

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学 探究尖尾芋抗乳腺癌作用机制

王 鹏<sup>1†</sup>, 陈 娅<sup>1†</sup>, 彭兰淳<sup>1</sup>,  
郑青竹<sup>1</sup>, 陈 厅<sup>2</sup>, 彭江丽<sup>1,3</sup>, 彭求贤<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学药学院; <sup>2</sup>湖南中医药大学中西医结合学院; <sup>3</sup>湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心;

<sup>4</sup>湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 长沙 410208

**摘要:**本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术、网络药理学策略探究尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌药效物质基础及作用机制, 并通过 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型验证尖尾芋石油醚部位 (petroleum ether fraction of *Alocasia cucullata*, EAC) 体内抗乳腺癌作用及机制。基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 数据获取 EAC 化学成分 41 个, 包括 11 种芳香类成分、8 种萜类成分、5 种生物碱类成分、4 种脂脂肪酸类成分、2 种香豆素类成分和 11 种其他类成分; 基于鉴定出的化合物通过网络药理学得到 556 个潜在作用靶点; 蛋白互作网络 (PPI) 分析发现 MAPK1、Bcl-2 等 10 个核心靶点, 富集分析发现核心靶点可能通过 MAPK、PI3K-Akt 等细胞凋亡相关信号通路发挥抗乳腺癌作用, 并通过分子对接技术验证了毛地黄毒苷配基等活性成分与细胞凋亡相关蛋白 pERK、Bcl-2、Bax 具有良好的结合能力。抗乳腺癌活性研究结果表明与模型对照组比较, EAC 低、中、高剂量组肿瘤生长趋势渐缓, 肿瘤质量减少, 抑瘤率逐渐增加; EAC 中、高剂量组脾脏指数有显著性差异, EAC 低剂量组脾脏指数效果不显著 ( $P < 0.05$ ); HE 染色观察到给药组肿瘤组织中细胞排列疏松, 轮廓不清晰。ELISA 法检测小鼠血清, 发现 EAC 高、中剂量组、5-氟尿嘧啶阳性对照组的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量均降低。动物验证实验结果表明不同浓度 EAC 均能下调 MAPKs 信号通路中 p-ERK 蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ), 而对 ERK、JNK、p-38、p-JNK、p-p38 蛋白水平无显著性差异; EAC 能显著升高小鼠乳腺癌组织中 Bax/Bcl-2 蛋白水平和基因表达水平。综上, 尖尾芋石油醚部位能下调 p-ERK 蛋白水平, 促进癌细胞凋亡从而抑制 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长。

**关键词:**尖尾芋; 石油醚部位; 抗乳腺癌活性; 化学成分; 网络药理学; MAPKs 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)4-0675-19

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.4.015

## Anti-breast cancer mechanism of *Alocasia cucullata* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology

WANG Peng<sup>1†</sup>, CHEN Ya<sup>1†</sup>, PENG Lan-chun<sup>1</sup>,  
ZHENG Qing-zhu<sup>1</sup>, CHEN Ting<sup>2</sup>, PENG Jiang-li<sup>1,3</sup>, PENG Qiu-xian<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine;

<sup>3</sup>Hunan Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of Chinese Medicine;

<sup>4</sup>Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha 410208, China

**Abstract:** In this study, UPLC-Q-TOF-MS/MS technology and network pharmacology strategy were used to explore the pharmacodynamic material basis and mechanism of anti-breast cancer of petroleum ether fraction of *Alocasia cucullata* (EAC). The anti-breast cancer effect and mechanism of EAC *in vivo* were verified by 4T1 breast cancer tumor-bearing mouse model. Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS data, 41 chemical components of EAC were identified, including 11 aromatic compounds, 8

收稿日期: 2023-08-07

接受日期: 2023-11-29

基金项目: 国家自然科学基金 (81973593); 湖南省自然科学基金-科药联合项目 (2022JJ80087); 国家级大学生创新创业训练计划 (S202310541057); 湖南中医药大学中药学一流学科基金资助项目 (2018-3)

† 共同第一作者

\* 通信作者 Tel: 86-731-88458238; E-mail: cspqx@163.com

terpene compounds, 5 alkaloid compounds, 4 fatty acid compounds, 2 coumarin compounds, and 11 other compounds. Network pharmacology identified 556 potential target proteins for the identified compounds. PPI analysis identified 10 core targets, including MAPK1 and Bcl-2. Enrichment analysis suggested that these core targets might exert anticancer effects through pathways like MAPK and PI3K-Akt, related to cell apoptosis. Molecular docking confirmed the strong binding ability of active components like digitoxigenin with apoptosis-related proteins such as pERK, Bcl-2, and Bax. The results of the anticancer activity study showed that compared to the model group, the tumor growth trend was slower in the low, medium, and high-dose EAC groups. Tumor mass decreased, and the tumor inhibition rate increased gradually. The spleen index showed significant differences in the medium and high-dose EAC groups, while the low-dose EAC group did not show significant effects ( $P < 0.05$ ). HE staining revealed loosely arranged cells with unclear outlines in the tumor tissues of the treated groups. ELISA analysis of mouse serum revealed decreased levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the high and medium-dose EAC groups, as well as in the positive control group treated with 5-fluorouracil. Animal validation experiments demonstrated that EAC, at different concentrations, downregulated the expression of p-ERK protein in the MAPK signaling pathway ( $P < 0.01$ ), with no significant differences observed in the levels of ERK, JNK, p-38, p-JNK, and p-p38 proteins. EAC significantly increased the levels of Bax/Bcl-2 proteins and gene expression in mouse breast cancer tissues. In conclusion, EAC can down-regulate p-ERK protein levels, promote cancer cell apoptosis, and inhibit the growth of 4T1 breast cancer tumors in mice.

**Key words:** *Alocasia cucullata*; petroleum ether fraction; anti-breast cancer activity; chemical composition; network pharmacology; MAPK signaling pathway

在全球范围内,乳腺癌占有所有癌症发病率的10%,占女性肿瘤相关死亡率的15%,世界卫生组织发表的最新的《全球癌症报告2020》显示在2018年有210万乳腺癌新病例,有2.7万人死于乳腺癌,严重威胁机体健康<sup>[1,2]</sup>。由此可见,有效的乳腺癌治疗方法尤为重要。中医根据辨证论治理论,调整机体阴阳气血,脏腑经络等功能,对治疗乳腺癌有明显的疗效<sup>[3]</sup>。中医药能通过改善机体代谢、调节患者机体整体功能,减少乳腺癌的复发和转移以提高临床疗效<sup>[4,6]</sup>。

尖尾芋为天南星科海芋属植物尖尾芋 *Alocasia cucullata* (Lour.) Schott 的根茎,为传统民间用药,具有清热解毒,消肿镇痛的作用<sup>[7]</sup>。现代药理学研究表明尖尾芋可以激活免疫因子抑制黑色素瘤等多种肿瘤细胞活性,提高机体免疫能力,诱导癌细胞的凋亡从而发挥抗肿瘤功效,其相关分子机制涉及 MAPK、PI3K-Akt 等信号通路<sup>[8,9]</sup>。文献报道在体外细胞实验中发现尖尾芋石油醚部位 (petroleum ether fraction of *Alocasia cucullata*, EAC) 可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖,其机制与抑制 MAPK 通路中 p-ERK/ERK 的表达有关,同时通过 GC-MS 分析得到尖尾芋石油醚部位富含亚油酸等多种不饱和脂肪酸类成分及  $\gamma$ -谷甾醇等多种植物甾醇类成分<sup>[10]</sup>。现代研究表明亚油酸等不饱和脂肪酸及植物甾醇能通过调控 Bax/Bcl-2 水平,诱导乳腺癌细胞发生凋亡<sup>[11-14]</sup>。这提示尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌机制还可能与调控 Bax/Bcl-2 水平有关。但目

前尖尾芋石油醚部位化学成分研究仅局限于 GC-MS 分析,尖尾芋石油醚部位体内抗乳腺癌作用机制研究暂无相关报道,其药效物质基础及体内抗乳腺癌作用机制研究均相对薄弱。而 4T1 细胞移植瘤模型的生长状态及转移部位能很好模拟人类晚期乳腺癌,成为评估晚期乳腺癌药物的良好模型<sup>[15]</sup>。因此,本文以尖尾芋石油醚部位为研究对象,通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 明确尖尾芋石油醚部位化学成分组成,同时运用网络药理学策略结合分子对接技术在分子水平上阐明尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌作用机制,最后通过 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型评估尖尾芋石油醚部位体内抗乳腺癌效果并验证其抗乳腺癌作用机制。以期为尖尾芋的深入研究和开发利用提供实验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

实验动物:6~7 周龄的 BALB/c-nu 小鼠,体重 18~22 g,48 只,全部为雌性,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。实验经湖南中医药大学伦理委员会批准,伦理审查批准编号:SLBH-202205560005。动物饲养在湖南中医药大学实验动物中心,饲养环境:温度 22~24  $^{\circ}\text{C}$ ,湿度 60%~65%,昼夜交替,自由饮食饮水,适应性喂养一周后进行实验。

### 1.2 细胞

4T1 系小鼠乳腺癌细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

### 1.3 药材

尖尾芋于 2021 年 11 月购于广西钦州,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为天南星科海芋属植物尖尾芋 *Alocasia cucullata* (Lour.) Schott 的干燥根茎,凭证标本(2021113)保存于湖南中医药大学湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室。

### 1.4 仪器与材料

超高效液相色谱串联四级杆/飞行时间质谱(安捷伦公司);SILFA 多功能酶标仪(美国博腾仪器有限公司);NanoDrop2000c 超微量分光光度计(美国赛默飞)。

5-氟尿嘧啶(批号:HY90006,上海 MCE(中国)公司);DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素溶液、胎牛血清(批号:WHB823G111、WH1021A161、SA211028,武汉普诺赛生命科技有限公司);RIPA 裂解液(批号:CW2333S,江苏康为世纪生物科技股份有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0012,上海碧云天生物技术有限公司);凝胶试剂盒(批号:SW143-01/02,赛文创新(北京)生物技术有限公司);预染分子量 marker(批号:26616,美国赛默飞);ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK、p38、p-p38、Bax、Bel-2、HRP 标记山羊抗兔 IgG(批号分别为 R22685、310065、R24780、340810、R25239、310091、R22708、R22494、511203,成都正能生物技术有限责任公司);GAPDH、Beta Actin(批号:10494-1-AP、81115-1-RR,ProteintechGroup);逆转录试剂盒、NovoStart<sup>2</sup> SYBR qPCR SuperMix Plus(批号:E047-01B、E096-01B,苏州近岸蛋白质科技股份有限公司);小鼠 IL-1 $\beta$  ELISA Kit、小鼠 TNF- $\alpha$  ELISA Kit(批号:CSB-E08054m、CSB-E04741m,武汉华美);石油醚、甲醇(批号:BGE8RRE0、23055025,安徽泽升科技有限公司)。

### 1.5 尖尾芋成分分析

#### 1.5.1 样品的制备

称取尖尾芋根茎 50 kg,粉碎,分为两份,每份各 24.58 kg。70% 乙醇水溶液回流提取 3 次,每次 2 h,减压浓缩后得到密度为 1.37 的浸膏 8.65 kg。浸膏经蒸馏水混悬后,使用石油醚萃取 20 次,每次 2 L,最终得到石油醚部位浸膏 233.0 g。称取 5.0 g 尖尾芋石油醚部位浸膏,以适量甲醇复溶,离心取上清液,过膜后得供试品溶液。

#### 1.5.2 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu$ m),柱温 30  $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL/min,进样量 1  $\mu$ L;流动相 A(0.1% 甲酸水),流动相 B(纯乙腈),梯度洗脱(0 ~ 5 min,95%  $\rightarrow$  90% A;5 ~ 10 min,90%  $\rightarrow$  80% A;10 ~ 15 min,80%  $\rightarrow$  62% A;15 ~ 25 min,62%  $\rightarrow$  20% A;25 ~ 28 min,20%  $\rightarrow$  0% A;28 ~ 32 min,0% A;32 ~ 34 min,0%  $\rightarrow$  95% A)。紫外检测器:双波长模式,信号 A、B 的波长分别为:254、320 nm;检测时间:34 min。

#### 1.5.3 质谱方法

电喷雾离子化源,正离子检测模式。毛细管电压为正离子 3 000 V,喷嘴电压 1 000 V,锥孔电压 65 V,碎裂电压 175 V,雾化器温度 320  $^{\circ}$ C,雾化器气流 8 L/min,分子量扫描范围为 100 ~ 1 100  $m/z$ ,碰撞能量梯度 10 ~ 40 eV,鞘气温度 350  $^{\circ}$ C。

### 1.6 尖尾芋作用靶点预测

#### 1.6.1 活性成分对应靶点筛选

利用 TCMSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库查询 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定的尖尾芋石油醚部位化合物所对应靶点,同时通过 Uniprot 数据库查询靶点对应的基因名称,选择物种为“Homo sapiens”,建立数据集,将靶点蛋白名称对应 Uniprot 数据集统一转换为基因名称。检索 GeneCards 在线数据库,选择“Breast cancer”为关键词,获得与乳腺癌相关靶点的数据集。使用 Venny 2.1.0,提取化学成分与疾病交集靶点作为尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌的潜在作用靶点。

#### 1.6.2 蛋白互作网络(PPI)的构建

将尖尾芋石油醚部位化学成分抗乳腺癌的潜在作用靶点导入 STRING 在线数据库获取 PPI 网络,选择物种为“Homo sapiens”,置信度设置为 0.400,使用 Cytoscape3.9.0 中 Cyto NCA 插件中的度值(Degree)算法筛选出得分前 40 的潜在核心靶点,将潜在核心靶点导入 STRING 数据库,选择物种为“Homo sapiens”,置信度设置为 0.900,得到尖尾芋石油醚部位化学成分的潜在核心靶点蛋白的 PPI 网络。

#### 1.6.3 富集分析

通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台对尖尾芋石油醚部位化学成分核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。选取生物学过程(bio-

logical process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 前 5 个条目进行 GO 富集结果圆圈图绘制, 选取京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路前 20 个条目进行气泡图绘制。

#### 1.6.4 “成分-靶点-通路”网络的构建

利用 Cytoscape 3.6.1 软件, 构建尖尾芋石油醚部位“成分-靶点-通路”网络, 分析化合物和靶点间的度值关系, 其中节点代表活性成分、核心靶点和信号通路, 边用来连接活性成分、核心靶点和信号通路。

#### 1.6.5 分子对接验证

选取度值较为靠前的成分及靶点对其进行分子对接。利用 PubChem 在线数据库获取关键成分的 3D 结构, 并在 PDB 数据库下载相应靶点 3D 结构的 pdb 文件, 运用 AutoDock4.2.6 软件, 对靶点及活性成分进行分子对接分析, 并使用 PyMol 2.4.1 软件进行可视化处理。

### 1.7 尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌活性研究

#### 1.7.1 动物分组

将 BALB/c-nu 小鼠随机分为正常对照组 (HC 组)、模型对照组 (BC 组)、阳性药物 5-氟尿嘧啶组 (5-FU 组)、尖尾芋低 (EAC-L)、中 (EAC-M)、高 (EAC-H) 剂量组。

#### 1.7.2 接种肿瘤

取生长良好的 4T1 小鼠乳腺癌细胞进行接种。调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL, 活细胞数 > 95%, 除正常对照组的小鼠外, 将其余组小鼠于右侧腋下皮下注射 4T1 乳腺癌细胞 0.1 mL/只, 48 h 后接种部位有小突起即表明 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠造模成功。定期观察小鼠肿瘤增长情况, 同时记录成瘤时间、生长速度和肿瘤形态。肿瘤细胞于小鼠右腋下接种的当天定义为第 0 天。

#### 1.7.3 动物给药

小鼠接种成功后, 当肿瘤长到直径 3~4 mm 时开始灌胃。HC、BC 组小鼠用生理盐水灌胃, 每天一次; EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H 组分别灌胃 10、40、160 mg/mL 尖尾芋石油醚部位浸膏 (总固体得率为 76.51%), 每天一次, 连续灌胃 15 d。5-FU 组腹腔注射阳性药物 5-氟尿嘧啶 2.5 mg/mL, 隔天一次, 一共注射 8 次。

#### 1.7.4 肿瘤体积变化及抑瘤率

每天在给药前称体重, 用游标卡尺测量小鼠皮下瘤, 按公式 (1) 计算肿瘤相对体积。

$$V_1 = (L \times W^2) / 2 \quad (1)$$

式中,  $V_1$  为肿瘤相对体积 ( $\text{mm}^3$ ),  $L$  为小鼠皮下移植瘤的最长径 (mm),  $W$  为垂直径长度 (mm)。

末次给药 24 h 后, 所有小鼠处死眼球采血, 剥离瘤体, 称瘤重, 按公式 (2) 计算抑瘤率。

$$R_1 = (1 - A/B) \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $R_1$  为抑瘤率,  $A$  为实验组平均肿瘤重量 (mg),  $B$  为模型对照组平均瘤重量 (mg)。

#### 1.7.5 脾脏指数

取小鼠脾脏, 用生理盐水洗涤并用滤纸吸干表面水分, 用电子天平称重, 按公式 (3) 计算各脾脏指数。

$$R_2 = (C/D) \times 100\% \quad (3)$$

式中,  $R_2$  为脾脏指数,  $C$  为脾脏重量 (mg),  $D$  为小鼠体重 (g)。

#### 1.7.6 苏木素-伊红 (HE) 观察肿瘤组织病理变化

取各组小鼠肿瘤组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 脱蜡、脱水、包埋、切片、染色、封片, 最后显微镜镜检, 图像采集分析。

#### 1.7.7 ELISA 法检测血清中细胞因子水平

小鼠眼眶取血, 1 000 g 低温离心 15 min, 取上清液进行检测, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 水平。

### 1.8 动物实验验证

#### 1.8.1 Western blot 检测肿瘤组织中蛋白表达

将肿瘤组织样本剪成小块加入匀浆珠, 称量肿瘤组织的重量, 按照 1:10 (g/mL) 的比例加入 RIPA 裂解液, 提前加入适量蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂, 于匀浆机中低温研磨, 提取肿瘤组织蛋白; 用二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度法进行定量。配制 10% 的分离胶, 装配好好电泳槽, 加入电泳缓冲液, 各组蛋白上样量保持一致, 80 V 恒压电泳至溴酚蓝染料前沿至凝胶末端, 终止电泳。采用湿转, 200 mA 恒压转膜 90 min, 快速封闭液封闭 20 min; 根据一抗说明书稀释比例稀释抗体 (ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38、Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin) 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 一抗孵育完毕后室温振荡洗涤 3 次, 每次 10 min; 二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; 室温振荡洗涤 3 次后, 加入化学发光剂后曝光显影, Image J 分析软件分析结果, 目的

蛋白相对表达量 = 目的蛋白电泳条带净光密度值 / 内参蛋白电泳条带净光密度值。

### 1.8.2 实时荧光定量 PCR 检测细胞凋亡相关因子 mRNA 表达水平

取小鼠肿瘤组织 0.1 g, 加入 1 mL Trizol 溶液, 加入研磨钢珠低温高速研磨, 加入 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈颠倒混匀, 低温离心取上清加入异丙醇, 低温离心弃上清加入 75% 乙醇 1 mL, 低温离心留沉淀, 晾干后加入 15  $\mu$ L 无菌 DEPC 水溶解, 用 NanoDrop 测定

RNA 浓度。将 RNA 母液用无酶水稀释后按照逆转录试剂盒对 RNA 进行逆转录。按说明书配制 20  $\mu$ L PCR 扩增体系, 轻轻混匀离心后上机检测, 放置荧光定量 PCR 仪上, 设置如下程序: 步骤 1: 95  $^{\circ}$ C, 60 s; 步骤 2: 95  $^{\circ}$ C, 20 s; 58  $^{\circ}$ C, 20 s; 72  $^{\circ}$ C, 30 s; 步骤 3: 将步骤 2 设置为 45 个循环。在荧光定量 PCR 仪上采集退火延伸时的信号, 得到循环阈值 (Cycle threshold, Ct) 后用计算出各组样品目的基因的表达量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 以 GAPDH 作为内参, 引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

| 基因<br>Gene | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence(5'→3') |                           |
|------------|---------------------------------------|---------------------------|
|            | 上游引物<br>Upstream primer               | 下游引物<br>Downstream primer |
| GAPDH      | AACGACCCCTTCATTGACCTC                 | ACTGTGCCGTTGAATTTGCC      |
| Bax        | CGTGAGCGGCTGCTTGCTGTG                 | ATGGTGAGCGAGGCGGTGAG      |
| Bcl-2      | CCGTCGTGACTTCGCAGAGATG                | ATCCCTGAAGAGTTCCTCCACCAC  |

### 1.8.3 统计学分析

应用 SPSS 21.0 软件对数据进行分析, 计量结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 GraphPad Prism 9 软件绘制相关柱状图,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 尖尾芋石油醚部位化学成分鉴定

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析得尖尾芋石油醚部位正离子模式基峰图 (Base peak chromatogram,

BPC), 见图 1。结合 Chemspider、MassBank 等数据库, 从尖尾芋石油醚部位中共鉴定 41 个化学成分, 具体信息见表 2。其中包括 11 种芳香类成分 (2、3、5、6、9、12、15、16、19、20、29)、8 种萜类成分 (10、17、22、24、26、27、32、40)、5 种生物碱类成分 (4、8、18、28、39)、4 种脂肪酸类成分 (23、25、34、36)、2 种香豆素类成分 (13、21) 及 11 种其他类成分 (1、7、11、14、30、31、33、35、37、38、41)。

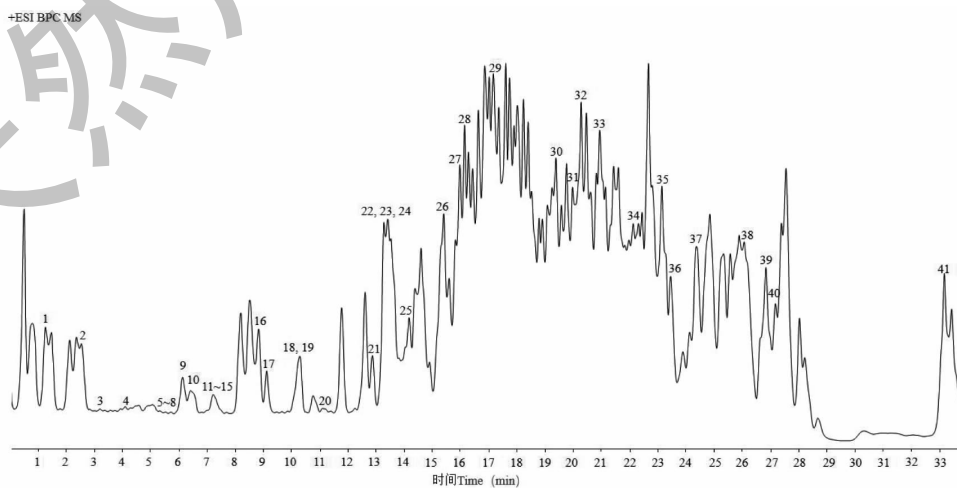


图 1 尖尾芋石油醚部位正离子模式 BPC 图

Fig. 1 The BPC diagram of EAC under positive ion mode

表 2 尖尾芋石油醚部位中鉴定出的化学成分  
Table 2 The chemical components identified from EAC

| 序号<br>No. | 保留时间 $t_R$<br>(min) | 化合物<br>Compound                         | 分子式<br>Molecular<br>formula                                  | 理论值<br>Theoretical<br>value<br>( $m/z$ [M + H] <sup>+</sup> ) | 实测值<br>Measured<br>value<br>( $m/z$ [M + H] <sup>+</sup> ) | 碎片离子<br>Fragment ion<br>( $m/z$ ) |
|-----------|---------------------|---|--|---|--|-----------------------------------|
| 1         | 1.19                | 胡桃醌<br>Juglone                          | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                | 175.038 9   | 175.039 5  | 157.004 2、129.977 8、121.029 0     |
| 2         | 2.71                | 没食子酸<br>Gallic acid                     | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                 | 171.028 7   | 171.028 8  | 153.018 3、107.013 0               |
| 3         | 3.39                | 4-羟基苯甲酸<br>4-Hydroxybenzoic acid        | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                 | 139.039 0   | 139.038 7  | 121.029 3                         |
| 4         | 4.49                | 咖啡碱<br>Caffeine                         | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | 195.087 7   | 195.087 6  | 138.070 9                         |
| 5         | 5.38                | 1,3,5-三甲氧基苯酚<br>1,3,5-Trimethoxybenzene | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>                | 169.086 5   | 169.086 5  | 153.055 2、139.075 9               |
| 6         | 5.61                | 对甲苯酚<br>p-Cresol                        | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O                              | 109.064 8   | 109.065 0  | 108.057 5                         |
| 7         | 5.65                | 2-吡啶吡啶<br>2-Pyridinylhydrazine          | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>                 | 110.071 3   | 110.071 6  | 109.063 9                         |
| 8         | 5.94                | 骆驼蓬醇<br>Harmol                          | C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O             | 199.086 5   | 199.087 1  | 171.055 7、155.060 8               |
| 9         | 6.26                | 香兰素<br>Vanillin                         | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                 | 153.054 6   | 153.054 8  | 137.023 9                         |
| 10        | 6.52                | 当归酸<br>Angelic acid                     | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                 | 101.059 7   | 101.059 7  | 100.052 4                         |
| 11        | 7.11                | 黄樟醚<br>Safrole                          | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>               | 163.075 4   | 163.075 4  | 147.044 6、131.049 7               |
| 12        | 7.44                | 丁香醛<br>Syringaldehyde                   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                | 183.065 2   | 183.065 5  | 155.075 1                         |
| 13        | 7.52                | 6-甲基香豆素<br>6-Methylcoumarin             | C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                | 161.059 5   | 161.059 8  | 133.065 7、105.072 7               |
| 14        | 7.72                | 吲哚-3-乙酸<br>Indole-3-acetic acid         | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>               | 176.070 6   | 176.070 1  | 130.065 1                         |
| 15        | 7.92                | 对苯二酚<br>Hydroquinone                    | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                 | 111.044 0   | 111.043 9  | 110.036 7                         |
| 16        | 8.87                | 芥子醇<br>Sinapyl alcohol                  | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>               | 211.096 5   | 211.096 8  | 193.086 0、161.059 7               |
| 17        | 9.32                | 薄荷酮<br>Pulegon                          | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O                            | 153.127 4   | 153.127 2  | 137.096 7、109.101 8               |
| 18        | 10.71               | 钩吻素戊<br>Koumidine                       | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O             | 295.180 4   | 295.180 2  | 143.072 0                         |
| 19        | 10.82               | 藜芦醛<br>Veratraldehyde                   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>                | 167.070 3   | 167.070 3  | 139.074 0                         |
| 20        | 11.43               | 姜酮<br>Zingerone                         | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>               | 195.101 6   | 195.102 0  | 177.091 8、145.065 3               |
| 21        | 13.19               | 7-羟基香豆素<br>7-Hydroxycoumarin            | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                 | 163.039 0   | 163.039 1  | 133.028 4、105.033 4               |
| 22        | 13.98               | 香芹酮<br>Carvone                          | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O                            | 151.111 7   | 151.111 8  | 123.080 3、109.064 6               |
| 23        | 13.98               | 茉莉酸<br>Jasmonic acid                    | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>               | 211.132 9   | 211.133 2  | 181.086 4                         |

续表 1 (Continued Tab. 1)

| 序号<br>No. | 保留时间 $t_R$<br>(min) | 化合物<br>Compound                      | 分子式<br>Molecular<br>formula                     | 理论值<br>Theoretical<br>value<br>( $m/z$ [M + H] <sup>+</sup> ) | 实测值<br>Measured<br>value<br>( $m/z$ [M + H] <sup>+</sup> ) | 碎片离子<br>Fragment ion<br>( $m/z$ ) |
|-----------|---------------------|--------------------------------------|---|---|--|-----------------------------------|
| 24        | 14.23               | 大麻萜酚<br>Cannabigerol                 | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | 317.247 5   | 317.247 2  | 299.237 0、193.122 1、123.116 9     |
| 25        | 15.93               | 亚麻酸<br>Linolenic acid                | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>  | 279.231 9   | 279.232 0  | 205.195 0、177.164 0               |
| 26        | 16.11               | $\gamma$ -姜黄烯<br>$\gamma$ -Curcumene | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                 | 205.195 1   | 205.194 9  | 189.163 7                         |
| 27        | 16.28               | 缬草烯酸<br>Valerenic acid               | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>  | 235.169 3   | 235.169 7  | 189.163 9                         |
| 28        | 17.23               | 甜菜碱<br>Betaine                       | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>  | 118.086 8   | 118.086 5  | -                                 |
| 29        | 19.74               | 肉桂酸<br>Cinnamic acid                 | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>    | 149.059 7   | 149.059 5  | 131.049 6                         |
| 30        | 20.59               | 1-棕榈酸单甘油酯<br>1-Monopalmitin          | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>  | 331.205 9   | 331.206 2  | 317.207 7                         |
| 31        | 20.98               | 肉桂酸苄酯<br>Benzyl cinnamate            | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 239.106 7   | 239.107 0  | 131.049 8、103.054 8               |
| 32        | 21.34               | 柠檬烯<br>Limonene                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | 137.132 5   | 137.132 3  | 109.101 1                         |
| 33        | 22.60               | 酸藤子酚<br>Embelin                      | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>  | 295.190 4   | 295.190 2  | 155.033 5                         |
| 34        | 23.24               | 二十碳三烯酸<br>Eicosatrienoic acid        | C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>  | 307.263 2   | 307.263 0  | 289.252 6                         |
| 35        | 23.77               | 鸮尾酮<br>Irone                         | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O               | 207.174 3   | 207.174 1  | 125.986 1                         |
| 36        | 24.22               | 亚麻酸甲酯<br>Methyl linolenate           | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | 293.247 5   | 293.247 2  | 261.221 3                         |
| 37        | 25.49               | 毛地黄毒苷配基<br>Digitoxigenin             | C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>  | 375.253 0   | 375.253 2  | 357.243 0、339.232 4               |
| 38        | 26.25               | 甘油单油酸酯<br>Glyceryl monooleate        | C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>  | 357.299 9   | 357.299 7  | 339.289 4                         |
| 39        | 26.97               | 番茄碱<br>Tomatidine                    | C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>2</sub> | 416.352 3   | 416.351 7  | 398.342 3、255.211 3               |
| 40        | 27.37               | 大麻二酚<br>Cannabidiol                  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>  | 315.231 9   | 315.231 6  | 193.122 3                         |
| 41        | 33.19               | 大豆脑苷<br>Soyacerebroside II           | C <sub>40</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>9</sub> | 714.551 5   | 714.552 4  | 696.541 2、534.488 7               |

### 2.1.1 芳香类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出 11 个芳香类成分,分别为苯酚类化合物 **2**、**5**、**6**、**9**、**12**、**15**、**16**、**19**、**20**,芳香酸类化合物 **3**、**29**。以化合物 **20** 姜酮为例,正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  195.102 0 [M + H]<sup>+</sup>,其二级碎片离子:177.091 8 [M + H-

H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>、145.065 3 [M + H-CH<sub>6</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>。其可能裂解途径见图 2。

### 2.1.2 萜类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出 8 个萜类成分,分别为化合物 **10**、**17**、**22**、**24**、**26**、**27**、**32**、**40**。其中化合物 **10** 为单萜类化合物,化合物 **17**、**22**、**32** 为单萜

类化合物,化合物 **24**、**40** 为萘酚类化合物,化合物 **26**、**27** 为倍半萜类化合物。以化合物 **17** 胡薄荷酮为例,在正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$

153.127 2  $[M + H]^+$ , 其二级碎片离子: 137.096 7  $[M + H - CH_4]^+$ 、109.101 8  $[M + H - C_2H_4O]^+$ 。其可能裂解途径见图 3。

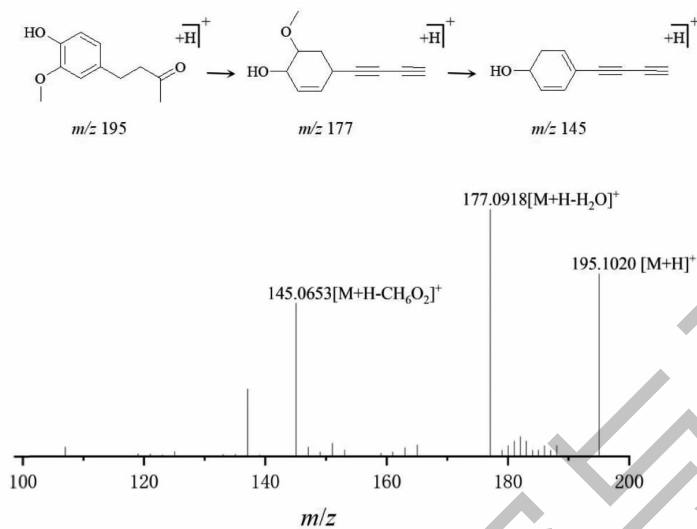


图 2 正离子模式下姜酮的质谱裂解方式

Fig. 2 Mass spectrometry fragmentation pathway of zingerone in positive ion mode

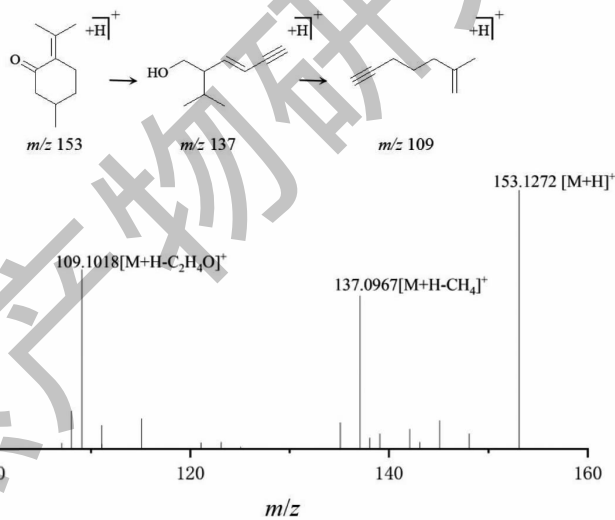


图 3 正离子模式下胡薄荷酮的质谱裂解方式

Fig. 3 Mass spectrometry fragmentation pathway of pulegone in positive ion mode

### 2.1.3 生物碱类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出 5 个生物碱类成分,分别为化合物 **4**、**8**、**18**、**28**、**39**。其中化合物 **4** 为黄嘌呤类生物碱,化合物 **8** 为  $\beta$ -咪唑类生物碱,化合物 **18** 为单萜吡啶类生物碱,化合物 **28** 为季铵碱类物质,化合物 **39** 为糖苷类生物碱。以化合物 **8** 骆驼蓬醇为例,在正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  199.087 1  $[M + H]^+$ , 其二级碎片离子: 171.055 7

$[M + H - C_2H_4]^+$ 、155.060 8  $[M + H - C_2H_4O]^+$ 。其可能裂解途径见图 4。

### 2.1.4 脂肪酸类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出 4 个脂肪酸类成分,分别为化合物 **23**、**25**、**34**、**36**。以化合物 **23** 茉莉酸为例,在正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  211.133 2  $[M + H]^+$ , 其二级碎片离子: 181.086 4  $[M + H - C_2H_6]^+$ 。其可能裂解途径见图 5。



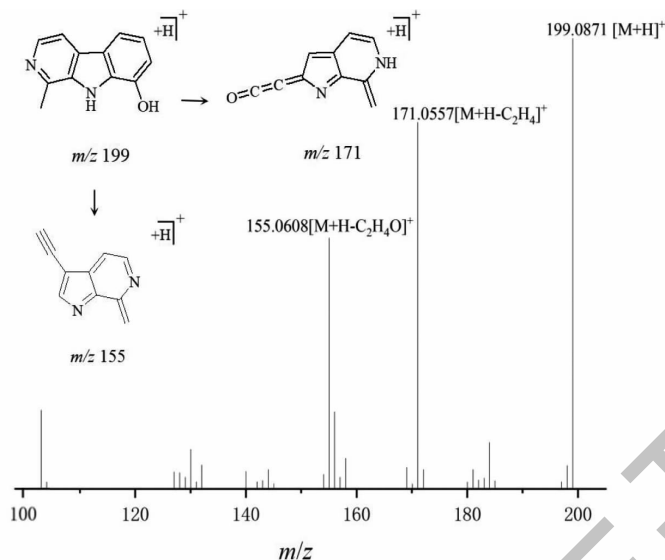


图 4 正离子模式下骆驼蓬醇的质谱裂解方式

Fig. 4 Mass spectrometry fragmentation pathway of harmol in positive ion mode

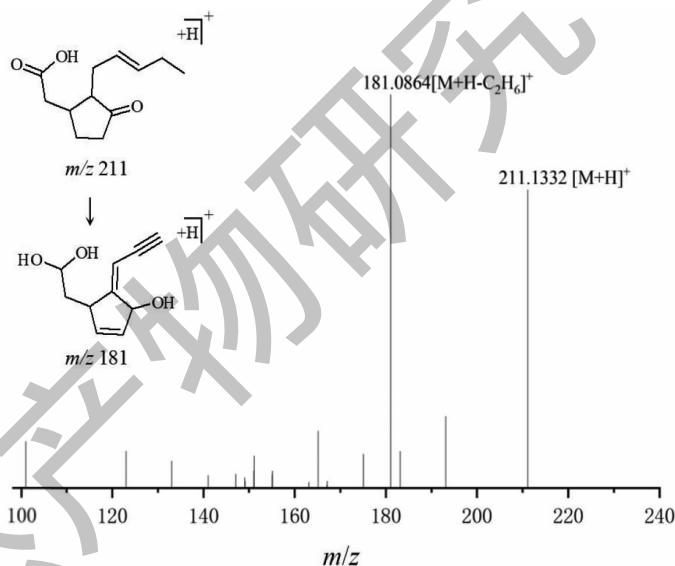


图 5 正离子模式下茉莉酸的质谱裂解方式

Fig. 5 Mass spectrometry fragmentation pathway of jasmonic acid in positive ion mode

### 2.1.5 香豆素类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出 2 个香豆素类成分,分别为化合物 **13**、**21**。以化合物 **21** (7-羟基香豆素) 为例,在正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  163.039 1 [M + H]<sup>+</sup>,其二级碎片离子:133.028 4 [M + H-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>、105.033 4 [M + H-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>。其可能裂解途径见图 6。

### 2.1.6 其他类成分分析

从尖尾芋石油醚部位中鉴定出化合物 **1** 为萘醌

类化合物,化合物 **7** 为吡啶类化合物,化合物 **11** 为简单苯丙素类化合物,化合物 **14** 为吡啶类化合物,化合物 **30**、**31**、**38** 为酯类化合物,化合物 **33** 为苯醌类化合物,化合物 **35** 为酮类化合物,化合物 **37** 为甾醇类化合物,化合物 **41** 为脑苷脂类化合物。以化合物 **11** 黄樟醚为例,在正离子模式下其准分子离子峰为  $m/z$  163.075 4 [M + H]<sup>+</sup>,其二级碎片离子:147.044 6 [M + H-CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>、131.049 7 [M + H-CH<sub>4</sub>O]<sup>+</sup>。其可能裂解途径见图 7。

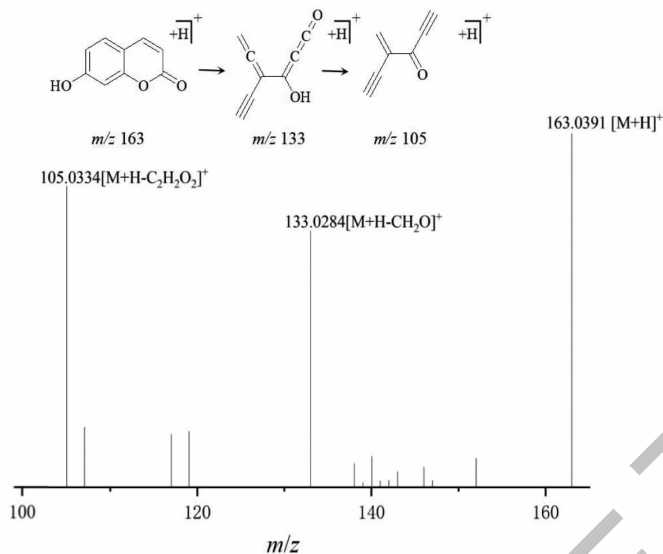


图6 正离子模式下7-羟基香豆素的质谱裂解方式

Fig. 6 Mass spectrometry fragmentation pathway of 7-hydroxycoumarin in positive ion mode

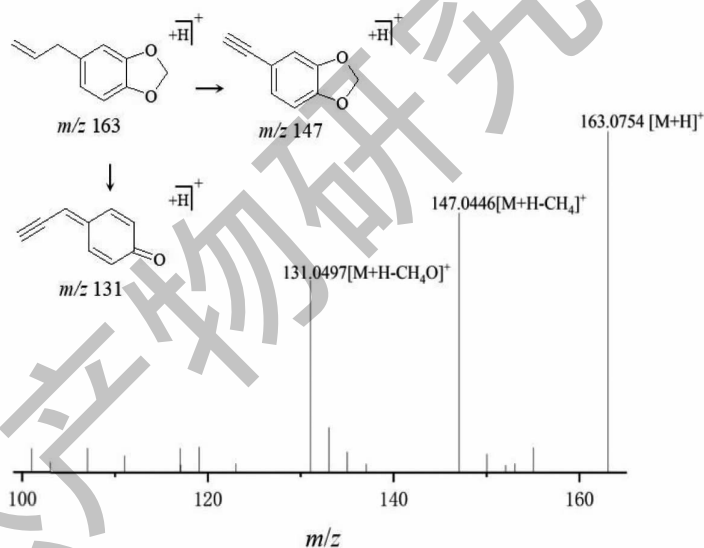


图7 正离子模式下黄樟醚的质谱裂解方式

Fig. 7 Mass spectrometry fragmentation pathway of safrol in positive ion mode

## 2.2 网络药理学分析

通过检索数据库并利用 Venny2.1.0 研究发现尖尾芋石油醚部位化学成分与乳腺癌具有 556 个交集靶点,如图 8 所示。进一步分析得到 35 个成分与乳腺癌有关的 40 个潜在核心靶点,再将 40 个潜在核心靶点蛋白相互作用信息导入 Cytoscape3.9.0 绘制尖尾芋石油醚部位活性成分作用靶点蛋白相互作用(PPI)网络图,如图 9 所示,节点大小及颜色深浅代表靶点度值大小。尖尾芋石油醚部位化学成分作

用靶点中,度值排名前 10 依次为类固醇受体共激活因子(SRC)、胱天蛋白酶 3(CASP3)、表皮生长因子受体(EGFR)、转录激活因子 3(STAT3)、核因子  $\kappa$ B 亚基 1(NFKB1)、白介素-6(IL6)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(BCL2)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14),这些靶点主要集中于 MAPK 蛋白家族和 PI3K 蛋白家族。

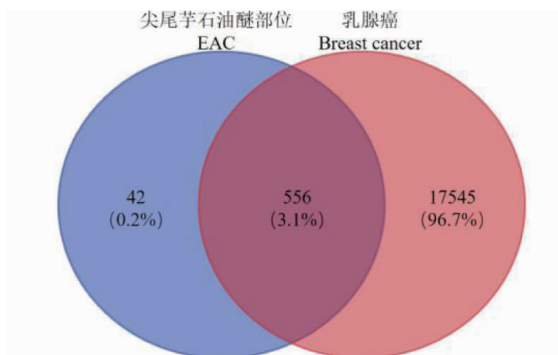


图 8 交集靶点分析

Fig. 8 Intersectional target analysis

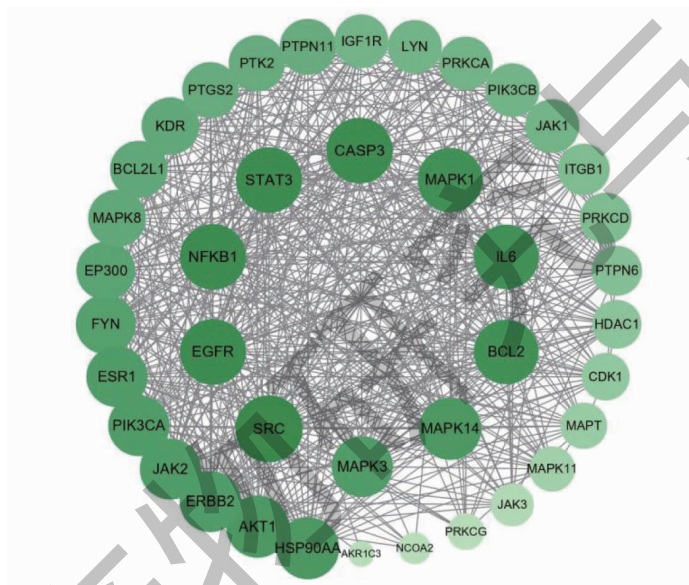


图 9 PPI 网络构建

Fig. 9 Construction of PPI network

再通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台对尖尾芋石油醚部位 40 个核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。获得 GO term 共 484 条,其中 GO BP 有 354 条、GO CC 有 51 条、GO MF 有 79 条。分别选取 BP、CC、MF 前 5 个条目进行 GO 富集结果气泡图绘制,如图 10 所示,BP 富集结果显示 EAC 治疗乳腺癌的靶点主要涉及到细胞内信号传导过程、蛋白质磷酸化、细胞凋亡负调控等过程。CC 富集结果显示 EAC 治疗乳腺癌的靶点主要集中于质膜细胞质侧的外源性成分、细胞质及脂筏等部位。MF 富集结果显示 EAC 治疗乳腺癌的靶点主要集中在蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、酶结合等方面。GO 富集分析结果提示尖尾芋石油

醚部位化学成分可通过细胞凋亡负调控过程发挥抗癌作用。

共获得 KEGG 通路共 156 条,选取 KEGG 富集通路前 20 个条目进行气泡图绘制,如图 11 所示,前 10 条分别为 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、乙型肝炎、癌症中的蛋白多糖、癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、MAPK 信号通路、VEGF 信号通路以及内分泌抵抗,这些通路涉及表皮生长因子受体信号通路(EGFR 信号通路)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路(PI3K-Akt 信号通路)及丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK 信号通路)等,均和癌症反应密切相关。

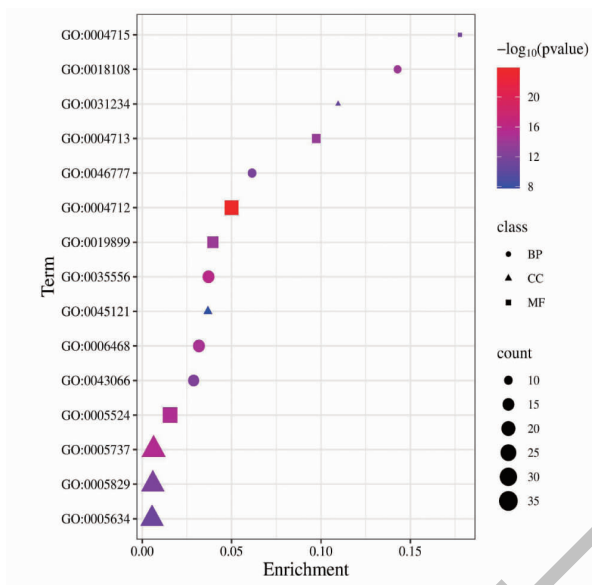


图 10 GO 富集结果气泡图

Fig. 10 Bubble diagram of GO enrichment analysis

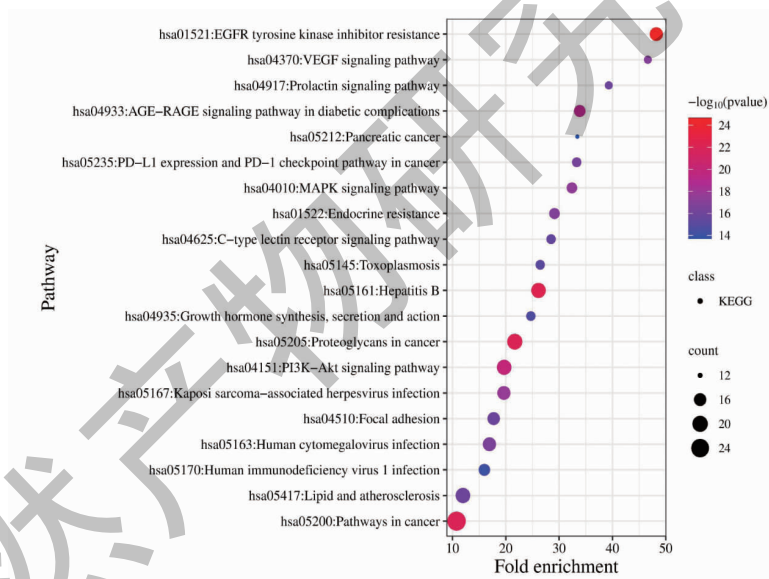


图 11 KEGG 通路富集结果气泡图

Fig. 11 Bubble diagram of KEGG pathway analysis

运用 Cytoscape 3.9.0 作图软件对前 10 条 KEGG 信号通路相关的 32 个尖尾苧有效成分、26 个核心靶点制作成分-靶点-通路互作网络图,如图 12 所示。尖尾苧石油醚部位活性成分中,度值排名前 5 依次为毛地黄毒苷配基、亚麻酸、7-羟基香豆素、肉桂酸苄酯、姜酮,活性成分作用靶点中,度值排名前 10 依次为前列腺素内过氧化物合酶 (PTGS2)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)、丝裂

原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、磷酸肌醇 3 激酶  $\alpha$  (PIK3CA)、磷酸肌醇 3 激酶  $\beta$  (PIK3CB)、蛋白激酶 C $\alpha$  (PRKCA)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1) 以及雌激素受体 (ESR1),这些靶点主要集中于 MAPK 蛋白家族和 PI3K 蛋白家族,很多癌症和 MAPK 及 PI3K 蛋白家族有关。此外,KEGG 通路富集分析结果提示尖尾苧石油醚部位化学成分可通过 MAPK、PI3K-Akt 等信号通路发挥抗肿瘤功效。

同时,利用 Autodock 软件进行半柔性分子对接

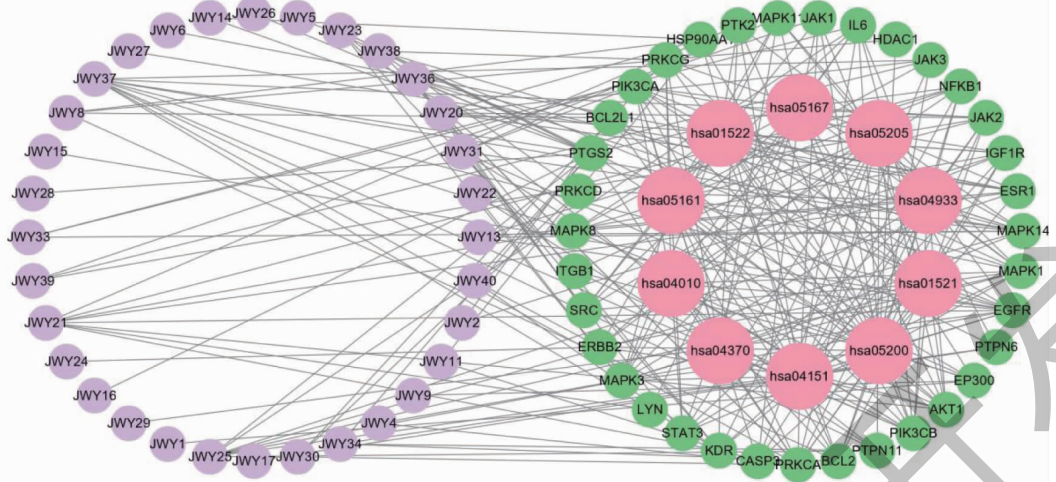


图 12 成分-靶点-通路交互网络图

Fig. 12 Network of “active ingredient-target-pathway”

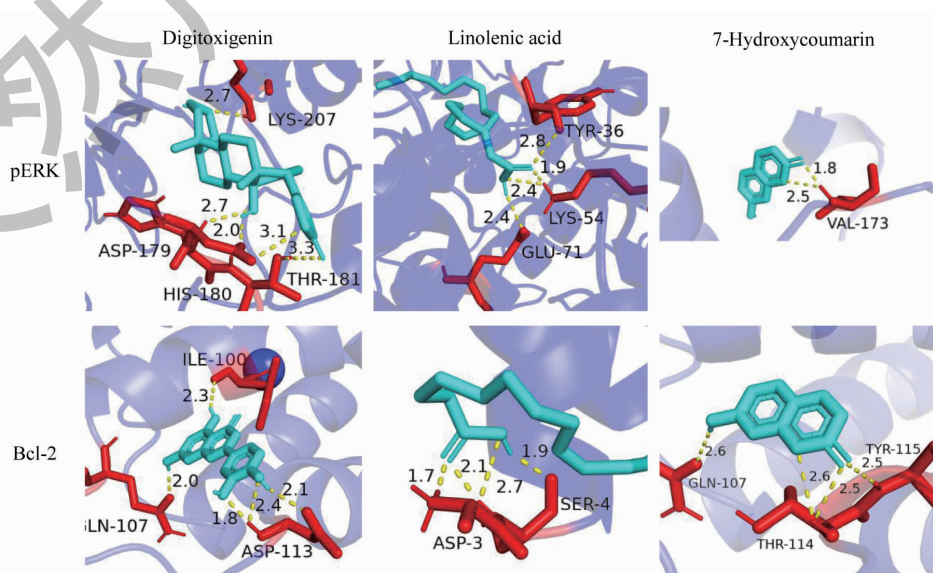
反向验证,选取“成分-靶点-通路”网络中度值排名前3的核心成分(毛地黄毒苷配基、亚麻酸、7-羟基香豆素)与文献调研得到的尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌相关核心靶点<sup>[10]</sup>(p-ERK、Bcl-2、Bax)进行分子对接,见表3。结合能数值越小,说明该成分与核心靶点结合越稳定,其中6组对接结合能均小于-5.0

kcal/mol,表明毛地黄毒苷配基及7-羟基香豆素和3个凋亡相关核心靶点间具有良好的结合能力<sup>[16]</sup>,对接构象见图13所示。以上对接结果表明,尖尾芋石油醚部位活性成分可自发地与3种凋亡相关的核心蛋白结合,从而发挥抗乳腺癌活性。

表 3 核心成分与核心靶点对接结果

Table 3 Molecular docking result between core components and core targets

| 核心成分<br>Core ingredient   | 结合能 Binding energy (kcal/mol) |       |       |
|---------------------------|-------------------------------|-------|-------|
|                           | pERK                          | Bcl-2 | Bax   |
| 毛地黄毒苷配基 Digitoxigenin     | -7.29                         | -7.74 | -6.28 |
| 亚麻酸 Linolenic acid        | -3.21                         | -4.15 | -2.27 |
| 7-羟基香豆素 7-Hydroxycoumarin | -5.42                         | -5.42 | -5.10 |



续图 13(Continued Fig.13)

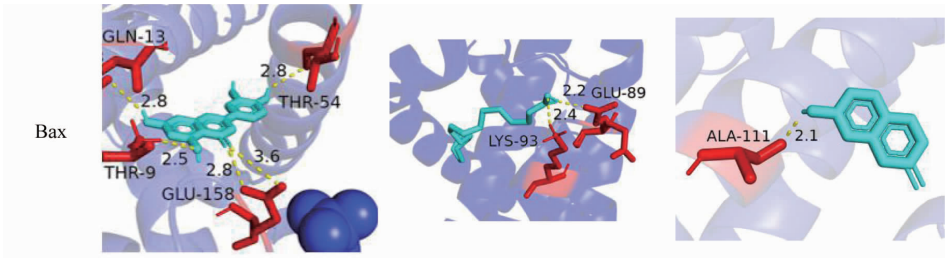


图 13 分子对接结果

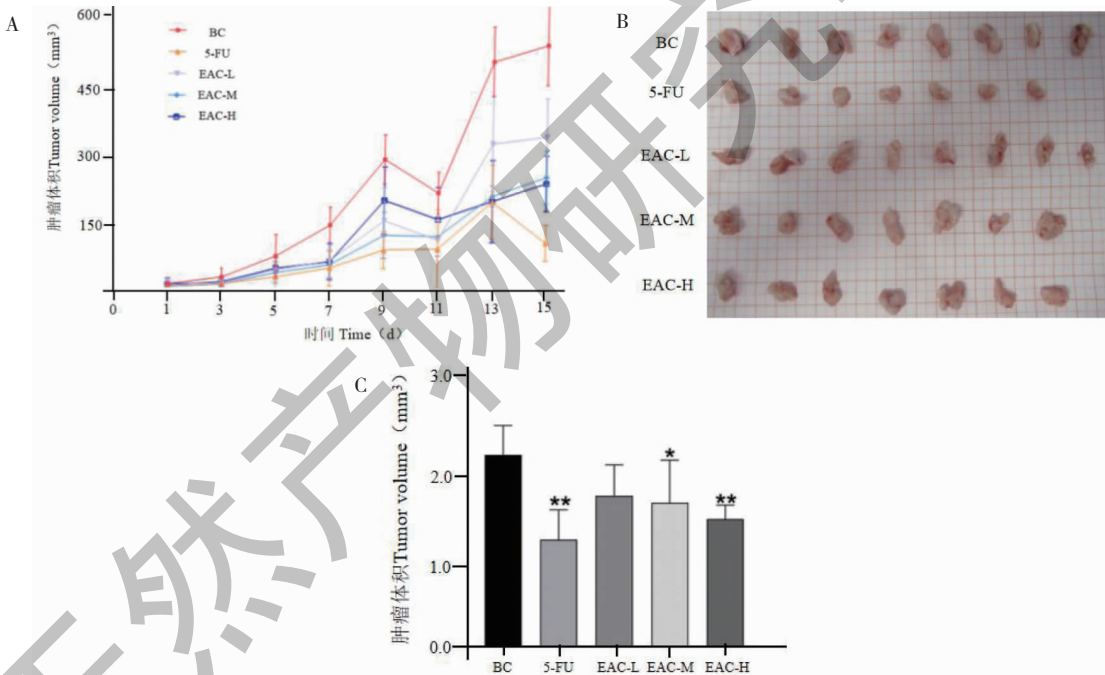
Fig. 13 Results of molecular docking

## 2.3 尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌活性研究

### 2.3.1 肿瘤体积变化及抑瘤率

BALB/c-nu 小鼠经 15 天尖尾芋石油醚部位浸膏干预后,每两天用游标卡尺对小鼠皮下肿瘤进行测量,随时间变化,小鼠肿瘤体积逐渐增大,其中 BC 组体积生长最大,平均体积为 518.96 mm<sup>3</sup>,其他给药组平均体积均未超过 350 mm<sup>3</sup>(见图 14A)。小鼠

处死后将各组肿瘤剥离下来并称重(见图 14B),各药物组肿瘤重量与 BC 组比较具有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )(见图 14C)。得到 5-FU 组、EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H 组肿瘤抑制率分别为 44.11%、21.36%、24.93%、33.45% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )(见表 4)。

图 14 尖尾芋石油醚部位对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )Fig. 14 Effect of EAC on tumor growth in tumor-bearing mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

注:A. 肿瘤体积;B. 肿瘤形态学观察;C. 肿瘤重量;与 BC 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Note: A. Tumor volume; B. Tumor morphological observation; C. Tumor weight; Compared with BC, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.3.2 脾脏指数

各组小鼠的脾脏指数的影响结果见图 15。实验结果显示 EAC-H、EAC-M 组以及 5-FU 组脾脏指数与 BC 组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );EAC-L 组脾脏指数效果不显著。

### 2.3.3 苏木素-伊红(HE)观察肿瘤组织病理变化

实验对肿瘤组织进行 HE 染色,为初步探讨尖尾芋石油醚部位提取物对肿瘤组织凋亡的影响。在 BC 组中肿瘤细胞排列紧密,核仁明显,染色深,基本无坏死。而 5-FU 组、EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H

表 4 各组抑瘤率

Table 4 Tumor suppression rates for each group

| 组别<br>Group | 动物数值<br>Number of animal | 肿瘤重量<br>Tumor weight (g) | 抑瘤率<br>Tumor inhibition rate (%) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| BC          | 8                        | 2.24 ± 0.34              | -                                |
| 5-FU        | 7                        | 1.25 ± 0.35 **           | 44.11                            |
| EAC-L       | 8                        | 1.76 ± 0.36              | 21.36                            |
| EAC-M       | 7                        | 1.68 ± 0.50 *            | 24.93                            |
| EAC-H       | 7                        | 1.49 ± 0.16 **           | 33.45                            |

注:与 BC 组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

Note: Compared with BC, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

组肿瘤细胞均排列疏松, 细胞轮廓模糊, 细胞质破裂, 肿瘤细胞坏死区域较大, 提示尖尾芋石油醚部位具有抗乳腺癌作用(见图 16)。

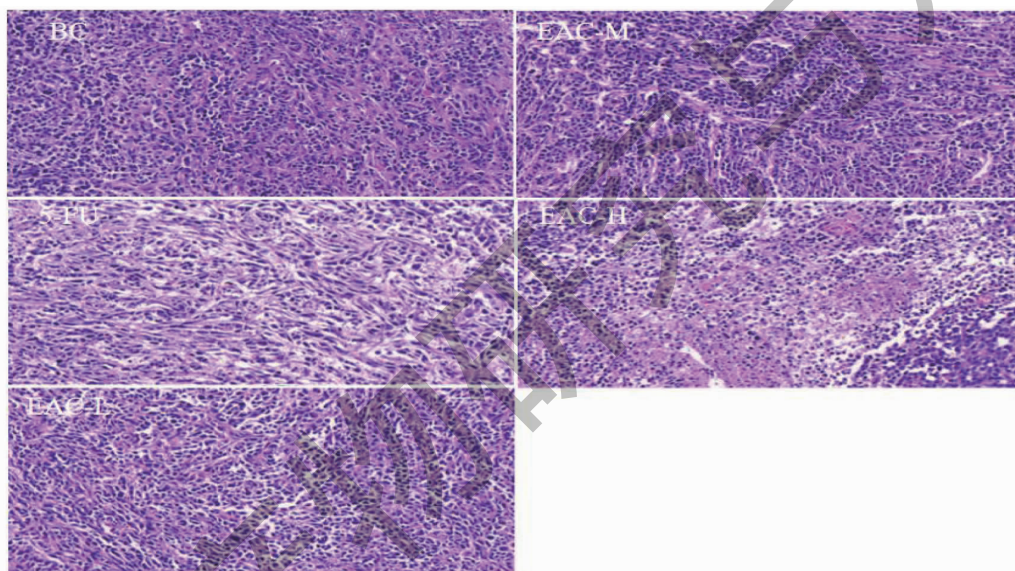


图 16 HE 染色观测各组荷瘤小鼠移植瘤组织的病理变化(×100)

Fig. 16 Pathological changes of transplanted tumor tissues of tumor-bearing mice in each group were observed by HE staining (×100)

2.3.4 ELISA 法检测血清中细胞因子水平

如图 17 所示, 与 HC 组比较, BC 组小鼠血清中

IL-1β、TNF-α 水平显著升高(P < 0.05); 与 BC 组比较, 5-FU 组、EAC-M 组、EAC-H 组小鼠血清中 IL-

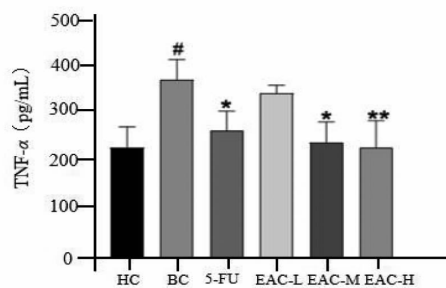
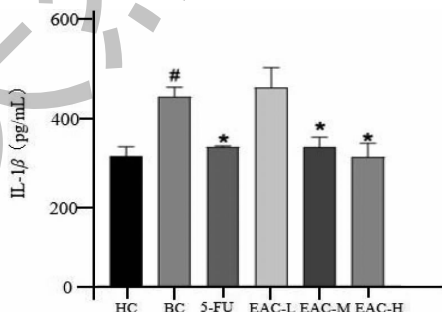


图 17 各组小鼠血清中细胞因子含量(x ± s, n = 3)

Fig. 17 Contents of cytokines in serum of mouse groups(x ± s, n = 3)

注:与 HC 组比较, #P < 0.05; 与 BC 组相比, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。Note: Compared with HC, #P < 0.05, Compared with

BC, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

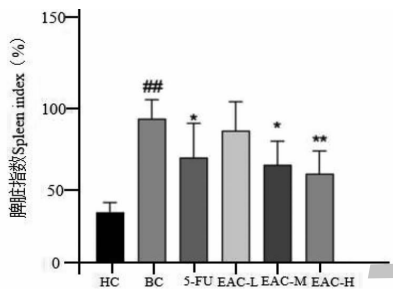


图 15 尖尾芋石油醚部位对脾脏指数的影响(x ± s, n = 7)

Fig. 15 Effects of EAC on spleen index(x ± s, n = 7)

注:与 HC 组比较, ###P < 0.01; 与 BC 组相比, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。Note: Compared with HC, ###P < 0.01; Compared with BC, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

$\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), EAC-L 组无显著性差异。

## 2.4 动物实验验证

### 2.4.1 Western blot 检测肿瘤组织中蛋白表达

#### 2.4.1.1 MAPK 信号通路相关蛋白表达情况

提取各组肿瘤组织蛋白后,以  $\beta$ -actin 作为内参

对各组蛋白定量分析,结果显示,与模型组比较,5-FU 组、EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H 组的总 ERK1/2 表达量无明显变化,但能显著降低 p-ERK 蛋白表达量,p-ERK/ERK 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),而 ERK、JNK、p-38、p-JNK、p-p38 蛋白表达量无明显变化,结果见图 18。

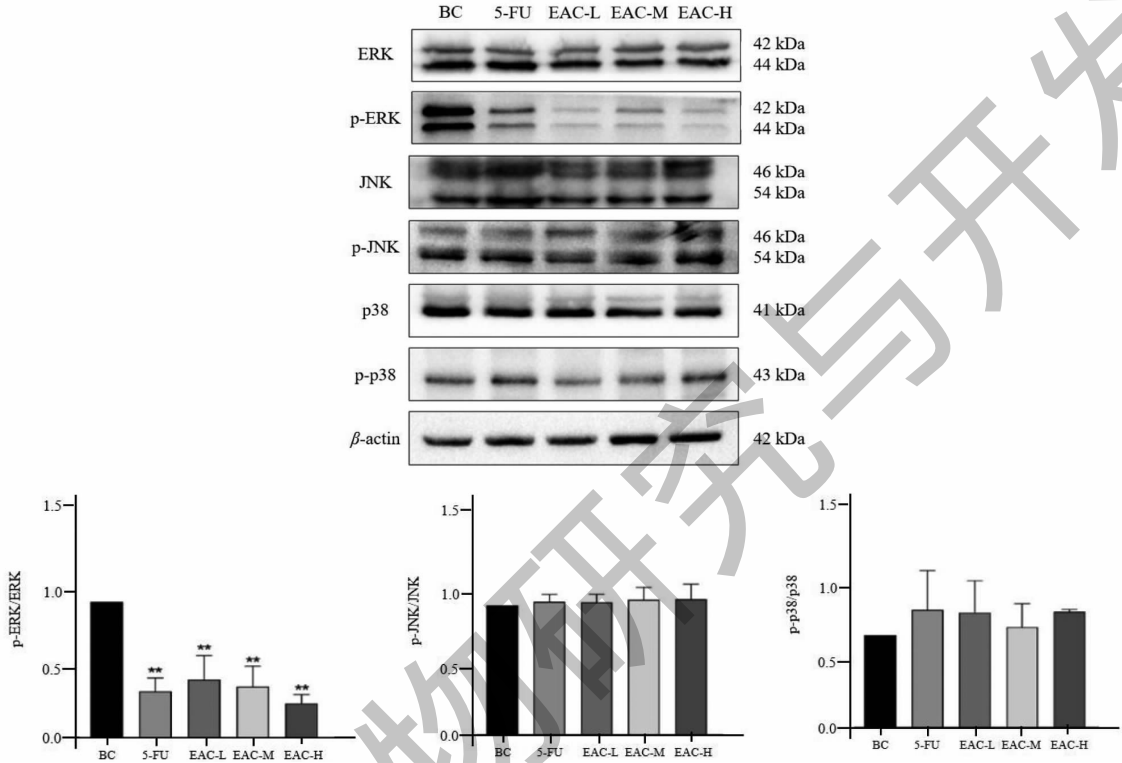


图 18 EAC 调控 MAPKs 信号通路相关蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 18 EAC regulates the expression of MAPKs signaling pathway related proteins ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注:与 BC 组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。 Note: Compared with BC, \*\*  $P < 0.01$ 。

#### 2.4.1.2 凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达情况

采用免疫印迹法检测肿瘤组织中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达水平,设置对照组,以  $\beta$ -actin 作为内参对照,将各组与 BC 组比较,发现 5-FU 组、EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), Bax 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 结果见图 19。

#### 2.4.2 实时荧光定量 PCR 检测细胞凋亡相关因子 mRNA 表达水平

提取各组肿瘤组织中的 RNA,采用 qRT-PCR 法,检测凋亡相关基因 Bax/Bcl-2 mRNA 的含量,与 BC 组比较,5-FU 组、EAC-L 组、EAC-M 组、EAC-H 组 Bax/Bcl-2 mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 如图 20 所示,提示尖尾芋石油醚部位通过调节 Bax/

Bcl-2 相关途径来促进肿瘤组织中的癌细胞发生凋亡。

## 3 讨论与结论

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析了尖尾芋石油醚部位的 41 种化学成分。同时,通过网络药理学策略分析出尖尾芋石油醚部位 32 个抗乳腺癌活性成分及 556 个抗乳腺癌相关靶点,PPI 网络预测得到 MAPK1、Bcl-2 等 40 个核心靶点,这些靶点主要集中于 MAPK 蛋白家族和 PI3K 蛋白家族。进一步通过 GO 生物学过程富集分析显示,尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌主要涉及细胞凋亡负调控等生物过程,KEGG 信号通路富集分析显示,尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌作用靶点富集多在 PI3K-Akt、MAPK 信号通路,均与细胞凋亡相关。PPI 网络预测得到



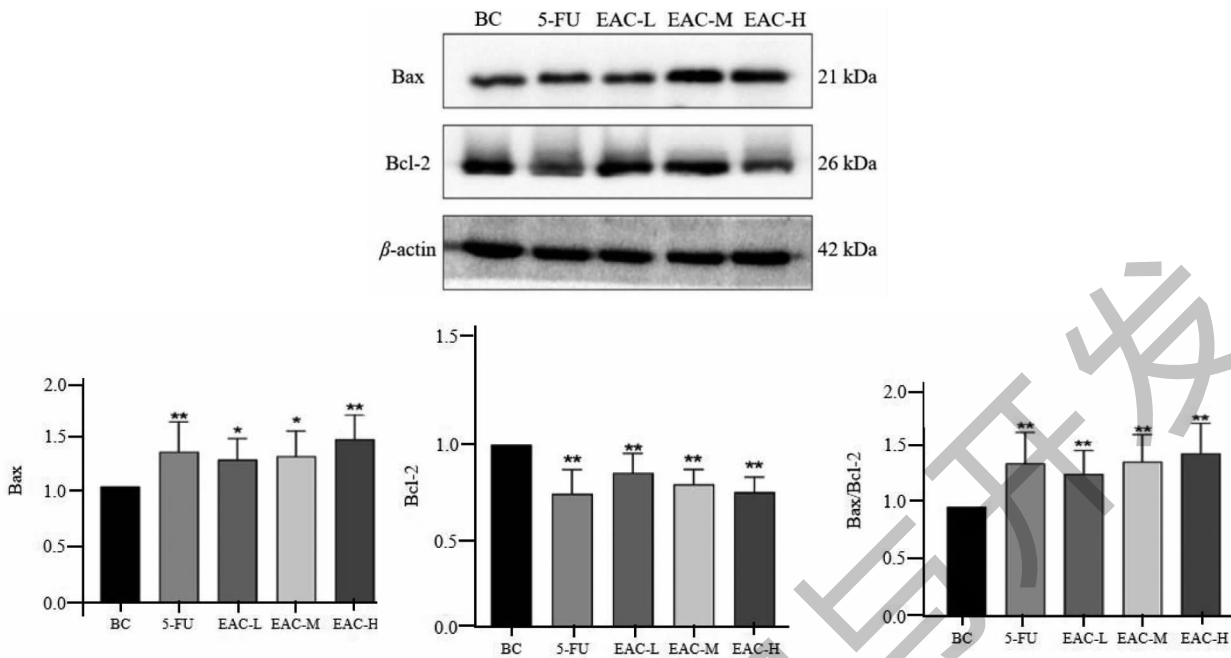


图 19 EAC 调控凋亡相关蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 19 EAC regulates the expression of apoptosis-associated proteins ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 BC 组比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01。 Note: Compared with BC, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

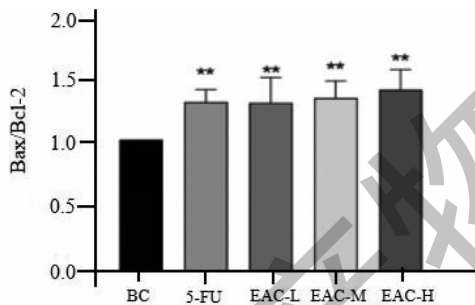


图 20 EAC 调控凋亡相关 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 20 EAC regulates mRNA expression related to apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 BC 组比较, \*\* P < 0.01。 Note: Compared with BC, \*\* P < 0.01.

尖尾芋在民间常被用于治疗多种癌症,其块茎中的化合物能抑制多种癌细胞的生长<sup>[17]</sup>。本课题组前期研究发现,尖尾芋水提物能通过增强小鼠脾细胞活力,抑制小鼠乳腺癌的生长,延长乳腺癌小鼠的生存期,细胞实验发现尖尾芋能明显催化免疫单核细胞分化为巨噬细胞,激发巨噬细胞的功能,激活免疫达到抗肿瘤作用<sup>[18,19]</sup>。尖尾芋石油醚部位能抑制人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的生长,促进癌细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本试验结果表明尖尾芋石油醚部位能抑制荷瘤小鼠乳腺癌生长的速度,减轻肿瘤重量,且抑瘤率呈现浓度依赖趋势。脾脏是动物体内重要的免疫器官,可反映出药物对免疫系统的影响<sup>[20]</sup>。灌胃 EAC 中、高剂量组的小鼠较于模型组小鼠具有较高的脾脏指数且具有显著性差异,这提示尖尾芋石油醚部位能提高荷瘤小鼠的免疫功能。肿瘤组织 HE 染色结果表明:模型组小鼠肿瘤细胞生长致密,而 5-氟尿嘧啶组与尖尾芋给药组细胞排列疏松,细胞轮廓模糊,肿瘤细胞坏死区域明显,提示肿瘤细胞膜破裂,尖尾芋石油醚部位能诱导肿瘤细胞发生凋亡。

有大量研究表明,炎症可以介导多种疾病,包括心血管疾病、癌症、糖尿病、关节炎、阿尔茨海默病等<sup>[21]</sup>。致症因子的存在持续存在,会导致炎症无法

MAPK1、Bcl-2 等凋亡相关核心靶点,进一步通过分子对接技术验证得到甾醇类成分毛地黄毒苷配基、脂肪酸类成分亚麻酸及香豆素类成分 7-羟基香豆素与文献调研得到的尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌相关核心靶点 (p-ERK、Bcl-2、Bax) 均能自由结合 (结合能 < 0 kcal/mol)。以上研究结果提示尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌作用与其多成分、多靶点的特性有关,其抗乳腺癌机制与 PI3K-Akt、MAPK 等凋亡相关信号通路有关。

消除,炎症就会变成慢性的,从而导致细胞突变和增殖,这样会更利于癌症的发生发展。肿瘤坏死因子(TNF)是重要的促炎细胞因子之一,而乳腺癌相关微环境的特征是慢性炎症,TNF- $\alpha$  可以通过刺激肿瘤细胞内以及周围基质细胞内的雌激素代谢,积累雌激素,从而促进肿瘤的发生发展<sup>[22,23]</sup>。有研究发现外源性 TNF- $\alpha$  在 MDAMB-468、SK-BR3<sup>[24]</sup> 和 MDA-MB-231<sup>[25]</sup> 细胞中不能诱导肿瘤细胞凋亡,而内源性 TNF- $\alpha$  在 HS578T 细胞中具有保护性抗凋亡活性<sup>[26]</sup>。促炎因子白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的主要来源包括 MDSCs,巨噬细胞和 DCs 等髓系细胞,在肿瘤微环境中发挥促进肿瘤生长或增强抗肿瘤免疫检测作用<sup>[27]</sup>。IL-1 $\beta$  已被证明可促进肿瘤微环境中未成熟髓系细胞 MDSCs 的积累来促进肿瘤进展<sup>[28,29]</sup>。本研究中,通过 ELISA 试剂盒检测法发现,与模型组相比,阳性药物组以及尖尾芋不同浓度给药组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量均有所降低,且高剂量组含量最低,因此推测,小鼠接种肿瘤后,尖尾芋石油醚部位可能通过降低促炎因子水平,从而抑制肿瘤的发展。综上,尖尾芋石油醚部位在体内具有显著的抗乳腺癌作用。

MAPK 是一种丝氨酸蛋白激酶,属于内源性凋亡途径,ERK、JNK 和 p38 是哺乳动物中已发现的三条最主要的信号传导途径,它们有着不同的激活状态,参与各种生长因子、细胞因子以及激素受体活化后的信号影响,调节细胞的生长、分化<sup>[30-32]</sup>。本实验研究中,MAPKs 信号通路相关蛋白,ERK、JNK、p38、p-JNK、p-p38 蛋白水平无显著性差异,p-ERK 蛋白水平表达降低,提示尖尾芋石油醚部位可能通过抑制 p-ERK/ERK 的表达来发挥抗乳腺癌作用,这与前期研究的体外实验及网络药理学预测相关通路结果一致。另外,EAC 能升高 Bax/Bcl-2 蛋白表达量,提高凋亡基因 Bax/Bcl-2 mRNA 水平,提示 EAC 通过促进肿瘤细胞的凋亡而发挥抗乳腺癌作用。

综上所述,尖尾芋石油醚部位能抑制 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤生长,其抗乳腺癌作用与其多成分、多靶点的特性有关,其机制可能与下调 p-ERK/ERK 的表达,升高 Bax/Bcl-2 表达,提高 Bax/Bcl-2 mRNA 水平,促进肿瘤细胞凋亡有关。本研究为尖尾芋治疗乳腺癌的临床应用提供了理论参考,但其更深入的药效物质基础、作用靶点及机制还需进一步探究。

#### 参考文献

1 Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global cancer in

women: burden and trends [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2017,26:444-457.

- Shang MY, Guo S, Zhang Q, et al. Current status of breast cancer screening in China [J]. *Pract J Cancer (实用癌症杂志)*, 2020,35:1911-1914.
- Fu Q, Shi L, Yang GW, et al. Influencing factors of recurrence and metastasis for postoperative breast cancer high-risk population and evaluation on TCM therapy [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med (中国中医药信息杂志)*, 2014,21:27-31.
- Chen Y. Clinical study on integrated traditional chinese and western medicine treatment of advanced triple-negative breast cancer [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), 2019.
- Zhao X, Wang Q, Yang S, et al. Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016,781:60-68.
- Mao XY, Pang DZ, Luo WZ, et al. Effects of Danshensu on the expression of PKB and PKC in breast cancer mouse tumor tissues [J]. *Heilongjiang Med Pharm (黑龙江医药科学)*, 2018,41:130-131.
- Li JW, Yu O, Yong X, et al. Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中医大辞典) [M]. Beijing: People's Health Press, 1995:30-31.
- Kaur A, Kamboj SS, Singh J, et al. Isolation of a novel *N*-acetyl-*D*-lactosamine specific lectin from *Alocasia cucullata* (Schott.) [J]. *Biotechnol Lett*, 2005,27:1815-1820.
- Fan ML, Mo ZX. Research progress on chemical constituents and anti-tumor activity of *Alocasia cucullata* [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019,35:597-600.
- Chen Y, Wang P, Peng LC, et al. Chemical Compositions and mechanism of anti-breast cancer activity of petroleum ether site of *Alocasia cucullata* (Lour.) Schott [J]. *Cent South Pharm (中南药学)*, 2023,21:844-849.
- Ip C, Ip MM, Loftus T, et al. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000,9:689-696.
- Kwong SC, Abd Jamil AH, Rhodes A, et al. Fatty acid binding protein 7 mediates linoleic acid-induced cell death in triple negative breast cancer cells by modulating 13-HODE [J]. *Biochimie*, 2020,179:23-31.
- Llor X, Pons E, Roca A, et al. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes [J]. *Clin Nutr*, 2003,22:71-79.
- Xu H, Li Y, Han B, et al. Anti-breast-cancer activity exerted by  $\beta$ -sitosterol-*D*-Glucoside from sweet potato via upregulation of microRNA-10a and via the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2018,66:9704-9718.
- Liu ZX, Niu DQ, Wang D. Several problems in clinical trans-

- formation of 4T1 cell tumorigenic breast cancer mouse model [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志),2022,32:145-152.
- 16 Wang Y, Fan Z, Yang M, et al. Protective effects of E Se tea extracts against alcoholic fatty liver disease induced by high fat/alcohol diet; *in vivo* biological evaluation and molecular docking study [J]. Phytomedicine, 2022, 101:154113.
- 17 Lei X, Feng Y, Liang S, et al. Antitumor activity and chemical composition of petroleum ether extract from rhizomes of *Alocasia cucullata* (Schott.) [J]. J Chin Pharm(中国医药工业杂志), 2012, 43:340-343.
- 18 Peng QX. Inhibition of mouse breast cancer growth and induction of THP-1 cell differentiation by aqueous extract of *Alocasia cucullata* [D]. Guangzhou: Southern Medical University(南方医科大学), 2012.
- 19 Peng QX, Cai H, Sun X, et al. *Alocasia cucullata* exhibits strong antitumor effect *in vivo* by activating antitumor immunity [J]. PloS one, 2013, 8:e75328.
- 20 Tan L, Sun X, Xu Y, et al. Protective effects of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on immunosuppressed mice [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 106:160-167.
- 21 Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: The enemy within [J]. Cancer Cell, 2004, 6:203-208.
- 22 DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response; crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9:212.
- 23 Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, et al. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches [J]. Cell Oncol, 2020, 43:1-18.
- 24 Cai X, Cao C, Li J, et al. Inflammatory factor TNF- $\alpha$  promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF- $\kappa$ B ( and/or p38 )/p-STAT3/HBXIP/TNFR1 [J]. Oncotarget, 2017, 8:58338.
- 25 Wang Y, Wang X, Zhao H, et al. Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappaB activation and Bcl-2 overexpression [J]. J Chemother, 2012, 24:348-357.
- 26 Pileczki V, Braicu C, Gherman CD, et al. TNF- $\alpha$  gene knock-out in triple negative breast cancer cell line induces apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14:411-420.
- 27 Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway [J]. Sci Signal, 2010, 3:cm1.
- 28 Tu S, Bhagat G, Cui G, et al. Overexpression of interleukin-1 $\beta$  induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice [J]. Cancer cell, 2008, 14:408-419.
- 29 Song X, Krelin Y, Dvorkin T, et al. CD11b +/Gr-1 + immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1 $\beta$ -secreting cells [J]. J Immunol, 2005, 175:8200-8208.
- 30 Wen S, Hou Y, Fu L, et al. Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin  $\beta$ 3-p38 MAPK signalling [J]. Cancer Lett, 2019, 442:320-332.
- 31 Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. Exp Ther Med, 2020, 19:1997-2007.
- 32 Xie X, Deng T, Duan J, et al. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway [J]. Eco-tox Environ Safe, 2020, 190:110133.