

基于网络药理学和分子对接探讨四物汤抗乳腺癌的作用机制

单丽芳¹, 康国娇¹, 张超², 缪玮², 宋晓坤^{2*}

1. 普洱市中医医院 药剂科, 云南 普洱 665000

2. 天津医科大学肿瘤医院, 天津 300060

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接技术分析四物汤抗乳腺癌的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库分析平台 (TCMSP) 获取熟地黄、白芍、川芎、当归的主要活性成分及其靶点, 根据吸收、分布、代谢和排泄 (absorption、distribution、metabolism and excretion, ADME) 筛选中药活性组分; 通过在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM)、治疗靶标数据库 (TTD)、Genecards 和 Drugbank 数据库获取乳腺癌主要作用靶点; 通过 Venn Diagram 得到四物汤与乳腺癌的共同靶点; 利用 Biosogenet 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction network, PPI) 分析, 构建 PPI 网络; 采用 Metascape 平台分析“药物-成分-靶点”及其参与的生物过程及通路, 采用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“活性成分-疾病-通路”网络, 并运用 AutoDock 及 Pymol 对关键靶点与相应活性成分进行分子对接验证。**结果** 从四物汤中筛选得到 40 种活性成分及 147 个作用靶点, 与 1505 个乳腺癌相关靶点取交集, 得到 61 个共同靶点; 四物汤抗乳腺癌的核心活性成分为山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇等, 关键靶点为前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 (estrogen receptor1, ESR1)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT1) 等; 四物汤抗乳腺癌的生物学通路众多, 主要功能为调控细胞周期进程、血管生成、激素水平等。分子对接结果显示, 筛选的主要活性成分与其对应靶蛋白均具有较好的结合活性。**结论** 四物汤抗乳腺癌具有多成分、多靶点、多通路的特点, 为其临床应用提供基础。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 四物汤; 乳腺癌; 山柰酚; β -谷甾醇; 豆甾醇; 没食子酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)13-3943-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.018

Mechanism of Siwu Decoction on breast cancer based on network pharmacology and molecular docking

SHAN Li-fang¹, KANG Guo-jiao¹, ZHANG Chao², MIAO Wei², SONG Xiao-kun²

1. Department of Pharmacy, Puer Hospital of Traditional Chinese Medicine, Puer 665000, China

2. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract: **Objective** To reveal the mechanism of Siwu Decoction (四物汤) on breast cancer based on network pharmacology and molecular docking. **Methods** Main chemical components and targets of *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Paeoniae Radix Alba*, *Chuanxiong Rhizoma* and *Angelicae Sinensis Radix* were obtained from TCMSP database, and active components of Siwu Decoction were screened according to absorption, metabolism, distribution and excretion (ADME). Main targets of breast cancer were obtained from databases of Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Therapeutic Target Database (TTD), Genecards and Drugbank. Common targets of Siwu Decoction and breast cancer were obtained by Venn Diagram, and Biosogenet was used to analyze protein-protein interaction (PPI) and construct PPI network. Metascape platform was used to analyze “drug-component-target” and its involved biological processes and pathways, and then Cytoscape 3.8.0 software was used to construct a network of “active component-disease-pathway”. AutoDock and PyMol were used to conduct molecular docking verification of key targets and corresponding active ingredients. **Results** A total of 40 active ingredients were screened from Siwu Decoction, and 147 predicted targets were obtained; 1505 main targets for breast cancer were obtained, 61 common targets for active ingredients of Siwu Decoction and breast cancer were obtained. Core active ingredients from Siwu Decoction on breast cancer were kaempferol, β -sitosterol, gallic acid, stigmasterol and etc. Core targets were prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), estrogen receptor 1 (ESR1),

收稿日期: 2020-12-21

作者简介: 单丽芳 (1989—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事肿瘤临床药学及中药理论与应用研究。Tel: 18387723782 E-mail: 465352726@qq.com

*通信作者: 宋晓坤, 女, 硕士, 主任药师, 从事医院药学质控及临床药学研究。E-mail: xiaokun18@hotmail.com

RAC- α serine/threonine-protein kinase (AKT1) and etc. Many biological pathways were involved in anti-breast cancer effect of Siwu Decoction with mainly function of regulating cell cycle process, angiogenesis and hormone levels. Molecular docking results showed that main active components had good binding activity with their corresponding target proteins. **Conclusion** Siwu Decoction has characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway on anti-breast cancer, which provides the basis for its clinical application.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Siwu Decoction; breast cancer; kaempferol; β -sitosterol; stigmasterol; gallic acid

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一，美国癌症协会统计，2019 年乳腺癌的新发病例在美国女性十大主要癌症类型中位居首位^[1]。我国国家癌症中心《2018 年全国最新癌症报告（上）》指出，乳腺癌为当前中国女性发病率最高的肿瘤，其发病率逐年升高，且越来越年轻化^[2]。随着中医药的不断发展，中药在治疗乳腺癌中发挥着重要作用，尤其在改善症状方面具有极大潜力。中医将乳腺癌归于“乳岩”“乳石痈”“奶岩”范畴，其病位在肝、脾、肾。中医认为，气滞血瘀痰凝是乳腺癌的主要病机，血液运行不畅，血流瘀滞最终成为“瘤”^[3-4]。四物汤源自《仙授理伤续断秘方》，为补血活血的经典方剂，由熟地黄、白芍、川芎、当归组成，具有补血和血、调经化瘀的功效^[5]，临床上被广泛用于促进骨髓造血、改善外周血象及修复受损红细胞、治疗骨科类疾病、妇科类疾病、恶性肿瘤放化疗后血虚及血液高凝症等^[6]。四物汤能够防治乳腺癌^[7]，但由于其多成分、多靶点的特点，四物汤治疗乳腺癌的作用机制较为复杂，确定其活性成分群及作用机制成为亟需解决的问题。

网络药理学为中药组方应用于多种疾病的机制研究提供了科学通道^[8]，其所运用的系统生物学研究思路与复方多成分、多靶点、多途径相互作用的特点高度一致，而整体性、系统性与中医药研究的整体观、辨证论治相契合。本研究采用网络药理学方法，根据四物汤中主要活性成分的分子结构特征进行靶点筛选，对乳腺癌相关靶点进行预测，从整体角度系统分析二者在网络中特定节点的相互作用关系，从而探索药物与机体的相互关联，揭示可能潜在的作用机制，并采用分子对接技术对筛选出的主要活性成分和关键靶点进行结合活性验证，为四物汤的临床应用及深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 四物汤相关靶点筛选

通过中医药系统药理学平台（TCMSP）^[9]检索熟地黄、白芍、川芎、当归的活性成分，由于中药

进入体内后多通过有效成分入血发挥作用，故根据口服利用度（oral bioavailability, OB） $\geq 30\%$ 且类药性（drug-likeness, DL） ≥ 0.18 ^[10]对活性成分信息进行初步筛选，以获得活性成分及其作用靶点，根据文献报道补充未预测到的活性成分的已知靶点。将活性成分作用靶点统一在 Uniprot 蛋白质数据库（<https://www.uniprot.org>）进行规范。

1.2 四物汤活性成分网络构建

将四物汤的活性成分与对应的靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件，构建“活性成分-靶点”网络，并进行网络拓扑分析。节点代表活性成分，边代表活性成分与靶点的相互作用。

1.3 乳腺癌相关靶点筛选

以“breast cancer”为关键词进行检索，挖掘 GeneCards 数据库（<https://www.genecards.org>）、OMIM 数据库（<http://www.omim.org>）、TTD 数据库（<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>）、Drugbank 数据库（<https://go.drugbank.com>）^[11]中乳腺癌的潜在靶点。在 Genecards 数据库中，分值越高则代表该靶点与疾病联系越密切，若靶点过多则设定分值大于中位数的靶点为乳腺癌的潜在靶点。合并 4 个疾病数据库靶点，删除重复值，得到疾病相关的靶点名称。将活性成分作用靶点进行去重，利用 Venn Diagram 得到“活性成分-疾病”共同靶点。

1.4 “活性成分-疾病”靶点蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction network, PPI）网络的构建及网络拓扑学分析

为系统地探讨四物汤活性成分相关靶点与乳腺癌靶点间复杂的网络协同作用，使用 Cytoscape 3.8.0 软件中的 Biosogenet 插件分别构建四物汤活性成分相关靶点的 PPI 网络和乳腺癌相关靶点的 PPI 网络，构建 2 个网络的重叠部分，得到新的交集网络。根据度值、介度、紧密度、网络中心性和局部边缘通性对交集网络进行网络拓扑学分析。筛选大于度值的 2 倍中位数节点构成显著交集 PPI 网络，再进一步筛选出同时满足分别大于上述 5 个网络拓扑学参

数中位数的网络节点构成核心 PPI 网络。

1.5 “活性成分-疾病”靶点基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

将四物汤治疗乳腺癌的靶点录入 Metascape 平台 (<http://metascape.org/gp/index.html>) [12], 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC), 物种设置 “sapiens”, 选择 Custom Analysis, 设置 $P < 0.01$, 分析其主要的生物学过程与代谢通路并进行富集分析, 将结果绘制成气泡图进行可视化。

1.6 “活性成分-靶点-通路”网络的构建

运用 CytoScape 3.8.0 软件构建“活性成分-靶点-通路”网络, 利用 CytoScape 3.8.0 软件内置工具 Network Analyzer 进行分析, 根据网络拓扑学参数如度值、介度、紧密度等, 分析核心靶点及主要活性成分。

1.7 关键靶点的分子对接验证

为更好地阐述四物汤治疗乳腺癌的潜在靶点与

对应的活性成分之间的结合活性, 根据上述筛选出的活性成分和核心靶点, 分别选取“活性成分-靶点-通路”网络中度值排名靠前的靶点与差异活性成分进行分子对接验证, 以临床常用药物雷洛昔芬、多西他赛作为对照。分别从 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶蛋白受体的晶体结构, 运用 PyMoL 软件删除靶蛋白受体无关配体和非蛋白分子 (如水分子); 从 ZINC 数据库 (<http://zinc.docking.org/>) 下载配体的化学结构; 采用 AutoDock Tools 工具对上述靶蛋白受体和配体小分子进行常规预处理, 以配体为中心设置 Grid Box, 再用 Autogrid 模块得到对接活性位点, 进行分子对接, 得到结合能。选取与靶蛋白对接结合能最高的成分, 采用 PyMoL 软件对结果进行可视化。

2 结果

2.1 四物汤活性成分相关靶点的获取

利用 TCMSP 数据库初步获得活性成分熟地黄 76 个、白芍 85 个、川芎 189 个、当归 125 个。经吸收、分布、代谢和排泄 (absorption、distribution、metabolism and excretion, ADME) 筛选以及文献补充, 共获得活性成分熟地黄 5 个、白芍 19 个、川芎 14 个、当归 7 个, 见表 1。将活性成分在数据库中

表 1 四物汤的活性成分

Table 1 Active ingredients in Siwu Decoction

来源	MOL ID	活性成分	OB/%	DL	来源	MOL ID	活性成分	OB/%	DL
熟地黄、川芎	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	白芍	MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
					白芍	MOL000263	oleanolic acid	29.02	0.76
白芍	MOL001906	methylgallate	30.91	0.05	白芍	MOL000513	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	31.69	0.04
熟地黄、当归	MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	白芍	MOL001889	methyl linolelaidate	41.93	0.17
					白芍	MOL001393	myristic acid	21.18	0.07
熟地黄	MOL000012	arachic acid	16.66	0.19	川芎	MOL001494	mandenol	42.00	0.19
熟地黄	MOL003717	methyl palmitoleate	34.61	0.12	川芎	MOL002135	myricanone	40.60	0.51
熟地黄	MOL000842	sucrose	7.17	0.23	川芎	MOL002140	perilyrine	65.95	0.27
白芍	MOL001910	11 α ,12 α -epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	64.77	0.38	川芎	MOL002151	senkyunone	47.66	0.24
					川芎	MOL002157	wallichilide	42.31	0.71
					川芎	MOL000433	FA	68.96	0.71
白芍	MOL001918	paeoniflogeneone	87.59	0.37	川芎	MOL001641	methyl linoleate	41.93	0.17
白芍	MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	川芎	MOL002202	tetramethylpyrazine	20.01	0.03
					川芎、当归	MOL001788	adenine	62.81	0.03
					川芎	MOL002099	senkyunolide-K	61.75	0.08
白芍	MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	川芎	MOL002200	levistolide-A	9.96	0.82
白芍	MOL001925	paeoniflorin_qt	68.18	0.40	川芎、当归	MOL002201	cis-ligustilide	51.30	0.07
白芍	MOL001928	albiflorin_qt	66.64	0.33	川芎	MOL000027	α -curcumene	4.68	0.06
白芍	MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	当归、白芍	MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75
白芍	MOL000211	mairin	55.38	0.78	当归	MOL000023	hemo-sol	39.84	0.02
白芍	MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	当归	MOL000389	ferulic acid (cis)	54.97	0.06
白芍	MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	当归	MOL008286	(-)-camphoric acid	99.13	0.07
白芍	MOL001923	(3S,3aR,6S,7aR)-6-hydroxy-6-methyl-2,5-dioxo-3a,4,7,7a-tetrahydro-3H-benzofuran-3-yl)methyl benzoate	17.84	0.30					

进行检索, 获取对应的靶点, 并将其导入 Unitprot 数据库进行基因名标准化处理, 获得活性成分作用靶点熟地黄 48 个、川芎 52 个、白芍 157 个、当归 103 个, 合并后删除重复值共得到作用靶点 147 个。

2.2 四物汤“活性成分-靶点”网络的构建与分析

将四物汤的活性成分及对应的靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 构建“活性成分-靶点”网络图, 见图 1。网络由 184 个节点和 396 条边组成, 六边形

代表 4 味中药筛选出的活性成分, 六边形越大表示活性成分越重要, 其中 SD 为来源于熟地黄的成分, DG 为来源于当归的成分, BS 为来源于白芍的成分, CX 为来源于川芎的成分, A1 表示熟地黄、川芎共有成分, B1 表示熟地黄、当归共有成分, C1 表示白芍、当归共有成分, D1、D2 表示川芎、当归共有成分。矩形代表活性成分对应的靶点, 节点与节点之间的边表示活性成分与靶点之间的相互作用关系。

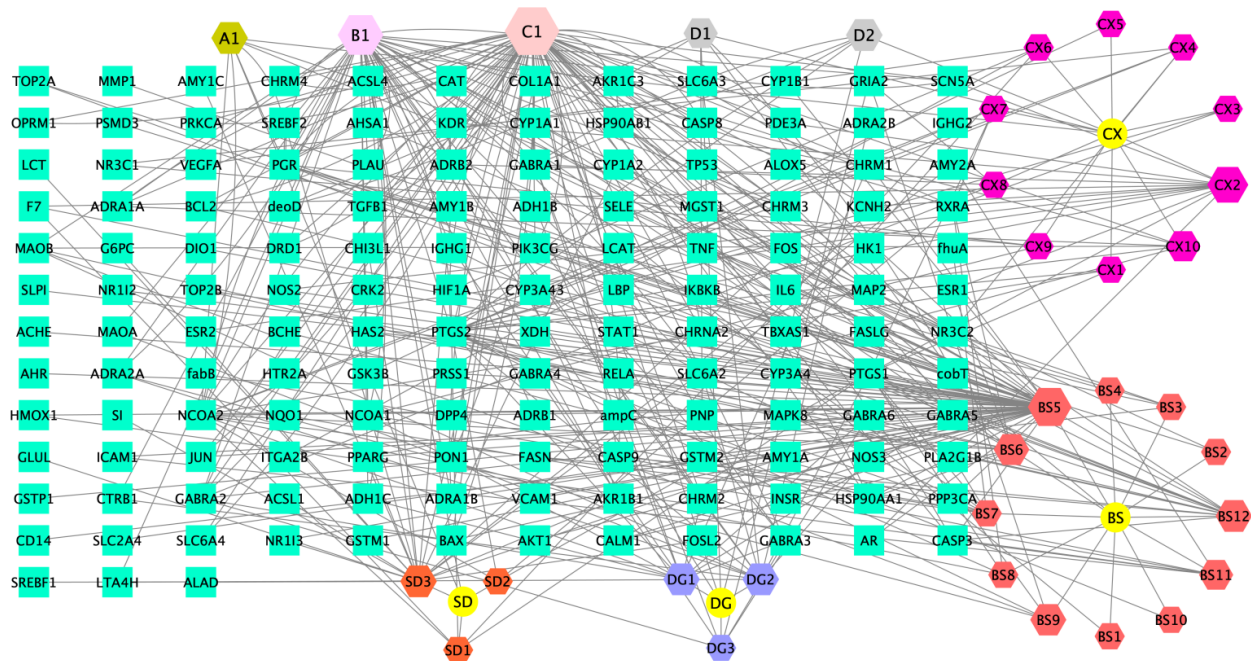


图 1 四物汤“活性成分-靶点”网络

Fig. 1 Network of “active component-target” of Siwu Decoction

2.3 乳腺癌相关靶点的获取

从 Genecards 数据库获得乳腺癌相关靶点时, 根据经验设定分值大于中位数的靶点为乳腺癌的潜在靶点, 分值最大值为 440.05、最小值为 0.08、中位数为 21.22, 故设定分值 > 21.22 的靶点为乳腺癌的潜在靶点。合并 OMIM、TTD、Drugbank 数据库靶点删除重复值, 最终得到 1505 个乳腺癌相关靶点。采用 Venn Diagram 将筛选的四物汤活性成分靶点与乳腺癌疾病靶点取交集, 得到四物汤成分-乳腺癌共同靶点 61 个, 见图 2。表明四物汤中活性成分配伍使用既能够增加治疗靶点数量、扩大治疗范围, 又能协同作用于共同靶点、提高疗效。其中共同靶点主要包括多种激素受体, 如孕激素受体 (progesterone receptor, PGR)、雄激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ESR1/ESR2)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor,

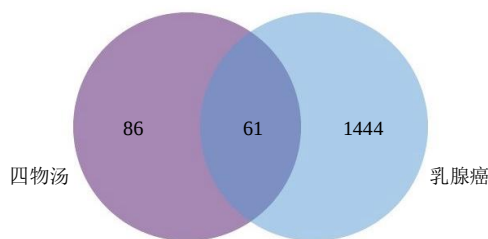


图 2 四物汤活性成分靶点与乳腺癌相关靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of Siwu Decoction active ingredient targets and breast cancer related targets

NR3C1)、前列腺素 G/H 合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、核受体辅激活蛋白 1 (nuclear receptor coactivator 1, NCOA1) 等。

2.4 “活性成分-疾病”靶点 PPI 网络的构建及网络拓扑学分析

将上述得到的数据分别构建四物汤活性成分作用靶点 PPI 和乳腺癌相关靶点 PPI 网络, 见图 3。

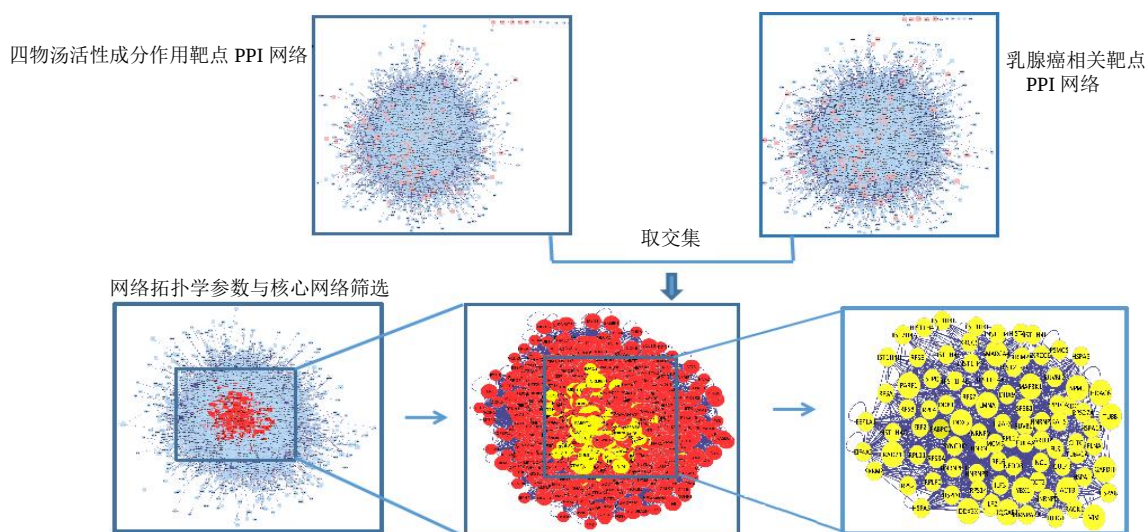


图 3 PPI 网络的构建、网络拓扑学分析与核心靶点筛选

Fig. 3 Construction of PPI networks, network topology analysis and core target screening

网络中的节点代表靶点，边表示靶点间的相互作用关系。四物汤活性成分作用靶点 PPI 网络有 4893 个节点和 121 902 条边，乳腺癌相关靶点 PPI 网络共有 11 540 个节点和 231 226 条边。“活性成分-疾病”的 PPI 网络有 4748 个节点和 117 568 条边。度值大于 2 倍中位数的节点 PPI 网络有 1223 个节点和 53 223 条边。同时满足大于度值、介度、紧密度、网络中心性和局部边缘通性 5 个网络拓扑学参数中位数的核心 PPI 网络共有 232 个节点和 4233 条边，其中度值、介度、紧密度、网络中心性和局部边缘通性的中位数分别为 98、480.083、0.433、139.200、15.690。表明四物汤的活性成分作用于多个靶点，且各靶点之间具有相互协同作用。

2.5 “活性成分-疾病”靶点 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

共得到 KEGG 富集结果 263 条，根据 *P* 值选取

排名前 20 的结果绘制高级气泡图，见图 4，四物汤治疗乳腺癌主要涉及癌症的途径、铂类药物耐药、磷脂酰肌醇-3-激酶（phosphoinositide 3-kinase, PI3K）-蛋白激酶 B（protein kinase B, Akt）信号通路、化学致癌作用、内分泌抵抗、卵巢类固醇生成、核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）信号通路、癌症中的转录失调等通路。

GO 富集分析共得到 MF 富集结果 46 个、BP 富集结果 1340 个、CC 富集结果 41 个。如图 5 所示，MF 主要涉及核受体活性、蛋白质均二聚活性、过转录因子结合、氧化还原酶活性、蛋白激酶结合、蛋白磷酸酶 2A 结合、热休克蛋白 90（heat shock protein 90, Hsp90）结合、肿瘤坏死因子受体超家族结合等；如图 6 所示，BP 主要涉及活性氧代谢程、对类固醇激素的反应、对脂多糖的反应、凋亡信号通路、腺体发育、对细胞外刺激的反应、对异源生

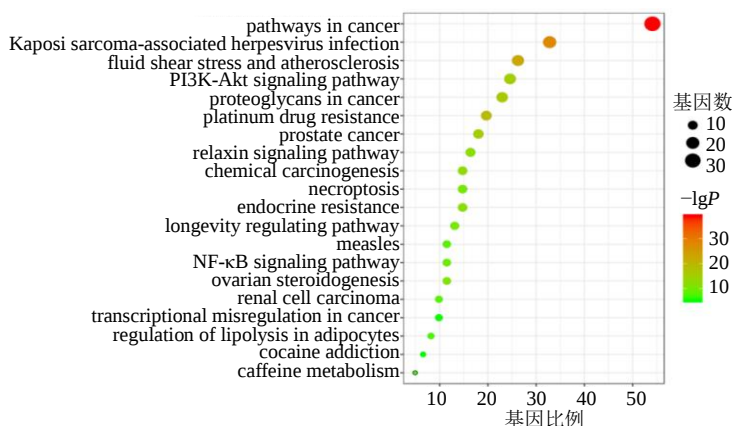


图 4 “活性成分-疾病”靶点 KEGG 通路富集分析 (前 20)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of targets of “active ingredient-disease” (top 20)

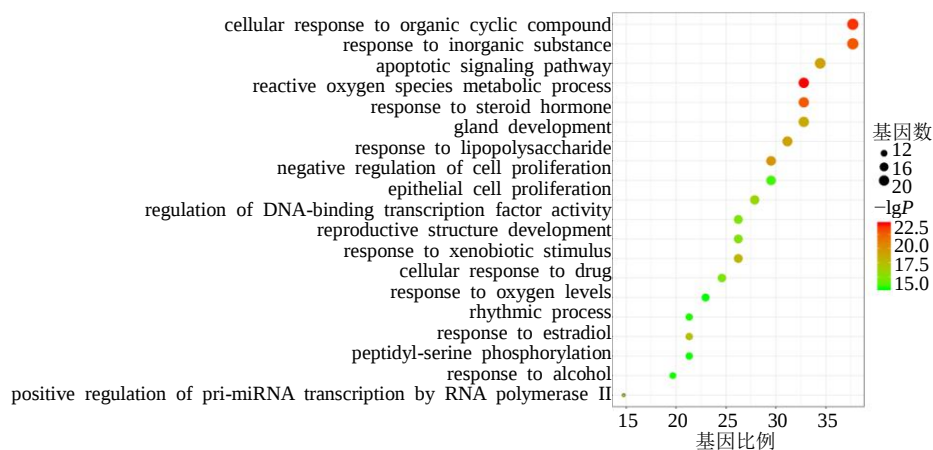


图 5 “活性成分-疾病”靶点 GO 通路 BP 富集分析 (前 20)

Fig. 5 GO biological processes enrichment analysis of targets of “active ingredient-disease” (top 20)

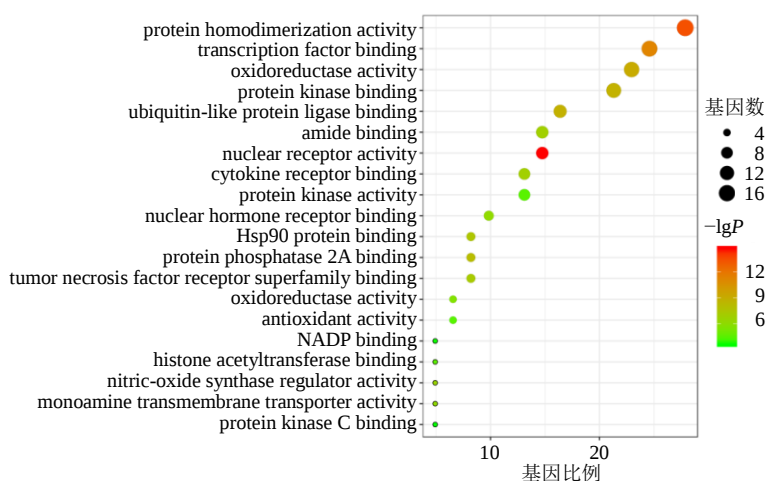


图 6 “活性成分-疾病”靶点 GO 通路 MF 富集分析 (前 20)

Fig. 6 GO molecular functions enrichment analysis of targets of “active ingredient-disease” (top 20)

物刺激的反应、对雌二醇的反应、上皮细胞增殖、RNA 聚合酶 II 对 pri-miRNA 转录的正调控、DNA

结合转录因子活性的调节、细胞对药物的反应、细胞增殖的负调控、肽丝氨酸磷酸化等；如图 7 所示，

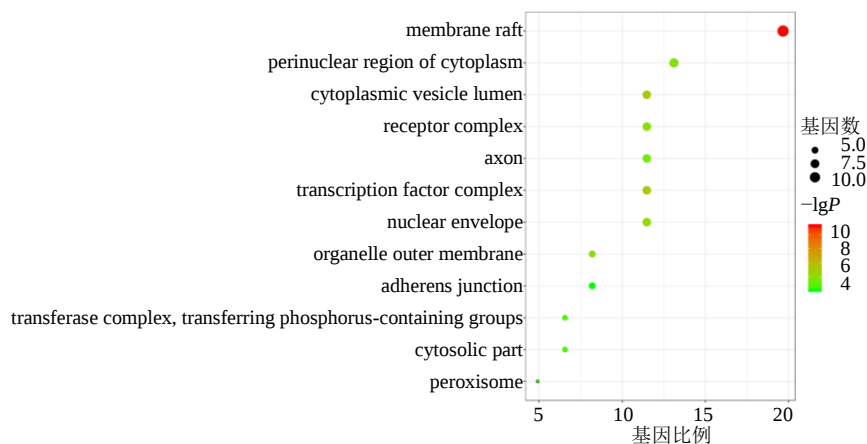


图 7 “活性成分-疾病”靶点 GO 通路 CC 富集分析 (前 12)

Fig. 7 GO cellular component enrichment analysis of targets of “active ingredient-disease” (top 12)

CC 主要涉及膜筏、细胞质囊泡腔、转录因子复合体、受体复合体、细胞质核周区域、轴突、胞质部分、转移酶复合物、转移含磷基团、过氧化物酶体、黏附连接等。

2.6 “活性成分-靶点-通路”网络的构建

“活性成分-靶点-通路”网络见图 8，包括 98 个节点和 298 条边。如表 2 所示，山柰酚度值为 31、介度为 0.069 9、紧密度为 0.516 0； β -谷甾醇度值为

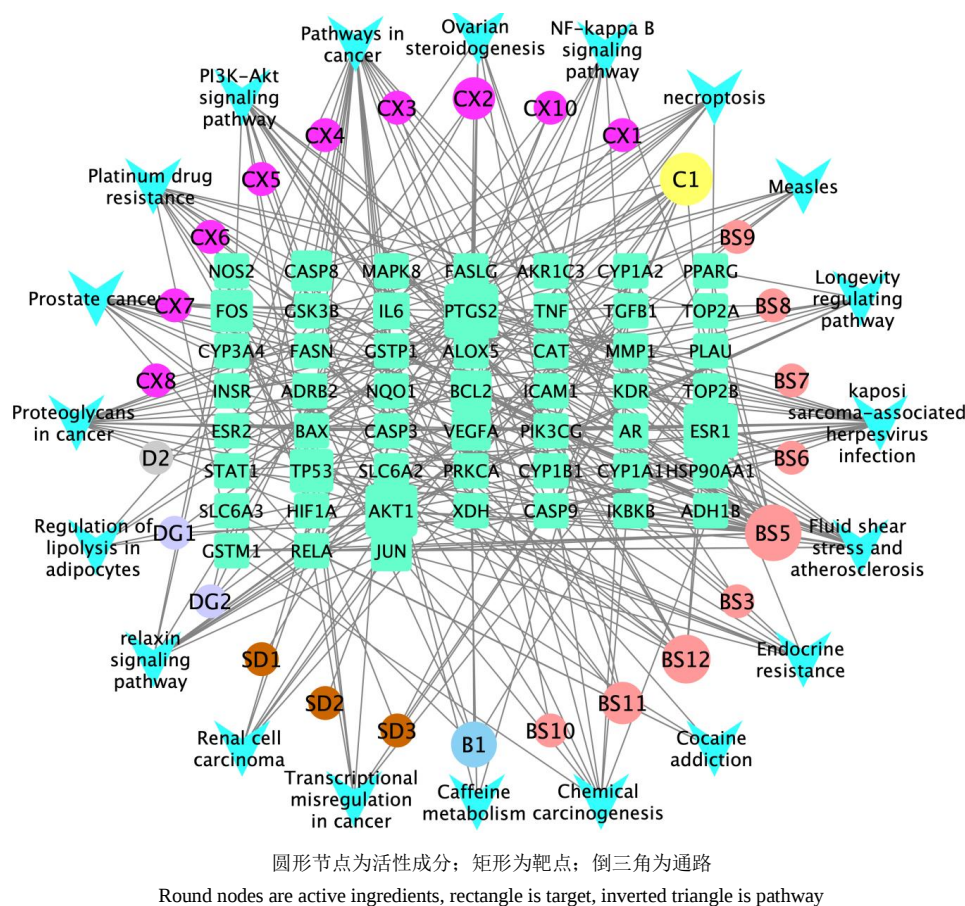


图 8 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 8 “Active ingredient-target-pathway” network

表 2 四物汤主要活性成分网络节点特征参数

Table 2 Network node characteristic parameters of main active ingredients of Siwu Decoction

MOL ID	活性成分	度值	介度	紧密度
MOL000422	山柰酚	31	0.069 9	0.516 0
MOL000358	β -谷甾醇	12	0.049 4	0.414 5
MOL000513	没食子酸	10	0.033 7	0.400 8
MOL000449	豆甾醇	5	0.013 9	0.361 9
MOL000263	齐墩果酸	4	0.002 0	0.310 9
MOL000492	(+)-儿茶素	4	0.016 2	0.370 2
MOL002135	杨梅酮	4	0.012 7	0.361 9
MOL000389	阿魏酸	4	0.007 8	0.351 4
MOL000842	蔗糖	3	0.001 9	0.308 9
MOL000027	α -姜黄素	3	0.005 4	0.348 9
MOL002202	川芎嗪	2	0.000 1	0.277 1
MOL001924	芍药苷	2	0.000 3	0.305 0
MOL000023	(+)-柠檬烯	2	0.004 9	0.341 5
MOL001393	肉豆蔻酸	2	0.004 7	0.363 6

12、介度为 0.049 4、紧密度为 0.414 5，预测山柰酚、 β -谷甾醇为四物汤治疗乳腺癌的主要活性成分。其次为没食子酸、豆甾醇、齐墩果酸、(+)-儿茶素、杨梅酮、阿魏酸、蔗糖、 α -姜黄素、川芎嗪、(+)-柠檬烯和芍药苷。如表 3 所示，PTGS2 在网络中的度值为 27、介度为 0.337 3、紧密度为 0.510 5；ESR1 度值为 26、介度为 0.313 8、紧密度为 0.482 5，预测 PTGS2、ESR1 为四物汤治疗乳腺癌的主要靶点。此外，AKT1、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3, CASP3)、JUN 原癌基因、肿瘤抗原 p53 (tumor antigen p53, TP53)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, BCL2)、FOS 原癌基因、BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2 associated X protein, BAX)、RELA 原癌基因、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL6)、CASP8、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial

表 3 四物汤主要活性成分靶点网络节点特征参数

Table 3 Characteristic parameters of target network node of main active ingredients of Siwu Decoction

靶点	度值	介度	紧密度
PTGS2	27	0.337 3	0.510 5
ESR1	26	0.313 8	0.482 5
AKT1	14	0.052 1	0.449 1
TP53	11	0.021 7	0.397 5
BCL2	10	0.021 7	0.429 2
CASP3	11	0.036 0	0.429 2
JUN	11	0.025 1	0.429 5
FOS	9	0.037 6	0.423 8
BAX	9	0.022 7	0.425 4
RELA	9	0.022 4	0.423 8
MAPK8	9	0.016 0	0.418 3
IL6	7	0.025 7	0.412 9
STAT1	7	0.011 8	0.412 9
TGFB1	7	0.011 6	0.412 9
VEGFA	7	0.020 3	0.407 6
TNF	7	0.017 3	0.387 9

growth factor A, VEGFA)、NCOA1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等也为重要靶点。

2.7 主要活性成分与关键靶点的分子对接

通常配体与受体结合能越低, 结合的构象越稳定, 结合能 <0 表明配体分子能够与受体蛋白自发结合, 结合能 ≤ -17.78 kJ/mol 表明配体与受体有一定的结合活性, 结合能 ≤ -20.92 kJ/mol 表明配体与受体有较好的结合活性, 结合能 ≤ -29.29 kJ/mol 表明配体与受体有强的结合活性^[13-14]。分别选取“活

性成分-靶点-通路”网络中度值较大的靶点 PTGS2 (PDB-ID 5KIR)、ESR1 (PDB-ID 1GWQ)、AKT1 (PDB-ID 3OS5), 分别以 4 个度值较大的核心成分山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇为对象, 以多西他赛、雷洛昔芬为阳性对照药物, 采用 AutoDock 进行分子对接验证。如表 4 和图 9 所示, 山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇与关键靶点的结合能均 < -20.92 kJ/mol, 其中山柰酚与 PTGS2、ESR1 的结合能均 < -29.29 kJ/mol, 且强于多西他赛、雷洛昔芬, β -谷甾醇与 AKT1 的结合能 < -29.29 kJ/mol, 强于多西他赛、雷洛昔芬, 表明活性成分与对应的靶点均具有较强的结合活性。

3 讨论

由于致病因素的复杂性, 乳腺癌病因尚未完全明确。既往研究认为乳腺癌是由乳腺上皮细胞不典型的增生向原位癌转化, 最终进展为浸润性癌^[15]。随着深入研究, 发现乳腺癌的发生与发展是多种因

表 4 核心活性成分与关键靶点的分子对接

Table 4 Molecular docking between main active ingredients and core targets

活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
	PTGS2	ESR1	AKT1
山柰酚	-29.37	-31.67	-24.31
β -谷甾醇	-26.02	-25.56	-29.92
没食子酸	-22.38	-21.63	-21.30
豆甾醇	-21.09	-25.69	-28.37
多西他赛	-13.39	-17.15	-24.73
雷洛昔芬	-23.01	-29.99	-28.58

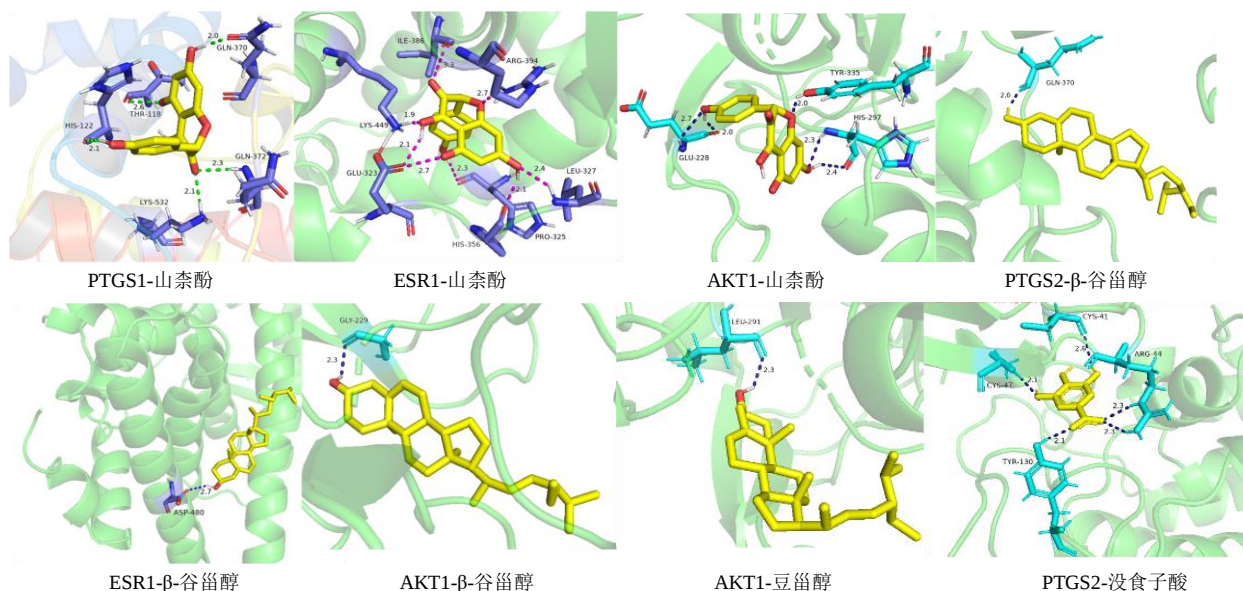


图 9 四物汤抗乳腺癌的关键活性成分与关键靶点的分子对接模式

Fig. 9 Molecular docking mode of key active components and targets of Siwu Decoction anti-breast cancer

素、多种机制共同作用的结果。除癌细胞本身外，炎症因素、血管微环境、成纤维细胞等肿瘤微环境也起着重要作用，其产物与乳腺癌上皮细胞联系密切^[16]。现代医学主要采用手术、放疗、化疗、内分泌治疗、靶向治疗等手段，提高患者的生存周期，但同时也带来很多严重的不良反应。相较于西医疗法，中药能够通过多靶点、多途径抑制肿瘤，在缓解不良反应、提高肿瘤患者生活质量等方面发挥着重要作用。

3.1 四物汤活性成分分析

本研究采用网络药理学方法发现，四物汤共有 40 种活性成分、147 个潜在靶点与乳腺癌相关，初步筛选出山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇、齐墩果酸、阿魏酸等为四物汤治疗乳腺癌的活性成分。山柰酚为白芍的主要成分，能够抑制乳腺癌细胞生长，诱导乳腺癌细胞凋亡，抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[17]。 β -谷甾醇为白芍和当归的共同成分，能够诱导乳腺癌细胞凋亡并抑制其转移^[18]。没食子酸为白芍主要成分，可以诱导乳腺癌细胞凋亡，并发生形态学改变^[19]。豆甾醇为熟地、当归的共有成分，能够有效预防或治疗乳腺癌、卵巢癌等癌症^[20]。阿魏酸为当归、川芎的共有成分，阿魏酸能够通过雌激素受体 α 调控肺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 的表达，从而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[21]。

3.2 关键靶点分析

PPI 网络分析发现，四物汤各活性成分作用于多个靶点，且各靶点之间相互协同，经筛选关键靶点为 PTGS2、ESR1、AKT1、CASP3、JUN、TP53、BCL2、FOS、BAX、RELA、IL6、CASP8、VEGFA、NCOA1、TNF 等。研究表明，四物汤表现出雌激素作用，而雌激素主要通过雌激素受体 α 促进人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖。ESR1 编码雌激素受体 α ，主要参与乳腺癌等妇科肿瘤细胞的增殖^[22]。PTGS2 能够将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物，是前列腺素合成的重要限速酶。PTGS2 通过在乳腺癌中的过表达促进血管再生、肿瘤细胞的增殖和侵袭，从而促进肿瘤的发生、发展和转移。因此，PTGS2 在诊断和治疗乳腺癌中具有重要意义^[16]。AKT1 是 PI3K-Akt 信号通路中重要的下游靶点，被磷酸化激活后主要参与细胞进程^[23]。AKT1 过表达可以激活激素依赖性的内分泌受体，还可以促进乳腺癌细胞

增殖^[24]。

3.3 活性成分与关键靶点作用的分析

KEGG 通路富集结果主要涉及了 PI3K-Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、癌症的途径、药物耐药等方面。PI3K-Akt 信号通路主要调控细胞的生长、增殖、代谢等，PI3K 的异常激活可以继发下游靶点 Akt 磷酸化的持续激活，继而引起正常乳腺细胞的生长，抑制其凋亡，并使 VEGF 的合成增加，为乳腺癌的侵袭和转移提供条件^[25]。PI3K 信号通路的异常激活还可以进一步影响 p53、NF- κ B 等与乳腺癌密切相关的下游通路^[26-27]。

山柰酚能够通过下调 PI3K、Akt、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 蛋白磷酸化水平，促进人炎性乳腺癌细胞 SUM190 凋亡^[28]；山柰酚能够通过作用于与胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) 相关的雌激素受体 α 信号通路，抑制 MCF-7 细胞生长^[29]；山柰酚能够诱导 MCF-7 细胞凋亡，并下调 BCL2 蛋白表达水平^[30]。 β -谷甾醇可以抑制 PI3K-Akt 信号通路，逆转上皮-间质转化，从而诱导乳腺癌细胞的凋亡并抑制其转移^[18]。四物汤能够通过调控 PTGS2 治疗多种疾病^[31]。NF- κ B 通路的激活可以促进乳腺癌细胞增殖，抑制细胞凋亡，从而促进癌症进展^[32]。Akt 可以通过 NF- κ B/NF- κ B 抑制蛋白 (NF- κ B inhibitor protein, I κ B) 信号通路诱导环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达，促进肿瘤发生^[33]。齐墩果酸通过作用于雌激素受体，诱导乳腺癌细胞凋亡^[34]。没食子酸联合顺铂主要通过激活内源性和外源性凋亡通路，并抑制 p65 蛋白表达，从而诱导乳腺癌细胞凋亡^[35]。文献报道与本研究结果一致，分子对接结果也佐证了主要活性成分 (山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇) 与关键靶点均具有较强的结合活性。表明四物汤可能通过山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸、豆甾醇等主要活性成分，作用于 PTGS2、ESR1、AKT1 等相关靶点，干预 PI3K-Akt、NF- κ B 等信号通路，从调控细胞周期进程、血管生成、激素水平等方面发挥治疗乳腺癌作用。

本研究采用网络药理学和分子对接技术，对四物汤治疗乳腺癌的活性成分、作用靶点和信号通路进行探究，发现四物汤防治乳腺癌具有多成分、多靶点、多通路的特点，为其临床应用提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gray J M, Rasanayagam S, Engel C, *et al.* State of the evidence 2017: An update on the connection between breast cancer and the environment [J]. *Environ Health*, 2017, 16(1): 94.
- [2] Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin J J, *et al.* Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(5): 378-397.
- [3] 朱明玥, 吕志刚. 近代名老中医治疗乳腺癌经验浅析 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3162-3166.
- [4] 陈前军, 裴晓华. 早期乳腺癌中医辨证内治专家共识 [J]. 现代中医临床, 2020, 27(3): 5-8.
- [5] 刘俊志, 郭平. 四物汤与 JAK2-STAT5 信号通路对造血功能调控的研究进展 [J]. 中医学报, 2019, 34(5): 950-954.
- [6] 何丹, 万丹, 舒骏, 等. 四物汤物质基础、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 221-229.
- [7] Wen Z N, Wang Z J, Wang S, *et al.* Discovery of molecular mechanisms of traditional Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang using gene expression microarray and connectivity map [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18278.
- [8] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [9] 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.
- [10] Li J S, Zhao P, Li Y, *et al.* Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15290.
- [11] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [12] 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.
- [13] 庄莉, 翟园园, 姚卫峰, 等. 基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究 [J]. 药学报, 2019, 54(5): 877-885.
- [14] 樊启猛, 杨岩涛, 肖美凤, 等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4200-4208.
- [15] 杨琛肇, 宋颖, 申培红, 等. 乳腺癌易感基因 1/2 和特异性基因 1 与乳腺癌发生发展的相关性 [J]. 河南医学研究, 2019, 28(5): 956-958.
- [16] 曹清, 程波, 聂静, 等. COX-2 介导肿瘤相关成纤维细胞在乳腺癌进展中的作用研究 [J]. 当代医学, 2017, 23(6): 15-17.
- [17] 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]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109086.
- [18] 李元凤. β -谷甾醇-D-葡萄糖苷对乳腺癌细胞增殖、凋亡和侵袭转移的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [19] Rezaei-Seresht H, Cheshomi H, Falanji F, *et al.* Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An *in silico* and *in vitro* study [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2019, 9(6): 574-586.
- [20] 周志远, 卢群, 刘洋, 等. 豆甾醇的研究及开发进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(24): 15-17.
- [21] 孙瑛蔚, 柯洪, 赵梓亦, 等. 阿魏酸通过雌激素受体 α 调控人乳腺癌细胞系的增殖、迁移及侵袭 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(12): 1708-1712.
- [22] 卢迪. 基于 GPER 信号通路探讨四物汤的雌激素样效应及其分子机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [23] Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: A comprehensive review [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 154.
- [24] Riggio M, Perrone M C, Polo M L, *et al.* AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44244.
- [25] McAuliffe P F, Meric-Bernstam F, Mills G B, *et al.* Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis [J]. *Clin Breast Cancer*, 2010, 10(Suppl 3): S59-S65.
- [26] 王建君, 徐小艳, 冯智坤, 等. 乳腺浸润性导管癌中 survivin 与 NF- κ B 的表达及其临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(11): 1327-1335.
- [27] 许立生, 王水, 赵志泓, 等. VEGF 和 p53 在三阴性乳腺癌患者组织和血清中表达及预后研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2021, 41(1): 118-121.
- [28] 赵明智, 张磊, 周丹, 等. 山柰酚调控 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路促进人炎性乳腺癌 SUM190 细胞株凋亡的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(6): 872-877.
- [29] Kim S H, Hwang K A, Choi K C. Treatment with

- kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 28: 70-82.
- [30] Yi X F, Zuo J C, Tan C, *et al*. Kaempferol, a flavonoid compound from *GYNURA MEDICA* induced apoptosis and growth inhibition in mcf-7 breast cancer cell [J]. *Afr J Tradit Compl Altern Med*, 2016, 13(4): 210-215.
- [31] 刘春杰, 刘奕兵, 杨丽华, 等. 四物汤作用机制的网络药理学初步分析 [J]. *中药材*, 2019, 42(8): 1896-1902.
- [32] Wyatt G L, Crump L S, Young C M, *et al*. Cross-talk between SIM2s and NFκB regulates cyclooxygenase 2 expression in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 131.
- [33] St-Germain M E, Gagnon V, Parent S, *et al*. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway [J]. *Mol Cancer*, 2004, 3: 7.
- [34] 谢贤鑫, 王聪, 李伟杰, 等. 齐墩果酸衍生物 SZC014 同时诱导乳腺癌细胞的凋亡和自噬 [J]. *中医药学报*, 2019, 47(4): 17-23.
- [35] 郝艳丽. 没食子酸诱导肺癌细胞凋亡机制及其应用的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[责任编辑 李亚楠]