

文章编号 1006-8147(2019)04-0316-04

论著

网络药理学探究神效瓜蒌散治疗乳腺癌作用机制

付精精, 吴雄志

(天津医科大学肿瘤医院中西医结合科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘要 目的: 通过网络药理学探究神效瓜蒌散治疗乳腺癌的机制。方法: 设置不同剂量神效瓜蒌散组, 对乳腺癌细胞 SKBR-3 进行台盼蓝染色法、MTS 试验、划痕实验等体外实验验证其治疗乳腺癌的作用, 通过网络药理学构建有效成分-作用靶点网络, 预测神效瓜蒌散作用于乳腺癌的机制, 最后通过 Western blot 实验验证预测。结果: 神效瓜蒌散能够在体外抑制乳腺癌细胞 SKBR-3 的增殖和迁移, 通过网络药理学预测神效瓜蒌散可能通过 ER、HSP90 等靶点作用于乳腺癌发挥其抗肿瘤作用, 通过 Western blot 观察到神效瓜蒌散作用的乳腺癌细胞 SKBR-3 的 ER α 表达下降。结论: 神效瓜蒌散可能主要通过抑制 ER 内分泌通路治疗乳腺癌。

关键词 神效瓜蒌散; 乳腺癌; 网络药理学; ER

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

Action mechanism of Shenxiaogualousan in treatment of breast cancer by network pharmacology method

FU Jing-jing, WU Xiong-zhi

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cancer Institute Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To explore the Shenxiaogualousan mechanism for the treatment of breast cancer by the network pharmacology and in vitro experiments. **Methods:** Shenxiaogualousan groups given different dosages were established in the present study. Trypan blue staining, MTS test, scratch test and other in vitro tests were used to verify the effect of Shenxiaogualousan on breast cancer cell line SKBR-3. Furthermore, the mechanism of Shenxiaogualousan in breast cancer was predicted by constructing an active component-action target network through network pharmacology, followed by verification using western blot. **Results:** The effective Shenxiaogualousan could inhibit the proliferation and migration of breast cancer cell line SKBR-3 in vitro. Network pharmacology predicted that the effective Shenxiaogualousan could have anti-tumor effect on breast cancer through ER, HSP90 and other targets. Furthermore, western blot results showed that the expression of ER α was decreased in SKBR-3 cells after treated with the effective Shenxiaogualousan. **Conclusion:** The effective Shenxiaogualousan may have a role in the treatment of breast cancer through the inhibition of ER endocrine pathways.

Key words Shenxiaogualousan; breast cancer; network pharmacology; ER

乳腺癌是世界范围内确诊率最高的癌症, 每年新增病例 167 万例, 死亡人数超过 50 万^[1], 据报道, 乳腺癌是女性癌症死亡的主要原因^[2], 中国女性新诊断的癌症中有 15% 是乳腺癌^[3], 其中 75% 的乳腺癌是雌激素 ER 阳性^[4]。中医是我国的传统医学, 中草药常用来治疗不同类型癌症, 不仅可以减轻癌症疼痛、呕吐、腹泻、疲乏、白细胞减少等化疗副作用, 还有抗增殖、抗迁移等作用, 可以提高患者生存率^[5-7]。神效瓜蒌散是传统的中药方剂, 来源于宋·陈自明的妇科著作《妇人良方》, 由瓜蒌、甘草、当归、乳香、没药组成, 主治乳痛及一切痈疽初起, 其中“乳痛”

为古代文献常见的类似乳腺癌表现疾病, 故选取神效瓜蒌散研究其抗乳腺癌的作用机制。网络药理学是基于生物分子网络构建“药物-靶点-通路”多层次网络分析药效活性成分和可能的分子网络机制, 旨在建立中药及其复方多成分、多途径、多靶点间的协同作用联系^[8-10]。本文将进行体外实验验证神效瓜蒌散对乳腺癌的抑制作用, 再运用网络药理学的思路和方法, 预测神效瓜蒌散作用于乳腺癌的靶点, 运用 Western 验证蛋白, 探讨神效瓜蒌散作用乳腺癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 神效瓜蒌散的瓜蒌、甘草、当归、乳香和没药均购买自北京同仁堂大药房。药物经过浸泡、煮沸、过滤、旋蒸、冻干等步骤得到神效瓜蒌散的水提物。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81473441)

作者简介 付精精(1992-), 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤学; 通信作者: 吴雄志, E-mail: 13702062585@163.com。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞系 SKBR-3 细胞培养在含 10%胎牛血清的 1640 培养基于 37 ℃, 95%的空气和 5%CO₂ 的饱和湿度下培养。SKBR-3 购买自中国科学院肿瘤细胞库。

1.2.2 细胞增殖实验 细胞增殖试验采用台盼蓝染色法和 MTS 法检测细胞存活和增殖情况。台盼蓝染色法是对数增长的乳腺癌 SKBR-3 细胞 1×10^4 /孔密度铺在 24 孔板培养,设置空白对照组、神效瓜蒌散剂量组(50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$),细胞计数使用 0.4%的台盼蓝计数。MTS 法将对数增长的乳腺癌 SKBR-3 细胞 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 铺在 96 孔板培养,设置空白对照组、神效瓜蒌散剂量组(50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每孔加入 20 μL MTS,用美国 Bio-Rad 微孔板光度计在 490 nm 处测定吸光度(OD)值。

1.2.3 划痕实验 细胞划痕实验将对数增长的乳腺癌 SKBR-3 细胞(10×10^4)铺在 24 孔板培养,设置空白对照组、神效瓜蒌散剂量组(50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$),划痕分别在 0、6、12、24 和 48 h 拍照。

1.2.4 Western blot 实验 对数增长的乳腺癌 SKBR-3 细胞(20×10^4)铺在 6 孔板培养,设置空白对照组、神效瓜蒌散剂量组(100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),收集培养 72 h 后的细胞,裂解细胞提取蛋白。采用 Western blot 法检测 ER α 的表达水平,以 β -actin 为空白对照,操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 网络药理学方法

1.3.1 药物有效成分的收集和靶点预测 通过先前研究^[1],神效瓜蒌散的 5 个药物成分分别从 TCMS 数据库、TCMID 数据库等数据库查找有效成分,其中按照类药性 >0.18 筛选有效成分,再通过 pubchem、drugbank、chemmapper 等数据库根据药物结构的相似性找到有效成分相应靶点。

1.3.2 乳腺癌的靶点预测 乳腺癌的靶点通过网络数据库 TTD(Therapeutic Target Database)和 Pubmed、知网等数据库文献中筛选。

1.3.3 网络构建和分析 将预测到神效瓜蒌散的有效成分的靶点和乳腺癌的预测靶点进行匹配,并通过 Cytoscape 软件,根据成分与靶点关联的程度、匹配的程度制作对应中药的成分-靶点网络图,并对其归纳和总结。

1.4 统计学分析 图标使用 Excel、PowerPoint 和 GraphPad Prism 5 生成图形。使用社会科学 SPSS12.0 的统计软件包确定统计显著性。

2 结果

2.1 神效瓜蒌散水提物的提取结果 买自北京同

仁堂的神效瓜蒌散 240 g 经过浸泡、煮沸、过滤、旋蒸、冻干等步骤得到 110 g 神效瓜蒌散水提物。

2.2 细胞增殖实验结果

2.2.1 台盼蓝法结果 使用台盼蓝法加入不同剂量神效瓜蒌散(50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后,连续计数乳腺癌 SKBR-3 细胞 6 d,观察不同剂量组细胞数目变化和差异,发现在剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的低剂量组就出现细胞数目的明显减少,并且呈剂量依赖性,且在第 3 天细胞数目开始明显减少,呈时间依赖性($P < 0.05$),见图 1。

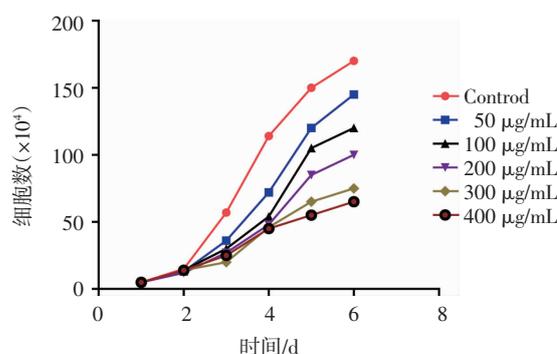


图1 SKBR-3 细胞在不同剂量药物台盼蓝计数
Fig 1 SKBR 3 cells trypan blue countings at different doses

2.2.2 MTS 法结果 MTS 实验设置空白对照组、不同剂量神效瓜蒌散(50、100、200、300 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组后,72 h OD 值见图 2,从图中可以看出,随着神效瓜蒌散浓度的增加,OD 值呈剂量依赖性下降($P < 0.05$)。

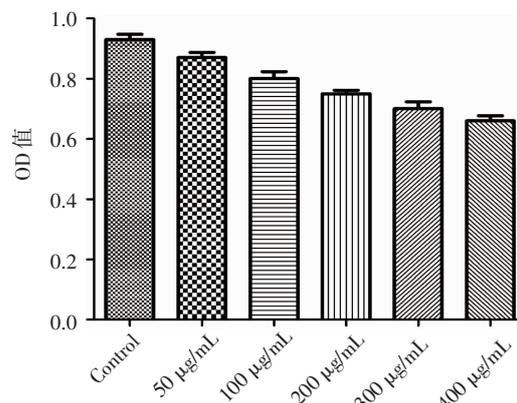


图2 SKBR-3 细胞在不同剂量组药物 MTS 的 OD 值
Fig 2 OD value of the MTS for SKBR 3 cells at different dose drugs

台盼蓝法和 MTS 实验说明神效瓜蒌散能够抑制乳腺癌细胞 SKBR-3 增殖,且呈剂量、时间依赖性。

2.3 划痕实验结果 为了初步探索神效瓜蒌散与乳腺癌 SKBR-3 细胞迁移的关系,采用划痕实验方法。划痕实验设置对照组、不同剂量神效瓜蒌散(100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组后,24 h 实验结果见图 3,从图中可以看出和空白对照组相比,各加药组细胞迁移的距离明显减少,说明神效瓜蒌散能够抑制乳腺癌

细胞 SKBR-3 的迁移,且呈剂量依赖性。

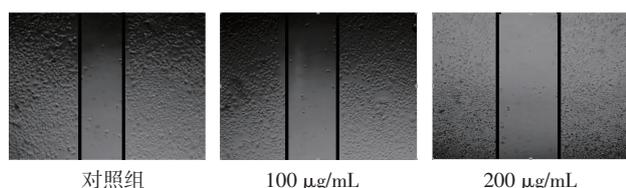


图3 SKBR-3 细胞在不同剂量组药物的 24 h 划痕(4×100)

Fig 3 SKBR 3 cell scratches at different doses for 24 h(4×100)

2.4 网络药理学结果

2.4.1 药物有效成分的收集和靶点预测结果 神效瓜蒌散的瓜蒌、甘草、当归、乳香和没药 5 个成分,通过 TCMSp 数据库、TCMID 数据库等数据库,按照类药性 >0.18 筛查到的有效成分及通过 pubchem、drugbank、chemmapper 等数据库找到药物的有效成分和靶点情况见表 1。

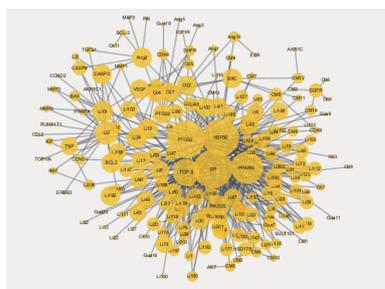
表 1 神效瓜蒌散组分的有效成分、预测靶点结果

Tab 1 Active ingredients in Shenxiaogualousan and its predicted target results

药物	有效成分/个	预测靶点/个
当归	11	103
甘草	206	2 070
瓜蒌	23	57
没药	14	38
乳香	11	37

2.4.2 乳腺癌的靶点预测结果 乳腺癌通过 TTD 数据库筛选到靶点 80 个,通过 Pubmed、知网等数据库文献查找到 41 个靶点,所以乳腺癌的靶点一共 121 个。

2.4.3 网络构建和分析结果 通过神效瓜蒌散的有效成分和预测靶点与乳腺癌的靶点匹配后,用 Cytoscape 软件构建的神效瓜蒌散成分靶点网络图见图 4,从图中可见神效瓜蒌散靠前的靶点是 ER、HSP90 等,可以推测神效瓜蒌散通过 ER、HSP90 等靶点作用于乳腺癌发挥其抗肿瘤作用。



钻石代表药物的有效成分,圆形代表药物作用于乳腺癌的靶点,图形从小到大表示联系的程度,成份与靶点的作用通过连线表

图 4 神效瓜蒌散的成分靶点网络图

Fig 4 Target network diagram for Shenxiaogualousan ingredients

2.5 神效瓜蒌散对 ER α 作用结果 网络药理学分析神效瓜蒌散可能主要通过作用于 ER 发挥抗乳腺癌作用,为此笔者检测了神效瓜蒌散作用的乳腺癌

细胞 SKB 的 ER α 的表达以验证网络药理学分析的预测结果。结果显示:加入不同浓度的神效瓜蒌散(0、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后,随着药物剂量的增加,ER α 逐渐减少($P < 0.05$),见图 5。Western blot 实验结果与网络药理学预测机制部分吻合。

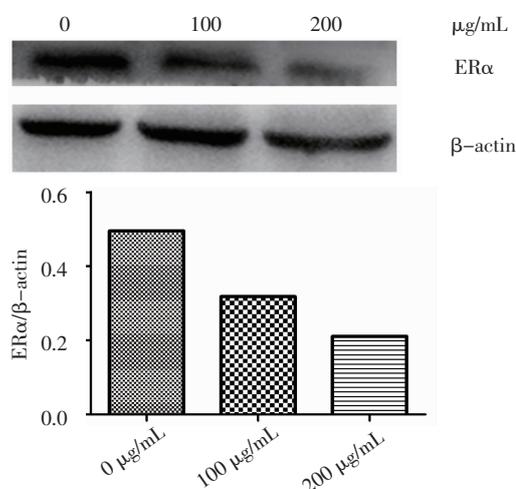


图 5 神效瓜蒌散对乳腺癌细胞 SKB 的 ER α 表达的影响

Fig 5 Shenxiaogualousan impact on breast cancer cells of SKB expression of ER alpha

3 讨论

通过实验结果表明,神效瓜蒌散能够在体外抑制乳腺癌细胞 SKBR-3 的增殖和迁移,并且呈剂量依赖性。网络药理学建立的成分靶点图,排在前两位分别是 ER、HSP90。

乳腺癌是世界范围内确诊率最高的癌症,其中 75% 的乳腺癌是雌激素 ER 阳性,雌激素长期过度刺激、ER 表达水平增高或转录激活活性增强,是导致乳腺癌的重要原因^[13],1896 年,Beatson 医生首先对乳腺癌患者进行了卵巢切除术,开创了针对雌激素治疗的先河。如今 ER 受体已经是乳腺癌内分泌治疗的作用靶点,是乳腺癌治疗的主要方法之一,多数临床研究结果显示内分泌辅助治疗可以显著降低乳腺癌复发率并延长生存期。雌激素的生物学效应主要通过雌激素受体介导的对下游靶基因转录激活或抑制效应来实现,雌激素有两个受体,ER α 与 ER β ,研究表明在乳腺中以 ER α 为主,ER α 过度激活是雌激素依赖性乳腺癌发生与进展的重要因素^[12]。雌激素的核受体按照结构和功能主要分为 2 类:类固醇激素受体家族和甲状腺受体家族,类固醇激素受体未活化状态时与热休克蛋白结合存在,配体与受体结合使热休克蛋白与受体解离^[13]。

热休克蛋白(HSP)是高度保守的应激蛋白,在细胞中作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运、逆转录许多关键调节因子的蛋白水解过程,从而影响

细胞生长、分化和生存^[14-15]。热休克蛋白通常按照分子量不同,分为 HSP70 和 HSP90,其中 HSP90 又分为 HSP90 α 和 HSP90 β 两种亚型,两者同源性高达84%,其中 HSP90 在雌激素的信号传导中起重要作用即当雌激素受体未与雌激素结合时,细胞内的 ER 和 HSP90 形成 ER-HSP 90 复合物,雌激素和 ER 结合后,HSP90 分离,雌激素受体激活发挥生物学效应^[15]。研究表明,HSP90 的过高水平的表达与乳腺癌患者的不良预后相关^[16]。

神效瓜蒌散从宋代以来就用来治疗乳腺癌,本研究利用网络药理学的方法,发现其发挥抗乳腺癌作用可能主要是通过内分泌通路,今后可以进一步研究神效瓜蒌散通过内分泌通路治疗乳腺癌的具体机制以及可能存在的其他抗乳腺癌的通路。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):359
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115
- [4] Siersbaek R, Kumar S, Carroll J S. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor a function in breast cancer[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(17/18):1141
- [5] Qi F H, Zhao L, Zhou A Y, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer[J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1):16
- [6] Li X, Yang G, Li X, et al. Traditional Chinese medicine in cancer care: a review of controlled clinical studies published in Chinese[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4):60338
- [7] Yang X E, Hao J, Zhu C H, et al. Survival benefits of western and traditional Chinese medicine treatment for patients with pancreatic cancer[J]. *Medicine*, 2015, 94(26):1008
- [8] 张莹,韦佳慧,张成玲,等.基于网络药理学的加味佛手散抑制子宫内膜侵袭转移机制研究[J].*药学报*,2018,53(9):1398
- [9] Ning K, Zhao X, Poetsch A, et al. Computational molecular networks and network pharmacology[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017(1):7573904
- [10] Wang Y, Lin W, Li C, et al. Multipronged therapeutic effects of Chinese herbal medicine Qishenyiqi in the treatment of acute myocardial infarction[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(2):98
- [11] Gao L, Wang X D, Niu Y Y, et al. Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(4):24944
- [12] 杨洁,韩为东,赵亚力.雌激素与乳腺癌[J].*现代肿瘤医学*, 2007, 15(3):431
- [13] 刘晓霞,翟曜耀,赵越.雌激素受体 ER α 的功能调控及相关疾病的研究进展[J].*中国细胞生物学学报*,2011,33(1):65
- [14] Rochelle B, Luke W. Altered Hsp90 function in cancer:A unique therapeutic opportunity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(8):1021
- [15] 张柯基,张凤春.乳腺癌 ER 信号途径中 HSP90 作用之研究进展——一种乳腺癌新的靶向治疗思路的理论基础[J].*现代肿瘤医学*,2007,15(2):270
- [16] Pick E, Kluger Y, Giltane J M, et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7):2932
- [17] 杨新苗,洪小南,胡夕春.环氧化酶-2 与乳腺癌关系的研究进展[J].*中国癌症杂志*,2004,14(6):80
- [18] 林艳,匡文斌,吴碧涛,等.肝细胞生长因子通过上调环氧合酶 2 表达增强乳腺癌细胞的侵袭能力[J].*肿瘤*,2015,35(7):732
- [19] Qin G, Xu F, Qin T, et al. Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39):41794
- [20] Harris R E, Chlebowski R T, Jackson R D, et al. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs:prospectively results from the Women's Health Initiative[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18):6096

(2018-11-14 收稿)

(上接第 315 页)

- CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1):16
- [5] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(5):362
- [6] Zhai H Y, Zhao C, Zhang N, et al. Alkaloids from pachysandra terminalis inhibit breast cancer invasion and have potential for development as antimetastasis therapeutic agents[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(7):1305
- [7] Jin M N, Ma S N, Zhai H Y, et al. A new megastigmane alkaloid from pachysandra terminalis with antitumor metastasis effect[J]. *Chem Nat Comp*, 2015, 51(2):311
- [8] Fang H J, Shou X A, Liu Q, et al. Synthesis and anti-metastatic effects of novel chiral ionone alkaloid derivatives[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 101(28):245
- [9] Millis J R, Lau M K. Alternative pathways to adipic acid by combined fermentation and catalytic methods: US20150225329[P]. 2015
- [10] Josefina A, Elisabetta B, Claudio F, et al. Chem inform abstract: lipase-mediated synthesis of the enantiomeric forms of 4,5-Epoxy-4,5-di-Hydro- α -ionone and 5,6-Epoxy-5,6-dihydro- β -ionone. A new direct access to enantiopure(R)-and(S)- α -ionone[J]. *Chem-inform*, 1999, 30 (24):187
- [11] Sato S, Fukuda Y, Ogura Y, et al. Synthesis of two epimeric secosteroids, strophasterols A and B[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 129(36):10911
- [12] Mori K, Yang C Y. Pheromone synthesis. Part 259: Synthesis of seven methyl-branched hydrocarbons as the pheromone candidates for female Korean apricot wasp, *Eurytomamaslovskii* [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(30): 4593

(2018-11-13 收稿)