

基于网络药理学和实验验证探讨香菇多糖抑制三阴乳腺癌的作用机制

代晓阳, 张 燕, 王红磊, 赵家熙, 杨晓春, 翁勤洁*

浙江大学 药学院 药物安全评价研究中心, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 基于网络药理学研究香菇多糖抑制三阴乳腺癌 (TNBC) 的作用机制并采用细胞和动物实验进行验证。方法 通过 GeneCards 数据库和 DisGeNET 数据库筛选与 TNBC 相关基因靶点, 利用 TCMID、PubChem、SwissTargetPrediction 和 GeneCards 数据库查询香菇多糖相关基因靶点。使用 Sangerbox 软件进行基因本体论 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。结合 STRING 数据库与 Cytoscape 3.7.0 软件将共同靶点进行可视化处理, 筛选核心靶点, 构建“化合物-靶点-通路”网络。利用 Metascape 软件进行转录因子及相关调控基因特异富集。体外培养小鼠 TNBC 细胞 4T1 和人 TNBC 细胞 MDA-MB-231, 磺酰罗丹明 B 染色法观察香菇多糖 (31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对细胞存活率的影响; 健康雌性 BABLC 小鼠 sc 接种 1×10^6 个 4T1-Luc 细胞构建 TNBC 模型, 通过小动物活体成像系统观察香菇多糖 (100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对肿瘤生长的影响, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测肿瘤组织信号转导和转录活化因子 3 (STAT3) 和血管内皮生长因子 A (VEGFA) mRNA 表达。结果 数据库及软件分析得到香菇多糖治疗 TNBC 关键靶点 52 个, 靶点主要涉及 PI3K-Akt、AGE-RAGE、HIF-1、MAPK 信号通路和肿瘤蛋白多糖相关通路, PPI 分析得到 VEGFA、STAT3、MAPK1、IL2、TNF、RELA、AKT1、MAPK3、BCL2L1 和 HSP90AA1 10 个 hub 基因。与对照组比较, 香菇多糖对 4T1 和 MDA-MB-231 细胞存活率均有显著抑制作用 ($P < 0.05, 0.01$), 且作用呈浓度相关性; 在给药 14、21 d 后, 与模型组比较, 香菇多糖能够剂量相关性地抑制小鼠 TNBC 肿瘤的生长, 高剂量组差异显著 ($P < 0.05, 0.01$), 21 d 抑制率达到 $(91.9 \pm 4.7)\%$; 与对照组比较, 香菇多糖给药后能够剂量相关性抑制 STAT3 和 VEGFA 的 mRNA 表达, 高剂量组差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 香菇多糖可通过多靶点、多途径协同作用抑制 TNBC 的生长。

关键词: 香菇多糖; 三阴乳腺癌; 网络药理学; 信号转导和转录活化因子 3; 血管内皮生长因子 A

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 10-2031-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.013

Research and verification of mechanism of lentinan on triple negative breast cancer based on network pharmacology and experiment

DAI Xiaoyang, ZHANG Yan, WANG Honglei, ZHAO Jiaxi, YANG Xiaochun, WENG Qinjie

Center for Drug Safety Evaluation and Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To study the mechanism of lentinan on inhibiting triple negative breast cancer (TNBC) based on network pharmacology and to verify it by animal and molecular biology experiments. **Methods** TNBC related genes were identified used GeneCards database and DisGeNET database. Lentinan-related gene targets were inquired used TCMID, PubChem, SwissTargetPrediction and GeneCards database. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway was analysed by Sangerbox software. Core targets were visualized by combining STRING database and Cytoscape 3.7.0 software, and "chemicals-targets-pathways" network was established. The transcription factors and related regulatory genes were specifically enriched by Metascape software. Mouse TNBC cells 4T1 and human TNBC cells MDA-MB-231 were cultured *in vitro*. The effects of lentinan (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on cell viability were observed by sulfoylrhodamine B staining. The TNBC model was constructed by inoculated with 1×10^6 4T1-Luc cells by sc of healthy female BABLC mice. The effect of lentinan (100 and 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) on tumor growth was observed by *in vivo* small animal imaging system. The mRNA expressions of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in tumor

收稿日期: 2022-07-12

基金项目: 浙江大学实验技术研究项目 (SJS202016)

第一作者: 代晓阳 (1986—), 男, 博士, 研究方向为肿瘤药理学、药物毒理和创新药物研发。E-mail: daixiaoyang@zju.edu.cn

*通信作者: 翁勤洁, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事药理学、安全性评价和创新药物研发方向的研究。E-mail: wengqinjie@zju.edu.cn。

tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Totally 52 key targets of lentinan related to TNBC were identified by database and software analysis, which mainly involving PI3K-Akt, AGE-RAGE, HIF-1, MAPK and proteoglycans related pathways. Totally 10 hub genes including *VEGFA*, *STAT3*, *MAPK1*, *IL2*, *TNF*, *RELA*, *AKT1*, *MAPK3*, *BCL2L1* and *HSP90AA1* were identified by PPI analysis. Compared with the control group, lentinan significantly inhibited the survival rate of 4T1 and MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$, 0.01), and the effect was concentration dependent. After 14 and 21 days of administration, lentinan could inhibit the growth of TNBC tumor in mice dose-dependent compared with the model group, and the difference was significant in the high-dose group ($P < 0.05$, 0.01), and the 21-day inhibition rate reached $(91.9 \pm 4.7)\%$. Compared with the control group, lentinan administration could inhibit the mRNA expression of *STAT3* and *VEGFA* in a dose-dependent manner, and the differences were significant in the high-dose group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Lentinan can inhibit the growth of TNBC through the synergistic effect of multiple targets and multiple pathways.

Key words: lentinan; triple negative breast cancer; network pharmacology; signal transducer and activator of transcription 3; vascular endothelial growth factor A

乳腺癌的发病率位居女性恶性肿瘤之首,全球每年死亡病例高达40万人。三阴乳腺癌(TNBC)是其中恶性程度高、侵袭性较强,易发生转移的一类,5年生存期仅有10%左右^[1]。目前TNBC的治疗手段较为单一,以手术为主,辅以放化疗。主要的化疗方案为蒽环类和(或)紫杉类细胞毒药物,但这类传统的化疗方案治疗效果有限,且不良反应大^[2]。因此,寻求靶向治疗药物或天然产物以及天然产物与临床现有药物的联用方法成为TNBC研究的热点之一。

从天然物质中提取的活性成分在肿瘤治疗中广泛应用,具有疗效好、毒副作用小的优点。近年来,多糖因具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、降血糖等多种重要的生物学活性受到越来越多的关注^[3-4]。香菇多糖是一种真菌多糖,主要有效成分为 β -1,3-葡聚糖,具有良好的抗肿瘤、抗病毒及免疫调节作用。诸多研究发现香菇多糖具有预防肿瘤的作用,单独使用或与其他化疗药物联合使用在多种癌症(如卵巢癌、胃癌、肝癌、肺癌和乳腺癌等)中均表现出较好的抗肿瘤作用,并且与化疗药物联用时能够降低化疗药物的毒副作用^[5-6]。当前,香菇多糖在临床上已被用作化疗药物的辅助药,用以提高乳腺癌患者化疗后的免疫功能,改善患者的生存质量^[7]。然而关于香菇多糖治疗TNBC的研究较少,分子机制尚不明确。本研究拟通过网络药理学,筛选出香菇多糖治疗TNBC的关键靶点,结合体外细胞活性检测技术和活体成像技术,更直观的监测香菇多糖对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术对筛选得到的关键基因进行验证,为后续香菇多糖治疗TNBC的分子机制研究提供佐证及基础。

1 材料

1.1 细胞及实验动物

小鼠TNBC细胞4T1和人TNBC细胞MDA-MB-231购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,荧光素酶标记4T1(4T1-Luc)细胞由本实验室构建并保存。

SPF级雌性BALB/C小鼠,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0011,动物实验在浙江大学药物安全评价研究中心进行,遵守本机构实验动物管理与使用委员会(IACUC)规程并经审核批准,批准文号IACUC-21-368。

1.2 试剂及仪器

香菇多糖片,购自湖北广仁药业有限公司,规格10 mg,批号2102020,国药准字H42022727;香菇多糖(原料药,货号S5083,生产批号S508302)购自Selleck公司;磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)购自美国SIGMA-ALDRICH公司;Tris-base购自安徽Biosharp公司;荧光素酶购自美国MedChem Express公司;qRT-PCR试剂盒购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;Trizol试剂购自上海生工生物工程股份有限公司;逆转录试剂盒购自TAKARA公司;其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

Lumina III小动物活体成像系统购自美国PerkinElmer公司;FAST 7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;Varioskan Flash酶标仪购自美国Thermo公司。

2 方法

2.1 网络药理学预测香菇多糖治疗TNBC的作用机制

2.1.1 TNBC和香菇多糖相关靶点筛选 打开PubChem数据库“<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>”

gov/”，输入“lentinan”（香菇多糖的英文名）搜索得到化合物，复制 SMILES 号。通过 SwissTarget Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、TCMID (<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>) 和 GeneCards (<http://www.genecards.org>) 预测香菇多糖的潜在靶点。利用 GeneCards 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/search>) 数据库，以“triple negative breast cancer”为关键词，搜索 TNBC 疾病相关靶点。随后利用 R 语言软件分析得到香菇多糖和 TNBC 共同靶点，作为香菇多糖治疗 TNBC 的潜在作用靶点。

2.1.2 靶点 GO 及 KEGG 分析 利用 Sangerbox 平台 (<http://sangerbox.com/>) 的 ClusterProfiler 模块对香菇多糖治疗 TNBC 的潜在作用靶点进行基因本体论 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析，并利用气泡图绘制工具对排名前 20 的通路进行可视化分析。

2.1.3 蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析 将潜在作用靶点输入 String 数据库 (<https://STRING-db.org/>)，获得 PPI 网络，将 minimum required interaction score 选项设为 high confidence (0.700)。随后将 String 数据库的输出文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件，进行 PPI 可视化操作，并设置 Network Analyzer 插件中的度值和介数评估靶点的重要性，使用 cytohubba 插件，设置得到排名前 10 的 hub 基因。

2.1.4 潜在作用靶点的相关转录因子及调控基因富集 将潜在作用靶点输入 MetaScape 软件 (<https://metascape.org/gp/index.html>)，使用 Express Analysis 和 Custom Analysis 选项对靶点进行分析，得到潜在作用靶点的相关转录因子及调控基因富集结果。

2.2 实验验证

2.2.1 细胞增殖抑制实验 取处于对数生长期的 4T1 和 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中，贴壁过夜后，分别加入不同浓度梯度（终浓度为 31.25、62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）的香菇多糖原料药，对照组不加药。作用 72 h 后，采用 10% 三氯醋酸 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h，4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SRB 染色 20 min，1% 乙酸清洗去除多余染料后，10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-base 溶解后，515 nm 波长下测定吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2.2 小鼠 TNBC 模型制备及给药 选取 15 只健康雌性 BABLc 小鼠，sc 接种 1×10^6 个 4T1-Luc 细

胞。待肿瘤平均总光子数达到 $1 \times 10^7 \text{ p}\cdot\text{s}^{-1}$ 后，随机均分为 3 组：模型组和香菇多糖低、高剂量 (100、200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 香菇多糖片) 组。按 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体积 ig 给药，对照组给予等量生理盐水，每天 1 次，持续 3 周。每周采用小动物活体成像系统对小鼠进行化学发光成像。

2.2.3 qRT-PCR 技术验证香菇多糖治疗 TNBC 的主要基因表达^[8] 给药结束后，剖取小鼠肿瘤组织，提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA。Primer 5 设计引物 (表 1)，内参为 18S rRNA 基因，用 7500 Fast Real-Time PCR 仪进行荧光定量 PCR 反应检测 STAT3 和 VEGFA 的表达。采用相对值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据处理。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
STAT3	正向 TATTCAGCGGACTCACCAGC
	反向 AACCAACCTCCTCAAACCGT
VEGFA	正向 CGACCAACATCCTGGTGTCT
	反向 TACGGGGCAGCACTACCTG
18S rRNA	正向 AGGGGAGAGCGGGTAAGAGA
	反向 GGACAGGACTAGGCGGAACA

2.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析，数据符合 shapiro-wilk (S-W) 正态分布检验，定量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述，组间比较采用 one-way ANOVA 进行检验。

3 结果

3.1 香菇多糖治疗 TNBC 相关靶点分析

通过 TCMID 和 SwissTarget Prediction 数据库检索得到香菇多糖相关靶点 84 个。TNBC 相关靶点由 GeneCards 和 DisGeNET 数据库获得，共 3 399 个。R 软件分析得到 52 个香菇多糖治疗 TNBC 相关靶点。结果见图 1。

3.2 香菇多糖治疗 TNBC 靶点 GO 及 KEGG 分析

通过 Sangerbox 将 GO 分析分为 3 个部分：生物过程 (BP)、细胞组成 (CC) 和分子功能 (MF)，选取前 20 位的功能富集 (图 2)。香菇多糖治疗 TNBC 的靶点主要涉及磷酸酶结合、受体调节活性等 MF，参与丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 调控、体液水平调节、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 1-ERK2 调节、正向调控细胞黏附等 BP，并发现此类靶点富集于膜筏、膜区、细胞外基质等 CC。通路富集结果发现靶点主要涉及磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)-丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (Akt)、晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-

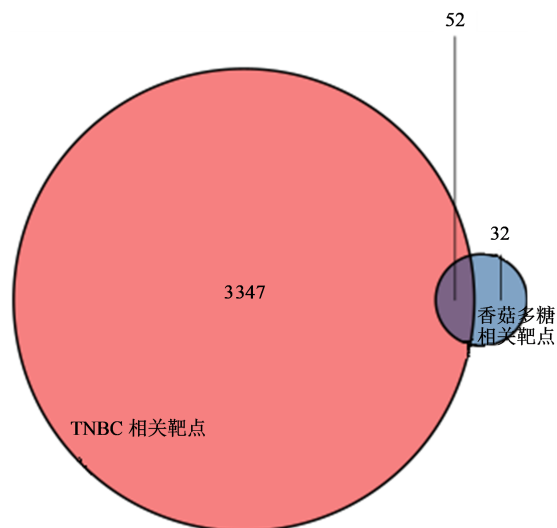


图1 TNBC与香菇多糖交叉靶点分析

Fig. 1 Cross-target analysis between TNBC and lentinan

RAGE)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)、MAPK 信号通路和肿瘤蛋白多糖(proteoglycans, PGs)相关通路。

3.3 PPI 分析

将香菇多糖治疗 TNBC 的 52 个潜在靶点进行 PPI 分析,共得到 *VEGFA*、*STAT3*、*MAPK1*、*IL2*、*TNF*、*RELA*、*AKT1*、*MAPK3*、*BCL2L1*和*HSP90AA1* 10 个 hub 基因(图3)。

随后通过 Metascape 富集分析结果发现,这 10 个 hub 基因主要参与胃泌素和白细胞介素等信号通路(图4)。

3.4 潜在作用靶点的相关转录因子及调控基因富集

相关转录因子及调控基因富集分析发现,香菇多糖治疗 TNBC 的潜在靶点富集的相关转录因子靶区主要是 CDC5 01、NFKB C、CP2 02、

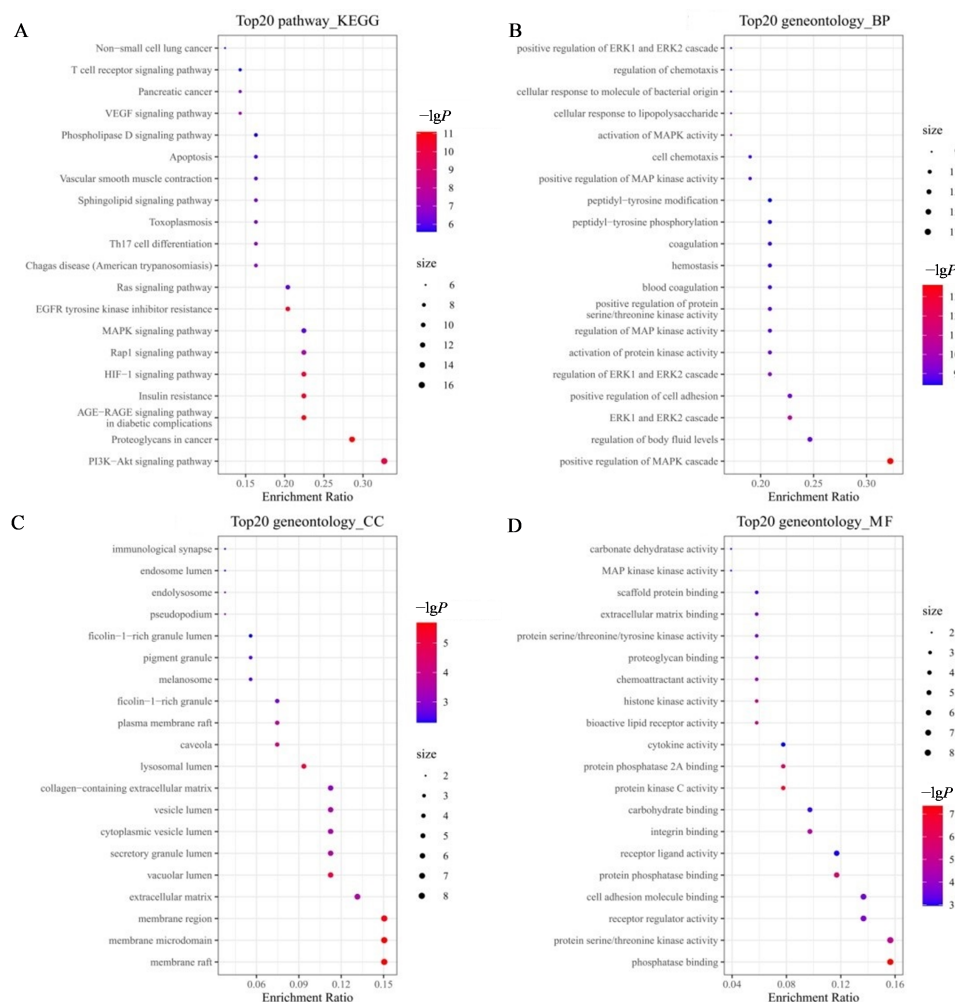


图2 香菇多糖治疗 TNBC 相关靶点的 GO 和 KEGG 可视化分析

Fig. 2 GO and KEGG visual analysis of related targets in lentinan treatment of TNBC

AR Q6 等(图 5-A)。另一项相关调控基因富集结果发现,这些靶点主要受 *SPI*、*RELA*、*JUN*、

TP53、*NF-kB1*、*STAT1h* 和 *STAT3* 等基因调控(图 5-B)。

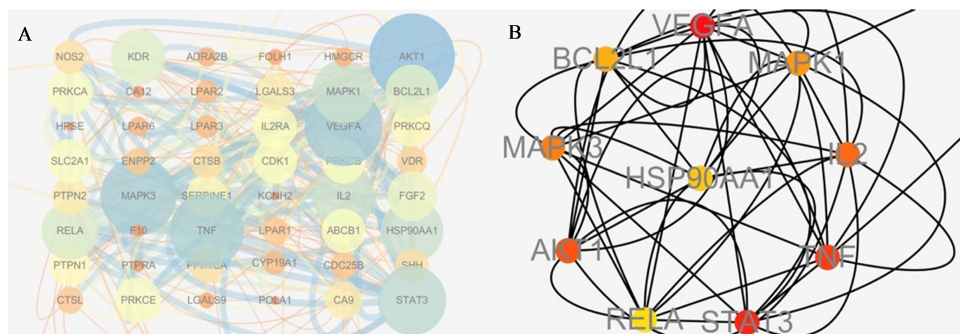


图3 香菇多糖治疗TNBC潜在靶点的PPI分析(A)及hub基因筛选(B)

Fig. 3 PPI analysis (A) and hub gene screening (B) of potential targets in lentinan treatment of TNBC

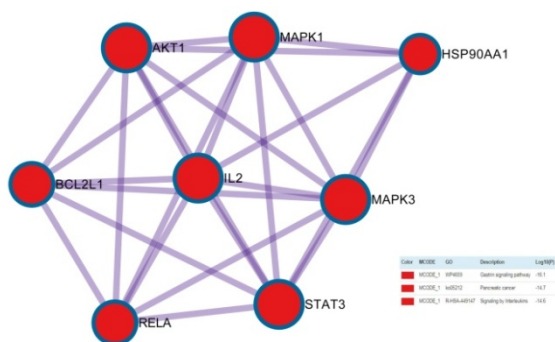


图4 菇多糖治疗TNBC的hub基因通路富集分析

Fig. 4 Pathway enrichment analysis of hub gene in lentinan treatment of TNBC

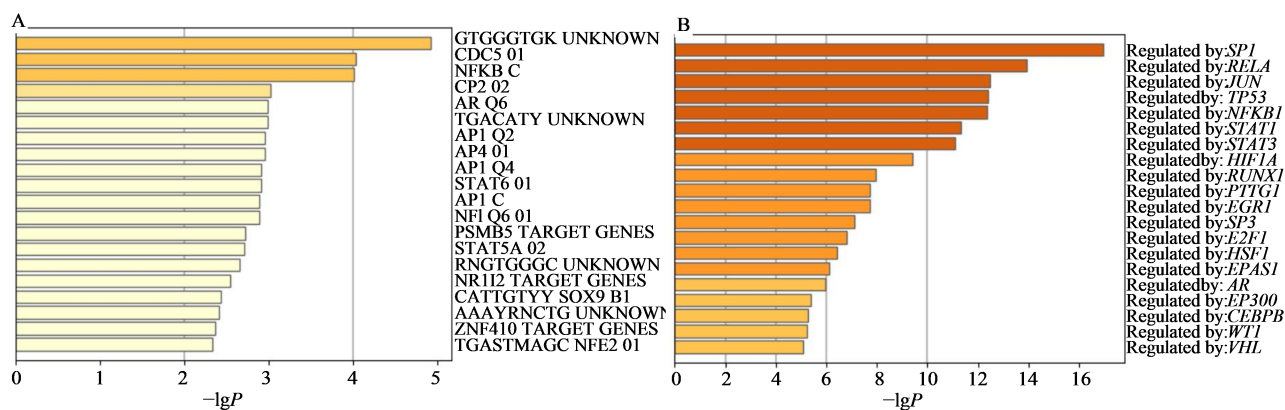


图5 香菇多糖治疗TNBC潜在作用靶点相关转录因子(A)及调控基因(B)富集

Fig. 5 Enrichment analysis of potential target related transcription factors (A) and regulatory genes (B) in lentinan treatment of TNBC

差异显著($P < 0.05, 0.01$),见表4,提示香菇多糖可抑制JAK-STAT相关信号通路,减少肿瘤血管生成。

4 讨论

TNBC是女性常见的恶性肿瘤,其发病机制复杂,临床治疗手段单一,预后不佳,已逐渐成为女性死亡率最高的肿瘤疾病,严重危害女性生命健康。香菇多糖是从香菇的子实体中提取分离的多糖,现代药理学研究表明香菇多糖毒副作用小,且具有多

3.5 实验验证

细胞增殖抑制实验结果显示,与对照组比较,香菇多糖对4T1和MDA-MB-231细胞存活率均有显著抑制作用($P < 0.05, 0.01$),且作用呈浓度相关性。结果见表2。

在给药14、21 d后,与模型组比较,香菇多糖能够剂量相关性地抑制小鼠TNBC肿瘤的生长,高剂量组差异显著($P < 0.05, 0.01$),21 d抑制率达到 $(91.9 \pm 4.7)\%$ 。结果见图6、表3。

基于网络药理学的分析结果,在TNBC动物模型中对2个关键靶基因进行qRT-PCR验证。结果显示,与对照组比较,香菇多糖给药后能够剂量相关性抑制STAT3和VEGFA的mRNA表达,高剂量组

种生物活性功能,故而被广泛用于治疗恶性肿瘤及病毒性肝炎等疾病^[9]。临床上香菇多糖已被证实具有抗肿瘤作用,并能减轻化疗的毒副作用,增强疗效^[7],但是香菇多糖治疗TNBC的分子机制尚不清晰。

本研究通过体外细胞增殖抑制实验证明了香菇多糖对人源和鼠源TNBC细胞(MDA-MB-231和4T1)增殖均具有抑制作用,进一步建立4T1-Luc细

表2 香菇多糖对小鼠和人TNBC细胞的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Inhibitory effect of lentinan on TNBC cells of mouse and human ($\bar{x} \pm s, n=3$)			
组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率%	
		4T1 细胞	MDA-MB-231 细胞
对照	—	100	100
香菇多糖	31.25	94.26 $\pm$ 11.56*	94.98 $\pm$ 1.53*
	62.50	92.56 $\pm$ 8.99*	92.18 $\pm$ 1.08*
	125.00	69.10 $\pm$ 18.07**	80.09 $\pm$ 0.16**
	250.00	63.66 $\pm$ 7.64**	44.86 $\pm$ 0.22**
	500.00	52.49 $\pm$ 0.04**	34.74 $\pm$ 0.59**
	1 000.00	27.52 $\pm$ 5.85**	18.56 $\pm$ 1.50**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group表3 香菇多糖对小鼠TNBC移植瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

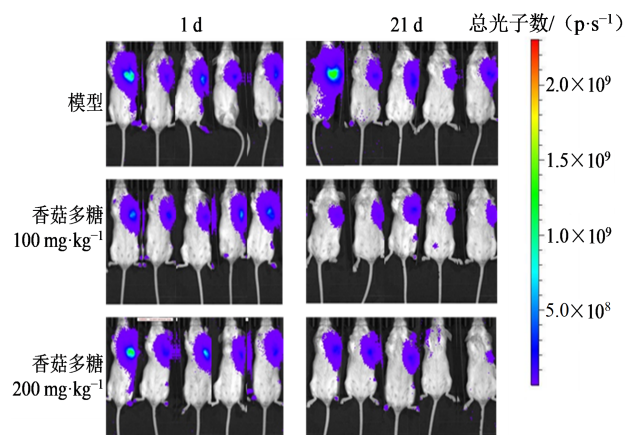
Table 3 Inhibitory effect of lentinan on growth of mouse TNBC xenograft ($\bar{x} \pm s, n=5$)						
组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	总光子数/($\times 10^7 \text{ p} \cdot \text{s}^{-1}$)				21 d
		1 d	7 d	14 d	21 d	抑制率/%
模型	—	3.2 $\pm$ 4.5	66.4 $\pm$ 90.3	530.7 $\pm$ 451.6	1 454.4 $\pm$ 774.9	—
香菇多糖	100	3.2 $\pm$ 5.4	61.3 $\pm$ 93.1	217.0 $\pm$ 189.7	750.8 $\pm$ 387.4	48.3 $\pm$ 26.6
	200	3.0 $\pm$ 2.3	10.5 $\pm$ 14.1	39.2 $\pm$ 38.5*	117.1 $\pm$ 68.7**	91.9 $\pm$ 4.7

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group表4 香菇多糖对小鼠TNBC移植瘤关键基因mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of lentinan on mRNA expression of key genes in mouse TNBC xenograft model ($\bar{x} \pm s, n=5$)			
组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	STAT3/18S rRNA	VEGFA/18S rRNA
模型	—	1.12 $\pm$ 0.53	1.14 $\pm$ 0.53
香菇多糖	100	0.60 $\pm$ 0.30	1.03 $\pm$ 0.71
	200	0.23 $\pm$ 0.18**	0.31 $\pm$ 0.37*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

胞小鼠TNBC移植瘤模型,小动物活体成像监测结果也证实香菇多糖能够明显抑制小鼠TNBC模型体内肿瘤细胞的生长。本研究应用网络药理学分析香菇多糖抑制TNBC的潜在作用机制及靶点,经GO和KEGG富集发现,这些潜在靶点与PI3K-Akt、AGE-RAGE、HIF-1、RAP1和肿瘤PGs相关通路相关。在多数肿瘤中,PI3K-Akt相关信号通路被视为与肿瘤细胞增殖、代谢等密切相关,是新药研发的热门靶点,能够被多种信号通路激活,影响下游分子信号。HIF-1 α 是HIF的主要亚型之一,是调节血管内皮生成因子(VEGF)表达的关键蛋白,也是恶性肿瘤乏氧环境不可缺少的调节蛋白,与肿瘤血管

图6 香菇多糖对小鼠TNBC移植瘤模型荧光的影响
Fig. 6 Effect of lentinan on fluorescence of mouse TNBC xenograft model

新生密切相关^[10]。PGs是细胞表面和细胞周围微环境中一个重要的分子效应器,可参与调节肿瘤发生、血管生成等重要生物过程,目前研究显示PGs可影响肿瘤细胞增殖、黏附、迁移和侵袭能力^[11-12]。肿瘤细胞增殖迁移过程中,AGE-RAGE可以有效激活细胞内的氧化应激效应,引发细胞内活性氧簇(ROS)的大量积聚,引发机体氧化应激和炎症反应^[13-14],同样Rap1信号通路以及RELA(p65)基因也被证实与机体炎症反应相关^[15-16],参与调节NFKB水平,而HSP90AA1、BCL2L1和TNF等基因与肿瘤细胞的缺氧、凋亡、坏死密切相关^[17-20]。此外,MAPK信号途径也是经典的生物信号调节通路,在体内涉及广泛的生物学过程,其中Ras/Raf/MEK/ERK通路是近年来研究比较热门的通路之一,与肿瘤细胞的增值、分化等过程密切相关^[21],这也与富集结果发现的ERK1-ERK2信号调节和PPI分析中得到的MAPK1/3基因一致。JAK-STAT信号通路是一个进化保守的信号级联反应,参与肿瘤细胞的增殖、分化、血管生成以及机体免疫调节等过程,影响Ras/MAPK、PI3K和TGF- β 等信号通路,还可被IL2激活,STAT3表达增加,增强机体免疫细胞如T细胞、B细胞、NK细胞的免疫活性^[22-24]。上述网络药理学分析结果表明,香菇多糖可通过调节PI3K-

Akt、Ras/Raf/MEK/ERK 和 JAK-STAT 等信号通路调节机体免疫,诱导细胞凋亡,减少氧化应激和炎症等多途径抑制肿瘤的生长。基于此,本研究继续采用 qRT-PCR 技术对香菇多糖治疗小鼠 TNBC 模型的核心靶点进行验证,结果再次证实经香菇多糖给药后小鼠肿瘤中 *STAT3* 和 *VEGFA* 基因的表达显著降低。

本研究采用网络药理学和实验验证探讨了香菇多糖抑制 TNBC 的可能作用机制,香菇多糖可通过抑制 JAK-STAT 相关信号通路和减少肿瘤血管生成抑制 TNBC 的生长。此外,网络药理学分析结果提示香菇多糖还可能通过抑制 PI3K-Akt 和 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路、调节机体免疫,诱导细胞凋亡,减少氧化应激和炎症等多途径抑制肿瘤的生长。本研究扩充了香菇多糖的抗肿瘤作用机制研究,也为香菇多糖用于治疗 TNBC 提供理论参考和数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Santuario-Facio S K, Cardona-Huerta S, Perez-Paramo Y X, et al. A new gene expression signature for triple negative breast cancer using frozen fresh tissue before neoadjuvant chemotherapy [J]. *Mol Med*, 2017, 23: 101-111.
- [2] Henderson I C, Berry D A, Demetri G D, et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(6): 976-983.
- [3] 孙晓萌,高社干.三阴性乳腺癌的临床治疗现状及新进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2020, 35(6): 1037-1039.
Sun X M, Gao S G. Current situation and new progress of clinical treatment of triple negative breast cancer [J]. *Pract J Cancer*, 2020, 35 (6): 1037-1039.
- [4] 张翥峰,钱柯,马莉莎,等.人参皂苷 Rg3 和大黄酸钠米乳的制备及其联合 aPD-L1 治疗三阴性乳腺癌的药效学研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(16): 4973-4981.
Zhang F F, Qian K, Ma L S, et al. Preparation of ginsenoside Rg₃ and rhein nanoemulsion and pharmacodynamics study of its combination with aPD-L1 in treatment of triple negative breast cancer [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(16): 4973-4981.
- [5] 徐文琴,吴艳红,余方流,等.香菇多糖抑制乳腺癌 4T1 细胞小鼠移植瘤增殖机制研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(2): 111-116.
- Xu W Q, Wu Y H, Yu F L, et al. Inhibition mechanism of lentinan on the proliferation of breast cancer 4T1 cells xenograft model in mice [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2021, 28(2): 111-116.
- [6] 吕莉,邓明辉,郭立仪.香菇多糖辅助治疗非小细胞肺癌对患者免疫功能的影响 [J]. *中国卫生标准管理*, 2021, 12(14): 101-104.
Lyu L, Deng M H, Guo L Y. The effect of lentinan in the treatment of non-small cell lung cancer on the immune function of patients [J]. *China Heal Stand Manag*, 2021, 12(14): 101-104.
- [7] 鲁海燕,张喜平.香菇多糖对新辅助化疗后乳腺癌患者免疫功能及淋巴细胞的影响 [J]. *安徽医药*, 2018, 22 (12): 2427-2431.
Lu H Y, Zhang X P. Effect of lentinan on infiltrating lymphocytes of tumor tissue and peripheral blood in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2018, 22(12): 2427-2431.
- [8] Zhao J, Liu Y C, Zhang W H, et al. Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(19): 3112-3123.
- [9] 陈同强,林卡莉,邓婷,等.香菇多糖对荷瘤小鼠胸腺、脾和肿瘤的影响 [J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(4): 508-510.
Chen T Q, Lin K L, Deng T, et al. Anti-tumor effect of lentinan on S180 sarcomas in mouse [J]. *Chin J Anat*, 2008, 31(4): 508-510.
- [10] Jiang B H, Zheng J Z, Leung S W, et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(31): 19253-19260.
- [11] 袁媛,周静.核心蛋白聚糖生物学的研究进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(9): 1303-1306.
Yuan Y, Zhou J. Biology review of core proteoglycan [J]. *Medical Recapitulate*, 2011, 17(9): 1303-1306.
- [12] 樊江浩,刘揆亮,吴静.蛋白多糖在肿瘤血管生成中的作用 [J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(4): 515-519.
Fan J H, Liu K L, Wu J. The roles of proteoglycans in tumor angiogenesis [J]. *J Clin Pathol Res*, 2016, 36(4): 515-519.
- [13] 周子艺,夏晓霞,冉欢,等.植物多酚通过 RAGE/MAPK/NF-κB 通路抑制 AGEs 诱导的炎症反应研究进展 [J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 306-312.
Zhou Z Y, Xia X X, Ran H, et al. Plant polyphenols inhibit AGEs-induced inflammatory responses through the RAGE/MAPK/NF-κB signaling pathway: A review [J]. *Food Sci*, 2022, 43(1): 306-312.

- [14] 张凯琳. 晚期糖基化终末产物及其受体信号传导通路在慢性氟中毒神经损伤中的作用 [D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2013.
- Zhang K L. The role of advanced glycation end products and their receptor signal transduction pathways in nerve injury caused by chronic fluorosis [D]. Guiyang: Guiyang Medical University, 2013.
- [15] 苏莉. Rap1 信号通路调节细胞粘附和肿瘤发生的机制 [A]//湖北省暨武汉市生物化学与分子生物学学会第八届第十七次学术年会 [C]. 宜昌: 湖北省科学技术协会, 2007.
- Su L. Mechanism of Rap1 signaling pathway regulating cell adhesion and tumorigenesis [A]//The 8th and 17th annual meeting of Hubei and Wuhan Society of Biochemistry and Molecular Biology [C]. Yichang: Hubei Association of Science and Technology, 2007.
- [16] 李毅斌, 蔡军伟, 刘靖华. RelA/p65 的翻译后修饰及其对 NF- κ B 转录活性的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(11): 977-983.
- Li Y B, Cai J W, Liu J H. Post-translational modification of RelA/p65 in regulating NF- κ B transcriptional activities [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2012, 28(11): 977-983.
- [17] Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(8): 537-549.
- [18] 范永红, 李学圆, 张睿. BCL2 对肿瘤的发展关系及临床应用 [J]. 健康大视野, 2013, 21(19): 188-189.
- Fan Y H, Li X Y, Zhang R. The relationship between BCL2 and tumor development and its clinical application [J]. Health vision, 2013, 21(19): 188-189.
- [19] 钱海利, 王海娟, 林晨. 抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白拮抗分子在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2011, 20(2): 100-102.
- Qian H L, Wang H J, Lin C. Research progress in anti-proapoptotic bcl-2 family proteins antagonists for cancer therapy [J]. China Cancer, 2011, 20(2): 100-102.
- [20] 古翠萍, 张沂平. TNF- α 抗肿瘤作用机制新进展 [J]. 中国肿瘤, 2007, 16(2): 102-105.
- Gu C P, Zhang Y P. Progress on anti-tumor mechanism of tumour necrosis factor-alpha [J]. Bull Chin Cancer, 2007, 16(2): 102-105.
- [21] Toropovsky A N, Pavlova O N, Viktorov D A, et al. Molecular-genetic mechanisms of the signal cascade RAS-RAF-MEK-ERK associated with the development of the tumor process and the purpose of targeted drugs for colorectal cancer [J]. Jour, 2021, 11(4): 25-35.
- [22] 洪璇, 张艳桥. JAK-STAT 信号传导通路在肿瘤中的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2011, 31(4): 463-466.
- Hong X, Zhang Y Q. Progress on JAK-STAT signaling pathway in cancer research [J]. Basic Clin Med, 2011, 31(4): 463-466.
- [23] Rochman Y, Spolski R, Leonard W J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(7): 480-490.
- [24] Liao W, Lin J X, Leonard W J. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation [J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(5): 598-604.

[责任编辑 兰新新]