

基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨汉防己甲素对胰腺癌的作用机制

侯文蓉¹, 曾渊君², 任红岳², 张春斌^{1,2*}

1. 佳木斯大学 基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007

2. 漳州卫生职业学院 医学技术学院, 转化医学检测应用技术协同创新中心, 福建 漳州 363000

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子对接和体外实验探讨汉防己甲素 (TET) 治疗胰腺癌的潜在作用靶点, 并阐明其相关分子机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库构建 TET 的潜在作用靶点数据集, 与在 GeneCards 和 OMIM 数据库中获得 PAAD 相关靶点取交集, 得到 TET 治疗 PAAD 的潜在作用靶点。利用 STRING 数据库获取交集靶点蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络信息并导入 Cytoscape 3.8.0 筛选核心靶点; 运用 Metascape 数据库对交集靶点进行基因本体论 (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。使用 AutoDock 和 PyMol 软件进行分子对接验证。采用 CCK-8 法检测不同梯度浓度 TET 对胰腺癌细胞增殖活性的影响; 胰腺癌细胞分为对照组和汉防己甲素 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 组, 采用细胞划痕愈合实验、克隆形成实验和流式细胞术检测各组细胞迁移率、克隆形成情况和细胞周期变化。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测各组细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 通路相关基因表达水平。**结果** 获得 TET 影响胰腺癌的潜在靶点 140 个, 分析构建胰腺癌与 TET 之间的 PPI 网络, 获得核心靶点 Akt1、表皮生长因子受体 (EGFR) 和 *PIK3CA* 等。分子对接显示这些核心靶点与 TET 都具有良好的结合活性。GO 和 KEGG 富集分析表明 TET 治疗胰腺癌的关键靶点主要涉及磷酸化等生物学过程和 PI3K-Akt 等信号通路。胰腺癌细胞的死亡率随着 TET 浓度的增加而升高。与对照组比较, TET 组细胞迁移率降低 ($P < 0.01$), TET 组 PANC-1 细胞克隆形成数减少 ($P < 0.001$); 与对照组比较, TET 组 G_0/G_1 期比例升高 ($P < 0.001$)。与对照组相比, TET 组血小板源性生长因子受体 α (*PDGFR α*) 基因表达下调 ($P < 0.05$), 而 T 细胞白血病/淋巴瘤 1A (*TCL1A*)、*Jun*、*ILK*、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (*mTOR*)、核转录因子- κB 抑制剂 α (*NF- κB*)、*PIK3CA*、丝裂原活化蛋白激酶 8 (*MAPK8*) 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** TET 可抑制人胰腺癌细胞增殖、迁移和克隆, 造成细胞周期阻滞, 其作用机制可能与 PI3K-Akt 信号通路有关。

关键词: 汉防己甲素; 胰腺癌; 网络药理学; 分子对接; PI3K-Akt 信号通路

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)12-3076-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.12.010

Mechanism of tetrandrine in treatment of pancreatic adenocarcinoma based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments

HOU Wenrong¹, ZENG Yuanjun², REN Hongyue², ZHANG Chunbin^{1, 2}

1. School of Basic Medical Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

2. College of Medical Technology, Zhangzhou Health Vocational College, Translational Medicine Testing Application Technology Collaborative Innovation Center, Zhangzhou 363000, China

Abstract: Objective To analyze the potential therapeutic targets of tetrandrine (TET) in treatment of pancreatic adenocarcinoma (PAAD) by network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* cellular test, and to clarify the related molecular mechanism.

Methods Potential target datasets for TET were compiled utilizing the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), Swiss Target Prediction and PharmMapper. To obtain target information pertinent to pancreatic cancer, the term "pancreatic ductal adenocarcinoma" was employed in searches within the GeneCards and OMIM databases. The intersection of TET targets and pancreatic cancer targets was identified to determine the potential therapeutic targets for pancreatic cancer.

收稿日期: 2024-08-31

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2022J01531, 2023J01250)

作者简介: 侯文蓉, 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤相关机制。E-mail: 1006540676@qq.com

*通信作者: 张春斌, 教授, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤的分子机制及分子生物学检验。E-mail: zhangcb@jmsu.edu.cn

Subsequently, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database and imported into Cytoscape 3.8.0 software to identify core targets. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were conducted using the Metascape database. Molecular docking validation was performed utilizing AutoDock and PyMOL software. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay. Additionally, pancreatic cancer cells were categorized into a control group and TET treatment group (6.25, 12.5, 25 $\mu\text{mol/L}$) to evaluate cell migration via the scratch assay, clone formation ability through colony formation assay, and cell cycle distribution using flow cytometry. The mRNA expression on level of PI3K-Akt pathway-related genes in the cells were detected using the real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) method. **Results** A total of 140 potential targets of TET affecting pancreatic cancer were obtained, the PPI network between TET and pancreatic cancer was analyzed and constructed, and core targets such as Akt1, epidermal growth factor receptor (EGFR) and PIK3CA were obtained. Molecular docking showed that these core targets had good binding activity with TET. GO and KEGG enrichment analysis revealed that the key targets of TET in the treatment of pancreatic cancer were mainly involved in biological processes such as phosphorylation and PI3K-Akt, MAPK and other signaling pathways. It was observed that the mortality rate of pancreatic cancer cells treated with TET increased proportionally with the concentration of the drug, compared to the control group. Additionally, the migration rate of PANC-1 cells in the TET treatment group was significantly reduced ($P < 0.01$) relative to the control group. Furthermore, compared with the blank control group, the number of colony formation of PANC-1 cells in the TET treatment group was significantly decreased ($P < 0.001$), indicating a dose-dependent effect. Flow cytometry analysis revealed a significant increase in the proportion of cells in the G₀/G₁ phase in the TET treatment group compared with control group ($P < 0.001$). Compared with the control group, the expression levels of *PDGFRA* mRNA in the TET group were significantly decreased ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of *TCL1A*, *Jun*, *ILK*, *mTOR*, *NF- κ BIA*, *GRB10*, *FOS*, *CASP9*, *PIK3CA*, *CD40*, and *MAPK8* were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** TET can inhibit PAAC cell proliferation, migration, cloning, and causing cell cycle arrest, and the underlying mechanism of which may involve the PI3K-Akt signaling pathways.

Key words: tetrandrine; pancreatic cancer; network pharmacology; molecular docking; PI3K-Akt signaling pathway

根据世界卫生组织 2024 年发布的数据, 2022 年胰腺癌在全球癌症死亡数中排名第 6 位^[1]。中国国家癌症中心 2024 年发布的癌症数据显示: 胰腺癌位于男性高病死率排名第 6 位, 女性高病死率排名第 8 位, 且在男性群体中死亡率呈上升态势, 预计在未来几年仍持续升高^[2]。估计到 2030 年, 它的病死率将排名第 2 位^[3]。胰腺癌又称“癌中之王”, 具有非特异性、起病隐匿、发展迅速的特点, 又由于胰腺的特殊解剖位置和生理功能, 治疗效果不佳, 且易转移复发, 胰腺癌的预后非常差, 所以寻找适合胰腺癌的药物尤为重要。

汉防己甲素 (tetrandrine, TET) 是一种天然的双苄基异喹啉生物碱, 最初从防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的根中分离得到。长期以来, 它一直是中药的一部分, 具有治疗炎症性疾病、高血压、矽肺病和自身免疫性疾病等作用^[4]。近年来多次报道其具有良好的抗肿瘤活性, 如抑制增殖和诱导细胞凋亡, 并抑制人前列腺癌细胞的迁移和侵袭^[5]; TET 在体外和体内对结肠癌^[6-7]、膀胱癌^[8]、口腔癌^[9]、乳腺癌^[10]、胰腺癌^[11]、肺癌^[12]等癌症均具有预防和治疗价值。

本研究从生物信息学的角度出发, 基于多个相

关数据库的药物和疾病信息, 探究 TET 和胰腺癌靶基因间的作用网络, 并通过将网络药理学的结果与体外研究结果相结合, 以期从不同方面探讨汉 TET 对胰腺癌治疗的机制, 为后续 TET 辅助治疗胰腺癌的作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要试剂 TET (上海源叶生物科技有限公司, 货号 S31752, 纯度 97%); DMEM 培养基 (货号 L110KJ) 购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (货号 2366517CP) 购自 Gibco; 膜联蛋白 V (Annexin V) - 异硫氰酸荧光素 (FITC) / 碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒 (货号 C1062M)、细胞周期检测试剂盒 (货号 C1052)、4% 多聚甲醛 (货号 P0099-500ml)、结晶紫染液 (货号 C0121-100 mL) 均购自碧云天生物技术公司; 反转录试剂盒 (货号 wc-SJH0021) 和荧光定量 PCR 检测试剂盒 (货号 WC-MRNA0120-H) 均购自上海沃吉基因。

1.1.2 细胞株 人胰腺癌 PANC-1、BxPC-3、SW1990 细胞均购自厦门逸漠生物科技有限公司; 所有细胞均在补充有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 含有 5% CO_2 的培养箱中培养。

待细胞生长至 80% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化传代。选取状态良好的对数生长期细胞用于后续实验。

1.1.3 仪器 1300 series A2 生物安全柜 1374[赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司]; CO₂ 细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司); Thermo Multiskan Sky 全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司); EVOS FL 细胞荧光成像系统(Thermo Fisher Scientific 公司); FACSVerse 流式细胞仪(美国 BD 公司); LabServ 梯度 PCR Touch 基因扩增仪(Thermo Fisher Scientific 公司); QuantStudio 3 实时荧光定量 pcr 仪(Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 网络药理学

1.2.1 TET 在胰腺癌治疗中的潜在作用靶点 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库(<http://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索 TET 的作用靶点。利用 SwissTargetPrediction 在线平台(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 并将物种限定为“Homo sapiens”, 进行靶点预测。利用 PharmMapper 数据库^[13-14]检索 TET 的作用靶点。在 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/>)中将靶点蛋白转换为统一的基因名称。将几个网站获得的靶点去重后得到 TET 的作用靶点。

在 GeneCards (<https://www.genecards.org>) 和 OMIM (<http://www.omim.org>) 数据库中以“pancreatic ductal adenocarcinoma”为检索词获取胰腺癌相关的靶点信息。将药物与疾病的靶点基因整理至 Excel, 映射得到 TET 与胰腺癌的共同靶点, 通过在线作图网站(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图。

1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析与关键靶点筛选 通过访问 STRING 在线数据库(<https://string-db.org/>), 对 TET 与胰腺癌的共同靶点进行 PPI 构建, 以获得蛋白质之间的相互作用关系, 物种限定为“Homo sapiens”并采用(High confidence>0.7)置信度, “hide disconnected nodes in the network”导出 TSV 格式的蛋白质相互作用数据集, 用 Cytoscape 3.8.0 软件可视化, 得到 PPI 网络图。在网络中, 节点的 degree 表示节点之间的连接数, degree 越大, 成为核心靶蛋白的可能性越高。

1.2.3 基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 运用 Metascape 数据库(<http://metascape.org/>), 限定物种为“Homo

sapiens”, 对 TET 治疗胰腺癌的潜在靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析, 用以说明这些靶点在基因功能层面和信号通路中发挥的作用。GO 富集分析主要从生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)3 个方面进行。通过微生信(<http://bioinformatics.com.cn/>)的在线可视化工具处理富集分析结果。

1.2.4 分子对接 依据 PPI 网络图谱中的关键属性(中介中心性、接近中心性和 degree 值)筛选靶点蛋白, 从 RCSB PDB 数据库(<http://www.rcsb.org>)获取蛋白的三维结构作为对接受体。通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载化合物的 3D 结构, 利用 Open babel 3.1.1 软件转化为 pdb 格式, 作为对接配体。前处理阶段通过 AutoDock Tools 1.5.7 软件对分子进行去水、加氢, 设置活性口袋。使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接验证, PyMol 2.6.0 辅助进行结果可视化。

1.3 实验验证

1.3.1 细胞培养 所有细胞均在含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 37 °C 下, 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长至 80% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化传代。选取状态良好的对数生长期细胞用于后续实验。

1.3.2 CCK-8 检测细胞增殖 根据说明书, 通过 CCK-8 法分析加药后细胞活力。将 SW1990、PANC-1 和 BxPC-3 细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度分别接种在 96 孔板中, 细胞贴壁后设置空白组(只添加培养基)、对照组(添加 0.1% DMSO)和不同梯度浓度(2.5~200 μmol/L) TET 组处理 24 h, 每组设置 3 个复孔。在处理结束时, 向每个孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 在培养箱中继续孵育 1 h, 于酶标仪中检测波长 450 nm 处的吸光度(A)值, 数据保存用于后续处理。以半抑制浓度为参考进行后续实验。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.3.3 划痕愈合实验 在 6 孔板中按 6×10⁵ 个/孔的浓度接种 PANC-1 和 BxPC-3 细胞, 分为对照组和 12.5 μmol/L TET 组, 每组设 3 个复孔。培养 24 h 后, 用移液器枪头在细胞培养板上以 0.5~1.0 cm 间隔均匀划线, PBS 润洗 3 次以去除因划线脱落漂浮的细胞。然后加入含 12.5 μmol/L TET 和不含 TET 的无血清 DMEM 培养基, 以仅加入含 DMSO 的无血清 DMEM 培养基作为对照组。在 0、12 h 分别拍照, 用图像分析 Image J 软件测量划痕面积, 根据公式计算每组细胞的细胞迁移率。实验重

复3次。

细胞迁移率=(初始划痕面积-12 h 划痕面积)/初始划痕面积

1.3.4 克隆形成实验 实验分为对照组和 6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ TET 组,收集 PANC-1 细胞,并将其以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔板中,细胞贴壁后移除旧培养液,加入含 TET 或不 TET 的新鲜培养基,放入培养箱内培养。待培养板中出现肉眼可观测的细胞克隆时,移除旧培养液,用 PBS 清洗。每孔加入 2 mL 浓度为 4% 的多聚甲醛溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置固定细胞 15 min。完成固定后,移除固定液,然后向每孔加入 1 mL 的结晶紫染色液,染色 20 min,用去离子水缓慢冲洗掉染色液。将培养板倒置,拍摄克隆形成的图像,并对克隆进行计数。

克隆形成率=克隆数/接种细胞数

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期 将细胞接种到 6 孔板中,待细胞贴壁,密度为 70%~80% 时使用 12.5 $\mu\text{mol/L}$ TET 处理 PANC-1 细胞,等量 DMSO 作为对照。24 h 后收集各组细胞,缓慢加入预冷的 75% 的乙醇 3 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后离心,弃上清,按照说明配置 PI 染色液,每管细胞样品加入 500 μL PI 染色液,轻柔并充分重悬细胞沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴 30 min,流式细胞仪检测细胞周期情况。

1.3.6 实时荧光定量(qRT)-PCR 检测 在实验前 1 d 将细胞接种到 6 孔板中,第 2 天细胞密度为 70%~80%,使用 12.5 $\mu\text{mol/L}$ TET 处理细胞,等量 DMSO 作为对照。24 h 后,收集细胞,采用试剂盒提取总 RNA,并于超微量分光光度计中检测 RNA 浓度,反转录获得 cDNA。根据沃吉基因荧光定量试剂盒的说明和步骤操作,配置总体积 10 μL 的反应体系进行 RT-qPCR 实验。每个 qPCR 实验重复 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法处理结果,获得 mRNA 的相对表达量。

1.3.7 统计学方法 采用 Graphpad Prism 8 统计软件进行数据分析,组间差异采用 t 检验或单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学与分子对接

2.1.1 靶点的获取与 PPI 网络的构建 利用 TCMSP、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 进行 TET 靶点预测,分别获得其作用靶点 17、102、256 个。利用 UniProt 数据库对靶点进行名称规范化,去

重后得到 TET 相关靶点共 344 个。在 Genecards、DisGenet、OMIM 数据库中,以“pancreatic adenocarcinoma”为关键词,筛选、汇总、去重共获得疾病靶点 1 816 个。通过 Venn 交集分析,获得共同靶点 140 个(图 1)。

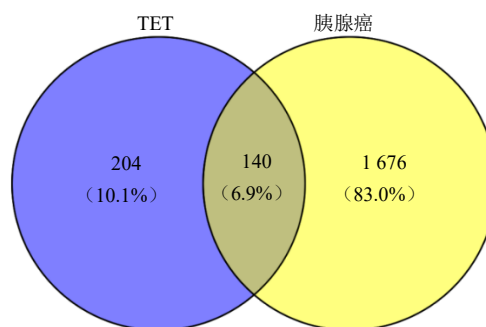


图1 TET 靶点与胰腺癌靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of TET targets and PAAD targets

将药物与疾病交集靶点导入 STRING 数据库,绘制 PPI 网络(图 2),该 PPI 网络包括 140 个节点和 807 条边,平均节点度 11.5。将 PPI 网络数据上传 Cytoscape 3.9.1 并进行核心靶点筛选,依据中介中心性、接近中心性和 degree 值筛选出排名前 20 的关键靶点(图 3)。

2.1.2 TET 与胰腺癌交集靶基因的富集分析 为了探究 TET 和胰腺癌交集基因的生物学功能,通过 DAVID 数据库对交集靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 通路分析。根据 $P\leq 0.01$, $\text{FDR}\leq 0.05$ 筛选 GO 分析条目,其中生物过程(BP)280 条,细胞组成(CC)35 条,分子功能(MF)64 条。各选取 P 值排序前 10 位的结果作图,见图 4。其中,生物过程主要涉及磷酸化、蛋白质磷酸化、蛋白质自身磷酸化、凋亡过程的负向调控、信号传导;细胞组成涉及胞质溶胶、细胞质、受体复合物、细胞核等;分子功能主要涉及:蛋白激酶活性、ATP 结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性等。KEGG 富集结果选取前 20 位的结果作图,见图 5,所涉及的通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路、癌症中的蛋白多糖、前列腺癌、MAPK 信号通路等。

2.1.3 分子对接 根据 PPI 分析结果,选取 degree 值较高的靶点与 TET 进行分子对接模拟,从而进一步明确 TET 与治疗胰腺癌的关键靶标的结合程度与效果。当配体与受体结合能 <0 kJ/mol 即可判定它们之间具有自发结合的能力。结合能越小,表明受体和配体亲和力越高,二者相互作用的潜力也越

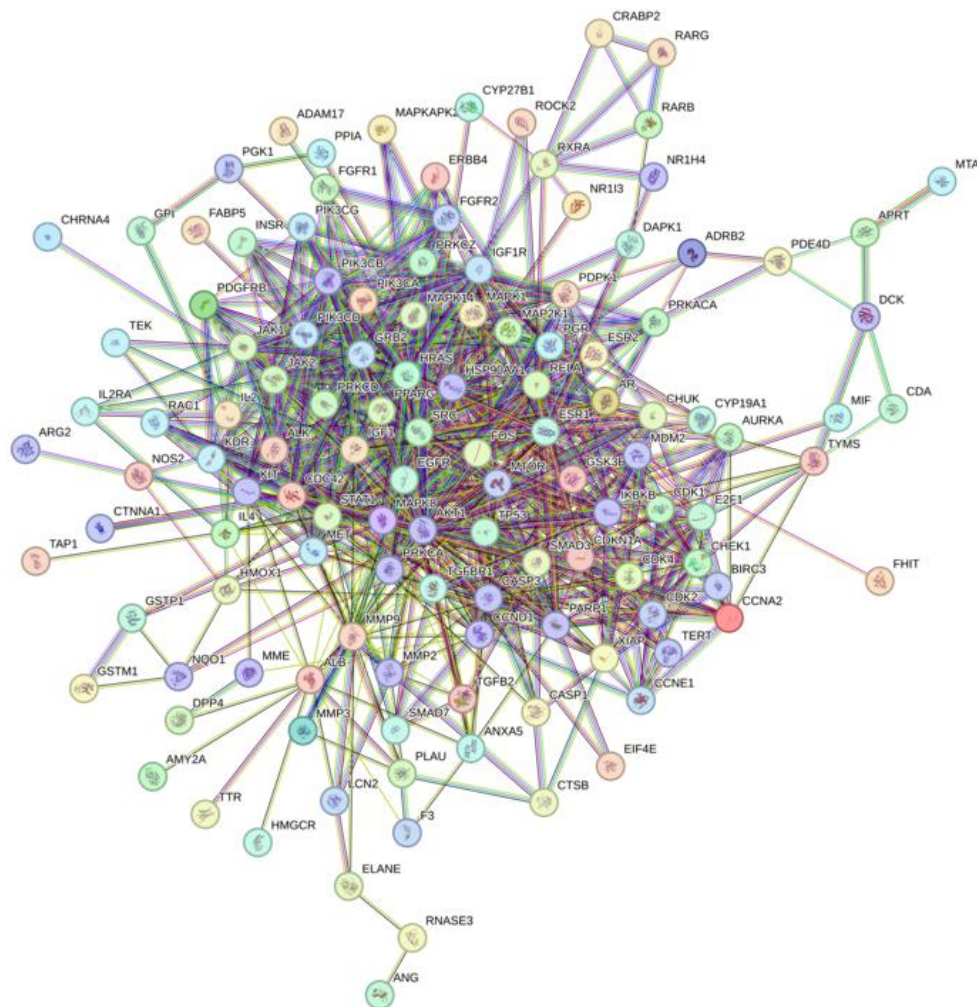


图 2 TET 治疗 PAAD 潜在靶点 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of potential targets of TET in treatment of PAAD

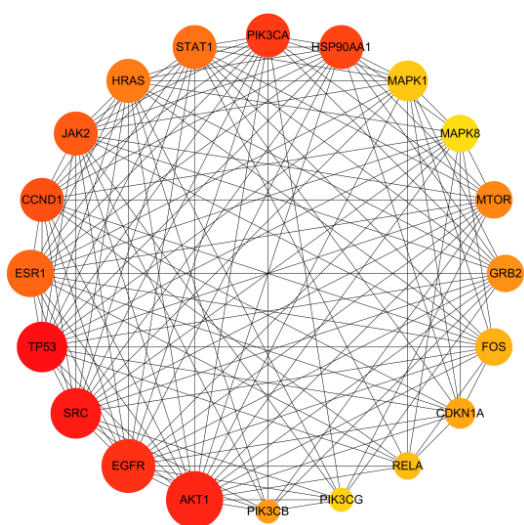


图 3 PPI 网络中综合排名前 20 位的靶点

Fig. 3 Top 20 comprehensive ranking targets in PPI network

大。结合能 < -5.0 kJ/mol 可视为二者具备较高的结合活性，结合能 < -7.0 kJ/mol 表明结合活性很强。TET 与上述筛选出的靶点结合能均 < -5.0 kJ/mol，见表 1。通过 Pymol 软件可视化，TET 与核心靶点分子对接图见图 6。这些结果表明 TET 能够很好地与关键核心靶点进行结合，一定程度上验证了 TET 治疗胰腺癌网络药理学推断的结果。

2.2 体外实验结果

2.2.1 TET 对 PANC-1 细胞增殖的影响 由图 7 可知，3 种胰腺癌细胞的死亡率随着 TET 处理浓度的增加而升高，说明 TET 能够抑制胰腺癌细胞的增殖。

2.2.2 TET 对细胞迁移能力的影响 与对照组相比，TET 组抑制了 PANC-1 细胞（图 8-A）和 BxPC-3 细胞（图 8-B）的划痕愈合率，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ 、 0.001 ）。

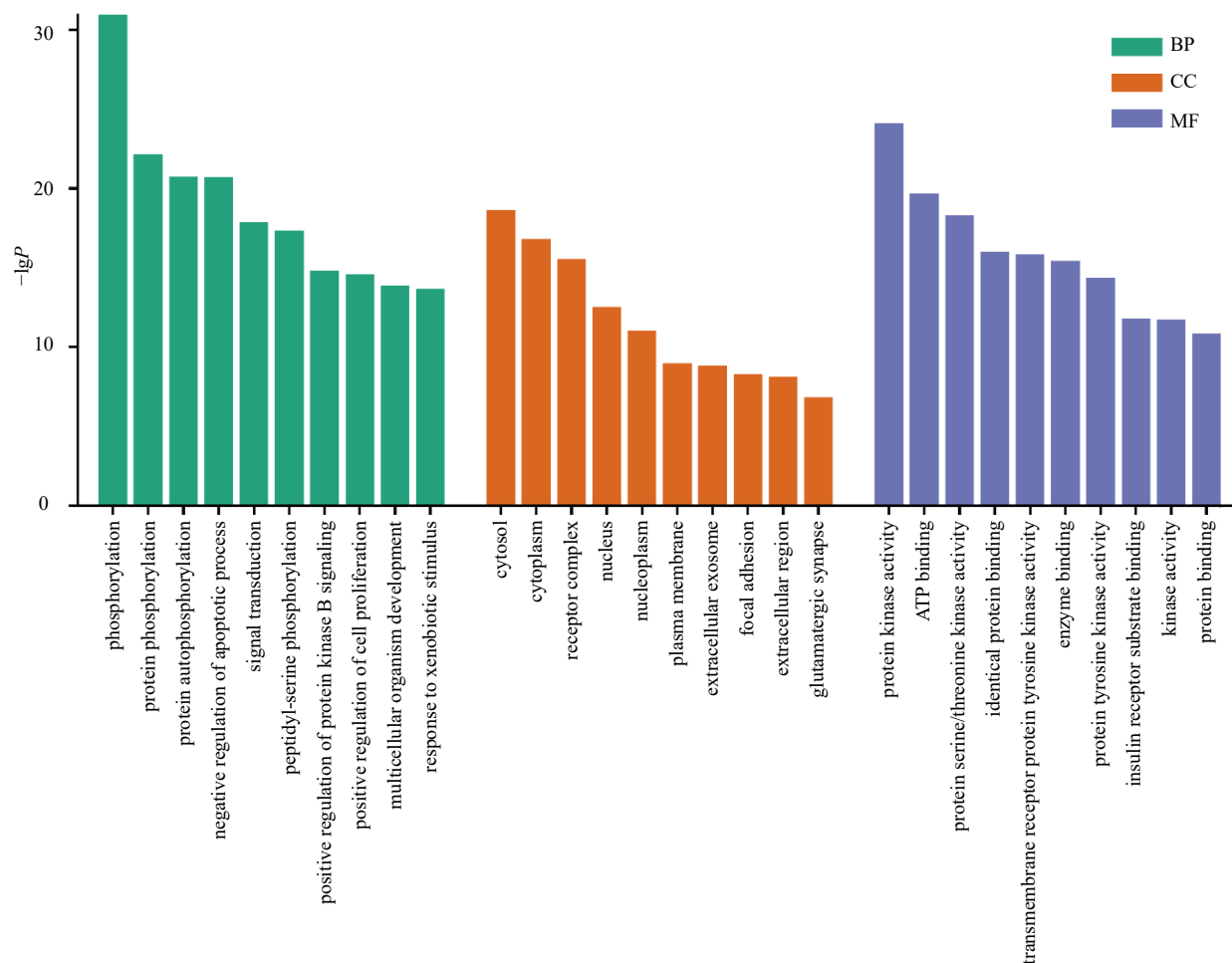


图 4 TET 作用于胰腺癌潜在靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis on potential targets of TET acting on PAAD

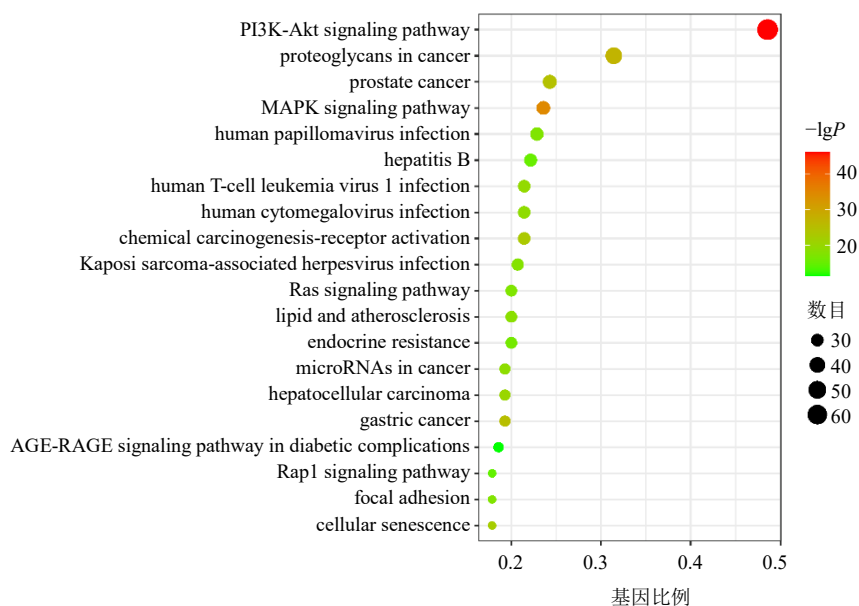


图 5 TET 作用于胰腺癌的潜在靶点 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 KEGG signaling pathway enrichment analysis of potential targets of TET acting on PAAD

表 1 分子对接结果

Table 1 Molecular docking results

靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
mTOR	-8.797 94	HASP90AA1	-6.480 06	EGFR	-6.180 18
MAPK8	-8.140 27	CCND1	-6.453 04	TP53	-6.090 08
PI3K	-6.932 13	MAPK1	-6.415 41	STAT1	-6.022 29
HARS	-6.895 65	SRC	-6.254 46	ESR1	-5.885 01
FOS	-6.784 92	Akt1	-6.192 87	JAK2	-5.740 95

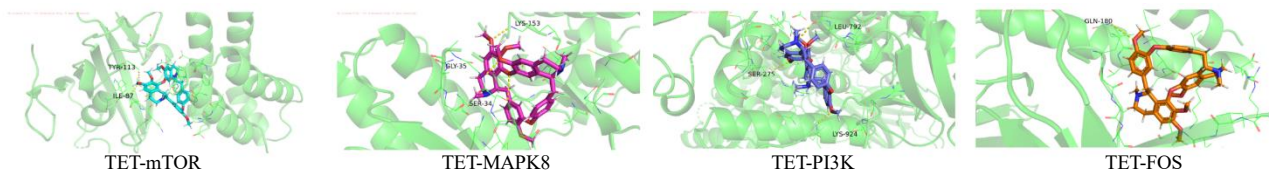
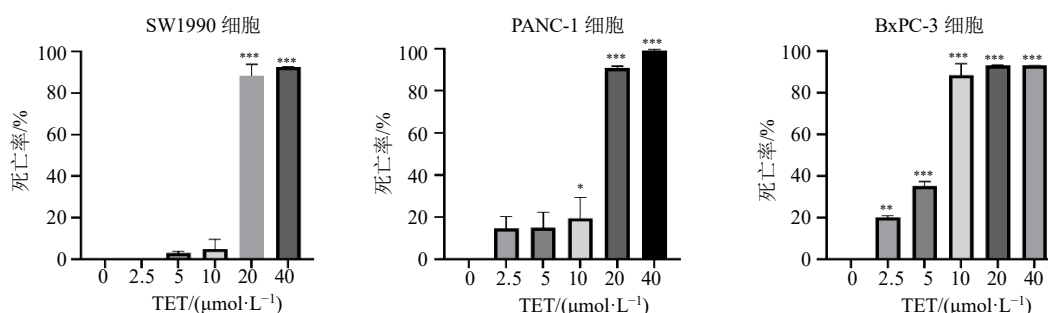


图 6 TET 与核心靶点分子对接图

Fig. 6 Macromolecular docking diagram of TET and key target

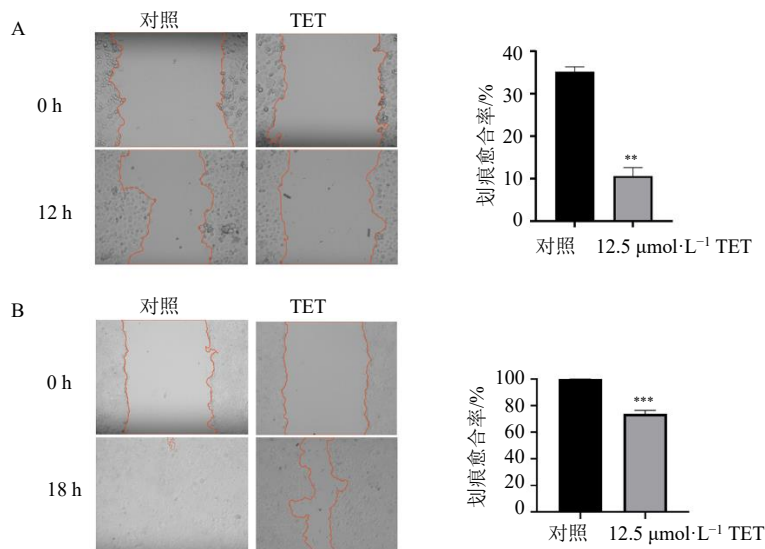


与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

图 7 CCK-8 法检测各组法检测各组胰腺癌细胞死亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Mortality rates of pancreatic cancer cells in various groups detected by CCK-8 method ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

图 8 TET 对 PANC-1 (A) 和 BxPC-3 (B) 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effects of TET on the migration of PANC-1 (A) and BxPC-3 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

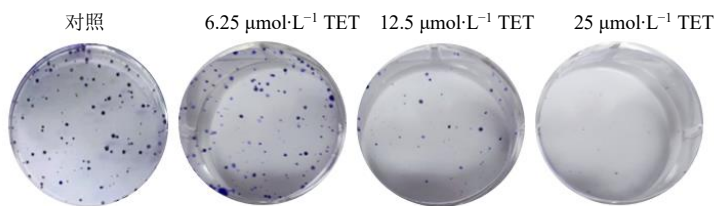
2.2.3 TET 对细胞克隆形成能力的影响 如图 9 所示,与对照组相比,6.25、12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ TET 组 PANC-1 细胞集落形成能力均降低,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.2.4 TET 对细胞周期的影响

如图 10 所示,12.5 $\mu\text{mol/L}$ TET 处理后,与对照组相比,TET 组 PANC-1 细胞 G_0/G_1 期比例升高 ($P < 0.001$),说明 TET 会引起 PANC-1 细胞周期阻滞。

2.3 qRT-PCR 检测 TET 对胰腺癌细胞 PI3K-Akt 通路的影响

如图 11 所示,与对照组相比,TET 组 *PDGFRA* 基因表达下调 ($P < 0.05$),而 *TCL1A*、*Jun*、*ILK*、*mTOR*、*NF- κ BIA*、*GRB10*、*FOS*、*CASP9*、*PIK3CA*、*CD40*、*MAPK8* 基因表达水平显著上调 ($P < 0.05$),说明 TET 可能通过影响 PANC-1 细胞中 PI3K-Akt 信号通路发挥抗胰腺癌作用。



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

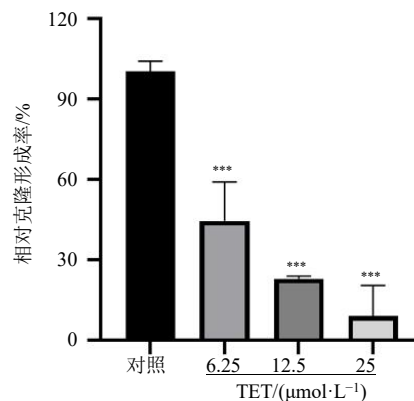
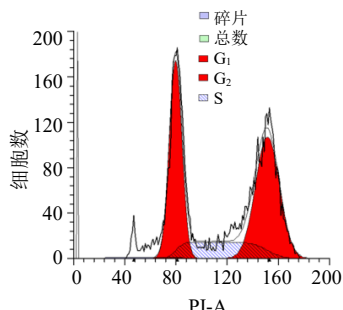
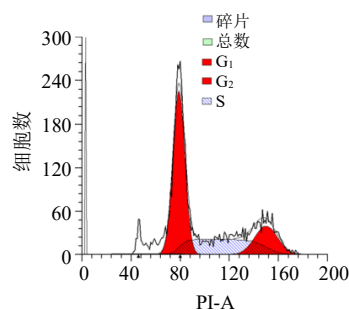


图 9 TET 对 PANC-1 细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effects of TET on clonogenicity of PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

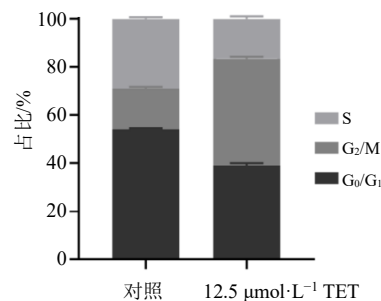


图 10 流式细胞术检测各组不同细胞周期 PANC-1 细胞百分率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Percentages of PANC-1 cells in various groups at different cell cycles detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

目前为止,胰腺癌患者唯一可能获得根治的治疗手段仍是手术切除,但由于缺乏早期有效的诊断方法与手段,仅约 20% 的患者能得到根治性手术切除^[15],而吉西他滨、5-氟尿嘧啶的治疗易出现耐药性^[16],奥沙利铂联合治疗法不良反应较强,因此迫切需要探索新的药物治疗胰腺癌^[17]。

本研究首次利用网络药理学分析了 TET 治疗胰腺癌的分子机制。筛选出 TET 共 344 个靶点,与

胰腺癌交叉靶点有 140 个。分析构建了胰腺癌与 TET 之间的 PPI 网络,获得核心靶点基因 *Akt1*、*EGFR*、*SRC*、*TP53*、*ESR1*、*CCND1*、*JAK2*、*HSP90AA1*、*PI3K* 等。分子对接显示这些核心靶点与汉防己甲素都具有良好的结合活性。GO 和 KEGG 富集分析表明 TET 治疗胰腺癌的关键靶点主要涉及磷酸化等生物学过程和 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路。

CCK-8 实验发现不同浓度 TET 对胰腺癌 SW1990、PANC-1、BxPC-3 细胞的增殖均有抑制作

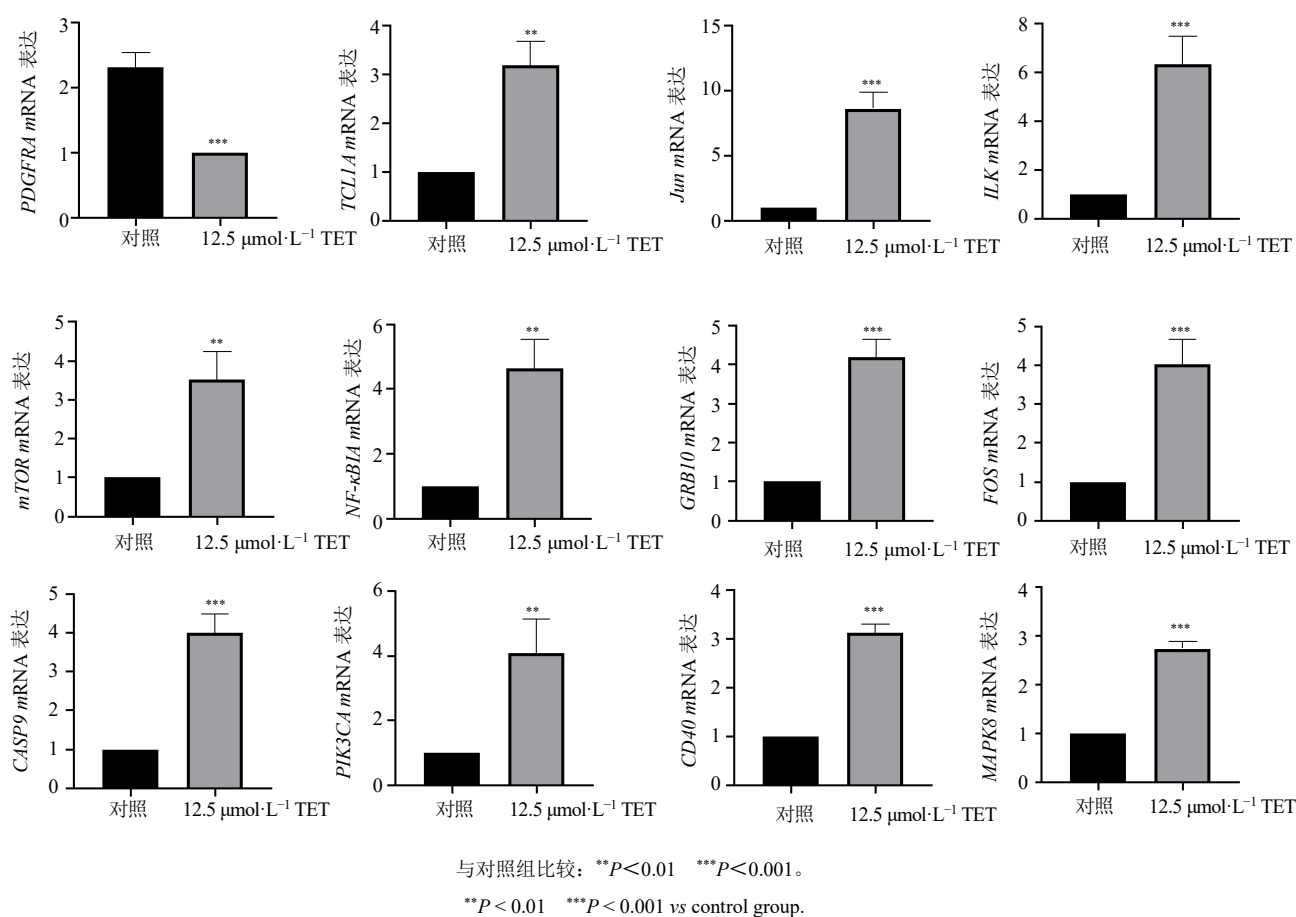


图 11 qRT-PCR 检测 TET 对胰腺癌细胞 PI3K-Akt 通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 11 Effect of TET on PI3K-Akt pathway in the cells by qRT-PCR method ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

用, 后续实验结果发现 TET 组胰腺癌细胞迁移能力、克隆个数均降低, G_0/G_1 期比例升高, 表明 TET 能有效抑制胰腺癌细胞增殖、克隆、迁移, 使细胞周期阻滞。

qRT-PCR 对 PI3K-Akt 通路分析发现, 与对照组比较, TET 干预后, *PDGFR4* 基因表达下调, *TCL1A*、*JUN*、*ILK*、*mTOR*、*NF-κB1A*、*GRB10*、*FOS*、*CASP9*、*PIK3CA*、*CD40*、*MAPK8* 基因表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 其中 *mTOR*、*MAPK8*、*PIK3CA*、*FOS* 在分子对接中表现出与 TET 较高的结合活性, 表明 TET 可能通过作用于以上靶点而对胰腺癌发挥直接或间接的调控作用。

PI3K-Akt-mTOR 通路在细胞增殖、生长、凋亡和耐药^[18-20]等多种癌症特征中起着至关重要的作用。许多研究证明 PI3K-Akt 通路的改变与胰腺癌的出现之间存在关联。*PIK3CA* 基因产物 p110α 是 I_A 类 PI3Ks, PI3K 是一种脂质激酶, 在细胞存活、运动、黏附和凋亡等多种细胞生理功能中发挥作用^[21]。作为

PI3K-Akt 信号通路的关键下游靶标, mTOR 复合物被激活后可通过诱导上皮-间质转化, 增强胰腺癌细胞的迁移率, 并通过增强细胞自噬, 减弱细胞凋亡信号, 进而促进细胞耐药^[22-23]。FOS 基因的主要产物 C-FOS 是激活蛋白 AP-1 复合物的成员, 该复合物参与包括增殖、迁移、细胞凋亡和血管生成在内的多种生物过程过程的调节^[24-25]。MAPK8 也被称作 JNK1, 根据细胞类型和刺激, JNK 可以激活许多不同的下游靶标, 包括 AP-1 家族的成员, c-Jun 等^[26], Fos/Jun 的激活可能会启动整套下游事件, 最终导致细胞终末分化并增加其化疗敏感性^[27]。

本文通过网络药理学筛选、分子对接技术, 预测了 TET 治疗胰腺癌的可能靶点, KEGG 通路富集的结果预测 PI3K-Akt 信号通路可能参与了 TET 对胰腺癌的治疗, 体外细胞实验验证了 TET 能够有效地抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移、克隆能力与诱导细胞周期阻滞, qRT-PCR 实验验证了 PI3K-Akt 信号通路是其发挥抗胰腺癌作用的重要机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jokhadze N, Das A, Dizon D S. Global cancer statistics: A healthy population relies on population health [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 224-226.
- [2] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, *et al.* Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2913-2921.
- [4] 张翔宇, 曹世杰, 王小莹, 等. 汉防己甲素及其衍生物的研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2022, 32(1): 43-52.
- [5] Liu W, Kou B, Ma Z K, *et al.* Tetrandrine suppresses proliferation, induces apoptosis, and inhibits migration and invasion in human prostate cancer cells [J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 850-853.
- [6] Wu J M, Chen Y, Chen J C, *et al.* Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice [J]. *Cancer Lett*, 2010, 287(2): 187-195.
- [7] Sun Y F, Wink M. Tetrandrine and fangchinoline, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* can reverse multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein activity in multidrug resistant human cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(8/9): 1110-1119.
- [8] 李家仁, 李林锦, 朱建龙, 等. 汉防己丙素干预亚硝基胺致大鼠膀胱癌的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(20): 5201-5206.
- [9] Lien J C, Lin M W, Chang S J, *et al.* Tetrandrine induces programmed cell death in human oral cancer CAL 27 cells through the reactive oxygen species production and caspase-dependent pathways and associated with beclin-1-induced cell autophagy [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(1): 329-343.
- [10] Yuan B, Yao M J, Wang X, *et al.* Antitumor activity of arsenite in combination with tetrandrine against human breast cancer cell line MDA-MB-231 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 113.
- [11] Singh K, Dong Q, TimiriShanmugam P S, *et al.* Tetrandrine inhibits deregulated cell cycle in pancreatic cancer cells: Differential regulation of p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} and cyclin D1 [J]. *Cancer Lett*, 2018, 425: 164-173.
- [12] Chen Z, Zhao L, Zhao F, *et al.* Tetrandrine suppresses lung cancer growth and induces apoptosis, potentially via the VEGF/HIF-1 α /ICAM-1 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7433-7437.
- [13] Liu X F, Ouyang S S, Yu B, *et al.* PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.
- [14] Wang X, Pan C X, Gong J Y, *et al.* Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(6): 1175-1183.
- [15] Balaban E P, Mangu P B, Yee N S. Locally advanced unresectable pancreatic cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline summary [J]. *J Oncol Pract*, 2017, 13(4): 265-269.
- [16] Chand S, O'Hayer K, Blanco F F, *et al.* The landscape of pancreatic cancer therapeutic resistance mechanisms [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(3): 273-282.
- [17] Rombouts S J, Walma M S, Vogel J A, *et al.* Systematic review of resection rates and clinical outcomes after FOLFIRINOX-based treatment in patients with locally advanced pancreatic cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(13): 4352-4360.
- [18] Tong H B, Li K K, Zhou M Y, *et al.* Coculture of cancer cells with platelets increases their survival and metastasis by activating the TGF β /Smad/PAI-1 and PI3K/AKT pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(13): 4259-4277.
- [19] Niu P F, Liu F, Lei F M, *et al.* Breviscapine regulates the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of colorectal cancer cells via the PI3K/AKT pathway [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 9674.
- [20] Chan C H, Chiou L W, Lee T Y, *et al.* PAK and PI3K pathway activation confers resistance to KRAS^{G12C} inhibitor sotorasib [J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(1): 148-159.
- [21] Khan K H, Yap T A, Yan L, *et al.* Targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling network in cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(5): 253-265.
- [22] Kim L C, Cook R S, Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment [J]. *Oncogene*, 2017, 36(16): 2191-2201.
- [23] Zhao T H, Fan J L, Abu-Zaid A, *et al.* Nuclear mTOR signaling orchestrates transcriptional programs underlying cellular growth and metabolism [J]. *Cells*, 2024, 13(9): 781.
- [24] Qu X, Yan X B, Kong C, *et al.* C-Myb promotes growth and metastasis of colorectal cancer through c-fos-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(10): 3183-3196.
- [25] Liu S S, Zhang J F, Yin L Y, *et al.* The lncRNA RUNX1-IT1 regulates C-FOS transcription by interacting with RUNX1 in the process of pancreatic cancer proliferation, migration and invasion [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 412.
- [26] Tam S Y, Law H K W. JNK in tumor microenvironment: Present findings and challenges in clinical translation [J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2196.
- [27] Zhang K, Ying H Y, Zhao R P, *et al.* Capilliposide from *Lysimachia capillipes* promotes terminal differentiations and reverses paclitaxel resistance in A2780T cells of human ovarian cancer by regulating Fos/Jun pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(1): 111-116.

【责任编辑 金玉洁】