

· 论著 ·

基于网络药理学和分子对接的苦参抗乳腺癌潜在机制研究

张 敏^{1,2}, 汪晓河¹, 周阳云¹, 石美智¹, 韩忻云³, 韩向晖², 陈君君¹ (1. 上海市第六人民医院药剂科, 上海 201306; 2. 上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所, 上海 200032; 3. 华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的 采用网络药理学和分子对接的方法分析苦参抗乳腺癌的主要活性成分及潜在分子机制。方法 采用 TCSP、ETCM 数据库和查阅国内外文献收集筛选苦参化学成分, 通过 Swiss Target Prediction 数据库对有效活性成分的靶点进行预测, 通过 GeneCards、TTD、Drugbank、OMIM 收集乳腺癌相关靶点, 根据 Venny 2.1.0 软件筛选出苦参抗乳腺癌疾病靶点; 采用 Cytoscape 软件构建苦参-核心活性成分-靶点网络图, 用 STRING 数据库分析共有靶点, 构建 PPI 网络图, 通过 DAVID 数据库和 Hplot 平台对关键靶点蛋白进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并采用 Schrodinger 软件对活性成分与靶点进行分子对接, 同时采用分子生物学方法对关键靶点进行验证。结果 从苦参中共筛选出结构明确的活性成分 36 个, 筛选出 70 个苦参抗乳腺癌的疾病靶点, 其中 EGFR、AKT1、ESR1、SRC、CYP19A1、AR、ABCB1 等 12 个核心靶点参与乳腺癌中内分泌抵抗、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、雌激素等信号通路, 且核心成分与关键靶点 AR 之间的结合能最高。体外细胞实验显示, 苦参提取物可抑制乳腺癌细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 上调 AR 蛋白的表达。结论 苦参通过多成分作用于多靶点和多个信号通路, 调节复杂的生物过程发挥抗乳腺癌的作用, 苦参对 AR 蛋白的上调可能成为治疗乳腺癌新的治疗策略。

[关键词] 苦参; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; 雌激素受体

[文章编号] 2097-2024(2023)12-0722-11

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202302001

Potential mechanism of *Sophora flavescens* against breast cancer via network pharmacology and molecular docking

ZHANG Min^{1,2}, WANG Xiaohu¹, ZHOU Yangyun¹, SHI Meizhi¹, HAN Xinyun³, HAN Xianghui², CHEN Junjun¹ (1. Department of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Chinese Traditional Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the main active components and potential molecular mechanism of *Sophora flavescens* against breast cancer based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** The chemical constituents were collected and screened by TCSP, ETCM database and literature review. The targets of active ingredients were predicted by Swiss Target Prediction database. Breast cancer-related targets were collected by GeneCards, TTD, Drugbank and OMIM. The anti-breast cancer targets of *Sophora flavescens* were screened by Venny 2.1.0 software. Cytoscape software was used to construct the network diagram of *Sophora flavescens*-key active ingredients-targets. STRING database was used to analyze the common targets, and PPI network diagram was constructed. GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of key target proteins were performed by DAVID database and Hplot online platform. Schrodinger software was used to calculate the molecular docking between the active ingredients and targets. Molecular biological methods were used to verify the key targets. **Results** A total of 36 active components with clear structures were screened from *Sophora flavescens*. 70 anti-breast cancer targets of *Sophora flavescens* were screened out. 12 core targets including EGFR, AKT1, ESR1, SRC, CYP19A1, AR and ABCB1 participate in endocrine resistance, EGFR tyrosine kinase inhibitors and estrogen signaling pathways in breast cancer. Moreover, the docking score between the core component and the key target AR is the highest. *In vitro* experiments showed that the extract of *Sophora flavescens* can inhibit the proliferation of breast cancer cells, induce cell apoptosis and up-regulate AR protein expression. **Conclusion** It was revealed that *Sophora flavescens* plays an anti-breast cancer role by regulating complex biological processes through multiple components acting on multiple targets and signaling pathways. The upregulation of AR protein by *Sophora flavescens* may become a new therapeutic strategy for the treatment of breast cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82003987)

[作者简介] 张 敏, 硕士, 药师, 研究方向: 中药药理学, Email: zhangmin-ruby@163.com

[通信作者] 陈君君, 博士, 主管药师, 研究方向: 中药抗肿瘤药理学、临床药理学, Email: chenjunjun8812@sina.com

[Key words] *Sophora flavescens*; breast cancer; network pharmacology; molecular docking; androgen receptor

乳腺癌是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,居女性癌症发病率的首位,是引起女性死亡的主要原因之一^[1]。乳腺癌最常用的联合化疗可降低复发率,但引起的肿瘤细胞多药耐药和严重的不良反应限制了其临床疗效。中医药已被广泛用于癌症的治疗,可通过提高肿瘤对药物的敏感性、调节机体免疫功能,增强化疗效果,改善患者预后^[2]。其优势主要体现在中药作用多靶点、多途径而产生广泛的生物活性和较低的毒性,现已被用作乳腺癌在内的多种癌症的替代疗法^[3]。

苦参(*Sophora flavescens*)味苦性寒,始载于《神农本草经》,具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效。苦参的主要化学成分包括生物碱、黄酮类、苯丙素、萜类、甾体、有机酸和挥发油等。其中苦参生物碱占 3%,苦参黄酮占 1.5%,是苦参的两类特征性成分,具有抗炎和抗肿瘤等药理作用,对急性髓系白血病、鼻咽癌、宫颈癌、乳腺癌、结直肠癌、膀胱癌、胰腺癌等均显示出较好的抗肿瘤活性^[4]。

目前关于苦参抗乳腺癌的研究多局限于探索苦参中某种活性成分作用于特定靶点或通路的抗乳腺癌的机制,未从整体角度阐释苦参抗乳腺癌的作用机制。因此,本研究基于网络药理学的方法,从中药作用的整体理论和中医药现代化的研究思路,探究苦参抗乳腺癌的作用,初步构建其主要活性成分作用于多靶点、多通路的作用机制网络,为开发基于苦参的抗乳腺癌新药和临床用药提供参考^[5-6]。

1 资料和方法

1.1 数据库与软件

中药系统药理学分析平台(TCMSP);中医药百科全书数据库(ETCM);通用蛋白质数据库(UniProt);人类基因数据库(Genecards);生物信息学和化学信息学数据库(Drugbank);人类孟德尔遗传数据库(OMIM);治疗靶点数据库(TTD);蛋白质互作平台(STRING10.5);生物学信息注释数据库(DAVID 6.8)。数据库检索日期为 2021 年 12 月。

1.2 苦参活性成分的筛选

应用 TCMSP 数据库检索关键词“苦参”的所有活性成分,选择“ingredient”,设置阈值标准为:口服生物利用度(OB)≥30%,且类药性(DL)≥0.18,并结合 ETCM 数据库和国内外文献,筛选出苦参的活性成分。

1.3 苦参活性成分靶点的筛选

从 PubChem 数据库获得筛选出的苦参活性成分的 2D 结构式导入 Swiss Target Prediction 数据库,预测苦参活性成分的靶点,物种选择 *Homo sapiens*,导入结构式,筛选与苦参活性化合物相关的作用靶点。通过 UniProt 数据库,将检索得到的所有靶点蛋白校正为其标准名称。

1.4 乳腺癌靶点的筛选

将搜索关键词设置为“breast cancer”,使用 GeneCards、Drugbank、OMIM、TTD 数据库对癌症的靶点进行搜索,将 Drugbank、OMIM、TTD 数据库中的乳腺癌相关基因进行合并、去重后,得到乳腺癌的靶点^[7]。

1.5 苦参抗乳腺癌靶点的筛选

将以上四个数据库获取的乳腺癌靶基因与苦参活性成分靶基因输入 Venny 2.1.0 软件,取交集作为苦参抗乳腺癌的靶点,筛选出苦参抗乳腺癌的潜在靶点。

1.6 苦参-核心活性成分-靶点网络的构建

将上述靶点及主要活性成分导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建苦参抗乳腺癌的苦参-核心活性成分-靶点网络图。用 Cytoscape 3.7.2 软件中“Network analyzer”功能,对网络拓扑属性进行分析,得到苦参抗乳腺癌的主要活性成分。

1.7 苦参蛋白互作网络构建

将上述得到的主要靶基因上传到 STRING 数据库,设置物种为“*Homo sapiens*”,进行检索,利用 STRING 数据库对 PPI 网络图进行分析,得到相关靶点参数。将该参数上传至 Cytoscape 3.7.2 软件,构建苦参蛋白互作网络(PPI)图。

1.8 苦参抗乳腺癌靶点的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

将苦参抗乳腺癌靶点输入 DAVID 6.8 平台,结合 Hplot 平台分别进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析,依据 $P < 0.01$,筛选苦参抗乳腺癌的靶点富集的生物功能及信号通路。

1.9 活性成分与靶点的分子对接验证

根据苦参抗乳腺癌的苦参-核心活性成分-靶点网络图,选择核心活性成分与主要靶点进行分子对接。从 PubChem 数据库下载苦参核心活性成分的 SDF 文件,在 PDB 数据库寻找各主要靶点的 PDB 文件,利用 Schrodinger 2018 软件进行分子对接。

1.10 实验验证

1.10.1 细胞株

人乳腺癌 MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库。以含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基添加 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱培养, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.10.2 药品和试剂

苦参提取物(原药材生药量=20:1, 批号: 20220710, 西安瑞迪生物科技有限公司); 胎牛血清(批号: 10099-141)、胰蛋白酶(批号: 2323491)购自 GIBCO; DMEM 高糖培养基(批号: 8122184, Hyclone); CCK8 试剂盒(批号: C0039)、Hoechst 33342 荧光染料(批号: C1029)购自碧云天生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛(批号: CR2110036)、Androgen Receptor (AR) 抗体(批号: GB11253)、cy3-山羊抗兔二抗(批号: GB21303)、DAPI 染料(批号: G1012)、抗荧光淬灭封片剂(批号: G1401)购自 Servicebio。

1.10.3 CCK8 法检测细胞存活率

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /ml, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入不同浓度的苦参提取物(0、1.25、2.5、5、10、20、40 mg/ml), 每组设置 6 个复孔。空白组加入相应的无细胞培养基, 相同处理。药物作用 24 h 后, 显微镜下观察并拍照; 吸弃原培养基, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 100 μ l 含有 10 μ l 的 CCK8 的新鲜培养基, 于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中继续培养 2 h 后, 多功能酶标仪测定 450 nm 波长处 OD 值, 根据 OD 值计算细胞的存活率: 细胞存活率=[(给药组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)] $\times$ 100%。

1.10.4 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡能力

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /ml, 接种于 6 孔板中, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入不同浓度的苦参提取物处理, 药物作用 48 h 后, 吸弃原培养基, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 1 ml 含有 100 μ l Hoechst 33342 染色液的新鲜培养基, 室温染色 20 min 后, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察并拍照, 并使用 Image J 软件进行荧光定量分析。

1.10.5 免疫荧光检测 AR 蛋白的表达情况

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞密度至 1×10^5 /ml, 接种于 6 孔板细胞爬片上, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入不同浓度的苦参提取物处理,

药物作用 48 h 后, 吸弃原培养基, PBS 洗涤 3 次, 每孔加 1 ml 4% 的多聚甲醛, 固定细胞 15 min, 弃去固定液, PBS 洗涤 3 次, 加入细胞破膜液破膜 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。每孔加入 1 ml 的 5% BSA 溶液, 置于摇床上室温封闭 30 min, 弃去封闭液, 加入 AR 一抗(1:500 稀释), 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入荧光素标记的 cy3-山羊抗兔二抗, 摇床上室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 1 μ g/ml DAPI, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。待玻片稍干后, 用抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察并分别采集 AR 染色、DAPI 染色及两者合并图像, 并使用 Image J 软件进行荧光定量分析, 每孔至少随机选取 3 个不同视野。

2 结果

2.1 苦参中活性化合物的筛选

在 TCMSP 数据库中检索苦参共得到 113 个化合物, 根据 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18, 结合 ETCM 数据库和国内外文献, 最终确定结构明确的化合物 36 种, 见表 1。

2.2 苦参抗乳腺癌的作用靶点及主要成分预测

通过 Swiss Target Prediction 数据库预测共得到苦参活性成分的药物靶点 509 个, 分别从 TTD 数据库、Drugbank 数据库和 OMIM 数据库获取乳腺癌疾病靶点 137 个、244 个和 506 个, 去除重复项得到 756 个疾病靶点。从 GeneCards 数据库获得乳腺癌疾病靶点 15230 个, 保留分值 $\geq$ 4.38(2 倍中位数)的疾病靶点 3813 个, 合并 4 个数据库检索结果并删去重复项, 得到 275 个乳腺癌相关靶点。采用 Venny 2.1 软件, 绘制苦参活性成分靶点与乳腺癌疾病靶点韦恩图, 得到 70 个共有靶点(图 1)。

2.3 苦参活性成分-靶点互作网络

根据 Cytoscape 3.7.2 软件绘制的苦参抗乳腺癌“中药-活性成分-靶点”网络图的参数, 筛选化合物 Degree(度)值 $>$ 5 的节点, 共筛选出 24 种核心活性成分, 对应 67 个靶点, 构建苦参抗乳腺癌的“中药-核心活性成分-靶点”网络图, 如图 2 所示, 每个参与互作的蛋白节点用一个圆圈表示, 圆圈面积越大、颜色越深表示其 Degree 值越大, 在药物-核心活性成分-靶点网络中, 总共包括 92 个节点(其中包含 1 个药物节点、24 个化合物节点和 67 个靶点节点)和 630 条边。按照 Degree(度)值 $>$ 5 排列活性成分, 从中可见木犀草素、槲皮素、菜豆素、甘草素等的 Degree 值最大, 是苦参抗乳腺癌的核心活

表 1 苦参中 36 种活性化合物基本信息

分子编号	化合物名称	分子式	OB(%)	DL
MOL006596	大豆素	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	97.27	0.76
MOL000456	菜豆素	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	78.20	0.73
MOL001484	高丽槐素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	75.18	0.54
MOL004941	甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	71.12	0.18
MOL000392	刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	69.67	0.21
MOL006565	异苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	68.68	0.25
MOL003648	山槐素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	65.83	0.54
MOL003627	槐果碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	64.26	0.25
MOL005944	苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	63.77	0.25
MOL006627	12,13-去氢苦参碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	62.23	0.25
MOL006571	安纳基林	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	62.01	0.24
MOL006626	勒奇黄烷酮 G	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	60.97	0.40
MOL003680	槐定碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	60.07	0.25
MOL006566	12,13-去氢苦参碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	58.34	0.25
MOL006649	5 α -羟基苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	55.42	0.28
MOL006630	去甲藤黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	54.93	0.24
MOL006628	白羽扇豆碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	52.71	0.24
MOL006623	苦参新醇 T	C ₂₅ H ₃₀ O ₇	51.28	0.64
MOL006650	三叶豆紫檀苷丙二酸酯	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	48.69	0.52
MOL006652	三叶豆紫檀苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	48.53	0.74
MOL006604	异黄腐醇	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	48.09	0.39
MOL005100	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	47.74	0.27
MOL006613	苦参素	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	47.62	0.38
MOL000098	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	46.43	0.28
MOL003347	贯叶金丝桃素	C ₃₅ H ₅₂ O ₄	44.03	0.60
MOL003673	怀特酮	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	42.80	0.36
MOL006622	苦参新醇 O	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	42.41	0.76
MOL001040	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	42.36	0.21
MOL003676	槐胺碱	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	42.16	0.25
MOL006582	5 α ,9 α -二羟基苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	40.93	0.32
MOL003542	8-异戊烯醇去甲基淫羊藿苷	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	38.04	0.39
MOL006569	14 β -羟基苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	37.26	0.29
MOL000006	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	36.16	0.25
MOL006561	14 α -羟基苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	35.73	0.29
MOL006570	9 α -羟基槐胺碱	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	35.23	0.29
MOL006563	9 α -羟基苦参碱	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	32.04	0.29

性成分。

为了更好地理解苦参抗乳腺癌的作用机制,按照 Degree>5 排列主要靶点,筛选出苦参抗乳腺癌的主要疾病靶点 25 个。用 STRING 数据库分析该网络参数,导入 Cytoscape 软件构建苦参蛋白互作

网络(PPI)图,以明确生物分子间相互作用相关的重要靶蛋白(图 3)。筛选出前 12 位的主要核心靶蛋白为 EGFR、AKT1、ESR1、SRC、CYP19A1、AR、ABCB1、CDK1、ESR2、KDR、IGF1R 和 TOP1,各核心靶点的拓扑参数见表 2。

2.4 苦参抗乳腺癌靶点的 GO 功能富集分析

利用 DAVID 数据库对筛选出的 12 个关键靶

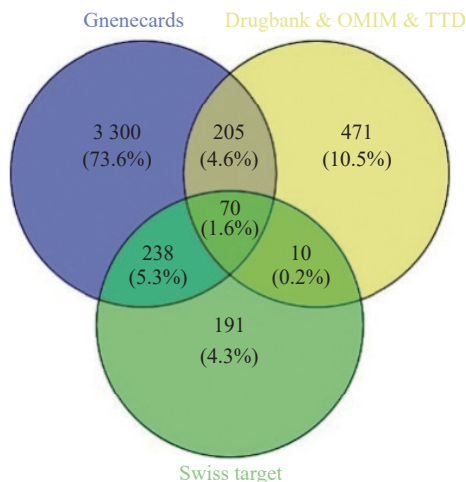


图 1 苦参抗乳腺癌靶点韦恩图

点进行 GO 功能富集分析, 依据 $P < 0.01$, 选出 GO 条目 49 个, 其中生物过程(BP)29 个, 分子功能(MF)17 个, 及细胞组成(CC)3 个。利用 Hiplot 在线平台对每个种类的前 15 个条目进行可视化分析。结果显示, 苦参抗乳腺癌靶点的生物过程主要涉及蛋白自磷酸化、凋亡过程的负向调控、信号转导、细胞增殖、胞内雌激素受体信号通路等。分子功能涉及酶结合反应、一氧化氮合成酶调节活性、蛋白酪氨酸激酶活性、染色质结合反应、类固醇结合反应等。细胞过程涉及细胞核、细胞质膜和细胞膜(图 4)。

2.5 苦参抗乳腺癌靶点的 KEGG 通路富集分析

采用 Hiplot 在线平台对苦参关键作用靶点的 KEGG 信号通路进行富集分析, 依据 $P < 0.01$ 筛选 KEGG 信号通路, 以 Gene Ratio 代表目标基因中属

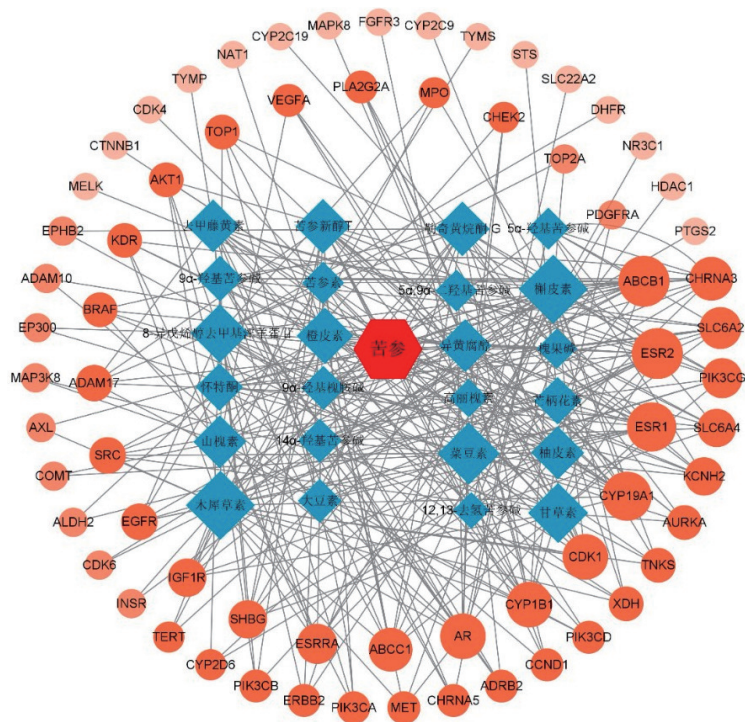


图 2 苦参-核心活性成分-靶点网络图

注: 蓝色菱形表示核心活性成分, 橙色圆形表示靶点

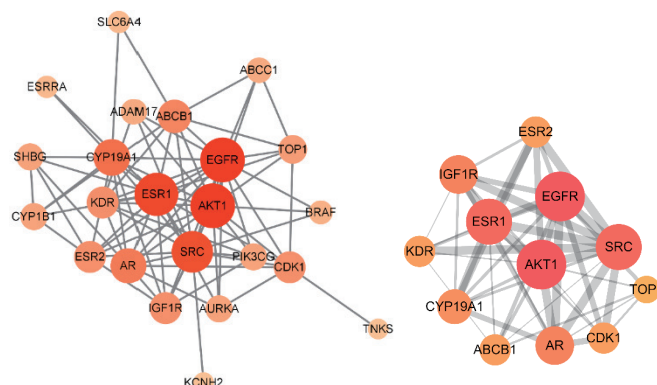


图 3 苦参抗乳腺癌的 PPI 网络 (筛选后)

表 2 核心靶点及其拓扑参数

靶点	蛋白名称	度	介数	紧密度
EGFR	表皮生长因子受体	16	1.28×10^{-1}	7.86×10^{-1}
AKT1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1	16	1.28×10^{-1}	7.86×10^{-1}
ESR1	雌激素受体 α	15	1.45×10^{-1}	7.59×10^{-1}
SRC	非受体酪氨酸激酶 Src	14	1.58×10^{-1}	7.33×10^{-1}
CYP19A1	细胞色素P450酶 19A1	11	0.95×10^{-1}	6.47×10^{-1}
AR	雄激素受体	10	0.32×10^{-1}	6.47×10^{-1}
ABCB1	ATP结合盒B亚家族成员1	9	0.65×10^{-1}	6.11×10^{-1}
CDK1	周期素依赖性激酶1	8	0.97×10^{-1}	5.95×10^{-1}
ESR2	雌激素受体 β	8	0.18×10^{-1}	5.95×10^{-1}
KDR	血管内皮生长因子受体2	8	0.12×10^{-1}	5.95×10^{-1}
IGF1R	胰岛素样生长因子1受体	8	0.08×10^{-1}	5.95×10^{-1}
TOP1	DNA拓扑异构酶1	6	0.08×10^{-1}	5.64×10^{-1}

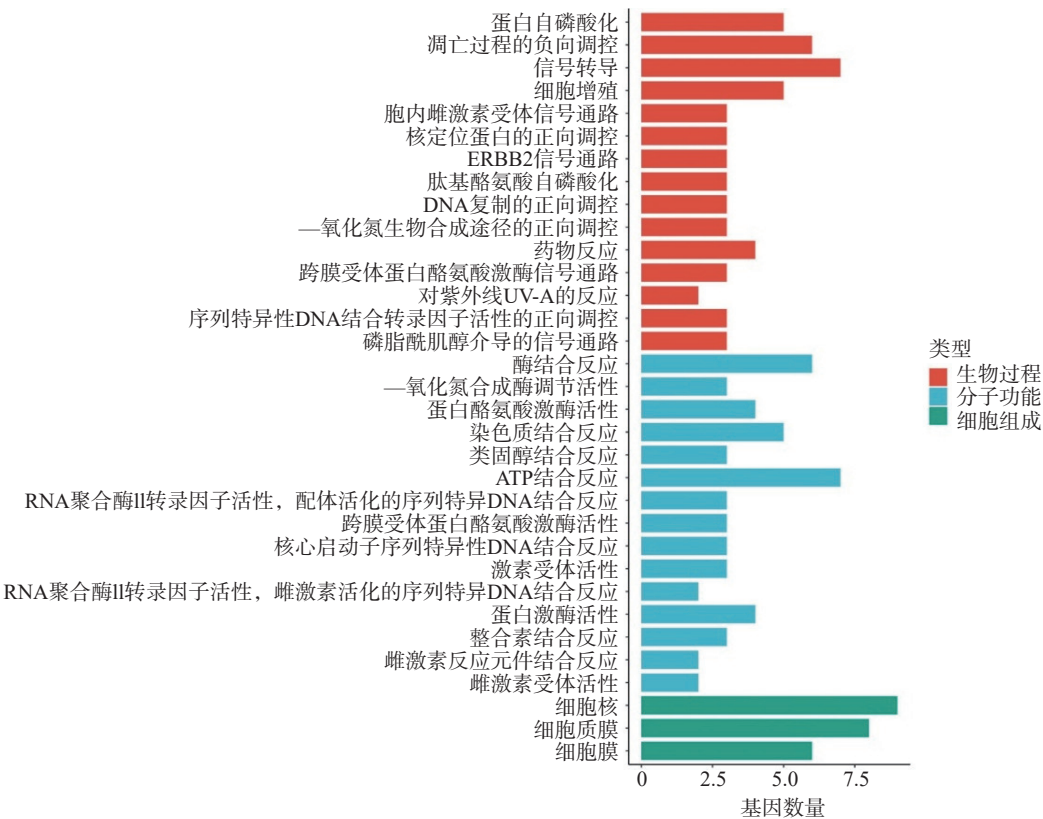


图 4 苦参抗乳腺癌关键靶点的 GO 富集分析

于这个 pathway 的基因的数量在背景基因中所占的百分比, P 值以及调控通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度, 其中气泡颜色代表 P 值的大小, Gene Ratio 代表富集的程度大小, 气泡大小代表该通路中目标基因的数量, 对前 15 个通路进行可视化分析, 同时绘制苦参抗乳腺癌的基因-概念网络图。图 5 所示, 按照 P 值从小到大富集的通路为内分泌抵抗、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、肿瘤中的蛋白多糖、雌激素信号通路、乳腺癌、催乳素信

号通路、黏着斑、Rap1 信号通路、前列腺癌、VEGF 信号通路、黏附连接、黑色素瘤、神经胶质瘤、ErbB 信号通路、Ras 信号通路; 各信号通路对应的靶点包括 SRC、IGF1R、ESR2、ESR1、EGFR、AKT1、KDR 和 AR(图 6)。

2.6 苦参抗乳腺癌活性成分与靶点的分子对接验证
将 24 种核心活性成分的分子配体与 12 个靶点进行分子对接, 得到 275 组分子对接数据。各靶点与核心活性成分对接能力的交叉数据如图 7 所

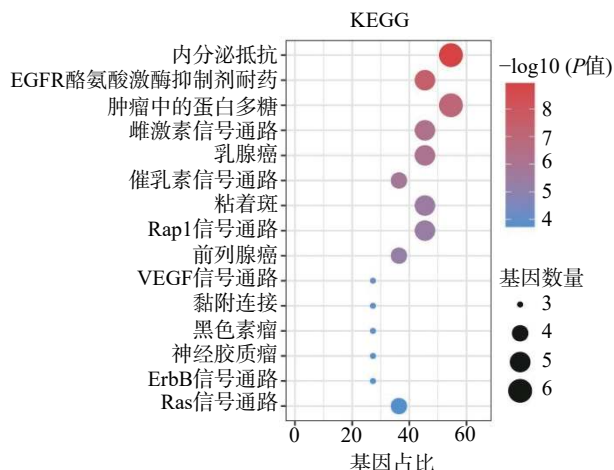


图5 苦参抗乳腺癌关键靶点的 KEGG 通路富集分析

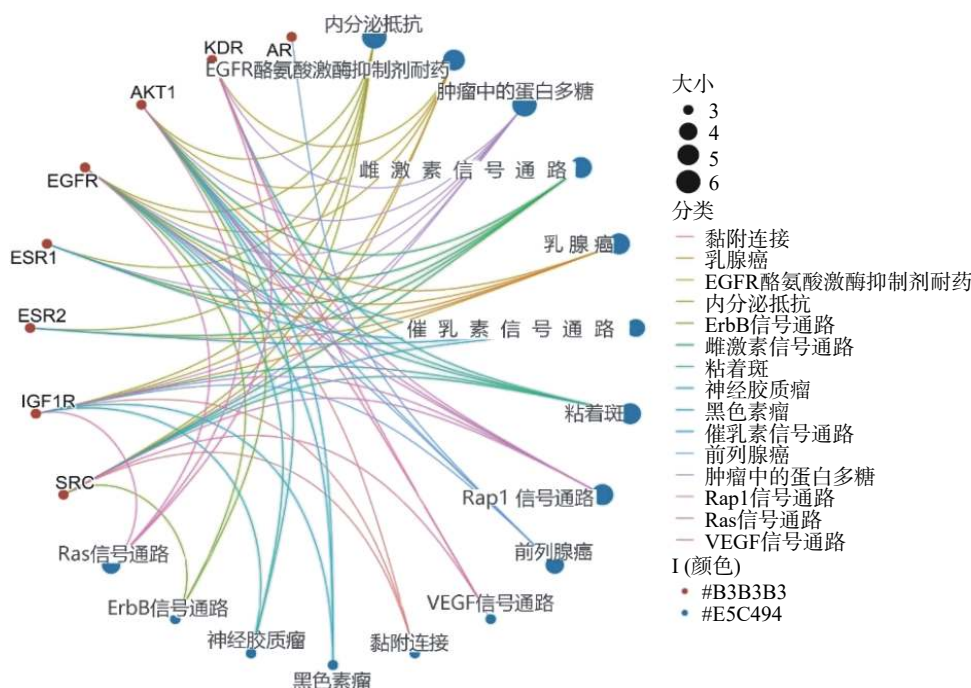


图6 苦参抗乳腺癌关键靶点的基因-概念网络图

2.8 苦参提取物诱导 MCF-7 细胞凋亡

采用 Hoechst33342 荧光染色观察细胞凋亡形态变化,空白对照组的 MCF-7 细胞生长状态良好,细胞膜和细胞核形态正常,细胞核呈现均匀的淡蓝色弥散的荧光,未观察到明显凋亡的细胞形态;KS 各浓度组 Hoechst33342 荧光强度较空白对照组显著增强 ($P<0.01$),细胞形态发生变化,细胞数量略有减少,细胞呈不规则膨胀或皱缩,部分细胞膜破裂,细胞核呈碎块状致密浓染,且当 KS 浓度为 20 mg/ml 时,细胞凋亡特征最为明显,凋亡数量明显增加,荧光强度最强呈现蓝白色,表明 KS 可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡(图 9)。

2.9 苦参提取物上调乳腺癌细胞 AR 蛋白的表达

为验证苦参作用靶点的分子对接结果,采用免

示,图中红色越深,表示结合自由能越高,对接能力越强。结果显示活性成分与靶点 EGFR、ESR1、CYP19A1、AR 和 ESR2 等的对接能力较好。苦参中三种活性成分:甘草素、柚皮素和怀特酮与关键靶点 AR 结合的对接分数均大于 10,结合能力较其他活性成分和靶点更强。

2.7 苦参提取物抑制 MCF-7 细胞增殖

CCK8 检测结果显示, MCF-7 细胞的存活率随着苦参提取物(KS)浓度的增大而降低,呈现药物浓度依赖性,当 KS 浓度达到 20 mg/ml 时, MCF-7 细胞的存活率约为 49%(图 8A);绘制 KS 对 MCF-7 细胞作用的 IC_{50} 曲线,计算 IC_{50} 值约为 17.3 mg/ml(图 8B)。

免疫荧光染色检测 MCF-7 细胞内 AR 蛋白定位和表达水平。采用 DAPI 对细胞核进行染色,发现 AR 定位在细胞核内。与对照组相比, 20 mg/ml 的 KS 浓度组, AR 荧光强度显著最强 ($P<0.01$),提示 KS 可显著上调 AR 蛋白的表达水平,与分子对接的结果一致(图 10)。

3 讨论

乳腺癌在《妇人大全良方》《本草纲目》等中医古籍属“乳岩”“乳石痈”的范畴,由于肝伤失其条达,气血瘀滞,热毒结滞于乳中而发病。热毒是导致恶性肿瘤发生发展的主要原因,脏腑经络、气血津液受热毒侵犯是恶性肿瘤发生发展的关键^[8]。扶正和祛邪是中药在肿瘤综合治疗过程中的两个重

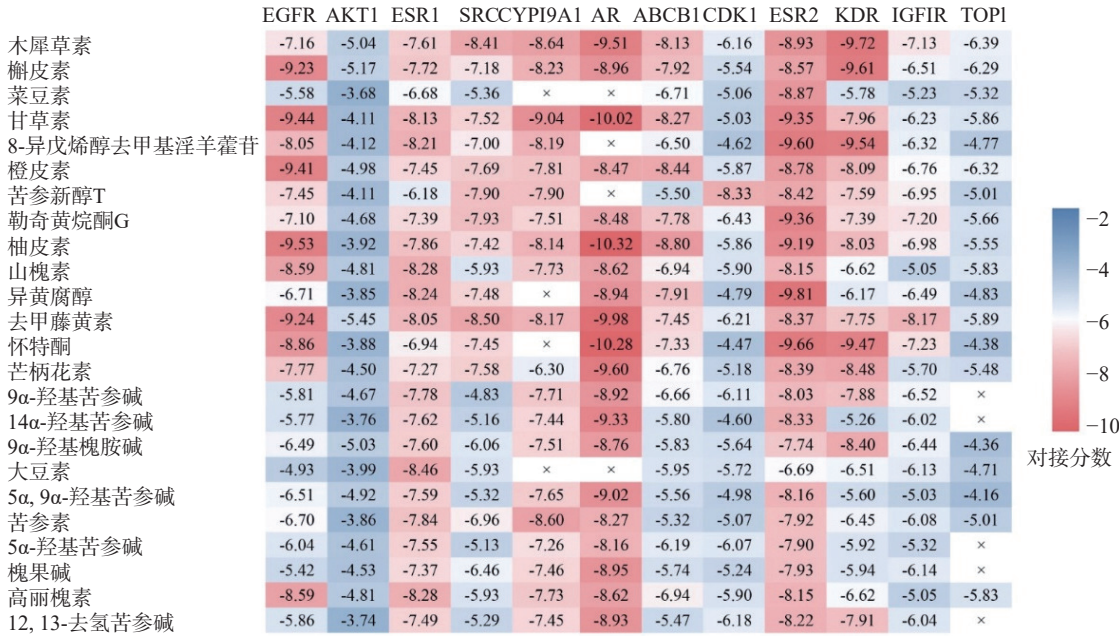


图 7 分子对接分数的热图分析

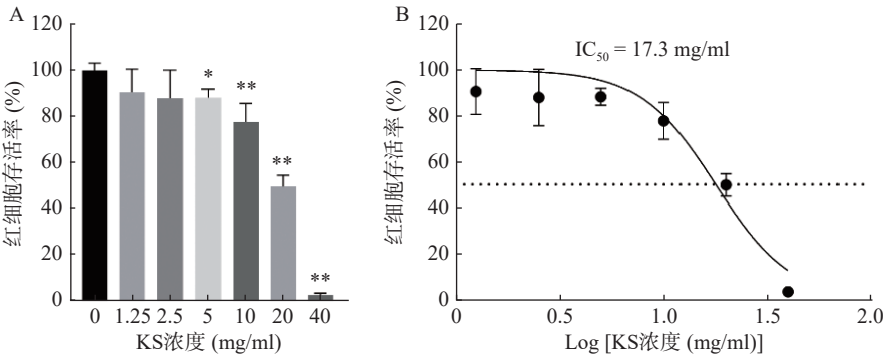


图 8 CCK8 检测 MCF-7 细胞增殖能力

A. KS 对细胞存活率的影响; B. KS 对细胞作用的 IC₅₀ 曲线;
P*<0.05, *P*<0.01, 与空白对照组比较

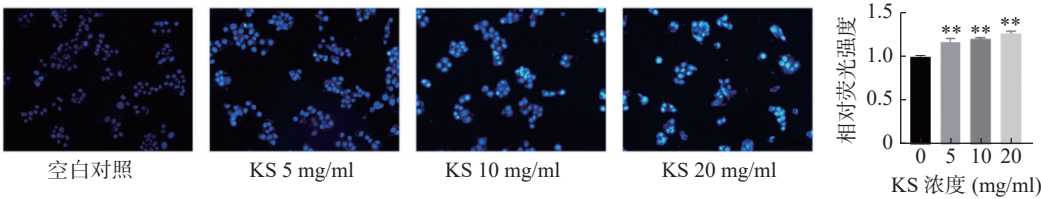
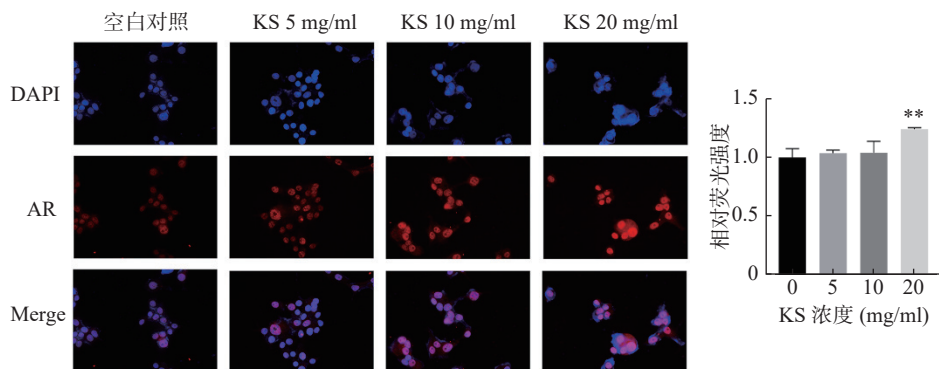


图 9 Hoechst33342 荧光染色检测 MCF-7 细胞凋亡 (×200)

***P*<0.01, 与空白对照组比较

要环节,祛邪类药物主要以清热解毒、软坚散结、活血化痰等功效为主,具有诱导细胞分化、促进细胞凋亡、逆转多药耐药、抗侵袭转移等多方面的作用^[9]。因此,清热解毒属祛邪的范畴,可作为乳腺癌的主要治法之一。苦参具有清热燥湿、杀虫、利尿之功效,在传统医学中主要用于治疗湿热黄疸、泻痢、皮肤瘙痒等病症。现代药理学研究表明,苦参具有抗氧化、抗炎、抗心律失常、平喘、抗溃疡和抗肿瘤等多种药理活性^[10]。在抗肿瘤方面的研究

显示,苦参及其制剂在抗肿瘤、减轻化疗不良反应和逆转肿瘤耐药方面均发挥重要作用。本研究构建的苦参-核心活性成分-靶点网络发现苦参抗乳腺癌的核心成分有 24 种,主要为黄酮类和生物碱类。靶点 EGFR、AKT1、ESR1、SRC、CYP19A1、AR、ABCB1、CDK1、ESR2、KDR、IGF1R 和 TOP1 在苦参抗乳腺癌中发挥了重要作用。EGFR 属于受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族成员,几乎在所有亚型的乳腺癌患者中常过度表达^[11]。本研究发

图 10 免疫荧光染色观察 MCF-7 细胞 AR 表达水平 ($\times 200$)** $P < 0.01$, 与空白对照组比较

现苦参最核心的作用靶点为 EGFR。EGFR 表达增加与乳腺癌的发生发展有关, 可通过激活 Ras-Raf-MEK-ERK、PI3K-Akt-mTOR 和 Src-STAT3 通路来发挥作用^[12-13]。有研究显示 EGFR 介导的 β -连环蛋白核蓄积对于 AKT1 抑制诱导的乳腺癌转移至关重要^[14]。AKT1 属于 AKT 家族成员, 是本研究显示的苦参作用的关键靶点之一。有研究表明 AKT1 和细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)之间存在交叉调节, 两者在不同亚型乳腺癌中的表达呈正相关性, 且在 Luminal A、Luminal B 和三阴性乳腺癌中的相关性最强^[15-16]。基于二代测序分析显示, AKT1 基因突变与原发乳腺癌相比在转移性乳腺癌中显著富集, 并被明确为可调控的靶点^[17-18]。目前, 已有多种靶向 AKT 的小分子抑制剂正在进行临床试验, 可能为包括三阴性乳腺癌在内的难治性乳腺癌患者带来新的希望^[19]。但 AKT1 抑制乳腺癌转移的具体机制和下游信号通路尚不完全清楚^[20-21]。而单纯的 AKT 抑制剂作为抗癌药物可能带来争议, 如药物开发难度大价格昂贵, 对靶点的选择特异性问题导致的不良反应包括高血糖、腹泻、皮疹及可能出现的其他不利因素^[22-23]。而 AKT 抑制剂 Capivasertib(AZD5363)在 AKT1 突变肿瘤患者中表现出显著的临床意义, 特别是对于 ER 阳性的乳腺癌患者^[24]; 同样, AKT 抑制剂 GDC-0068 在三阴性乳腺癌中与紫杉醇联用也延长了患者的无进展生存期^[25]。本研究中显示的苦参中核心活性成分对 AKT1 的靶向性可能为乳腺癌患者治疗药物的开发带来新的思路。

内分泌治疗在 ER 阳性乳腺癌患者的治疗中占有举足轻重的地位, 该疗法包括选择性雌激素受体调节剂 (SERMs), 选择性雌激素受体抑制剂 (SERDs) 和芳香化酶抑制剂 (AIs)。ESR1 基因是编码 ER 的基因, 在 ER 阳性乳腺癌中存在 ESR1

基因突变、扩增和融合, 但扩增和融合的频率远低于点突变且与耐药的相关性仍不明确^[26]。药物靶点本身的突变通常是肿瘤逃避药物作用的优先机制, ESR1 突变已成为内分泌抵抗的关键机制, 近年来研究发现 ESR1 配体结合域 (LBD) 的突变是 ER 阳性转移性乳腺癌耐药的常见驱动因素^[27]。这些 LBD 点突变可通过不依赖激素的 ER 转录活性, 直接导致乳腺癌对 AI 的抗性并降低对他莫昔芬和氟维司群的敏感性^[28]。而雄激素受体 (AR) 在 ER 阳性的乳腺癌中的作用一直以来都存在争议, 最新的研究显示, AR 通过改变 ER 和关键转录共激活因子的基因组分布, 在内分泌抵抗的 ER 阳性乳腺癌中发挥抑癌作用, 并支持 AR 激动剂作为 ER 阳性乳腺癌的治疗策略^[29]。此外, 研究者采用中药方剂治疗三阴性乳腺癌患者, 发现 AR 阳性的三阴性乳腺癌患者预后优于 AR 阴性患者^[30]。但目前尚无 AR 激动剂被用于乳腺癌的治疗, 且苦参作为具有多靶点作用的中药, 与 AR 特异性抑制剂的作用机制存在一定差异。本研究发现内分泌抵抗是苦参抗乳腺癌最核心的通路, 分子对接的结果显示主要活性成分与靶点 AR 的结合能最高。在体外细胞实验中, 发现苦参提取物可显著抑制 ER 表达阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 上调 AR 蛋白的表达, 进一步验证了分子对接的结果, 提示苦参对 AR 的上调可能成为治疗乳腺癌新的治疗策略, 为乳腺癌新的治疗方案提供理论依据。

综上所述, 本研究通过网络药理学发现苦参核心成分的主要靶点包括 AKT1、ESR1、CYP19A1 和 AR 等, 提示苦参可能通过多靶点增强乳腺癌对内分泌治疗的敏感性。分子对接的结果显示苦参核心成分与 AR 的结合能力最强, 体外实验也验证了苦参对 AR 表达的上调作用, 提示苦参对 AR 的

上调可能成为治疗乳腺癌新的治疗策略。但本研究还存在一定的局限性,如本研究以单味中药苦参作为研究对象分析其抗乳腺癌的活性成分和作用机制,而以苦参为主要组分的中药复方或中成药在临床中的应用更为常见,其他辅助中药也可能会发挥协同抗乳腺癌的作用。此外,本研究以网络药理学的方法分析苦参抗乳腺癌的作用机制,这些研究结果还需要更多的基础实验和临床研究来进一步验证。

【参考文献】

- [1] SIEGEL R, MILLER K, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73: 17-48.
- [2] ZHANG X Y, QIU H, LI C S, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer[J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(5): 283-298.
- [3] GREENLEE H, DUPONT-REYES M J, BALNEAVES L G, et al. Clinical practice guidelines on the evidence-based use of integrative therapies during and after breast cancer treatment[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 194-232.
- [4] CHEN M H, GU Y Y, ZHANG A L, et al. Biological effects and mechanisms of matrine and other constituents of *Sophora flavescens* in colorectal cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 171: 105778.
- [5] 李梢. 基于生物网络调控的方剂研究模式与实践 [J]. 中西医结合学报, 2007, 5(5): 489-493.
- [6] 林玲, 吴勤研, 宋熙薇. 基于网络药理学的康艾注射液抗非小细胞肺癌作用机制分析 [J]. 药学与临床研究, 2021, 29(2): 86-91.
- [7] WANG Y X, ZHANG S, LI F C, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D1031-D1041.
- [8] 李华华, 杨峰, 裴俊文, 等. 杨峰教授在清热解毒理论指导下运用复方苦参注射液治疗恶性肿瘤经验 [J]. 中医研究, 2021, 34(7): 74-76.
- [9] 李佳鑫, 王冰, 于森. 基于“扶正祛邪”治则的中药抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5751-5757.
- [10] LI J J, ZHANG X, SHEN X C, et al. Phytochemistry and biological properties of isoprenoid flavonoids from *Sophora flavescens* Ait[J]. *Fitoterapia*, 2020, 143: 104556.
- [11] MASUDA H, ZHANG D W, BARTHOLOMEUSZ C, et al. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(2): 331-345.
- [12] BURNES M L, GRUSHKO T A, OLOPADE O I. Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker?[J]. *Cancer J*, 2010, 16(1): 23-32.
- [13] NAKAI K, HUNG M C, YAMAGUCHI H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(8): 1609-1623.
- [14] LI W, HOU J Z, NIU J, et al. Akt1 inhibition promotes breast cancer metastasis through EGFR-mediated β -catenin nuclear accumulation[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 82.
- [15] GAO F, ALWHAIBI A, SABBINENI H, et al. Suppression of Akt1- β -catenin pathway in advanced prostate cancer promotes TGF β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2017, 402: 177-189.
- [16] CHEN K, JIAO X M, ROCCO A D, et al. Endogenous cyclin D1 promotes the rate of onset and magnitude of mitogenic signaling via Akt1 Ser473 phosphorylation[J]. *Cell Rep*, 2020, 32(11): 108151.
- [17] GEELEN C T, SAVAS P, TEO Z L, et al. Clinical implications of prospective genomic profiling of metastatic breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 1-13.
- [18] DOSSOU A S, BASU A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1422.
- [19] SCHMID P, ABRAHAM J, CHAN S, et al. Capivasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer: the PAKT trial[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(5): 423-433.
- [20] LI C W, XIA W Y, LIM S O, et al. AKT1 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer through phosphorylation-dependent Twist1 degradation[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1451-1462.
- [21] LIU H, RADISKY D C, NELSON C M, et al. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11): 4134-4139.
- [22] HANKER A B, KAKLAMANI V, ARTEAGA C L. Challenges for the clinical development of PI3K inhibitors: strategies to improve their impact in solid tumors[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(4): 482-491.
- [23] VERNIERI C, CORTI F, NICHETTI F, et al. Everolimus versus alpelisib in advanced hormone receptor-positive HER2-negative breast cancer: targeting different nodes of the PI3K/AKT/mTORC1 pathway with different clinical implications[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 33.
- [24] HYMAN D M, SMYTH L M, DONOGHUE M T A, et al. AKT inhibition in solid tumors with AKT1 mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(20): 2251-2259.
- [25] KIM S B, DENT R, IM S A, et al. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(10): 1360-1372.
- [26] RAO G H, PIEROBON M, KIM I K, et al. Inhibition of AKT1 signaling promotes invasion and metastasis of non-small cell lung cancer cells with K-RAS or EGFR mutations[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7066.
- [27] LEI J T, GOU X X, SEKER S, et al. *ESR1* alterations and metastasis in estrogen receptor positive breast cancer[J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2019, 5: 38.
- [28] JESELSON R, BUCHWALTER G, ANGELIS C D, et al.

- ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(10): 573-583.
- [29] HICKEY T E, SELTH L A, CHIA K M, et al. The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. *Nat Med*, 2021, 27(2): 310-320.
- [30] YU L H, YU Q H, XU C C, et al. The expression of androgen receptor in triple-negative breast cancer and the effect of a traditional Chinese medicine formula on disease-free survival[J]. *Gland Surg*, 2022, 11(11): 1772-1783.
[收稿日期] 2023-02-01 [修回日期] 2023-07-07
[本文编辑] 陈盛新
-
- (上接第 709 页)
- [32] TSUN Z Y, POSSEMATO R. Amino acid management in cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 43: 22-32.
- [33] HASHIM ABDALLA M S, TAYLOR-ROBINSON S D, SHARIF A W, et al. Differences in phosphatidylcholine and bile acids in bile from Egyptian and UK patients with and without cholangiocarcinoma[J]. *HPB*, 2011, 13(6): 385-390.
- [34] SHARIF A W, WILLIAMS H R, LAMPEJO T, et al. Metabolic profiling of bile in cholangiocarcinoma using *in vitro* magnetic resonance spectroscopy[J]. *HPB (Oxford)*, 2010, 12(6): 396-402.
- [35] MURAKAMI Y, KUBO S, TAMORI A, et al. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16294-16305.
- [36] PADTHAISONG S, PHETCHARABURANIN J, KLANRIT P, et al. Integration of global metabolomics and lipidomics approaches reveals the molecular mechanisms and the potential biomarkers for postoperative recurrence in early-stage cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Metab*, 2021, 9(1): 30-44.
- [37] YI M, LI J J, CHEN S N, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 118-135.
- [38] LIANG Q, WANG C, LI B B, et al. Lipidomics analysis based on liquid chromatography mass spectrometry for hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *RSC Adv*, 2015, 5(78): 63711-63718.
- [39] WANG X X, LI J, ZHANG A H. Urine metabolic phenotypes analysis of extrahepatic cholangiocarcinoma disease using ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *RSC Adv*, 2016, 6(67): 63049-63057.
- [40] HAZNADAR M, DIEHL C M, PARKER A L, et al. Urinary metabolites diagnostic and prognostic of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(10): 1704-1711.
- [41] BANALES J M, IÑARRAIRAEGUI M, ARBELAIZ A, et al. Serum metabolites as diagnostic biomarkers for cholangiocarcinoma, hepatocellular carcinoma, and primary sclerosing cholangitis[J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 547-562.
- [42] MACIAS R I R, MUÑOZ-BELLVÍS L, SÁNCHEZ-MARTÍN A, et al. A novel serum metabolomic profile for the differential diagnosis of distal cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1433-1450.
- [43] KOTAWONG K, CHAIJAROENKUL W, ROYTRAKUL S, et al. Screening of molecular targets of action of atractylodin in cholangiocarcinoma by applying proteomic and metabolomic approaches[J]. *Metabolites*, 2019, 9(11): 260-273.
- [44] GIUSTARINI D, GALVAGNI F, TESEI A, et al. Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 972-981.
- [45] ZHANG J, HANG C H, JIANG T, et al. Nuclear magnetic resonance-based metabolomic analysis of the anticancer effect of metformin treatment on cholangiocarcinoma cells[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 570516-570528.
- [46] BI L, REN Y D, FENG M X, et al. HDAC11 regulates glycolysis through the LKB1/AMPK signaling pathway to maintain hepatocellular carcinoma stemness[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(8): 2015-2028.
- [47] STEPHENNE X, FORETZ M, TALEUX N, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(12): 3101-3110.
- [48] CHEN X, LIU H S, SHEN L, et al. Untargeted UPLC-MS-based metabolomics analysis reveals the metabolic profile of intrahepatic cholangiocarcinoma process and the intervention effect of Osthole in mice[J]. *Pharmacol Res Mod Chin Med*, 2022, 3: 100096-100113.
[收稿日期] 2022-11-09 [修回日期] 2023-04-28
[本文编辑] 陈盛新