

# 基于网络药理学的谷糠结合态多酚抗乳腺癌机制研究

李帅涛<sup>1#</sup>, 张立超<sup>2#\*</sup>, 刺晓琴<sup>3</sup>, 李爱平<sup>4</sup>, 武海丽<sup>1</sup>, 李卓玉<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>山西大学生命科学学院; <sup>2</sup>山西大学生物医学研究院; <sup>3</sup>山西大学生物技术研究所;

<sup>4</sup>山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006

**摘要:**本研究旨在探讨谷糠结合态多酚(bound phenol of inner shell, BPIS)发挥抗乳腺癌细胞活性的作用机制。首先采用细胞计数法检测 BPIS 对乳腺癌细胞以及正常乳腺细胞活性的影响;然后综合运用 SEA、SIB 以及 GeneCards 等数据库获得 BPIS 和乳腺癌的相关靶点,并分析活性成分与作用靶点的互作网络以及通路。本研究筛选得到 BPIS 抗乳腺癌相关靶点 39 个,主要涉及糖脂代谢和细胞自噬等生物过程以及 MAPK、PI3K/AKT、FoxO 等多条信号通,表明 BPIS 抗乳腺癌是多成分、多靶点、多通路协同作用的过程,而与细胞死亡相关的细胞自噬很可能在 BPIS 抑制乳腺癌过程中发挥主要作用。

**关键词:**谷糠结合态多酚; 乳腺癌; 网络药理学; 作用机制

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)8-1339-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.8.006

## The mechanism of BPIS against breast cancer based on network pharmacology

LI Shuai-tao<sup>1#</sup>, ZHANG Li-chao<sup>2#\*</sup>, LA Xiao-qin<sup>3</sup>, LI Ai-ping<sup>4</sup>, WU Hai-li<sup>1</sup>, LI Zhuo-yu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Shanxi University; <sup>2</sup>Institutes of Biomedical Sciences, Shanxi University;

<sup>3</sup>Institutes of Biotechnology, Shanxi University; <sup>4</sup>Modern Research

center for traditional Chinese medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the mechanism of BPIS (bound phenol of inner shell) against breast cancer cell. Firstly, the effect of BPIS on the activity of breast cancer cells and normal breast cells was detected by cell counting. Secondly, the SEA, SIB and GeneCards databases were used to predict and screen the targets of BPIS on breast cancer. Then, the String database, Cytoscape software and DAVID database were used to construct the active components-targets network and analyse pathway. After these studies, 39 targets were screened, which involved in biological processes such as Glycolipid metabolism, autophagy and so on, and signaling pathways such as MAPK, PI3K/AKT, FoxO and so on. These results indicated that BPIS anti-breast cancer is a multi-component, multi-target, multi-signal synergistic process, and autophagy associated with cell death is likely to play a major role in BPIS inhibition of breast cancer.

**Key words:** BPIS; breast cancer; network pharmacology; pharmacological mechanism

谷子(*Setaria italica*),学名粟,是我国传统优势作物,含有丰富的蛋白质、维生素和微量元素,具有很高的营养价值,在我国广泛种植<sup>[1]</sup>。而谷糠作为谷子加工过程中的副产品,往往被人们所忽视,有研究表明谷糠含有丰富的植物化学物质,如多酚等,具

有广泛的生物学特性和药理反应<sup>[2]</sup>。有研究表明植物多酚具有抗氧化、调控细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡等,从而抑制癌细胞的增殖<sup>[3]</sup>。

乳腺癌是我国女性最常见的恶性肿瘤之一,主要由乳腺导管上皮出现恶性改变而发生<sup>[4]</sup>。近年来,乳腺癌发病率不断增加,已经严重威胁了我国女性的身心健康<sup>[5]</sup>。乳腺癌的发生有许多内源和外源的因素参与其中,是一个长期的、多因素的过程<sup>[6]</sup>。目前,手术及放疗仍是治疗乳腺癌的主要方式,但治疗过程往往带来严重的副作用<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现 BPIS 对人肝癌细胞、宫颈癌细胞

收稿日期:2019-03-18 接受日期:2019-07-02

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(81803791,31800290);山西省应用基础研究面上青年基金(201801D221249);国家自然科学基金面上项目(31770382)

\* 通信作者 E-mail:lzy@sxu.edu.cn, zlc@sxu.edu.cn

# 共同第一作者

以及结肠癌细胞等多种癌症细胞均有显著的抑制作用<sup>[8]</sup>,尤其能够显著抑制乳腺癌细胞的活性,但对正常乳腺细胞没有明显影响,因此探明其具体作用机制将扩展临床治疗手段,减轻副作用,对乳腺癌的治疗具有重要意义。

网络药理学能够通过计算机模拟算法、运用组学、高通量筛选及网络分析等技术揭露药物-靶点-疾病之间复杂的网络信号关系,已经成为揭示生物系统复杂功能和行为的有力工具<sup>[9]</sup>。网络药理学从系统生物学和生物网络角度对药物的作用机制进行整体分析,具有高通量、快速、灵敏和准确的特点<sup>[10]</sup>。因此运用网络药理学对 BPIS 抗乳腺癌作用的靶点与通路进行筛选,构建 BPIS 的成分-靶点-疾病网络模型,从系统生物学的角度对 BPIS 抗乳腺癌的可能作用机制进行整体阐释,为后续具体作用机制的研究以及特殊医药食品的开发提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

谷子品种为晋谷 21 号,产地为山西省晋中市,由山西省天下谷公司提供。人乳腺癌细胞 MDA-MB-231(南京恩晶生物科技有限公司);人乳腺癌细胞 MCF-7 和正常乳腺细胞 MCF-10A(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);RPMI-1640 Medium 培养基、DMEM/F-12 培养基和 DMEM High Glucose 培养基(山西百奥生物技术有限公司);青链霉素(100X,北京索莱宝科技公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);胰蛋白酶(北方同正公司);CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Eppendorf Galaxy 170S);倒置显微镜(Zeiss,德国)。

### 1.2 BPIS 对乳腺癌细胞活性检测

人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和人正常乳腺细胞 MCF-10A 均培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。等到细胞长满贴壁,用胰酶消化、1 000 rpm 离心制成细胞悬液,接种到 12 孔板中,细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /孔。细胞贴壁后弃掉培养基,加入 1 mL 含 BPIS 的新培养基,BPIS 浓度为 2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。加药处理 24 h 后,在显微镜下观察细胞形态,并用血球计数板进行计数。

### 1.3 BPIS 活性成分的鉴定

称取一定量的谷糠,用 80% 的预冷丙酮室温搅拌 2 h(谷糠,丙酮物料比为 1:20),静置 20 min 后弃上清,用 NaOH(2 mol/L)于室温下搅拌 1 h(物料

比 1:10)。加适量 HCl 终止消化,调节 PH 为 7。11 000 rpm,离心 5 min,取上清。上清中加入乙酸乙酯(乙酸乙酯:上清 = 1:1)进行脱脂,静置 10 min,11 000 rpm,离心 10 min,取上清,重复操作 5 次。将得到的多酚于旋转蒸发仪上 45 °C 旋转蒸发,将旋转蒸发后的液体用 100D 透析袋透析除盐,真空冷冻干燥,即可得到谷糠结合态多酚。

本课题组在前期实验中采用大孔树脂柱对 BPIS 成分进行分离纯化,使用旋转蒸发仪浓缩至一定体积、真空冻干至粉末,用甲醇配置成溶液,通过超高效液相色谱-高分辨飞行质谱连用仪(UPLC-Triple-TOF/MS)对 BPIS 中主要成分进行了鉴定<sup>[11]</sup>。

### 1.4 BPIS 作用靶点预测

将整理得到的 BPIS 活性成分,导入 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中,得到 Smiles 化学式并下载其 3D 分子结构式,保存为 SDFfile(.sdf)格式。将 BPIS 活性成分对应的 Smile 化学式输入到 SEA (<http://sea.bkslab.org/>)数据库中,得到作用靶点。DRAR-CPI (<https://cpi.bio-x.cn/drar/>)是一种反向分子对接服务器,服务器以对接得分(*Z'*-score)表示活性成分与蛋白质间相互作用强度,规定 *Z'*-score < -0.5 时活性成分与靶点有结合的可能性<sup>[12]</sup>。登陆 DRAR-CPI 服务器,上传 BPIS 活性成分的.sdf 格式文件,为了提高预测准确度,选取 *Z'*-score < -1 的靶点作为药物潜在靶点。将筛选到的靶点 PDB ID 导入 UniProt 数据库,转化为 GeneCards 数据库对应的基因名称(Gene name)。为了提高靶点的准确性,对两个数据库得到的作用靶点进行整理,作为 BPIS 潜在的作用靶点。

### 1.5 乳腺癌相关靶点预测

通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)和 HOME-NCBI-GENE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)数据库,输入关键词“Breast cancer”,设置物种为人,进行检索,得到与乳腺癌相关的潜在靶点。

### 1.6 蛋白相互作用网络构建与分析

将预测得到的 BPIS 潜在作用靶点与乳腺癌相关靶点进行匹配,得到 BPIS 抗乳腺癌的潜在作用靶点。将靶点信息导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>)<sup>[13]</sup>,设置物种为人,获取蛋白相互作用关系,将结果保存为 TSV 格式文件。从文件中获取 node1、node2 和 Combined score 相关信息,并导入

Cytoscape version 软件,制作蛋白相互作用网络,并进行分析。将节点大小和颜色与 degree 的大小关联,将边的粗细与 combine score 的大小关联,建立靶点蛋白相互作用网络。

### 1.7 活性成分-蛋白靶点网络构建与分析

将 BPIS 活性成分和抗乳腺癌潜在靶点导入 Cytoscape version 软件,构建 BPIS 活性成分-抗乳腺癌靶点相互作用网络。

### 1.8 GO 和 KEGG 富集分析

将 BPIS 抗乳腺癌潜在靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>),将列表和背景物种限定为人,进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。本研究选择 GO 分析中生物过程 (BP, biological process)、分子功能 (MF, molecular function) 和细胞成分 (CC, cell component) 3 个模块对基因功能进行

注释,并设置阈值  $P < 0.05$ ,按照靶点数目筛选排名靠前的生物功能和通路,并进行绘图。

## 2 结果

### 2.1 BPIS 对乳腺癌细胞活性有明显抑制作用

利用浓度梯度的 BPIS 处理乳腺癌细胞 24 h,细胞形态发生了显著的改变,如图 1 所示,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞由原来的长梭形逐渐变圆,并且皱缩,发生明显的死亡现象,而对对照组 MCF-10A 形态无明显变化。随后,利用血球计数板对细胞进行计数,并统计其存活率,结果如图 2 所示,MCF-10A 与对照组相比无明显变化,而 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞经浓度为  $8 \mu\text{g/mL}$  的 BPIS 处理 24 h,细胞存活率显著降低,表明 BPIS 对乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 的生长有显著抑制作用,而对正常乳腺细胞作用不明显。

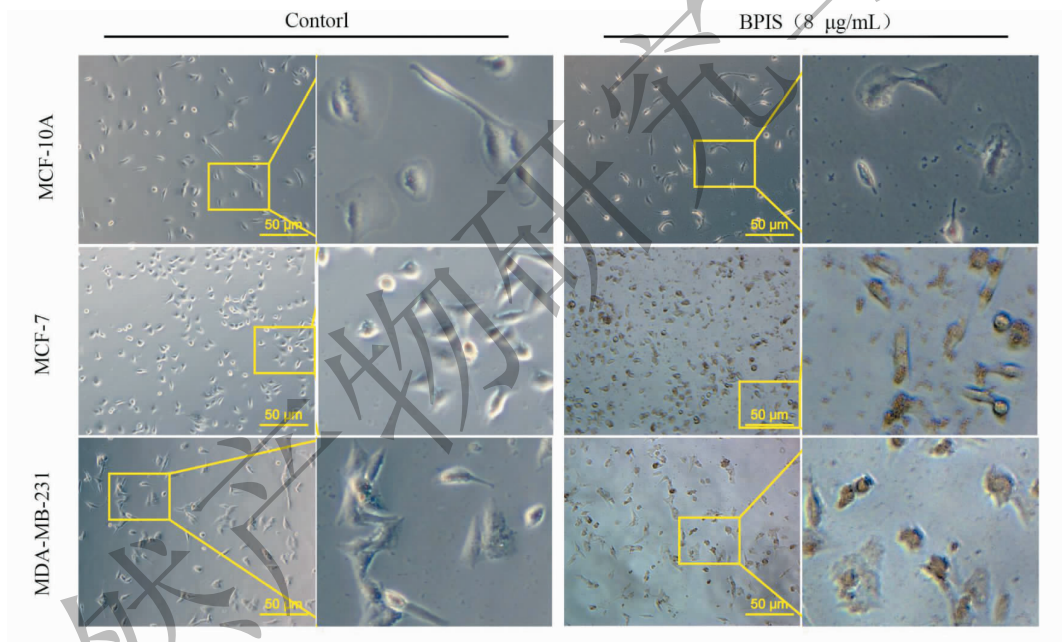


图 1 BPIS 对乳腺癌细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of BPIS on the morphology of breast cancer cells

### 2.2 BPIS 活性成分及靶点预测

通过前期对 BPIS 组分的鉴定,并以鉴定出的活性成分和癌症为关键词在 PubMed 进行文献检索,去除检索结果为 0 的活性成分,整理得到 8 个 BPIS 化学成分,详见表 1。将 BPIS 活性成分导入 SEA 数据库和 DRAR-CPI 服务器,并选取  $Z'$ -score  $< -1$ ,删除重复数据,整理得到 577 个作用靶点。对 GeneCards 数据库和 HOME-NCBI-GENE 数据库检索结果进行整理,得到乳腺癌相关靶点 1676 个。将

BPIS 作用靶点与乳腺癌靶点进行匹配,整理得到 39 个 BPIS 抗乳腺癌潜在靶点,详见表 2。

### 2.3 蛋白相互作用网络构建与分析

将筛选得到的 39 个潜在靶点导入 String 数据库,选择物种为“Homo sapiens”检索得到蛋白相互作用关系网络,结果保存为 TSV 格式文件,将文件中 node1、node2 和 Combined score 相关信息导入 Cytoscape version 软件绘制蛋白相互作用网络,详见图 3。

图中节点(node)代表作用靶点,节点的大小代表该靶点作用强度,靶点的 degree 等级越高,节点越大,对应的颜色由绿到红逐渐加深。其中边(edge)表示靶点之间的关联,边的粗细代表靶点间关联的大小,靶点间 Combine score 值越大,靶点间结合度越高,边越粗。图中共有 39 个节点,286 条边,平均节点度为 14.7,平均局部聚类系数为 0.694。其中靶点 RHOA 与 MAPK8、靶点 EGFR 与 CCND1 和靶点 PTGS 2 与 VEGFA 相连的边较粗,说明结合程度较大。同时,靶点 INS、ESR1、HRAS 和 MAPK1 的节点较大,说明 degree 等级较大,预测以上靶点可能发挥主要作用。胰岛素(INS)是由  $\beta$  细胞受内源性或外源性刺激,而分泌的一种蛋白质激素,能够促进糖原、脂肪和蛋白质的合成,最新医学

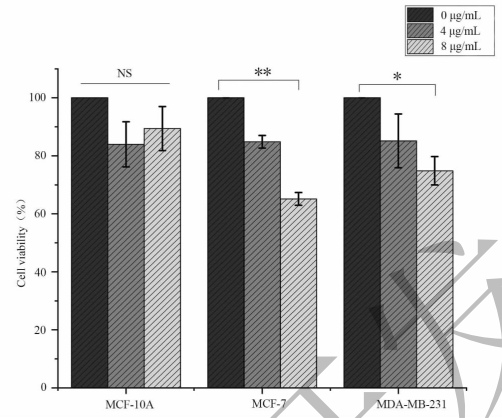


图2 BPIS对乳腺癌细胞活性的影响( $n=3, x \pm s$ )

Fig. 2 Effect of BPIS on the activity of breast cancer cells ( $n=3, x \pm s$ )

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

表1 BPIS中活性成分  
Table 1 Active compounds in BPIS

序号 No.	化合物 Composition	化学式 Chemical formula	程度 Degree	介数 Betweenness	分子量 Molecular weight
1	葡萄糖基丁香酸 Glucosyringic acid	$C_{15}H_{20}O_{10}$	7	0.087 336 5	360
2	4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	6	0.009 199 45	138
3	香草酸 Vanillic acid	$C_8H_8O_4$	8	0.209 686 38	168
4	丁香酸 Syringic acid	$C_9H_{10}O_5$	8	0.027 788 24	198
5	对香豆酸 p-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	12	0.061 184 68	166
6	牡荆酸 Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$	22	0.526 738 84	432
7	阿魏酸 Ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	18	0.161 196 17	194
8	异阿魏酸 Isoferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	16	0.113 005 01	194

表2 BPIS活性成分抗乳腺癌潜在靶点  
Table 2 Information of potential anti-breast cancer targets form BPIS

序号 No.	基因名称 Gene name	UniProt ID	蛋白名称 Protein name	程度 Degree	介数 Betweenness
1	ESR1	P03372	雌激素受体 Estrogen receptor	3	0.000 815 25
2	CCND1	P24385	G1/S-特异性周期蛋白-D1 G1/S-specific cyclin-D1	1	0
3	ABCG2	Q9UNQ0	三磷酸腺苷结合盒亚家族 G2 抗体 ATP-binding cassette sub-family G member 2	6	0.084 518 52
4	EGFR	P00533	表皮生长因子受体 Epidermal growth factor receptor	2	0.018 645 05
5	VEGFA	P15692	血管内皮生长因子 A Vascular endothelial growth factor A	2	0.008 759 86
6	ACE	P12821	血管紧张肽转化酶 Angiotensin-converting enzyme	3	0.030 498 07

续表 3

序号 No.	基因名称 Gene name	UniProt ID	蛋白名称 Protein name	程度 Degree	介数 Betweenness
7	ABCB1	P08183	多药耐药蛋白 1 Multidrug resistance protein 1	5	0.067 812 61
8	PTGS2	P35354	前列腺素 G / H 合成酶 2 Prostaglandin G/H synthase 2	3	0.001 852 24
9	GSTM1	P09488	谷胱甘肽 s 转移酶 Mu 1 Glutathione S-transferase Mu 1	4	0.006 722 45
10	SERPINE1	P05121	纤溶酶原激活物抑制剂-1 Plasminogen activator inhibitor 1	2	0.008 759 86
11	MAPK1	P28482	丝裂原激活蛋白激酶 1 Mitogen-activated protein kinase 1	1	0
12	GSTT1	P30711	谷胱甘肽 S 转移酶 T1 Glutathione S-transferase theta-1	6	0.043 502 82
13	GSTP1	P09211	谷胱甘肽巯基转移酶 Glutathione S-transferase P	3	0.003 121 22
14	CD44	P16070	CD44 抗原 CD44 antigen	1	0
15	ESR2	Q92731	雌激素受体 $\beta$ Estrogen receptor beta	3	0.000 815 25
16	RELA	Q04206	转录因子 p65 Transcription factor p65	3	0.001 852 24
17	GSK3B	P49841	糖原合成酶激酶-3 Glycogen synthase kinase-3 beta	1	0
18	CYP1A1	P04798	细胞色素 P450 1A Cytochrome P450 1A1	3	0.031 687 85
19	PARP1	P09874	聚[ adp -核糖]聚合酶 1 Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1	0
20	MMP1	P03956	间质胶原酶 Interstitial collagenase	3	0.000 815 25
21	RHOA	P61586	转化蛋白 RhoA Transforming protein RhoA	6	0.013 908 07
22	PTK2	Q05397	局灶性粘附激酶 1 Focal adhesion kinase 1	1	0
23	MAPK8	P45983	丝裂原激活蛋白激酶 8 Mitogen-activated protein kinase 8	1	0
24	IGFBP3	P17936	胰岛素样生长因子结合蛋白 3 Insulin-like growth factor-binding protein 3	3	0.002 434 2
25	HDAC1	Q13547	组蛋白脱乙酰酶 1 Histone deacetylase 1	4	0.003 614 48
26	FGFR1	P11362	成纤维细胞生长因子受体 1 Fibroblast growth factor receptor 1	1	0
27	CYP1B1	Q16678	细胞色素 P450 1B1 Cytochrome P450 1B1	5	0.067 845 6
28	PLAU	P00749	尿激酶型纤溶酶原激活剂 Urokinase-type plasminogen activator	1	0
29	HRAS	P01112	GTP 酶 HRas GTPase HRas	2	0.008 759 86
30	MGMT	P16455	甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 Methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	7	0.054 731 75
31	ERBB3	P21860	酪氨酸激酶 erbB-3 Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	1	0
32	EP300	Q09472	组蛋白乙酰转移酶 p300 Histone acetyltransferase p300	4	0.003 614 48

续表 3

序号 No.	基因名称 Gene name	UniProt ID	蛋白名称 Protein name	程度 Degree	介数 Betweenness
33	SHBG	P04278	性激素结合球蛋白 Sex hormone-binding globulin	2	0.000 846 41
34	ABCC1	P33527	多药耐药相关蛋白 1 Multidrug resistance-associated protein 1	2	0.018 645 05
35	INS	P01308	胰岛素 Insulin	1	0
36	CDK2	P24941	细胞周期蛋白依赖性激酶 2 Cyclin-dependent kinase 2	1	0
37	IL2	P60568	白细胞介素-2 Interleukin-2	2	0.008 759 86
38	RARB	P10826	维甲酸受体 Retinoic acid receptor beta	6	0.013 908 07
39	CCNB1	P14635	G2 / 有丝分裂特异性细胞周期蛋白 B1 G2/mitotic-specific cyclin-B1	1	0

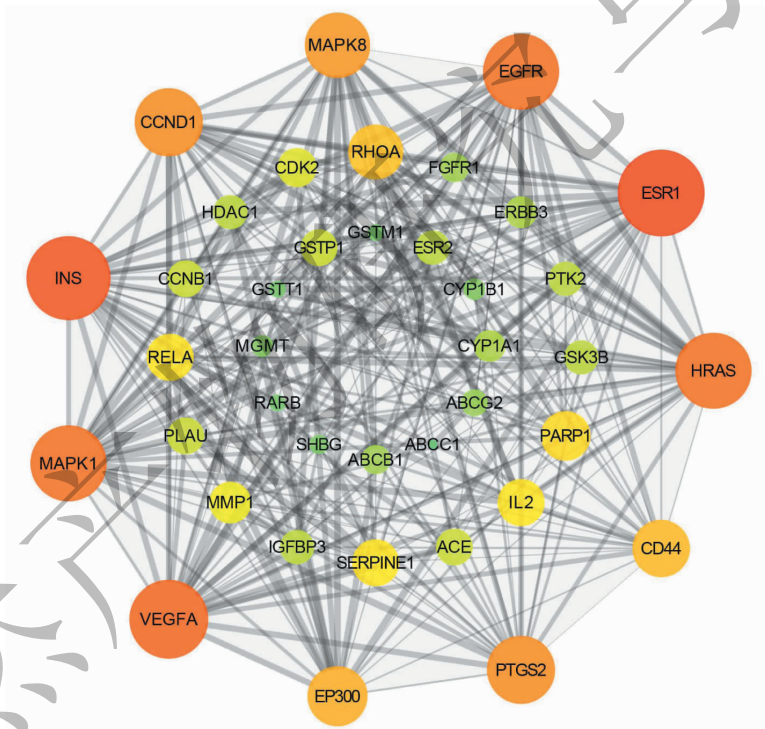


图 3 BPIS 蛋白相互作用网络

Fig. 3 Protein interaction network of BPIS.

注:节点的颜色和大小代表作用强度,边的粗细代表结合度。Note: The size and the color of the node represents the value of the degree, the thickness of the side indicates the value of the combine score.

数据显示,糖尿病及糖脂代谢障碍与许多恶性肿瘤的发生有密切的关联<sup>[14]</sup>。HRAS 属于 RAS 家族的小 GTP 酶,是癌症中经常发生突变的致癌基因,HRAS 调节复杂的信号转导网络,包括 RAF-MEK-ERK 级联、VEGF-PI3K-AKT 途径和 Raf-1 信号转导来促进癌细胞的增殖、迁移、血管生成和自噬等发

生<sup>[15]</sup>。MAPK1 是一类丝裂原活化蛋白激酶,据研究报道,MAPK1 参与了细胞的自噬、脂代谢、增殖、迁移和侵袭等过程<sup>[16,17]</sup>。可以预测 BPIS 主要通过细胞的增殖、迁移、自噬和糖脂代谢的调控来发挥抗乳腺癌作用。



## 2.4 BPIS 活性成分-作用靶点网络构建

将 BPIS 活性成分和作用靶点相关信息导入

Cytoscape version 软件,构建活性成分-作用靶点网络图,详见图4。图中共有47个节点,107条边,其

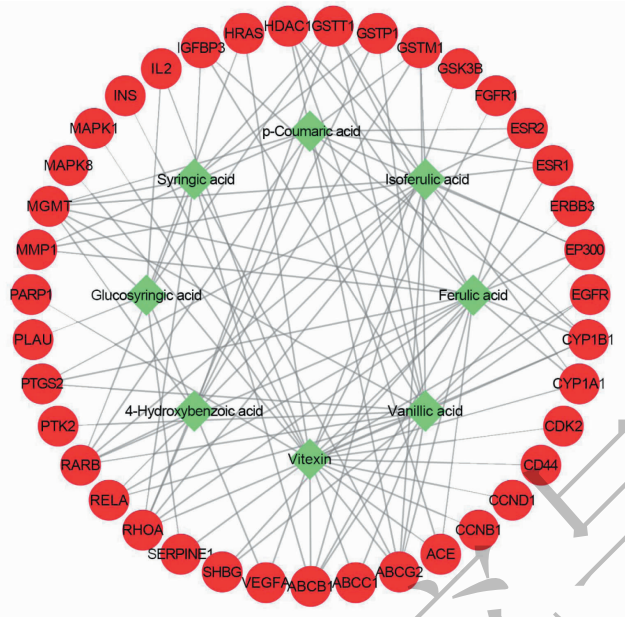


图4 BPIS 活性成分-靶点相互作用网络

Fig. 4 Components-targets network of BPIS

注:绿色菱形代表BPIS主要活性成分,红色圆形代表BPIS抗乳腺癌潜在靶点。Note: The green diamond is the main active components of BPIS, the red circle is the potential anti-breast cancer targets of BPIS.

中菱形绿色的节点代表BPIS活性成分,圆形红色的节点代表相关靶点。由图中可以看出,活性成分 Vitexin 对应22个靶点,靶点 MGMT 对应了7个活性成分,体现了BPIS多成分、多靶点的调节特点。

## 2.5 GO 和 KEGG 富集分析

将BPIS活性成分对应的靶点信息导入DAVID数据库,进行GO生物功能富集分析和KEGG通路富集分析。根据分析结果设置阈值 $P < 0.05$ ,筛选得到12个生物过程,如图5所示,分别为RNA聚合酶II启动子转录正调控、药物反应、信号转导、MAPK级联反应、GTP酶活性激活正调控、血管生

成、细胞增殖负调控、蛋白磷酸化、细胞凋亡正调控、PI3K信号传导正调控、ERK1和ERK2级联正调节及细胞多脂多糖反应。细胞成分的分析结果如图6所示,靶点主要涉及核、细胞质、质膜和胞液等。靶点涉及的分子功能如图7所示,主要有蛋白质结合、ATP结合、酶结合及蛋白激酶活性等。其中蛋白激酶是催化蛋白质磷酸化过程的酶,在肿瘤细胞中有重要的作用。蛋白激酶Mst是在体内普遍表达的一种苏氨酸蛋白激酶,研究发现激活Mst活性可以引起细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

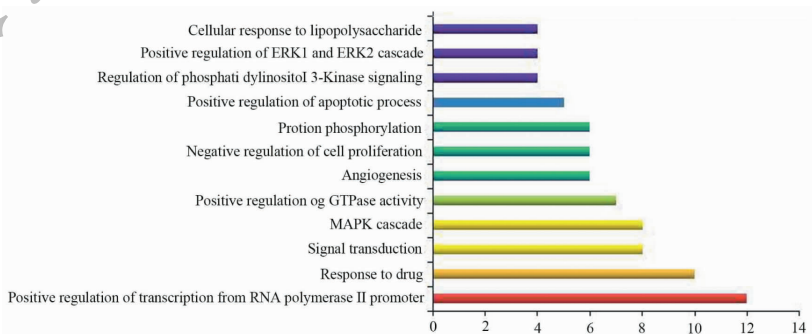


图5 GO 生物过程富集分析

Fig. 5 Gene Ontology (GO) analysis of Biological process

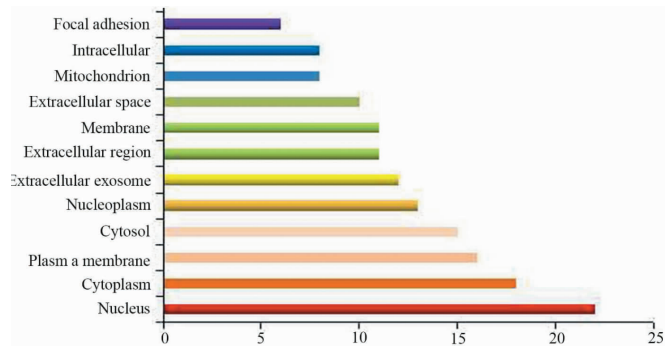


图 6 GO 细胞成分富集分析

Fig. 6 Gene Ontology (GO) analysis of cell component

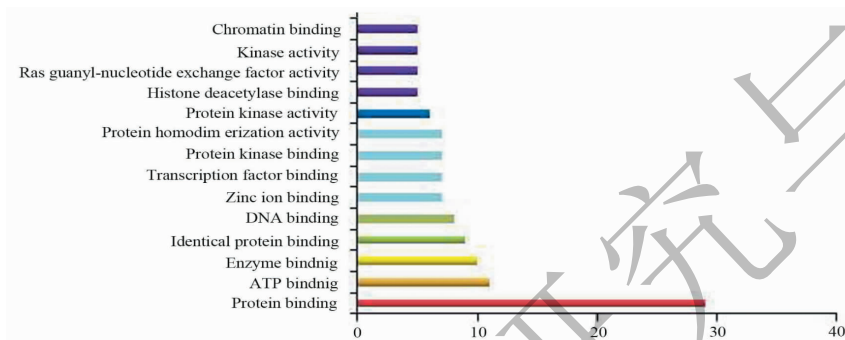


图 7 GO 分子功能富集分析

Fig. 7 Gene Ontology (GO) analysis of molecular function

KEGG 通路富集分析(图 8)发现,这些靶点主要涉及癌症信号通路(pathways in cancer)、蛋白多糖在癌症中的作用(proteoglycans in cancer)、PI3K-AKT 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)和 ErbB 信号通路等。粘蛋白(MUC1)是一种与肿瘤相关的糖蛋白,在 90% 的乳腺癌中高表达,且与乳腺癌患者的瘤负荷量成正比,以 MUC1 为乳腺癌治疗的靶点可以有效的杀伤

乳腺癌<sup>[19]</sup>。PI3K/AKT(丝氨酸/苏氨酸激酶)信号通路可以通过促进细胞生长、迁移和增殖、减少凋亡等途径促进乳腺癌肿瘤的形成,有研究表明使用小檗碱可以通过抑制 AKT-mTOR 信号通路,从而诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞自噬及凋亡<sup>[20]</sup>。以上结果与文献基本一致,表明了 BPIS 活性成分的相关靶点分布在不同的代谢通路,体现了 BPIS 多成分、多靶点协同抗乳腺癌的作用机制。

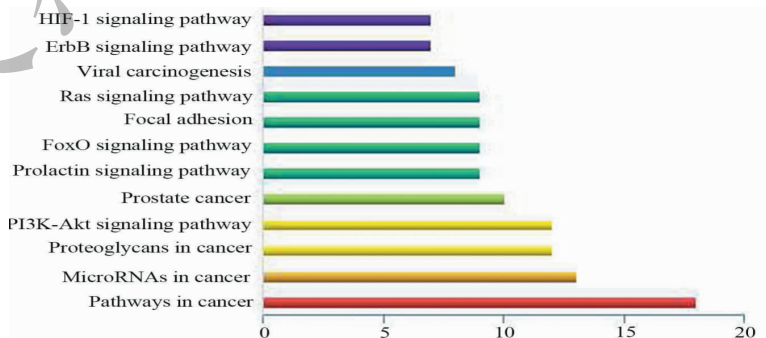


图 8 BPIS 相关靶点的 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis of BPIS potential targets



## 2.6 靶点通路分析

利用 DAVID 数据库对 BPIS 相关靶点进行 KEGG 通路富集分析,并整合绘制出最终的通路图。如图 9 所示,将 BPIS 抗乳腺癌相关靶点标记为浅绿色,通路靶点标记为浅蓝色。图中显示了 EGFR/MAPK、EGFR/Ras、RhoA、INS/PI3K-AKT、CD44 和 VEGF 信号通路可能参与了 BPIS 对乳腺癌细胞活性的调节。EGFR 是一种具有内在蛋白酪氨酸激酶活性的跨膜受体蛋白,其活化会导致广泛的生物反应,涉及细胞的凋亡、迁移和增殖等,而三阴性乳腺癌的特征在于 EGFR 的过表达和其下游信号传导途径的激活;有研究发现使用单克隆抗体西妥昔和一种酪氨酸激酶抑制剂对 EGFR 进行双重靶向治疗,能够对 MAPK 和 RAS 信号通路进行抑制,可能成为三阴性乳腺癌的潜在治疗方法<sup>[21,22]</sup>。PI3K/

AKT 信号通路在乳腺癌中往往是被激活的,且有研究发现,通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,能够通过促进分子伴侣介导的自噬,从而抑制细胞的增殖并促进细胞的凋亡<sup>[23,24]</sup>。CD44 是哺乳动物细胞表面上普遍存在的糖蛋白,研究发现其在多种实体肿瘤如:乳腺癌、肺癌和胰腺癌中高度表达<sup>[25]</sup>。实体瘤的进展取决于恶性组织中血管的形成,在一系列促血管生成因子中,血管内皮生长因子 VEGF 起着关键作用,VEGF 的阻断可导致血管网络的消退并抑制肿瘤的生长<sup>[26]</sup>。其中 EGFR/MAPK 和 INS/PI3K-AKT 都与糖脂代谢的调节有密切联系,同时分析结果显示,与上述信号通路联系最密切的死亡相关过程只有自噬,表明 BPIS 很可能通过调节乳腺癌细胞中的糖脂代谢促进其自噬性死亡,从而发挥特异性的抗乳腺癌作用。

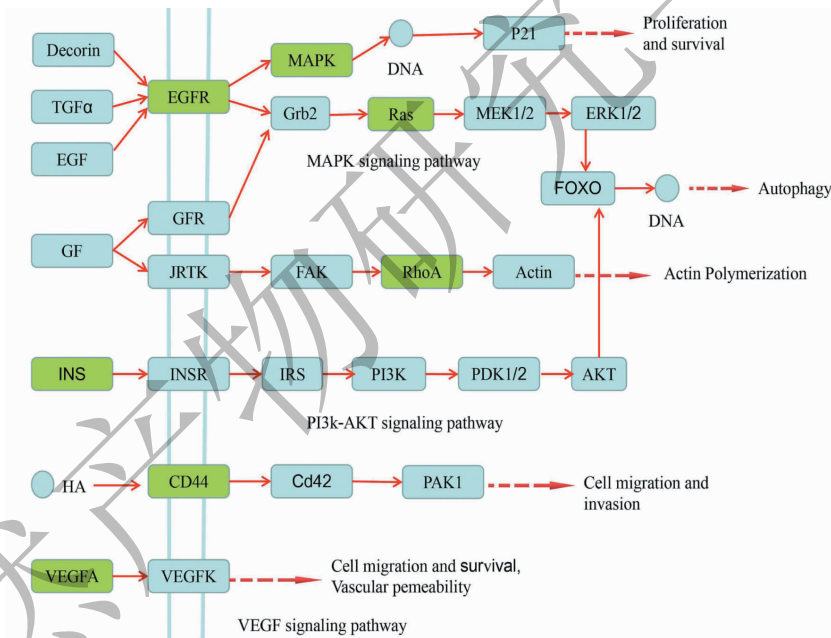


图 9 BPIS 抗乳腺癌潜在靶点通路分析

Fig. 9 Potential anti-breast cancer pathways of BPIS

## 3 结论

谷糠虽然是谷物加工过程中的副产品,但它含有丰富的营养元素和活性物质,其中谷糠结合态多酚具有较高的生物活性,包括抗氧化、抗高血糖、抗肿瘤和免疫调节等作用<sup>[27]</sup>。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,三阴性乳腺癌是较特殊的类型,具有恶性程度高、侵袭能力强等特点,目前缺乏有效的治疗手段<sup>[28]</sup>。我们研究发现,BPIS 对乳腺癌细胞具有特异性杀伤作用。本文通过网络药理学方法,对

BPIS 发挥抗乳腺癌作用的机制进行系统的分析和预测,为进一步深入研究 BPIS 抗乳腺癌作用提供了扎实的理论依据。

富集分析结果显示,BPIS 主要参与调控药物反应、信号转导、MAPK 级联反应、蛋白磷酸化等生物过程;涉及核、细胞质、质膜和胞液等细胞组分;涉及蛋白质结合、ATP 结合、蛋白激酶活性等分子功能。靶点通路富集分析结果显示:12 个靶点参与 PI3K-AKT 信号通路(30.8%)、9 个靶点参与 FoxO 信号

通路(23.1%)、9个靶点参与Ras信号通路(23.1%)、7个靶点参与ErbB信号通路(17.9%)，其中FoxO信号、MAPK信号、PI3K/AKT信号以及INS信号都与糖脂代谢以及细胞自噬存在显著相关性。

有研究表明胃癌组织中，自噬相关基因LC3和FoxO表达水平显著增高<sup>[29]</sup>，且FoxO的磷酸化有助于三酰甘油转运蛋白MTP的表达和极低密度脂蛋白VLDL的产生，促进脂类的转运<sup>[30]</sup>。然而p38MAPK、PI3K/AKT和FoxO1的磷酸化水平与LC3 II/LC3 I和Beclin1的表达呈负相关，其磷酸化减弱后能够促进自噬的发生<sup>[31-33]</sup>。同时有研究表明脂代谢相关基因FTO在乳腺癌细胞中高度表达，用FTO抑制剂处理后，乳腺癌细胞中PI3K/AKT表达水平明显降低，说明PI3K/AKT信号参与了乳腺癌细胞中的脂质代谢<sup>[34]</sup>。结合相关文献报道以及本研究所做的相关分析，我们推测BPIS可能通过阻断脂质转运以及代谢，使细胞内脂质代谢紊乱，导致PI3K/AKT和FoxO等信号的减弱，从而引发细胞自噬，过度的自噬导致正常的细胞功能受损以及进一步的细胞死亡。由于肿瘤细胞本身就存在较强的自噬活动，BPIS的进一步诱导使其很容易达到自噬性死亡的最大阈值，这可能也是BPIS对肿瘤细胞具有特异性杀伤作用的重要原因。

综上所述，网络药理学结果显示BPIS中8个活性成分作用于39个靶点，涉及了多个生物过程、分子功能和细胞成分。通过对蛋白相互作用网络和BPIS活性成分-靶点网络的构建，发现靶点之间，活性成分和靶点之间存在相互作用关系，体现了特殊医药食品多成分-多靶点-多途径的作用特点。这一研究将为深入探讨BPIS抗乳腺癌的作用机制以及进一步的开发利用提供科学依据。

#### 参考文献

- Li JL. Application of cereals in sports nutrition food in China [J]. J Food Safe Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9: 5559-5564.
- Shi JY, Shan SH, Li HQ, et al. Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8: 74582-74594.
- Wang XJ, Yuan SL, Wei YQ. Cancer preventive effect and anti-cancer activity of plant polyphenols [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2005, 17: 508-517.
- Luo AN, Qu YQ, Dong R, et al. The treatment progress of the breast cancer [J]. Prog. Mod. Biomed(现代生物医学进展), 2015, 15: 160-162.
- Wang Y, Liu L. Progress in the application of fulvestrant combination in the treatment of advanced breast cancer [J]. Zhejiang J Integ Tradit Chin Western Med(浙江中西医结合杂志), 2018, 28: 982-986.
- Wang XH. Pathogenesis and treatment of breast cancer [J]. World Latest Med Infor(世界最新医学信息文摘), 2017, 17: 195.
- Grischke EM, Wu ZB. Breast cancer—a hereditary disease [J]. Chin Ger J Clin Oncol, 2000, 5: 59-60.
- Shi JY, Shan SH, Li ZW, et al. The inhibitory effects of bound polyphenols from foxtail millet bran on proliferation of four tumor cell lines [J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2015, 37: 178-184.
- Zhu DN, Chen C, Wang SM, et al. Application progress of network pharmacology in the research of traditional Chinese medicine [J]. Guangdong Chem Ind, 2018, 45: 157-158.
- Chen XR, Zhou WX, Zhang YX. Network pharmacology experimental research related technology [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2012, 26: 131-137.
- Lu Y, Shan SH, Li HQ, et al. Reversal effects of bound polyphenol from foxtail millet bran on multi-drug resistance in human HCT-8/Fu colorectal cancer cell [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66: 5190-5199.
- Zhou Y, Liu ZQ, Zhang XD, et al. Network analysis on the pharmacological mechanism of Zexie Decoction in treating hypertension [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2019, 39(1): 47-52.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45: 362-368.
- Wu S, Ding YL, He YQ. Correlation between abnormal glucose and lipid metabolism and occurrence and development of cancers [J]. Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗杂志), 2018, 25: 955-959.
- Wu XY, Liu WT, Wu ZF, et al. Identification of HRAS as cancer-promoting gene in gastric carcinoma cell aggressiveness [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6: 1935-1948.
- Tang YW, Huang H, Guo H, et al. HOTAIR Interacting with MAPK1 Regulates Ovarian Cancer skov3 Cell Proliferation, Migration, and Invasion [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 1856-1863.
- Xiao YZ, Liu H, Yu JJ, et al. MAPK1/3 regulate hepatic lipid metabolism via ATG7-dependent autophagy [J]. Autophagy,

- 2016, 12:592-593.
- 18 Lin X, Cai F, Li X, et al. Prognostic significance of mammalian sterile 20-like kinase 1 in breast cancer[J]. *Tumor Biology*, 2013, 34:3239-3243.
- 19 Li F, Ji J, Shi PY, et al. Research on MUC1 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes for breast cancer[J]. *Prac J Cancer (实用癌症杂志)*, 2017, 32(1):12-15.
- 20 Qian J, Tan JN, Cheng HB, et al. Effect of berberine on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells and its molecular mechanism[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2019, 31:422-427.
- 21 Sobande F, Dušek L, Matějková A, et al. EGFR in triple negative breast carcinoma: significance of protein expression and high gene copy number[J]. *Cesk Patol*, 2015, 51(2):80.
- 22 Guerrab AE, Bamdad M, Kwiatkowski F, et al. Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7:73618-73637.
- 23 Lee JJ, Loh K, Yap YS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2016, 12:342-354.
- 24 Li Y, Lu L, Luo N, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway protects against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure by chaperone-mediated autophagy in rats[J]. *Biomed. Pharmacother*, 2017, 92:544-553.
- 25 Mattheolabakis G, Milane L, Singh A, et al. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine[J]. *J Drug Target*, 2015, 23:605-618.
- 26 Chekhonin VP, Shein SA, Korochagina AA, et al. VEGF in tumor progression and targeted therapy [J]. *Curr Cancer Drug Tar*, 2013, 13:423-443.
- 27 Shi JY, Shan SH, Li ZY, et al. Bound polyphenol from foxtail millet bran induces apoptosis in HCT-116 cell through ROS generation[J]. *J Funct Foods*, 2015, 17:958-968.
- 28 Liu D, Zhang YB, Yan WJ, et al. miR-200b suppresses triple negative breast cancer cells in vitro [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ; Med Sci Ed (西安交通大学学报:医学版)*, 2018, 39:743-746.
- 29 Lu HF, Niu XP, Shen H, et al. Expression of autophagy related genes LC3 and FoxO1 in gastric cancer and its significance[J]. *J Shenyang Med College (沈阳医学院学报)*, 2016, 18:242-244.
- 30 Zhao H, Zhang YJ, Shu LY, et al. Effect of FoxO1 on glucose and lipid metabolism in liver[J]. *Basic & Clinical Med (基础医学与临床)*, 2019, 39:115-119.
- 31 Yang Q, Li Y, Li YQ. Influence of taxol passes through the p38MAPK Pathway for autophagy and apoptosis in rat renal tubular epithelial cells[J]. *Inner Mongolia Med J (内蒙古医学杂志)*, 2017, 49:779-780.
- 32 Ma KK, Ju YH, Chen QQ, et al. Effect of astragaloside IV on the regulation of PI3K/Akt/FoxO1 signal in kidney of type 2 diabetic nephropathy rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25(2):74-81.
- 33 Yan WJ, Ma XC, Zhao XY, et al. Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and in vitro [J]. *Drug Des Dev Ther*. 2018, 16:3961-3972.
- 34 Liu YZ, Wang RY, Zhang LC, et al. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13:4685-4690.
- (上接第 1479 页)
- 47 Shi X, et al. Hepatic and fecal metabolomic analysis of the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14:1174-1182.
- 48 Abdulkadir B, et al. Routine use of probiotics in preterm infants; longitudinal impact on the microbiome and metabolome [J]. *Neonatology*, 2016, 109:239-247.
- 49 Noorbakhsh H, et al. Metabolomics analysis revealed metabolic changes in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and metabolic responses to a synbiotic yogurt intervention [J]. *Eur J Nutr*, 2018; 1-11.
- 50 Wang M, et al. Beneficial changes of gut microbiota and metabolism in weaned rats with *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 supplementation [J]. *J Funct Foods*, 2018, 48:252-265.
- 51 Vemuri R, et al. *Lactobacillus acidophilus* dds-1 modulates the gut microbiota and improves metabolic profiles in aging mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10:1255.
- 52 Eliasson M, et al. From data processing to multivariate validation-essential steps in extracting interpretable information from metabolomics data [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12:996-1004.