

·数字中医药·

本文引用:付佳琪,蔡治国,于漫亚,郭志江,张云晓,崔兴. 基于网络药理学及全转录组测序对当归四逆汤干预外泌体抑制多发性骨髓瘤血管新生的机制研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(1):120-128.

基于网络药理学及全转录组测序对当归四逆汤干预外泌体抑制多发性骨髓瘤血管新生的机制研究

付佳琪¹,蔡治国²,于漫亚¹,郭志江¹,张云晓¹,崔兴^{3*}

(1.山东中医药大学中医学院,山东 济南 250013;2.山东中医药大学附属医院质控办,山东 济南 250013;
3.山东中医药大学附属医院血液科,山东 济南 250013)

[摘要] **目的** 基于骨髓瘤细胞株外泌体测序及网络药理学研究当归四逆汤抑制多发性骨髓瘤血管新生的机制,为后续研究提供有针对性的指导。**方法** 利用 TC MSP 在线平台及 SwissTargetPrediction 网站获取当归四逆汤主要化学成分及对应靶点,借助 GeneCards 获取多发性骨髓瘤血管新生相关靶点基因,经与当归四逆汤作用靶点匹配后,获得当归四逆汤抑制多发性骨髓瘤血管新生的作用靶点,并筛选出相应作用成分。取正常人($n=5$)和骨髓瘤患者($n=6$)外周血清提取外泌体进行测序,获得差异表达基因。对骨髓瘤细胞外泌体进行全转录组测序,取交集后获得骨髓瘤来源外泌体差异表达基因。进而与当归四逆汤抑制多发性骨髓瘤血管新生的作用靶点匹配,获得当归四逆汤干预外泌体抑制多发性骨髓瘤的作用靶点。借助 STRING 平台与 Cytoscape 3.8.2 软件对靶点间相互作用网络进行分析,并利用 Metascape 网站进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。运用 R 语言对结果进行可视化处理。最后对主要有效成分和作用靶点进行分子对接验证。**结果** 当归四逆汤作用于多发性骨髓瘤血管新生的有效成分有 117 种,干预外泌体发挥相关作用的相关靶点 39 个,包括 CCND1、EGF 等。GO 分析结果显示,当归四逆汤作用于多发性骨髓瘤血管新生潜在靶点的生物功能涉及血管新生、血管系统发育、细胞周期调节等。KEGG 通路富集显示,当归四逆汤作用于多发性骨髓瘤血管新生潜在靶点的通路主要涉及 PI3K-AKT、HIF-1 等与 VEGF 相关的信号通路等。分子对接结果表明主要有效成分槲皮素、桦木酸与关键作用靶点 AKT1 之间具有良好的对接活性。**结论** 本研究初步揭示了当归四逆汤能够通过 PI3K-AKT、HIF-1 通路干预外泌体抑制多发性骨髓瘤血管新生,为进一步的实验研究提供基础。

[关键词] 外泌体;全转录组测序;当归四逆汤;多发性骨髓瘤;血管新生;网络药理学

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.01.024

Study on the mechanism of Danggui Sini Decoction intervening exosomes inhibiting angiogenesis of multiple myeloma based on network pharmacology and whole transcriptome sequencing

FU Jiaqi¹, CAI Zhiguo², YU Manyi¹, GUO Zhijiang¹, ZHANG Yunxiao¹, CUI Xing^{3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250013, China; 2. Quality Control Office, The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250013, China; 3. Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250013, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of Danggui Sini Decoction in inhibition of angiogenesis in multiple myeloma based on exosome sequencing of myeloma cells and network pharmacology, in order to provide targeted guidance for further

[收稿日期]2021-09-24

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(82074348);泰山学者青年专家人才项目(tsqn201812145);山东省重点研发计划(公益类)(2019GSF108162);山东省自然科学基金项目(ZR2020MH354)。

[第一作者]付佳琪,女,本科生,研究方向:中医学。

[通信作者]*崔兴,男,博士,主任医师,硕士研究生导师,E-mail: cdz45@163.com。

studies. **Methods** The main chemical components and corresponding targets of Danggui Sini Decoction were obtained by TCMSPP online platform and SwissTargetPrediction website. GeneCards was used to obtain the target genes related to angiogenesis of multiple myeloma. After matching with the targets of Danggui Sini Decoction, the targets of Danggui Sini Decoction inhibiting angiogenesis of multiple myeloma was obtained, and the corresponding action components were screened. Exosomes were extracted from peripheral blood serum of normal persons ($n=5$) and myeloma patients ($n=6$) and sequenced to obtain differentially expressed genes. Whole transcriptome sequencing of myeloma exosomes was performed, and the differentially expressed genes of myeloma-derived exosomes were obtained after intersection. Then, the targets of Danggui Sini Decoction in inhibiting angiogenesis of multiple myeloma were matched, and the targets of Danggui Sini Decoction intervening exosomes in inhibiting multiple myeloma were obtained. The interaction network between targets was analyzed by STRING platform and Cytoscape 3.8.2 software, and GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed by Metascape website. R language was used to visualize the results. Finally, molecular docking verification was performed on the main effective components and targets. **Results** There were 117 effective components of Danggui Sini Decoction on angiogenesis in multiple myeloma, and 39 related targets for intervention of exosomes, including CCND1, EGF, etc. GO analysis showed that the biological functions of potential targets of Danggui Sini Decoction on angiogenesis in multiple myeloma were related to angiogenesis, vascular system development and cell cycle regulation. KEGG pathway enrichment showed that the pathways of Danggui Sini Decoction acting on potential targets of multiple myeloma angiogenesis mainly involved PI3K-AKT, HIF-1 and other VEGF-related signaling pathways. Molecular docking results showed that quercetin and betulinic acid had good docking activity with key target AKT1. **Conclusion** This study preliminarily revealed Danggui Sini Decoction can intervene exosomes to inhibit multiple myeloma angiogenesis through PI3K-Akt and HIF-1 pathways, providing a basis for further research.

[**Keywords**] exosome; whole transcriptome sequencing; Danggui Sini Decoction; multiple myeloma; angiogenesis; network pharmacology

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)属于中医学“骨蚀”“骨痹”的范畴。中医理论认为,肿瘤发生发展的重要病因病机是寒凝瘀血内阻。寒凝血瘀证表明肿瘤组织处于缺血缺氧的微环境中^[1],这种微环境能促进肿瘤分泌携带有血管生成因子的外泌体^[2],促使肿瘤血管的新生。《素问·调经论》中载有“血气者,喜温而恶寒,寒则泣不能流,温则消而去之”的治则,因而可以采用温阳化瘀的中药治疗本病。温阳化瘀中药能够改善机体高凝状态和肿瘤周围组织微循环,不仅可以直接抑制肿瘤血管新生,还能够通过改善肿瘤周围组织微环境,从肿瘤的生物特征与血管生成相关因子等方面,阻断肿瘤的血管新生^[3]。当归四逆汤源于《伤寒杂病论》,为医圣张仲景所作的经典名方。本方温阳活血通脉并举,恰好符合抑制外泌体所介导肿瘤血管新生的机制。

肿瘤细胞诱导的血管新生是大多数恶性肿瘤生长和转移的前提^[4],越来越多的研究表明,血管新生是MM瘤生长、浸润、转移过程中的重要环节^[5]。沙利度胺、来那度胺可以通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生成因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)等的表达进而抑制血管新生^[6],目前在MM的治疗

中已取得较好临床效果^[4]。外泌体对细胞通讯有着重要作用,能够参与多种生物过程,如细胞凋亡、血管形成、炎症等^[7]。在对MM瘤的研究中发现,外泌体中富含双调蛋白(amphiregulin, AREG),而AREG可以通过激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[8]促进血管新生;外泌体亦可通过靶向抑制缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)增强血管生成^[9],从而参与骨髓微环境的血管新生,这些特点为抑制MM血管新生的治疗提供了新的靶点。

网络药理学能够系统地研究药物对疾病网络的干预和影响^[10],其整体观和系统理论与中医学的整体观念及中药方剂多靶点、多成分的原理相一致,是研究中药复方配伍与药理作用的有效技术方法。分子对接技术通过理论模拟受体与配体之间的相互作用,预测其结合模式和亲和力,从而能够完善药理学实验的设计。

本研究通过提取外泌体并进行分析,结合网络药理学和分子对接技术,旨在阐释当归四逆汤抑制MM血管新生的有效活性成分及可能的分子机制,为后续的实验研究提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 外泌体提取与分析

1.1.1 试剂与仪器 RPMI-1640 培养液(产品编号:CF0001-500ML)、RIPA 裂解缓冲液均购自济南 Spark jade 生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(上海 Beyotime 生物技术有限公司,产品编号:C0256);anti-Calnexin(产品编号:sc-46669)、anti-TSG101(产品编号:sc-101254)、anti-CD63(产品编号:sc-5257)均购自美国 Santa Cruz 公司;外泌体快速沉淀试剂盒(美国 System Bioscience 公司);透射电镜(日本 Hitachi 公司,型号:TEM-HT7700);BCA 蛋白质测定试剂盒(上海 Beyotime 生物技术有限公司)。

1.1.2 临床血清标本 本研究纳入 2019 年 8 月在山东中医药大学附属医院(中国济南)血液科住院的 6 例 MM 患者。招募 5 名健康志愿者作为对照组。该研究获得山东中医药大学附属医院伦理委员会批准,所有参与者在试验前签署了知情同意书。将外周血样品收集在真空促凝管中,并在离心(离心半径 16 cm,2500 r/min)5 min 后获得血清样品。

1.1.3 U266 细胞株培养收集上清液 MM 细胞系 U266 来自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),置于含有 10% FBS、1% 双抗的培养液中,并放在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。培养骨髓瘤细胞到密度 80% 左右,弃上清,应用 PBS 洗涤细胞沉淀 2 次。将培养基更换为含有 10% 去除外泌体的 FBS 的 RPMI-1640 培养基,继续培养 36 h 后收集细胞上清液。

1.1.4 外泌体提取 通过 Exo Quick 外泌体快速沉淀试剂盒分离正常人外周血清及 U266 细胞上清液的外泌体。将 250 μL 血清样品与 63 μL Exo Quick 外泌体沉淀溶液混合,在冰上孵育 30 min 并离心,然后吸取上清液,离心 5 min,最后分离沉淀中的外泌体。

1.1.5 透射电镜分析 用 4% 多聚甲醛固定外泌体,用 PBS 洗涤。将样品在室温下放置在碳涂覆的 200 目铜网格上 20 min,并在 1% 戊二醛中固定 5 min,然后用去离子水洗涤 3 次。用草酸铈酞对样品进行染色 5 min,并以 1:9 的比例加入一滴 4% 乙酸铈酞和 2% 甲基纤维素在冰上包埋,再用透射电

子显微镜对干燥的网格成像。

1.1.6 蛋白印迹分析 对 MM 患者和健康志愿者血清中提取的外泌体分别进行蛋白印迹分析。用 RIPA 裂解缓冲液(Spark jade)裂解细胞,用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定(Beyotime)蛋白质浓度。等量的样品蛋白用 10% SDS-PAGE 进行电泳分离,然后转移到 PVDF 膜上。在 5% 脱脂奶溶液中浸泡 2 h 后,将膜在 40 ℃ 下与一级抗体 anti-Calnexin, anti-TSG101, anti-CD63(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)一起孵育过夜。然后,将膜与第二抗体(Beyotime)一起孵育 1 h。最后,使用 Alpha Innotech Fluor Chem Q 成像分析系统进行可视化。

1.1.7 高通量测序 利用 Illumina HiSeq 仪器上述两种来源的外泌体进行 150 bp 双端测序,相关基因表达分析由上海云序生物科技有限公司进行。

1.2 网络药理学研究

1.2.1 当归四逆汤有效成分及靶点的筛选 通过 TCMSIP 在线平台^[11]寻找当归四逆汤中当归、桂枝、白芍、细辛、通草、甘草、大枣的化学组成成分,根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30% 和类药性(drug likeness, DL)≥0.18 的 2 个 ADME 属性值筛选出符合条件的化学成分及其对应靶点,借助 UniProt 蛋白质数据库,物种设定为“human”,将靶点转换为对应的基因,并利用 SwissTargetPrediction 网站^[12](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)补充药物有效成分的作用靶点信息。

1.2.2 MM 靶点的收集与筛选 以“multiple myeloma and angiogenesis”为检索词,通过 GeneCards 数据库、OMIM 数据库检索相应的靶点。合并 2 个疾病数据库靶点后,删除重复值得到 MM 靶点。

1.2.3 当归四逆汤成分-作用靶点网络构建 将当归四逆汤成分靶点与 MM 血管新生靶点取交集,获得当归四逆汤抑制 MM 血管新生的作用靶点。根据交集靶点反向筛选当归四逆汤有效成分,构建当归四逆汤成分-作用靶点网络,将其导入 Cytoscape 3.8.2 软件^[13],使用 Network Analyzer 功能进一步分析当归四逆汤成分-作用靶点网络,根据成分与靶点连接情况筛选出当归四逆汤作用于 MM 的关键成分。

1.3 当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的机制研究

1.3.1 当归四逆汤-外泌体靶点基因网络图构建 将

当归四逆汤抑制 MM 血管新生靶点基因与外泌体差异表达基因取交集,即获得当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的作用靶点。利用 STRING 平台^[14]与 Cytoscape 软件,对交集靶点进行网络拓扑分析,并构建当归四逆汤-外泌体靶点基因网络图。

1.3.2 KEGG 与 GO 分析 应用 Metascape 数据平台对当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的相关靶点进行富集分析,以 $P < 0.01$ 为筛选标准,进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,并借助 R 语言对富集结果进行可视化处理。

1.3.3 分子对接 筛选出当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的主要有效成分与靶点,利用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得核心靶点蛋白晶体结构的 PDB 格式文件,通过 TCMSp 数据库获得有效成分的 Mol2 格式文件,利用 AutoDock Tools 对核心靶点和有效成分进行处理,获得相应的 pdbqt 格式文件,利用 Vina 进行分子对接,并统计各模型的结合能,最后用 PyMol 对活性较高的对接模型进行可视化。

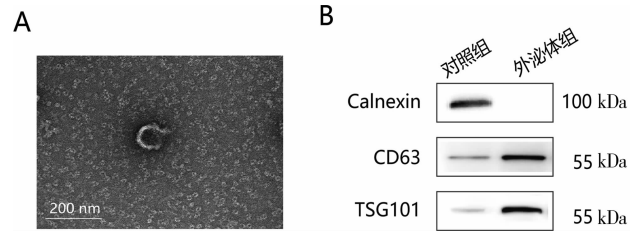
2 结果

2.1 外泌体的鉴定

透射电镜显示直径 < 100 nm 的圆形外泌体(图 1A)。Western blot 分析证实 MM 患者血清中非外体标记 Calnexin 的低表达和特异性外体膜标记 CD63 和 TSG101(图 1B)的高水平。

2.2 外泌体测序结果

与健康志愿者相比,骨髓瘤患者外周血外泌体高通量测序共发现了 20 309 个差异表达的 mRNA。为筛选表达差异显著的外泌体 mRNA,以 FC 值和



注:A.透射电镜检测血清外泌体的形态和大小;B. Western blot 分析显示 MM 患者血清中非外泌体标记物 Calnexin 低表达,特异性外泌体膜标记物 CD63 和 TSG101 高表达

图 1 外泌体鉴定

P 值($FC \geq 2.0$ 和 $P < 0.05$)作为统计学显著性标准,总共有 6782 个 mRNA 在 MM 患者和健康对照组中有显著不同的表达,其中,5982 个为上调 mRNA,800 个为下调 mRNA。U266 全转录组测序共获得 13 629 个 mRNA。

2.3 当归四逆汤有效成分及靶点

在 TCMSp 数据库中,初步检索到 7 味中药化学成分共 1069 种,经 ADME 筛选后,得到有效成分 155 种,删除 25 种无作用靶点的成分,即 130 种有效成分(见表 1)。将 130 个有效成分与中药构建复方-成分网络(见图 2),并对网络进行拓扑分析,根据“中介中心性”降序排列,前 4 位的有效成分分别是桦木酸、山柰酚、槲皮素、谷甾醇。

通过 TCMSp 数据库筛选有效成分靶点信息,结合 SwissTargetPrediction 在线靶标垂钓,并统一在 UniProt 蛋白质数据库将化合物作用的蛋白质靶点进行规范。共收集到相关作用靶点共 346 个(已删除重复值)。

2.4 MM 血管新生靶点的获取

从 GeneCards 数据库获得 MM 瘤血管新生靶点 1770 个。设定 Score 大于中位数的靶点为 MM 血管

表 1 当归四逆汤主要成分

MOL ID	成分名称	MOL ID	成分名称
MOL000098	槲皮素(querletin)	MOL000211	桦木酸(mairin)
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	MOL012940	绣线菊碱 A(spiradine A)
MOL002773	β -胡萝卜素(beta-carotene)	MOL002311	甘草酚(glycyrol)
MOL000497	甘草查尔酮 A(licochalcone A)	MOL012992	滇刺枣碱 D(mauritine D)
MOL004328	柚皮素(naringenin)	MOL001918	芍药苷(paeoniflorgenone)
MOL000392	芒柄花素(formononetin)	MOL008647	穆坪马兜铃酰胺(moupinamide)
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	MOL004904	甘草吡喃香豆素(licopyranocoumarin)
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	MOL004891	紫檀素(shinpterocarpin)
MOL000492	儿茶素[+]-catechin]	MOL004841	甘草查尔酮 B(licochalcone B)
MOL004576	黄杉素(taxifolin)	MOL000500	牛角花酮(vestitol)

新生的潜在靶点,连续进行 2 次筛选后,结合 OMIM 数据库补充相关靶点,合并后删除重复值,得到 MM 相关靶点 885 个。

2.5 当归四逆汤成分-作用靶点网络构建

将筛选的当归四逆汤活性成分靶点与 MM 血管新生靶点通过 R 语言取交集,并将交集靶点通过 STRING 平台与 Cytoscape 软件构建靶点相互作用网络,最终获得 143 个交集靶点(见表 3)。根据交集靶点反向筛选当归四逆汤有效成分,得到作用于 MM 血管新生的相关活性成分 117 个,通过 Cytoscape 软件的 Network Analyzer 功能构建当归四逆汤成分-靶点网络,根据“度中心性”排序发现,前 5 位化合物为槲皮素、山柰酚、 β -胡萝卜素、甘草查尔酮 A、柚皮素(见表 2),推测可能为当归四逆汤抑制 MM 血管新生的关键成分。

2.6 当归四逆汤-外泌体靶点基因网络构建

将人外周血外泌体差异上调基因与 U266 测序基因取交集,获得 3862 个骨髓瘤细胞来源的差异基因(见图 3A),将其与当归四逆汤作用靶点匹配,获

表 2 当归四逆汤关键成分基本信息

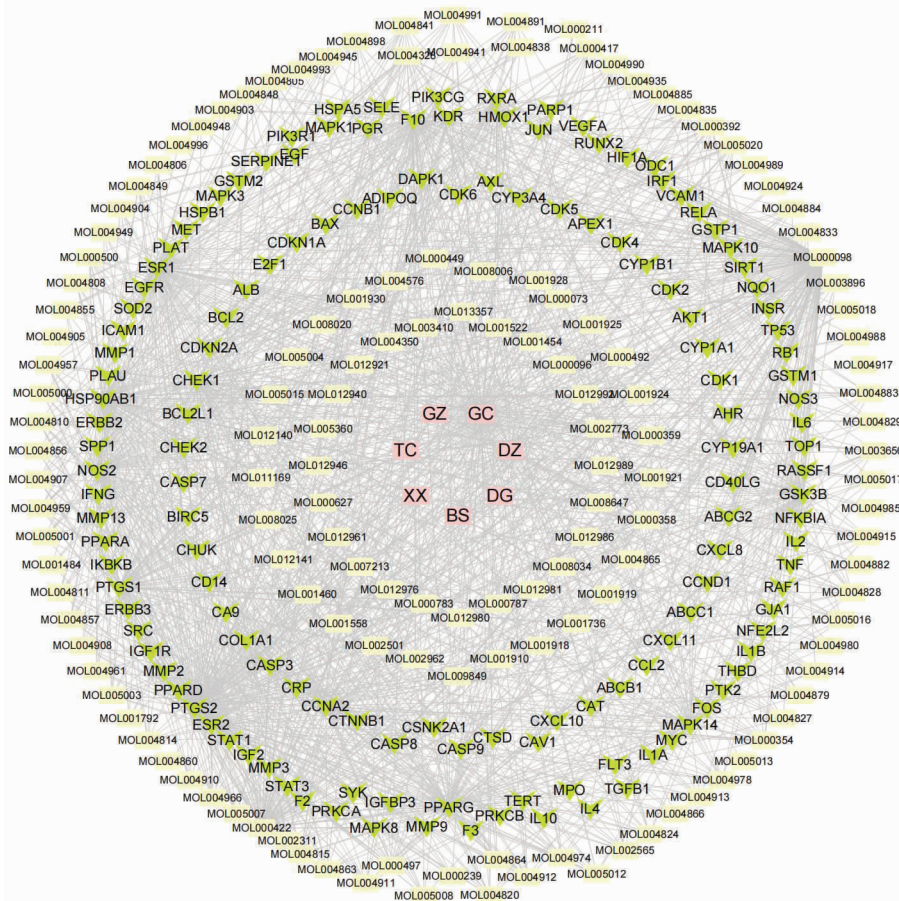
中药	MOL ID	成分	边数
大枣、甘草	MOL000098	槲皮素(queretin)	121
白芍、细辛、甘草	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	65
大枣	MOL002773	β -胡萝卜素(beta-carotene)	19
甘草	MOL000497	甘草查尔酮 A(Licocalcone A)	19
甘草	MOL004328	柚皮素(naringenin)	19

得当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的可能作用靶点 39 个(见表 3,图 3B)。借助 STRING 平台与 Cytoscape 软件制作当归四逆汤干预外泌体作用靶点网络图(图 3C)。

2.7 KEGG 与 GO 分析

应用 Metascape 数据平台对当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生相关的 39 个靶点进行富集分析,以 $P < 0.01$ 为筛选标准,获得 GO 生物学过程条目 587 条、KEGG 通路 27 条,运用 R 语言对富集显著的相关通路进行可视化处理(图 4)。

GO 生物学过程分析结果显示,相关靶点基因富集在血管发育(blood vessel development)、血管形



注:红色方形代表 7 种中药,黄色方形代表作用成分,绿色箭头代表作用靶点

图 2 当归四逆汤抑制 MM 血管新生复方-成分-靶点网络

表3 交集靶点信息

基因名称	度中心性(Degree)	基因名称	度中心性(Degree)
TP53	43	ESR1	31
STAT3	43	CCND1	28
AKT1	42	SRC	23
MAPK1	42	ERBB2	22
MAPK3	42	EGF	22
JUN	41	CDKN2A	21
SRC	37	SIRT1	20
RELA	35	CASP9	18
TNF	34	CDK4	18
PIK3R1	30	CCNB1	17
MAPK8	29	RELA	15
IL6	27	PARP1	15
MAPK14	27	CDK2	13
VEGFA	27	CHEK1	13
MYC	26	ESR2	13
CTNNB1	25	CYP19A1	12
ESR1	25	CHEK2	11
FOS	25	PTK2	11
RB1	23	ERBB3	11
EGFR	23	MET	10

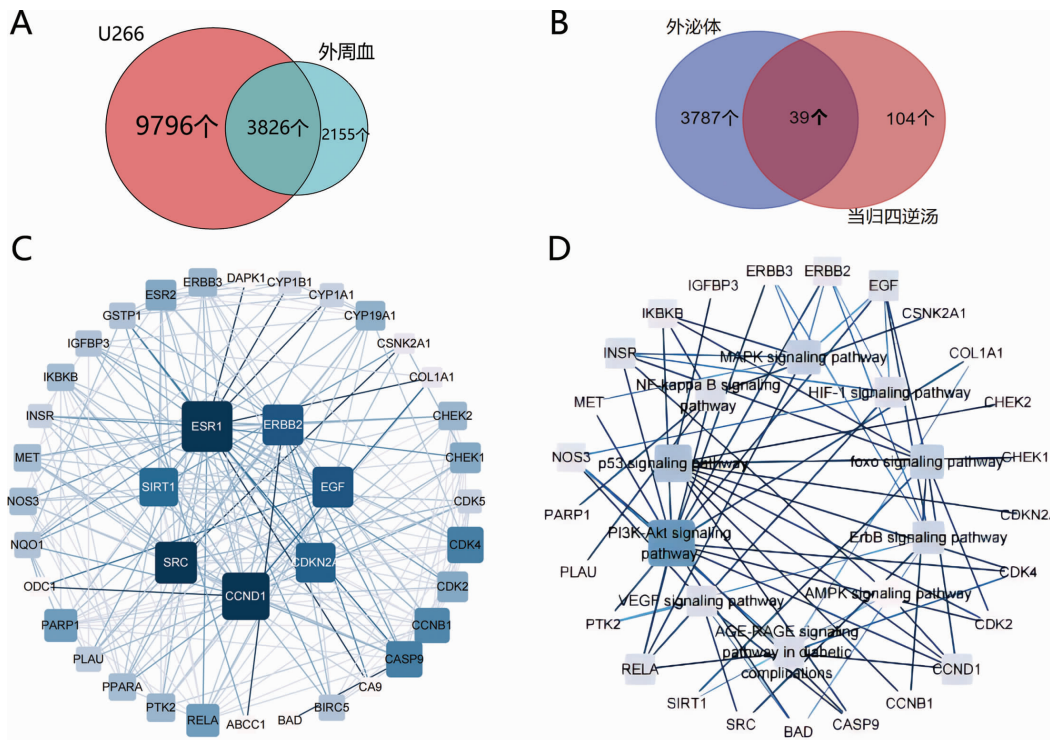
注:左侧为当归四逆汤抑制MM血管新生的作用靶点,排名前3的靶点为TP53、STAT3、AKT1;右侧为当归四逆汤干预外泌体发挥治疗作用的靶点,排名前3的靶点为ESR1、CCND1、SRC(均按照“度中心性”排序)

态发育(blood vessel morphogenesis)、激酶活性的调控(regulation of kinase activity)、细胞周期的调节(regulation of cell cycle)等生物学过程。

KEGG 通路包括 PI3K-AKT 信号通路、p53 信号通路、VEGF 信号通路、NF-kappa B 信号、MAPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、HIF-1 信号通路等。选取 *P* 值在前 10 位的通路建立靶点-通路网络(见图 3D)进行分析,发现多个靶点显著富集在 PI3K-AKT 信号通路,同时多条信号通路与血管新生有关,如 VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路等。这提示当归四逆汤可以通过多条通路干预外泌体从而抑制 MM 血管新生。

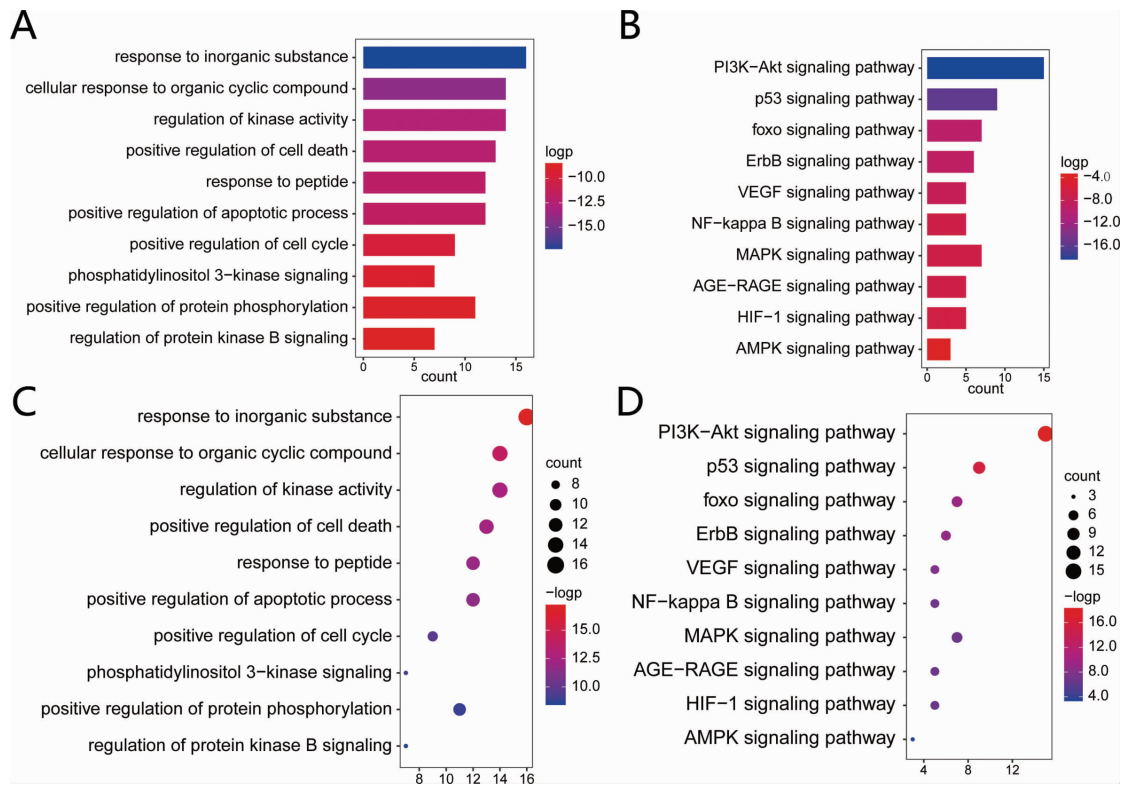
2.8 分子对接

通过 KEGG 分析并进一步查阅文献,发现当归四逆汤抑制 MM 血管新生中的多条通路均有 PI3K-AKT 信号通路的参与,而 AKT1 是该通路上的关键靶点,而 AKT1 同时为当归四逆汤发挥治疗作用的关键靶点,因此,选取 2 种主要有效成分(槲皮素、山柰酚)与 AKT1 结合模式进行展示(见图 5)。由图 5 可见槲皮素和山柰酚与 JUN、MAPK1、AKT1 靶点蛋白均形成氢键,表明具有良好的结合性。



注:A.U266 外泌体-外周血外泌体差异表达基因韦恩图;B.骨髓瘤来源外泌体-当归四逆汤作用靶点韦恩图;C.当归四逆汤干预外泌体作用靶点网络,颜色越深、方形越大代表“度中心性”值越大;D.当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生通路-靶点网络,颜色越深、方形越大代表“度中心性”值越大

图3 交集靶点获取与靶点网络构建

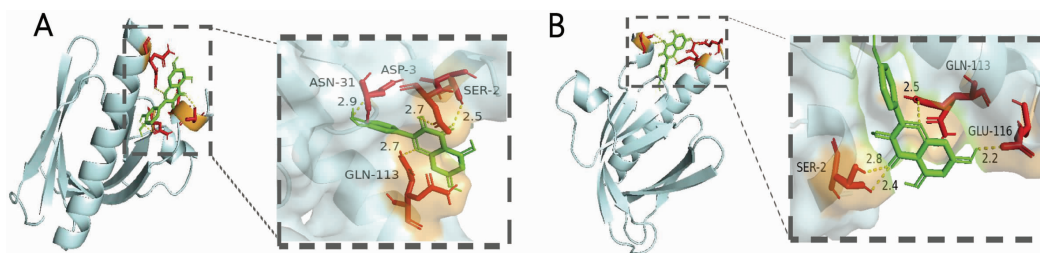


注:A、C 为 GO-BP 富集分析;B、D 为 KEGG 通路富集分析

图 4 当归四逆汤干预外泌体靶点基因富集分析

表 3 分子对接结果(kcal/mol)

成分	STAT3	TP53	JUN	AKT1	MAPK1	MAPK3	SRC
槲皮素(querceetin)	-7.3	-6.4	-7.8	-6.4	-7	-6.8	-7.7
山柰酚(kaempferol)	-6.3	-6.4	-8.5	-5.9	-8.1	-7	-7.6



注:A.槲皮素与 AKT1 分子对接;B.山柰酚与 AKT1 分子对接

图 5 分子对接模式图

3 讨论

肿瘤细胞分泌的外泌体对血管新生具有重要影响,肿瘤细胞来源的外泌体能够通过 Hh-GLI 信号通路促进 VEGF 的表达^[15],也可通过分泌 EGFR 诱导血管新生^[16]。本研究团队通过对 U266 细胞外泌体进行测序,并将高表达基因与当归四逆汤抑制 MM 血管新生的靶点进行匹配,进一步分析发现,U266 细胞外泌体差异表达的 mRNA 中存在 VEGF 等血管新生相关的 mRNA 高表达。KEGG 通路富集

分析显示,主要富集于 PI3K-AKT、AGE-RAGE、VEGF、HIF-1 等信号通路,揭示了当归四逆汤干预 U266 外泌体抑制血管新生的主要机制。

网络药理学分析发现,槲木酸、山柰酚、槲皮素、谷甾醇可能是本方发挥作用的重要成分。槲木酸可抑制 HIF-1 α 的转录,进而抑制 HIF-1 α 和 STAT3 与 VEGF 基因启动子的结合来减少新生血管形成^[17];山柰酚能够通过调节 VEGF/VEGF-2 及其下游信号级联,从而起到抑制血管新生的作用^[18];槲皮素为黄酮类化合物,有研究表明槲皮素能够下调 VEGF-A 的

表达,能够很好的抑制血管新生^[19-20]。以上3种成分在当归四逆汤成分中“中介中心性”排序为前3位,提示桦木酸、山柰酚、槲皮素可能是当归四逆汤发挥抗血管新生的重要成分,而通过分子对接技术,验证了槲皮素、山柰酚与相关靶点具有良好的结合性。从而推测当归四逆汤主要通过以下机制干预外泌体抑制骨髓瘤血管新生:(1)槲皮素通过抑制 VEGF 的表达水平抑制肿瘤血管新生^[21];(2)槲皮素可以抑制 HIF-1 α 的转录活性从而抑制肿瘤血管新生^[22];(3)槲皮素与山柰酚一同抑制 AKT 的表达^[22],从而抑制 MM 血管新生。

通路富集结果显示,当归四逆汤干预外泌体抑制血管新生相关的通路主要集中在以下几条:(1)PI3K/AKT 信号通路:PI3K 为两个亚基构成的异二聚体,包括催化亚基和调节亚基^[23],其活化后能够将 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)转化为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)^[24]。AKT 是 PI3K 的下游信号分子,能够与 PIP3 相结合,从而激活 Ser473 位点,进而调控肿瘤细胞的凋亡。VEGF 启动子包含多种转录调节因子,如 SP1/SP3 的结合位点^[25],在受到刺激时,PI3K 的调节亚基会磷酸化,AKT 上 Ser473 也磷酸化,从而使 PI3K/AKT 激活,SP1 上的 Thr453 与 Thr739 被磷酸化,启动 VEGF 的转录^[26]。AKT 活化可启动下游信号分子 mTOR,mTOR 能够促进 VEGF 的上调,促进血管新生^[27]。此外,mTOR 还可调节 STAT3 的活化,而 STAT3 在肿瘤缺氧环境下,能够和 HIF-1 α 与 VEGF 启动子结合,从而促进血管新生^[28];同时能够促进其下游目标如 BFGF、HGF 的表达,从而导致新生血管形成。(2)VEGF 相关通路:VEGF 是血管新生过程中最重要的调节因子之一^[29],其介导的各信号级联几乎参与血管新生的各个过程^[30]。VEGF 的表达水平与骨髓瘤血管新生关系密切,已经有学者将其作为其评价疗效及危险度指标之一^[31]。(3)HIF-1 α 相关通路:HIF-1 α 为缺氧情况下诱导产生的特异结合蛋白,其与 HIF-1 β 构成活性 HIF-1 异二聚体,参与缺氧反应基因调节,从而使细胞适应低氧环境,促进血管新生,有研究显示^[32-33],HIF-1 α 可能通过上调 Ang-2 表达,进一步上调多种促血管生成因子的表达从而导致肿瘤血管新生。而且在 HIF-1 α 调节其下游基因 VEGF 的过程中,PI3K/AKT 通路也会起重要调节作用^[34]。因此,HIF-1 α 在肿瘤血管新生

中具有重要的意义。

综上所述,本研究通过对 U266 及外周血清外泌体进行高通量测序并结合网络药理学,系统分析了当归四逆汤干预外泌体抑制 MM 血管新生的作用机制,并通过分子对接技术验证了有效成分与核心靶点之间具有良好的结合活性,从而证实了本研究团队的假说:温阳化瘀中药可以通过干预肿瘤细胞分泌外泌体介导血管新生抑制肿瘤发展,肿瘤所处寒凝血瘀状态与血管新生存在一定的联系。当归四逆汤抑制 MM 血管新生具有多靶点、多通路的特点,为当归四逆汤的进一步研究提供理论基础。

参考文献

- [1] 周华妙,郭勇.寒凝血瘀对结肠癌肺转移模型小鼠肺组织 VEGF、MMP-2 表达的影响[J].浙江中西医结合杂志,2012,22(6):429-432.
- [2] 周辉,沈伟锋,邵平扬.缺氧外泌体传递 miR-199a-5p 对胃癌细胞 SGC-7901 迁移和侵袭的影响[J].医学信息,2021,34(1):78-82,86.
- [3] 熊文杰,刘焕勋,史敦云,等.骨髓瘤细胞来源外泌体对 NK 细胞表面活化受体的影响[J].中国实验血液学杂志,2017,25(6):1713-1717.
- [4] 师亮,陈浩,崔慧林,等.青蒿琥酯对人骨髓瘤细胞抗血管生成的作用[J].解剖学杂志,2018,41(2):152-155.
- [5] 伏杰,王松坡,李琦,等.活血化痰中药抗肿瘤血管新生的实验研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(4):153-157.
- [6] 杨学文,马利敏,赵小强,等.雷利度胺联合化疗治疗急性白血病的临床效果及对血管生成因子的影响[J].中国实验血液学杂志,2016,24(3):702-706.
- [7] 王含必,邓成艳.外泌体的生物功能及临床应用潜能[J].生殖医学杂志,2021,30(7):966-970.
- [8] RAIMONDO S, SAIIEVA L, VICARIO E, et al. Multiple myeloma-derived exosomes are enriched of amphiregulin (AREG) and activate the epidermal growth factor pathway in the bone microenvironment leading to osteoclastogenesis[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2019, 12(1): 2.
- [9] UMEZU T, TADOKORO H, AZUMA K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1[J]. Blood, 2014, 124(25): 3748-3757.
- [10] 张彦琼,李梢.网络药理学与中医药现代研究的若干进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(6):883-892.
- [11] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TC MSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13.

- [12] GFELLER D, MICHELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073-3079.
- [13] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Research*, 2003, 13 (11): 2498-2504.
- [14] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein - protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [15] BHAT A, YADAV J, THAKUR K, et al. Exosomes from cervical cancer cells facilitate pro-angiogenic endothelial reconditioning through transfer of Hedgehog-Gli signaling components[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(1): 319.
- [16] 刘轩宇,陈磊.外泌体在胃癌腹膜转移中机制的研究进展[J].*外科理论与实践*,2021,26(1):76-78.
- [17] 高倩,吴佩,何疆,等.青蒿素和桦木酸阻断脂多糖诱导小鼠血管新生及组织增殖[J].*中国药理学杂志*,2015,50(4): 330-338.
- [18] CHIN H K, HORNG C T, LIU Y S, et al. Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. *Oncology Reports*, 2018, 39(5): 2351-2357.
- [19] 李彩丽,廖应英,成丹,等.槲皮素对食管癌 Eca109 细胞迁移侵袭及血管生成的影响[J].*国际消化病杂志*,2017,37(2):104-108.
- [20] TANG S M, DENG X T, ZHOU J, et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121: 109604.
- [21] HAO Y L, ZHANG C P, SUN Y Y, et al. Licochalcone A inhibits cell proliferation, migration, and invasion through regulating the PI3K/AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12: 4427-4435.
- [22] 史新萌,刘玉萍,瞿鼎,等.抑制 HIF-1 α 表达的中药抗肿瘤活性成分研究进展[J].*药理学学报*,2021,56(10):2689-2719.
- [23] 耿军辉,张丽军,王亚丽,等.PI3K/Akt 信号通路在肿瘤血管新生的研究进展[J].*现代肿瘤医学*,2018,26(9):1462-1466.
- [24] 刘泽宇,万宇翔,黄金昶.当归四逆汤治疗肝细胞癌作用机制的网络药理学分析[J].*中国实验方剂学杂志*,2020,26(6):185-192.
- [25] SØLVSTEN C A E, PAOLI F, CHRISTENSEN J H, et al. Voluntary physical exercise induces expression and epigenetic remodeling of VEGF A in the rat Hippocampus[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(1): 567-582.
- [26] SHARMA S, GURU S K, MANDA S, et al. A marine sponge alkaloid derivative 4-chloro fuscapylin inhibits tumor growth and VEGF mediated angiogenesis by disrupting PI3K/Akt/mTOR signaling cascade [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2017, 275: 47-60.
- [27] XU T W, LV Z, CHEN Q H, et al. Vascular endothelial growth factor over-expressed mesenchymal stem cells-conditioned media ameliorate palmitate-induced diabetic endothelial dysfunction through PI-3K/AKT/m-TOR/eNOS and p38/MAPK signaling pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106: 491-498.
- [28] LEE H, JEONG A J, YE S K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy[J]. *BMB Reports*, 2019, 52(7): 415-423.
- [29] 郑硕,黄奕红.肝癌组织中血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子-II 的表达情况及影响因素分析[J].*吉林医学*,2021,42(5): 1064-1067.
- [30] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等.VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J].*中国比较医学杂志*,2015,25(12):81-86.
- [31] PALTA A, KAUR M, TAHLAN A, et al. Evaluation of angiogenesis in multiple myeloma by VEGF immunorexpression and microvessel density [J]. *Journal of Laboratory Physicians*, 2020, 12(1): 38-43.
- [32] 王宝财,金寿德,张新.缺氧诱导因子-1 α 对非小细胞肺癌血管生成及其对预后的影响[J].*临床肺科杂志*,2021,26(5):747-751.
- [33] BAHRAMI A, ATKIN S L, MAJEED M, et al. Effects of curcumin on hypoxia-inducible factor as a new therapeutic target[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 137: 159-169.
- [34] WANG D F, ZHAO W, LIU J R, et al. Effects of HIF-1 α on spermatogenesis of varicocele rats by regulating VEGF/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Reproductive Sciences*, 2021, 28(4): 1161-1174.

(本文编辑 苏维)