

基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌耐药的作用机制

杨 焱¹, 王毛毛^{1,2}, 于 淼^{1,2}, 季宇彬^{1,2}, 李文兰^{1,2}, 辛国松^{1,2*}, 李海茹^{3*}

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要:目的 研究防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌阿霉素耐药潜在的作用机制。方法 首先通过 TCMSP 数据库对防己生物碱类活性成分进行筛选, 采用 SwissTargetPrediction 数据库在线预测防己生物碱类活性成分潜在靶点, 通过 GeneCards 数据库收集疾病靶点, 取交集构建“成分-靶点”和蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 然后进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能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, 最后对预测的防己生物碱类活性成分与核心靶点进行分子对接验证。进一步通过体外实验验证防己生物碱类活性成分抗肿瘤活性, 采用 CCK-8 实验检测防己生物碱类活性成分对乳腺癌 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用, 采用倒置光学显微镜、荧光显微镜检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞形态的影响, 采用流式细胞仪检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响, 采用 Western blotting 检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞核心靶点蛋白表达的影响。结果 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱为逆转乳腺癌阿霉素耐药的防己生物碱类活性成分, 可能作用于原癌基因 SRC、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)、蛋白激酶 B1 (protein kinase b1, AKT1)、有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic alpha polypeptide gene, PIK3CA)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 等靶点, 调控钙信号通路、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-cGMP 依赖性蛋白激酶 (cGMP dependent protein kinase, PKG) 信号通路、Apenlin 信号通路、维甲酸诱导基因-1 (retinoic acid-inducible gene-1, RIG-I) 样受体信号通路, 从而逆转乳腺癌阿霉素耐药。体外实验结果显示, *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞均具有增殖抑制作用, 能够改变细胞形态, 诱导细胞发生凋亡, 并且对关键通路节点蛋白 HSP90AA1、MAPK1、PIK3CA、Caspase-3 蛋白表达具有调节作用。结论 防己逆转乳腺癌阿霉素耐药主要活性成分为 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱, 可以通过调控关键靶点蛋白 HSP90AA1、MAPK1、PIK3CA、Caspase-3 表达, 诱导肿瘤细胞发生凋亡, 最终逆转乳腺癌阿霉素耐药。防己能够通过多成分、多途径、多靶点逆转乳腺癌阿霉素耐药。

关键词: 防己; 生物碱类活性成分; 乳腺癌; 多药耐药; 网络药理学; *N*-甲基毛果芸香碱; 粉防己碱; 光千金藤碱; 甜菜碱
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2841-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.017

Mechanism of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on reversing drug resistance in breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments

YANG Yi¹, WANG Mao-mao^{1,2}, YU Miao^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}, LI Wen-lan^{1,2}, XIN Guo-song^{1,2}, LI Hai-ru³

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 中国博士后面上项目 (2021MD703828); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2022H002); 黑龙江省博士后资助项目 (LBH-Z20172); 2022 年哈尔滨商业大学产业化项目支持计划 (XL0086); 哈尔滨商业大学研究生科研创新项目 (YJSCX2022-753HSD)

作者简介: 杨 焱 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤中药药理学。

*通信作者: 李海茹 (1988—), 女, 副教授, 博士 (博士后), 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: lihairu0419@126.com

辛国松 (1984—), 男, 副教授, 博士 (博士后), 硕士生导师, 研究方向为抗肿瘤中药药理学。

E-mail: 13766801150@163.com

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Ministry of Education, Harbin 150076, China
3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: Objective To study the potential mechanism of active components of Fangji (*Stephaniae Tetrandrae Radix*) alkaloids on reversing adriamycin resistance in breast cancer. **Methods** Firstly, active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids were screened by TCMSD database, potential targets were predicted online by SwissTargetPrediction database, and disease targets were collected by GeneCards database. Targets were taken by intersection, “component-target” and protein-protein interaction (PPI) networks were constructed, and then gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out. Finally, predicted active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids were verified by molecular docking with core targets. Further, anti-tumor activity of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids was verified by *in vitro* experiments, the inhibitory effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on proliferation of breast cancer MCF-7 and MCF-7/ADR cells was detected by CCK-8 experiment; Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on morphology of MCF-7 and MCF-7/ADR cells was detected by inverted optical microscope and fluorescence microscope; Flow cytometry was used to detect the effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on apoptosis of MCF-7 and MCF-7/ADR cells; Western blotting was used to detect the effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on core targets protein expressions in MCF-7 and MCF-7/ADR cells. **Results** *N*-methylflindersine, stepharine, tetrandrine and betaine were the active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids in reversing adriamycin resistance in breast cancer, which may act on proto-oncogene SRC, epidermal growth factor receptor (EGFR), heat shock protein 90 α family member 1 (HSP90AA1), protein kinase B1 (AKT1), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), phosphoinositide 3-kinase catalytic α polypeptide gene (PIK3CA), cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3) and other targets, regulate calcium signaling pathway, cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-cGMP dependent protein kinase (PKG) signaling pathway, Apenlin signaling pathway and retinoic acid-induced gene-I (RIG-I)-like receptor signaling pathway, thus reversing the adriamycin resistance of breast cancer. The *in vitro* experimental results showed that *N*-methylflindersine, stepharine, tetrandrine and betaine all had inhibitory effects on the proliferation of MCF-7 and MCF-7/ADR cells, which could change the cell morphology, induce cell apoptosis, and regulate the expressions of key pathway node proteins HSP90AA1, MAPK1, PIK3CA and Caspase-3. **Conclusion** The main active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids in reversing the adriamycin resistance of breast cancer are *N*-methylflindersine, stepharine, tetrandrine and betaine, which can induce the apoptosis of tumor cells by regulating the expression of key target proteins HSP90AA1, MAPK1, PIK3CA and Caspase-3, and finally reverse the adriamycin resistance of breast cancer. *Stephaniae Tetrandrae Radix* can reverse adriamycin resistance of breast cancer through multi-component, multi-channel and multi-target.

Key words: *Stephaniae Tetrandrae Radix*; alkaloid active components; breast cancer; multidrug resistance; network pharmacology; *N*-methylflindersine; tetrandrine; stepharine; betaine

乳腺癌严重威胁女性生命健康, 根据 2020 年 WHO 世界癌症负担数据分析, 乳腺癌发病率已经超越肺癌, 成为全球发病率最高的癌症^[1]。全球每年新增乳腺癌患者高达 230 万, 每年死亡病例高达 69 万, 其高发病率和高致死率成为威胁女性生命健康的第一杀手^[2]。临床发现乳腺癌细胞具有极强的增殖、侵袭、转移能力, 阿霉素是临床上治疗乳腺癌的常用药物, 但阿霉素治疗乳腺癌过程中易产生耐药性, 很难达到预期的治疗效果^[3-5]。中成药因其具有高效低毒、多途径、多靶点、整体调控等优势, 已被临床广泛使用^[6-8], 研究表明多种中药活性成分能够通过多途径、多靶点调控肿瘤细胞关键节点蛋白表达、促进肿瘤细胞发生凋亡、逆转乳腺癌多药

耐药, 表现出对抗乳腺癌多药耐药的潜力^[9-10]。防己是防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根茎, 别名粉防己、粉寸己、汉防己, 主要分布于安徽、浙江、江西、湖南、湖北、福建、台湾、广东、广西和海南等地^[11-12]。防己中含有生物碱、黄酮、多糖、有机酸等丰富的化学成分^[13-15], 具有抗肿瘤、抗高血压、抗炎、抗纤维化等广泛的药理作用^[16]。本研究基于网络药理学^[17]及分子对接技术筛选防己活性生物碱成分抗乳腺癌 MCF-7/ADR 耐药的相关靶点和通路, 并将筛选后的活性成分与靶蛋白进行分子对接, 采用体外实验验证防己活性生物碱调控相关通路关键靶点逆转乳腺癌耐药的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

乳腺癌 MCF-7 细胞、MCF-7/ADR 耐药细胞由国家教育部抗肿瘤天然药物工程中心提供。

1.2 药品与试剂

粉防己碱(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 T107322)、N-甲基毛果芸香碱(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 54717)、甜菜碱(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 W422312)购自阿拉丁试剂有限公司; 光千金藤碱(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 BBP06021)购自云南西力生物技术股份有限公司; 二甲基亚砜(批号 20200901)购自天津中和盛泰化工有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 BA00208)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic α polypeptide gene, PIK3CA)抗体(批号 bs-2067R)购自北京博奥森生物技术有限公司; Hoechst 33258 染色液(批号 C1018)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AF0006)、HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 二抗(批号 A0192)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 bs-AC030)、有丝分裂原活化蛋白激酶 1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)抗体(批号 bs-AF0147)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(heat shock protein 90 α family class A member 1, HSP90AA1)抗体(批号 AF7137)购自碧云天生物试剂有限公司。

1.3 仪器

ECO-170P-230 型细胞培养箱(美国 NBS 公司); RXL2001 型荧光显微镜(德国 Leica 公司); Allegra 64R 型低温高速离心机、EPICS-XL 型流式细胞仪(美国贝克曼公司); GIS-2019 型凝胶成像系统(天能科技有限公司); DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂); MoODEL680 型酶标仪(美国 NBS 仪器设备公司)。

1.4 数据库与软件

UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>); TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>); 微生信网站(www.bioinformatics.com.cn); GeneCard 数据库(<https://www.gene-cards.org/>); DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>); RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>); STRING 数据库(<http://string-db.org/>); Cytoscape 3.9.1 软件; Venny2.1 软

件; PyMOL2.4.0 软件; Autodock Tools1.5.7 软件。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 防己生物碱类活性成分及靶点筛选 采用 TCMSP 数据库分析防己生物碱类活性成分以及作用靶点,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 20\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.10 作为筛选标准,得到符合条件的防己生物碱类单体,使用 Uniprot 数据库进行基因注释,得到活性成分 ID、名称等数据;通过 SwissTargetPrediction 在线预测防己生物碱类单体的作用靶点,再利用 Cytoscape 3.9.1 软件对数据进行可视化处理,形成“成分-靶点”网络。

2.1.2 乳腺癌阿霉素耐药靶点的获取 在 GeneCards 数据库上搜集乳腺癌阿霉素耐药(breast cancer adriamycin resistance)疾病靶点,设置关联度 ≥ 20 ,利用 Venny 2.1 软件对疾病-药物靶点取交集,得到 84 个交集靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建及核心靶点筛选 采用 STRING11.5 数据库,导入交集靶点,物种设定为“Homo sapiens”,置信度设定为 ≥ 0.700 ,隐藏孤立蛋白,导入 Cytoscape 3.9.1 软件,运用 CytoNCA 插件进行网络拓扑学分析,以点度中心性、介度中心性、接近中心性 $\geq$ 所有节点的中位数为标准筛选核心蛋白。

2.1.4 交集靶点的基因本体(gene ontology, GO)功能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 采用 DAVID 6.9 数据库,导入获得的交集基因,物种设定为“Homo sapiens”,根据 $FDR \leq 0.05$,通过生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3 个层次对基因功能分析得到结果,将数据载入到微生信网站使其可视化。

2.1.5 “防己生物碱类成分-靶点-通路”网络构建 采用 Cytoscape 3.9.1 软件,构建“防己生物碱类成分-靶点-通路”网络。

2.1.6 分子对接验证 将分析得到的防己生物碱类活性成分与核心靶点进行分子对接验证。首先在 TCMSP 数据库下载活性成分 2D 结构的 sdf 格式文件,在 RCSB 数据库下载核心靶点蛋白 3D 结构 pdb 格式文件。进一步使用 Autodock Tools 1.5.7 对蛋白和成分数据进行加氢、除水等处理并保存为 pdbqt 格式,采用 PyMOL2.4.0 进行结果的可视化。

2.2 实验验证

2.2.1 CCK-8 实验检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7 细胞、MCF-7/ADR 耐药细胞的增殖抑制作用 取对数生长期的 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞，以 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板，每孔 100 μ L，培养 24 h 后，分别加入 100 μ L 不同浓度（1、2、4、8、16、32 μ mol/L）的 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱，对照组加入不含药物的培养基，设置 6 个平行孔。将 96 孔板放入培养箱培养 48 h 后，每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂，继续培养 2 h，采用酶标仪检测各孔吸光度（*A*）值，计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.2 倒置显微镜、荧光显微镜观察防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞形态的影响 取对数生长期的 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞，以 3×10^4 个/mL 接种于 6 孔板，培养 24 h 后，MCF-7 细胞分别加入 *N*-甲基毛果芸香碱（14 μ mol/L）、光千金藤碱（14 μ mol/L）、粉防己碱（13 μ mol/L）、甜菜碱（22 μ mol/L），MCF-7/ADR 细胞分别加入 *N*-甲基毛果芸香碱（15 μ mol/L）、光千金藤碱（17 μ mol/L）、粉防己碱（14 μ mol/L）、甜菜碱（25 μ mol/L），对照组加入不含药物的培养基。培养 48 h 后，采用倒置显微镜进行拍照。每孔加入 1 mL 多聚甲醛固定 1 h 后，弃去废液，冲洗后加入 200 μ L Hoechst 33258 染色液，水浴加热 30 min 后取出，采用荧光显微镜进行拍照。

2.2.3 流式细胞仪检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响 取对数生长期的 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞，以 3×10^4 个/mL 接种于 6 孔板，培养 24 h 后，按“2.2.2”项下方法进行给药，培养 48 h 后，弃去培养基，胰酶消化收集细胞。加入 70%冰乙醇，固定 24 h 后离心，800 μ L 加入 Annexin V 和碘化丙啶（PI）染液孵育，用尼龙网将染色后的细胞滤过，采用流式细胞仪检测。

2.2.4 防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞 Caspase-3、MAPK1、HSP90AA1、PIK3CA 蛋白表达的影响 取对数生长期的 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞，以 3×10^4 个/mL 接种于 6 孔板，培养 24 h 后，按“2.2.2”项下方法进行给药，培养 48 h 后，加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液，裂解 30 min，收集细胞离心 15 min。取上清液煮沸使蛋白变性，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电

泳，转至 PVDF 膜，封闭 2 h 后加入一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后，洗膜；加入二抗，孵育 2 h 后，洗膜，加入化学发光试剂并用显色仪拍照。

2.2.5 统计学分析 用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 防己生物碱类活性成分及靶点筛选

通过 TCMSP 数据库以 $OB \geq 20\%$ 、 $DL \geq 0.10$ 作为筛选标准，得到 4 个符合条件的防己生物碱类单体见表 1。

表 1 防己生物碱类活性成分信息

Table 1 Informaton of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids

序号	名称	分子式	CAS 号
1	<i>N</i> -甲基毛果芸香碱	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	50333-13-6
2	光千金藤碱	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	2810-21-1
3	粉防己碱	C ₃₈ H ₄₂ N ₂ O ₆	518-34-3
4	甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	107-43-7

利用 SwissTargetPrediction 在线预测 4 种生物碱单体的作用靶点，共得到 332 个靶点。通过 Cytoscape 3.9.1 软件，对数据进行可视化处理分析，并构建“成分-靶点”网络（图 1）。

3.2 乳腺癌阿霉素耐药靶点的获取

在 GeneCards 上搜集乳腺癌阿霉素耐药疾病靶点，设置关联度 ≥ 20 ，得到 490 个靶点。其中防己生物碱类 4 个单体的作用靶点与疾病靶点存在 84 个交集靶点（图 2）。

3.3 PPI 网络的构建及核心靶点筛选

利用 STRING 11.5 数据库，导入交集靶点，获得 PPI 网络（图 3-A）。采用 Cytoscape 3.9.1 软件、CytoNCA 插件进行网络分析，并且将点度中心性、介度中心性、接近中心性 $\geq$ 所有节点的中位数设定为筛选标准，筛选得到 7 个核心靶点（图 3-B），分别为蛋白激酶 B1（protein kinase B1，AKT1）、HSP90AA1、原癌基因 SRC、PIK3CA、Caspase-3、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、MAPK1。

3.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 6.9 数据库对防己生物碱类活性成分和疾病的交集靶点进行 GO 功能富集分析，设定 $FDR \leq 0.05$ ，共获得 GO 功能 590 条，其中 435 条 BP、64 条 CC、91 条 MF。选取前 10 的条目通过微生信网进行可视化分析，见图 4-A。

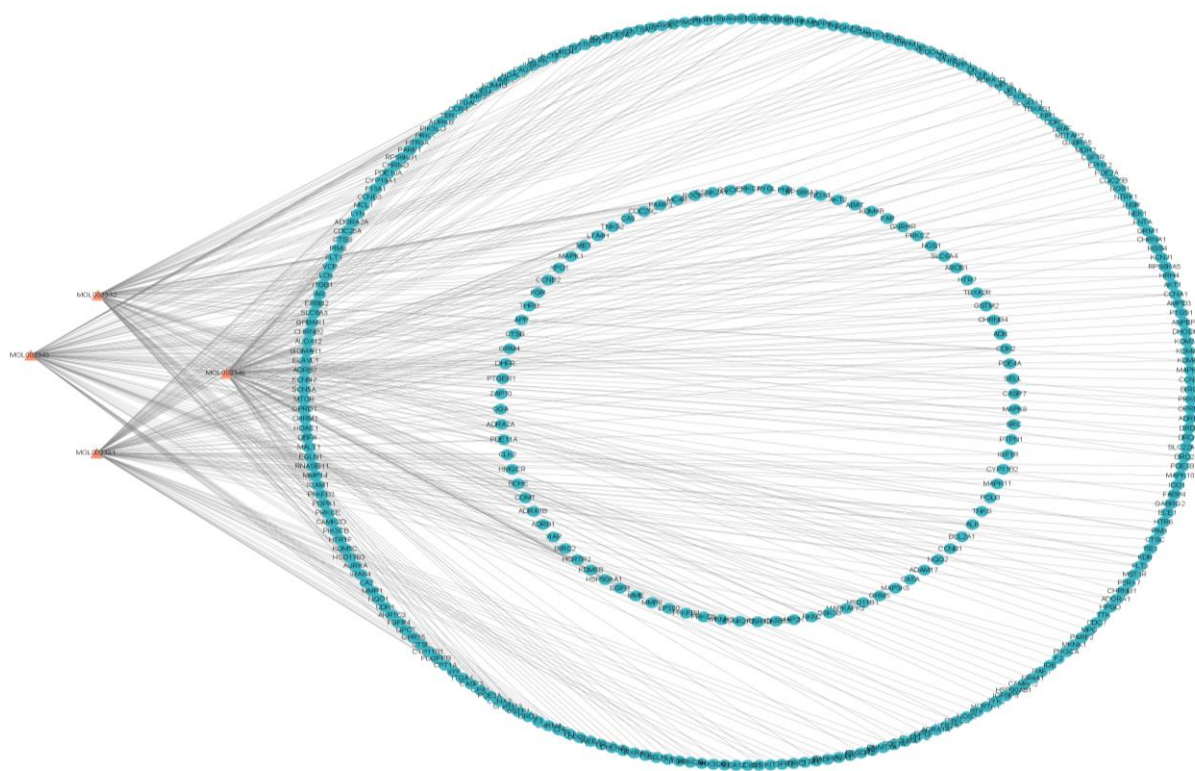
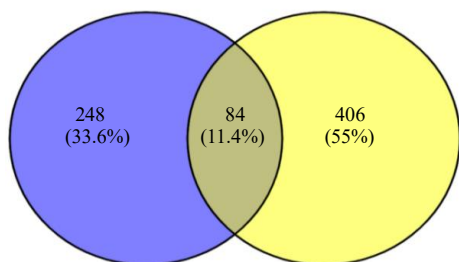


图 1 防己生物碱类活性成分-靶点网络

Fig. 1 Active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids-target network



防己生物碱类活性成分

乳腺癌阿霉素耐药

图 2 防己生物碱类活性成分与疾病交集靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of intersection targets of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids and disease

通过 DAVID 6.9 数据库对防己生物碱类活性成分和疾病的交集靶点进行 KEGG 通路富集分析, 设定 $FDR \leq 0.05$, 得到 148 条通路, 选取前 20 的条目通过微生信网进行可视化分析, 见图 4-B。结果表明, 防己生物碱类活性成分与乳腺癌阿霉素耐药密切相关的信号通路为钙信号通路、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-cGMP 依赖性蛋白激酶 (cGMP dependent protein kinase, PKG) 信号通路、Apelin 信号通路、维甲酸诱导基因-I (retinoic acid-inducible gene-I, RIG-I) 样受体信号通路等。

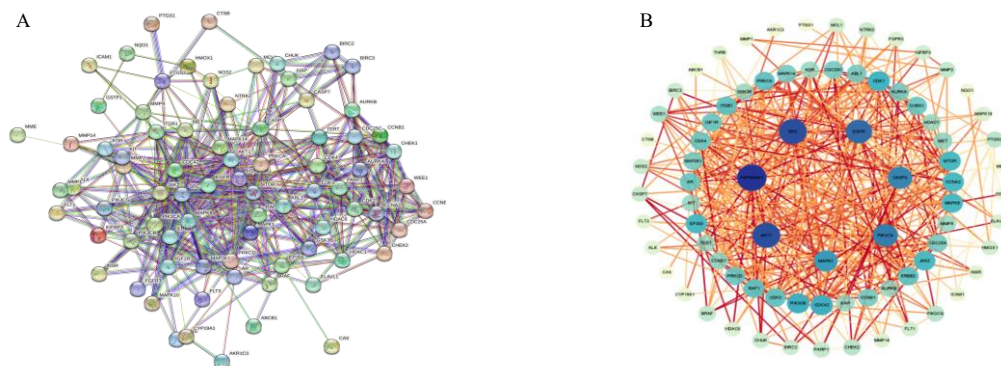


图 3 PPI 网络 (A) 和 PPI 核心靶点网络 (B)

Fig. 3 PPI network (A) and PPI network of core targets (B)

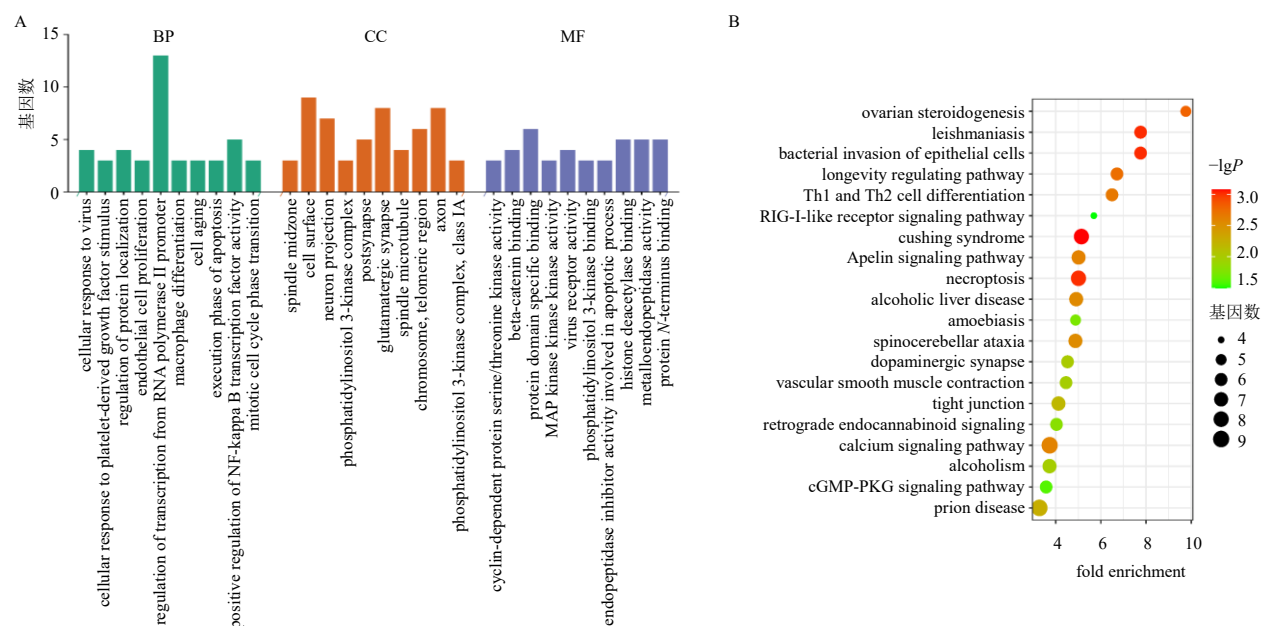


图 4 防己生物碱类活性成分抗乳腺癌阿霉素耐药靶点的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids against adriamycin resistance in breast cancer

3.5 “防己生物碱类活性成分-靶点-通路”网络的构建

将防己生物碱类活性成分、核心靶点、KEGG 富集分析富集度前 20 的通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件绘制“防己生物碱类活性成分-靶点-通路”网络图, 见图 5。

3.6 分子对接验证

以 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱为配体, Caspase-3、AKT1、MAPK1、HSP90AA1、PIK3CA、EGFR、SRC 为受体, 利用

Autodock Tools1.5.7 软件, 进行分子对接, 结果显示, 小于 -4 kJ/mol 的占 53.57%, 除 EGFR 和粉防己碱外, 其余成分与受体间结合能均小于 0 kJ/mol。各成分与 AKT1、Caspase-3、HSP90AA1、MAPK1、PIK3CA、SRC、EGFR 显示良好的结合活性。其中 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱以及甜菜碱与 Caspase-3 结合活性最好, 对接演示见图 6。

3.7 防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

如图 7 所示, *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞均具有增殖抑制作用。根据给药浓度和抑制率进行线性回归, 计算 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 14.77、14.47、13.95、22.08 $\mu\text{mol/L}$, 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 分别为 15.13、17.33、14.20、25.15 $\mu\text{mol/L}$, 说明这 4 种生物碱能够逆转乳腺癌 MCF-7/ADR 耐药细胞的耐药性, 后续实验剂量参考 IC_{50} 值进行设定, MCF-7 细胞的给药剂量为 *N*-甲基毛果芸香碱 14 $\mu\text{mol/L}$ 、光千金藤碱 14 $\mu\text{mol/L}$ 、粉防己碱 13 $\mu\text{mol/L}$ 、甜菜碱 22 $\mu\text{mol/L}$, MCF-7/ADR 细胞的给药剂量为 *N*-甲基毛果芸香碱 15 $\mu\text{mol/L}$ 、光千金藤碱 17 $\mu\text{mol/L}$ 、粉防己碱 14 $\mu\text{mol/L}$ 、甜菜碱 25 $\mu\text{mol/L}$ 。

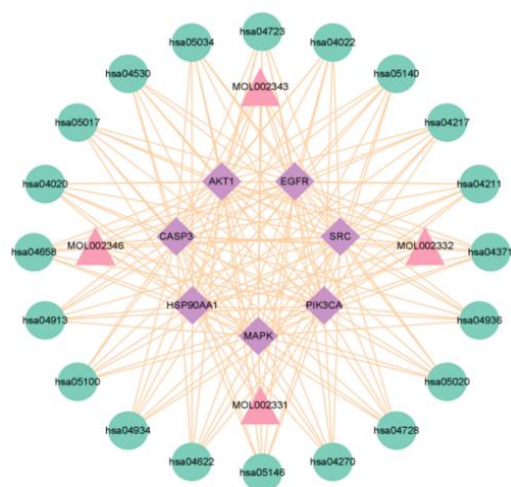


图 5 “防己生物碱类活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 5 “Active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloid-target-pathway” network

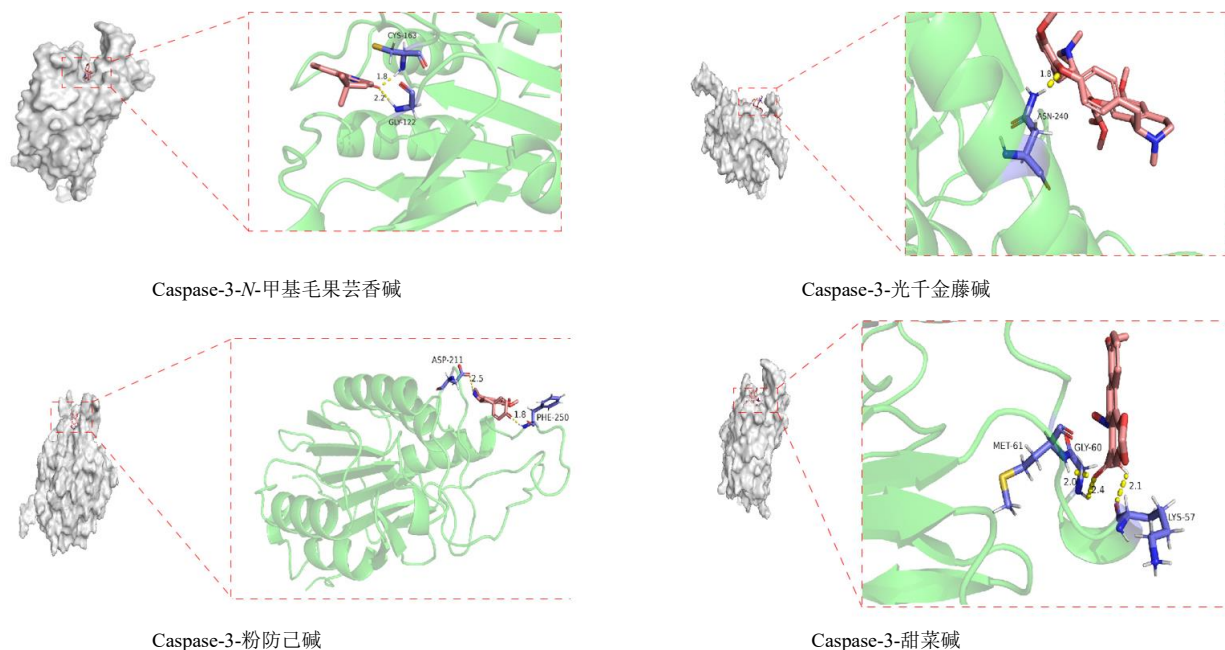


图 6 防己生物碱类活性成分与核心靶点分子对接模式

Fig. 6 Molecular docking mode of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloid with core targets

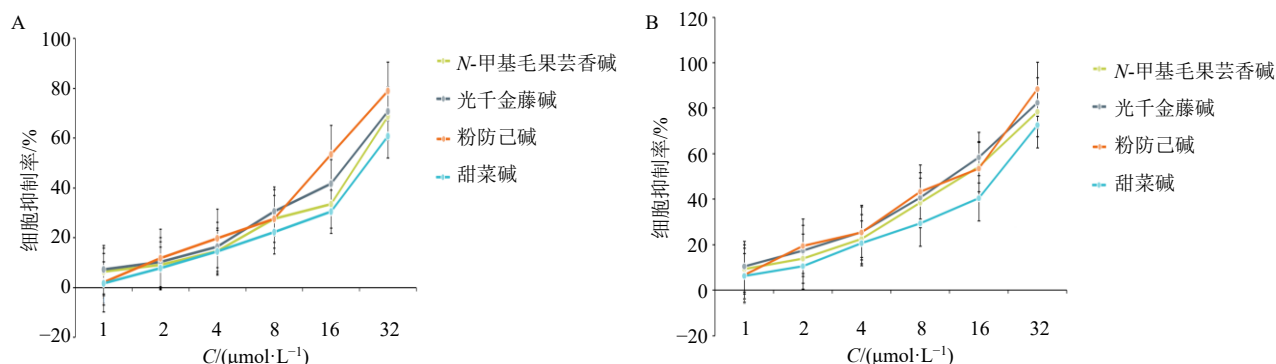


图 7 防己生物碱类活性成分对 MCF-7 (A) 和 MCF-7/ADR (B) 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on proliferation of MCF-7 (A) and MCF-7/ADR (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.8 防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞形态的影响

采用倒置显微镜、荧光显微镜观察 *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞形态的影响,如图 8 所示,防己生物碱类活性成分可以明显改变 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞的形态,并且出现部分细胞变圆漂浮现象;荧光显微镜下各给药组细胞出现凋亡小体,且细胞膜破碎明显,细胞排列稀疏,细胞核呈现较强的荧光。

3.9 流式细胞仪检测防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

如图 9 所示, *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱诱导 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞

凋亡,对 MCF-7 细胞的凋亡率分别为 $(26.22 \pm 0.47)\%$ 、 $(14.38 \pm 0.35)\%$ 、 $(28.71 \pm 0.64)\%$ 、 $(19.67 \pm 0.26)\%$,大部分凋亡细胞处在 G_1 、 G_2 期,判定为早期凋亡;对 MCF-7/ADR 细胞的凋亡率分别为 $(17.94 \pm 0.29)\%$ 、 $(13.75 \pm 0.86)\%$ 、 $(21.51 \pm 0.51)\%$ 、 $(16.95 \pm 0.37)\%$,大部分凋亡细胞处在 G_1 、 G_2 期,判定为早期凋亡。

3.10 防己生物碱类活性成分对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞 HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 10、11 所示, *N*-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱作用于 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞 48 h 后, HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1

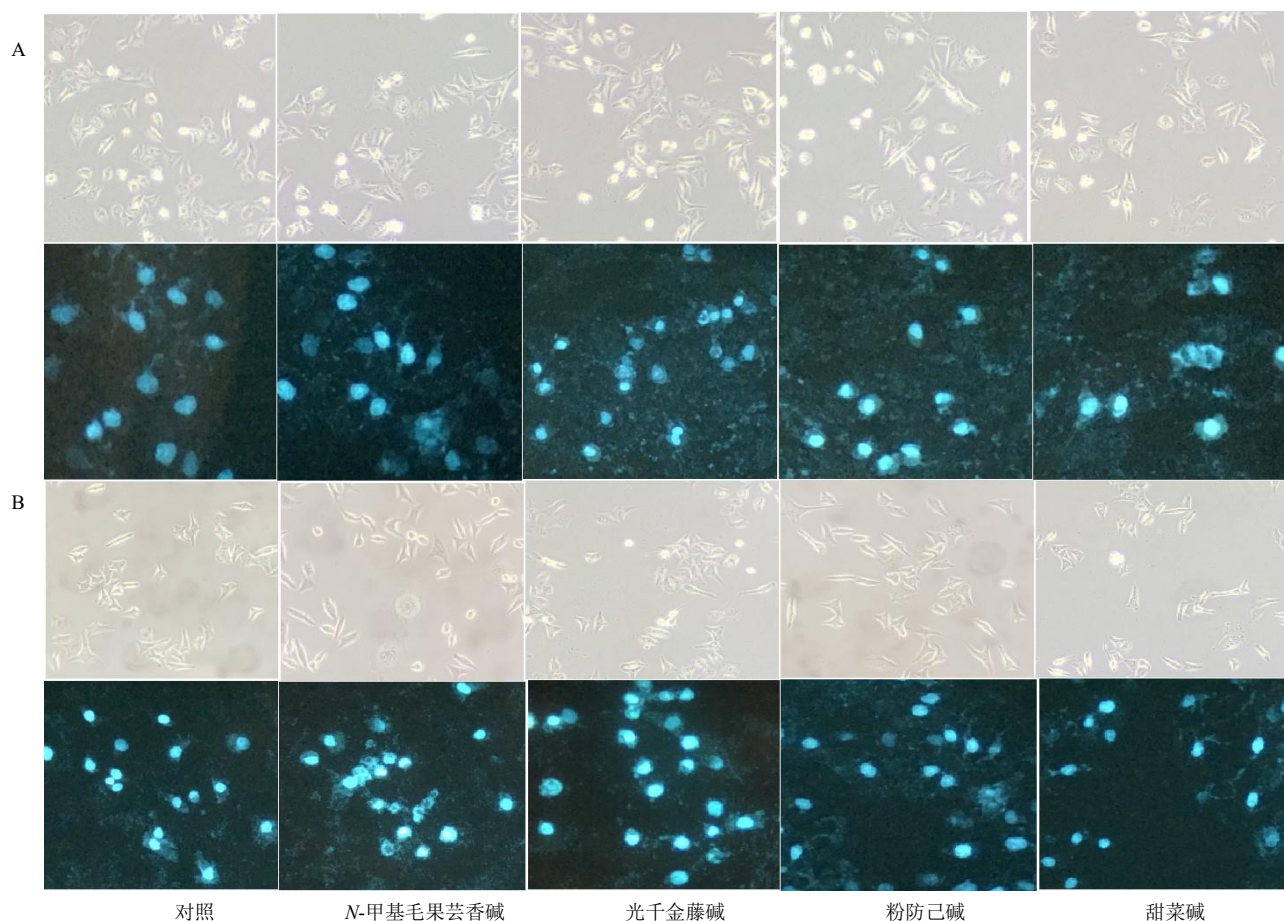


图 8 防己生物碱类活性成分对 MCF-7 (A) 和 MCF-7/ADR (B) 细胞形态的影响 (×400)

Fig. 8 Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on morphology of MCF-7 (A) and MCF-7/ADR (B) cells (× 400)

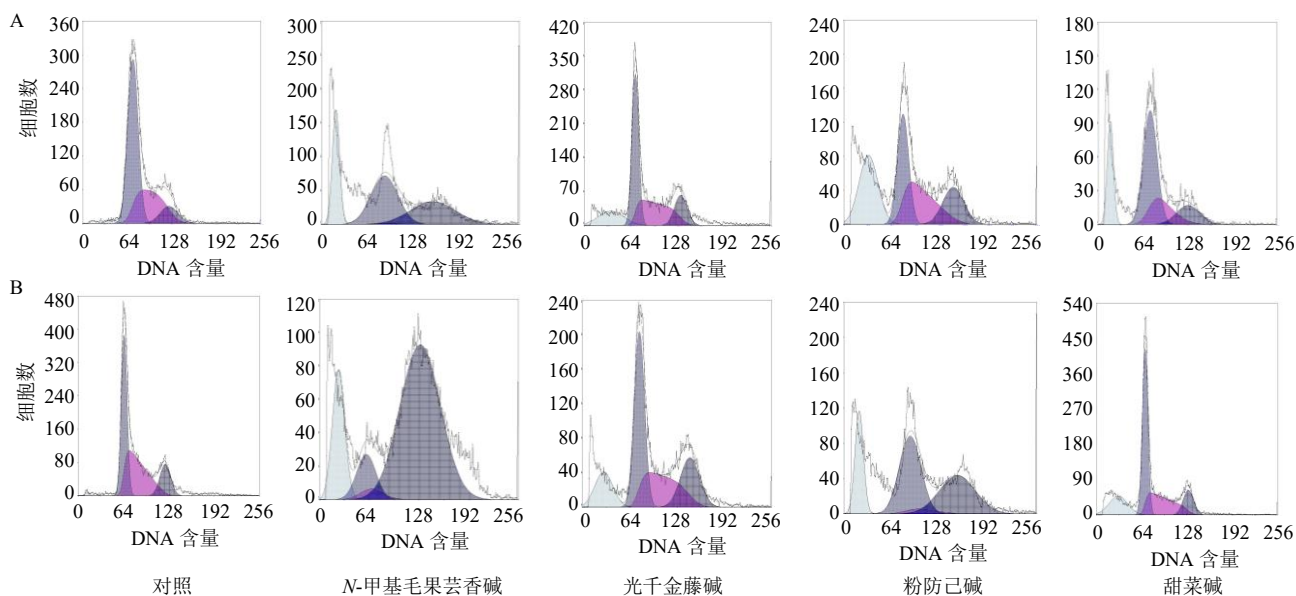
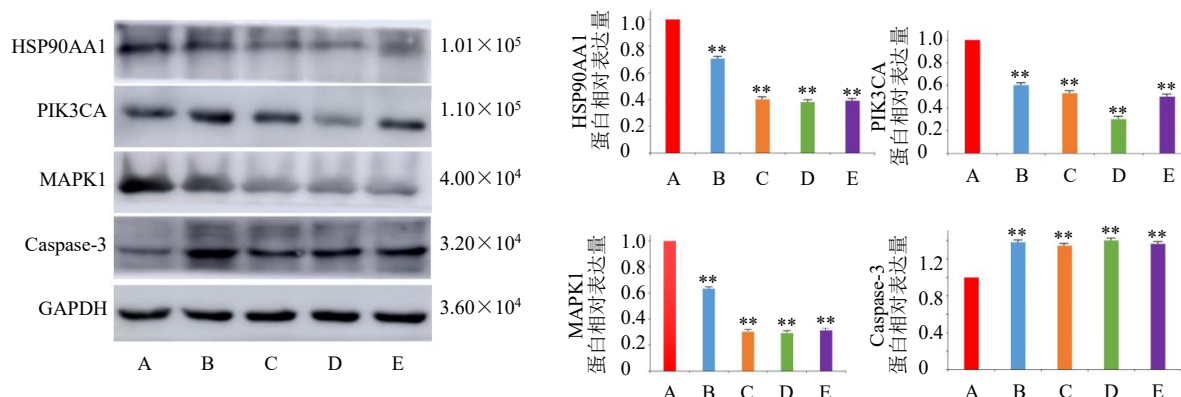


图 9 防己生物碱类活性成分对 MCF-7 (A) 和 MCF-7/ADR (B) 细胞凋亡的影响

Fig. 9 Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on apoptosis of MCF-7 (A) and MCF-7/ADR (B) cells



A-对照组 B-N-甲基毛果芸香碱组 C-光千金藤碱组 D-粉防己碱组 E-甜菜碱组 与对照组比较: ** $P < 0.01$, 图 11 同

A-control group B-N-methylflindersine group C-stepharine group D-tetrandrine group E-betaine group ** $P < 0.01$ vs control group, same as fig. 11

图 10 防己生物碱类活性成分对 MCF-7 细胞 HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 10 Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on HSP90AA1, PIK3CA, MAPK1 and Caspase-3 protein expressions in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

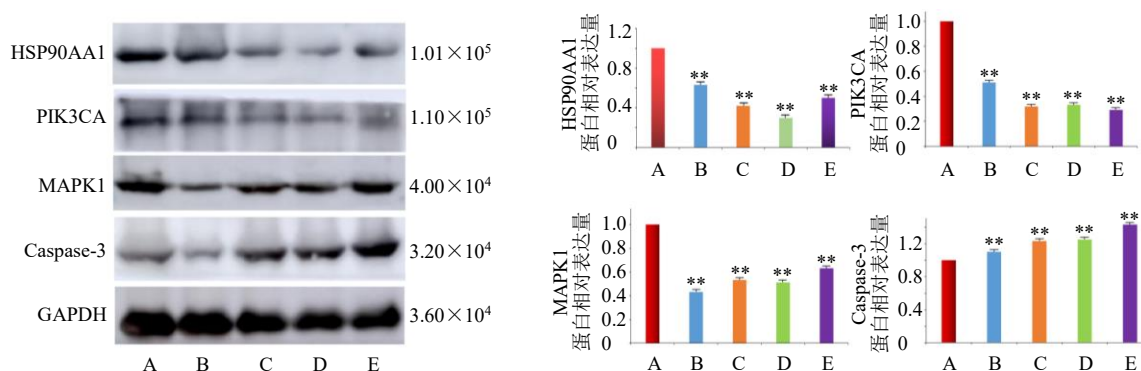


图 11 防己生物碱类活性成分对 MCF-7/ADR 细胞 HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 11 Effect of active components of *Stephaniae Tetrandrae Radix* alkaloids on HSP90AA1, PIK3CA, MAPK1 and Caspase-3 protein expressions in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

目前中药逆转乳腺癌阿霉素耐药的研究已取得了进展,但肿瘤耐药机制复杂,且中药成分众多,网络药理学在有效成分以及疾病靶点筛选得到了广泛的应用,在一定程度上可以缩小研究的范围和明确研究的目的;分子对接技术将成分靶点与疾病靶点相结合,以虚拟评价的方式验证网络药理学的预测结果。进一步采用网络药理学方法,筛选防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌阿霉素耐药的潜在靶点及作用通路,结果发现 N-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱 4 个活性成分主要作用于 SRC、EGFR、HSP90AA1、AKT1、MAPK1、PIK3CA、Caspase-3 7 个核心靶点。分子对接结果显示 N-甲基

毛果芸香碱与 Caspase-3、MAPK1、EGFR、HSP90AA1、PIK3CA 和 SRC 有良好的结合活性(结合能 < -4 kJ/mol);光千金藤碱与 Caspase-3、MAPK1 和 PIK3CA 有良好的结合活性(结合能 < -4 kJ/mol);粉防己碱与 Caspase-3、HSP90AA1、MAPK1 和 PIK3CA 有良好的结合活性(结合能 < -4 kJ/mol);甜菜碱与 Caspase-3、PIK3CA 有良好的结合活性(结合能 < -4 kJ/mol),其中 N-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱以及甜菜碱与 Caspase-3 结合活性最好。KEGG 通路富集分析结果表明,防己活性生物碱类成分可能作用于钙信号通路、cGMP-PKG 信号通路、RIG-I 样受体信号通路、Apenlin 信号通路等通路来逆转乳腺癌阿霉素耐药。

体外实验结果显示, N-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱、甜菜碱 4 个防己生物碱类活性

成分均对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞具有增殖抑制作用,能够改变肿瘤细胞形态,诱导肿瘤细胞凋亡,进一步对关键通路节点蛋白检测发现,4 种生物碱对 MCF-7、MCF-7/ADR 细胞 HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1、Caspase-3 蛋白均具有调节作用。HSP90AA1^[18-20]、PIK3CA^[22-26]、MAPK1^[27-28]是诱发肿瘤发生的标志性蛋白,这 4 种生物碱能够显著下调 HSP90AA1、PIK3CA、MAPK1 蛋白表达,说明能够抑制肿瘤细胞增殖;Caspase-3^[29-32]蛋白是肿瘤细胞凋亡的启动子,这 4 种生物碱能够显著上调 Caspase-3 蛋白表达,说明能够诱发肿瘤细胞凋亡。实验结果说明,N-甲基毛果芸香碱、光千金藤碱、粉防己碱和甜菜碱可以调控乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞的 Caspase-3、MAPK1、HSP90AA1、PIK3CA 关键靶点,诱导细胞发生凋亡,逆转乳腺癌耐药。本研究采用网络药理学、分子对接技术和体外细胞实验明确了防己逆转乳腺癌阿霉素耐药的药效物质基础、潜在作用靶点及通路,为防己生物碱类成分逆转乳腺癌阿霉素耐药的研究奠定了研究基础,也为解决临床乳腺癌阿霉素耐药提供有效方案参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] WHO. Global health estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019 [Z/OL]. [2021-02-20]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghc-leading-causes-of-death>.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview [J]. *Int J Cancer*, 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [3] Kerr A J, Dodwell D, McGale P, et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality [J]. *Cancer Treat Rev*, 2022, 105: 102375.
- [4] Goldner M, Pandolfi N, Maciel D, et al. Combined endocrine and targeted therapy in luminal breast cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2021, 21(11): 1237-1251.
- [5] Al-Malky H S, Al Harthi S E, Osman A M M. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2020, 26(2): 434-444.
- [6] Liu M. Effects of Chinese herbal formula on immune function and nutritional status of breast cancer patients [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 5900024.
- [7] Guo Q Q, Coyle M E, Zhang A L, et al. Chinese medicine syndrome differentiation for early breast cancer: A multicenter prospective clinical study [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 914805.
- [8] Zhang Y F, Zhang B, Zhou W L, et al. Management of long-term sores and ulcers of breast cancer survivors with Chinese herbal medicines: A case report [J]. *Front Psychiatry*, 2022, 13: 874691.
- [9] Zhou J, Yu C H, Peng C. Anticancer effect of tanshinones on female breast cancer and gynecological cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 824531.
- [10] Bai X, Ta N, Gong G H, et al. Effects of integrated Chinese traditional medicine and conventional western medicine on the quality of life of breast cancer patients: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 3123878.
- [11] 杜佳蓉, 吴威, 史晨旭, 等. 防己本草考证与化学成分、药理作用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(5): 70-82.
- [12] 刘嘉琪, 张雅男, 赵婉, 等. 粉防己化学成分及药理学研究进展 [J]. *中医药学报*, 2017, 45(3): 100-103.
- [13] 莫柳英, 张帆, 郝二伟, 等. 基于化学成分、药理作用及网络药理学的防己质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(19): 6283-6295.
- [14] 许进业, 许凤清, 孔垂皓, 等. 粉防己根的化学成分及抗肝纤维化活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(12): 2050-2055.
- [15] 刘顺, 李姚婷, 沈思懿, 等. 粉防己根的化学成分研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(6): 1384-1387.
- [16] 吴梦丽, 何秋梅, 杨帆, 等. 基于网络药理学的防己主要活性成分及药理作用机制分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 213-216.
- [17] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [18] Liu C C, Zhao W, Su J, et al. HSP90AA1 interacts with CSFV NS5A protein and regulates CSFV replication via the JAK/STAT and NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1031868.
- [19] Yang S S, Nie T J, She H, et al. Regulation of TFEB nuclear localization by HSP90AA1 promotes autophagy and longevity [J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 822-838.
- [20] Chen X, Zhu Y, Song C C, et al. MiR-424-5p targets HSP90AA1 to facilitate proliferation and restrain differentiation in skeletal muscle development [J]. *Anim Biotechnol*, 2022, doi: 10.1080/10495398.2022.2102032.
- [21] Zhang M N, Peng Y N, Yang Z W, et al. DAB2IP down-regulates HSP90AA1 to inhibit the malignant biological behaviors of colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 561.
- [22] Burnette S E, Poehlein E, Lee H J, et al. Evaluation of alpelisib-induced hyperglycemia prophylaxis and

- associated risk factors in PIK3CA-mutated hormone-receptor positive, human epidermal growth factor-2 negative advanced breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2023, 197(2): 369-376.
- [23] Zeng L, Zhang H Y, Yang C Y, *et al.* Generation of a tree shrew breast cancer model using lentivirus expressing *PIK3CA-H1047R* [J]. *Zool Res*, 2023, 44(1): 94-97.
- [24] Vollbrecht C, Hoffmann I, Lehmann A, *et al.* Proficiency testing of PIK3CA mutations in HR⁺/HER2-breast cancer on liquid biopsy and tissue [J]. *Virchows Arch*, 2023, 482(4): 697-706.
- [25] Venetis K, Pepe F, Munzone E, *et al.* Analytical performance of next-generation sequencing and RT-PCR on formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues for *PIK3CA* testing in HR⁺/HER2-breast cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3545.
- [26] Yao J, You Q, Zhang X, *et al.* PIK3CA somatic mutations as potential biomarker for immunotherapy in elder or TP53 mutated gastric cancer patients [J]. *Clin Genet*, 2023, 103(2): 200-208.
- [27] Chen Z Y, Huang M X, You J Y, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0023404 promotes the proliferation, migration and invasion in endometrial cancer cells through regulating miR-217/MAPK1 axis [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 242.
- [28] Li H L, Song Y H, Du Z P, *et al.* Overexpression of miR-633 suppresses the tumorigenicity of gastric cancer cells and induces apoptosis by targeting MAPK1 [J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42(5): 1033-1045.
- [29] Yazdani M, Hallaj A, Salek F, *et al.* Potential of the combination of *Artemisia absinthium* extract and cisplatin in inducing apoptosis cascades through the expression of p53, BAX, caspase 3 ratio, and caspase 9 in lung cancer cells (Calu-6) [J]. *Eur J Integr Med*, 2022, 56: 102193.
- [30] Silva F F V E, Padín-Iruegas M E, Caponio V C A, *et al.* Caspase 3 and cleaved caspase 3 expression in tumorigenesis and its correlations with prognosis in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11937.
- [31] Yu F, Tan W D, Chen Z Q, *et al.* Nitidine chloride induces caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis by inhibiting PI3K/Akt pathway in lung cancer [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 115.
- [32] Soto K M, Luzardo-Ocampo I, López-Romero J M, *et al.* Gold nanoparticles synthesized with common mullein (*Verbascum thapsus*) and castor bean (*Ricinus communis*) ethanolic extracts displayed antiproliferative effects and induced Caspase 3 activity in human HT29 and SW480 cancer cells [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(10): 2069.

[责任编辑 李亚楠]