

基于网络药理学分析瑞香素抗多种肿瘤的作用机制及体外实验验证

冯松¹, 张小东², 覃亚亚², 彭彬^{1*}

¹川北医学院; ²川北医学院附属医院, 南充 637000

摘要: 基于网络药理学预测瑞香素抗恶性胶质瘤、肝癌和三阴性乳腺癌的共同靶点及可能机制, 并对其进行体外实验验证。利用 Swiss Target Prediction 和 GeneCards 等数据库检索瑞香素与恶性胶质瘤、肝癌和三阴性乳腺癌的共同靶点。使用 Cytoscape 构建瑞香素-三种肿瘤蛋白质相互作用网络图 (PPI) 并筛选出核心靶点, 并对核心靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析; 通过 AutoDock Tools 对瑞香素与核心靶点进行分子对接。体外实验验证: 采用 CCK-8 和 Western blot 法行体外实验验证不同浓度瑞香素对 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞系细胞抑制率和 P53、RRM2 蛋白的表达水平的影响。共筛选出瑞香素抗三种肿瘤核心靶点 56 个, 富集分析显示靶点富集在 P53 通路和癌症通路, 参与细胞周期调节、细胞凋亡、DNA 生物合成和修复等生物过程; 分子对接结果显示瑞香素与 P53、RRM2 有较好的结合作用。体外验证实验显示, 与对照组比较, 瑞香素能显著抑制 U-251 MG、HepG-2、MDA-MB231 的增殖 ($P < 0.01$), 并显著上调其 P53 蛋白及下调 RRM2 蛋白的表达, 且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。我们的结果提示瑞香素能抑制 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞增殖, 其机制可能与调控 P53/RRM2 通路有关。

关键词: 瑞香素; 网络药理学; 恶性胶质瘤; 肝癌; 三阴性乳腺癌

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)1-0144-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.1.018

Study on the anti-tumor mechanism of daphnetin based on network pharmacology analysis and experimental verification *in vitro*

FENG Song¹, ZHANG Xiao-dong², QIN Ya-ya², PENG Bin^{1*}

¹North Sichuan Medical College; ²Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

Abstract: In this study, network pharmacology prediction and *in vitro* experimental verification were used to explore the common targets and possible mechanisms of daphnetin against malignant glioma, liver cancer and triple-negative breast cancer. The targets of daphnetin and malignant glioma, hepatocellular carcinoma and triple negative breast cancer were retrieved by using Swiss Target Prediction and GeneCards database, respectively. The protein-protein interaction network between daphnetin and three kinds of tumors was constructed by using Cytoscape, and the core targets were screened. GO and KEGG enrichment analysis was performed on the core targets. The molecular docking study of daphnetin with core targets were carried out using the AutoDock Tools. CCK-8 and Western blot were used to verify the effects of daphnetin on the cell inhibition rate and the protein expression levels of p53 and RRM2 in U-251MG, HepG-2 and MDA-MB231 cell lines. 56 core targets of daphnetin against three kinds of tumor were screened. Enrichment analysis showed that the core targets were enriched in p53 pathway and cancer pathway and involved in biological processes such as cell cycle regulation, apoptosis, DNA biosynthesis and repair. Molecular docking results showed that daphnetin strongly bound with P53 and RRM2. *In vitro* results showed that Daphnetin significantly inhibited U-251 MG, HepG-2, MDA-MB231 proliferation ($P < 0.01$), up-regulated P53 protein expression and down-regulated RRM2 expression in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Our results suggested that daphnetin can inhibit the proliferation of U-251MG, HepG-2 and MDA-MB231 cells, and its mechanism may be related to the regulation of p53/

收稿日期: 2021-04-20 接受日期: 2021-08-17

基金项目: 川北医学院国家预科研项目 (CBY19-YZ12); 南充市学校科技战略合作 (19SXHZ0106); 川北医学院附属医院研发项目 (2020ZD003)

* 通信作者 Tel: 86-018090588857; E-mail: binpeng01@sina.com

RRM2 pathway.

Key words: daphnetin; network pharmacology; malignant glioma; hepatocellular carcinoma; triple negative breast cancer

瑞香素提取于瑞香属植物,为我国首创的天然药物单体^[1],因其具有抗凝作用,目前临床主要用于心血管疾病治疗。另外,大量研究表明瑞香素对多种肿瘤细胞有抑制作用,其机制包括通过 MAPK1/2-JNK1/2-Akt 通路抑制乳腺癌、作用于 Bcl-2/Bax 靶点进而抑制肝癌、通过 Akt/NF- κ B 通路抑制肺腺癌^[2]、通过 AMPK/Akt/mTOR 通路抑制卵巢癌^[3],瑞香素抗肿瘤作用的靶点及通路有一定共通性。肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病,其发病率逐年上升。其中肝癌是致死性最高的恶性肿瘤^[4];三阴性乳腺癌是女性乳腺癌中恶性程度较高,且治疗困难的一种^[5];恶性胶质瘤是致残、致死率均高的神经系统恶性肿瘤^[6]。既往研究表明瑞香素有明确的抗多种肿瘤的作用,但其抗肿瘤作用是否存在共同的靶点或通路尚未见报道。因此,本研究拟通过网络药理学预测瑞香素治疗恶性胶质瘤、肝癌、三阴性乳腺癌的共同靶点或通路,并对其进行体外实验验证,为瑞香素在抗肿瘤中的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学预测瑞香素抗胶质瘤、肝癌、乳腺癌的共同靶点及通路

通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询瑞香素 (daphnetin) 的二维结构,使用 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测瑞香素的潜在作用靶点,剔除其中可能性为“0”的靶点。

通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中搜索“Malignant Glioma”、“Adult Hepatocellular Carcinoma”、“Triple Negative Breast Neoplasms”,分别检索出恶性胶质瘤、肝癌和三阴性乳腺癌的靶点,去除 relevance score < 10 的靶点。上述靶点取交集,得到三种肿瘤共同靶点。

将三种肿瘤交集靶点和瑞香素预测靶点分别输入到 Cytoscape (version 3.7.1) 中,用该软件构建瑞香素-三种肿瘤蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 图。使用“Cyto NCA”插件,根据“degree、betweenness、closeness”数据筛选出核心靶点。

将筛选出的核心靶点导入 Metascape 数据库

(<https://metascape.org>),对瑞香素抗肿瘤靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。以 $P < 0.01$ 作为筛选标准。

分子对接实验,将瑞香素三维结构导入 ChemBio3D Ultra 14.0 进行能量最小化, AutodockTools 1.5.6 进行加氢、计算电荷、分配电荷、设置可旋转键。从 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库下载关键靶点蛋白,使用 Pymol 2.3.0 去除蛋白结晶水、原始配体等,将蛋白结构导入 AutodockTools 1.5.6 进行加氢、计算电荷、分配电荷、指定原子类型。采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行对接。结果利用 PyMOL 2.3.0 和 LigplotV 2.1 进行相互作用模式分析。

根据人类蛋白图谱数据库 (www.proteinatlas.org),筛选出 RRM2 表达较高的细胞系。

1.2 体外实验验证

1.2.1 细胞、试剂与仪器

恶性胶质瘤细胞株 (U-251 MG)、肝癌细胞株 (HepG-2)、三阴性乳腺癌细胞株 (MDA-MB231) 由川北医学院基础医学院创新平台提供。瑞香素 (北京索莱宝科技公司); DMEM 培养基 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); CCK-8 试剂盒、P53、RRM2 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 羊抗兔 IgG 抗体 (北京华兴博创生物技术中心); 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); Bio-Rad 全自动酶标仪、Bio-Rad chemiDoc XRS + 化学发光凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad)。

1.2.2 细胞培养

上述肿瘤细胞使用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素的培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,于倒置显微镜观察细胞生长情况,取对数生长期细胞做后续实验。

1.2.3 CCK8 法检测细胞抑制率

分别将 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞以每孔 5×10^3 细胞 (100 μ L 悬液) 接种于 96 孔板中,各接种 15 孔。于 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h 后,每种细胞分别加入含瑞香素浓度为 0 (对照组)、10、20、40 和 80 μ g/mL 完全培养基 100 μ L,各设 3 复孔。于 48 h 后,每孔加 90 μ L 无血清 DMEM 及 10 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h,后用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度,实验重复 3 次。

细胞抑制率 = $[1 - (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$

1.2.4 Western blot 检测 P53、RRM2

分别用 0(对照组)、40 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瑞香素处理 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞 48 h 后,加入适量的 RIPA 裂解细胞提取蛋白,BCA 法蛋白定量,样品在 10% SDS-PAGE 行电泳,然后电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭,P53、RRM2 和 GAPDH 兔来源一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 h 后,山羊抗兔二抗于室温孵育 2 h,发光试剂(ECL)显影,凝胶成像系统成像,其结果用软件 Image J 进行分析。

1.3 统计学方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 23.0 统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

将瑞香素的结构(见图 1)导入 Swiss Target Prediction 数据库预测得到瑞香素潜在靶点 100 个,其中 Probability 为 0 的有 43 个,删除该靶点,得到有效治疗靶点 57 个。

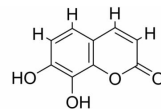


图 1 瑞香素的结构

Fig. 1 Structure of daphnetin

通过 GeneCards 数据库筛选得到恶性胶质瘤靶基因 426 个、肝癌靶基因 886 个和三阴性乳腺癌靶基因 1197 个,所得到的靶基因取交集后得到三种肿瘤的共同靶基因 253 个(见图 2)。

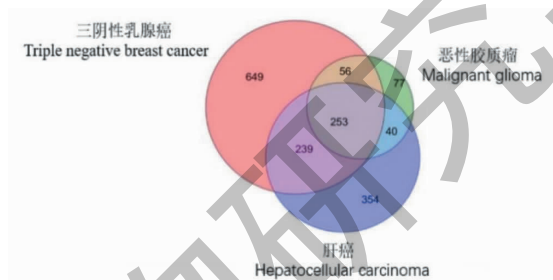


图 2 恶性胶质瘤、肝癌、三阴性乳腺癌靶点交集的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of intersection targets of malignant glioma, hepatocellular carcinoma and triple-negative breast cancer

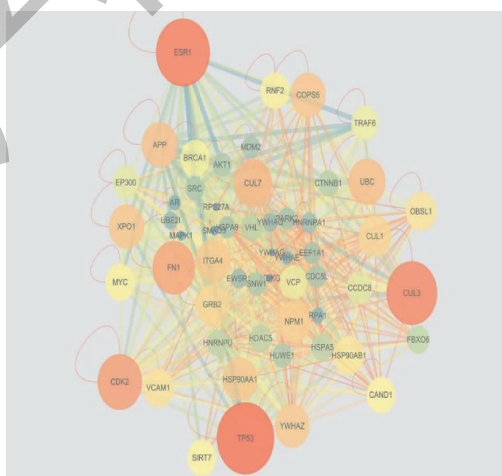


图 3 瑞香素潜在治疗恶性胶质瘤、肝癌及三阴性乳腺癌共同作用靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network of potential therapeutic targets of daphnetin for malignant glioma, hepatocellular carcinoma and triple-negative breast cancer

注:以节点大小和颜色深浅标识靶点连接度。Note: The node size and color in the figure indicate the target connectivity. The larger the node, the deeper the color, and the higher the connectivity.

用 Cytoscape 构建瑞香素-三种肿瘤 PPI 图,筛选出 P53、ESR1、CUL3、MCM2、CDK2 等 56 个基因为瑞香素抗三种肿瘤的核心靶点(见图 3)。

对这 56 个核心靶点进行 GO 富集分析,发现瑞

香素抗三种肿瘤的机制主要与细胞周期的调节、促进细胞凋亡以及 DNA 的合成和修复等生物过程有关(见图 4)。

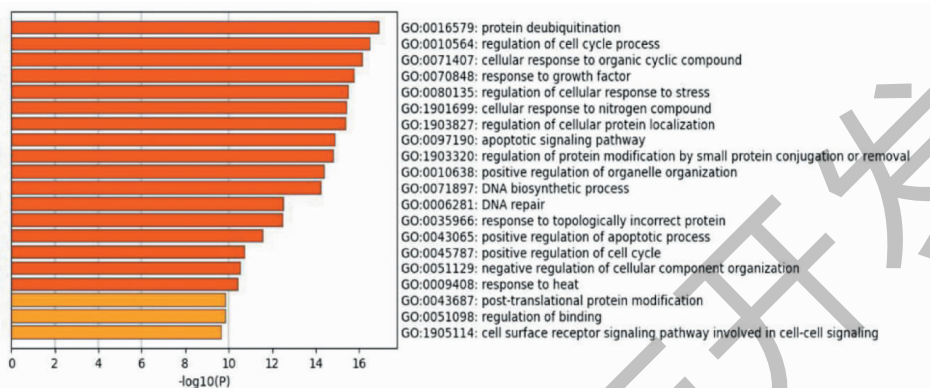


图 4 GO 功能富集分析图

Fig. 4 GO functional enrichment analysis diagram

对瑞香素与恶性胶质瘤、肝癌、三阴性乳腺癌相关靶点交集基因的 KEGG 通路富集分析结果显示,

P53 通路及癌症通路为瑞香素抗肿瘤的主要通路(见图 5)。

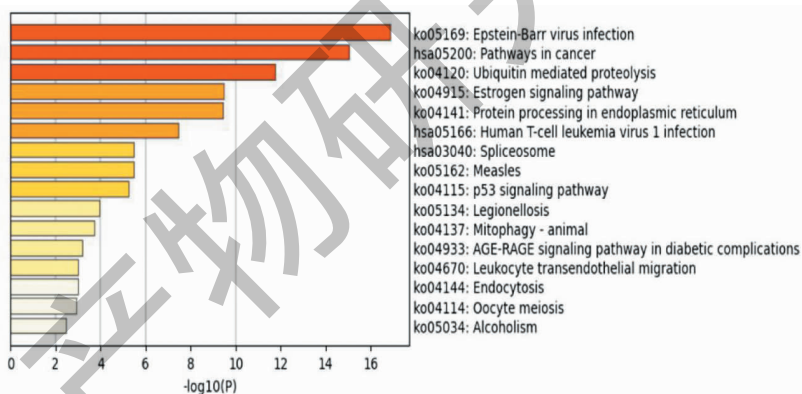


图 5 KEGG 通路富集分析图

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis diagram

通过 KEGG 数据库查询到的 P53 通路图显示 P53R2 是 DNA 修复的重要通路(见图 6)。在 KEGG 数据库及网络药理学分析中认为 P53R2 即为 RRM2^[7],而核糖核酸还原酶 M2 亚基(ribonucleotide reductase subunit M2, RRM2)是调控 DNA 合成和修复的关键酶亚基^[8]。

通过 cBioPortal 数据库分析显示 RRM2 在恶性胶质瘤、肝癌和乳腺癌中高表达(见图 7)。因此我们选择对 P53/RRM2 通路进行实验验证,明确其是否是瑞香素抗三种肿瘤的共同通路。

分子对接结果显示,瑞香素与 P53 蛋白的结合

能为-5.7 kcal/mol,其主要是通过形成氢键以及疏水作用力,与 Arg267(A)、Ser99(A)形成 3 个氢键,氢键长度分别为 3.19、3.18、3.21 Å;与 Leu264(A)、Ile254(A)、Pro98(A)、Thr256(A)具有疏水作用。瑞香素与 RRM2 蛋白的结合能为-6.7 kcal/mol,其主要是通过形成氢键以及疏水作用力,与 Tyr323(A)、Arg330(A)分别形成 4 个氢键,氢键长度分别为 2.87、3.19、2.80、3.24 Å;与 Val327(A)、Ser263(A)、Phe240(A)、Met350(A)、Gly267(A)、Gly233(A)、Gys270(A)具有疏水作用。提示瑞香素与 P53 及 RRM2 均具有较好的结合作用(见图 8、9)。

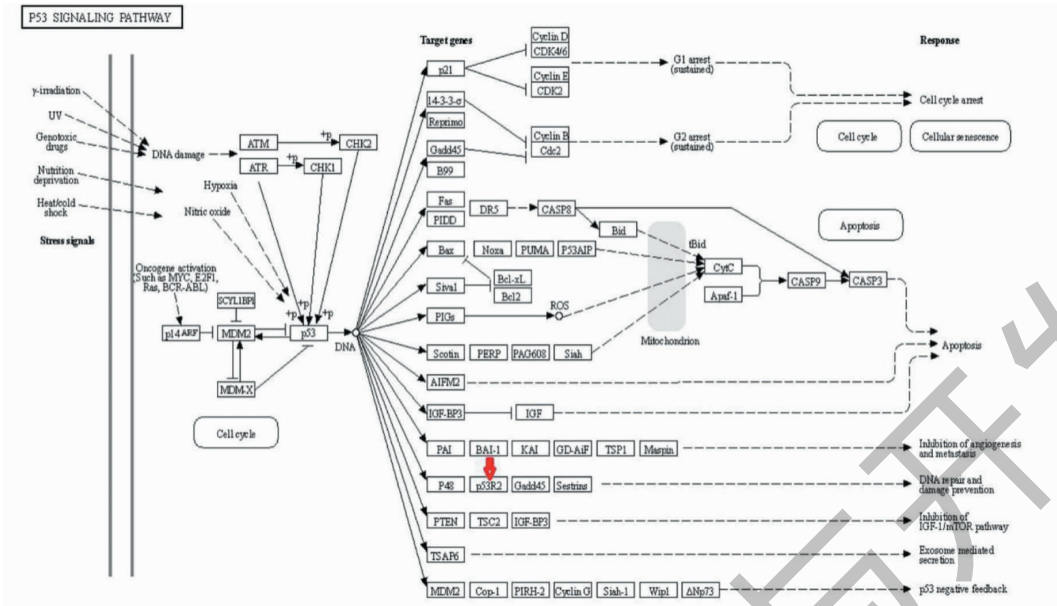


图 6 P53 通路图

Fig. 6 P53 pathways in KEGG database

注:红色箭头表示 p53R2 (P53/RRM2) 通路。Note: The red arrow indicates the p53R2 (p53/RRM2) pathway.

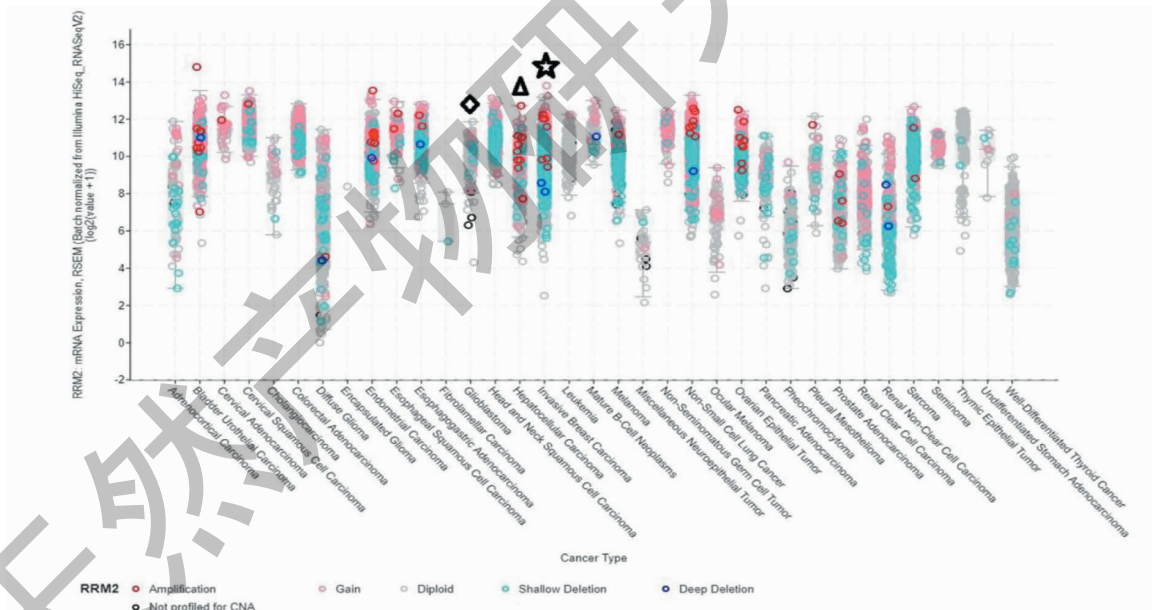


图 7 cBioPortal 数据库中 RRM2 mRNA 在不同肿瘤的表达水平

Fig. 7 Expression level of RRM2 mRNA in different cancer in cBioPortal database

注:◇:恶性胶质瘤;△:肝癌;☆:乳腺癌。Note:◇: Malignant glioma; △: Hepatocellular carcinoma; ☆: Breast carcinoma.

通过人类蛋白图谱数据库获得 RRM2 在正常组织(见图 10A)和肿瘤细胞系(见图 10B)中的表达水平。从中筛选出 RRM2 较正常脑组织和肝组织表达较高的 U-251 MG、HepG-2 细胞系。另外, Yun 等研究显示乳腺癌中 MDA-MB231 细胞系的

RRM2 表达较高^[9], 因此我们选择上述三个细胞系进行后续体外验证实验。

2.2 瑞香素对肿瘤细胞增殖的影响

与对照组比较,瑞香素(10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 处理肿瘤细胞 48 h 后,能显著抑制 U-251 MG、

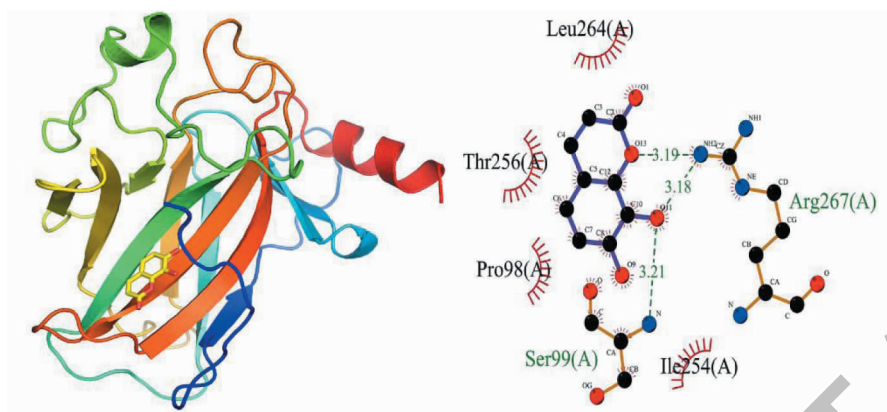


图8 瑞香素与 P53 蛋白对接图

Fig. 8 The molecular docking diagram of daphnetin with P53 protein

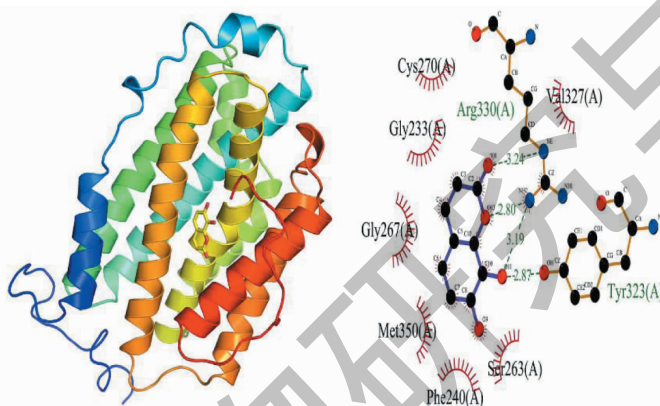


图9 瑞香素与 RRM2 蛋白对接图

Fig. 9 The molecular docking diagram of daphnetin and RRM2 protein

HepG-2、MDA-MB231 细胞增殖,且呈剂量依赖性。瑞香素为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,三个细胞系间,抑制率无明显差异;瑞香素为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,U-251 MG 的抑制率较 HepG-2、MDA-MB231 高 ($P < 0.05$),HepG-2 和 MDA-MB231 的抑制率无明显差异;瑞香素为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,三个细胞系间,抑制率差异明显 ($P < 0.01$),以 HepG-2 抑制率最高;瑞香素为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,HepG-2 抑制率最高,与 U-251 MG、MDA-MB231 差异明显 ($P < 0.01$),而 U-251 MG 和 MDA-MB231 抑制率无明显差异(见图 11)。

2.3 瑞香素对肿瘤细胞 P53 和 RRM2 蛋白表达的影响

与对照组比较,40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瑞香素处理 U-251 MG、HepG-2、MDA-B231 细胞 48 h 后,P53 表达均显著增高 ($P < 0.01$),RRM2 的表达均显著降低 ($P < 0.05$)。与 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瑞香素处理 U-251 MG、HepG-2、MDA-MB231 细胞 48

h 后,P53 表达均显著增高 ($P < 0.01$),RRM2 的表达均显著降低 ($P < 0.05$)。瑞香素为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,U251-MG 细胞系中 RRM2 的表达量与 MDA-MB231 细胞系间差异明显 ($P < 0.05$),而 HepG-2 和 MDA-MB231 细胞系间 RRM2 的表达量无明显差异;瑞香素为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,三个细胞系间 RRM2 的表达量无明显差异。瑞香素为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,三个细胞系间 P53 表达量无明显差异;HepG-2 抑制率最高;瑞香素为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,U-251 MG 细胞系中 P53 的表达量与 HepG-2 和 MDA-MB231 差异明显 ($P < 0.05$),而 HepG-2 和 MDA-MB231 细胞系中 P53 的表达量无明显差异(见图 12)。

3 讨论与结论

本研究首先采用网络药理学分析,发现 P53 通路是瑞香素抗恶性胶质瘤、肝癌和乳腺癌的共同通路。同时,本研究通过体外验证实验发现瑞香素在浓度为 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均能显著抑制 U-251 MG、

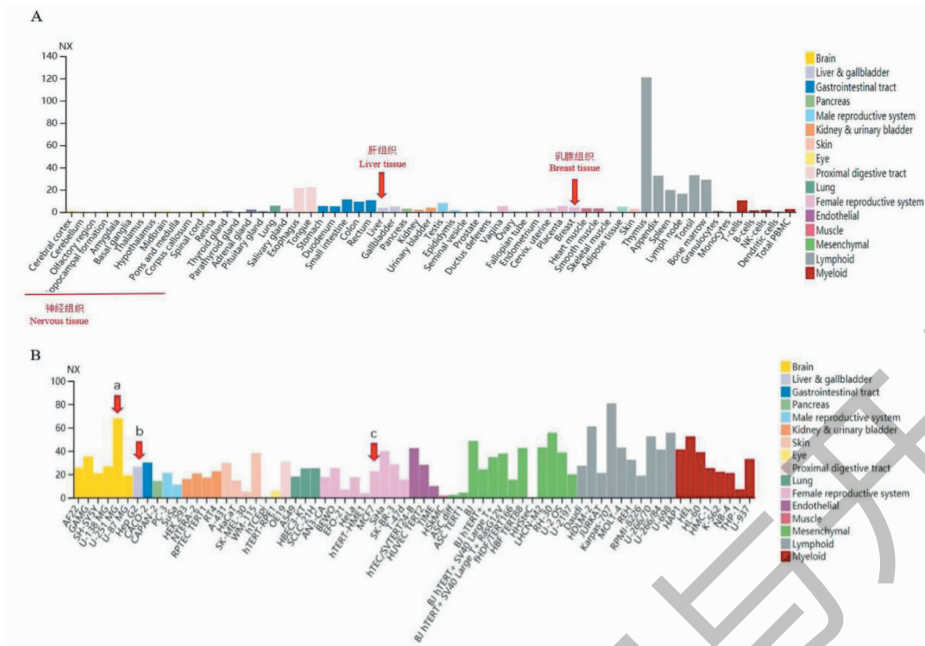


图 10 人蛋白质数据库中 RRM2 在不同组织中的表达水平

Fig. 10 The expression of RRM2 in different tissues in human protein database

注: A: 正常组织; B: 肿瘤细胞系 (a: 胶质瘤 U-251 MG 细胞系; b: 肝癌 HepG-2 细胞系; c: 乳腺癌)。Note: A: Normal tissue; B: Tumor cell lines (a: Glioma cell line U251-MG; b: Hepatocellular carcinoma cell line HepG-2; c: Breast carcinoma).

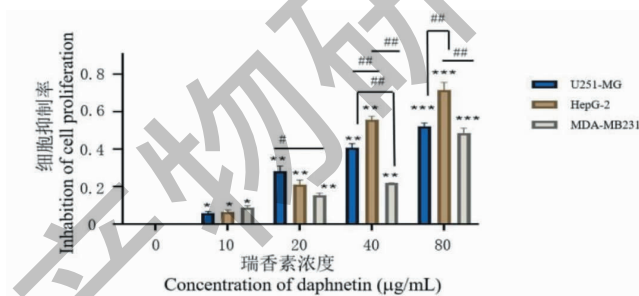


图 11 不同浓度瑞香素对肿瘤细胞的抑制率 ($n = 3$)

Fig. 11 Inhibitory rate of daphnetin at different concentrations on tumor cells ($n = 3$)

注: 与对照组比较 (相同细胞系内), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 不同细胞系间比较 (相同浓度瑞香素), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group in the same cell line, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Comparison of different cell lines treated with daphnetin at the same concentration, # $P < 0.05$.

HepG-2 及 MDA-MB231 三种细胞的增殖, 并显著提高这三种肿瘤细胞中 P53 蛋白的表达水平。P53 是重要的抑癌基因, 其机制主要包括细胞周期阻滞、促进肿瘤细胞衰老和凋亡、抑制血管生成和肿瘤转移以及促进 DNA 合成和修复和调节等^[10]。我们的研究表明瑞香素可增加上述三种肿瘤细胞中 P53 表达, 进而发挥抑癌作用。RRM2 是 P53 通路中调控 DNA 合成和修复的关键酶, 且在 P53 通路中富集^[11]。大量研究也证明 P53 能通过 RRM2 调控细胞周期、DNA 合成及修复, 并诱导肿瘤细胞凋

亡^[12]。因此 RRM2 成为多种肿瘤治疗的重要靶点^[13]。

结果发现, 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的瑞香素处理 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞后, 其 RRM2 蛋白表达均显著降低。RRM2 为核糖核酸还原酶 (ribonucleotide reductase, RR) 中最重要的亚基, 是生物体内催化 DNA 合成和修复的关键酶^[14]。目前研究表明 RRM2 在胶质瘤、乳腺癌、肝癌等疾病中高表达, 是肿瘤治疗的靶点^[11, 15, 16], 其与肿瘤细胞的侵袭转移能力、药物抵抗和细胞周期调控等相关^[15, 17, 18]。

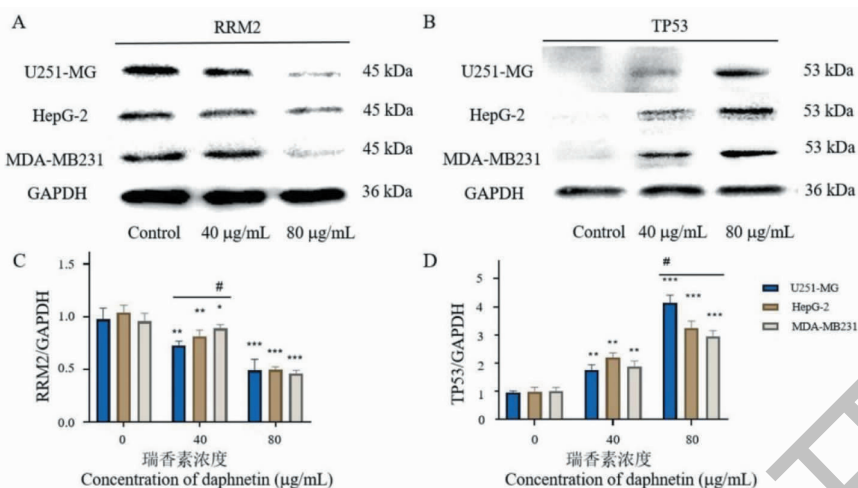


图 12 瑞香素对 U-251 MG、HepG-2 和 MDA-MB231 细胞中 P53 和 RRM2 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 12 Effect of daphnetin on p53 and RRM2 protein expression in U-251 MG, HepG-2 and MDA-MB231 cells ($n = 3$)

注: A 表示瑞香素(0, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$)处理 48 h 后 RRM2 蛋白质印迹条带; B 表示瑞香素(0, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$)处理 48 h 后 P53 蛋白质印迹条带; C、D 分别表示 RRM2 和 P53 与内参 GAPDH 的比率。与对照组比较(相同细胞系内), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 不同细胞系间比较(相同浓度瑞香素), # $P < 0.05$ 。Note: After treatment with daphnetin (0, 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, A and B showed Western blot bands of RRM2 and p53, respectively; C and D showed the ratio of RRM2 and p53 to GAPDH, respectively. Compared with the control group in the same cell line, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Comparison of different cell lines treated with daphnetin at the same concentration, # $P < 0.05$.

RRM2 含酪氨酸氨基酸及 Fe-S 基团,故目前所开发的靶向药物多是基于上述靶点开发,如自由基清除剂、铁螯合剂、铁类似物等,部分 RRM2 抑制剂已应用于肿瘤的临床治疗^[19],但有血液-淋巴系统代谢紊乱,肝肾功能失调,胃肠道反应等多种副作用^[20]。瑞香素是一种具有铁螯合功能的天然植物活性成分,已有研究发现瑞香素可抑制疟原虫中 RR 活性及表达^[21],我们的结果进一步证明瑞香素能抑制多种人体肿瘤细胞中 RRM2 蛋白的表达。因 RRM2 在 DNA 复制与修复中的重要作用,推测瑞香素能抑制多种肿瘤细胞,与其调控 RRM2 的表达密切相关。瑞香素可作为一种新的 RRM2 抑制剂应用于肿瘤的治疗,且具有安全性高、分布广等特点^[22]。

综上所述,我们的结果表明瑞香素可抑制 U-251 MG、HepG-2、MDA-MB231 细胞系增殖,瑞香素与 P53 及 RRM2 有较好的结合能力。瑞香素抗多种肿瘤的机制可能与 P53/RRM2 通路有关。瑞香素可作为一种新的 RRM2 抑制剂,极具开发前景。

参考文献

1 Li S, Li YX, Emmanuel MN, et al. Daphnetin and an oxazole compound inhibit indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 12: 2128-

2132.
2 Han S, Li LZ, Song SJ. *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae): Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses [J]. Phytochemistry, 2020, 171: 112231.
3 Fan XY, Xie M, Zhao FJ, et al. Daphnetin triggers ROS-induced cell death and induces cytoprotective autophagy by modulating the AMPK/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer [J]. Phytomedicine, 2021, 82: 153465.
4 Anwanwan D, Singh SK, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873: 188314.
5 Khosravi-Shahi P, Cabezon-Gutiérrez L, Custodio-Cabello S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2018, 14(1): 32-39.
6 Reitman ZJ, Winkler F, Elia AEH. New directions in the treatment of glioblastoma [J]. Semin Neurol, 2018, 38(1): 50-61.
7 Sun QQ, Liu P, Long B, et al. Screening of significant biomarkers with poor prognosis in hepatocellular carcinoma via bioinformatics analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(32): e21702.
8 Chen G, Luo Y, Warncke K, et al. Acetylation regulates ribonucleotide reductase activity and cancer cell growth [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3213.

- 9 Yun HJ, Cho YH, Moon Y, et al. Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2 [J]. *Exp Mol Med*, 2008, 40: 345-353.
- 10 Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 104-113.
- 11 Zhou ZY, Li YZ, Hao HY, et al. Screening hub genes as prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma by bioinformatics analysis [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(1-suppl): 76S-86S.
- 12 He ZF, Hu X, Liu WJ, et al. P53 suppresses ribonucleotide reductase via inhibiting mTORC1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 41422-41431.
- 13 Aye Y, Li M, Long MJ, et al. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 2011-2021.
- 14 Zou Y, Li WZ, Zhou J, et al. ERK inhibitor enhances everolimus efficacy through the attenuation of dNTP pools in renal cell carcinoma [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 550-561.
- 15 Sun HZ, Yang BY, Zhang H, et al. RRM2 is a potential prognostic biomarker with functional significance in glioma [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15: 533-543.
- 16 Quan DL, Chen K, Zhang JR, et al. Identification of lncRNA NEAT1/miR-21/RRM2 axis as a novel biomarker in breast cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 235: 3372-3381.
- 17 Li JF, Pang JL, Liu YD, et al. Suppression of RRM2 inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest and promotes the apoptosis of human neuroblastoma cells and in human neuroblastoma RRM2 is suppressed following chemotherapy [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40: 355-360.
- 18 Li C, Zheng JF, Chen S, et al. RRM2 promotes the progression of human glioblastoma [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 6759-6767.
- 19 Mannargudi MB, Deb S. Clinical pharmacology and clinical trials of ribonucleotide reductase inhibitors: is it a viable cancer therapy [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143: 1499-1529.
- 20 Botzenhardt S, Li N, Chan EW, et al. Safety profiles of iron chelators in young patients with haemoglobinopathies [J]. *Eur J Haematol*, 2017, 98(3): 198-217.
- 21 Huang F, Tang LH, Chen B, et al. In vitro effect of daphnetin on cytochrome C oxidase and ribonucleotide reductase of *Plasmodium falciparum* [J]. *Chin J Parasitol Parasitic Dis* (中国寄生虫学与寄生虫病杂志), 2006, 24(3): 179-182.
- 22 Zou WW, Shu Q, Fu YY, et al. Toxicology of daphnetin [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2013, 35: 908-914.