

# 基于网络药理学、分子对接技术及体外实验验证 探讨龙葵治疗乳腺癌的作用机制

温馨<sup>1</sup>, 胡锦涛<sup>1\*</sup>, 程敏<sup>1,2\*</sup>, 宋忠兴<sup>1</sup>

<sup>1</sup>陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)  
陕西省创新药物研究中心, 咸阳 712083; <sup>2</sup> 商洛学院, 商洛 726000

**摘要:** 基于网络药理学和细胞实验探讨龙葵治疗乳腺癌的作用机制。利用 TCMSp 数据库、Swiss-Target-Prediction 和文献挖掘等方法收集龙葵的活性成分 7 种, 通过 GeneCards 数据库收集与乳腺癌相关靶基因 110 个, 运用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络, 将潜在靶点导入 STRING 11.5 数据库中获取 PPI 网络, 使用 DAVID 数据库对潜在靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。GO 功能富集分析发现 694 个结果。KEGG 通路富集分析发现 128 个结果 ( $P < 0.05$ ), 涉及癌症、PI3K/Akt、MAPK 等相关的信号通路。运用 AutoDock-vina 1.1.2 软件对龙葵中的 7 种关键活性成分, 桉皮树脂醇、 $\beta$ -胡萝卜素、谷甾醇、薯蓣皂苷元、澳洲茄碱、胆固醇及槲皮素与潜在靶点 AKT1、ESR1、EGFR、SRC、MAPK1 进行分子对接, 结果显示预测的关键成分薯蓣皂苷元与核心靶点 AKT1 和 EGFR 等具有较好的结合性。细胞实验结果表明, 不同浓度的薯蓣皂苷元可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖并促进细胞凋亡, 薯蓣皂苷元可调控 EGFR、AKT1 以及 p-AKT1 蛋白的表达, 同时薯蓣皂苷元可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达、上调促凋亡蛋白 Bax 表达。综上结果表明, 龙葵抗乳腺癌的潜在作用机制可能与调控 MDA-MB-231 细胞增殖及凋亡等过程相关, 且通过两个关键靶基因 AKT1 和 EGFR 发挥作用。

**关键词:** 龙葵; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; 薯蓣皂苷元; 细胞凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)10-1782-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.10.015

## Mechanism of *Solanum nigrum* in treatment of breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experimental verification

WEN Xin<sup>1</sup>, HU Jin-hang<sup>1\*</sup>, CHENG Min<sup>1,2\*</sup>, SONG Zhong-xing<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shaanxi Innovative Drug Research Center, State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation) Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China; <sup>2</sup> Shangluo University, Shangluo 726000, China

**Abstract:** To explore the mechanism of action of *Solanum nigrum* in the treatment of breast cancer based on network pharmacology and cellular experiments. The TCMSp database, Swiss-Target-Prediction and literature mining were used to collect seven active ingredients of *S. nigrum*. One hundred and ten target genes related to breast cancer were collected through the GeneCards database, and Cytoscape 3.8.0 software was used to construct the "drug-active-ingredient-target-disease" network. The potential targets were imported into the STRING 11.5 database to obtain the PPI network, and GO and KEGG enrichment analyses were performed on the potential targets using the DAVID Database. Go function enrichment analysis found 694 items. KEGG pathway enrichment analysis found 128 items ( $P < 0.05$ ), involving cancer, PI3K/AKT, MAPK and other signaling pathways related to *S. nigrum*. Molecular docking of seven key active ingredients medioresinol,  $\beta$ -carotene, sitosterol, diosgenin, solanocapsine, cholesterol and quercetin from *S. nigrum* with potential targets AKT1, ESR1, EGFR, SRC, MAPK1, using

收稿日期: 2023-04-20 接受日期: 2023-07-28

基金项目: 国家自然科学基金(82104230); 陕西省科技创新团队(2022TD-56); 秦岭特色生物资源综合开发利用项目(2019ZY-CXPT-09); 咸阳市 2020 重大科技专项(2020K01-20)

\* 通信作者 E-mail: hujinhanghi@126.com, exitxiaobai@163.com

AutoDock-vina 1.1.2 software. The molecular docking results showed that the predicted key component, diosgenin, showed good binding to the core targets, such as AKT1 and EGFR. The results showed that different concentrations of diosgenin inhibited the proliferation and promoted apoptosis of triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231, and diosgenin regulated the expression of EGFR, AKT1 and p-AKT1 proteins, meanwhile diosgenin also down-regulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and up-regulated the expression of pro-apoptotic protein Bax. The above results suggest that the potential mechanism of action of *S. nigrum* against breast cancer may be related to the regulation of MDA-MB-231 cell proliferation and apoptosis, and through two key target genes AKT1 and EGFR.

**Key words:** *Solanum nigrum*; breast cancer; network pharmacology; macromolecular docking; diosgenin; apoptosis

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,也是女性癌症相关死亡的主要原因<sup>[2]</sup>。乳腺癌的患病风险与很多因素有关,如年龄、遗传、生殖因素以及肥胖等<sup>[3]</sup>。目前,激素疗法、手术、化疗和放疗是乳腺癌治疗的主要策略,然而,由于乳腺癌是一种复杂且高度异质性疾病,多药耐药和严重的副作用限制了这些治疗方法的治疗效果,因此,迫切需要开发更有效、更安全的抗乳腺癌药物<sup>[4,5]</sup>。在癌症治疗中,中药和天然产物具有多层次、多途径、多靶点、高效且副作用小等优势,展现出良好的抗肿瘤效果<sup>[6,7]</sup>。而中药及其活性化合物抗乳腺癌具有疗效确切,毒副作用小、靶点丰富及机制多样等特点,中药来源的抗乳腺癌药物具有良好的开发和应用前景。

龙葵(*Solanum nigrum* L.)是茄科的一种药用植物,广泛分布于欧洲、亚洲和美洲。龙葵具抗癌、抗炎,抗氧化、抗菌和抗癫痫等作用,其主要的生物活性成分包括甾体皂苷、生物碱、酚类和多糖<sup>[8,9]</sup>。现代研究表明,龙葵及其活性成分(主要为甾体类、有机酸类、木脂素类及其他类)可用于治疗不同类型的癌症,如肝癌<sup>[10]</sup>、宫颈癌<sup>[11]</sup>、胰腺癌<sup>[12]</sup>、乳腺癌<sup>[13]</sup>等。龙葵甲醇提取物可诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-468 发生自噬和凋亡<sup>[14]</sup>,龙葵水提物和乙醇提取物对乳腺癌细胞 MCF-7 具有细胞毒性,并诱导 MCF-7 细胞发生凋亡和周期阻滞<sup>[13,15]</sup>,除此之外,龙葵也可通过表观遗传调节发挥抗乳腺癌的作用<sup>[16]</sup>。薯蓣皂苷元是一种来源于薯蓣属植物的天然甾体皂苷元,具有较好的抗肿瘤活性,研究表明薯蓣皂苷元可通过抑制 Vav2 活性抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移,并影响细胞的迁移行为,揭示薯蓣皂苷元可能具有抗转移潜能<sup>[17]</sup>。尽管上述研究取得了一定的进展,但龙葵抗乳腺癌的物质基础、作用靶点及详细的分子机制尚不完全明确。本研究基于网络药理学和分子对接相结合的技术方法,构建多层次、多角度的“药物-靶标-通路-疾病”网络关

系,并结合体外细胞实验进行验证,明确了龙葵有效成分薯蓣皂苷元可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖并诱导细胞发生凋亡,初步探讨了薯蓣皂苷元的作用分子机制,为龙葵治疗乳腺癌的进一步研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 龙葵活性成分筛选及作用靶点获取

采用 TC MSP (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 数据库以药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ <sup>[18]</sup> 为筛选依据,获得龙葵的活性成分。此外,通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库<sup>[19]</sup> 收集龙葵有效成分及其作用靶点,筛选后利用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行蛋白靶点矫正。

### 1.2 收集乳腺癌相关靶点

使用 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库以“breast cancer”为关键词进行检索,去重后得到乳腺癌的相关疾病靶点。

### 1.3 收集龙葵活性成分治疗乳腺癌潜在靶点

将挖掘到的乳腺癌相关疾病靶点和龙葵活性成分相关靶点导入线软件 Venny 2.1 (<https://bioinformatics.csic.es/tools/venny/>) 进行分析,筛选映射获取交集得到龙葵治疗乳腺癌的潜在作用靶点,并绘制维恩 Venn 图。

### 1.4 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

将龙葵治疗乳腺癌作用映射的交集靶点输入 STRING 10.5 在线软件(<https://string-db.org>) 构建蛋白相互作用网络,然后将 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.8.0 进行拓扑分析,并通过插件 MCODE 聚类分析共同靶点的度值大小筛选出核心靶点。

### 1.5 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

利用生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>, Version 6.8) 将潜在

作用靶点 Symbol 录入, Identifier 选择为“OFFICIAL\_GENE\_SYMBOL”, 物种选择为“Homo sapiens”, 列表类型选择为“Gene List”, 进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。根据 *P* 值筛选得到 GO 生物学功能分析结果和 KEGG 通路富集分析结果, 并将获得的结果通过微生信分析平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制成气泡图进行可视化。

### 1.6 “药物-活性成分-靶点-疾病”网络构建

将龙葵中药物-活性成分-靶点网络与 KEGG 富集的代谢通路的结果相整合, 在 Cytoscape 3.8.0 中构建“药物-活性成分-靶点-通路”网络图。网络中各节点 (node) 分别代表活性成分和关键靶点基因; 网络中边 (edge) 用来连接活性成分与关键靶点基因; 连接到网络的节点以度值 (degree) 为单位进行表示。网络中节点度值越大, 表明该有效成分发挥的作用越强。

### 1.7 分子对接

将筛选得到的龙葵核心成分与乳腺癌疾病关键靶点进行分子对接, 分析来计算网络中关键枢纽的亲合力。配体的三维 (3D) 结构从 PubChem 数据库下载。利用 RCSB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获得受体的三维结构。配体和受体由 mglttools\_win32\_1.5.6 软件修复, 并保存为 PDBQT 文件。AutoDock Vina 1.1.2 软件 (<http://vina.scripps.edu/>) 用于测试关键活性成分和目标蛋白质之间对接的亲合力。

### 1.8 实验细胞

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。细胞株用含 10% 胎牛血清的 L15 培养液培养, 并置于 37 °C, 100% 空气, 饱和湿度条件下恒温培养。

### 1.9 主要试剂

薯蓣皂苷元 (批号: S229101, 纯度为 100%, Selleck 生物科技有限公司), 用 1.205 9 mL 的乙醇将 50 mg 纯度为 100% 的薯蓣皂苷元溶解, 终浓度为 100 mmol/L, -20 °C 保存; Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (批号: A211-01, 南京诺唯赞生命科技股份有限公司); MTT (批号: 906M501, 北京索莱宝科技有限公司)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (批号: P1200-2, 北京索莱宝科技有限公司)、Hoechst 33342 (批号: 20211015, 北京索莱宝科技有限公司); 蛋白 Marker (批号: 91227189, Thermo 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: PA115, 天根生化科技有限公

司); ECL 化学发光底物 (批号: 180-5001, 上海天能生命科学有限公司); 兔抗 p-AKT1 单克隆抗体 (批号: 9018S, Cell Signaling Technology); 兔抗 AKT1 单克隆抗体 (批号: N12151652, 沈阳万类生物科技有限公司)、兔抗 EGFR 单克隆抗体 (批号: N08180628, 沈阳万类生物科技有限公司); 鼠抗 Bax 单克隆抗体 (批号: 10005017, 武汉三鹰生物技术有限公司)、鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体 (批号: 10022354, 武汉三鹰生物技术有限公司)、鼠抗  $\beta$ -action 单克隆抗体 (批号: 10021787, 武汉三鹰生物技术有限公司)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG (批号: 20000258, 武汉三鹰生物技术有限公司)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (批号: 20000374, 武汉三鹰生物技术有限公司)。

### 1.10 MTT 法检测薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板中, 加入不同浓度的薯蓣皂苷元培养 48 h, 弃去上清, 每孔加入 180  $\mu$ L 无血清的培养基和 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃去上清, 加入 150  $\mu$ L DMSO 溶解 MTT 甲瓚沉淀, 混匀后, 使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (A)。按公式计算肿瘤细胞生长抑制率: 抑制率 =  $(1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ , 以细胞抑制率对药物浓度对数作图, 计算出薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞的 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.11 Hoechst 33342 检测细胞形态

将细胞接种至 24 孔板中, 接种密度为  $1 \times 10^5$  个/孔; 细胞贴壁后用不同浓度的薯蓣皂苷元对细胞进行处理。用免疫染色固定液固定细胞, PBS 洗 3 次, 按照 Hoechst 33342 试剂盒中的说明书进行染色, 使用荧光显微镜观察并拍照。

### 1.12 流式细胞术检测细胞凋亡率

将对数生长期的细胞接种于 6 孔培养板中, 培养 24 h 后用不同浓度的薯蓣皂苷元进行处理, 48 h 后消化细胞并离心收集细胞。使用细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行染色, 利用流式细胞仪检测细胞的凋亡并用 Flowjo 软件分析。

### 1.13 Western blot 检测相关蛋白的表达

细胞处理同“1.12”, 收集细胞, 使用 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白。通过 BCA 定量法测定蛋白浓度, 将等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳。采用湿转电转移的方法, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉 (TBST 配制) 37 °C 封闭 PVDF 膜 1

h, 去除封闭液, 孵育一抗(1:2 000), 4 ℃ 过夜, TBST 洗膜三次, 室温孵育二抗(1:5 000) 1 h, TBST 洗膜三次后用 ECL 发光液显影, 使用 ChemiDoc XRS 图像系统结合 Image Lab 软件进行图像采集以及数据分析。

### 1.14 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 进行

组间比较采用 ANOVA 方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 龙葵活性成分筛选及作用靶点确定

通过 TCMSP 数据库, 并结合相关文献报道, 根据  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  筛选出符合条件且剔除无对应靶点信息的龙葵活性成分共 7 个(见表 1)。

表 1 龙葵活性成分信息

Table 1 Active ingredients of *S. nigrum*

Mol ID	化合物 Compound	OB(%)	DL
MOL002058	椴树脂醇 Medioresinol	57.2	0.62
MOL002773	$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -Carotene	37.18	0.58
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
MOL000546	薯蓣皂苷元 Diosgenin	80.88	0.81
MOL007356	澳洲茄碱 Solanocapsine	52.94	0.67
MOL000953	胆固醇 Cholesterol	37.87	0.68
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28

### 2.2 龙葵治疗乳腺癌的潜在作用靶点预测

通过 GeneCards 数据库筛选获得乳腺癌相关靶点 1 729 个, 利用在线软件 Venny2.1 对乳腺癌相关

靶点和龙葵活性成分相关靶点进行映射, 取交集后, 获得共同靶点 110 个, 即龙葵可能通过多个潜在作用靶点协同治疗乳腺癌(见图 1)。

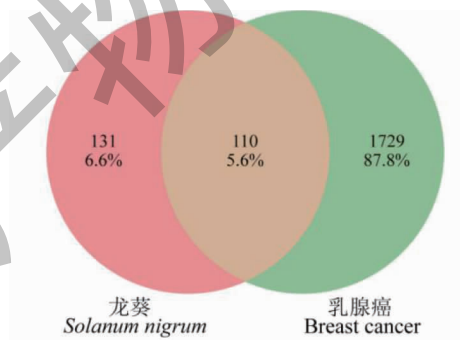


图 1 龙葵活性成分相关靶点与乳腺癌相关靶点韦恩图

Fig. 1 Venn analysis of breast cancer target and *S. nigrum* target

### 2.3 PPI 网络构建

将龙葵与乳腺癌的 110 个共同靶点输入 STRING 数据库, 获得 PPI 网络, 利用 Cytoscape 3.8.0 进行网络可视化(见图 2)。该网络中涉及 110 个节点, 1 096 条边, 其中节点表示靶基因, 边表示靶基因间的相互作用关系。根据插件的网络拓扑分析结果显示, 节点 degree 平均值为 19.9。根据节点数值筛选 ERBB2、EGFR、KIT、SRC、ESR1、AKT1、MAPK1、

PIK3CA 等关键靶点, 并认为这些靶点对龙葵治疗乳腺癌起到关键作用。

### 2.4 靶点的 GO 富集分析

将龙葵 110 个交集靶点录入 DAVID 数据库中, 共得到 GO 富集分析结果 694 个, 其中包括 499 个生物过程(biological processes, BP)、63 个细胞组分(cell composition, CC)和 132 个分子功能(molecular function, MF)。各筛选出排名前 10 的 GO 富集结果

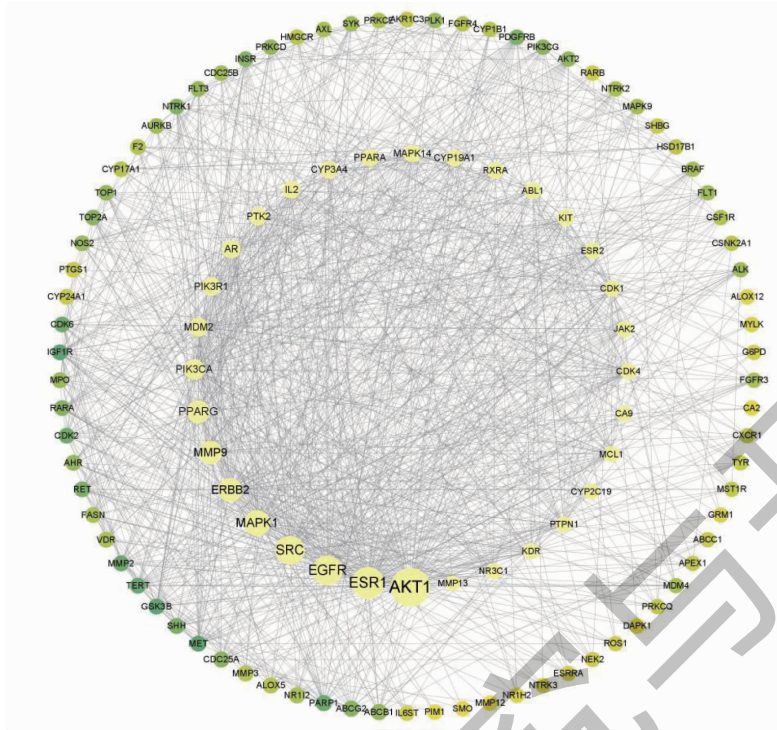


图2 PPI网络互作图

Fig. 2 PPI network interaction graph

绘制柱形图(见图3)。生物富集结果表明激酶活性正向调节、蛋白酪氨酸激酶活性、结合蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、MAPK 级联的正向调节、PI3K 信号

正向调节、锌离子结合、ATP 结合等生物过程均在龙葵治疗乳腺癌过程中发挥着重要作用。

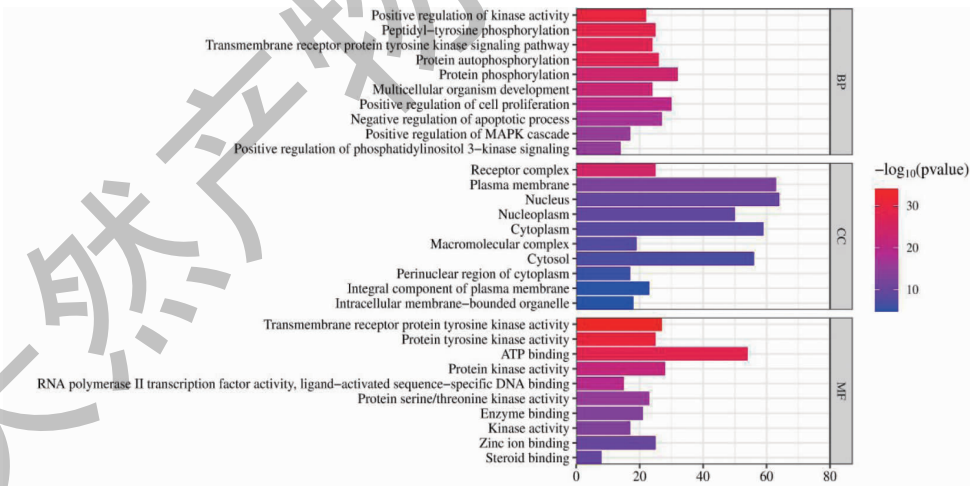


图3 GO功能富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

## 2.5 靶点的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析中筛选得到 137 条信号通路,取排名前 20 的通路进行 KEGG 可视化,绘制气泡图(见图 4)。与乳腺癌相关的通路主要有癌症通

路、PI3K/Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性信号通路、ErbB 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路和 Rap1 信号通路等。该结果提示龙葵通过作用于多条信号通路来发挥治疗乳腺癌的作用。

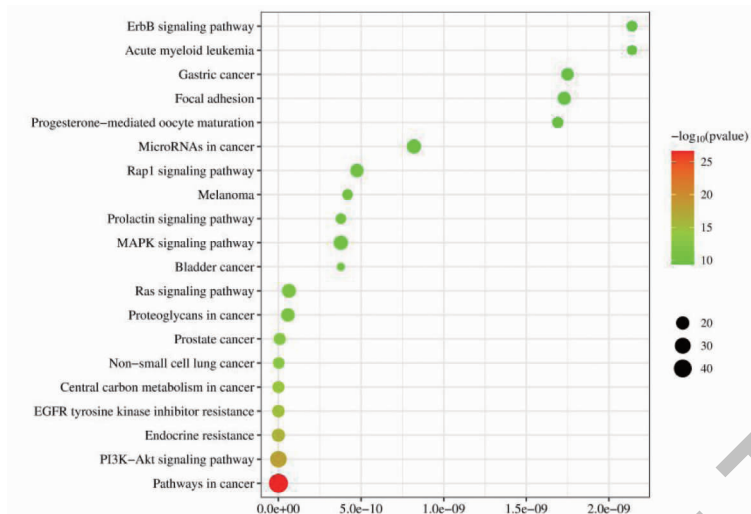


图 4 共有靶点的前 20 条 KEGG 通路

Fig. 4 Bubble chart of KEGG enrichment for common target protein

### 2.6 “成分-靶点-通路”网络构建

采用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路”网络图(见图 5),该网络共有 138 个节点,其中 7 个成分(橙色菱形)、110 个靶点(蓝色四边形)、20 条通

路(绿色圆形),492 条边。图中用度值(degree)预测出节点间的关联数,且度值越大表明该成分或该靶点越重要。

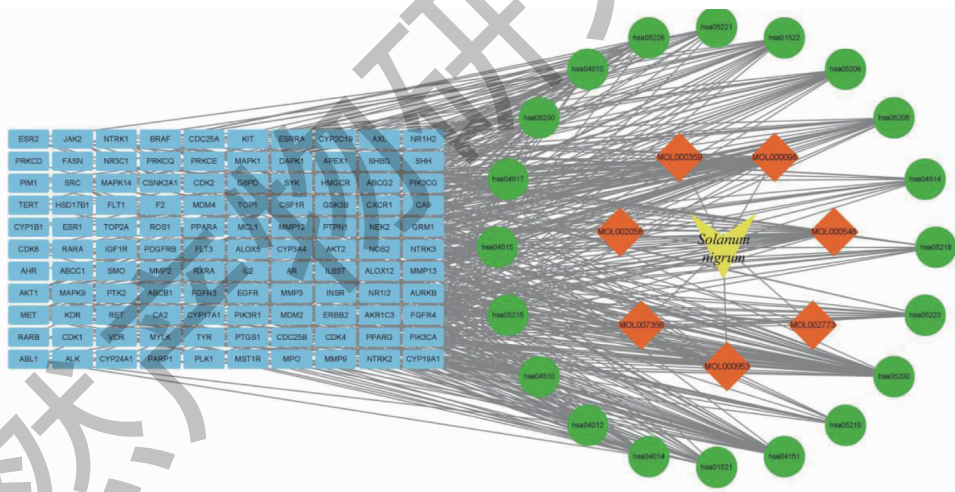


图 5 龙葵-靶点-疾病及相关通路的互作网络

Fig. 5 Interaction network of *S. nigrum*-target-disease and related pathways

### 2.7 分子对接

根据龙葵抗乳腺癌互作网络的主要活性成分,选择基因网络中具有大多数靶点的五个组分和具有高度节点的蛋白质进行分子对接。

表 2 和图 6 为关键靶点的活动中心坐标以及对接的结合能,分子对接结合自由能越小,则代表受体与配体间的亲和力越大。取与每个蛋白质结合最强化合物进行可视化处理(见图 7)。结果显示,所有化合物与蛋白对接的结合能均小于-6 kcal/mol,

说明各化合物与各蛋白均能较好结合。为了验证上述结果,使用分子对接分析来计算网络中关键枢纽的亲和力。

### 2.8 薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

MTT 实验表明,与对照组(0 μmol/L)相比,不同浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L)的薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率均显著增高,说明薯蓣皂苷元可抑制MDA-MB-231

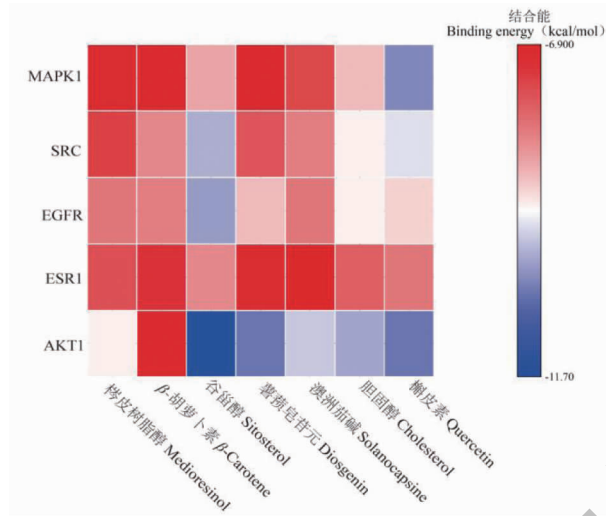


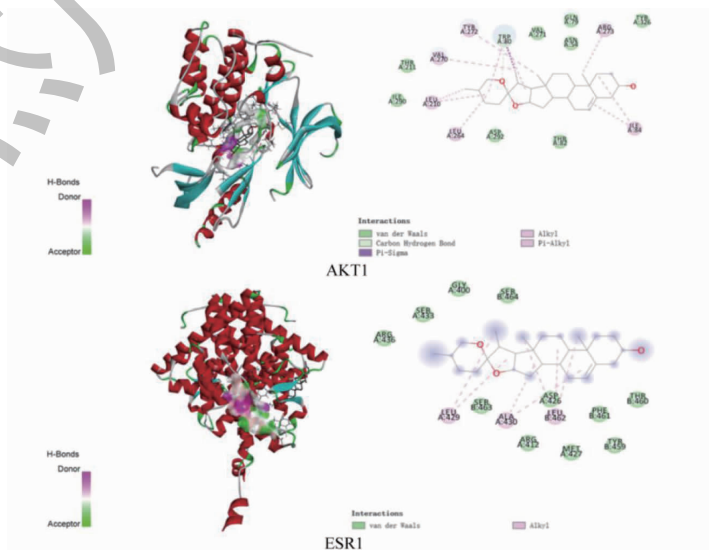
图6 龙葵活性成分与靶点蛋白结合能热图

Fig. 6 Thermogram of binding energy between active components of *S. nigrum* and target protein

表2 活性成分与靶点蛋白结合能

Table 2 Binding energy of active components to target proteins

活性成分 Active component	结合能 Binding energy (kcal/mol)				
	AKT1	ESR1	EGFR	SRC	MAPK1
椴皮树脂醇 Medioresinol	-9.2	-7.6	-8.1	-7.4	-7.1
$\beta$ -胡萝卜素 $\beta$ -Carotene	-7	-7.2	-8.2	-8.3	-7
谷甾醇 Sitosterol	-11.7	-8.3	-10.1	-9.9	-8.6
薯蓣皂苷元 Diosgenin	-10.5	-7.1	-8.8	-7.7	-7
澳洲茄碱 Solanocapsine	-9.7	-6.9	-8.1	-8.2	-7.5
胆固醇 Cholesterol	-10	-7.8	-9.2	-9.2	-8.8
槲皮素 Quercetin	-10.5	-8.1	-9	-9.5	-10.3



续图 7 (Continued Fig. 7)

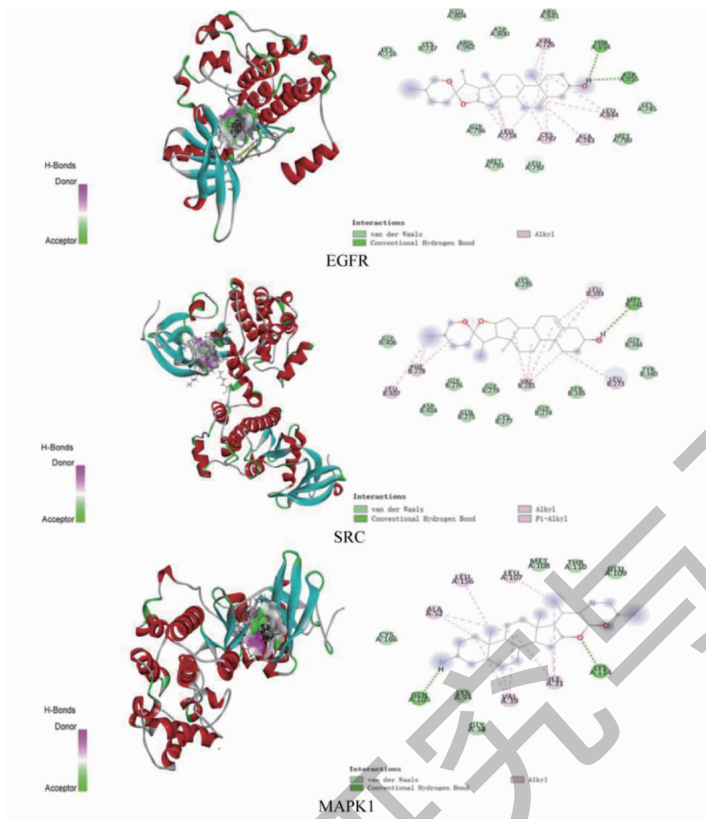


图7 薯蓣皂苷元与关键靶点分子对接模式图

Fig. 7 Docking pattern diagram of diosgenin elements with key target molecules

细胞的增殖,并且抑制作用呈剂量依赖性(见图8)。计算薯蓣皂苷元抑制MDA-MB-231细胞的 $IC_{50}$ 为 $44.98 \pm 3.06 \mu\text{mol/L}$ ,故后续实验采用0、15、30、60

$\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷元处理MDA-MB-231细胞进行机制研究。

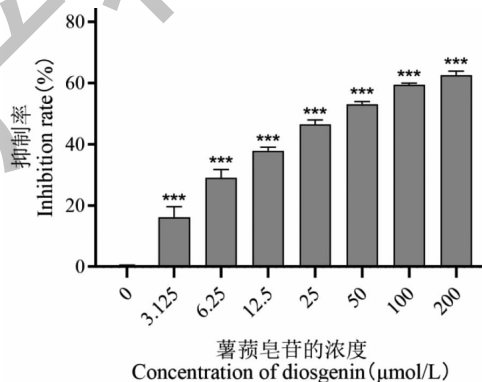


图8 不同浓度薯蓣皂苷元对MDA-MB-231细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 8 Effects of diosgenin with different concentrations on proliferation of MDA-MB-231 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与0  $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣皂苷元组相比,\*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  diosgenin group, \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2.9 薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Hoechst 33342染色,并采用荧光显微镜观察细胞形态。如图9所示,对照组细胞核被Hoechst

33342染成均匀的蓝色,呈圆形或椭圆形,不同浓度薯蓣皂苷元处理组则出现典型的凋亡特征,包括不同程度的呈致密浓染的细胞核。



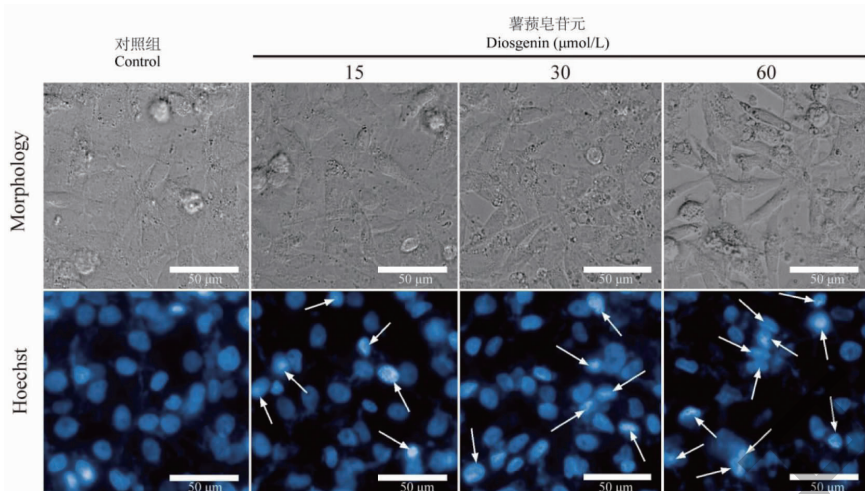


图9 不同浓度薯蓣皂苷元对MDA-MB-231细胞形态学的影响

Fig. 9 Effects of diosgenin with different concentrations on cell morphology of MDA-MB-231 cells

注:白色箭头标记凋亡细胞。Note: White arrows mark apoptotic cells.

Annexin V-FITC/PI 双染法结果显示,与对照组相比,不同浓度(15、30、60  $\mu\text{mol/L}$ )的薯蓣皂苷元

均可诱导MDA-MB-231细胞凋亡(见图10)。

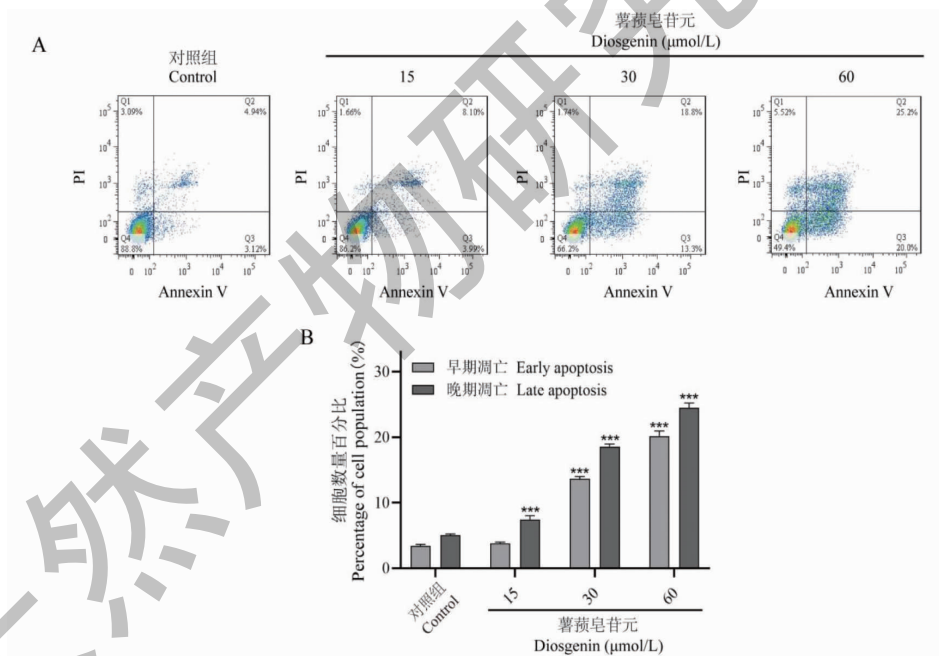


图10 不同浓度薯蓣皂苷元对MDA-MB-231细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 10 Effects of diosgenin with different concentrations on apoptosis of MDA-MB-231 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with control, \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2.10 薯蓣皂苷元对MDA-MB-231细胞中AKT1、p-AKT1、EGFR以及凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 检测MDA-MB-231细胞中EGFR、AKT1、p-AKT1、Bax、Bcl-2蛋白的表达, $\beta$ -action作为内参。实验结果显示,与对照组相比,薯蓣皂苷元可

下调MDA-MB-231细胞中EGFR蛋白表达,同时上调AKT1蛋白表达,下调p-AKT1蛋白表达(见图11A)。与对照组相比,薯蓣皂苷元可上调MDA-MB-231细胞中Bax蛋白表达,同时下调Bcl-2蛋白表达(见图11B)。

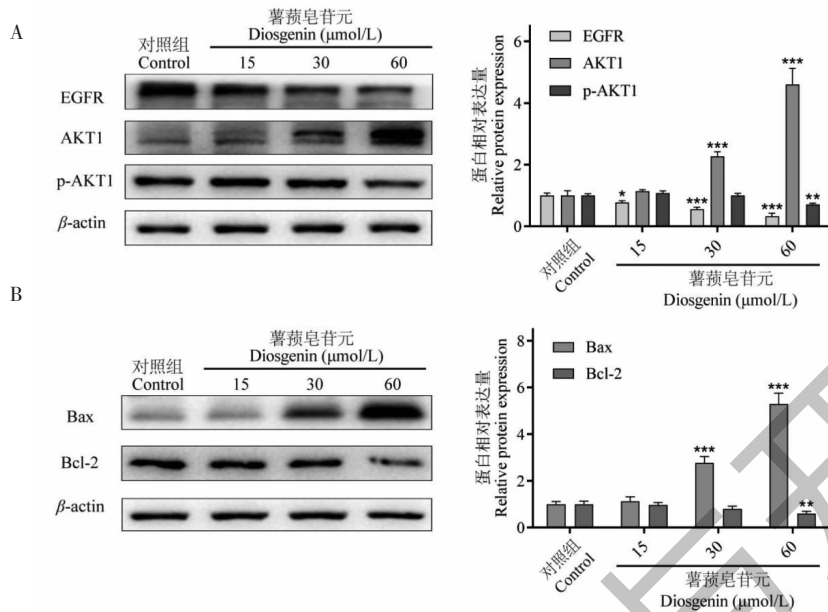


图 11 不同浓度薯蓣皂苷元对相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Effects of diosgenin with different concentrations on the expression of related proteins ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。Note:Compared with control,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

### 3 讨论与结论

龙葵是我国传统中草药,现代药理学发现龙葵有多种生物活性,且大多数集中在抗肿瘤领域<sup>[20,21]</sup>。有研究表明其活性成分薯蓣皂苷元可通过调节多种细胞信号通路发挥抗肿瘤作用,且与细胞生长、分化、凋亡等众多重要的分子靶点密切相关<sup>[22,23]</sup>。

本研究通过网络药理学 TCMSP 数据库<sup>[24]</sup>分析,共筛选出桉皮树脂醇、 $\beta$ -胡萝卜素、谷甾醇、薯蓣皂苷元、澳洲茄碱、胆固醇和槲皮素 7 个有效活性成分,将挖掘到的龙葵活性成分相关靶点与乳腺癌疾病靶点导入线软件 VENNY 2.1 映射获取交集,同时 PPI 网络分析表明这些交集靶点间具有密切的联系。有研究表明,槲皮素、澳洲茄碱和谷甾醇具有抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡等药理作用<sup>[25-27]</sup>。薯蓣皂苷元可促进乳腺癌 MCF-7 细胞和 Skp2 细胞的凋亡<sup>[28]</sup>。由此可见,龙葵有效成分槲皮素、澳洲茄碱、谷甾醇和薯蓣皂苷元可发挥抗肿瘤作用。

化合物-靶点网络图可知,龙葵-疾病靶点取交集后共得到 110 个靶点,进一步筛选发现 ERBB2、EGFR、KIT、SRC、ESR1、AKT1、MAPK1、PIK3CA 等为龙葵有效成分治疗乳腺癌的靶蛋白。其中桉皮树脂醇、薯蓣皂苷元和槲皮素等都作用于 AKT1 和

EGFR 靶点,AKT(丝氨酸/苏氨酸激酶)和 EGFR(表皮生长因子受体)在细胞增殖、迁移和代谢等方面具有重要意义。因此,靶向 AKT 和 EGFR 对乳腺癌来说是非常有吸引力的治疗策略<sup>[29,30]</sup>。本研究结果表明,在乳腺癌发展进程中 AKT1 和 EGFR 等靶点起着重要作用,并且可能是龙葵治疗乳腺癌的潜在作用靶点。GO 富集分析可知,龙葵抗乳腺癌的靶基因涉及激酶活性正调节、结合蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、MAPK 级联的正向调节、PI3K 信号正向调节、ATP 结合等生物过程,这些关键过程在龙葵治疗乳腺癌中发挥重要作用。KEGG 结果显示,共富集 137 条信号通路,如癌症通路、PI3K/Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性信号通路、ErbB 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路、Rap1 信号通路等。

分子对接技术探究龙葵的关键活性成分和目标蛋白质间的亲和力,结果表明,槲皮素、谷甾醇和薯蓣皂苷元等作用成分与靶点 AKT1、EGFR、ESR1、SRC 和 MAPK 等有良好的结合活性,反映了龙葵主要活性成分薯蓣皂苷元、谷甾醇和槲皮素治疗乳腺癌的主要机制可能与以上作用成分和靶点关系密切,龙葵可能通过多靶点及多信号通路对乳腺癌具有一定治疗作用。

基于分子对接研究结果,选择龙葵主要活性成

分薯蓣皂苷元进行抗肿瘤实验,并验证薯蓣皂苷元对其预测靶点 EGFR、AKT1 的调控作用。深入探讨薯蓣皂苷元抗乳腺癌潜在的作用机制。实验结果表明,薯蓣皂苷元可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖并诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,薯蓣皂苷元可下调细胞中 EGFR 蛋白的表达,上调 AKT1 蛋白的表达,值得注意的是,薯蓣皂苷元可使 AKT 磷酸化水平下调,同时薯蓣皂苷元能上调促凋亡蛋白 Bax 表达、下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。

综上所述,本研究应用网络药理学数据平台分析筛选龙葵主要活性成分,同时分析了龙葵治疗乳腺癌的多成分、多靶点、多通路的作用机制,并在体外进行实验验证,结果表明龙葵可能作用于 AKT1 和 EGFR 等靶点发挥治疗乳腺癌的作用,为进一步深入研究龙葵治疗乳腺癌的相关作用机制及后续龙葵临床应用研究提供思路和依据。

#### 参考文献

- 1 Wang L, Zhang S, Wang X. The metabolic mechanisms of breast cancer metastasis[J]. *Front Oncol*,2020,10:602416.
- 2 Huerta-reyes M, Aguilar-rojas A. Three dimensional models to study breast cancer(Review)[J]. *Int J Oncol*,2021,58:331-43.
- 3 Holm JB, Rosendahl AH, Borgquist S. Local biomarkers involved in the interplay between obesity and breast cancer[J]. *Cancers*,2021,13:6286.
- 4 Shafi S, Khan S, Hoda F, et al. Decoding novel mechanisms and emerging therapeutic strategies in breast cancer resistance[J]. *Curr Drug Metab*,2020,21:199-210.
- 5 Elkaeed EB, Salam H, Sabt A, et al. Recent advancements in the development of anti-breast cancer synthetic small molecules[J]. *Molecules*,2021,26:7611.
- 6 Liu Y, Yang S, Wang K, et al. Cellular senescence and cancer: focusing on traditional chinese medicine and natural products[J]. *Cell Prolif*,2020,53:e12894.
- 7 Du H, Liu Y, Chen X, et al. DT-13 synergistically potentiates the sensitivity of gastric cancer cells to topotecan via cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol*,2018,818:124-131.
- 8 Chen X, Dai X, Liu Y, et al. *Solanum nigrum* Linn: an insight into current research on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology[J]. *Front Pharmacol*,2022,13:918071.
- 9 Jabamallairaj A, Priatama RA, HEO J, et al. Medicinal metabolites with common biosynthetic pathways in *Solanum nigrum* [J]. *Plant Biotechnol Rep*,2019,13:315-327.
- 10 Nawaz A, Jamal A, Arif A, et al. *In vitro* cytotoxic potential of *Solanum nigrum* against human cancer cell lines[J]. *Saudi J Biol Sci*,2021,28:4786-4792.
- 11 Li J, Niu RX, Dong LX, et al. Anti-cervical cancer and anti-metastatic effects of sub-fraction 1a of *Solanum nigrum* L [J]. *Indian J Tradit Know*,2018,17:437-444.
- 12 Tuan Anh HL, Tran PT, Thao DT, et al. Degalactotigonin, a steroidal glycoside from *Solanum nigrum*, induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting the EGFR signaling pathways in pancreatic cancer cells[J]. *Biomed Res Int*,2018,2018:3120972.
- 13 Ling B, Xiao S, Yang J, et al. Probing the antitumor mechanism of *Solanum nigrum* L. aqueous extract against human breast cancer MCF7 cells[J]. *Bioengineering*,2019,6:112.
- 14 Shirkevad A, Borojeni ZN, Alayasin SE. Methanol extract of *Solanum nigrum* induces autophagy and apoptosis in MDA-MB-468 breast cancer cells[J]. *Indian J Pharm Sci*,2019,81:527-532.
- 15 Churiyah C, Ningsih I, Firdayani F. The cytotoxic, apoptotic induction, and cell cycle arrest activities of *Solanum nigrum* L. ethanolic extract on MCF-7 human breast cancer Cell [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2020,21:3735-3741.
- 16 Shirkevand A, Boroujeni ZN, Aleyasin SA. *Solanum nigrum* anticancer effect through epigenetic modulations in breast cancer cell lines[J]. *Curr Cancer Ther Rev*,2020,16:121-126.
- 17 He Z, Chen H, Li G, et al. Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity[J]. *Phytomedicine*,2014,21:871-876.
- 18 Wang S, Wang H, Lu Y. Tianfoshen oral liquid: a CFDA approved clinical traditional Chinese medicine, normalizes major cellular pathways disordered during colorectal carcinogenesis[J]. *Oncotarget*,2017,8:14549-15469.
- 19 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*,2019,47:W357-W364.
- 20 Yang MY, Hung CH, Chang CH, et al. *Solanum nigrum* suppress angiogenesis-mediated tumor growth through inhibition of the AKT/mTOR pathway[J]. *Am J Chin Med*,2016,44:1273-1288.
- 21 Wu FX, Zhao N, Mei QX, et al. Anti-tumor mechanism and research progress of *Solanum nigrum* [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*,2017,40:1238-1241.
- 22 Raju J, Mehta R. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin[J]. *Nutr Cancer*,2009,61:27-35.

- 23 Liu XX, Guo YK, Ai Q, et al. Study on the mechanism of Li-wei Dihuang Pills in the treatment of osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33:1593-1602.
- 24 Wan XH, Cai MB, You QH. Virtual screening of JAK3 specific inhibitors using molecular docking based on TCMSP database [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34:484-490.
- 25 Duo J, Ying GG, Wang GW, et al. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bel-2 and Bax regulation [J]. Mol Med Rep, 2012, 5:1453-1456.
- 26 Li TC, Chen NJ, Chen YY, et al. Solasonine induces apoptosis of the SGC-7901 human gastric cancer cell line *in vitro* via the mitochondria-mediated pathway [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26:3387-3395.
- 27 Bao X, Zhang Y, Zhang H, et al. Molecular mechanism of  $\beta$ -sitosterol and its derivatives in tumor progression [J]. Front Oncol, 2022, 12:926975.
- 28 Liu YL, Zhou ZJ, Yan JZ, et al. Diosgenin exerts antitumor activity via downregulation of Skp2 in breast cancer cells [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:8072639.
- 29 Martorana F, Motta G, Pavone G, et al. AKT inhibitors: New weapons in the fight against breast cancer [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:662232.
- 30 Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer [J]. Mol Oncol, 2018, 12:3-20.

天然产物研究与开发