

基于网络药理学和体外实验探讨淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的作用机制

蒋如如, 董海波, 袁翠英, 周敏, 陈兵*

南京大学医学院附属鼓楼医院 血液内科, 江苏 南京 210003

摘要: 目的 通过网络药理学、分子对接和体外实验探讨淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的作用机制。方法 利用 PharmMapper、SEA、SwissTargetPrediction 数据库收集淫羊藿素的作用靶点, 通过 DisGeNET、GeneCards、MalaCards 数据库收集多发性骨髓瘤的疾病靶点。利用 Venn 分析获得作用靶点与疾病靶点的共有靶点并导入 STRING 数据库分析靶点间相互作用关系, 再通过 Cytoscape 软件构建淫羊藿素与抗多发性骨髓瘤潜在作用靶点的可视化关系网络, 然后对潜在作用靶点进行基因本体 (GO) 功能富集分析和和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 并对关键靶点进行分子对接验证。进一步对人多发性骨髓瘤 U266 细胞开展体外实验, CCK-8 法检测淫羊藿素对 U266 细胞增殖的影响, qPCR 和 Western blotting 检测淫羊藿素对关键通路中相关基因、蛋白表达的影响。**结果** 筛选得到淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点 143 个, 其中的重要作用靶点主要有蛋白激酶 B1 (Akt1)、白蛋白 (ALB)、连环蛋白 β 1 (CTNNB1)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1)。GO 功能、KEGG 通路富集分析和分子对接结果表明, 淫羊藿素可能作用于 PI3K/Akt 信号通路。体外细胞实验显示, 淫羊藿素可抑制人多发性骨髓瘤 U266 细胞增殖, 并显著上调 U266 细胞中 PIK3R1 表达、下调 Akt1 表达 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 淫羊藿素可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路中 PIK3R1、Akt1 的表达, 抑制多发性骨髓瘤细胞增殖, 发挥治疗多发性骨髓瘤的潜在作用, 为淫羊藿素的进一步开发利用提供理论依据。

关键词: 淫羊藿素; 多发性骨髓瘤; 网络药理学; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 细胞增殖

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)05-1115-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.005

Mechanism of icaritin treating multiple myeloma based on network pharmacology and *in vitro* experiments

JIANG Ruru, DONG Haibo, YUAN Cuiying, ZHOU Min, CHEN Bin

Department of Hematology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210003, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of icaritin in treatment of multiple myeloma through network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments. **Methods** To collect the targets of icaritin using PharmaMapper, SEA, and SwissTargetPrediction databases, and collect disease targets of multiple myeloma using DisGeNET, GeneCards, and MalaCards databases. Using Venn analysis to obtain common targets for action and disease targets, and importing them into the STRING database to analyze the interaction relationships between targets. Then, using Cytoscape software, a visual relationship network between icaritin and potential targets for anti multiple myeloma action is constructed. Then, GO and KEGG enrichment analysis are performed on potential targets, and molecular docking verification is performed on key targets. Further *in vitro* experiments were conducted on human multiple myeloma U266 cells. The CCK-8 method was used to detect the effect of icaritin on U266 cell proliferation, and qPCR and Western blotting were used to detect the effect of icaritin on the expression of related genes and proteins in key pathways. **Results** A total of 143 potential targets of icaritin in treatment of multiple myeloma were selected. The important targets were Akt1, ALB, CTNNB1, HSP90AA1, EGFR, MAPK1, ERBB2, and PIK3R1. GO and KEGG enrichment and molecular docking results showed that icaritin may affect the PI3K/Akt signaling pathway. *In vitro* experiments showed that icaritin could inhibit the proliferation of human multiple myeloma U266 cells, and significantly up-regulate the expression of PIK3R1 and down-regulate the expression of Akt1 in

收稿日期: 2024-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273954)

作者简介: 蒋如如, 技师, 硕士, 研究方向为血液病诊断。E-mail: jiangruru123@163.com

*通信作者: 陈兵, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为恶性血液病的基础及转化研究。E-mail: chenbin2004@163.com

U266 cells ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Icaritin could inhibit the proliferation of multiple myeloma cells by regulating the expression of PIK3R1 and Akt1 in the PI3K/Akt signaling pathway, and play a potential role in the treatment of multiple myeloma, providing a theoretical basis for the further development and utilization of icaritin.

Key words: icaritin; multiple myeloma; network pharmacology; PI3K/Akt signal pathway; cell proliferation

多发性骨髓瘤是一种血液系统恶性肿瘤，其特征是骨髓中存在异常克隆性浆细胞，导致破坏性骨损伤、肾脏损伤、贫血和高钙血症^[1]。根据全球癌症观察站的最新数据，全球每年报告的癌症诊断占 0.9%，其中有 588 161 例多发性骨髓瘤病例^[2]。研究表明，多发性骨髓瘤患者发病年龄中位数为 69 岁，大约 63% 多发性骨髓瘤患者年龄超过 65 岁^[3]。目前我国的多发性骨髓瘤发病率为 1/10 万~2/10 万，而随着我国进入老龄化社会，其发病率将会不断增加^[4]。

在过去的几十年中，由于骨髓瘤治疗包括蛋白酶抑制剂（如硼替佐米）、免疫调节剂（如来那度胺）和自体干细胞移植正在迅速发展，多发性骨髓瘤的预后有了显著改善，但也存在不同程度的不良反应，如血栓风险增加、周围神经病变及过敏反应等^[5-7]，往往预后并不理想。然而，多发性骨髓瘤仍是化疗耐药或难治性疾病导致的不治之症。因此，迫切需要寻找新的有效的多发性骨髓瘤治疗药物。

值得关注的是，中医药在提高机体免疫力，发挥“扶正抑瘤”功效方面具有显著优势^[8]。中医学认为多发性骨髓瘤属于“骨痹”“骨蚀”“虚劳”范畴，以脾肾亏虚、痰瘀湿毒为主要病因病机^[9]。淫羊藿具有温补肾阳、补虚扶正之功效，是中医临床抗肿瘤使用频率较高的一味温阳药，也是抗肿瘤经方中发挥扶正固本功效的重要药味^[10]。淫羊藿素是淫羊藿的主要活性成分之一，是淫羊藿苷的水解产物，其具有抗肿瘤、抗骨质疏松以及神经保护等药理作用^[11-12]。在多发性骨髓瘤中，淫羊藿素被证明可以抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖并加强细胞凋亡和周期停滞，以抑制多发性骨髓瘤的进展，这表明淫羊藿素在多发性骨髓瘤中发挥抗癌作用^[13]。然而，淫羊藿素如何通过复杂的信号网络抑制多发性骨髓瘤细胞尚未明确。

近年来，网络药理学从生物网络平衡的角度为阐明作用机制、发现新靶点、重新定位新适应症提供了有效的研究策略^[14]。在本研究中，利用网络药理学和生物信息学手段，探讨了淫羊藿素抗多发性骨髓瘤的潜在作用和机制，为进一步挖掘其潜在的临床应用价值奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 靶点收集

利用 SwissTargetPrediction (<http://www.swiss-targetprediction.ch/>)、SEA (<http://sea.bkslab.org/>)、PharmMapper (http://www.lilab-ecust.cn/pharm_mapper/) 数据库，以“icaritin”为关键词收集淫羊藿素的作用靶点。通过 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、MalaCards (<https://www.malacards.org/>) 数据库，以“multiple myeloma”为关键词收集多发性骨髓瘤的疾病靶点。再利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 统一靶点名称。

1.2 靶点蛋白的互作关系网络构建

利用 FunRich 软件中 Venn 分析获得淫羊藿素作用靶点与多发性骨髓瘤疾病靶点的共有靶点，即为淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点，并将其导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 获得靶点蛋白之间的相互作用关系，再通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建淫羊藿素与抗多发性骨髓瘤潜在作用靶点的可视化关系网络，获取其中显著相关的关键靶点。

1.3 基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

利用 FunRich 软件对淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点进行 GO 富集分析，揭示淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组成 (CC)。利用 KOBAS 数据库 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) 进行 KEGG 通路富集分析，揭示淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的关键通路。校正后 $P < 0.05$ 为显著富集。

1.4 分子对接

首先从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载淫羊藿素的化学结构式文件，然后导入 Chem 3D (v15.0) 软件生成 3D 化学结构并使其能量最小化。从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载靶点蛋白的晶体结构文件，使用 PyMOL 软件去除蛋白结构中的溶剂和有机物，再使用 AutoDock (v4.2.6) 软件对蛋白结构进行加氢、计算电荷、添加原子类型。利用 Autodock Vina

执行淫羊藿素和靶点蛋白的分子对接过程，再通过 PLIP 分析淫羊藿素和靶点蛋白对接的分子间作用力，最后利用 PyMOL 软件对分子对接结果进行可视化。

1.5 体外细胞实验

1.5.1 材料与仪器 人多发性骨髓瘤 U266 细胞株 (批号 W202259481, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 淫羊藿素 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 YB21577, 上海源叶生物科技有限公司); 来那度胺 (质量分数 99% , 批号 ML832567, 上海麦克林生化科技股份有限公司); RPMI-1640 培养基 (含新生牛血清、双抗) (批号 2022K1504, 江苏凯基生物技术股份有限公司); PBS 缓冲液 (批号 2022G4202, 武汉赛维尔生物科技有限公司); CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒 (批号 2022K9305)、细胞裂解液 (批号 2022K5202)、BCA 蛋白含量检测试剂盒 (批号 2022K2101) (江苏凯基生物技术股份有限公司); RNA-easy™ Isolation Reagent (批号 Z20228165, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); Evo M-MLV 反转录试剂预混液 (批号 2023AG11706)、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (批号 2023AG21348) (湖南艾科瑞生物工程有限公司); DEPC 水 (批号 R20220021, 上海碧云天生物技术有限公司); PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 P20231203, 北京索莱宝科技有限公司); β -肌动蛋白 (β -actin) Rabbit mAb (批号 2022AC038)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) p85 alpha Rabbit mAb (批号 2022A4992)、蛋白激酶 B1 (Akt1) Rabbit pAb (批号 2022A11016)、HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (批号 2022AS014) (武汉爱博泰克生物科技有限公司); 高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒 (批号 2022T6152, 上海天能科技有限公司)。

超净台、CO₂ 培养箱 (美国赛默飞世尔科技公司); Sigma 2-16K 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 实验室离心机股份有限公司); TECAN Sunrise 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); Eppendorf 5810R 多功能台式离心机 (德国艾本德股份公司); Roche Light Cycler 480 全自动荧光定量 PCR 系统 (瑞士 Roche 公司); Bio-Rad Trans-Blot SD 型半干转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon-5200 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.5.2 细胞培养 U266 细胞复苏后, 待生长至

80%~95% 融合时进行细胞传代。将细胞悬液转移至 15 mL 无菌离心管中, 200×g 离心 5 min。弃去上清, 加入 37 °C 预热的 RPMI-1640 培养基重悬细胞, 按照 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞/mL 传代比例转移至新的培养皿中, 置于温度为 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中继续培养。

1.5.3 实验分组及处理 收集生长至对数期的 U266 细胞, 实验组分别用浓度为 2、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素处理细胞, 对照组加入不含淫羊藿素的培养基, 来那度胺组加入含 2 $\mu\text{mol/L}$ 来那度胺的培养基。

1.5.4 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 将细胞接种于 96 孔板, 每组 3 个复孔, 每孔细胞数 5×10^4 个, 培养 48 h 后, 按 1.5.3 项下分组及处理每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 1.5 h, 用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度 (A) 值, 计算各实验组的细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}}$$

1.5.5 qPCR 检测关键基因表达 首先使用 RNA-easy™ Isolation Reagent 提取细胞样品的总 RNA, 然后使用 Evo M-MLV 反转录试剂预混液将总 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录程序为 37 °C 反应 15 min, 85 °C 加热 5 s。使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒在 Roche LightCycler480 全自动荧光定量 PCR 系统中进行 qPCR 实验。PCR 扩增条件: 95 °C 持续 30 s; 然后 95 °C 持续 5 s, 60 °C 持续 30 s 进行 40 个循环。引物序列如表 1 所示。以 β -actin 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名称	正向序列	反向序列
β -actin	5'-GCTCTTTTCCA GCCTTCCTT-3'	5'-GAGCCAGAGCAGT GATCTCC-3'
PIK3R1	5'-ACCCCAGTTTT TGTTGCTTG-3'	5'-ACTGCCCAACAAA ACAGTCC-3'
Akt1	5'-TCTATGGCGCT GAGATTGTG-3'	5'-CTTAATGTGCCCGT CCTTGT-3'

1.5.6 Western blotting 检测关键蛋白表达 首先使用细胞裂解液提取细胞样品的总蛋白, 并采用 BCA 法测定蛋白浓度。然后按样本溶液体积与上样缓冲液 (5×), 99 °C 金属浴加热 10 min 使蛋白变性, 即得最终样品。样品通过 10% SDS-PAGE 凝胶分

离,再转移到硝酸纤维素膜上。在室温下,用 TBST 缓冲液配制的 5%脱脂奶粉溶液封闭 2 h 后,于 4 ℃ 孵育一抗过夜。然后用 TBST 缓冲液将膜洗涤 3 次,并在室温下与 1:2 000 稀释的二抗孵育 1 h,最后再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次。使用 Western blotting 显影液在成像系统中进行化学发光显影,再通过 Image J 软件对显影的蛋白条带进行灰度分析,从而定量蛋白印迹上条带的灰度值。

1.5.7 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用 One-way ANOVA 检验进行分析,其中组间两两比较采用 Dunnett's 多重比较,数据采用 GraphPad Prism 软件进行分析。

2 结果

2.1 淫羊藿素、多发性骨髓瘤疾病靶点的获取

利用 SwissTargetPrediction、SEA、PharmMapper 数据库共筛选得到淫羊藿素作用靶点 252 个。通过 DisGeNET、GeneCards、MalaCards 数据库共筛选得到多发性骨髓瘤疾病靶点 4 076 个。将淫羊藿素作用靶点与多发性骨髓瘤疾病靶点进行 Venn 分析,见图 1,两者共有 143 个靶点,即为淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点。

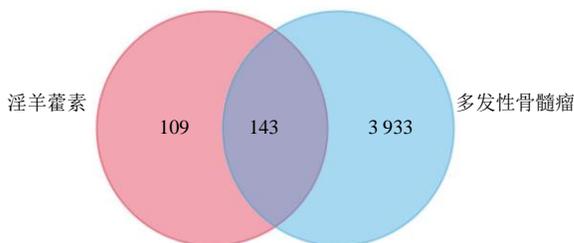


图 1 淫羊藿素与多发性骨髓瘤疾病靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn plot of icaritin and multiple myeloma targets

2.2 淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的作用靶点分析

将筛选得到的淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的 143 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库,获得靶点蛋白之间的相互作用关系,再利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建可视化关系网络,见图 2,进一步显示出淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的关键作用靶点主要有 Akt1、白蛋白 (ALB)、连环蛋白 β 1 (CTNNB1)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1)。

2.3 GO 功能富集分析

如图 3 所示,淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜

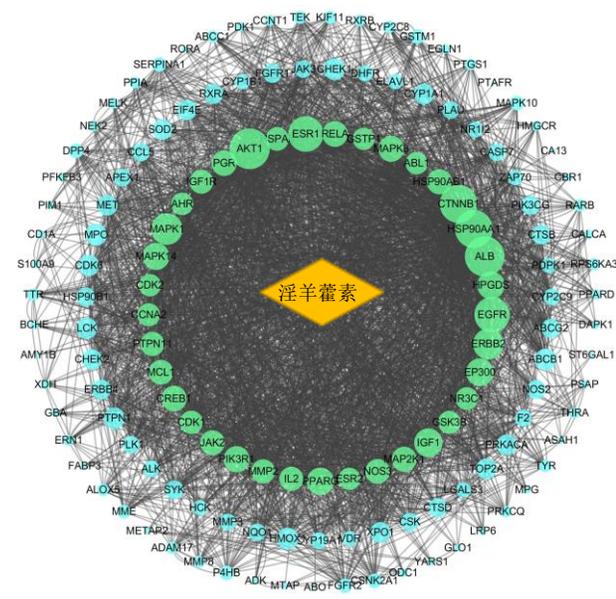


图 2 淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在靶点的相互作用关系网络

Fig. 2 Interaction network of potential targets of icaritin in treatment of multiple myeloma

在作用靶点的 GO 功能富集分析显示 BP 主要集中在蛋白质磷酸化、细胞内信号转导等;MF 主要集中在蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、蛋白结合等;CC 主要集中在细胞质、受体复合物等。

2.4 KEGG 通路富集分析

如图 4A 所示,KEGG 通路富集分析显示癌症相关通路、PI3K/Akt 信号通路等在淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤中显著富集。各通路之间的相互作用关系网络(图 4B)进一步提示了这些信号通路在淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤中的重要调控作用。

2.5 淫羊藿素与 PI3K/Akt 信号通路中关键靶点的分子对接验证

如图 5 所示,将淫羊藿素与 Akt1、EGFR、HSP90AA1、PIK3R1、ERBB2、MAPK1 进行分子对接分析。结果显示,淫羊藿素可通过氢键、疏水相互作用、 π -阳离子相互作用与 Akt1 结合,亲和力为-8.6 kcal/mol (1 cal=4.4 J);淫羊藿素还可通过氢键、疏水相互作用分别与 EGFR、HSP90AA1、PIK3R1、MAPK1 结合,亲和力依次为-8.9、-8.4、-7.3、-8.1 kcal/mol;此外,淫羊藿素可通过氢键、疏水相互作用、 π -堆积(垂直)作用与 ERBB2 结合,亲和力为-6.3 kcal/mol。分子对接结果表明,淫羊藿

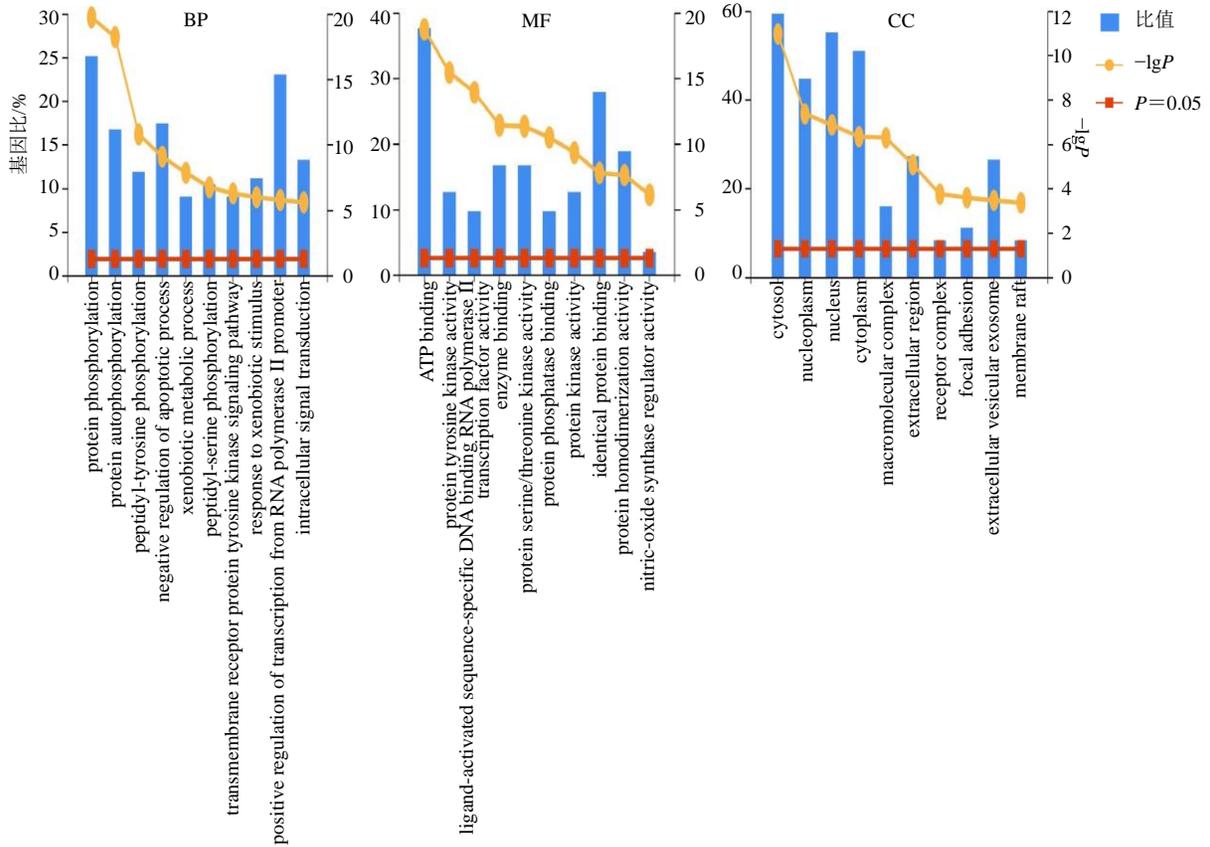


图 3 淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 3 GO functional enrichment analysis of potential targets of icaritin in treatment of multiple myeloma

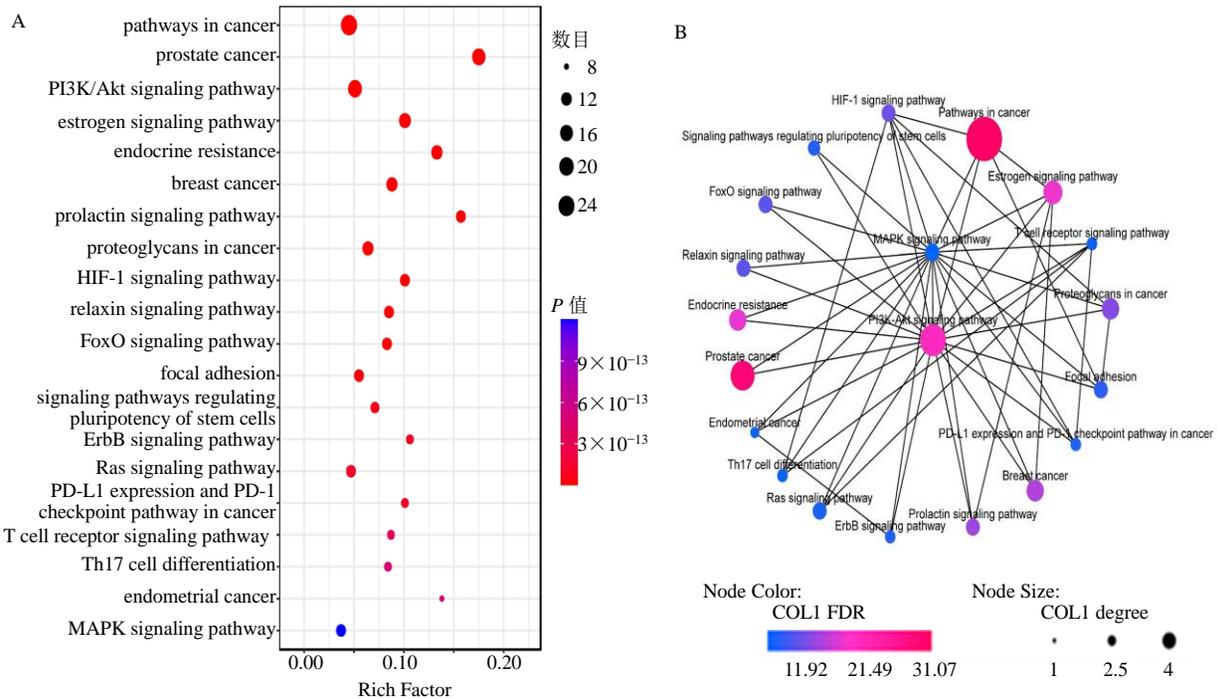


图 4 淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点的 KEGG 通路富集分析 (A) 及各通路之间的相互作用关系网络 (B)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of icaritin in treatment of multiple myeloma (A) and the interaction network between each pathway (B)

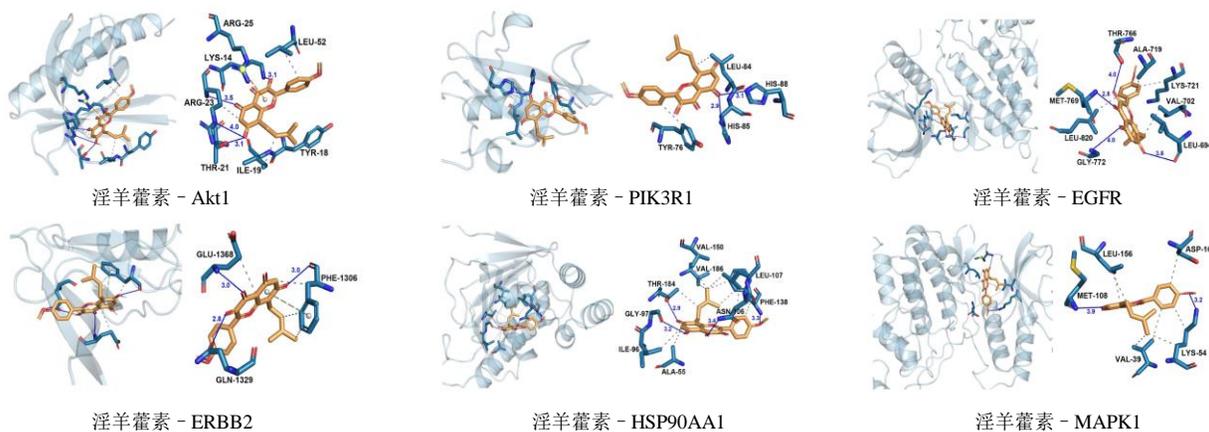


图 5 淫羊藿素与重要靶点的虚拟对接分析

Fig. 5 Virtual docking analysis of icaritin with important targets

素与重要作用靶点 Akt1、EGFR、HSP90AA1、PIK3R1、ERBB2、MAPK1 均能有效地结合。

2.6 不同浓度淫羊藿素对人多发性骨髓瘤 U266 细胞增殖的影响

如图 6 所示，淫羊藿素处理 48 h 后，U266 细胞增殖抑制率升高，且呈浓度相关性。结果表明，采用 32 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素处理 U266 细胞 48 h 可较好地抑制细胞增殖。

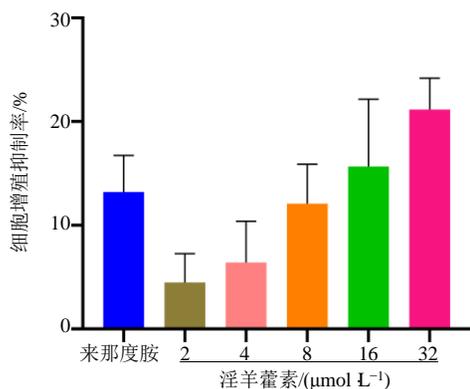
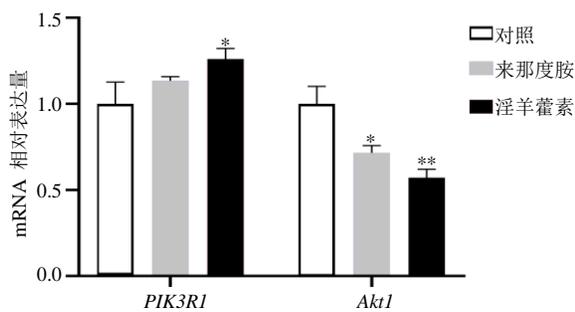


图 6 不同浓度淫羊藿素对人多发性骨髓瘤 U266 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of icaritin on the proliferation inhibition rate of human multiple myeloma U266 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 淫羊藿素对 U266 细胞中 PIK3R1、Akt1 mRNA 表达的影响

如图 7 所示，采用 32 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素处理 U266 细胞 48 h 后均能显著上调 PIK3R1 mRNA 表达、下调 Akt1 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$)。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 7 淫羊藿素对 U266 细胞 PIK3R1、Akt1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of icaritin on PIK3R1 and Akt1 mRNA expression in U266 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.8 淫羊藿素对 U266 细胞中 PIK3R1、Akt1 蛋白表达的影响

如图 8 所示，采用 32 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿素处理 U266 细胞 48 h 后均能明显上调 PIK3R1 蛋白表达、下调 Akt1 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$)。

3 讨论

多发性骨髓瘤是血液系统浆细胞恶性肿瘤，其特征表现为恶性克隆性浆细胞过度增殖，引起骨质破坏以及单克隆免疫球蛋白异常分泌，进而导致组织脏器损伤^[15]。尽管新的化疗药物以及自体骨髓移植治疗在一定程度上能改善多发性骨髓瘤的疗效，但相应的不良反应及患者的依从性问题仍然存在^[16]。因此，亟待寻找治疗多发性骨髓瘤的创新药物。

淫羊藿素是淫羊藿苷的水解产物，已被证明对乳腺癌、肝细胞癌等具有显著的抗肿瘤作用^[17]，并

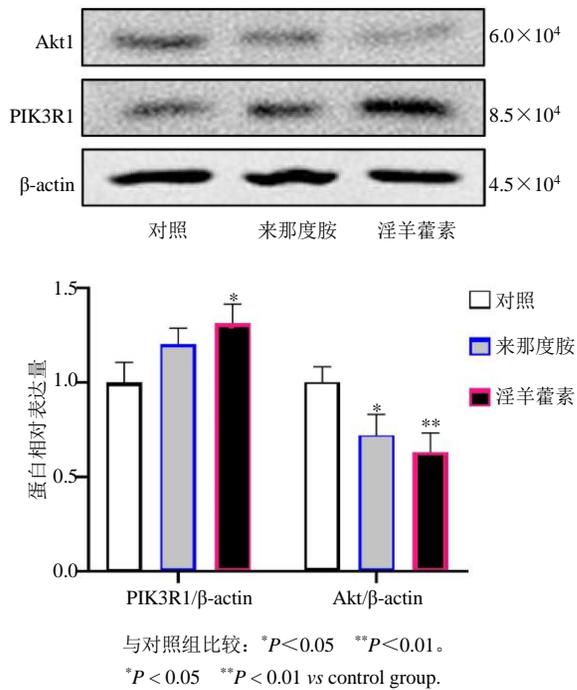


图 8 淫羊藿素对 U266 细胞 PIK3R1、Akt1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of icaritin on the expression of PIK3R1 and Akt1 proteins in U266 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

且已有用于肝细胞癌治疗的上市药淫羊藿素软胶囊。除了对实体瘤的研究外，淫羊藿素对各种血液癌细胞有显著的抑制作用，包括白血病、多发性骨髓瘤等血液系统恶性肿瘤^[18]。研究表明，淫羊藿素可有效抑制骨髓瘤细胞的增殖，而对正常骨髓细胞的增殖无影响，表明淫羊藿素对正常造血的一般细胞毒性作用较低或没有^[13]。因此，淫羊藿素可能突破临床上常规药物的局限性，成为一种有前景的新型候选药物。目前，少有报告描述淫羊藿素的抗肿瘤作用机制，其确切的抗肿瘤作用分子机制尚未表征。因此，本研究拟探讨淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜力及可能的分子机制，为深入开发和利用淫羊藿素提供科学依据。

本研究首先利用网络药理学筛选出淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在作用靶点 143 个，其重要作用靶点主要有 Akt1、ALB、CTNNB1、HSP90AA1、EGFR、MAPK1、ERBB2、PIK3R1。GO 功能富集分析显示，淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的 BP 和 MF 主要集中在蛋白质磷酸化、细胞内信号转导和蛋白激酶活性，而 KEGG 通路富集分析也显示 PI3K/Akt 信号通路在淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤中显著富集，这共同提示了 PI3K/Akt 信号通路在其中的重要调控作用。PI3K/Akt 信号通路作为细胞内重要信号

转导通路之一，参与很多重要的生物学过程的调控，可通过影响下游多种效应分子的活化状态，在细胞增殖和凋亡中发挥关键作用^[19]。研究发现，PI3K/Akt 信号通路在肿瘤发生中广泛的激活，尤其是 PIK3CA、PIK3R1、PTEN、Akt1 等基因存在异常表达，与肿瘤发生、发展以及耐药密切相关^[20]。由于多发性骨髓瘤细胞与骨髓间充质干细胞相互作用刺激的多种细胞因子可激活 PI3K/Akt 通路，因此阻断 PI3K/Akt 已成为一种有前景的多发性骨髓瘤治疗策略^[21]。本研究通过分子对接验证也提示，淫羊藿素可能作用于 PI3K/Akt 信号通路中涉及的重要作用靶点 Akt1、EGFR、HSP90AA1、PIK3R1、ERBB2、MAPK1，这进一步提示淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤具有较好的潜力。

研究表明，PIK3R1 被认为是一种肿瘤抑制因子，其可以调节癌细胞增殖，已被确定在多种人类肿瘤的癌变过程中发挥重要作用，并与肿瘤进展和转移有关^[22]。另外，Akt1 也是一种与肿瘤相关的基因，参与了细胞的增殖、分化、存活和代谢等生理过程，其产生的突变或异常表达，可能导致肿瘤生长、转移和耐药性增强等问题^[23]。本研究进一步利用人多发性骨髓瘤 U266 细胞开展体外实验，验证淫羊藿素对 U266 细胞增殖的抑制作用及对 PI3K/Akt 信号通路中关键靶点 PIK3R1、Akt1 的调控作用。实验结果显示淫羊藿素可较好地抑制 U266 细胞增殖，并在 PI3K/Akt 信号通路中显著上调 PIK3R1 表达、下调 Akt1 表达。这进一步表明淫羊藿素具有较好的抑制多发性骨髓瘤细胞增殖的生物活性。

综上所述，本研究首先通过网络药理学和分子对接提示了淫羊藿素治疗多发性骨髓瘤的潜在重要通路 PI3K/Akt 信号通路及其所涉及的重要作用靶点 Akt1、EGFR、HSP90AA1、PIK3R1、ERBB2、MAPK1。进一步通过人多发性骨髓瘤 U266 细胞实验验证了淫羊藿素可通过调控 PI3K/Akt 信号通路中 PIK3R1、Akt1 的表达，抑制多发性骨髓瘤细胞增殖，发挥治疗多发性骨髓瘤的潜在作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cowan A J, Green D J, Kwok M, *et al.* Diagnosis and management of multiple myeloma: A review [J]. *JAMA*, 2022, 327(5): 464-477.
- [2] Abduh M S. An overview of multiple myeloma: A

- monoclonal plasma cell malignancy's diagnosis, management, and treatment modalities [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2024, 31(2): 103920.
- [3] Padala S A, Barsouk A, Barsouk A, *et al.* Epidemiology, staging, and management of multiple myeloma [J]. *Med Sci*, 2021, 9(1): 3.
- [4] 张少晗, 应燕萍, 赵慧函, 等. 1990—2019 年我国多发性骨髓瘤疾病负担及其变化趋势分析 [J]. *医学信息*, 2022, 35(22): 23-27.
- [5] Li P P, Xu B, Xu J D, *et al.* Lenalidomide promotes thrombosis formation, but does not affect platelet activation in multiple myeloma [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14097.
- [6] Cebulla N, Schirmer D, Runau E, *et al.* Neurofilament light chain levels indicate acute axonal damage under bortezomib treatment [J]. *J Neurol*, 2023, 270(6): 2997-3007.
- [7] Shanbhag A, Pritchard E R, Chatterjee K, *et al.* Highly probable drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome associated with lenalidomide [J]. *Hosp Pharm*, 2017, 52(6): 408-411.
- [8] 柯有甫, 李春香, 高文谦, 等. 扶正抑瘤法治疗恶性肿瘤的用药策略 [J]. *中医临床研究*, 2014, 6(2): 134-135.
- [9] 张云慧, 蒋士卿, 辛静, 等. 中医药治疗多发性骨髓瘤的研究进展 [J]. *中医肿瘤学杂志*, 2023, 5(2): 34-40.
- [10] 许雯雯, 张锋利. 淫羊藿抗肿瘤的治疗进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(8): 206-208.
- [11] Huong N T, Son N T. Icaritin: A phytomolecule with enormous pharmacological values [J]. *Phytochemistry*, 2023, 213: 113772.
- [12] 华辞怡, 史有阳, 谢颖, 等. 淫羊藿有效成分治疗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6593-6600.
- [13] Zhu S C, Wang Z H, Li Z J, *et al.* Icaritin suppresses multiple myeloma, by inhibiting IL-6/JAK2/STAT3 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10460-10472.
- [14] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [15] Silberstein J, Tuchman S, Grant S J. What is multiple myeloma? [J]. *JAMA*, 2022, 327(5): 497-497.
- [16] Joshua D E, Bryant C, Dix C, *et al.* Biology and therapy of multiple myeloma [J]. *Med J Aust*, 2019, 210(8): 375-380.
- [17] Zhang C J, Sui X X, Jiang Y D, *et al.* Antitumor effects of icaritin and the molecular mechanisms [J]. *Discov Med*, 2020, 29(156): 5-16.
- [18] Yang X J, Xi Y M, Li Z J. Icaritin: A novel natural candidate for hematological malignancies therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 28: 4860268.
- [19] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, *et al.* The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [20] He Y, Sun M M, Zhang G G, *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [21] Keane N A, Glavey S V, Krawczyk J, *et al.* AKT as a therapeutic target in multiple myeloma [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(8): 897-915.
- [22] Liu Y, Wang D, Li Z J, *et al.* Pan-cancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5924.
- [23] Alwhaibi A, Verma A, Adil M S, *et al.* The unconventional role of Akt1 in the advanced cancers and in diabetes-promoted carcinogenesis [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 145: 104270.

[责任编辑 高源]