

基于数据库挖掘和分子生物学探讨白藜芦醇治疗肺腺癌的作用机制

耿其顺, 李依静, 沈志博, 郑园园, 李砺锋, 薛文华, 赵杰*

(郑州大学第一附属医院, 郑州 450052)

[摘要] 目的:结合生物信息学与分子生物学探讨白藜芦醇治疗肺腺癌的作用机制。方法:从DrugBank获取白藜芦醇作用靶点信息,运用STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。在TCGA数据库中分析靶标基因在肿瘤及正常组织中表达量,预示其在肿瘤发生发展中的影响。然后,运用随机森林和单因素COX回归的分析方法对靶标基因进行筛选。结合生物信息学结果,使用分子生物学探究白藜芦醇治疗肺腺癌的作用机制。结果:基于白藜芦醇作用靶点的PPI网络,筛选出10个Hub基因,其中溶质载体家族2成员1(SLC2A1),花生四烯酸5-脂氧合酶(ALOX5),过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)和花生四烯酸15-脂氧合酶(ALOX15)在肿瘤和正常组织中表达量具有显著差异。然后,随机森林和单因素COX回归分析结果表明SLC2A1对肺腺癌的生存和预后意义重大。KM-plotter生存分析结果显示SLC2A1表达量与肺癌患者的总体生存率(OS),初次进展(FP),进展后生存率(PPS)均紧密相关。分子生物学实验也进一步证明白藜芦醇能够通过降低SLC2A1表达,抑制肺腺癌细胞的增殖和迁移。免疫组化评分显示SLC2A1在肿瘤和正常组织中蛋白表达量具有显著差异。结论:白藜芦醇通过降低SLC2A1表达,抑制肺腺癌细胞的增殖和迁移,在肺腺癌的临床治疗中具有深远意义。

[关键词] 白藜芦醇; 肺腺癌; 生物信息学; 作用机制; 分子生物学

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0199-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210918

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210526.1322.001.html>

[网络出版日期] 2021-05-26 17:54

Mechanism of Resveratrol in Treatment of Lung Adenocarcinoma: An Exploration Based on Database Mining and Molecular Biology

GENG Qi-shun, LI Yi-jing, SHEN Zhi-bo, ZHENG Yuan-yuan, LI Li-feng, XUE Wen-hua, ZHAO Jie*

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of resveratrol (RSV) in the treatment of lung adenocarcinoma (LUAD) based on bioinformatics and molecular biology. **Method:** The targets of RSV were retrieved from DrugBank and then imported into STRING for constructing a protein-protein interaction (PPI) network. TCGA database was utilized to analyze the expression of target genes in tumor and normal tissues, followed by the prediction of their impacts on tumor occurrence and development and the screening of target genes using random forest and univariate Cox regression models. With the results of bioinformatics taken into consideration, the mechanism of RSV in inhibiting LUAD was further explored by molecular biology. **Result:** Ten Hub genes were screened out from the PPI network of RSV targets. Among them, solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1), arachidonate 5-lipoxygenase (ALOX5), peroxisome proliferative activated receptor gamma (PPARG), and arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) differed significantly in their expression in

[收稿日期] 20210222(002)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC0909900)

[第一作者] 耿其顺,在读硕士,从事临床药学相关研究,Tel:0371-66862570,E-mail:gqs630862@163.com

[通信作者] *赵杰,博士,二级教授,从事临床药学相关研究,Tel:0371-66862570,E-mail:jiezhaoz2016@163.com

tumor and normal tissues. As revealed by random forest and univariate COX regression analysis, SLC2A1 was of great significance to the survival and prognosis of patients with LUAD. The survival analysis through Kaplan-Meier (KM) plotter indicated that the SLC2A1 expression was closely related to the overall survival (OS), first progression (FP), and post-progression survival (PPS) of LUAD patients. The molecular biological experiments further proved that RSV inhibited the proliferation and migration of LUAD cells by reducing the expression of SLC2A1. As verified by immunohistochemical scoring, SLC2A1 protein expression in tumor tissue was significantly different from that in normal tissue. **Conclusion:** RSV inhibits the proliferation and migration of LUAD cells by reducing the expression of SLC2A1, which has far-reaching significance in the clinical treatment of LUAD.

[Keywords] resveratrol (RSV); lung adenocarcinoma (LUAD); bioinformatics; mechanism of action; molecular biology

肺癌(LC)是全球十大恶性肿瘤之一,在全球癌症的发病率和死亡率中排名第一,是一个重大的全球健康问题^[1]。组织学上,肺癌被广泛地分为两类,小细胞肺癌(SCLC),占有肺癌的15%;非小细胞肺癌(NSCLC),分为肺腺癌(LUAD),鳞状细胞癌(SCC)和大细胞癌(LCC)。在肺癌的这些分型中,肺腺癌(LUAD)是最常见的分型之一^[2]。目前治疗肺腺癌的方法很多,但是肺腺癌是一种以晚期诊断为特征的疾病,在治疗选择方面并没有明显进展^[3]。因此寻找新的药物和治疗靶点对于肺腺癌的治疗具有重要意义。

白藜芦醇(RSV,3'5'4'-三羟基二苯乙烯)是一种由植物合成的非黄酮类多酚化合物,常见于花生、葡萄及其酒类中,但主要来源于常用药材蒲公英^[4]。RSV作为一种天然抗氧化剂,主要通过清除自由基、抑制自由基的生成和脂质过氧化、调节抗氧化相关酶的活性及基因的表达等机制发挥抗氧化作用,在预防肥胖及相关疾病、心血管疾病和癌症方面发挥着重要作用^[5]。近年来,各种研究揭示了RSV在肿瘤治疗中的无限潜力,其治疗乳腺癌和结肠癌的作用机制已有明确研究^[6];RSV通过调节zeste2多梳抑制复合物1/2亚基增强子(ERK1/2)信号传导抑制zeste2多梳抑制复合物2亚基增强子(EZH2),从而抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖^[7],同时可以靶向丝氨酸和苏氨酸激酶1/信号转导子和转录激活子3(Akt/STAT3)信号通路抑制结肠癌生长^[8]。此外,RSV与肺癌治疗显著相关,其可能的机制是多方面的,主要体现在抑制肿瘤细胞增殖和分裂、促进肿瘤细胞凋亡、停滞细胞周期进程和阻碍癌症转移^[9-10]。尽管以往研究对RSV治疗肺癌的作用机制已有部分阐述,但是为了实现肺腺癌精准医疗,相关作用机制仍有待深入研究。

本研究基于DrugBank中RSV的靶点信息,联合生物信息学与分子生物学解析RSV治疗肺腺癌的主要作用机制。通过对RSV作用靶点的挖掘筛选,构建RSV-靶点-肺腺癌作用网络以期从分子层面验证RSV对肺腺癌作用效果及作用机制。结果表明RSV可以通过降低溶质载体家族2成员1(SLC2A1)表达,从而抑制肺腺癌细胞系的增殖,侵袭等生物学行为。本研究将生物信息学与分子生物学相结合,发现RSV可以通过作用于SLC2A1靶点发挥治疗肺腺癌作用,为后期的基础研究和临床研究奠定基础。

1 材料

RSV(MCE公司,批号HY-16561,纯度≥98%)。二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D2650)。RPMI 1640培养基,胎牛血清,青霉素-链霉素溶液(100×),0.25%胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA),磷酸盐缓冲液(PBS,10×)(美国Gibco公司,批号分别为2110284,10270106,10378-016,25200-056,70011-044)。细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号40203ES60)。trizol RNA分离试剂,Lipofectamine™3000转染试剂(赛默飞世尔科技公司,批号A33251,L3000001)。PrimeScript RT试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司,批号RR036Q]。SYBR Green实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒(艾科瑞生物科技有限公司,批号AG11701)。抗SLC2A1抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号ab14683]

Heracell 150i型CO₂细胞培养箱,Varioskan LUX型多功能酶标仪(美国Thermo公司);5810R型台式离心机(德国Eppendorf公司);Microfuge 20R型冷冻离心机(美国Beckman公司);FQD-48A(A4)

型 Real-time PCR 检测系统(杭州博日科技有限公司)

2 方法

2.1 数据来源与细胞培养 从 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库获取 Genomic Data Commons (GDC) TCGA 肺腺癌数据集,包括 59 例正常样本和 526 例肺腺癌患者的表达谱信息和临床信息,这些数据从加州大学圣克鲁兹分校的癌症基因组学浏览器网站下载 (<https://xena.ucsc.edu/>)^[11]。从 DrugBank 数据库 (www.drugbank.ca)^[12] 获取 RSV 作用靶点信息。

人肺腺癌细胞系 A549 和 HCC827 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。所有细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中,培养于添加含 10% 胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基中。

2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与 Hub 基因筛选 使用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>)^[13] 获得 RSV 作用靶点的相互作用网络,根据节点度 (degree) 值设定网络中节点颜色深浅 (degree 值越大,节点颜色越深)。然后,使用 Cytoscape 3.7.2 的 cytoHubba 插件,以 MCC 为特定方法选择 Top10 的节点作为 Hub 基因。

2.3 Hub 基因的富集分析与相关性分析 将筛选出的作用靶点导入 DAVID 数据库^[14] 进行富集分析,包括生物过程 (BP), 分子功能 (MF), 细胞成分 (CC), 以 $P < 0.05$ 作为筛选标准,获得 Hub 节点的前五条富集通路。然后,基于 TCGA 的肺腺癌数据集,探讨 Hub 基因在肿瘤及正常组织中的表达情况,并对其在肿瘤中的相关性进行分析

2.4 关键基因的选择及其生存分析 采用随机森林算法以节点纯度为指标,排列并展示所筛选基因位点重要性,选取前 5 位基因;同时联合单因素 COX 回归分析的方法筛选关键基因。运用 KM plotter 数据库 (<http://kmplot.com/>),从总体生存率 (OS), 初次进展 (FP), 进展后生存率 (PPS) 3 个方面分析关键基因与生存和预后的关系。然后,基于 TCGA 数据库,进一步分析 SLC2A1 在正常及肿瘤组织中表达情况,及其与肺腺癌患者生存的关系。

2.5 免疫组化 为了检测 SLC2A1 在肿瘤及邻近的非肿瘤组织中的表达情况,从肺腺癌阵列(上海芯超生物科技有限公司,批号 HLugA030PG02) 获得肺腺癌样本。肿瘤组织芯片脱蜡再水化,然后进行抗原修复,应用 PBS 洗 2 遍,加正常山羊血清封

闭,室温 20 min 后甩去液体。加入 SLC2A1 抗体 (0.5 g·L⁻¹, 1:100) 后在 4 °C 过夜。洗涤 3 次后,组织芯片与链霉亲和素辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育 1 h。玻片用 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 染色,苏木精对核染色,脱水、封片后显微镜进行观察。标记物染色强度由两位研究者独立评分:0 分,阴性;1 分,弱;2 分,温和;3 分,强劲。免疫评分时,SLC2A1 中、强染色组为高表达组,阴性、弱表达组为低表达组。

2.6 siRNA 沉默 SLC2A1 siRNA 靶向位置为人 SLC2A1 的 5'-GGAATTCAATGCTGATGAT-3' 和非特异性干扰 siRNA 序列 (siNC, 上海吉玛基因),使用 Lipofectamine 3000 瞬时转染到 A549 和 HCC827 细胞中,按照说明书进行操作。转染 48 h 后进行测定。

2.7 Real-time PCR 加入 trizol 1 mL 从细胞中分离 RNA,将其转移到无酶的 EP 管中,并在 -80 °C 下保存。利用 PrimerBank 获得人待测基因 SLC2A1 及内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) mRNA 的引物序列。使用 PrimeScript RT 试剂盒从总 RNA 合成互补 DNA (cDNA),并使用 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒进行 PCR。每份标本每个基因检测均作 3 个重复检测管。反应板置于实时荧光定量 PCR 仪运行以下热循环参数为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,并使用 2^{-ΔΔC_t} 方法分析数据。

2.8 细胞增殖和迁移能力测定 将细胞接种在 96 孔板中 (5×10³ 细胞/孔),培养过夜后,分别使用 50 μmol·L⁻¹ RSV 和 siSLC2A1 分别处理细胞。于 24, 48, 72 h, 将 CCK-8 溶液添加到每个孔中,并在 37 °C 下孵育 2 h 后测定吸光度 A。为了检测细胞迁移能力,将细胞接种到 6 孔板中 (1×10⁵ 个/孔)。使用 50 μmol·L⁻¹ RSV 和 siSLC2A1 分别处理细胞后,用 10 μL 移液器吸头刮擦细胞层,以形成均匀的缺口。然后,用 PBS 洗涤细胞并在不含胎牛血清 (FBS) 的培养基中孵育 48 h。在倒置显微镜下,拍摄细胞之间的缺口边缘距离。所有实验均重复 3 次。

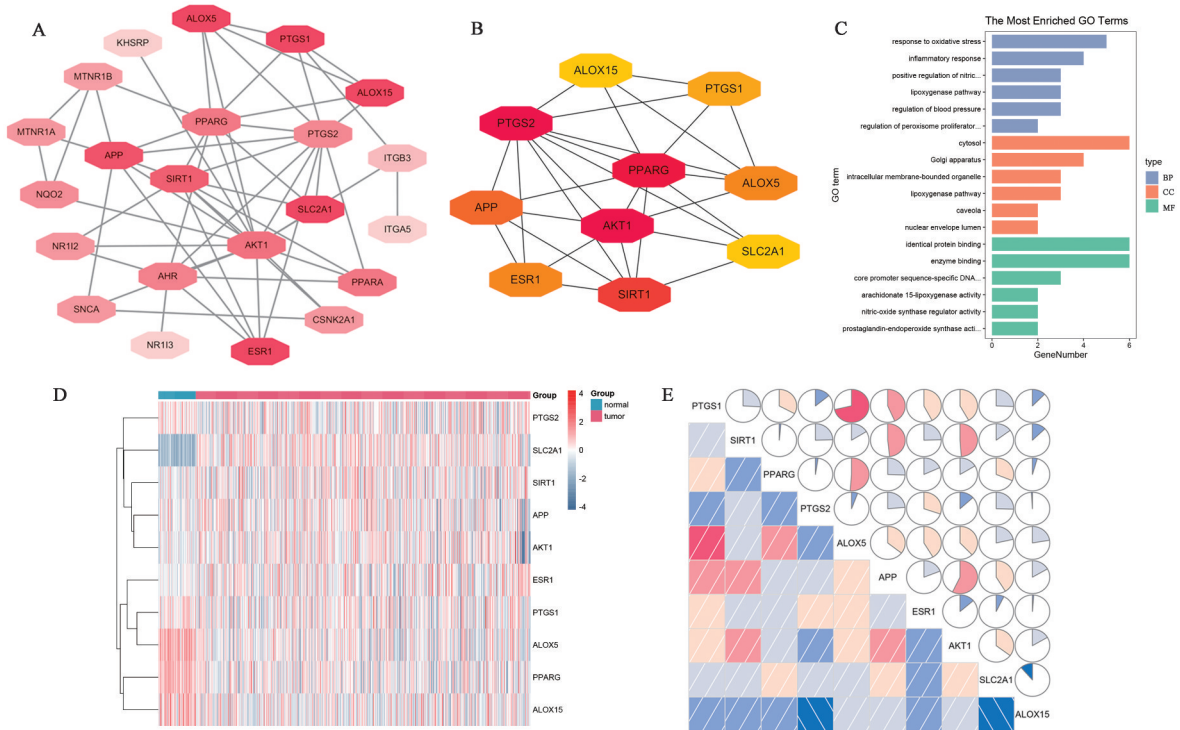
2.9 统计分析 所有统计分析均使用 GraphPad Prism 5.0 和 R 3.6.1 软件进行。数据表示方式为 $\bar{x} \pm s$ 。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 RSV 有效作用靶点选取及 PPI 网络构建 DrugBank 数据库筛选出 RSV 活性靶点 26 个,使用 STRING 数据库绘制靶标基因的 PPI 网络图,

见图1。PPI网络中节点数26,边数56,平均节点度4.31,平均局部聚类系数0.536,期望边数21,PPI富集 $P < 1.29 \times 10^{-10}$ 。这些数据表明PPI网络图中节点之间关系密切,可信度高。使用CytoHubba插件对PPI网络图进行分析,获得Top10节点,即Hub节点,包括花生四烯酸-15-脂加氧酶(ALOX15),ALOX5,环加氧酶1(PTGS1),PTGS2,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG),AKT1,淀粉样前体蛋白

(APP),雌激素受体1(ESR1),SIRT1和SLC2A1,见图1(B)和表1。使用DAVID数据库对Hub节点进行GO富集分析后($P < 0.05$),共获得70个富集结果。其中包括生物过程45项,分子功能14项,细胞成分11项,排名前十的GO富集结果见图1(C)。富集结果表明,Hub节点参与对氧化应激反应,炎症反应,脂氧化酶途径等生物学过程,均与肿瘤的发生发展密切相关。



A. RSV靶标PPI网络;B. Hub基因PPI网络;C. Hub基因GO富集分析结果;D. Hub基因表达量分析;E. Hub基因相关性
图1 RSV靶标蛋白互作网络构建与基因表达分析

Fig. 1 PPI network construction of resveratrol target and the analysis of gene expression

3.2 Hub基因在肿瘤中的表达及相关性分析 在TCGA肺腺癌数据集中检索筛选出的10个Hub基因在正常及肿瘤组织中表达量,数据结果显示SLC2A1,ALOX15,ALOX5和PPARG在正常组织和肺腺癌组织中明显差异表达,表明其对于肿瘤的发生发展可能存在影响,可以作为肿瘤诊断标志物,见图1(D)。同时,通过比较Hub基因在肺腺癌中表达相关性,发现ALOX15,PTGS1,PPARG和AKT1与多个基因存在紧密相关性,说明RSV可能通过作用于多个靶点发挥治疗肺腺癌的整体作用。

3.3 关键基因SLC2A1的筛选 采用随机森林算法对Hub基因进行分析整理,以节点纯度为标准,对各基因重要性进行排序,获得具有显著功能的前5个靶点,见图2(A);并采用单因素COX回归分析

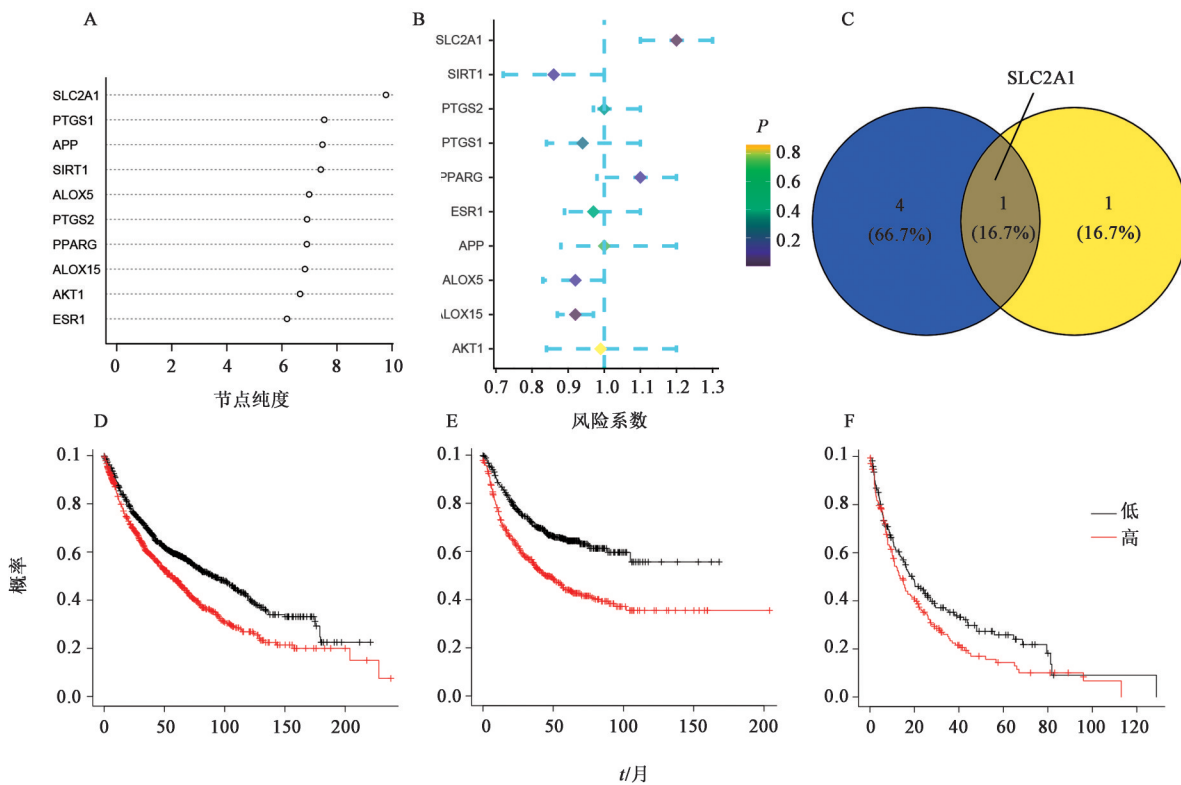
的方法计算各基因风险比率(Hazard ratios)展示其在肿瘤中的风险度,结果显示SLC2A1,ALOX15对肺腺癌患者的预后具有显著影响,见图2(B)。将2种分析结果综合考虑,发现SLC2A1在肺腺癌发生和发展中意义重大,见图2(C)。

3.4 SLC2A1在LUAD中表达情况和生存分析 从KM Plotter数据库筛选肺癌患者临床生存资料,匹配肿瘤组织SLC2A1基因表达量并以表达量的中位数为分界点,将临床样本分为高表达和低表达两组采用Kaplan-Meier法分析SLC2A1表达水平与患者生存预后关系,结果显示SLC2A1基因表达量影响患者总体生存率,初次进展生存率及进展后预后生存,见图2(D,F);相比低表达者,SLC2A1高表达者生存率较低,说明SLC2A1高表达是LUAD发生与进展的危险因素。然后,在TCGA数据库中检索

表1 RSV治疗肺癌的Hub基因相关信息

Table 1 Information of Hub genes of RSV for lung adenocarcinoma

基因	基因全称	功能通路	degree
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	arachidonic acid metabolism, regulation of lipolysis in adipocytes, platelet activation	5
SIRT1	sirtuin type 1	ampk signaling pathway, foxo signaling pathway, glucagon signaling pathway	9
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	ampk signaling pathway, longevity regulating pathway, osteoclast differentiation	10
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	arachidonic acid metabolism, c-type lectin receptor signaling pathway, human cytomegalovirus infection	11
ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	arachidonic acid metabolism, fc epsilon ri signaling pathway, ovarian steroidogenesis	5
APP	amyloid beta precursor protein	alzheimer disease, serotonergic synapse	8
ESR1	Estrogen Receptor 1	endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption, endocrine resistance, estrogen signaling pathway	5
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	camp signaling pathway, ampk signaling pathway, egfr tyrosine kinase inhibitor resistance	15
SLC2A1	solute carrier family 2 member 1	adipocytokine signaling pathway, glucagon signaling pathway, hif-1 signaling pathway	4
ALOX15	arachidonate 15-lipoxygenase	arachidonic acid metabolism, ferroptosis; linoleic acid metabolism	4



A. Hub基因重要性排序; B. Hub基因单因素COX回归分析; C. 关键基因韦恩图; D. SLC2A1表达与肺癌患者总体生存率; E. 初次进展生存率; F. 进展后预后生存率

图2 RSV治疗肺癌的关键基因的筛选

Fig. 2 Screen of key genes of RSV for lung adenocarcinoma

LUAD与SLC2A1表达相关信息。依据59例正常组织,526例肺癌组织样本分析得出,SLC2A1在肿瘤和正常组织中表达存在明显差异,在肿瘤组织中表达量显著增加($P < 0.05$)。ROC曲线显示

SLC2A1可以作为肺癌患者的诊断标记物[曲线下面积(AUC)=0.958];生存分析表明SLC2A1表达量与肺癌患者生存预后显著相关($P < 5 \times 10^{-4}$)。进一步分析SLC2A1表达与临床病理参数的关系,统

计分析显示 SLC2A1 表达与肿瘤 T, N 分级, 患者生存状态密切相关 ($P < 0.05$), 见表 2。同时, 肺腺癌组织芯片免疫组化结果显示 SLC2A1 表达量在癌旁组

与肿瘤组织间存在明显差异 ($P < 0.01$), 进一步证实了 SLC2A1 对肺腺癌发生和进展的重要性, 见图 3(D)。

表 2 肺腺癌 SLC2A1 表达与临床病理参数的关系

Table 2 Relationship between SLC2A1 expression and clinicopathological parameters in lung adenocarcinoma

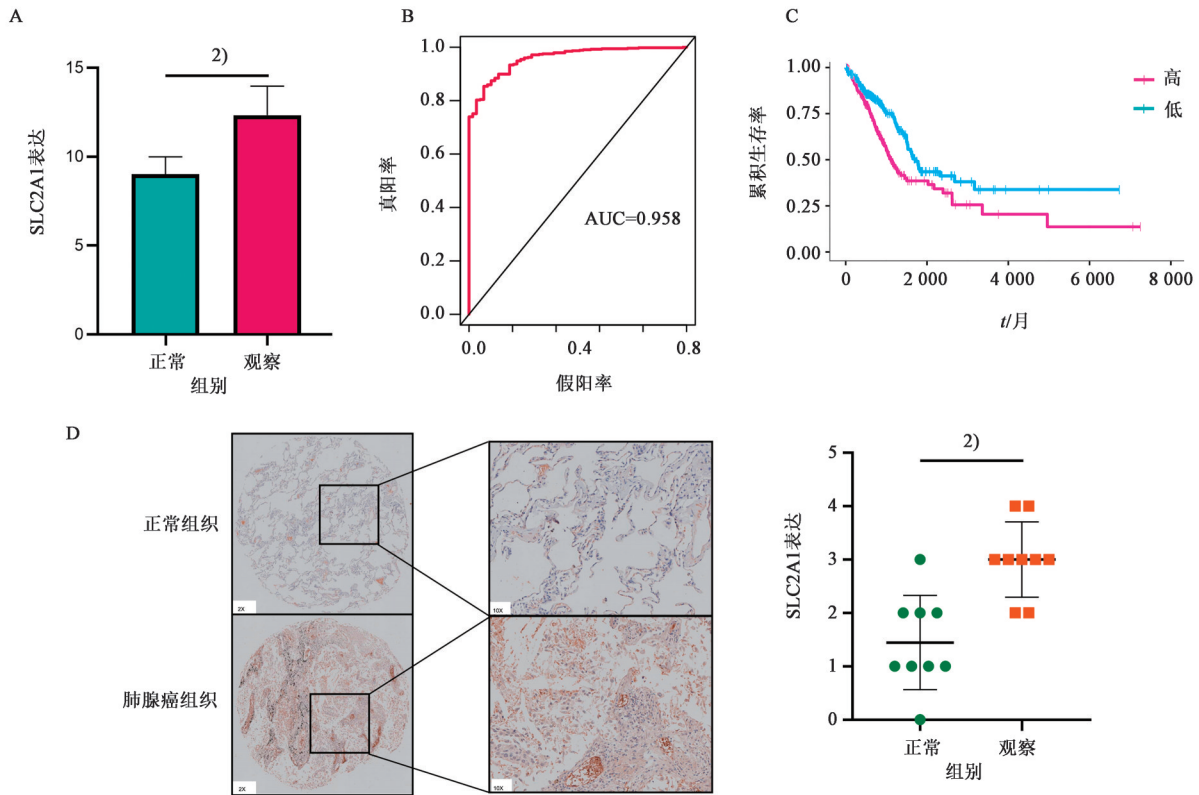
特征	SLC2A1		合计	P
	高	低		
样本数	246	245	491	
年龄(岁)	≥60	170	186	0.091
	<60	76	59	
性别	男	120	145	0.021
	女	126	100	
临床分期	I	121	149	0.056
	II	70	48	
	III	41	37	
	IV	14	11	
pT分期	T1	68	99	0.014
	T2	142	117	
	T3	28	17	
	T4	7	10	
	TX	1	2	
pN分期	N0	147	175	0.003
	N1	59	31	
	N2	35	32	
	N3	2	0	
	NX	3	7	
pM分期	M0	161	165	0.697
	M1	14	10	
	MX	71	70	
状态	生存	141	170	0.006
	死亡	105	75	

3.5 RSV, siSLC2A1 对肺腺癌细胞系生物学行为影响 采用 Real-time PCR 方法分别检测空白组 1 (NC1, 添加溶剂 DMSO), RSV50 组(在培养基中添加终浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RSV); 空白组 2 (NC2, 转染 siNC), siSLC2A1 组 (siSLC2A1, 转染 siSLC2A1) 中 SLC2A1 的 mRNA 相对表达量。结果显示, 与空白组比较, RSV50 组和 siSLC2A1 组中 SLC2A1 mRNA 表达量均显著降低, 提示 RSV 对 SLC2A1 mRNA 表达的负向调控作用, 见图 4(A)。采用划痕修复实验研究 RSV50 组与 siSLC2A1 对细胞迁移的影响, 与空白组相比 RSV50 组与 siSLC2A1 组划痕宽度没有明显变化, 迁移率显著降低, 说明 RSV 与 siSLC2A1

能够抑制肺腺癌细胞系 A549 和 HCC827 的细胞迁移, 见图 4(B)。通过平板克隆和 CCK-8 细胞增殖实验进一步检测细胞的生长情况。实验数据显示, RSV50 组, siSLC2A1 组平板克隆形成率和细胞增殖能力明显降低, 提示 RSV 和下调 SLC2A1 表达具有抑制肿瘤生长的作用, 见图 4(C, D)。综上所述, RSV 与 SLC2A1 在影响肿瘤发生发展方面具有显著作用, SLC2A1 与肿瘤存在正性相关, 而作为 RSV 重要活性靶点, 提示了 RSV 可能通过降低 SLC2A1 表达发挥治疗肺腺癌的作用机制。

4 讨论

RSV 是天然存在于多种植物的非黄酮类多酚



A. SLC2A1基因在正常组织和肺腺癌组织中的表达差异;B. SLC2A1诊断肺腺癌患者的ROC曲线分析;C. SLC2A1表达与肺腺癌患者预后;D. 肺腺癌组织与癌旁组织中SLC2A1免疫组化表达;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.05$

图3 SLC2A1的表达及生存相关性分析

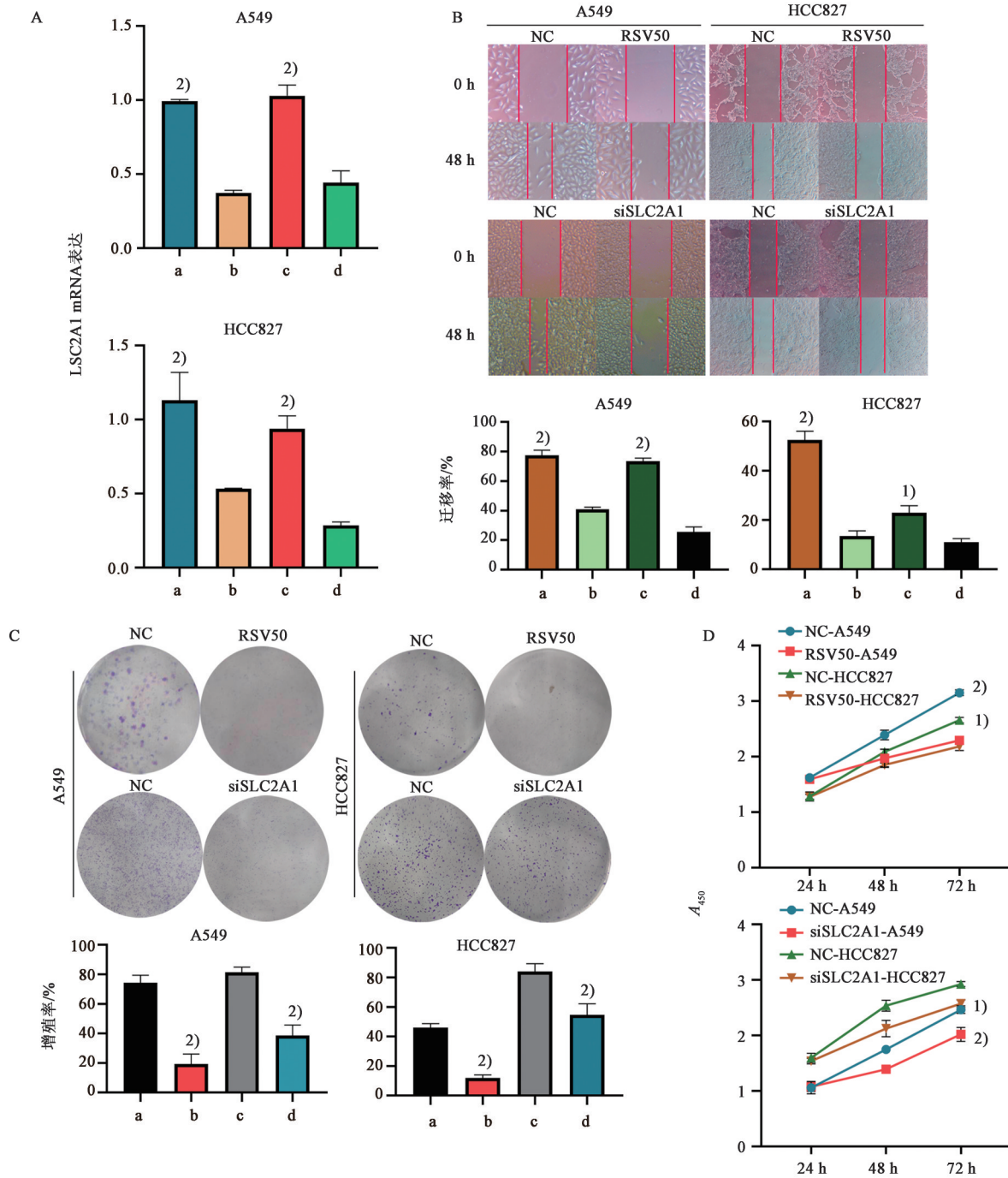
Fig. 3 SLC2A1 expression and survival correlation analysis

化合物,在抗炎症、抗肿瘤方面存在巨大潜力^[15]。RSV 现已在美国、加拿大以保健品形式出现在市场中,在中国 RSV 也被用于制作调血脂,抗肿瘤等医疗药品^[16]。作为天然多酚化合物,RSV 在抗氧化和抗自由基方面具有明显生物活性,其抗炎作用机制已有明确研究^[17]。RSV 更为突出的特点在于抗肿瘤能力,可通过多种机制对肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、白血病等多种肿瘤产生不同程度的拮抗作用^[18]。研究表明,RSV 通过调节 RhoA/Lats1/YAP 信号轴抑制乳腺癌肿瘤细胞的侵袭;还可以通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制上皮-间质转化(EMT)逆转胃癌中阿霉素耐药性^[19]。既往研究显示 RSV 在肿瘤的起始,增殖,发生阶段皆可进行调控和抑制,可能通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路诱导癌细胞的凋亡^[20]。

肺腺癌是一种高度恶性且异质性的疾病,由于筛查工具和症状隐瞒的缺陷,肺腺癌的诊断大多处于晚期。因此,迫切需要鉴定新的生物标记物以微调患者预后的预测并调整治疗策略。SLC2A1 是跨膜葡萄糖转运蛋白家族的成员之一,分布于各种组织中,在许多肿瘤中过表达^[21],并且与患者预后紧

密相关。SLC2A1 被广泛地认为是主要的葡萄糖转运蛋白,并且已被确定为几种癌症类型中可能的预后因素^[22]。研究表明,SLC2A1 在胃癌患者中明显上调,并发现 SLC2A1 与肿瘤侵袭深度和临床分期显著相关。同时,SLC2A1 在胃癌细胞中的过表达促进了体外细胞的增殖和转移,表明 SLC2A1 是一个有潜力的胃癌治疗靶点^[23]。此外,一项基于免疫组织化学分析和生物信息学的研究表明 SLC2A1 表达升高与手术切除的肺腺癌患者的不良预后相关^[24]。

在本研究中,共收集到 RSV 相关作用靶点 26 个,其中多个靶点与肺腺癌具有紧密联系,提示 RSV 治疗肺腺癌具有多靶标的特点,其 PPI 网络图也呈现出 RSV 各靶标之间关系密切,提示其作用机制复杂多样,非单一蛋白靶标作用而成。Hub 基因富集分析结果包括炎症反应,脂氧化酶途径,氧化应激反应等,进一步表明 RSV 抗炎、抗肿瘤等作用。同时,通过随机森林和单因素 COX 回归的分析方法,发现 SLC2A1 与肺腺癌患者生存预后紧密相关。免疫组化结果表明相较于癌旁组织,肺腺癌组织中 SLC2A1 表达量明显升高。此外,分子生物学实验进一步证明 RSV 可以通过降低 SLC2A1 表达,抑制



A. 不同组别中SLC2A1 mRNA的相对表达量;B. 划痕实验检测RSV和siSLC2A1对肺腺癌细胞迁移能力影响;C. 平板克隆形成实验检测RSV和siSLC2A1对肺腺癌细胞克隆形成能力影响;D. CCK-8实验检测RSV和siSLC2A1对肺腺癌细胞增殖能力影响;a. NC1;b. RSV50;c. NC2;d. siSLC2A1;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$

图4 RSV和siSLC2A1对肺腺癌细胞生物学行为的影响

Fig. 4 Effect of resveratrol and siSLC2A1 on the biological behavior of lung adenocarcinoma cells

肺腺癌细胞的增殖和迁移。

本研究将生物信息学与分子生物学相结合,以探讨RSV治疗肺腺癌的作用机制。通过免疫组化和分子生物学实验验证了生物信息学所得结果,表明RSV可能通过作用于SLC2A1发挥治疗肺腺癌的作用机制。该研究一方面肯定了RSV在肺腺癌

治疗中的潜力,另一方面为癌症早期诊断标志物,特定靶点治疗提供思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I,

- et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [2] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments[J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [3] 张颖, 高原, 刘春英. 补中益气汤对肺腺癌荷瘤裸鼠 A549/DDP 细胞顺铂耐药的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(23): 73-78.
- [4] BUSQUETS S, AMETLLER E, FUSTER G, et al. Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model [J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1/2): 144-148.
- [5] RAUF A, IMRAN M, BUTT M S, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(9): 1428-1447.
- [6] SINHA D, SARKAR N, BISWAS J, et al. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms [J]. *Semin Cancer Biol*, 2016, 40/41: 209-232.
- [7] HU C, LIU Y, TENG M, et al. Resveratrol inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells by suppressing EZH2 through the modulation of ERK1/2 signaling [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35(5): 445-456.
- [8] LI D, WANG G, JIN G, et al. Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 630-640.
- [9] WHYTE L, HUANG Y Y, TORRES K, et al. Molecular mechanisms of resveratrol action in lung cancer cells using dual protein and microarray analyses [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 12007-12017.
- [10] YU Y H, CHEN H A, CHEN P S, et al. MiR-520h-mediated FOXC2 regulation is critical for inhibition of lung cancer progression by resveratrol [J]. *Oncogene*, 2013, 32(4): 431-443.
- [11] GOLDMAN M J, CRAFT B, HASTIE M, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 675-678.
- [12] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [13] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [14] DENNIS G J, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(5): 418-427.
- [15] SPRINGER M, MOCO S. Resveratrol and its human metabolites-effects on Metabolic health and obesity [J]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 143.
- [16] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(14): 2568-2578.
- [17] 刘顺, 李赫宇, 赵玲. 白藜芦醇降尿酸、抗炎作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2): 304-307.
- [18] KO J H, SETHI G, UM J Y, et al. The role of resveratrol in cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2589.
- [19] XU J, LIU D, NIU H, et al. Resveratrol reverses doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 19.
- [20] YOUSEF M, VLACHOGIANNIS I A, TSIANI E. Effects of resveratrol against lung cancer: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Nutrients*, 2017, 9(11): 1231.
- [21] SEAMAN M N G, MUKADAM A S, BREUSEGEM S Y. Inhibition of TBC1D5 activates Rab7a and can enhance the function of the retromer cargo-selective complex [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(12): jcs217398.
- [22] LIAO Y, YIN G, WANG X, et al. Identification of candidate genes associated with the pathogenesis of small cell lung cancer via integrated bioinformatics analysis [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 3723-3733.
- [23] YAN S, WANG Y, CHEN M, et al. Deregulated SLC2A1 promotes tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 16144-16157.
- [24] GUO W, SUN S, GUO L, et al. Elevated SLC2A1 expression correlates with poor prognosis in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a study based on immunohistochemical analysis and bioinformatics [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(4): 631-644.

[责任编辑 顾雪竹]