

网络药理学及单细胞测序技术对山竹醇抗乳腺癌 潜在通路及上皮细胞亚群关联分析

张文龙, 刘金虹, 姚慧, 胡忆榕, 胡鑫*

(中南民族大学 药学院, 湖北 武汉, 430074)

摘要 为探究山竹醇抗乳腺癌的作用机制及对上皮细胞亚群的靶向关联特征, 通过网络药理学筛选山竹醇潜在靶点 283 个及乳腺癌相关靶点 4560 个, 获得两者交集靶点 192 个, 构建 PPI 网络并筛选出 TP53、SRC、AKT1 等核心靶点; GO/KEGG 富集分析显示潜在靶点主要集中于癌症通路、MAPK 信号通路等肿瘤相关通路. 分子对接验证山竹醇与潜在靶点具有良好结合活性(结合能 ≤ -5.0 kcal/mol), 其中与 STAT3 的结合能 -8.7 kcal/mol. 细胞实验表明: 山竹醇浓度依赖性抑制两株乳腺癌细胞增殖, 下调 mRNA 转录及翻译后修饰(*p-STAT3*、*p-AKT* 和 *p-SRC*). 单细胞测序分析明确了 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的亚群组成, 筛选出关键上皮细胞亚群, 其潜在靶向通路和网络药理学预测的通路高度匹配. 交集分析发现山竹醇调控 MCF-7(增殖-凋亡)和 MDA-MB-231(侵袭-迁移)恶性表型的潜在基因与通路. 研究揭示了山竹醇抗乳腺癌的特异性调控机制, 为乳腺癌个体化治疗及山竹醇的临床转化提供了理论依据.

关键词 山竹醇; 乳腺癌; 网络药理学; 单细胞测序

中图分类号 R963 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2026)06-0775-13

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260754

Association analysis of core pathways and epithelial cell subsets in garcinol-mediated anti-breast cancer using network pharmacology combined with single-cell RNA sequencing

Zhang Wenlong, Liu Jinhong, Yao Hui, Hu Yirong, Hu Xin*

(College of Pharmaceutical Science, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, Hubei China)

Abstract To investigate the mechanism of action of garcinol against breast cancer and the characteristics of targeted association with epithelial cell subsets, 283 potential targets of garcinol and 4560 targets related to breast cancer were screened by network pharmacology, 192 intersection targets were obtained, PPI network was constructed and core targets such as TP53, SRC, and AKT1 were selected; GO/KEGG enrichment analysis showed that potential targets were mainly concentrated in tumor-related pathways such as pathway signaling in cancer and MAPK pathway. Molecular docking verified that garcinol had good binding activity (binding energy ≤ -5.0 kcal/mol) to potential targets, with binding energy -8.7 kcal/mol to STAT3. Cell experiments showed that garcinol concentration-dependently inhibited the proliferation of two breast cancer cells and down-regulated mRNA transcription and post-translational modifications (*p-STAT3*, *p-AKT* and *p-SRC*). Single-cell sequencing analysis identified the subset composition of MCF-7 and MDA-MB-231 cells and selected key epithelial cell subsets whose potential targeted pathways closely matched those predicted by network pharmacology. Intersection analysis revealed potential genes and pathways involved in the regulation of malignant phenotypes of MCF-7 (proliferation-apoptosis) and MDA-MB-231 (invasion-migration) by garcinol. The study reveals the specific regulatory

收稿日期 2026-01-07

* 通信作者 胡鑫(1977-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 天然产物抗肿瘤代谢机制, E-mail: huxin5540@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81201610); 湖北省自然科学基金资助项目(2023AFB681); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZY17014)

mechanism of garcinol against breast cancer and provides a theoretical basis for individualized treatment of breast cancer and clinical translation of garcinol.

Keywords garcinol; breast cancer; network pharmacology; single-cell sequencing

乳腺癌是女性中发病率极高的恶性肿瘤,临床上不同病理亚型的患者在预后效果和临床治疗响应上存在显著差异,这一现象的核心根源在于真实肿瘤组织中高度的细胞异质性^[1-2].

山竹醇(garcinol)是天然酚类化合物,可通过 JAK2 等通路诱导肿瘤细胞凋亡、抑制细胞增殖,发挥抗乳腺癌作用^[3-4]. 网络药理学作为解析多靶点药物作用机制的关键技术,能够快速构建“药物-靶点-通路”的完整关联网络,为清晰阐明药物的作用模式提供高效且系统的研究手段^[5]. 拟通过该技术筛选山竹醇抗乳腺癌的潜在靶点,明确其作用的关键通路,并通过分子对接结合 qRT-PCR、蛋白质免疫印迹等实验,来初步验证药物作用的分子机制及调控效应.

单细胞测序技术能够精准捕获单个细胞的基因表达特征,清晰识别肿瘤细胞内部的亚群分类,为揭示药物对不同细胞的特异性作用提供了全新研究视角^[6]. 本研究通过单细胞测序探究乳腺癌常用细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞上皮亚群中的信号通路富集关联,明确山竹醇对不同细胞亚群的特异性调控作用,为乳腺癌个体化治疗和山竹醇临床转化提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 山竹醇潜在靶点获取

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, CID: 5281560)获取山竹醇的化学结构(图 1). 限定物种为人类,分别利用 Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/?ref=labworm>, 置信度>0.8)与 PharmMapper(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>, 匹配度>0.7)进行靶点预测. 结果经合并去重,最终获得 283 个潜在作用靶点.

1.1.2 乳腺癌相关靶点获取

以“breast cancer”为关键词,分别检索 GeneCards(<https://www.genecards.org/>, 相关性评分>10)与 OMIM(<https://www.omim.org/>, 筛选致病与易感基因)数据库. 将两者结果合并去重,最终获得乳腺癌疾病

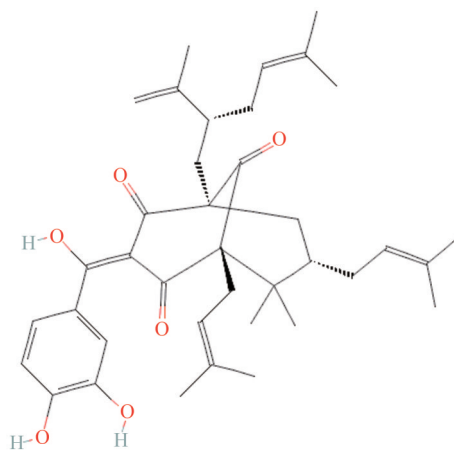


图 1 山竹醇的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of garcinol

相关靶点数据集.

1.1.3 交集靶点筛选与 PPI 网络构建

利用 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)获取山竹醇与乳腺癌的交集靶点. 导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>, 限定人类且置信度>0.9)构建蛋白相互作用(PPI)网络并剔除孤立基因. Cytoscape 3.9.1 及其 Network Analyzer 插件进行可视化与拓扑参数计算.

1.1.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将交集靶点导入 Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html>, 设定 $P<0.05$ 且 $FDR<0.05$), 进行 GO 与 KEGG 通路富集分析. 结果通过网站 <https://www.bioinformatics.com.cn/> 可视化.

1.2 分子对接验证

从 RCSB PDB(<https://www.rcsb.org/>)获取蛋白结构,经 PyMOL2.5 处理保留活性域;同时从 PubChem 获取山竹醇的 3D 结构(SDF 格式),利用 ChemDraw 20.0 进行能量最小化与氢键修复. 随后,通过 AutoDock Tools 1.5.6 对蛋白与配体进行加氢和电荷分配等预处理,并导入 AutoDock Vina 1.2.0 执行分子对接并可视化.

1.3 单细胞测序与数据分析

从 GEO 数据库获取乳腺癌细胞系 MCF-7 (GSM6212012、GSM7789998)与 MDA-MB-231(GSM-8839788、GSM8839796)的 scRNA-seq 数据. 利用 R 包 Seurat 构建对象并执行质控(线粒体占比<20%, $500<nFeature<5000$, $3000<nCount<30000$), 经

scDblFinder 剔除双细胞后获得高质量表达矩阵. 随后,采用 Harmony 算法校正批次效应,并基于高变基因进行 PCA 与 tSNE 降维聚类. 结合 E-cadherin、CK18 等标志物筛选出纯化的上皮细胞亚群. 采用 FindAllMarkers 函数 ($|\log_2FC| \geq 1$, $P < 0.05$, min. pct = 0.25) 提取差异基因,依托 clusterProfiler 包完成 KEGG 富集分析. 最后,将上述结果与网络药理学核心网络进行关联,对比分析两株细胞上皮亚群的作用共性与特异性.

1.4 细胞实验

1.4.1 原料试剂

DMEM 高糖培养基(美国 Gibco)、青-链霉素与 RNase-free ddH₂O(美国赛默飞);胎牛血清(四季青);DMSO(阿拉丁);细胞表型及蛋白检测试剂(CCK-8、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、ECL 显影液等)购自碧云天;核心抗体(β -Actin、AKT1、STAT3、SRC)及 Marker 购自武汉爱博泰克;凝胶制备及缓冲液购自上海雅酶;PVDF 膜购自杭州科百特. 逆转录与 qPCR 检测试剂盒购自北京金沙.

1.4.2 CCK8 实验筛选山竹醇最佳给药浓度

将对数生长期细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板(100 μ L/孔),培养 24 h 至贴壁. 随后加入不同浓度的山竹醇(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μ M),每组设 3 个复孔. 给药孵育 48 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂避光孵育 2 h,利用酶标仪检测 450 nm 处

吸光度(OD 值). 通过 GraphPad Prism 9.0 计算细胞存活率,筛选出无明显细胞毒性且呈浓度依赖的 3 个给药浓度,用于后续 Western Blot 与 qRT-PCR 实验.

1.4.3 蛋白免疫印迹实验检测关键蛋白表达水平

以筛选出的不同浓度山竹醇分别干预 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 48 h. 收集细胞后,RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min(4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min 离心 15 min)提取总蛋白. 经 BCA 法定量并加入 5 $\times$ Loading Buffer 煮沸变性后,SDS-PAGE 电泳分离及湿法转膜. 将膜于室温快速封闭 20 min,依次与对应一抗(4 $^{\circ}$ C 过夜)及荧光二抗(室温 2 h)孵育,期间以 TBST 充分洗膜. 最后经 ECL 显影,利用 ImageJ 软件量化蛋白条带灰度值.

1.4.4 qRT-PCR 实验检测关键基因 mRNA 表达

以相同给药条件干预 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞后,提取总 RNA 并经 Nanodrop 2000 质检(A_{260}/A_{280} 介于 1.8~2.0),随后逆转录合成 cDNA. 针对 Degree 值排名前十的核心基因及内参 GAPDH 设计特异性引物(表 1),采用 SYBR Green 法在 20 μ L 体系下进行 qRT-PCR 扩增. 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;并辅以熔解曲线分析. 最终利用 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 法计算目的基因的相对 mRNA 表达量.

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

Gene	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
TP53	TGTGACTTGACGTA CTCCC	ACCATCGCTATCTGAGCAGC
SRC	ACATCCCCAGCAACTACGTG	CAGTAGGCACCTTTTCGTGGT
AKT1	CAGGATGTGGACCAACGTGA	TCTCCTCCTCCTCCTGCTTC
JUN	AACAGGTGGCACAGCTTAAAC	CAACTGCTGCCGTTAGCATGAG
EP300	ACCAGGAATGACTTCTAGTTTGA	TGGAAGGCTGTTGCATACGA
MAPK3	CTCTGCCCTCCAAGACCAAG	GACTGGCCACCTCATCC
STAT3	CAGCAGCTTGACACACGGTA	AAACACCAAAGTGCCATGTGA
MAPK1	TACACCAACCTCTCGTACATCG	CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT
RELA	CCCCTTCCAAGAAGAGCAGC	AGATCTTGAGCTCGGCAGTG
PIK3R1	TGGACGGCGAAGTAAAGCAT	AGCCATAGCCAGTTGCTGTT

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 交集靶点

通过数据库筛选共获得山竹醇作用靶点 283

个,乳腺癌相关靶点 4560 个. 取两者交集,最终获得山竹醇抗乳腺癌的共同靶点 192 个(图 2).

2.1.2 山竹醇与乳腺癌交集靶点的 PPI 网络构建

将 192 个靶点导入 STRING 数据库进行可视化分析,并建立 PPI 网络(图 3). 再将 PPI 网络的节点导入

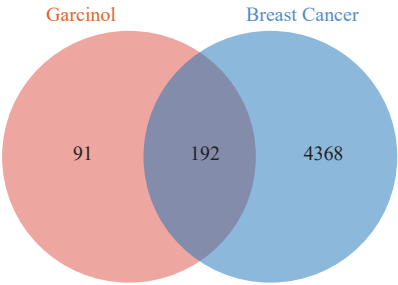


图2 山竹醇-乳腺癌交集靶点韦恩图

Fig. 2 Garcinol-breast cancer intersection targets venn diagram

Cytoscape3.9.1软件中进行核心网络的构建(图4(a)),按照degree值从大到小排列进行排列(图4(b)).

2.1.3 潜在靶向基因GO功能与KEGG通路富集分析

GO分析中:生物过程层面,潜在靶向基因主要集中在细胞对含氮化合物的响应、蛋白质磷酸化的正向调节、MAPK 级联激活的正向调节等,提示潜在靶向基因主要参与乳腺癌细胞增殖、恶性活化相关的信号转导^[7-9];细胞组分层面主要分布于细胞信号

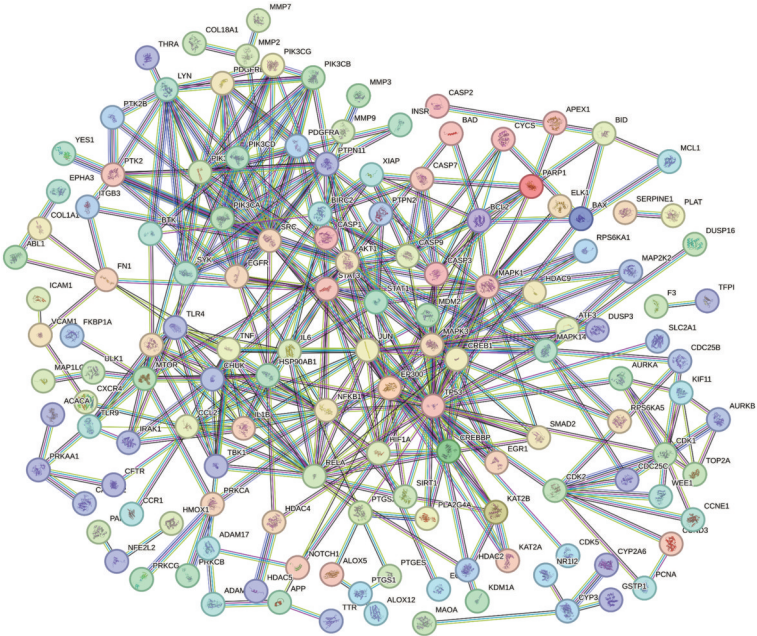
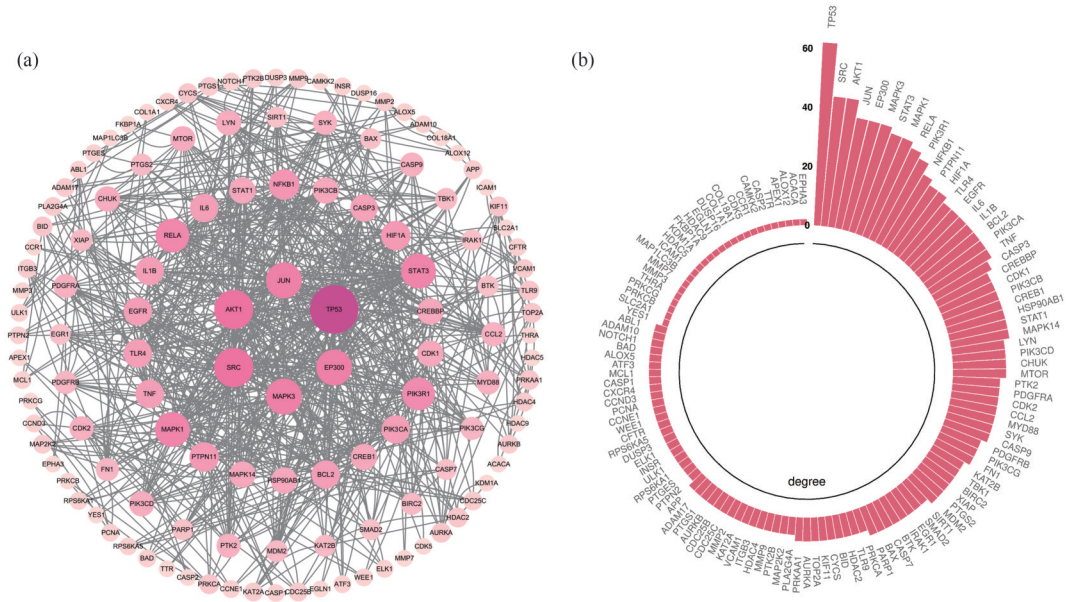


图3 山竹醇抗乳腺癌核心基因的蛋白-蛋白互作网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network of core genes for garcinol against breast cancer



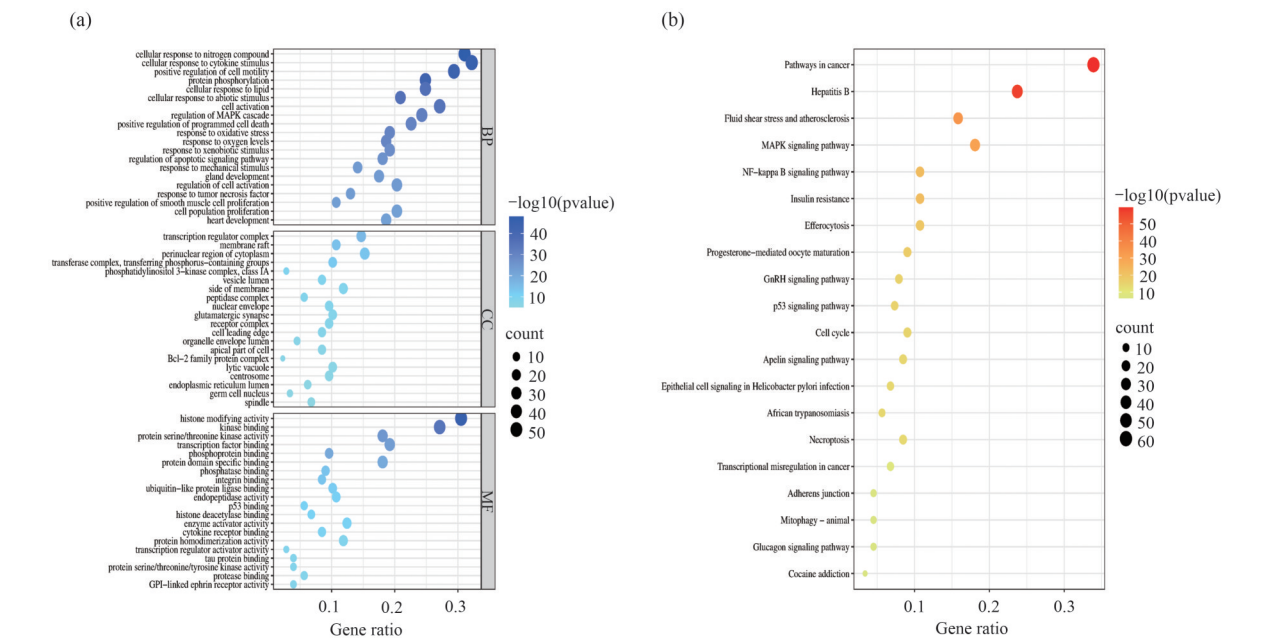
(a) 核心靶点与关联通路的环形互作网络;(b) 核心基因的连接度(degree)分布弦图

图4 山竹醇抗乳腺癌核心靶点分析图

Fig. 4 Core target analysis of garcinol in breast cancer

调控相关分子,为信号通路调控提供结构基础^[10],集中于细胞质核周区、磷脂酰肌醇-3-激酶复合物等;分子功能层面,调控乳腺癌细胞基因表达、胞内信号传

递的关键功能载体^[11](图 5(a))等基因富集于组蛋白修饰活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶结合等。



气泡横坐标为基因占比(gene ratio),纵坐标为GO富集条目或KEGG通路,颜色深度代表富集显著性(-log10(p.adjust)),气泡大小代表核心基因数量;富集筛选标准为校正后 $P<0.05$,基因占比gene ratio >0.1 。

(a)抗乳腺癌核心基因GO功能富集分析;(b)抗乳腺癌核心基因KEGG通路富集分析

图5 山竹醇-乳腺癌靶点GO功能与KEGG通路富集分析图

Fig. 5 Garcinol-breast cancer targets GO function and KEGG pathway enrichment analysis

KEGG分析中:潜在靶向基因集中于与乳腺癌发生发展、增殖、侵袭及炎症微环境相关信号通路:癌症通路、MAPK信号通路、NF- κ B信号通路等,是山竹醇发挥药效关键靶点;此外还有参与乳腺癌细胞周期进程、基因组稳定性维持及细胞黏附调控,协同调控肿瘤细胞恶性表型^[12-14](图 5(b)):细胞周期、p53信号通路、黏附连接等上述筛选到的基因有望成为山竹醇精准调控乳腺癌细胞恶性表型的作用靶点。

2.2 分子对接可视化

将PPI网络中Degree值排名前十的核心靶点(TP53、SRC等)与山竹醇进行分子对接分析.最小结合能计算结果(表2)提示,山竹醇与这些核心靶点均具有较强的结合亲和力.图6对其中结合能最低四个靶点(STAT3、MAPK3、EP300和PIK3R1)的分子对接模式进行了三维可视化展示。

2.3 山竹醇对乳腺癌细胞的增殖抑制及核心靶点的表达调控

2.3.1 CCK8实验检测药物对细胞毒性

MCF-7和MDA-MB-231细胞存活率均在给药 $>1.6\mu\text{M}$ 和 $>3.2\mu\text{M}$ 时显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.001$)

表2 山竹醇与Degree值前十的核心靶点的分子对接结合能表

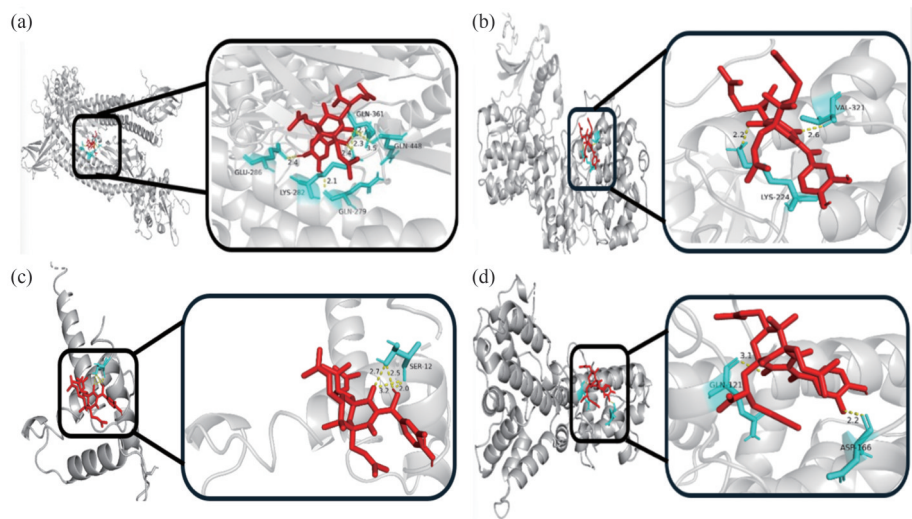
Tab. 2 Molecular docking binding energy between garcinol and top 10 core targets by degree value

配体	受体	结合能/(kcal/mol)
山竹醇	STAT3	-8.7
	MAPK3	-7.6
	EP300	-7.4
	MAPK1	-7.1
	AKT1	-7.0
	JUN	-7.0
	SRC	-6.1
	RELA	-5.8
	TP53	-5.7
	PIK3R1	-7.3

(图 7(a)-(b)),后续实验给药浓度确定为:MCF-7(0.1、0.2、0.4 μM)、MDA-MB-231(0.1、0.4、1.6 μM)。

2.3.2 实时荧光定量PCR实验检测核心靶点mRNA转录水平

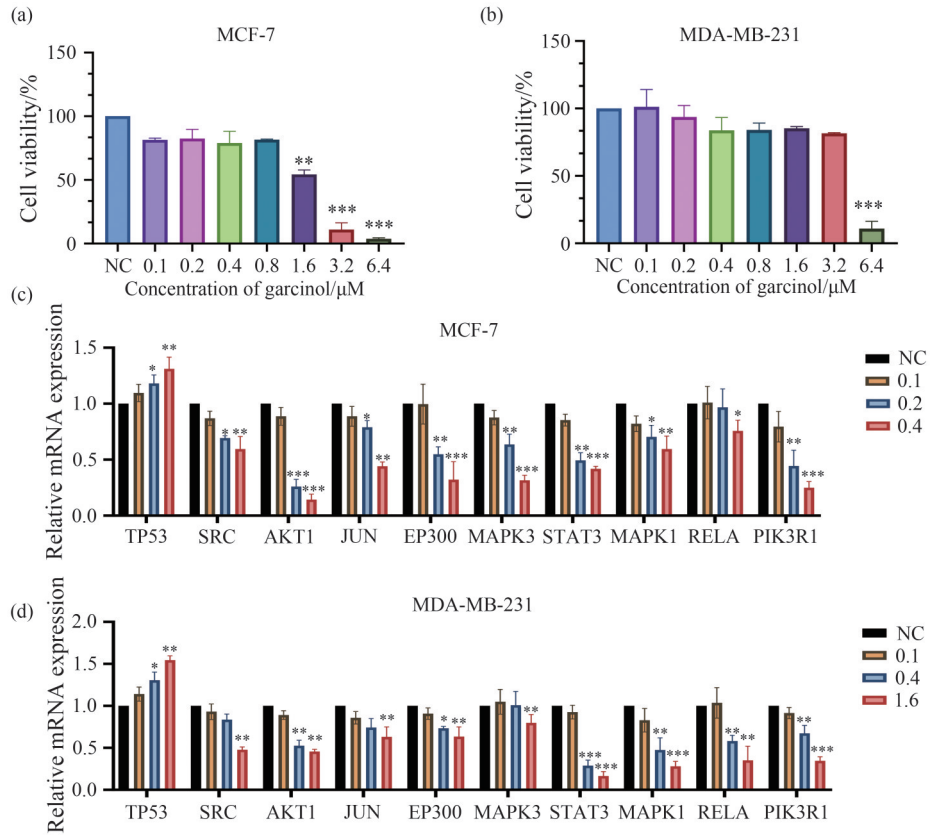
在山竹醇最大给药浓度处理下,两株乳腺癌细胞中核心靶点TP53的mRNA表达水平均显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而其余核心靶点(如SRC、AKT1



(a)-(d)分别展示了山竹醇与STAT3、MAPK3、EP300和PIK3R1的最优对接构象及活性交互位点放大图.

图6 山竹醇与Degree值排名中四个结合能最低核心靶点的分子对接

Fig. 6 Molecular docking conformations of garcinol with four core targets possessing the lowest binding energy



所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示($n=3$),与空白组(NC)相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$.

(a)&(b)对MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞增殖的影响;(c)&(d)对MCF-7和MDA-MB-231细胞核心靶点mRNA表达的影响

图7 山竹醇对乳腺癌细胞增殖及核心靶点mRNA表达的影响

Fig. 7 Effects of garcinol on proliferation and core target mRNA expression in breast cancer cells

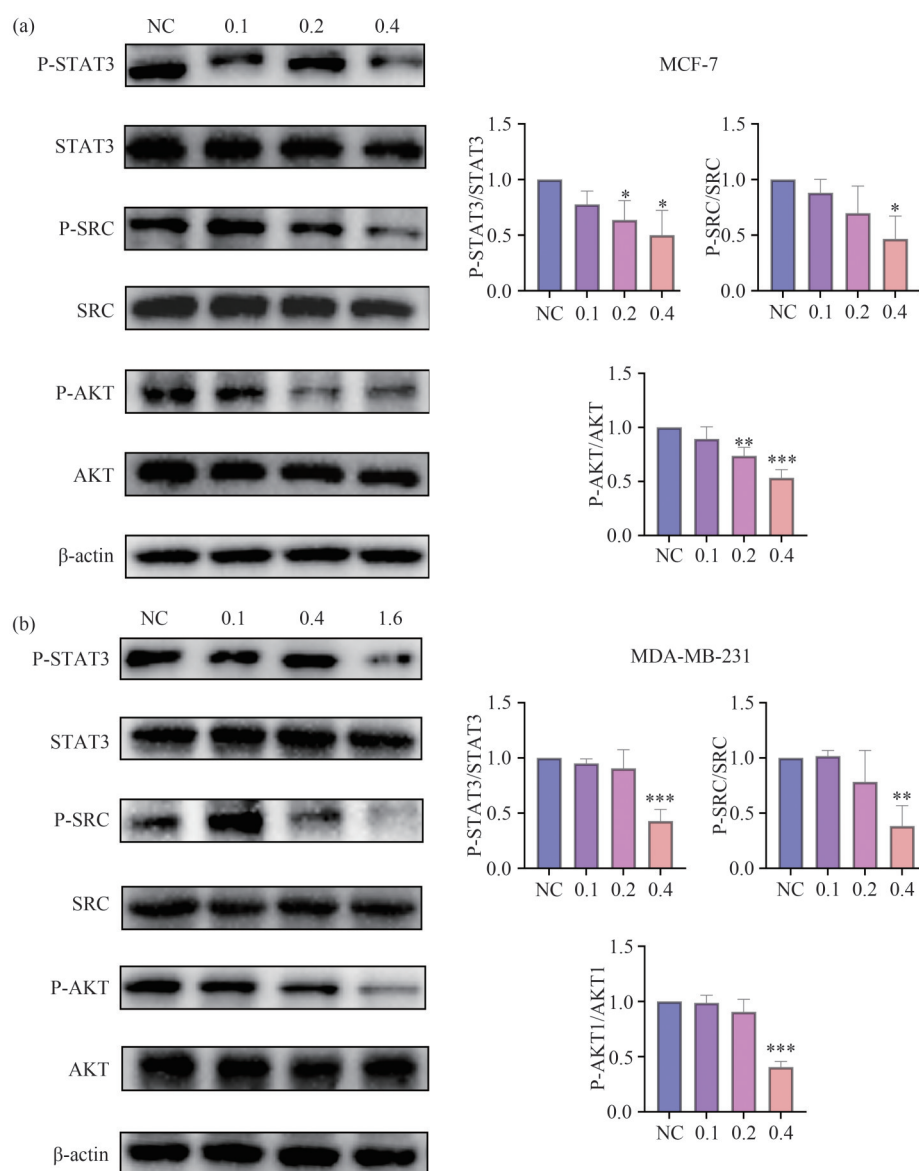
等)的mRNA表达则呈现明显下调趋势($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)(图7(c)-(d)).

2.3.3 蛋白免疫印记实验检测核心靶点蛋白表达水平

山竹醇可显著抑制STAT3、SRC及AKT磷酸

化.定量分析表明,两株细胞在最大给药浓度下,p-STAT3、p-AKT及p-SRC水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)(图8).

综上,山竹醇通过双重调控抗乳腺癌:浓度依赖性调控潜在靶向分子mRNA转录表达,抑制



所有数据均以平均值±标准差表示(n=3),与空白组(NC)相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$.

(a)山竹醇对 MCF-7 细胞的影响;(b) 山竹醇对 MDA-MB-231 细胞的影响

图8 山竹醇对乳腺癌细胞核心靶点蛋白表达的影响

Fig. 8 Effects of garcinol on core target protein expression in breast cancer cells

靶向基因翻译后磷酸化,最终抑制乳腺癌细胞增殖.

2.4 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞的单细胞测序

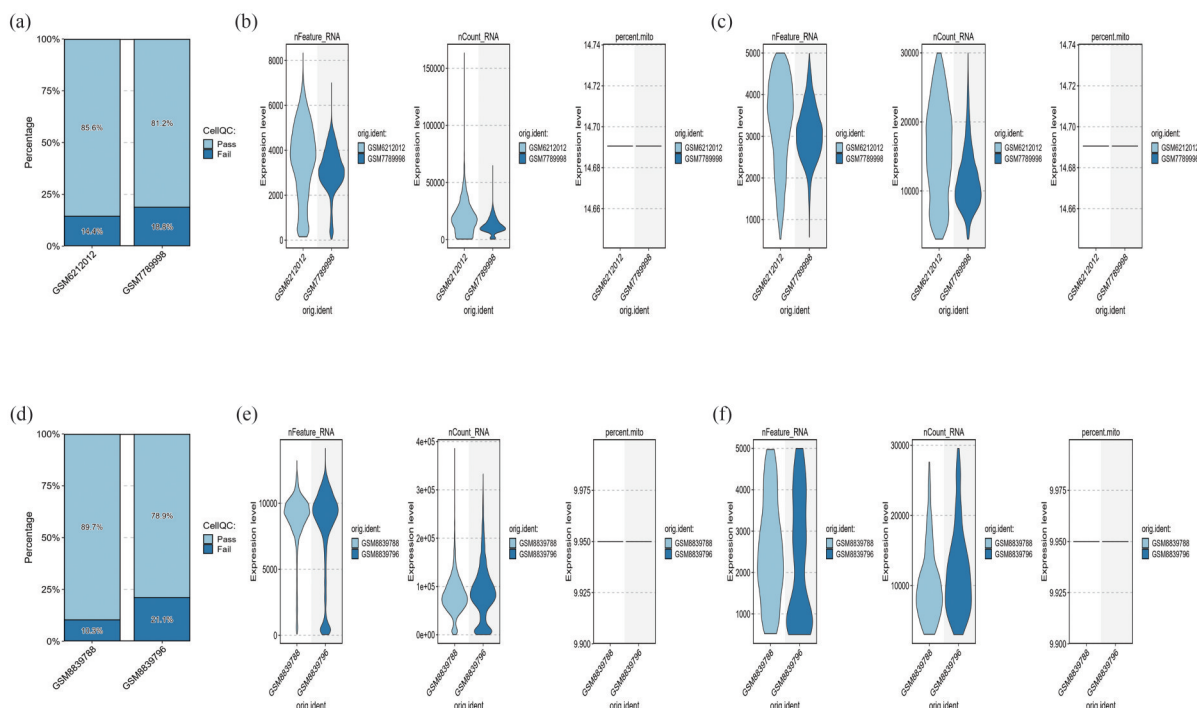
2.4.1 R 语言 Seurat 包对 GEO 数据库中 MCF-7 与 MDA-MB-231 单细胞转录组数据集的分析

经 R 语言 Seurat 包对两个细胞的样本数据进行读取后,两个细胞各自样本中基因数范围极大(基因数>5000),总转录本数量级极高(>30000),线粒体占比维持正常水平(图9(b)-(e));接着对细胞进行质量控制,其中 MCF-7 细胞的 GSM6212012 数据集通过率为 81.2%、GSM7789998 数据集为 85.6% (图9(a)),MDA-MB-231 细胞的 GSM8839788 数

据集通过率 78.9%、GSM8839796 数据集为 89.7% (图9(d)). 过滤质量不合格的细胞后各个样本的三个指标均在正常范围(图9(c)-(f)),所有数据均满足后续分析要求.

2.4.2 单细胞转录组数据的批次整合与细胞分群可视化

MCF-7 细胞 UMAP 可视化结果(图10(a))显示:两个样本来源的细胞在二维空间中呈现显著的交叉混合分布,提示技术批次差异已得到有效校正,后续分群结果能够反映细胞真实的生物学异质性;MCF-7 细胞分群 UMAP 图(图10(b))显示:样本中 9 个边界清晰的细胞亚群,结合分样本的亚群分布



(a) MCF-7 细胞各样本的质控通过率; (b) MCF-7 细胞质控前的 nFeature_RNA、nCount_RNA 及 percent.mt 分布; (c) MCF-7 细胞质控后的 nFeature_RNA、nCount_RNA 及 percent.mt 分布; (d) MDA-MB-231 细胞各样本的质控通过率; (e) MDA-MB-231 细胞质控前的 nFeature_RNA、nCount_RNA 及 percent.mt 分布; (f) MDA-MB-231 细胞质控后的 nFeature_RNA、nCount_RNA 及 percent.mt 分布

图 9 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞单细胞转录组数据的质控通过率及质控前后指标分布

Fig. 9 Quality control pass rate and index distribution before and after quality control of single-cell transcriptome data of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

展示可进一步观察到:各样本均覆盖了 MCF-7 的主要细胞亚群,未出现单一样本特有的偏倚性分群,验证了分群结果的稳定性。

MDA-MB-231 细胞经与 MCF-7 细胞相同的校正流程和聚类(图 10(c)),结果显示 MDA-MB-231 细胞存在 5 个亚群(图 10(d));MDA-MB-231 细胞分群 UMAP 图进一步验证了 MDA-MB-231 细胞各亚群在不同样本中的一致性分布,排除了样本特异性对亚群构成的干扰。

上述结果不仅证实 MCF-7 与 MDA-MB-231 细胞系均存在显著的细胞异质性,同时通过严格的批次校正与聚类分析,确保了细胞亚群划分的稳定性与生物学可靠性,为后续解析各亚群的转录组特征、功能表型及潜在调控机制提供了可靠的细胞分群基础。

2.4.3 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞单细胞转录组功能解析及药物-细胞通路匹配验证

进一步基于 E-cadherin、CK18(上皮细胞标志物)及 OCT4、SOX2(诱导多能干细胞标志物)的表达特征进行细胞类型注释,将上述 9 个亚群进一步归为 2 个核心聚类。MCF-7 细胞样本中共包含 9657 个细胞,可清晰分为 2 个聚类(图 11(a)):上皮细胞

(epithelial cells)8163 个,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, IPS cells)1494 个。接下来以上皮细胞部分为主要研究对象,对其差异表达基因进行分析,并通过基因-通路关联网络可视化展示功能聚类结果。图中 C1 模块富集细胞周期、P53 信号通路等通路,核心关联基因(如 *TP53*、*CDK2*)是细胞周期进程的关键调控因子^[10];C4 模块则聚焦 DNA 复制、错配修复等通路,关联基因(如 *RPA1*、*POLD2*)参与 DNA 合成与损伤修复^[11]。两个模块的协同富集,提示该上皮细胞处于活跃增殖状态,且通过 DNA 修复通路保障增殖过程中的基因组稳定性。C3 模块富集蛋白酶体通路,负责异常蛋白的降解与细胞稳态维持^[12];C2 模块则覆盖核质转运、剪接体等通路,关联基因参与 RNA 剪接、核-质物质转运等基础代谢过程^[13](图 11(c))。这两类通路的富集,反映了上皮细胞在高增殖状态下对蛋白稳态、基因表达调控的基础需求。

通路-基因关联图结果进一步展示“通路-基因”的具体对应关系:不同颜色基因节点对应 6 类通路,清晰呈现了各功能通路的核心基因成员,明确了通路功能的分子载体。词云图中:TP53(P53 信号/细胞周期核心)、PSMD 家族基因(蛋白酶体通路)、CDK2/

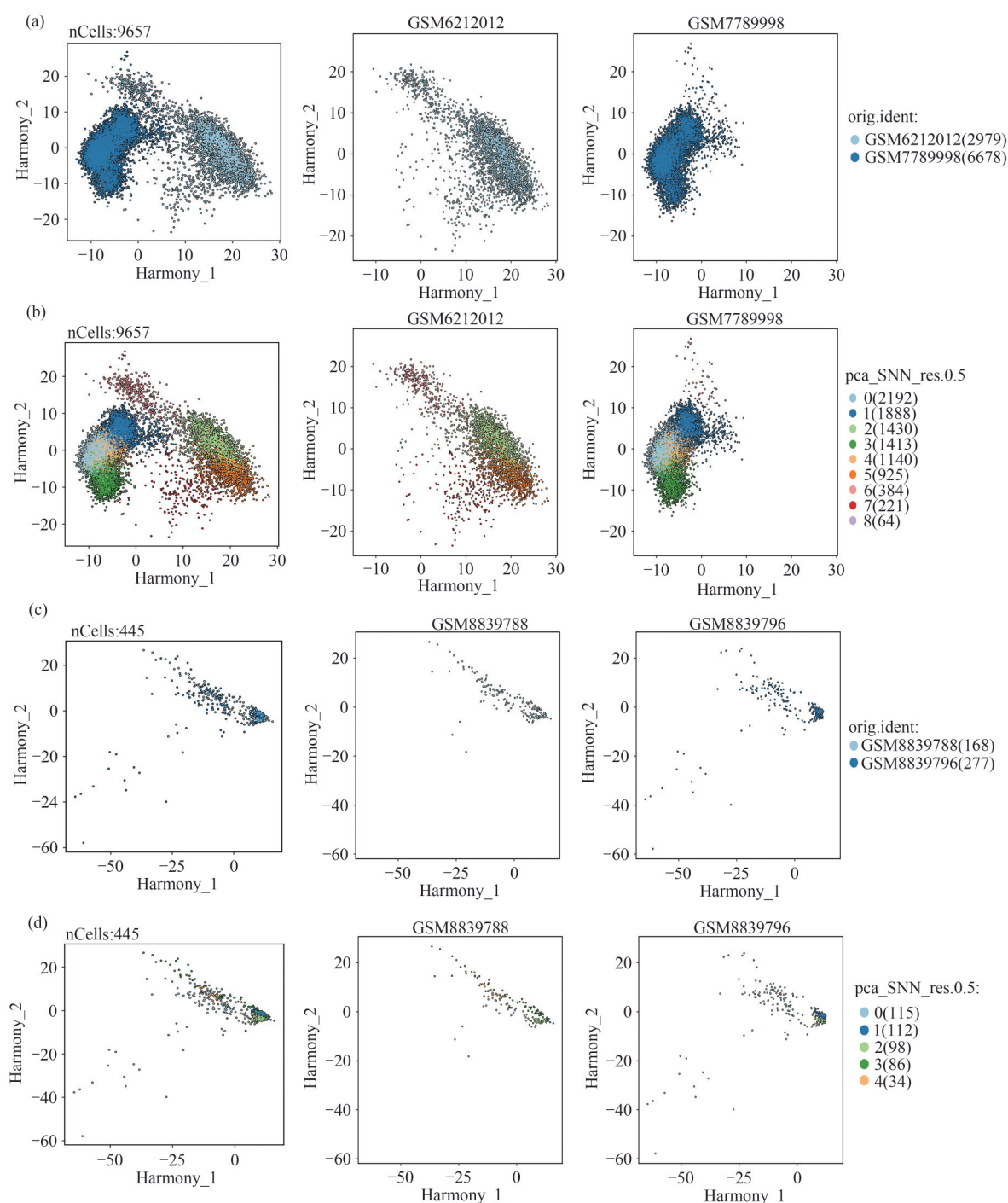


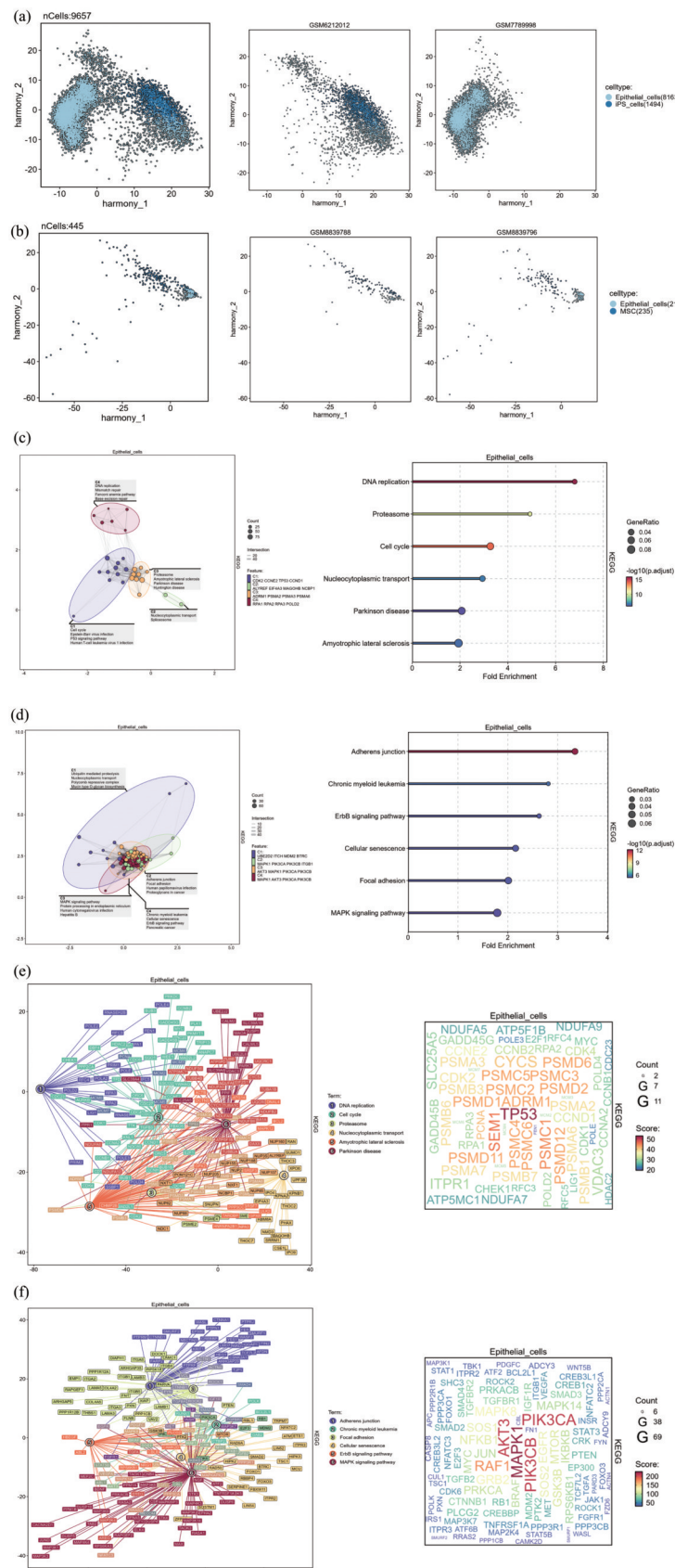
图10 MCF-7与MDA-MB-231单细胞转录组的Harmony整合降维、样本分布及细胞分群可视化图

Fig. 10 Harmony integration dimensionality reduction, sample distribution and cell clustering visualization of single-cell transcriptomes of MCF-7 and MDA-MB-231

CCNE2(细胞周期)等基因显著突出,直接对应气泡图与关联图的核心通路,是调控上皮细胞“增殖+DNA稳态+蛋白稳态”表型的潜在分子(图11(e)).

MDA-MB-231细胞中5个亚群结合细胞标志物表达特征注释后可清晰分为2个聚类:上皮细胞210个,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)235

个(图11(b)). 对上皮细胞差异表达基因进行分析,并通过基因-通路关联网络可视化展示功能聚类结果. 通路富集网络模块分析:差异基因与关联通路被聚类为4个核心功能模块,各模块功能协同支撑MDA-MB-231细胞生物学特征:C1模块富集泛素介导的蛋白降解、核质转运通路,核心功能为蛋白泛



(a)MCF-7细胞类型的Harmony降维分布;(b)MDA-MB-231细胞类型的Harmony降维分布;(c)MCF-7上皮细胞KEGG通路富集模块网络;
(d)MDA-MB-231上皮细胞KEGG通路富集模块网络;(e)MCF-7K上皮细胞核心通路基因(f)MDA-MB-231上皮细胞核心通路基因
图 11 MCF-7和MDA-MB-231细胞上皮细胞的注释、功能通路富集及核心基因可视化图

Fig. 11 Visualization of annotation, functional pathway enrichment and core genes of MCF-7 and MDA-MB-231 epithelial cells

素化降解与核质物质转运,保障细胞内分子稳态;C2模块黏附连接、黏着斑通路为核心,介导细胞间黏附及细胞与细胞外基质的互作,而该通路正是肿瘤细胞侵袭迁移表型的关键调控基础;C3模块富集MAPK信号通路,主要参与细胞增殖与迁移的信号转导,为细胞动态表型调控提供核心信号支撑;C4模块涵盖ErbB信号通路等肿瘤相关通路,与细胞增殖活性及恶性表型密切相关^[14](图11(d))。

通路-基因关联图结果显示:黏附连接通路核心关联CTNNB1、CDH1等细胞黏附关键分子,Focal adhesion通路富集整合素及骨架调控基因,MAPK信号通路则以MAPK1/3、RAF1为核心调控节点,上述基因均为细胞黏附、迁移表型的直接调控因子^[15-16](图11(d))。基因词云图结果显示:*AKT3*、*MAPK1*、*PIK3CA*等基因显著富集,为功能网络中的核心节点基因(图11(f));这些基因不仅是MAPK、PI3K-AKT经典信号通路的关键成员,可协同调控细胞增殖活性,同时参与细胞黏附动态及迁移过程的调控,是

MDA-MB-231三阴乳腺癌细胞恶性表型的潜在靶点。

2.4.4 网络药理学靶标与MCF-7和MDA-MB-231细胞的核心基因交集及功能匹配

将前面得到的潜在靶向基因筛选出degree≥8值大于的基因与MCF-7上皮细胞和MDA-MB-231细胞的核心基因取交集,得到与MCF-7上皮细胞的交集基因共6个(*TP53*、*BCL2*、*CDK1*、*CDK2*、*HDAC2*、*CYCS*),与MDA-MB-231细胞核心靶点的交集基因共15个(*JUN*、*EP300*、*MAPK1*、*NFKB1*、*EGFR*、*PIK3CA*、*CREBBP*、*PIK3CB*、*MAPK14*、*MTOR*、*PTK2*、*FN1*、*XIAP*、*SMAD2*、*PRKCA*)(图12)。

TP53、*CDK1*和*CDK2*对应MCF-7的核心通路“细胞周期”、“P53信号通路”——*TP53*作为P53通路核心抑癌基因,调控细胞周期阻滞;CDK1/CDK2是细胞周期进程的关键驱动因子,二者共同支撑MCF-7的高增殖表型;*BCL2*、*CYCS*关联线粒体凋亡通路——*BCL2*通过抑制线粒体凋亡维持细胞存活,*CYCS*是线粒体凋亡的启动分子^[17],二者协同调控

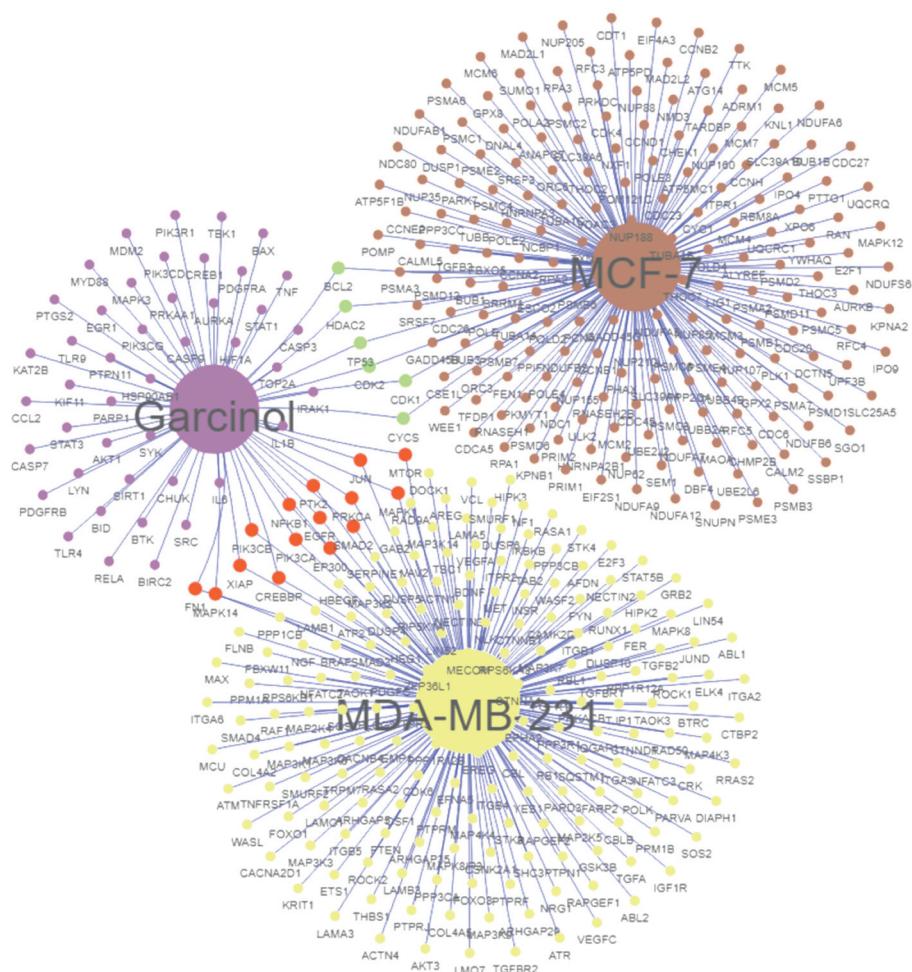


图12 网络药理学核心靶点与MCF-7、MDA-MB-231细胞上皮细胞核心基因交集网络韦恩图

Fig. 12 Venn diagram of the intersection network between core targets of network pharmacology and epithelial core genes of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

MCF-7 的凋亡平衡;HDAC2 作为组蛋白去乙酰化酶,通过转录调控参与细胞周期、凋亡通路的功能整合^[18]。

MAPK1、PIK3CA/PIK3CB、MTOR、MAPK14 对应 MDA-MB-231 的重要信号通路“MAPK/PI3K-AKT 信号通路”——MAPK1/MAPK14 通过调控细胞骨架重排驱动迁移,PIK3CA/PIK3CB-MTOR 轴与三阴乳腺癌侵袭能力相关调控通路^[19];PTK2、FN1 关联“黏着斑”通路——FN1 作为细胞外基质成分介导细胞-基质黏附^[20],PTK2 参与黏着斑信号转导^[21],二者共同调控 MDA-MB-231 细胞的动态迁移;JUN、NFKB1 (转录因子)、EGFR (生长因子受体)、SMAD2 (上皮间质转化相关)等分子,构成“信号转导-转录调控-表型执行”的功能网络,与 MDA-MB-231 细胞的恶性表型相关^[22-24]。

MAPK、细胞周期、黏附连接等通路,与 MCF-7、MDA-MB-231 细胞关键通路高度匹配;基因层面,交集基因既覆盖 MCF-7 “增殖-凋亡”,也关联 MDA-MB-231 “侵袭-迁移”。该交叉结果验证了网络药理学靶标的“肿瘤表型特异性”与“双细胞覆盖性”,为后续药物的功能验证及分子机制解析提供了潜在靶点与通路。

3 讨论

目前,天然产物抗肿瘤研究正处于一个瓶颈期:虽然大家都知道它“多靶点、多通路”,但这种“广撒网”的特性往往让研究显得精准度不足,很难讲清楚到底哪个才是核心。本研究构建的“宏观-实验-微观”多维范式,本质上就是为了给天然产物研究“剥茧抽丝”。通过网络药理学与分子对接,将山竹醇杂乱的潜在靶点聚焦到了 TP53 和 AKT1 等枢纽节点上,这不仅从系统层面理清了作用脉络,也为后续药物开发提供了明确的分子坐标。

更深层次的科学问题在于乳腺癌极强的内部异质性。临床上经常发现,同一种药在不同亚型甚至同一肿瘤的不同细胞群中效果完全不同,传统的批量细胞实验(bulk)往往会因为“平均化”而掩盖这些关键差异。本研究利用单细胞测序技术,直接在微观尺度上捅破了这层窗户纸。山竹醇对 MCF-7 和 MDA-MB-231 的调控路径截然不同——前者偏向凋亡控制,后者偏向迁移抑制。

然而,MCF-7 与 MDA-MB-231 虽然是极具代表

性的管腔型与三阴性工具细胞,但它们仅仅是乳腺癌广阔异质性谱系中的“冰山一角”。真实的肿瘤是一个由恶性细胞、免疫成分及基质纤维组成的复杂生态系统,脱离了微环境支持的体外模型在模拟真实病理响应时存在天然局限。目前的单细胞分析更多是基于基线状态的理论推演,这种“离体异质性”与患者体内的“原位异质性”之间仍存在认知鸿沟。

因此,本研究的发现更像是一个初步的科学信号。未来,计划构建裸鼠原位成瘤模型,并引入空间转录组学等前沿技术,在真实的组织时空维度下验证山竹醇对肿瘤细胞及其微环境的重塑作用。这不仅将为山竹醇的临床转化夯实理论根基,也为攻克乳腺癌异质性耐药这一临床难题提供新的策略参考。

参 考 文 献

- [1] Xu L, Saunders K, Huang S P, et al. A comprehensive single-cell breast tumor atlas defines epithelial and immune heterogeneity and interactions predicting anti-PD-1 therapy response[J]. *Cell Reports Medicine*, 2024, 5(5): 101511.
- [2] 夏田田,王路,陈军波,等.乳腺病理图像分类与辅助诊断系统设计[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2025, 44(5): 703-711.
- [3] Ahmad A, Wang Z, Wojewoda C, et al. Garcinol-induced apoptosis in prostate and pancreatic cancer cells is mediated by NF- kappaB signaling[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2011, 3(4): 1483-1492.
- [4] Patwa N, Chauhan R, Chauhan A, et al. Garcinol in gastrointestinal cancer prevention: Recent advances and future prospects [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2024, 150(7): 370.
- [5] 王强,兰明,骆玺,等.通过网络药理学探究宽筋藤治疗类风湿性关节炎的药理机制[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2025, 44(5): 616-628.
- [6] Lu R L, Fang J Y. Epigenetic modification and cancer [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006, 18 (1): 10-14. DOI:10.1108/02756660610663826.
- [7] Vakili-Samiani S, Khanghah O J, Gholipour E, et al. Cell cycle involvement in cancer therapy; WEE1 kinase, a potential target as therapeutic strategy[J]. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2022, 824: 111776.
- [8] Fortunato C, James P A, Spurdle A B. Current review of TP53 pathogenic germline variants in breast cancer patients outside Li-Fraumeni syndrome [J]. *Human Mutation*, 2018, 39(12): 1764-1773.

- [9] Esmailniakooshkghazi A, Pham E, George S P, et al. In colon cancer cells fascin1 regulates adherens junction remodeling[J]. The FASEB Journal, 2023, 37 (3): e22786.
- [10] Tadesse S, Anshabo A T, Portman N, et al. Targeting CDK2 in cancer: Challenges and opportunities for therapy[J]. Drug Discovery Today, 2020, 25 (2): 406-413.
- [11] Zou Z, Ni M, Zhang J, et al. *miR-30a* can inhibit DNA replication by targeting RPA1 thus slowing cancer cell proliferation[J]. Biochemical Journal, 2016, 473(14): 2131-2139.
- [12] Mofers A, Pellegrini P, Linder S, et al. Proteasome-associated deubiquitinases and cancer[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2017, 36(4): 635-653.
- [13] Hill R, Cautain B, de Pedro N, et al. Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy [J]. Oncotarget, 2014, 5(1): 11-28.
- [14] Li Y, Lu R, Abuduhailili X, et al. NSUN7 promotes cervical cancer progression through activation of ErbB signaling pathway[J]. Functional & Integrative Genomics, 2025, 25(1): 37.
- [15] Corso G, Magnoni F, Massari G, et al. CDH1 germline mutations in healthy individuals from families with the hereditary diffuse gastric cancer syndrome[J]. Journal of Medical Genetics, 2022, 59(4): 313-317.
- [16] Wu S, Hu C, Hu P, et al. RAF1 promotes anlotinib resistance in non-small cell lung cancer by inhibiting apoptosis [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2025, 151(4): 138.
- [17] Olarewaju O, Hu Y, Tsay H C, et al. microRNA miR-20a-5p targets CYCS to inhibit apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Death & Disease, 2024, 15: 456.
- [18] Qiao X, Wu X, Chen S, et al. Discovery of novel and potent dual-targeting AXL/HDAC2 inhibitors for colorectal cancer treatment *via* structure-based pharmacophore modelling, virtual screening, and molecular docking, molecular dynamics simulation studies, and biological evaluation[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2024, 39(1): 2295241.
- [19] Kumar S, Bhattacharyya S, Das A, et al. *In vitro* effect of PIK3CA/mTOR inhibition in triple-negative breast cancer subtype cell lines [J]. Breast Disease, 2022, 41(1): 241-247.
- [20] Chen C, Ye L, Yi J, et al. FN1 mediated activation of aspartate metabolism promotes the progression of triple-negative and luminal a breast cancer[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2023, 201(3): 515-533.
- [21] Fan Z, Duan J, Wang L, et al. PTK2 promotes cancer stem cell traits in hepatocellular carcinoma by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. Cancer Letters, 2019, 450: 132-143.
- [22] Kancharla J, Prasad I D V, Bhaskar L V K S, et al. Meta-analysis of NFKB1-94 ATTG ins/del polymorphism and risk of breast cancer[J]. Current Drug Metabolism, 2020, 21(3): 221-225.
- [23] Lev S. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: The EGFR axis[J]. Biochemical Society Transactions, 2020, 48(2): 657-665.
- [24] Wang W D, Zeng C Y, Shang Y, et al. Thiostrepton suppresses triple-negative breast cancer through downregulating c-FLIP/SMAD2/3 signaling pathway [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2024, 26(8): 945-954.

(责编&校对 姚春娜)