

基于网络药理学的淫羊藿苷对氟尿嘧啶所致大鼠骨髓间充质干细胞凋亡抑制作用的机制研究

张小年, 吴绍锋, 林锐珊, 罗晶, 刁远明 (广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 基于网络药理学的淫羊藿苷(ICA)对氟尿嘧啶(5-FU)所致大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)凋亡抑制作用机制研究。**方法** 在 TCMSP 数据库收集淫羊藿苷的药代动力学相关数据, 利用 CTD 和 GeneCards 两个数据库, 检索获取淫羊藿苷的所有潜在作用靶点, 采用 DAVID 6.8 数据库对淫羊藿苷潜在靶点进行 GO 富集分析以及进一步的筛选收集关键靶点。将关键靶点导入 STRING 数据库, 结合运用 Cytoscape 3.8.2 软件制作蛋白互作网络(PPI), 并用 STRING 数据库进行通路富集分析(KEGG)。采用 Western Blot 法检测 Akt/GSK3 β /CyclinD1 通路 3 个特征蛋白以及凋亡密切相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达情况。**结果** 获得淫羊藿苷潜在作用靶点 83 个, 进一步筛选得到关键靶点 29 个, 通路富集分析结果按照 FDR 值从小到大排序, 其前 20 条中具有重要作用的为 PI3K-Akt 通路、HIF-1 信号通路以及 FoxO 信号通路等。基于 KEGG 富集分析结果, 建立了 PI3K-Akt 核心作用通路的可视化通路网络图。Western Blot 实验结果揭示, 与模型组比较, 淫羊藿苷处理组 p-Akt($P < 0.01$)的表达升高, p-GSK3 β 水平和 CyclinD1 的表达有升高趋势($P > 0.05$), Bcl-2/Bax 比值升高($P < 0.001$); LY294002 抑制 Akt 磷酸化之后, 相应 p-Akt、p-GSK3 β 水平和 CyclinD1 的表达下降($P < 0.05$, $P < 0.001$), Bcl-2/Bax 比值减少($P < 0.001$)。**结论** 淫羊藿苷对 5-FU 所致大鼠骨髓间充质干细胞凋亡抑制作用可能是通过激活 Akt/GSK3 β /CyclinD1 信号通路以及 Bcl-2 途径介导的。

关键词: 网络药理学; 淫羊藿苷; 氟尿嘧啶(5-FU); 骨髓间充质干细胞; 凋亡; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0211-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.010

Research on the Mechanism of Icaritin on the Inhibition of 5-FU-induced Apoptosis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Based on Network Pharmacology

ZHANG Xiaonian, WU Shaofeng, LIN Ruishan, LUO Jing, DIAO Yuanming (School of Basic Medical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of icaritin(ICA) on the inhibition of 5-FU-induced apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) based on network pharmacology. **Methods** The pharmacokinetic data of ICA was collected from the TCMSP database. The CTD and GeneCards databases were used to retrieve all potential targets of ICA. The DAVID 6.8 database was used to perform GO enrichment analysis of potential targets and subject to further screening and collect key targets. The key targets were imported into the STRING database, which was combined with Cytoscape 3.8.2 software to make Protein-Protein Interaction Networks (PPI), and pathway enrichment analysis (KEGG) was analyzed by STRING database. Western Blot was used to detect the expression of three characteristic proteins in the Akt/GSK3 β /CyclinD1 pathway and apoptosis-regulatory proteins Bcl-2 and Bax. **Results** 83 potential targets of ICA were obtained, and 29 key targets were further screened. The results of KEGG were ranked by the FDR value from small to large. The top 20 pathways, including PI3K-Akt pathway,

收稿日期: 2021-05-12

作者简介: 张小年, 女, 实验师, 硕士研究生, 研究方向: 钆配合物抗肿瘤机制以及中医药调控干细胞防治肿瘤。Email: shezn84@gzucm.edu.cn。通信作者: 刁远明, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医药调控干细胞防治肿瘤。Email: zsdym@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20191095)。

HIF-1 signaling pathway and FoxO signaling pathway, etc., play important roles in the inhibitory process. Visualization of PI3K-Akt core pathway was established according to the results of KEGG enrichment analysis. Western blot experiments revealed that compared with the model group, the levels of p-Akt ($P < 0.01$), p-GSK3 β and the expression of CyclinD1 ($P > 0.05$) in the ICA treatment group increased, and the ratio of Bcl-2/Bax also increased ($P < 0.001$). After LY294002 inhibited Akt phosphorylation, the corresponding p-Akt, p-GSK3 β levels and CyclinD1 expression decreased ($P < 0.001$, $P < 0.05$), and the Bcl-2/Bax ratio decreased obviously ($P < 0.001$).

Conclusion The inhibitory effect of ICA on 5-FU-induced apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells is most likely mediated by activating the Akt/GSK3 β /CyclinD1 signaling pathway and the Bcl-2 pathway.

Keywords: Network pharmacology; icariin; 5-fluorouracil (5-FU); bone marrow mesenchymal stem cells; apoptosis; rats

氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)是一种尿嘧啶的类似物,通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶活性,干扰DNA的合成,发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[1]。5-FU作为临床一线抗肿瘤药物对消化道癌及其他实体瘤有良好疗效,在肿瘤内科治疗中占有重要地位,但是在临床治疗过程中,5-FU有效剂量持续使用不仅杀伤癌细胞,同时也使正常细胞受到严重损伤,因此常伴有对多种器官的毒副作用,比如:胃肠道炎症^[2-3]、心脏毒性^[4-5]、神经毒性^[6]、骨髓抑制^[7]等。5-FU在细胞内转化为有效的氟尿嘧啶脱氧核苷酸后,被活跃分裂的组织及肿瘤所优先摄取。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有强大的增殖能力和多向分化潜能^[8],是一种处于活跃分裂状态的细胞,因此很容易被5-FU所“误伤”,从而引起严重的骨髓抑制毒副作用。

研究^[9-13]证实,具有补肾生血、益气活血作用的中药复方、中药及有效成分能一定程度上促进骨髓间充质干细胞增殖,甚至抑制不利因素引起的凋亡、诱导分化。淫羊藿苷(icariin, ICA)是从温阳补肾药淫羊藿中提取出来的有效成分,也是黄酮醇苷类化合物。实验研究^[14-18]表明,淫羊藿苷具有促进骨髓间充质干细胞增殖和分化、抑制骨髓间充质干细胞细胞凋亡的作用,可对抗不利因素引发的骨髓间充质干细胞损伤。

本课题组前期的体外实验研究^[19]发现,一定浓度的淫羊藿苷可促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,用5-FU造成大鼠骨髓间充质干细胞的损伤,同时给予淫羊藿苷干预后,发现淫羊藿苷对5-FU诱导的大鼠骨髓间充质干细胞凋亡有一定的抑制作用。由此说明,淫羊藿苷对5-FU化疗损伤大鼠骨髓间充质干

细胞具有一定的保护作用,但是该过程的信号转导途径,还有待进一步深入研究。

本研究采用网络药理学的分析方法,筛选淫羊藿苷促进骨髓间充质干细胞增殖和抑制凋亡过程中的特征靶点和分子通路,并结合分子生物学验证实验,初步探寻淫羊藿苷在促进骨髓间充质干细胞增殖和对抗5-FU诱导的凋亡过程中所起的作用及潜在机制,以求更深入地了解淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞的生物学效应,为临床大剂量化疗后骨髓抑制的中药调控和治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学使用的数据库及相关分析平台 中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)^[20](<http://tcmssp.com/tcmssp.php>); CTD(The Comparative Toxicogenomics Database)^[21]数据库(<http://ctdbase.org/>); genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>); uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>); DAVID 6.8 数据库^[22](<https://david.ncifcrf.gov/>); STRING 11.0 数据库(<https://string-db.org/>); Cytoscape 3.8.2 分析软件。

1.2 动物 SD大鼠,雄性,SPF级,4周龄,体质量(100 $\pm$ 20)g,购自广州中医药大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(粤)2018-0085。购入后直接用于取材,进行原代骨髓间充质干细胞(BMSCs)培养。本研究所涉及的动物实验部分均符合动物伦理委员会的准则。

1.3 药物试剂 淫羊藿苷,纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司,批号:B21576;5-FU,纯度>98%,中国 Solarbio 公司,批号:1126A023;SD大

鼠骨髓间充质干细胞专用培养基, 美国 Cyagen 公司, 批号: T161122G001; 胰蛋白酶, 美国 Gibco 公司, 批号: 19521H12; LY294002, 美国 MedChemExpress 公司, 批号: HY-10108; 兔多克隆抗体 CyclinD1、p-Akt (Ser473)、p-GSK3 β (Ser9), 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为: 2978T、9271T、5558T; 兔多克隆抗体 Bcl-2、兔单克隆抗体 Bax 以及 GAPDH, 购自英国 abcam 公司, 批号分别为 ab194583、ab32503、ab181602; 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0018S。其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器 VS-1300-u 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; HF100 二氧化碳培养箱, 力康上海有限公司; AE2000 倒置显微镜, 厦门麦克奥迪实业有限公司; XB120A-SCS 分析天平, 瑞士 Precisa 公司; 1658033 小型垂直电泳转印系统, 美国伯乐 Bio-Rad 公司, GR60DA 全自动高压蒸汽灭菌锅, 致微(厦门)仪器有限公司; TS-1000 多用脱色摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; ES125SW 电子分析天平, 瑞士 Precisa 公司。

1.5 淫羊藿苷潜在作用靶点的收集与筛选 淫羊藿苷的结构式、口服生物利用度(OB)、药物相似度(DL)、血脑屏障(BBB)等药代动力学特性数据来自 TCMS 数据库与分析平台。以“icariin”为关键词, 通过 CTD 和 GeneCards 两个数据库检索淫羊藿苷的潜在作用靶点, 取交集并删除重复项之后, 建立淫羊藿苷的靶点数据库。

1.6 GO 富集分析筛选关键靶点 利用 DAVID 6.8 对淫羊藿苷靶点进行 GO 富集分析, 得出淫羊藿苷靶点参与的生物学过程(Biological Process, BP), 并分析、整理、收集与正向调控细胞增殖、负向调控细胞凋亡有关的生物学过程中的关键靶点。

1.7 关键靶点的互作网络(PPI)构建 将“2.2”获得的关键靶点上传到在线蛋白相互作用分析数据库 STRING 11.0 中, 将靶点间最低联系分数设置为 0.4 分, 选择物种“Rattus norvegicus”, 将无关联的靶点隐藏, 即可获得关键靶点蛋白的相互作用关系; 然后结合运用 Cytoscape 3.8.2 软件对关键靶点蛋白互作网络进行美化编辑, 即可获得优美清晰的 PPI 图; 同时在“Analysis”菜单下载 KEGG 通路富集分析结果, 综合分析以发现淫羊藿苷发挥作用的信号传导通路。

1.8 骨髓间充质干细胞的取材、分离培养及纯化 参

照相关文献方法^[23], 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞。脱颈处死 SD 大鼠, 无菌条件下取出大鼠双侧股骨和胫骨, 剔除肌肉及结缔组织, 放置于含 1% 双抗培养基的培养皿中, 转入细胞房超净工作台。剪断骨髓末端, 露出骨髓腔, 用基础培养液不断冲洗骨髓腔, 直至骨髓被全部冲出。收集冲洗液, 反复吹打均匀后于 4℃、800 $\times g$ 离心 8 min; 弃上清, 沉淀加入完全培养液, 重悬后转移至培养瓶中; 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 观察细胞状态并换液; 之后每 2 d 换 1 次液。当细胞生长融合达 80%~90% 时, 胰酶消化, 1:2 传代。

1.9 实验分组及给药 根据随机对照原则分为 4 组: ①空白对照组(Control): 无特殊处理。②模型组(单用 5-FU 组): 5-FU 的质量浓度为 $2.5 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (5-FU 对大鼠骨髓间充质干细胞的 IC₅₀ 值), 使用生理盐水溶解稀释。③5-FU+淫羊藿苷组(5-FU 与淫羊藿苷共同作用组): 淫羊藿苷终浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 先用 DMSO 溶解至 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 再用培养基稀释至终浓度。④5-FU+淫羊藿苷+LY294002 组(5-FU、淫羊藿苷与 LY294002 共同作用组): LY294002 终浓度 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用 PBS 缓冲液溶解。

1.10 蛋白免疫印迹检测 p-Akt、p-GSK3 β 、CyclinD1、Bcl-2、Bax 蛋白水平 将细胞接种到六孔板里, 培养过夜, 待细胞密度融合约为 80% 左右时, 依据所需终浓度对每组细胞进行给药。加药处理细胞 48 h 以后, 吸掉废液, 用 PBS 清洗 3 遍, 用胰蛋白酶将贴壁细胞进行消化后收集, 将裂解液加入细胞中进行细胞裂解, 提取蛋白进行蛋白质浓度测定。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样品, 按浓度算好上样所需体积, 每个样品上样 30 μg 。80 V 恒压, 跑 40 min 左右, 看到预染 Marker 开始分离, 溴酚蓝跑至分离胶, 调电压至 120 V, 溴酚蓝到达胶的底部, 停止电泳, 关闭电源, 取出凝胶, 并将其转移到 PVDF 膜上。用 TBST 漂洗 PVDF 膜 5 min 左右, 放入封闭液中, 于摇床上室温封闭 2 h; 将 PVDF 膜分别放入装有 3 mL 稀释好一抗(稀释比例 1:1 000)的小盒子中, 置于 4℃ 冰箱孵育过夜。TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min; 将 PVDF 膜放入含有 3 mL 二抗(1:1 000 稀释)的小槽内, 置于摇床上室温平缓摇动 1 h; TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 使用 ECL 化学发光法, 将试剂盒 A 和 B 两种试剂 1:1 等体积混合; 5 min 后, 于化学发光仪上曝光。使用 ImageJ 测量蛋白质条带的灰度值以进行

半定量分析。蛋白质的相对表达由目标蛋白质光密度值/内参蛋白光密度值表示。

1.11 统计学处理方法 应用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对实验结果进行统计分析, 实验结果均使用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿苷的药代动力学特性以及潜在作用靶点的收集和筛选 在 TCMS 中输入淫羊藿苷的 CAS 号: 489-32-7, 收集淫羊藿苷的药代动力学相关数据, 包括 MW=676.73, OB(%)=41.58, DL=0.61, BBB=-3.00, 结果淫羊藿苷的 OB 值为 41.58%, 大于 30%。淫羊藿苷结构信息如图 1 所示。以“icariin”为关键词, 在 CTD 检索到 98 个靶点, 在 GeneCards 数据库搜索到 41 个靶点, 取并集之后, 去除重复以及不规范的靶点, 最终共获得潜在作用靶点 83 个。

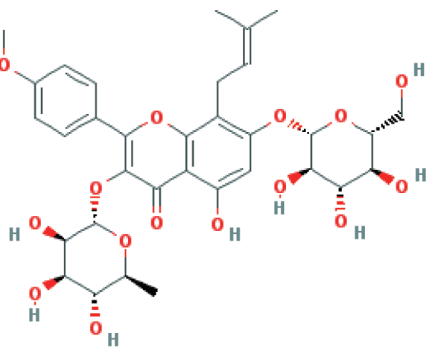


图 1 淫羊藿苷(ICA)的结构式

Figure 1 The structure of ICA

2.2 GO 功能富集分析以及关键靶点收集筛选 将“2.1”项获得的 83 个潜在作用靶点输入 DAVID 6.8, 对淫羊藿苷靶点进行 GO 富集分析, 得出淫羊藿苷靶点参与的生物学过程(Biological Process, BP)共 618 条, 按照 P 值从小到大的顺序, 取前 20 条富集结果进行分析, 采用 R 语言将前 20 条富集结果绘制可视化气泡图(见图 2)。结合本课题组前期研究^[19]结果, 一定浓度的淫羊藿苷可促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖, 并抑制 5-FU 诱导的凋亡, 所以收集这 20 条富集结果中“positive regulation of cell proliferation”以及“negative regulation of apoptotic process”两条生物学过程包含的靶点, 取并集去除重复基因, 得到 29 个关键靶点。

2.3 关键靶点蛋白相互作用网络 PPI 图及分析 将“2.2”项下 29 个靶点导入到 STRING 数据库后, 结

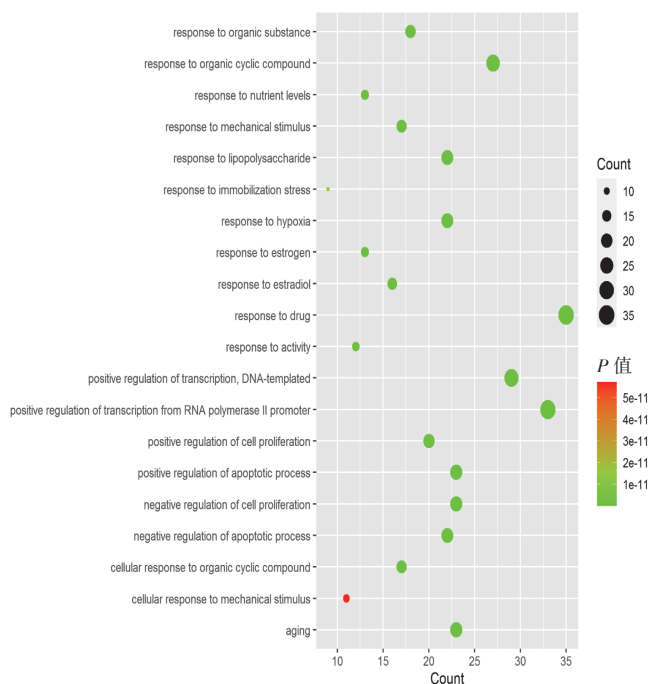


图 2 淫羊藿苷(ICA)潜在作用靶点参与的生物学过程(前 20 位)

Figure 2 Biological processes enrichment analysis involved in potential targets of ICA(top20)

合使用 Cytoscape 3.8.2 软件, 即可获得如图 3 所示的蛋白互作网络图。同时关键靶点导入到 STRING 数据库后, 在 STRING 数据库下的“Analysis”下载 KEGG 通路富集分析结果, 共得到 139 条通路, 按照 FDR 值从小到大排序, 其前 20 条主要通路见图 4。通过 KEGG 数据分析, 具有重要作用的为 PI3K-Akt 通路、HIF-1 信号通路以及 FoxO 信号通路。有研究^[24]表明, 肾上腺髓质素对缺氧和血清剥夺诱导产生的骨髓间充质干细胞凋亡有抑制作用, 这种保护作用是通过 Akt/GSK3 β 信号通路介导的。前期我们的研

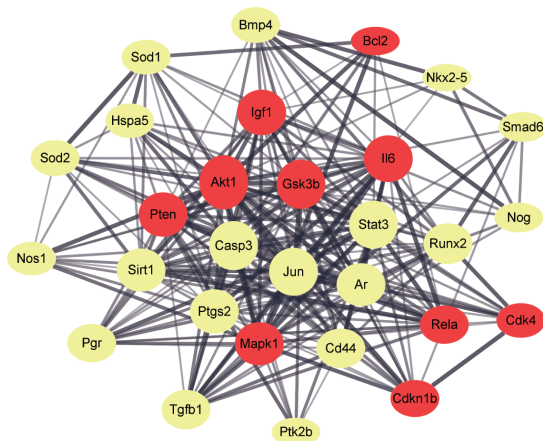


图 3 淫羊藿苷(ICA)关键靶点蛋白相互作用的 PPI 网络

Figure 3 PPI network of ICA key targets

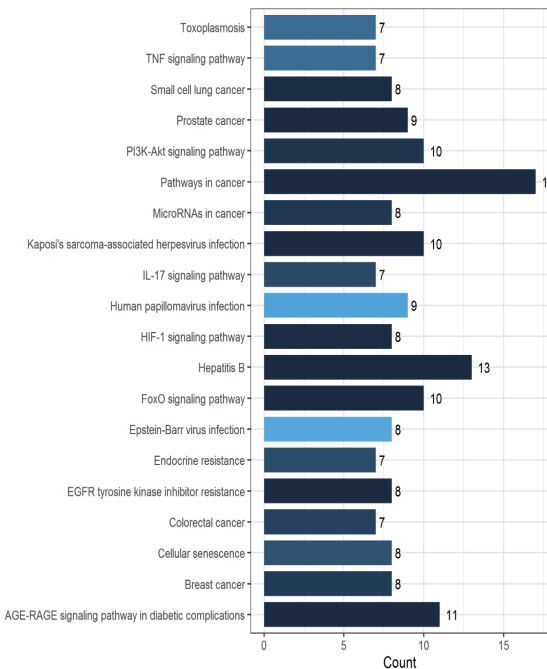


图 4 淫羊藿苷(ICA)关键靶点 KEGG 信号通路富集结果 (前 20 位)

Figure 4 Top 20 pathways for enrichment analysis of ICA key targets (top20)

究^[19]结果显示淫羊藿苷对 5-FU 诱导的大鼠骨髓间充质干细胞凋亡有一定的抑制作用。结合网络药理学分析结果, 我们初步推测淫羊藿苷可能通过调节 Akt/GSK3 β /CyclinD1 信号通路促进骨髓间充质干细胞增殖, 抑制凋亡, 拮抗 5-FU 所致损伤。基于 KEGG 富集分析结果, 建立了核心作用通路的可视化通路网络图, 见图 5。

2.4 骨髓间充质干细胞的形态观察 在本实验中, 根据干细胞的生长特性, 采用全骨髓培养法分离纯化骨髓间充质干细胞。取材获得的原代细胞以球形悬浮在培养基中, 并与一些杂质细胞(如血细胞)等混合在一起。培养 24 h 后, 可以看到部分成长梭形的成纤维形状细胞黏附在培养瓶壁上, 用 PBS 冲洗掉不贴壁的细胞。继续培养 3 d 后, 分布不均匀的纺锤形或长梭形贴壁细胞明显增加, 形成了多个增殖簇。7~12 d 后, 细长的纺锤形细胞长满了培养瓶的底部, 此时可以进行传代培养。

2.5 各组给药处理 48 h 后细胞状态 由图 6 可知, 与空白对照组比较, 模型组细胞生存状态明显变

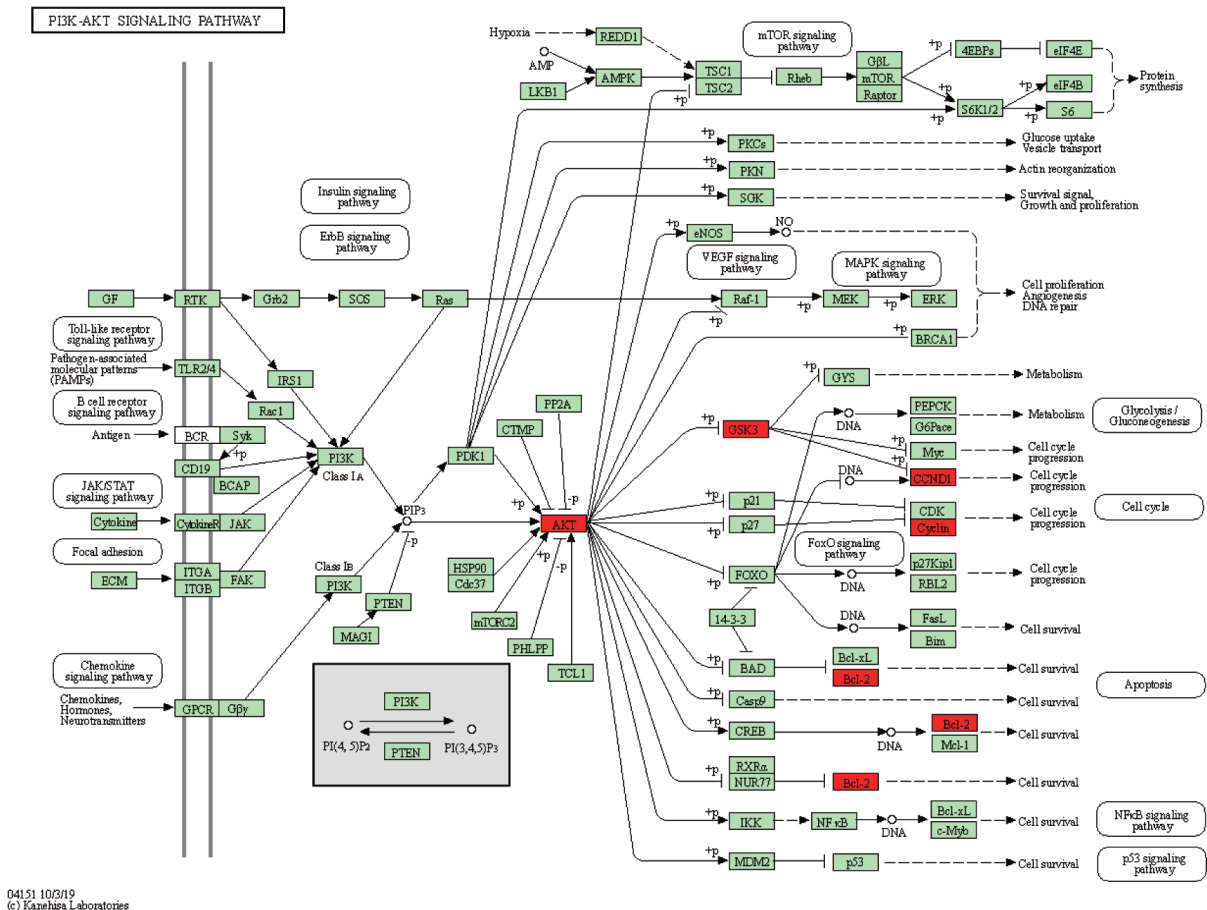


图 5 PI3K-Akt 核心作用通路的可视化通路网络图

Figure 5 Visualization Chart of PI3K-Akt core signaling pathway

差,细胞形态改变,数目减少。与模型组比较,5-FU+淫羊藿苷组细胞状态相对较好,说明淫羊藿苷对5-FU导致的骨髓间充质干细胞增殖抑制有一定的

拮抗作用,可保护骨髓间充质干细胞,5-FU+淫羊藿苷+LY294002组,细胞状态与模型组状态相仿,数目减少,形态改变。

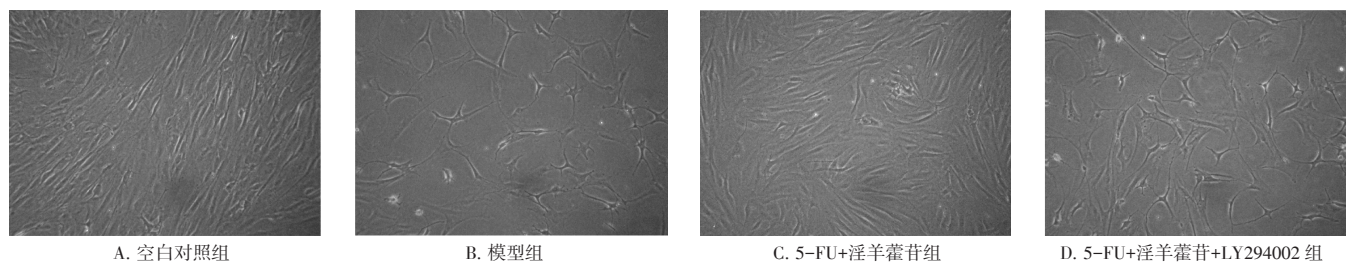


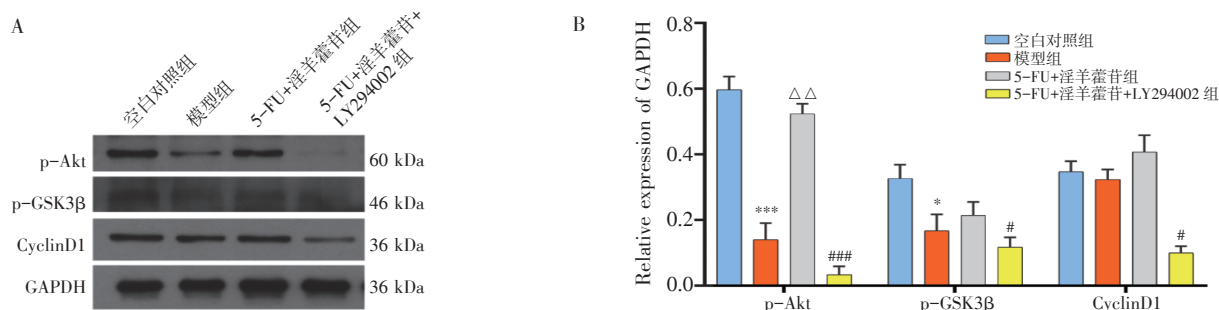
图6 加药处理48 h后各组的细胞状态(×200)

Figure 6 Cell morphology of each group after 48 h treatment(×200)

2.6 淫羊藿苷对Akt/GSK3 β /CyclinD1信号通路及

凋亡相关蛋白表达的调控作用 据报道^[25], Akt/GSK3 β /CyclinD1途径对促进细胞的存活是很重要的。因此,本研究通过蛋白质印迹分析研究了该途径是否可介导骨髓间充质干细胞中淫羊藿苷的抗凋亡作用。如图7所示,与空白对照组比较,模型组中p-Akt($P<0.001$)、p-GSK3 β ($P<0.05$)蛋白表达量明显降低; CyclinD1蛋白表达量有一定程度降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比

较,当淫羊藿苷与5-FU共孵育时, Akt的磷酸化和细胞增殖增加($P<0.01$),同时淫羊藿苷也促进了GSK3 β 的磷酸化以及CyclinD1的表达,但差异无统计学意义($P>0.05$);然而,当加入抑制剂LY294002后, Akt磷酸化被明显抑制($P<0.001$), GSK3 β 磷酸化水平以及CyclinD1表达呈现明显下降($P<0.05$)。LY294002阻断了淫羊藿苷对大鼠骨髓间充质干细胞p-Akt表达水平和增殖的影响。



注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与5-Fu+淫羊藿苷组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图7 淫羊藿苷(ICA)对5-FU诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)损伤后Akt/GSK3 β /CyclinD1途径相关蛋白(p-Akt, p-GSK3 β 和CyclinD1)表达水平的影响

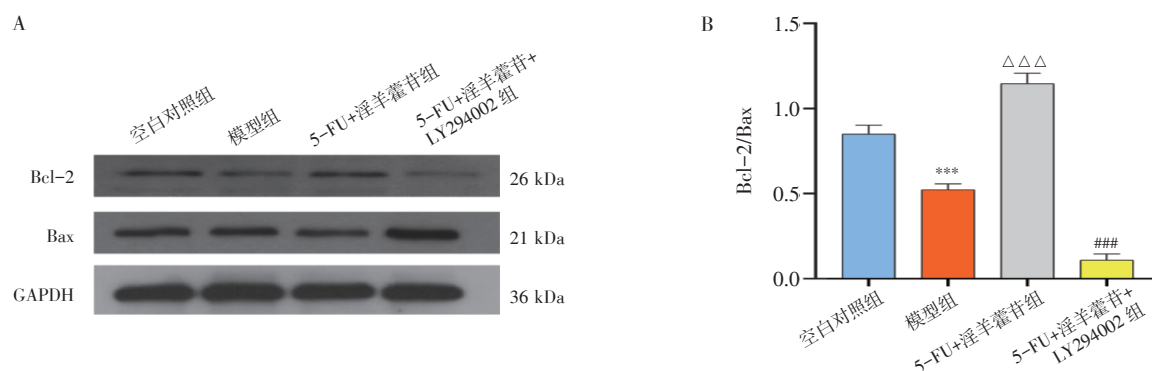
Figure 7 Effect of ICA on the expression levels of Akt/GSK3 β /CyclinD1 pathway related proteins(p-Akt, p-GSK3 β and CyclinD1) after 5-FU-induced damage of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Bcl-2家族成员是线粒体介导凋亡的重要调控因子,并被分类为抗凋亡蛋白(例如Bcl-2)和促凋亡蛋白(例如Bax)^[26]。Bcl-2/Bax比值常用于确定细胞凋亡的程度^[27],因此,本研究检测了Bcl-2和Bax的蛋白质表达水平,见图8。本实验结果表明,与空白对照组比较,模型组骨髓间充质干细胞被5-FU诱导处理后, Bcl-2表达减少, Bcl-2/Bax比值降低($P<0.001$);当加入淫羊藿苷与5-FU共孵育处理后 Bcl-2表达增加, Bax表达减少, Bcl-2/Bax比值明显增加($P<$

0.001);而当加入LY294002抑制剂后,凋亡被激活,淫羊藿苷的作用被拮抗阻断, Bax表达明显增加, Bcl-2/Bax比值降低($P<0.001$),各组之间差异均有统计学意义。

3 讨论

网络药理学^[28]是基于系统生物学理论和生物系统网络分析来设计药物的一门学科,它是以生物医学数据库为处理对象,并通过其独特的研究方法比如



注：与空白对照组比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与 5-FU+淫羊藿苷组比较，### $P < 0.001$

图 8 淫羊藿苷(ICA)对 5-FU 诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)损伤后凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达水平的影响

Figure 8 The effect of ICA on the expression levels of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax after 5-FU-induced damage of rat bone marrow mesenchymal stem cells

文本数据挖掘、网络分析等技术获取药物与靶点之间的相关信息，从而预测和分析药物的作用靶标，阐明药物作用机制。本研究利用网络药理学方法，借助相关生物医学数据库和分析软件对淫羊藿苷(ICA)的靶点进行收集分析，并对其在促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)增殖和对抗 5-FU 诱导的凋亡过程中所起的作用及潜在机制进行了研究。通过搜索 CTD 和 GeneCards 数据库，获得了潜在作用靶点 83 个，将这些靶点进行 GO 富集分析以及进一步的筛选收集得到 29 个关键靶点，将关键靶点绘成网络 PPI 图及行 KEGG 通路分析，得出 PI3K-Akt 核心作用通路。

Akt 是一种丝氨酸-苏氨酸激酶，据报道^[29]其可充当强大的存活信号，发挥抗凋亡作用并促进细胞存活。GSK3 β 是 Akt 的重要下游信号蛋白激酶，GSK3 β 在 serine9 处被 Akt 磷酸化导致其活性受到抑制并减少凋亡^[30-31]。已有报道^[32]表明 GSK3 β 使 CyclinD1 磷酸化，而 Akt 使 GSK3 β 失活，从而导致 CyclinD1 表达增加并正向调节，促进细胞周期进程。基于本课题组前期的体外实验研究^[19]发现以及网络药理学分析结果，我们假设淫羊藿苷可通过 Akt/GSK3 β /CyclinD1 途径对 5-FU 诱导损伤条件下的骨髓间充质干细胞发挥保护作用。

为验证假设，本研究通过蛋白质印迹检测了 Akt 和 GSK3 β 的磷酸化水平以及 CyclinD1 的表达，结果表明：5-FU 诱导了骨髓间充质干细胞的凋亡并降低了 p-Akt、p-GSK3 β 水平和 CyclinD1 的表达，而用淫羊藿苷共处理提高了 p-Akt 和 p-GSK3 β 及 CyclinD1 的表达水平。然而，加入抑制剂 LY294002 抑制 Akt 的磷酸化后，阻断了淫羊藿苷对细胞增殖和 p-Akt 水平的影响，同时导致 p-GSK3 β 和 CyclinD1

的表达也降低。目前的结果表明淫羊藿苷促进了 Akt 和 GSK3 β 的磷酸化，进而增加 CyclinD1 的表达，从而诱导 G1/S 期转变，加速细胞周期的进展，促进骨髓间充质干细胞增殖，保护骨髓间充质干细胞免受 5-FU 诱导的细胞凋亡。此外，据报道^[33-34]，Bcl-2 家族蛋白与 Akt/GSK3 β 有关，p-Akt 和 p-GSK3 β 上调 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达，并增加 Bcl-2/Bax 的比值。因此，本研究进一步检验了 Bcl-2 途径是否也参与了淫羊藿苷的抗凋亡活性。

目前的结果表明，5-FU 可诱导减少 Bcl-2 蛋白表达并使得 Bcl-2/Bax 值降低。淫羊藿苷可以在此基础条件下增加 Bcl-2 蛋白的表达，使得 Bcl-2/Bax 比值升高。由此可见，淫羊藿苷使得 Akt 和 GSK3 β 的磷酸化水平提高，Bcl-2/Bax 的比值增加，抗凋亡活性增强，极大地拮抗了 5-FU 诱导骨髓间充质干细胞凋亡。总而言之，本研究表明淫羊藿苷对 5-FU 所致大鼠骨髓间充质干细胞凋亡抑制作用有可能是通过 Akt/GSK3 β /CyclinD1 信号通路以及 Bcl-2 途径介导的。

[致谢：广州中医药大学中西医结合基础研究中心(广东省普通高校中医治法与治则研究重点实验室)对本研究提供了帮助，特此感谢!]

参考文献：

- [1] LONGLEY D B, HARKIN D P, JOHNSTON P G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 330-338.
- [2] CHANG C T, HO T Y, LIN H, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and *in vivo* bioluminescence imaging[J]. Plos One, 2012, 7 (3): e31808.

- [3] ZHANG S, LIU Y, XIANG D, et al. Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 910-916.
- [4] POLK A, VISTISEN K, VAAGE-NILSEN M, et al. a systematic review of the pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2014, 15: 47.
- [5] ZAMORANO J L, LANCELLOTTI P, RODRIGUEZ M D, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for practice guidelines: the task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the european society of cardiology (ESC)[J]. Eur Heart J, 2016, 37(36): 2768-2801.
- [6] GAMELIN E, BOISDRON-CELLE M, GUERIN-MEYER V, et al. Correlation between uracil and dihydrouracil plasma ratio, fluorouracil (5-FU) pharmacokinetic parameters, and tolerance in patients with advanced colorectal cancer: a potential interest for predicting 5-FU toxicity and determining optimal 5-fu dosage[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(4): 1105.
- [7] JUSTINO P F, MELO L F, NOGUEIRA A F, et al. Treatment with *saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice[J]. Br J Nutr, 2014, 111(9): 1611-1621.
- [8] OHISHI M, SCHIPANI E. Bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2010, 109(2): 277-282.
- [9] 李庆双, 郑关毅, 张碧琴, 等. 毛冬青甲素对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及迁移的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(3): 358-364.
- [10] 王力, 吴鑫, 卢新政, 等. 人参皂苷Rg1对培养大鼠骨髓间充质干细胞增殖影响的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2007, (11): 1480-1484.
- [11] 方健康, 周轶平, 李玛琳. 中药对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及分化的影响研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2834-2837.
- [12] 刁远明, 张小年, 周贤熙, 等. 新橙皮苷对化疗损伤骨髓间充质干细胞的保护作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 731-737.
- [13] 胡琦. 基于PI3K-Akt-FoxO信号通路探讨四物汤调节骨髓基质细胞增殖和凋亡的机制[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018: 95.
- [14] 陈花英, 周娟, 吴焕成, 等. 淫羊藿苷对高糖环境下骨髓间充质干细胞凋亡及成骨分化的影响[J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45(4): 37-42.
- [15] 李琦, 孙贵才. 淫羊藿苷对骨髓间充质干细胞铁死亡及向心肌样细胞分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 1988-1992.
- [16] 杨智洋. 淫羊藿苷联合四环素对糖皮质激素诱导的大鼠骨髓间充质干细胞损害的保护作用[D]. 锦州: 辽宁医学院, 2012: 46.
- [17] 翟远坤, 王鸣刚, 李志忠, 等. 淫羊藿苷含药血清对体外培养骨髓间充质干细胞增殖及成骨性分化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2): 480-484.
- [18] 张芳, 闫海洋, 陈旭义, 等. 淫羊藿苷对微重力下骨髓间充质干细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(1): 10-13.
- [19] 张小年, 张洁文, 吴绍锋, 等. 淫羊藿苷对5-氟尿嘧啶诱导的大鼠骨髓间充质干细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 675-681.
- [20] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [21] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. The comparative toxicogenomics database: update 2017[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D972-D978.
- [22] DENNIS G J, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. Genome Biol, 2003, 4(5): 3.
- [23] 曹华, 高建华, 刘小龙, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离鉴定方法及生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9): 1357-1361.
- [24] SI H, ZHANG Y, SONG Y, et al. Overexpression of adrenomedullin protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis via the Akt/GSK3beta and Bcl2 signaling pathways[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(6): 3342-3352.
- [25] SHIMURA T. Acquired Radioresistance of cancer and the AKT/GSK3beta/cyclin D1 overexpression cycle[J]. J Radiat Res, 2011, 52(5): 539-544.
- [26] CVEJIC D, SELEMETJEV S, SAVIN S, et al. Changes in the balance between proliferation and apoptosis during the progression of malignancy in thyroid tumours[J]. Eur J Histochem, 2009, 53(2): e8.
- [27] MAHDAVI S, KHODARAHMI P, ROODBARI N H. Effects of cadmium on Bcl-2/ Bax expression ratio in rat cortex brain and hippocampus[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(3): 321-328.
- [28] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [29] LIAO Y, HUNG M C. Physiological regulation of Akt activity and stability[J]. Am J Transl Res, 2010, 2(1): 19-42.
- [30] CHEN L, ZHANG Y, SUN X, et al. Synthetic resveratrol aliphatic acid inhibits TLR2-mediated apoptosis and an involvement of Akt/GSK3beta pathway[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(13): 4378-4382.
- [31] LIN J X, XIE X S, WENG X F, et al. Overexpression of IC53d promotes the proliferation of gastric cancer cells by activating the AKT/GSK3beta/cyclin D1 signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2019, 41(5): 2739-2752.
- [32] LIU L, ZHANG H, SHI L, et al. Inhibition of rac1 activity induces G1/S phase arrest through the GSK3/cyclinD1 pathway in human cancer cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1395-1400.
- [33] KAGA S, ZHAN L, ALTAF E, et al. Glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(1): 138-147.
- [34] LINSEMAN D A, BUTTS B D, PRECHT T A, et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis[J]. J Neurosci, 2004, 24(44): 9993-10002.

(编辑: 修春)