公司）；TS-1000 脱色摇床（其林贝尔仪器制造有限公司）；Infinite M Plex 酶标仪（瑞士 Tecan 公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 SCU 潜在作用靶点的筛选

使用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库检索 SCU 的 SMILES 号，将其导入 SwissTargetPrediction (swisstargetprediction.ch) 和 TargetNet 数据库 (targetnet.scbdd.com)，去重，得到 SCU 的潜在作用靶点。

1.2.2 乳腺癌相关疾病靶点的筛选

以“breast cancer”为关键词，检索 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>) 以及 TTD 数据库 (db.idrblab.net)，收集乳腺癌相关靶点，合并、去重，作为乳腺癌相关的疾病靶点。

1.2.3 药物-疾病交集靶点的获取

将数据库预测的 SCU 潜在作用靶点和乳腺癌相关的疾病靶点上传到 Venny2.1.0 平台 (bioinfogpcnb.csic.es/tools/venny)，绘制药物-疾病的交集靶点 Venny 图，作为 SCU 干预乳腺癌的潜在治疗靶点。

1.2.4 蛋白互作 (PPI) 网络构建与分析

将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>)，物种设定为“Homo sapiens”，构建 SCU 与乳腺癌交集靶点的 PPI 网络，将结果保存为 tsv 文件。导入 Cytoscape3.7.2 软件，利用 cytoHubba 插件得到各个靶点的度值 (degree)，保留排名前 5 的靶标蛋白^[15]。

1.2.5 交集靶点的 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

将交集靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。其中，GO 富集分析根据生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular

component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 对靶点进行注释和分类。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的标准进行筛选。将数据导入 R 软件进行可视化分析, 分别选取 GO 分析前 10 位和 KEGG 分析前 20 位的结果进行绘图。利用 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建 SCU 的“成分-靶点-通路”图。

1.2.6 分子对接验证

选择 PPI 交互网络中中度值排名前两位的关键靶点进行分子对接。分别通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 获取药物和关键靶点蛋白的结构。利用 Pymol 软件对蛋白质结构进行去水和配体处理, 保存^[17], 最后利用 Autodock Vina 软件进行分子对接和利用 Pymol 软件进行可视化处理。

1.2.7 癌症基因组图谱 (TCGA) 临床数据分析

参考董阳逗等的方法^[6], 从 TCGA 数据库获得乳腺癌患者和健康人群的转录组测序数据, 使用 R 软件 v4.4.0 分析筛选出的核心靶基因在两组人群中的表达情况, 通过 wilcox 检验进行差异的统计学分析, 其中 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

1.2.8 细胞实验验证

1.2.8.1 MCF-7 细胞的培养

将 MCF-7 细胞培养于含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。采用 0.25% 胰酶常规消化细胞并传代。

1.2.8.2 CCK-8 检测 SCU 的体外抗增殖作用

将处于对数生长期的 MCF-7 细胞消化后制成细胞悬液, 以 100 μL 每孔加至 96 孔板内, 使每孔内细胞数为 5 000 个。设置空白对照组 (control, Con) 和不同浓度 SCU 处理组, 每组设置 6 个复孔。待细胞贴壁过夜后, 加入不同浓度的 SCU (0、5、10、20、40、80、160 μmol/L) 干预 48 h, 之后每孔加入 20 μL 的 CCK-8 试剂, 37 °C 培养箱继续孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.2.8.3 Western blot 检测相关蛋白水平的表达

收集各组细胞, 用 RIPA 裂解液于 4 °C 下裂解细胞, 获取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。上样, 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 再用 5% 脱脂奶粉进行封闭。TBST 洗膜后, 加入一抗, 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 显色并拍照。用 Image J 软件分析条带灰度值, 以目的条带灰度值与 β -actin 为内分析各目的蛋白的表达情况。

1.3 数据处理

所有检测重复 3 次，结果以平均值±标准差表示。组间均数比较采用 *t* 检验，多组间样本均数比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行统计和分析；采用 GraphPad Prism 软件作图。

2 结果与分析

2.1 灯盏花乙素干预乳腺癌潜在作用靶点的获取

SwissTargetPrediction 数据库和 TargetNet 数据库检索去重后得到 SCU 的潜在作用靶点 100 个；应用 GeneCards、OMIM、TTD 数据库对乳腺癌相关靶点进行筛选、去重，得到 18 062 个靶点；对药物和疾病相关靶点进行韦恩图绘制，得到交集靶点共 90 个，作为 SCU 干预乳腺癌的潜在作用靶点，结果如图 1 所示。

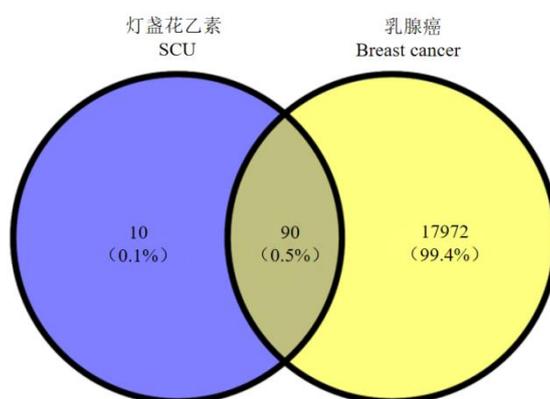


图 1 SCU-乳腺癌共同靶点 Venn 图

Fig.1 Venn diagram of the common targets of SCU-breast cancer

2.2 PPI 网络构建与关键靶点筛选

利用 STRING 数据库对 90 个交集靶点进行 PPI 网络构建，如图 2 所示，将结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件，通过 cytoHubba 插件筛选出度值排名前 5 位的靶蛋白（见表 1），依次为 EGFR、TNF、CASP3、PTGS2 以及 MAPK14，预测其可能为 SCU 作用的关键靶标。

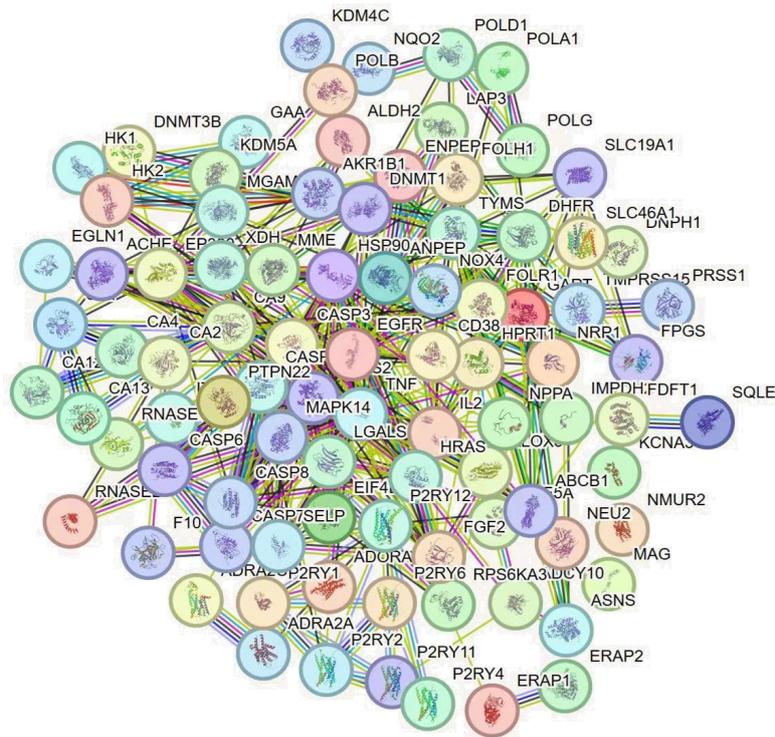


图 2 SCU 治疗乳腺癌的蛋白互作网络分析图

Fig.2 PPI network of potential targets of SCU in treatment of breast cancer

表 1 基于度值的 SCU 治疗乳腺癌的前 5 个关键靶蛋白

Table 1 The top 5 key protein targets of SCU in the treatment of breast cancer ranked by degree value

排名	靶点	度值
Rank	Target	Degree
1	EGFR	36
2	TNF	34
3	CASP3	32
4	PTGS2	29
5	MAPK14	27

2.3 GO 与 KEGG 富集分析

通过 DAVID 数据库对筛选出的 90 个靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。利用 R 语言对具有显著性差异的基因富集结果进行可视化处理。

GO 功能富集分析的结果如图 3 所示。BP 方面，交集基因主要参与管径调节 (regulation of tube diameter)、维持血管直径 (blood vessel diameter maintenance)、含叶酸的化合物代谢过程 (folic acid-containing compound metabolic process) 等生物过程。CC 方面，交集基因

主要分布在细胞顶端部分（apical part of cell）、细胞基部（basal part of cell）、基底外侧质膜（basolateral plasma membrane）等细胞部位。MF 方面，交集基因主要富集在 G 蛋白偶联嘌呤能核苷酸受体活性（G protein-coupled purinergic nucleotide receptor activity）、裂合酶活性（lyase activity）、酰胺结合（amide binding）等。KEGG 通路富集分析气泡图如图 4 所示。结果显示，SCU 治疗乳腺癌的相关信号通路涉及到脂质和动脉粥样硬化通路（Lipid and atherosclerosis）、胞葬信号通路（Efferocytosis）、C-型凝集素受体信号通路（C-type lectin receptor signaling pathway）、凋亡信号通路（Apoptosis）、HIF-1 信号通路（HIF-1 signaling pathway）、IL-17 信号通路（IL-17 signaling pathway）以及 TNF 信号通路（TNF signaling pathway）等。此分析显示，SCU 的抗乳腺癌作用具有多靶点、多通路的特性。

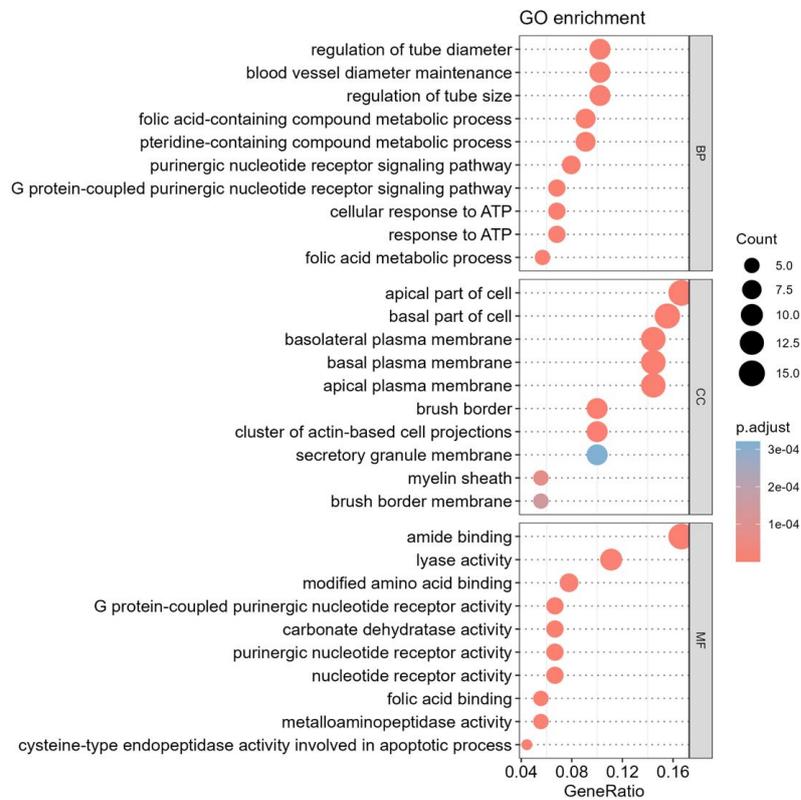


图 3 GO 富集分析气泡图

Fig.3 GO enrichment analysis bubble diagram

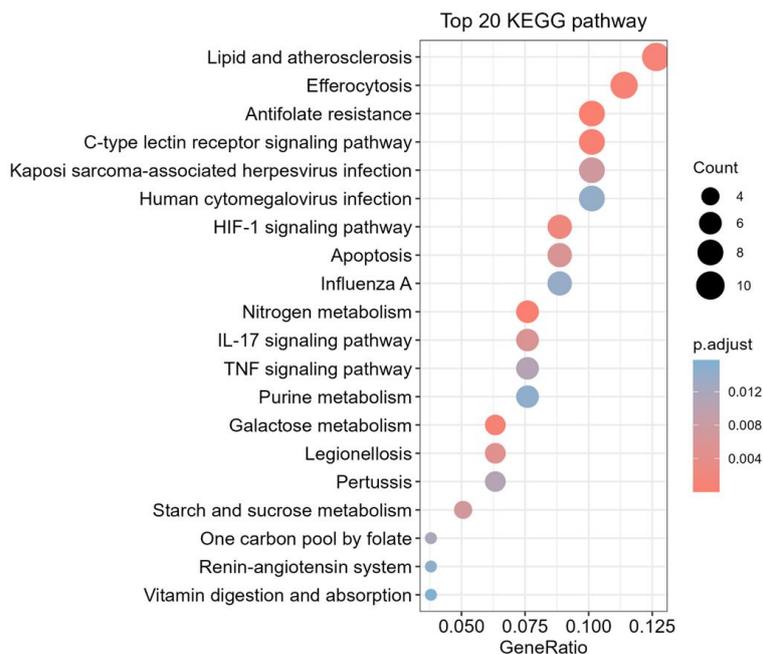


图 4 KEGG 富集分析气泡图

Fig.4 Results of KEGG enrichment analysis bubble diagram

2.4 SCU“成分-靶点-通路”网络的构建

以 SCU 为中心，用 KEGG 通路富集分析得到的前 20 个关键通路和关键通路上富集的 50 个靶点绘制“成分-靶点-通路”图（见图 5），其中绿色三角形表示 SCU，橙色菱形表示通路，蓝色圆形靶点。由图可以看出，SCU 的抗乳腺癌作用涉及多个靶点、多条通路。

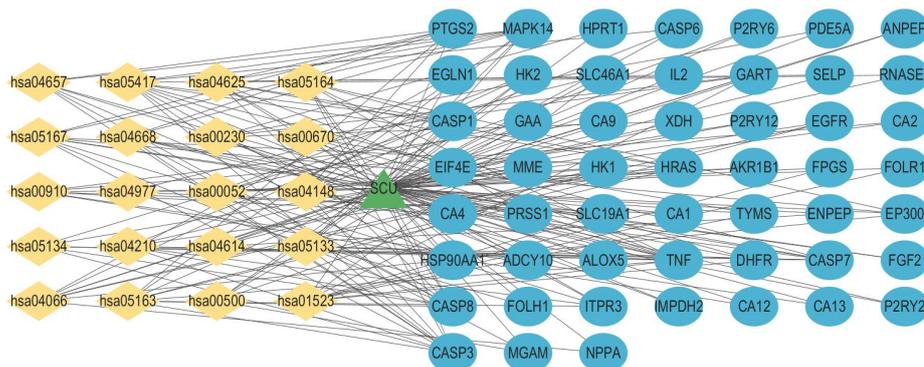


图 5 SCU 的“成分-靶点-通路”网络图

Fig.5 Network prediction of compound-target-pathway of SCU

2.5 核心靶基因在临床乳腺癌样本中的表达水平分析

为验证核心靶基因在乳腺癌患者（Tumor_G1）和健康人群（Normal）中是否存在差异表达，接下来利用癌症基因组图谱（TCGA）数据库获取乳腺癌患者（ $n=1101$ ）和正常健康

人群 ($n = 572$) 的基因表达临床数据集, 分析核心靶基因的表达情况。结果如图 6 所示, 与健康人群相比, 乳腺癌患者中 TNF、CASP3 以及 MAPK14 mRNA 的表达水平极显著升高 ($P < 0.01$); 而 EGFR 及 PTGS2 mRNA 的表达则出现极显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 证实通过网络药理学筛选预测的靶基因在临床乳腺癌样本中发生了差异表达, 提示这些关键靶基因可能与乳腺癌的发生发展密切相关。

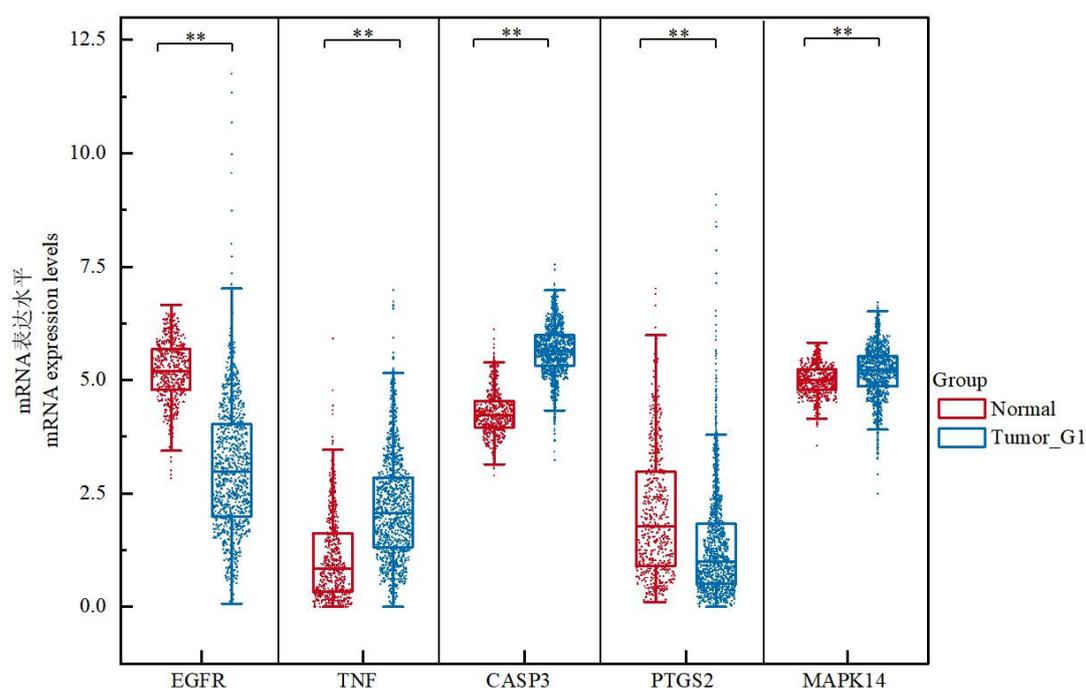


图 6 乳腺癌患者和健康人群中核心靶点 mRNA 的表达水平

Fig.6 The mRNA expression levels of core targets in breast cancer patients and healthy population

注: $**P < 0.01$ 。Note: $**P < 0.01$ 。

2.6 分子对接

借助 Autodock Vina 软件对排名前两位核心靶蛋白即 EGFR 和 TNF 与 SCU 进行分子对接分析, 以进一步评估 SCU 与关键靶标之间的结合能力。结合能是衡量分子结合稳定性的参数, 其值小于 0 时, 说明受体分子与配体分子能自发结合且产生相互作用。结合能越小, 说明化合物和蛋白靶标的对接能力越强, 对接后分子的稳定性越高^[17]。SCU 与 EGFR、TNF 的结合能分别为 -11.2 和 -10.1 kcal/mol, 均在 -5 kcal/mol 以下, 表明 SCU 与两个靶标均具有较强的结合能力, 结构较为稳定。使用 Pymol 软件对 SCU 和靶标的对接结果进行可视化分析和观察, 结果如图 7 所示。由图可以看出, SCU 可以对接到靶标的疏水口袋中, 并通过多个氢键与靶标紧密结合。

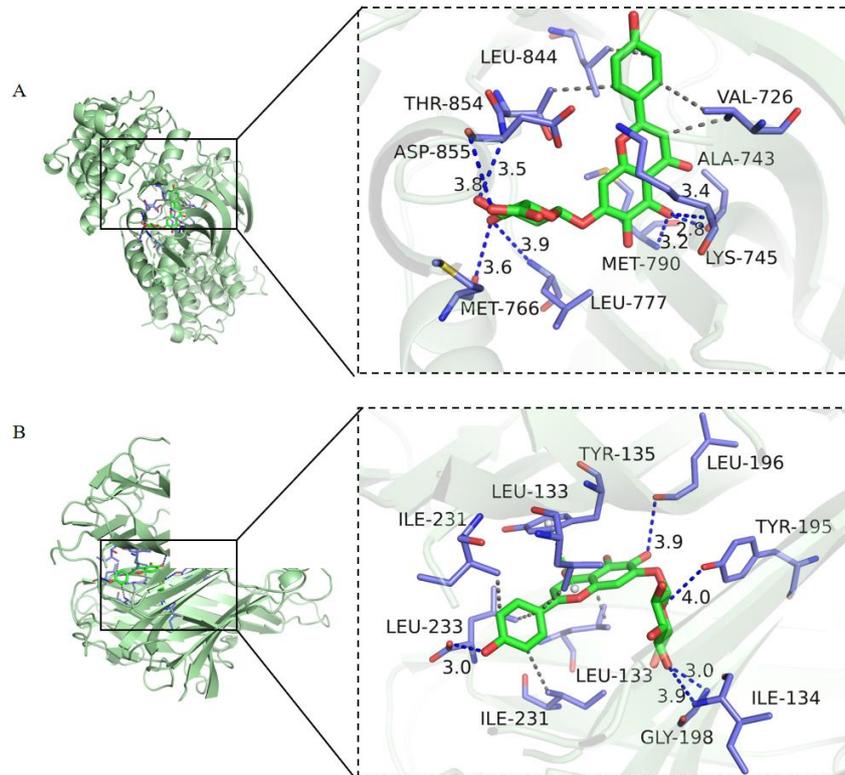


图 7 分子对接模式图

Fig.7 Molecular docking diagram

注：A. SCU-EGFR；B. SCU-TNF。

2.7 灯盏花乙素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

采用 CCK-8 检测 SCU 对乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抗增殖作用。结果如图 8 所示，与空白对照组（control, Con）相比，SCU 各组相对增殖率分别为 92.98%、88.92%、83.52%、80.2%、60.72%、42.22%。其中 40 $\mu\text{mol/L}$ SCU 处理组的细胞增殖率与 Con 相比具有显著差异 ($P < 0.05$)；80 和 160 $\mu\text{mol/L}$ SCU 处理组的细胞增殖率与 Con 相比具有极显著差异 ($P < 0.01$)。提示 SCU 处理可以剂量依赖性抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖。

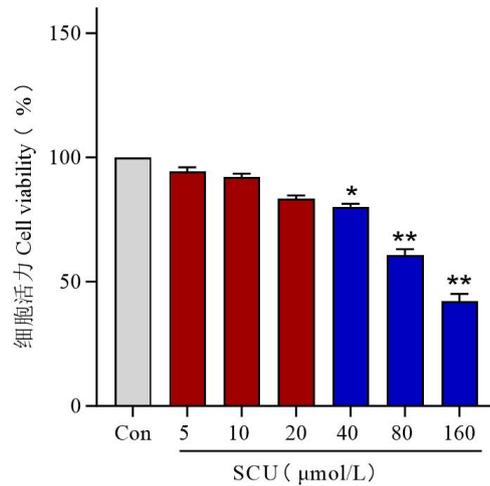


图8 不同浓度 SCU 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.8 The anti-proliferative activity of varying concentrations of SCU on MCF-7 cell line ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与 Con 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.8 灯盏花乙素对乳腺癌 MCF-7 细胞蛋白表达的影响

为进一步探究 SCU 对乳腺癌相关基因及信号通路的影响, 在结合上述 PPI 网络分析、TCGA 数据库差异基因表达分析以及分子对接结果后, 选择了 EGFR 和 TNF 进行后续通路分析。

对比不同浓度 SCU 处理对人乳腺癌 MCF-7 细胞 EGFR 表达的影响。Western blot 的结果如图 9 所示。与空白对照组 (control, Con) 相比, 80 和 160 μmol/L SCU 处理剂量依赖性的上调了 MCF-7 细胞 EGFR 的蛋白表达水平, 其中 80 μmol/L SCU 处理组与 Con 相比差异具有显著性 ($P < 0.05$), 而 160 μmol/L SCU 处理组进一步引起了 EGFR 表达水平的极显著上调 ($P < 0.01$)。提示 SCU 可能通过上调 EGFR 表达水平发挥抗肿瘤增殖作用。

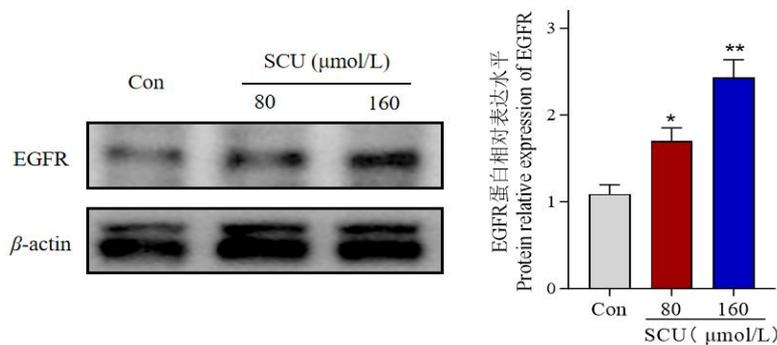


图9 SCU 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 EGFR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of SCU on EGFR protein expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结合 KEGG 分析的结果（图 4），又分析了 TCGA 数据库中 HIF-1 α mRNA 在乳腺癌患者及健康对照人群中的表达情况，结果表明与健康人群相比，HIF-1 α mRNA 的表达水平在乳腺癌病人中发生极显著上调（ $P < 0.01$ ）（图 10）。

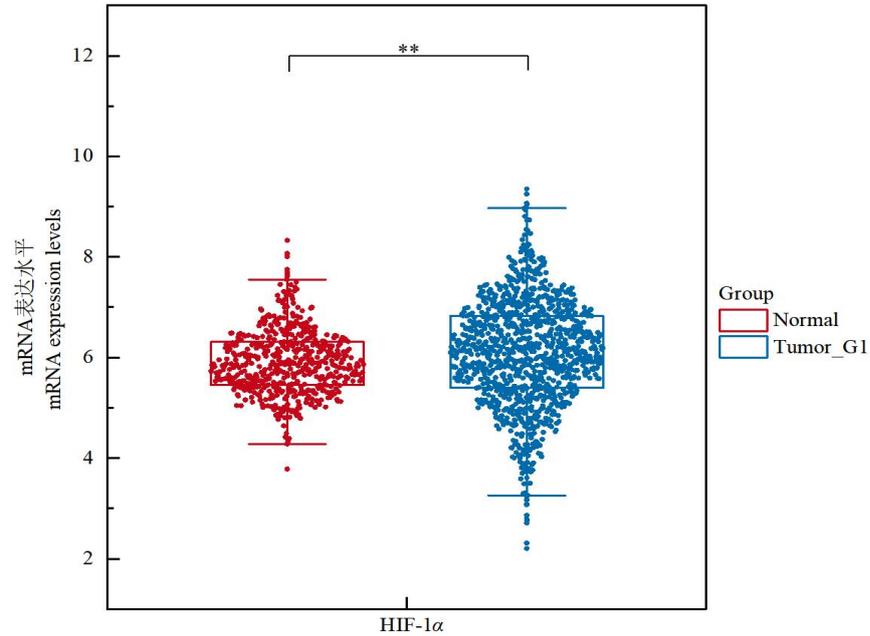


图 10 乳腺癌患者和健康人群中 HIF-1 α mRNA 的表达水平

Fig.10 mRNA expression levels of HIF-1 α in breast cancer patients and healthy population

注: $**P < 0.01$ 。Note: $**P < 0.01$ 。

最后，同样也借助于 Western blot 实验，考察不同浓度（80、160 $\mu\text{mol/L}$ ）的 SCU 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 TNF- α 及其下游 HIF-1 α 蛋白的影响，结果如图 11 所示。与空白对照组（control, Con）相比，80 $\mu\text{mol/L}$ SCU 处理使 HIF-1 α 蛋白表达显著下调（ $P < 0.05$ ），TNF- α 蛋白表达极显著下调（ $P < 0.01$ ）；160 $\mu\text{mol/L}$ SCU 处理进一步促进了目的蛋白的差异表达，使 HIF-1 α 和 TNF- α 蛋白表达降低，差异均具有极显著性（ $P < 0.01$ ）。

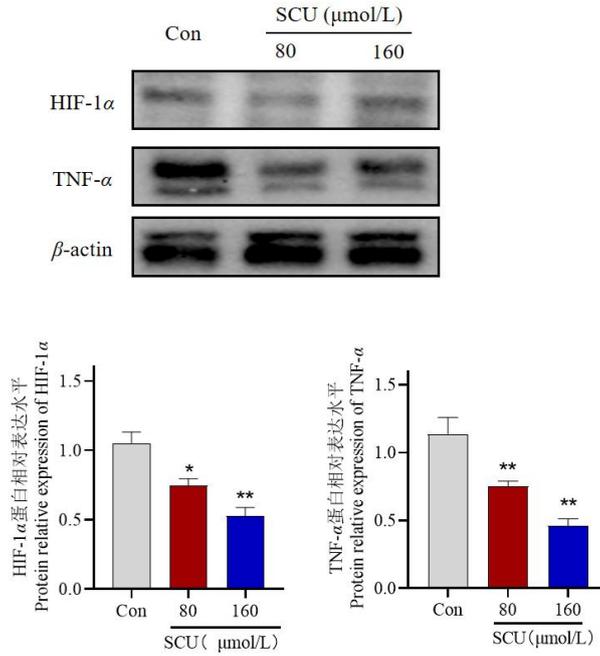


图 11 不同浓度 SCU 对人乳腺癌 MCF-7 细胞 TNF- α 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of SCU on the protein expression levels of TNF- α and HIF-1 α in human breast adenocarcinoma

MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

传统中药材的药效物质基础和作用机制研究是中药现代化研究的核心环节。但其作用靶点多向、作用途径和通路众多等特点，已成为中医药现代化进程中的瓶颈和亟待解决的难题之一。网络药理学是一种研究药物作用机制的新模式，通过构建“疾病-靶点-药物”网络，可以系统地观察药物对疾病网络的干预和影响^[14]。网络药理学的整体性、系统性与中药多靶点、整体性的特点高度相似，因而借助网络药理学手段研究中药的作用机制成为近年来中药研究的常用手段。SCU 是一种来源于中药灯盏细辛的天然黄酮类化合物，多项研究表明其可通过多个靶点、多条通路抑制包括乳腺癌在内的多种肿瘤的增殖^[6-13]。但其作用于乳腺癌的具体靶点和机制尚未完全阐明。本研究借助网络药理学、分子对接以及体外实验验证等多种方法，系统研究 SCU 抗乳腺癌的潜在靶点和作用机制，以期为开发新的乳腺癌治疗药物以及中药的现代化研究提供新的思路。

研究通过筛选药物靶点和疾病靶点数据库，挖掘出 90 个交集靶点作为 SCU 干预乳腺癌的潜在治疗靶点，提示 SCU 干预乳腺癌具有多靶点的特点。进一步 GO 功能富集和 KEGG 通路分析的结果进一步证实 SCU 多靶点、多通路的作用方式构成了复杂的网络系统。其抗乳腺癌的作用涵盖了管径调节、维持血管直径、含叶酸的化合物代谢过程等多种生物过程。

核心的信号通涉及了多条与乳腺癌密切相关的信号通路，如胞藏信号通路、C-型凝集素受体信号通路、凋亡信号通路、HIF-1 信号通路、IL-17 以及 TNF 信号通路等。TNF- α 是最重要的促炎细胞因子之一，可由基质细胞尤其是 M1 型肿瘤相关巨噬细胞和肿瘤细胞产生。TNF- α 参与乳腺癌发展的所有阶段，影响肿瘤细胞的增殖和存活、上皮间充质转化（epithelial-to-mesenchymal transition, EMT）、转移和复发等多个过程^[17]。HIF-1 α 为 HIF 家族成员之一，在多种肿瘤中过表达，继而影响肿瘤进展。HIF-1 α 的上调可促肿瘤血管生成、细胞生长、存活、侵袭、转移、糖代谢、免疫逃逸以及治疗耐药，是肿瘤治疗的一个非常有潜力的靶点^[18]。值得注意的是，EGFR 也在 HIF-1 α 信号通路上富集。EGFR 属于表皮生长因子受体家族成员之一，在多种肿瘤的发生发展中也起着非常重要的作用^[19]。目前已有多个靶向 EGFR 的药物应用于临床，包括用于非小细胞肺癌和结直肠癌治疗的小分子抑制剂以及用于结直肠癌和头颈癌治疗的大分子单克隆抗体药物。但是，EGFR 在乳腺癌中的表达和作用则仍备受争议。有研究表明，EGFR 在乳腺癌，尤其是三阴性乳腺癌（TNBC）中表达上调^[20]，抑制 EGFR 可以抑制乳腺癌的增殖以及增加化疗敏感性^[21]。但也有研究证实，EGFR 在乳腺癌中表达下调^[22]，高的 EGFR 表达水平与更差的总生存期相关^[23]，激活 EGFR 信号通路则导致乳腺癌细胞发生凋亡^[24]。因此，明确 EGFR 在乳腺癌中的表达情况并阐释其作用也是我们接下来的研究重点之一。

为进一步明晰 SCU 作用于乳腺癌的关键靶点以及对这些关键靶点表达影响，研究通过 PPI 网络分析，筛选得到了度值排名前 5 的核心靶点，依次为 EGFR、TNF、CASP3、PTGS2 以及 MAPK14。进一步筛选出度值最高的两个核心靶点 EGFR 和 TNF- α 进行分子对接，结果显示 SCU 与两个靶点均具有较好的结合能力，充分提示它们可能是 SCU 干预乳腺癌的关键靶点。

在综合分析 PPI 网络、分子对接、KEGG 富集分析结果、靶点与乳腺癌以及靶点之间的关联性^[24, 25]后，研究选择了 EGFR、TNF- α 以及 HIF-1 α 三个靶点进行后续分析。研究通过 TCGA 数据库验证这三个靶点在乳腺癌患者中的表达情况。结果显示 EGFR mRNA 在乳腺癌患者中的表达较正常人群中发生了极显著下调，提示上调 EGFR 可能作为靶向乳腺癌的策略之一。为进一步确证 EGFR 在 SCU 的抗乳腺癌作用中扮演的角色，研究又通过 Western blot 实验考察 SCU 对 MCF-7 细胞 EGFR 表达的影响，结果显示，SCU 可上调 EGFR 蛋白的表达水平，进一步证实 EGFR 的上调参与了 SCU 抗乳腺癌作用的发挥。不同的是，TNF- α 和 HIF-1 α 的 mRNA 则在乳腺癌患者中极显著上调，表明我们通过网络药理学筛选出的 TNF- α /HIF-1 α 信号通路与乳腺癌发生、发展具有高度的关联性。最后研究又考察了不同浓度

的 SCU 对 TNF- α /HIF-1 α 蛋白表达的影响。结果显示, SCU 处理后, MCF-7 细胞中 TNF- α 及 HIF-1 α 蛋白的表达显著下调, 提示靶向 TNF- α /HIF-1 α 通路也参与 SCU 的抗肿瘤作用。

综上, 本研究基于网络药理学、分子对接以及实验验证, 对 SCU 治疗乳腺癌的机制进行了初步探讨, 结果显示 SCU 可通过多靶点、多通路来发挥抗乳腺癌作用, 其中 EGFR 以及 TNF- α /HIF-1 α 通路可能在其中发挥了重要作用。本研究为后续 SCU 及其他多靶点、多通路药物的研究提供理论依据和参考价值。然而, 本研究在机制探索方面尚缺乏相关的动物实验论证, 课题组后续将进一步构建小鼠乳腺癌模型, 并针对上述分析获得的关键的 EGFR 信号通路以及 TNF- α /HIF-1 α 信号通路进行深入的机制探索和验证。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world-wide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-249.
- 2 Riggio AI, Varley KE, Welm AL. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124: 13-26.
- 3 Wang Y, Shen SY, Liu L, et al. Jolkinolide B inhibits proliferation or migration and promotes apoptosis of MCF-7 or BT-474 breast cancer cells by downregulating the PI3K-Akt pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114581.
- 4 Ye F, Dewanjee S, Li Y, et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22: 105.
- 5 Fan H, Lin P, Kang Q, et al. Metabolism and pharmacological mechanisms of active ingredients in *Erigeron breviscapus*[J]. *Curr Drug Metab*, 2021, 22: 24-39.
- 6 Yang N, Zhao Y, Wang Z, et al. Scutellarin suppresses growth and causes apoptosis of human colorectal cancer cells by regulating the p53 pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15: 929-935.
- 7 Li F, Wang S, Niu M. Scutellarin inhibits the growth and EMT of gastric cancer cells through regulating PTEN/PI3K pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44: 780-788.
- 8 Tian CC, Zhang Q, Bao XB, et al. Effect of scutellarin on melanoma B16 *in vitro* and *in vivo* and its mechanism[J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2023, 44: 406-412.
- 9 Mei XY, Zhang JN, Jia WY, et al. Scutellarin suppresses triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting TNF α -induced vascular endothelial barrier breakdown[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43: 2666-2677.
- 10 Deng W, Han W, Fan T, et al. Scutellarin inhibits human renal cancer cell proliferation and migration via upregulation of PTEN[J]. *Biomed. Pharmacother*, 2018, 107: 1505-1513.

- 11 Zhang Q,Bao XB,Tian CC.Effect of scutellarin on promoting the sensitivity of breast cancer 4T1 cells to cisplatin *in vitro* and *in vivo*[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:331-340.
- 12 He GH,Xing DJ,Jin D,et al.Scutellarin improves the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells to iodine-125 seeds via downregulating the AKT/mTOR pathway[J].Thorac Cancer,2021,12:2352-2359.
- 13 Sun W,Ge Y,Cui J,et al.Scutellarin resensitizes oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells to oxaliplatin treatment through inhibition of PKM2[J].Mol Ther Oncolytics,2021,21:87-97.
- 14 Liu XL,Zhu PY,Ma JR,et al.Antioxidant activity and mechanism of *Centranthera grandiflora* Benth roots based on network pharmacology and *in vitro* experiments[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2024,36:155-166.
- 15 Liu XR,Niu MZ,Gao Y,et al.Mechanism of dihydromyricetin in improving renal fibrosis in db/db mice based on network pharmacology and experimental validations[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35(11):1964-1976.
- 16 Dong YD,Niu YH,Zhang Y,et al.Exploring the mechanism of action of resveratrol in the treatment of non-small cell lung cancer based on network pharmacology and experimental validation[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:28-36.
- 17 Cruceriu D,Baldasici O,Balacescu O,et al.The dual role of tumor necrosis factor-alpha(TNF- α) in breast cancer:molecular insights and therapeutic approaches[J].Cell Oncol,2020,43:1-8.
- 18 Zhi S,Chen C,Huang H,et al.Hypoxia-inducible factor in breast cancer:role and target for breast cancer treatment[J].Front Immunol,2024,15:1370800.
- 19 Arteaga CL,Engelman JA.ERBB receptors:from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics[J].Cancer cell.2014,25:282-303.
- 20 Li X,Zhao L,Chen C,et al.Can EGFR be a therapeutic target in breast cancer[J].BBA-Rev Cancer,2022,1877:188789.
- 21 Maennling AE,Tur MK,Niebert M,et al.Molecular targeting therapy against EGFR family in breast cancer:progress and future potentials[J].Cancers,2019,11:1826.
- 22 Flångeng MH,Knappskog S,Haynes BP,et al.Inverse regulation of EGFR/HER1 and HER2-4 in normal and malignant human breast tissue[J].PloS one,2013,8:e74618.
- 23 Zia T,Bangfan L,Nadeem A,et al.Comprehensive multi-level expression profiling of key biomarkers in breast cancer patients[J].Am J Transl Res,2023,15:6058.
- 24 Jackson NM,Ceresa BP.Protein kinase G facilitates EGFR-mediated cell death in MDA-MB-468 cells[J].Exp

Cell Res,2016,346:224-232.

- 25 Xia LM,Mo P,Huang WJ,et al.The TNF- α /ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxMI expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis[J].Carcinogenesis,2012,33:2250-2259.

收稿日期: 2024-05-21 接受日期:

基金项目: 江苏省盐城市卫生健康委员会 2023 年度医学科研立项项目 (YK2023032); 江苏高校哲学社会科学研究一般项目资助 (2022SJYB2075); 江苏医药职业学院自然科学基金研究重点项目 (20214107)

*通信作者 E-mail: Baoxiaobo0603@163.com