

芦荟大黄素通过 RRS1/HIF-1 α 信号通路抑制三阴性乳腺癌血管生成的作用机制研究

华亚男^{1,2,*}, 吴红娇¹, 沈星茹¹, 曾佑琴^{1,2}, 国锦琳^{1,2,*}

¹成都中医药大学医学技术学院;

²成都中医药大学医学技术学院 川渝共建感染性疾病中西医结合诊治重庆市重点实验室, 成都 611137

摘要:探究芦荟大黄素 (aloe-emodin, AE) 抑制三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 血管生成的作用、直接靶点及分子机制。体外以 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ AE 处理 TNBC 细胞, 采用 CCK-8、划痕/Transwell 及血管形成实验分别检测增殖、迁移侵袭和血管生成能力; 体内建立异种移植瘤模型, 免疫组化检测肿瘤细胞密度和血小板内皮细胞黏附分子-1 (cluster of differentiation 31, CD31) 微血管密度。采用分子对接、pull-down 和细胞热位移分析 (cellular thermal shift assay, CETSA) 鉴定靶点, 并通过敲减/过表达及 Western blot 验证信号通路。结果显示, AE 浓度依赖性抑制 TNBC 细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成, 体内降低肿瘤细胞密度和微血管密度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。分子对接、pull-down 和 CETSA 结果显示, AE 可靶向结合核糖体合成调节因子 1 (ribosome biogenesis regulator 1 homolog, RRS1) 并抑制其表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 敲减 RRS1 抑制 TNBC 细胞血管生成, 过表达则相反 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。转录组联合 Western blot 提示 RRS1 调控缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 通路, AE 可调节 RRS1 及下游 HIF-1 α 相关蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。综上, AE 抑制 TNBC 血管生成可能通过下调 RRS1/HIF-1 α 通路为其潜在机制。

关键词: 芦荟大黄素; RRS1; 血管生成; 三阴性乳腺癌; HIF-1 α

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)9-1863-18

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.9.001

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.9.001

Aloe-emodin inhibiting angiogenesis in triple-negative breast cancer via the RRS1/HIF-1 α signaling pathway

HUA Ya-nan^{1,2,*}, WU Hong-jiao¹, SHEN Xing-ru¹, ZENG You-qin^{1,2}, GUO Jin-lin^{1,2,*}

¹College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional

Chinese Medicine; ²College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional

Chinese Medicine, Chongqing Key Laboratory of Sichuan-Chongqing Co-construction for Diagnosis and

Treatment of Infectious Diseases Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: This study aims to investigate the effect of aloe-emodin (AE) on inhibiting angiogenesis in triple-negative breast cancer (TNBC), its direct target, and the underlying molecular mechanism. *In vitro*, TNBC cells were treated with AE at 0, 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$, and cell proliferation, migration/invasion, and angiogenic capacity were assessed by CCK-8, wound healing/Transwell, and tube formation assays, respectively. *In vivo*, a xenograft tumor model was established, and immunohistochemistry was used to detect tumor cell density and microvessel density based on CD31 (cluster of differentiation 31) staining. Molecular docking, pull-down assays, and cellular thermal shift assay (CETSA) were employed to identify the target, and knockdown/overexpression combined with Western blot were used to verify the signaling pathway. The results showed that AE suppressed TNBC cell proliferation, migration, invasion, and angiogenesis in a concentration-dependent manner, and reduced tumor cell density and microvessel density *in vivo* ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). Molecular docking, pull-down,

收稿日期: 2026-04-15 接受日期: 2026-07-24

基金项目: 国家自然科学基金 (82505697); 四川省自然科学基金 (2022NSFC0733); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (MPRC2021017)

* 通信作者 E-mail: huayanan@cdutcm.edu.cn, guojinlin@cdutcm.edu.cn

and CETSA revealed that AE could directly bind to ribosome biogenesis regulator 1 homolog (RRS1) and downregulate its expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). Knockdown of RRS1 inhibited angiogenesis, while overexpression had the opposite effect ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). Transcriptomic analysis combined with Western blot suggested that RRS1 regulated the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) pathway, and AE modulated the expression of RRS1 and downstream HIF-1 α -related proteins ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). In conclusion, AE may inhibit TNBC angiogenesis through downregulating RRS1, with the HIF-1 α pathway serving as a potential downstream mechanism.

Key words: aloe-emodin; RRS1; angiogenesis; triPle-negative breast cancer; HIF-1 α

乳腺恶性肿瘤是女性癌症相关死亡的主因之一^[1,2]。TNBC 以雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 均阴性为特征,具有低分化、高侵袭性和高复发转移率,预后为乳腺癌亚型中最差^[3]。尽管诊疗进步延长了患者生存^[2],复发转移仍是 TNBC 死亡主因。因缺乏有效靶点与生物标志物,且分子分型复杂,TNBC 治疗面临严峻挑战,亟需高效新药^[3],肿瘤血管生成是驱动 TNBC 进展、侵袭与转移的关键环节^[4,5]。HIF-1 α /血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 通路为 TNBC 血管生成的核心机制之一, HIF-1 α 积累及核转位,上调 VEGFA 转录,促进新生血管形成^[6]。因此,靶向抑制 HIF-1 α /VEGFA 通路以调控血管生成,是遏制 TNBC 进展的重要策略。

传统本草典籍所载的植物源化学成分,具有来源广泛、疗效确切及生物相容性良好等优势,正逐渐成为颇具潜力的抗肿瘤药物候选物^[7]。近年来,天然产物通过靶向肿瘤血管生成发挥抗肿瘤作用的研究日益受到关注,多酚类、多糖类、生物碱、萜类等多种天然产物已被证实具有抗血管生成活性。针对 TNBC,黄酮类化合物可通过诱导凋亡、阻滞细胞周期、抑制血管生成等多层次、多靶点机制发挥抗癌作用,而多种植物化学小分子也被报道具有抗 TNBC 血管生成的潜力^[5]。AE 是一种蒽醌类化合物,其母核由三环芳香体系构成,C3 位连接羟甲基,C6 位为羟基,具有典型的蒽醌结构特征。该化合物广泛存在于百合科植物芦荟 (*Aloe vera*)、蓼科植物大黄 (*Rheum palmatum*) 以及豆科植物扁豆 (*Dolichos biflorus*) 等多种药用植物中^[8],具有抗炎和抗肿瘤等多种药理活性。已有研究表明,AE 可通过诱导细胞凋亡在多种恶性肿瘤中发挥抗癌作用。然而,专门针对 AE 在 TNBC 中的抑制作用及其分子机制的研究较为有限,且现有报道多集中于细胞增殖表型,缺乏对体内药效、具体靶点及信号通路的深入探讨。此外,在抗血管生成方面,早期研究发现 AE 可抑制结肠癌细胞的迁移和血管生成,其机制涉及下调基

质金属蛋白酶-2/9 (matrix MetalloProteinase-2/9, MMP-2/9)、Ras 同源基因家族成员 B (Ras homolog gene family, member B, RhoB) 和 VEGFA 的表达;另有研究指出,AE 的抗血管生成作用可能与抑制尿激酶分泌和内皮细胞管状结构形成有关^[9]。那么,AE 是否通过特异性靶向某条信号通路来抑制 TNBC 的血管生成过程? 其体内安全性与有效性如何? 这些问题在现有文献中尚缺乏系统研究。因此,本研究旨在探讨 AE 对 TNBC 体外及体内血管生成能力的影响,并初步阐明其分子机制,以期为 TNBC 的治疗提供新的实验依据。

RRS1 通过参与核糖体 RNA 加工和核糖体亚基组装,在核糖体合成中发挥关键作用,并可从蛋白质合成层面影响中药药理效应。近年来,RRS1 在乳腺癌发生发展中的重要性日益受到关注。RRS1 作为核糖体生物合成的重要调控蛋白,其表达水平在多种恶性肿瘤中显著上调。最新研究证实,RRS1 在乳腺癌细胞系中的表达水平显著高于正常乳腺上皮细胞,且 *RRS1* 敲低可显著抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移能力^[10]。上调表达的 *RRS1* 可通过促进核糖体 RNA 的转录与加工、加速蛋白质合成,进而驱动肿瘤细胞周期进程,增强细胞增殖能力。此外,抑制 RRS1 表达还可调控凋亡相关通路,促进乳腺癌细胞凋亡。另有研究表明,*RRS1* 过表达与肿瘤细胞对多种化疗药物的耐药性密切相关。综上,RRS1 被视为乳腺癌潜在的预后标志物及抗肿瘤治疗靶点^[10,11]。在分子水平上,RRS1 调控细胞周期动力学及应激反应相关的转录网络,并可能影响肿瘤血管生成。已有研究表明,RRS1 调节磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白 (phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B/mechanistic target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 通路,该通路对 HIF-1 α 的稳定化和 VEGFA 的上调至关重要。这些研究提示,RRS1 可能是抗血管生成治疗中的潜在靶点。然而,能够调控 RRS1 活性的药物分子尚未见报道,AE 与 RRS1 之间的调控关系亦尚待阐明。

鉴于 RRS1 在核糖体生物合成及应激调控中的关键作用,推测其可能参与肿瘤微环境适应与血管生成调控,但该功能及作为 AE 直接靶点的可行性尚待验证。因此,本研究旨在系统探讨 AE 通过调节 RRS1 及其下游信号通路在 TNBC 血管生成中的作用与调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及动物

人源 TNBC 细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-468,人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及人脐静脉内皮细胞(HUVECs)由成都中医药大学医学技术学院提供。

24 只 SPF 级雌性,BALB/c 裸鼠,4~6 周龄,体重 14~16 g(动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,动物使用许可证:SYXK(川)2023-0275),实验动物饲养在 SPF 动物房,温度维持在 22~24℃,相对湿度在 55%~60%,本实验经动物伦理委员会批准(批准号:SYXK2023-0082)。

1.1.2 主要试剂

AE(纯度:98.32%,批号:M4000-202402,美国 MedChemExpress 公司);顺铂(cisplatin,CDDP)(纯度:99.84%,批号:T1564,美国 TargetMol Chemicals Inc. 公司);DMEM 培养基(批号:6125659,中国赛默飞世尔科技公司);ECM-2 内皮细胞生长培养基(批号:38941,中国安诺伦(北京)生物科技有限公司);胎牛血清(批号:SA240910,中国武汉普诺赛公司);抗生素-抗真菌溶液(批号:2500060011,中国北京索莱宝科技有限公司);0.25% 胰蛋白酶-EDTA(纯度:0.25%,批号:2500120050,中国北京索莱宝科技有限公司);ECM-2 SingleQuots 添加剂(批号:CC-4176,美国 Lonza Group Limited 公司);DMSO(批号:67-68-5,中国奥默生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(批号:20A02A60,中国武汉博士德生物工程有限公司);RIPA 裂解液(批号 20109A02,中国上海雅酶生物技术公司);4% 多聚甲醛(纯度:4%,批号:24132702,中国兰杰柯科技有限公司);Matrigel 基质胶(批号:354263,美国 Corning Incorporated 公司);Transwell 小室(批号:3422,美国 Corning Incorporated 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号:03911450,中国上海雅酶生物技术公司);ECL 化学发光超敏显色试剂盒(批号:4AW011-100,中国四正柏生物科技有限公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:

04A21059,中国雅酶生物技术公司);RRS1(批号:00107032,中国武汉三鹰生物技术有限公司);HIF-1 α (批号:N30JL01,成都正能生物技术有限责任公司);VEGFA(批号:00125924,中国三鹰生物技术有限公司);磷脂酶 C γ 1(phospholipase C gamma 1,PL-CG1)(批号:N12JA24,成都正能生物技术有限责任公司);p-PLCG1(批号:370372,成都正能生物技术有限责任公司);细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)(批号:22h9958,中国亲科生物研究中心有限公司); β -actin(批号:66009-1-Ig,中国武汉三鹰生物技术有限公司);HRP 标记羊抗兔/鼠 IgG 二抗(批号:34i9522,中国苏亲科生物研究中心有限公司);PVDF 膜(批号:0000161946,美国 MilliPore 公司);结晶紫(纯度:G1062,批号:2500060011,中国索莱宝科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器

II60 CO₂ 恒温细胞培养箱(美国赛默飞世尔仪器有限公司);ID3 多功能酶标仪(中国美谷分子仪器有限公司);TI-2U 倒置荧光显微镜(日本尼康公司);Centrifuge5424 R 高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司);TGL-16 低速离心机(中国湘仪集团);Tanon-5200Multi 全自动化学发光成像系统(中国上海天能科技有限公司);LifeECO PCR 仪(中国杭州博日科技股份有限公司);FQD-96C 实时荧光定量 PCR(中国四川杰莱美科技有限公司);PowerPace-Basic + Mini-protean + MiniTrans-Blot 蛋白电泳系统(美国 Biorad 公司);。

1.2 细胞培养及给药处理

MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-10A 及 HUVECs 细胞均按标准条件培养。其中,MDA-MB-231、MDA-MB-468 及 MCF-10A 细胞培养于含 10% 热灭活胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)及 1% 抗生素-抗真菌溶液的 DMEM 高糖完全培养基中;HUVECs 则培养于含 2% FBS 并添加 EGM-2 SingleQuots 生长因子的 EGM-2 培养基。所有细胞均置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中,每日更换新鲜培养液。当细胞融合度达到 80%~90% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化传代。

AE 以 DMSO 溶解配制成 10 mmol/L 母液,临用前以完全培养基稀释至目标浓度,溶剂对照组加入等体积 DMSO,终浓度 $\leq 0.1\%$ (V/V)。给药浓度基于前期预实验及文献综合确定:首先采用 CCK-8 法检测 AE 对 MDA-MB-231、MDA-MB-468 及 MCF-

10A 细胞处理 24 h 后的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}), 结合相关文献报道的用药范围^[12], 确定实验干预浓度。

1.3 CCK-8 法检测细胞活力

将 MDA-MB-231、MDA-MB-468 及 MCF-10A 细胞以 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板, 每孔加 100 μ L 完全培养基, 培养 24 h 后, 实验组加入含不同浓度 AE 的新鲜培养基, 对照组加等体积 DMSO, 分别继续培养 24、48 h。每孔加入 CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 多功能酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值。实验独立重复 3 次, 每次设 3 个复孔。

1.4 集落形成实验

MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞以 500 个/孔密度接种于 6 孔板, 含血清 DMEM 培养基培养, 贴壁 24 h 后, 常氧条件 (37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、21% O_2) 下加入不同浓度 AE、CDDP 或等体积 DMSO (0.1%) 处理, 每 3 天更换含相应浓度药物的培养基, 连续培养 10~14 d。PBS 洗涤细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 充分洗涤后自然干燥。ImageJ 软件 (v2.1.0) 计数含 50 个细胞以上的集落, 实验独立重复 3 次。

1.5 伤口愈合实验

MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞以 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板, 培养至融合度 90%~95%, 无菌 200 μ L 移液枪头沿直尺在单层细胞表面划直线伤口, PBS 洗涤 3 次去除脱落细胞。加入含不同浓度 AE、CDDP 或等体积 DMSO 的无血清培养基, 分别于划痕后 0、12、24、48 h 倒置相差显微镜下观察并拍照。ImageJ 软件测量划痕宽度, 计算细胞迁移率, 细胞迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 各时间点划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。实验独立重复 3 次。

1.6 Transwell 迁移实验

使用 Corning Transwell 小室 (孔径 8 μ m, 24 孔板) 评估细胞迁移行为。用无血清培养基稀释 Matrigel 基质胶 (1:9 比例稀释), 向每个 Transwell 上室加入 50~100 μ L 稀释后的基质胶, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育至少 1 h 使其凝固。MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞经不同浓度 AE 和 CDDP 预处理 24 h, 胰蛋白酶消化后无血清 DMEM 培养基重悬, 调整细胞密度为 5×10^4 个/200 μ L, 接种于 Transwell 上室; 下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基作为趋化诱导剂。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱孵育 24 h 后,

无菌棉签擦拭去除上室未迁移细胞, 下室细胞经 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min。PBS 洗涤后倒置显微镜下观察, 随机选取 5 个视野拍照并计数迁移细胞数, 实验独立重复 3 次。

1.7 血管生成实验

本研究所用无生长因子的 Matrigel 基质胶、无菌移液耗材和微量离心管均在 4 $^{\circ}$ C 下预平衡 30 min。在无菌条件下, 使用预冷的移液器将 50 μ L Matrigel 均匀分注到 96 孔板中培养。实验组包含收集自经 4 个浓度 AE (0、10、20、40 μ mol/L) 和 5 nmol/L CDDP 处理后的 TNBC 细胞的条件培养基, 每个浓度设 3 个技术重复。所有预聚步骤均在控温工作台上于冰上操作, 以维持基质胶的粘度。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下聚合 60 min 后, 收集融合度达 90% 的 HUVECs, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 300 $\times$ g 离心 5 min, 并通过自动细胞计数仪进行定量。将细胞以每孔 1×10^4 个细胞的浓度重悬于 100 μ L 含 AE 的培养基中接种。孵育 5 h 后, 使用显微镜对毛细管样网络进行成像。采用 NIH ImageJ 软件及其 Angiogenesis Analyzer 插件分析定量形态学参数——即每视野总管长度和分支点数。

1.8 生物素标记与 pull-down 实验

1.8.1 生物素标记

生物素与 PEG 溶于二氯甲烷, 室温磁力搅拌至完全溶解, 冻干得生物素-PEG 粉末。反应体系中加入 20 mL 冷水, 有机溶剂萃取 3 次, 合并有机层, PBS 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥。浓缩后经硅胶柱层析纯化, 获得生物素标记的 AE 小分子化合物。

1.8.2 pull-down 实验

蛋白提取: 对数生长期 TNBC 细胞加入含 $1 \times$ 蛋白酶抑制剂混合物及 IP 裂解缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 摇床裂解 2 h, 每 30 min 涡旋振荡 1 次; 4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times$ g 离心 20 min, 取上清, 再次 4 $^{\circ}$ C、10 000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度并调至一致。

沉降步骤: ①链霉亲和素凝胶平衡: 混匀链霉亲和素凝胶悬浮液, 取 50 μ L 加入离心柱, 塞紧底塞置于收集管, 加 250 μ L TBS, 开盖敞底后 1 300 $\times$ g 离心 60 s, 重新塞紧底塞; ②小分子固定: 加 300 μ L 5 mmol/L 生物素标记小分子或纯生物素, 盖紧顶盖及底塞, 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜, 次日开盖敞底 1 300 $\times$ g 离心 60 s, 弃流穿液; ③生物素封闭: 加 250 μ L 生物素封闭试剂, 室温平衡 5 min, 1 300 $\times$ g 离心 60 s, 重复

1 次;④捕获靶蛋白:加 300 μ L 蛋白样品(1 mg),盖紧顶盖,4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜,次日开盖敞底 1 300 $\times$ g 离心 60 s,收集流穿液备用;⑤洗涤与洗脱:加 250 μ L 洗涤缓冲液,室温孵育 1 min,1 300 $\times$ g 离心 60 s,重复洗涤 1 次;最后加 200 μ L 洗脱缓冲液,1 300 $\times$ g 离心 60 s,收集洗脱液用于后续检测。

1.9 分子对接

芦荟大黄素的三维 SDF 结构从 PubChem 数据库(<http://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取,并使用 OPenBabel 2.3.2 转换为 MOL2 格式。随后使用 AutoDockTools 对配体进行预处理:添加氢原子、计算部分电荷、指定原子类型,并生成用于对接的 PDBQT 文件。核心靶点的晶体结构从 PDB 数据库下载,筛选标准包括:分辨率优于 0.25 nm、无共结晶配体或突变、来源于人类。使用 AutoDock Tools 对 PDB 结构进行预处理:删除水分子、添加极性氢、计算 Kollman 电荷,并将受体转换为 PDBQT 格式。分子对接使用 AutoDock Vina 1.1.2 版本进行。结合亲和力使用 Seaborn (Python 库)或 GraPhPad Prism 可视化热图。配体与靶蛋白之间的相互作用模式使用 PyMOL 进行可视化和分析,并保存关键相互作用图。

1.10 Western blot 实验

对数生长期 MDA-MB-231 及 MDA-MB-468 细胞经不同浓度 AE 处理 24 h 后,预冷 PBS 洗涤 2 次,加入含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 并反复吹打;4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 15 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品调至相同浓度,加样缓冲液后 100 $^{\circ}$ C 金属浴变性 10 min,以 30 μ g/孔上样量进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜。含 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h,分别加入 RRS1、HIF-1 α 、VEGFA、PLCG1、p-PLCG1 (Tyr783)、ERK 及 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。TBST 洗涤 3 次(每次 10 min),加入 HRP 标记二抗室温孵育 1 h,再次 TBST 洗涤 3 次。ECL 化学发光法显色,ChemIDoc 凝胶成像系统拍摄条带图像,ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参计算目标蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.11 CETSA

对数生长期 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞接种于 2 个 100 mm 培养皿,培养至融合度约 80%,实验组加 40 μ mol/L AE 处理 2 h,对照组加等

体积 DMSO。胰蛋白酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次后重悬,每组均分成 7 份(每份 50 μ L)。设置 40、43、46、49、52、55、58 $^{\circ}$ C 温度梯度,PCR 仪中分别加热 3 min,室温放置 3 min 后-80 $^{\circ}$ C 冷冻过夜。样品反复冻融 2 次裂解细胞,4 $^{\circ}$ C、20 000 $\times$ g 离心 20 min,取上清,加样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,Western blot 法检测 RRS1 及 β -actin 蛋白表达。ImageJ 软件分析条带灰度值,将 RRS1 信号强度归一化至 β -actin,以温度为横坐标、相对蛋白含量为纵坐标绘制蛋白热稳定性曲线。实验独立重复 3 次。

1.12 转录组测序

对数生长期 MDA-MB-231 细胞经 AE 处理 48 h 后,TRIzol 法提取总 RNA,核酸分析仪评估 RNA 纯度、浓度及完整性,选取 RIN 值 > 8.0 的样品用于后续实验。Oligo (dT)磁珠富集 mRNA,片段化试剂打断后逆转录合成 cDNA 第 1 条链,再合成第 2 条链,纯化后构建 cDNA 文库并进行 Illumina 高通量测序。

测序数据经 FastQC 质控,Trimmomatic 软件去除低质量序列及接头序列;clean reads 通过 HISAT2 比对至人类参考基因组 (GRCh38);StringTie 软件进行转录本组装及基因表达定量;DESeq2 软件筛选差异表达基因,筛选阈值为 $|\log_2 \text{FC}| > 1$ 且调整后 P 值(adj. P) < 0.05;clusterProfiler 软件对差异表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.13 RNA 提取与 qPCR

对数生长期 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞经 AE 处理 48 h 后,TRIzol 法提取总 RNA,核酸分析仪评估 RNA 纯度、浓度及完整性,反转录获取 cDNA。使用 SYBR Green qPCR 试剂盒在实时荧光定量 PCR 仪上对 cDNA 进行扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平,并以 GAPDH 基因作为内参对照。

1.14 动物体内实验

对数生长期 MDA-MB-231 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后,无菌 PBS 重悬为 5×10^6 个/mL 细胞悬液,每只裸鼠右侧腋窝靠后背皮下接种 200 μ L,观察肿瘤的生长情况,肿瘤可触及且体积稳定增长暨造模成功(造模成功率 100%)。待肿瘤体积生长至约 100 mm³(肿瘤体积 = 长径 $\times$ 短径² $\times$ 0.5)时,将荷瘤鼠随机分为 4 组($n = 6$):溶剂对照组(0.9% NaCl)、AE 低剂量组(10 mg/kg)、AE 中剂量组(20 mg/kg)、AE 高剂量组(40 mg/kg)。腹腔注射给药,每 2 d 给药 1 次,给药体积 100 μ L/10 g

体重,连续给药 21 d,每隔 1 d 记录小鼠体重及肿瘤长、短径并计算肿瘤体积。

给药结束后,CO₂ 安乐死法处死小鼠,完整剥离肿瘤组织,称重并拍照;部分肿瘤组织置于 4% 多聚甲醛固定,用于 HE 染色及 CD31 免疫组化染色;另一部分液氮速冻后-80 ℃ 保存,用于 Western blot 实验检测肿瘤组织中 RRS1 及 HIF-1 α 的蛋白表达。

1.15 HE 染色

4% 多聚甲醛固定的肿瘤组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,制备 5 μ m 厚连续切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,苏木精染色 5 min,自来水冲洗 5 min;1% 盐酸乙醇分化 30 s,0.2% 氨水返蓝 1 min,自来水充分冲洗;伊红染色 2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学显微镜下观察并拍照,比较各组肿瘤组织细胞形态、坏死区域及基质变化。

1.16 免疫组织化学染色

肿瘤组织石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后,置于 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(PH 6.0)中 95 ℃ 加热 15 min 进行抗原修复,自然冷却后 PBS 洗涤 3 次(每次 5 min);3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 洗涤 3 次;5% BSA 室温封闭 1 h,倾去封闭液后滴加 CD31 一抗,4 ℃ 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,滴加 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,DAB 显色试剂盒显色,苏木精复染细胞核,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性

树胶封片。光学显微镜下观察并拍照,每张切片随机选取 5 个高倍视野,ImageJ 软件测量阳性区域积分光密度值,计数 CD31 阳性微血管数目以评估微血管密度。

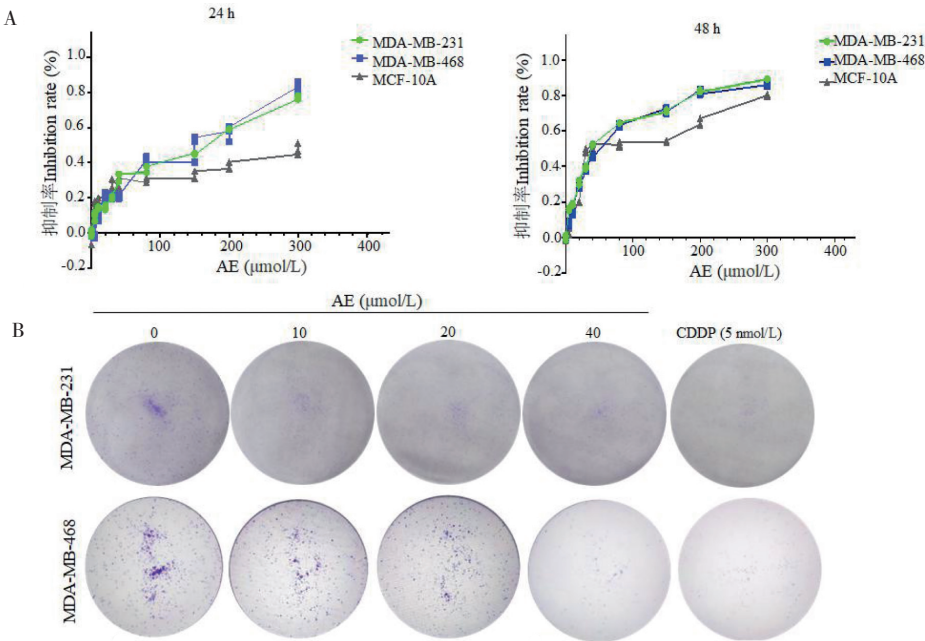
1.17 统计学分析

所有实验均独立重复 3 次,定量数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 GraPhPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间多重比较采用 Tukey 事后检验;两组间比较采用双尾 Student *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果分析

2.1 AE 对 TNBC 细胞的增殖、迁移、侵袭及血管生成的影响

采用 CCK-8 法检测细胞活力。AE 处理 48 h 对细胞的抑制效果高于 24 h,48 h 结果显示,MDA-MB-231、MDA-MB-468 及 MCF-10A 细胞的 IC₅₀ 分别为 85.59、94.28 和 126.19 μ mol/L(见图 1A),提示 AE 对 TNBC 细胞具有相对选择性的细胞毒性作用。结合参考文献及 IC₅₀ 结果,后续实验选取 10、20、40 μ mol/L 进行处理,阳性药物对照采用 CDDP,浓度为 5 nmol/L。集落形成实验结果表明,AE 呈浓度依赖性显著抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的集落形成能力,CDDP 组亦几乎完全抑制集落形成,其效应与 AE 高浓度组(40 μ mol/L)相当(见图 1B)。划痕愈合实验显示,AE 处理后 2 种 TNBC 细



续图 1(Continued Fig.1)

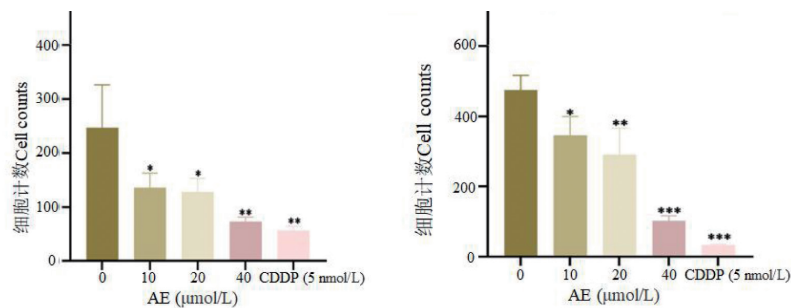


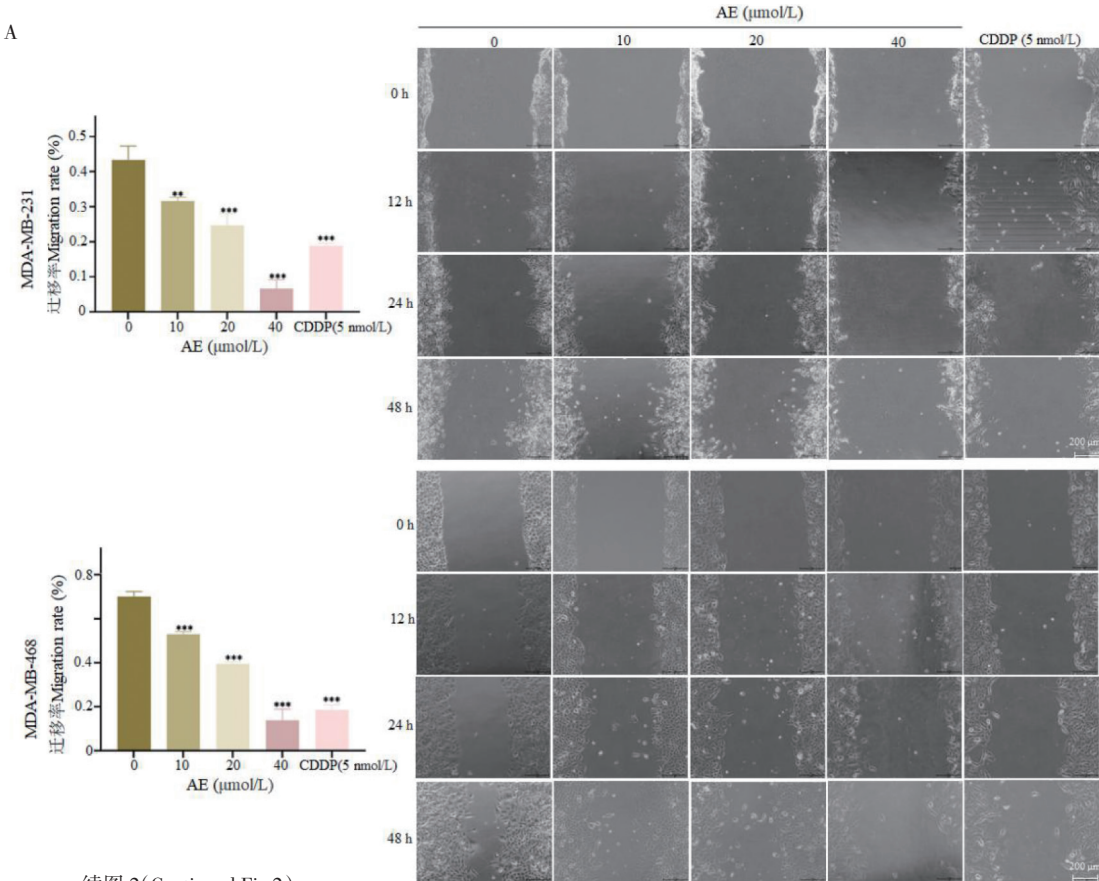
图1 AE 对 TNBC 细胞的增殖 (A) 及克隆形成 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of AE on proliferation (A) and colony formation (B) of TNBC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 0 μmol/L 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,图 2 ~5、12、13 同。Note:Compared with the 0 μmol/L group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,the same applies to Fig. 2-5、12 and 13.

胞的迁移能力均明显减弱,CDDP 阳性对照组在相同时间点亦显著延缓了细胞划痕的愈合(见图 2A)。Transwell 侵袭实验进一步证实,AE 以剂量依赖性方式抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的侵袭能力,相比之下 CDDP 组穿过小室的细胞数量减少与 40 μmol/L 组差异无统计学意义,进一步验证了本部分药效学结果的可靠性(见图 2B)。

为评估 AE 对血管生成的影响,本研究收集 AE 处理后的 TNBC 细胞条件培养基,诱导 HUVECs 在 Matrigel 基质胶上形成管状结构。结果显示,与对照组相比,AE 处理组 HUVE 形成的管状结构显著减少,表现为网格数目、交叉点数目及总管长均明显下降(见图 3),表明 AE 可间接抑制内皮细胞的血管生成能力。



续图 2(Continued Fig.2)

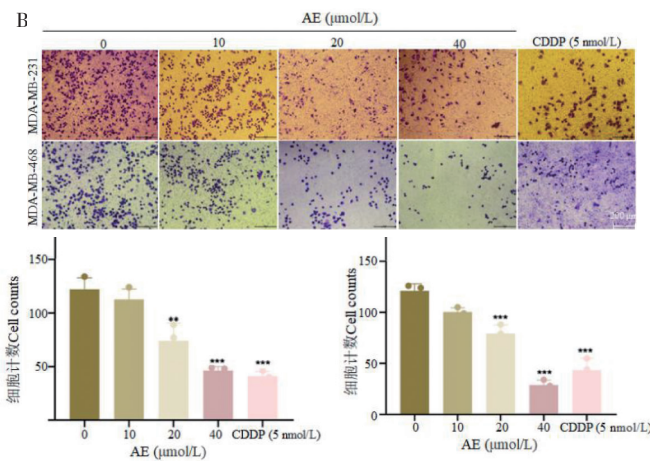


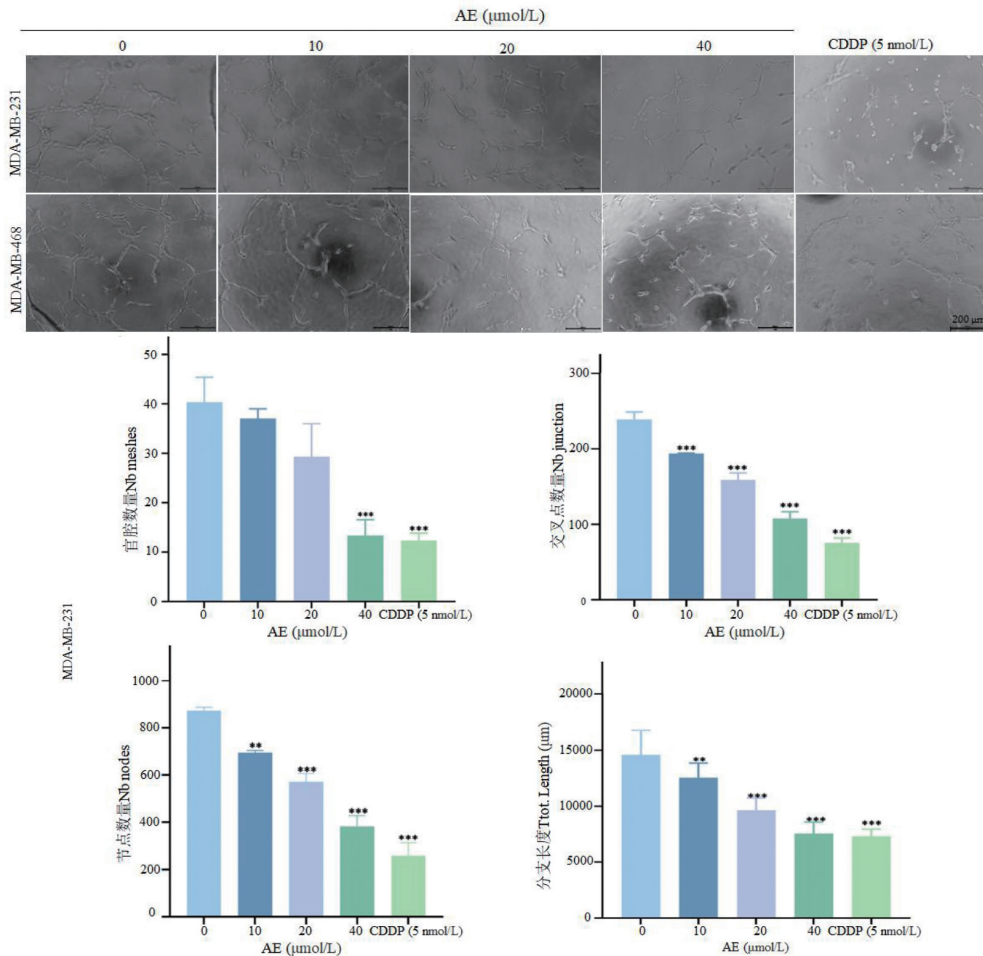
图2 AE对TNBC细胞迁移(A)及侵袭(B)的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of AE on migration (A) and invasion (B) of TNBC cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 AE对裸鼠异种移植瘤的增殖及血管生成的影响

为验证AE的体内抗肿瘤及抗血管生成作用,本研究构建了MDA-MB-231细胞裸鼠增殖瘤模型。荷瘤鼠分别接受溶剂对照或不同剂量AE腹腔注射,每2 d一次,连续给药21 d。结果显示,AE处理

组肿瘤体积和瘤重均显著低于对照组,且呈剂量依赖性(见图4)。HE染色观察到AE处理组肿瘤组织内坏死区域增多,活性肿瘤细胞密度降低(见图5A)。肿瘤组织CD31免疫组织化学染色显示,AE处理组微血管密度显著降低(见图5B),证实AE在体内同样有效抑制肿瘤血管生成。



续图 3(Continued Fig.3)

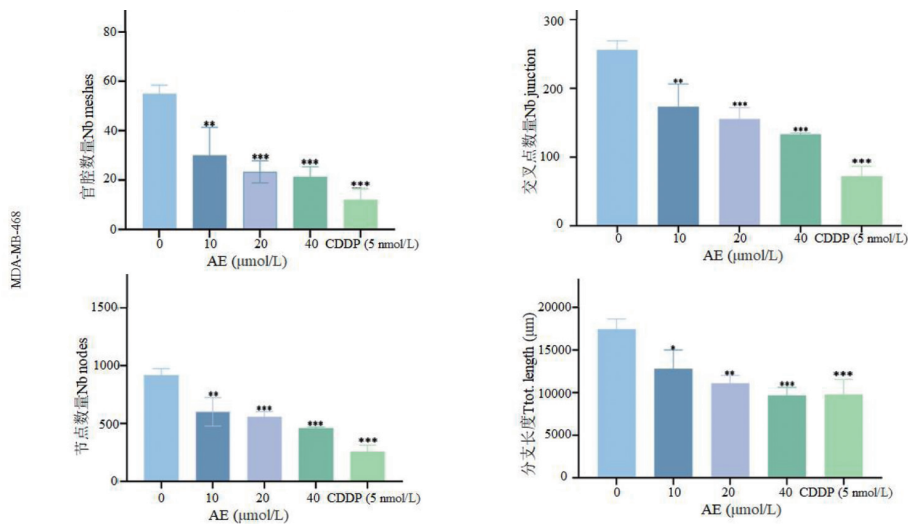


图3 AE对TNBC细胞血管生成能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.3 Effect of AE on angiogenic of TNBC cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

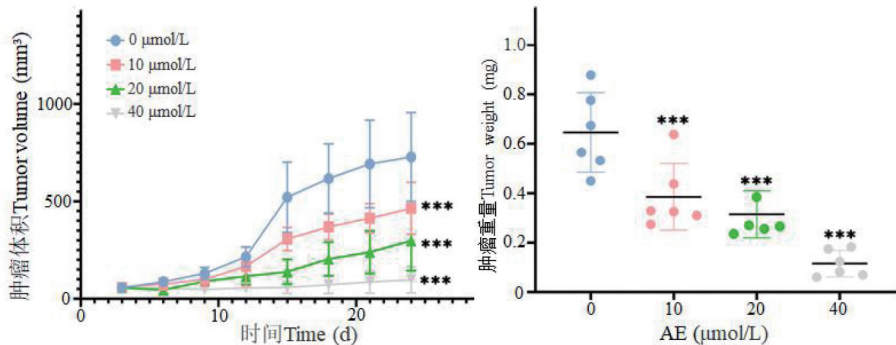
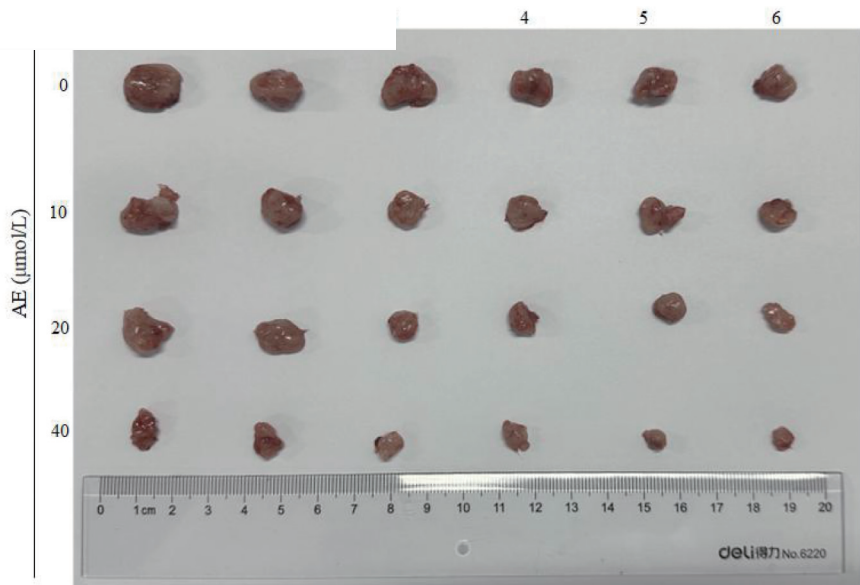


图4 AE对裸鼠异种移植瘤的增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.4 Effect of AE on the proliferation of xenograft tumors in nude mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

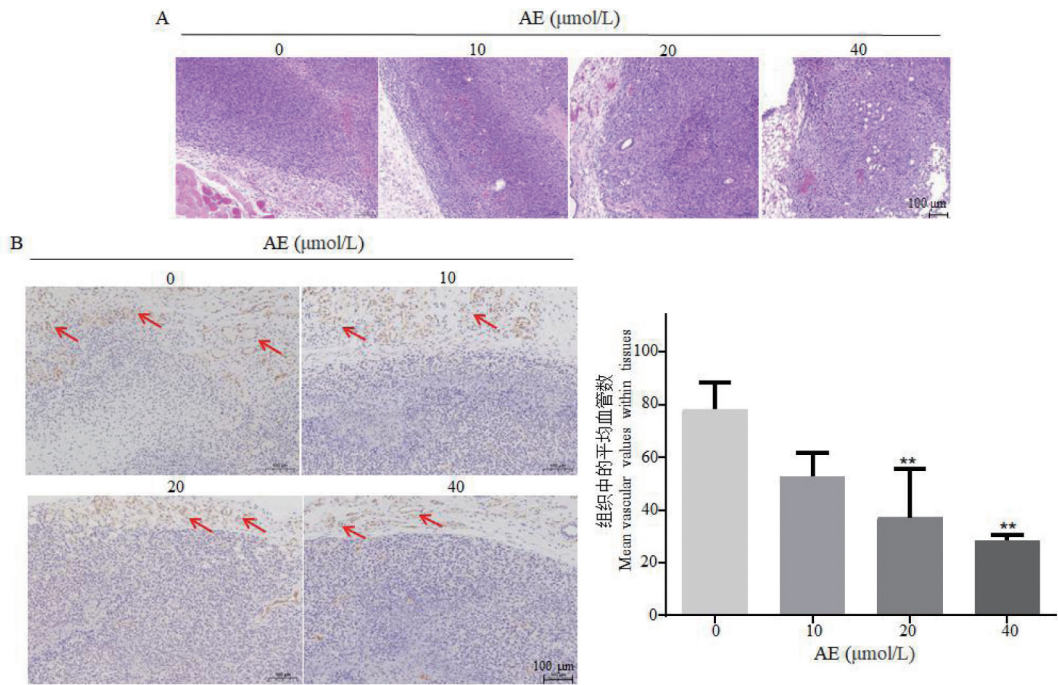


图5 裸鼠肿瘤组织 HE 染色形态观察(A) 及免疫组化 CD31 染色检测微血管密度(B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 H&E staining for morphology (A) and CD31 immunohistochemistry for microvessel density (MVD) in tumor tissues (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:免疫组织化学染色显示 CD31 阳性血管内皮细胞(箭头)。Note:Immunohistochemical staining shows CD31-positive vascular endothelial cells (arrows).

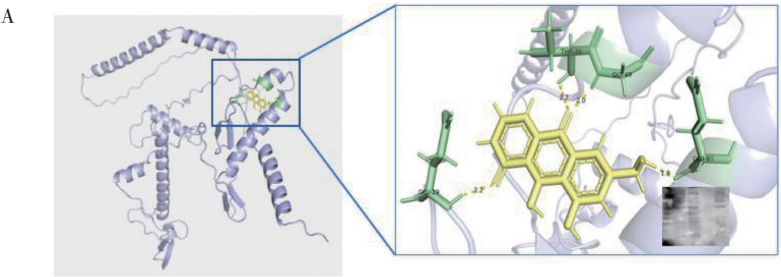
2.3 AE 靶向结合 RRS1

为揭示 AE 的分子靶点,本研究采用分子对接技术预测 AE 与候选蛋白的结合能力。分子对接结果显示,AE 与 RRS1 的结合能为-7.0 kcal/mol,该结果提示二者具有较高结合亲和力。结构分析表明,AE 嵌入 RRS1 结合口袋后,通过多重氢键与疏水相互作用实现稳定结合:AE 的酚羟基与 Gly60、Gly45 分别形成键长 0.19、0.2 nm 的强氢键,C9 羰基与 Thr48 形成 0.27 nm 氢键,末端苯环与 Glu79 形成 0.22 nm 氢键,共同构成极性相互作用网络。同时,蒽醌母核的平面芳香结构与周围疏水残基形成 π -烷基相互作用,实现“氢键锚定 + 疏水包裹”的协同稳定效应,为高亲和力结合提供了结构基础(见

图 6A)。为进一步验证,本研究合成了生物素标记的 AE 探针(见图 6B),并开展 pull-down 实验。结果显示,生物素-AE 可有效捕获细胞裂解液中的 RRS1 蛋白(见图 6C)。CETSA 结果证实,AE 处理可显著提高 RRS1 的热稳定性,使其熔解温度(T_m)由对照组的 52 $^{\circ}\text{C}$ 升至 55 $^{\circ}\text{C}$ (见图 7),在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中 ΔT_m 分别为 2.02 $^{\circ}\text{C}$ 和 2.61 $^{\circ}\text{C}$ (见图 7)。上述结果证实 RRS1 是 AE 的直接作用靶点。

2.4 RRS1 对 TNBC 细胞血管生成的影响

为明确 RRS1 在 TNBC 血管生成中的功能,本研究在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中敲低或过表达 *RRS1*,并收集条件培养基诱导 HUVECs 管



续图 6(Continued Fig.6)

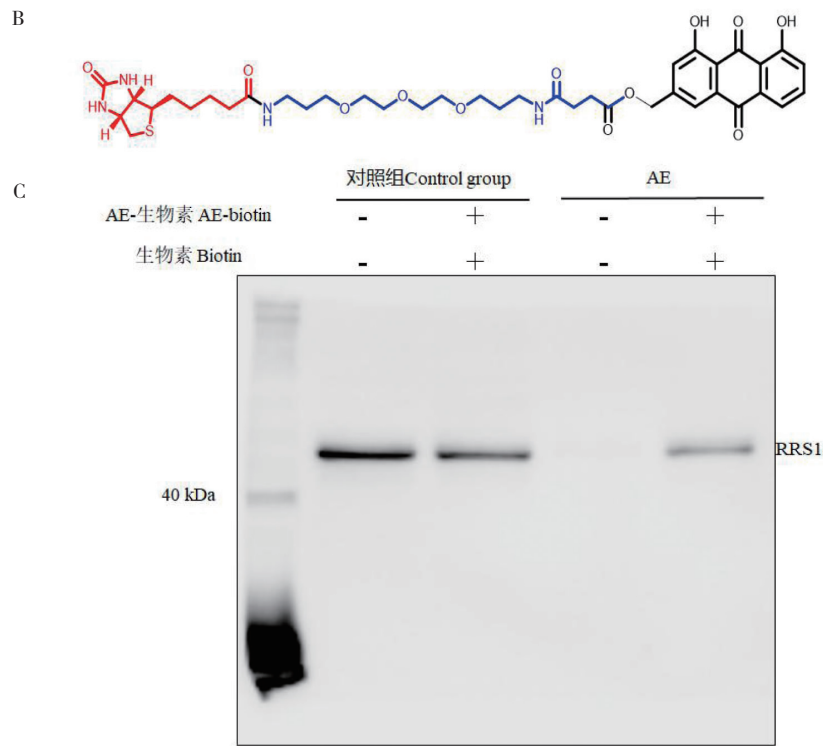


图 6 AE 与 RRS1 的分子对接分析 (A) 及 pull-down 验证两者相互作用 (B、C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Molecular docking analysis of AE with RRS1 (A) and pull-down validation of their interaction (B、C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

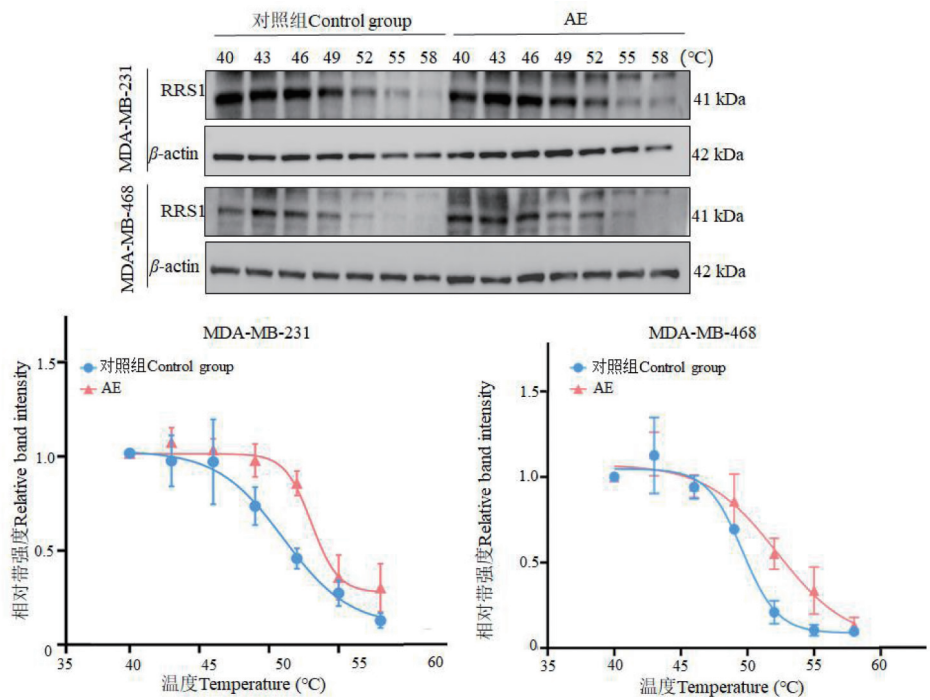


图 7 CETSA 检测 AE 处理对 RRS1 蛋白稳定性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 CETSA analysis of the effect of AE treatment on RRS1 protein stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

形成。结果显示,RRS1 敲低组 HUVECs 管状结构形成能力显著减弱,表现为网格数、交叉点数及分支长度减少(见图 8)。相反,RRS1 过表达则显著增强 HUVECs 的血管生成能力(见图 9)。上述结果表明

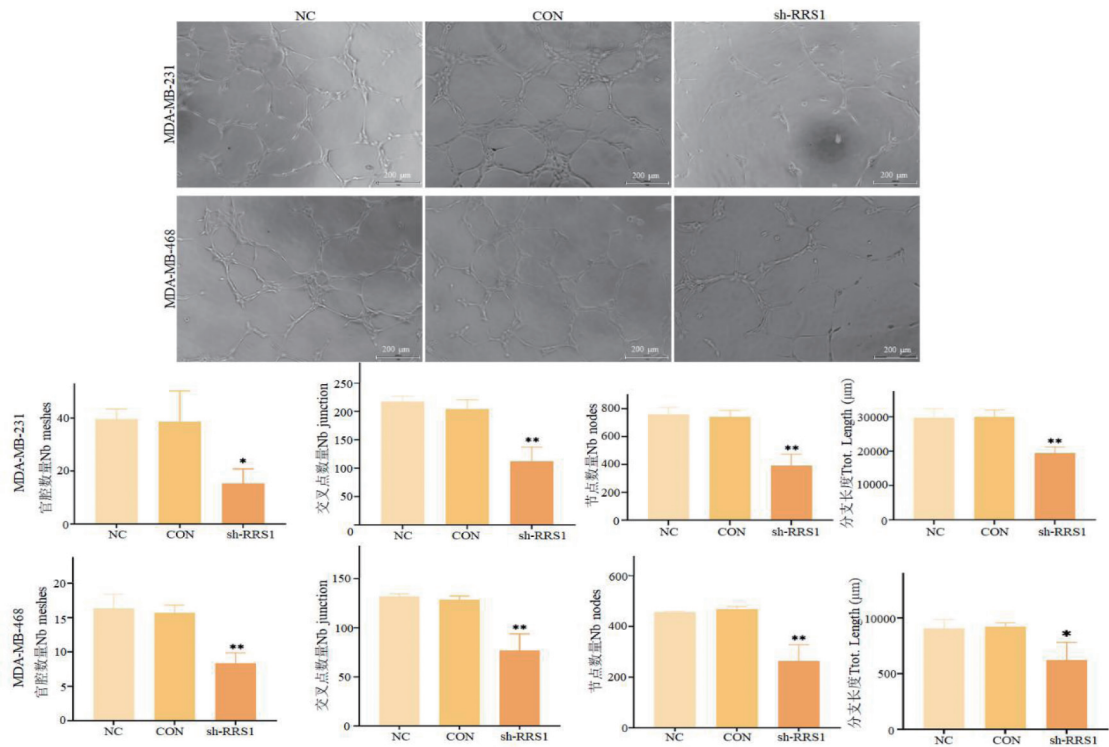


图 8 敲减 *RRS1* 对 TNBC 细胞血管生成的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of *RRS1* knockdown on angiogenesis in TNBC cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:NC 为对照组,CON 为慢病毒对照组,sh-RRS1 为慢病毒敲减组(与 NC 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,图 10、11 同)。
Note:NC is the control group,CON is the lentivirus control group,and sh-RRS1 is the lentivirus knockdown group (compared with NC,
* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,the same applies to Fig. 10 and Fig. 11).

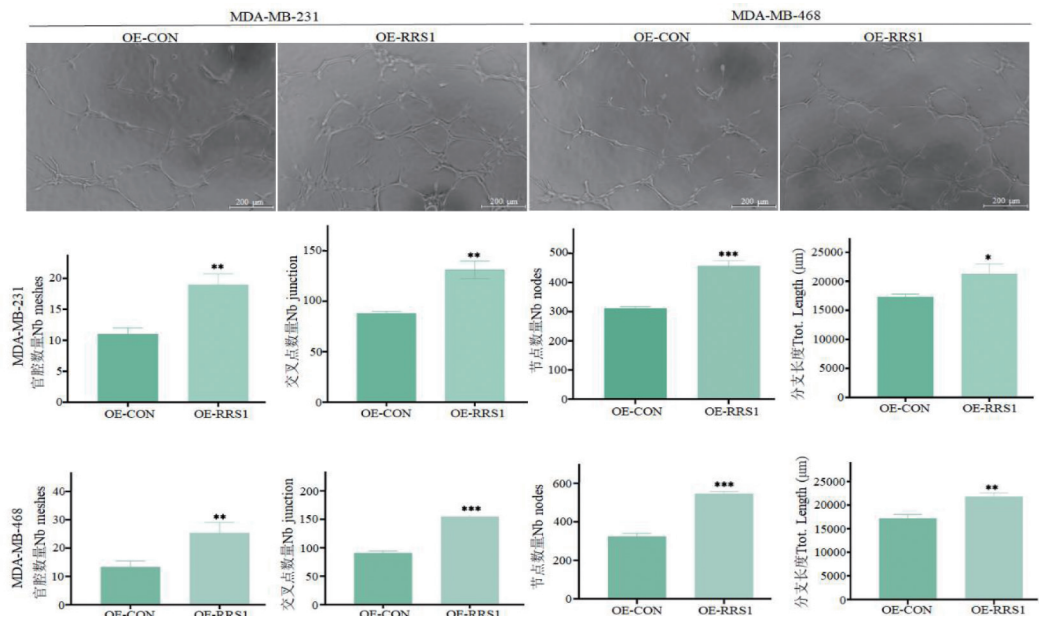


图 9 过表达 *RRS1* 对 TNBC 细胞血管生成的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of *RRS1* overexpression on angiogenesis in TNBC cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:OE-CON 为过表达慢病毒对照组,OE-RRS1 为慢病毒过表达组(与 OE-CON 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$)。Note:OE-CON is the overexpression lentivirus control group,and OE-RRS1 is the lentivirus overexpression group (compared with OE-CON,* $P < 0.05$,
** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$).

RRS1 在 TNBC 细胞中介导促血管生成作用。

2.5 RRS1 通过 HIF-1 α 信号通路调控 TNBC 血管生成

为探究 RRS1 调控血管生成的分子机制,本研究对 RRS1 敲低的 MDA-MB-231 细胞进行转录组测序。共筛选出 3 257 个差异表达基因。GO 富集分析显示,这些基因参与细胞代谢、蛋白质定位、应激响应、蛋白质结合等生物学过程。KEGG 通路富集

分析表明,RRS1 敲低显著影响核糖体、mTOR、HIF-1 α 及细胞周期等通路(见图 10A)。qPCR 结果显示,RRS1 敲低显著抑制 HIF-1 α mRNA 表达(见图 10B)。Western blot 进一步证实,RRS1 敲低可下调 HIF-1 α 、VEGFA 蛋白表达,并抑制 PLCG1 磷酸化及 ERK 表达(见图 11),以上结果表明,RRS1 通过调控 HIF-1 α 的 mRNA 表达影响其蛋白水平,进而参与 TNBC 血管生成。

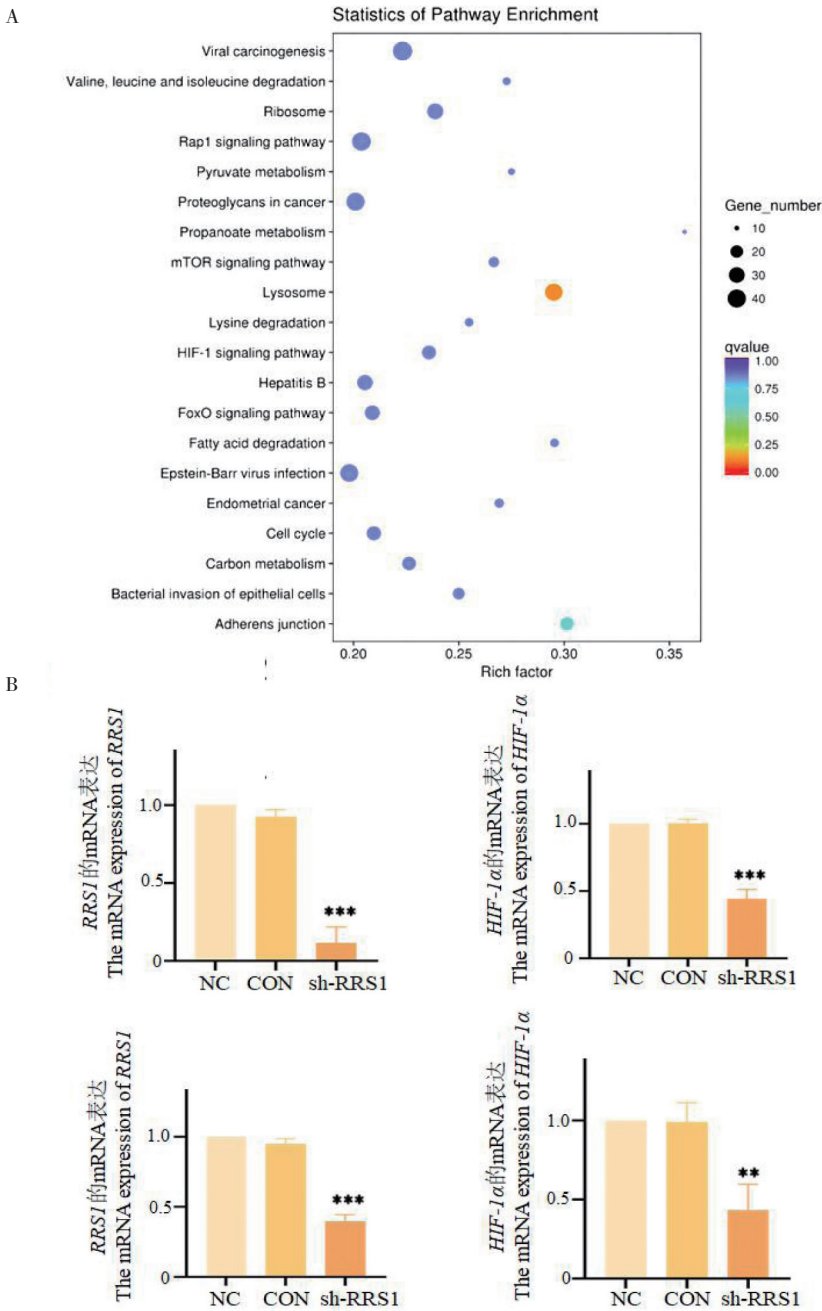


图 10 敲减 RRS1 的 MDA-MB-231 转录组 KEGG 通路富集分析 (A) 及 RRS1 和 HIF-1 α 的 mRNA 表达 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 KEGG pathway enrichment analysis of MDA-MB-231 transcriptome with RRS1 knockdown (A) and the mRNA expression of RRS1 and HIF-1 α (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

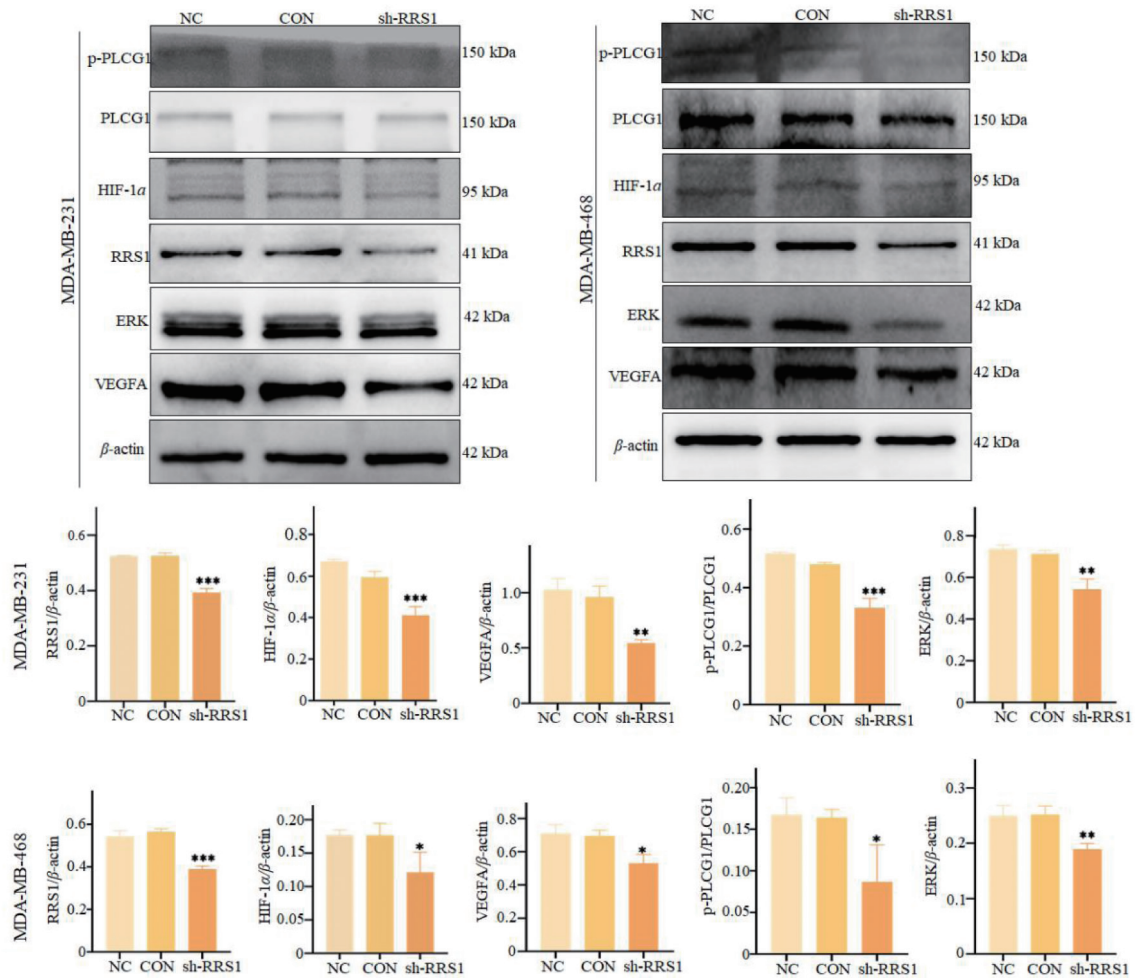


图 11 敲低 *RRS1* 抑制 HIF-1 α 信号通路相关蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Knockdown of *RRS1* suppressed the expression of proteins associated with the HIF-1 α signaling pathway($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 AE 调控 TNBC 细胞 HIF-1 α -VEGFA 信号

鉴于 AE 可靶向结合 *RRS1*, 本研究进一步检测 AE 对 *RRS1* 表达及其下游信号通路的影响。Western blot 结果显示, AE 呈浓度依赖性抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中 *RRS1* 蛋白表达(见图 12A、12C), 体内肿瘤组织样本同样证实 AE 可下调 *RRS1* 表达(见图 12B、12D), 并显著抑制 HIF-1 α 的表达。HIF-1 α 的表达会激活 VEGFA; VEGFA 分泌后与内皮细胞受体结合, 通常会激活经典的 PLCG1-ERK 增殖/迁移通路。因此, 本研究检测了 HIF-1 α 下游相关蛋白的表达, VEGFA 蛋白表达明显降低, 且降低了 PLCG1 磷酸化水平及 ERK 表达(见图 13)。综上, AE 通过靶向结合 *RRS1*, 下调其表达, 进而抑制 HIF-1 α -VEGFA 信号通路, 发挥抗血管生成作用。

3 讨论与结论

本研究结果提示, AE 对 TNBC 血管生成的抑制作用可能与其下调 *RRS1* 表达相关, 而 HIF-1 α 通路或许是 *RRS1* 调控 TNBC 血管生成的下游机制之一。这为 AE 的抗癌机制提供了新的视角, 尤其是在 TNBC 进展与转移相关的血管生成过程。

本研究探讨了 *RRS1* 抑制与 TNBC 抗血管生成效应之间的潜在关联, 也提出了 AE 特异性地作用于核糖体蛋白 *RRS1*——该蛋白已被报道参与癌细胞存活和增殖。实验结果表明, AE 与 *RRS1* 的结合可能影响 AE 的功能, 进而下调 HIF-1 α 表达。这一发现具有重要意义, 因为 HIF-1 α 是血管生成的关键转录调控因子, 在乳腺癌细胞中异常高表达^[13]。本研究数据显示, 通过干扰 *RRS1*, 可降低 HIF-1 α 表达水平, 从而影响 TNBC 细胞的血管生成能力。这一

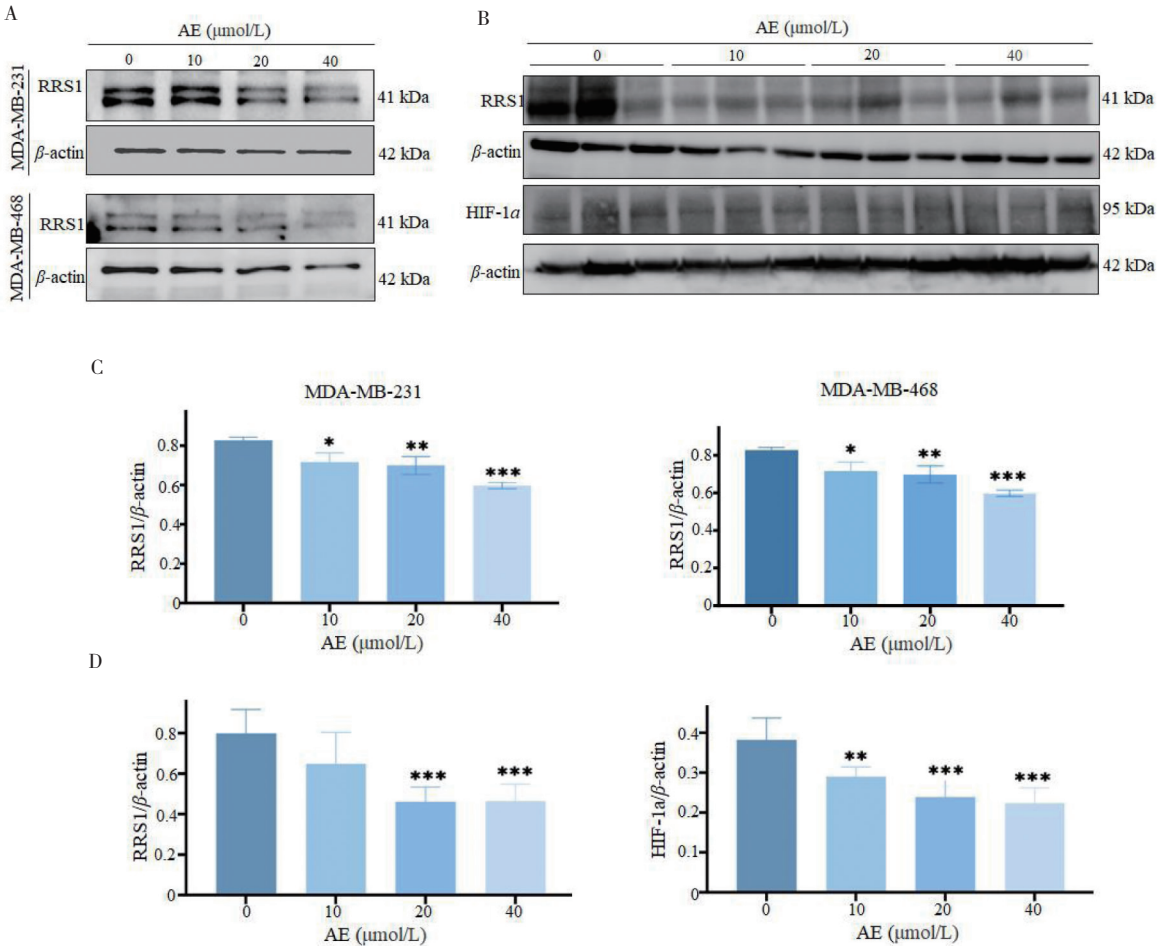


图 12 AE 对 RRS1 和 HIF-1 α 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of AE on the expression levels of RRS1 and HIF-1 α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结果与既往关于核糖体蛋白参与调控癌症相关信号通路的报道一致^[14]。

RRS1 是一种参与核糖体生物发生的蛋白,主要定位于核仁,负责调控核糖体 RNA 的加工及核糖体亚基的组装。HIF-1 α 的翻译效率高度依赖于核糖体的功能状态。抑制 RRS1 可能引发核糖体组装异常或核糖体应激,进而激活核糖体应激感应通路(如 MDM2-P53 通路或 MAPK 通路),从而间接影响 HIF-1 α 的 mRNA 翻译效率^[15]。综上所述,RRS1 对 HIF-1 α 的调控可能主要发生在转录或 mRNA 稳定性水平,而非翻译水平。后续研究可通过转录抑制实验(如放线菌素 D 处理)及 RNA pulldown 等实验,深入探究 RRS1 调控 HIF-1 α mRNA 表达的具体分子机制。

目前的数据显示 AE 处理可降低 RRS1 蛋白水平,但尚未明确这一效应是发生在转录、mRNA 稳定性、翻译还是蛋白降解层面。考虑到 AE 是一种蒽

醌类化合物,既往研究提示其可能通过抑制转录因子活性(如 NF- κ B、AP-1)或影响表观遗传修饰来下调基因表达。然而,RRS1 作为核糖体生物发生相关蛋白,其表达往往与细胞增殖状态紧密偶联^[16]。AE 可能通过诱导细胞周期阻滞或核糖体应激反馈性下调 RRS1 表达后续实验应通过 qPCR 检测 RRS1 mRNA 水平、放线菌酮追踪实验分析蛋白半衰期,以及泛素化检测来明确 AE 的作用层面。

既往关于 AE 的抗癌研究多集中于其诱导凋亡、抑制增殖、阻断侵袭等作用,涉及的信号通路包括 AKT、MAPK、Wnt/ β -catenin^[17]等。少数研究报道 AE 可抑制血管生成,但通常归因于直接下调 VEGFA 或抑制内皮细胞功能^[17]。本研究的创新点在于,首次将核糖体蛋白 RRS1 作为 AE 的直接或间接靶点;揭示了 AE 通过 RRS1 调控 HIF-1 α /VEGFA 轴的信号级联,而非直接抑制 VEGFA;在 TNBC 这一亚型中系统验证了 AE 的抗血管生成效应,并提

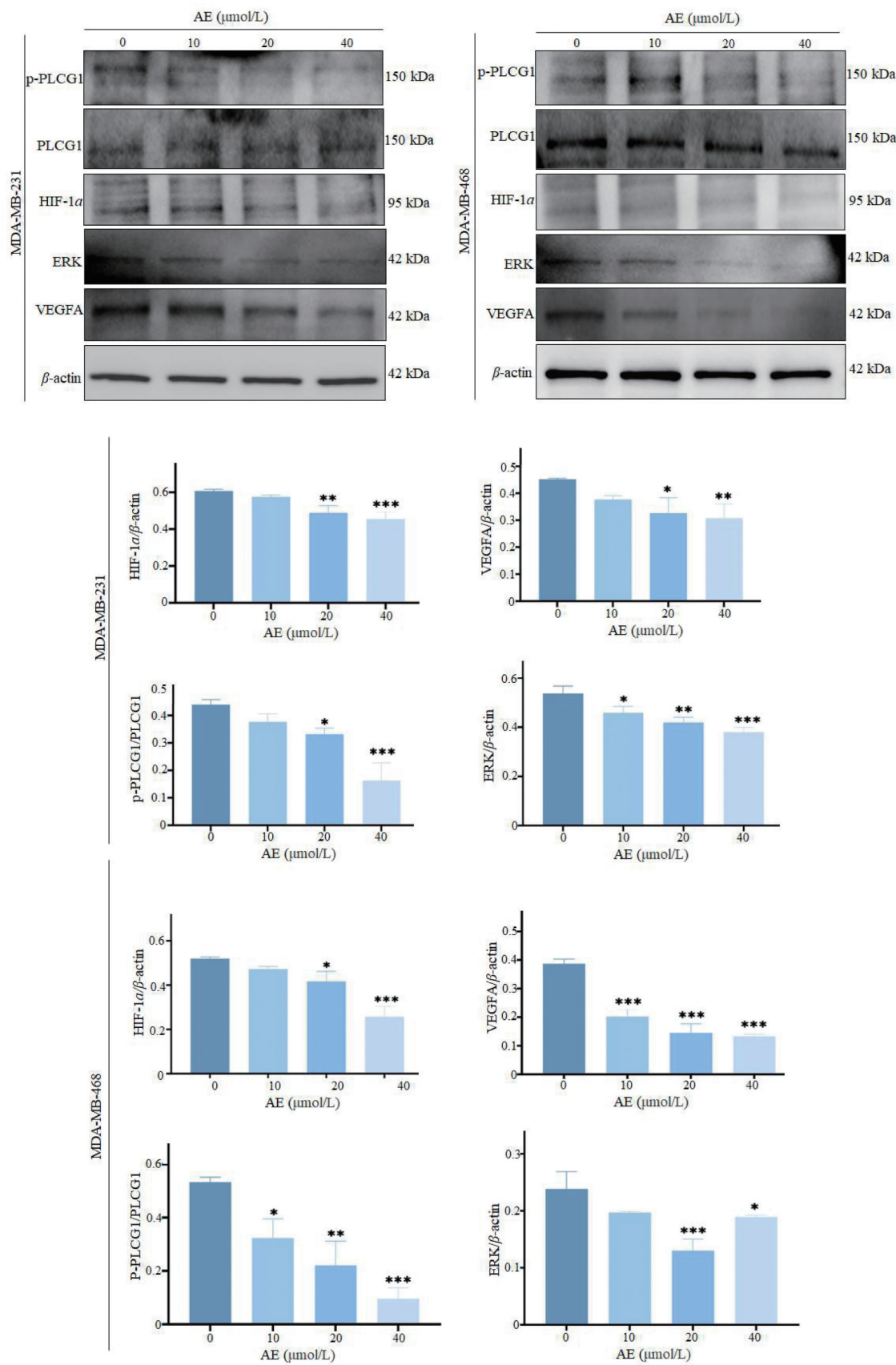


图 13 AE 对 HIF-1α 信号通路相关蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of AE on the expression levels of proteins related to the HIF-1α signaling pathway($\bar{x} \pm s, n = 3$)

供了体内外一致性证据^[18]。这为 AE 作为多靶点天然产物的抗肿瘤机制增添了新的维度。

HIF-1 α 信号通路是包括 TNBC 在内的多种癌症中血管生成的重要调控通路^[19]。本研究,AE 处理下调了 HIF-1 α 及其下游靶点 VEGFA 的表达水平。这种多重调控效应值得关注,因为 VEGFA 在促进内皮细胞增殖和迁移、驱动新生血管形成中发挥关键作用。实验中观察到的 VEGFA 水平降低与内皮细胞管形成及迁移能力减弱趋势相一致,为 AE 的潜在抗血管生成作用提供了初步实验支持。这些发现与既往关于 HIF-1 α 信号在肿瘤血管生成中作

用的研究结果一致^[20],提示芦荟大黄素可作为该通路的潜在调节剂。

乳腺癌是全球恶性肿瘤相关死亡的重要原因,TNBC 患者的治疗选择尤其有限。新生血管在肿瘤进展和转移中发挥核心作用。然而,目前的 VEGFA 靶向治疗存在疗效局限、耐药性和不良反应等问题^[21]。在此背景下,本研究通过展示天然化合物 AE 具有抗血管生成活性,为治疗策略提供了新的探索方向。AE 可能通过下调 RRS1 介导 HIF-1 α 通路抗 TNBC 血管生成(见图 14)。

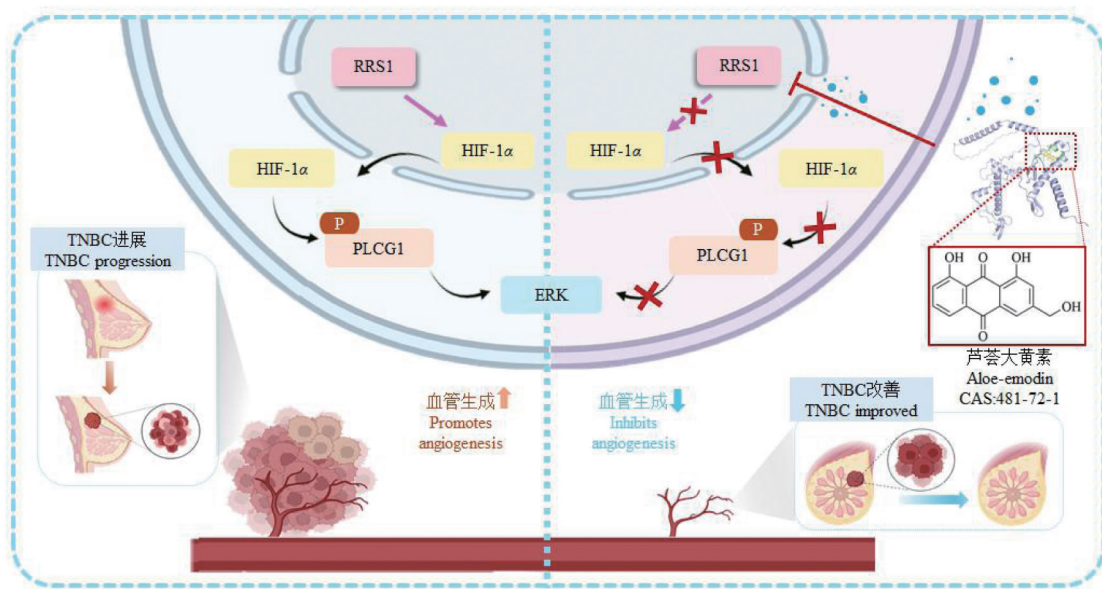


图 14 AE 调控 TNBC 进展的分子机制

Fig. 14 Molecular mechanism of AE in regulating TNBC progression

需要注意的是,本研究存在若干局限性。第一,目前研究主要集中于体外细胞水平。在动物模型中,本研究仅通过 CD31 检测初步评估了 AE 对 TNBC 血管生成的影响。为了进一步阐明 AE 在体内肿瘤血管生成中的作用,后续实验应纳入更多血管生成相关标志物(如 α -SMA 和 CD105),以及微血管造影技术,以实现肿瘤内血流速度、血管密度和灌注的实时定量分析,且 AE 与 RRS1 相互作用的具体分子机制尚未完全确定,需要更多证据支持 AE 的结合特异性及其下游效应。此外,值得指出的是,本研究未设置阳性对照组,因此无法直接比较 AE 与已知抗 TNBC 药物(如紫杉醇、CDDP 等)的效应强度。后续研究应引入临床一线药物作为阳性对照,以更全面地评估 AE 的抗肿瘤效价。同时,天然产物往往具有多靶点作用特性。尽管本研究证实

RRS1 是 AE 抑制 TNBC 的重要靶点,但 AE 可能同时还作用于其他蛋白(如 AKT、ERK、VEGFR 等),共同介导其抗肿瘤效应。因此,RRS1 是否为 AE 的唯一或首要靶点,以及不同靶点之间的协同关系,后续研究可采用药物亲和反应靶点稳定性技术、细胞热位移分析结合质谱鉴定、或基于反向对接的虚拟筛选等方法,系统鉴定 AE 的更多潜在结合蛋白。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.41588>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J

- Clin,2021,71:209-249.
- 2 Shiao JP, Wu CC, Chang SJ, et al. FAK regulates VEGFR2 expression and promotes angiogenesis in triple-negative breast cancer[J]. *Biomedicines*, 2021, 9: 1789.
 - 3 Zhang Y, Yang H, Jiang YH, et al. Angiogenesis and immune microenvironment in triple-negative breast cancer: Targeted therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871: 167880.
 - 4 Ribatti D, Nico B, Ruggieri S, et al. Angiogenesis and antiangiogenesis in triple-negative breast cancer[J]. *Transl Oncol*, 2016, 9: 453-457.
 - 5 Poh-Yen K. Phytochemical small molecules as potential antiangiogenesis targeted therapy for triple-negative breast cancer[J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2024, 34: 451-466.
 - 6 Sledge GW Jr, Rugo HS, Burstein HJ. The role of angiogenesis inhibition in the treatment of breast cancer[J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2006, 4: 1-10.
 - 7 Yang Z, Zhang QH, Yu LH, et al. The signaling pathways and targets of traditional Chinese medicine and natural medicine in triple-negative breast cancer[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113249.
 - 8 Cui Y, Chen LJ, Huang T, et al. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin[J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18: 425-435.
 - 9 Şeker Karatoprak G, Küpeli Akkol E, Yücel Ç, et al. Advances in understanding the role of aloe emodin and targeted drug delivery systems in cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7928200.
 - 10 Wu QL, Deng L, Sun WJ, et al. Effect of regulator of ribosome synthesis 1 on the proliferation and migration of breast cancer cells and its mechanism of action[J]. *J Precis Med (精准医学杂志)*, 2023, 38: 315-319.
 - 11 Xia WF, Liu Y, Cheng T, et al. Down-regulated lncRNA SBF2-AS1 inhibits tumorigenesis and progression of breast cancer by sponging microRNA-143 and repressing RRS1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 18.
 - 12 Xie J, Zhang JF, Chen XY, et al. Aloe-emodin: from pharmacological mechanisms to clinical applications and future perspectives[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1741679.
 - 13 Zhi SJ, Chen C, Huang HL, et al. Hypoxia-inducible factor in breast cancer: role and target for breast cancer treatment[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1370800.
 - 14 Yue Z, Xia R, Jie Y, et al. Genomic hallmarks and therapeutic targets of ribosome biogenesis in cancer[J]. *Brief Bioinform*, 2024, 25: bbae023.
 - 15 Huppertz I. Free ribosomal proteins as culprits for nucleolar stress[J]. *Mol Cell*, 2024, 84: 1400-1402.
 - 16 He J, Liu SJ, Luo SJ, et al. The role of RRS1 in breast cancer cells metastasis and AEG-1/AKT/c-Myc signaling pathway[J]. *Neoplasma*, 2024, 71: 347-358.
 - 17 Manzano JAH, Abellanosa EAM, Aguilar JPP, et al. Dimeric anthraquinone rugulosin a induces apoptosis in lung adenocarcinoma and targets PI3K/AKT/MAPK pathways *in silico* [J]. *ACS Omega*, 2026, 11: 18744-18759.
 - 18 Lin L, Zou Y, Zhang D. Silencing ribosome biogenesis regulator 1 homolog (RRS1) inhibits angiogenesis and cisplatin resistance of lung cancer cells by activating ferroptosis mediated by p53 pathway[J]. *Tissue Cell*, 2025, 94: 102796.
 - 19 Ge CW, Meng DD, Peng YQ, et al. The activation of the HIF-1 α -VEGFA-Notch1 signaling pathway by Hydroxysafflor yellow A promotes angiogenesis and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142: 113097.
 - 20 Palazon A, Tyrakis PA, Macias D, et al. An HIF-1 α /VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32: 669-683.
 - 21 Peng YL, Wang Y, Tang N, et al. Andrographolide inhibits breast cancer through suppressing COX-2 expression and angiogenesis via inactivation of p300 signaling and VEGF pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 248.