

· 数据挖掘 ·

基于芯片分析联合网络药理学探寻淫羊藿干预乳腺癌干细胞的生物标志物及靶点机制

赵丽君¹, 马艳苗¹, 梁凯¹, 吴梦雪¹, 崔亚新¹, 范建新², 李震宇², 彭涛^{3*}
(1. 山西中医药大学, 太原 030619; 2. 山西大学 中药现代研究中心, 太原 030006;
3. 山西省中西医结合医院, 太原 030013)

[摘要] 目的:通过芯片分析联合网络药理学及其实验验证,阐明淫羊藿干预乳腺癌干细胞(BCSCs)的潜在分子标志物和药物-化合物-靶点机制。方法:在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索相关药物信息,获得淫羊藿的活性成分和潜在靶点。在基因表达综合(GEO)数据库检索“Breast Cancer Stem Cells”,通过分析筛选,获取GSE98239芯片数据,使用GEO2R在线分析工具获取其差异基因,绘制差异基因热图和火山图。通过Cytoscape 3.8.0构建淫羊藿干预乳腺癌干细胞差异基因网络图,并进行药物与疾病基因的基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析。将人乳腺癌MDA-MB-231细胞分为20%,40%,60%淫羊藿含药血清组和对照组,通过细胞增殖与活性检测(CCK-8),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测淫羊藿含药血清干预MDA-MB-231后,对其活性和乳腺癌细胞中靶蛋白表达量的影响。结果:获得淫羊藿含有的黄酮、甾醇、生物碱及倍半萜类活性成分23个,发现其与乳腺癌干细胞中的B细胞淋巴瘤-2样蛋白1(BCL2L1),基质金属蛋白酶2(MMP2),前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2),血管内皮生长因子(VEGF)A,转化生长因子 β 受体I(TGFBR1)等枢纽基因相互作用,参与诱导新的血管生成、细胞迁移,使BCSCs持续自我更新而凋亡减少并发生细胞迁移,从而促进乳腺癌的复发和转移。KEGG结果显示,淫羊藿干预 pathway in cancer 信号通路中转化生长因子 β (TGF- β),VEGF,胞内磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt),丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)亚通路的多个差异表达基因(DEGs)来发挥其干预乳腺癌干细胞的功效。实验表明,淫羊藿含药血清干预后乳腺癌细胞存活率显著降低,乳腺癌细胞中TGFBR1和Smad2表达量显著降低($P < 0.01$)。结论:淫羊藿不同浓度含药血清中的多个组分,能够协同作用于乳腺癌干细胞的目标差异表达基因,并通过下调TGF- β 通路中关键分子TGFBR1及下游信号Smad2蛋白的表达水平,从而发挥抑制乳腺癌细胞增殖的作用。

[关键词] 网络药理学; 芯片分析; 淫羊藿; 乳腺癌干细胞; 作用机制

[中图分类号] R271.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0195-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210416

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210202.1015.001.html>

[网络出版日期] 2021-2-2 11:23

Biomarkers and Target Mechanisms of Epimedium Folium Intervention on Breast Cancer Stem Cells Based on Chip Analysis and Network Pharmacology

ZHAO Li-jun¹, MA Yan-miao¹, LIANG Kai¹, WU Meng-xue¹, CUI Ya-xin¹,
FAN Jian-xin², LI Zhen-yu², PENG Tao^{3*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China;

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

3. Shanxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Taiyuan 030013, China)

[收稿日期] 20200813(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703978);山西省科技厅重点研发计划项目(201803D421053);山西省科技厅新型冠状病毒疫情防控科研攻关项目(202003D33002/GZ);山西省高等学校科技创新项目(201804002);山西中医药大学基础研究专项(2020PY-JC-01);国家中医药管理局中医方剂新药创制创新团队项目(2018TD-004)

[第一作者] 赵丽君,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤疾病的研究,E-mail:672213789@qq.com

[通信作者] *彭涛,博士,主任医师,硕士生导师,从事经方防治炎性免疫性疾病研究,E-mail:Pengtao5197220@163.com

[Abstract] **Objective:** To elucidate the potential molecular markers and drug-compound-target mechanism of Epimedii Folium intervention on breast cancer stem cells(BCSCs) through chip analysis combined with network pharmacology and experimental validation. **Method:** Relevant drug information was retrieved in Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) to obtain the active components and potential targets of Epimedii Folium. "Breast Cancer Stem Cells" were searched in Gene Expression Omnibus(GEO) database, and GSE98239 chip data were obtained through analysis and screening. Then GEO2R online analysis tool was used to obtain the differential genes to draw differential gene heat map and volcano map. The differential gene network map of Epimedii Folium intervention for breast cancer stem cells was constructed by Cytoscape 3.8.0, and Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of drug and disease genes were performed. Human breast cancer MDA-MB-231 cells were divided into 20%, 40%, 60% Epimedii Folium drug-containing serum group and control group. Cell counting kit-8 (CCK-8), and Western blot were used to detect the effect of Epimedii Folium drug-containing serum intervention on cell activity and target protein expression in breast cancer cells. **Result:** Twenty-three active components including flavones, sterols, alkaloids and sesquiterpenoids were obtained from Epimedii Folium. It was found that Epimedii Folium interacted with B-cell lymphoma-2-like protein 1 (BCL2L1), matrix metalloproteinase 2(MMP2), prostaglandin-endoperoxide synthase 2(PTGS2), vascular endothelial growth factor A(VEGFA), transforming growth factor beta receptor 1(TGFBR1) and other pivotal genes in breast cancer stem cells, participated in the induction of new angiogenesis and cell migration, enabled the continuous self-renewal of BCSCs, decreased apoptosis and cell migration, thus promoting the recurrence and metastasis of breast cancer. KEGG results showed that Epimedii Folium intervened in multiple differential expressed genes (DEGs) of transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor(VEGF), phosphoinositide 3kinase/protein kinase B(PI3K/Akt), mitogen-activated protein kinase(MAPK) and mammalian target of rapamycin(mTOR) subpathways in cancer signaling pathways to exert its efficacy in intervening breast cancer stem cells. Experiments showed that the survival rate of breast cancer cells was significantly reduced and the expression levels of TGFBR1 and Smad2 in breast cancer cells significantly decreased after the intervention of Epimedii Folium drug-containing serum($P < 0.01$). **Conclusion:** Several components in different concentrations of drug-containing serum of Epimedii Folium can synergistically act on target differentially expressed genes of breast cancer stem cells, and inhibit the proliferation of breast cancer cells by down-regulating the expression levels of TGFBR1, a key molecule in the TGF- β pathway, and Smad2, a downstream signal.

[Key words] network pharmacology; chip analysis; Epimedii Folium; breast cancer stem cells; mechanism

乳腺癌是发生在乳腺组织的具有高转移和高复发特性的恶性肿瘤。据调查显示,乳腺癌严重影响着世界将近八分之一的女性,其发病率居于全球女性癌症发病首位,死亡率第2位^[1]。近年来中国女性乳腺癌患病率呈现逐年上升趋势,中国女性每年的乳腺癌新发病例数和死亡例数约占世界10%^[2]。尽管近年来早期筛查和综合治疗策略的应用,改善了乳腺癌的预后,但复发、转移、耐药使得乳腺癌治愈率极为低下,20%~30%的乳腺癌患者在诊断和治疗后发生转移。乳腺癌干细胞最早由AL-HAJJ等^[3]发现,是许多乳腺癌的纤维蛋白来源,极易积累突变。谱系追踪研究表明,发育中的乳腺

内存在单能腔祖细胞和基底祖细胞,这些细胞分别长时间维持和支持完全分化的腔和基底细胞谱系^[4-5]。干细胞能够以与原始肿瘤相似的异质性重建肿瘤,表现出可塑性和再扩化^[3]。这种罕见的细胞群体表现为CD44⁺/CD24⁻和ALDH1⁺表型,常用的化疗药物不能根除这些细胞,反而会增加肿瘤中的肿瘤干细胞池,引起乳腺癌的复发和转移^[6]。乳腺癌干细胞具有高度分化、自我更新、稳态控制、易发生远处转移等特性^[7-8],并参与调节分泌型糖蛋白(Wnt)信号通路,细胞-细胞通信(Notch)信号通路,Hedgehog(Hh)信号通路和转化生长因子- β (TGF- β)信号通路等^[9-12]。因此,靶向干预乳腺癌干细胞,降

低其干细胞特性,将成为预防和治疗乳腺癌复发转移的一个重要方向。

淫羊藿始载于《神农本草经》,又名仙灵脾、刚前,多年生草本植物,其性温,味辛、甘,入肝、肾经,能补肾壮阳,祛风除湿^[13]。淫羊藿的化学成分以黄酮类为主,还包括木脂素类、生物碱类等。淫羊藿临床常用于生殖、骨骼、心血管、血液、呼吸等多个系统的疾病,也是治疗乳腺癌的常用药物,对乳腺癌细胞增殖有明显的抑制作用^[14]。有研究证实,淫羊藿能够通过G₁期阻滞抑制雌二醇(E₂)促进的细胞周期进程并调节E₂的细胞代谢,抑制乳腺癌MCF-7细胞的生长增殖^[15]。转化生长因子β受体I(TGFBR1)是TGF-β信号转导的关键节点,其高表达与乳腺癌的预后和转移有关。

芯片分析是基于基因表达综合(GEO)数据库对疾病基因表达矩阵进行生物信息学分析的一种前期分析方法。GEO数据库是将精选的基因表达原始数据集和平台记录存储在基因表达综合数据库,通过筛选可获得特征性的疾病差异表达基因(DEGs),为疾病和药物实验研究提供了前期基因数据。网络药理学是运用网络生物学、系统生物学、基因冗余度等原理解释疾病发展的过程,从网络整体观来认识药物与机体的相互作用,预测药物对疾病生物学作用机制的一种新药试验和研发手段,也可用于药物的药理机制研究、药物重新定位等^[16-17]。

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,新的治疗方法对乳腺癌患者来说值得期待。靶向乳腺癌干细胞是新晋的一个研究热点。淫羊藿是常用的抗癌类中药,有抑制肿瘤细胞增殖等作用,但其具体机制尚未明确,本研究将借助基因芯片分析及网络药理学方法,筛选出淫羊藿与乳腺癌干细胞有关的枢纽基因、通路及机制,并用实验进一步验证所得结果,探求淫羊藿干预乳腺癌干细胞的作用机制,为乳腺癌治疗提供新的思路与方法。

1 材料

淫羊藿(*Epimedium brevicornu*)购自晋中市同仁堂药房连锁有限公司,药材经执业药师吉海杰副主任药师鉴定为正品。将淫羊藿饮片放入去离子水中,浸泡约60 min后煎煮。第1次用6倍量水,煎煮约0.5 h;第2次用3倍量水,煎煮约0.5 h。合并2次煎煮液后过滤,将滤液减压浓缩至0.72 g·mL⁻¹(以生药量计),4℃条件下保存备用。二甲基亚砜(DMSO),0.25%胰蛋白酶(含EDTA),无菌磷酸盐缓冲液(PBS),细胞计数(CCK)-8试剂盒(武汉博士

德生物工程有限公司,批号分别为PYG0040, PYG0015, PYG0021, AR1160);100倍青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号P1400);胎牛血清(FBS),RPMI 1640培养基(北京协和细胞资源中心,批号分别为CCCM030,CCCM018);BCA蛋白浓度测定试剂盒、超敏ECL化学发光即用型底物(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为40256, 30180);重组Anti-Smad2, TGFBR1抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab40855, ab31013)。人乳腺癌MDA-MB-231细胞,用于检测淫羊藿对乳腺癌干细胞的影响(北京协和细胞资源中心,批号3111C0001CCC000014)。Wistar雄性大鼠20只,体质量为180~220 g,用于制备淫羊藿含药血清,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。本实验获得山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号2020DW192)。

Model311型CO₂培养箱(美国Thermo公司);SQ-188型通用型迷你垂直电泳槽(上海珂淮仪器有限公司),EPS-300型电泳仪(上海天能科技有限公司);Contfuge Stratos型高速低温离心机, Varioskan LUX型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);GPJ9-TS100-F型倒置显微镜(Nikon Japan公司);Gel Doc XR+型凝胶分析软件及成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 淫羊藿潜在药理信息与DEGs的筛选 在TCMSP(<https://tcmospw.com/tcmosp.php>)数据库以中药“淫羊藿”为关键词查找淫羊藿的化学成分,进行筛选[口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18]^[18]后,再找出各活性成分相对应的潜在靶点。

通过GEO数据库以“breast cancer stem cells”为关键词进行搜索,经筛选后选择GSE98239^[19]的样本表达数据作为研究对象,该数据样本为转移性乳腺癌细胞,分为无血清培养和单层培养两组,用来比较乳腺癌干细胞和乳腺癌细胞之间差异基因的表达情况。在GEO数据库下载其原始数据并进行分组整理,用GEO2R在线差异基因分析工具进行分析并下载全部结果,以P<0.05, |log₂FC|>1为筛选条件筛选出用于后续分析的DEGs。

2.2 构建淫羊藿干预乳腺癌干细胞共同机制网络 将淫羊藿潜在靶点基因与乳腺癌干细胞的差异基因取交集后,获得共表达差异基因,并做韦恩图,用Cytoscape 3.8.0软件构建淫羊藿干预乳腺癌干细胞的“淫羊藿成分-共有差异基因”网络图,并使用

Network Analyzer功能对“淫羊藿成分-共有差异基因”网络进行分析。

2.3 淫羊藿-乳腺癌干细胞共同差异基因关系分析和功能分析 以“Homo sapiens”为研究背景,在STRING 11.0(<https://string-db.org/>)数据库对淫羊藿-乳腺癌干细胞的DEGs进行蛋白互作分析,并用Cytoscape 3.8.0软件对蛋白互作网络图进行可视化,用CytoNCA插件对该网络进行分析。用David在线富集工具,对淫羊藿-乳腺癌干细胞的DEGs进行生物信息功能和信号通路富集分析。

2.4 制备淫羊藿含药血清 将20只大鼠适应性喂养7 d后,用随机数字表标记后随机分为淫羊藿煎剂组和空白血清组,每组10只。给药组大鼠用淫羊藿煎剂 $7.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,空白血清组给予 $7.2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生理盐水灌胃,1次/d,连续给药7 d。第7天给药后2 h水合氯醛麻醉,经腹主动脉采血, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置30 min,离心分离后提取血清。将同组的血清合并后混合均匀, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭活30 min,分装后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

2.5 细胞培养 在无菌条件下,将89%的RPMI 1640培养基,10% FBS和1%的100倍青链霉素混合液加入50 mL的离心管中,制成完全培养基。人乳腺癌MDA-MB-231细胞在完全培养基条件下放置在5% CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中进行培养。

2.6 用CCK-8检测淫羊藿对乳腺癌细胞活性的影响 取对数生长期的人乳腺癌MDA-MB-231细胞制成每1 mL培养基中含有 4×10^5 个细胞的细胞悬液。将细胞分为4组,20%,40%,60%淫羊藿含药血清组和空白血清组,每组设6个平行孔,以每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于96孔培养板中,做好标记,放在培养箱中预培养($37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2)。淫羊藿组分别用20%,40%,60%的淫羊藿含药血清处理细胞12,24,48 h,空白血清组加入等量PBS。将CCK-8试剂以每孔10 μL 滴入处理好的细胞培养板,再培养1~4 h后用酶标仪检测各组细胞活性。

2.7 用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定淫羊藿对TGFBR1和Smad2蛋白表达含量的影响 收集MDA-MB-231细胞,提取蛋白,测定蛋白含量,分别结合一抗、二抗孵育,ECL化学发光显影成像,Image lab分析结果。

2.8 统计处理 采用SPSS 25.0进行数据统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

3 结果

3.1 淫羊藿药理信息筛选 以 $\text{DL}\geq 0.18$, $\text{OB}\geq 30\%$ 为条件,对通过TCMSP数据库检索收集到淫羊藿的化学成分进行筛选,获得类药性成分23个,见表1。并预测各活性成分的潜在靶点,将所有靶点汇总并删除重复值后为114个。

3.2 乳腺癌干细胞差异基因筛选 以 $P<0.05$, $|\log_2FC|>1$ 为筛选条件,对GEO2R在线分析工具分析所得结果进行筛选,获得差异表达基因共1 046个,将淫羊藿潜在靶点和乳腺癌干细胞差异基因取交集,获得淫羊藿干预乳腺癌干细胞的潜在作用差异基因21个,绘制火山图和热图,见图1,分析乳腺癌细胞与乳腺癌干细胞的DEGs关系,可以看出这21个差异基因在两组间[GSM2589743, GSM2589744, GSM2589745为无血清培养组(Group C), GSM2589740, GSM2589741, GSM2589742为单层培养组(Group T)]的表达情况存在明显差异。

3.3 构建淫羊藿-乳腺癌干细胞共同差异基因机制网络 运用Cytoscape 3.8.0软件对“化合物-DEGs”关系网络作可视化分析,见图2。根据拓扑分析得出淫羊藿作用于乳腺癌干细胞的化学成分有黄酮类12个、甾醇类3个、生物碱类2个和倍半萜类1个。由图可见淫羊藿是通过多种化学成分干预多个乳腺癌靶点来发挥治疗乳腺癌的作用的。淫羊藿作用于乳腺癌干细胞的主要化学成分是4',7-二羟基黄酮(DFV),木犀草素(luteolin),山柰酚(kaempferol),槲皮素(quercetin),金圣草黄素(chryseriol)。

对淫羊藿-乳腺癌干细胞共同靶点关系进一步网络化分析,设定物种为人,将淫羊藿和乳腺癌干细胞共同DEGs上传至STRING 11.0数据库,下载结果并在Cytoscape 3.8.0软件用CytoNCA插件对淫羊藿-乳腺癌干细胞共同靶点关系网络进行分析,选取Betweenness, Closeness, Degree为分析对象。可以得出淫羊藿干预乳腺癌干细胞的主要作用靶点为B细胞淋巴瘤-2样蛋白1(BCL2L1),基质金属蛋白酶2(MMP2),人前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2),血管内皮生长因子A(VEGFA),转化生长因子 β 受体I(TGFBR1)等。见图3。

3.4 淫羊藿-乳腺癌干细胞共同基因GO生物信息和京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路分析 将淫羊藿-乳腺癌干细胞共同DEGs导入DAVID数据库,通过对淫羊藿-乳腺癌干细胞共同

表 1 淫羊藿化合物基本信息

Table 1 Basic information of Epimedii Folium compounds

MOL ID	化合物名称	OB/%	DL
MOL001510	24-表氨酯醇	37.58	0.71
MOL001645	乙酸亚油醇酯	42.1	0.2
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
MOL001792	4',7-二羟基黄烷酮	32.76	0.18
MOL003044	金圣草黄素	35.85	0.27
MOL003542	8-isopentenyl-kaempferol	38.04	0.39
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL004367	橄榄脂素	62.23	0.41
MOL004373	脱水淫羊藿素	45.41	0.44
MOL004380	C-homoerythrinan, 1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-, (3.beta.)-	39.14	0.49
MOL004382	淫羊藿 A	56.96	0.77
MOL004384	淫羊藿 C	45.67	0.5
MOL004386	淫羊藿 E	51.63	0.55
MOL004388	6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium	60.64	0.66
MOL004391	8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone	48.54	0.25
MOL004394	脱水淫羊藿苷-3-O- α -L-鼠李糖苷	41.58	0.61
MOL004396	1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-1,3-diol	52.31	0.22
MOL004425	淫羊藿苷	41.58	0.61
MOL004427	淫羊藿苷 A7	31.91	0.86
MOL000006	木樨草素	36.16	0.25
MOL000622	广玉兰内酯	63.71	0.19
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28

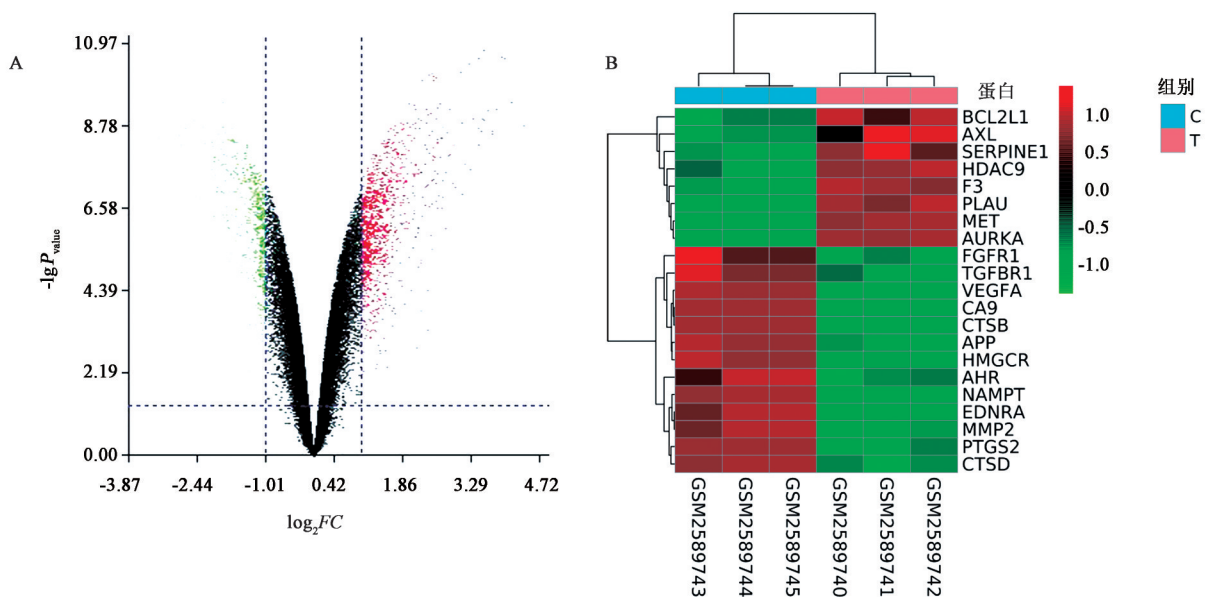
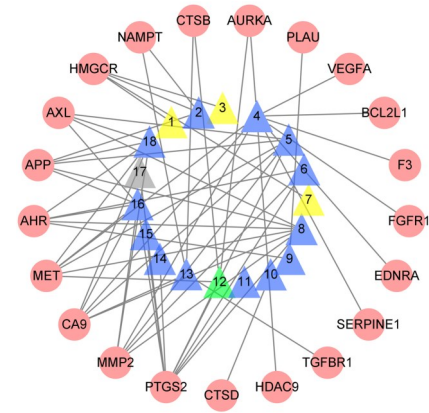


图 1 乳腺癌干细胞(BCSCs)的 DEGs 火山(A)与表达谱热(B)分析

Fig. 1 BCSCs DEGs volcano map(A) and expression profiles heatmap(B)



蓝色.黄酮类;黄色.甾醇类;绿色.生物碱类;灰色.倍半萜类;粉色.靶点;1.24-表氨基醇;2.乙酸亚油醇酯;3.poriferast-5-en-3beta-ol;4.4',7-二羟基黄酮;5.金圣草黄素;6.8-isopentenyl-kaempferol;7.谷甾醇;8.山柰酚;9.脱水淫羊藿素;10.C-homoerythrinan,1,6-didehydro-3,15,16-trimethoxy-, (3.beta.)-;11.淫羊藿E;12.6-hydroxy-11,12-dimethoxy-2,2-dimethyl-1,8-dioxo-2,3,4,8-tetrahydro-1H-isochromeno[3,4-h]isoquinolin-2-ium;13.8-(3-methylbut-2-enyl)-2-phenyl-chromone;14.去氢淫羊藿素-3-O- α -鼠李糖苷;15.淫羊藿苷;16.木犀草素;17.广玉兰内酯;18.槲皮素

图2 淫羊藿化合物-干细胞共同差异基因网络关系
Fig. 2 Epimedium compound and stem cells common differential gene network

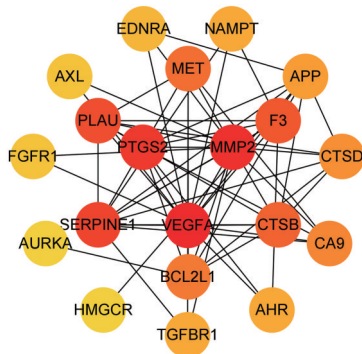


图3 淫羊藿干预乳腺癌干细胞靶点网络关系
Fig. 3 Intervention target network of Epimedium Folium on breast cancer stem cells

DEGs的生物过程,细胞组分以及分子功能进行分析,分别得到54条,11条,11条目标条目。按照富集基因数量排序,分别选取前10条目可视化展示,见表2。

VEGFA和TGFBR1通过细胞增殖的正调控、细胞迁移的正调控、内皮细胞增殖的正调控、细胞成分运动的正调节,细胞表面,蛋白质结合等作用来参与乳腺癌的进展;PTGS2通过血管生成、细胞增殖、炎症反应等途径来参与乳腺癌的进展;MMP2通过对缺氧的反应、细胞增殖的正调控、蛋白水解等途径来参与乳腺癌的进展;BCL2L1通过细胞增

殖、细胞增殖的正调控来参与乳腺癌细胞的增殖,见图4(GO:0090050 positive regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis;GO:0001666 response to hypoxia;GO:0005615 extracellular space;GO:0009986 cell surface;GO:0005515 protein binding;GO:0004252 serine-type endopeptidase activity;hsa05200 pathways in cancer;hsa05205 proteoglycans in cancer)。

通过KEGG分析得到10条淫羊藿-乳腺癌干细胞共同DEGs参与的信号通路。其中,Pathways in cancer通路富集基因最多。这些靶点参与的亚通路有胞内磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路,血管内皮生长因子(VEGF)信号通路,TGF- β 信号通路等;它们通过参与多个信号通路发挥持续血管生成、炎症反应、逃避凋亡等作用来促进肿瘤细胞无限生长。而淫羊藿可能通过调控这些靶点的表达,阻断相应信号通路的传导,进而阻断乳腺癌的发生发展。

3.5 淫羊藿含药血清对MDA-MB-231细胞形态学及活性观察的影响 MDA-MB-231细胞为梭形树突状生长,细胞呈簇聚,生长旺盛,形态规整,分裂增殖快。淫羊藿含药血清组的MDA-MB-231细胞数量与空白组相比明显减少,密度减少,细胞稀落,形态不规则,体积明显缩小,部分细胞脱落,悬于培养液之中,见图5。

与空白MDA-MB-231细胞组相比,淫羊藿含药血清(20%),淫羊藿含药血清(40%),淫羊藿含药血清(60%)处理24,48h后细胞的存活率明显降低,见图6,说明淫羊藿含药血清对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用具有显著性。

3.6 淫羊藿含药血清对乳腺癌MDA-MB-231细胞TGFBR1,Smad2蛋白表达的影响 实验选择TGF- β 信号通路中的靶基因TGFBR1及下游基因Smad2进行验证。与空白血清组相比,淫羊藿含药血清干预后的乳腺癌MDA-MB-231细胞中TGFBR1,Smad2蛋白表达显著降低($P<0.01$),见图7。空白血清组TGFBR1,Smad2蛋白表达量分别为(18.82 \pm 0.43)和(9.54 \pm 0.77),淫羊藿含药血清干预后的乳腺癌MDA-MB-231细胞中TGFBR1,Smad2蛋白表达量显著降低至(0.41 \pm 0.05)和(0.35 \pm 0.07)。

4 讨论

乳腺癌干细胞在近年来被认为是导致乳腺癌转移复发的主要因素,具有促进肿瘤的发生、介导

表2 淫羊藿干预乳腺癌干细胞靶点生物信息和信号通路分析

Table 2 Analysis of biological information and signaling pathways of target of Epimedii Folium on breast cancer stem cells

富集类型	名称	基因数/个
生物过程	GO:0045944 从RNA聚合酶II启动子转录的正调控	6
	GO:0007165 信号转导	6
	GO:0001666 对缺氧的反应	5
	GO:0001701 子宫内胚胎发育	5
	GO:0001525 血管生成	5
	GO:0008284 细胞增殖的正调控	5
	GO:0030335 细胞迁移的正调控	4
	GO:0006468 蛋白磷酸化	4
	GO:0006508 蛋白水解	4
	GO:0090050 芽生血管形成过程中细胞迁移的正调控	3
细胞组分	GO:0005886 质膜	11
	GO:0005615 细胞外空间	10
	GO:0005576 细胞外区域	9
	GO:0070062 细胞外分泌体	8
	GO:0009986 细胞表面	7
	GO:0005887 质膜的组成部分	5
	GO:0031012 细胞外基质	4
	GO:0031093 血小板 α 颗粒腔	3
	GO:0043235 受体复合物	3
	GO:0045121 膜筏	3
分子功能	GO:0005515 蛋白质结合	20
	GO:0042803 蛋白质同二聚化活性	6
	GO:0004252 丝氨酸型内肽酶活性	5
	GO:0005524 三磷酸腺苷(ATP)结合	5
	GO:0046982 蛋白质异二聚化活性	4
	GO:0042802 相同的蛋白质结合	4
	GO:0004713 蛋白酪氨酸激酶活性	3
	GO:0008201 肝素结合	3
	GO:0004672 蛋白激酶活性	3
	GO:0004714 跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性	2
信号通路	hsa05200 癌症通路	8
	hsa05205 蛋白多糖在癌症中的作用	5
	hsa04014 Ras信号通路	4
	hsa05206 癌症中的microRNA	4
	hsa04151 PI3K/Akt信号通路	4
	hsa05212 胰腺癌	3
	hsa04610 补体和凝血级联	3
	hsa04520 黏附连接	3
	hsa04064 核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路	3
	hsa05202 癌症中的转录失调	3

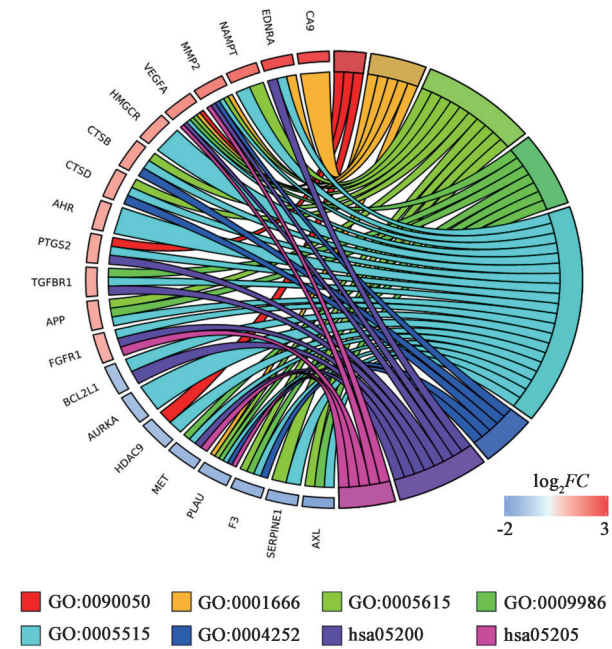
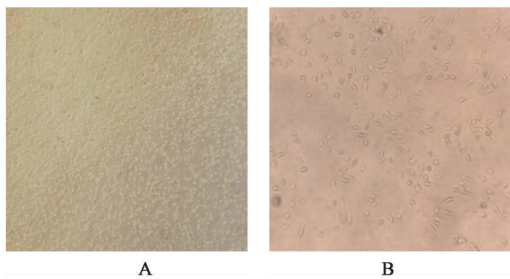


图4 淫羊藿干预乳腺癌干细胞靶点GO和KEGG分析弦
Fig. 4 Chord diagram of GO and KEGG analysis on targets of Epimedii Folium intervention on breast cancer stem cells



A. 空白血清组; B. 淫羊藿含药血清组
图5 淫羊藿对MDA-MB-231细胞的形态的影响($\times 100$)

Fig. 5 Effects of Epimedii Folium on morphology of MDA-MB-231 cells ($\times 100$)

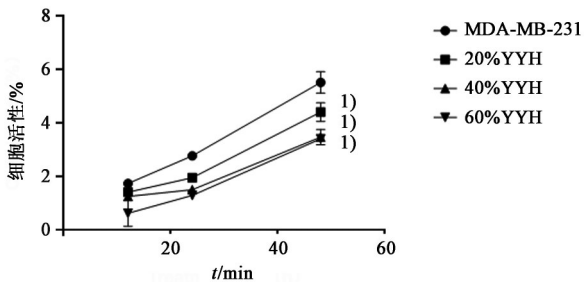


图6 淫羊藿含药血清作用12, 24, 48 h对MDA-MB-231细胞活性的影响
Fig. 6 Effect of Epimedii Folium containing serum on cell viability of MDA-MB-231 at 12, 24 and 48 h

肿瘤的转移、增加对治疗的抗药性等作用。BCSC越来越被认为是一个动态的细胞群体,其特征是能够获得一系列表型、功能和代谢状态,以响应微环境的变化。随着肿瘤微环境的调控,BCSC维持了

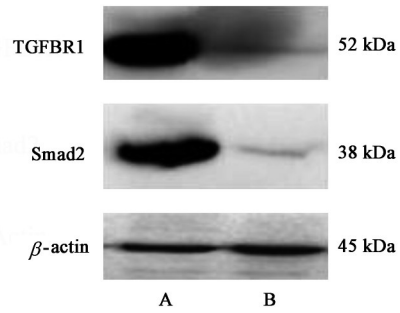


图7 淫羊藿对TGFBR1, Smad2蛋白相对表达量的影响
Fig. 7 Effects of Epimedii Folium on relative expression of TGFBR1, Smad2 protein

较高的可塑性,其状态的转变可以引起肿瘤异常增殖、复发转移和治疗抵抗或者耐药。传统中药淫羊藿的化学成分以黄酮类为主,有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等作用,其抗肿瘤作用可能与其抑制细胞增殖、迁移、调控分化、诱导凋亡等相关^[20]。本研究中的网络药理学分析也证实了这一点,淫羊藿中的众多黄酮类(12种)、甾醇、生物碱及倍半萜类化合物参与了干预乳腺癌干细胞的过程。

本研究基于芯片分析联合网络药理学,认为淫羊藿干预BCSCs是通过多成分与多靶点相互作用来实现的,利用TCMSP和GEO数据库获得淫羊藿干预BCSC的21个共同差异表达基因。通过基因生物功能富集分析发现,这些DEGs主要参与的生物过程为对新生血管生成的正调节作用、缺氧反应、血管生成,细胞组成为胞外间隙、细胞表面、胞外区,分子功能为蛋白质结合、蛋白质同聚活性、相同蛋白质结合,KEGG信号通路为癌症通路、蛋白多糖在癌症中的作用,Ras信号通路等。

淫羊藿苷(icariin)能诱导乳腺癌细胞周期G₀/G₁期阻滞和凋亡,并抑制细胞自噬。研究报道,淫羊藿苷抑制BCCs增殖和转移的作用可能与下调细胞周期蛋白激酶(CDK) 2/4, 细胞周期蛋白D₁(Cyclin D₁), 高B淋巴细胞瘤2(Bcl-2), LC3- I / II, AGT 5, Beclin-1, VEGF等蛋白的表达水平,上调半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)和p62等蛋白的表达水平有关^[21-24]。淫羊藿素可以通过降低乳腺癌细胞雌激素受体- $\alpha 36$ (ER- $\alpha 36$)和表皮生长因子受体(EGFR)蛋白的表达来减少乳腺癌细胞球体的形成^[25]。淫羊藿次苷可通过提高乳腺癌组织中Caspase-3和AIFM1的表达,提高Bcl-2相关X蛋白(Bax)/Bcl-2值,来诱导乳腺癌细胞自身凋亡^[26]。

通过对淫羊藿干预乳腺癌干细胞DEGs的

STRING 和 CytoNCA 蛋白关系网络图分析发现,淫羊藿治疗乳腺癌干细胞的枢纽基因分别为 VEGFA, MMP2, PTGS2, TGFBR1, SERPINE1, PLAUI, F3, CTSB, MET, BCL2L1, 主要集中在 Pathway in cancer 信号通路。Pathway in cancer 信号通路是一条非常庞大的信号通路,淫羊藿可能作用于该信号通路中的 TGF- β , VEGF, PI3K/Akt, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK), 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)等信号通路,从而发挥抑制乳腺癌干细胞的作用,这也充分体现了中药多组分-多靶点的特色,即中药中的多组分并不是仅仅作用于肿瘤干细胞的一个方面,而是通过作用于血管新生和侵袭、凋亡、增殖、耐药等多方面发挥协同调控作用。例如, BCL2L1 对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞的生长抑制和凋亡发挥关键作用^[27]。间质表皮转化因子(c-Met)表达增加和 Topo II 表达降低与肿瘤细胞化疗耐药有关^[28]。肝细胞生长因子(HGF)与其受体 c-Met 特异性结合后,起到了促进细胞迁移、远处侵袭和血管生成的作用^[29]。MMP2 参与血管重塑、血管新生、肿瘤侵袭等多种功能^[30],降低 MMP2 的表达水平,能够抑制乳腺癌干细胞的侵袭与迁移能力^[31],改善乳腺癌预后^[32]。PTGS2 在肿瘤组织中高表达,参与调节细胞运动、增殖和抗凋亡等。Akt1 和 COX2/PTGS2 通过调节上皮细胞间充质转化(EMT),凋亡和衰老,抑制乳腺癌转移、耐药^[33]。VEGFA 能通过 β -链蛋白(β -catenin)/VE-cadherin 来促进血管网络的形成,调控细胞迁移^[34-35]。TGFBR1 是 TGF- β 信号转导的关键节点,可通过磷酸化下游信号分子,胞浆内桥梁 Smad2 蛋白启动胞内信号传递,调控细胞增殖及迁移相关基因的转录^[36],其高表达与乳腺癌的预后和转移有关。本研究的结果表明,3种不同浓度淫羊藿含药血清作用于乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后,可以显著抑制其细胞增殖,并具有剂量依赖性。同时,淫羊藿还能显著降低 MDA-MB-231 细胞 TGF- β 通路 TGFBR1 及下游信号 Smad2 蛋白的表达量,并进一步与 pathway in cancer 信号通路中的其他信号通路一起,诱导肿瘤丧失增殖能力。

本研究通过网络药理学联合 GEO 芯片分析发现淫羊藿药材中含有的黄酮、甾醇、生物碱及倍半萜类化合物与乳腺癌干细胞中的 BCL2L1, MMP2, PTGS2, VEGFA, TGFBR1 等枢纽基因相互作用,参与诱导新的血管生成、细胞迁移,使 BCSCs 持续自我更新而凋亡减少并发生细胞迁移,从而促进乳腺

癌的复发和转移。淫羊藿干预 pathway in cancer 信号通路中 TGF- β , VEGF, PI3K/Akt, MAPK, mTOR 亚通路的多个 DEGs 来发挥其干预乳腺癌干细胞的功效。结合网络药理学及 GEO 数据库分析结果,进一步通过实验验证了淫羊藿不同浓度含药血清能抑制乳腺癌细胞增殖,下调 TGF- β 通路中关键分子 TGFBR1 及下游信号 Smad2 蛋白的表达水平。本次研究探讨了淫羊藿作用于乳腺癌干细胞的潜在分子标志物和药物-化合物-靶点机制,为今后的靶向乳腺癌干细胞基础和临床研究提供了思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (1): 7-30.
- [2] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): e279-e289.
- [3] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [4] THARMAPALAN P, MAHENDRALINGAM M, BERMAN H K, et al. Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention [J]. EMBO J, 2019, 38(14): e100852.
- [5] SOUSA B, RIBEIRO A S, PAREDES J. Heterogeneity and plasticity of breast cancer stem cells [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1139: 83-103.
- [6] PALOMERAS S, RUIZ-MARTINEZ S, PUIG T. Targeting breast cancer stem cells to overcome treatment resistance [J]. Molecules, 2018, 23 (9): 2193.
- [7] BUTTI R, GUNASEKARAN V P, KUMAR T V S, et al. Breast cancer stem cells: biology and therapeutic implications [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 107: 38-52.
- [8] DITTMER J. Breast cancer stem cells: features, key drivers and treatment options [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 53: 59-74.
- [9] REN L, CHEN H, SONG J, et al. MiR-454-3p-Mediated Wnt/ β -catenin signaling antagonists suppression promotes breast cancer metastasis [J]. Theranostics, 2019, 9(2): 449-465.
- [10] KONTOMANOLIS E N, KALAGASIDOU S, POULILIOU S, et al. The notch pathway in breast cancer progression [J]. Sci World J, 2018, 2018:

- 2415489.
- [11] BHATEJA P, CHERIAN M, MAJUMDER S, et al. The hedgehog signaling pathway: a viable target in breast cancer? [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (8): 1126.
- [12] SURIYAMURTHY S, BAKER D, TEN DIJKE P, et al. Epigenetic reprogramming of TGF- β signaling in breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(5):726.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [14] 罗露,袁志鹰,黄惠勇,等. 淫羊藿化学成分及药理研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2019, 15(6):190-194.
- [15] TELANG N T, LI G, KATDARE M, et al. The nutritional Herb *Epimedium grandiflorum* inhibits the growth in a model for the luminal A molecular subtype of breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (4): 2477-2482.
- [16] 黄美雯,杨华杰,周晓春,等. 网络药理学在民族药研究中的应用与展望[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (15):3187-3194.
- [17] 刘志强,王博龙. 中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展[J]. *中成药*, 2019, 41 (1): 171-178.
- [18] AUNGST B J. Optimizing oral bioavailability in drug discovery: an overview of design and testing strategies and formulation options [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106 (4):921-929.
- [19] INSUA-RODRIGUEZ J, PEIN M, HONGU T, et al. Stress signaling in breast cancer cells induces matrix components that promote chemoresistant metastasis [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(10):e9003.
- [20] 李艳,于涛,苗明三. 淫羊藿的化学、药理与临床应用分析[J]. *中医学报*, 2017, 32(4):619-622.
- [21] 何丽君,江金井,陈豪,等. 淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(2): 17-20.
- [22] CHENG X, TAN S, DUAN F, et al. Icaritin induces apoptosis by suppressing autophagy in tamoxifen-resistant breast cancer cell line MCF-7/TAM [J]. *Breast Cancer*, 2019, 26(6):766-775.
- [23] 郭莉,张娴,柴生颢,等. 淫羊藿苷对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡作用的实验研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(3):643-645.
- [24] TAO C C, WU Y, GAO X, et al. The antitumor effects of icaritin against breast cancer is related to estrogen receptors [J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20: 1-13.
- [25] WANG X, ZHENG N, DONG J, et al. Estrogen receptor- α 36 is involved in icaritin induced growth inhibition of triple-negative breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 171:318-327.
- [26] SONG J, HUANG H, XIA Z, et al. TPGS/phospholipids mixed micelles for delivery of icaritin to multidrug-resistant breast cancer [J]. *Integr Cancer Ther*, 2016, 15(3):390-399.
- [27] LI B, NI CHONGHAILE T, FAN Y, et al. Therapeutic rationale to target highly expressed CDK7 conferring poor outcomes in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(14):3834-3845.
- [28] JIA L, YANG X, TIAN W, et al. Increased expression of c-Met is associated with chemotherapy-resistant breast cancer and poor clinical outcome [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:8239-8249.
- [29] PARR C, ALI AY. *Boswellia frereana* suppresses HGF-mediated breast cancer cell invasion and migration through inhibition of c-Met signalling [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):281.
- [30] XU H, LIN F, WANG Z, et al. CXCR2 promotes breast cancer metastasis and chemoresistance via suppression of AKT1 and activation of COX2 [J]. *Cancer Lett*, 2018, 412:69-80.
- [31] 尹燕雪,李传伟,于爱莲,等. 盐霉素通过 TGF β 1/Smad 信号通路抑制 MMP-2、9 降低 CD44⁺/CD24^{low} 表型乳腺癌干细胞迁移和侵袭能力[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(3):262-267.
- [32] CANCEMI P, BUTTACAVOLII M, ROZ E, et al. Expression of alpha-enolase (ENO1), Myc promoter-binding protein-1 (MBP-1) and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) reflect the nature and aggressiveness of breast tumors [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16):3952.
- [33] QIN H, LIU X, LI F, et al. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling [J]. *Cancer Lett*, 2017, 409: 30-41.
- [34] 黄清南,黄耀,李明,等. 血管内皮生长因子(VEGF)高表达和血小板应答蛋白1(TSP-1)低表达与乳腺癌患者预后相关分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2019, 35(9):828-831.
- [35] ZHANG Q, LU S, LI T, et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):173.
- [36] SUNDQVIST A, MORIKAWA M, REN J, et al. JUNB governs a feed-forward network of TGF β signaling that aggravates breast cancer invasion [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(3):1180-1195.

[责任编辑 顾雪竹]