

基于网络药理学的升麻治疗乳腺癌作用机制研究

李玥锴¹, 李钦琳¹, 韩凌³, 路金才^{1, 2*}, 吕重宁^{1, 2*}

1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110006

2. 辽宁省中药资源保护与开发重点实验室, 辽宁 沈阳 110006

3. 本溪国家中成药工程技术研究中心有限公司, 辽宁 本溪 117004

摘要: 目的 通过构建升麻 *Cimicifugae Rhizoma* 化学成分-靶点-代谢信号通路网络, 探讨其治疗乳腺癌的作用机制。方法 利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 和 PharmMapper 获取升麻化学成分与作用靶点, 将其与乳腺癌疾病靶点取交集得到升麻治疗乳腺癌的作用靶点, 进一步利用靶点-成分反向筛选得到治疗乳腺癌的升麻潜在活性成分; 通过 GeneMANIA 数据库获取间接靶标和“蛋白-靶点”互作网络, 并通过蛋白-蛋白相互作用筛选关键靶标; 采用 Cytoscape 构建“成分-靶点”网络图, 使用分子对接将潜在活性成分和关键靶标配对, 以证实前期靶标筛选和反向药效团匹配的可靠性; 通过 DAVID 网站对作用靶点进行基因本体论 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 分析, 利用 R 语言和在线绘图网站 (omishare tools) 将结果可视化。**结果** 获得升麻潜在活性成分共 68 个, 与乳腺癌相关疾病靶点 48 个, 关键靶点为 ESR1、SRC 和 HRAS。GO 功能富集分析得到生物过程 (BP) 条目 484 条, 细胞组成 (CC) 条目 7 条, 分子功能 (MF) 条目 75 条。KEGG 通路富集筛选获得 21 条信号通路。分子对接结果显示关键靶标与升麻潜在活性成分匹配性较好。**结论** 升麻主要通过作用于 ESR1、SRC、HRAS 等靶点, 调节癌症通路、蛋白多糖通路和雌激素信号通路等起到治疗乳腺癌的作用。

关键词: 升麻; 乳腺癌; 网络药理学; ESR1; SRC; HRAS; 癌症通路; 蛋白多糖通路; 雌激素信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 04-0642-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.04.006

Study on mechanism of *Cimicifugae Rhizoma* in treatment of breast cancer based on network pharmacology

LI Yuekai¹, LI Qinlin¹, HAN Ling³, LU Jincan^{1, 2}, LÜ Chongning^{1, 2}

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110006, China

2. Liaoning Provincial Key Laboratory of TCM Resources Conservation and Development, Shenyang 110006, China

3. NERC for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Benxi 117004, China

Abstract: Objective To establish a chemical constituents-disease target-metabolic signaling pathway network of *Cimicifugae Rhizoma* for understanding its mechanism on anti-breast cancer. **Methods** TCMSP database and PharmMapper were used to obtain the chemical components and action targets of *Cimicifugae Rhizoma*. The therapeutic targets of anti-breast cancer were obtained by intersecting these targets above with those of breast cancer disease. Then, the reverse screening was executed for the potential active components of *Cimicifugae Rhizoma*. Indirect targets and protein-targets interaction networks were acquired through the GeneMANIA database, and key targets were screened through protein-protein interaction. Cytoscape was used to construct the "medicinal materia-ingredient-target" network diagram, and molecular docking was used to pair up potential active components with key targets, which confirmed the credibility of early target screening and reverse pharmacophore matching methods. Targets were imported into DAVID database for GO function enrichment analysis and KEGG pathway analysis, the results were visualized using

收稿日期: 2021-08-11

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2018M633721); 辽宁省科技特派员专项计划 (2020JH5/10400129); 辽宁省中药资源普查项目 (2019020)

第一作者: 李玥锴 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源学研究。E-mail: lyky10209@126.com

*共同通信作者: 路金才, 教授, 研究方向为中药新药研究和道地药材资源研究。E-mail: jincailu@126.com

吕重宁, 副教授, 研究方向为中药新药研究和道地药材资源研究。E-mail: lcnmi@outlook.com

R language and Omishare Tools. **Results** Totally 68 potential active ingredients of *Cimicifugae Rhizoma* and 48 breast cancer-related disease targets were obtained, the key targets were ESR1, SRC, and HRAS. A total of 75 GO items were obtained by GO functional enrichment analysis, including 484 biological processes (BP), and seven cell component (CC) items. KEGG enrichment analysis yielded 21 pathways. The result of molecular docking suggested that key targets paired well with the potential active components of *Cimicifugae Rhizoma*. **Conclusion** *Cimicifugae Rhizoma* carried out its therapeutic means in breast cancer treatment mainly through its behaviors of acting on targets such as ESR1, SRC, HRAS, etc, and regulating pathways in cancer, proteoglycans in cancer, and estrogen signaling pathway.

Key words: *Cimicifugae Rhizoma*; breast cancer; network pharmacology; ESR1; SRC; HRAS; pathways in cancer; proteoglycans in cancer; estrogen signaling pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤^[1],近年来乳腺癌患者发病率逐年增加,据美国2019年癌症调查报告统计,乳腺癌占女性所有新发癌症诊断的30%^[2]。目前,西医治疗乳腺癌主要以根治性手术、化疗及内分泌治疗为主,但治愈效果并不理想且复发转移率高^[3]。相比之下,以中医药为基础开发抗乳腺癌药物具有辨证论治和多成分、多靶点、多途径的治疗优势和特色。

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.) Maxim 或升麻 *C. foetida* L. 的干燥根茎,临床上常用于治疗头痛、咽喉肿痛、麻疹不透、子宫下垂等症^[4]。现代研究表明,升麻及其同属药用植物具有多种药理作用,尤其是在抗乳腺癌方面作用显著^[5-6]。Borrelli等^[7]发现黑升麻 *C. racemose* (L.) Nutt. 能够抑制乳腺癌细胞增生;Hostanska等^[8]发现黑升麻乙醇提取物和异丙醇提取物均可抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB231 细胞的增殖。Einbond等^[9]研究发现升麻中的脱氧升麻亭、升麻亭和 cimracemoside A 对人乳腺癌细胞 MCF-7 有抑制作用;曹丽等^[10]通过体外实验发现升麻总苷对 MDA-MB231 细胞具有明显的抑制作用。但到目前为止,升麻抗乳腺癌的药效物质基础和作用机制仍不明确。

网络药理学是一门运用计算机和网络方法分析药物与疾病和靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用关系的药理学分支学科^[11],这与中药治疗疾病的基本特点——成分多、作用靶点多、作用途径复杂等不谋而合。其可以从系统水平构建“中药活性成分-靶点-疾病”网络,阐明中药的分子作用机制^[12-13]。因此,本研究基于网络药理学方法研究升麻治疗乳腺癌的作用机制,通过数据库筛选、“成分-靶点”网络构建、蛋白-蛋白相互作用分析、基因本体论(GO)分析、功能显著性和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析、“成分-靶点-作用

通路”网络构建、分子对接验证,探讨升麻治疗乳腺癌的药效物质基础与作用机制。

1 方法

1.1 筛选升麻活性成分

根据国内外学者的深入研究^[14-15],发现升麻属植物化学成分主要包括三萜及其苷类、酚酸类、色酮类及其他类型化合物;以“升麻”为关键词,检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),收集升麻现有化学成分数据;根据化学成分的药动学参数[吸收、分布、代谢及排泄(ADME)]对其进行活性成分筛选,筛选条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥15%、类药性(drug-likeness, DL)≥0.14^[16-19]。

1.2 升麻活性成分靶点预测

将升麻活性成分以 mol2 的格式导入 PharmMapper^[20-21]在线网站进行潜在靶点的预测分析,设置参数如下:最大生成构象(maximum generated conformations):100;生成构象(generate conformers):Yes;靶点选择设置(select target set):Human protein target only;保留匹配目标的数量(number of reserved matched targets):100^[22]。取匹配值(fit score)前15位^[23]的蛋白作为该化合物的潜在靶点,获得升麻潜在靶点数据库。

1.3 获取升麻抗乳腺癌的作用靶点

以“breast cancer”为关键词,从 CTD (<https://ctdbase.org/>) 和 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库中筛选乳腺癌的疾病靶点,构建乳腺癌靶点数据库。将“1.2”项中得到的升麻潜在靶点数据库与疾病靶点数据库取交集,得到升麻治疗乳腺癌的作用靶点,并通过作用靶点反向筛选升麻活性成分。同时,将课题组待发表的升麻抗肿瘤蛋白组学研究中得到的靶点加入,得到升麻治疗乳腺癌的作用靶点库。

1.4 构建成分-作用靶点网络

将获取的升麻活性成分和作用靶点利用

Cytoscape 3.7.2 软件构建“成分-作用靶点”网络图,通过拓扑学参数分析,以度(degree)值的大小为指标,筛选出主要活性成分。

1.5 蛋白互作网络的构建与筛选

通过 GeneMANIA (<http://genemania.org/>) 数据库,将升麻抗乳腺癌的潜在作用靶点导入其中,获取靶点间的互作关系,进而得到间接靶点。将间接靶点加入作用靶点库中,导入 String 数据库中,选择 Homo sapiens,打分默认 0.4^[22],得到靶点互作网络,保存其 TSV 格式,导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,进行互作网络的拓扑学分析,获取节点的度值、中介中心度 (betweenness centrality, BC)、拓扑系数 (topological coefficient, TC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 的信息,选度值排名前 3 的靶点作为关键靶蛋白。

1.6 分子对接

从蛋白晶体结构数据库 PDB 中获取关键靶蛋白和升麻蛋白组学研究中得到的靶点的三维结构,以 PDB 格式上传,配体为“1.4”项中反向筛选出来的升麻的主要活性成分,以 mol2 格式上传,进行分子对接验证。

1.7 GO 和 KEGG 富集分析

将获得的升麻抗乳腺癌的潜在作用靶点输入 DAVID 数据库 (<http://David.ncifcrf.gov/home.jsp>),

输入靶基因名称并限定物种为 Homo sapiens,进行 GO 生物学过程富集分析和 KEGG 信号通路富集分析,设定阈值 $P < 0.05$ 。将结果通过 R 语言和 Omishare Tools 在线绘图网站可视化。

1.8 “药物成分-靶点-作用通路”网络的建立

在 Excel 中按 2 列分别构建“升麻成分-靶点”“靶点-作用通路”的列表,将其导入 Cytoscape 3.7.2 中构建网络。

2 结果

2.1 升麻活性成分筛选

以“升麻”为关键词检索 TCMSP 数据库,首先以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,发现大量已被报道的活性成分并未选入,于是将筛选条件优化至 $OB \geq 15\%$ 、 $DL \geq 0.14$,获取了升麻活性成分 68 个,信息见表 1。

2.2 靶点预测与筛选

通过 PharmMapper 对升麻筛选所得活性成分进行靶点预测,其中 68 种成分均与乳腺癌有关,将预测靶点与 TTD、CTD 数据库所获得的与乳腺癌疾病相关的 542 个靶点进行对比后取交集靶点,筛选得到升麻治疗乳腺癌的直接作用靶点 28 个、间接作用靶点 20 个,并将本课题组待发表的升麻抗肿瘤蛋白组学研究中得到的 5 个靶点加入其中,具体靶点信息见表 2。

表 1 升麻活性成分的基本信息

Table 1 Basic information on active ingredients of *Cimicifugae Rhizoma*

编号	化合物英文名称	化合物中文名称	OB/%	DL
MOL011985	12-hydroxycimigenol-3-O- α -L-arabinopyranoside	12-羟基升麻醇-3-O- α -L-阿拉伯吡喃糖苷	31.89	0.14
MOL011986	12-hydroxycimigenol-3-O- α -L-arabinopyranoside_qt	12-羟基升麻醇	17.71	0.38
MOL011987	15-O-acetylacerinol	15-O-乙酰丙酮醇	18.49	0.36
MOL011991	23-epi-26-deoxyacteinol_qt	23-表-26-脱氧升麻烃苷元	47.64	0.35
MOL011992	23-O-acetylcimigenol-3-O- β -D-xylopyranoside	23-O-乙酰升麻醇-3-O- β -D-吡喃木糖苷	21.09	0.31
MOL011993	23-O-acetylcimigenol-3-O- β -D-xylopyranoside_qt	23-O-乙酰升麻醇	28.81	0.69
MOL011994	23-O-acetylshengmanol-3-O- α -L-arabinopyranoside	23-O-乙酰升麻醇-3-O- α -L-阿拉伯糖苷	21.09	0.31
MOL011995	23-O-acetylshengmanol-3-O- α -L-arabinopyranoside_qt	23-O-乙酰升麻醇	28.81	0.69
MOL011997	24-O-acetyl-7,8-didehydrocimigenol-3- β -D-xyloside_qt	24-O-乙酰基-7,8-二羟基升麻醇	18.21	0.49
MOL011998	24-epi-7,8-didehydrocimigenol	24-表-7,8-二羟基升麻醇	17.15	0.40
MOL011999	24-epi-acerinol	24-表-小升麻醇	31.31	0.42
MOL012000	24-hydroxy-12-acetoxy-25,26,27-trinorcycoartan-16,23-dione-3-O- α -L-arabinopyranoside	24-羟基-12-乙酰氧基-25,26,27-三去甲环木波萝烷-16,23-二酮-3-O- α -L-阿拉伯糖苷	21.89	0.45
MOL012001	24-hydroxy-12-acetoxy-25,26,27-trinorcycoartan-16,23-dione-3-O- α -L-arabinopyranoside_qt	24-羟基-12-乙酰氧基-25,26,27-三去甲环木波萝烷-16,23-二酮	29.39	0.79
MOL012002	24-O-acetylcimigenol-3-O- β -D-xylopyranoside	24-O-乙酰升麻醇-3-O- β -D-木糖苷	17.74	0.19
MOL012003	24-O-acetylcimigenol-3-O- β -D-xylopyranoside_qt	24-O-乙酰升麻醇	16.63	0.49
MOL012006	25-O-acetyl-7,8-didehydrocimigenol-3- β -D-xyloside_qt	25-O-乙酰基-7,8-二羟基升麻醇	22.43	0.33
MOL012009	25-O-acetylcimigenol-3-O- β -D-galactoyranoside_qt	25-O-乙酰升麻醇	19.35	0.32

续表1

编号	化合物英文名称	化合物中文名称	OB/%	DL
MOL012011	25- <i>O</i> -acetylcimigenol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glc-(1-2)- β - <i>D</i> -xylopyranoside_qt	25- <i>O</i> -乙酰升麻醇- β - <i>D</i> -木糖苷	30.04	0.32
MOL012014	25- <i>O</i> -anhydrocimigenol-3- β - <i>D</i> -xylopyranoside_qt	25- <i>O</i> -脱水升麻醇	17.65	0.43
MOL012016	26-deoxyacteïn_qt	26-脱氧升麻炔苷元	27.90	0.29
MOL012018	3-keto-24-epi-7,8-didehydrocimigenol	3-酮基-24-表-7,8-二羟基升麻醇	23.62	0.40
MOL012021	7,8-didehydro-27-deoxyacteïn_qt	7,8-二脱氢-27-脱氧升麻炔苷元	17.77	0.29
MOL012022	7,8-didehydrocimigenol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -xyloside	7,8-二羟基升麻醇-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -木糖苷	17.62	0.15
MOL012023	7,8-didehydrocimigenol	7,8-去氧升麻醇	36.79	0.40
MOL012025	cimisine D_qt	升麻昔D苷元	17.87	0.49
MOL012027	ferulic acid- β - <i>D</i> -glucoside	阿魏酸- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	25.23	0.32
MOL012029	heracleifolinoside A_qt	大三叶升麻昔A苷元	16.41	0.77
MOL012030	heracleifolinoside B	大三叶升麻昔B	42.31	0.17
MOL012031	heracleifolinoside B_qt	大三叶升麻昔B苷元	27.16	0.79
MOL012035	heracleifolinoside D_qt	大三叶升麻昔D苷元	17.16	0.57
MOL012038	heracleifolinoside F	大三叶升麻昔F	47.98	0.18
MOL012039	heracleifolinoside F_qt	大三叶升麻昔F苷元	20.64	0.77
MOL012040	norkhelloside	凯林昔	31.31	0.84
MOL012041	norkhelloside_qt	凯林昔苷元	37.81	0.16
MOL012042	acerinol	金龟草二醇	29.57	0.42
MOL012044	acteïn_qt	阿科特素苷元	15.95	0.26
MOL012046	cimifoetiside A_qt	西麻昔A苷元	17.35	0.33
MOL012048	cimifoetiside B_qt	西麻昔B苷元	15.51	0.26
MOL012050	cimicifugadine_qt	升麻碱苷元	21.19	0.63
MOL012051	cimicifugamide	升麻酰胺	22.01	0.73
MOL012052	tuberosine A	块葛黄酮A	102.67	0.34
MOL012053	cimicifugic acid	升麻酸	83.02	0.45
MOL012054	cimicifugoside	升麻昔	20.13	0.36
MOL012055	cimicifugoside_qt	升麻昔苷元	33.84	0.74
MOL012057	cimicifugoside H-1_qt	升麻昔H-1苷元	17.84	0.40
MOL012060	cimigenol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -xylopyranoside	升麻醇-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃木糖苷	17.77	0.15
MOL012062	cimigenol	升麻醇	37.19	0.40
MOL012064	cimilactone A_qt	升麻内酯A	17.71	0.68
MOL012066	cimilactone B_qt	升麻内酯B	18.46	0.68
MOL012067	cimisine E	升麻昔E	16.49	0.16
MOL012068	cimisine E_qt	升麻昔E苷元	23.37	0.43
MOL012069	dahurinol	北升麻醇	17.32	0.60
MOL012070	demethoxycimicifugamide	去甲氧基升麻酰胺	19.80	0.71
MOL012073	methylcimicifugoside_qt	甲基升麻昔苷元	30.19	0.24
MOL012074	neocimisine	升麻新昔	17.64	0.31
MOL012078	visamminol	齿阿米醇	50.01	0.23
MOL012080	(2 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-24,25-epoxy-3- β -(β - <i>D</i> -xylopyranosyloxy)-9,19-cyclolanost-7-ene-16,23-dione	(2 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-24,25-环氧-3- β -(β - <i>D</i> -吡喃木糖苷)-9,19-环羊毛甾烷-7-烯-16,23-二酮	15.47	0.38
MOL012081	(2 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-24,25-epoxy-3- β -(β - <i>D</i> -xylopyranosyloxy)-9,19-cyclolanost-7-ene-16,23-dione_qt	(2 <i>R</i> ,24 <i>R</i>)-24,25-环氧-3- β -(β - <i>D</i> -吡喃木糖苷)-9,19-环羊毛甾烷-7-烯-16,23-二酮	40.10	0.76
MOL000131	linoleic acid	亚油酸	41.90	0.14
MOL001924	paeoniflorin	芍药苷	53.87	0.79
MOL001925	paeoniflorin_qt	芍药苷苷元	68.18	0.40
MOL000359	sitosterol	谷甾醇	36.91	0.75
MOL004029	visnagin	齿阿米素	44.25	0.15
MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	43.83	0.76
MOL000483	(<i>Z</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4-hydroxyphenyl)-ethyl]-acrylamide	(<i>Z</i>)-3-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)- <i>N</i> -[2-(4-羟基苯基)-乙基]-丙烯酰胺	118.35	0.26
MOL007777	stigmasta-5,22-dien-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	豆甾醇5,22-二烯三胺3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	21.32	0.63
MOL000087	β -sitosterol-3- <i>O</i> -glucoside	β -谷甾醇-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	20.63	0.62
MOL000357	sitoglucoside	西托糖苷	20.63	0.62

表2 升麻治疗乳腺癌的作用靶点信息

Table 2 Target information of component action of *Cimicifugae Rhizoma* in treatment of breast cancer

基因	靶点	频率	类型	基因	靶点	频率	类型
VDR	vitamin D3 receptor	41	直接	IMPDH1	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	1	直接
HSP90AA1	heat shock protein HSP 90-alpha	22	直接	SRC	proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	1	直接
GSTP1	glutathione S-transferase P	18	直接	RP11-618-	—	—	间接
RXRβ	retinoic acid receptor RXR-beta	17	直接	P17.4	—	—	间接
HRAS	GTPase Hras	13	直接	RXRG	retinoic acid receptor RXR-gamma	—	间接
AR	androgen receptor	12	直接	HR	lysine-specific demethylase hairless	—	间接
NR3C1	glucocorticoid receptor	12	直接	RBM14	RNA-binding protein 14	—	间接
PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	10	直接	SPOP	speckle-type POZ protein	—	间接
MME	neprilysin	7	直接	ZBTB20	zinc finger and BTB domain-containing protein 20	—	间接
MMP2	72 kDa type IV collagenase	4	直接	NR2C2	nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	—	间接
INSR	insulin receptor	3	直接	RBM39	RNA-binding protein 39	—	间接
FABP7	fatty acid-binding protein, brain	3	直接	NR0B1	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	—	间接
MMP3	stromelysin-1	3	直接	MMEL1	membrane metallo-endopeptidase-like 1	—	间接
CHEK1	serine/threonine-protein kinase Chk1	3	直接	ESR1	ethylene-responsive transcription factor ESR1	—	间接
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	3	直接	NR1I3	nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	—	间接
MET	hepatocyte growth factor receptor	2	直接	NR2E3	photoreceptor-specific nuclear receptor	—	间接
KDR	vascular endothelial growth factor receptor 2	1	直接	GMPR2	GMP reductase 2	—	间接
RARA	retinoic acid receptor alpha	1	直接	ECEL1	endothelin-converting enzyme-like 1	—	间接
ESR2	estrogen receptor beta	1	直接	ECE1	extent of cell elongation protein 1	—	间接
MMP9	matrix metalloproteinase-9	1	直接	PHEX	phosphate-regulating neutral endopeptidase PHEX	—	间接
BMP2	bone morphogenetic protein 2	1	直接	GMPR	GMP reductase 1	—	间接
STS	steryl-sulfatase	1	直接	RXRA	retinoic acid receptor RXR-alpha	—	间接
CYP19A1	aromatase	1	直接	KEL	kell blood group glycoprotein	—	间接
PGR	progesterone receptor	1	直接	TPT1	translationally-controlled tumor protein	—	待发表
PIM1	serine/threonine-protein kinase pim-1	1	直接	LGALS1	galectin-1	—	待发表
GPI	glucose-6-phosphate isomerase	1	直接	TPI1	triosephosphate isomerase	—	待发表
				CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	—	待发表
				MDH2	malate dehydrogenase	—	待发表

2.3 通过活性成分-靶点网络筛选主要潜在活性成分

“2.1”和“2.2”项中获取的升麻活性成分和作用靶点利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“成分-靶点”网络,见图1。通过拓扑学参数分析,选取度值排名前16位,即度值>3的成分为主要潜在活性成分,见表3。

2.4 升麻靶蛋白互作网络和拓扑参数分析

将“2.2”项得到的作用靶点基因导入 STRING 数据库,限定物种为 Homo sapiens 进行分析,蛋白互作网络(图2)包含53个节点、168条边。保存 TSV 文件,导入 Cytoscape 3.7.2 中进行拓扑学参数分析,结果见表4。

2.5 分子对接

选择拓扑学参数中度值排名前3的靶点 ESR1、SRC、HRAS 和升麻蛋白组学研究得到的靶点 TPT1、LGALS1、TPI1、CFL1、MDH2,与升麻的16个主要活性成分进行分子对接。用 Omishare Tools 软件将结果制作热图,结果见图3。结果显示,关键靶标与升麻潜在活性成分匹配性较好。

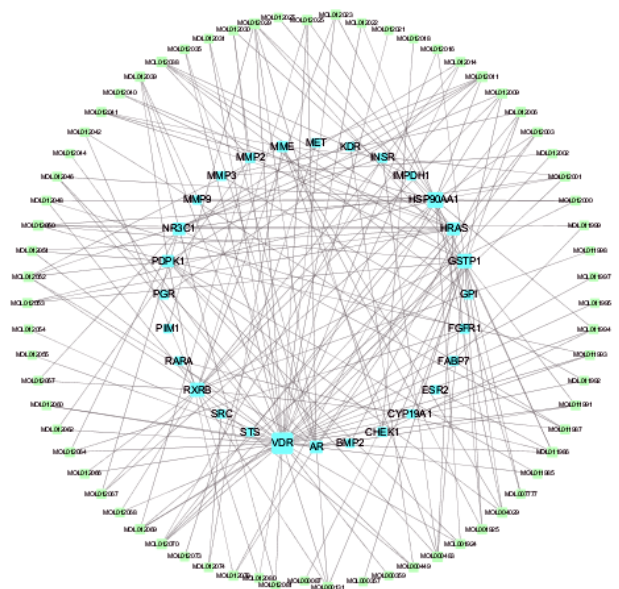


图1 升麻“成分-靶点”网络图
Fig. 1 “Ingredients-targets” network of *Cimicifugae Rhizoma*

2.6 GO和KEGG富集分析

对升麻治疗乳腺癌的潜在靶点通过 DAVID 数

表3 升麻的主要潜在活性成分

Table 3 Major activity constituents in *Cimicifugae Rhizoma*

成分编号	成分	度值
MOL012011	25-O-乙酰升麻醇-3-O-β-D-葡萄糖基-(1-2)-β-D-吡喃木糖苷	6
MOL012029	大三叶升麻苷A	6
MOL000483	(Z)-3-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)-N-[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-丙烯酰胺	5
MOL011986	12-羟基升麻醇-3-O-α-L-阿拉伯吡喃糖苷	5
MOL012038	大三叶升麻苷F	5
MOL012050	升麻碱	5
MOL012052	块葛黄酮A	5
MOL012070	去甲甲基升麻酰胺	5
MOL000131	亚油酸	4
MOL004029	齿阿米素	4
MOL012001	24-羟基-12-乙酰氧基-25,26,27-三去甲环木菠萝烷-16,23-二酮-3-O-α-L-阿拉伯糖苷	4
MOL012006	25-O-乙酰基-7,8-二羟基升麻醇-3-β-D-木糖苷	4
MOL012009	25-O-乙酰升麻醇-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷	4
MOL012025	升麻苷D	4
MOL012039	大三叶升麻苷F	4
MOL012069	北升麻醇	4

数据库进行GO生物分析,GO功能富集分析中得到生物过程(BP)条目484条,细胞组成(CC)条目7条,分子功能(MF)条目74条,利用R语言中 bonferroni 方法对P值进行校正后, $P < 0.05$ 认为具有显著差异,再根据富集程度 foldchange 从大到小排序,筛选后作图,见图4。

KEGG通路富集筛选得到21条信号通路($P < 0.05$),涉及癌症通路(pathways in cancer)、癌症中蛋白多糖通路(proteoglycans in cancer)和雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)等,通过 Omishare Tools 网站将结果可视化,见图5。

2.7 “药物成分-靶点-作用通路”网络图构建与分析

采用 Cytoscape 3.7.2 软件建立“药物成分-靶点-作用通路”网络图,进行拓扑学参数分析后,按“度”值高低调节节点在网络中的大小。“药物成分”为升麻的68个活性成分,“靶点”为升麻的直接靶点及KEGG通路($P < 0.05$)涉及的靶点,“互动通路”为 $P < 0.05$ 的KEGG通路。结果见图6。

3 讨论

升麻主要功效为清热解毒,具有抗炎、治疗肿瘤等作用。本研究结果表明,三萜皂苷类化合物为其抗乳腺癌的主要成分,通过“药物成分-靶点-通路”图可知,25-O-乙酰基-7,8-二羟基升麻醇-3-β-D-木糖苷、25-O-乙酰升麻醇-3-O-β-D-葡萄糖基-(1-2)-β-D-吡喃木糖苷、升麻醇、升麻苷、23-O-乙酰升麻醇-3-O-β-D-吡喃木糖苷、阿科特素等化合物是升麻抗乳腺癌的主要活性成分。上述化合物的抗肿瘤活性也已经有大量文献报道和证实^[24-25]。

本研究发现,在基于网络药理学筛选升麻活性成分的过程中,存在有些已报道的活性成分并未选入其中的问题,这可能是网络药理学研究中药物活性成分筛选条件的设置存在合理性问题。以“升麻”为关键词检索TCMSP数据库,首先以 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 作为筛选条件,发现大量已被报道的活性成分并未选入,于是将筛选条件优化至 $OB \geq$

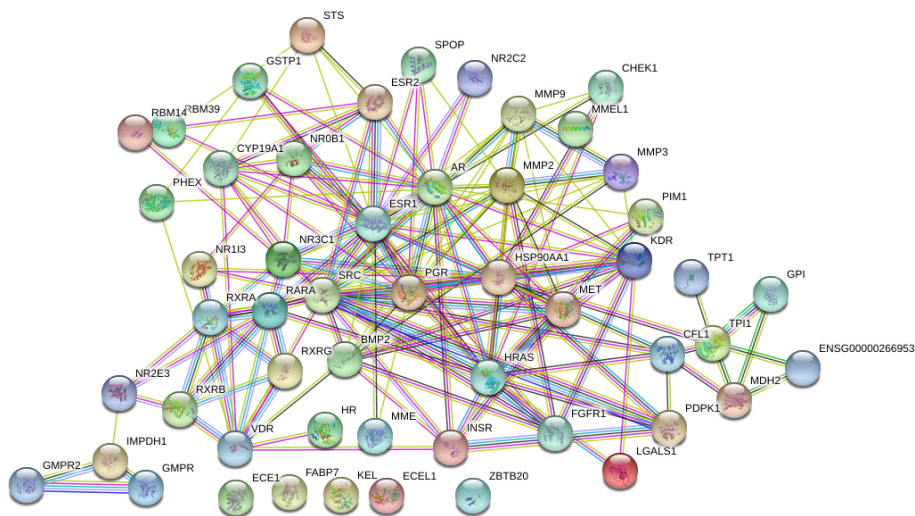


图2 升麻治疗乳腺癌靶点的蛋白互作网络

Fig. 2 Network interaction map of targets of *Cimicifugae Rhizoma* in treatment of breast cancer

表4 蛋白相互作用的拓扑学参数分析

Table 4 Topological parameter analysis of protein-protein interaction

靶点	度	BC	CC	TC	靶点	度	BC	CC	TC
ESR1	24	0.193 6	0.589 7	0.247 8	PDPK1	5	0.001 8	0.418 2	0.500 0
SRC	22	0.176 4	0.589 7	0.268 2	STS	5	0.001 6	0.403 5	0.442 9
HRAS	18	0.108 2	0.547 6	0.276 3	RXRG	4	0.000 0	0.356 6	0.533 3
AR	18	0.061 8	0.511 1	0.307 9	MDH2	4	0.010 9	0.317 2	0.444 4
HSP90AA1	17	0.172 0	0.528 7	0.285 1	CHEK1	4	0.000 0	0.422 0	0.572 6
MMP2	14	0.032 3	0.484 2	0.378 8	NR1I3	4	0.007 3	0.429 9	0.473 2
PGR	13	0.024 3	0.484 2	0.373 6	SPOP	4	0.000 0	0.393 2	0.638 9
KDR	13	0.018 8	0.479 2	0.389 1	GSTP1	4	0.005 6	0.414 4	0.516 7
MMP9	12	0.006 2	0.474 2	0.414 2	RBM39	4	0.006 0	0.386 6	0.385 4
NR3C1	10	0.059 0	0.489 4	0.365 7	NR2E3	4	0.124 6	0.356 6	0.500 0
MET	10	0.002 7	0.464 6	0.455 9	PIM1	3	0.000 0	0.403 5	0.654 3
VDR	10	0.083 0	0.446 6	0.271 4	IMPDH1	3	0.085 0	0.270 6	0.466 7
BMP2	10	0.012 0	0.455 4	0.354 3	PHEX	3	0.004 0	0.377 0	0.416 7
RARA	9	0.151 1	0.494 6	0.299 1	GPI	2	0.000 0	0.275 4	0.833 3
CYP19A1	9	0.016 5	0.455 4	0.358 0	LGALS1	2	0.000 0	0.365 1	0.775 0
RXRA	8	0.058 7	0.446 6	0.283 3	GMPR2	2	0.000 0	0.215 0	0.833 3
NR0B1	7	0.004 6	0.418 2	0.413 8	GMPR	2	0.000 0	0.215 0	0.833 3
ESR2	7	0.011 6	0.446 6	0.381 0	ENSG00000266953	2	0.000 0	0.275 4	0.833 3
INSR	7	0.007 2	0.438 1	0.390 8	MME	2	0.000 0	0.377 0	0.770 8
TPI1	6	0.120 5	0.374 0	0.258 3	RBM14	2	0.000 7	0.340 7	0.545 5
FGFR1	6	0.000 2	0.429 9	0.510 1	NR2C2	2	0.000 0	0.383 3	0.807 7
MMP3	6	0.0000	0.425 9	0.494 8	HR	1	0.000 0	0.310 8	0.000 0
CFL1	6	0.0655	0.434 0	0.387 1	TPT1	1	0.000 0	0.273 8	0.000 0
RXRB	5	0.0069	0.368 0	0.437 5					

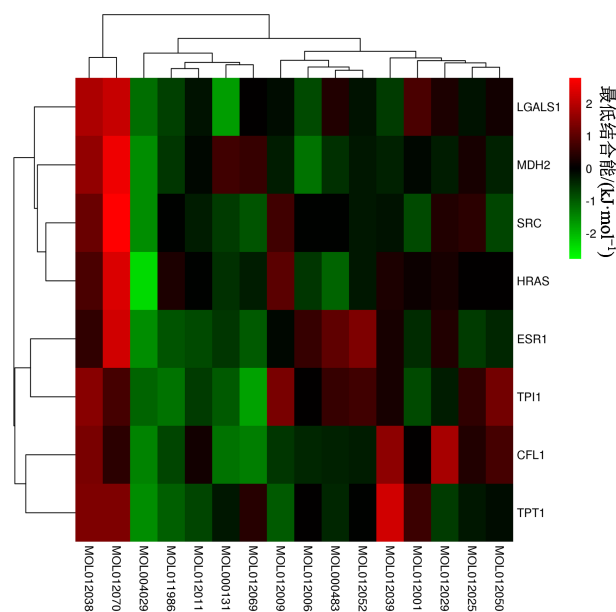


图3 升麻分子对接结果

Fig. 3 Molecular docking results of *Cimicifugae Rhizoma*

15%、DL \geq 0.14, 获取了升麻活性成分 68 个, 但仍有个别已知活性成分被系统排除。因此, 本课题组认为网络药理学研究的活性成分筛选中直接照搬“OB \geq 30%、DL \geq 0.18”这一标准, 对于大部分中药并不合适, 这一标准可能会导致中药中某些重要

活性化合物的遗漏, 同时筛选出一些作用效果甚微的成分, 给后续的研究造成困难。而目前绝大多数相关文献中, 对 OB 和 DL 的设置均为 OB \geq 30%, DL \geq 0.18, 如李丹等^[26]在人参的网络药理学研究中, 以 OB>30%、DL>0.18 为条件筛选出的 22 个活性成分中, 包含了山柰酚、玛卡因等极微量成分, 而人参中最主要的活性成分(人参皂苷类化合物)仅含有 3 个; 祝婧等^[27]在升麻“透疹”功效作用机制的网络药理学研究中, 以 OB \geq 30%、DL \geq 0.18 为条件筛选出的活性成分中, 包含了 β -谷甾醇、豆甾醇等成分, 而升麻起到抗炎作用的主要活性成分为三萜及其苷类、酚酸类。上述这些现象是值得科研人员深思的。

研究通过 TCMSP 数据库筛选出升麻活性成分, 采用 PharmMapper 对潜在活性成分的靶点进行预测, 并与乳腺癌相关疾病靶点取交集, 获得升麻治疗乳腺癌的直接作用靶点 28 个、间接作用靶点 20 个以及本课题组在升麻抗肿瘤蛋白组学研究中得到的 5 个靶点, 通过蛋白-蛋白相互作用网络得到排名前 3 的关键靶点: ESR1、SRC、HRAS, 构建“药物成分-靶点-通路”确定了 VDR、HSP90AA1、AR、GSTP1、PDPK1 为潜在重要靶点。关键靶基因均与

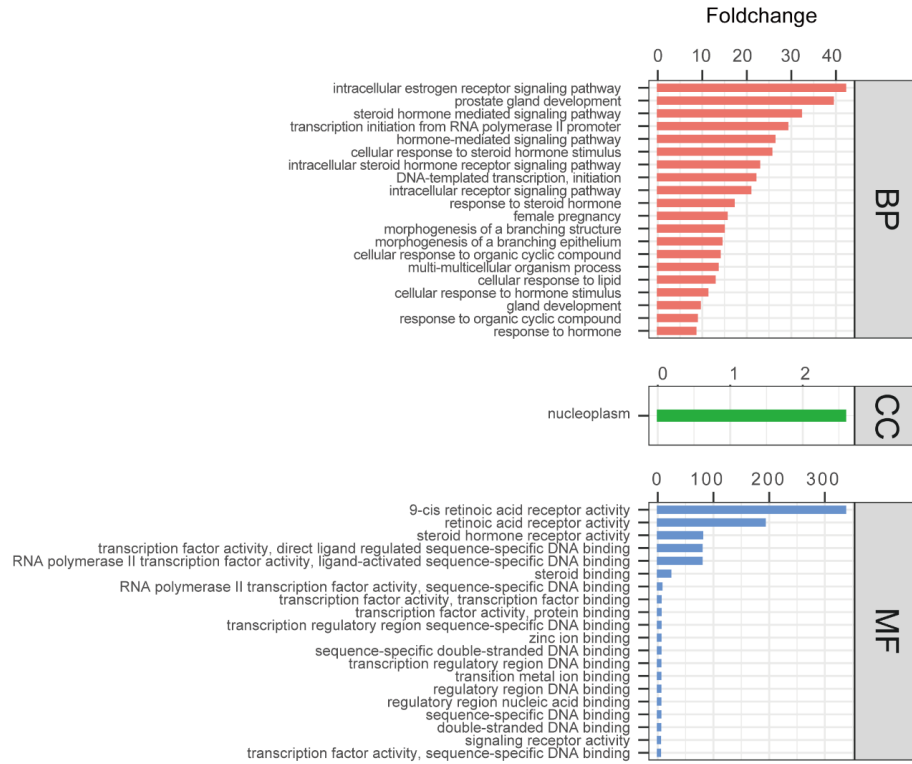


图4 升麻治疗乳腺癌的主要靶点的GO富集分析结果

Fig. 4 GO enrichment analysis of main candidate targets network from *Cimicifugae Rhizoma*

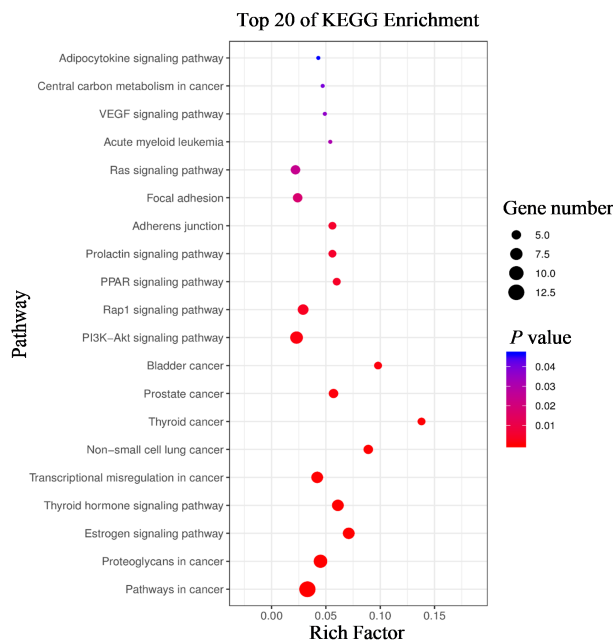


图5 KEGG通路富集分析结果

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

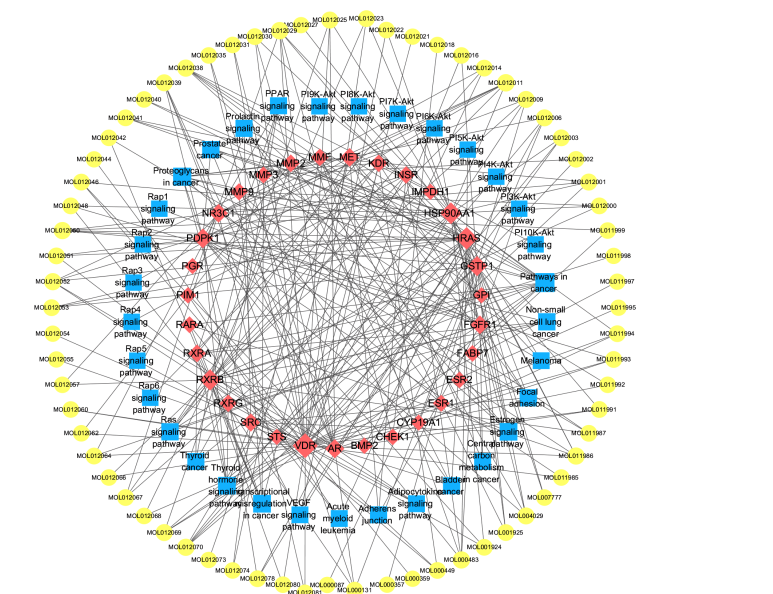


图6 “成分-靶点-通路”相互作用网络图

Fig. 6 Network diagram of of “ingredients targets KEGG pathway” interaction

乳腺癌的发生发展有着密切关系,可以以相关靶基因为靶点对乳腺癌起治疗作用以及检测乳腺癌在人体的情况等。

通过GO富集分析可以了解到,升麻治疗乳腺癌主要通过细胞内雌激素受体信号通路、前列腺发育、甾体类激素代谢通路、RNA聚合酶II启动子的转

录起始、激素化信号通路等生物学过程。KEGG富集通路排名靠前的条目包含癌症通路、癌症蛋白多糖、雌激素信号通路等。

本研究基于网络药理学全面、快速地探究了升麻治疗乳腺的有效成分、作用靶点、蛋白关系网络、生物学过程相关作用通路,相关结果为后续升麻治

疗乳腺癌的药理学研究提供了一定参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(13): 668-674.
Chen W Q, Zheng R S. Incidence, mortality and survival analysis of breast cancer in China [J]. Chin J Clin Oncol, 2015, 42(13): 668-674.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA A Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] Riis M. Modern surgical treatment of breast cancer [J]. Ann Med Surg, 2020, 56: 95-107.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 75.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 75.
- [5] 黄广欣, 龚苏晓, 许浚, 等. 升麻研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2651-2660.
Huang G X, Gong S X, Xu J, et al. Research progress of *Cimicifugae Rhizoma* and prediction analysis on Q-marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2651-2660.
- [6] Guo Y Q, Yin T, Wang X M, et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 209: 264-282.
- [7] Borrelli F, Ernst E. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) for menopausal symptoms: A systematic review of its efficacy [J]. Pharmacol Res, 2008, 58(1): 8-14.
- [8] Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, et al. *Cimicifuga Racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(2): 151-160.
- [9] Einbond L S, Ye W C, Kan H, et al. Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells [J]. Phytomedicine, 2008, 15(6/7): 504-511.
- [10] 曹丽, 杨卫彬, 潘瑞乐, 等. 兴安升麻总苷抗肿瘤药效研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(12): 31-33.
Cao L, Yang W B, Pan R (L/Y), et al. Experimental study on antitumor effects of total glycoside of *Cimicifuga dahurica* maxim [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2008, 15(12): 31-33.
- [11] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4789-4797.
Ren Y, Deng Y J, Ma H B, et al. Research progress and challenges of network pharmacology in field of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(18): 4789-4797.
- [12] 耿胜男, 谢鹏, 李阳杰, 等. 基于网络药理学的麻杏石甘汤治疗支气管哮喘的作用机制分析 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2168-2175.
Geng S N, Xie P, Li Y J, et al. Mechanism analysis of Mxing Shigan Decoction in treatment of bronchial asthma based on network pharmacology [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(11): 2168-2175.
- [13] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. Chin Herb Med, 2019, 11(4): 349-356.
- [14] 陈继永. 升麻的化学成分及生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Chen J Y. Studies on chemical constituents and bioactivities of *Cimicifuga foetida* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [15] 孙启泉, 左爱侠, 张婷婷. 升麻属植物化学成分、生物活性及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 3005-3016.
Sun Q Q, Zuo A X, Zhang T T. Advances in studies on chemical constituents in plants of *Cimicifuga* L. and their bioactivities and clinical application [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(14): 3005-3016.
- [16] Yamanishi Y, Kotera M, Kanehisa M, et al. Drug-target interaction prediction from chemical, genomic and pharmacological data in an integrated framework [J]. Bioinformatics, 2010, 26(12): i246-i254.
- [17] 郑武娟, 周润昌, 周湘君, 等. 基于网络药理学的人参治疗非酒精性脂肪肝病靶点研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 1971-1976.
Zheng W J, Zhou R C, Zhou X J, et al. Explain therapeutic target of *Panax ginseng* for nonalcoholic fatty liver disease through network pharmacology system [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(10): 1971-1976.
- [18] Zheng C L, Pei T L, Huang C, et al. A novel systems pharmacology platform to dissect action mechanisms of traditional Chinese medicines for bovine viral diarrhoea disease [J]. Eur J Pharm Sci, 2016, 94: 33-45.
- [19] Yamanishi Y, Kotera M, Kanehisa M, et al. Drug-target interaction prediction from chemical, genomic and pharmacological data in an integrated framework [J]. Bioinformatics, 2010, 26(12): i246-i254.
- [20] Liu X F, Ouyang S S, Yu B, et al. PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Web Server issue): W609-W614.

- [21] 方坚松, 刘艾林, 杜冠华. 基于化学信息学方法预测药物靶点的研究进展 [J]. 药学学报, 2014, 49(10): 1357-1364.
Fang J S, Liu A L, Du G H. Research advance in the drug target prediction based on chemoinformatics [J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(10): 1357-1364.
- [22] 韩彦琪, 许浚, 张喜民, 等. 基于网络药理学的元胡止痛滴丸治疗原发性痛经的作用机制研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(3): 380-387.
Han Y Q, Xu J, Zhang X M, et al. Network pharmacology-based study on mechanism of Yuanhu Zhitong Dropping Pills in the treatment of primary dysmenorrhea [J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(3): 380-387.
- [23] 沈红波, 周一农, 郑杰, 等. 基于网络药理学葵花护肝片"多成分-多靶点-多通路"的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1464-1474.
Shen H B, Zhou Y N, Zheng J, et al. "Multi-component-multi-target-multi-pathway" mechanism of Kuihua Hupan Tablets based on network pharmacology [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(7): 1464-1474.
- [24] Li J X, Yu Z Y. *Cimicifugae rhizoma*: From origins, bioactive constituents to clinical outcomes [J]. Curr Med Chem, 2006, 13(24): 2927-2951.
- [25] 裴秋燕, 斯建勇, 沈连刚, 等. 兴安升麻根茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1075-1078.
Pei Q Y, Si J Y, Shen L G, et al. Chemical constituents from rhizomes of *Cimicifuga dahurica* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(6): 1075-1078.
- [26] 李丹, 鲍淑红. 基于网络药理学探讨人参对乳腺癌的作用机制 [J]. 海南医学院学报, 2020, 26(6): 411-417.
Li D, Bao S H. Explore the mechanism of *Ginseng* on breast cancer based on network pharmacology [J]. J Hainan Med Univ, 2020, 26(6): 411-417.
- [27] 祝婧, 吴江峰, 燕波, 等. 基于网络药理学探讨中药升麻"透疹"功效作用机制 [J]. 江西中医药, 2019, 50(11): 60-64.
Zhu J, Wu J F, Yan B, et al. Study on the efficacy mechanism of Chinese herbal medicine *Cimicifugae rhizoma* of "promoting eruption" based on network pharmacology [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2019, 50(11): 60-64.

[责任编辑 兰新新]