

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学及实验验证探析雷公藤治疗三阴性乳腺癌的分子机制

吴沁航*, 朱丽文, 陈子慧, 陶宇洋, 万朋, 潘扬, 冷雪娇
(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:利用网络药理学预测雷公藤治疗三阴性乳腺癌(TNBC)的有效成分、靶点及相关信号通路,体外细胞模型验证其分子机制。方法:通过中药系统药理数据库(TCMSP)筛选雷公藤活性成分;疾病相关基因与突变位点数据库(DisGeNET)和基因数据库(GeneCards)获取TNBC疾病靶点;Venny平台整合雷公藤治疗TNBC的潜在靶点;String数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;DAVID数据库进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;AutoDock Vina对雷公藤甲素与核心靶点进行分子对接;噻唑蓝(MTT)比色法检测雷公藤甲素(0、5、10、20、30、40、50、60、80 nmol·L⁻¹)对MDA-MB-231细胞的增殖抑制活性;Hoechst 33342染色法分析雷公藤甲素(0、12.5、25、50 nmol·L⁻¹)诱导MDA-MB-231细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测雷公藤甲素(0、25、50 nmol·L⁻¹)对关键靶点的表达调控。结果:预测结果显示雷公藤23个活性成分对应55个TNBC作用靶点,靶点共涉及生物过程103种,细胞组成15种,分子功能35种,参与脂质与动脉粥样硬化、细胞凋亡等细胞信号通路140条;雷公藤甲素与核心靶点蛋白激酶B1(Akt1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、细胞肿瘤抗原p53(p53)、转录因子AP-1(JUN)、信号转导及转录激活因子3(STAT3)、肿瘤坏死因子(TNF)、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、前列腺素G/H合成酶2(PTGS2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的对接结合活性较高;MTT比色法结果表明,与空白组比较,雷公藤甲素(20、30、40、50、60、80 nmol·L⁻¹)能明显抑制三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖($P<0.05$, $P<0.01$);Hoechst 33342染色结果显示,与空白组比较,雷公藤甲素(12.5、25、50 nmol·L⁻¹)MDA-MB-231细胞凋亡率升高($P<0.05$, $P<0.01$);Western blot实验表明,与空白组比较,雷公藤甲素(50 nmol·L⁻¹)作用后细胞中p-Akt、VEGFA和TNF- α 相对表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),雷公藤甲素(25、50 nmol·L⁻¹)组p53相对表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$),呈浓度依赖性。结论:雷公藤治疗TNBC具有多成分、多靶点、多通路的特点,其机制与调节p53、VEGFA、TNF- α 等靶点,进而诱导细胞凋亡、抑制血管生成及炎症反应等有关,为后续深入基础研究及临床应用提供了科学依据。

[关键词] 雷公藤; 三阴性乳腺癌; 网络药理学; 分子机制; 实验验证

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0131-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220625

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1459.006.html>

[网络出版日期] 2022-1-14 9:45

Mechanism of *Tripterygium wilfordii* in Treatment of Triple Negative Breast Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

WU Qin-hang*, ZHU Li-wen, CHEN Zi-hui, TAO Yu-yang, WAN Peng, PAN Yang, LENG Xue-jiao
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the active ingredients, therapeutic targets, and relative signaling pathways of *Tripterygium wilfordii* in the treatment of triple negative breast cancer (TNBC) based on network pharmacology, and to verify the mechanism through *in vitro* cell model. **Method:** The active ingredients of

[收稿日期] 2021-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82104451);高等学校博士学科点专项(20133237120011);南京中医药大学国自然青年基金经费配套项目(XPT82104451)

[通信作者] * 吴沁航,博士,讲师,从事中药抗肿瘤药理研究, E-mail: wuqinhang@njucm.edu.cn

T. wilfordii were screened from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The targets of TNBC were obtained from DisGeNET and GeneCards. Venny was used to identify the potential therapeutic targets of *T. wilfordii* against TNBC. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed with String database. Gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were carried out with DAVID to predict the mechanisms of potential targets. The molecular docking between triptolide and key targets were performed with AutoDock Vina. The effect of triptolide (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 nmol·L⁻¹) on the proliferation of MDA-MB-231 cells was determined through methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The effect of triptolide (0, 12.5, 25, 50 nmol·L⁻¹) on the apoptosis of MDA-MB-231 cells was detected with Hoechst 33342 staining. Western blot was performed to detect the effect of triptolide (0, 25, 50 nmol·L⁻¹) on the expression levels of key targets. **Result:** *T. wilfordii* had 23 active ingredients related to 55 potential targets of TNBC. GO and KEGG enrichment revealed that the potential targets were associated with 103 biological processes, 15 cellular components, and 35 molecular functions, and were involved in 140 signaling pathways including atherosclerosis and apoptosis. The results of molecular docking demonstrated that triptolide could bind with the targets including threonine kinase 1 (Akt1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), cellular tumor antigen p53 (p53), transcription factor AP-1 (JUN), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), tumor necrosis factor (TNF), mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8), prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), and Caspase-3. According to the results of MTT assay, triptolide (20, 30, 40, 50, 60, 80 nmol·L⁻¹) inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells compared with blank control ($P<0.05$, $P<0.01$). Hoechst 33342 staining showed that triptolide (12, 25, 50 nmol·L⁻¹) induced the apoptosis of MDA-MB-231 cells compared with blank control ($P<0.05$, $P<0.01$). Western blot showcased that 50 nmol·L⁻¹ triptolide down-regulated the relative expression levels of p-Akt, TNF- α , and VEGFA, while 25 and 50 nmol·L⁻¹ triptolide up-regulated the relative expression level of p53 in a dose-dependent manner compared with the blank control ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** *T. wilfordii* has multiple ingredients, targets, and pathways in the treatment of TNBC. It may regulate p53, VEGFA, TNF- α and other key targets to induce cell apoptosis and suppress angiogenesis and inflammatory response, which provides a scientific basis for the further investigation and clinical application of *T. wilfordii*.

[Keywords] *Tripterygium wilfordii*; triple negative breast cancer; network pharmacology; molecular mechanism; experimental validation

乳腺癌的发病率居我国妇科恶性肿瘤第1位,且近年来呈快速增长的趋势。世界卫生组织公布最新全球癌症数据,乳腺癌已取代肺癌成为全球第一大癌症^[1]。三阴性乳腺癌(TNBC)是雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(Her-2)表达均为阴性的一种乳腺癌亚型,其发病机制复杂,由于没有明确的分子靶标,患者手术后无法进行内分泌及靶向治疗,极易复发和转移,死亡率高,TNBC因此被称为最难治愈的疾病之一,急需开发新的药物和治疗方法。雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 又名黄藤、断肠草、蒸龙草等,是卫矛科雷公藤属植物,味苦辛凉,具有杀虫解毒、消肿止痛、活血通络的功效,临床上常用于治疗类风湿性关节炎、抗肿瘤、免疫调节等^[2-4]。雷公藤主要通过调控细胞周期、抑制血管生成、诱导细胞凋亡、干扰DNA

损伤修复等发挥抗肿瘤作用,其用于治疗TNBC能有效降低患者术后复发及转移率^[5-6],然而其有效成分及靶点机制尚不明确。

中药治疗疾病具有多成分、多靶点、多途径等特点,在防治肿瘤方面具有独特的优势。雷公藤活性成分众多,抗癌机制不明确,缺乏对其抗TNBC药效物质及分子机制方面的系统性研究。网络药理学作为药理学的一门分支,可在大数据的基础上构建不同层次的关系网络实现对药物活性成分-靶点-疾病的关联性分析,其研究方法符合中医药的整体性思维,适用于中药复杂成分的解析与开发^[7-8]。本研究运用网络药理学结合分子对接及实验验证对雷公藤活性成分、作用靶点、信号通路以及TNBC的疾病特征做系统性分析筛选,探析雷公藤的分子机制,为其治疗TNBC的临床应用及后续研究提供

指导。

1 材料与方法

1.1 活性成分与靶点筛选

1.1.1 数据库与软件 本研究所使用的在线数据库平台有TCMSP (<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、Uniprot (<https://www.uniprot.org>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org>)、GeneCards (<https://www.genecards.org>)、Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools>)、String (<https://string-db.org>)、David (<https://david.ncifcrf.gov>)、PDB (<https://www.rcsb.org>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)，软件有Cytoscape 3.8.0、R Studio 3.6.1、Chem3D 19.0.0.22、AutoDock Vina 1.1.2和Pymol 2.5.0。

1.1.2 雷公藤活性成分与靶点的收集 利用TCMSP数据库，以“雷公藤”为关键词检索化学成分，筛选生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18的雷公藤活性成分及其对应的靶点。在Uniprot数据库的UniProKB检索功能中输入靶点蛋白质名称，将收集的靶点名称转化为基因ID。

1.1.3 TNBC靶点的获取及韦恩分析 采用DisGeNET和GeneCards数据库，检索TNBC相关基因，建立TNBC疾病靶点数据库。将雷公藤活性成分靶点和TNBC靶点进行交集，Venny平台进行韦恩分析，获取雷公藤治疗TNBC的潜在靶点信息。

1.1.4 “活性成分-靶点”网络构建 雷公藤治疗TNBC的潜在靶点及对应的化学成分导入网络可视化软件Cytoscape 3.8.0，绘制“雷公藤活性成分-潜在靶点”网络图，R Studio 3.6.1分析节点连接度(degree)筛选雷公藤治疗TNBC的主要活性成分。

1.1.5 蛋白质相互作用网络构建与核心靶点筛选 将潜在靶点信息导入String数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析，选择可信度为“high confidence”，构建PPI网络，筛选degree值大于中位数2倍的核心靶点。

1.1.6 靶点生物功能注释及通路分析 运用DAVID数据库的功能注释工具对潜在靶点进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析，以 $P < 0.05$ 为筛选条件。GO注释包括生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)，探析靶点所涉及的生物学功能。KEGG分析潜在靶点富集的通路，预测雷公藤治疗TNBC的分子机制。

1.1.7 “活性成分-靶点-通路”网络构建 雷公藤活性成分、潜在靶点和KEGG信号通路数据导入

Cytoscape 3.8.0软件，构建“活性成分-靶点-信号通路”网络，以degree和central值评估节点在网络中的重要性，反向查询雷公藤治疗TNBC的有效成分。

1.2 分子对接 将雷公藤主要活性成分雷公藤甲素与核心靶点进行分子对接。雷公藤甲素结构由PubChem数据库下载，Chem3D软件进行能量最小化；核心靶点结构通过PDB数据库下载，选择分辨率较低、结构完整的最佳蛋白晶体结构，并进行除水、加氢等预处理。AutoDock Vina软件进行半柔性分子对接，Pymol软件对结果可视化。

1.3 实验验证

1.3.1 材料 人TNBC细胞MDA-MB-231购自美国ATCC公司，编号ATCC[®] HTB-26，传至第3代；雷公藤甲素(南京泽朗医药科技有限公司，批号kws-438-20150106，纯度99%)，DMEM培养基(美国Gibco公司，批号8121302)，胎牛血清(上海源叶生物科技有限公司，批号J06M10S82038)，噻唑蓝(MTT，美国Sigma公司，批号SP1080)，Hoechst 33342细胞凋亡染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司，批号L15O11G127599)，磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、p53、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司，批号分别为4060、65373、2527、3707、5174)，辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔抗体(美国CST公司，批号7074)，ECL检测试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司，批号D412DA0006]。

1.3.2 仪器 HEPAcell 150i型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司)，5810R型冷冻离心机(美国Beckman公司)，DMI3000B型倒置荧光显微镜(德国Lecia公司)，SPARK 10M型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)，PowerPac[™] Basic型电泳仪及转膜仪、ChemiDoc[™] XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.3.3 MTT比色法测定细胞增殖活性 MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基，以 1×10^5 个/孔接种96孔板，37℃培养过夜，每孔分别加入5、10、20、30、40、50、60、80 nmol·L⁻¹的雷公藤甲素100 μ L作用细胞24 h，以无血清培养基为空白对照，每孔加入5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L继续培养4 h，二甲基亚砜(DMSO)150 μ L充分溶解生成的甲瓩，酶标仪570 nm处测定吸光度A，计算细胞增殖抑制率。细胞抑制率=(1-A_{用药组}/A_{空白组}) \times 100%。

1.3.4 Hoechst33342细胞凋亡检测 对数生长期

MDA-MB-231细胞以 5×10^5 个/孔接种6孔板,分别以12.5、25、50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素作用细胞,无血清培养基为空白组,24 h后吸去上清,每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33342染色液,室温避光孵育30 min,荧光显微镜观察,计算细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测靶点蛋白质表达 MDA-MB-231细胞经0、25、50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤甲素处理,试剂盒提取细胞总蛋白,蛋白样品经SDS-PAGE电泳,恒流转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入p-Akt、VEGFA、p53、TNF- α 和GAPDH一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST洗膜后加入二抗(1:5 000),室温孵育1.5 h,再用PBST洗膜3次,ECL发光试剂盒显色,Image J分析蛋白条带,以GAPDH为内参。

1.3.6 统计学处理 应用SPSS 24.0统计软件对实验数据进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤治疗TNBC有效成分及靶点预测

2.1.1 雷公藤治疗TNBC的活性成分 由TCMSP数据筛选到雷公藤活性成分25个,对应133个作用靶点。利用疾病数据库DisGeNET、GeneCards获得TNBC相关靶点,将两者数据合并去重后共获得TNBC疾病靶点1 685个。Venny平台对雷公藤活性成分靶点和TNBC疾病靶点交集,得到雷公藤和TNBC的共有靶点55个,分别为 $\alpha 1\text{A}$ 肾上腺素能受体(ADRA1A)、 $\beta 2$ 肾上腺素能受体(ADRB2)、芳烃受体(AHR)、90 kDa热休克蛋白ATP酶同系物1(AHSA1)、醛酮还原酶家族1成员C3(AKR1C3)、Akt1、雄激素受体(AR)、凋亡调控因子B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、杆状病毒IAP蛋白(BIRC3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、Caspase-9、7型C-C趋化因子受体(CCR7)、M 130抗原(CD163)、程序性细胞死亡配体1(CD274)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Chk1(CHEK1)、4型趋化因子受体(CXCR4)、肝配蛋白 β 受体2(EPHB2)、雌激素受体1(ESR1)、 β 雌激素受体2(ESR2)、原癌基因c-Fos(FOS)、氨基丁酸受体3亚基(GABRA3)、糖原合成酶-3 β (GSK3B)、谷胱甘肽S转移酶P1(GSTP1)、细胞间黏附分子1(ICAM1)、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)、转录因子AP-1(JUN)、信号转导及转录激活因子1

(STAT1)、信号转导及转录激活因子3(STAT3)、TNF、丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)、诱导骨髓白血病细胞分化蛋白Mcl-1(MCL1)、间质胶原酶1(MMP1)、诱导型一氧化氮合酶2(NOS2)、内皮型一氧化氮合酶3(NOS3)、核受体亚家族I成员2(NR1 I 2)、核受体亚家族I成员3(NR1 I 3)、糖皮质激素受体 α (NR3C1)、盐皮质激素受体(NR3C2)、孕激素受体(PGR)、过氧化物酶增殖激活受体(PPARG)、蛋白激酶C- α (PRKCA)、前列腺素合成酶2(PTGS2)、分泌性白细胞蛋白酶抑制因子(SLPI)、转录因子p65(RELA)、维甲酸受体RXR- α (RXRA)、选择素E(SELE)、多巴胺转运体(SLC6A3)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、p53、血管细胞黏附蛋白1(VCAM1)、T细胞激活抑制分子1(VTCN1),这些靶点为雷公藤治疗TNBC的潜在靶点,关联雷公藤活性成分23个,包括(+)-皮树脂醇-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、雷酚萘醇、异落叶松脂素、豆甾烷-3,6-二酮、金色酰胺醇酯、21-羟基铁线蕨酮、3,3'-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)-2H-1-苯并吡喃、皮树脂醇、5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆素-3)-香豆素、山海棠素、 β -谷甾醇、常春藤皂苷元、异黄酮酚、山柰酚、丁子香萜、川陈皮素、豆甾醇、雷公藤甲素、雷酚二萜酸、雷公藤内酯醇、雷公藤多苷、雷酚内酯和浙贝素。见表1。

2.1.2 “活性成分-靶点”网络构建与分析 将23个雷公藤活性成分及55个潜在靶点信息导入Cytoscape 3.8.0构建“活性成分-靶点”关系网络,见增强出版材料,绿色节点代表雷公藤活性成分,蓝色节点代表潜在靶点。在23个活性成分中,有18个化合物与 ≥ 2 个靶点相连,靶点中有27个潜在靶点对应2个及以上化合物。18个化合物为(+)-皮树脂醇-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、雷酚萘醇、异落叶松脂素、3,3'-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)-2H-1-苯并吡喃、皮树脂醇、5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆素-3)-香豆素、山海棠素、 β -谷甾醇、常春藤皂苷元、异黄酮酚、山柰酚、川陈皮素、豆甾醇、雷公藤甲素、雷酚二萜酸、雷公藤内酯醇、雷公藤多苷、雷酚内酯和浙贝素,27个靶点分别为ADRA1A、ADRB2、Akt1、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、CHEK1、ESR1、ESR2、GABRA3、GSK3B、JUN、MAPK8、VEGFA、NOS2、NOS3、NR3C1、PGR、PPARG、PTGS2、RELA、RXRA、STAT3、TGFB1、TNF和p53,体现了雷公藤多成分、多靶点的协同作

表1 雷公藤治疗TNBC的相关活性成分

Table 1 Related active ingredients of *Tripterygium wilfordii* for TNBC treatment

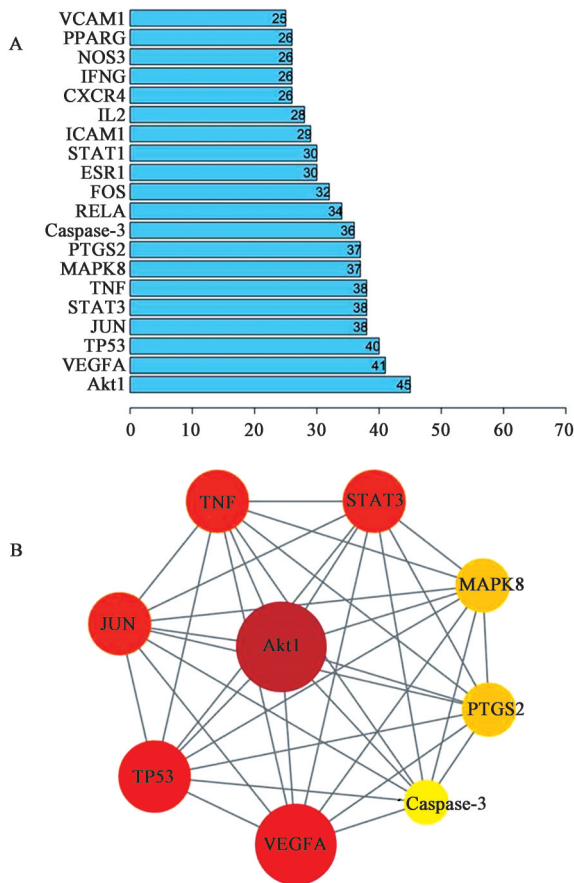
MOLID	英文名称	中文名称	种类	MW	OB/%	DL
MOL003182	(+)-Medioresinol di-O-beta-D-glucopyranoside_qt	(+)-皮树脂醇-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	木脂素	388.45	60.69	0.62
MOL003185	Triptonoterpenol	雷酚萜醇	二萜	346.51	48.84	0.38
MOL003283	Isolariciresinol	异落叶松脂素	木脂素	360.44	66.51	0.39
MOL007535	Stigmastane-3,6-dione	豆甾烷-3,6-二酮	三萜	428.77	33.12	0.79
MOL007415	Aurantiamide acetate	金色酰胺醇酯	酰胺	444.57	58.02	0.52
MOL003266	21-Hydroxyadiantone	21-羟基铁线蕨酮	三萜	428.77	34.11	0.77
MOL009386	3,3'-bis-(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran	3,3'-双-(3,4-二氢-4-羟基-6-甲氧基)-2H-1-苯并吡喃	吡喃	358.42	52.11	0.54
MOL002058	Medioresil	皮树脂醇	木脂素	388.45	57.2	0.62
MOL003199	5,8-Dihydroxy-7-(4-hydroxy-5-methyl-coumarin-3)-coumarin	5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆素-3)-香豆素	香豆素	352.31	61.85	0.54
MOL003184	Neotriptophenolide	山海棠素	二萜	342.47	45.42	0.53
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	三萜	414.79	36.91	0.75
MOL000296	Hederagenin	常春藤皂苷元	三萜	414.79	36.91	0.75
MOL003217	Isoxanthohumol	异黄腐酚	黄酮	354.43	56.81	0.39
MOL000422	Kaempferol	山柰酚	黄酮	286.25	41.88	0.24
MOL000211	Mairin	丁子香萜	三萜	456.78	55.38	0.78
MOL005828	Nobiletin	川陈皮素	黄酮	402.43	61.67	0.52
MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	甾醇	412.77	43.83	0.76
MOL003187	Triptolide	雷公藤甲素	二萜	360.44	51.29	0.68
MOL003245	Triptonoditerpenic acid	雷酚二萜酸	二萜	344.49	42.56	0.39
MOL003280	Triptonolide	雷公藤内酯醇	二萜	326.42	49.51	0.49
MOL003248	Triptonoterpene	雷公藤多苷	二萜	300.48	48.57	0.28
MOL003196	Triptophenolide	雷酚内酯	二萜	312.44	48.5	0.44
MOL004443	Zhebeiresinol	浙贝素	苯丙素	280.3	58.72	0.19

用特征。R Studio 3.6.1 分析结果显示,雷公藤甲素的潜在靶点数最多(degree=26),其次是山柰酚(degree=21)、川陈皮素(degree=15)、β-谷甾醇(degree=13)和异落叶松脂素(degree=9),提示这些成分在雷公藤治疗TNBC疾病中发挥主要作用。雷公藤活性成分-潜在靶点网络图见增强出版附件。

2.1.3 PPI网络构建与核心靶点 雷公藤治疗TNBC的55个潜在靶点输入String数据库获取靶点蛋白质的相互作用网络数据,Cytoscape可视化PPI网络,潜在靶点的PPI网络见增强出版材料。网络中包含546条边,55个节点,度值中位数为17.9。筛选度值大于中位数2倍的节点有9个,分别是Akt1、VEGFA、p53、JUN、STAT3、TNF、MAPK8、PTGS2和Caspase-3。其中,p53、JUN、STAT3、MAPK8、Akt1、Caspase-3可调控细胞增殖、凋亡和转移,VEGFA调

控血管生成,TNF和PTGS2与炎症相关,这些节点在PPI网络中信息传递率高,能更多地影响其他节点,为雷公藤治疗TNBC的核心靶点。进一步用Cytoscape绘制核心靶点的相互作用网络,节点的大小和颜色反应度值大小,节点越大、颜色越红则对应的度值越大。见图1。

2.1.4 靶点GO生物功能注释 将雷公藤治疗TNBC的55个潜在靶点导入DAVID数据库,分别从生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3个角度进行功能富集分析,结果显示雷公藤治疗TNBC靶点的生物过程与类固醇激素受体活性、炎症反应、细胞死亡正调控等相关性较大;细胞组分主要富集于膜筏、质膜外侧和受体复合物;分子功能则与核受体、DNA转录结合因子、蛋白激酶结合等密切相关。见表2。



注: A. 度值排名前20位的靶点; B. 核心靶点相互作用网络
图1 核心靶点筛选与分析

Fig. 1 Select and analysis of key targets

表2 GO富集分析

Table 2 GO enrichment analysis

功能	名称	富集靶点数
生物过程	类固醇激素受体活性	20
	炎症反应	20
	脂多糖应答	19
	细胞死亡正调控	18
	细胞粘附调节	18
细胞组分	膜筏	8
	质膜外侧	8
	受体复合物	7
	RNA聚合酶II转录调节复合物	6
	细胞器外膜	6
分子功能	核受体活性	20
	DNA转录结合因子	13
	蛋白质结构域特异性结合	12
	蛋白质同源二聚体活性	11
	蛋白激酶结合	9

2.1.5 KEGG通路富集分析 利用DAVID数据库对潜在靶点进行KEGG通路分析,富集气泡图见图2。潜在靶点的通路主要涉及脂质和动脉粥样硬化、AGE/晚期糖基化终产物受体(RAGE)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、细胞凋亡、TNF、IL-17和Th17细胞分化等,提示雷公藤治疗TNBC可能是通过调节血管通透性、诱导肿瘤细胞凋亡、改善炎症及免疫微环境等方面的机制实现的。

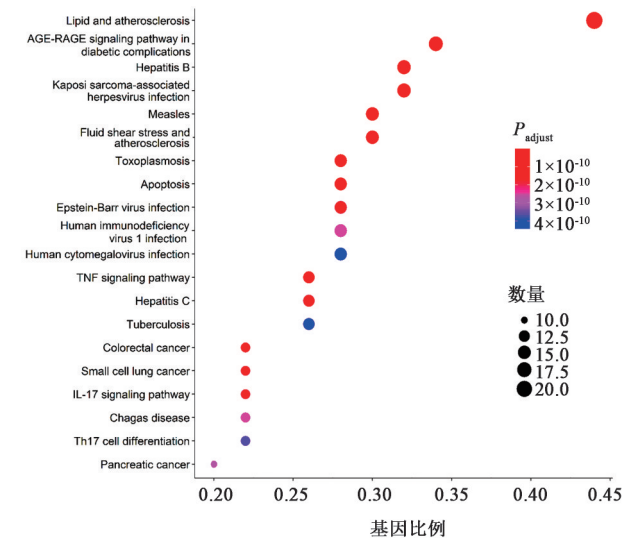


图2 KEGG通路富集分析

Fig. 2 Bubble chart of KEGG pathway enrichment

2.1.6 “活性成分-靶点-通路”网络构建 选取KEGG富集通路中与TNBC相关的脂质与动脉粥样硬化通路、AGE/RAGE信号通路、细胞凋亡、TNF、IL-17信号通路,与雷公藤活性成分及靶点导入Cytoscape 3.8.0构建“活性成分-靶点-信号通路”网络,活性成分-靶点-通路网络图见增强出版,其中蓝色长方形节点代表靶点,灰色三角形节点代表通路,绿色圆形节点代表雷公藤活性成分。根据通路及其关联的作用靶点,反向查询出靶点所对应的雷公藤主要有效成分为雷公藤甲素、山柰酚、β-谷甾醇、川陈皮素和异落叶松脂素,见表3。基于雷公藤甲素作用核心靶点数最多,本研究选择雷公藤甲素进行后续的分子对接和细胞实验验证。

2.2 分子对接 将雷公藤甲素与核心靶点Akt1、VEGFA、p53、JUN、STAT3、TNF、MAPK8、PTGS2和Caspase-3进行分子对接,结合能越低表示配体和受体蛋白的结合越稳定,一般以结合能≤-5 kcal·mol⁻¹作为评分标准,结合能≤-7.5 kcal·mol⁻¹表示有强结合,雷公藤甲素与靶点蛋白的对接结合能数据见表4。结果显示所有对接结合自由能均<-5 kcal·mol⁻¹,

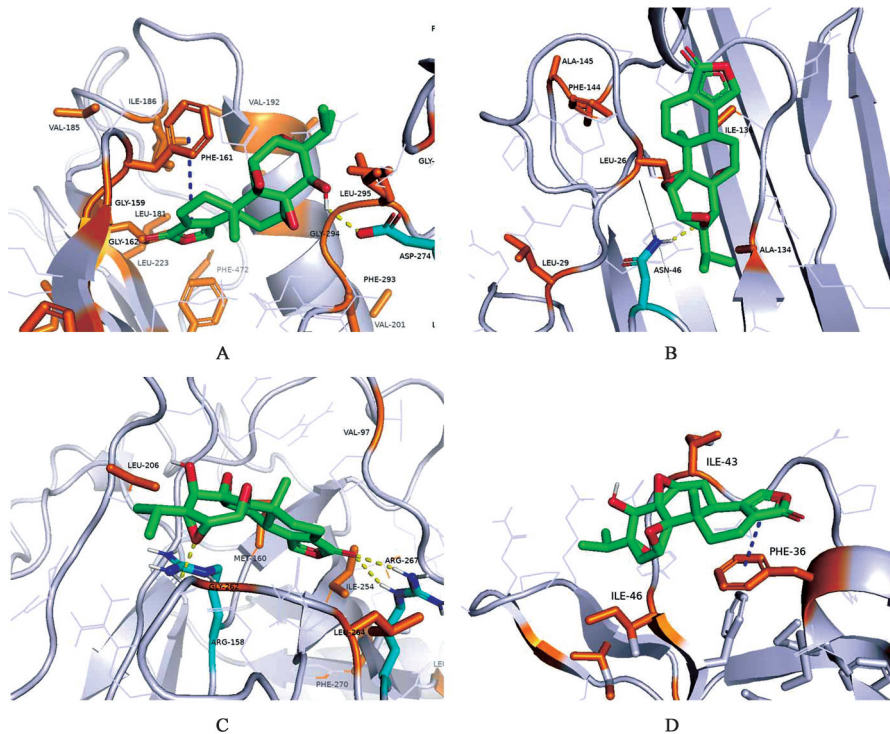
表3 活性成分-靶点-通路信息

Table 3 Active component-target-pathway corresponding information

活性成分	靶点数/个	靶点	通路
雷公藤甲素	17	Bcl-2、BIRC3、Caspase-3、CD163、FOS、JUN、MAPK8、MCL1、PTGS2、RELA、Akt1、STAT3、TNF、TGFB1、p53、IFNG、VEGFA	脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE、细胞凋亡、TNF、IL-17
山柰酚	16	Akt1、Bax、Bcl-2、Caspase-3、ICAM1、JUN、MAPK8、NOS3、TNF、PTGS2、RELA、SELE、STAT1、VCAM1、MMP1、PPARG	脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE、细胞凋亡、TNF、IL-17
β -谷甾醇	9	Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、JUN、PRKCA、PTGS2、TGFB1	脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE、细胞凋亡、TNF、IL-17
川陈皮素	9	Bax、Bcl-2、Caspase-9、JUN、MAPK8、PTGS2、p53、GSK3B、PPARG	脂质与动脉粥样硬化、细胞凋亡、IL-17
异落叶松脂素	4	NOS3、PTGS2、GSK3B、PPARG	脂质与动脉粥样硬化、AGE/RAGE通路

雷公藤甲素与核心靶点均有较高的亲和力,能借助氢键、疏水键、 π - π 共轭键等分子间相互作用力产生

较稳定构象。结合能 $<-7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的对接可视化结果见图3。



注:A. 雷公藤甲素与Akt1; B. TNF; C. p53; D. VEGFA; 绿色. 雷公藤甲素; 橘色. 疏水氨基酸残基; 深蓝色虚线. π - π 共轭键; 黄色虚线. 氢键

图3 雷公藤甲素与高亲和力靶点相互作用分析

Fig. 3 Interaction analysis of triptolide and targets with high affinity

2.3 实验验证

2.3.1 雷公藤甲素对TNBC细胞的增殖抑制活性

与空白组比较,雷公藤甲素在 $20\sim 80 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 能明显抑制TNBC细胞MDA-MB-231的增殖($P<0.05, P<0.01$),作用24 h的半数抑制浓度(IC_{50})为 $29.06 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表5。

2.3.2 雷公藤甲素对TNBC细胞凋亡的影响

Hoechst33342染料能穿透细胞膜与DNA结合,在

紫外灯下呈蓝色荧光。不同浓度雷公藤甲素处理MDA-MB-231细胞后,经Hoechst 33342染料染色,凋亡细胞显亮蓝色,正常细胞显弱蓝色。与空白组比较,经不同浓度雷公藤甲素作用后,MDA-MB-231细胞凋亡率明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见图4、表6。

2.3.3 雷公藤甲素对p-Akt、p53、VEGFA和TNF- α 蛋白表达的影响 与空白组比较,雷公藤甲素

表4 雷公藤甲素与核心靶点结合能预测

Table 4 Prediction of binding energy of triptolide and key targets

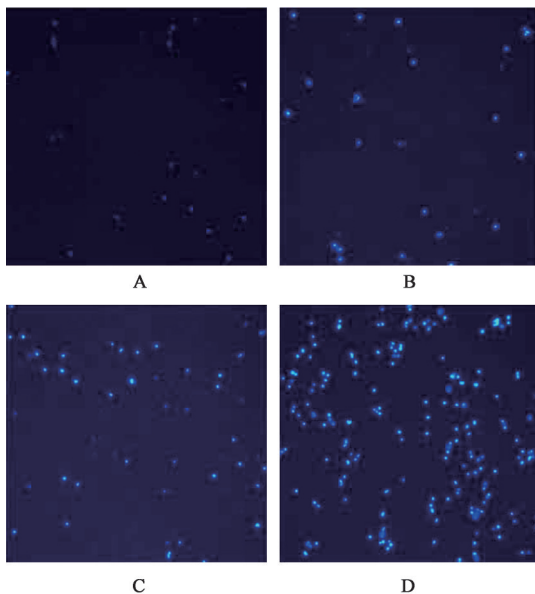
靶点名称	PDB ID	结合能/kcal·mol ⁻¹
Akt1	4GV1	-8.5
VEGFA	4KZN	-7.6
TNF	5UUI	-7.7
Caspase-3	4JJ7	-7.4
MAPK8	3PZE	-7.3
JUN	5FV8	-6.7
p53	3ZME	-7.7
STAT3	6NJS	-7.2
PTGS2	5F19	-7.3

表5 雷公藤甲素对MDA-MB-231细胞增殖抑制活性($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Inhibition effect of triptolide on MDA-MB-231 cell proliferation ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	A ₅₇₀	抑制率/%
空白组		0.773±0.078	-
雷公藤甲素组	5	0.751±0.083	2.85±0.24
	10	0.725±0.069	6.21±0.56
	20	0.531±0.046 ¹⁾	31.37±1.17 ¹⁾
	30	0.364±0.033 ¹⁾	52.86±1.46 ¹⁾
	40	0.250±0.042 ²⁾	67.61±2.49 ²⁾
	50	0.162±0.037 ²⁾	79.03±2.97 ²⁾
	60	0.128±0.038 ²⁾	83.44±4.96 ²⁾
	80	0.106±0.024 ²⁾	86.26±4.94 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表6和表7同)



注:A.空白组;B~D.雷公藤甲素组(12.5、25、50 nmol·L⁻¹)

图4 雷公藤甲素对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

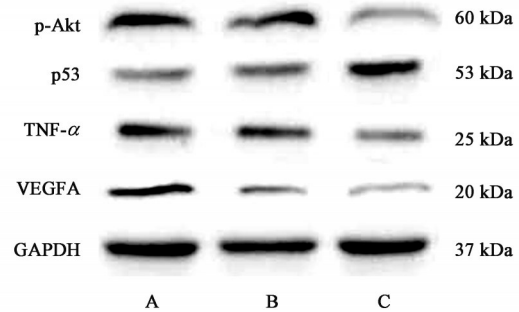
Fig. 4 Effect of triptolide on MDA-MB-231 cell apoptosis

表6 雷公藤甲素对MDA-MB-231细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of triptolide on apoptosis rate of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	细胞凋亡率/%
空白组		4.27±1.33
雷公藤甲素组	12.5	11.64±1.86 ¹⁾
	25	22.69±2.13 ¹⁾
	50	43.52±2.48 ²⁾

(50 nmol·L⁻¹)组MDA-MB-231细胞中p-Akt、VEGFA和TNF- α 相对表达水平降低($P<0.05, P<0.01$),雷公藤甲素组(25、50 nmol·L⁻¹)抑癌基因p53相对表达水平升高($P<0.05, P<0.01$),呈浓度依赖性。见图5、表7。



注:A.空白组;B、C.雷公藤甲素(25、50 nmol·L⁻¹)组

图5 各组靶点蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of target proteins in each group

3 讨论

TNBC是乳腺癌的一种亚型,组织分化差,具有高侵袭、高转移性特点,5年生存率不超过15%,寻找新的药物和治疗手段是当前临床上急需解决的问题。TNBC在中医属于“乳岩”范畴,TNBC患者情志不畅、肝脾不合,瘀毒内生而与痰浊、瘀血等病理因素胶着存在。中药雷公藤能活血通络、消肿止痛,用于治疗TNBC活性显著,但由于雷公藤所含成分众多,其抗TNBC的活性物质及作用机制至今没有清晰地阐明。

本研究利用网络药理学在大数据基础上,通过构建“活性成分-靶标-通路-疾病”“核心靶点相互作用”等网络,多层次深入挖掘雷公藤治疗TNBC的有效成分、靶点和作用机制,结合分子对接、MTT、Hoechst 33342染色和Western blot实验进行验证,共筛选到雷公藤作用于TNBC的活性成分23个,潜在靶点55个。雷公藤甲素属于环氧二萜内酯化合物,具有调节免疫、抗肿瘤的作用。雷公藤甲素能激活Caspase-3凋亡通路,调节细胞自噬,呈时间和

表7 雷公藤甲素对靶点蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of triptolide on relative expression levels of target proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	p-Akt/GAPDH	p53/GAPDH	TNF-α/GAPDH	VEGFA/GAPDH
空白组		0.724±0.019	0.383±0.013	0.573±0.029	0.688±0.039
雷公藤甲素组	25	0.665±0.036	0.514±0.029 ¹⁾	0.512±0.044	0.337±0.024 ¹⁾
	50	0.337±0.027 ¹⁾	0.698±0.038 ²⁾	0.354±0.018 ¹⁾	0.209±0.022 ²⁾

浓度依赖性抑制 TNBC 细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468 的增殖,诱导细胞凋亡^[9]。山柰酚属于黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗病毒等活性。AROWOSEGBE 等^[10]发现,山柰酚可作为 TNBC 中 P-21 活化激酶 4(PAK4)的抑制剂,通过与 ATP 结合位点作用发挥抗 TNBC 活性。川陈皮素也属于黄酮类化合物,能抗血小板凝聚、抗肿瘤和抗过敏。研究表明,川陈皮素可显著抑制 AGE/RAGE 通路上游靶点核转录因子(NF)-κB 的转录活性,抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,促进细胞凋亡^[11]。β-谷甾醇是植物甾醇类成分之一,有降胆固醇、祛痰、抗肿瘤以及修复组织的作用。β-谷甾醇可激活 Caspase,调控 PI3K、p-Akt 及 Bcl-2 家族蛋白质的表达,由 PI3K/Akt/Bcl-2 途径诱导 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞凋亡^[12]。异落叶松脂素为环氧木脂素类化合物,具有抗肿瘤、抗炎和抑菌作用。在人 MCF-7 异种移植和致癌因子诱导的大鼠乳腺肿瘤模型中,异落叶松脂素可减缓乳腺肿瘤的生长,并降低血管密度^[13]。现有文献报道与本研究结果筛选出的雷公藤有效成分及靶点较吻合。

GO 结果显示,雷公藤治疗 TNBC 的潜在靶点与炎症反应、核受体、DNA 转录因子等体内生物过程有关。其中,核受体是一类依赖于配体的转录调节因子家族,包括类固醇激素受体、维甲酸受体、孤儿核受体等,影响细胞的生长分化、凋亡等生物学过程^[14]。类固醇激素受体包括雌激素受体和孕激素受体,与乳腺癌的发生发展密切相关^[15-16]。LI 等^[17]通过体内外实验表明,雷公藤甲素可通过阻断雌激素受体抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的活性,并且可以显著降低荷瘤小鼠肿瘤的质量和体积。孤儿核受体雌激素相关受体基因表达的降低,受体亚型及亚细胞定位是 TNBC 的关键特征之一^[18]。此外,TNBC 的分子形成还受多种因素调控,在 HNF4α 等转录因子作用下,可调控 ERα 的表达,控制 TNBC 细胞中重要靶点的形成。本研究网络药理学分析结果提示雷公藤可靶向 ERα、孤儿核受体等影响 TNBC 的发展。最新研究发现部分孤儿核受

体能在 ERα 阴性的疾病中表达,其有望成为治疗 TNBC 的新靶点^[19]。

KEGG 通路富集结果显示,雷公藤治疗 TNBC 的肿瘤相关通路主要为脂质和动脉粥样硬化、AGE/RAGE、细胞凋亡、TNF 及 IL-17 信号通路。临床研究发现,肿瘤、囊肿等实性包块病症与动脉粥样硬化之间存在着密切的联系,中医认为“虚瘀致癌”是 TNBC 发生、发展的核心病机,TNBC 患者大都伴血瘀的症状,如面色晦暗、唇舌紫黯等^[20]。局部血液的高凝状态将促进血管生成,大大提高肿瘤的生长及转移率,临床上应用活血化瘀法治疗 TNBC 取得了良好的效果^[21-22]。肿瘤的生长及转移都需要新生血管的生成,VEGFA 是一种内皮生长因子以及血管通透性的调节因子,由内皮细胞及肿瘤等多种细胞分泌,在实体瘤血管生成中起关键调节作用。本研究通过实验证明,雷公藤甲素呈剂量依赖性降低 TNBC 细胞中血管内皮生长因子 VEGFA 的表达,抑制 TNBC 细胞增殖。

AGE/RAGE 信号通路在肿瘤的发展过程中起关键作用。RAGE 是一种多配体的受体,其配体包括 AGEs、S100/钙调素蛋白家族等,主要分布在成纤维细胞、血管内皮细胞及肿瘤细胞等表面^[23]。在高糖、氧化应激等特殊环境下,AGEs 与 RAGE 结合,发生氧化应激反应,活性氧(ROS)增加,激活多条与细胞增殖有关的通路,促进肿瘤的发展^[24]。临床研究表明,乳腺癌患者体内有大量的 AGEs 生物标志物及与 AGEs 密切相关的脂氧化产物丙二醛^[25]。不同的 RAGE 配体在乳腺癌的发病机制中作用不同,调控 AGE/RAGE 信号通路是治疗乳腺癌的有效途径。山柰酚作为雷公藤的活性成分对 AGEs 有良好的抑制效果^[26]。

细胞凋亡是细胞自主发生、高度有序的程序性死亡过程^[27]。Akt 作为 PI3K、JAK 等通路的关键分子,主要通过第 308 位的苏氨酸和第 473 位的丝氨酸磷酸化而具有激酶活性。活化的 Akt 通过下游分子,如 mTOR、MDM2、p21、IKK 等调控细胞增殖、周期及代谢^[28]。p53 是研究较多的抑癌基因,MDM2

可结合 p53 而使其失活,对肿瘤形成起重要作用。TNF 由活化的巨噬细胞和免疫细胞产生,包括 TNF- α 和 TNF- β 。TNF- α 占 TNF 生物学活性的 70%,参与机体的免疫应答及炎症反应^[29]。健康女性血清中不含 TNF- α ,但在乳腺癌患者体内 TNF- α 呈高表达,且乳腺癌分期越高,TNF- α 的表达水平也越高^[30]。雷公藤甲素能抑制 TNF- α 介导的 c-IAP1/2 和 I κ B α 活化,增加 cleaved PARP 水平,并进一步活化乳腺癌细胞中的 Caspase-3,从而使细胞凋亡率升高^[31]。本研究 Western blot 实验表明雷公藤甲素可显著抑制 Akt 的磷酸化水平,上调抑癌基因 p53 的表达,并下调炎症因子 TNF- α 的表达,与网络药理学预测结果相印证。

综上所述,雷公藤含有二萜类化合物(雷公藤甲素等)、三萜类化合物(β -谷甾醇等)、黄酮类化合物(山柰酚、川陈皮素等)和木脂素类化合物(异落叶松脂素等)与 VEGFA、p53 等核心靶点结合,通过 AGE/RAGE、动脉粥样硬化、细胞凋亡等信号通路诱导细胞凋亡、抑制新生血管生成、改善炎症及免疫微环境,达到抗 TNBC 的作用。本研究创新性地采用网络药理学结合分子对接及实验验证初步探讨了雷公藤治疗 TNBC 的靶点及作用机制,同时也存在着一些不足,如研究未涉及到疾病的临床分型、量效关系等问题,后续将通过实验进一步完善。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] HEER E, HARPER A, ESCANDOR N, et al. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(8): 1027-1037.

[2] 农程,王欣之,江振洲,等. 雷公藤对免疫系统作用及机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(16): 3374-3383.

[3] SONG C Y, XU Y G, LU Y Q. Use of *Tripterygium wilfordii* Hook F for immune-mediated inflammatory diseases: progress and future prospects [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(4): 280-290.

[4] ZHANG W, LI F, GAO W. *Tripterygium wilfordii* inhibiting angiogenesis for rheumatoid arthritis treatment [J]. *J Natl Med Assoc*, 2017, 109(2): 142-148.

[5] RAMAMOORTHY P, DANDAWATE P, JENSEN R, et al. Celastrol and triptolide suppress stemness in triple negative breast cancer: notch as a therapeutic

target for stem cells [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(5): 482.

[6] 刘敏,王明武. 解毒破瘀法抑制三阴性乳腺癌复发与转移的临床研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(2): 111-113.

[7] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.

[8] LUO T T, LU Y, YAN S K, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(1): 72-80.

[9] VARGHESE E, SAMUEL S M, VARGHESE S, et al. Triptolide decreases cell proliferation and induces cell death in triple negative MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 163.

[10] AROWSEGBE M A, AMUSAN O T, ADEOLA S A, et al. Kaempferol as a potential PAK4 inhibitor in triple negative breast cancer: extra precision glide docking and free energy calculation [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2020, 17(5): 682-695.

[11] 曹鹏,王东明,顾振华. 川陈皮素对乳腺癌细胞的化疗增敏作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(9): 1418-1422.

[12] XU H, LI Y, HAN B, et al. Anti-breast-cancer activity exerted by β -sitosterol-d-glucoside from sweet potato via upregulation of microRNA-10a and via the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Agric Food Chem*, 2018, 66(37): 9704-9718.

[13] SAARINEN N M, WARRI A, DINGS R P, et al. Dietary lariciresinol attenuates mammary tumor growth and reduces blood vessel density in human MCF-7 breast cancer xenografts and carcinogen-induced mammary tumors in rats [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(5): 1196-1204.

[14] DE BOSSCHER K, DESMET S J, CLARISSE D, et al. Nuclear receptor crosstalk - defining the mechanisms for therapeutic innovation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(7): 363-377.

[15] LAZAR M A. Maturing of the nuclear receptor family [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(4): 1123-1125.

[16] SAHA S, DEY S, NATH S. Steroid hormone receptors: links with cell cycle machinery and breast cancer progression [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 620214.

[17] LI H, PAN G F, JIANG Z Z, et al. Triptolide inhibits human breast cancer MCF-7 cell growth via downregulation of the ER α -mediated signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(5):

- 606-613.
- [18] FERNANDEZ A I, GENG X, CHALDEKAS K, et al. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor beta (ERR β) in triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 179 (3) : 585-604.
- [19] LIN M L, PATEL H, REMENYI J, et al. Expression profiling of nuclear receptors in breast cancer identifies TLX as a mediator of growth and invasion in triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25) : 21685-21703.
- [20] 江科, 李春阳, 董梦婷, 等. 扶正解毒活血法对三阴性乳腺癌术后无病生存期及生活质量的影响[J]. *中医药通报*, 2020, 19(5): 50-54.
- [21] 张亚萌, 宋鲁成. 从中西医角度探讨动脉粥样硬化与肿瘤的关系[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(5): 533-535.
- [22] 盛佳钰, 吴建春, 范建兵, 等. 益气活血方对三阴性乳腺癌MDA-MD-231细胞体外抑制作用的研究[J]. *中医药通报*, 2020, 19(1): 67-72.
- [23] AZIZAN N, SUTER M A, LIU Y, et al. RAGE maintains high levels of NF- κ B and oncogenic Kras activity in pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 592-597.
- [24] RAHIMI F, KARIMI J, GOODARZI M T, et al. Overexpression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in ovarian cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(1): 61-68.
- [25] GÖNENÇ A, OZKAN Y, TORUN M, et al. Plasma malondialdehyde (MDA) levels in breast and lung cancer patients [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2001, 26(2) : 141-144.
- [26] 王晓欣. 加工工艺对食凉茶化学成分及AGEs抑制活性影响的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- [27] DARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582-592.
- [28] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 54.
- [29] INOUE M, ANDO D, KAMADA H, et al. A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- α mutant enhances molecular stability and enables facile modification [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(16): 6438-6451.
- [30] LYU Y G, XU X, YUN J, et al. TNF- α regulates the proliferation of human breast cancer cells by regulating the level of ceramide [J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 33(10): 1303-1309.
- [31] CHENG X, SHI W, ZHAO C, et al. Triptolide sensitizes human breast cancer cells to tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inhibiting activation of the nuclear factor- κ B pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3257-3264.

[责任编辑 张丰丰]