

基于网络药理学探究知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的作用机制

王鲁娇^{1,2}, 李育林², 王文², 张康乐², 侯爱画², 司文涛^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 烟台市中医医院, 山东 烟台 264013

摘要: **目的** 运用网络药理学技术探究知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的活性成分、潜在靶点和作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库、TCM-ID 数据库和 BATMAN-TCM 数据库, 筛选知柏地黄丸的有效活性成分和作用靶点, 利用 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库和 GEO 数据库检索获得乳腺癌内分泌治疗耐药的相关靶基因, 并与活性成分作用靶点取交集得到共同靶点; 通过 String 11.5 数据库构建知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的蛋白质互作 (PPI) 网络, 并借助 Cytoscape 3.8.2 软件的 CytoNCA 插件筛选核心靶点; 通过 Metascape 基因功能注释分析工具对交集靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建药物活性成分-靶点-通路相互作用网络, 获取核心活性成分。**结果** 共筛选出知柏地黄丸活性成分 80 个, 与疾病的交集靶点 117 个, 主要涉及肿瘤蛋白 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-6 (IL6)、雌激素受体 1 (ESR1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 等。KEGG 通路富集分析显示磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt、MAPK、核因子- κ B (NF- κ B)、雌激素等信号通路可能是知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的关键信号通路, 由药物活性成分-靶点-通路网络得出槲皮素、山柰酚、脱水淫羊藿素、 β -谷甾醇、薯蓣皂苷元等是发挥作用的核心活性成分。**结论** 知柏地黄丸中的槲皮素、山柰酚、脱水淫羊藿素、 β -谷甾醇、薯蓣皂苷元等核心活性成分, 能够作用于 TP53、Akt1、TNF、IL-6、ESR1、MAPK1 等多个关键靶点, 调节 PI3K-Akt、MAPK、NF- κ B、雌激素等信号通路, 发挥治疗乳腺癌内分泌耐药的作用。

关键词: 知柏地黄丸; 乳腺癌; 网络药理学; 内分泌耐药; 槲皮素; 山柰酚

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)01-0069-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.009

Study on the mechanism of Zhibai Dihuang Pills in treatment of endocrine resistance in breast cancer based on network pharmacology

WANG Lujiao^{1,2}, LI Yulin², WANG Wen², ZHANG Kangle², HOU Aihua², SI Wentao²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Yantai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264013, China

Abstract: Objective To explore the active ingredients, potential targets and mechanism of action of Zhibai Dihuang Pills in treatment of endocrine drug resistance in breast cancer by network pharmacology. **Methods** Through TCMSP database, TCM-ID database and BATMAN-TCM database, the active ingredients and targets of Zhibai Dihuang Pills was screened. And the targets related to drug resistance of breast cancer endocrine therapy were retrieved by GeneCards database, OMIM database, TTD database and GEO database. The intersection of component targets and disease targets was used to obtain common targets. The protein-protein interaction network of Zhibai Dihuang Pills for the treatment of endocrine resistance of breast cancer was constructed by String 11.5 database, and the core targets were screened by CytoNCA plug-in of Cytoscape 3.8.2 software. The GO and KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets was performed by Metascape gene function annotation analysis tool. The interaction network of active ingredient-target-pathway was constructed by Cytoscape 3.8.2 software to obtain the core active ingredients. **Results** A total of 80 active components of Zhibai Dihuang Pills were screened, and 117 intersecting targets with diseases were screened, mainly involving TP53, Akt1, TNF, IL-6, ESR1, MAPK1 and so on. KEGG pathway enrichment analysis showed that PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B and

收稿日期: 2023-09-09

基金项目: 山东省中医药科技项目 (2021M091); 齐鲁中医药优势专科集群建设项目 (肿瘤科) (鲁卫函[2022]46 号)

作者简介: 王鲁娇, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中医、中西医结合治疗肿瘤。E-mail: 1444017073@qq.com

*通信作者: 司文涛, 博士, 副主任医师, 研究方向为中医、中西医结合治疗肿瘤。E-mail: win45t@163.com

estrogen may be the key signal pathways of Zhibai Dihuang Pills in the treatment of breast cancer endocrine resistance. Quercetin, kaempferol, dehydrated icariin, β -sitosterol and diosgenin are the core active components from the drug active component- target-pathway network. **Conclusion** Core active ingredients such as quercetin, kaempferol, Anhydroicaritin, β -sitosterol and diosgenin in Zhibai Dihuang Pills may affect the signaling pathways of PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B and estrogen by acting on multiple targets such as TP53, Akt1, TNF, IL-6, ESR1 and MAPK1, which plays a role in the treatment of breast cancer endocrine resistance.

Key words: Zhibai Dihuang Pills; breast cancer; network pharmacology; endocrine resistance; quercetin; kaempferol

根据世界卫生组织下属国际癌症研究中心 (IARC) 统计, 2020 年全球新发乳腺癌约 230 万例, 占总体癌症发病的 11.7%, 女性乳腺癌首次超过肺癌成为最常见的癌症, 乳腺癌是癌症相关死亡的五大主要原因之一^[1]。2020 年中国乳腺癌新发病例 41.6 万例, 死亡病例约 11.7 万例^[2], 已成为我国严重威胁女性健康的第一大恶性肿瘤^[3]。激素受体 (HR) 阳性乳腺癌占乳腺癌总数的 70%~80%, 是乳腺癌中数量最常见的亚型^[4]。对于 HR 阳性的乳腺癌患者, 内分泌治疗是最有效的治疗手段。受益于内分泌治疗, HR 阳性乳腺癌患者的预后要比其他类型的乳腺癌好^[5], 而原发性或获得性内分泌治疗耐药是限制内分泌治疗疗效的主要因素, 是内分泌治疗面临的难题。因此, 寻找疗效好、毒副反应低的耐药逆转药物已成为临床上亟待攻克的问题。

近年来, 已有大量研究结果表明, 中医药具有多成分、多效应的特点, 可多通路、多靶点作用于恶性肿瘤细胞, 在增强抗癌药物的敏感性和治疗肿瘤耐药方面发挥了独特优势, 在逆转肿瘤耐药性方面, 尤其是在治疗乳腺癌内分泌耐药方面具有广阔的发展前景^[6-9]。本团队前期动物实验已发现知柏地黄丸可以通过调节细胞外调节蛋白激酶 (ERK) /蛋白激酶 B (Akt) 通路, 抑制肿瘤生长, 促进肿瘤细胞凋亡, 与乳腺癌内分泌治疗之间存在协同增效的作用^[10]。研究证明, 知柏地黄丸中知母、熟地黄和山药等提取的化合物能够通过调控磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、mTOR 信号通路或 Notch 信号通路, 逆转阿霉素、多西他赛或奥沙利铂等化疗耐药, 提高抗肿瘤活性^[11-13], 但其在治疗乳腺癌内分泌耐药的机制研究方面鲜有报道。基于此, 本研究应用网络药理学方法进一步探索知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的潜在关键靶点及作用机制, 为基础研究和临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物活性成分及靶点的筛选

通过 TCMSP 数据库 (<https://tcmsp-e.com/tcmsp>。

php)^[14]、TCM-ID 数据库 (<https://www.bidd.group/TCMID/>)^[15]和 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)^[16]检索知柏地黄丸的组方药物熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮、知母和黄柏的活性成分。根据 TCMSP 的 ADME 参数^[17-18], 将口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 作为标准, 筛选知柏地黄丸中活性较高的化合物。在相关靶点检索框中筛选出活性成分对应的靶标蛋白, 使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>)^[19]查询靶标蛋白对应的基因名称, 并从中过滤出已被验证的人类基因, 建立数据集。使用 Cytoscape 3.8.2 软件, 对知柏地黄丸活性成分-靶点的关系进行可视化分析。

1.2 乳腺癌内分泌耐药相关靶点的获取

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[20]、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)^[21]、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>)^[22]和 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)^[23]中以 (“Breast Neoplasm*” OR “Breast Tumor*” OR “Breast Cancer” OR “Mammary Cancer*” OR “Human Mammary Carcinoma*” OR “Breast Carcinoma*”) AND (“Endocrine therapy” OR “Aromatase Inhibitor*” OR “Letrozole” OR “Anastrozole” OR “Exemestane” OR “Selective Estrogen Receptor Downregulator*” OR “Fulvestrant” OR “Selective Estrogen Receptor Modulator*” OR “Tamoxifen”) AND (“Resistance”) 为关键词进行检索, 获取疾病靶点, 并将 4 个数据库的筛选结果合并删除重复项后获得相关靶点。

1.3 药物活性成分靶点与疾病靶点交集基因的获取

将筛选后的药物化学成分靶点与疾病靶点分别输入 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 的 List1 和 List2, 获得交集基因, 并制作出 Venny 图将结果可视化。

1.4 蛋白质互作 (PPI) 网络构建及核心靶点筛选

采用 String 11.5 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)^[24], 选择多种蛋白模块, 导入药物与疾病的交集靶点,

设置物种为人类，网络连接线为“confidence”，最小交互阈值为“highest confidence (0.900)”，隐藏游离节点，导出 tsv 文件，导入到 Cytoscape 3.8.2 软件，使 PPI 网络可视化，运用 CytoNCA 插件进行网络拓扑学分析，从交集靶点中进一步筛选知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的核心靶点。

1.5 基因本体（GO）和京都基因组百科全书（KEGG）通路富集分析

将交集靶点导入 Metascape 基因富集分析工具 (<https://metascape.org/>)^[25]，进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。物种设定为“Homo sapiens”，设置富集的统计学显著性为“P value cut off=0.01”，获得知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌治疗耐药潜在靶点的主要基因功能及参与的信号通路。采用微生信在线作图网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对 GO 和 KEGG 通路富集的前 20 位条目以气泡图的方式进行可视化展示。

1.6 构建药物活性成分-靶点-通路网络图

将药物活性成分、交集靶点、KEGG 富集分析富集的前 20 条通路导入 Cytoscape 3.8.2 软件，构建知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的成分-靶点-通路网络图。

2 结果

2.1 知柏地黄丸活性成分及作用靶点

通过 TCMSP 数据库、TCM-ID 数据库和 BATMAN-TCM 数据库，以 OB≥30%和 DL≥0.18 为标准，去除没有对应靶点的成分后得到知柏地黄丸活性成分共 80 个，其中知母 13 个、黄柏 27 个、熟地黄 4 个、山药 15 个、山茱萸 17 个、泽泻 7 个、茯苓 8 个和牡丹皮 8 个，药物之中重复的活性成分有 11 个。通过 UniProt 数据库确认并转换，最终筛选出 179 个药物成分作用靶点。根据 OB 进行降序排列，选取排名前 30 的活性成分见表 1。药物中重复的活性成分见表 2。

表 1 知柏地黄丸中 OB 排名前 30 位的活性成分

Table 1 Active ingredients in Zhibai Dihuang Pills with top 30 OB

成分编号	成分名称	OB/%	DL	所属中药	靶点个数
MOL000483	cis-N-阿魏酰酪胺	118.35	0.26	知母	5
MOL000631	N-反式-对香豆酰酪胺	112.90	0.20	知母	8
MOL000546	薯蓣皂苷元	80.88	0.81	知母、山药	14
MOL004071	右旋四氢巴马汀	73.94	0.64	黄柏	23
MOL005531	远华蟾蜍精	69.99	0.79	山茱萸	2
MOL000785	黄藤素	64.60	0.65	黄柏	12
MOL000622	广玉兰内酯	63.71	0.19	黄柏	2
MOL001736	花旗松素	60.51	0.27	山药	2
MOL004489	知母皂苷 F	60.06	0.79	知母	1
MOL000787	原阿片碱	59.26	0.83	黄柏	19
MOL005430	山萘酮 C	59.05	0.39	山药	13
MOL001677	灰绿曲霉酰胺	58.02	0.52	知母	2
MOL001131	二氢黄柏苷	56.60	0.39	黄柏	5
MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78	牡丹皮	1
MOL000492	儿茶素	54.83	0.24	茯苓、牡丹皮	7
MOL000322	海风藤酮	54.72	0.38	山药	16
MOL001924	芍药苷	53.87	0.79	牡丹皮	4
MOL001455	四氢小檗碱	53.83	0.77	黄柏	23
MOL004497	小星蒜碱	51.65	0.62	知母	8
MOL001944	异紫花前胡内酯	50.28	0.18	知母	11
MOL000073	(+)-表儿茶素	48.96	0.24	茯苓	3
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	黄柏、山茱萸、牡丹皮	124
MOL001495	亚麻酸乙酯	46.10	0.20	山茱萸	2
MOL002668	甲基黄连碱	45.83	0.87	黄柏	6
MOL004373	脱水淫羊藿素	45.41	0.44	知母	24
MOL005465	氧杂蒽酮衍生物	45.33	0.77	山药	9
MOL006422	唐松草定碱	44.41	0.73	黄柏	9
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	知母、黄柏、熟地黄、山药、山茱萸	25
MOL005440	异岩藻甾醇	43.78	0.76	山药	7
MOL002651	去氢丹参酮 IIA	43.76	0.40	黄柏	15

表 2 药物中重复的活性成分
Table 2 Repeated active ingredients in herbs

成分编号	成分名称	OB/%	DL	来源
MOL001449	豆甾醇	43.83	0.76	知母、黄柏、熟地黄、山药、山茱萸
MOL000546	薯蓣皂苷元	80.88	0.81	知母、山药
MOL000953	胆甾烷醇	37.87	0.68	知母、山药
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	知母、牡丹皮
MOL005438	菜油甾醇	37.58	0.71	黄柏、山药
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75	黄柏、山茱萸
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75	黄柏、山茱萸
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	黄柏、山茱萸、牡丹皮
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	黄柏、熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、牡丹皮
MOL011455	股金醇棕榈酸酯	32.70	0.65	山茱萸、茯苓
MOL000492	儿茶素	54.83	0.24	茯苓、牡丹皮

2.2 知柏地黄丸的靶点与乳腺癌内分泌耐药相关基因交集

通过 GeneCards 数据库收集到 1 162 个疾病靶点, OMIM 数据库收集到 502 个疾病靶点, TTD 数据库收集到 121 个疾病靶点, 通过 GEO 数据库收集到 1 429 个, 将 4 个数据库的疾病靶点合并筛选删除重复值后获得 2 972 个乳腺癌内分泌耐药相关靶基因。使用 Venny 2.1.0 在线工具, 将 179 个药物活性成分的作用靶点与 2 972 个乳腺癌内分泌耐药相关靶基因取交集, 获得 117 个交集靶点, 见图 1, 即知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的作用靶点。

知柏地黄丸与乳腺癌内分泌耐药的交集靶点见表 3。

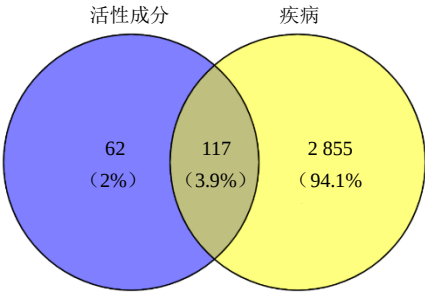


图 1 知柏地黄丸成分靶点 - 乳腺癌内分泌耐药靶点的韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of targets of Zhibai Dihuang Pills-endocrine resistance of breast cancer

表 3 知柏地黄丸与乳腺癌内分泌耐药的交集靶点
Table 3 Intersection targets of Zhibai Dihuang Pills and endocrine resistance of breast cancer

靶点名称							
ABAT	CAV1	CYP1A2	GJA1	IL-2	MTOR	PLAU	SELE
ACACA	CCL2	CYP1B1	GSK3B	IL-4	MYC	PON1	SERPINE1
ADRB2	CCNA2	CYP2B6	GSTM1	IL-6	NCOA1	PPARA	SLC2A4
AHR	CCNB1	CYP3A4	GSTP1	INSR	NCOA2	PPARD	SLPI
AKR1C3	CCND1	E2F1	HIF1A	IRF1	NFE2L2	PPARG	SOD1
AKT1	CDKN1A	E2F2	HMOX1	KDR	NFKBIA	PRKCA	SPP1
AR	CHEK1	EGF	HSF1	MAP2	NOS2	PRKCB	STAT1
BAX	CHEK2	EGFR	HSPB1	MAPK1	NR1I2	PTGS1	TNF
BCL2	CHUK	ELK1	ICAM1	MAPK14	NR3C1	PTGS2	TOP1
BCL2L1	CLDN4	ERBB2	IFNG	MAPK8	NR3C2	RAF1	TOP2A
BIRC5	CRP	ERBB3	IGF2	MMP1	ODC1	RASSF1	TP53
CASP3	CTSD	ESR1	IGFBP3	MMP2	OPRM1	RB1	VCAM1
CASP8	CXCL10	ESR2	IL-10	MMP3	PARP1	RELA	
CASP9	CXCL8	F3	IL-1A	MMP9	PGR	RUNX2	
CAT	CYP1A1	FASN	IL-1B	MPO	PLAT	RXRA	

2.3 PPI 网络分析结果及核心靶点筛选

将交集靶点导入 String 11.5 数据库，生成 1 个具有 117 个节点，366 条边，平均节点度 6.26 的 PPI 网络，见图 2。使用 CytoNCA 插件从交集靶点中筛选核心靶点，要求同时满足大于度中心性（DC）、特征向量中心性（EC）、中介中心性（BC）、紧密中心性（CC）这 4 项平均值的条件，得到网络拓扑分析结果，见表 4。利用 Cytoscape 3.8.2 软件将核心靶点进行可视化，见图 3。

2.4 交集靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析

将知柏地黄丸治疗内分泌耐药的交集靶点导入 Metascape 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析得到生物过程（BP）、细胞组分（CC）和分子功能（MF）各 1 612、78、136 条。按 *P* 值大小升序排列，选取前 20 项使用微生信在线作图网站进行可视化分析，见图 4。

KEGG 富集分析共得到 191 条信号通路，选取 *P* 值最小的前 20 条信号通路进行可视化展示，见图 5。知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药涉及多条信号通路，主要包括 PI3K/Akt、丝裂原活化蛋白激

酶（MAPK）、核因子-κB（NF-κB）、雌激素等。

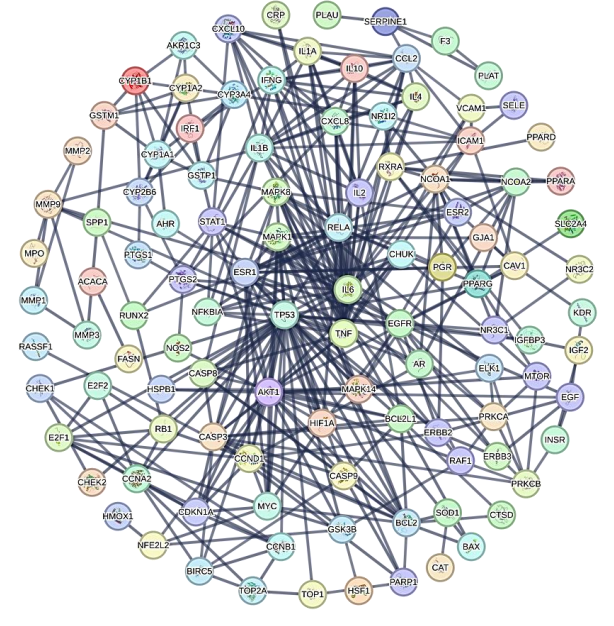


图 2 知柏地黄丸与乳腺癌内分泌耐药交集靶点的 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network of intersection targets of Zhibai Dihuang Pills and endocrine resistance of breast cancer

表 4 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药核心靶点拓扑分析结果

核心靶点	DC	EC	BC	CC
TP53	36	0.303 8	3 133.865 1	0.484 0
AKT1	23	0.233 5	1 329.362 8	0.467 0
TNF	21	0.259 3	1 224.090 7	0.429 1
IL6	21	0.253 4	1 173.793 8	0.424 0
ESR1	20	0.190 7	1 202.333 1	0.454 9
MAPK1	16	0.180 4	601.484 5	0.443 5
IL1B	16	0.210 6	305.094 1	0.392 6
BCL2	15	0.164 6	617.477 7	0.403 0
CASP3	14	0.167 6	438.199 2	0.436 2
CCL2	13	0.173 9	858.832 0	0.365 5
RELA	13	0.186 4	873.855 3	0.439 8
CCND1	12	0.125 5	320.423 5	0.395 5
MAPK8	12	0.142 7	868.267 3	0.439 8
EGFR	11	0.109 5	503.498 8	0.432 7
STAT1	10	0.124 1	365.853 6	0.407 7
ICAM1	9	0.118 4	226.227 3	0.340 8
PTGS2	8	0.106 7	775.107 1	0.407 7

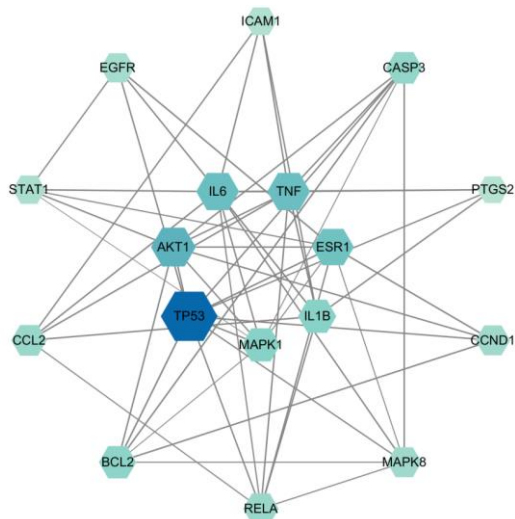


图 3 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药核心靶点 PPI 网络
Fig. 3 PPI network of core targets of Zhibai Dihuang Pills in treatment of endocrine resistance of breast cancer

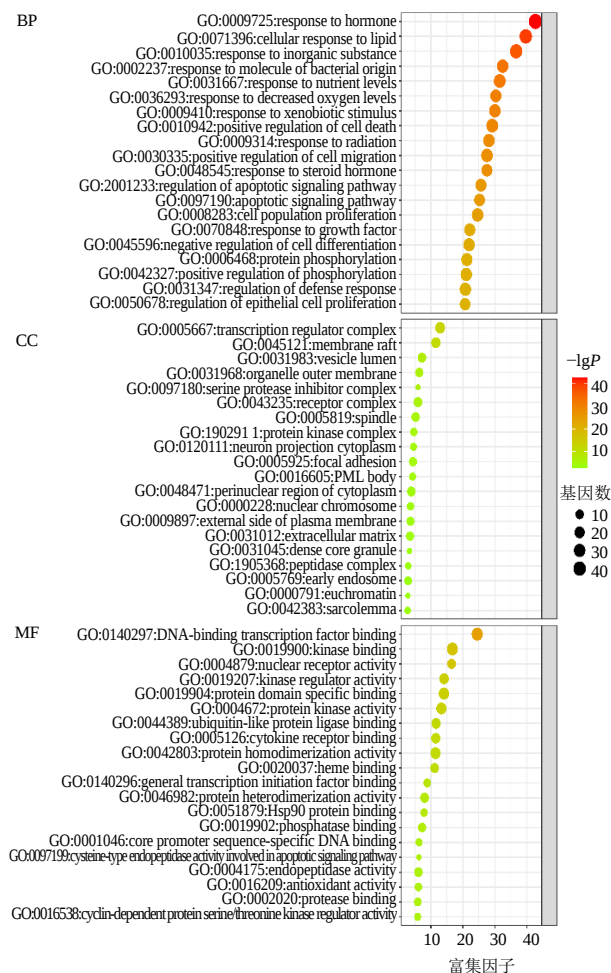


图 4 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药靶基因 GO 富集
Fig. 4 GO enrichment of target genes of endocrine resistance in treatment of breast cancer with Zhibai Dihuang Pills

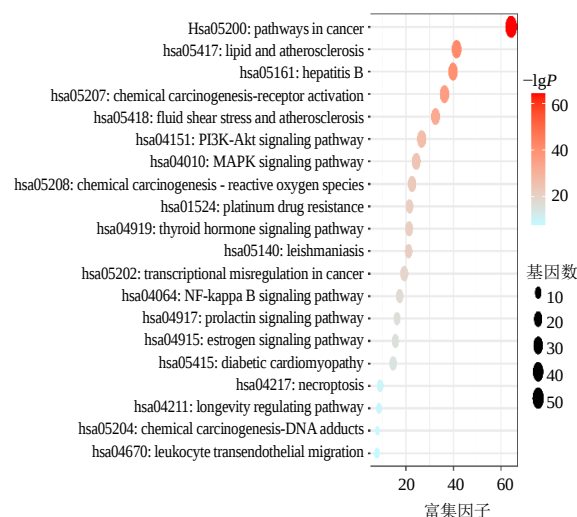


图 5 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药靶基因的 KEGG 通路分析
Fig. 5 KEGG pathway analysis of target genes of endocrine resistance in treatment of breast cancer with Zhibai Dihuang Pills

2.5 药物活性成分 - 靶点 - 通路网络图

将药物成分、交集靶点、KEGG 通路分析富集的前 20 条通路导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 构建活性成分 - 靶点 - 通路网络, 见图 6。该网络共计 217 个节点、818 条连接线, 包含靶点 117 个、知柏地黄丸活性成分 80 个。按度值 (degree) 从大到小排列, 获得核心活性成分的拓扑分析结果, 见表 5。

3 讨论

3.1 知柏地黄丸的中医病机分析

知柏地黄丸最早出自明代名医秦昌遇所著的《症因脉治》, 为中医滋肾阴、泻相火的经典方剂。该方由熟地黄、山茱萸、山药、知母、黄柏等八味中药组成, 主要用于治疗以潮热盗汗、腰膝酸软、五心烦热、体倦乏力、舌红少苔、脉细数为特征的阴虚火旺之证, 契合乳腺癌内分泌耐药肝肾阴虚为本, 痰毒瘀为标的基本病机^[9, 26-27]。有研究表明, 知柏地黄丸能够改善 HR 阳性乳腺癌患者内分泌治疗期间出现的类更年期综合征^[28]。因此, 知柏地黄丸可能有治疗乳腺癌内分泌耐药的重要作用。

3.2 知柏地黄丸核心活性成分分析

本研究结果显示, 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的核心活性成分为槲皮素、山柰酚、脱水淫羊藿素、 β -谷甾醇、薯蓣皂苷元等, 可能在乳腺癌内分泌耐药中发挥重要作用。槲皮素及其代谢物具有抗炎、抗增殖、促进细胞凋亡和阻滞细胞周期的

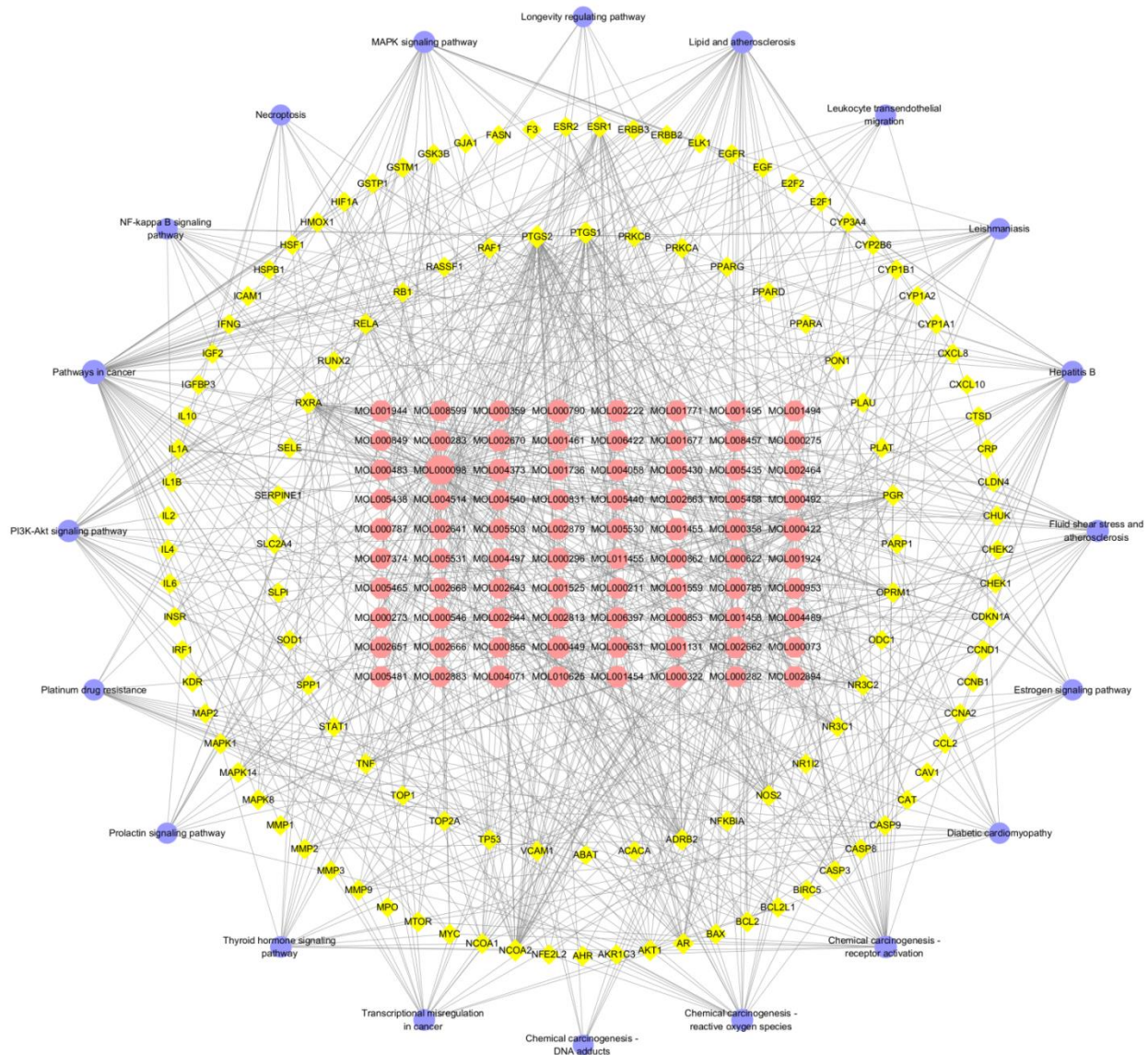


图 6 知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的“活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 6 Network of “active ingredient-target-pathway” of Zhibai Dihuang Pills in treatment of endocrine resistance of breast cancer

表 5 知柏地黄丸核心活性成分拓扑分析

Table 5 Topological analysis of core active ingredients in Zhibai Dihuang Pills

成分编号	成分名称	OB/%	DL	所属中药	degree	BC	CC
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	黄柏、山茱萸、牡丹皮	94	0.383 2	0.541 6
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	知母、牡丹皮	32	0.078 2	0.422 4
MOL004373	脱水淫羊藿素	45.41	0.44	知母	15	0.016 1	0.383 2
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	黄柏、山茱萸	14	0.030 9	0.393 1
MOL000546	薯蓣皂苷元	80.88	0.81	知母、山药	13	0.043 0	0.386 0
MOL002662	吴茱萸次碱	40.30	0.60	黄柏	12	0.011 0	0.366 3
MOL001461	二氢白屈菜红碱	32.73	0.81	熟地黄	10	0.005 8	0.375 2
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	知母、黄柏、熟地黄、山药、山茱萸	9	0.026 2	0.380 5
MOL000785	黄藤素	64.60	0.65	黄柏	9	0.003 6	0.367 5
MOL001454	小檗碱	36.86	0.78	黄柏	8	0.002 8	0.366 3

特性,能够发挥抑制肿瘤的作用^[29-30],其作用机制可能与槲皮素能够抑制 p38 MAPK 磷酸化发挥抗增殖作用和诱导 NF- κ B 信号通路或调节 P53、Bcl-2、FasI 等调控分子发挥促凋亡作用有关^[31-37]。研究显示,槲皮素可能是通过阻断 ER α 和 Her-2 介导的信号通路之间的串话调节,或抑制 Pin1 的过表达、下调血管内皮生长因子(VEGF)基因转录,抑制肿瘤血管生成,逆转乳腺癌他莫昔芬(TAM)耐药^[38-39]。山柰酚属于黄酮类化合物,能够促进肿瘤细胞凋亡,与其他黄酮类化合物联合使用,对 ABC 亚家族 G 亚型 2(ABCG2)的表达有更强的抑制作用,增强其抗癌和逆转耐药的作用^[40-42]。脱水淫羊藿素通过抑制上皮-间质转化发挥抗乳腺癌作用,其潜在机制可能与增强谷胱甘肽过氧化酶 1(GPX1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、敲除含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)的表达,抑制 N-cadherin、vimentin、Ki-67 的表达有关^[43]。 β -谷甾醇通过影响神经酰胺代谢增强 TAM 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用^[44]。薯蓣皂苷元通过抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 Skp2 的表达来抑制细胞增殖与迁移,诱导细胞的凋亡^[45]。上述研究结果表明,知柏地黄丸中的这些活性成分具有抗乳腺癌的作用,在治疗乳腺癌内分泌耐药方面也发挥着重要作用。

3.3 知柏地黄丸的核心靶点分析

本研究通过 PPI 网络和 CytoNCA 插件对知柏地黄丸的核心靶点进行了预测,结果显示肿瘤蛋白 p53(TP53)、蛋白激酶 B1(Akt1)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-6(IL6)、雌激素受体 1(ESR1)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)等可能是知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的关键靶点。TP53 基因是第 1 个被发现的肿瘤抑制基因^[46-49]。TP53 功能失活或其相关途径失活是人类肿瘤的共同特征,通常与恶性肿瘤增加、患者生存率低和治疗耐药相关^[50-52]。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可被多种生长信号激活,调节细胞的存活、增殖和分化,促进血管生成以及影响代谢的基本过程^[53]。在接受内分泌治疗的乳腺癌患者中,Akt 激活与预后不良相关,Akt 过度激活的患者临床获益进一步降低^[54]。研究显示,过度激活 Akt 的乳腺癌细胞对雌激素的依赖性降低,对内分泌治疗的敏感性也会下降^[55-56]。肿瘤细胞和周围微环境的炎症信号促进肿瘤生长^[57-58]。抗肿瘤治疗可诱导多种炎症细胞因子水平的上调,包括

IL-6、IL-8 和 TNF- α 等^[59-61]。TNF- α 是肿瘤发生发展过程中重要的促炎细胞因子,在乳腺癌获得性耐药中发挥着重要作用^[62-63]。具体机制可能与 TNF- α 诱导 ABCG2、趋化因子配体 1(CXCL1)和趋化因子配体 2(CXCL2)的过度表达,促进乳腺癌细胞的生长有关^[64-66]。研究发现,药物敏感的乳腺癌细胞不表达 IL-6,而多药耐药的乳腺癌细胞会产生高水平的 IL-6^[67]。因此,IL-6 表达水平的升高,可能是导致抗肿瘤治疗效果差、肿瘤复发和侵袭性生长的机制之一^[59-60, 68]。ESR1 突变既预先存在于原发肿瘤中,又能在转移过程中富集^[69]。在 ESR1 配体结合域(LBD)中发现的 ESR1 突变会导致 ER 结构的改变,使乳腺癌细胞能够以非雌激素依赖途径激活 ER 转录功能,促进乳腺癌细胞的增殖^[70]。临床上转移性 ER 阳性乳腺癌患者在接受芳香化酶抑制剂治疗的过程中,获得非配体依赖的 ESR1 突变,导致内分泌耐药的发生和肿瘤的复发^[71]。在 HR 阳性乳腺癌患者 TAM 治疗后,MAPK1、AKT1 基因的早期表达变化可能作为耐药和未来不良预后的早期标志^[72]。以上研究结果均表明,知柏地黄丸作用的 TP53、Akt1、TNF、IL-6、ESR1、MAPK1 这些靶点是治疗 HR 阳性乳腺癌内分泌耐药的关键靶点。

3.4 知柏地黄丸的信号通路分析

KEGG 通路富集分析的结果显示,有多条信号通路参与知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药,其中主要包括 PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路、雌激素信号通路等。研究表明,PI3K/AKT/mTOR 通路的激活是对长期雌激素剥夺导致的获得性耐药的重要机制之一,抑制该通路可改善乳腺癌内分泌耐药,防止肿瘤转移和复发^[73-75]。MAPK 信号通路在细胞增殖、分化、凋亡、血管生成和凋亡等过程中发挥着重要作用^[76]。其中,P38 MAPK 信号通路主要与炎症反应、细胞凋亡、细胞周期调节、TAM 耐药和疾病的不良预后有关^[77-81]。在 TAM 耐药的乳腺癌细胞中,VEGF 的表达水平升高,p38 MAPK 信号通路被激活,导致乳腺癌细胞对 TAM 治疗的敏感性下降^[81]。NF- κ B 信号通路的激活是乳腺癌发生转移和耐药的另一重要机制^[82]。抑制 NF- κ B 信号通路可以抑制 TAM 或芳香化酶抑制剂(AI)耐药的乳腺癌细胞的增殖,恢复耐药细胞对 TAM 或 AI 的敏感性^[83-84]。研究发现,E3 泛素连接酶 TRIM47 与 NF- κ B 信号通路之间存在正反馈调节,TRIM47 持续激活 NF- κ B 信号通路可能是乳腺癌内

分泌耐药的潜在机制^[85]。前梯度蛋白 3 (AGR3) 与雌激素相关, AGR3 激活雌激素信号通路, 会导致乳腺癌对 TAM 的耐药^[86]。研究发现, 雌激素信号通路与关键代谢调控因子之间存在串话调节, 乳腺癌细胞为适应代谢的改变, 从而对内分泌治疗产生耐药性^[87]。上述研究结果表明, 通过调控 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路和雌激素信号通路, 能够治疗乳腺癌内分泌耐药。

综上所述, 知柏地黄丸中的槲皮素、山柰酚、脱水淫羊藿素、 β -谷甾醇、薯蓣皂苷元等核心活性成分, 能够作用于 TP53、Akt1、TNF、IL6、ESR1、MAPK1 等多个关键靶点, 调节 PI3K/Akt、MAPK、NF- κ B、雌激素等信号通路, 发挥治疗乳腺癌内分泌耐药的作用。本研究为深入探索知柏地黄丸治疗乳腺癌内分泌耐药的分子机制奠定了基础, 但其确切的作用机制仍需要体内外实验的进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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): 209-249.
- [2] Cao W, Chen H D, Yu Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(7): 783-791.
- [3] 国家肿瘤质控中心乳腺癌专家委员会, 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤药物临床研究专业委员会. 中国晚期乳腺癌规范诊疗指南(2022 版) [J]. *中华肿瘤杂志*, 2022, 44(12): 1262-1287.
- [4] Hammond M E, Hayes D F, Dowsett M, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(16): 2784-2795.
- [5] Matsumoto A, Jinno H, Murata T, *et al.* Prognostic implications of receptor discordance between primary and recurrent breast cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2015, 20(4): 701-708.
- [6] 张悦, 林怡, 陶丽. 中医药逆转抗肿瘤药物耐药的机制探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(5): 183-189.
- [7] 湛海燕, 丁晓庆. 薯蓣皂苷对耐三苯氧胺乳腺癌细胞生长的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2019, 22(29): 3570-3575.
- [8] 董合玲, 谭庆麟, 叶志彬, 等. 补中益气汤在转移性乳腺癌他莫昔芬耐药中的作用及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(18): 4467-4469.
- [9] 常磊, 卓至丽, 卢雯平, 等. 疏肝益肾方治疗乳腺癌内分泌耐药的临床观察及对外泌体 miR-221 的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(12): 1295-1302.
- [10] Li Y, Si W, Hou A, *et al.* Zhibai Dihuang Wan contributes apoptosis of tumor cells in estrogen-receptor-positive breast cancer mice via ERK/AKT pathway [J]. *Acta Medica Mediterranea*, 2020, 36: 3089-3094.
- [11] 陈洁汝. RNA 干扰 Apollon 基因联合中药知母皂苷 A-III 对 K562/ADM 细胞多药耐药的影响及其分子机制的研究 [D]. 滨州: 滨州医学院, 2017.
- [12] 夏旭, 崔洪泉, 胡培森, 等. 熟地黄多糖通过 mTOR 通路对多西他赛耐药前列腺癌细胞株自噬的作用机制研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(1): 209-213.
- [13] 李瑞雪, 王子源, 吕凤红, 等. 薯蓣皂苷对结肠癌细胞化学增敏作用研究 [A] // 2022CCTB 中国肿瘤标志物学术大会暨中国整合肿瘤学大会暨第十六届肿瘤标志物青年科学家论坛暨中国肿瘤标志物产业创新大会论文集 [C]. 上海: 中国抗癌协会, 2023: 111-112.
- [14] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [15] Chen X, Zhou H, Liu Y B, *et al.* Database of traditional Chinese medicine and its application to studies of mechanism and to prescription validation [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149(8): 1092-1103.
- [16] Liu Z Y, Guo F F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.
- [17] Xu X, Zhang W X, Huang C, *et al.* A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [18] Tao W Y, Xu X, Wang X, *et al.* Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal *Radix Curcumae* formula for application to cardiovascular disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [19] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D158-D169.
- [20] Safran M, Dalah I, Alexander J, *et al.* GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.
- [21] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, *et al.* OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue):

- D789-D798.
- [22] Zhou Y, Zhang Y T, Lian X C, *et al.* Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D1398-D1407.
 - [23] Clough E, Barrett T. The gene expression omnibus database [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1418: 93-110.
 - [24] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
 - [25] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
 - [26] 许凯丽, 杜晓红, 李静蔚. 基于数据挖掘的乳腺癌内分泌治疗期不良反应的中医用药规律研究 [J]. *中医临床研究*, 2018, 10(35): 13-16.
 - [27] 赵娜. 乳腺癌内分泌治疗期中医证型分布及证候特点研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
 - [28] 李铁, 卓睿. 知柏地黄丸降低三苯氧胺治疗乳腺癌产生的毒副作用临床研究 [J]. *广西中医药*, 2009, 32(4): 6-8.
 - [29] Händlén M, Nieminen R, Vuorela P, *et al.* Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages [J]. *Mediators Inflamm*, 2007, 2007: 45673.
 - [30] Wu Q, Needs P W, Lu Y L, *et al.* Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Food Funct*, 2018, 9(3): 1736-1746.
 - [31] Sharma A, Kashyap D, Sak K, *et al.* Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: A review of research and patents [J]. *Pharm Pat Anal*, 2018, 7(1): 15-32.
 - [32] Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram N D. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141370.
 - [33] Bulavin D V, Phillips C, Nannenga B, *et al.* Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(4): 343-350.
 - [34] Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, *et al.* Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: Signal cascade and drug-DNA interaction [J]. *Cell Prolif*, 2013, 46(2): 153-163.
 - [35] Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, *et al.* The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1/2/3): 84-91.
 - [36] Sun Z J, Chen G, Hu X, *et al.* Activation of PI3K/Akt/IKK-alpha/NF-kappaB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: Its inhibition by quercetin [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(7): 850-863.
 - [37] Huang C Y, Chan C Y, Chou I T, *et al.* Quercetin induces growth arrest through activation of FOXO1 transcription factor in EGFR-overexpressing oral cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(9): 1596-1603.
 - [38] Wang H X, Tao L Y, Qi K, *et al.* Quercetin reverses tamoxifen resistance in breast cancer cells [J]. *J BUON*, 2015, 20(3): 707-713.
 - [39] Oh S J, Kim O, Lee J S, *et al.* Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(11): 3227-3234.
 - [40] Luo H T, Daddysman M K, Rankin G O, *et al.* Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc [J]. *Cancer Cell Int*, 2010, 10: 16.
 - [41] Zhang S Z, Yang X N, Morris M E. Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(7): 1263-1273.
 - [42] Wang X N, Yang Y T, An Y T, *et al.* The mechanism of anticancer action and potential clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 117: 109086.
 - [43] Li F F, Shi Y Y, Yang X J, *et al.* Anhydroicaritin inhibits EMT in breast cancer by enhancing GPX1 expression: A research based on sequencing technologies and bioinformatics analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 764481.
 - [44] Awad A B, Barta S L, Fink C S, *et al.* Beta-Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(4): 419-426.
 - [45] Liu Y L, Zhou Z J, Yan J Z, *et al.* Diosgenin exerts antitumor activity via downregulation of Skp2 in breast cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8072639.
 - [46] Lane D P, Crawford L V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells [J]. *Nature*, 1979,

- 278(5701): 261-263.
- [47] Linzer D I, Levine A J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells [J]. *Cell*, 1979, 17(1): 43-52.
- [48] Kress M, May E, Cassingena R, *et al.* Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum [J]. *J Virol*, 1979, 31(2): 472-483.
- [49] Melero J A, Stitt D T, Mangel W F, *et al.* Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and-transformed cells [J]. *Virology*, 1979, 93(2): 466-480.
- [50] Munro A J, Lain S, Lane D P. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: A systematic review [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(3): 434-444.
- [51] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, 408(6810): 307-310.
- [52] Vousden K H, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 594-604.
- [53] Revathidevi S, Munirajan A K. Akt in cancer: Mediator and more [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 80-91.
- [54] Pérez-Tenorio G, Ståhl O, Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(4): 540-545.
- [55] Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, *et al.* Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(2): 137-144.
- [56] DeGraffenried L A, Friedrichs W E, Russell D H, *et al.* Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(23): 8059-8067.
- [57] Fisher D T, Appenheimer M M, Evans S S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 38-47.
- [58] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, *et al.* Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 149185.
- [59] Chang C H, Hsiao C F, Yeh Y M, *et al.* Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(9): 1977-1985.
- [60] Wu C T, Chen M F, Chen W C, *et al.* The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer [J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8: 159.
- [61] Chen M F, Chen P T, Lu M S, *et al.* IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 26.
- [62] Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, *et al.* The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: Molecular insights and therapeutic approaches [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(1): 1-18.
- [63] Yang Y, Feng R N, Bi S, *et al.* TNF-alpha polymorphisms and breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 129(2): 513-519.
- [64] Mosaffa F, Lage H, Afshari J T, *et al.* Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha increase ABCG2 expression in MCF-7 breast carcinoma cell line and its mitoxantrone-resistant derivative, MCF-7/MX [J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(10): 669-676.
- [65] Malekshah O M, Lage H, Bahrami A R, *et al.* PXR and NF- κ B correlate with the inducing effects of IL-1 β and TNF- α on ABCG2 expression in breast cancer cell lines [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(2): 474-480.
- [66] Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, *et al.* A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis [J]. *Cell*, 2012, 150(1): 165-178.
- [67] Conze D, Weiss L, Regen P S, *et al.* Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(24): 8851-8858.
- [68] Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 signaling: A key event in tumorigenesis? [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(1): 7-9.
- [69] Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, *et al.* Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(313): 313ra182.
- [70] Toy W, Shen Y, Won H, *et al.* ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1439-1445.
- [71] Dustin D, Gu G W, Fuqua S A W. ESR1 mutations in breast cancer [J]. *Cancer*, 2019, 125(21): 3714-3728.
- [72] Hamadneh L, Bahader M, Abuarqoub R, *et al.* PI3K/AKT and MAPK1 molecular changes preceding matrix metalloproteinases overexpression during tamoxifen-resistance development are correlated to poor prognosis in breast cancer patients [J]. *Breast Cancer*, 2021, 28(6): 1358-1366.
- [73] Miller T W, Hennessy B T, González-Angulo A M, *et al.* Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2406-2413.
- [74] Sanchez C G, Ma C X, Crowder R J, *et al.* Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase

- inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(2): R21.
- [75] Nunnery S E, Mayer I A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer [J]. *Drugs*, 2020, 80(16): 1685-1697.
- [76] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [77] Dhanasekaran D N, Reddy E P. JNK signaling in apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245-6251.
- [78] Huang G H, Shi L Z, Chi H B. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination [J]. *Cytokine*, 2009, 48(3): 161-169.
- [79] Cuadrado A, Nebreda A R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-417.
- [80] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1358-1375.
- [81] Aesoy R, Sanchez B C, Norum J H, *et al.* An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(10): 1630-1638.
- [82] Wang X M, Fang Y, Sun W B, *et al.* Endocrinotherapy resistance of prostate and breast cancer: Importance of the NF- κ B pathway (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(5): 1064-1074.
- [83] Yde C W, Emdal K B, Guerra B, *et al.* NF- κ B signaling is important for growth of antiestrogen resistant breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 135(1): 67-78.
- [84] Kubo M, Kanaya N, Petrossian K, *et al.* Inhibition of the proliferation of acquired aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells by histone deacetylase inhibitor LBH589 (panobinostat) [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(1): 93-107.
- [85] Azuma K, Ikeda K, Suzuki T, *et al.* TRIM47 activates NF- κ B signaling via PKC- ϵ /PKD3 stabilization and contributes to endocrine therapy resistance in breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(35): e2100784118.
- [86] Jiang R, Sun Y J, Chen X, *et al.* Estrogen-regulated AGR3 activates the estrogen receptor signaling pathway to promote tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2021, 190(2): 203-211.
- [87] Kulkoyluoglu-Cotul E, Arca A, Madak-Erdogan Z. Crosstalk between estrogen signaling and breast cancer metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(1): 25-38.

[责任编辑 金玉洁]