

网络出版时间:2024-04-11 21:54:44 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1010.011

葛根素靶向线粒体抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭的机制

余才翰^{1,2},李岱¹,谢敏¹

摘要 目的 利用网络药理学、分子对接及体外实验验证探讨葛根素对人乳腺癌细胞 HCC1806 增殖、侵袭和凋亡的作用及机制。方法 GEO 数据库收集乳腺癌和线粒体疾病数据, GEO2R 分析差异性表达基因; 韦恩图分析乳腺癌与线粒体数据集的重叠基因; GO 和 KEGG 功能富集分析重叠基因; STRING 和 Cytoscape 分析重叠基因相互作用网络并筛选核心基因; Autodock 对接葛根素和核心基因; 通过 CCK-8、EdU、TUNEL 和 Transwell 实验检测细胞增殖、凋亡和侵袭能力, 采用 Mito-Tracker 实验检测线粒体膜电位, Western blot 检测蛋白质表达水平。体内实验通过乳腺癌皮下异种移植和免疫组化分析葛根素的抗肿瘤药效。结果 乳腺癌和线粒体疾病共有 132 个重叠基因, 筛选出 10 个核心差异性表达基因, 其中双丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸蛋白激酶(DST)在乳腺癌组织中呈低表达。葛根素可结合并上调 DST 表达, 抑制人乳腺癌细胞 HCC1806 增殖和侵袭, 促进细胞凋亡, 增加凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase 3 和 Bax 表达, 下调抗凋亡蛋白 Bel-2 的表达, 降低线粒体膜电位。体内实验显示葛根素可抑制乳腺癌的生长, 上调瘤体组织中 DST 的表达。结论 葛根素抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭并促进癌细胞凋亡进而抑制乳腺癌生长。

关键词 葛根素; 线粒体; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; DST

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0627-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.011

世界卫生组织国际癌症研究机构统计数据显示, 2020 年全球新发癌症病例 1 929 万例, 其中乳腺癌新增人数达 226 万, 成为全球第一大癌症^[1]。癌症不仅是一种遗传疾病, 更是一种代谢疾病^[2], 线

粒体作为能量代谢的主要细胞器, 在肿瘤发生、增殖和凋亡中发挥重要作用^[3]。线粒体功能受损可显著降低肿瘤细胞增殖和致瘤能力^[4]。研究^[5]表明, 线粒体 DNA 缺失的小鼠无法形成肿瘤。

葛根素是从葛根属豆科植物中提取的一种黄酮类分子, 具有抗肿瘤活性。葛根素可阻断核因子- κ B p65 (NF- κ B p65) 和细胞外调节蛋白激酶(Erk) 抑制乳腺癌细胞迁移、侵袭和黏附^[6], 还可通过降低葡萄糖代谢诱导胰腺癌细胞线粒体依赖性凋亡^[7]。然而, 葛根素在乳腺癌中的机制尚未明确, 有待进一步探索。该研究基于网络药理学和分子对接预测葛根素的潜在靶点和分子途径, 通过体内外实验进行验证, 为乳腺癌的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞 HCC1806 和人正常乳腺上皮细胞 MCF10A 均购自广州吉尼欧生物科技有限公司。HCC1806 细胞培养在 RPMI-1640 培养基中, MCF10A 细胞培养在 DMEM 培养基中。两种培养基均含有 10% 胎牛血清、50 U/ml 青霉素和 50 μ g/ml 链霉素, 并置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养。

1.1.2 实验动物 20 只雄性 BALB/c 裸鼠, SPF 级, 8 周龄, 体质量 20 ~ 25 g, 购自湖北贝恩特生物科技有限公司 [生产许可证号: SCXK(鄂) 2021-0027]。

1.1.3 药物、试剂与仪器 葛根素购于上海源叶生物科技有限公司(批号: B20446)。RPMI-1640 培养基(批号: 8121368)、DMEM 培养基(批号: 8123037) 购自美国 Gibco 公司, DMSO(批号: ST038) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司。CO₂ 培养箱(新加坡艺思高科技有限公司), 超净工作台(苏州净化设备有限公司), 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司), 显微镜(日本奥林巴斯有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 数据收集 通过 GEO 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 收集乳腺癌和正常乳

2024-02-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81901149); 湖北省自然科学基金(编号: 2022CFB356)

作者单位: ¹ 湖北科技学院医学部药学院, 咸宁 437100

² 咸宁市中心医院(湖北科技学院第一附属医院) 眼科, 咸宁 437100

作者简介: 余才翰, 男, 硕士研究生;

谢敏, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xie-min2020a@163.com

李岱, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 249858565@qq.com

腺组织数据,数据集编号为 GSE42568;收集线粒体疾病与对照组数据,数据集编号为 GSE42986。在线 GEO2R 分析差异性表达基因。使用韦恩图分析乳腺癌与线粒体数据集之间的重叠基因。对重叠基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析,使用 STRING 数据库分析重叠基因的相互作用网络,使用 Cytoscape 可视化重叠基因相互作用网络,并通过介数中心筛选核心基因。GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 在线分析枢纽基因在乳腺癌患者中的差异性表达。Human Protein Atlas 数据库 (<https://www.proteinatlas.org/>) 下载对相关蛋白的乳腺癌和正常乳腺组织的免疫组化染色图像。

1.2.2 CCK-8 细胞增殖实验 取对数生长期乳腺癌细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板 (Corning, USA) 中。然后,用不同浓度的葛根素 (0、3、10 和 30 mol/L) 处理细胞。处理 24 h 后,向每个孔中加入 10 μ l CCK-8 试剂,然后培养 2 h,利用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.2.3 细胞划痕实验 取对数生长期乳腺癌细胞,以每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板,培养箱中孵育 24 h,融合率达到 90% 左右,用 20 μ l 无菌枪头在孔内垂直横线划痕,用 PBS 洗除脱落细胞后,加入葛根素含 1% 胎牛血清培养基继续培养,并在 0、24 h 显微镜下观察各孔并拍照,每组实验重复 3 次及以上。用 Image J 软件测量划痕面积,用 Graphpad Prism8 软件分析实验结果。

1.2.4 Transwell 细胞迁移侵袭实验 将含 5×10^4 个细胞的无血清 RPMI-1640 培养基 200 μ l 加入上室,在下室中加入含 10% 胎牛血清的培养基,在 37 $^{\circ}$ C 条件下细胞浸润 24 h。4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,再用结晶紫染色 15 min, PBS 洗涤 3 次,用棉签去除上室细胞,显微镜下观察拍照。

1.2.5 EdU 细胞增殖实验 取对数生长期乳腺癌细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 24 孔板,培养约 24 h 后葛根素干预。配制 EdU 工作液,等体积混合孵育 2 h,去除培养液, PBS 洗涤 2 次。免疫染色固定液室温固定 15 min,去除固定液, PBS 洗涤 2 次,免疫染色强力通透液室温孵育 15 min,去除通透液, PBS 洗涤 2 次。加入配制好的 Click 反应液,室温避光孵育 30 min,吸除反应液, PBS 洗涤 2 次。加入预热的细胞培养液,用含 DAPI 抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 TUNEL 细胞凋亡实验 葛根素诱导细胞凋亡,免疫染色固定液固定 30 min。 PBS 清洗 2 次,含

0.3% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞,室温孵育 5 min。 PBS 洗涤 2 次,用 50 μ l TUNEL 检测液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。 PBS 洗涤 3 次,加入预热的细胞培养液,用含 DAPI 抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.7 线粒体膜电位水平检测 Mito-Tracker Red CMXRos 是一种红色线粒体特异性探针,用于检测线粒体膜电位。取对数生长期乳腺癌细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 24 孔板,培养约 24 h 后葛根素干预。去除细胞培养液, PBS 洗涤 2 次,加入配制好的工作液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。去除工作液, PBS 洗涤 2 次,加入预热的细胞培养液,用含 DAPI 抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.8 乳腺癌裸鼠移植瘤模型的构建及处理 本研究中所有动物实验均经湖北科技学院实验动物伦理委员会批准 (批准号:2022-03-042),并按照当地和国际的动物护理和使用指南进行。雄性裸鼠在 SPF 级无菌动物室适应性饲养 5 d。取对数期生长乳腺癌细胞消化离心后重悬,最终细胞浓度为 4×10^6 个/ μ l。裸鼠深度麻醉后,于裸鼠背部皮下注射接种,建立人乳腺癌裸鼠移植瘤模型。当肿瘤平均体积约为 50 mm³ 时,将裸鼠随机分为对照组、葛根素给药组。给药组每日腹腔注射葛根素 (按 20 mg/kg 给药),对照组每日腹腔注射等量生理盐水。14 d 后处死小鼠,剥离瘤体计算体积,计算公式如下:体积 = $a \times b^2 / 2$ (a = 长, b = 宽,单位为 mm)。

1.2.9 免疫组化实验 瘤体组织进行常规脱水、包埋,制作石蜡切片 (4 μ m),脱蜡,抗原修复 20 min, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,过氧化氢孵化 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,封闭液封闭 1 h, I 抗 (1 : 100) 孵育过夜, PBS 清洗 3 次,每次 10 min, II 抗 (1 : 1 000) 孵育 1 h, PBS 清洗 3 次,每次 10 min, DAB 染色 5 min, PBS 清洗,苏木精染色 5 min, PBS 清洗,脱水、透明,中性树脂封片,荧光显微镜下观察拍片。

1.2.10 分子对接 分子对接 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 DST (ID 为 5YNV) 结构; Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载葛根素二维 (2D) 结构; ChemBio3D 优化葛根素; Autodock_vina 将葛根素分别与 DST 对接; OpenBabel (v2.3.1) 39 分离文件,添加氢键并分配可旋转键和电荷; PDBQT 进一步对接; PyMOL 可视化对接结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计

分析,两组数据比较采用独立样本 t 检验,所有计量资料数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌及线粒体相关基因差异性表达分析

乳腺癌数据集 GSE42568 包含 9 667 个差异性表达基因(图 1A),线粒体疾病数据集 GSE42986 包含 256 个差异性表达基因(图 1B),两个数据集的重叠基因共 132 个(图 1C)。使用 GO 和 KEGG 富集分析对 132 个重叠基因分析。GO 功能富集分析得到生物过程、细胞组分和分子功能三方面的注释和分类,将排名前 8 的条目绘制柱状图,结果见图 1D。KEGG 通路富集筛选出 3 条信号通路,结果见图 1E。

2.2 乳腺癌线粒体差异性表达基因相互作用网络及核心基因分析

将乳腺癌线粒体差异性表达基因相互作用在线分析并可视化,筛选出 10 个核心基因,结果见图 1F。GEPIA 分析 10 个核心基因在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达水平。结果发现在 1 085 例乳腺癌患者中,DST 在乳腺癌组织中蛋白水平呈低表达,见图 2A。同时,HPA 数据库查询到 DST 在免疫组化染色图像中乳腺癌组织呈现更低的阳性率,见图 2B。分子对接结果显示,葛根素可与 DST 蛋白的 60 位精氨酸、207 位谷氨酸和 277 位天冬氨酸结合,结合能量为 -9.2 kcal/mol,见图 2C。同时,免疫印迹结果显示,DST 蛋白的相对表达量给药组 (1.55 ± 0.13) 显著高于对照组 (1.00 ± 0.05) ($t = -6.74, P < 0.05, n = 3$),见图 2D。

2.3 葛根素抑制乳腺癌细胞增殖

CCK-8 法检测结果显示,在 $3 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 时葛根素对正常乳腺上皮细胞存活没有显著影响,但明显抑制乳腺癌细胞存活,并随着葛根素的浓度增大乳腺癌细胞存活率

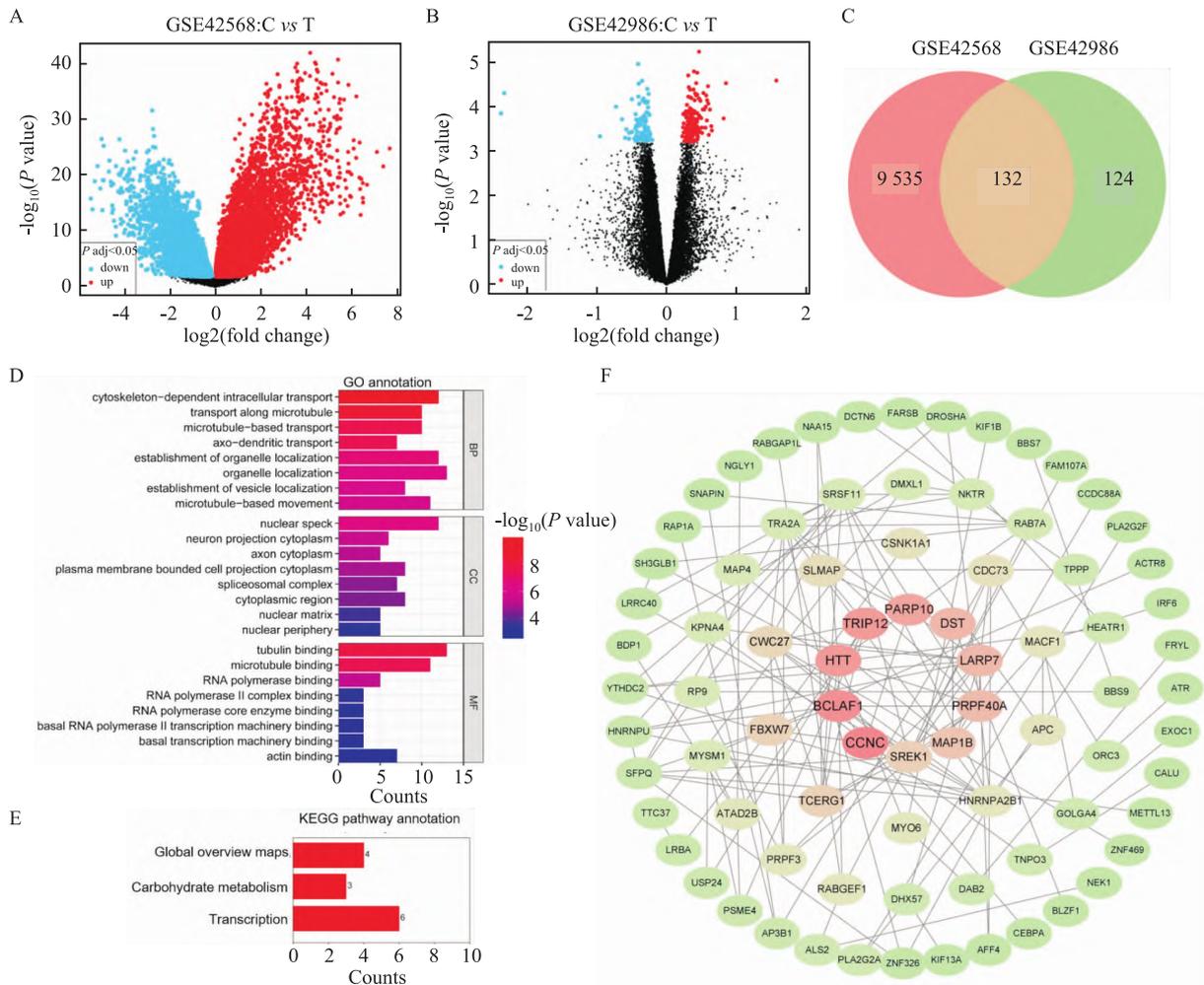


图 1 乳腺癌和线粒体疾病相关基因分析

A:乳腺癌差异性表达基因火山图;B:线粒体疾病差异性表达基因火山图;C:乳腺癌和线粒体疾病重叠基因韦恩图;D、E:重叠差异性表达基因 GO(D)和 KEGG(E)富集分析;F:重叠差异性基因相互作用网络

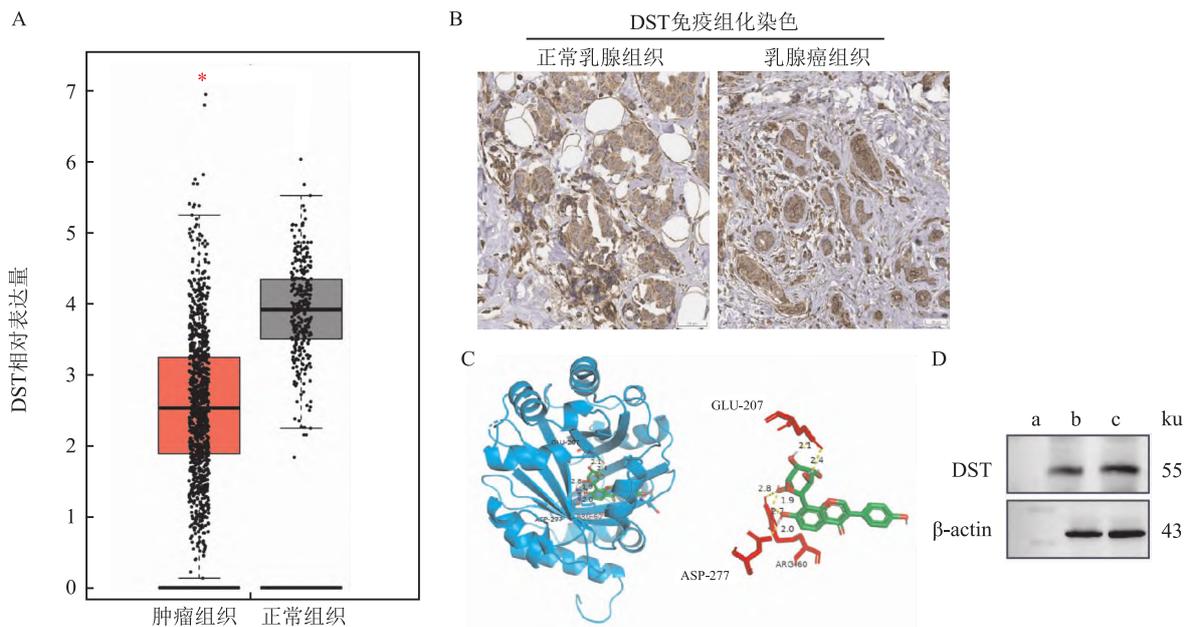


图2 DST与乳腺癌的相关性分析

A: DST在乳腺癌患者中的转录分析;与正常组织比较: * $P < 0.05$; B: DST在乳腺癌患者中的免疫组化表达; C: 葛根素与DST的分子对接图; D: 葛根素对DST表达的免疫印迹图及分析数据: a: Marker; b: 对照组; c: 给药组

逐渐降低 ($P < 0.05$), $IC_{50} = 14.51 \mu\text{mol/L}$, 后续给药浓度选择 $10 \mu\text{mol/L}$, 见图 3A。EdU 细胞增殖实验结果显示, EdU 阳性细胞给药组 (0.30 ± 0.07) 显著少于对照组 (0.73 ± 0.07) ($t = 10.05, P < 0.05, n = 3$), 见图 3B。

2.4 葛根素抑制乳腺癌细胞侵袭 Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, 给药组细胞迁移穿过 Transwell 小室的细胞数明显减少 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 4A。划痕实验结果显示, 与对照组相比, 给药组 24 h 后划痕距离显著增宽 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 4B。

表1 葛根素对乳腺癌细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	侵袭细胞数(个)	细胞迁移率(%)
对照	106.00 ± 6.00	0.61 ± 0.05
给药	22.00 ± 4.00*	0.29 ± 0.05*
t 值	20.18	8.30

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 葛根素诱导乳腺癌细胞凋亡 TUNEL 实验结果显示, 乳腺癌细胞经葛根素处理 48 h 后, 凋亡率明显增加 ($P < 0.05$), 见表 2、图 5A。同时免疫印迹实验结果显示, 与对照组相比, 给药组显著增加凋亡因子 Cleaved-Caspase3 和 Bax 的表达水平, 并下调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$), 见表 2、图 5B。

表2 葛根素对乳腺癌细胞凋亡水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	TUNEL	Cleaved-Caspase 3 相对表达水平	Bax 相对 表达水平	Bcl-2 相对 表达水平
对照	0.04 ± 0.01	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05
给药	0.47 ± 0.04*	2.60 ± 0.05*	2.18 ± 0.07*	0.52 ± 0.04*
t 值	-16.50	-39.96	-24.23	13.15

与对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 葛根素降低线粒体功能 Mito-Tracker Red 法检测线粒体膜电位, 结果显示, 葛根素处理后, 与对照组 (1.00 ± 0.06) 相比, 给药组 (0.53 ± 0.70) 的相对荧光强度明显减弱 ($t = 9.16, P < 0.05, n = 3$), 见图 6。

2.7 葛根素对乳腺癌移植瘤的影响 HCC1806 细胞皮下异种移植瘤, 连续给药 14 d, 与对照组相比, 给药组显著减慢肿瘤的生长 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 7A。免疫组化显示葛根素连续给药 14 d 后, 给药组瘤体组织中 DST 阳性细胞明显增加 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 7B。

表3 葛根素对乳腺癌皮下异种移植瘤体积以及瘤体组织 DST 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	瘤体体积 (mm^3)	DST 相对表达量
对照	2 778.95 ± 620.67	1.00 ± 0.25
给药	926.35 ± 242.17*	1.90 ± 0.30*
t 值	8.79	-4.03

与对照组比较: * $P < 0.05$

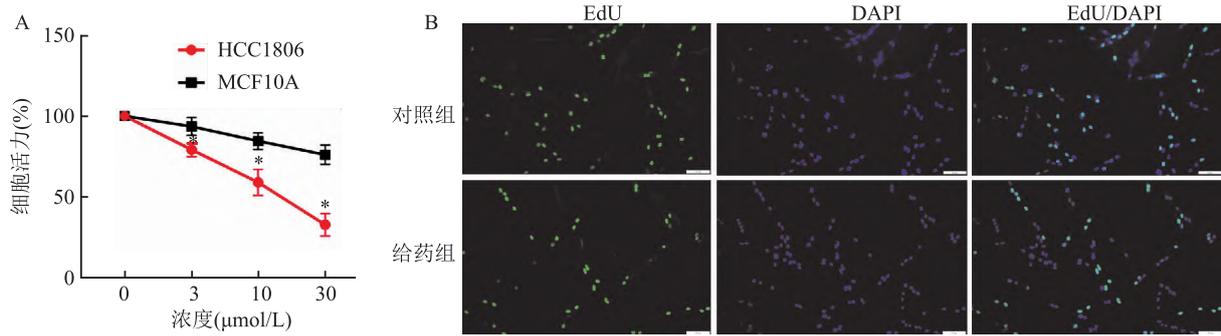


图3 葛根素对乳腺癌细胞存活率和增殖的影响

A: CCK-8 法分析葛根素对细胞存活率的作用; B: EdU 细胞增殖实验分析葛根素对乳腺癌细胞增殖的影响 ×20

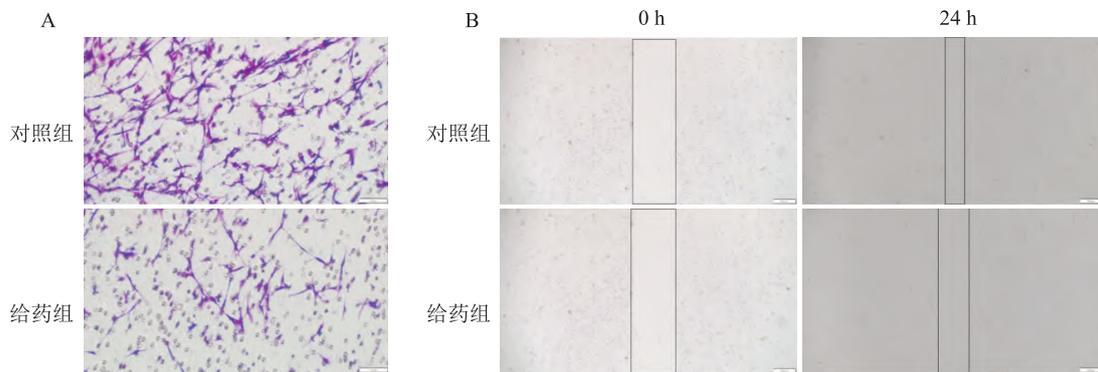


图4 Transwell 和细胞划痕实验分析葛根素对乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响

A: Transwell 实验检测对照组和给药组细胞侵袭能力 ×20; B: 划痕实验检测对照组和给药组细胞迁移能力 ×4

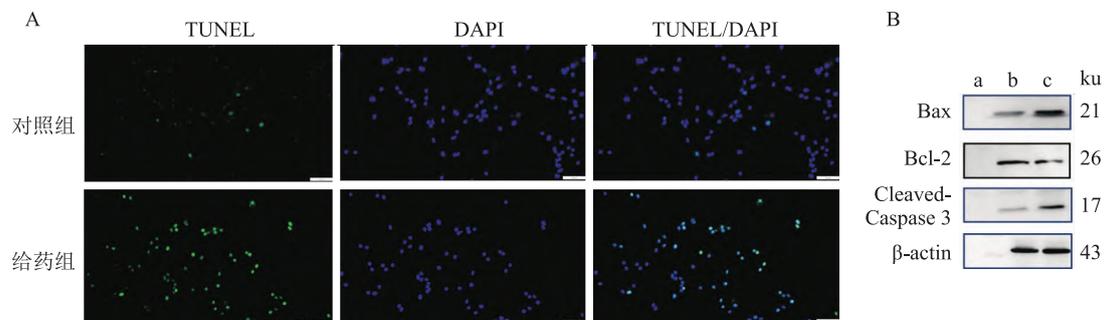


图5 TUNEL 和免疫印迹分析葛根素对细胞凋亡的影响

A: TUNEL 细胞凋亡实验检测对照组和给药组细胞凋亡水平 ×20; B: Western blot 检测对照组和给药组 Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase 3 蛋白相对表达量, a: Marker; b: 对照组; c: 给药组

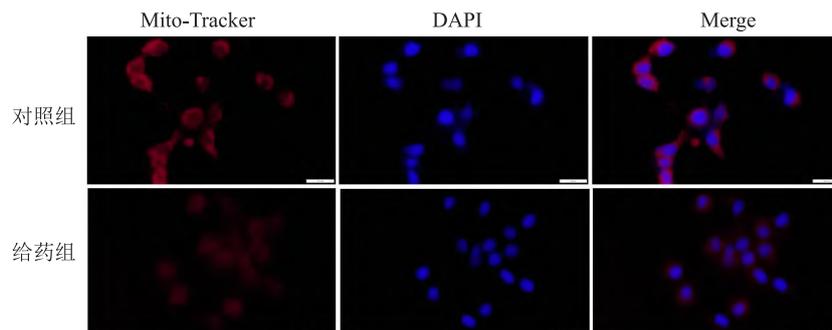


图6 葛根素对线粒体膜电位的影响 ×60

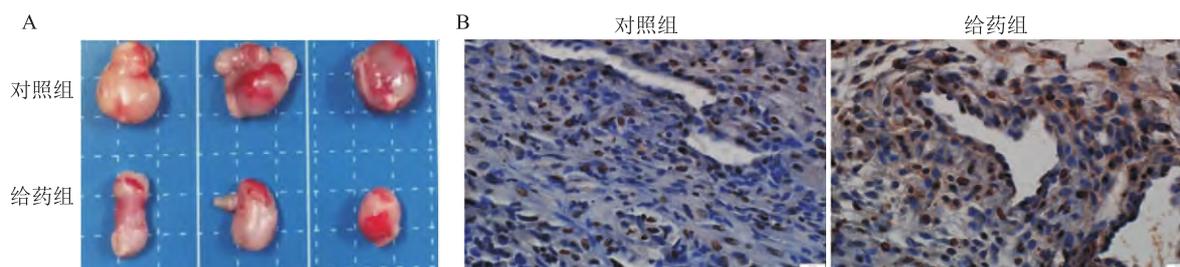


图7 葛根素对乳腺癌皮下异种移植瘤生长及对瘤体组织中 DST 表达的影响

A: 对照组和给药组移植瘤图片; B: 免疫组化染色检测对照组和给药组瘤体组织中 DST 的表达 $\times 60$

3 讨论

本研究显示葛根素可能通过结合 DST 抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭,同时诱导其凋亡。DST 是一种独特的具有磷酸化酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基的蛋白质,是多种癌症发生发展的关键蛋白质,并与不良临床结果相关。DST 的表达与肝癌、非小细胞癌、腺癌、结直肠癌、膀胱癌以及乳腺癌患者的生存相关^[8]。6.4% 的肺癌患者据报告存在 DST 基因改变, DST 基因组扩增的患者表现出较差的生存率^[9]。DST 可通过调节上皮-间质细胞转移促进结直肠癌转移并增加随后的化疗耐药性^[10]。DST 低表达也可增加细胞周期蛋白依赖性激酶 14 表达,并促进乳腺癌细胞的增殖和侵袭,并增加体内的致癌性^[11]。DST 基因突变通过激活 ERK1/2 和 MMP2/9 信号通路,促进单发纤维性肿瘤/血管外皮细胞瘤细胞转移^[12]。在慢性化疗药物治疗存活的三阴性乳腺癌患者的细胞中发现 DST 的表达量明显高于未治疗组^[13]。因此, DST 可作为癌症治疗的一个有效靶标。

DST 的稳定与线粒体的完整性密切相关,从而维持有效的线粒体形态和生理功能。DST 过表达可在应激条件下抑制线粒体磷酸化解偶联,减少 ATP 形成,引发线粒体功能障碍及线粒体适用性降低,从而抑制肺癌的进展^[9]。DST 可激活线粒体动力相关蛋白 1 介导的线粒体分裂,降低氧化磷酸化和糖酵解,从而促进多形性胶质母细胞瘤的侵袭性^[14]。本研究表明葛根素可降低线粒体功能。因此,推测葛根素通过激活 DST 表达降低线粒体功能从而抑制肿瘤进程。

本研究创新点在于通过网络药理学和分子对接技术筛选出核心基因 DST, 然后进行体内和体外实验验证 DST 在乳腺癌中的作用及可能机制, 为后期研究乳腺癌治疗方法提供了新思路和新靶点。然

而, 本研究未深入探讨 DST 蛋白在乳腺癌中的作用机制, 在后续研究中可将 DST 作为靶点采用药理学方法激活或抑制其活性、病毒学方法过表达或敲降该基因, 分析其下游信号的改变, 从而阐明其在乳腺癌中的作用机制。

(致谢: 感谢湖北科技学院基础医学院胡美纯博士在乳腺癌移植瘤实验中提供的支持和帮助。)

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Li Y, Li Z. Potential mechanism underlying the role of mitochondria in breast cancer drug resistance and its related treatment prospects[J]. Front Oncol, 2021, 11: 629614.
- [3] Sandoval-Acuna C, Torrealba N, Tomkova V, et al. Targeting mitochondrial iron metabolism suppresses tumor growth and metastasis by inducing mitochondrial dysfunction and mitophagy[J]. Cancer Res, 2021, 81(9): 2289-303.
- [4] 杜敏娟, 李立丰, 刘瑞琦, 等. 敲除 hsa_circRNA_102958 调节胰腺腺癌 PANC-1 细胞增殖、氧化应激和线粒体功能[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(7): 1111-6.
- [5] Wedam R, Greer Y E, Wisniewski D J, et al. Targeting mitochondria with ClpP agonists as a novel therapeutic opportunity in breast cancer[J]. Cancers, 2023, 15(7): 1936.
- [6] Liu X, Zhao W, Wang W, et al. Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF- κ B and Erk pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 429-36.
- [7] Zhu H Y, Xiao Y Y, Guo H C, et al. The isoflavone puerarin exerts anti-tumor activity in pancreatic ductal adenocarcinoma by suppressing mTOR-mediated glucose metabolism[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(23): 25089-105.
- [8] Correa-Sáez A, Jiménez-Izquierdo R, Garrido-Rodríguez M, et al. Updating dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2): molecular basis, functions and role in diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77: 4747-63.
- [9] Valencia K, Echepare M, Teijeira   , et al. DSTYK inhibition in-

- creases the sensitivity of lung cancer cells to T cell-mediated cytotoxicity[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(12): e20220726.
- [10] Zhang J, Miller Z, Musich P R, et al. DSTYK promotes metastasis and chemoresistance *via* EMT in colorectal cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1250.
- [11] Imawari Y, Mimoto R, Hirooka S, et al. Downregulation of dual-specificity tyrosine-regulated kinase 2 promotes tumor cell proliferation and invasion by enhancing cyclin-dependent kinase 14 expression in breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(2): 363 – 72.
- [12] Tang G, Yang Y, Shang L, et al. A DSTYK mutation activates ERK1/2 signaling to promote intraspinal dissemination in a case of solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma[J]. *Lab Invest*, 2019, 99(10): 1501 – 14.
- [13] Ogbu S C, Rojas S, Weaver J, et al. DSTYK enhances chemoresistance in triple-negative breast cancer cells[J]. *Cells*, 2021, 11(1): 97.
- [14] Kim K, Lee S, Kang H, et al. Dual specificity kinase DYRK3 promotes aggressiveness of glioblastoma by altering mitochondrial morphology and function[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2982.

Mechanism of puerarin targeting the mitochondria to inhibit proliferation and invasion of breast cancer cells

Yu Caihan^{1,2}, Li Dai¹, Xie Min¹

(¹*School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100;*

²*Dept of Ophthalmology, Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100)*

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of puerarin on the proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer cell HCC1806 *via* network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments. **Methods** The data of breast cancer and mitochondrial diseases were collected from GEO database, and the differentially expressed genes were analyzed by GEO2R. Overlapping genes between breast cancer and mitochondrial database were analyzed by Venn diagram. GO and KEGG enrichment analyzed the overlapping genes. STRING and Cytoscape analyzed overlapping gene interaction networks and screen core genes. Interaction between puerarin and core genes was docked with autodock. Cell proliferation, apoptosis and invasion capacity were measured by CCK-8, EdU, TUNEL and Transwell experiments, mitochondrial membrane potential was measured by Mito-Tracker experiments and protein expression levels were measured by Western blot. Anti-tumor efficacy of puerarin was analyzed by subcutaneous xenograft of breast cancer and immunohistochemical assay *in vivo*. **Results** Among 132 overlapping genes in breast cancer and mitochondrial disease, 10 core differentially expressed genes were selected. Among these core genes, dual serine/threonine and tyrosine protein kinase (DST) was low expressed in breast cancer tissues. Puerarin bound to DST, up-regulated its expression, inhibited the proliferation and invasion of HCC1806 breast cancer cells, promoted breast cell apoptosis, increased the expression levels of apoptosis-related proteins Cleaved-Caspase 3 and Bax, down-regulated the expression of anti-apoptosis protein Bcl-2, and decreased mitochondrial membrane potential. *In vivo*, puerarin inhibited the growth of breast cancer and up-regulated the expression of DST in tumor tissues. **Conclusion** Puerarin inhibits the proliferation and invasion of breast cancer cells, promotes the apoptosis of cancer cells and inhibits breast cancer growth.

Key words puerarin; mitochondria; breast cancer; network pharmacology; molecular docking; DST