

基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨菟丝子醇提物抗乳腺癌作用机制

宋 辉^{1,2}, 黄晓俏¹, 孙向明^{1,2}, 汤 静¹, 王玉涵¹, 韩桐楠¹, 李文兰^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学药学院 (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

摘 要: **目的** 基于网络药理学、分子对接及体内实验验证探讨菟丝子醇提物抗乳腺癌的疗效及作用机制。**方法** 借助 SwissADME 平台筛选课题组前期通过 UPLC/Q-TOF-MS 分析得到的 46 个菟丝子醇提物候选化合物, 利用 TCMSP、ETCM、BATMAN-TCM 数据库预测其潜在靶点; GeneCards、OMIM、DrugBank 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, 利用 DAVID 数据库进行基因本体 (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, 并建立“成分-靶点-通路”网络, 采用 AutoDock 等软件对关键活性成分和核心靶点进行分子对接验证。建立 4T1 荷瘤小鼠模型, 设置模型组、环磷酰胺 (20 mg/kg) 组和菟丝子醇提物低、中、高剂量 (3.12、6.24、12.48 g/kg) 组, 连续给药 14 d, 观察菟丝子醇提物对小鼠体质量、脾脏和胸腺指数的影响; 小动物活体成像检测肿瘤细胞光子数; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色检测瘤组织病理变化; Western blotting 检测肿瘤组织磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路及凋亡相关蛋白表达。**结果** 网络药理学筛选得到 17 种菟丝子活性成分及靶点 428 个, 乳腺癌疾病靶点 1 534 个, 交集靶点 184 个, 其中 AKT1、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53) 等 9 个为核心靶点, 与槲皮素、芹菜素等 7 个核心成分分子对接结果良好。通过 KEGG 和 GO 分析发现, PI3K/Akt 信号转导通路可能是菟丝子抗乳腺癌的重要途径。动物实验结果证实成功构建 4T1 荷瘤小鼠模型, 与模型组比较, 菟丝子醇提物组小鼠体质量、胸腺指数显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 脾脏指数及肿瘤细胞光子数显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 同时瘤组织可见部分坏死区域, 细胞核呈溶解现象。菟丝子醇提物组显著下调 p-PI3K、p-Akt、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 上调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 升高 Bax/Bcl-2 值 ($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 菟丝子醇提物能够明显抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长, 其作用机制可能与调控 PI3K/Akt 通路、促进细胞凋亡有关。

关键词: 菟丝子; 乳腺癌; 网络药理学; PI3K/Akt 信号通路; 细胞凋亡; 金丝桃苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4747-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.012

Mechanism of alcohol extract of *Cuscuta chinensis* against breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and animal experiments

SONG Hui^{1,2}, HUANG Xiaoqiao¹, SUN Xiangming^{1,2}, TANG Jing¹, WANG Yuhan¹, HAN Xunan¹, LI Wenlan^{1,2}

1. School of Pharmacy (Pharmaceutical Engineering Technology Research Center), Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Ministry of Education, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of alcohol extract of *Cuscuta chinensis* on breast cancer based on network pharmacology, molecular docking and *in vivo* experimental verification. **Methods** A total of 46 candidate compounds were identified from alcohol extract of *C. chinensis* using UPLC/Q-TOF-MS analysis in preliminary study. These components were

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 黑龙江省重点研发计划项目 (2022ZX02C08); 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果建设项目 (LJGXCG2022-096); 2022 年哈尔滨商业大学博士科研启动支持计划项目 (22BQ15); 2022 年哈尔滨商业大学产业化项目支持计划项目 (22CZ17)

作者简介: 宋 辉 (1981—), 女, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。

Tel: 13633602561 E-mail: huihui4595@sina.com

*通信作者: 李文兰 (1967—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及质量标准。

Tel: (0451)84605022 E-mail: lwldzd@163.com

analyzed on SwissADME platform to predict potential targets, which were further identified using TCMSP, ETCM and BATMAN-TCM databases. GeneCards, OMIM and DrugBank databases were used to collect disease targets. The intersections were used to construct the “component-target” and protein-protein interaction (PPI) network. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using DAVID database, and “component-target-pathway” network was constructed. Molecular docking verification of key active ingredients and core targets was conducted using AutoDock and other software. A 4T1 tumor-bearing model in mice was established, model group, cyclophosphamide (20 mg/kg) group and alcohol extract of *C. chinensis* low-, medium- and high-dose (3.12, 6.24, 12.48 g/kg) groups were set up. Drugs were administered continuously for 14 d, the effect of alcohol extract of *C. chinensis* on body weight, spleen and thymus indexes were monitored; Tumor cell photon counts were measured using live animal imager; Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to observe pathological changes in tumor tissue; Western blotting was used to detect phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway and apoptosis-related protein expressions in tumor tissue. **Results** A total of 17 active ingredients and 428 potential targets of *C. chinensis*, along with 1 534 targets of breast cancer, and 184 intersection targets, were identified using network pharmacology. Molecular docking demonstrated favorable interactions for nine core targets, including AKT1, estrogen receptor 1 (ESR1), epidermal growth factor receptor (EGFR) and tumor protein p53 (TP53), etc, with seven core components such as quercetin and apigenin. KEGG and GO analysis indicated that PI3K/Akt signaling pathway may be a crucial pathway for *C. chinensis* to prevent breast cancer. The animal experiments confirmed the successful establishment of the mouse 4T1 tumor-bearing mouse model. Compared with model group, the body weight and thymus index of mice in alcohol extract of *C. chinensis* group were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), while the spleen index and photon number of tumor cells were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). At the same time, some necrotic areas were visible in tumor tissue, and the nucleus showed dissolution. The alcohol extract of *C. chinensis* group significantly down-regulated the expressions of p-PI3K, p-Akt and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein ($P < 0.05$, 0.01), up-regulated the expression of Bcl-2 associated X protein (Bax) ($P < 0.05$, 0.01), and increased Bax/Bcl-2 value ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Alcohol extract of *C. chinensis* can significantly inhibit the growth of tumor in tumor-bearing mice, and its mechanism may be related to regulating PI3K/Akt pathway and promoting cell apoptosis.

Key words: *Cuscuta chinensis* Lam.; breast cancer; network pharmacology; PI3K/Akt pathway; apoptosis; hyperoside

根据 2020 年世界卫生组织国际癌症研究所的癌症负担数据分析, 乳腺癌发病率已高居全球癌症榜榜首, 全球每年新增女性乳腺癌病例约 230 万, 死亡病例约 69 万, 已严重威胁女性生命健康^[1-2]。与其他国家相比, 我国女性乳腺癌患者每年新增约 30.4 万例, 并逐渐呈现年轻化趋势^[3]。目前西医治疗乳腺癌以手术、放化疗、分子靶向、内分泌治疗及一些新辅助治疗等综合治疗为主, 但因其严重的毒副作用而具有一定的局限性^[4-6]。近年来, 中药以其独特的优势在抗乳腺癌方面脱颖而出, 能显著抑制肿瘤生长、抗肿瘤复发转移、逆转耐药性以及调节机体免疫功能, 同时具有防治抗肿瘤药物所致心脏毒性的作用, 并且其多途径、多靶点的特点更能达到全身治疗的作用^[7-8]。

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 或菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的干燥成熟种子, 别名禅真、蚕豆寄生、豆寄生、菟藤、豆阎王、金丝藤^[9-11]等, 主要分布于我国黑龙江、山东、辽宁、北京、山东、河北、河南、宁夏、广东和云南等省市^[12-13], 常寄生于大豆、黄芩、绿豆等

植物上^[14]。菟丝子中含有黄酮、酚酸、木脂素、生物碱等丰富的化学成分^[15-17], 具有抗肿瘤、抗衰老、调节生殖内分泌激素水平、抑制卵巢颗粒细胞 (granulosa cells, GCs) 凋亡和自噬失衡、改善认知等广泛的药理作用^[18-19]。本研究基于网络药理学^[20]筛选菟丝子醇提物抗乳腺癌作用的相关靶点和通路, 将筛选后的活性成分与靶蛋白进行分子对接, 并结合动物实验进行初步验证, 为菟丝子临床治疗乳腺癌提供理论依据。

1 材料

1.1 数据库

SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>); TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>); ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/>); BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>); OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>); DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>); STRING 数据库 (<https://string-db.org>); DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>); PDB 数据库 (<https://>

www.rcsb.org)。

1.2 细胞与动物

小鼠乳腺癌 4T1-Luc 细胞购自上海美轩生物科技有限公司。

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 体质量 (18 ± 2) g, 购自哈尔滨医科大学实验动物学部, 许可证号 SYXK(黑) 2019-001。所有小鼠均饲养于温度 $22 \sim 25$ °C、相对湿度 40%~70% 的环境中, 自由进食饮水, 适应性饲养 7 d 后进行实验。动物实验经哈尔滨商业大学药学院实验动物伦理委员会批准(批准号 HSDYXY-2021004)。

1.3 药材

菟丝子购自黑龙江省萝北县菟丝子种植基地, 经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定为旋花科植物菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的干燥成熟种子。

1.4 药品与试剂

复方环磷酰胺片(cyclophosphamide, CTX, 国药准字 H22026738, 批号 220601) 购自通化茂祥制药有限公司; *D*-萤光素钾盐(*D*-luciferin potassium salt) 萤光素酶底物(批号 122799) 购自美国 PerkinElmer 公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色液(批号 DH0006) 购自北京雷根生物技术有限公司; 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF, 批号 BL507A-8) 购自兰杰柯科技有限公司; Bradford 蛋白定量试剂盒(批号 022521210525) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 蛋白 Marker(批号 01146562) 购自广州赛国生物科技有限公司; 蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt) 抗体、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 抗体、p-Akt 抗体、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号分别为 NO4220003、NO3073380、NO4294074、NO4261556、NO4071637、NO4161114) 购自万类生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗、p-PI3K 抗体(批号分别为 BJ08079044、BJ07207167) 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.5 仪器

DL-CJ-1N 型医用型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司); ECO-170P-230 型二氧化碳培养箱(美国 NBS 公司); Anke TDL80-2C 型离心机

(上海安亭科学仪器厂); PE IVIS Lumina III 型小动物活体成像系统(美国 PerkinElmer 公司); DYY-7C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); HS-3345 型全自动石蜡切片机(金华市华速科技有限公司); c500 型凝胶成像系统(美国 Azure 公司); Gen2 型高分辨荧光显微镜[艾普拜生物科技(苏州)有限公司]。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 构建“活性成分-靶点”和蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络 课题组前期对菟丝子醇提物化学成分进行 UPLC/Q-TOF-MS 分析, 得到 46 个候选化合物^[21]。通过 SwissADME 平台预测, 同时满足肠胃吸收“High”、类药五原则中有 ≥ 2 个“Yes”的化合物纳入活性成分范畴。TCMSP、ETCM、BATMAN-TCM 数据库检索各活性成分, 收集相关靶点信息, 构建“活性成分-靶点”网络; GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库得到乳腺癌疾病基因靶点。Venny 2.1 平台对主要活性成分靶标与乳腺癌疾病靶标取交集, 以度值的中位数为参考, 筛选菟丝子醇提物抗乳腺癌作用的核心靶点; STRING 数据库、Cytoscape 3.8.1 软件构建 PPI 网络。

2.1.2 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 将核心靶点导入 DAVID 数据库获得 GO 功能分析与 KEGG 通路富集分析结果, 于微生信平台进行可视化分析。

2.1.3 构建“成分-靶点-通路”网络 应用 Cytoscape 3.8.1 软件构建“成分-靶点-通路”网络, 以大于 3 倍度值的中位数为参考筛选菟丝子醇提物抗乳腺癌作用的关键成分。

2.1.4 成分-靶点分子对接 利用 Chem 3D 软件, 在交集靶点中, 以大于 3 倍度值的中位数为参考(度值中位数=39), 筛选菟丝子醇提物抗乳腺癌的关键靶点; 通过 PDB 数据库、PyMOL 及 AutoDock 软件, 对成分、蛋白进行处理; 运行 Vina, 依次将活性成分与蛋白进行对接打分, 并进行热图分析。

2.2 动物实验

2.2.1 菟丝子醇提物的制备 将菟丝子研成粉末, 称取适量, 加入 95%乙醇, 浸泡过夜; 按照料液比 1:10 各提取 3 次, 煮沸, 每次提取时间 1 h; 合并 3 次滤液, 浓缩得到浸膏, 得膏率为 14.81%。醇提物含金丝桃苷不低于 2.6 mg/g(以生药量计)^[22]。

2.2.2 乳腺癌荷瘤小鼠模型的建立、分组与给药 取对数生长期的 4T1-Luc 细胞，调整密度为 1×10^7 个/mL，吸取 200 μ L 细胞悬液，于小鼠右侧腋下接种，第 3 天后，将其随机分为模型组、CTX(20 mg/kg) 组和菟丝子醇提物低、中、高剂量(以生药量计 3.12、6.24、12.48 g/kg)组，每组 8 只，另取 8 只正常 BALB/c 小鼠作为对照组，连续 ig 给药 14 d，对照组和模型组 ig 等体积生理盐水。

2.2.3 小动物活体成像 给药第 5、8、11、14 天进行小鼠活体成像，活体成像前 10 min ip 15 mg/mL 荧光素钾盐溶液(150 mg/kg)。使用异氟烷气体麻醉，利用系统自带软件采集图像并测量相对光子数，分析小鼠体内肿瘤细胞信号强度的变化。

2.2.4 动物处死及相关指标检测 给药 14 d 后，禁食不禁水，次日处死小鼠，取出小鼠体内实体瘤、胸腺及脾脏，清理表面结缔组织，精密称定质量后计算抑瘤率和胸腺、脾脏指数。

抑瘤率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量

胸腺指数=胸腺质量/体质量

脾脏指数=脾脏质量/体质量

2.2.5 HE 染色 给药 14 d 后，分离出模型组、CTX 组和菟丝子醇提物高、中、低剂量组肿瘤组织，取部分瘤组织经福尔马林溶液固定，石蜡包埋后进行连续切片、固定、HE 染色，在显微镜下观察瘤组织病理学变化。

2.2.6 Western blotting 检测瘤组织 PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达 取各组小鼠肿瘤组织，加入 RIPA 裂解液充分研磨，离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度。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，封闭后加入一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗(1:10 000)，室温孵育 1 h，显影，采用 Image Lab 软件对条带进行灰度分析。

2.3 统计学分析

数据分析用 SPSS Statistics 21.0 软件进行处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 “活性成分-靶点”和 PPI 网络的构建 菟丝子醇提物经筛选得到 17 个符合条件的活性成分见表 1。利用 TCMSP 等数据库得到 428 个活性成分靶点，GeneCards 等数据库检索得到 1 534 个乳腺癌

疾病基因靶点，将相关靶点对比，得到交集靶点 184 个(图 1)。菟丝子醇提物“活性成分-靶点”网络包含节点 445 个、边 883 条，见图 2。以度值 ≥ 39 为参考，得到 94 个菟丝子醇提物活性成分抗乳腺癌的核心靶点，见图 3。PPI 网络共有节点 94 个、边 2 646 条，其抗乳腺癌作用可能与 AKT1、雌激素受体 1(estrogen receptor 1, ESR1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53, TP53)、白蛋白(albumin, ALB)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、AP-1 转录因子亚基(AP-1 transcription factor subunit, JUN)、骨髓细胞瘤癌基因(myelocytomatosis oncogene gene, Myc)、胰岛素(insulin, INS)等靶点密切相关。

表 1 菟丝子醇提物主要活性成分
Table 1 Main active ingredients of alcohol extract of *C. chinensis*

编号	成分
TSZ1	槲皮素
TSZ2	山柰酚
TSZ3	异鼠李素
TSZ4	芹菜素
TSZ5	对氨基苯甲酸
TSZ6	1-乙酰基- β -咔啉
TSZ7	邻苯二甲酸酐
TSZ8	蜜环菌癸素
TSZ9	麦芽酚
TSZ10	4-羟基香豆素
TSZ11	绿原酸
TSZ12	金丝桃苷
TSZ13	6-(6-cyano-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-6-oxohexanoic acid
TSZ14	凹脉丁公藤碱
TSZ15	2,6-十八碳二炔酸
TSZ16	tsuzuic acid
TSZ17	<i>cis</i> - α -irone

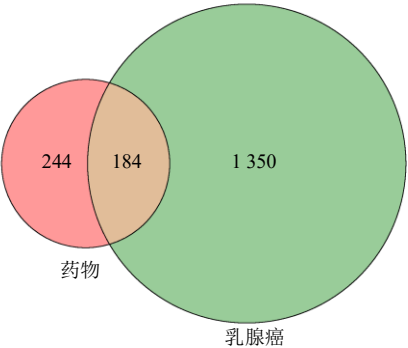


图 1 药物-疾病靶点 Venn 图
Fig. 1 Venn diagram of drug-disease target

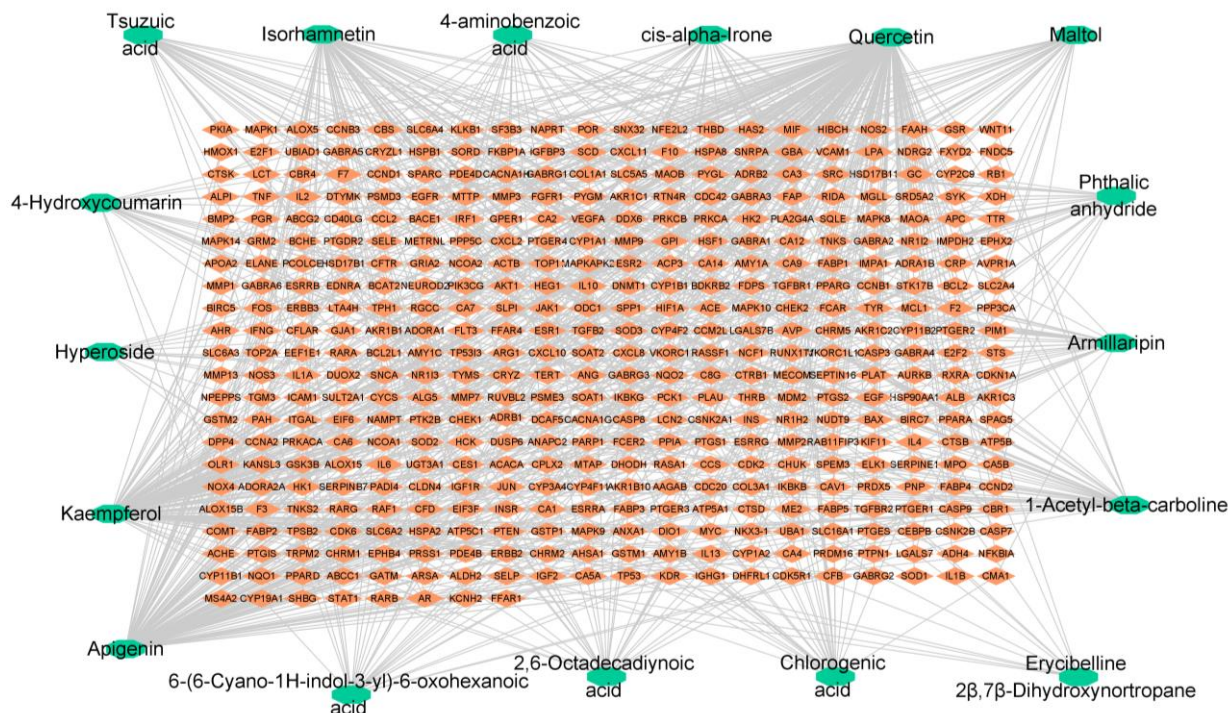


图 2 成分-靶点网络

Fig. 2 Component-target network

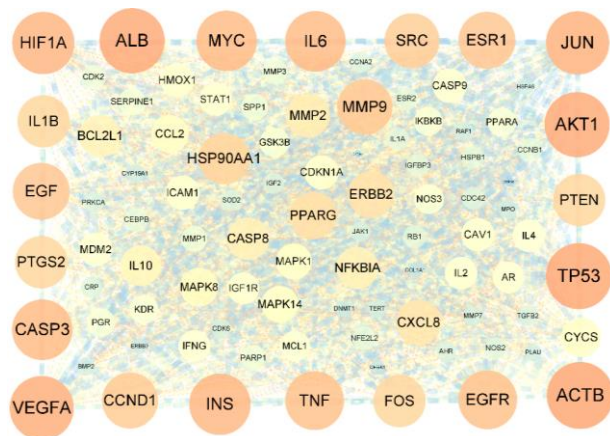


图 3 菟丝子醇提取物抗乳腺癌核心靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of core targets of alcoholic extract of *C. chinensis* anti-breast cancer

3.1.2 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 数据库获得 GO 功能 858 条, 其中 672 条生物过程 (biological process, BP)、62 条细胞组分 (cellular component, CC)、124 条分子功能 (molecular function, MF)。选取排名前 10 的条目通过微生物网可视化分析, 见图 4-A。菟丝子醇提取物主要活性成分可能通过调控 RNA 聚合酶 II 启动子的转录、基因表达、凋亡等方式发挥抗乳腺癌作用。KEGG 分析富集得到 164 条通路, 选取前 30 条通

路进行可视化分析, 见图 4-B。菟丝子醇提取物发挥抗乳腺癌作用主要与癌症信号通路 (pathways in cancer)、PI3K/Akt 通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 通路等密切相关。其中, 癌症通路富集程度最高, 相关的靶点数 55 个; PI3K/Akt 信号通路次之, 相关的靶点数 34 个。

3.1.3 “成分-靶点-通路”网络的构建 以大于 3 倍度值的中位数为参考 (度值中位数=5), 菟丝子醇提取物 17 个主要活性成分中槲皮素 (度值=111)、芹菜素 (度值=72)、山柰酚 (度值=59)、异鼠李素 (度值=35)、*cis*- α -irone (度值=19)、6-(6-cyano-1*H*-indol-3-yl)-6-oxohexanoic acid (度值=16)、蜜环菌癸素 (度值=16) 7 个化合物在“成分-靶点-通路”网络中具有较高的连接度, 可能是菟丝子醇提取物发挥抗乳腺癌作用的关键成分, 见图 5。

3.1.4 关键成分与靶点的分子对接 9 个关键靶点 (AKT1、ESR1、EGFR、TP53、ALB、VEGFA、JUN、MYC、INS) 与 7 个关键成分 [槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素、*cis*- α -irone、6-(6-cyano-1*H*-indol-3-yl)-6-oxohexanoic acid、蜜环菌癸素] 依次分子对接, 结果见图 6, 颜色深浅代表结合能绝对值的大小, 颜色越深, 结合能的绝对值越大, 结合作用越

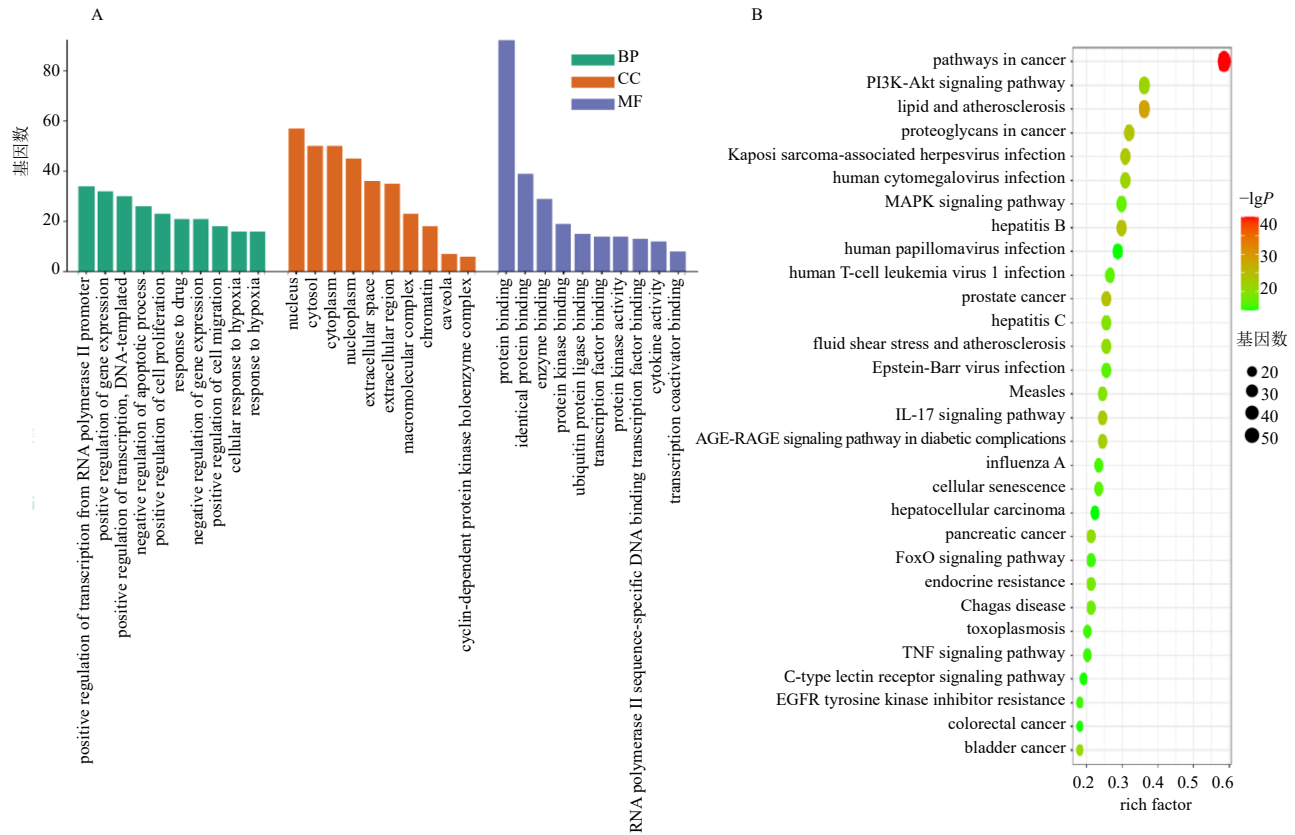


图 4 GO 功能 (A) 与 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis

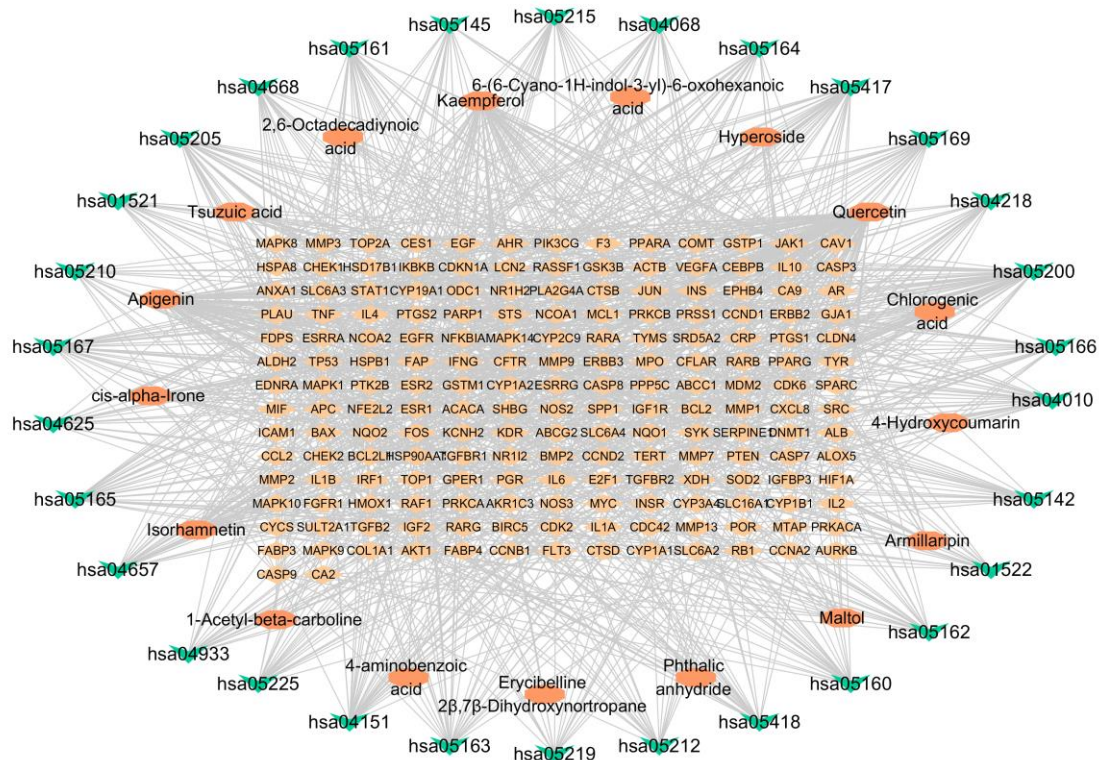


图 5 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 5 “Active ingredient-target-pathway” network

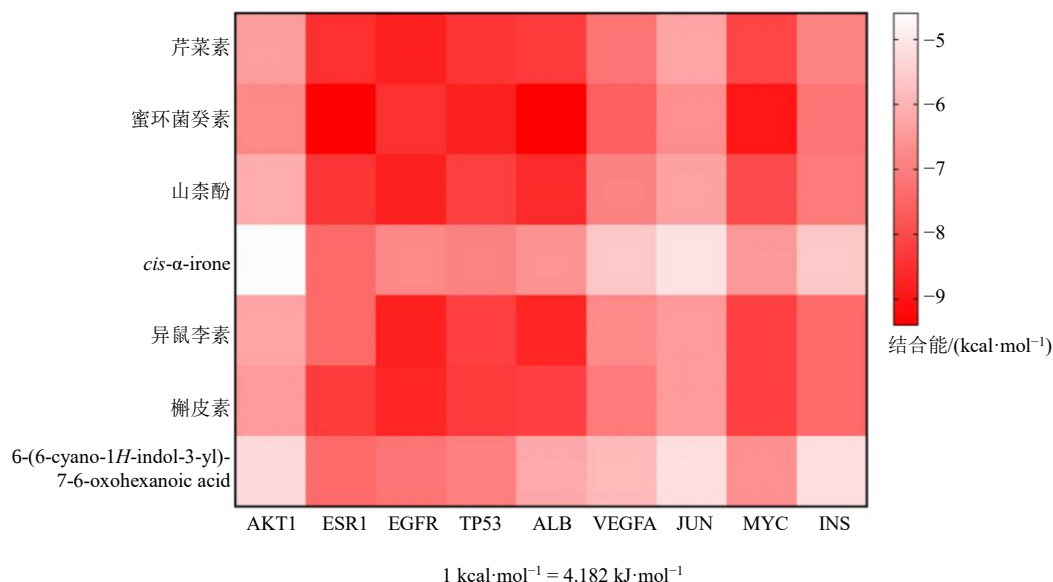


图 6 分子对接热图分析

Fig. 6 Molecular docking heat map analysis

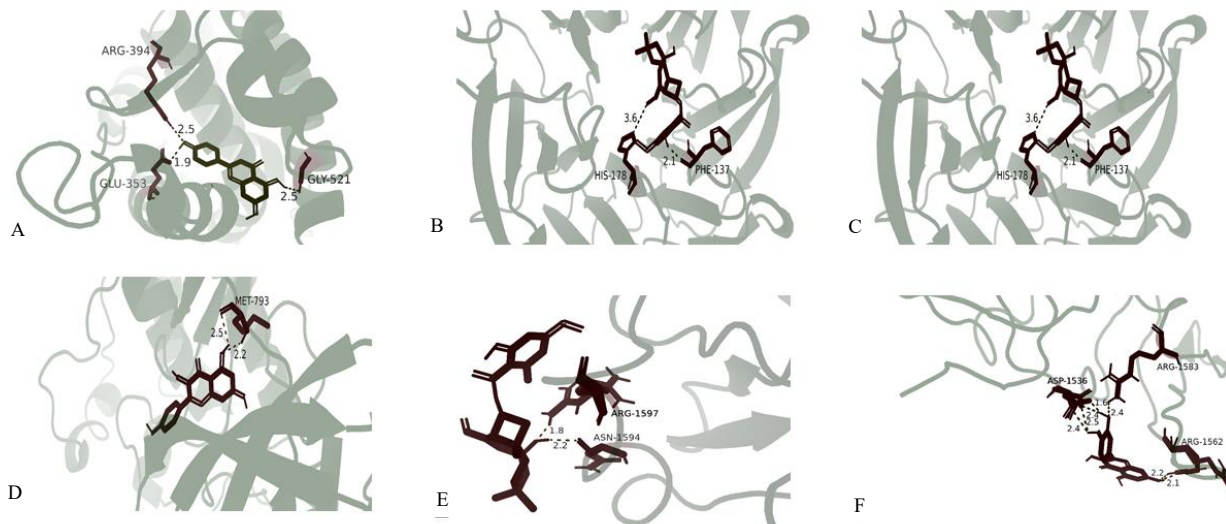
强。对接结果表明，菟丝子醇提取物关键物质与乳腺癌关键靶点具有良好的结合作用，利用 PyMOL 软件，将结合作用较强的进行可视化，见图 7。

3.2 动物实验结果

3.2.1 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠体质量的影响 如图 8 所示，与对照组比较，模型组小鼠体质量明显下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，菟丝子醇提取物

组均不同程度增加乳腺癌荷瘤小鼠体质量，其中高剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.2.2 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤细胞光子数的影响 如图 9 所示，给药第 11 天后，菟丝子醇提取物组和 CTX 组小鼠肿瘤生长速度均明显慢于模型组 ($P < 0.05$, 0.01)；给药 14 d 后，荷瘤小鼠体内肿瘤细胞光子数由高到低排序为模型组 > 菟丝子醇提取物

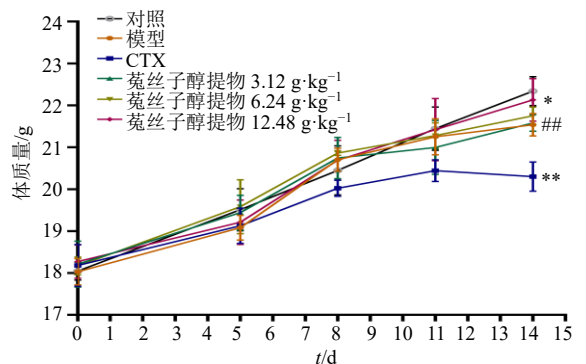


A-芹菜素与 ESR1 的对接图；B-蜜环菌癸素与 MYC 的对接图；C-蜜环菌癸素与 TP53 的对接图；D-山柰酚与 ESR1 的对接图；E-山柰酚与 EGFR 的对接图；F-槲皮素与 TP53 的对接图。

A-docking diagram of apigenin and ESR1; B-docking diagram of armillaripin and MYC; C-docking diagram of armillaripin and TP53; D-docking diagram of kampferol and ESR1; E-docking diagram of kampferol and EGFR; F-docking diagram of quercetin and TP53.

图 7 分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking pattern diagram



与对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下图同。

$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 8 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠体质量的影响

($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 8 Effect of alcohol extract of *C. chinensis* on body weight of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

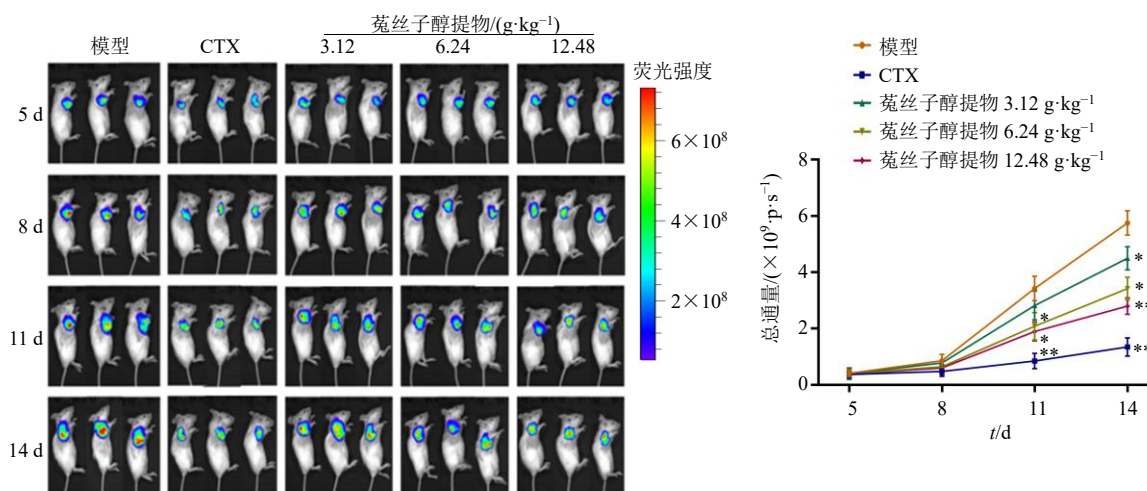


图 9 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤发光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of alcohol extract of *C. chinensis* on luminescence intensity of tumors in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

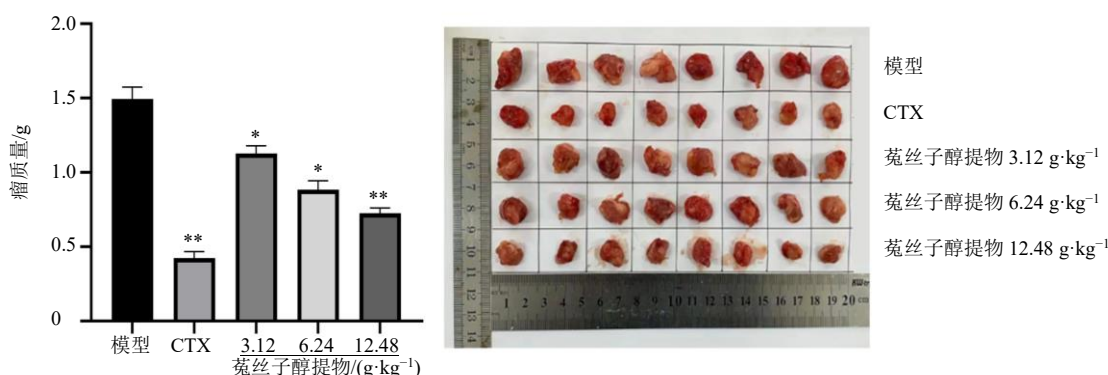


图 10 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 10 Effect of alcohol extract of *C. chinensis* on tumor growth in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

低剂量组>菟丝子醇提取物中剂量组>菟丝子醇提取物高剂量组>CTX 组。

3.2.3 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用 如图 10 所示,与模型组比较,各给药组小鼠瘤质量均明显降低($P<0.05$ 、 0.01)。菟丝子醇提取物低、中、高剂量组抑瘤率分别为 24.58%、40.88%、51.42%。

3.2.4 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠脏器指数的影响 如图 11 所示,与对照组比较,模型组小鼠胸腺指数明显下降($P<0.01$),脾脏指数明显升高($P<0.01$);与模型组比较,CTX 组小鼠胸腺指数明显降低($P<0.01$),菟丝子醇提取物中、高剂量组胸腺指数显著升高($P<0.05$ 、 0.01),各给药组小鼠脾脏指数均显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。

3.2.5 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠瘤组织病理变化的影响 如图 12 所示,模型组小鼠肿瘤细胞形状不

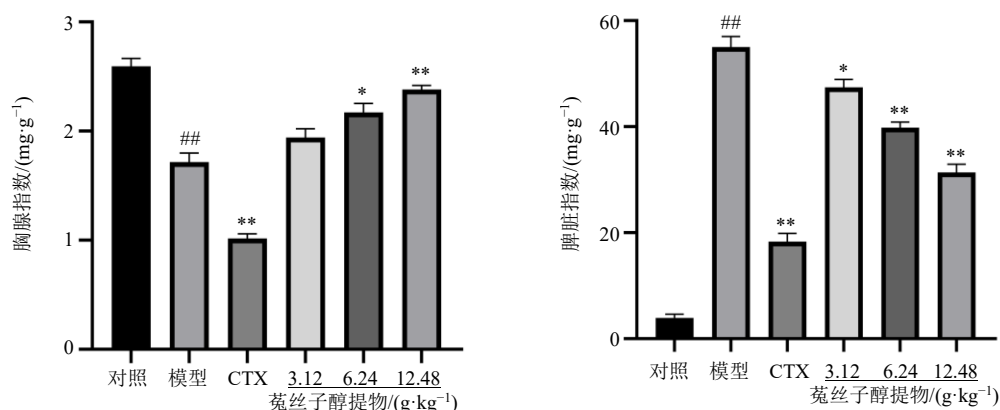


图 11 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 11 Effect of alcohol extract of *C. chinensis* on organ index in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

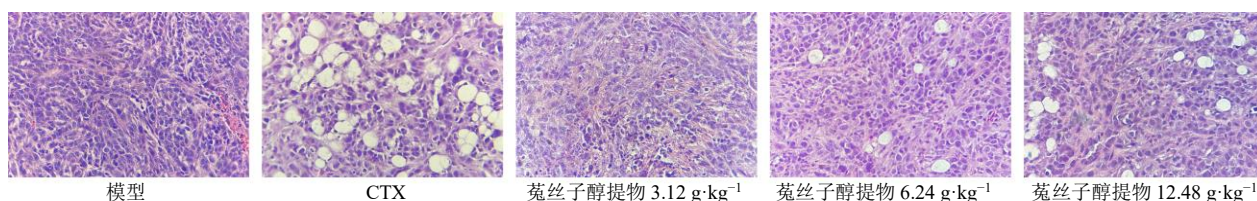


图 12 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤组织病理学变化的影响 (HE, ×20)

Fig. 12 Effect of alcohol extract of *C. chinensis* on histopathological changes of tumor tissue in tumor-bearing mice (HE, ×20)

规则，排列紧密，边界清晰，结构完整，细胞核大，呈蓝紫色；菟丝子醇提取物各给药组肿瘤细胞边界模糊，胞质疏松淡染，细胞核呈溶解现象，菟丝子醇提取物中、高剂量组可见部分坏死区域。

3.2.6 菟丝子醇提取物对荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响 如图 13 所示，与模型组比较，CTX 组和菟丝子醇提取物中、高剂量组小鼠肿瘤组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；各给药组 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，Bax/Bcl-2 值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

乳腺癌居女性癌症发病率首位，严重影响了女性的身心健康，且患者逐步呈年轻化趋势^[3]。目前治疗乳腺癌主要以手术、药物化疗、放射治疗、分子靶向、内分泌治疗以及一些新辅助治疗等综合治疗方法为主，但这些治疗方法常伴有恶心、呕吐、脱发、记忆力下降、认知功能障碍等严重不良反应，患者在承受癌症带来的痛苦时还要忍受不良反应带来的不适^[23-24]。目前，中药凭借多成分、多靶点、不良反应小的优势，已成为肿瘤治疗过程中新的发

展方向。菟丝子作为我国传统的种子类药材，具有拟雌激素作用、防止骨质疏松、调节免疫、抗衰老、抗肿瘤等药理作用，但其抗乳腺癌的作用机制尚不完全明确^[18,25-26]。因此本研究采用网络药理学探究菟丝子醇提取物抗乳腺癌的作用机制并结合分子对接和体内动物实验进行验证，为后期研究提供理论及实验参考。

网络药理学是药物研发的新策略，通过识别目标、疾病和药物之间的关联，从整体角度揭示结果^[27-29]。本研究采用网络药理学，发现菟丝子醇提取物共有槲皮素、山柰酚、异鼠李素、芹菜素、对氨基苯甲酸等 17 个活性成分，PPI 网络分析后发现菟丝子醇提取物发挥抗乳腺癌作用的关键靶点有 AKT1、ESR1、EGFR、TP53、ALB、VEGFA 等，涉及 672 个生物过程、164 条信号通路，分子对接结果显示菟丝子醇提取物中 7 种活性成分与 9 个关键靶点均具有较好的结合能力。KEGG 通路富集结果表明癌症通路富集程度最高，相关靶点数 55 个；PI3K/Akt 信号通路次之，相关靶点数 34 个，可见菟丝子发挥抗乳腺癌的作用是通过多靶点、多通路实现的。癌症通路是一个庞大的网络，含有多条信号通路，如 PI3K/Akt、MAPK、Janus 激酶/信号转

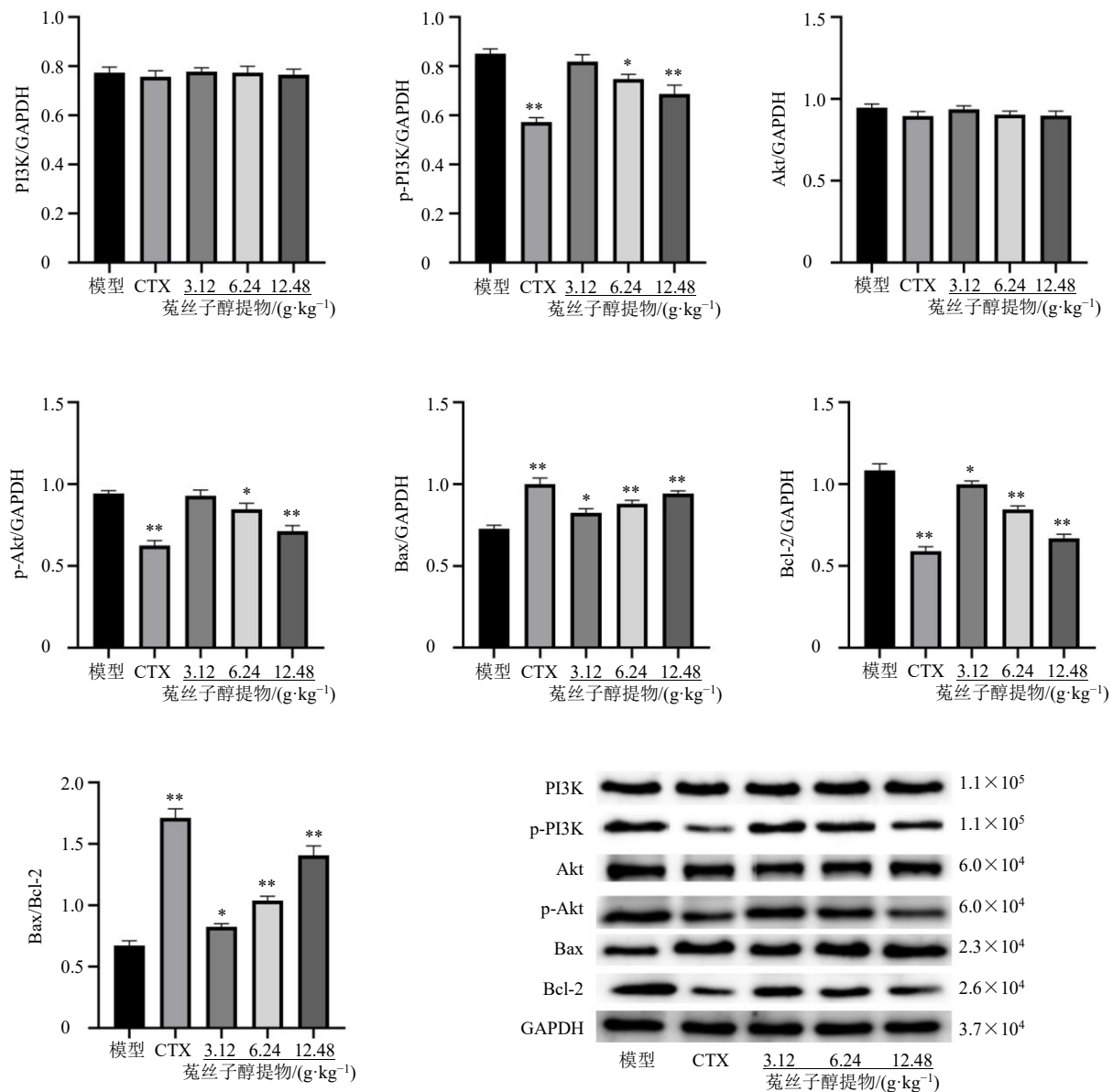


图 13 各组小鼠瘤组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2、Bax/Bcl-2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2 protein expressions in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

导与转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 等信号通路, 结合 PI3K/Akt 信号通路的富集程度及相关靶点, 本研究重点考察此通路中蛋白表达情况, 以期明确其调控机制。在后续研究中, 还将陆续考察 MAPK 等信号通路的调控情况及各通路中的交联“串话”。

本研究建立 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型, 连续 ig 给药 14 d, 与模型组比较, 菟丝子醇提取物高剂量组小鼠体质量明显增加; 随着接种时间的延长, 菟丝子醇提取物给药组均能显著降低小鼠体内肿瘤细胞光

子数和瘤质量。其中, 菟丝子醇提取物高剂量组抑瘤率为 51.42%, 同时瘤组织可见部分坏死区域, 细胞核呈溶解现象。胸腺和脾脏是重要的免疫器官, 参与了机体的细胞免疫和体液免疫, 一般情况, 癌症患者的胸腺指数和脾脏指数均会降低, 免疫功能下降, 本研究结果显示模型组小鼠胸腺指数小于对照组, 而脾脏指数远大于对照组, 可能由于机体肿瘤引起的脾脏过度增大; 菟丝子醇提取物组均能升高小鼠的胸腺指数, 降低其脾脏指数, 其中菟丝子醇提取物高剂量组效果最好, 以上结果表明菟丝子醇提取物

能够抑制小鼠体内肿瘤的生长。

PI3K/Akt 通路是一条与细胞凋亡、增殖密切相关的信号生存通路,现代研究表明,PI3K/Akt 信号通路与多种肿瘤的形成联系密切^[30]。PI3K 作为一种重要的细胞信号转导分子,可被细胞外多种信号刺激(如生长因子、细胞因子、激素等)而激活,进而催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2)产生磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3)。PIP3 作为细胞内的第二信使可结合并活化 PI3K 下游的多种信号蛋白如 Akt, Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K 控制细胞增殖、分化、凋亡的主要下游靶点,激活的 Akt 是重要的抗凋亡调节因子,可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白如 Bcl-2 蛋白家族、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cystein-aspartate protease, Caspase)家族等凋亡相关蛋白。细胞凋亡是一个极其复杂的、精确调控的、蛋白酶依赖的分子级联反应过程。目前,存在 2 种主要的细胞凋亡途径,包括外源性(死亡受体介导凋亡)信号通路、内源性(细胞线粒体介导凋亡)信号通路^[31-32]。其中,细胞线粒体凋亡信号通路主要通过调节 Bcl-2 蛋白家族来发挥功能,其主要机制是控制线粒体膜的通透性,以此来调节线粒体细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 的释放; Bcl-2 家族中促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白的相对平衡是细胞内稳态的重要决定因素,因此, Bax/Bcl-2 的高比例常被认为是促进细胞凋亡发生的重要条件。Western blotting 结果显示菟丝子醇提取物显著下调小鼠瘤组织内 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 表达,升高 Bax/Bcl-2 值。动物实验结果与网络药理学预测结果一致,表明菟丝子醇提取物发挥抗乳腺癌的作用机制可能是通过 PI3K/Akt 信号通路调控下游相关凋亡蛋白,参与乳腺癌细胞的线粒体凋亡途径,促进细胞凋亡。

本研究采用网络药理学、分子对接技术和动物实验明确菟丝子醇提取物抗乳腺癌的药效物质基础、潜在作用靶点及通路,为菟丝子临床治疗乳腺癌提供理论依据,为天然中药的开发以及抗肿瘤新药的研发奠定一定的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview [J]. *Int J Cancer*,

2021, 149(4): 778-789.

- [2] 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.
- [3] Guedes T S R, Dantas de Oliveira N P, Holanda A M, et al. Body image of women submitted to breast cancer treatment [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(6): 1487-1493.
- [4] Ben-Dror J, Shalamov M, Sonnenblick A. The history of early breast cancer treatment [J]. *Genes*, 2022, 13(6): 960.
- [5] Rossi L, Mazzara C, Pagani O. Diagnosis and treatment of breast cancer in young women [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2019, 20(12): 86.
- [6] Fisusi F A, Akala E O. Drug combinations in breast cancer therapy [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2019, 7(1): 3-23.
- [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] 孟丽, 王轶蓉. 浅析中医从肝肾论治早发性卵巢功能不全 [J]. *中医临床研究*, 2023, 15(16): 27-32.
- [10] 仇雯丽, 杨凤莲. 治疗少弱精子症常用中药分子机制研究新进展 [J]. *医学理论与实践*, 2021, 34(20): 3529-3531.
- [11] 方雨婷. 加味安胎方治疗肾虚血瘀型复发性流产的临床疗效观察 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [12] 管群, 吕圭源, 俞静静, 等. 不同产地菟丝子总黄酮及金丝桃苷的含量测定 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(2): 184-186.
- [13] 和映玉, 邓清月, 李仙仙, 等. 基于 VOSviewer 和 CiteSpace 的菟丝子知识图谱可视化分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 4958-4972.
- [14] 蔡杏栗, 林罡, 李大建, 等. 基于文献计量学的菟丝子研究现状及热点分析 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2024, 22(4): 82-86.
- [15] 王尧尧, 王蕾, 戚莹雪, 等. 菟丝子药材化学成分研究进展 [J]. *山东中医药大学学报*, 2020, 44(6): 705-712.
- [16] 张颖. 菟丝子不同炮制品化学成分和补肾阳作用的比较研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [17] 姚广大. 菟丝子中抗抑郁有效成分发现及其作用机制研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2022.
- [18] 王莹, 张婧如, 田伟, 等. 菟丝子及其提取物药理机制研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(11):

- 1961-1964.
- [19] 黄明珠, 王景龙, 崔晓萍, 等. 菟丝子的药理作用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42(5): 101-104.
- [20] 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.
- [21] 王靖雅, 孙向明, 宋辉, 等. 基于 HPLC-Q/TOFMS/MS 技术的菟丝子醇提物的大鼠体内成分分析 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3770-3775.
- [22] 孙向明, 宋辉, 阎新佳, 等. 菟丝子雌激素样作用质量标志物的筛选及含量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2671-2679.
- [23] Chang J S, Chang J H, Kim N, *et al.* Intensity modulated radiotherapy and volumetric modulated arc therapy in the treatment of breast cancer: An updated review [J]. *J Breast Cancer*, 2022, 25(5): 349-365.
- [24] 潘晓晓, 陈梦鸽, 陈雯. 乳腺癌化疗期间不良反应的影响因素及中医干预措施分析 [J]. 中国妇幼保健, 2024, 39(7): 1284-1287.
- [25] Xu D, Lu M, Liu Y, *et al.* An analysis of the clinical medication rules of traditional Chinese medicine for polycystic ovary syndrome based on data mining [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 6198001.
- [26] 李明奇, 赵晓璐, 高晓阳, 等. 植物药总黄酮的药理作用机制及应用进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(1): 200-204.
- [27] Wu J S, Zhang F Q, Li Z Z, *et al.* Integration strategy of network pharmacology in traditional Chinese medicine: A narrative review [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(3): 479-486.
- [28] Zhang P, Zhang D F, Zhou W A, *et al.* Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25(1): bbad518.
- [29] Shang L R, Wang Y C, Li J X, *et al.* Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302(Pt A): 115876.
- [30] Zhang Z, Yao L, Yang J H, *et al.* PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3547-3554.
- [31] Wang L, Gao X, Tang X J, *et al.* SENP1 protects cisplatin-induced AKI by attenuating apoptosis through regulation of HIF-1 α [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 419(1): 113281.
- [32] 熊致立, 王瑞, 朱晓云, 等. 黄连解毒汤对脂多糖诱导的小鼠急性肾损伤治疗作用及机制 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 853-860.

[责任编辑 李亚楠]