doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.10.007

蛇葡萄素抗乳腺癌的网络药理学分析及细胞试验研究*

李 月[1,2],周 永[3],张芸绮[2],王妙然[1,2],蔺晓菁[2],钟 莹[1,2],李继斌[1△]

(1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院重大代谢性疾病转化医学重点实验室,重庆 400016; 3. 重庆市巴南区人民医院临床营养科,重庆 401320)

摘要:目的 探讨蛇葡萄素(AMP)抗乳腺癌的药理学作用机制。**方法** 通过 Pubchem 数据库获取 AMP3D 分子结构,上传至 PharmMapper 数据库,获得 AMP 作用靶点基因,利用 Genecards 数据库获取乳腺癌疾病靶点基因;通过 Venny R 软件获得 AMP 与乳腺癌作用靶点交集,并输入 String 数据库,以 Cytoscape3.2.1 软件构建"药物－靶点－疾病"可视化网络;再进行 GO 和 KEGG 富集分析。体外培养 MDA－MB－231 细胞,通过 CCK－8 试验、划痕试验、迁移及逆转录聚合酶链反应进行验证。**结果** 共选出 119 个靶基因;GO 富集分析显示,靶基因主要集中在氧化应激等生物学过程;KEGG 通路富集分析显示,AMP 抗乳腺癌作用靶基因涉及 PI3K－Akt,MAPK,Ras 等信号通路。体外验证试验结果显示,AMP 可明显抑制 MDA－MB－231 细胞增殖和迁移,下调关键靶基因非受体酪氨酸激酶和基质金属蛋白酶 2 的表达。**结论** 该研究为 AMP 用于乳腺癌的防治提供了理论依据和研发思路。

关键词:蛇葡萄素;网络药理学;乳腺癌;细胞试验;作用机制

中图分类号:R965 **文献标志码:A** **文章编号:1006－4931(2021)10－0023－06**

Network Pharmacological Analysis and Cell Test Research of Ampelopsin Against Breast Cancer

LI Yue[1,2], *ZHOU Yong*[3], *ZHANG Yunqi*[2], *WANG Miaoran*[1,2], *LIN Xiaojing*[2], *ZHONG Ying*[1,2], *LI Jibin*[1]

(*1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016; 2. Chongqing Key Laboratory of Translational Medicine in Major Metabolic Diseases, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016; 3. Department of Clinical Nutrition, People's Hospital of Ba'nan District, Chongqing, China 401320*)

Abstract: Objective To investigate the pharmacological mechanism of ampelopsin(AMP) in the treatment of breast cancer. **Methods** AMP 3D molecular structure was obtained from PubChem database and uploaded to PharMapper to obtain AMP target genes. The breast cancer target genes were obtained by Genecards database. The intersection of AMP and breast cancer target was obtained by Venny R software and input into the String database to construct the "drug－target－disease" visual network by Cytoscape 3.2.1 software. GO and KEGG enrichment analysis was performed. MDA－MB－231 cells were cultured *in vitro* and verified by CCK－8, scratch, migration and RT－qPCR. **Results** A total of 119 target genes were screened. GO enrichment analysis showed that the target genes were mainly concentrated in biological processes such as oxidative stress, and KEGG enrichment analysis showed that the target genes of AMP anti－breast cancer were involved in PI3K－Akt, MAPK, Ras and other signaling pathways. The results of *in vitro* validation test showed that AMP could significantly inhibite the proliferation and migration of MDA－MB－231 cells, and down－regulate the expression of key target genes, nonreceptor tyrosine kinase(SRC) and matrix metalloproteinase－2(MMP2). **Conclusion** This study provides a theoretical basis and the research ideas for the application of AMP in the prevention and treatment of breast cancer.

Key words: ampelopsin; network pharmacology; breast cancer; cell test; mechanism of action

乳腺癌为常见恶性肿瘤,2018 年乳腺癌发生率位居全球恶性肿瘤第 2,病死率第 5[1]。目前,乳腺癌的临床治疗措施主要有手术切除、放射治疗(简称放疗)、化学治疗(简称化疗)和分子靶向治疗。随着早期诊断和治疗策略的改进,患者预后明显改善,但仍有较多患者最终出现肿瘤复发和耐受现象。蛇葡萄素(AMP)又名二氢杨梅素(DMY),属黄酮类化合物。植物化学研究表明,DMY 和杨梅素分别是藤茶中的 2 种主要黄酮类化合物。AMP(20%～30%,*m*/*m*)的含量远高于杨梅素(1.5%～3.0%,*m*/*m*)[2]。AMP 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物学活性[3]。网络药理学以系统生物学为基础,对"药物－靶点－疾病"间关系进行分析,强调对信号通路的多调节途径,与中药"多成分－多靶点－多通路"的作用机制相似[4]。本研究中运用网络药理学方法预测 AMP 作用靶点及相关信号通路,并结合细胞试验对潜在作用靶点进行验证,阐释 AMP 抗乳腺癌的作用机制。现报道如下。

1 靶点研究

1.1 靶点获取

AMP 靶点:通过 Pubchem 数据库获取 AMP 的 3D

*基金项目:教育部电磁辐射医学防护重点实验室开放课题[2017DCKF002]。

第一作者:李月,女,土家族,在读硕士研究生,研究方向为天然化合物与代谢性疾病防治,(电子信箱)895018264@qq.com。

△通信作者:李继斌,男,博士,教授,研究方向为天然化合物与代谢性疾病防治,(电子信箱)100091@cqmu.edu.cn。

分子结构，保存为 sdf 格式，然后上传至 PharmMapper 数据库，得到 AMP 作用的靶点基因，根据 fit score 进行排序，利用 UniProt 数据库的 Retrieve/ID Mapping 功能，将靶点的 UniProt ID 转换为 Gene Symbol。

疾病靶点：以“breast cancer”作为关键词，检索 GeneCards 数据库，并进行筛选，获取疾病相关靶点数据集。使用 R 4.0.4 软件，提取 AMP 与疾病靶点中的共同靶点，作为 AMP 治疗乳腺癌的潜在作用靶点（即药物－疾病共同靶点）。

1.2 蛋白相互作用（PPI）网络的构建及关键靶点筛选

将上述过程获得的靶点交集导入 String 蛋白质分析平台，蛋白种类设置为“Homo sapiens”，构建 PPI 网络图，输出结果格式为 TSV 格式。将文件中的 node1 和 node2 信息导入 Cytoscape 3.2.1 软件中绘制 PPI 网络图，利用“Tools”中的“Network Analysis”功能进行网络拓扑结构分析，以大于或等于中位数 1 倍值的接近中心度和介数中心度，以及大于或等于中位数 2 倍值的度值为筛选标准。值越大表明节点在网络中的地位越重要，从而筛选出关键靶点。

1.3 关键靶点的生物过程与信号通路分析

将筛选出的关键靶点导入 R 4.0.4 软件中建模，对关键靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析，探讨 AMP 关键靶点的功能分布，预测 AMP 潜在的调控通路。

将上述过程获得的靶点交集导入 String 蛋白质分析平台，将蛋白种类设置为“Homo sapiens”，构建 PPI 网络图，输出结果格式为 TSV 格式。将文件中的 node1 和 node2 信息导入 Cytoscape 3.2.1 中绘制 PPI 网络图，利用“Tools”中的“Network Analysis”功能进行网络拓扑结构分析，以大于或等于中位数 1 倍值的接近中心度和介数中心度及大于或等于中位数 2 倍值的度值为筛选标准；值越大表明节点在网络中的地位越重要。将 PharmMapper 数据库 AMP 作用靶点与 GeneCards 得到的乳腺癌相关基因进行比对，筛选出 119 个 AMP－乳腺癌潜在作用靶点。结果见图 1 和图 2。

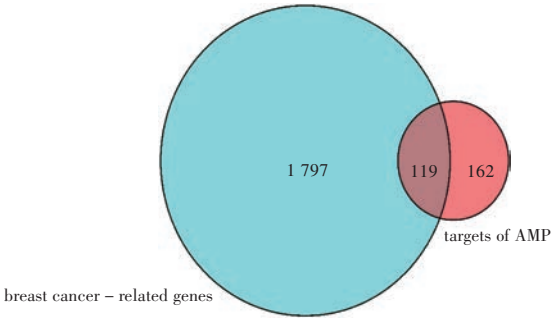


图 1 蛇葡萄素抗乳腺癌靶点分析

Fig. 1 The anti－breast cancer targets of ampelopsin

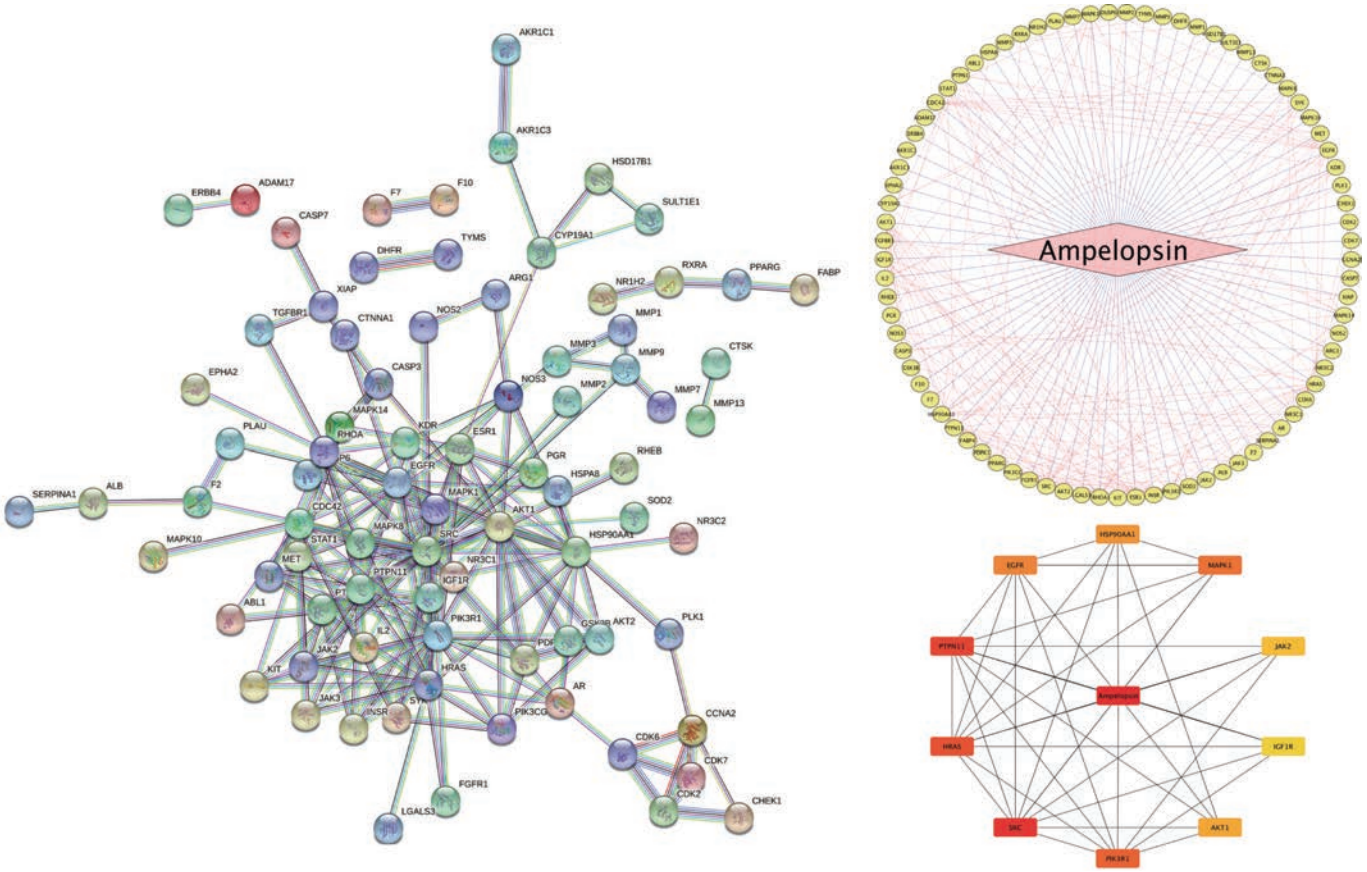


图 2 蛇葡萄素抗乳腺癌 PPI 网络分析

Fig. 2 Protein－protein interaction（PPI） network of ampelopsin against breast cancer

1.4 关键靶点的生物过程与信号通路分析

将筛选出的关键靶点导入 R 4.0.4 软件中建模，对关键靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析，探讨 AMP 关键靶点的功能分布，预测 AMP 潜在的调控通路。GO 富集分析结果表明，这些靶点被富集到 1 926 个生物学过程，与 response to oxidative stress，response to reactive oxygen species，cellular response to oxidative stress，regulation of MAP kinase activity，peptidyl－tyrosine phosphorylation 5 个生物学过程密切相关；在细胞组分方面，靶点富集最多的是 focal adhesion，cell－substrate adherens junction，cell－substrate junction；在分子功能中，主要起作用的是 endopeptidase activity 和 protein serine/threonine kinase activity。结果见图 3 A（图中 BP 为生物过程，CC 为细胞组分，MF 为分子功能）。

KEGG 通路富集分析结果显示，与 83 个潜在靶点基因显著相关（$P \leqslant 0.05$）的通路有 63 条，排名靠前的信号通路为：PI3K－Akt signaling pathway、MAPK signaling pathway、Ras signaling pathway 等，涉及基质金属蛋白酶 2（MMP2）和非受体酪氨酸激酶（SRC）等。结果见图 3 B。

2 细胞验证试验

2.1 仪器、试药与细胞

仪器：3111 型 CO_2 培养箱、1510 型酶标仪（美国 ThermoFisher 公司）；AX10 型倒置荧光显微镜（德国 Zeiss 公司）；CFX96 型实时定量聚合酶链反应仪（美国 Bio－Rad 公司）。

试药：AMP（成都曼斯特生物科技有限公司，批号为 A0049，含量≥98%）；CCK－8 检测试剂盒（日本同仁公司）；Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒（大连宝生物工程有限公司）；PRMI 1640 培养基和胎牛血清（FBS）均购自美国 Gibco 公司；Transwell 小室（美国 Coning 公司）；PCR 引物（生工生物工程＜上海＞股份有限公司）。

细胞：三阴性乳腺癌细胞 MDA－MB－231（受赠于重庆医科大学公共卫生与管理学院练雪梅教授）。

2.2 对 MDA－MB－231 细胞活力的影响

采用 CCK－8 法。于 37 ℃及 5% CO_2 条件下，培养 MDA－MB－231 细胞至对数生长期，调整细胞密度至每 1 mL 1×10^4 个，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL。设定 AMP 浓度分别为 0，20，40，60，80，100 μmol/L，每组设 5 个复孔，作用 24 h。培养结束后加入 CCK－8，于 450 nm 波长处测定吸光度（A），计算细胞活力。细胞活力 $=(A_{试验}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白}) \times 100\%$，$A_{试验}$ 为具有细胞、CCK 溶液和 AMP 溶液的吸光度，$A_{空白}$ 为具有培养基和 CCK 溶液而无细胞的吸光度；$A_{对照}$ 为具有细胞、CCK 溶液而无 AMP 溶液的吸光度。结果，与 0 μmol/L 比较，AMP 浓度为 20，40，60，80，100 μmol/L 时细胞活力显著减弱，40 μmol/L 作用最明显。结果见图 4。采用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件分析，行 Dunnett－t 和独立样本 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义（下同）。

2.3 对 MDA－MB－231 细胞迁移的影响

采用划痕试验及 Transwell 试验。将 MDA－MB－231 细胞接种于 6 孔板中，待细胞生长至 80% ～90% 后，利用 200 μL 枪头进行垂直划痕。磷酸盐缓冲溶液（PBS）清洗 3 次，加入一定浓度的 AMP 处理细胞 24 h，分别在 0 h 和 24 h 时镜下观察并采集图片。将 MDA－MB－231 细胞接种于 6 孔板中，加入 20，40，60 μmol/L 的 AMP 处理细胞 24 h 后，将细胞接种于无基质胶小室。上室加入不含血清的培养基（200 μL），下室加入含 10% FBS 的培养基（600 μL）。24 h 后，细胞置 4% 多聚甲醛中固定 15 min，PBS 清洗细胞 3 次后，结晶紫染色液（0.05 mmol/L）染色 20 min，在荧光显微镜下观察。结果见图 5。

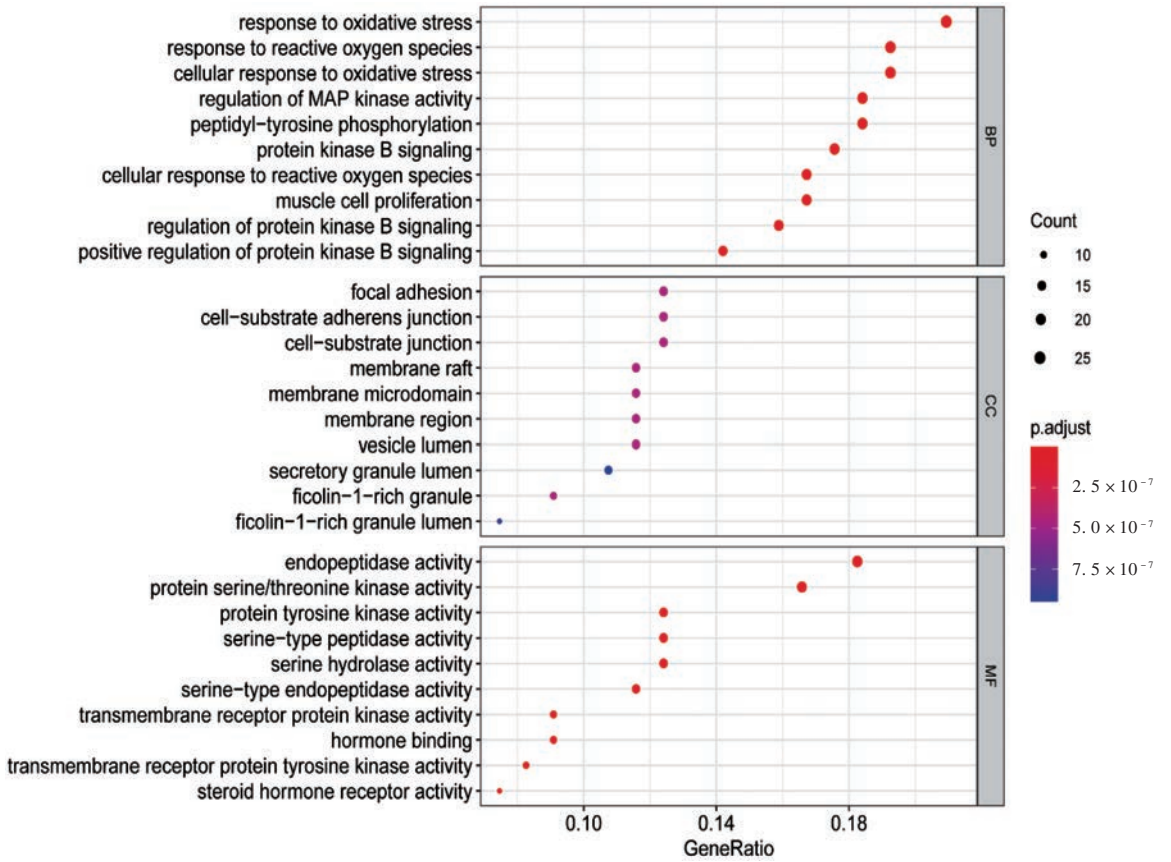
2.4 对 MDA－MB－231 细胞 MMP2 和 SRC mRNA 表达的影响

采用逆转录定量聚合酶链反应（RT－PCR）法。收集细胞，细胞按 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中，以 Trizol 法提取总 RNA，逆转录合成 cDNA，以 β－actin 引物为内参。PCR 条件：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 4 s，58 ℃退火 10 s，65 ℃延伸 5 s，共 40 个循环。以 BioRad CFX 软件记录扩增曲线和 C_t 值，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量，试验重复 3 次。引物序列见表 1，结果见图 6。

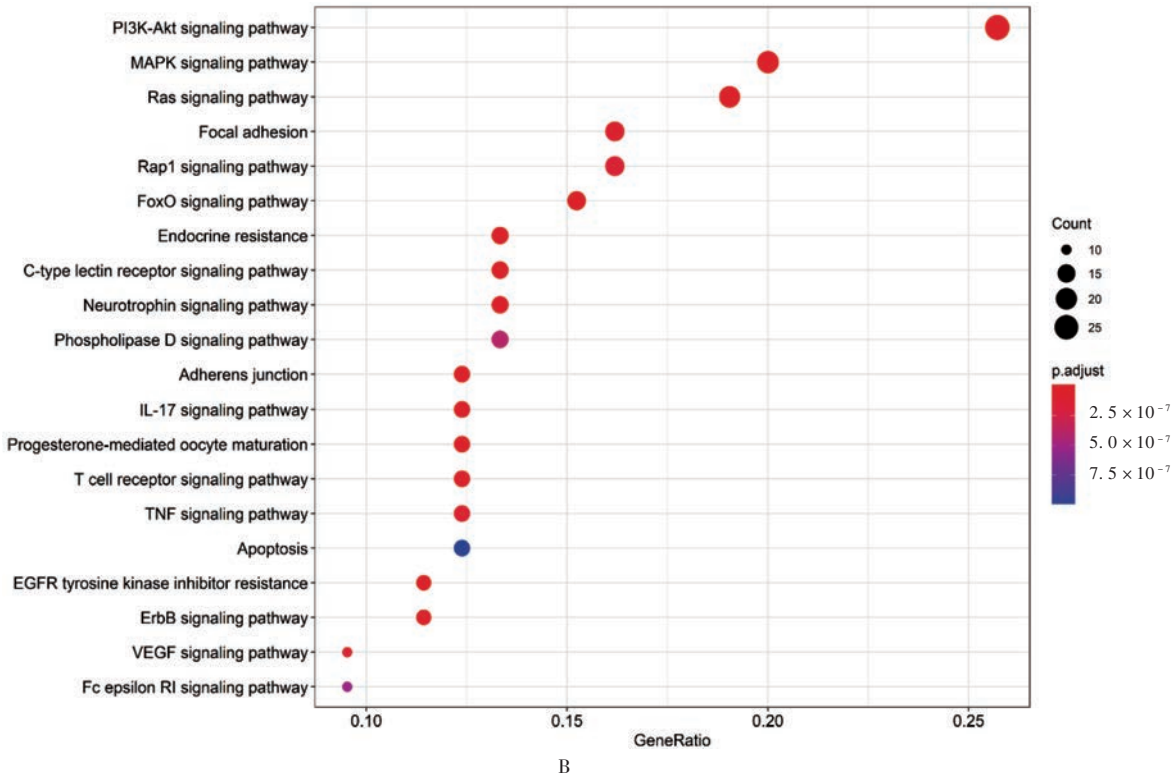
3 讨论

乳腺癌发病率和死亡率逐年上升，2018 年全球癌症报告显示其占新发女性癌症的 24.2%[1]。根据常规病理学分型，乳腺癌分为激素受体阳性、表皮生长因子受体 2 阳性和三阴性[5]3 种类型。三阴性乳腺癌（TNBC）是指患者的雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和表皮生长因子受体 2（HER2）均为阴性，具有复发率高、病死率高和侵袭性强的临床特点[6]。本研究中采用的 MDA－MB－231 细胞即为 TNBC 细胞。目前，临床对乳腺癌的治疗多采取化疗，其存在很大的耐药性和复发性，预后极差。

有研究发现，显齿蛇葡萄富含的 AMP 具有良好的抗癌（尤其对骨瘤、胃癌和乳腺癌）作用[7－9]。有研究证实，AMP 可通过抑制乳腺癌细胞 Akt/mTOR 通路，诱导细胞死亡[10]；通过 MAPK 和 PI3K/Akt 信号传导可促进高热诱导的淋巴癌细胞凋亡[11]；可有效抑制乳腺癌荷瘤小鼠的肿瘤生长，且对模型小鼠的心、肝、肾功能均无明显影响[12]；也有研究探讨了 AMP 抑制肿瘤生长的可能机制，包括细胞周期阻滞、诱导细胞死亡和增加细胞内活性氧（ROS）的产生等信号通路[13]。



A



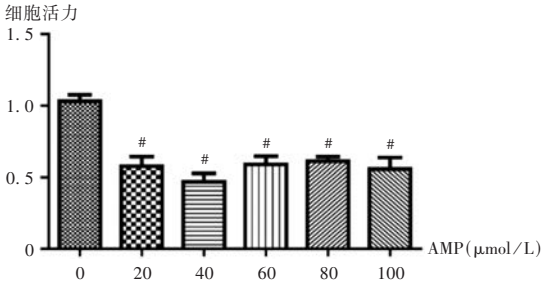
B

A. GO 富集分析 B. KEGG 通路富集分析

图 3 蛇葡萄素抗乳腺癌靶点 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

A. Go enrichment analysis B. KEGG pathway enrichment analysis

Fig. 3 Go enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of the anti – breast cancer targets of ampelopsin



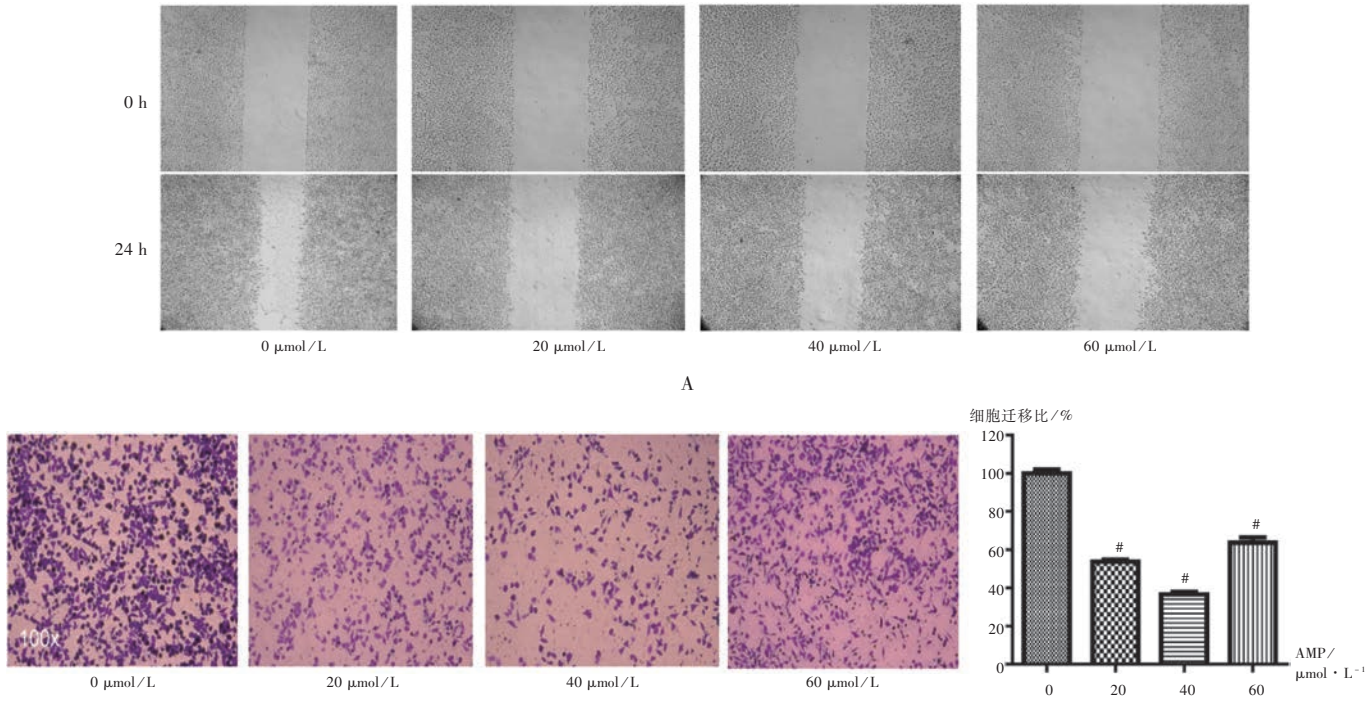
注：与 0 μmol/L 比较，$^{\#}P<0.01$。图 5、图 6 同。

图 4 MDA－MB－231 细胞生长情况

Note: Compared with those at the concentration of 0 μmol/L, $^{\#}P<0.01$, as well as Fig. 5 and Fig. 6.

Fig. 4 The proliferation of MDA－MB－231 cells

本研究中利用网络药理学方法分析获得 AMP 作用于乳腺癌相关靶基因共 119 个。通过 PPI 网络筛选出 10 个关键靶点，包括 MMP2，SRC，PTPN11，HRAS 等。进一步对核心靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析，初步预测出 AMP 通过氧化应激反应等功能途径及 PI3K－Akt 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路等多条通路途径发挥治疗乳腺癌的作用。此外，本研究中以 MDA－MB－231 细胞试验加以验证。结果表明，AMP 作用 MDA－MB－231 细胞 24 h 能明显抑制细胞的活力及迁移，同时抑制与增殖迁移相关的 MMP2 和 SRC mRNA 的表达。但本研究结果显示，AMP 对细胞迁移能力的抑制作用并非严格呈剂量依赖性，40 μmol/L 抑制



A. 划痕试验结果（×100） B. Transwell 试验结果

图 5 MDA－MB－231 细胞迁移能力

A. Results of Scratch test（×100） B. Results of Transwell test

Fig. 5 The migration ability of MDA－MB－231 cells

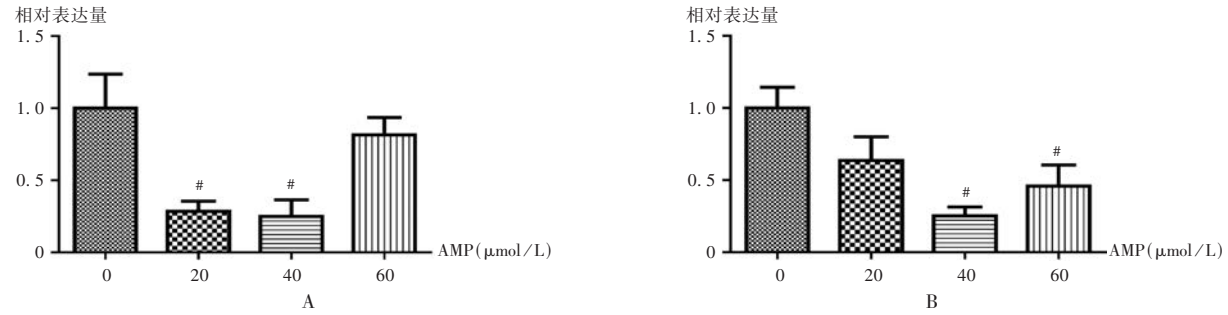
表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	序列
MMP2	上游 ATTGTATTTGATGGCATCGCTC
	下游 ATTCATTCCCTGCAAAGAACAC
SRC	上游 TGCGAGAAAGTGAGACCACGAAAG
	下游 ACTGGGTGCGGGAGGTGATG
β－actin	上游 CCTGGCACCCAGCACAAT
	下游 GGGCCGGACTCGTCATAC

能力强于 60 μmol/L，该现象与其他研究结果类似[14]，但具体机制还需进一步证实。

在关键靶点中，采用细胞试验观察了 AMP 对 SRC 的作用。SRC 与细胞增殖、分化、存活和侵袭相关[15]。已有研究发现，其通过 PI3K，MAPK，STAT3，FAK 信号通路介导癌细胞生长、迁移和血管生成[16－17]。黏着斑激酶（FAK）是一种非受体酪氨酸激酶，FAK－SRC 复合物在许多肿瘤细胞中被激活，FAK 和 SRC 的催化活性在促进蛋白酶相关肿瘤转移方面扮演着重要角色[18]。大量研究显示，MMP 尤其是 MMP2 和 MMP9 涉及肿瘤迁移环节[19]。有研究表明，AMP 通过减少 MMP2 的表达来减弱增殖性玻璃体视网膜病变（PVR）的侵袭和迁移[20]；在肝癌细胞中，AMP 也发挥了抑制肝癌细胞的迁移和侵



A. MMP2 B. SRC

图6 MMP2和SRC mRNA表达情况

A. MMP2 B. SRC

Fig. 6 The mRNA expression of MMP2 and SRC

袭作用[21]。在本研究中，AMP可显著降低MDA-MB-231细胞的MMP2表达水平，提示MMP2可能是AMP抑制肿瘤细胞迁移的关键靶点。

综上所述，AMP治疗乳腺癌具有多成分、多靶点、多途径的特点。本研究为AMP应用于乳腺癌的防治提供了理论依据和研发思路。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.

[2] ZHANG J, CHEN Y, LUO H, et al. Recent Update on the Pharmacological Effects and Mechanisms of Dihydromyricetin[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 1204.

[3] 杨 楠, 贾晓斌, 张振海, 等. 黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 373-381.

[4] 代吉瑞, 魏文峰, 霍金海, 等. 网络药理学在中医药领域的研究进展[J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(6): 105-107.

[5] TSANG JYS, TSE GM. Molecular Classification of Breast Cancer[J]. Advances in Anatomic Pathology, 2020, 27(1): 27-35.

[6] HE MY, RANCOULE C, REHAILIA-BLANCHARD A, et al. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies[J]. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2018, 131: 96-101.

[7] ZUO Y, LU Y, XU Q, et al. Inhibitory effect of dihydromyricetin on the proliferation of JAR cells and its mechanism of action[J]. Oncology Letters, 2020, 20(1): 357-363.

[8] LIU C, ZHAO P, YANG Y, et al. Ampelopsin suppresses TNF-α-induced migration and invasion of U2OS osteosarcoma cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(6): 4729-4736.

[9] ZHOU Y, SHU F, LIANG X, et al. Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89021.

[10] ZHOU Y, LIANG X, CHANG H, et al. Ampelopsin-induced autophagy protects breast cancer cells from apoptosis through Akt-mTOR pathway via endoplasmic reticulum stress[J]. Cancer Science, 2014, 105(10): 1279-1287.

[11] FENG QW, CUI ZG, JIN YJ, et al. Protective effect of dihydromyricetin on hyperthermia-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma cells[J]. Apoptosis, 2019, 24(3/4): 290-300.

[12] 张明亮, 刘先富, 陈 晨, 等. 二氢杨梅素对乳腺癌模型小鼠的抑瘤作用及其对小鼠肝、肾毒性的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2019, 40(4): 6-8.

[13] CHANG H, PENG X, BAI Q, et al. Ampelopsin suppresses breast carcinogenesis by inhibiting the mTOR signalling pathway[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(8): 1847-1854.

[14] 周防震, 张晓元, 詹远京, 等. 二氢杨梅素抑制人乳腺癌细胞侵袭和下调MMP-2/-9蛋白表达研究(英文)[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(4): 352-358.

[15] ZHOU J, XU M, LE K, et al. SRC Promotes Tamoxifen Resistance in Breast Cancer via Up-Regulating SIRT1[J]. Onco Targets and Therapy, 2020, 13: 4635-4647.

[16] ROSKOSKI R JR. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors[J]. Pharmacological Research, 2015, 94: 9-25.

[17] JIN W. Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications[J]. Cancers, 2020, 12(5): 1339.

[18] MITRA SK, SCHLAEPFER DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2006, 18(5): 516-523.

[19] EATEMADI A, AIYELABEGAN HT, NEGAHDARI B, et al. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 86: 221-231.

[20] WANG K, YANG SF, HSIEH YH, et al. Effects of dihydromyricetin on ARPE-19 cell migration through regulating matrix metalloproteinase-2 expression[J]. Environmental Toxicology, 2018, 33(12): 1298-1303.

[21] ZHANG QY, LI R, ZENG GF, et al. Dihydromyricetin inhibits migration and invasion of hepatoma cells through regulation of MMP-9 expression[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(29): 10082-10093.

(收稿日期：2021-02-25)