

·数字中医药·

本文引用: 王 鹏, 陈 娅, 彭江丽, 彭求贤. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨尖尾芋抗乳腺癌药效物质及作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(1): 77-85.

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨 尖尾芋抗乳腺癌药效物质及作用机制

王 鹏^{1,2}, 陈 娅^{1,2}, 彭江丽^{1,3}, 彭求贤^{1,2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;
3. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

[摘要] 目的 利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和网络药理学探讨尖尾芋抗乳腺癌物质基础及作用机制。方法 结合 MassBank 等数据库及现有文献研究, 鉴定尖尾芋醇提物的化学成分, 通过 TCMSP、GeneCards 等数据库筛选尖尾芋抗乳腺癌的作用靶点, 使用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.0 构建关键靶点蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络; 通过 DAVID 数据库对关键靶点进行基因本体论 (gene ontology, GO) 功能与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 最后借助 Cytoscape 3.9.0 构建“成分-基因-通路”互作网络图。结果 从尖尾芋醇提物中共鉴定 18 个成分, 包括生物碱类 (1, 3, 10, 12)、苯丙素类 (2, 8, 18)、黄酮类 (6, 7, 9, 11, 15) 等; 基于鉴定出的化合物通过网络药理学得到 429 个潜在作用靶点; PPI 分析发现 PIK3CA、PIK3R1、MAPK1 等 10 个核心靶点, 富集分析发现核心靶点可能通过调控癌症通路发挥抗乳腺癌作用, “成分-基因-通路”互作网络图显示生物碱类成分小檗碱及黄酮类成分山柰酚、木犀草素可能是尖尾芋醇提物发挥药效的主要活性成分, 其机制与凋亡相关。结论 本研究初步探究了尖尾芋醇提物抗乳腺癌活性成分为生物碱及黄酮类成分, 其作用机制与细胞凋亡相关, 为进一步开展尖尾芋醇提物抗乳腺癌的药效物质基础及作用机制研究提供了新的思路和线索。

[关键词] 尖尾芋醇提物; 抗乳腺癌; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱; 网络药理学; 相互作用; 富集分析
[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.01.012

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

WANG Peng^{1,2}, CHEN Ya^{1,2}, PENG Jiangli^{1,3}, PENG Qiuxian^{1,2*}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Engineering Technology Research Center for Bioactive Substance Discovery of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To explore the material basis and mechanism of action of *Alocasia cucullata* against breast cancer by UPLC-Q-TOF-MS/MS technology and network pharmacology strategies. **Methods** Combined with MassBank and other databases as well as existing literature research, the chemical constituents of the ethanol extract of *Alocasia cucullata* were identified. The anti-breast cancer targets of *Alocasia cucullata* were screened by TCMSP, GeneCards, and other databases. And the protein-protein interaction (PPI) network of key targets was constructed using STRING database and Cytoscape 3.9.0. Then, GO and KEGG enrichment analyses of key targets were performed by DAVID database. Finally, the interaction network of "component-

[收稿日期] 2023-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81973593); 湖南省自然科学基金-科药联合项目 (2022JJ80087); 湖南中医药大学研究生广东一方制药有限公司科研基金项目 (2021YF01); 湖南中医药大学中药学一流学科基金资助项目 (校行科学 [2018]3 号) 资助。

[通信作者] * 彭求贤, 男, 博士, 硕士研究生导师, E-mail: cspqx@163.com。

gene-pathway" was constructed by Cytoscape 3.9.0. **Results** A total of 18 components were identified from the ethanol extract of *Alocasia cucullata*, including alkaloids (1, 3, 10, 12), phenylpropanoids (2, 8, 18), and flavonoids (6, 7, 9, 11, 15), etc. Based on the identified compounds, 429 potential targets were obtained by network pharmacology. In addition, ten core targets such as PIK3CA, PIK3R1, and MAPK1 were found by PPI analysis. Enrichment analysis revealed that these core targets may exert anti-breast cancer effects by regulating cancer pathways. Moreover, the interaction network of "component-gene-pathway" showed that the alkaloid component berberine and the flavonoid components kaempferol and luteolin may be the main active components of the ethanol extract of *Alocasia cucullata* responsible for pharmacological effects, and their mechanism was related to apoptosis. **Conclusion** This study preliminarily explored that the anti-breast cancer active components of the ethanol extract of *Alocasia cucullata* were alkaloids and flavonoids, and their mechanism of action was related to apoptosis, which provides new ideas and clues for further research on the material basis and mechanism of action of the ethanol extract of *Alocasia cucullata* against breast cancer.

[**Keywords**] ethanol extract of *Alocasia cucullata*; anti-breast cancer; UPLC-Q-TOF-MS/MS; network pharmacology; interaction; enrichment analysis

尖尾芋,又名卜芥,为天南星科海芋属植物尖尾芋 *Alocasia cucullata*(Lour.)Schott 的根茎。在中国尖尾芋主产于福建、广西、广东、四川及贵州等海拔 2 000 米以下地区,尖尾芋最早记载于《广西实用中草药新选》,味辛、微苦,性寒,有毒,归肺经,具有清热解毒、消肿镇痛的功效^[1-2]。现代研究表明,尖尾芋水提物和醇提物具有显著的抗肿瘤活性^[3-6],尖尾芋水提物通过免疫增强抗乳腺癌的物质基础与其所含多糖有关^[3],但尖尾芋醇提物通过诱导乳腺癌细胞凋亡的药效物质基础研究比较薄弱,其抗乳腺癌活性成分尚不明确^[4]。因此,本研究主要采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术深入解析尖尾芋醇提物的化学组成,并运用网络药理学探究尖尾芋醇提物抗乳腺癌的核心活性成分、核心靶点及作用机制,以期对尖尾芋的深入研究及开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 尖尾芋醇提物化学成分分析

1.1.1 色谱条件和质谱条件 色谱条件:色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相 A(0.1%甲酸水),流动相 B(纯乙腈),梯度洗脱(0~2 min,95% A;2~12 min,95%~70% A;12~22 min,70%~0% A;22~25 min,0% A),进样量 1 μL,以 0.3 mL/min 流速进行梯度洗脱,柱温为 30 ℃。

质谱条件:使用正、负离子 2 种模式进行检测,设定锥孔电压 30 V,毛细管电压 1.0 kV,离子源温度 100 ℃,脱溶剂气温度 100 ℃,脱溶剂气体流速 50 L/h。采集方式为 MSE,采集时间 25 min。分子量扫描范围为 m/z 100~1 500,碰撞能量为 40~60 V,碰

撞气体为高纯氩气。使用亮氨酸脑啡肽进行准确质量数实时校正。

1.1.2 尖尾芋醇提物样品溶液的制备 尖尾芋于 2020 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。精密称取尖尾芋粉末 1 g,用 20 mL 70%甲醇回流提取 2 次,每次 2 h。用布氏漏斗抽滤,合并滤液,减压浓缩成浸膏,将浸膏转移至 10 mL 容量瓶中并加入甲醇,定容至刻度,超声 20 min,10 000 r/min 离心 10 min,离心半径 13.5 cm,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得尖尾芋醇提物样品溶液。

1.1.3 尖尾芋醇提物的化学成分鉴定 采用全扫描-动态排除和数据依赖性扫描(DDA),基于 Acquity 超高效液相色谱串联四极杆/飞行时间质谱对尖尾芋醇提物中的化学成分进行检测和数据采集。采用 MassLynx V4.1 软件提取总离子流色谱图,获取化学成分的保留时间、质谱准分子离子峰和碎片离子峰等信息,参考 Chemspider、MassBank、MoNA 和 HMDB 数据库和相关文献,推测总结不同类别化合物及其质谱裂解规律。

1.2 尖尾芋醇提物网络药理学分析

1.2.1 作用靶点预测 利用 TC MSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、Swiss 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)查询 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定尖尾芋醇提物化合物所对应的靶点,同时通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)查询靶点对应的基因名,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。检索 GeneCards 在线数据库(<https://www.genecards.org/>)

www.genecards.org/),选择“breast cancer”为关键词,获得与抗乳腺癌相关靶点的数据集。使用 Venny 2.1.0,提取单体化合物与疾病交集靶点作为尖尾芋抗乳腺癌的潜在作用靶点。

1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将尖尾芋醇提物化学成分抗乳腺癌的潜在作用靶点导入 STRING在线数据库(STRING: functional protein association networks (string-db.org))获取 PPI网络,选择物种为“Homo sapiens”,置信度设置为 0.400,使用 Cytoscape 3.9.0 中 Cyto NCA 插件中的 degree 值算法筛选出得分前 30 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,得到尖尾芋醇提物化学成分的潜在核心靶点蛋白的 PPI 网络。

1.2.3 尖尾芋醇提物化学成分的 GO 及 KEGG 通路富集分析 通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台对尖尾芋醇提物化学成分核心靶点进

行 GO 和 KEGG 富集分析。选取生物学过程(biological 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 富集结果气泡图绘制,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。

1.2.4 尖尾芋醇提物“成分-靶点-通路”网络的构建 利用 Cytoscape 3.9.0(<https://cytoscape.org/>)软件,构建尖尾芋醇提物“成分-靶点-通路”网络,分析化合物和靶点间的度(degree)值关系,其中节点代表化学成分、靶点和信号通路,边用来连接化学成分、靶点和信号通路。

2 结果和分析

2.1 尖尾芋醇提物主要化学成分

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析得尖尾芋醇提物总离子流色谱图,见图 1。结合 Chemspider、MassBank 等数据库及现有文献研究,从尖尾芋醇

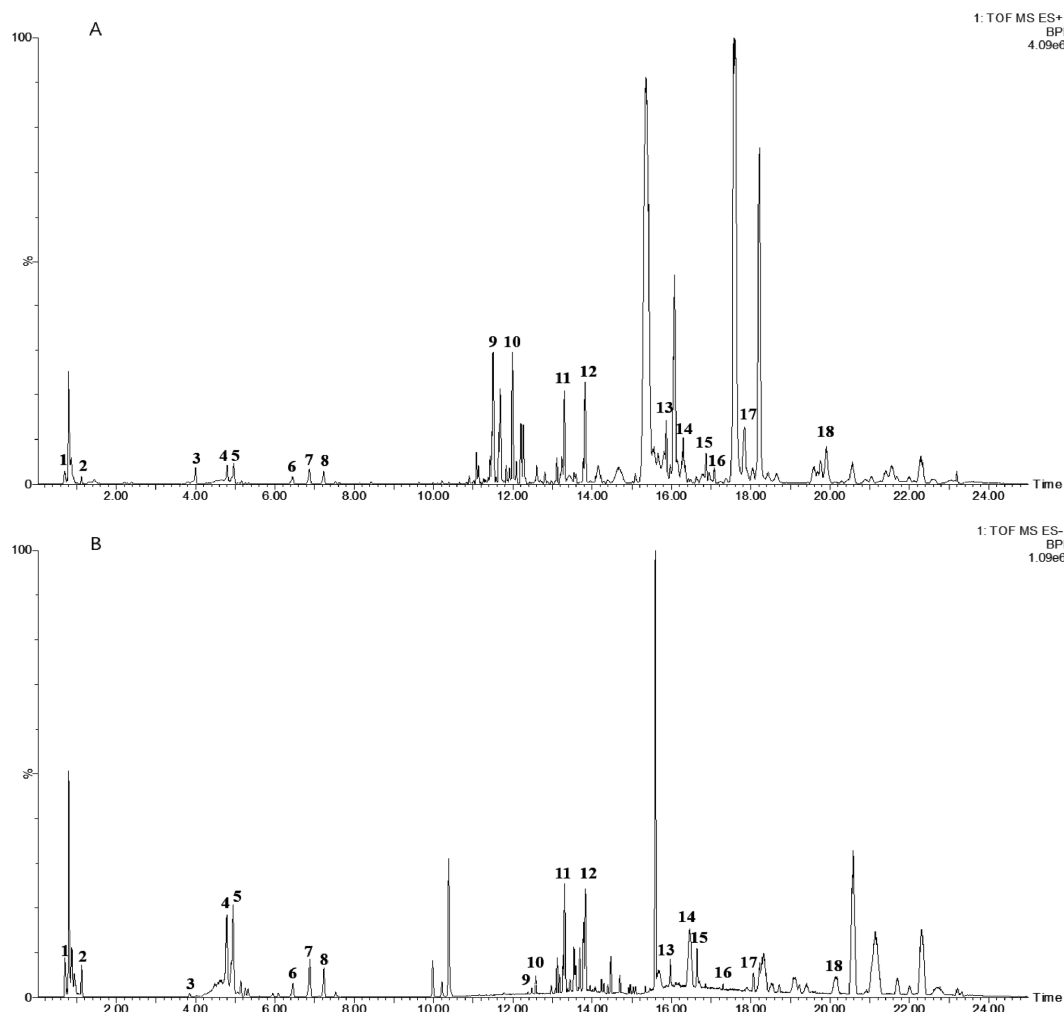


图 1 尖尾芋醇提物正负离子模式总离子流图谱

注:A.正离子模式;B.负离子模式。

提物中共鉴定 18 个化学成分,具体信息见表 1。其中包括生物碱类成分(1,3,10,12)、吲哚类成分(4,5)、黄酮类成分(6,7,9,15)、苯丙素类成分(8,18)及其

他类成分(2,11,13,14,16,17),其结构式见图 2。

2.2 生物碱类成分分析

从尖尾芋醇提物中鉴定出 4 个生物碱类成分,分

表 1 尖尾芋醇提物主要化学成分

| 峰号 | 化合物 | t_R/min | 分子式 | m/z | | δ/ppm | 加合物 | MS ² |
|----|---|-----------|---|---------|---------|--------------|---------------------|-------------------------------|
| | | | | 实际值 | 测得值 | | | |
| 1 | 长春蔓尼定(vincanidine) ^[7] | 0.70 | C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₂ | 307.154 | 307.154 | 0 | [M-H] ⁻ | 239.092 2,170.059 1 |
| 2 | 间羟基肉桂酸(m-coumaric acid) ^[8] | 1.12 | C ₉ H ₈ O ₃ | 162.874 | 162.875 | 2 | [M-H] ⁻ | 119.050 8 |
| 3 | 白屈菜红碱(chelerythrine) ^[9] | 4.00 | C ₂₁ H ₁₈ NO ₄ | 348.122 | 348.122 | 4 | [M] ⁺ | 332.091 6,304.096 9 |
| 4 | 3-吲哚甲醛(3-formylindole) ^[10] | 4.80 | C ₉ H ₇ NO | 146.059 | 146.059 | 6 | [M+H] ⁺ | 118.065 0 |
| 5 | 吲哚(indole) ^[11] | 4.97 | C ₈ H ₇ N | 118.065 | 118.065 | 4 | [M+H] ⁺ | 117.057 4 |
| 6 | 原花青素 B1(procyanidin B1) ^[12] | 6.44 | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.136 | 577.136 | 4 | [M-H] ⁻ | 425.088 7,289.072 2 |
| 7 | 山柰酚(kaempferol) ^[13] | 6.87 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 285.040 | 285.041 | 3 | [M-H] ⁻ | 184.052 3,168.052 5 |
| 8 | 爵床脂素 G(justicidin G) ^[14] | 7.23 | C ₂₁ H ₁₄ O ₇ | 379.081 | 379.081 | 0 | [M+H] ⁺ | 349.070 4,335.092 3 |
| 9 | 木犀草素(luteolin) ^[15] | 11.50 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 285.040 | 285.040 | 9 | [M-H] ⁻ | 151.002 8,133.029 4,107.013 9 |
| 10 | 小檗碱(berberine) ^[16] | 11.99 | C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ | 336.123 | 336.123 | 9 | [M] ⁺ | 321.099 7,320.091 8,306.077 2 |
| 11 | 芦荟大黄(aloë-emodin) ^[17] | 13.30 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 269.044 | 269.045 | 5 | [M-H] ⁻ | 240.034 8 |
| 12 | 钩吻素戊(koumidine) ^[18] | 13.82 | C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O | 295.180 | 295.181 | 5 | [M+H] ⁺ | 143.072 5 |
| 13 | 二氢茉莉酮(dihydrojasnone) ^[19] | 15.87 | C ₁₁ H ₁₈ O | 167.143 | 167.143 | 0 | [M+H] ⁺ | 123.080 4,111.080 2 |
| 14 | 月桂酸乙酯(ethyl laurate) ^[20] | 16.30 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 229.216 | 229.215 | 9 | [M+H] ⁺ | 201.185 5 |
| 15 | 3',6-二甲基黄酮 ^[21] | 16.87 | C ₁₇ H ₁₄ O ₂ | 251.106 | 251.106 | 5 | [M+H] ⁺ | 135.044 3 |
| 16 | 1-棕榈酸单甘油酯(1-monopalmitin) ^[22] | 17.08 | C ₁₉ H ₃₈ O ₄ | 353.265 | 353.266 | 1 | [M+Na] ⁺ | 331.206 3,317.207 9 |
| 17 | 胡薄荷酮(pulegone) ^[23] | 17.85 | C ₁₀ H ₁₆ O | 153.127 | 153.127 | 2 | [M+H] ⁺ | 137.096 6,109.101 7 |
| 18 | 丁香酚(eugenol) ^[24] | 19.91 | C ₁₀ H ₁₂ O ₂ | 165.091 | 165.091 | 8 | [M+H] ⁺ | 124.051 9,109.028 4 |

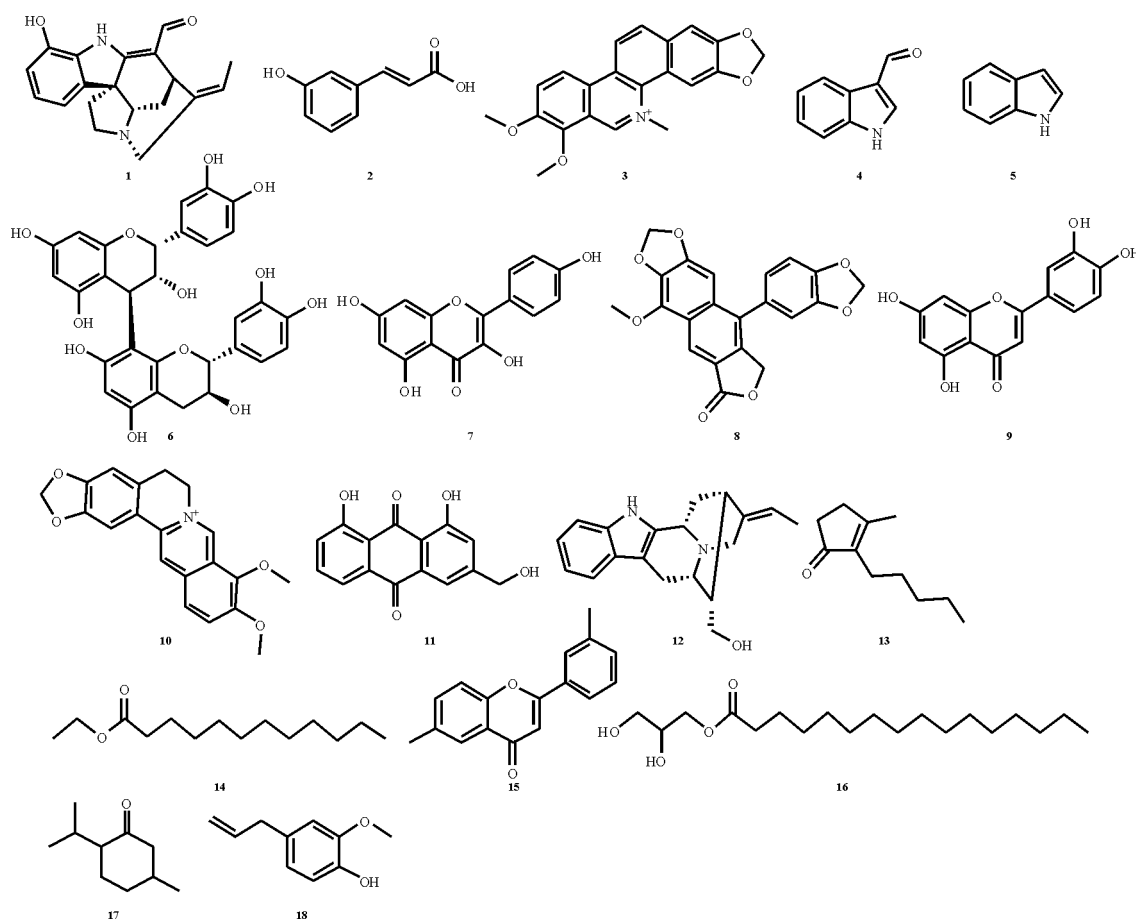


图 2 尖尾芋醇提物化学成分结构图

别为化合物 **1**、**3**、**10**、**12**。其保留时间分别为 0.70 min、4.00 min、11.99 min 和 13.82 min。负离子模式下可见化合物 **1** m/z 307.154 0 $[M-H]^-$ ，其二级碎片离子： m/z 239.092 2 $[M-H-C_4H_4O]^-$ 、170.059 1 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$ ，结合 MassBank 数据库信息及参考文献[7]，鉴定该化合物为长春蔓尼定(vincanidine)。在正离子模式下化合物 **3**，准分子离子峰为 m/z 348.122 4 $[M]^+$ ，其二级碎片离子： m/z 332.091 6 $[M-CH_4]^+$ 、304.096 9 $[M-CO_2]^+$ ，结合 MassBank 数据库信息及参考文献[9]，鉴定该化合物为白屈菜红碱(chelerythrine)。化合物 **10** 小檗碱(berberine)分子式为 $C_{20}H_{18}NO_4$ ，通过扫描正离子模式的一级质谱图谱得准分子离子： m/z 336.123 9 $[M]^+$ ，小檗碱属于异喹啉类生物碱，此类生物碱的母核易形成稳定的大 π 共轭体系一般不会发生裂解，碎片离子主要以甲氧基等小分子取代基为主^[25]。所以小檗碱二级特征碎片离子为 m/z 321.099 7 $[M-CH_3]^+$ 、320.091 8 $[M-CH_4]^+$ 、306.077 2 $[M-2CH_3]^+$ 。其裂解途径见图 3。在正离子模式下化合物 **12**，准分子离子峰为 m/z 295.181 5 $[M+H]^+$ ，其二级碎片离子： m/z 143.072 5 $[M+H-C_{10}H_{16}O]^+$ ，结合 MassBank 数据库信息及参考文献[18]，鉴定该化合物为钩吻素戊(koumidine)。

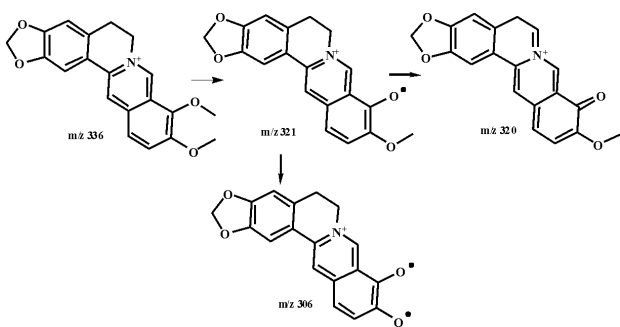


图 3 正离子模式下小檗碱的质谱裂解方式

2.3 吲哚类成分分析

从尖尾芋醇提取物中鉴定出 2 个吲哚类成分，分别为化合物 **4**、**5**。其保留时间分别为 4.80、4.97 min。化合物 **4**、**5** 在正离子模式下分别可见 m/z 146.059 6 $[M+H]^+$ 、 m/z 118.065 4 $[M+H]^+$ 。对 m/z 146.059 6 $[M+H]^+$ 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **4** 的质谱给出其二级碎片离子为 m/z 118.065 0 $[M-CO]^+$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[10]，鉴定该化合物为 3-吲哚甲醛(3-formylindole)。对 m/z 118.065 4 $[M+H]^+$ 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **5** 的质谱给出其二级

碎片离子为 m/z 117.057 4 $[M]^+$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[11]，鉴定该化合物为吲哚(indole)。

2.4 黄酮类成分分析

从尖尾芋醇提取物中鉴定出 4 个黄酮类成分，包括化合物 **6**、**7**、**9**、**15**。其保留时间分别为 6.44、6.87、11.50、16.87 min。化合物 **6**、**7**、**9** 在负离子模式下分别可见 m/z 577.136 4 $[M-H]^-$ 、 m/z 285.041 3 $[M-H]^-$ 、 m/z 285.040 9 $[M-H]^-$ 。对 m/z 577.136 4 $[M-H]^-$ 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **6** 的质谱给出其二级碎片离子为 m/z 425.088 7 $[M-H-C_8H_8O_3]^-$ 、289.072 2 $[M-H-C_{15}H_{12}O_6]^-$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[12]，鉴定该化合物为原花青素 B1(procyanidin B1)。对 285.041 3 $[M-H]^-$ 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **7** 的质谱给出其二级碎片离子为 m/z 184.052 3 $[M-H-C_4H_4O_3]^-$ 、168.052 5 $[M-H-C_4H_4O_4]^-$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[13]，鉴定该化合物为山柰酚(kaempferol)。对 m/z 285.040 9 $[M-H]^-$ 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **9** 的质谱给出其二级碎片离子： m/z 151.002 8 $[M-C_8H_7O_2]^-$ 、133.029 4 $[M-C_7H_5O_4]^-$ 、107.013 9 $[M-C_9H_7O_4]^-$ 均为黄酮苷元碎裂特征离子，结合 Chemspider 数据库及参考文献[15]，鉴定该化合物为木犀草素(luteolin)。在正离子模式下化合物 **15**，准分子离子峰为 m/z 251.106 5 $[M+H]^+$ ，其二级碎片离子为 m/z 135.044 3 $[M+H-C_9H_8]^+$ ，结合 MassBank 数据库信息及参考文献[21]，鉴定该化合物为 3',6'-dimethylflavone。

2.5 苯丙素类成分分析

从尖尾芋醇提取物中鉴定出的苯丙素类成分可分为木脂素类及苯丙酸类，其中化合物 **8** 为木脂素类，化合物 **18** 为苯丙酸类。化合物 **8**、**18** 保留时间分别为 7.23、19.91 min，在正离子模式下分别可见 m/z 379.081 0 $[M+H]^+$ 、 m/z 165.091 8 $[M+H]^+$ ，对化合物 **8** 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **8** 的质谱给出其二级碎片离子为 m/z 349.070 4 $[M+H-CH_2O]^+$ 、335.092 3 $[M+H-CO_2]^+$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[14]，鉴定该化合物为爵床脂素 G(justicidin G)。对化合物 **18** 进行 MS/MS 裂解分析，化合物 **18** 的质谱给出其二级碎片离子为 m/z 124.051 9 $[M+H-C_3H_5]^+$ 、109.028 4 $[M+H-C_3H_5O]^+$ ，结合 MassBank 数据库及参考文献[24]，鉴定该化合物为丁香酚(eugenol)。

2.6 其他类成分分析

从尖尾芋醇提取物中鉴定出化合物 **2** 为脂肪酸类，

化合物 11 为蒽醌类,化合物 13、17 为酮类,化合物 14、16 为酯类。蒽醌类化合物 11,通过扫描负离子模式的一级质谱图谱得准分子离子: m/z 269.045 5 $[M-H]^-$,其二级碎片离子: m/z 240.034 8 $[M-H-CHO]^-$,结合文献[17],鉴定该化合物为芦荟大黄素(aloe-emodin)。酮类化合物 17,其通过正离子模式的一级质谱扫描图谱得准分子离子: m/z 153.127 2 $[M+H]^+$,二级质谱的碎片离子为 m/z 137.096 6 $[M+H-CH_4]^+$ 、109.101 7 $[M+H-C_2H_4O]^+$ 。根据以上裂解方式,结合 MoNA 数据库信息及参考文献[23],鉴定该化合物为胡薄荷酮(pulegone)。

2.7 网络药理学分析

按照上述研究方案,运用网络药理学对尖尾芋尖尾芋醇提取物鉴定成分进行分析,发现尖尾芋醇提取物化学成分与乳腺癌具有 429 个交集靶点。进一步分析得到 13 类成分与乳腺癌有关的 30 个潜在核心靶点,再将 30 个潜在核心靶点蛋白相互作用信息导入 Cytoscape3.9.0 绘制尖尾芋醇提取物活性成分作用靶点蛋白相互作用网络图,如图 4 所示,节点大小及颜色深浅代表靶点 degree 值大小。

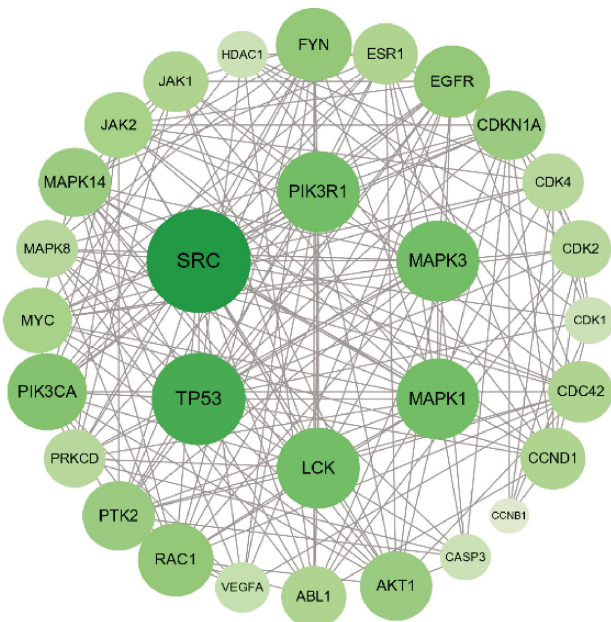


图 4 尖尾芋醇提取物活性成分作用靶点蛋白相互作用网络图

再通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 在线分析平台对尖尾芋醇提取物 30 个核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。获得 GO 条目共 408 条,其中 GO BP 有 308 条、GO CC 有 42 条、GO MF 有 58

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 5 所示,GO BP 条目中前 5 条为蛋白磷酸化、胞内信号转导、细胞凋亡负调控过程、细胞衰老以及纤维母细胞正调控过程。GO CC 条目中前 5 条为细胞溶质、细胞质、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、细胞核以及质膜细胞质侧的外源性成分。GO MF 条目中前 5 条为蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、酶结合以及蛋白激酶结合。

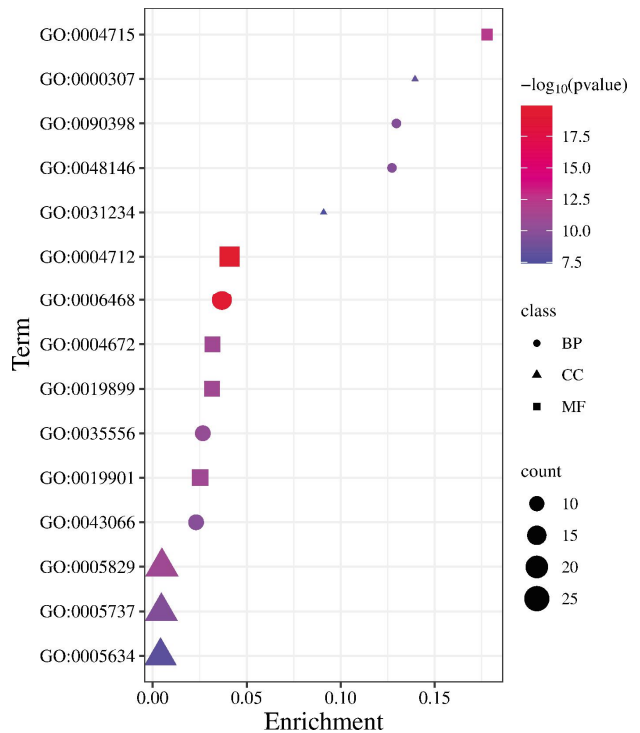


图 5 GO 富集结果气泡图

共获得 KEGG 通路共 142 条,选取 KEGG 富集通路前 20 个条目进行气泡图绘制,如图 6 所示,前 10 条分别为胰腺癌、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、癌症通路、癌症蛋白多糖、内分泌抵抗、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、人巨细胞病毒、病毒致癌、结直肠癌以及乙型肝炎,这些通路均和癌症反应密切相关。

运用 Cytoscape 3.9.0 作图软件对尖尾芋醇提取物 13 个有效成分、30 个核心靶点及 10 条 KEGG 信号通路制作成分-靶点-通路互作网络图,如图 7 所示。成分、靶点、通路在网络图中用节点表示,两个节点间的相互作用用边表示,degree 值的大小决定节点大小,从而确定中药中重要的成分及相互作用力度。

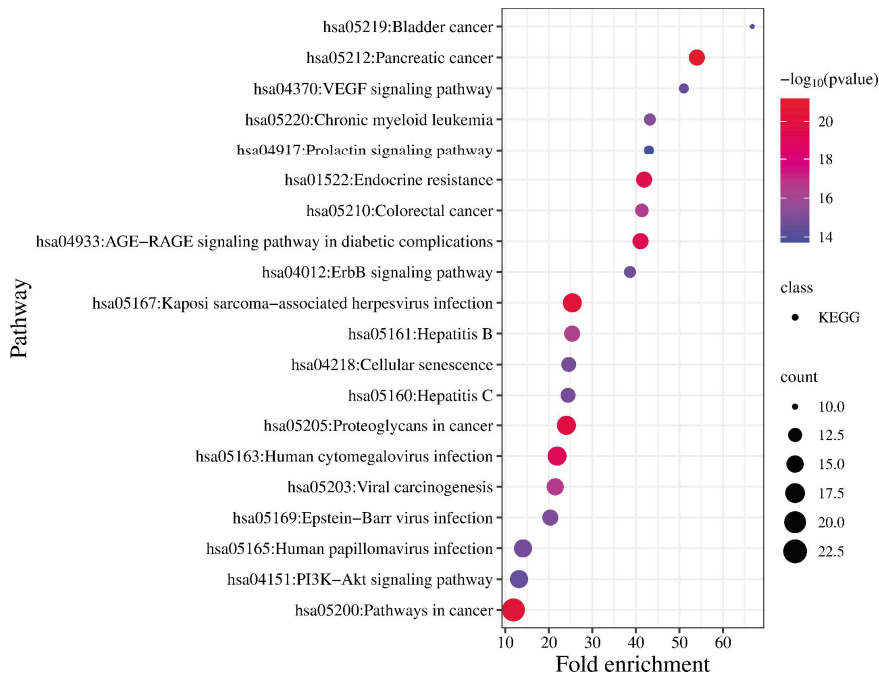


图 6 KEGG 通路富集结果通路图

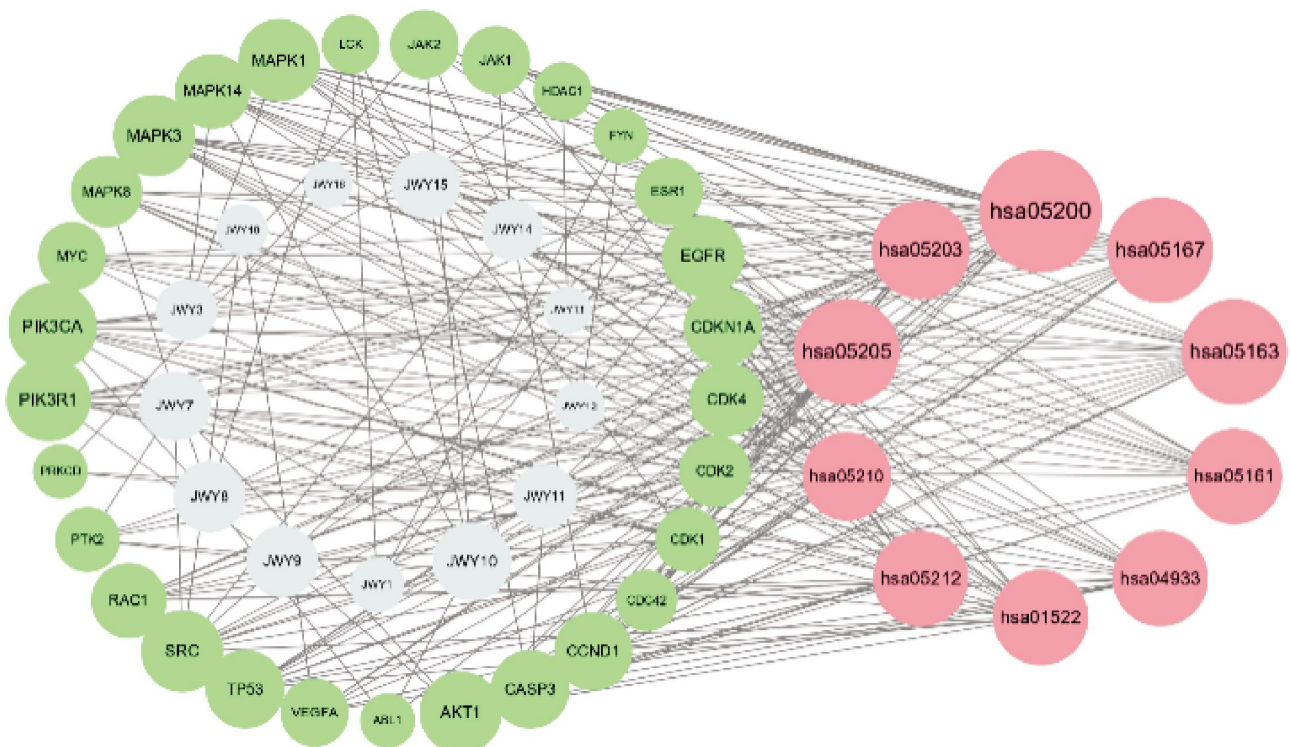


图 7 成分-基因-通路互作网络图

尖尾芋醇提取物成分中小檗碱度值最高,其次是山柰酚、木犀草素、爵床脂素 G、芦荟大黄素等,而 1-棕榈酸单甘油酯度值最低,这些成分中,生物碱类化合物小檗碱及黄酮类化合物山柰酚、木犀草素可能是尖尾芋醇提取物发挥药效的主要活性成分。同时,尖尾芋醇提取物化学成分作用靶点中,度值排名前 10 依次为磷酸肌醇 3 激酶 α (PIK3CA)、磷酸肌醇 3 激

酶调节亚基 1 (PIK3R1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、类固醇受体共激活因子 (SRC)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1A (CDKN1A)、肿瘤蛋白 (TP53),这些靶点主要集中于 PI3K 蛋白家族和 MAPK 蛋白家族,很多癌症和

PI3K 及 MAPK 蛋白家族有关。此外,KEGG 通路分析也发现,尖尾芋醇提物化学成分主要通过调控癌症通路、病毒感染相关通路,从而发挥抗肿瘤、抗病毒感染功效。

3 结语

本课题组前期研究^[4]发现,尖尾芋醇提物石油醚部位具有良好的抗乳腺癌活性,其机制与抑制 MAPKs 通路 p-ERK/ERK 的表达有关,但尖尾芋醇提物抗乳腺癌药效物质基础尚不明确。因此,本文采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析了尖尾芋 70%乙醇提取物的 18 种化学成分,同时,通过网络药理学分析出尖尾芋醇提物 13 个抗乳腺癌活性成分(1,3,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18)及 429 个抗乳腺癌相关靶点,说明尖尾芋醇提物抗乳腺癌作用与其多成分、多靶点的特性有关。其中生物碱类成分小檗碱(10)及黄酮类成分山柰酚(7)、木犀草素(9)为度值排名前三的核心成分,研究表明^[26-28],这 3 种成分抗乳腺癌作用与其抑制 MAPK、PI3K 等信号通路,促进凋亡等有关。PPI 网络预测得到 SRC、TP53、MAPK1、MAPK3、PIK3R1 5 个核心靶点,进一步通过 GO 生物学过程富集分析显示,尖尾芋醇提物抗乳腺癌主要涉及蛋白翻译后修饰、细胞凋亡负调控等生物过程,KEGG 信号通路富集分析显示,尖尾芋醇提物抗乳腺癌作用靶点富集最多的在癌症通路,包括 TP53、MAPK1、MAPK3 等 23 个靶点蛋白,TP53 是一个经典肿瘤抑制蛋白,该蛋白可以调控细胞生长、凋亡等多种生物过程^[29]。而 MAPK 为丝氨酸/苏氨酸激酶,也可以调节程序性细胞凋亡^[30]。这些靶点蛋白主要集中于 PI3K 蛋白家族和 MAPK 蛋白家族,均与细胞凋亡相关,成分-基因-通路互作网络图显示,生物碱类成分小檗碱及黄酮类成分山柰酚、木犀草素可能为尖尾芋抗乳腺癌的主要活性成分,其机制与凋亡相关。以上研究结果与本课题组前期研究的尖尾芋醇提物抗乳腺癌机制相符合。

综上,尖尾芋醇提物可能通过小檗碱、山柰酚及木犀草素等成分调控 TP53、MAPK1、MAPK3 等 30 个核心靶点蛋白,进而影响 PI3K、MAPK 等凋亡相关信号通路来发挥抗乳腺癌作用,提示尖尾芋醇提物抗乳腺癌作用的药效物质基础可能与其所含生物碱类及黄酮类成分有关,为后续尖尾芋醇提物抗乳

腺癌药效物质基础及作用机制的进一步研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 李 恒. 天南星科的生态地理和起源[J]. 云南植物研究, 1986, 8(4): 363-381.
- [2] 郭晓庄. 中药大辞典[M]. 天津: 天津科技出版公司, 1992: 1458.
- [3] 彭求贤. 尖尾芋水提物抑制小鼠乳腺癌生长与诱导 THP-1 细胞分化作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [4] 陈 娅, 王 鹏, 彭兰淳, 等. 尖尾芋石油醚部位化学成分及抗乳腺癌作用研究[J]. 中南药学, 2023, 21(4): 844-849.
- [5] PENG Q X, CAI H B, SUN X G, et al. *Alocasia cucullata* exhibits strong antitumor effect in vivo by activating antitumor immunity[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75328.
- [6] FANG M, ZHU D Q, LUO C H, et al. In vitro and in vivo anti-malignant melanoma activity of *Alocasia cucullata* via modulation of the phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 213: 359-365.
- [7] BAIKUNI A, HAWARI F L, SUTRIYO, et al. Untargeted LC-QTOF-MS/MS based metabolomic profile approach of bacterial ferment lysates and skin commensal bacterial cocktail ferment lysates[J]. HAYATI Journal of Biosciences, 2023, 30(3): 576-587.
- [8] SZEWCZYK K, OLECH M. Optimization of extraction method for LC-MS based determination of phenolic acid profiles in different *Impatiens* species [J]. Phytochemistry Letters, 2017, 20: 322-330.
- [9] QING Z X, CHENG P, LIU X B, et al. Structural speculation and identification of alkaloids in *Macleaya cordata* fruits by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening procedure[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2014, 28(9): 1033-1044.
- [10] MUZ M, DANN J P, JÄGER F, et al. Identification of mutagenic aromatic amines in river samples with industrial wastewater impact[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(8): 4681-4688.
- [11] 荣 波, 蒋青香, 林诗笛, 等. 基于 GC-MS-O 结合 OAV 比较铁观音和白芽奇兰茶叶的香气品质[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 351-363.
- [12] 许 文, 傅志勤, 林 婧, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青中 10 种黄酮类成分[J]. 药学学报, 2014, 49(12): 1711-1717.
- [13] 梁 艳, 于世锋, 陈卫军, 等. 山柰酚的电喷雾质谱裂解途径[J]. 应用化学, 2009, 26(10): 1250-1252.
- [14] WANG L N, PAN J Y, YANG M H, et al. Chromatographic fingerprint analysis and simultaneous determination of eight lignans in *Justicia procumbens* and its compound preparation by

- HPLC-DAD[J]. Journal of Separation Science, 2011, 34(6): 667-674.
- [15] DUAN K F, YUAN Z F, GUO W, et al. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(2): 201-208.
- [16] ZHOU H, LI W Y, SUN L, et al. A rapid LC-MS/MS method for simultaneous determination of berberine and irbesartan in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study after oral administration in rats[J]. Biomedical Chromatography, 2021, 35(9): e5144.
- [17] YANG C J, WANG S H, GUO X W, et al. Simultaneous determination of seven anthraquinones in rat plasma by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of semen cassiae extract[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 169: 305-313.
- [18] SHEN X W, MA J S, WANG X Q, et al. Toxicokinetics of 11 Gelsemium alkaloids in rats by UPLC-MS/MS[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 8247270.
- [19] RAFI M, KAROMAH A H, SEPTANINGSIH D A, et al. LC-MS/MS based metabolite profiling and lipase enzyme inhibitory activity of *Kaempferia angustifolia* Rosc. with different extracting solvents[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(11): 104232.
- [20] HIMES S K, CONCHEIRO M, SCHEIDWEILER K B, et al. Validation of a novel method to identify in utero ethanol exposure: simultaneous meconium extraction of fatty acid ethyl esters, ethyl glucuronide, and ethyl sulfate followed by LC-MS/MS quantification[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(7): 1945-1955.
- [21] DEKERMENDJIAN K, KAHNBERG P, WITT M R, et al. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1999, 42(21): 4343-4350.
- [22] RAWAT P, RAWAT P, KUMAR P, et al. Identification and characterization of compounds from methanolic extracts of *Lau-naea procumbens* by gas chromatography-MS, liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS, and ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quad time of flight/MS[J]. Pharmacognosy Magazine, 2021, 17(73): 120.
- [23] LASSILA T, MATTILA S, TURPEINEN M, et al. Tandem mass spectrometric analysis of S- and N-linked glutathione conjugates of pulegone and menthofuran and identification of P450 enzymes mediating their formation[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2016, 30(7): 917-926.
- [24] LIU Y T, AI X H, LI L, et al. A fast and accurate isotope dilution GC-IT-MS/MS method for determination of eugenol in different tissues of fish: application to a depletion study in mandarin fish[J]. Biomedical Chromatography, 2018, 32(5): e4163.
- [25] 张武岗, 郎一帆, 姚云, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对藏药宽筋藤中生物碱类成分的快速辨识[J]. 中草药, 2023, 54(24): 7977-7988.
- [26] LI X, ZHAO S J, SHI H L, et al. Berberine hydrochloride IL-8 dependently inhibits invasion and IL-8-independently promotes cell apoptosis in MDA-MB-231 cells[J]. Oncology Reports, 2014, 32(6): 2777-2788.
- [27] 李鹰飞, 曾世彬, 邱华平, 等. 山奈酚对乳腺癌细胞增殖及诱导凋亡的作用研究及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(22): 3679-3682.
- [28] 郑媿, 董欣敏, 张子英, 等. 木犀草素负向调节核糖体蛋白S12表达抑制MDA-MB-231细胞增殖与侵袭[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(7): 1198-1205.
- [29] DUFFY M J, SYNNOTT N C, O'GRADY S, et al. Targeting p53 for the treatment of cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2022, 79: 58-67.
- [30] WANG F J, LIU W, NING J F, et al. Simvastatin suppresses proliferation and migration in non-small cell lung cancer via pyroptosis[J]. International Journal of Biological Sciences, 2018, 14(4): 406-417.

(本文编辑 苏维)