

[文章编号] 1671-587X(2024)03-0759-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240320

基于红景天苷对三阴性乳腺癌关键差异基因作用机制的生物信息学和分子对接技术分析

朱紫嘉¹, 陈霞², 崔曼³, 文继红³, 王苹⁴, 宋东¹

(1. 吉林大学第一医院乳腺外科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院药理学系, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学第一医院普通妇一科, 吉林 长春 130021; 4. 吉林大学第一医院耳鼻咽喉-头颈外科, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 通过生物信息学和网络药理学方法探讨红景天苷治疗三阴性乳腺癌(TNBC)的作用机制, 阐明其产生治疗作用的主要靶点和信号通路。**方法:** 通过基因表达综合数据库(GEO)获取数据集GSE45827, 利用R软件包GSEABase进行基因集富集分析(GSEA), 采用limma R软件包寻找相邻正常组织和TNBC组织之间的差异表达基因(DEGs), 对DEGs进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析, 将DEGs与药物靶点结合, 导入基因/蛋白相互作用检索搜查工具String数据库, 形成蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络。使用MCODE插件对PPI网络进行功能模块筛选, 对SCORE值排名前2位的关键模块基因再次进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析。将2次KEGG富集分析所得通路与转录组数据GSEA富集分析结果取交集, 获得红景天苷治疗TNBC的作用通路。使用CytoHubba插件计算出关键模块中最大团中心性(MCC)评分前10位的关键节点基因, 即为核心基因。应用AutoDock Vina 1.1.2和PyMOL 2.3.0软件完成分子对接。**结果:** KEGG与GSEA富集分析的结果取交集得到13条共同通路, 涉及细胞周期、细胞衰老和p53信号通路等。GO功能富集分析结果中所涉及的有丝分裂、核分裂和姐妹染色单体分离等生物学过程与细胞周期有密切关联, 与KEGG富集分析结果一致。SCORE值排名第1位的关键模块中包含5个红景天苷药物作用靶点, 分别为重组人细胞周期蛋白A2(CCNA2)、细胞周期检查点激酶1(CHEK1)、驱动蛋白家族成员11(KIF11)、DNA拓扑异构酶2(TOP2A)和胸腺嘧啶酸合酶(TYMS), 将上述蛋白与红景天苷进行分子对接, 结果均表现出很强的结合能力(结合能 $< -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)。**结论:** 红景天苷的紧密结合靶标位于TNBC的DEGs关键功能模块中, 可以与CCNA2蛋白结合产生直接的调控作用, 与KIF11、TOPA2、CHEK1和TYMS蛋白结合可针对TNBC的关键节点基因产生间接的调控作用, 红景天苷有可能成为TNBC的临床治疗药物。

[关键词] 红景天苷; 三阴性乳腺癌; 生物信息学; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R737.9; R285.5 **[文献标志码]** A

Bioinformatics and molecular docking technology analysis on mechanism of salidroside on key differential genes of triple negative breast cancer

ZHU Zijia¹, CHEN Xia², CUI Man³, WEN Jihong³, WANG Ping⁴, SONG Dong¹

(1. Department of Breast Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;

[收稿日期] 2023-03-08

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目(20210401057YY, 20210101326JC)

[作者简介] 朱紫嘉(1998—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事乳腺癌临床治疗方面的研究。

[通信作者] 宋东, 教授, 博士研究生导师(E-mail: songdong@jlu.edu.cn)

2. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;
3. Department of General Gynecology, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China;
4. Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the mechanism of salidroside in the treatment of triple negative breast cancer (TNBC) by using the bioinformatics and network pharmacology methods, and to clarify the main targets and signaling pathways involved in the therapeutic effect. **Methods:** The dataset GSE45827 was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database; the gene set enrichment analysis (GSEA) was performed by using the R software package GSEABase; the differentially expressed genes (DEGs) between the adjacent normal tissue and TNBC tissue were identified by limma R software package; the Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were performed on the DEGs, and the DEGs were integrated with the drug targets to import into gene/protein interaction retrieval tool String database, and the protein-protein interaction (PPI) networks were constructed; the functional module screening of the PPI network was conducted by MCODE plugin, and the top 2 modules ranked by SCORE value were further subjected to GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway analysis. The pathways obtained from the two rounds of KEGG enrichment analysis were intersected with the results of GSEA enrichment analysis to identify the pathways involved in the therapeutic effect of salidroside on TNBC. The top 10 key node genes in the highest scoring module determined by the maximum clique centrality (MCC) score calculated by CytoHubba plugin were considered as the core genes; the molecular docking was performed by AutoDock Vina 1.1.2 and PyMOL 2.3.0 Software. **Results:** The intersection of KEGG and GSEA enrichment analysis results showed 13 signaling pathways, including the cell cycle, cellular senescence, and p53 signaling pathways, and so on. The biological processes involved in the GO functional analysis, such as mitosis, nuclear division, and sister chromatid separation, were closely related to the cell cycle and consistent with the results of the KEGG signaling pathway enrichment analysis. The top ranked module based on the SCORE value contained 5 drug target genes of Rhodiola glycoside, such as cyclin A2 (CCNA2), checkpoint kinase 1 (CHEK1), kinesin family member 11 (KIF11), DNA topoisomerase 2- α (TOP2A), and thymidylate synthase (TYMS). The molecular docking results demonstrated strong binding affinities between the above proteins and Rhodiola glycoside (binding energy $< -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). **Conclusion:** The tightly binding target of salidroside is located in the key functional modules of DEGs of TNBC, which can directly regulate by binding with CCNA2 and protein, and indirectly regulate the key differentially genes of TNBC by binding with KIF11, TOP2A, CHEK1 and TYMS proteins. Therefore, salidroside may be a potential clinical therapeutic drug for TNBC.

KEYWORDS Salidroside; Triple negative breast cancer; Bioinformatics; Network pharmacology; Molecular docking

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 占有乳腺癌的 15%~20%, 以同时出现雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 阴性为特征。TNBC 无法从内分泌治疗和抗 HER-2 靶向治疗中获益, 具有全身转移率高、对常规治疗不敏感和易耐药等特点, 患者预后较

差^[1-2]。目前 TNBC 的临床治疗仍然以化疗为主, 但不良反应较重, 患者难以耐受。

红景天苷作为一种富含多糖的成分, 是从中药红景天中提取的活性成分, 在提高人体免疫功能方面具有明显优势, 已被广泛用于预防高原病、增强免疫力、改善血管功能、延缓人体衰老、缓解抑郁症状和消除疲劳等^[3-5]。同时, 红景天苷的抗肿瘤生物学作用广泛。研究^[3-4]表明: 红景天苷在体内

外均可抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖, 使细胞周期受抑制, 细胞分裂停滞在分裂时相。近年来研究^[5-8]显示: 红景天苷在肺癌、未分化甲状腺癌和胃癌中具有抗肿瘤活性。

研究^[6]显示: $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 红景天苷可抑制人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期, 并明显抑制细胞的迁移和侵袭。有研究者^[7]采用 TNBC 细胞系 MDA-MB 231 进行研究发现: 红景天苷可通过基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 调控表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) / Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, Jak2) / 信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路, 抑制 TNBC 细胞迁移、侵袭和血管生成。研究^[8]显示: 红景天苷对乳腺癌裸鼠模型肿瘤生长的抑制作用强于紫杉醇, 其作用机制可能是通过下调细胞凋亡调节因子 B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和肿瘤抗原 p53, 上调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny l aspartate specific proteinase 3, Caspase 3), 从而增加促凋亡因子的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡。红景天苷是一种极具潜力的抗乳腺癌药物, 具有重要研究价值, 但其作用机制目前尚不明确, 从生物信息学和网络药理学的角度深入探讨红景天苷与 TNBC 相互作用机制的研究较少, 因此本文作者从该切入点进行分析, 以期红景天苷用于 TNBC 的临床治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 公共数据收集 从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载包含 TNBC 和相邻正常组织样本的数据集 (GSE45827), 选用该数据集中包括 11 个正常样本和 41 个 TNBC 肿瘤样本的信息。根据患者临床信息对基因表达数据进行初步处理, 使用 R 软件 limma 包, 根据 GPL570-55999 文件对基因符号进行注释, 形成完整的表达矩阵。

1.2 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的鉴定 使用 limma R 软件包对原始数据进行质量控制、数据背景校正、归一化处理、对数转

换和去除批次效应处理, 并寻找相邻正常组织和 TNBC 组织之间的 DEGs, 计算变换倍数 (fold change, FC), 以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2\text{FC}| \geq 2$ 作为筛选标准用以检测与正常样本相比的 TNBC 组织中的 DEGs。选用 ggplot2 和 pheatmap 等 R 软件包对分析结果进行可视化绘图。R 软件包可从 bioconductor 网站 (<https://www.bioconductor.org/>) 免费下载获取。

1.3 基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)、基因本体论 (Gene Ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路富集分析 利用 DAVID 数据库, 根据各基因的分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC) 和生物学过程 (biological process, BP) 对 DEGs 进行 GO 功能及 KEGG 信号通路富集分析, 阐明 DEGs 和细胞信号通路的功能。R 软件 GSEABase 包用于分析基因矩阵数据所涉及的通路。

1.4 红景天苷潜在靶点筛选 在比较毒理基因组学数据库 (Comparative Toxicogenomics Database, CTD) (<http://ctdbase.org/>)、Phar mMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、Super-PRED 数据库 (<https://prediction.charite.de/index.php>) 和 SwissTarget Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中检索红景天苷的作用靶点。利用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将靶点名称标准化。将红景天苷靶标与 TNBC 对应 DEGs 取并集获得红景天苷治疗疾病的潜在靶点。

1.5 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络 选择 String 在线分析工具 (<http://www.string-db.org/>), 置信度为 0.4, 从数据库中获取的红景天苷药物靶点和 DEGs 取并集后构建 PPI 网络图。采用 Cytoscape (3.9.1 版) 软件构建交互式网络图, 并使用 MCODE 插件在网络图中追踪关键基因模块。在 PPI 网络中, 节点代表目标蛋白质, 边代表蛋白质之间存在相互作用。

1.6 分子对接 根据小分子的化学文摘服务社 (Chemical Abstracts Service, CAS) 号从 PubChem 数据库下载 SDF 格式的 3D 结构, 将结构导入 ChemBio3D Ultra 14.0 进行能量最小化, 将 Minimum RMS Gradient 设置为 0.001, 将小分子保

存为 mol2 格式。将优化好的小分子导入 AutodockTools-1.5.6 进行加氢、计算电荷、分配电荷和设置可旋转键后保存为“pdbqt”格式。从蛋白质结构数据库 (protein data bank, PDB) 下载细胞周期素 A2 (cyclin A2, CCNA2) (PDB ID: 4EOP)、细胞周期检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHEK1) (PDB ID: 7SUF)、驱动蛋白超家族成员 11 (kinesin family member 11, KIF11) (PDB ID: 6TIW)、DNA 拓扑异构酶 2 α (DNA topoisomerase 2-alpha, TOP2A) (PDB ID: 1ZXM) 和胸腺嘧啶酸合酶 (thymidylate synthase, TYMS) (PDB ID: 6QXH), 使用 Pymol 2.3.0 软件去除蛋白结晶水和原始配体等, 将蛋白结构导入 AutoDocktools (v1.5.6) 进行加氢、计算电荷、分配电荷和指定原子类型并保存为“pdbqt”格式。使用 POCASA 1.1 在线工具 (<https://g6altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>) 预测蛋白结合位点, 采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接。利用 PyMOL 2.3.0 软件对对接结果进行相互作用模式分析。

2 结果

2.1 红景天苷的潜在靶点 通过 CTD、pharmmapper、Super-PRED 和 SwissTarget Prediction 数据库获取红景天苷作用靶点, 经过 UniProt 数据库校正并整理去重, 取并集后得到作用靶点共 410 个。见图 1。

2.2 DEGs 的识别和 GSEA 富集分析 对数据集 GSE45827 进行分析, TNBC 组有 814 个 DEGs, 包括 452 个上调基因和 362 个下调基因, $|\log_2 FC| \geq 2$

且 $P < 0.05$ 。正常组和 TNBC 组 DEGs 的热图和火山图见图 2A 和 2B, 其中热图展示了 $|\log_2 FC|$ 前 50 位的差异基因。对表达矩阵基因信息进行 GSEA 富集分析, 结果显示: 富集的通路主要涉及 DNA 复制、同种异体移植排斥、柠檬酸循环、蛋白酶体、移植物抗宿主病、视黄醇的新陈代谢、甘油酯新陈代谢、醛固酮调节钠重吸收、药物代谢-细胞色素 P450 和细胞色素 P450 对异种生物的代谢作用等。见图 2C 和 2D。

2.3 红景天苷作用靶点和 DEGs 将 DEGs 与药物靶点取交集, 共发现 29 个共同的基因 (表 1)。GO 功能富集分析结果显示: BP 主要涉及细胞发育的正向调节、糖基化合物代谢过程和肌肉细胞分化的正向调节; CC 涉及血小板 α 颗粒管腔、血小板 α 颗粒和血液微粒; MF 涉及激素绑定、核受体活性和配体激活的转录因子活性等。KEGG 信号通路富集到的通路途径包括叉头框蛋白 O (Forkhead box protein O, FoxO) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路、核苷酸代谢、结肠直肠癌、小细胞肺癌、前列腺癌、化学致癌-活性氧、AMP 依赖的蛋白激酶 (AMP activated protein kinase, AMPK) 信号通路、胰岛素信号通路、自噬-动物、胃癌和细胞衰老等, 上述通路与许多恶性肿瘤的发生发展有密切关联 (图 3)。

2.4 DEGs 的 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析 采用 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能富集分析中, BP 结果显示: 筛选出的 DEGs 主要在核内有丝分裂、通过质膜黏附分子的嗜同质细胞黏附、细胞器裂变、腺发育、有丝分裂姐妹染色单体分离、细胞激活的正向调节、白细胞激活的正向调控和核分裂等子集中富集; CC 结果显示: DEGs 主要在含有胶原的细胞外基质、血液微粒、质膜的外侧、细胞-底物连接、染色体区域、黏着斑、黑素体和色素颗粒等子集中富集; MF 结果显示: DEGs 主要在糖胺聚糖绑定、整合素结合、单链 DNA 解旋酶活性、主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex II, MHC II) 蛋白复合物结合、DNA 解旋酶活性、肝素结合和免疫球蛋白受体结合成分中富集。见图 4A。KEGG 信号通路富集分析结果显示: DEGs 主要在细胞周期、细胞衰老、卵母细胞减数分裂、人类 T 淋巴细

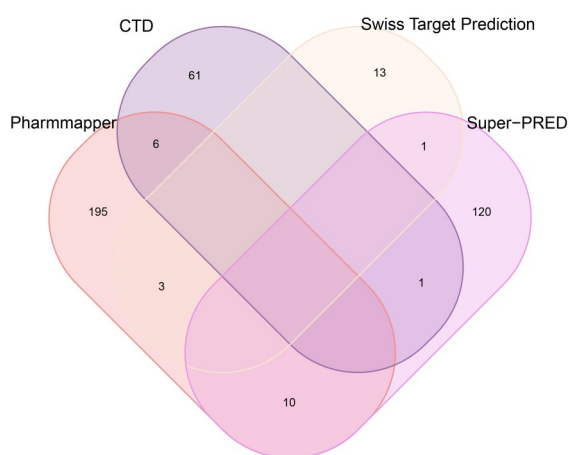
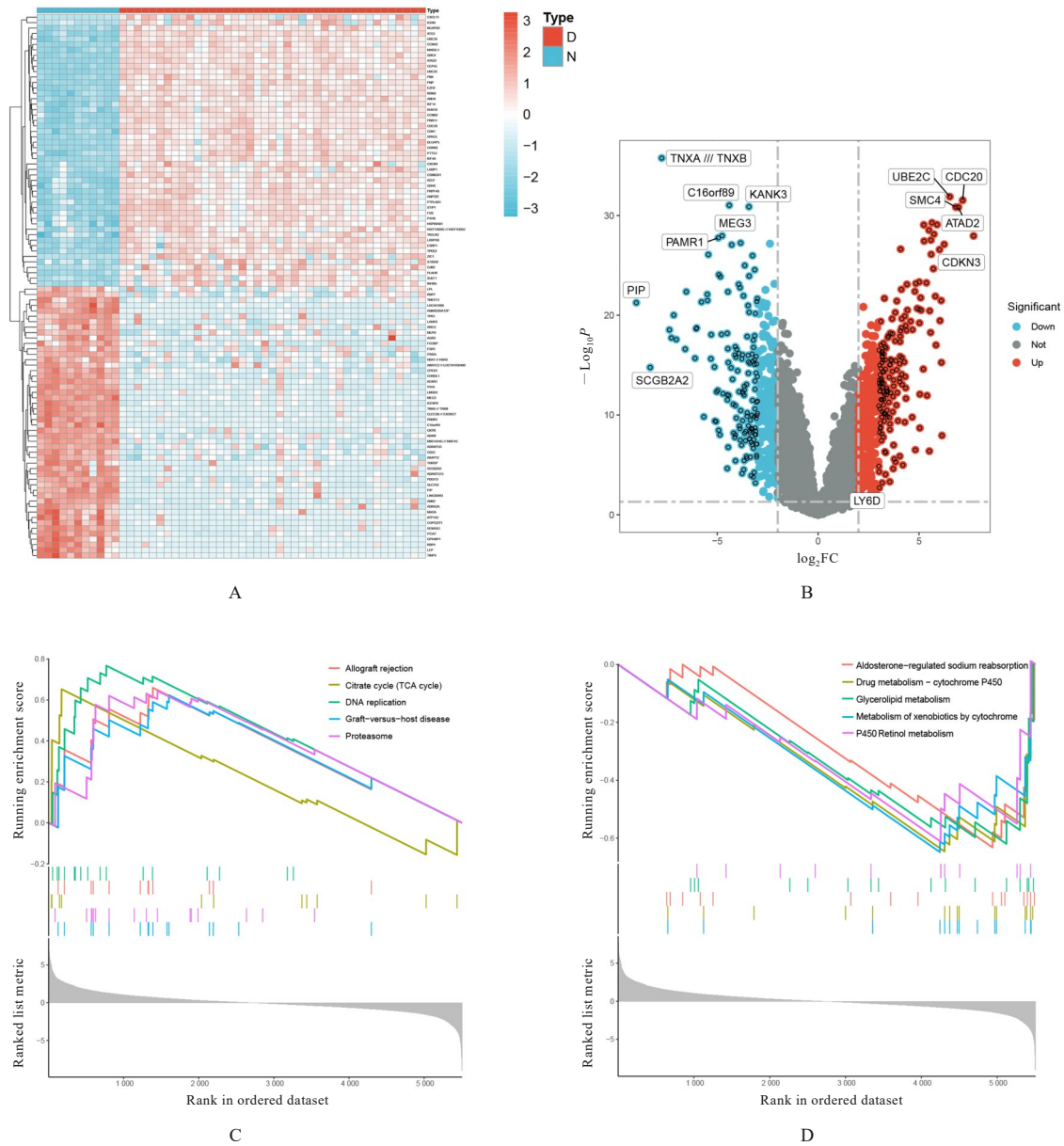


图 1 红景天苷作用靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of action targets of salidroside



A: Heat map; B: Volcano map; C,D:GSEA analysis;C: Pathway was up-regulated;D: Pathway was down-regulated.

图2 DEGs的热图、火山图和GSEA分析

Fig. 2 Heat map, volcano map, and GSEA analysis on DEGs

胞白血病病毒1感染、病毒性心肌炎、黏着斑、p53信号通路、疟疾、铁死亡、孕激素介导的卵母细胞成熟、类风湿性关节炎、硫胺素新陈代谢、前列腺癌、DNA复制、肠道免疫网络的IgA生产、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) -受体相互作用、阿米巴病、柠檬酸循环、白细胞介素17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路和急性髓系白血病等通路中富集。见图4B。

2.5 PPI和关键基因模块的筛选 筛选出的DEGs结果结合药物作用靶点在String网站上进行分析,

获得PPI结果。采用Cytoscape软件对PPI结果进行拓扑分析, 构建PPI网络 (图5A), 使用MCODE插件对PPI网络进行功能模块筛选 (图5B和5C), 在R软件中使用clusterProfiler包对SCORE值排名前2位的功能模块进行KEGG信号通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 关键基因模块1和2的基因主要在鼠疫感染、人类T淋巴细胞白血病病毒1型感染、化学致癌-活性氧、趋化因子信号通路、晚期糖基化终产物 (advanced glycosylation end products, AGEs) -AGEs受体

表1 红景天苷作用靶点与DEGs交集所得共有基因

Tab. 1 Shared genes obtained from intersection of salidroside targets and DEGs

Abbreviation of gene	Full name of gene
ALB	Albumin
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1 member C1
SOD2	Superoxide dismutase 2
PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2
MME	membrane metallo endopeptidase
UCK2	Uridine-cytidine kinase 2
AR	Androgen receptor
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha
KIT	Mast/stem cell growth factor receptor Kit
THRB	Thyroid hormone receptor beta
CCNA2	Cyclin A2
ADAM33	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 33
Bcl-2	B cell lymphoma-2
DDIT4	DNA damage-inducible transcript 4
TGFB1	Transforming growth factor beta-1
FN1	Fibronectin
PRKAR2B	cAMP-dependent protein kinase type II -beta regulatory subunit
CA4	Carbonic anhydrase 4
PNP	Purine nucleoside phosphorylase
SLC40A1	Solute carrier family 40 member 1
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
NR3C2	Mineralocorticoid receptor
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
F13A1	Coagulation factor XIII A chain
THRA	Thyroid hormone receptor alpha
SCN3A	Sodium channel protein type 3 subunit alpha
PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1

(receptor of AGEs, RAGE) 信号通路在糖尿病并发症中的作用、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、黏着斑、病毒致癌作用、脂质与动脉粥样硬化和细胞周期等信号通路中富集(图5D)。GO功能富集分析结果见图5E。采用CytoHubba插件计算关键基因模块中MCC评分前10位的关键节点基因,并生成相互作用网络图,即得到10个核心基因,包括TOP2A、泛素结合酶E2C(ubiquitin-conjugating enzyme E2 C, UBE2C)、细胞分裂周期蛋白20(cell division cycle protein 20, CDC20)、

细胞周期素依赖性激酶1(cyclin-dependent kinase 1, CDK1)、大同源物大关联蛋白5(disks large-associated protein 5, DLGAP5)、中心体蛋白55(centrosomal protein of 55 kDa, CEP55)、KIF11、核糖核苷二磷酸还原酶亚基M2(ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2, RRM2)、细胞周期蛋白B1(cyclin B1, CCNB1)、BUB1有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B(BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase B, BUB1B),其中TOP2A和KIF11属于药物作用靶点,其余8个基因属于TNBC的DEGs(图5F)。

2.6 DEGs结合红景天苷关键通路的筛选 将GSEA富集分析结果、DEGs的KEGG富集分析结果和关键模块基因KEGG富集分析通路相结合,取交集得到13个信号通路(图6)。13个信号通路涉及人类T淋巴细胞白血病病毒1型感染(hsa05166)、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性(hsa04510)、黏着斑(hsa04110)、细胞周期(hsa04218)、细胞衰老(hsa01521)、前列腺癌(hsa04621)、Nod样受体信号通路(hsa05215)、IL-17信号通路(hsa04657)、急性髓系白血病(hsa04114)、p53信号通路(hsa05221)、卵母细胞减数分裂(hsa04115)、孕酮介导的卵母细胞成熟(hsa04914)和利什曼病(hsa05140)。

2.7 分子对接 将PPI网络关键模块中的药物靶点基因与红景天苷进行分子对接。选择MCODE插件筛选出的评分最高关键模块中的5个药物靶基因TYMS、KIF11、CCNA2、TOP2A和CHEK1与红景天苷进行分子对接。分子对接结果显示:红景天苷与上述5个药物靶基因均可实现良好对接,结合能 $< -7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,其中最大团中心性(maximal clique centrality, MCC)评分前10位的核心基因中KIF11和TOP2A与红景天苷的结合能 $\leq -8.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,之间具有很强的结合能力(表2)。分子对接结果可视化分析见图7。

3 讨论

乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤,并且呈逐年增长趋势。研究^[9]显示:2020年女性乳腺癌新发病例数达2 261 419例,占全球女性恶性肿瘤发病的25.84%,占全球恶性肿瘤发病的12.50%。全球女性乳腺癌发病率为58.5/10万,世界标准发病率为47.8/10万,在癌症发病率谱中居首位。

流行病学调查^[10-11]显示:TNBC多发生于绝

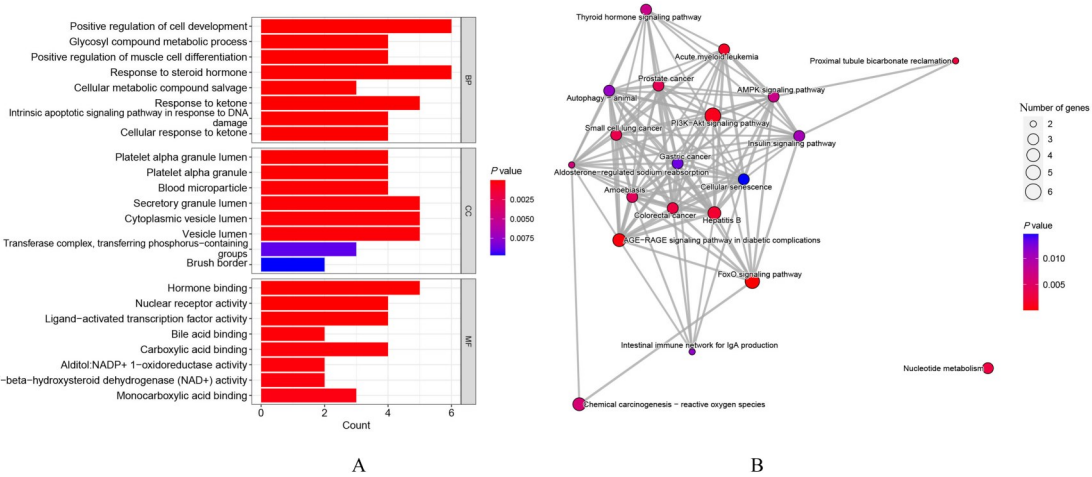


图3 29个交集基因的GO功能富集分析(A)和KEGG信号通路富集分析(B)

Fig. 3 GO functional enrichment analysis(A) and KEGG signaling pathway enrichment analysis(B) on 29 intersection genes

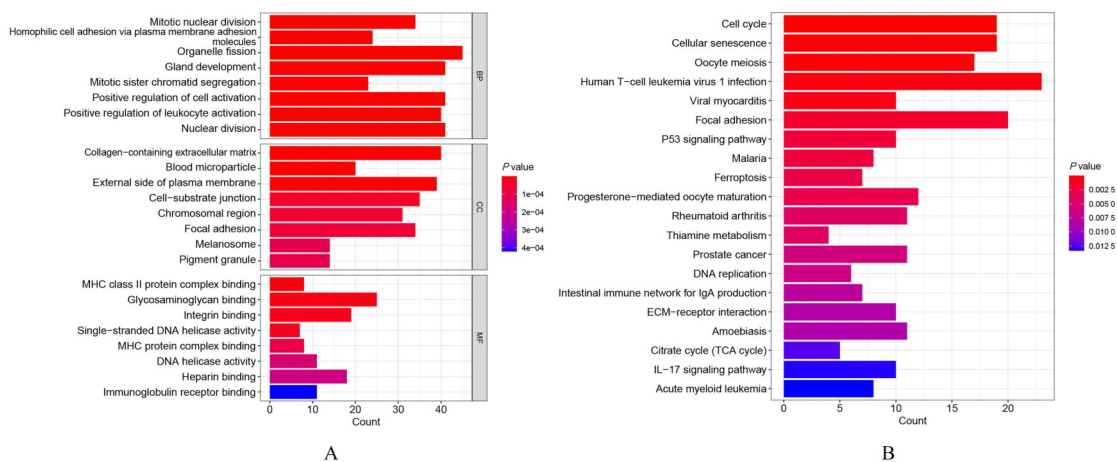


图4 DEGs的GO功能富集分析(A)和KEGG信号通路富集分析(B)

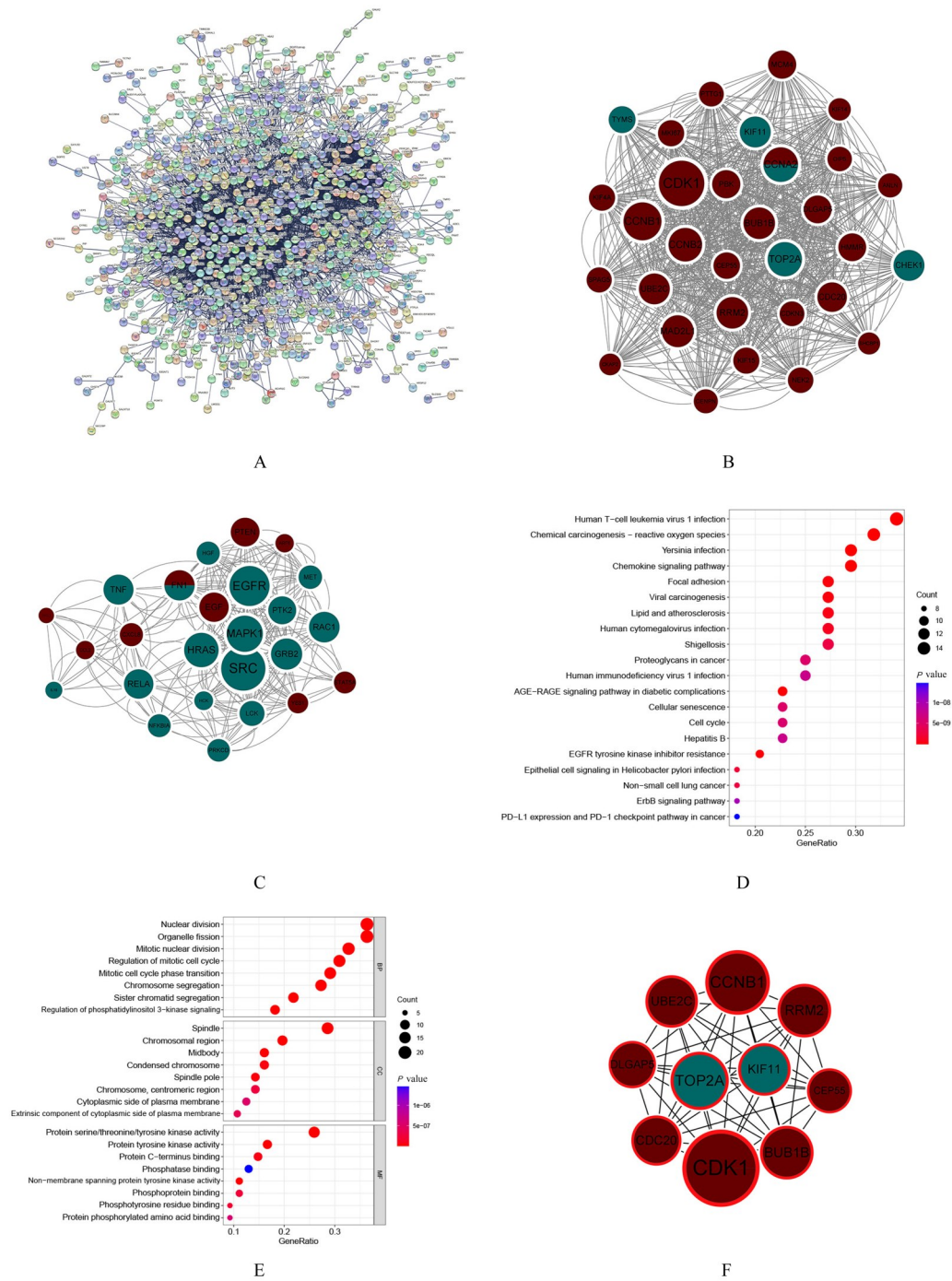
Fig. 4 GO functional enrichment analysis (A) and KEGG signaling pathway enrichment analysis (B) on DEGs

经前女性。与其他类型乳腺癌比较，TNBC易复发和转移，病情进展迅速，并且缺乏有效的治疗靶点，预后较差^[12-13]。目前，针对TNBC的标准治疗方案还停留在化疗和放疗阶段，缺乏明确靶点和靶向药物。

通过分析红景天苷对不同肿瘤细胞作用的相关研究，本文作者认为：红景天苷可能在治疗TNBC中发挥作用。本研究首先利用CTD、pharmmapper、Super-PRED和SwissTarget Prediction数据库获取了410个与红景天苷有关的目标基因，然后通过对转录组数据进行差异分析，结果显示：在TNBC与正常组织之间存在452个上调基因和362个下调基因。本文作者对DEGs进行

GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析，并进一步将DEGs与药物靶点结合形成PPI网络，使用MCODE插件筛选出关键模块，对SCORE值排名前2位的关键模块进行KEGG通路富集分析，将2次KEGG富集分析所得通路与转录组数据GSEA富集分析结果取交集，得到13条共同通路，其中多个通路涉及恶性肿瘤发生发展的多个方面；将DEGs与红景天苷作用靶点取交集，获得29个共有基因，进行富集分析得到相关通路，但由于在PPI网络中部分共有节点之间的互作关系缺乏紧密性，故本研究着重分析位于关键功能模块中的红景天苷作用靶点。

本研究中GO富集分析结果显示：关键模块中



A: PPI network diagram; B: Gene module with highest score obtained by MCODE plug-in; C: Gene module with second highest score obtained by MCODE plug-in; D: Bubble map of KEGG enrichment analysis on key module genes; E: Bubble map of GO enrichment analysis; F: PPI network of top 10 MCC scoring genes in key module genes.

图5 PPI网络和KEGG信号通路及GO功能富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagrams of PPI network and KEGG signaling pathway and GO functional enrichment analysis

的基因主要在核内有丝分裂、核分裂、有丝分裂细胞周期的调节、有丝分裂细胞周期相变和姐妹染色单体分离等生物过程中起到重要作用; KEGG信号通路分析结果显示: 上述基因与细胞周期、细胞衰

老、卵母细胞减数分裂和孕酮介导的卵母细胞成熟等有密切联系。关键模块所涉及的生物学过程与细胞周期有密切关联, KEGG信号通路富集分析结果也验证了该结果。

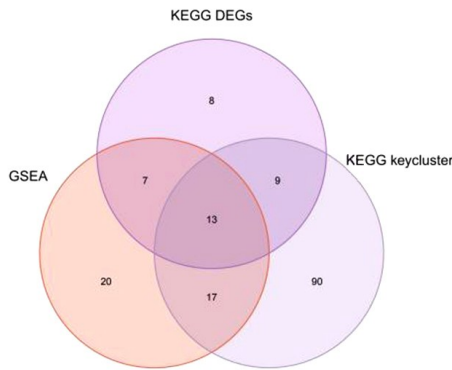


图6 信号通路交集形成的韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of intersections of signaling pathways

表2 分子对接结果

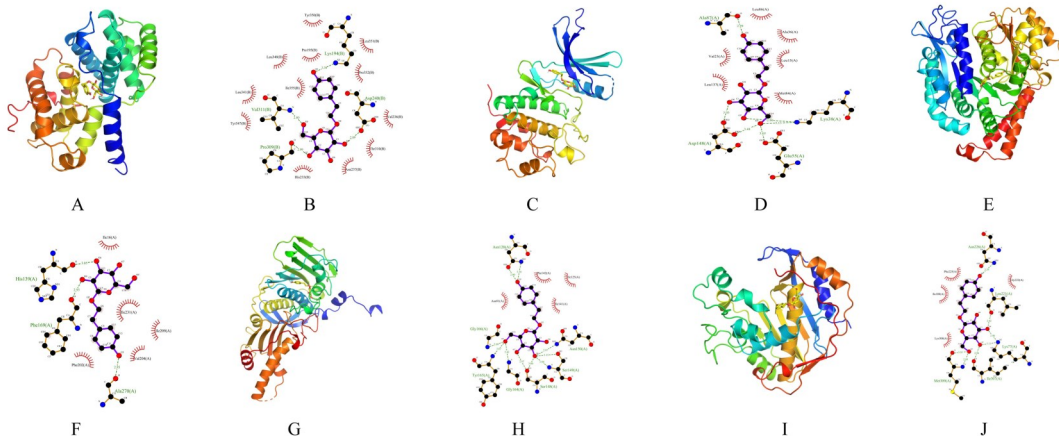
Tab. 2 Molecular docking results

Target gene	PDB ID	Binding energy(kcal·mol ⁻¹)
CCNA2	4EOP	-7.0
CHEK1	7SUF	-7.3
KIF11	6TIW	-8.0
TOPA2	IZXM	-8.2
TYMS	6QXH	-7.4

另外, Nod样受体信号通路也在本研究筛选出的13条重要通路中。Nod样受体是炎症免疫受体的代表之一, 目前研究^[14]显示: 炎症与肿瘤存在着密切关联, 炎症甚至是部分恶性肿瘤发生发展的主要原因。已有研究^[15]通过细胞实验和动物实验验证: Nod样受体信号通路与TNBC、炎性乳腺

癌、胃癌和结肠癌等均存在关联, 但不同研究所得结论各不相同, Nod样受体信号通路所起到的作用也不同, 具体机制仍有待进一步研究。本研究从生物信息学角度验证了红景天苷可通过Nod样受体信号通路作用于TNBC。

IL-17信号通路也是关键模块基因明显富集的通路之一。IL-17是一种参与免疫反应的细胞因子, 与细胞膜上IL-17受体(IL-17 receptor, IL-17R)结合发挥作用。在乳腺癌相关研究^[16]中, IL-17R可通过募集肿瘤坏死因子联合受体6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)和激活核因子κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)上调Bcl-2, 并诱导乳腺癌细胞对依托泊苷的耐药性; 而用抗体靶向抑制白细胞介素17受体B(interleukin-17 receptor B, IL-17RB)或白细胞介素17B(interleukin-17B, IL-17B)可抑制人乳腺癌细胞体外集落形成和体内肿瘤生长。研究^[17]显示: 酒精性脂肪性肝炎可以通过抑制Th17细胞分化、白细胞介素17A(interleukin-17A, IL-17A)阻断抗体和骨髓细胞中IL-17AR基因敲除来预防肝细胞癌的发生。RAO等^[18]研究显示: 肿瘤TNM分期越高, 血清中IL-17、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平越高; Cox回归分析显示: 血清中IL-17、LDH和VEGF水平及肿瘤TNM分期可能是胃癌的独立高危影响因素。IL-17信号通路与多种恶性肿瘤存在紧密关联^[17-18], 针对该通路寻找靶向药物具有重要意义。



A, B: CCNA2; C, D: CHEK1; E, F: KIF11; G, H: TOP2A; I, J: TYMS; A, C, E, G, I: 3D interaction diagrams; B, D, F, H, J: 2D interaction diagrams.

图7 分子对接模型

Fig. 7 Molecular docking model

本研究在PPI网络中提取到了MCC评分前10位的节点,其中包括2个药物作用靶点和8个疾病关键DEGs;分子对接结果显示:TOP2A和KIF11均可以很低的结合能与红景天苷形成良好对接,从而通过调控此二者的表达影响疾病的关键DEGs的表达,其中CDK1、CCNB1和CDC20均与细胞周期有密切关联^[19-20],红景天苷对其进行间接调控,即对细胞周期产生影响,进一步验证了红景天苷对TNBC的抗肿瘤活性。

在筛选出的10个核心基因中,2个药物作用靶点TOP2A和KIF11虽然在本研究的生物信息学分析结果中差异无统计学意义,但文献检索^[21-22]结果显示:TOP2A和KIF11与TNBC的发生发展及预后均存在明显的关联。

刘蕾等^[23]研究显示:TOP2A在所有TNBC患者中的高表达率为35.8%(19/53),接受多西紫杉醇联合表柔比星作为新辅助化疗的TNBC患者总体病理完全缓解(pathologic complete response, PCR)率为18.9%(10/53),TOP2A高表达的TNBC患者PCR率为31.6%(6/19),而TOP2A低表达的患者PCR率仅为11.8%(4/34),可见TOP2A不仅在相当一部分TNBC患者中高表达,同时通过检测TOP2A基因表达可预测化疗对TNBC患者的疗效。WEI等^[24]通过对GSE76250数据集的分析最终鉴定了8个与TNBC相关的核心基因,其中包含TOP2A,且上述基因的生存预后分析表明其与TNBC患者总体生存呈负相关关系。

THANKAMONY等^[25]研究显示:KIF11缺失可导致TNBC细胞增殖能力明显降低,同时与单纯化疗比较,用KIF11抑制剂治疗结合化疗也出现更明显的减瘤效果。NOVITASARI等^[26]通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库对TNBC进行分析筛选出的250个明显上调的DEGs中同样包括KIF11。

本研究通过网络药理学和生物信息学方法系统分析了TNBC转录组基因表达的差异,经过分子对接证明了红景天苷的紧密结合靶标位于疾病的最关键基因模块之中,可针对TNBC的关键DEGs产生调控作用,同时揭示了红景天苷作用于TNBC的可能信号通路,为后续针对二者关系的研究提供了可靠的理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

朱紫嘉参与论文设计和撰写及数据收集和统计学分析,陈霞参与论文修改和审校,崔曼、文继红和王莘参与数据收集及统计学分析,宋东参与论文设计。

[参考文献]

- [1] 李清平,王心强.三阴型和非三阴型乳腺癌的临床病理特征及无瘤生存率对比[J].中国地方病防治杂志,2017,32(3):342-343.
- [2] 冷茹冰,张新阁,周红艳,等.不同分子分型乳腺癌的临床病理特征及预后危险因素分析[J].临床医学,2021,41(5):8-10.
- [3] MA W D, WANG Z Y, ZHAO Y, et al. Salidroside suppresses the proliferation and migration of human lung cancer cells through AMPK-dependent NLRP3 inflammasome regulation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6614574.
- [4] HU X L, ZHANG X Q, QIU S F, et al. Salidroside induces cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(1): 62-67.
- [5] RONG L, LI Z D, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 122: 109726.
- [6] 龚舒,段承刚,陶忠桦,等.红景天苷对人乳腺癌MDA-MB-435细胞功能的作用[J].泸州医学院学报,2016,39(2):118-123.
- [7] KANG D Y, SP N, KIM D H, et al. Salidroside inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDA-MB 231 TNBC cells by regulating EGFR/Jak2/STAT3 signaling via MMP2 [J]. Int J Oncol, 2018, 53(2): 877-885.
- [8] SUN A Q, JU X L. Inhibitory effects of salidroside on MCF-7 breast cancer cells *in vivo* [J]. J Int Med Res, 2020, 48(11): 300060520968353.
- [9] 何思怡,李贺,曹毛毛,等.全球及我国女性乳腺癌疾病负担年龄分布及变化趋势[J].中国肿瘤,2023,32(1):1-7.
- [10] LI X X, YANG J, PENG L M, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 161(2): 279-287.
- [11] BONOTTO M, GERRATANA L, POLETTI E, et al. Measures of outcome in metastatic breast cancer: insights from a real-world scenario [J]. Oncologist,

- 2014, 19(6): 608-615.
- [12] YIN L, DUAN J J, BIAN X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 61.
- [13] HAHNEN E, LEDERER B, HAUKE J, et al. Germline mutation status, pathological complete response, and disease-free survival in triple-negative breast cancer: secondary analysis of the GeparSixto randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(10): 1378-1385.
- [14] KORNILUK A, KOPER O, KEMONA H, et al. From inflammation to cancer[J]. *Ir J Med Sci*, 2017, 186(1): 57-62.
- [15] SILVA CORREIA J D A, MIRANDA Y, AUSTIN-BROWN N, et al. Nod1-dependent control of tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(6): 1840-1845.
- [16] HUANG C K, YANG C Y, JENG Y M, et al. Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF- κ B-mediated antiapoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 2014, 33(23): 2968-2977.
- [17] GOMES A L, TEIJEIRO A, BURÉN S, et al. Metabolic inflammation-associated IL-17A causes non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(1): 161-175.
- [18] 赵媛媛, 张楠, 孙维义, 等. 黄芪多糖对裸鼠结直肠癌移植瘤的抑制作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(3): 375-379.
- [19] SUNADA S, SAITO H, ZHANG D D, et al. CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 550: 56-61.
- [20] KAPANIDOU M, CURTIS N L, BOLANOS-GARCIA V M. Cdc20: At the crossroads between chromosome segregation and mitotic exit [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(3): 193-205.
- [21] MA J L, CHEN C, LIU S, et al. Identification of a five genes prognosis signature for triple-negative breast cancer using multi-omics methods and bioinformatics analysis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(11): 1578-1589.
- [22] GUIDO B C, BRANDÃO D C, BARBOSA A L A, et al. Exploratory comparisons between different anti-mitotics in clinically-used drug combination in triple negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2021, 12(19): 1920-1936.
- [23] 刘蕾, 李席如, 胡蕴慧, 等. TOP2A、EGFR基因表达与三阴性乳腺癌TE方案新辅助化疗疗效的相关性[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(12): 940-943.
- [24] WEI L M, LI X Y, WANG Z M, et al. Identification of hub genes in triple-negative breast cancer by integrated bioinformatics analysis [J]. *Gland Surg*, 2021, 10(2): 799-806.
- [25] THANKAMONY A P, MURALI R, KARTHIKEYAN N, et al. Targeting the Id1-Kif11 axis in triple-negative breast cancer using combination therapy[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1295.
- [26] NOVITASARI D, JENIE R I, KATO J Y, et al. The integrative bioinformatic analysis deciphers the predicted molecular target gene and pathway from curcumin derivative CCA-1.1 against triple-negative breast cancer (TNBC)[J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2021, 33(1): 19.