

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学 探究茯苓抗乳腺癌作用机制

孙明杰¹,王妍妍^{1,2},姚亮^{1,2},王雷^{1,2,4,6},
吕婷婷¹,郝丽君¹,张越^{1,2,6*},陈卫东^{1,2,3,4,5,6*}

¹安徽中医药大学药学院;² 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心;³ 中药资源保护与开发研究所;

⁴中药复方安徽省重点实验室;⁵ 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室,合肥 230012;

⁶直接口服中药饮片亳州市重点实验室,亳州 236000

摘要:本研究结合 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和网络药理学探究茯苓抗乳腺癌的作用机制,并通过细胞实验初步验证。基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 数据获取茯苓活性成分 37 个,通过数据库获取成分靶点 301 个。联合 GEO 数据库筛选出乳腺癌差异基因 725 个,进而获得茯苓治疗乳腺癌的潜在作用靶点 30 个。PPI 分析发现茯苓抗乳腺癌主要作用于 PPARG、PPARA 等靶点。KEGG 富集分析发现其发挥作用主要与 PPAR 信号通路相关。分子对接显示,核心成分与核心靶点对接稳定,且核心成分相应碳链上的羧基、羟基及酯基是靶点结合的主要功能基团。细胞验证实验结果表明,茯苓提取物能明显抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移,同时降低细胞中乳酸含量;细胞免疫荧光结果表明 PPARG 蛋白主要分布在细胞核上,且经茯苓提取物刺激后荧光强度明显增强。综上,初步研究茯苓对乳腺癌的多靶点、多通路治疗作用,其机制可能与调节 PPARG 等靶点,抑制肿瘤细胞增殖及迁移,影响肿瘤细胞代谢等有关。

关键词:茯苓;乳腺癌;网络药理学;UPLC-Q-TOF-MS/MS;作用机制

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)10-1764-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.10.015

Mechanism of anti-breast cancer action of *Poria cocos* (Schw.) Wolf based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology

SUN Ming-jie¹, WANG Yan-yan^{1,2}, YAO Liang^{1,2}, WANG Lei^{1,2,4,6},
LYU Ting-ting¹, HAO Li-jun¹, ZHANG Yue^{1,2,6*}, CHEN Wei-dong^{1,2,3,4,5,6*}

¹School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine; ²MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials;

³Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development;

⁴Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula;

⁵Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012, China; ⁶Bozhou Key Laboratory of Oral Chinese Herbal Slices, Bozhou 236000, China

Abstract: This study combined UPLC-Q-TOF-MS/MS technology with network pharmacology to explore the anti-breast cancer mechanism of *Poria cocos*, and verified by cellular experiments for preliminary. There were 37 active components obtained from UPLC-Q-TOF-MS/MS data, then obtained 301 target components from drug database. A total of 725 differential genes were screened by breast cancer gene expression microarray through the GEO databases. After taking the intersection, 30 potential targets of *P. cocos* in the treatment of breast cancer were obtained. PPI analysis showed that *P. cocos* mainly acted on PPARG, PPARA and other targets of anti-breast cancer. KEGG enrichment analysis showed that it was mainly related to PPAR signaling pathway. Molecular docking showed that the core components docked with the core targets stably, and the car-

收稿日期:2022-01-17 接受日期:2022-08-17

基金项目:国家自然科学基金(81773988);安徽省菌类药物研发“115”产业创新团队项目(皖人才办[2020]4号);安徽省中央引导地方科技发展专项(201907.d07050002);安徽高校研究生科学研究项目(YJS20210496)

*通信作者 Tel:86-511-68129180;E-mail:2017201219031@stu.ahtcm.edu.cn, wdchen@ahtcm.edu.cn

boxyl, hydroxyl and ester groups on the corresponding carbon chains of the core components were the main functional groups for the binding targets. The results of the cell validation experiments showed that the *P. cocos* extract group could significantly inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells, and obviously enhanced the fluorescence intensity of PPAR γ protein, which mainly distributed in the nucleus. In conclusion, this paper presents a preliminary study on the multi-target and multi-pathway therapeutic effect of *P. cocos* on breast cancer, the mechanism of which may be related to the regulation of PPAR γ and other targets, the inhibition of tumor cell proliferation and migration, and the influence of tumor cell metabolism.

Key words: *Poria cocos*; breast cancer; network pharmacology; UPLC-Q-TOF-MS/MS; mechanism

乳腺癌 (breast cancer, BC) 已超过肺癌成为全球癌症发病率的主要原因, 占所有癌症病例的 11.7%, 是全球癌症死亡的第五大原因^[1]。目前, 化疗、手术、放射等常见的治疗手段, 具有较强的不良反应, 如对人体的肝、肾有毒副作用, 破坏肠道系统稳态等^[2]。这极大限制了治疗乳腺癌的效果, 为此寻找低毒高效的抗肿瘤药物有重要意义。而大多数中药及其复方具有低毒高效的优点, 合理使用有利于降低癌症患者的毒副作用, 减轻患者痛苦^[3]。

茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 为多孔菌科真菌类的一种扶正抗癌药, 其单药或是与其他药物配伍用于乳腺癌的治疗和调理在我国中药领域历史悠久^[4]。现代研究提示茯苓具有抗肿瘤作用^[5], 其提取物对人肝癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌均有明显的抑制增殖作用^[6-9]。这表明茯苓具有发展成抗肿瘤药物的巨大潜力, 然而现阶段对茯苓抗乳腺癌的分子机制和作用靶点仍然不够明晰, 因此本文基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS, 通过网络药理学方法, 探讨茯苓与乳腺癌的关系, 并辅以细胞实验进行初步验证, 以期为进一步开展相关实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

液质联用仪: Waters AcquityTM 型超高效液相色谱系统 (Waters 有限公司); Waters Xevo G2 Q-TOF 型高分辨率飞行时间质谱仪 (Waters 有限公司); i3x 型多功能酶标仪 (Molecular Devices 美谷分子仪器有限公司)。胎牛血清 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 批号: 2177370); RPMI 1640 培养基 (上海逍鹏生物科技有限公司, 批号: 2151419); 乳酸测试盒 (南京建成生物科技有限公司, 批号: 20220425); ATP 检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 批号: 0816212202110); PPAR γ 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: BA06071376); 盐酸阿霉素 (源叶生物科技有限公司, 批号: H12D11J134157); 小鼠乳腺癌 4T1 细胞 (赛百慷生物技术股份有限公司); 甲醇为色谱纯; 乙腈为质谱

级。

1.2 茯苓成分分析

1.2.1 样品的配制

茯苓采自安徽省金寨县桃岭乡, 经安徽中医药大学俞年军教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓; 将茯苓粉碎后过 60 目分析筛后, 精密称定 50.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加 1 L 甲醇, 70 °C 回流 6 h, 重复提取 2 次并合并滤液, 旋蒸浓缩后烘干, 得到茯苓提取物 (*Poria cocos* (Schw.) Wolf extract, PCE)。将提取物以适量甲醇复溶, 离心取上清, 过膜后得到供试品溶液。

1.2.2 色谱条件

COSMOSIL-2.5C₁₈-MS-II 色谱柱 (3.0 mm × 100 mm), 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 243 nm, 进样量 2 μ L; 流动相为纯乙腈 (A)-纯水 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 7 min, 5% → 45% A; 7 ~ 10 min, 45% → 65% A; 10 ~ 20 min, 65% → 75% A; 20 ~ 25 min, 75% → 80% A; 25 ~ 35 min, 80% → 95% A。

1.2.3 质谱方法

运用配备有电喷雾离子源 (ESI) 的 Waters Xevo G2Q-TOF 质谱仪做质谱检测, 检测模式为负离子。在负离子模式下, 毛细管电压为 -2.5 kV, 锥孔电压为 50 V, 离子源温度为 110 °C, 锥孔气流量为 50 L/h, 雾化气 (N₂) 流量为 600 L/h, 去溶剂气温度为 350 °C。MSE 扫描模式, 低能量扫描的碰撞电压设置为 6.0 eV, 高能量扫描的碰撞电压设置为 20 ~ 80 eV, 扫描范围为 m/z 50 ~ 1 200 Da。亮氨酸脑啡肽为准确质量数校准液 (正离子模式: m/z 556.277 1 [M + H]⁺; 负离子模式: m/z 554.261 5 [M-H]⁻)。

1.3 茯苓作用靶点预测

1.3.1 活性成分对应靶点筛选

通过 Pubchem 数据库查询所鉴定化合物的 Canonical SMILES 号, 利用 ChemDraw 绘制未检索到的化合物结构, 导出 mol 格式文件后通过 Open Babel 分子格式转换工具获得 SMILES 号, 上传 SMILES 号在 Swiss Target Prediction 平台中选择分数大于 0.1

的靶点,去除重复靶点,获得茯苓活性成分对应的靶点。

1.3.2 乳腺癌潜在靶点筛选

以“breast cancer”为关键词,利用 GEO 数据库获得乳腺癌基因表达芯片(GSE29431),该芯片数据包含 12 例健康受试者和 54 例乳腺癌患者的乳房组织基因表达量,以健康受试者和患者基因差异倍数的绝对值($|\log FC|$) ≥ 2 和 $P < 0.05$ 作为差异基因的筛选条件。

1.3.3 交集靶点的确定

使用 R 软件 R 包 VennDiagram,将药物靶点基因与乳腺癌靶点基因取交集并绘图,得到成分靶点集与疾病靶点集的交集靶点基因,这些交集靶点基因即为茯苓活性成分对乳腺癌潜在作用靶点。

1.3.4 富集分析

利用 R 软件 clusterProfiler 包进行 GO 和 KEGG 富集分析,并以 $P < 0.05$ 为筛选条件,获得分析结果,将分析的结果按 count 值降序进行排列,并对 GO 中细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 排名前 13 位的条目和前 20 的 KEGG 通路,运行 R 软件包 ggplot2 进行图像可视化转换。

1.3.5 交集靶点的 PPI 网络构建

将茯苓活性成分对乳腺癌的潜在作用靶点导入 STRING 平台,获得所预测靶点的相互作用关系,利用 Cytoscape 软件绘制靶点蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI),最低相互作用阈值选择“confidence scores (0.4)”,隐藏网络中无联系的节点,所得结果由 Cytoscape 进行可视化处理,并使用 cytoHubba 工具计算发挥药效的核心靶点。

1.3.6 “茯苓活性成分-靶点-乳腺癌”网络的构建

基于 Cytoscape 3.7.2 构建“茯苓活性成分-靶点-乳腺癌”网络,网络中的节点分别为活性成分、靶点、乳腺癌,边表示活性成分与靶点,乳腺癌与靶点之间的相互关系。利用 CytoNCA 插件对网络图进行分析,得到茯苓活性候选成分中治疗乳腺癌的主要药效成分。

1.4 关键成分和核心靶点的分子对接验证

利用 Chem Draw 绘制筛选的活性成分化学结构,导出 mol 格式文件,再利用 ChemBio3D Ultra 14.0 转化为 3D 结构。从 PDB 数据库下载核心靶点基因的 PDB 格式文件,运用 PyMOL 软件、AutoDock 4.2.6 软件进行预处理,AutoDock Vina 软件完成分子对

接,PyMOL 2.4.1 软件进行可视化处理。

1.5 细胞实验验证

1.5.1 细胞毒性测定

采用 CCK-8 法检测茯苓提取物对 4T1 细胞增殖活性的影响。将处于对数生长期的 4T1 细胞接种到 96 孔板中 (1×10^5 个/孔)。贴壁后,加入 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸阿霉素 (doxorubicin hydrochloride, DOX) 和不同浓度的茯苓提取物培养 24 h 后测定细胞存活率。

1.5.2 细胞迁移能力测定

调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,每孔 1 mL 于 24 孔板中。待细胞融合至 100% 时,使用 $10 \mu\text{L}$ 的移液枪头划痕。对照组 (control, CON) 加入 1 mL 空白培养基,盐酸阿霉素组 (DOX) 加入 1 mL 含 DOX $1 \mu\text{g}$ 的培养基,茯苓提取物组 (PCE) 加入 1 mL 含 $80 \mu\text{g}$ 茯苓提取物的培养基,继续培养 12 h,显微镜下观察相同位置,拍照计算迁移率。

1.5.3 细胞代谢能力测定

取对数生长期的细胞,分别加入含 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 和不同浓度的茯苓提取物 ($5 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 1640 培养基培养 24 h,吸取培养液,依据试剂盒说明书方法测定胞外乳酸 (lactic acid, LD) 水平。收集细胞裂解液,依据试剂盒说明书方法测定样品 ATP 水平。

1.5.4 核心靶点表达分析

取对数生长期的细胞以 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/孔的浓度接种至 6 孔板,待细胞贴壁后根据实验分组进行不同处理;24 h 后,处理并观察 PPAR γ 的蛋白荧光表达情况。

1.6 数据处理分析

运用 Masslynx V4.1 软件收集 UPLC-QTOF-MS/MS 数据,借助 UNIFI 科学信息系统识别鉴定。其他数据均使用 GraphPad Prism 8 软件分析,实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) 表示。组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果

2.1 茯苓活性成分和靶点预测及乳腺癌 GEO 基因芯片分析

2.1.1 茯苓活性成分分析及靶点筛选

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析得到茯苓负离子流图见图 1。利用 UNIFI 数据处理系统、Masslynx V 软件及文献比对^[5],完成色谱峰对应化

化合物的定性分析,共鉴定出 49 种化合物,筛选出 37 种活性化合物见表 1。随后对成分进行靶点筛查,合并去重后共获得 301 个活性成分靶点。

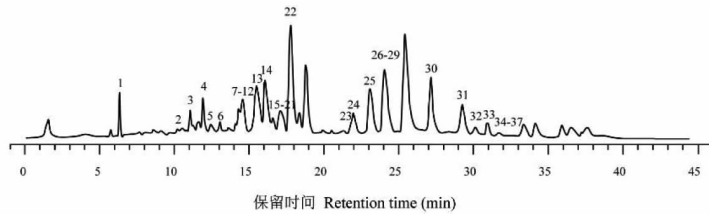


图 1 茯苓负离子模式 TIC 图

Fig. 1 The TIC diagram of *P. cocos* under negative ion mode

表 1 茯苓活性成分

Table 1 Components of *P. cocos*

序号 No.	保留时间 t_R (min)	成分 Ingredient	分子式 Molecular formula	碎片离子 Fragment ion (m/z)
1	6.74	3-酮基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸 3-Oxo-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	$C_{30}H_{44}O_3$	207.175 0,146.964 7
2	10.76	茯苓酸 A(F) Poricoic acid A(F)	$C_{31}H_{46}O_6$	485.326 7,483.311 5,443.274 8, 227.104 6,114.935 5
3	11.25	3 α ,16 α ,25-三羟基-羊毛甾-7,9(11),24(31)-三烯-21-酸 3 α ,16 α ,25-Trihydroxy-lanosta-7,9(11),24(31)-trien-21-oic acid	$C_{31}H_{48}O_5$	453.336 9,325.181 6,163.112 0
4	12.10	茯苓新酸 BM Poricoic acid BM	$C_{31}H_{46}O_5$	467.314 9,455.316 7,419.293 1, 311.166 2
5	13.21	茯苓酸 G Poricoic acid G	$C_{30}H_{46}O_5$	467.314 9,311.167 6,209.044 1, 103.919 2
6	13.91	3-O-乙酰基-16 α -羟基-氢化松苓酸 3-O-Acetyl-16 α -hydroxytrametenolic acid	$C_{32}H_{50}O_5$	413.265 2,279.231 0,243.898 1, 225.924 9
7	14.26	3 β ,16 α -二羟基-24-酮基-羊毛甾-7,9(11)-三烯-21-酸 3 β ,16 α -Dihydroxy-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	$C_{30}H_{46}O_4$	407.289 0,325.181 5,103.919 1
8	14.41	16-O-乙酰茯苓酸 16-O-Acetylpachymic acid	$C_{35}H_{54}O_6$	469.331 2,325.181 5
9	14.74	16 α -羟基松苓酸 16 α -Hydroxytrametenolic acid	$C_{30}H_{48}O_4$	409.273 2
10	14.92	25-羟基茯苓新酸 H 25-Hydroxyporicoic acid H	$C_{31}H_{46}O_5$	481.331 1,339.196 7
11	15.08	乙酰依布利酸 Acetyleburicoic acid	$C_{33}H_{52}O_4$	512.378 4,479.350 7,339.198 9, 281.246 1,183.010 8
12	15.34	16-去氧茯苓酸 B 16-Deoxyporicoic acid B	$C_{30}H_{44}O_4$	339.197 9,245.893 2,209.947 4
13	15.63	3-差向去氢土莫酸 3-Epidehydrotumulosic acid	$C_{31}H_{48}O_4$	471.347 3,423.325 8,337.251 3, 205.158 0
14	15.69	25-羟基茯苓酸 25-Hydroxypachymic acid	$C_{33}H_{52}O_6$	483.347 5,423.325 8,337.251 3, 146.964 1
15	16.22	土莫酸 Tumulosic acid	$C_{31}H_{50}O_4$	467.315 0,281.244 2,221.189 2
16	16.36	29-羟基去氢茯苓酸 29-Hydroxydehydrotumulosic acid	$C_{31}H_{48}O_5$	485.362 2,467.315 0,221.189 2
17	16.40	茯苓新酸 DM Poricoic acid DM	$C_{32}H_{48}O_6$	515.333 3,467.315 0,243.897 9, 225.924 7,103.919 3
18	16.56	29-羟基去氢茯苓酸 29-Hydroxydehydropachymic acid	$C_{33}H_{50}O_6$	527.335 0,497.326 6,483.345 1, 471.347 3,279.231 1
19	17.31	16 α -乙酰氧基-25,25-二甲氧基-羊毛甾-8,24(31)-二烯-21-酸 16 α -Acetoxy-25,25-dimethoxyl-lanosta-8,24(31)-dien-21-oic acid	$C_{33}H_{46}O_6$	529.351 1,297.151 0,185.115 7

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 t_R (min)	成分 Ingredient	分子式 Molecular formula	碎片离子 Fragment ion (m/z)
20	17.86	茯苓新酸 C Poricoic acid C	$C_{31}H_{46}O_4$	464.311 1, 423.331 7, 384.331 7, 339.196 7, 311.200 9
21	20.91	<i>O</i> -乙酰基茯苓酸-31-醇 <i>O</i> -Acetyl pachymic acid-31-ol	$C_{35}H_{56}O_7$	569.381 7, 513.353 6, 243.897 8
22	21.80	茯苓新酸 AM Poricoic acid AM	$C_{32}H_{48}O_5$	463.318 4, 371.256 8
23	23.11	3-差向去氢茯苓酸 3- <i>epi</i> -Dehydropachymic acid	$C_{33}H_{50}O_5$	451.318 8, 146.964 7
24	24.01	去氢茯苓酸 Dehydropachymic acid	$C_{33}H_{50}O_5$	513.358 0, 163.111 3
25	24.10	茯苓新酸 HM Poricoic acid HM	$C_{32}H_{50}O_5$	355.224 8, 163.111 3
26	24.17	土莫酸甲酯 Tumulosic acid methy ester	$C_{36}H_{56}O_6$	513.358 0, 163.111 3
27	24.57	茯苓酸甲酯 Pachymic acid methylester	$C_{34}H_{54}O_5$	340.201 5, 279.229 3, 214.877 2, 162.837 1
28	25.38	茯苓酸 Pachymic acid	$C_{33}H_{52}O_5$	513.305 7, 465.335 7, 339.235 5, 163.111 2, 149.094 8
29	28.81	3 α -苯甲酰基去氢土莫酸 3 α - <i>epi</i> -Benzoyldehydrotumulosic acid	$C_{38}H_{52}O_5$	523.338 0, 359.149 8, 245.893 4, 225.925 1
30	29.96	茯苓新酸 AE Poricoic acid AE	$C_{33}H_{50}O_5$	453.336 9, 163.112 0
31	30.08	16 α -羟基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸 16 α -Hydroxy-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	$C_{30}H_{44}O_3$	339.231 2, 220.945 4, 163.112 0
32	30.71	3 β ,16 α ,27-三羟基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸 3 β ,16 α ,27-Trihydroxy-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	$C_{31}H_{48}O_3$	333.241 4, 279.230 6, 209.947 5
33	31.63	16 α -羟基-羊毛甾-8,24-二烯-21-酸 16 α -Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-oic acid	$C_{30}H_{46}O_3$	339.231 2, 163.112 1, 146.964 7
34	32.55	3-酮基-羊毛甾-7,9(11),24(31)-三烯-21-酸 3-Keto-lanosta-7,9(11),24(31)-trien-21-oic acid	$C_{31}H_{48}O_3$	339.231 7, 283.166 9, 163.111 9
35	32.56	16 α -乙酰氧基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸 16 α -Acetoxy-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	$C_{33}H_{47}O_4$	465.302 0, 163.111 9
36	34.01	齿孔酸 Eburicoic acid	$C_{31}H_{50}O_3$	444.748 9, 339.198 9, 325.182 1, 311.166 4
37	35.51	5,8-过氧化麦角甾醇 Ergosterol-5,8-peroxide	$C_{28}H_{44}O_3$	325.182 7, 255.230 6, 163.111 8

2.1.2 乳腺癌相关靶点基因筛选

共筛选得到 725 个乳腺癌差异基因,其中在乳腺癌患者组织中上调基因 617 个,下调基因 108 个,

绘制火山图见图 2A,将茯苓主要活性成分与乳腺癌差异基因进行交集并绘制韦恩图,交集得到 30 个共同靶点基因见图 2B。

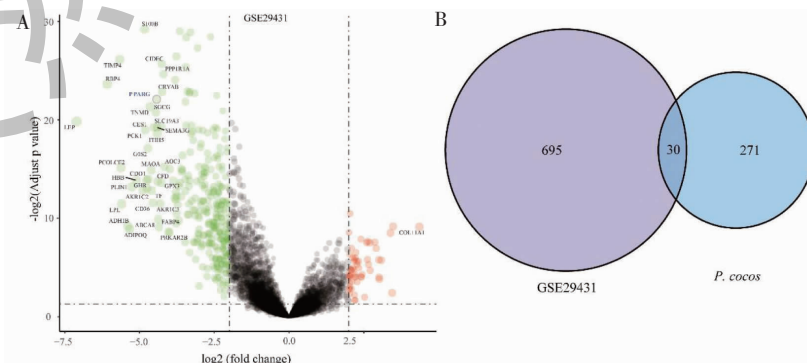


图 2 基因芯片差异分析与交集靶点分析

Fig. 2 Gene chip differential analysis and intersectional target analysis

注: A. 基因芯片 GSE29431 差异分析; B. 茯苓与差异基因交集靶点。Note: A. GSE29431 differential analysis; B. Intersection targets of *P. cocos* and differentially expressed genes.

2.1.3 GO 和 KEGG 富集分析

将 30 个基因导入 R 软件,GO 和 KEGG 富集分析利用 clusterProfiler 包完成,根据 $P < 0.05$ 分别筛选出 362 个 BP 条目、3 个 CC 条目和 50 个 MF 条目。前 13 的 GO 条目见图 3A。GO 功能分析表明,核膜、膜筏及膜微域等为主要细胞组分;分子功能主要与单羧酸结合、羧酸结合、胆汁酸结合等相关;炎症反应的调节、脂肪酸代谢过程、脂质代谢调节过程等是主要参与的生物过程。通路分析得到 150 条 KEGG 富集条目,前 10 通路见图 3B。KEGG 通路富集结果显示,PPAR 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、Relaxin 信号通路为主要富集的通路,其中富集 PPAR 信号通路中的靶点为 PPARG、FABP4、FABP5、MMP1、PPARA、SCD、NR1H3。

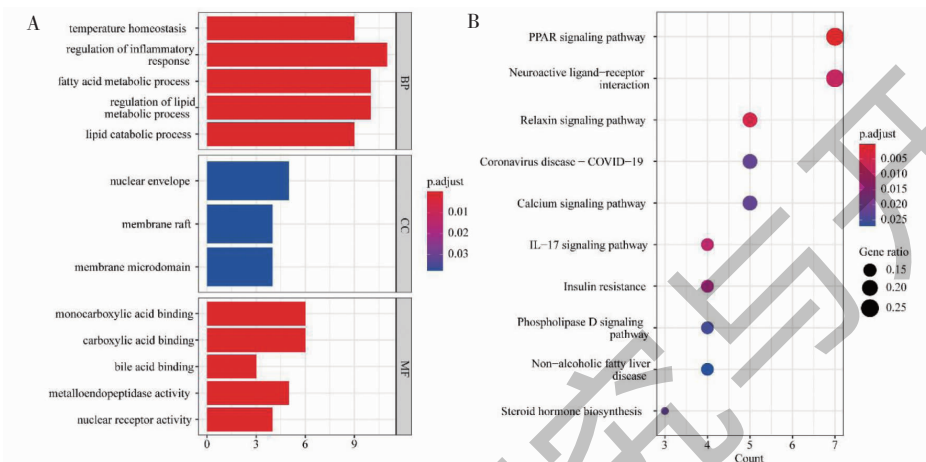


图 3 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis

注:A. GO 富集分析;B. KEGG 富集分析。Note:A. GO enrichment analysis;B. KEGG enrichment analysis.

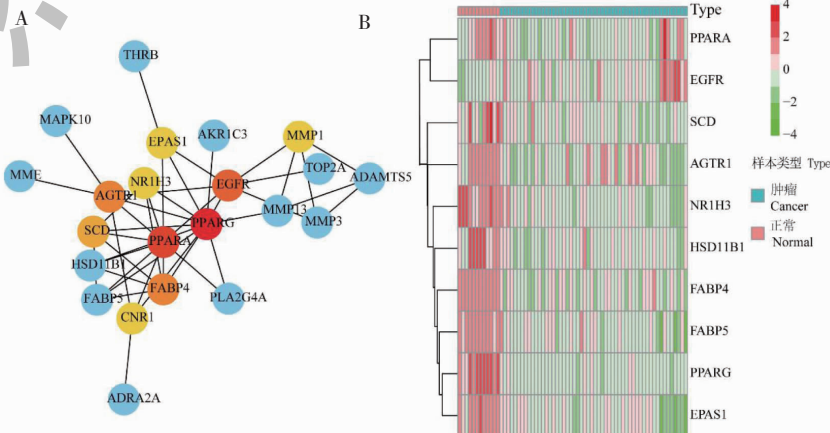
2.1.4 茯苓活性成分-乳腺癌靶点 PPI 网络的构建

将上述 30 个共同靶点输入到 STRING 数据库中进行检索,将其导入 Cytoscape 软件,得到由 24 个节点及 46 条边组成的 PPI 网络(见图 4A)。其中,节点越大、颜色越深,则代表对应靶蛋白的“degree”值越大。度值排序前 10 的核心靶点基因在不同样本中的表达量变化见图 4B,由图可知茯苓活性成分抗乳腺癌主要作用的靶点排名前 5 中 PPARG、PPARA、FABP4 均是 PPAR 信号通路所富集到的靶

点,这提示在这几条核心通路中,茯苓可能主要通过 PPAR 信号通路发挥作用。进一步对 PPARA 和 PPARG 的基因进行表达分析,发现 PPARG 相比与 PPARA 具有更明显的趋势与显著性(见图 4C、4D)。

2.1.5 茯苓“药物-成分-靶点-疾病”网络的构建

利用 Cytoscape 软件构建茯苓“药物-成分-靶点-疾病”网络,结果见图 5。该网络中共有 64 个节点,372 条边,其中茯苓活性成分以橙色菱形表示,30 个靶基因以绿色圆形表示。利用 CytoNCA 插件进行



续图 4(Continued Fig.4)

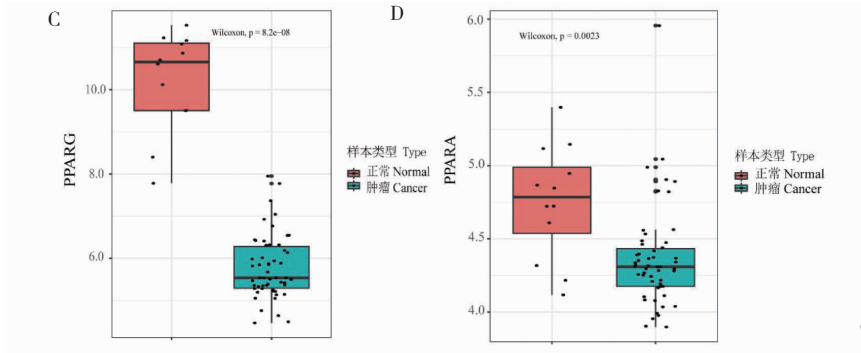


图4 PPI网络构建和核心靶点基因表达差异分析

Fig. 4 Construction of PPI network and core target gene expression calorimetry analysis

注:A. PPI网络;B. 核心靶点基因表达量;C. PPARG基因表达量;D. PPARA基因表达量。Note:A. PPI network;B. Core target gene expression;C. PPARG gene expression;D. PPARA gene expression.

度值分析发现茯苓中度值前3的活性成分为茯苓酸 A (poricoic acid A, 度 = 16)、土莫酸 (tumulosic acid,

度 = 7)、3-酮基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸 (3-Oxo-lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid, 度 = 7)。

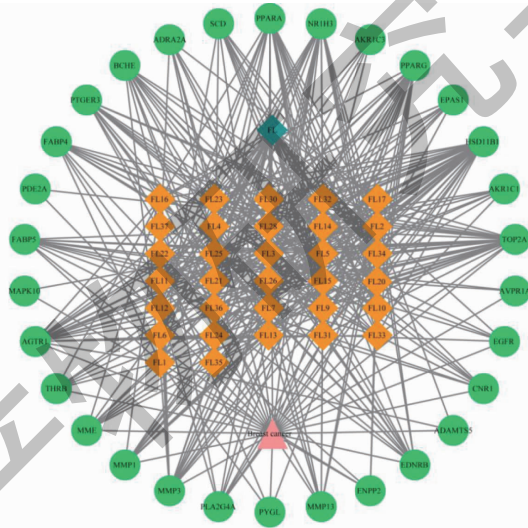


图5 “药物-成分-靶点-疾病”网络

Fig. 5 Network of “drug-active ingredient-target-disease”

2.2 关键成分和核心靶点的分子对接验证

使用 Autodock Vina 将 2 个核心靶点与“茯苓成分-靶点-疾病”网络中的 3 个关键成分进行分子对接验证,标记出受体蛋白中与化合物分子连接的氨基酸残基,得到相应的氨基酸序号与氢键数量,对接结果见图 6。以上结果说明关键成分与核心靶点的结合活性较好,并且以上核心成分对接的功能基团是相应碳链上的羧基、羟基及酯基,提示茯苓关键成分可能通过上述功能基团作用于上述核心靶点发挥防治乳腺癌的作用。

2.3 细胞实验验证

2.3.1 茯苓提取物对 4T1 细胞的增殖抑制活性

茯苓提取物在 4T1 细胞上作用 24 h 的毒性结果见图 7。与对照组比较,茯苓提取物在 160 ~ 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能明显抑制 4T1 细胞的增殖 ($P < 0.01$),当作用浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞相对生存率约为 92%,可认为无细胞毒性,选取 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及其更低浓度用于进一步实验。

2.3.2 茯苓提取物对 4T1 细胞的迁移活性影响

细胞划痕实验结果如图 8 所示,与对照组相比,茯苓提取物组迁移率显著抑制 ($P < 0.01$);与 DOX 组比较,在设定剂量下,茯苓提取物组细胞迁移率的抑制作用更强。

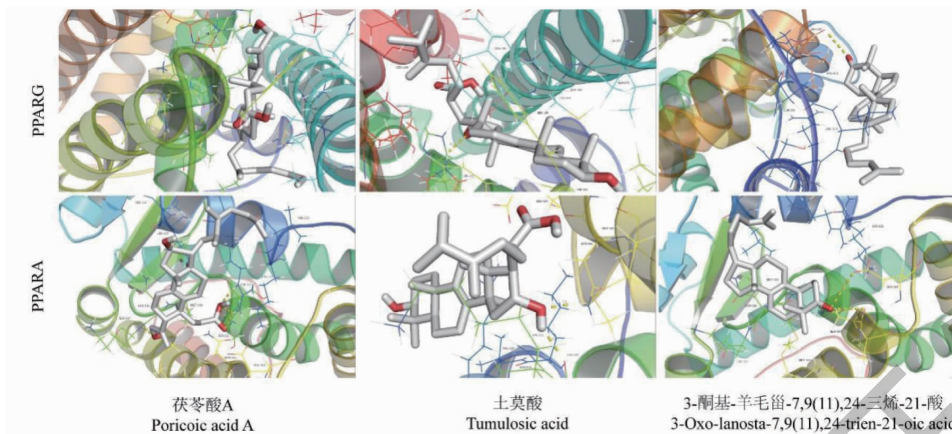


图 6 核心成分与核心靶点分子对接模式

Fig. 6 Docking mode of core components and target molecules

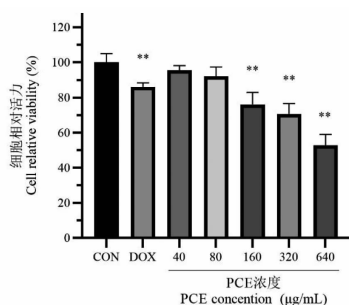


图 7 茯苓提取物对 4T1 细胞增殖抑制活性

Fig. 7 Inhibitory effect of PCE on proliferation of 4T1 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 8,9 同)。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Fig. 8,9 are the same).

2.3.3 茯苓提取物对 4T1 细胞代谢影响

茯苓提取物对 4T1 细胞 ATP 水平、LD 浓度的影响见图 9。使用茯苓提取物干预用后,细胞 ATP 的水平没有显著性影响,而 LD 水平随着其浓度增加而逐渐降低,表明茯苓提取物能够降低细胞内 LD

水平,影响 4T1 细胞代谢过程。

2.3.4 茯苓提取物对 PPARG 蛋白表达的影响

从 3 个组别的染色结果可以看出,底物蛋白 PPARG(绿色荧光)主要表达分布在细胞核上,茯苓提取物及盐酸阿霉素组显著增强(见图 10)。

3 讨论与结论

“药物成分-靶点-疾病”网络分析筛选得到茯苓酸 A、土莫酸、3-酮基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸与相关靶点的连接度较高,可能在茯苓治疗乳腺癌中发挥潜在的活性作用。研究表明以四环三萜为代表的成分具有显著的抗肿瘤活性^[10],目前已发表的文献中多以四环三萜类的主要成分茯苓酸等作为主要研究对象^[6],本研究筛选出的抗乳腺癌活性成分茯苓酸 A、土莫酸、3-酮基-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-21-酸与茯苓酸结构相似,均为羊毛甾烷型四环三萜,具有一定的研究价值。

本研究得到茯苓活性成分作用靶点 301 个,与

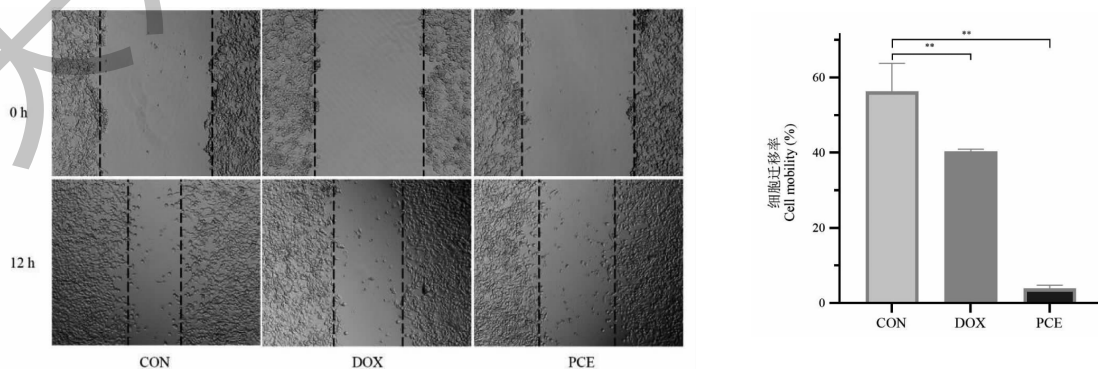


图 8 各组细胞的迁移情况

Fig. 8 Migration of cells in each group

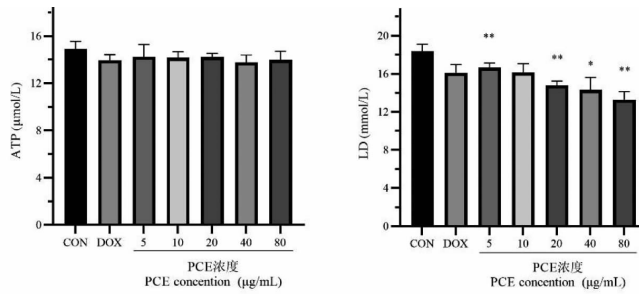


图9 茯苓提取物对4T1细胞代谢过程的调控

Fig.9 Regulation of PCE on the metabolic process of 4T1 cells

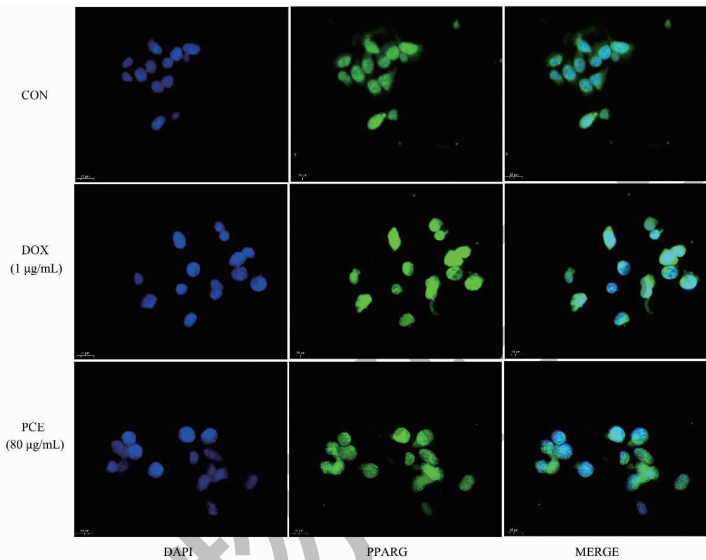


图10 PPARG蛋白在各组中的表达(×400)

Fig.10 Expression of PPARG protein in each group(×400)

乳腺癌差异基因取交集,共同作用靶点得到30个,筛选出茯苓活性成分抗乳腺癌核心结合蛋白(PPARG、PPARA),这2个靶点与肿瘤密切相关。KEGG通路富集分析结果显示,主要涉及乳腺癌靶点的信号通路有神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、PPAR信号通路等。其中最值得关注的是PPAR信号通路,这与我们预测的核心靶点结果相一致。PPAR是被脂肪酸及其衍生物激活的核激素受体,具有3种亚型^[11]。其中PPARG作为其中一种亚型,其受体激动剂已被提议作为乳腺癌的预防药物^[12]。PPARG通路已被明确与人类肿瘤的多种恶性特征相关,如增殖,侵犯,远处转移等,并涉及多种机制^[13]。有研究表明橙皮素在抑制乳腺癌干细胞的作用机制中,PPARG是重要的潜在作用靶点,在细胞增殖和新陈代谢中起重要作用^[14]。在氧气

充足的条件下肿瘤细胞会优先以糖酵解的方式产生ATP与大量的乳酸,为肿瘤细胞的增殖、转移供能^[15]。考察ATP含量以及乳酸产量可体现茯苓对肿瘤细胞能量代谢的影响。因此本实验围绕PPARG展开相关研究,细胞功能实验使用CCK8、划痕实验及试剂盒法验证茯苓对乳腺癌细胞增殖、转移和代谢能力的影响。结果表明,与对照组比较,茯苓提取物(160~640 μg/mL)能明显抑制乳腺癌细胞的增殖($P < 0.01$);划痕实验结果显示细胞迁移受到显著抑制($P < 0.01$);同时与对照组比较,茯苓提取物不同浓度作用后细胞中乳酸含量降低,ATP的水平没有显著性影响,茯苓提取物可能主要影响其他代谢进程进而影响细胞的新陈代谢;细胞免疫荧光结果表明PPARG蛋白主要分布在细胞核上,且经茯苓提取物刺激后荧光强度明显增强。

综上所述,本研究基于网络药理学分析揭示茯苓活性成分作用靶点和潜在机制,利用分子对接技术进一步验证活性成分与靶点蛋白的亲合关系,并对核心靶点的相关作用进行实验验证,结果表明茯苓可能通过上调 PPAR γ 的表达,抑制肿瘤细胞增殖及迁移、影响细胞代谢发挥抗乳腺癌作用,研究结果与现有文献的相关报道相互佐证。研究通过数据指导现代药物发现,为阐明茯苓防治乳腺癌的药效物质基础和作用机制提供了新的见解。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71:209-249.
- 2 Zhang L, Wang M, Zhang XX, et al. The mechanism of chelerythrine against breast cancer by network pharmacology and molecular docking[J]. J Xi'an Jiaotong Univ; Med Sci(西安交通大学学报:医学版), 2021, 42:554-561.
- 3 Li L, Zhou X, Gong XJ, et al. Progress of research on the anti-endometrial cancer effects and mechanisms of traditional Chinese medicine and natural product[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:2146-2156.
- 4 Dan WA. retrospective clinical study on prognostic factors and medication characteristics of 67 patients with postoperative bone metastases from breast cancer[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), 2021.
- 5 Deng TM, Peng DY, Yu NJ, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Poria cocos* and predictive analysis on quality markers[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51:2703-2717.
- 6 Wen H, Wu Z, Hu H, et al. The anti-tumor effect of pachymic acid on osteosarcoma cells by inducing PTEN and Caspase 3/7-dependent apoptosis[J]. J Nat Med, 2018, 72:57-63.
- 7 Lee S, Lee S, Roh HS, et al. Cytotoxic constituents from the sclerotia of *Poria cocos* against human lung adenocarcinoma cells by inducing mitochondrial apoptosis[J]. Cells, 2018, 7(9):116.
- 8 Wei J. Induction of pachymic acid on apoptosis of human breast cancer MDA-MB -231 cells by activating poly ADP ribose polymerase[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:3861-3865.
- 9 Miao G, Han J, Zhang J, Wu Y, Tong G. Targeting pyruvate kinase M2 and hexokinase II, pachymic acid impairs glucose metabolism and induces mitochondrial apoptosis[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42:123-129.
- 10 Cheng YM, Shen CJ, Chang CC, et al. Inducement of apoptosis by cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes, through death receptor 5 in human cervical cancer cell lines[J]. Cell Death Discov, 2017, 3:17014.
- 11 Kandel A, Dhillon SK, Prabakaran CB, et al. Identifying kinase targets of PPAR γ in human breast cancer[J]. Drug Target, 2021, 29:660-668.
- 12 Furth PA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and BRCA1[J]. Endocr-Relat Cancer, 2019, 26:R73-R79.
- 13 Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: physiological importance and clinical implications[J]. Eur J Med Chem, 2019, 166:502-513.
- 14 Hermawan A, Ikawati M, Khumaira A, et al. Bioinformatics and *in vitro* studies reveal the importance of p53, PPAR γ and notch signaling pathway in inhibition of breast cancer stem cells by hesperetin[J]. Adv Pharm Bull, 2021, 11:351-360.
- 15 Li Y, Yang D, Tian N, et al. The ubiquitination ligase SMURF2 reduces aerobic glycolysis and colorectal cancer cell proliferation by promoting ChREBP ubiquitination and degradation[J]. J Biol Chem, 2019, 294:14745-14756.