白屈菜-元胡药对抗雌激素受体阳性乳腺癌药效物质及作用机制Δ

邹　翔[1*]，舒　淇[1]，吴　双[2]，于佳慧[1]，张雪瑞[1]，孙雨恒[1]，曲中原[2#]（1.哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心，哈尔滨　150076；2.哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨　150076）

中图分类号　R917；R966　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）08-0935-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.08.08

摘　要　目的　分析白屈菜-元胡药对（CHCR）的主要成分，预测其抗雌激素受体（ER）阳性乳腺癌的药效物质、潜在作用靶点及通路并进行验证。**方法**　采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）技术对CHCR乙醇提取物的成分进行分析；对所得成分进行网络药理学分析，构建CHCR“活性成分-靶点-通路”网络，并对富集通路进行体外细胞实验验证。**结果**　共鉴定出58个化学成分，含生物碱57个、有机酸1个。网络药理学共筛选出活性成分38个，“成分-疾病”交集靶点的蛋白质-蛋白质互作网络中有核心靶点38个；得基因本体条目258个，京都基因与基因组百科全书通路137条，主要包括雌激素信号通路、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（PI3K/Akt）信号通路等。验证实验结果显示，CHCR作用于MCF-7细胞的半数抑制浓度为693 μg/mL；150、300、600 μg/mL的CHCR可显著降低磷酸化PI3K、磷酸化Akt、ERα蛋白和ESR1 mRNA的表达水平（$P<0.01$）。**结论**　CHCR抗ER阳性乳腺癌的作用可能与调控ER、PI3K/Akt通路有关，具有多成分、多靶点的作用特点。

关键词　白屈菜；元胡；雌激素受体阳性乳腺癌；超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱；网络药理学；实验验证

Pharmacodynamic substances and mechanism of Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma against estrogen receptor-positive breast cancer

ZOU Xiang[1], SHU Qi[1], WU Shuang[2], YU Jiahui[1], ZHANG Xuerui[1], SUN Yuheng[1], QU Zhongyuan[2]（1. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To analyze the main components of Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma (CHCR), and to predict pharmacodynamic substances against estrogen receptor (ER) -positive breast cancer and their potential targets and signaling pathways, followed by verifying experiments. **METHODS** The ethanol extract of CHCR was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). The network pharmacology analysis was performed for the screened components. The network diagram of CHCR "active components-target-pathway" was constructed, and the enrichment pathway *in vitro* was validated. **RESULTS** A total of 58 chemical components were identified, including 57 alkaloids and 1 organic acid. A total of 38 active ingredients were screened from the network pharmacology, and 38 core targets were found in the protein-protein interaction network of "component-disease" intersection targets; 258 gene ontology entries and 137 Kyoto encyclopedia of genes and genomics pathways were obtained, mainly including estrogen signal pathway, phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signal pathway, etc. The results of validation test showed that the median inhibitory concentration of CHCR to MCF-7 cells was 693 μg/mL; 150, 300, 600 μg/mL CHCR could significantly reduce the expressions of phosphorylated PI3K, phosphorylated Akt, ERα protein and ESR1 mRNA ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** The anti-ER-positive breast cancer effect of CHCR may be related to the regulation of ER and PI3K/Akt pathways, which has the characteristics of multi-component and multi-target effects.

KEYWORDS　*Chelidonium majus*; *Corydalis yanhusuo*; estrogen receptor-positive breast cancer; UPLC-Q-TOF-MS/MS; network pharmacology; experimental verification

乳腺癌已超过肺癌成为全球第一大癌，严重威胁人类健康[1]。其中，雌激素受体（estrogen receptor，ER）阳性乳腺癌占比超过70%，是最主要的乳腺癌类型[2]。目前，内分泌治疗是ER阳性乳腺癌的主要治疗手段[3]，然而其治疗周期较长，且会引发血脂异常、关节疼痛、耐药性和心脏毒性等一系列不良反应[4—5]。

据报道，白屈菜-元胡药对（Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma，以下简称“CHCR”）是肿瘤辅助治疗的常用药对之一，白屈菜、元胡常用剂量分别为15、15～30 g[6]。白屈菜为罂粟科植物白屈菜*Chelidonium majus*

Δ **基金项目**　黑龙江省自然科学基金项目（No.LH2022H001）；黑龙江省重点研发计划指导类项目（No.GZ20210110）

＊**第一作者**　研究员，博士。研究方向：抗肿瘤天然药物。E-mail：zouxiang@hrbcu.edu.cn

通信作者　教授，博士生导师，博士。研究方向：中药炮制。E-mail：qiuqiuqu@163.com

L. 的干燥全草，味苦、性凉，具有镇痛、止咳、解毒之功效[7]。相关研究指出，白屈菜中的白屈菜碱可通过抑制p65核转位、抑制核因子κB信号转导而促进MCF-7细胞凋亡[8]；白屈菜红碱可通过调控磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）信号通路和血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）信号通路来抑制乳腺癌的发生发展[9]。元胡为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang的干燥块茎，其性温、味辛苦，具有活血、利气、止痛之功效[7]。相关研究指出，元胡提取物可通过诱导活性氧生成和阻滞G2/M细胞周期来抑制MCF-7细胞的增殖[10]；其所含脱氢紫堇碱可通过调节B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma-2，Bcl-2）和Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）之间的比例来介导细胞凋亡，从而抑制MCF-7细胞的增殖[11]。可见，白屈菜、元胡具有明确的抗乳腺癌作用，笔者推测CHCR亦有抗乳腺癌作用。研究CHCR抗乳腺癌作用并阐明其作用机制，对于扩大药对的适用范围，以及指导中医临床乳腺癌的治疗具有较高的研究价值。基于此，本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）技术分析CHCR的化学成分，利用网络药理学方法筛选其治疗ER阳性乳腺癌的潜在作用靶点和通路并进行体外实验验证，以期为CHCR在乳腺癌临床治疗中的应用及相关药物的开发提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括液相色谱-G6500系列四极杆飞行时间质谱联用仪（美国Agilent公司）、CO-150型二氧化碳培养箱（美国NBS公司）、iMark型酶标仪[伯乐生命医学产品（上海）有限公司]、DYCZ-24DN型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、ImageQuant LAS500型分子生物成像仪（GE通用电器医疗集团生命科学部）、Easy Cycler 96型聚合酶链式反应（PCR）仪（德国Biometra公司）、QuantStudio™ 1型实时荧光定量PCR仪[英潍捷基（上海）贸易有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

实验所用白屈菜药材、醋制元胡饮片均购自哈尔滨三棵树中药材专业市场，经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定分别为罂粟科植物白屈菜 *C. majus* L. 的干燥全草和罂粟科植物延胡索 *C. yanhusuo* W. T. Wang的干燥块茎醋炙品。上述药材/饮片粉碎后，备用。

白屈菜碱、延胡索乙素、原阿片碱、四氢黄连碱对照品（批号分别为DST220428-079、DSTDY010101、DSTDY011301、DSTDS015801，纯度均不低于98%）均购自成都德思特生物技术有限公司；长春新碱对照品（阳性对照，批号PCS-210402，纯度≥98%）购自北京中科质检生物技术有限公司；胎牛血清购自美国Gibco公司；RPMI 1640培养液购自大连美仑生物技术有限公司；BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司；兔源ERα、Akt、PI3K、β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体（批号分别为L07130940、M04070003、M06243380、N09271372）均购自沈阳万类生物科技有限公司；兔源磷酸化PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）、磷酸化Akt（phosphorylated Akt，p-Akt）多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为AG20900287、AE04205649、BJ08079044）均购自北京博奥森生物技术有限公司；PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA eraser试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™试剂盒（批号分别为RR047A、RR420A）均购自宝日医生物技术（北京）有限公司；甲醇、乙腈、甲酸均为分析纯，其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 细胞

人乳腺癌MCF-7细胞由哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心提供。

2 方法

2.1 CHCR的成分分析

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取白屈菜碱、延胡索乙素、原阿片碱、四氢黄连碱对照品各1 mg，分别加甲醇超声溶解并定容于5 mL容量瓶中，制成质量浓度均为0.2 mg/mL的对照品溶液，经0.22 μm微孔滤膜过滤，备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取白屈菜、醋制元胡粉末各5 g，加10倍量95%乙醇超声提取2 h，过滤；药渣以同法再提取1 h，过滤；合并2次滤液，浓缩，得浸膏（1 mg浸膏相当于15 mg生药）。取上述浸膏，加甲醇复溶并定容于25 mL容量瓶中，制成质量浓度为0.08 g/mL（以浸膏量计）的药对供试品溶液，经0.22 μm微孔滤膜过滤，备用。

2.1.3 色谱条件与质谱条件 （1）色谱条件：以ACQUITY UPLC HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）为色谱柱，0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～4 min，20%B；4～17 min，20%B→22%B；17～19 min，22%B→100%B；19～24 min，100%B→15%B）；流速为0.3 mL/min；柱温为30 ℃；检测波长为269 nm；进样量为0.2 μL。（2）质谱条件：采用电喷雾离子源进行正、负离子模式扫描；离子源温度为550 ℃；正负离子源电压分别为5 500、−4 500 V，裂解电压分别为80、−80 V；碰撞能分别为35、−35 eV，碰撞能扩展分别为15、−15 eV；雾化气（gas1）压力为380 kPa，辅助气（gas2）压力为35 kPa，气帘气（curtain gas）压力为240 kPa。一级质谱母离子扫描范围为 *m/z* 80～1 500；对信息依赖响应值超过100 cps的8个色谱峰进行二级质谱扫描，子离子扫描范围为 *m/z* 50～1 500。

2.1.4 样品检测与数据处理 取“2.1.2”项下供试品溶液，按“2.1.3”项下色谱与质谱条件进样分析，将采集结果导入MassHunter软件，通过化合物质谱裂解规律、准分子离子峰以及碎片离子信息与采集结果信息比对，对数据进行分析，列出检测到的峰强度以保留时间和产生的质量数据（*m/z*）对各峰进行标识，质量精确度小于10 ppm。

相关化学成分信息通过PubMed、ChemSpider、Swiss Target Prediction、中国知网、中药系统药理数据库和分析平台（TCMSP）等数据库查询，具体信息包括成分名称、CAS号、化学结构、分子式及质谱裂解规律等。

2.2 CHCR抗ER阳性乳腺癌作用机制的预测

将鉴定所得CHCR的化学成分分别输入TCMSP和Swiss Target Prediction数据库，以口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、类药性（drug-like properties，DL）≥0.18为标准筛选药对的活性成分[12]，同时纳入已报道的活性成分，在TCMSP和Swiss Target Prediction数据库中检索以获得CHCR成分靶点。借助GeneCards、OMIM、DrugBank数据库，以“estrogen receptor-positive breast cancer”为检索词，获取ER阳性乳腺癌的疾病靶点。采用Venny 2.1.0平台获得“成分-疾病”的交集靶点。将交集靶点输入至String 11.5数据库以获得靶点间相互作用关系，同时借助Cytoscape 3.8.2软件构建蛋白质-蛋白质互作（protein-protein interaction，PPI）网络。采用DAVID 6.8数据库进行基因本体（GO）和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，利用Omic-Share平台进行数据可视化展示。最后，采用Cytoscape 3.8.2软件构建CHCR抗ER阳性乳腺癌作用的“活性成分-靶点-通路”关联网络。

2.3 CHCR抗ER阳性乳腺癌作用及机制验证

2.3.1 CHCR对MCF-7细胞的增殖抑制作用 采用MTT法进行检测。取对数生长期的MCF-7细胞，按3×10^4个/mL接种于96孔板中，每孔100 μL。待细胞贴壁后，分别按终浓度0（即空白对照组）、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL加入CHCR 95%乙醇提取物（制备方法同“2.1.2”项下）含药培养液（给药剂量依据预实验结果设置）；设置阳性对照孔，分别按终浓度0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL加入长春新碱含药培养液（给药剂量依据预实验结果设置）；同时设置不含细胞、不含药物的调零孔，每孔加入100 μL不含药培养液。每组设置6个复孔。培养48 h后，弃去培养液，加入0.5 mg/mL的MTT试剂100 μL；孵育4 h后，弃去上清液，每孔加入二甲基亚砜150 μL，避光振荡后，采用酶标仪于570 nm波长下测定各孔的吸光度值，计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度（IC_{50}）。细胞增殖抑制率%=（空白对照组平均OD值－给药组平均OD值）/空白对照组平均OD值×100%。实验重复3次。

2.3.2 CHCR对富集通路相关蛋白的影响 采用Western blot法进行检测。取对数生长期的MCF-7细胞，随机分为空白对照组、阳性对照组（终浓度为0.5 μg/mL，剂量设置参考“2.3.1”项下结果）、CHCR组（终浓度分别为150、300、600 μg/mL，剂量设置参考“2.3.1”项下结果），每组设置6个复孔。其中，各药物组加入相应含药培养液100 μL，空白对照组加入等体积培养液。培养48 h后，收集各组细胞，用RIPA裂解缓冲液冰浴裂解，离心后收集蛋白，备用。以BCA法进行蛋白定量，将蛋白高温变性后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移至硝酸纤维素膜上，用5%脱脂奶粉室温封闭2 h，分别加入Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K、ERα、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），在4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶1 500），室温孵育2 h；利用ECL发光液显色，并置于分子生物成像仪下成像。应用Image J软件分析条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）条带灰度值的比值表示蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.3.3 CHCR对MCF-7细胞中ESR1 mRNA表达的影响 采用定量反转录PCR（quantitative reverse transcriptase-mediated PCR，qRT-PCR）法进行检测。取对数生长期的MCF-7细胞，按“2.3.2”项下方法分组、给药。培养48 h后，收集各组细胞，提取细胞总RNA，再反转录为cDNA。以cDNA为模板，进行PCR扩增（引物序列和产物长度见表1）。反应体系为TB Green Premix Ex Taq（Tli RNaseH Plus）（2X）10 μL、PCR Forward Primer（10 μmol/L）0.4 μL、PCR Reverse Primer（10 μmol/L）0.4 μL、ROX Reference Dye（50X）0.4 μL、DNA模板2.0 μL、灭菌水6.8 μL，共20 μL。扩增程序反应条件为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算ESR1 mRNA（*ESR1*为ERα的基因名）的相对表达量，实验重复3次。

表1 引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
ESR1	上游引物：5′-TGCCCTACTACCTGGAGAACG-3′	158
	下游引物：5′-TGCACAGTAGCGAGTCTCCTTG-3′	163
GAPDH	上游引物：5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′	101
	下游引物：5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′	101

2.4 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 CHCR化学成分的鉴定

采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术所得CHCR化学成分的总离子流图如图1所示。通过一级和二级质谱信息分析并结合相关文献，从CHCR中共鉴定出58个化学成分，有23个来自白屈菜，24个来自元胡，11个为二者共有成分；58个成分中，生物碱类成分有57个、有机酸类成分有1个，具体信息如表2所示。

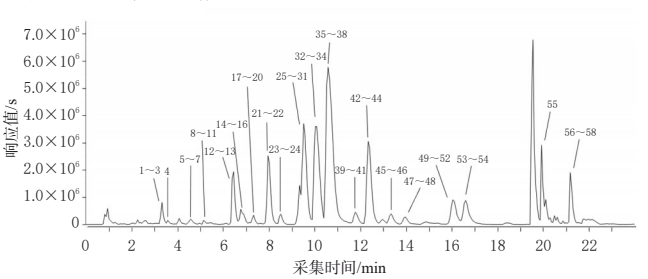


图1 CHCR化学成分UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的总离子流图

表2　CHCR化学成分的鉴定分析结果

峰号	保留时间/min	离子模式	检测值*m/z*	理论值*m/z*	误差/ppm	分子式	特征碎片离子*m/z*	鉴定结果	归属	代码[b]
1	3.063	$[M+H]^+$	328.154 8	328.154 3	1.523 7	$C_{19}H_{21}NO_4$	313.129 7,297.112 0,282.088 1,265.085 8,178.085 5	去甲异紫堇啡碱	元胡	
2	3.368	$[M]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	327.149 0,297.112 4,282.086 3,237.091 5,209.080 1,191.086 9	木兰花碱	白屈菜	
3	3.564	$[M+H]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	327.149 0,297.112 4,282.086 3,237.091 5,209.080 1,191.086 9,176.069 0,165.068 3,137.060 2	*d*-鹅掌楸啡碱	元胡	YH04
4	3.627	$[M+H]^+$	370.128 9	370.128 5	1.080 7	$C_{20}H_{19}NO_6$	352.118 5,321.076 1,303.065 5,263.070 2,235.075 5	白屈菜明碱	白屈菜	
5	4.638	$[M+H]^+$	328.154 8	328.154 3	1.523 7	$C_{19}H_{21}NO_4$	314.175 7,265.080 9,178.086 4,164.069 9	金黄紫堇碱	共有	GY01
6	4.794	$[M+H]^+$	328.154 8	328.154 3	1.523 7	$C_{19}H_{21}NO_4$	313.128 1,298.105 5,242.946 9,196.096 9	异波尔定碱	元胡	YH06
7	4.997	$[M+H]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{23}NO_4$	297.112 2,265.086 2,178.086 2,58.065 3	四氢非洲防己碱	共有	GY05
8	5.287	$[M+H]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{23}NO_4$	311.127 6,296.105 0,279.101 6,192.102 1	唐松草坡芬碱	元胡	YH15
9	5.452	$[M+H]^+$	326.139 2	326.138 7	1.533 1	$C_{19}H_{19}NO_4$	277.085 2,233.114 2,208.971 8,178.086 3	华紫堇碱	白屈菜	BQC05
10	5.498	$[M+H]^+$	336.086 9	336.086 6	0.892 6	$C_{19}H_{13}NO_5$	318.075 6,290.080 4,277.072 7,294.076 6	8-氧代黄连碱	白屈菜	BQC04
11	5.914	$[M+H]^+$	372.181 1	372.180 5	1.612 1	$C_{21}H_{25}NO_5$	354.169 7,323.125 3,292.104 8,208.095 5,190.084 9	咖坡林碱	元胡	YH03
12	6.142	$[M+H]^+$	192.065 7	192.065 5	1.041 3	$C_{10}H_9NO_3$	192.066 1,174.053 5,149.059 3,119.049 3	降氧化北美黄连次碱	元胡	
13	6.439	$[M+H]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{23}NO_4$	327.149 0,297.112 4,282.086 3,237.091 5,209.080 1,191.086 9	四氢药根碱	共有	
14	6.612	$[M+H]^+$	352.118 4	352.117 9	1.420 0	$C_{20}H_{17}NO_5$	327.147 1,310.130 4,294.124 7,265.123 7,192.101 9,178.086 3	氧海罂粟碱	元胡	
15	6.877	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	341.162 2,326.139 7,308.127 5,192.101 9	d-海罂粟碱	元胡	
16	6.988	$[M+H]^+$	342.170 4	342.170 0	1.169 0	$C_{20}H_{23}NO_4$	327.145 6,312.125 1,294.125 9,262.605 6	异紫堇定碱	白屈菜	BQC08
17	7.136	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	341.161 0,310.142 8,281.050 2,253.109 4,192.101 9,165.090 8	元胡菲碱	元胡	
18	7.207	$[M]^+$	322.108 0	322.107 4	1.862 7	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	307.083 8,279.087 6,249.077 4,205.096 5,172.016 6	13,14-二氢黄连碱	白屈菜	BQC02
19	7.378	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	308.128 4,341.162 3,325.141 0,192.101 9	延胡索乙素(右旋)[a]	元胡	YH10
20	7.378	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	308.128 4,341.162 3,325.141 0,192.101 9	延胡索乙素(左旋)[a]	元胡	YH14
21	7.865	$[M+H]^+$	370.128 9	370.128 5	1.080 7	$C_{20}H_{19}NO_6$	352.118 9,305.081 2,275.070 4	10-羟基白屈菜碱	白屈菜	
22	8.005	$[M+H]^+$	354.134 0	354.133 6	1.129 5	$C_{20}H_{19}NO_5$	336.123 4,323.091 4,305.081 1,275.070 3,247.075 4,206.081 2	白屈菜碱[a]	白屈菜	BQC06
23	8.506	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	314.162 5,327.160 3,312.158 5,294.121 7,206.117 0	异紫堇鳞茎碱	元胡	YH11
24	8.554	$[M+H]^+$	354.134 0	354.133 6	1.129 5	$C_{20}H_{19}NO_5$	341.163 3,326.163 3,308.130 0,294.125 2	原阿片碱[a]	共有	GY08
25	9.235	$[M+H]^+$	340.118 4	340.117 9	1.470 1	$C_{19}H_{17}NO_5$	323.091 5,305.081 3,275.070 4,189.071 5	去甲基白屈菜碱	白屈菜	
26	9.337	$[M+H]^+$	370.165 3	370.164 9	1.080 6	$C_{21}H_{23}NO_5$	352.154 9,321.112 4,290.093 7,188.070 6	隐品碱	共有	GY06
27	9.525	$[M+H]^+$	370.165 3	370.164 9	1.080 6	$C_{21}H_{23}NO_5$	352.154 7,321.112 6,290.093 2,206.081 4,188.070 7	别隐品碱	共有	GY02
28	9.571	$[M+H]^+$	354.134 0	354.133 6	1.129 5	$C_{20}H_{19}NO_5$	336.123 5,323.092 1,305.081 5,275.070 5,192.102 2	8-羟基二氢白屈菜红碱	白屈菜	BQC03
29	9.713	$[M+H]^+$	356.186 3	356.185 6	1.965 3	$C_{21}H_{25}NO_4$	294.125 7,249.086 5,192.102 1,165.090 9	异紫堇球碱	元胡	
30	9.791	$[M+H]^+$	354.134 0	354.133 6	1.129 5	$C_{20}H_{19}NO_5$	336.123 3,323.091 8,305.081 4,275.070 6	异白屈菜碱	白屈菜	
31	9.956	$[M+H]^+$	328.191 5	328.190 7	2.437 6	$C_{20}H_{25}NO_3$	313.173 2,283.133 4,226.129 6,159.080 8,121.064 5	狮足草碱	元胡	YH12
32	10.050	$[M+H]^+$	324.123 3	324.123 0	0.925 6	$C_{19}H_{17}NO_4$	307.096 6,295.097 6,249.091 0	四氢黄连碱[a]	共有	GY10
33	10.214	$[M+H]^+$	338.139 3	338.138 7	1.774 4	$C_{20}H_{19}NO_4$	325.121 9,323.115 4,314.142 0,312.121 4	去氢南天宁碱	元胡	
34	10.332	$[M+H]^+$	324.123 3	324.123 0	0.925 6	$C_{19}H_{17}NO_4$	307.096 3,249.090 8,176.070 8,149.059 6	金罂粟碱	白屈菜	BQC01
35	10.574	$[M]^+$	320.092 1	320.091 7	1.249 6	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	204.080 7,292.097 1,262.086 0,234.091 5	黄连碱	共有	GY04
36	10.716	$[M+H]^+$	338.139 3	338.138 7	1.774 4	$C_{20}H_{19}NO_4$	323.115 4,308.092 4,294.112 4,280.096 6,265.072 5	四氢刻叶紫堇明碱	元胡	YH13
37	10.825	$[M+H]^+$	320.092 1	320.091 7	1.249 6	$C_{19}H_{13}NO_4$	292.091 7,262.086 3,234.091 5,204.080 0,176.069 2	岩黄连灵碱	白屈菜	
38	10.966	$[M]^+$	338.139 3	338.138 7	1.774 4	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	294.112 8,265.986 8,239.970 4,162.980 7	*N*-甲基金罂粟碱	白屈菜	
39	11.562	$[M+H]^+$	370.165 3	370.164 9	1.080 6	$C_{21}H_{23}NO_5$	352.153 8,339.123 7,321.113 0,290.093 6,263.103 3,179.073 8	高白屈菜碱	白屈菜	BQC07
40	11.764	$[M+H]^+$	340.155 1	340.154 3	2.351 9	$C_{20}H_{21}NO_4$	338.139 8,323.126 7,307.120 4,292.109 9	*d*-南天竹啡碱	元胡	
41	11.992	$[M+H]^+$	340.155 1	340.154 3	2.351 9	$C_{20}H_{21}NO_4$	325.132 5,308.100 8	四氢小檗碱	元胡	YH01
42	12.094	$[M+H]^+$	354.170 6	354.170 0	1.694 1	$C_{21}H_{23}NO_4$	323.094 1,305.079 5,294.123 0	去氢海罂粟碱	元胡	
43	12.314	$[M+H]^+$	284.128 4	284.128 1	1.055 9	$C_{17}H_{17}NO_3$	269.087 9,251.030 9,239.238 8,224.042 2,147.043 9	对羟基桂皮酸对羟基苯乙胺	白屈菜	BQC09
44	12.502	$[M+H]^+$	354.170 6	354.170 0	1.694 1	$C_{21}H_{23}NO_4$	339.144 5,323.123 0,190.086 1	卡维丁	元胡	YH05
45	13.308	$[M]^+$	352.154 9	352.154 3	1.703 8	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	337.130 8,308.128 7,251.093 8,221.040 1,190.085 6	去氢紫堇球碱	元胡	YH09
46	13.895	$[M+H]^+$	314.139 2	314.138 7	1.591 7	$C_{18}H_{19}NO_4$	253.953 5,194.081 5,177.054 8,121.064 6	阿魏酸酰对羟基苯乙胺	白屈菜	BQC11
47	14.248	$[M+H]^+$	334.107 9	334.107 4	1.496 5	$C_{20}H_{15}NO_4$	319.085 0,306.110 7,291.090 6,263.096 0,217.926 8	二氢血根碱	共有	GY07
48	14.521	$[M+H]^+$	334.107 9	334.107 4	1.496 5	$C_{20}H_{15}NO_4$	331.847 3,319.082 2,306.112 2,291.063 3	去甲基白屈菜红碱	白屈菜	BQC10
49	16.042	$[M+H]^+$	366.134 3	366.133 6	1.911 9	$C_{21}H_{19}NO_5$	351.110 9,336.084 6,320.091 9,202.914 6,181.081 0	6-羟基二氢白屈菜红碱	白屈菜	
50	16.198	$[M+H]^+$	366.134 3	366.133 6	1.911 9	$C_{21}H_{19}NO_5$	351.112 7,337.127 8,320.094 1,265.038 4,191.863 2	紫堇洛星碱	元胡	YH07
51	16.213	$[M+H]^+$	352.154 9	352.154 3	1.703 8	$C_{21}H_{21}NO_4$	337.131 2,322.108 1,308.128 4,294.112 9,220.074 9	*N*-甲基四氢小檗碱	元胡	YH08
52	16.503	$[M]^+$	336.123 7	336.123 0	2.082 6	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	323.105 6,321.093 3,318.075 5,304.097 0,292.080 4,321.099 8	小檗碱	共有	GY03
53	16.825	$[M+H]^+$	368.113 4	368.112 9	1.358 3	$C_{20}H_{17}NO_6$	350.102 3,338.141 5,319.059 6,307.059 9,277.069 6	荷包牡丹碱	元胡	YH02
54	16.825	$[M+H]^+$	368.113 4	368.112 9	1.358 3	$C_{20}H_{17}NO_6$	350.102 3,338.141 5,319.059 6,307.059 9,277.069 6	氧化白屈菜碱	白屈菜	BQC12
55	20.670	$[M+H]^+$	392.113 6	392.112 9	1.785 2	$C_{22}H_{17}NO_6$	365.253 0,320.092 2,292.096 3,165.090 7,124.050 9	spallidamine	白屈菜	BQC13
56	21.132	$[M]^+$	334.107 9	334.107 4	1.496 5	$C_{20}H_{16}NO_4^+$	319.084 0,302.080 3,290.079 6,277.182 8	紫堇萨明碱	白屈菜	
57	21.297	$[M+H]^+$	348.123 3	348.123 0	0.861 8	$C_{21}H_{18}NO_4^+$	333.099 6,318.099 6,304.096 9,290.081 2,260.070 9,246.091 1,232.075 5,204.078 9	白屈菜红碱[13]	白屈菜	
58	21.360	$[M+H]^+$	332.092 2	332.091 7	1.505 6	$C_{20}H_{14}NO_4^+$	319.083 2,304.096 9,274.086 2,246.091 1	血根碱	共有	GY09

a：经对照品确认；b：后文“活性成分-靶点-通路”网络中各成分代码

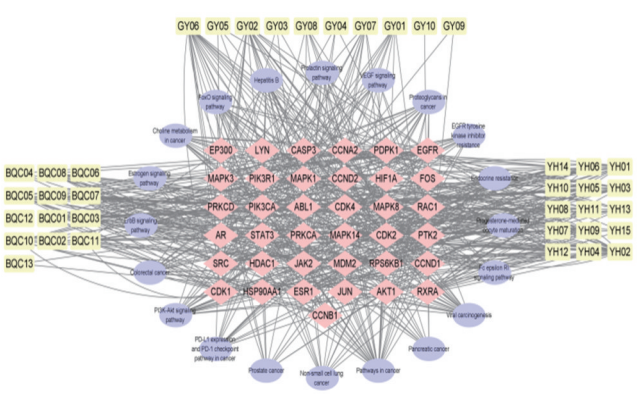
3.2 CHCR抗ER阳性乳腺癌作用机制的预测结果

3.2.1 CHCR活性成分筛选及其成分靶点预测 从“3.1”项下所鉴定出的58个化学成分中，筛选出38个活性成分，共得到成分靶点651个。

3.2.2 ER阳性乳腺癌疾病靶点的筛选结果 在Gene Cards、OMIM、DrugBank 3个数据库中共获得疾病靶点1 593个；通过Venny 2.1.0平台获得“成分-疾病”交集靶点180个。

3.2.3 PPI网络的构建及核心靶点筛选 对“3.2.2”项下“成分-疾病”交集靶点的PPI网络进行拓扑学分析，取大于2倍平均度值的靶点为核心靶点，共38个，包括ESR1、Akt1、磷酸肌醇3激酶调节亚单位1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1，PIK3R1）等。

3.2.4 GO/KEGG富集分析及“活性成分-靶点-通路”网络的构建 通过GO功能富集分析获得258个GO条目，包括171个生物过程条目、31个细胞组分条目、56个分子功能条目。其中，生物过程涉及信号转导、蛋白质磷酸化、RNA聚合酶Ⅱ启动子转录的正调控等；细胞组分主要涉及胞浆、细胞核区域等；分子功能主要涉及蛋白激酶结合活性、腺嘌呤核苷三磷酸结合活性等。通过KEGG富集分析获得通路137条，与CHCR抗ER阳性乳腺癌作用密切相关的信号通路主要包括：雌激素信号通路（estrogen signal pathway）、PI3K/Akt信号通路（PI3K/Akt signal pathway）、红细胞癌基因B信号通路（ErbB signal pathway）等。进一步构建“活性成分-靶点-通路”网络，结果显示，CHCR所含同一化合物可作用于不同靶点，不同化合物也可作用于同一靶点，充分体现出CHCR多成分、多靶点的抗ER阳性乳腺癌机制，结果见图2。具体成分代号见表2。



GY：白屈菜和元胡共有成分；BQC：白屈菜成分；YH：元胡成分

图2 CHCR“活性成分-靶点-通路”网络图

3.3 体外细胞实验验证结果

3.3.1 CHCR对MCF-7细胞的增殖抑制作用 CHCR作用于MCF-7细胞48 h后，随着药物浓度的增加，细胞抑制率逐渐升高，有一定的浓度依赖趋势，结果见图3。CHCR作用于MCF-7细胞的IC_{50}为693 μg/mL，长春新碱的IC_{50}为0.528 μg/mL。

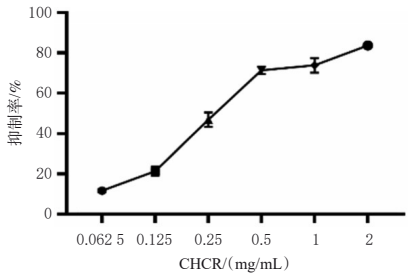
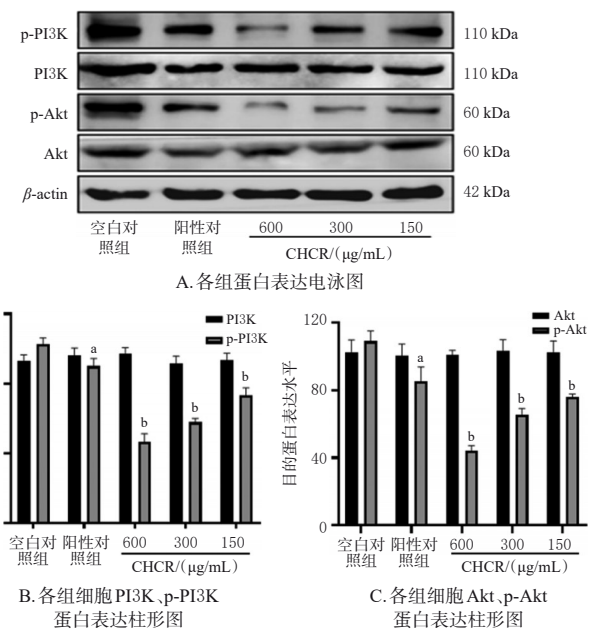


图3 CHCR对MCF-7细胞的增殖抑制作用（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.3.2 CHCR对PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响 不同浓度的CHCR均可显著降低MCF-7细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白的表达水平（$P<0.01$），而对PI3K、Akt蛋白的表达水平均无明显影响（$P>0.05$），结果见图4。这说明CHCR可抑制MCF-7细胞的PI3K/Akt信号通路，与网络药理学预测结果基本一致。



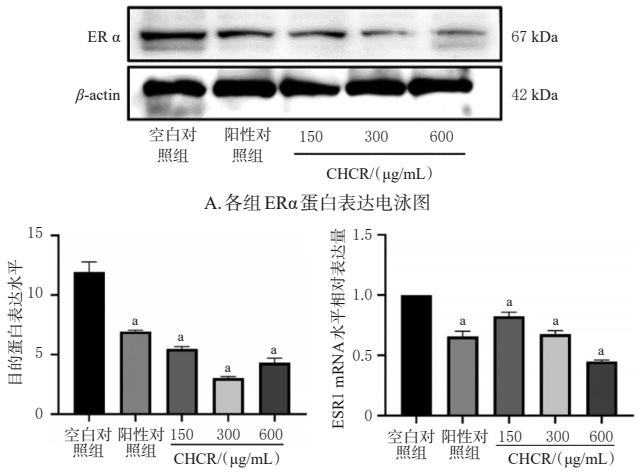
a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与空白对照组比较，$P<0.01$

图4 CHCR对MCF-7细胞PI3K/Akt通路蛋白表达的影响

3.3.3 CHCR对雌激素信号通路的影响 不同浓度的CHCR均可显著下调ERα蛋白的表达水平和ESR1 mRNA的表达水平（$P<0.01$），结果见图5。这说明CHCR可以抑制MCF-7细胞中雌激素信号通路，结果与网络药理学预测结果基本一致。

4 讨论

在我国，中医药疗法已成为乳腺癌治疗的重要手段之一。CHCR传统水煎液的临床疗效明确，但药效物质基础尚不清楚。与水相比，乙醇对植物细胞的穿透能力较强，采用乙醇提取可获得更多的成分。基于此，本研究首先采用乙醇提取CHCR，再以UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对该提取物的化学成分进行定性分析，初步鉴定出58个成分。其中，延胡索乙素可通过诱导细胞周期阻滞从而抑制ER阳性乳腺癌细胞的增殖[14]；小檗碱、白屈菜碱、白屈菜红碱也均具有良好的抗乳腺癌作用[15—17]。



A.各组ERα蛋白表达电泳图

B.各组细胞ERα蛋白表达柱形图　C:各组细胞ESR1 mRNA表达柱形图

a:与空白对照组比较,$P<0.01$

图5　CHCR对MCF-7细胞ERα蛋白表达的影响

研究表明,雌二醇与ERα结合后,会激活ERα及其下游靶基因;PI3K/Akt信号通路的上调可诱导肿瘤细胞增殖,这两者都是ER阳性乳腺癌患者病情进展和转移的重要原因[18]。此外,有研究表明,ERα被雌二醇活化后,PI3K/Akt信号通路的活性被激活,说明ERα是PI3K/Akt信号通路的上游因子[19]。Akt抑制剂AZD5363作用于ER阳性乳腺癌细胞系可使其p-Akt和ERα蛋白表达下调[20]。这说明ERα-PI3K/Akt-ERα反馈通路的存在可能影响ER阳性乳腺癌的发生和发展。本研究发现,CHCR可抑制MCF-7细胞的增殖,下调ERα、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达水平和ESR1 mRNA的表达水平,推测CHCR抗ER阳性乳腺癌的作用可能与调控ER和PI3K/Akt信号通路有关,这体现出CHCR多成分、多靶点的治疗机制,为其更好地应用于临床提供了科学依据。但本研究并未对富集获得的其他通路及机制进行验证,有待后续研究进一步完善。

参考文献

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview[J]. Int J Cancer, 2021.

[2] NUNNERY S E, MAYER I A. Targeting the PI3K-AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer[J]. Drugs, 2020, 80(16): 1685-1697.

[3] SPRING L M, GUPTA A, REYNOLDS K L, et al. Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Oncol, 2016, 2(11): 1477-1486.

[4] GARCIA-MARTINEZ L, ZHANG Y S, NAKATA Y, et al. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1786.

[5] 赵丹妮,闫石,蔡莉. 乳腺癌随访和药物副作用管理策略的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2022, 36(4): 369-373.

[6] 张青. 名老中医方药心得丛书:郁仁存常用抗肿瘤药对[M]. 北京:科学出版社, 2017, 120-123.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020, 112-145.

[8] 蒋姝亭,张红波,谈胤求,等. 白屈菜碱通过抑制核因子-κB信号促进乳腺癌MCF-7细胞凋亡[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(5): 862-864.

[9] 张蕾,王敏,张新新,等. 基于网络药理学和分子对接技术分析白屈菜红碱抗乳腺癌的作用机制[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2021, 42(4): 554-561, 573.

[10] XU Z T, CHEN X P, ZHANG Q W, et al. *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang extract inhibits MCF-7 cell proliferation by inducing cell cycle G2/M arrest[J]. Am J Chin Med, 2011, 39(3): 579-586.

[11] XU Z T, CHEN X P, FU S, et al. Dehydrocorydaline inhibits breast cancer cells proliferation by inducing apoptosis in MCF-7 cells[J]. Am J Chin Med, 2012, 40(1): 177-185.

[12] SHENG P, XIE J, WU Y Q, et al. A network pharmacology approach for uncovering the mechanism of 'kouchuangling' in radiation-induced oral mucositis treatment [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2023, 26(5): 1042-1057.

[13] SAI C M, WANG J A, LI B J, et al. Isolation and identification of alkaloids from *Macleaya microcarpa* by UHPLC-Q-TOF-MS and their cytotoxic activity *in vitro*, antiangiogenic activity *in vivo*[J]. BMC Chem, 2020, 14(1): 5.

[14] XIA X H, HE J C, LIU B, et al. Targeting ERα degradation by L-tetrahydropalmatine provides a novel strategy for breast cancer treatment[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(12): 2192-2204.

[15] WANG Y, LIU Y F, DU X Y, et al. Berberine reverses doxorubicin resistance by inhibiting autophagy through the PTEN/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 1909-1919.

[16] 张月. 白屈菜碱逆转人乳腺癌MCF-7/ADR细胞耐药的机制研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨商业大学, 2020.

[17] LIN W J, HUANG J J, YUAN Z W, et al. Protein kinase C inhibitor chelerythrine selectively inhibits proliferation of triple-negative breast cancer cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2022.

[18] DING J L, WANG X N, ZHANG Y, et al. Inhibition of BTF3 sensitizes luminal breast cancer cells to PI3Kα inhibition through the transcriptional regulation of ERα[J]. Cancer Lett, 2019, 440/441: 54-63.

[19] LIU Y F, MA H, WANG Y, et al. Cystatin SN affects cell proliferation by regulating the ERα/PI3K-AKT/ERα loopback pathway in breast cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 11359-11369.

[20] RIBAS R, PANCHOLI S, GUEST S K, et al. AKT antagonist AZD5363 influences estrogen receptor function in endocrine-resistant breast cancer and synergizes with fulvestrant(ICI182780)*in vivo*[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(9): 2035-2048.

(收稿日期:2022-11-03　修回日期:2023-02-23)

(编辑:曾海蓉)