

# 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的蒲公英化学成分分析及其抗癌机制的网络药理学研究

张松保<sup>1†</sup>, 孔令婕<sup>2†</sup>, 谷巍<sup>1,3\*</sup>, 李超<sup>4\*</sup>, 邱蓉丽<sup>1</sup>, 巢建国<sup>1</sup>, 裴凌峰<sup>1</sup>, 郭彦芳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京中医药大学, 南京 210023; <sup>2</sup>正大天晴药业集团股份有限公司, 南京 211122;

<sup>3</sup>江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023; <sup>4</sup>济川药业集团有限公司, 泰州 225441

**摘要:**为了探究蒲公英主要成分,分析其抗癌的可能机制及作用靶点,借助 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对蒲公英提取物进行分析,利用 SwissADME、Swiss Target Prediction 和 GeneCards 数据库获取蒲公英主要活性成分和抗癌的作用靶点,通过 String 在线数据库构建靶蛋白相互作用网络,并利用 DVIAD 在线数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。最终从蒲公英提取物中共鉴定出 29 个化合物,主要包括有机酸类、黄酮类等化学成分,筛选到 10 个活性成分,成分-疾病的共同靶点 84 个。网络分析显示,主要活性成分为槲皮素、木犀草素、芹菜素等,关键靶点为 AKT1、EGFR、SRC、ESR1、PTGS2、MMP9、KDR、MMP2、PIK3R1,并且涉及氧化-还原、负调控凋亡、蛋白质自磷酸化、ATP 结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酶结合等过程,和癌症通路、癌症蛋白聚糖、PI3K- Akt 信号通路等通路。综上,蒲公英是通过多成分、多靶点、多途径来发挥抗癌作用的。

**关键词:**蒲公英;HPLC-Q-TOF-MS/MS;成分分析;抗癌;网络药理学

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)2-0305-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.2.016

## Chemical composition analysis of *Taraxacum mongolicum* based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology study on its anticancer mechanism

ZHANG Song-bao<sup>1†</sup>, KONG Ling-jie<sup>2†</sup>, GU Wei<sup>1,3\*</sup>,

LI Chao<sup>4\*</sup>, QIU Rong-li<sup>1</sup>, CHAO Jian-guo<sup>1</sup>, PEI Ling-feng<sup>1</sup>, GUO Yan-fang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

<sup>2</sup>Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 211122, China;

<sup>3</sup>Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China;

<sup>4</sup>Jumpean Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou 225441, China

**Abstract:** To identify and analyze the main ingredients of *Taraxacum mongolicum* and to explore its therapeutic targets for cancer, HPLC-Q-TOF-MS/MS was used to analyze the extract in *T. mongolicum*. The active components of the *T. mongolicum* and the targets for anticancer were screened and predicted by SwissADME, Swiss target prediction and Genecards database. A target protein interaction network was constructed through the String online database, and the GO and KEGG enrichment analysis on key targets were performed by the DVIAD online database. Finally, a total of 29 compounds were identified from extract, including organic acids, flavonoids and other chemical components. Ten active ingredients were obtained, and 84 common targets for ingredients and diseases were screened. Further network analysis showed the main active ingredients including quercetin, luteolin, apigenin. The key targets were AKT1, EGFR, SRC, ESR1, PTGS2, MMP9, KDR, MMP2 and PIK3R1. In addition, the main process involved oxidation-reduction process, negative regulation of apoptotic process, protein autophosphorylation, ATP binding, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, enzyme binding, and the main pathway

收稿日期:2021-01-12

接受日期:2021-12-17

基金项目:中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查”(财社[2019]39号);国家重点研发计划(2018YFC1706902)

† 共同第一作者

\* 通信作者 E-mail: guwei9926@126.com, lc5358583@163.com

included pathways in cancer, proteoglycans in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, etc. In summary, *T. mongolicum* plays a role in anticancer through multi-component, multi-target, and multi-pathways.

**Key words:** *Taraxacum mongolicum*; HPLC-Q-TOF-MS/MS; component analysis; anticancer; network pharmacology

蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz.) 为菊科蒲公英属多年生草本植物, 味苦、甘, 性微寒, 归肝、胃经, 具清热解毒、消肿散结和利尿通淋之功效。在中医上多用于治疗疔疮肿毒、乳痈、瘰疬、目赤肿痛、咽痛、肺痈、肠痈、湿热黄疸和热淋涩痛等症<sup>[1]</sup>。蒲公英含有丰富的酚酸类、黄酮类、萜类等物质, 现代研究表明, 蒲公英具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[2-4]</sup>。

近年来, 癌症已久居我国致死病因的首位, 严重危害人民的健康。蒲公英消肿散结功效常被认为可以用来治疗肿瘤。现代研究表明蒲公英具有一定的抗肿瘤效果, 能够有效抑制多种肿瘤细胞的增殖。Takasaki 等<sup>[5]</sup>进行了蒲公英根提取物抗小鼠皮肤肿瘤研究, 结果表明蒲公英提取物具有有效的抑制作用。Zhan 等<sup>[6]</sup>研究发现蒲公英提取物可能有降低胃癌细胞 p53 的阳性表达的能力。Zhu 等<sup>[7]</sup>进行了蒲公英根提取物对胃癌的治疗作用, 发现蒲公英根提取物可通过抑制肿瘤细胞的增殖和迁移对胃癌进行治疗。还有多名学者研究结果均表明蒲公英具有良好的抗肿瘤作用<sup>[8,9]</sup>。综上所述, 蒲公英具有显著的抗肿瘤活性, 可用于开发抗肿瘤药物。

中药具有成分多样, 作用靶点众多, 并且不同靶点间还存在协同作用, 如何阐述中药的作用机制, 成为了阻碍中药发展的重大问题。网络药理学是采用高通量筛选, 运用网络可视化及网络分析等多种技术, 用以揭示药物、靶点、疾病间复杂的网络关系, 从多维度理解药物的作用机制, 这为中药研究中的多成分多靶点作用机制研究提供新的研究思路, 近年来被广泛用于中药研究中, 而蒲公英相关研究未见报道。蒲公英中化学成分众多, 采取传统的分析手段对其化学成分进行分析, 分析步骤繁琐、时间长<sup>[10]</sup>。HPLC-Q-TOF-MS/MS 具有高分辨率、高分离度、高灵敏度等优点, 该方法先通过液相色谱对蒲公英中的化合物进行分离, 后通过质谱对分离的化合物进行分析, 最后根据质谱信息对化合物进行定性, 实现中药成分的快速分析。

因此, 本研究首先通过采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 对蒲公英化学成分快速分析。在此基础上, 充分利用网络药理学分析技术, 从药物、化学成

分、靶点、疾病间相互作用的整体性和系统性出发, 探究蒲公英的抗癌作用机制, 为蒲公英在癌症预防及治疗研究中提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

LC-20ADXR 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司); Triple-TOF5600 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); TD5002A 电子天平(天津市天马仪器厂); KQ-500B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); 3-18K 离心机(德国 Sigma 公司); Q Direct8 超纯水仪(美国 MerckMilli 公司)。甲醇(色谱纯)中国 TE-DIA 公司、甲酸(色谱纯)上海 aladdin 公司、乙腈(色谱纯)中国 Meker 公司; 超纯水自制。

木犀草素对照品(批号: JBZ-0772)、异绿原酸 A 对照品(2450-53-5; 批号: JBZ-1451)、异鼠李素对照品(批号: JBZ-1422)、绿原酸对照品(批号: lw18022809)、咖啡酸对照品(批号: lw18013006)、菊苣酸对照品(批号: lw18011501)、芦丁对照品(批号: lw18012501)。其中, 木犀草素、异绿原酸 A、异鼠李素(南京金益柏生物科技有限公司); 绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、芦丁(南京良纬生物科技有限公司)。实验选取产于甘肃的蒲公英药材, 经南京中医药大学谷巍教授鉴定为菊科植物蒲公英(*Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz.) 干燥全草, 相关样品已留样存于南京中医药大学植物标本馆。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 供试品溶液制备

取蒲公英药材干燥样品, 粉碎, 过 60 目筛。精密称取样品粉末 1.0 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 60% 的甲醇 30 mL, 称重。超声 60 min(功率 500 W, 频率 40 kHz)。取出, 放置冷却后, 补足失重。取样品溶液 1 mL 置于 1.5 mL 离心管中, 离心(转速 12 000 rpm) 10 min, 吸取上清液, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

#### 1.2.2 色谱条件

色谱柱: 岛津 ODS  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 洗脱程序: 乙腈(A)和 0.1% 甲酸水(B)。梯度洗脱程序: 0 ~ 2 min, 5%  $\rightarrow$  10% A; 2 ~ 20 min, 10%  $\rightarrow$  21% A; 20 ~ 36 min, 21%  $\rightarrow$  25% A; 36 ~

44 min, 25% → 40% A; 44 ~ 55 min, 40% → 50% A。流速 1 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

### 1.2.3 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式采集数据; 质量扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 500; 喷雾电压 4.5 kV; 雾化气压力 60 psi; 辅助气压力 60 psi; 气帘气压力 40 psi; 离子源温度 600 °C; 锥孔电压为 100 V; 碰撞室射出电压 40 eV。

## 1.3 数据处理

### 1.3.1 化学成分鉴定

通过 Peakview1.2 软件对得到的图谱文件进行分析, 获得相应色谱峰对应化合物的精确相对分子质量及二级质谱信息, 通过查询相关数据库及文献并结合标准品对化合物进行定性分析, 然后在 Pubchem 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中查询相关成分的 Canonical SMILES 号。

### 1.3.2 蒲公英作用靶点预测

通过在 SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 中输入相关化合物的 Canonical SMILES 号, 选取胃肠吸收度高, 类药性优的化合物作为目标化合物, 再将目标化合物的 Canonical SMILES 号上传到 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 选择物种为“Homo Sapiens”, 筛选其中 probability > 0.7 的靶点为目标靶点。

以癌症 (cancer) 为关键字在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中查询与癌症相关的靶点信息, 删去其中 relevance score < 1 的靶点, 剩余作为癌症的作用靶点。再把化合物的目标靶点和

癌症的作用靶点进行比对, 筛选出蒲公英主要活性成分抗癌的潜在靶点。

### 1.3.3 蛋白相互作用网络构建 (PPI) 及核心靶点筛选

将所得蒲公英抗癌的潜在靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>), 选择“Multiple protein”, 物种选择为“Homo Sapiens”进行分析, 将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 获得 PPI 网络图, 并根据节点连接数目 degree 值, 筛选出核心靶点。

### 1.3.4 GO 功能与模块分析、KEGG 富集通路分析

将比对所得的靶点输入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中进行蒲公英抗癌靶点 GO 分类富集分析和 KEGG 通路富集分析。通过 FDR 值筛选相关通路, 并通过在线绘图平台 (<http://www.ehbio.com/ImageGP/>) 进行可视化绘图。

### 1.3.5 成分、靶点、通路作用网络构建。

将分析得到的靶点、信号通路和蒲公英成分相对应, 运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建活性成分-靶点-信号通路网络模型。

## 2 结果与分析

### 2.1 化学成分鉴定

按“1.4.1”项下方法, 对蒲公英的化学成分进行分析, 总离子流图 (TIC) 见图 1, 鉴定出其中 29 个化合物 (见表 1)。这些化合物主要包括有机酸类、黄酮类和香豆素类和萜类。蒲公英含有的有机酸类有没食子酸、香荚兰酸、色氨酸、酒石酸、绿原酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸、咖啡酸、阿魏酸、3,5 二羟基苯甲酸、苯甲酸、苹果酸、异绿原酸 A、菊苣酸、异绿原酸 B。

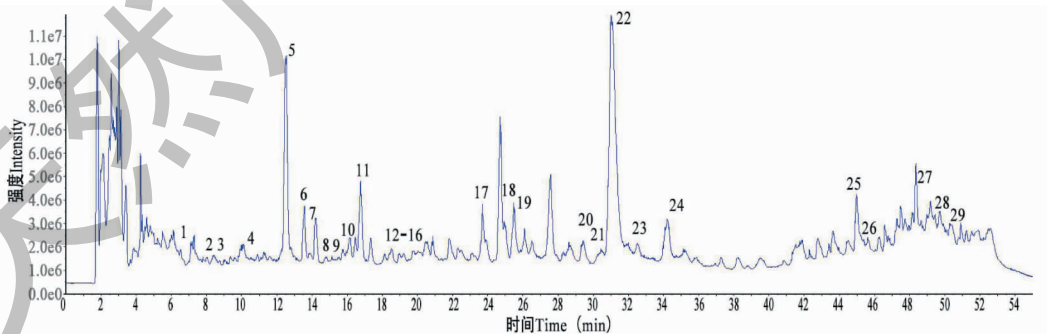


图 1 蒲公英样品总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagram of *Taraxacum mongolicum* sample

酚酸物质结构鉴定以峰 6、峰 11 为例。峰 6  $m/z$  353.086 9 [M-H]<sup>-</sup>, 数据库匹配出的分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>, 二级质谱图中 (见图 2A), 有奎宁酸特征碎片离子  $m/z$  191.054 6 [M-H-caffeoyl]<sup>-</sup>, 结合文献<sup>[11]</sup> 及

标准品初步判断为绿原酸。峰 11  $m/z$  179.034 8 [M-H]<sup>-</sup>, 数据库匹配出的分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, 二级质谱图 (见图 2B) 中有特征碎片离子  $m/z$  135.043 2 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 和  $m/z$  134.035 7 [M-H-CHO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 结合

文献<sup>[12]</sup>及标准品判断该成分为咖啡酸。

蒲公英含有的黄酮类物质有异荜草素、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、木犀草素-7-半乳糖醛酸苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、异鼠李素、白杨素。黄酮类物质结构鉴定以峰 25、峰 27 为例。峰 25  $m/z$  285.034 9, 数据库匹配出分子式为  $C_{15}H_{10}O_6$ , 二级质谱图(见图 2C)中发现  $m/z$  151.003 6  $[M-H-C_8H_6O_2]^-$ 、 $m/z$  133.029 9  $[M-H-C_7H_4O_4]^-$  两个典型的黄酮 C 环裂解碎片离子峰, 结合文献<sup>[13]</sup>及标准品判断化合物为木犀草素。峰 27

$m/z$  269.004 9  $[M-H]^-$ , 数据库匹配出的分子式为  $C_{15}H_{10}O_5$ , 二级质谱图中, 此物质在  $m/z$  269 处产生大量  $[M-H]^-$ , 并在  $m/z$  151.002 6  $[M-H-C_8H_6O]^-$  和  $m/z$  117.033 6  $[M-H-C_7H_4O_4]^-$  处存在与木犀草素相同裂解方式的特征碎片离子, 结合文献<sup>[14]</sup>初步判断为芹菜素。

此外蒲公英中还鉴定出秦皮甲素、秦皮乙素两个香豆素类成分及萜类成分蒲公英酸-1'- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷。

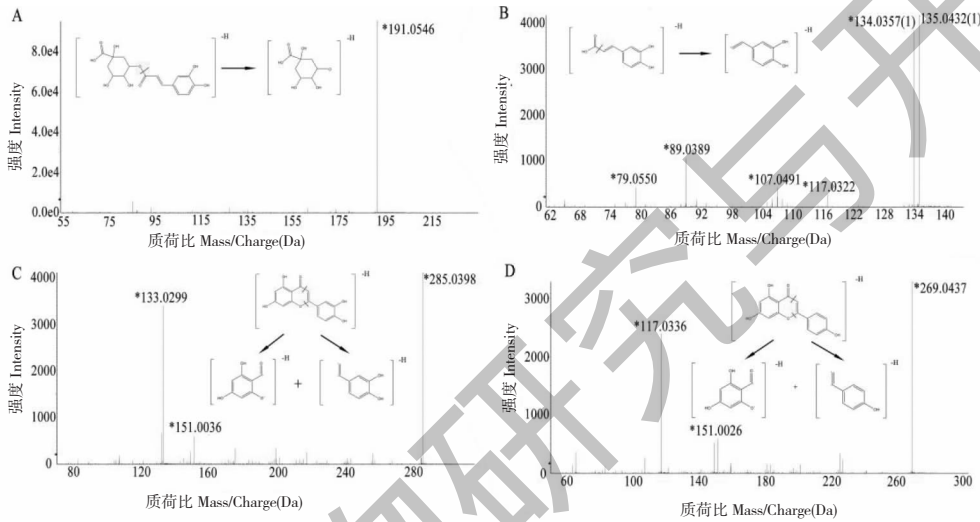


图 2 绿原酸(A)、咖啡酸(B)、木犀草素(C)和芹菜素(D)的二级质谱

Fig. 2 The secondary mass spectra of chlorogenic acid (A), caffeic acid (B), luteolin (C) and apigenin (D)

表 1 蒲公英化学成分鉴定信息

Table 1 Identification of compounds from *Taraxacum mongolicum*

峰号 No.	出峰时间 $t_R$ (min)	理论值 Observed value ( $m/z$ )	实测值 Measured value ( $m/z$ )	分子式 Molecular	离子模式 Ion mode	误差 Deviation ( $\times 10^{-6}$ )	二级碎片离子 Daughter ions (MS/MS)	化合物 Compound
1	6.280	169.013 7	169.014 7	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	5.917	125 $[M-H-CO_2]^-$	没食子酸 Gallic acid
2	8.192	167.034 4	167.035 1	$C_8H_8O_4$	$[M-H]^-$	3.981	152 $[M-H-CH_3]^-$ 、123 $[M-H-CO_2]^-$ 、 108 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$	香草兰酸 Vanillic acid
3	8.455	203.082 1	203.082 9	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M-H]^-$	4.171	203 $[M-H]^-$ 、159 $[M-H-CO_2]^-$	色氨酸 Tryptophan
4	10.691	339.071 6	339.071 9	$C_{15}H_{16}O_9$	$[M-H]^-$	-0.029	339 $[M-H]^-$ 、177 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、 133 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$	秦皮甲素 Esculin
5	12.508	149.008 6	149.009 4	$C_4H_6O_6$	$[M-H]^-$	5.268	149 $[M-H]^-$ 、87 $[M-H-CH_2O_3]^-$	酒石酸 Tartaric acid
6	13.545	353.087 3	353.086 9	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	-1.020	191 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$	绿原酸 Chlorogenic acid
7	13.595	137.023 9	137.024 9	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	7.517	137 $[M-H]^-$ 、119 $[M-H-H_2O]^-$	原儿茶醛 3,4-Dihydroxybenzaldehyde

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 No.	出峰时间 $t_R$ (min)	理论值 Observed value ( $m/z$ )	实测值 Measured value ( $m/z$ )	分子式 Molecular	离子模式 Ion mode	误差 Deviation ( $\times 10^{-6}$ )	二级碎片离子 Daughter ions (MS/MS)	化合物 Compound
8	14.654	137.023 9	137.024 4	$C_7H_6O_3$	[M-H] <sup>-</sup>	3.649	137[M-H] <sup>-</sup> , 93[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	对羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic acid
9	15.373	151.039 5	151.040 3	$C_8H_8O_3$	[M-H] <sup>-</sup>	5.164	107[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	对羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenylacetic acid
10	16.044	177.018 8	177.019 5	$C_9H_6O_4$	[M-H] <sup>-</sup>	4.039	177[M-H] <sup>-</sup> , 149[M-H-CO] <sup>-</sup> , 133[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 121[M-H-2CO] <sup>-</sup>	七叶内酯 Esculetin
11	16.775	179.034 4	179.034 8	$C_9H_8O_4$	[M-H] <sup>-</sup>	2.039	179[M-H] <sup>-</sup> , 135[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	咖啡酸 Caffeic acid
12	18.501	193.050 1	193.050 5	$C_{10}H_{10}O_4$	[M-H] <sup>-</sup>	2.150	193[M-H] <sup>-</sup> , 134[M-H-CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	阿魏酸 Ferulic Acid
13	19.168	153.018 8	153.019 3	$C_7H_6O_4$	[M-H] <sup>-</sup>	3.366	153[M-H] <sup>-</sup> , 109[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	3,5-二羟基苯甲酸 3,5-Dihydroxybenzoic acid
14	19.438	121.029 0	121.030 1	$C_7H_6O_2$	[M-H] <sup>-</sup>	9.461	121[M-H] <sup>-</sup> , 77[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	苯甲酸 Benzoic acid
15	19.853	447.092 7	447.092 0	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.655	447[M-H] <sup>-</sup> , 285[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 163[M-H-C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	异荜草素 Homoorientin
16	20.183	133.013 7	133.014 7	$C_4H_6O_5$	[M-H] <sup>-</sup>	7.518	133[M-H] <sup>-</sup> , 115[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 71[M-H-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	苹果酸 Malic acid
17	23.728	609.145 6	609.145 5	$C_{27}H_{30}O_{16}$	[M-H] <sup>-</sup>	-0.107	609[M-H] <sup>-</sup> , 301[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	芦丁 Rutin
18	25.023	463.087 7	463.086 8	$C_{21}H_{20}O_{12}$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.846	463[M-H] <sup>-</sup> , 301[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Isoquercitrin
19	25.494	447.092 7	447.091 7	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M-H] <sup>-</sup>	-2.326	447[M-H] <sup>-</sup> , 285[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 Cynaroside
20	30.286	447.092 7	447.091 9	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.879	447[M-H] <sup>-</sup> , 285[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 133[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 133[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	木犀草素-7-半乳糖醛酸苷 Luteolin 7-galacturonide
21	30.899	515.119 0	515.117 9	$C_{25}H_{24}O_{12}$	[M-H] <sup>-</sup>	-2.048	515[M-H] <sup>-</sup> , 353[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A
22	31.136	473.072 0	473.070 6	$C_{22}H_{18}O_{12}$	[M-H] <sup>-</sup>	-2.970	473[M-H] <sup>-</sup> , 293[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 179[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	菊苣酸 Chicoric acid
23	32.532	423.165 5	423.163 9	$C_{21}H_{28}O_9$	[M-H] <sup>-</sup>	3.781	423[M-H] <sup>-</sup> , 261[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 217 [M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 163 [M-H-C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	蒲公英酸-1'- $\beta$ - <i>D</i> - 葡萄糖苷 Taraxinic acid 1'- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -glucopyranoside
24	34.103	515.119 0	515.117 3	$C_{25}H_{24}O_{12}$	[M-H] <sup>-</sup>	-3.213	515[M-H] <sup>-</sup> , 353[M-H-C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	异绿原酸 B 3,4-Dicaffeoylquinic acid
25	44.986	285.039 9	285.039 4	$C_{15}H_{10}O_6$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.807	285[M-H] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 133[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	木犀草素 Luteolin
26	45.253	301.034 8	301.034 3	$C_{15}H_{10}O_7$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.761	301[M-H] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	槲皮素 Quercetin
27	48.673	269.045 0	269.044 9	$C_{15}H_{10}O_5$	[M-H] <sup>-</sup>	-0.372	269[M-H] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>-</sup> , 117[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	芹菜素 Apigenin
28	49.943	315.050 5	315.049 5	$C_{16}H_{12}O_7$	[M-H] <sup>-</sup>	-3.111	315[M-H] <sup>-</sup> , 300[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 271[M-H-CH <sub>3</sub> -CHO] <sup>-</sup>	异鼠李素 Isorhamnetin
29	50.363	253.050 1	253.049 8	$C_{15}H_{10}O_4$	[M-H] <sup>-</sup>	-1.126	253[M-H] <sup>-</sup> , 151[M-H-C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>-</sup> , 101[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	白杨素 Chrysin

## 2.2 活性成分靶点预测

按“1.4.2”项下方法对上述 29 个化合物进行分析,通过 swissADME 数据库分析,筛选出 17 个化合物。进一步在 Swiss Target Prediction 数据库中筛选,符合筛选条件的化合物有槲皮素、木犀草素、芹菜素、白杨素、咖啡酸、异鼠李素、没食子酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、3,5-二羟基苯甲酸,这些化合物涉及 93 条相关靶点信息。在 Genecards 数据库以癌症 (cancer) 为关键词,筛选得到 14 701 条癌症相关靶点,将筛选得到的癌症相关靶点与药物靶点进行比

对,共计得到 84 个共有靶点。

## 2.3 核心靶点筛选和蛋白-蛋白相互作用网络构建

按“1.4.3”项下方法进行 PPI 网络构建,结果如图 3 所示,图中共有 82 个节点,393 条边,平均节点度值为 8.93。选取节点度值前 30 绘制柱状图 (见图 4),以两倍平均度值筛选核心靶点,即度值大于 17.86 的靶点为核心靶点,如图 4 所示,包括 AKT1、EGFR、SRC、ESR1、PTGS2、MMP9、KDR、MMP2、PIK3R1 共 9 个靶点。

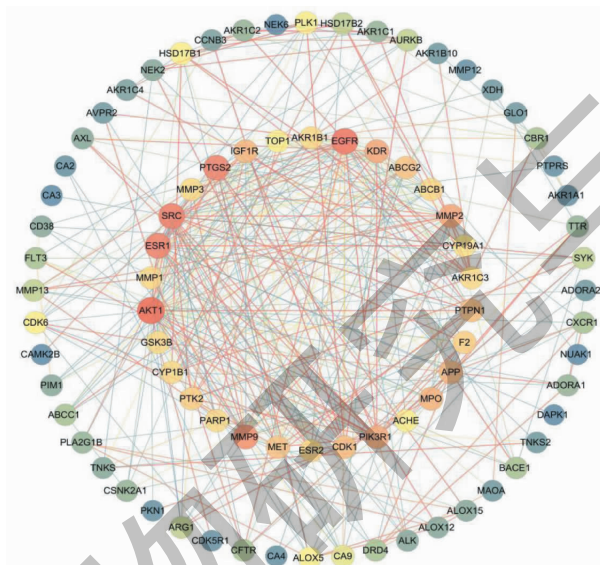


图3 靶点间相互作用网络

Fig. 3 Interaction network between targets

注:图中节点表示作用靶点,颜色表示靶点度值,红色越深靶点度值越高,蓝色越深度值越低。Note: The node in the figure represents the target point, and the color represents the value of the target point. The deeper the red, the higher the target value, and the lower the blue, the lower the depth value.

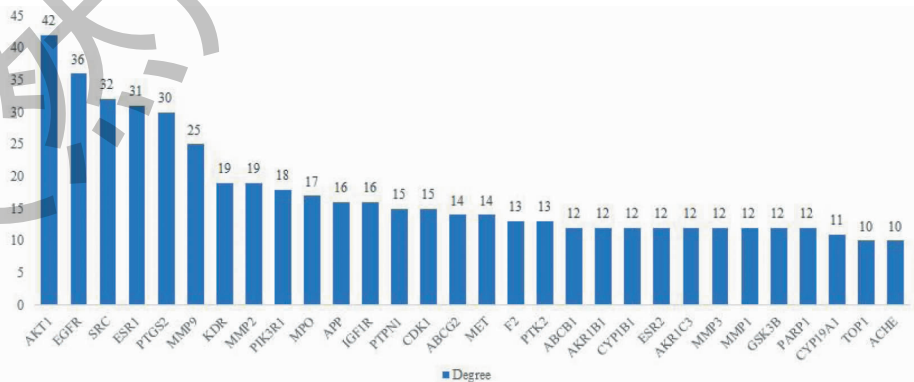


图4 蒲公英治疗癌症的核心靶点(排名前30)

Fig. 4 *Taraxacum mongolicum*'s core target for cancer treatment (top 30)

## 2.4 GO 分类富集分析

将蛋白相互作用网络中的 82 个蛋白靶点导入

DAVID 数据库中进行 GO 分类富集分析,选取其中 FDR < 0.05 的通路。其中生物过程 (biological

process, BP) 52 条, 细胞成分 (cellular component, CC) 7 条, 分子功能 (molecular function, MF) 38 条。根据 FDR 选择 BP、CC、MF 富集前 10 个靶点进行可视化并生成气泡图 (见图 5)。从图中可以看出在生物过程层面主要对氧化-还原、负调控凋亡、蛋白质自磷酸化、蛋白质磷酸化、细胞增殖、肽丝氨酸磷酸

化等过程影响较大; 在细胞成分层面主要对细胞质膜、细胞质基质、胞外分泌体、细胞外间隙等部位影响较大; 在分子功能层面, 主要对 ATP 结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、酶活性等分子功能影响较大。

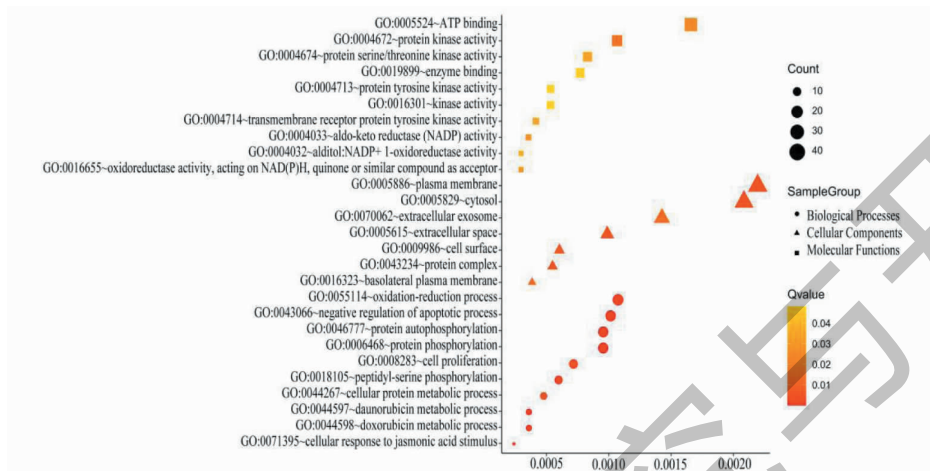


图 5 GO 富集分析气泡图 (排名前 10)

Fig. 5 Bubble diagram of GO analysis (top 10)

## 2.5 KEGG 通路富集分析

将蛋白相互作用网络中的 82 个蛋白靶点进行 KEGG 通路富集分析, 以  $FDR < 0.05$  为筛选条件, 得到与癌症相关的信号通路共计 24 条, 对这些通路

绘制可视化气泡图 (见图 6)。从图中可以看到相关通路信息, 其中包括癌症通路、癌症蛋白聚糖、PI3K-Akt 信号通路、局灶粘连、癌症中的 MicroRNAs、癌症转录失调、膀胱癌等多条癌症相关通路。

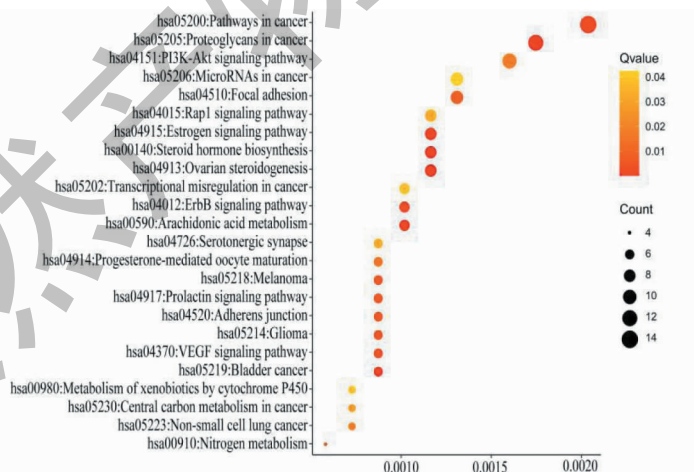


图 6 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble diagram of KEGG analysis (top 10)

## 2.6 蒲公英活性成分-靶点-信号通路网络模型

将富集得到的 24 条通路对应蒲公英抗癌的靶点及成分, 构建“活性成分-靶点-信号通路”网络模型 (见图 7)。该网络图中包括 116 个节点, 634 条

边, 其中 10 个红色三角形节点表示蒲公英中的活性成分, 82 个绿色正方形节点表示潜在靶点, 24 个黄色菱形节点表示信号通路。成分中, 槲皮素的度值最高为 59; 后面依次为木犀草素 28、芹菜素 26, 表

明其具有较强的抗癌作用。通路节点度值中,癌症途径(hsa05200)、癌症中的蛋白多糖(hsa05205)、PI3K-Akt 信号通路(hsa04151)、肿瘤中的 MicroR-

NAs(hsa05206)、局灶粘连(hsa04510)等排名靠前,推测其相关通路是蒲公英抗癌作用的主要通路。

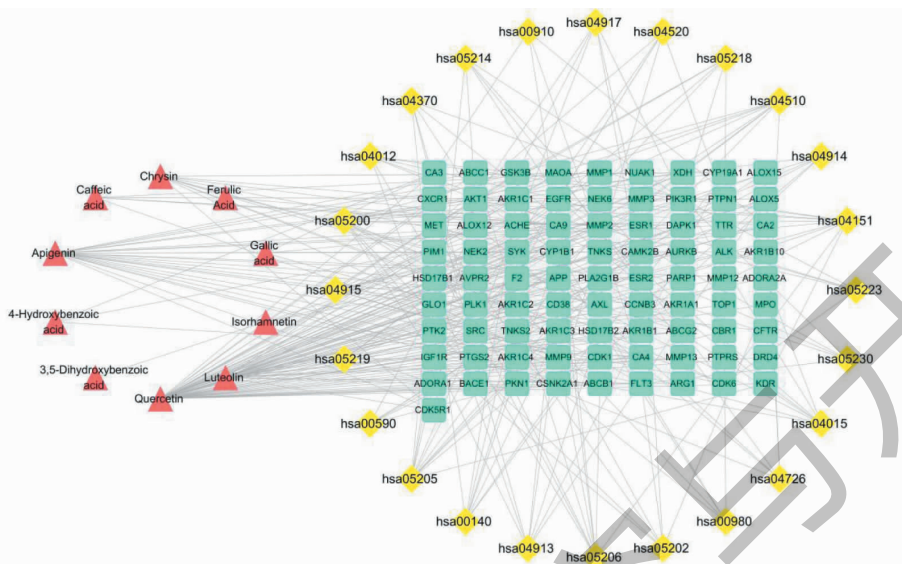


图 7 蒲公英“活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 7 *Taraxacum mongolicum* “active ingredient-target-pathway” network

注:图中红色三角形节点表示活性成分;绿色正方形节点表示潜在靶点;黄色菱形节点表示信号通路。Note: The red triangle node in the figure represents the active ingredient; The green square node represents the potential target; The yellow diamond node represents the signal pathway.

### 3 讨论与结论

HPLC-Q-TOF 联用技术具有高分辨率、高通量及高灵敏度等特点,结合文献和相关数据库,可以较为准确且快速对化学成分进行定性分析,广泛应用于中药成分的分析中。蒲公英全草入药,不同部位中各类成分分布差异较大,同时在不同的提取条件下,所得成分及含量存在差异。在本研究中通过对浓度为 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的甲醇溶液、5% 甲酸的甲醇溶液等提取溶剂对蒲公英全草进行提取考察,发现在 60% 甲醇提取条件下,峰形及出峰情况整体较优。因此,本实验选用 60% 甲醇对蒲公英全草进行提取分析,通过一级质谱推测成分的分子式,通过二级质谱结合相关文献及标准品推测化合物结构,最终从蒲公英中分析鉴定出了 29 个化学成分,其主要为有机酸类和黄酮类成分,是目前蒲公英发挥多种功效的主要研究的大类物质。本研究实现了对蒲公英化学成分的快速分析,为蒲公英的质量控制、药理作用等研究提供了参考。

蒲公英具有清热解毒、消肿散结等功效,被认为可以用来治疗肿瘤。现代研究表明蒲公英具有良好的抗癌效果,能够有效抑制肝癌、肺癌、宫颈癌、胰腺

癌和乳腺癌等癌细胞的增殖,并且对正常细胞无细胞毒性<sup>[15]</sup>。为进一步探究蒲公英的抗癌作用机制,本研究对分析得到的 29 个化学成分进行了抗癌网络药理学分析,发现其中槲皮素、木犀草素、芹菜素、白杨素、咖啡酸、异鼠李素、没食子酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、3,5-二羟基苯甲酸可能为蒲公英抗癌成分,其中槲皮素、木犀草素、芹菜素的抗癌作用较强。后续可结合各物种在蒲公英中的含量及分布情况对蒲公英抗癌的开发作进一步研究。

已有多名学者对相关化合物的抗癌作用机制进行研究。Song 等<sup>[16]</sup>研究发现,槲皮素可通过使前列腺癌细胞 PC-3 细胞中的 PI3K、Akt、mTOR 信号通路失活而诱导自噬。Wu 等<sup>[17]</sup>研究发现,槲皮素可通过 ROS-NUPR1 途径介导诱导自噬来致使骨肉瘤细胞死亡。Li 等<sup>[18]</sup>发现,槲皮素通过抑制 PTHR1 减少了人类转移性骨肉瘤细胞的侵袭,粘附,增殖和迁移。Hashemzaei 等<sup>[19]</sup>对多种肿瘤细胞系通过 MMT 分析,发现槲皮素能诱导所有测试的癌细胞系的凋亡。Seo 等<sup>[20]</sup>研究发现,木犀草素能下调钙激活的氯离子通道(ANO1)来起到抗癌作用。Chen 等<sup>[21]</sup>研究发现木犀草素和槲皮素可能通过阻断 Akt、



mTOR、c-Myc 信号传导途径来抑制 RPS19 激活的 EMT 信号传导,从而抑制癌细胞的转移。Yang 等<sup>[22]</sup>研究发现,芹菜素可通过抑制 PI3K、Akt、mTOR 途径抑制细胞增殖并诱导自噬。

由靶点蛋白相互作用网络图,根据度值筛选出 AKT1、EGFR、SRC、ESR1、PTGS2、MMP9、KDR、MMP2、PIK3R1 共 9 个核心靶点。AKT1 是 AKT 三个亚型之一,在多种生物效应中发挥作用,包括细胞增殖、存活和代谢调节。AKT 的失调,会引发癌症、糖尿病、心血管和神经系统疾病<sup>[23]</sup>。EGFR 是一种跨膜糖蛋白,会通过各种机制异常激活,例如受体过度表达,突变,配体依赖性受体二聚化,配体非依赖性激活,并且与多种人类癌症的发生有关<sup>[24]</sup>。MMP 是一类蛋白水解酶,可降解细胞外基质的多种成分。大量的实验和临床证据表明 MMP 参与了肿瘤的侵袭,新血管的生成和转移,是癌症治疗的理想药理学靶标。

GO 富集分析结果表明,蒲公英对氧化-还原过程、负调控凋亡过程、蛋白质自磷酸化等生物过程,细胞质膜、细胞质基质、胞外分泌体、细胞外间隙等部位,ATP 结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酶结合等分子功能影响较大。癌症细胞生长中需要大量能量,癌症细胞的代谢过程增强,氧化还原反应变得旺盛,同时癌症细胞会利用代谢过程产生的 ATP,因此 ATP 结合也是癌症的一个重要反应过程。其他相关过程也都涉及癌症过程中。KEGG 通路分析结果表明,相关靶点涉及癌症通路、癌症蛋白聚糖、PI3K-Akt 信号通路、局灶粘连、癌症 MicroRNAs、癌症转录失调、膀胱癌等多条癌症通路上。其中癌症蛋白聚糖通路中癌细胞分泌的蛋白聚糖诱发癌症转移,通过抑制该通路,可降低癌症的转移<sup>[25]</sup>;PI3K-Akt 信号通路具有调节细胞周期、蛋白质合成的作用,在癌症发病中 PI3K-Akt 信号通路通过多方面抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、肿瘤转移及新生血管生成<sup>[26]</sup>。上述结果表明筛选出来的相关生物过程及通路与蒲公英抗癌机制息息相关。

前列腺癌病理类型上包括腺癌、导管腺癌、尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌,其中前列腺腺癌占 95% 以上,在世界范围内,男性恶性肿瘤中前列腺癌的发病率排名第 2 位,死亡率排名第 5 位,如何对前列腺癌进行研究是一项热点话题。多位学者研究表明,蒲公英具有对前列腺癌具有良好的抑制作用<sup>[27]</sup>。现代研究表明针对前列腺癌靶向治疗中较

为成熟且具有明显研究价值的途径之一是磷脂酰肌 3-羟激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)信号通路,该信号通路的异常活化与疾病的发展和转归有显著相关性,在机体细胞的生长、增殖、凋亡以及炎症反应、血管生成以及肿瘤的发生发展中都起到了重要的参与调节作用<sup>[28]</sup>。在本研究中发现蒲公英中的多种功效物质可作用于 AKT 及 PI3K 等相关作用靶点上,结果表明,蒲公英可用于开发治疗前列腺癌。上述网络药理学结果为模拟推测结果,存在不足,后续须进一步通过想过药理实验对该结果进行推测,以为蒲公英进一步开发提供数据。

综上所述,本研究通过 HPLC-Q-TOF-MS 对蒲公英化学成分进行分析,共鉴定出 29 个化学成分,包括 16 个有机酸、10 个黄酮类成分、2 个香豆素类成分和 1 个萜类成分。运用网络药理学的方法研究蒲公英的抗癌作用机制,结果发现蒲公英中槲皮素、木犀草素、芹菜素等成分通过作用 AKT1、EGFR、SRC、ESR1 等核心靶点,参与氧化-还原过程、负调控凋亡过程、蛋白质自磷酸化、ATP 结合、蛋白激酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、酶结合等生物过程,继而在癌症中的通路、癌症中的蛋白聚糖、PI3K-Akt 信号通路等通路中的发挥抗癌作用。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:352.
- 2 Xie SY, Yang XY, Ding ZG, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24(S1):141-151.
- 3 Ma C, Zhu L, Wang J, et al. Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 168:349-355.
- 4 Kao FX, Liang YK, Li YX. Antibacterial effect and mechanism of dandelion phytic acid on *Salmonella* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:975-980.
- 5 Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H, et al. Anti-carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. II [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22:606-610.
- 6 Zhan F, Liu XY, Rong KB, et al. Effect of dandelion extract on expression of p53 and ki67 in gastric cancer mkn45 cell

- lines[J]. *Mod Hosp(现代医院)*, 2012, 12(5): 20-21.
- 7 Zhu H, Zhao H, Zhang L, et al. Dandelion root extract suppressed gastric cancer cells proliferation and migration through targeting lncRNA-CCAT1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1010-1017.
- 8 Ovadje P, Ammar S, Guerrero JA, et al. Dandelion root extract affects colorectal cancer proliferation and survival through the activation of multiple death signalling pathways [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 73080-73100.
- 9 Ding A, Wen X. Dandelion root extract protects NCM460 colonic cells and relieves experimental mouse colitis [J]. *J Nat Med*, 2018, 72: 857-866.
- 10 Peng DQ, Gao J, Guo XM, et al. Chemical constituents from roots of *Taraxacum mongolicum* [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2014, 36: 1462-1466.
- 11 Chen FC, Gao SH, Wang ZP. Identification of chemical components in *Actinidia chinensis* root by UHPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *China Pharm(中国药房)*, 2020, 31: 1725-1731.
- 12 Zhao LJ, Gao WY, Gu XR, et al. Identification and attribution of chemical compounds of Pudilan Antiphlogistic Oral Liquid [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2019, 44: 1573-1587.
- 13 An XX, Li YY, Zhan YF, et al. Analysis of the contents of total flavonoids in dandelion and determination of main components based on UPLC-Q-Exactive and HPLC [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理)*, 2019, 30(1): 99-105.
- 14 Xu QQ, Bao BH, Zhang L, et al. UPLC-QTOF-MS analysis and multicomponent quantitative analysis of *Cayratia Japonica* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报)*, 2020, 36: 517-524.
- 15 Shi GH, Chen YC, Wang XD, et al. Anti-tumor activity and its anti-tumor activity of dandelion research progress on mechanism of action [J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2017, 34: 858-862.
- 16 Song J, Bai J, Wang S, et al. Effects of quercetin on autophagy and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase b/mammalian target of rapamycin signaling pathway in human prostate cancer PC-3 cells [J]. *Acta Acad Med Sin(中国医学科学院学报)*, 2020, 42: 578-584.
- 17 Wu B, Zeng W, Ouyang W, et al. Quercetin induced NUPR1-dependent autophagic cell death by disturbing reactive oxygen species homeostasis in osteosarcoma cells [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2020, 67(2): 137-145.
- 18 Li S, Pei Y, Wang W, et al. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108839.
- 19 Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38: 819-828.
- 20 Seo Y, Ryu K, Park J, et al. Inhibition of ANO1 by luteolin and its cytotoxicity in human prostate cancer PC-3 cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174935.
- 21 Chen KC, Hsu WH, Ho JY, et al. Flavonoids luteolin and quercetin inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26: 1180-1191.
- 22 Yang J, Pi C, Wang G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- 23 Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease [J]. *Cell Signal*, 2011, 23: 1515-1527.
- 24 Singh D, Attri BK, Gill RK, et al. Review on EGFR Inhibitors: Critical Updates [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16: 1134-1166.
- 25 Yan T, Yang ZL. Heterogeneity of cancer-associated fibroblast and its application in targeted therapy [J]. *Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2020, 27: 1319-1327.
- 26 Wu D, Gao Y, Cui H, et al. Research progress on chemical constituents of dandelion and its treatment of prostate diseases [J]. *J Changchun Univ Chin Med(长春中医药大学学报)*, 2020, 36: 1084-1087.
- 27 Zhang Y, Li JH. Research progress on relationship between PI3K/AKT signaling pathway and prostate cancer [J]. *J Chin Oncol(肿瘤学杂志)*, 2021, 27: 153-157.
- 28 Wang F, Wang XG. The research of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in small cell lung cancer [J]. *World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘)*, 2016, 16(A4): 104-105.