

基于网络药理学的“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的作用机制探讨^Δ

吴代陆^{1*}, 麦喆钊², 陈怡², 陈宝艳³, 张璐², 孙治中², 孙伟鹏², 黄梅^{1#}(1.广州中医药大学第一附属医院乳腺科, 广州 510405; 2.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 3.广州中医药大学第一附属医院产科, 广州 510405)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2525-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.14

摘要 目的:挖掘“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的活性成分、靶点及通路,全面系统地探究其潜在作用机制。方法:基于网络药理学方法,通过TCMSP、DRAR-CPI、Genecards、OMIM等数据库检索获得“柴胡-白术”药对的主要活性成分及其治疗乳腺增生的潜在作用靶标;采用Cytoscape 3.6.0软件构建活性成分-潜在作用靶标网络和潜在作用靶标的相互作用网络,并筛选出5个潜在核心靶标,以分子对接法验证其与活性成分的结合亲和力。对潜在作用靶标进行基因本体和KEGG通路富集分析,获得关键通路,进而构建活性成分-潜在作用靶标-关键通路网络。结果:共获得“柴胡-白术”药对的活性成分17个、活性成分-潜在作用靶标47个。共获得核心靶标5个,包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1、 α 型蛋白激酶C、C型蛋白激酶、转化蛋白p21、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚基 α 型、pi3-激酶亚基 α 等;主要涉及5个信号通路,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路、磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶通路、小G蛋白通路、雌激素通路、骨形态发生蛋白通路。结论:“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生不仅具有通过多成分作用于多靶标的特征,而且会通过潜在作用靶标之间的相互影响发挥复杂的网络调节作用。

关键词 柴胡;白术;药对;乳腺增生;网络药理学;靶标;通路;机制

Research on the Functional Mechanism of Couplet Medicine of “Bupleuri Radix-*Atractylodis macrocephalea* Rhizoma” on Mammary Hyperplasia Based on Network Pharmacology

WU Dailu¹, MAI Zhexiong², CHEN Yi², CHEN Baoyan³, ZHANG Lu², SUN Zhizhong², SUN Weipeng², HUANG Mei¹ (1. Dept. of Galactophore, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3. Dept. of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen the active component, target and pathway of couplet medicine of “Bupleuri Radix-*Atractylodis macrocephalea* Rhizoma”, and to comprehensively explore its potential mechanism. METHODS: Based on the method of network pharmacology, main active components and potential targets of couplet medicine of “Bupleuri Radix-*A. macrocephalea* Rhizoma” were retrieved from TCMSP, DRAR-CPI, Genecards and OMIM database. The active component-potential target network and interaction network of potential targets were established by Cytoscape 3.6.0 software. Five potential core targets were screened, and its affinity with active components were validated with molecule docking method. GO classified enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of potential targets were carried out to obtain key pathway so as to construct active component-potential target-key pathway network. RESULTS: Totally 17 active components and 47 active component-potential targets were obtained from couplet medicine of “Bupleuri Radix-*A. macrocephalea* Rhizoma”. Five core targets were obtained, including AKT1, PRKCA, PRKCE, HRas, and PIK3CA. Five signaling pathways were involved, including MAPK pathway, PI3K/AKT pathway, RAS pathway, Estrogen pathway, BMP pathway. CONCLUSIONS: The couplet medicine of “Bupleuri Radix-*A. macrocephalea* Rhizoma” not only act on multiple targets through multiple components for mammary hyperplasia, but also play a complex network regulation role through the interaction between potential targets.

KEYWORDS Bupleuri Radix; *Atractylodis macrocephalea* Rhizoma; Couplet medicine; Mammary hyperplasia; Network pharmacology; Target; Pathway; Mechanism

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603653)

* 住院医师。研究方向:中西医结合治疗乳腺病。电话:020-36591843。E-mail:170847231@qq.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:中西医结合治疗乳腺病。电话:020-36591843。E-mail:huangmeigz@sina.com

乳腺增生又称为乳腺结构不良,是指乳腺上皮组织和纤维组织增生,乳腺组织导管和乳腺小叶在结构上的退行性病变及进行性结缔组织的生长^[1-3]。其发病率居乳房疾病的首位,临床主要症状表现为乳房弥散性结节

和疼痛^[4-5]。流行病学资料显示,有70%~80%的女性患有不同程度的乳腺增生,且多见于25~45岁的女性,其癌变率约为10%~20%^[6-7],给患者生理和心理健康带来了严重的危害。

乳腺增生疾病最早见于汉代华佗著《中藏经》,称为“乳癖”。中医认为其发病病机主要是肝气郁结导致肝脾两伤、痰气互结,气血双亏导致气血瘀滞^[8]。同时,现代临床研究也发现,肝气郁结是乳腺增生的常见发病机制^[9]。因此,对于乳腺增生,中医的主要治法是疏肝健脾疗法,以达到调理肝脾、舒畅气机的目的。“柴胡-白术”是疏肝健脾疗法中的常用药对,本课题组通过临床实践观察发现,运用“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生可取得良好的效果^[10]。现代药理学研究表明,以柴胡、白术为君臣药组方的逍遥散对雌性小鼠具有拟雌激素样作用,可增加正常小鼠子宫的质量,提高其雌二醇水平;而对于某些由于雌激素过高导致的疾病,如乳腺增生和子宫肌瘤,逍遥散又能发挥拮抗雌激素的作用,降低血清中雌二醇水平,并调节孕酮含量^[11-12]。因此,本团队认为“柴胡-白术”药对对雌激素水平具有双向调节作用,这可能与其治疗乳腺增生的作用机制相关。然而,目前对“柴胡-白术”药对的药理作用机制研究尚不够深入,即使有较多关于其抗乳腺增生方面的机制研究,却只停留在该药对调节内分泌以及改善乳腺组织形态结构层面,而关于该药对如何减轻乳腺组织对高浓度雌激素的反应,调节血清中雌激素、孕酮、雌二醇水平等机制尚未阐明,也未对该药对中的有效成分在体内抗乳腺增生的多靶点整合协同作用机制进行深入探讨。

一般认为,中药具有“多成分、多靶点、低亲和力、低选择性”的作用特点^[13],所以使用现代药理学理论阐述中药的药效物质基础和作用机制一直是研究的难点和关键点。网络药理学是基于系统生物学理论对生物系统进行网络分析,选取特定信息节点进行多靶点药物分子设计的新学科,其融合了系统生物学、多向药理学、生物信息学、计算机科学等多学科的技术和内容,能够进行“疾病表型-基因-靶点-药物”等多层次网络的构建,探索药物与疾病间的关联性,阐明药物作用机制^[14]。其整体性、系统性及复杂性的研究角度和研究方法,正好与中医药的作用特点相符合^[15]。

本研究基于网络药理学方法,以“柴胡-白术”药对中具有抗乳腺增生作用的主要活性成分为研究对象,通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络,全面系统地预测和挖掘其作用靶点,同时结合基因本体(Gene ontology, GO)分类富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,对“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的潜在作用机制进行分析和预测,以期为该药对的进一步开发利用提

供理论依据。

1 资料与方法

1.1 药物活性成分的获取

利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),分别以“柴胡”“白术”“Bupleurum”“Atractylodes”等为中英文关键词,以OB值(口服吸收度) $\geq 30\%$ 、DL值(类药性) ≥ 0.18 ^[16]为限定条件检索,获得该药对具有抗乳腺增生作用的活性成分。

1.2 药物活性成分的预测靶标及对应基因的获取

利用Chembiodraw Ultra 12.0软件绘制“柴胡-白术”药对活性成分的3D结构图,并将其结构文件上传至DRAR-CPI服务器(<https://omictools.com/drar-cpi-tool>),选取“Z-score < -0.5 ”的蛋白^[17],剔除重复部分后,将所得结果作为“柴胡-白术”药对活性成分的预测靶标。在Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)中输入各预测靶标的具体名称,限定物种为“Human”,获取预测靶标的对应基因。

1.3 “柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的潜在作用靶标的获取

分别以“Hyperplasia of mammary glands”“Mammary hyperplasia”“Breast hyperplasia”为关键词,在Genecards数据库(<https://www.genecards.org/>)和OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)中检索获得乳腺增生的疾病相关靶标及其对应基因。采用Excel 2013软件录入所获疾病相关靶标和“1.2”项下获得的“柴胡-白术”药对活性成分预测靶标的对应基因,并进行两者对比,筛选出交集部分,根据交集基因筛选出对应的靶标,作为“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的潜在作用靶标(下文中均以非斜体的基因名代表其对应的靶标)。

1.4 活性成分-潜在作用靶标网络的构建与分析

将“1.3”项下获得的“柴胡-白术”药对活性成分治疗乳腺增生的潜在作用靶标导入Cytoscape 3.6.0软件,构建活性成分-潜在作用靶标网络。通过网络图直观展示活性成分与潜在作用靶标之间的关系,并分析“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的作用特点。

1.5 潜在作用靶标的相互作用网络构建与分析

将“1.3”项下获得的“柴胡-白术”药对活性成分治疗乳腺增生的潜在作用靶标导入String数据库(<https://string-db.org>),将物种限定为“Homo sapiens”,获取潜在作用靶标的相互作用关系。将该关系文件导入Cytoscape 3.6.0软件,绘制潜在作用靶标相互作用网络,并利用Cytoscape 3.6.0软件中的“NetworkAnalyzer”工具对该网络进行分析,获取潜在作用靶标之间的连接度(Degree值),并根据Degree值绘制最终的潜在作用靶标相互作用网络图。

1.6 核心靶标的筛选及验证

基于“1.5”项下构建的潜在作用靶标相互作用网络,

筛选出 Degree 值最高的 5 个靶标(即网络图上节点面积最大的 5 个节点),作为潜在核心靶标,并进行分子对接验证。将潜在核心靶标导入 SystemsDock Web Site 服务器(<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>)与“柴胡-白术”药对的活性成分进行分子对接,得到两者之间的对接评分(Docking Score)。当对接评分<4.25,则表示活性成分分子和潜在核心靶标具有较弱的结合亲和性;对接评分为 4.25~<5.0,则表示两者之间具有一定的结合亲和性;对接评分为 5.0~<7.0,则表示两者之间具有较强的结合亲和性;对接评分≥7.0 则表示两者之间具有很强的结合亲和性^[18]。根据对接评分≥4.25 的活性成分所占比例评价上述 5 个潜在核心靶标与活性成分之间的结合亲和性,进而验证潜在核心靶标的真实性。

1.7 “柴胡-白术”药对治疗乳腺增生相关生物学过程与通路分析

将“1.3”项下获取的潜在作用靶标导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),选择“Select identifier”为“Official gene symbol”、“List type”为“Gene list”、物种为“Human”,进行 GO 分类富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 分类富集分析结果包括分子功能(Molecular function, MF)、生物过程(Biological process, BP)和细胞组分(Cellular component, CC)三部分。对所获得的 $P < 0.001$ ^[19]的生物学过程与通路,根据富集靶标数量由多到少进行排序,再选取富集靶标数量最多的前 10 条生物学过程与通路,作为本研究的主要分析对象。结合相关研究文献对该 10 条通路进行分析,筛选出可能与治疗乳腺增生相关的通路,作为关键通路。

1.8 活性成分-潜在作用靶标-关键通路网络构建

通过 DAVID 数据库获取富集于“1.7”项所获关键通路上的潜在作用靶标,并与相应的活性成分相匹配,得出三者之间的网络关系,并采用 Cytoscape 3.6.0 软件绘制活性成分-潜在作用靶标-关键通路网络,直观地展现“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的成分、靶标、通路三者之间的复杂网络关系,多方面阐释该药对治疗乳腺增生的作用机制。

2 结果

2.1 “柴胡-白术”药对活性成分获取结果

共检索获得“柴胡-白术”药对活性成分 17 个,其中柴胡活性成分 13 个、白术活性成分 4 个,主要包括乙酸芳樟酯、黄芩苷、3 β -乙酰化苍术酮、8 β -乙氧基白术内酯 III 等,详见表 1。

2.2 活性成分-潜在作用靶标的获取结果

根据 DRAR-CPI 服务器检索结果,共获得“柴胡-白术”药对活性成分的预测靶标 128 个;与 Genecards 数据库和 OMIM 数据库中获得的乳腺增生的疾病相关靶标进行对比取交集后,共筛选出“柴胡-白术”药对治疗乳

腺增生的活性成分-潜在作用靶标 47 个,详见表 2。

表 1 “柴胡-白术”药对的活性成分

Tab 1 Active components of couplet medicine of “Bupleuri Radix-A. macrocephalea Rhizoma”

序号	来源药材	中文名(英文全称)	OB, %	DL
1	柴胡	乙酸芳樟酯(Linoleyl acetate)	42.10	0.20
2	柴胡	黄芩苷(Baicain)	40.12	0.75
3	柴胡	豆甾醇(Sigmasterol)	43.83	0.76
4	柴胡	异鼠李素(Isorhamnetin)	49.60	0.31
5	柴胡	山奈素(Kaempferol)	41.88	0.24
6	柴胡	3, 5, 6, 7-四甲基化-2-(3, 4, 5-三甲氧苯基)色酮苷(3, 5, 6, 7-tetramethoxy-2-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)chromone)(简称为“色酮苷”)	31.97	0.59
7	柴胡	茵陈黄酮(Areapillin)	48.96	0.41
8	柴胡	过萜澄茄素(Cubebin)	57.13	0.64
9	柴胡	长贝壳杉素 A(Longikaurin A)	47.72	0.53
10	柴胡	(+)-川白芷内酯[(+)-anomalin]	46.06	0.66
11	柴胡	α -菠菜甾醇(α -spinasterol)	42.98	0.76
12	柴胡	牵牛花色素(Petunidin)	30.05	0.31
13	柴胡	槲皮素(Quercetin)	46.43	0.28
14	白术	14-乙酰基-12-异戊烯酰基-2E, 8Z, 10E-白术三醇(14-acetyl-12-seneciyl-2E, 8Z, 10E-atractylentriol)(简称为“白术三醇”)	63.37	0.30
15	白术	3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-二甲基-17-[(2R, 5S)-5-丙烷-2-ylacetan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-十二面体-1H-环戊基[a]菲-3-ol(简称为“菲-3-ol”)	36.23	0.78
16	白术	3 β -乙酰化苍术酮(3 β -acetoxyatractylone)	54.07	0.22
17	白术	8 β -乙氧基白术内酯 III(8 β -ethoxy atractylenolide III)	35.95	0.21

2.3 活性成分-潜在作用靶标网络构建结果

“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的活性成分-潜在作用靶标网络图见图 1。由图 1 可见,该网络上有节点 64 个、边线 257 条,其中六边形节点代表“柴胡-白术”药对活性成分,圆形节点代表潜在作用靶标,边线代表两者的相互关联。由该网络图可知,同一活性成分可以作用于不同靶标,而同一靶标也可对应不同活性成分,体现出“柴胡-白术”药对能通过多成分、多靶标发挥抗乳腺增生作用的特点。

2.4 潜在作用靶标相互作用网络构建

潜在作用靶标的相互作用网络见图 2。由图 2 可见,该相互作用网络上共有节点 47 个、边线 352 条,其中圆形节点代表潜在作用靶标,边线代表各靶标之间的相互关联。根据该网络图可知,潜在作用靶标之间存在复杂的相互作用关系,因此本团队推测“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生不仅是通过多成分作用于多靶标来发挥网络调节作用,还可能会通过潜在作用靶标之间的相互影响,进而产生了复杂的调节关系,发挥治疗作用。

2.5 核心靶标的筛选及验证结果

由图 2 可见,潜在核心靶标(即节点面积最大的 5 个节点)分别为 PRKCE、PRKCA、AKT1、PIK3CA、HRas。上述靶标与“柴胡-白术”药对的 17 个活性成分的分子对接结果显示,PRKCE、PRKCA 与 15 个活性成分(均占 88.2%)具有一定或更强的结合亲和性,AKT1、PIK3A、HRas 与 14 个活性成分(均占 82.4%)具有一定或更强的

HRas 等 47 个;上述靶标主要涉及 PI3K/AKT、雌激素 (Estrogen)、RAS、BMP、MAPK 等信号通路。

表 4 “柴胡-白术”药对潜在作用靶标的 MF 分析结果
Tab 4 MF analysis results of potential target for couplet medicine of “Bupleuri Radix-A. macrocephalea Rhizoma”

MF	对应中文	富集基因数	P
Protein binding	蛋白结合	41	6.08×10^{-11}
ATP binding	三磷酸腺苷结合	14	7.58×10^{-10}
Enzyme binding	酶结合	13	9.27×10^{-9}
Kinase activity	激酶活性	11	1.60×10^{-8}
Identical protein binding	相同蛋白结合	11	6.66×10^{-8}
Transcription factor activity, sequence-specific	转录因子活性, 序列特异性脱	9	5.89×10^{-7}
DNA binding	氧核糖核酸结合		
DNA binding	脱氧核糖核酸结合	9	6.57×10^{-7}
Protein tyrosine kinase activity	蛋白酪氨酸激酶活性	8	3.33×10^{-6}
Protein kinase activity	蛋白激酶活性	8	1.60×10^{-5}
Sequence-specific DNA binding	序列特异脱氧核糖核酸结合	8	2.56×10^{-5}

表 5 “柴胡-白术”药对潜在作用靶标的 BP 分析结果
Tab 5 BP analysis results of potential target for couplet medicine of “Radix Bupleuri-A. macrocephalea Rhizoma”

BP	对应中文	富集基因数	P
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	促进 RNA 聚合酶 II 启动子转录	16	2.20×10^{-13}
Signal transduction	信号转导	16	3.34×10^{-12}
Positive regulation of cell proliferation	促进细胞增殖	15	3.93×10^{-12}
Positive regulation of transcription, DNA-templated	促进 DNA 转录	15	8.50×10^{-12}
Transcription, DNA-templated	DNA 转录	14	1.41×10^{-11}
MAPK cascade	MAPK 级联	13	4.63×10^{-11}
Negative regulation of apoptotic process	抑制凋亡过程	12	5.33×10^{-11}
Phosphatidylinositol-mediated signaling	磷脂酰肌醇介导的信号	11	1.64×10^{-9}
Positive regulation of gene expression	促进基因表达	11	1.76×10^{-9}
Response to drug	药物反应	11	1.79×10^{-9}

表 6 “柴胡-白术”药对潜在作用靶标的 CC 分析结果
Tab 6 CC analysis results of potential target for couplet medicine of “Bupleuri Radix-A. macrocephalea Rhizoma”

CC	对应中文	富集基因数	P
Cytoplasm	细胞质	29	6.16×10^{-8}
Nucleus	细胞核	29	4.15×10^{-6}
Plasma membrane	细胞质膜	24	5.25×10^{-6}
Cytosol	细胞溶质	23	1.13×10^{-5}
Nucleoplasm	核浆	19	1.27×10^{-5}
Membrane	细胞膜	18	1.65×10^{-5}
Mitochondrion	线粒体	14	4.29×10^{-5}
Extracellular region	胞外区	12	7.34×10^{-5}
Protein complex	蛋白质复合体	11	2.93×10^{-4}
Perinuclear region of cytoplasm	胞浆的核周区域	8	3.60×10^{-4}

3 讨论

“柴胡-白术”药对具有疏肝解郁健脾的功效,是中医临床治疗乳癖的常用药对^[10]。近年来的临床经验总结发现,该药对在乳腺增生类疾病方面疗效明确^[10]。但目前“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生类疾病的具体作用

机制及相关活性成分尚未明确。为此,本研究基于网络药理学的原理和方法,拟深入探究其潜在作用机制。

表 7 “柴胡-白术”药对潜在作用靶标的 KEGG 通路富集分析结果

Tab 7 KEGG pathway enrichment analysis results of potential target for couplet medicine of “Bupleuri Radix-A. macrocephalea Rhizoma”

通路	对应中文	富集基因数	P
Signaling pathway of estrogen	雌激素信号通路	28	2.81×10^{-23}
RAS signaling pathway	RAS 信号通路	19	1.68×10^{-22}
BMP signaling pathway	BMP 信号通路	19	1.36×10^{-16}
PI3K/AKT signaling pathway	PI3K/AKT 信号通路	19	2.83×10^{-16}
MAPK signaling pathway	MAPK 信号通路	15	3.64×10^{-16}
Melanoma	黑色素瘤	14	4.36×10^{-15}
FoxO signaling pathway	FoxO 信号通路	14	5.29×10^{-15}
Hepatitis B	乙型肝炎	14	6.06×10^{-14}
Endometrial cancer	子宫内膜癌	13	1.90×10^{-12}
Central carbon metabolism in cancer	癌症的中心碳代谢	13	2.03×10^{-12}

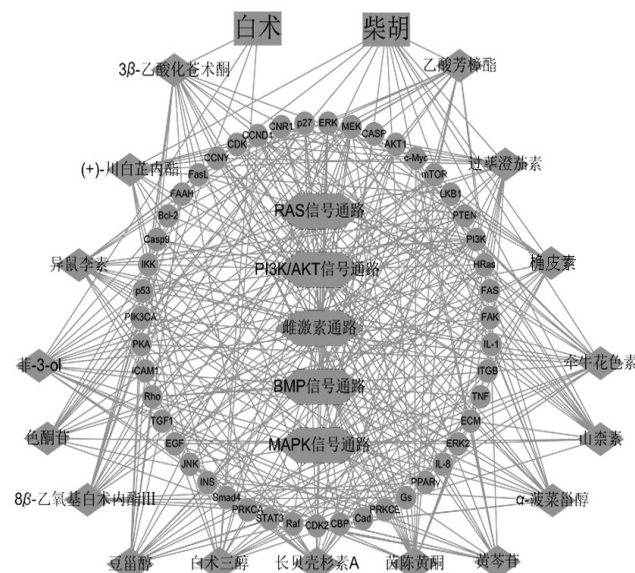


图 3 活性成分-潜在作用靶标-关键通路网络
Fig 3 Active component-potential target-key pathway network

本研究共检索获得“柴胡-白术”药对的活性成分 17 个,上述成分与乳腺增生的治疗可能相关的作用靶标有 47 个;构建了“活性成分-潜在作用靶标”网络,直观地体现了该药对通过多成分、多靶标治疗乳腺增生的特点;构建了潜在作用靶标相互作用网络,反映出该药对治疗乳腺增生相关的各靶标之间关系密切,亦印证其作用机制较为复杂多样;通过分子对接验证了“柴胡-白术”药对的活性成分和核心靶标之间结合亲和性较强,表明本研究对 PRKCE、PRKCA、AKT1、PIK3CA、HRas 在治疗过程中发挥核心作用的推测具有一定科学性。

3.1 “柴胡-白术”药对活性成分的药理作用

本研究获得“柴胡-白术”药对中如异鼠李素、柚皮素、黄芩苷、过氧蒽烯、豆甾醇等 17 个活性成分,结合

已有研究,本团队发现异鼠李素、槲皮素、黄芩苷在治疗乳腺疾病中具有重要作用。例如,文月玲等^[20]研究发现,黄芩苷可减轻由脂多糖诱发的家兔乳腺炎的进展,降低家兔血清中的乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶、髓过氧化物酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的活性,减少血清中IL-1、IL-6和TNF- α 的表达,同时能减轻炎症发热,从而发挥保护乳腺组织的作用。胡珊等^[21]研究发现,异鼠李素可通过抑制PI3K/AKT通路和膜受体酪氨酸蛋白激酶信号通路的活性来发挥抑制乳腺癌细胞增殖的作用,同时可以通过下调抑凋亡因子Bcl-2的表达、上调促凋亡因子Bax的表达来减少乳腺的过度增生,达到抗乳腺癌的目的。Seo HS等^[22]通过研究认为,高浓度的槲皮素作为一种植物激素,主要可通过上调胱天蛋白酶8(Caspase-8)、Caspase-3蛋白的水平,诱导多聚核糖聚合酶的裂解,促进外源性凋亡的发生,从而抑制乳腺癌的发生发展。

基于此,本团队认为“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生主要是通过减轻炎症反应、减缓临床症状,同时抑制乳腺细胞的过度增生、减缓病情进展,甚至通过促进细胞凋亡来发挥逆转性的治疗作用。

3.2 核心靶标的治疗意义

本研究结果显示,“柴胡-白术”药对可能主要通过作用于PRKCE、PRKCA、AKT1、PIK3CA、HRas等5个靶标来发挥治疗乳腺增生的作用。相关研究结果表明,下调PRKCE活性可使乳腺细胞的易感性增强,如增强内源性或外源性凋亡信号对乳腺细胞凋亡的调控以及增强其对电离辐射和细胞毒性药物的敏感性,这与乳腺增生密切相关^[23]。PRKCA和PIK3CA表达的抑制可减缓体内乳腺细胞的异常增长,而PIK3CA过表达亦可损害乳腺细胞DNA,增强乳腺细胞的易感性,促进乳腺细胞凋亡,达到抑制乳腺增生的效果^[24]。AKT1可产生刺激细胞增殖或降低雌激素受体依赖性的作用,影响雌激素受体磷酸化,从而造成内分泌环境紊乱,导致乳腺增生^[25]。HRas基因的突变会导致乳腺上皮细胞的异常生长,提高乳腺增生的发生率,是乳腺增生的危险因素^[26]。上述靶标均与乳腺增生的发病机制密切相关,提示“柴胡-白术”药对可能通过调节相关靶点,起到治疗乳腺增生的作用。

基于此,本团队认为“柴胡-白术”药对可通过抑制PRKCE、PRKCA、PIK3CA的表达,增强乳腺细胞的易感性,促进乳腺细胞的凋亡;同时,可增强其他抗肿瘤药物对乳腺细胞的杀伤作用,从而达到抑制乳腺增生的治疗效果。其次,该药对可通过抑制AKT1的表达,减少雌激素受体磷酸化的发生,调节体内内分泌紊乱的情况,达到减缓乳腺增生进展的目的。此外,该药对还可能通过降低HRas基因的突变率,抑制乳腺上皮细胞的异常

增殖,从而发挥预防乳腺增生或防止其恶化的作用。

3.3 关键通路的相关机制

综合既往研究结果,本团队认为“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的作用可能通过雌激素通路、PI3K/AKT、RAS、BMP、MAPK等信号通路来实现。现代医学认为,乳腺增生的发生与内分泌环境的紊乱有很大关系。目前研究发现,雌激素受体信号传导对乳腺的生长、发育及细胞凋亡等一系列生理活动有调控效应,雌激素受体信号通路失调可促进乳腺细胞过度增殖或抑制乳腺细胞凋亡,从而导致乳腺增生^[27]。PI3K/AKT/mTOR为PI3K/AKT通路下游众多通路中的一条,研究发现,该通路被激活后,被激活的AKT会直接磷酸化mTOR,发挥抗凋亡效应,从而促进乳腺细胞增殖^[28]。有研究证实,RAS基因传递细胞生长分化信号,催化活性区的突变,导致RAS蛋白不依赖于表皮生长因子受体/酪氨酸激酶型细胞表面受体(EGFR/HER)激化,促成细胞的恶性转化^[29]。孙丽等^[30]研究发现,BMP2和BMP4的表达上调会促进乳腺干细胞的增殖和分化,从而导致乳腺导管数量增加、分支增多,继而致使乳腺上皮增生。MAPK信号通路包括ERK1/2、JNK、p38 MAPK等3条通路,其主要功能是将细胞外信号传导至细胞内,多项研究证实,MAPK信号通路在乳腺细胞增殖、分化、凋亡及转移中有重要的调节作用,影响着乳腺增生等多种乳腺疾病的发生^[31-32]。

基于此,本团队考虑“柴胡-白术”药对是通过雌激素通路维持雌激素受体的稳定性,使雌激素发挥正常的生理功能,维持乳腺的正常生长、发育及凋亡;同时其能阻断PI3K/AKT/mTOR通路,抑制抗凋亡信号的传导,促进乳腺细胞的凋亡,发挥抑制乳腺增生的作用。对于RAS信号通路在乳腺增生中的治疗作用,本课题组推断其主要是减少了乳腺细胞的恶性转化及增生,从而起到预防乳腺增生及恶化的作用。此外,“柴胡-白术”药对还可通过阻断BMP信号通路,抑制BMP相关蛋白的表达,减少乳腺干细胞的增殖与分化;该药对还可通过调控MAPK通路,阻止细胞外的增殖信号传导至乳腺细胞内,发挥抑制乳腺细胞增殖的作用,同时促进凋亡信号的传导,增加乳腺细胞的凋亡,从而起到治疗乳腺增生的效果。

4 结语

本研究结果表明,“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的过程涉及了多个活性成分、作用靶标及生物过程,其作用机制复杂多样,并非只由单个成分、单个靶标或单个通路发挥作用,这与中药治疗疾病的特点相吻合。分子对接结果亦验证了本研究结果的可靠性,本文所得结论能与现有实证研究结果相符。但本研究结果只是一种分子机制上的预测探讨,该药对治疗乳腺增生的具体

作用机制仍需通过进一步研究予以验证。

参考文献

- [1] 王桂玲,任连成,刘春香.乳腺增生与乳腺癌相关性研究[J].中国医药导刊,2014,16(6):972-973.
- [2] 施学丽,邓家刚,蒋筱,等.195首治疗乳腺增生中药专利复方的用药规律分析[J].世界科学技术(中医药现代化),2013,15(7):1544-1551.
- [3] 谭工,胡波,刘奉,等.基于文献探析乳腺增生症的中医证治规律[J].重庆医学,2013,42(24):2887-2890.
- [4] 何家安.柴胡疏肝散治疗乳腺增生临床 Meta 分析[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(3):185-188.
- [5] 林毅,唐汉钧.现代中医乳房病学[M].北京:人民卫生出版社,2003:103.
- [6] 蒋洛余.2 980 例乳腺普查结果临床探讨[J].中国医药科学,2017,7(18):188-190.
- [7] 谷丽艳,易佳丽,樊延宏,等.中医药疗法治疗乳腺增生研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(1):173-176.
- [8] 何颖贤,张璐.中医药疏肝理脾法治疗乳腺增生的现状研究[J].世界最新医学,2017,17(40):58-60.
- [9] 徐玲,郭丽珍,吕雄,等.加味逍遥散调周法对乳腺增生患者血清性激素水平的影响[J].广州中医药大学学报,2019,36(4):487-491.
- [10] 王书新,段彪,陈毓菁,等.中药治疗乳腺增生的用药规律[J].中医药导报,2017,23(23):50-53.
- [11] 张琴,陆文亮.逍遥散的现代药理作用研究进展[J].中南药学,2013,11(7):530-532.
- [12] 陈薇,方志娥,王琴.逍遥散治疗乳腺增生研究进展[J].中国药业,2015,24(8):127-128.
- [13] 翁小刚,李玉洁,陈颖,等.倡议树立方剂“主效应”研究的新思路:对中药复方作用机制与配伍机制研究的新思考[J].中国中药杂志,2018,43(18):3782-3786.
- [14] 邢心睿,吕狄亚,柴逸峰,等.网络药理学在中药作用机制中的研究进展[J].药学实践杂志,2018,36(2):97-102.
- [15] 李学军,许海玉.网络药理学与中药研究[J].药学报,2018,53(9):1385-1386.
- [16] 汝锦龙.中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [17] WU Z, LI W, LIU G, et al. Network-based methods for prediction of drug-target interactions[J]. *Front Pharmacol*, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.011134.
- [18] HSIN KY, MATSUOKA Y, ASAI Y, et al. SystemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W507-W513.
- [19] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources[J]. *Nature Protoc*, 2009, 4(1):44-57.
- [20] 文月玲,张于,姚学萍,等.黄芩苷对LPS诱导的家兔乳腺炎的保护作用[J].天然产物研究与开发,2016,28(9):1377-1383.
- [21] 胡珊,邓甬川.异鼠李素对乳腺癌细胞的作用机制[J].中国药科大学学报,2013,44(6):563-567.
- [22] SEO HS, KU JM, CHOI HS, et al. Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1):31-42.
- [23] KÖRNER C, KEKLIKOGLOU I, BENDER C, et al. MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKC epsilon) [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(12):8750-8761.
- [24] HSU YH, YAO J, CHAN LC, et al. Definition of PKC-alpha, CDK6, and MET as therapeutic targets in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(17):4822-4835.
- [25] BOSTNER J, KARLSSON E, PANDIYAN MJ, et al. Activation of AKT, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(2):397-406.
- [26] GEYER FC, LI A, PAPANASTASIOU AD, et al. Recurrent hotspot somatic mutations in HRAS Q61 and PI3K-AKT pathway genes in breast adenomyoepitheliomas[J]. *Nat Commun*, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-04128-5.
- [27] 林妮,邱玉文,何贡云,等.荔枝核皂苷对大鼠乳腺增生的作用及对雌激素信号通路的影响[J].中药材,2015,38(4):798-802.
- [28] 陈茂山,杨光伦.PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导乳腺癌内分泌治疗耐药的研究进展[J].癌症进展,2017,15(10):1127-1130.
- [29] 史悦,袁高峰,石凤灵,等. RAS、CD68 和 CD34 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J].临床肿瘤学杂志,2015,20(12):1080-1083.
- [30] 孙丽,郭东辉,刘飞,等.小鼠乳腺增生组织中 BMP 信号通路的改变[J].中国病理生理杂志,2018,34(3):544-548.
- [31] 付立新,席磊,陈燕林,等.肿瘤相关成纤维细胞通过 p38/MAPK 信号通路促进人乳腺癌细胞迁移[J].重庆医科大学学报,2019,44(2):163-168.
- [32] 钱峰.氯化两面针碱通过 MAPK 信号通路抑制乳腺癌及肝癌细胞转移的机制[J].中国临床药学杂志,2018,27(3):143-148.

(收稿日期:2019-03-06 修回日期:2019-07-28)

(编辑:段思怡)