

## 基于网络药理学及实验验证探讨山慈菇-漏芦药对 治疗乳腺癌作用机制

王冰<sup>1</sup>, 王玥<sup>1</sup>, 朱仲康<sup>1</sup>, 崔勇<sup>1</sup>, 于嵩<sup>2</sup>, 刘海兴<sup>1</sup>, 王旭<sup>1\*</sup>  
(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 沈阳体育学院, 沈阳 110115)

**[摘要]** 目的:应用网络药理学研究方法筛选山慈菇-漏芦药对治疗乳腺癌的作用靶点及相关信号通路,通过体外实验明确其作用机制。方法:通过运用中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库检索获取山慈菇-漏芦的主要化学成分及相关作用靶点;使用GeneCards筛选乳腺癌疾病的相关靶标基因;通过Venn软件筛选出药物与疾病的共同作用靶点;构建出药物-疾病的靶点网络,蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建;通过基因本体(GO)富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集对有效作用靶点进行分析;通过细胞增殖与活性检测(CCK-8)实验、流式细胞术检测细胞凋亡实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)实验进行进一步的实验验证。结果:通过筛选得到山慈菇-漏芦有效化学成分7个,有效作用靶点61个,其中作用于乳腺癌的相关靶点55个。通过GO富集分析共富集到条目832个,在生物学过程方面集中体现。KEGG通路富集分析共富集到85个条目,包括肿瘤抑制基因信号通路p53,血管内皮生长因子(VEGF)信号通路,人表皮生长因子受体(EGFR)信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路等。通过体外实验验证了山慈菇-漏芦醇提取物可抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖,并诱导细胞的凋亡,与空白组,二甲亚砜(DMSO)组(0.1%溶剂组)相比较,给药组MDA-MB-231细胞吸光度显著降低( $P<0.01$ ),凋亡率显著增高( $P<0.01$ ),Western blot实验结果表明,与空白组和DMSO组相比较,各给药组细胞中磷酸化(p)-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt比值均明显降低( $P<0.05$ )。结论:山慈菇-漏芦醇提取物能有效抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖,并可以诱导其凋亡,作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路活化相关。

**[关键词]** 山慈菇;漏芦;网络药理学;乳腺癌;作用机制;药对

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0065-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211518

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211103.1432.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-11-03 18:10

### Mechanism of Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix Against Breast Cancer: An Exploration Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

WANG Bing<sup>1</sup>, WANG Yue<sup>1</sup>, ZHU Zhong-kang<sup>1</sup>, CUI Yong<sup>1</sup>, YU Song<sup>2</sup>, LIU Hai-xing<sup>1</sup>, WANG Xu<sup>1\*</sup>  
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China;  
2. Shenyang Sports University, Shenyang 110105, China)

**[Abstract]** **Objective:** To screen out the main targets and related signaling pathways of the herbal pair Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix in treating breast cancer based on network pharmacology and verify their action mechanism in *in vitro* experiments. **Method:** The main chemical components and related targets of Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the target genes related to breast cancer from GeneCards. Following the screening of the common targets of Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix and breast cancer using Venn, the Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix-breast cancer network and protein-

**[收稿日期]** 20210706(004)

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金计划重点项目(20180540105)

**[第一作者]** 王冰,助教,从事中医药防治肿瘤的机制研究,E-mail:1210957124@qq.com

**[通信作者]** \*王旭,教授,从事中医药防治阿尔茨海默病的机制研究,E-mail:wangxu7879@126.com

protein interaction (PPI) network were constructed. The effective targets were then subjected to gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The resulting outcomes were then verified by cell counting kit (CCK)-8 assay, flow cytometry, and Western blot. **Result:** The screening yielded seven effective components and 61 targets of *Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix*, among which 55 targets were involved in breast cancer. The GO analysis revealed 832 entries, which were mainly enriched in the biological processes. According to KEGG pathway enrichment analysis, 85 signaling pathways were obtained, including tumor suppressor p53, vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt). It was verified in *in vitro* experiments that the alcohol extract of *Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix* inhibited the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells and induced their apoptosis. Compared with the blank control group and the dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1% solvent) group, the medication groups exhibited obviously decreased absorbance in MDA-MB-231 cells ( $P < 0.01$ ) and increased apoptosis rate ( $P < 0.01$ ). The results of Western blot demonstrated that compared with the blank control group and the DMSO group, each medication significantly reduced the phosphorylated (p)-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The ethanol extract of *Cremastrae Pseudobulbus-Rhapontici Radix* effectively inhibits the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells and induces their apoptosis, which may be related to the inhibition of the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

**[Keywords]** *Cremastrae Pseudobulbus*; *Rhapontici Radix*; network pharmacology; breast cancer; action mechanism; herbal pair

乳腺癌是女性发病率较高的恶性肿瘤之一, 有相关报告指出, 2018年全球女性乳腺癌的发病率为每10万人46.3人, 死亡率为每10万人13.0人, 近年来呈显著上升的趋势<sup>[1]</sup>。有相关研究指出<sup>[2]</sup>, 不同分子分型的乳腺癌中, 与非三阴型乳腺癌相比较, 其中三阴型乳腺癌的复发及内脏的转移率均较高, 生存率较低, 预后较差, 是影响患者预后的独立危险因素。对于此类型乳腺癌的治疗, 采用化疗易发生耐药, 而且缺少内分泌治疗靶点<sup>[3]</sup>。近年来, 有研究表示<sup>[4]</sup>, 中医药治疗乳腺癌也取得了明显的效果, 越来越多的患者都在逐步积极接受中医药的治疗。有实验研究发现, 山慈菇和漏芦两药均有通过影响细胞增殖、凋亡以及细胞侵袭等多个方面来达到抗乳腺癌的作用<sup>[5-7]</sup>。李秀荣教授在治疗乳腺癌药对经验总结中提到, 山慈菇、漏芦两药配伍具有明显清热解毒、散结抗癌的功效, 并提出两药配伍在临床上有显著抗乳腺癌的功效<sup>[8]</sup>。在临床应用中, 散结类药物在抗乳腺癌方面效果显著, 比如临床常用制剂乳核散结片, 该制剂中的主要药味山慈菇、漏芦被广泛应用在抗乳腺癌治疗的方剂配伍当中, 并有显著的效果。但目前对两药联合作用且从细胞和分子水平来系统地阐述其抗乳腺癌作用机制的研究较少, 本研究通过网络药理学研究方法筛选出山慈菇-漏芦药对的有效成分, 进一步构建药物-

疾病靶点的网络图, 并探讨山慈菇-漏芦药对对抗乳腺癌的相关作用机制。

## 1 资料与方法

**1.1 药物关键化合物的筛选** 运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索出山慈菇、漏芦的主要有效化学成分, 再对两药的化学成分进行口服利用度(OB)及类药性(DL)筛选, 设置筛选条件为 $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 18\%$ 。

**1.2 山慈菇、漏芦化合物关键靶点及乳腺癌靶点的筛选** 利用TCMSP检索山慈菇、漏芦化合物的关键作用靶标基因, 利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)检索出靶标基因对应人类基因的名称。乳腺癌相关疾病的靶标基因通过GeenCards数据库检索获得。

**1.3 构建药物-疾病靶点网络及可视化分析** 利用Venn在线软件选取药物与疾病的共同靶点, 并绘制Venn图, 利用Cytoscape 3.7.2软件进行可视化分析。

**1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建** 将筛选得到的药物-疾病共同靶点基因导入STRING数据库, 得到PPI网络, 进一步筛选出靶点基因。

**1.5 基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 将山慈菇-漏芦的靶蛋白上传到DAVID 6.8数据库, 通过分析了解山慈菇-漏芦药对的有效成分对于乳腺癌的GO功

能,进行KEGG通路分析找到相关靶标在通路中的分布情况,直接观察到山慈菇-漏芦药对作用于乳腺癌的主要机制途径。

## 2 实验验证

**2.1 材料** 人乳腺癌MDA-MB-231细胞株购于中国科学院上海细胞库。

山慈菇、漏芦饮片[天马(安徽)国药科技股份有限公司];胎牛血清(Clark公司,批号FB15015);胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA, Invitrogen公司,批号25200056);DMEM培养液(Hyclone公司,批号SH30022.01B);细胞增殖与活性检测(CCK)-8试剂盒(Solution Vazyme公司,批号A311-01);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D2650);Annexin V-FITC/PI型细胞凋亡检测试剂盒(美国Everbright Inc公司,批号40302ES20);BCA法蛋白定量试剂盒(碧云天生物科技公司,批号P0012);兔抗人磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),磷酸化(p)-PI3K,蛋白激酶B(Akt),p-Akt(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为ABP50495,ABP59902,4691S,4060S)。

AVC-4D1型超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司);HERAcell 150i型高温灭菌二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);ELX-800型酶标仪(美国BioTek公司);ARIA III型流式细胞仪(美国BD公司);WD-9413B凝胶成像分析系统(北京六一制造厂);DYY-7C型蛋白电泳仪(北京六一制造厂)。

## 2.2 方法

**2.2.1 山慈菇-漏芦醇提取物制备** 称取山慈菇12 g,漏芦30 g,粉碎机粉碎,加75%乙醇500 mL,回流提取3次,均在沸后提取1.5 h左右,合并3次提取液,采用旋转蒸发器将提取液浓缩成浸膏状,置于烘箱中60℃烘干至粉末状,置于4℃冰箱备用。实验开始前,首先将药物用DMSO进行溶解并震荡,配置成含生药质量浓度为10 g·L<sup>-1</sup>的母液,DMEM培养基稀释为工作液,0.22 μm滤膜除菌,备用。

**2.2.2 MDA-MB-231细胞培养** 将人乳腺癌MDA-MB-231细胞株置于37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中,并使用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素和链霉素)培养细胞,平均1~2 d进行1次换液,并取对数生长期细胞进行实验。

**2.2.3 CCK-8法检测细胞活性** 取对数生长期的人乳腺癌MDA-MB-231细胞消化,接种于96孔板,平均细胞数为8×10<sup>3</sup>个/孔,设定实验分组,分别为空白组,DMSO组,低剂量组(10 mg·L<sup>-1</sup>),中剂量组(25 mg·L<sup>-1</sup>),高剂量组(50 mg·L<sup>-1</sup>),将低、中、高剂

量组的山慈菇-漏芦醇提取物作用MDA-MB-231细胞24 h,将培养液吸出后加入含10% CCK-8的培养基,2 h后(避光孵育),使用酶标仪在450 nm波长处检测各组吸光度A并计算,细胞活性=(A<sub>加药细胞</sub>-A<sub>空白</sub>)/(A<sub>DMSO</sub>-A<sub>空白</sub>)×100%。

**2.2.4 流式细胞仪检测细胞的凋亡率** 取对数生长期的人乳腺癌MDA-MB-231细胞消化,接种于6孔板中,细胞数目约1×10<sup>5</sup>个/孔,设定实验分组,分别为空白组,DMSO组,低、中、高剂量组,将低、中、高剂量组山慈菇-漏芦醇提取物作用MDA-MB-231细胞24 h,收集细胞后,每组加入的Binding-Buffer悬浮液500 μL,依次加入Annexin V-FITC 5 μL,Propidium Iodide 5 μL进行混匀,染色15 min(室温避光),于1 h内通过流式细胞仪检测,并分析细胞的凋亡率情况。

**2.2.5 应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K,p-PI3K,Akt,P-Akt蛋白的表达情况** 取对数生长期的人乳腺癌MDA-MB-231细胞消化,接种在10.0 mm直径的培养皿中,每皿中平均细胞数量为2×10<sup>6</sup>个,设定实验分组,分别为空白组,DMSO组,低、中、高剂量组,将低、中、高剂量山慈菇-漏芦醇提取物作用MDA-MB-231细胞24 h后收集细胞,加上RIPA裂解液裂解细胞(冰上操作),离心,收集蛋白进行蛋白浓度测定;取等量总蛋白上样进行15% SDS-PAGE,电泳条件为缓冲胶110 V电泳30 min,分离胶55 V电泳60 min,转膜条件为PVDF膜55 mA恒流湿转120 min,封闭60 min,PI3K,p-PI3K,Akt,p-Akt一抗4℃过夜孵育,次日滴加二抗避光室温孵育1 h后TBST洗膜,ECL发光后进行图像采集及数据分析。

**2.3 统计学方法** 以上实验重复3次,数据采用SPSS 22.0进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 山慈菇-漏芦药物有效化学成分** 本研究基于OB≥30%,DL≥0.18为筛选条件,从TCMSP数据库中共获取7个有效化学成分,山慈菇3个,漏芦为5个,其中β-谷甾醇在两药中均含有。见表1。

**3.2 药物与乳腺癌相关靶点** 利用GeneCards数据库筛选获得乳腺癌相关靶共14 630个,将山慈菇-漏芦的活性化合物对应的61个药物靶点与乳腺癌对应的14 630个疾病靶点获取交集,通过Venn图的形式得到55个共同靶点。

**3.3 “药物-疾病”靶点网络构建与分析** 将7个有

表1 山慈菇-漏芦有效化学成分

Table 1 Effective chemical ingredients of *Pseudobulbus Cremastrae-Rhapontici Radix*

分子ID	化合物名称	OB/%	DL	来源
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	山慈菇
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	山慈菇
MOL007991	2-methoxy-9, 10-dihydrophenanthrene-4, 5-diol	44.97	0.18	山慈菇
MOL001792	甘草素	32.76	0.18	漏芦
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	漏芦
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	漏芦
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	漏芦
MOL007939	diosbulbin B	43.01	0.70	漏芦

效成分及55个共同靶点通过Cytoscape 3.7.2软件构建山慈菇-漏芦“药物-疾病”的可视化网络图。

3.4 药物与乳腺癌靶蛋白PPI网络的构建 从Venn图中获得55个药物-疾病共同靶点上传至STRING数据库进一步得到PPI网络。

表2 山慈菇-漏芦药对抗乳腺癌的关键通路

Table 2 Key pathway of *Pseudobulbus Cremastrae-Rhapontici Radix* against breast cancer

通路	基因数/个	P
hsa05161:Hepatitis B	10	4.88×10 <sup>-8</sup>
hsa04915:Estrogen signaling pathway	9	1.54×10 <sup>-7</sup>
hsa05022:Pathways of neurodegeneration-multiple diseases	14	8.13×10 <sup>-7</sup>
hsa04215:Apoptosis-multiple species	5	1.43×10 <sup>-6</sup>
hsa04020:Calcium signaling pathway	10	1.89×10 <sup>-6</sup>
hsa04115:p53 signaling pathway	6	5.68×10 <sup>-6</sup>
hsa05169:Epstein-Barr virus infection	9	6.72×10 <sup>-5</sup>
hsa04080:Neuroactive ligand-receptor interaction	11	6.55×10 <sup>-6</sup>
hsa04370:VEGF signaling pathway	5	3.13×10 <sup>-5</sup>
hsa05224:Breast cancer	7	3.33×10 <sup>-5</sup>
hsa01521:EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	5	1.30×10 <sup>-4</sup>
hsa04151:PI3K/Akt signaling pathway	9	3.10×10 <sup>-4</sup>
hsa05163:Human cytomegalovirus infection	8	7.10×10 <sup>-5</sup>
hsa05170:Human immunodeficiency virus 1 infection	8	4.66×10 <sup>-5</sup>
hsa05161:Hepatitis B	10	4.88×10 <sup>-8</sup>
hsa05222:Small cell lung cancer	8	8.67×10 <sup>-8</sup>
hsa04657:IL-17 signaling pathway	7	1.72×10 <sup>-6</sup>
hsa04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	8	3.72×10 <sup>-6</sup>
hsa05031:Amphetamine addiction	6	4.08×10 <sup>-6</sup>
hsa04726:Serotonergic synapse	7	6.68×10 <sup>-6</sup>
hsa04919:Thyroid hormone signaling pathway	7	9.35×10 <sup>-6</sup>

### 3.5 山慈菇-漏芦治疗乳腺癌的通路富集分析

3.5.1 GO通路富集分析 通过GO功能富集分析共获得832个条目,其中山慈菇-漏芦治疗乳腺癌的关键靶点基因信息功能主要涉及的生物过程有细胞对药物的反应(cellular response to drug),膜电位的调节(regulation of membrane potential),对类固醇激素的反应(response to steroid hormone),腺苷酸环化酶调节G蛋白偶联受体信号通路(adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway)等。

3.5.2 KEGG通路富集分析 通过分析共富集到KEGG通路85条,筛选功能排名前21名条目,山慈菇-漏芦治疗乳腺癌的关键基因靶点所涉及到的信号通路主要有雌激素信号通路,p53信号通路,血管内皮生长因子(VEGF)信号通路,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,人表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药通路,钙信号通路,乳腺癌等经典信号通路,见表2。

**3.5.3 山慈菇-漏芦醇提取物影响人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡情况** 流式细胞仪检测结果显示,山慈菇-漏芦醇提取物作用MDA-MB-231

细胞24 h后,与空白组,DMSO组比较,低、中、高剂量组的细胞凋亡率均显著升高( $P<0.01$ )。见表3。

表3 山慈菇-漏芦醇提取物对人乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of alcohol extract of *Pseudobulbus Cremastrae-Rhapontici Radix* on the apoptosis rate of human breast cancer MDA-MB-231 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白		3.35±1.18	0.77±0.15	4.12±1.29
DMSO		4.20±0.57	0.81±0.15	5.01±0.71
提取物	10	12.52±0.27	1.67±0.24	15.77±0.39 <sup>1,2)</sup>
	25	17.94±1.62	6.04±0.44	23.98±1.84 <sup>1,2)</sup>
	50	19.81±1.87	2.20±0.78	22.02±1.19 <sup>1,2)</sup>

**3.5.4 山慈菇-漏芦醇提取物影响人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖情况** 与空白组,DMSO组细胞相比,低、中、高剂量的山慈菇-漏芦醇提取物作用于乳腺癌MDA-MB-231细胞24 h后,3组细胞活性显著降低( $P<0.01$ ),见表4。

表4 山慈菇-漏芦醇提取物对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Inhibitory rate of alcohol extract of *Pseudobulbus Cremastrae-Rhapontici Radix* on human breast cancer MDA-MB-231 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h抑制率/%
空白		0.00±0.00
DMSO		0.17±0.02
提取物	10	0.27±0.06 <sup>1,2)</sup>
	25	0.54±0.17 <sup>1,2)</sup>
	50	0.88±0.01 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ,与DMSO组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表4同)。

**3.5.5 山慈菇-漏芦醇提取物对各组细胞中p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt比值的影响** Western blot实验的结果发现,山慈菇-漏芦醇提取物在作用MDA-MB-231细胞24 h后,通过与空白组,DMSO组比较,低、中、高剂量组细胞中的p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt的比值均显著降低均明显降低( $P<0.05$ )。见表5,图1。

#### 4 讨论

我国女性恶性肿瘤当中发病率最高的是乳腺癌,并且患者的死亡率也是逐年增加<sup>[9]</sup>。而在乳腺癌的分型当中,三阴性乳腺癌的死亡率占比最高,并且易复发转移,在临床治疗中也是最棘手的,激素以及靶向治疗对三阴性乳腺癌的效果均不显著,几乎只能通过化疗进行诊治<sup>[10]</sup>。此外,中医认为痰

表5 各组细胞p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt比值( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Ratio of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt of each group of cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
空白		100	100
DMSO		94.5±9.2	91.3±8.9
提取物	10	42.3±5.3 <sup>1,2)</sup>	59.6±4.2 <sup>1,2)</sup>
	25	35.9±7.8 <sup>1,2)</sup>	48.7±6.3 <sup>1,2)</sup>
	50	49.2±11.2 <sup>1,2)</sup>	57.3±9.8 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,与DMSO组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ 与。

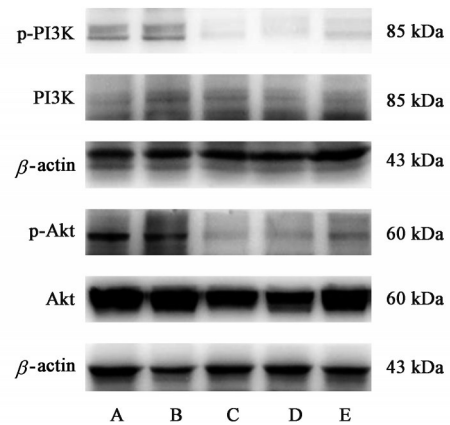


图1 各组细胞p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt表达

Fig. 1 Ratio of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt of each group of cells

浊、热毒等病理产物进行相互搏结而产生“癌毒”之邪,其可能是此类型乳腺癌的病因之一,可以采用清解癌毒、通络化痰散结的治疗方法进行治疗。

有研究表明山慈菇、漏芦治疗乳腺癌可以取得很好的疗效<sup>[11]</sup>,山慈菇性甘、凉、微辛,归肝、脾经,具有清热解毒,消痈散结之功,有实验研究表明<sup>[12-13]</sup>,山慈菇提取液可以明显抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖,还诱导其细胞的凋亡,作用机制可能是抑制了PI3K/Akt信号通路的活化;山慈菇

水煎剂也可以明显抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖,诱导癌细胞的凋亡,抑制癌细胞的迁移。漏芦苦寒,归胃经,有清热解毒、消痈散结、通经下乳、舒筋通脉的功效,有研究发现<sup>[14]</sup>,大剂量的漏芦提取物可以发挥显著的抑癌作用。因此两药配伍,具有明显的清热解毒、散结抗癌之功,是治疗乳岩的要药。

本研究结果发现,山慈菇、漏芦治疗乳腺癌中的有效化学成分主要有 $\beta$ -谷甾醇,豆甾醇,2-甲氧基-9,10-二氢菲-4,5-二醇,甘草素,谷甾醇,甘草苷和地黄素B。有研究报道显示<sup>[15-16]</sup>, $\beta$ -谷甾醇对肺癌、乳腺癌等有显著作用,可以通过多种途径发挥作用,比如细胞增殖、凋亡、周期、侵袭血管生成等。豆甾醇是一种生物活性高的天然提取物,生理功能较多,可以从抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡、阻滞肿瘤细胞周期、破坏肿瘤血管生成、抑制癌细胞转移等多种途径发挥对肝癌、胃癌、胆管癌的抑癌作用<sup>[17-19]</sup>。研究结果显示了山慈菇、漏芦两药中含有的相同或不同的化合物均具有显著的抑癌作用,因此两药联合应用可以得到更加显著的抑癌效果。

通过PPI蛋白互作结果可以看出,经筛选得到的主要靶点有GSK3B,ESR1,CASP8及MAPK14等。ESR1(estrogen receptor 1)为编码ER $\alpha$ 的基因,该基因若出现突变,常会导致乳腺癌内分泌治疗的耐药,因此对该基因的监测对乳腺癌治疗以及预后会发挥很大的作用<sup>[20]</sup>。GSK3B(glycogen synthase kinase-3 beta)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以通过作用信号蛋白结构蛋白以及转录因子来调控细胞的增殖、分化以及凋亡等。有研究发表表明<sup>[21]</sup>,GSK3B的表达情况影响着胃癌预后的情况。半胱氨酸蛋白酶CASP8是一种促凋亡蛋白,参与外源性凋亡信号通路,因此,其作为一种抑癌基因,参与了诸多肿瘤的发病过程,比如肝癌<sup>[22-23]</sup>、前列腺癌<sup>[24]</sup>等。MAPK14作为MAPK亚家族成员之一,通过影响肿瘤细胞的凋亡与周期等生物学特性来影响肿瘤的发生发展,CHEN等<sup>[25]</sup>研究表明通过MAPK14来抑制肿瘤血管生成和肿瘤细胞的转移。由此可见,以上基因都参与着肿瘤的发生发展过程,并影响肿瘤的预后。

本研究通过GO富集分析结果发现,山慈菇-漏芦抗乳腺癌的靶基因主要是通过影响细胞对药物的反应、膜电位的调节、对类固醇激素的反应、腺苷酸环化酶调节G蛋白偶联受体信号通路等生物学功能而达到抗乳腺癌的目的。在本研究KEGG富

集分析的结果中发现,山慈菇-漏芦主要是通过雌激素信号通路,p53信号通路,PI3K/Akt信号通路等发挥抗乳腺癌的作用。雌激素信号通路可以与一些蛋白相互作用,可能会同TGF- $\beta$ ,MAPK,Akt,NF- $\kappa$ B等信号传导途径交互,最终对乳腺肿瘤细胞的增殖、转移等具有影响<sup>[26]</sup>。p53是一种抑癌基因,当细胞癌变时,上游功能的相关基因来抑制体内p53的表达,进而抑制细胞周期阻滞以及凋亡。在恶性肿瘤的发生发展中,PI3K/Akt信号通路发挥着重要作用,有研究结果发现PI3K/Akt信号通路对恶性肿瘤的侵袭和转移等方面具有重要调控作用<sup>[27-28]</sup>,本研究选择此信号通路进行实验验证,发现山慈菇-漏芦醇提取物可能是通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖起到抑制作用并促进其细胞的凋亡。

本研究最后对网络药理学所分析的结果进行了体外实验验证,通过山慈菇-漏芦醇提取物对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖、凋亡以及对PI3K/Akt信号通路的调控作用进行实验研究。实验结果发现山慈菇-漏芦醇提取物可以对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖有抑制作用,并且可以诱导人乳腺癌MDA-MB-231细胞的凋亡,通过抑制PI3K/Akt信号通路活化进而控制乳腺癌发展。

综上所述,山慈菇-漏芦对乳腺癌细胞的抑制效果有显著优势,本实验基于网络药理学的研究,发现山慈菇-漏芦对乳腺癌的部分作用靶点及具体作用机制,为中医药抗乳腺癌多靶点、多途径及作用机制相关的研究提供了方法学借鉴,并为治疗乳腺癌的临床研究提供了理论支持和研究思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 马吉光,王宁菊,于文洁,等. “三阴”型与非“三阴”型乳腺癌患者的生物学行为差异性分析[J]. 南方医科大学学报,2011,31(10):1729-1732.
- [3] HUANG T, LIU H. Drug therapy for triple negative breast cancer [J]. J Breast Dis (Electronic Edition), 2019, 13(4):252-256.
- [4] 王鹏波,代云云,董涵,等. 中医药干预乳腺癌治疗的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(7):

- 235-243.
- [ 5 ] LIU Y, ZHANG Z Y, MA L J. Research progress on anti-breast cancer mechanism of *Iphigenia indica* [J]. *Drug Clin*, 2019, 34(3):863-866.
- [ 6 ] 梁聪, 李媛媛, 莫凡露, 等. 复方山慈菇醇提物对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(4):690-694.
- [ 7 ] 曹芳, 李秀荣. 漏芦抽提剂对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 的耐药逆转作用研究 [J]. *山东中医杂志*, 2009, 28(6):415-417.
- [ 8 ] 王宇, 曾辉, 李慧洁, 等. 李秀荣治疗乳腺癌药对经验总结及验案举隅 [J]. *中国中西医结合影像学杂志*, 2021, 19(1):34-36.
- [ 9 ] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115.
- [ 10 ] 李清平, 王心强. 三阴性和非三阴性乳腺癌的临床病理特征及无瘤生存率对比 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2017, 21(3):342-343.
- [ 11 ] 陈思, 荆晓静. 山慈菇含药血清对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖、凋亡以及迁徙能力影响的实验研究 [J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(4):75-78.
- [ 12 ] 兴伟, 刘远, 徐翌, 等. 山慈菇通过 PI3K/Akt 信号通路影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和凋亡 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(6):693-698, 706.
- [ 13 ] 牛晓雨, 王璐, 孙放. 山慈菇水煎剂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的影响 [J]. *中成药*, 2018, 40(1):197-200.
- [ 14 ] 焦中华, 刘培民, 李秀荣, 等. 漏芦抽提剂 (RHU) 含药血清对人乳腺癌耐药株 MCF-7/ADR 细胞 P170 蛋白表达的研究 [J]. *光明中医*, 2003, 18(5):17-19.
- [ 15 ] 陶仕英, 牛建昭, 王继峰, 等.  $\beta$ -谷甾醇对 T47D 细胞增殖和细胞周期的影响及作用机制探讨 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2015, 17(2):362-366.
- [ 16 ] BIN SAYEED M S, AMEEN S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(8):1214.
- [ 17 ] 李庆勇, 姜春菲, 张黎, 等.  $\beta$ -甾醇、豆甾醇诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(5):1173-1175.
- [ 18 ] KANGSAMAKSIN T, CHAITHONGYOT S, WOOTHICHAIRANGSAN C, et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  [J]. *PLoS One*, 2017, 12:e0189628.
- [ 19 ] LI K, YUAN D, YAN R, et al. Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway [J]. *J Buon*, 2018, 23:1420-1425.
- [ 20 ] MOELANS C B, MONSUUR H N, DE PINTH J H, et al. ESR1 amplification is rare in breast cancer and is associated with high grade and high proliferation: a multiplex ligation-dependent probe amplification study [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(5):489-494.
- [ 21 ] LUKAS B, RUPERT L, KAREN B, et al. Expression profiling of stem cell-Related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: a NOTCH2, GSK3B and catenin gene signature predicts survival [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):44-66.
- [ 22 ] 刘亚辉, 刘亚民, 谭岩, 等. 生存蛋白和半胱天冬酶-8 在肝癌中的表达及其临床意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(11):1065-1066.
- [ 23 ] CHO S, LEE J H, CHO S B, et al. Epigenetic methylation and expression of Caspase 8 and Survivin in hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Int*, 2010, 60(3):203-211.
- [ 24 ] XUE LY, REN LQ, LUO W, et al. Expression of Fas, Fas ligand, Fas-associated death domain protein caspase 8 and mutant P53 protein in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *National Med J China*, 2007, 87(3):150-154.
- [ 25 ] CHEN Y J, CHENG Y J, HUMG A C, et al. The synthetic flavonoid WYC02-9 inhibits cervical cancer cell migration/invasion and angiogenesis via MAPK14 signaling [J]. *Gynecologic Oncol*, 2013, 131(3):734-743.
- [ 26 ] 陈安安, 汪炬. 肿瘤中雌激素信号转导通路的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(3):570-576.
- [ 27 ] ZUO Z H, YU Y P, DING Y, et al. Oncogenic activity of miR-650 in prostate cancer is mediated by suppression of CSR1 expression [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(7):1991-1999.
- [ 28 ] WANG X, YANG L, HUANG F, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells [J]. *Immunol Lett*, 2017, 184(4):7-14.

[责任编辑 顾雪竹]