

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.14.014

基于整合药理学模型的漏芦干预三阴性乳腺癌转移药理机制研究

王博文¹, 汪丛丛¹, 刘存², 孙长岗^{1✉}

1. 山东大学齐鲁医学院, 山东省济南市历下区文化西路107号, 250012; 2. 山东中医药大学



[摘要] **目的** 通过整合药理学研究方法探索漏芦干预三阴性乳腺癌转移的潜在机制。**方法** 首先通过网络药理学方法筛选漏芦关键成分及关键靶点, 再筛选三阴性乳腺癌转移的特定靶标及关键靶标。其次对筛选出漏芦的关键成分和三阴性乳腺癌转移的关键靶标进行分子对接, 以评估化合物与靶标之间的亲和力, 并获得准确的组合模型。最后通过体外实验验证关键成分与靶标, MTT法评估细胞活性、细胞划痕实验评估运动能力, 并使用定量RT-PCR评估关键靶标mRNA表达。**结果** 网络药理学研究共获得了漏芦的4个关键成分(β -谷甾醇、甘草素、黄毒乙素、谷甾醇)和84个关键靶点。得到13个与三阴性乳腺癌转移相关的特定靶标, 其中层粘连蛋白 $\alpha 2$ (LAMA2)以及血管性血友病因子(VWF)是两个关键靶标, 靶标有效地富集在“细胞外基质相互作用”以及“局灶性粘连”两条信号通路。将筛选出的漏芦关键成分 β -谷甾醇、甘草素、黄毒乙素、谷甾醇与关键靶标LAMA2以及VWF进行分子对接研究, 结果显示 β -谷甾醇与LAMA2形成了最优构象。体外实验结果显示, 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇干预24 h、36 h时均能不同程度降低人三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞增殖率($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇干预24 h时可明显降低MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞运动能力。将50 $\mu\text{mol/L}$ β -谷甾醇干预MDA-MB-231细胞系24 h和36 h, 采用qRT-PCR检测LAMA2和涉及上皮间质转化的关键靶点[E-钙黏蛋白(CDH1)、N-钙黏蛋白(CDH2)、波形蛋白(VIM)] mRNA表达, 结果显示与24 h比较, LAMA2以及CDH1 mRNA表达在36 h均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** β -谷甾醇是漏芦干预三阴性乳腺癌转移的关键成分, 其能够有效地抑制细胞系的增殖, 可能是通过增强LAMA2和CDH1的表达实现的。

[关键词] 漏芦; 三阴性乳腺癌; 肿瘤转移; 整合药理学

乳腺癌导致的死亡主要是由转移引起^[1]。目前尽管内分泌治疗和人表皮生长因子受体2(Human epidermal growth factor receptor-2, HER2)靶向治疗取得了相当大的进展, 但有20%的乳腺癌患者会发生远处转移^[2]。无论从原发性肿瘤转移能力或是播散部位和时间, 乳腺癌均被广泛认为是一种复杂的异质性疾病^[3]。三阴性乳腺癌是乳腺癌特殊亚型, 其雌激素受体、孕激素受体以及HER2均呈阴性, 其治疗进展远落后于其他分子亚型, 这导致了三阴性乳腺癌的临床管理较差和转移率较高^[4]。

中医学称早期乳腺癌为“(乳)石痈”“乳

岩”, 指痈疽之至牢有根而硬如石者。肝、胃二经循行整个乳房, 其致病总属情志伤肝, 进而伤及脾胃, 以致气滞痰凝, 或冲任二经失调, 气滞血凝而发病。《太平惠民和剂局方》的千金漏芦汤、《三因极一病证方论》的漏芦散等均重用漏芦为君药, 以其退毒下脓之功治疗乳痈。漏芦清热解毒、通络消肿, 现代临床也将其作为治疗乳腺癌的常用药^[5], 但其仍存在药效物质及作用机理不明确等问题。单靶点的药理学研究思路不适用于中药复杂干预的特点, 因此, 寻找针对中药药效物质基础与现代肿瘤学基础原理相通的中医药抗癌研究思路和方法是需要不断探索的问题。

整合药理学融合了包括经典药理学、生物化

基金项目: 国家自然科学基金(81973677)

✉ 通讯作者: scgdoctor@126.com, (0536)8060165

学、医学及计算机技术、网络药理学等多学科方法,其交叉融合的思想与模式为中医药抗肿瘤的研究提供了思路。同时,整合药理学的方法为解析复杂的中药有效组分和疾病风险标志物信息提供了新方法,为从多途径、多靶点的复杂干预提供了技术支持。本研究基于整合药理学模型探讨漏芦干预三阴性乳腺癌转移的可能作用机制,以期在三阴性乳腺癌的临床治疗提供有效的中医药干预证据。

1 漏芦干预三阴性乳腺癌网络药理学分析

1.1 漏芦关键成分筛选及关键成分的靶点预测

漏芦的关键成分从 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 搜索获得。本研究中,对化合物的筛选预测是基于 TCMSP 数据库提供的 ADME (吸收、分布、代谢和排泄) 药代动力学行为模型,包括口服生物利用度、Caco-2 渗透性和药物相似性,并选择符合口服生物利用度 $\geq 30\%$ 、Caco-2 渗透性 > -0.4 、药物相似性 ≥ 0.18 标准的成分进行进一步研究。关键成分的靶点预测基于 TCMSP 以及 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 实现,预测靶点的准确信息从蛋白质注释数据库 UniProt (<https://www.uniprot.org>) 中提取。

结果显示,从 TCMSP 数据库中选择了 25 个从漏芦中提取的化合物,并严格按照 ADME 方法对活性成分进行评价,最终获得漏芦的 4 个关键成分,分别是 β -谷甾醇、甘草素、黄毒乙素、谷甾醇。基于 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 预测出 β -谷甾醇相关靶点 52 个,甘草素相关靶点 24 个,黄毒乙素相关靶点 15 个,谷甾醇相关靶点 18 个。筛选去重复后进一步从 UniProt 数据库中获得其正式名称,详细信息见表 1。

1.2 漏芦关键成分的网络构建和通路富集分析

将漏芦关键成分的靶点导入 STRING (<https://cn.string-db.org>),物种设置为“人类”,互作分数设置为 ≥ 0.4 ;将互作数据读入 Cytoscape 3.6.1 软件并实现可视化,靶点的通路富集分析基于插件 ClueGo 实现。

结果显示,关键靶点基于 STRING 实现网络互作,排除没有互作关系的靶标,构建了一个由 84 个节点和 435 个边组成的蛋白质相互作用网络图 (图 1)。该网络具有良好的互作属性,网络富集 $P < 0.01$ 。进一步对该网络进行通路分析,与肿瘤发生发展相关的凋亡通路、癌症通路、VEGF 通路被富集得到,并且与结直肠癌通路、肺癌通路等有密切关联,显示漏芦有良好的潜在抗肿瘤活性。

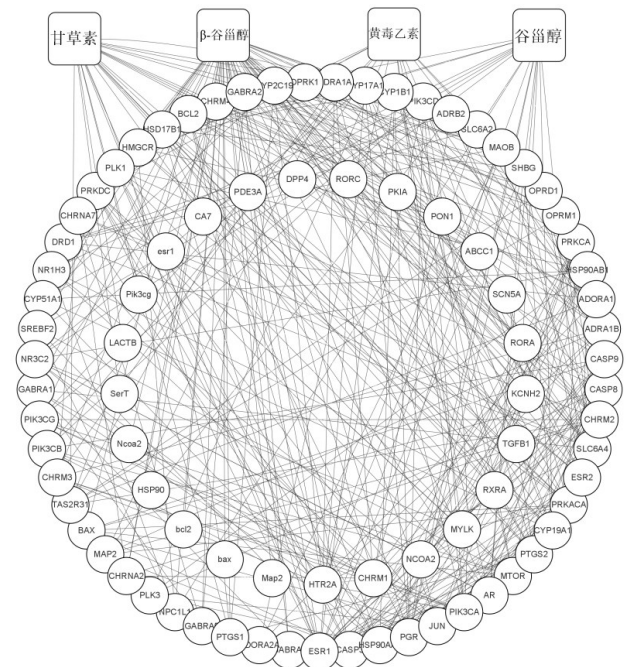


图1 漏芦关键成分与关键靶点互作网络图

表1 漏芦关键成分及其相关作用靶点

关键成分	靶点
β -谷甾醇	AR, HMGCR, CYP51A1, NPC1L1, NR1H3, CYP19A1, CYP17A1, RORC, ESR1, ESR2, SREBF2, SHBG, SLC6A2, CYP2C19, RORA, PGR, NCOA2, PTGS1, PTGS2, HSP90, PIK3CG, KCNH2, PRKACA, DRD1, CHRM3, CHRM1, SCN5A, GABRA2, CHRM4, PDE3A, HTR2A, GABRA5, ADRA1A, GABRA3, CHRM2, ADRA1B, ADRB2, CHRNA2, SLC6A4, OPRM1, GABRA1, CHRNA7, BCL2, BAX, CASP9, JUN, CASP3, CASP8, PRKCA, TGFB1, PON1, MAP2
甘草素	CYP19A1, ESR1, ESR2, HSD17B1, CA7, ABCC1, SHBG, CYP1B1, MAOB, TAS2R31, PTGS1, ADORA1, PTGS1, ESR1, PTGS2, RXRA, ADRB2, HSP90AB1, PIK3CG, PRKACA, LACTB, MAOB, SERT, PKIA
黄毒乙素	OPRK1, OPRM1, OPRD1, PRKDC, PIK3CA, MYLK, MTOR, PLK1, PIK3CD, PIK3CB, PIK3CG, PLK3, ADORA1, ADORA2A, DPP4
谷甾醇	AR, HMGCR, CYP51A1, NPC1L1, NR1H3, CYP19A1, CYP17A1, RORC, ESR1, ESR2, SREBF2, SHBG, SLC6A2, CYP2C19, RORA, PGR, NCOA2, NR3C2

1.3 三阴性乳腺癌转移相关靶标的筛选

从 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载三阴性乳腺癌样品的 mRNA 表达谱数据, 使用 limma 包, 将其与非三阴性乳腺癌进行差异分析, 鉴定出的差异表达 mRNA 被认定为三阴性乳腺癌特有的生物学靶标, 将其定义为靶标集合 A。从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 鉴定出包含原位乳腺癌和乳腺癌远处转移样本的芯片, 检索词为“Triple negative breast cancer”“Metastasis”, GEO2R 基于 limma 包实现差异分析, 获得乳腺癌转移相关靶标, 将其定义为靶标集合 B。统计标准设定为 $|\log FCI| > 2$ 且 $P < 0.05$ 。用 Venn 图整合两个靶标集合 A、B, 交集为三阴性乳腺癌转移相关的特定靶标。

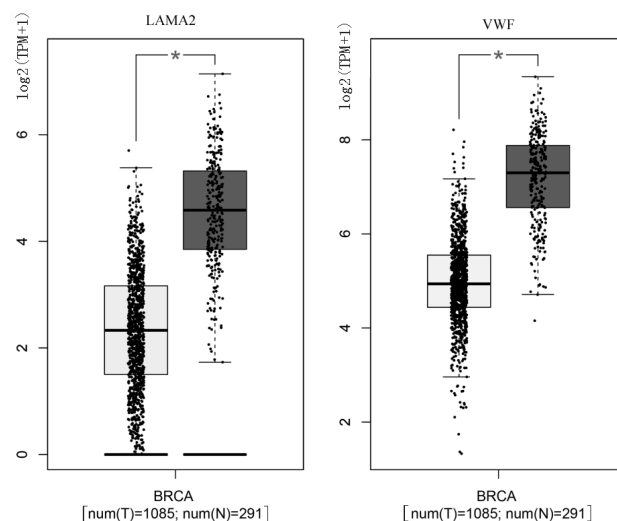
结果显示, 基于 TCGA 数据库下载乳腺癌的基因表达矩阵, 共 119 个三阴性乳腺癌样本转录组与临床数据被下载, limma 包差异分析共鉴定出 19553 个差异表达 mRNA, 根据截断标准 $|\log FCI| > 2$ 且 $P < 0.05$, 得到靶标集合 A, 共包含 224 个关键的差异表达 mRNA。从 GEO 数据库鉴定出芯片 GSE32531, 包括 13 个原位乳腺癌和 18 个乳腺癌远处转移样本。limma 包差异分析共鉴定出 1735 个差异表达 mRNA, 根据截断标准 $|\log FCI| > 2$ 且 $P < 0.05$, 得到靶标集合 B, 共包含 493 个关键的差异表达 mRNA。进一步将集合 A、B 取交集, 得到 13 个与三阴性乳腺癌转移相关的特定靶标, 分别是: LAMA2、MEX3A、ALDH2、EN1、SPARCL1、APOBEC3B、STEAP4、VWF、PRAME、TFF3、HORMAD1、HCAR1、SLC7A2。

1.4 三阴性乳腺癌转移相关靶标的通路富集

将上一步筛选得到的相关靶标读入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>), 获得 KEGG 途径图上可视化基因, $P < 0.05$ 作为截断标准。关键通路与靶标用作进一步研究。关键靶标的生存分析和差异表达分析是分别基于 Kaplan-Meier Plotter 生存分析网站 (<https://kmplot.com/analysis>) 和 GEPIA 基因表达互作分析网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 进行。

DAVID 结果显示, 靶标有效地富集在“细胞外基质相互作用”以及“局灶性粘连”两条信号通路, 表明关键靶标有效地集中在肿瘤转移方面。进一步发现, 层粘连蛋白 $\alpha 2$ (LAMA2) 及血管性血友因子 (VWF) 均在相关通路具有有效的富集, 差异表达验证被用于表征两个关键靶标 (图 2),

发现两者均在肿瘤中低表达。此外, 生存分析显示了 LAMA2 与预后风险的关联, 风险比 (HR) 为 0.68, 95% 置信区间 (0.55~0.84), $P < 0.01$ 。VWF 的 HR 为 0.92, 95% 置信区间 (0.74~1.14), $P = 0.44$ 。随后进一步进行分子对接研究。



注: LAMA2, 层粘连蛋白 $\alpha 2$; VWF, 血管性血友因子; BRCA, 乳腺癌; num (T), 肿瘤患者人数; num (N) 正常人数; TPM, 每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本数。

*指与正常人相比, $P < 0.05$ 。

图2 三阴性乳腺癌转移关键靶标 LAMA2 与 VWF 在正常人与乳腺癌患者的差异表达分析

2 漏芦治疗三阴性乳腺癌药靶分子对接的构象研究

分子对接是一种理论模拟方法, 用于研究配体和受体之间的相互作用, 并预测二者之间的结合方式和亲和力。近年来, 分子对接已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术^[6]。在本研究中, 将筛选出的漏芦关键成分 β -谷甾醇、甘草素、黄毒乙素、谷甾醇与关键靶标 LAMA2 及 VWF 进行分子对接研究。使用 SYBYL 2.1.1 软件实现漏芦关键成分与三阴性乳腺癌转移相关靶标的分子对接。小分子化合物的 2D 结构从 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库下载获得, 以 SDF 文件保存, 三阴性乳腺癌转移相关靶标的蛋白结构从 PDB (<https://www.rcsb.org>) 蛋白数据库获得。首先将蛋白导入 SYBYL 2.1.1 软件, 对于自带配体的蛋白选择“Ligand”模式将小分子化合物对接到配体位置, 对于无配体的蛋白选择“automatic”对接模式。进一步, 去水加氢, 加电荷, 生成活性口袋。最后, 将小分子读入 SYBYL 2.1.1 软件, 半柔性对接到活性位点, 完成打分。利用 C_Score 和

Total_Score 两者作为打分评判标准。最终结果显示, β -谷甾醇与 LAMA2(PDBID:5IK5, Total_Score: 8.0069, C_Score: 4) 形成了最优构象, 并且 β -谷甾醇与结合位点中的氢键相互作用。

3 漏芦治疗三阴性乳腺癌关键成分与靶标的体外实验验证

3.1 细胞培养及统计学方法

人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 购自 iCell Bioscience 公司。细胞在添加青霉素-链霉素溶液(双抗, Biosharp 公司, 货号 BL505A)、10% 胎牛血清的培养基(Gibco 公司, 货号 10099-141)中培养, 环境保持 37℃ 和 5% CO₂。所有的细胞培养工作都是在无菌条件下进行的。本研究结果使用 GraphPad Prism 6.0 统计软件和 ImageJ 1.53e 软件进行数据的定量分析。数据符合正态分布时用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 *t* 检验; 不符合正态分布时用中位数(四分位数间距)表示, 采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3.2 细胞增殖情况评定

选择 MTT 法评价不同药物浓度下的细胞增殖情况。将细胞以 10⁴ 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 药物干预前使用无血清培养基培养 4~6 h。首先设置浓度梯度进行药物剂量的初步筛选, 确定后续实验的有效浓度。分别将浓度 100、50、25、12.5、0 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -谷甾醇(成都德思特生物技术有限公司, 批号 DD0003)添加到每孔中, 空白组只添加培养基, 各组均设置 3 个复孔, MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 细胞孵育 12、24、36 h。随后每孔加入 MTT 溶液(0.5 mg/ml, Solarbio 公司, 批号 SP8400)继续孵育 4 h。最后, 在 37℃ 下每孔分别加入 150 μl 二甲基亚砜(Biosharp 公司, 批号

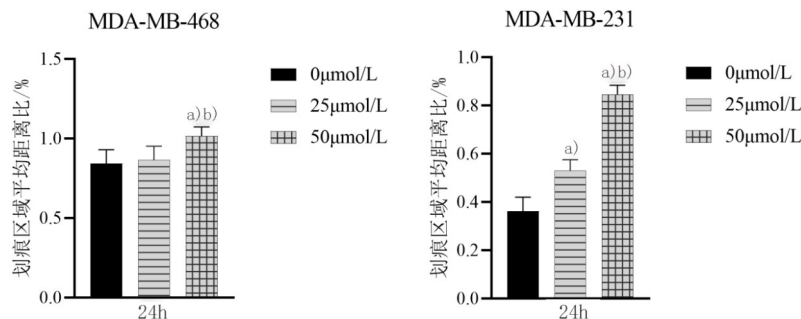
BL165B), 应用酶标仪(赛默飞世尔科技公司, Multiskan FC 型)测定二甲基亚砜在 570 nm 处的吸光度评估细胞的增殖情况。计算公式: 细胞增殖率(%) = $(\text{OD}_{\beta\text{-谷甾醇}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

在 MDA-MB-468 细胞系中, 干预 12 h 时仅 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇可降低细胞增殖率($P < 0.05$), 干预 24、36 h 时 12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇均可不同程度降低细胞增殖率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 MDA-MB-231 细胞系中, 干预 12 h 时 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇可降低细胞增殖率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 干预 24、36 h 时 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇均可降低细胞增殖率($P < 0.01$), 结果请扫描本文二维码获取。以上结果显示, β -谷甾醇从浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 、干预时间为 24 h 开始, 对两种细胞增殖都有显著的抑制作用, 故选择浓度 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -谷甾醇干预 24 h 后进行划痕实验。

3.3 细胞运动能力测定

采用划痕实验评估细胞运动能力。在划痕实验中, 将接种在 6 孔板中的 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 细胞培养到 90% 的合流率。使用枪头尖端手动刮去单层细胞。根据上述筛选出浓度和时间进行干预, 计算划痕区域平均距离比。划痕区域平均距离比 = $(\text{划痕距离}_{\text{实验组}} \div \text{划痕距离}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

图 3 示, 在 MDA-MB-468 细胞系中, 与 0、25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇可提高划痕区域平均距离比($P < 0.01$)。在 MDA-MB-231 细胞系中, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇均可提高划痕区域平均距离比($P < 0.01$); 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇均可提高划痕区域平均距离比($P < 0.01$)。以上结果表明 β -谷甾醇对肿瘤细胞迁移能力具有抑制作用。



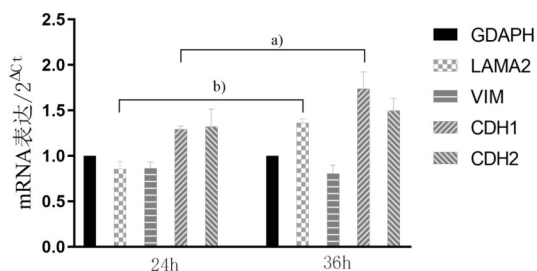
注: a) 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, $P < 0.01$; b) 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度比较, $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度 β -谷甾醇干预 24 h 对人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 细胞运动能力的影响

3.4 关键靶标 mRNA 表达检测

将 MDA-MB-231 细胞系暴露于浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ β -谷甾醇溶液的培养基中, 设置 4 个复孔, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 中培养 24 h 和 36 h。提取细胞的 mRNA, 反转录合成 cDNA。采用 qRT-PCR 检测 LAMA2 的表达, 并对涉及上皮间质转化 (EMT) 的关键靶点进行检测, 包括 E-钙黏蛋白 (CDH1)、N-钙黏蛋白 (CDH2)、波形蛋白 (VIM)^[7]。采用 qRT-PCR Trizol 试剂 (碧云天生物技术有限公司, 批号 R0016) 从三阴性乳腺癌细胞中提取总 RNA。使用 Transcriptor first strand cDNA 合成包 (TOYOBO 公司, 批号 fsq-101) 合成 cDNA。制备模板 DNA 扩增反应如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 min, 随后 40 个循环。每组使用两个重复的系统。使用的引物序列如下: LAMA2 (88 bp): 5'-CCTCCTCCTTCTGCTCTCC-3' (正向) 和 5'-TTGCTGATGTGCCTGTGACTGC-3' (反向); CDH1 (208 bp): 5'-AGTCACTGACACCAACGATAAT-3' (正向) 和 5'-ATCGTTGTTCCTGGATTGTG-3' (反向); CDH2 (142 bp): 5'-CGATAAGGATCAACCCCATACA-3' (正向) 和 5'-TTCA AAGTCGATTGCTTTGACC-3' (反向); VIM (140 bp): 5'-TGAATGACCGCTTCGCCAACTAC-3' (正向) 和 5'-CTCCCGCATCTCCTCCTCGTAG-3' (反向)。GAPDH (138 bp): 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' (正向) 和 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3' (反向)。

图 4 示, 干预 36 h 与 24 h 时比较, VIM 和 CDH2 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 LAMA2、CDH1 mRNA 表达均增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注: LAMA2, 层粘连蛋白 α_2 ; VIM, 波形蛋白; CDH1, E-钙黏蛋白; CDH2, N-钙黏蛋白。

a) 与 24 h 比较, $P<0.05$; b) 与 24 h 比较, $P<0.01$ 。

图 4 β -谷甾醇干预 24 h、36 h 对人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中关键靶标 mRNA 表达的影响

4 讨论

近年来, 中医药作为干预手段在肿瘤的临床治疗上越来越受到关注。随着网络药理学、系统生物学和计算机科学等方法学的提升和技术的不断革新, 以及其与中医药的理论背景的有效结合, 使中医药的表征达到了前所未有的新高度^[8-9]。本研究基于整合药理学模型, 通过网络药理学整合基因大数据的筛选分析, 获得漏芦和三阴性乳腺癌转移相关的靶标; 采用分子对接筛选药物和靶标之间的亲和力, 以直接揭示药物分子和靶标之间的相互作用、阐明二者的构效关系; 最终以体外实验验证漏芦的活性与作用机制。

漏芦, 味苦性寒, 归胃经, 《神农本草经》载: “主治皮肤热毒, 恶疮疽痔, 湿痹, 下乳汁”。本品苦寒降泄, 有清热解毒、消痈散结之效, 又因其能通经下乳, 故尤为治乳痈、乳岩之良药^[10]。有现代研究^[11-12]显示, 漏芦能有效地调节 Wnt、AKT/GSK-3 β 等信号传导途径, 并表现出广泛的抗肿瘤活性。在此基础上, 本研究通过 ADME 模型以及分子对接等预筛选, 明确了 β -谷甾醇在漏芦干预肿瘤效力中的关键作用, β -谷甾醇与 LAMA2 形成了最优构象。体外实验发现, β -谷甾醇能够有效地抑制人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 的细胞活性, 筛选出最佳干预浓度 (25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 和最佳干预时间 (24 h)。此外, β -谷甾醇对人三阴性乳腺癌细胞迁移能力具有抑制作用, 且 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 β -谷甾醇对 MDA-MB-231 与 MDA-MB-468 细胞运动能力均能显著抑制, 提示 β -谷甾醇对三阴性乳腺癌转移有潜在干预作用。

β -谷甾醇是一种天然的生物活性植物甾醇, 大量存在于富含脂肪的植物性食物中, 如坚果、种子以及豆类等^[13]。既往研究表明其在免疫调节、抗菌、抗炎、降脂、抗氧化等方面有广泛的药用活性^[14]。本研究通过整合药理学模型筛选分析, 明确了 β -谷甾醇对三阴性乳腺癌的调节作用, 增加了其药用范围, 补充了 β -谷甾醇以及相关中药在抗肿瘤领域的应用范围。

肿瘤转移事件的发生目前认为常与 EMT 相关, 其允许上皮细胞经历实质性的生化改变, 并实现间充质表型^[15-16]。这一过程改变了细胞-细胞和细胞-细胞外基质的黏附, 表现为黏附能力的降低, 细胞骨架的重组和流动性的增加^[17], 进一步导致肿瘤

细胞发生转移。其中以 CDH1、CDH2 等为代表的可促进 EMT 的转录因子, 被描述为 EMT 程序的主要驱动因素^[18-20], 这些转录因子之间的相互连接创建了肿瘤进展所需的信号网络。本研究还发现, LAMA2 在三阴性乳腺癌转移过程中有潜在价值, 尤其是 KEGG 通路富集显示, LAMA2 有效地富集在“细胞外基质相互作用”以及“局灶性粘连”, 这也显示出中医药干预疾病的多靶点特性。既往研究显示 LAMA2 与肿瘤有广泛相关性, 膀胱癌^[21]、卵巢癌^[22]、胰腺癌^[23]、肺腺癌^[24] 均与 LAMA2 相关, 这也从侧面验证本研究结果的可信性。本研究结果显示, 与干预 24 h 时比较, 干预 36 h 时 LAMA2、CDH1 mRNA 表达均增加, 显示了 β -谷甾醇抑制肿瘤转移的可能干预作用机制。

总之, 本研究的结果反映了 LAMA2 和 CDH1 在三阴性乳腺癌转移过程中的潜在病理作用, 以及其能作为漏芦干预疾病的有效靶点。但本研究也有一定的局限性, 首先基于网络药理学与分子生物大数据的分析虽然会提供一些新的认识, 但同时也有可能是在降维筛选过程中遗失一些关键靶点信息。其次, 漏芦关键成分的筛选是基于数据库进行的, 其有效成分的丰富度存在更新不及时的情况, 未来相关数据库的不断更新和丰富也可能导致本研究结果的更新。本研究构建了一个将网络药理学与生物信息学相结合的整合模型, 并进行了体外验证, 这种模式可以作为中医药多目标干预疾病机制研究的范例, 为中药临床应用提供基础。

参考文献

- [1] SIEGEL MB, HE X, HOADLEY KA, et al. Integrated RNA and DNA sequencing reveals early drivers of metastatic breast cancer [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128 (4): 1371-1383.
- [2] DAVIES C, GODWIN J, GRAY R, et al. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials [J]. *Lancet*, 2011, 378 (9793): 771-784.
- [3] TOBIN NP, HARRELL JC, LÖVROT J, et al. Molecular subtype and tumor characteristics of breast cancer metastases as assessed by gene expression significantly influence patient post-relapse survival [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26 (1): 81-88.
- [4] MILLER KD, NOGUEIRA L, MARIOTTO AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69 (5): 363-385.
- [5] 李晓彤. 基于数据挖掘探究李秀荣教授治疗乳腺癌临床用药规律及临证思辨特点 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [6] FONTANA RJ, CIRULLI ET, GU J, et al. The role of HLA-A *33: 01 in patients with cholestatic hepatitis attributed to terbinafine [J]. *J Hepatol*, 2018, 69 (6): 1317-1325.
- [7] NIETO MA, HUANG RY, JACKSON RA, et al. EMT: 2016 [J]. *Cell*, 2016, 166 (1): 21-45.
- [8] 李梢. 网络靶标: 中药方剂网络药理学研究的一个切入点 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (15): 2017-2020.
- [9] 张晓雨, 杨欣宇, 张琴, 等. 方证相应理论的系统生物学研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45 (6): 1335-1337.
- [10] 杨美珍, 王晓琴, 刘勇, 等. 祁州漏芦化学成分与药理活性研究 [J]. *中成药*, 2015, 37 (3): 611-618.
- [11] 繆成贵, 徐健, 高虎, 等. 禹州漏芦总黄酮抑制佐剂性关节炎大鼠 Wnt 信号 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (1): 129-133.
- [12] CAO ZQ, WANG XX, LU L, et al. β -sitosterol and gemcitabine exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activity by modulating apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition by deactivating Akt/GSK-3 β signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1525. doi: 10.3389/fphar.2018.01525.
- [13] BABU S, JAYARAMAN S. An update on β -sitosterol: a potential herbal nutraceutical for diabetic management [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110702. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110702.
- [14] MSBINSAYEED, KARIM SMR, SHARMIN T, et al. Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: a plant-derived orphan phytosterol [J]. *Medicines (Basel)*, 2016, 3 (4): 29.
- [15] AIELLO NM, KANG Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis [J]. *J Exp Med*, 2019, 216 (5): 1016-1026.
- [16] CHO ES, KANG HE, KIM NH, et al. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42 (1): 14-24.
- [17] THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (6): 442-454.
- [18] FEARON ER. Cancer: context is key for E-cadherin in invasion and metastasis [J]. *Curr Biol*, 2019, 29 (21): R1140-R1142.
- [19] LOH CY, CHAI JY, TANG TF, et al. The E-cadherin

- and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges[J]. Cells, 2019, 8(10): 1118.
- [20] MENDONSA AM, NA TY, GUMBINER BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(35): 4769-4780.
- [21] ZHANG Z, LIANG Z, LI D, et al. Development of a CAFs-related gene signature to predict survival and drug response in bladder cancer[J]. Hum Cell, 2022, 35(2): 649-664.
- [22] DIAO B, YANG P. Comprehensive analysis of the expression and prognosis for laminin genes in ovarian cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2021, 27: 1609855. doi: 10.3389/pore. 2021. 1609855.
- [23] ZHANG M, ZENG L, PENG Y, et al. Immune-related genes LAMA2 and IL1R1 correlate with tumor sites and predict poor survival in pancreatic adenocarcinoma[J]. Future Oncol, 2021, 17(23): 3061-3076.
- [24] LIANG J, LI H, HAN J, et al. Mex3a interacts with LAMA2 to promote lung adenocarcinoma metastasis via PI3K/AKT pathway [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 614.

Mechanism of Loulu (*Radix Rhapontici*) Intervention on the Metastasis of Triple-negative Breast Cancer: based on the Integrative Pharmacological Model

WANG Bowen¹, WANG Congcong¹, LIU Cun², SUN Changgang¹

1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan, 250012; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Loulu (*Radix Rhapontici*) intervention on the metastasis of triple-negative breast cancer (TNBC) through the construction of integrative pharmacological model.

Methods Firstly, the key components and targets of Loulu were selected by network pharmacology, and then the specific targets and key targets of TNBC metastasis were selected. Secondly, molecular docking was used to evaluate the affinity between key components of Loulu and key targets of TNBC metastasis and to obtain an accurate combinatorial model. Finally, the key components and targets were verified in vitro, while the cell viability and motor ability were evaluated by MTT assay and cell scratch assay, and the mRNA expression of key targets was evaluated by quantitative RT-PCR. **Results** A total of four key components (β -sitosterol, liquiritigenin, xanthotoxin B, sitosterol) and 84 key targets were obtained in this network pharmacology study. Finally, Thirteen specific targets were found to be associated with TNBC metastasis, of which laminin $\alpha 2$ (LAMA2) and von Willebrand factor (VWF) were the two key targets, with efficient enrichment in the “extracellular matrix interaction” and “focal adhesion” signaling pathways, respectively. Molecular docking was performed between identified key components of Loulu (β -sitosterol, liquiritigenin, xanthotoxin B, sitosterol) and the key targets including LAMA2 and VWF, showing best docking conformation of β -sitosterol with LAMA2. The in vitro results showed that β -sitosterol at the concentration of 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h and 36 h could effectively reduce the proliferation rate of TNBC MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells with varying degrees ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The motility of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells was significantly reduced by 50 $\mu\text{mol/L}$ β -sitosterol intervention for 24 h. qRT-PCR was used to detect mRNA expression of LAMA2 and key targets involved in epithelial-mesenchymal transition including E-cadherin (CDH1), N-Cadherin (CDH2), and Vimentin (VIM), and the results showed that compared with 24 h of 50 $\mu\text{mol/L}$ β -sitosterol intervention on MDA-MB-231 cell line, the 36 h intervention significantly increased the mRNA expressions of LAMA2 and CDH1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** β -Sitosterol is a key component of Loulu in the intervention of TNBC metastasis, which can effectively inhibit the proliferation of cell lines possibly by enhancing the expression of LAMA2 and CDH1.

Keywords Loulu (*Radix Rhapontici*); triple-negative breast cancer; metastasis; integrative pharmacological model

(收稿日期: 2022-01-21; 修回日期: 2022-03-01)

[编辑: 邓媛]