

# 中药消癥颗粒代谢产物分析：基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 结合网络药理学分析的综 合策略

王能<sup>a, b, 1</sup>, 杨博文<sup>a, b, 1</sup>, 张菊萍<sup>a, b</sup>, 郑轶枫<sup>a, b</sup>, 王胜奇<sup>a, b</sup>, 张晓彤<sup>a, b</sup>, 司徒红林<sup>a, b</sup>, 林毅<sup>a, b, \*</sup>, 王志宇<sup>a, b, \*</sup>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109569>

Biomedicine & Pharmacotherapy ( IF 6.529 )

**关键词：**消癥颗粒、超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱、网络药理学、胆汁酸代谢

## 摘要

消癥颗粒已获国家药品监督管理局批准用于治疗乳腺增生症。然而，消癥颗粒的吸收物质及其对代谢途径的影响在很大程度上仍是未知的。采用液相色谱与质谱联用技术鉴定血清中存在的物质。

利用网络药理学来探索所涉及的潜在代谢靶标和代谢途径。进行蛋白质印迹法和免疫荧光测定以进行靶标验证。

外源性结果表明 196 种化合物被过滤为吸收物质，其中在大鼠血清中初步鉴定出 63 种成分或代谢物，发现丹参酮 II 和丹参酮 I 的代谢物作为主要代谢途径。随后，内源性结果显示，消癥颗粒可显著调节血清生化指标，胆汁酸分泌信号通路在所有调控途径中排名第一。通过消癥颗粒治疗后，胆酸、甘氨胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸和牛磺胆酸等中间体的水平显著上调，伴随关键酶 CYP7A1 的表达增加，表明消癥颗粒可加速胆汁酸代谢途径。我们的研究首次展示了消癥颗粒在体内的综合代谢情况，胆汁酸合成途径可能是促成该药实现药理功能的关键机制之一。

a.广州中医药大学基础医学院整合医学研究中心; 广州中医药大学第二临床学院乳腺癌综合研究实验室; 广东省中医药科学研究院中医证候临床研究重点实验室;

b.广东省中医科学院广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东省中医院, 广东广州 510006

\*通讯作者 E-mail 地址: linyi1942@126.com (Y. Lin), wangzhiyu@gzucm.edu.cn (Z. Wang)。

1 王能和杨博文对这项工作有同等贡献。

Received 11 August 2019; Received in revised form 16 October 2019;

Accepted 20 October 2019

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

缩写：EBE，淫羊藿；CD，肉苁蓉；LH，益母草；SM，丹参；CA，郁金；RC，莪术；LL，女贞子；RPM，何首乌；CG，牡蛎；CT，鳖甲；TAM，肿瘤相关巨噬细胞；TCM，中医药；LC-MS，高效液相色谱与质谱联用；UPLC，超高效液相色谱；MS，质谱；POS，正离子；NEG，负离子；VIP，变量重要性指标；PCA，主成分分析；KEGG，京都基因和基因组百科全书；CYP7A1，胆固醇 7  $\alpha$ -羟化酶； $\Delta$ M，分子质量的变化；SD，斯普拉格-杜勒鼠；IDA，信息依赖基础；TIC，总离子色谱图；SDS-PAGE，十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳；DAPI，4',6-二脒基-2-苯基吲哚。

删除[奇绩医药]: ;  
删除[奇绩医药]:  
删除[奇绩医药]: ;  
删除[奇绩医药]:  
删除[奇绩医药]: ;  
删除[奇绩医药]:

1.介绍

消癥颗粒是由 10 种草药组成的中药方剂，包括淫羊藿（EB，中文名淫羊藿）、肉苁蓉（CD，中文名肉苁蓉）、益母草（LH，中文名益母草）、丹参（SM，中文名丹参）、郁金（CA，中文名郁金）、莪术（RC，中文名莪术）、女贞子（LL，中文名女贞子）、制首乌（RPM，中文名制首乌）、牡蛎（CG，中文名牡蛎）、鳖甲（CT，中文名鳖甲）<sup>[1]</sup>。此前，研究发现该配方可显著抑制动物乳腺增生模型中雌激素和黄体生成素的表达水平<sup>[2, 3]</sup>。更重要的是，消癥颗粒可以阻断 2,2-二羟甲基丁酸（DMBA）诱导的乳腺癌异种移植物中的致癌作用<sup>[4]</sup>。

删除[DAVE]: DMBA

同时，我们之前也报道了该配方可以通过靶向 MMTV-PyVT<sup>+/-</sup>小鼠自发性乳腺癌模型上的肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)/CXCL1 通路来预防乳腺癌的发生和转移<sup>[5]</sup>。目前，该配方已被中国国家药品监督管理局批准用于治疗乳腺增生。淫羊藿苷和丹参酮分别是 EB 和 SM 中存在的主要化合物，因此被认为是配方质量控制的主要标准。化学分析表明，不同批次配方中淫羊藿苷浓度测定在 2.977-3.067 mg/g 之间，丹参酮测定在 0.49-0.57 mg/g 之间<sup>[6, 7]</sup>。然而很少有关于消癥颗粒吸收物质的报道，而消癥颗粒在体内可能的代谢途径尚不清楚。因此系统地分析其吸收物质及其作用靶点，对于解释其药理作用和物质基础具有重要意义和必要性。

众所周知，中药配方通常含有上千种化学物质，多种化合物之间存在复杂的相互作用，如何识别可吸收物质是药理学家面临的一大挑战。在过去的十年中，网络药理学已成为建立化合物-化合物、靶标-疾病和化合物-靶标之间系统相关性的新工具<sup>[8, 9]</sup>。随着化合物收集、药代动力学评价(吸收、分布和代谢)、靶标预测和网络分析，预测整个药物-靶标相互作用网络和确定相关核心分子和途径

变得越来越快、越来越容易<sup>[10]</sup>。网络药理学使我们有机会将药理学研究策略从“一药一靶”模式转变为“药-靶网络相互作用”模式<sup>[11]</sup>。通过该方法，我们对消癍颗粒的 10 个中草药共产生~~的~~105 个成分~~和~~806 个潜在靶标进行了筛选。更重要的是，通过与乳腺癌 GENECARDS 数据库和 GSE5764 微阵列杂交，最终鉴定出 81 个乳腺癌相关基因为用药后的潜在靶标<sup>[5]</sup>。但由于方法上的限制，我们只能从不同的数据库中收集化合物和靶标来建立化合物-靶标图。在此过程中，也考虑到一些生物利用度低的物质，不可避免地导致假阳性结果。因此，可吸收成分的检测对于成功预测潜在化合物目标网络是非常必要的。

删除[DAVE]: ，并对

最近，高效液相色谱与质谱联用 (LC-MS) 方法越来越多地用于生物样品分析，具有高灵敏度和高通量的优势<sup>[12, 13]</sup>。在这项工作中，我们使用 UPLC 结合高分辨率 MS 对消癍颗粒的吸收原型成分和代谢物进行了表征。此外，利用网络药理学将吸收的成分与相应的靶标整合，并产生潜在的代谢途径。就我们而言，这是首次揭示消癍颗粒在体内吸收物质、代谢途径和靶点药理网络分析的综合结果。

2.材料和方法

2.1 消癍颗粒的制备

消癍颗粒提取物样品（20mg）加入 1000 μL 溶剂（乙腈-甲醇-水：2:2:1，含有 1 μg/mL 的~~L~~-2-氯~~苯~~丙氨酸）并涡旋振荡 30s，在 45Hz 下匀质 4 分钟，然后在冰水浴中超声 5 分钟。匀质和超声循环重复 3 次。然后将混合物以~~12,000rpm~~离心 15 分钟。

删除[DAVE]: -L-

删除[DAVE]: 内标

删除[DAVE]:

最后，将 2 μL 处理过的样品上清液注入 LC-MS/MS 检测系统。

2.2 动物实验

十二只雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自广东省实验动物有限公司（中国广东）。大鼠在温度为 24±2℃、湿度为 55±15%、暗光周期为 12h 的条件下适应一周。实验前，所有大鼠禁食过夜，自由饮水。雌性 SD 大鼠 12 只，体重 200 ±10g，随机分为 2 组，一次灌胃给予水提物（6g/kg）或等量生理盐水。分别在给药前和给药后 60 分钟，用肝素化管中从眼睛中收集约 1mL 血样。血样以 4000rpm 离心 15 分钟后分离血清，并储存于-80℃以备后用。所有动物护理和实验步骤均按照广州中医药大学动物伦理评审委员会批准的方案进行。

删除[DAVE]:

### 2.3 代谢物提取

每 100  $\mu\text{L}$  血清样品与 300  $\mu\text{L}$  甲醇（含有 1  $\mu\text{g/mL}$  的 L-2-氯苯丙氨酸）混合，涡旋 60 秒，在冰水浴中超声处理 5 分钟以沉淀蛋白质，在 4° C 下以 12,000rpm 离心 15 分钟后，将 2  $\mu\text{L}$  处理过的样品上清液注入超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱（UPLC-Q-Orbitrap MS）检测系统。

删除[DAVE]: 2-氯-L-苯丙氨酸内标

删除[DAVE]: UPLC-Q-Orbitrap MS

### 2.4 超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱分析

UPLC-Q-Orbitrap 质谱分析是使用 UHPLC 系统（1290，安捷伦科技公司），UPLC HSS T3 色谱柱（2.1mm $\times$ 100mm，1.8  $\mu\text{m}$ ，Waters）与 Q Exactive Orbitrap（QE，Thermo Fisher Scientific，美国）耦合进行的。流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液为阳性，5mmol/L 醋酸铵水溶液为阴性，流动相 B 为乙腈。洗脱梯度设置如下：0 分钟，1%B；1 分钟，1%B；8 分钟，99%B；10 分钟，99%B；10.1 分钟，1%B；12 分钟，1%B。流速为 0.5mL/min。进样体积为 2  $\mu\text{L}$ 。QE 质谱仪因其能够在 LC/MS 实验期间基于信息依赖性 (IDA) 获取 MS/MS 谱图而被使用。在此模式下，采集软件 (Xcalibur 4.0.27, Thermo) 根据预先选定的标准，在采集和触发 MS/MS 光谱时，持续评估全扫描测量 MS 数据。ESI 源条件设置如下：鞘气流速为 45Arb，辅助气流速为 15Arb，毛细管温度 320°C，在 NCE 模型中全质量分辨率为 70000，MS/MS 分辨率为 17500，碰撞能量为 20/40/60eV，喷雾电压分别为 3.8kV（正）或-3.1kV（负）。

### 2.5 数据处理和差异代谢物分析

对于外源性成分，通过使用 QE 结合 Compound Discover2.0 和 Xcalibur 4.0.27 的数据分析，采用了化学代谢物检测和结构解析的通用策略。在全扫描模式下采集样品的 MS 数据，并通过动态排除设置执行数据相关的 MS<sup>n</sup> 扫描。比较处理样品和空白样品的总离子色谱图 (TIC)，筛选出可能的原型成分和代谢物，排除内源性成分。随后，将通过 LC-MS/MS 检测的消癍颗粒的化学特征与血清中的差异物质杂交，然后给药。对于内源性代谢物，仅选取两组之间在方差分析中

有显著变化（p 值<0.05 和 VIP（变量重要性指标）值≥1.0）的差异代谢物作为潜在的生物标志物，并进一步鉴定 KEGG 通路和分子机制。

2.6 KEGG 通路分析

KEGG 是主要的公共通路相关数据库，不仅包括基因，还包括代谢物。代谢物被映射到 KEGG 代谢途径以进行途径分析和富集分析。通路富集分析确定了与整个背景相比，差异代谢物中显著富集的代谢通路或信号转导通路。计算公式如下：

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

这里 N 是所有带有 KEGG 标注的代谢物的数量，n 是 N 中差异代谢物的数量，M 是所有带有特定途径标注的代谢物的数量，m 是 M 中差异代谢物的数量。计算出的 p 值经过 FDR 校正，以 P≤0.05 作为阈值。满足此条件的途径被定义为差异代谢物的显著富集途径。

2.7 细胞培养和药物干预

将来自江苏凯基生物技术股份有限公司（货号：KG063）的人乳腺癌细胞系 L02 维持在含有 10%FBS 和 1%青霉素和链霉素(Gibco Life Technologies,Lofer, Austria) 的 RPMI1640 培养基中，培养基放置于温度 37℃，含 5%CO<sub>2</sub>的加湿培养箱中。将消癍颗粒粉末溶解在蒸馏水中，并以指定的浓度和持续时间加入细胞培养系统中。

删除[DAVE]: 根  
删除[DAVE]: 科技  
删除[DAVE]:

2.8 蛋白质印迹法

为了确定蛋白质浓度，将细胞在含有蛋白酶抑制剂混合物（Roche Diagnostics, IN）的 RIPA 缓冲液（Sigma, St. Louis, MO）中裂解。用二辛可宁酸法（Thermo Fisher Scientific, 波恩, 德国）测定蛋白质浓度。对定量的蛋白质裂解物(30 μg)进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，并在 10%聚丙烯酰胺凝胶上溶解。然后将蛋白质转移到 PVDF 膜（GE Healthcare，

Freiburg, Germany) 上。膜用 CYP7A1 的一抗 (Bioss, 北京, 中国) 在 4℃ 下探测过夜。用 Tris 缓冲盐水和 0.05%~~吐温 20 (Tween-20)~~ 洗涤 3 次后, 将膜与二级抗兔 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 在室温下孵育 2 小时。使用 ECL Advance 试剂 (GE Healthcare) 对信号进行可视化, 并使用 Image J 软件进行量化。

删除[DAVE]: Tween-20

## 2.9 免疫荧光分析

为了检测 CYP7A1 的表达, 无论是否加入消癍颗粒, 将大鼠冰冻肝组织切片 8  $\mu\text{m}$ , 在固定前在长凳上干燥几分钟。将 4% 多聚甲醛施用于切片 15 分钟。在山羊血清封闭 60 分钟后, 将样品与一抗 CYP7A1 在 4℃ 下共孵育过夜, 然后在室温下用荧光偶联的二抗标记 1 小时。最后应用 4,6 二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 进行核染色, 并用 NIKON TS2R 荧光显微镜检测信号。



3 结果

3.1 UPLC-Q-Orbitrap MS 数据处理与分析

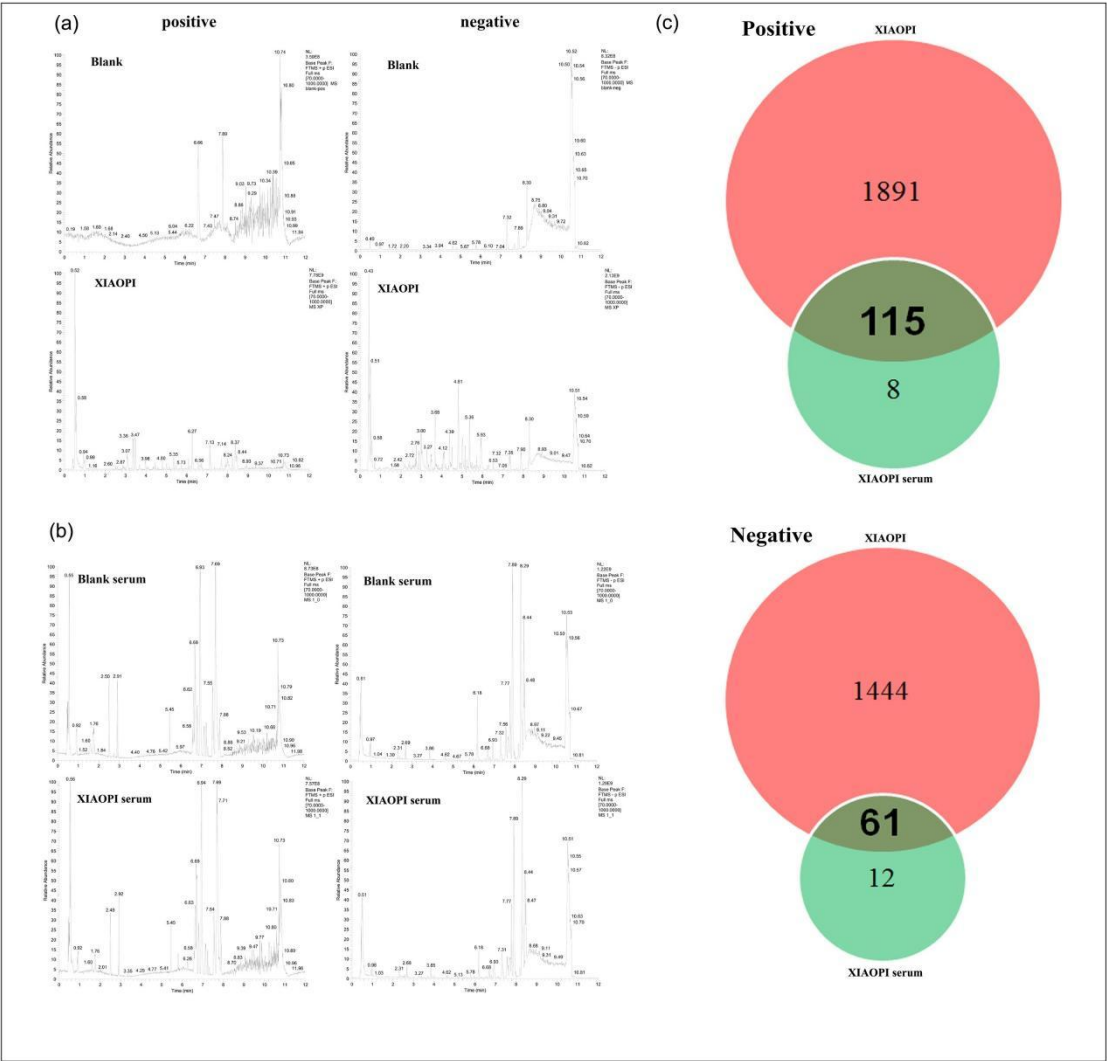


图 1

(a)消癖颗粒提取物的总离子色谱图；

(b)口服消癖颗粒治疗前后血清中检测成分的总离子色谱图（阳性或阴性模式）；

(c)消癖颗粒成分（红色）和消癖颗粒血清成分（绿色）分别在阳性或阴性模式下的维恩图结果。

消癖颗粒提取物的总色谱图见图 1a。通过 LC-MS/MS 检测，消癖颗粒处理前后血清的基峰色谱图见图 1b。使用 Proteo Wizard 将 MS 原始数据文件转换为 mzML 格式，并通过 R package XCMS（版本 3.2）进行处理，包括保留时间对齐、峰检测和峰匹配。OSI-SMMS（1.0 版，大连化学数据解决方案信息技术有限公司）使用内部 MS/MS 数据库用于进行峰注释。为了分析消癖颗粒的可吸收成分，首先选

择空白血清和消癥颗粒处理后的血清的差异化学特征，来筛选通过串联质谱法验证的物质。

Table 1  
The identification result of prototype components and metabolites in serum.

No	[M-H] <sup>-</sup> (mass error)	[M-H] <sup>+</sup> (mass error)	Formula	Identification	log2_FC(case_mean/control_mean)
M1		285.14762	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Rhein	4.82827872
M2		293.05345	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Hydroxyl tanshinone I	5.572263201
M3		273.11541	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Naringenin	5.291646504
M4		257.00828	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O	Dehydrogen-dehydrate-Tanshinone I	4.575512533
M5		287.05429	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	Kaempferol	4.200753425
M6		287.10933	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	Luteolin	5.748919584
M7		303.12185	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Quercetin	7.614412199
M8		337.13984	C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Dehydrat-Hydroxyl-Tanshinone I sulfate	8.315000037
M9		355.04644	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> S	Hydrotanshinone I sulfate	8.301346677
M10		317.13727	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Isorhamnetin	5.291646504
M11		335.12402	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Iso-preleoheterin	4.575512533
M12		335.16231	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	Preleoheterin	4.200753425
M13		345.08057	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Tanshinone I-CO + OH + sulfate	5.748919584
M14		345.15472	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Tanshinone I-CO + OH + sulfate	7.614412199
M15		325.14173	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Methyl-hydroxyl tanshinone II	6.338149111
M16		325.10583	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	Dehydro-dihydroxyl tanshinone II	5.779196062
M17		309.11110	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	dehydro tanshinone II	10.36244479
M18		311.18364	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Hydroxyl tanshinone II	7.409806663
M19		311.18209	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Tanshinone IIB	6.284168354
M20		275.12307	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	Hydrotanshinone I	5.074275721
M21		373.18252	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Dehydrotanshinone I sulfate	6.445915751
M22		297.14766	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	Cryptotanshinone	11.01319561
M23		313.14246	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Hydroxyl cryptotanshinone	6.77265388
M24		293.07993	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	Dehydrotanshinone II	7.43307762
M25		295.09523	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	Tanshinone II	5.17261644
M26		315.15815	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Dehydro hydroxylcryptotanshinone	5.951752407
M27		329.13731	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Dihydroxyl cryptotanshinone	6.181994143
M28		299.16326	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	Dihydro cryptotanshinone	6.340141756
M29		489.18951	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	Hydroxyl cryptotanshinone glucuronide	8.375378919
M30		385.07906	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Hydroxylcaritin	7.319636822
M31		339.08301	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Demethylcaritin	8.455807488
M32		337.13986	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Dehydro-demethylcaritin	8.301346677
M33		373.14818	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	Demethyl-dihydro-hydroxyl Curcumin	4.359582729
M34		341.13735	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	Bisdemethyl-dihydro Curcumin	5.892482015
M35		357.08021	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	Dihydro-demethyl Curcumin	5.476676765
M36		397.07284	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	Hydroxyl-methyl Curcumin	5.300454599
M37		283.13199	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	Zedoarolide B	4.621000105
M38		385.07906	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Hydroxylcaritin	7.319636822
M39	265.03478		C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O	Dihydrotanshinlactone	8.423007043
M40	277.95818		C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Dihydrotanshinone I	7.678339624
M41	335.08978		C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Dan-shexinkum d	11.82728115
M42	307.15448		C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Bisdemethoxycurcumin	6.169386099
M43	375.12869		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	Cryptotanshinone sulfate	6.554385884
M44	303.15962		C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Arachidonic acid	8.161827053
M45	287.12845		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Eriodictyol	6.107837433
M46	373.07671		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	Geniposidic acid	7.754617754
M47	313.03807		C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Protocatechuic aldehyde glucuronide	7.145916128
M48	313.99475		C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Protocatechuic aldehyde glucuronide	5.452500359
M49	232.97488		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	Protocatechuic acid sulfate	5.476732108
M50	277.95818		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S	Danshensu sulfate	5.615804827
M51	355.06635		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	3-(3,4-Dihydroxyphenyl) acrylic acid glucuronide	7.812973044
M52	467.06019		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> S	3,3'-Dimethyl rosmarinic acid-4'-O-sulfate	7.350153601
M53	551.17596		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	4'-Methyl lithospermic acid	7.906181202
M54	325.10746		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	Dihydroxyl tanshinone II	9.983432388
M55	329.05062		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Methyl 3,4-dihydroxyphenethyl glycoside	9.976572263
M56	329.13885		C19H20O5	Dihydroxyl cryptotanshinone II	7.783119282
M57	363.11210		C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	Harpagide	8.788678183
M58	345.11824		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Galiridoside	8.174395438
M59	351.13610		C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Dideglucose icariin	6.975579747
M60	491.1915		C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>	Massonianoside B	5.291646504
M61	275.0227		C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>12</sub>	Tanshinone I	4.767317829
M62	169.0141		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Gallic acid	5.372672335
M63	269.0455		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Emodin	4.436085167

表 1 血清中原型成分及代谢物鉴定结果

结果表明，通过比较空白组和消癥颗粒处理组，共过滤出 123 种正离子(POS)化学物质和 73 种负离子 (NEG) 化学物质。有趣的是，在消癥颗粒中发现了 115 种阳性化学物质和 61 种阴性化学物质（图 1c）。在这些发现的化学物质中，确



定了 38 种阳性和 25 种阴性（表 1），而剩下的化学物质被标记为未知。对于 MS 表征， $m/z$  249 和 193 处的诊断离子可用于快速提取和鉴定丹参酮 I 相关代谢物。同样， $m/z$  277 和 249 处的离子被鉴定为用于丹参酮 II 相关代谢物结构解析的诊断片段。例如，M22 在  $m/z$  297.1477 处显示出准分子离子  $[M-H]^+$ ，而  $MS^2$  产物离子在  $m/z$  277 和 249 处，这也比丹参酮 II 高 2Da（道尔顿）。因此，M22 被初步鉴定为隐丹参酮。

删除[DAVE]:

删除[DAVE]: Da

### 3.2 丹参酮相关代谢物的代谢途径分析

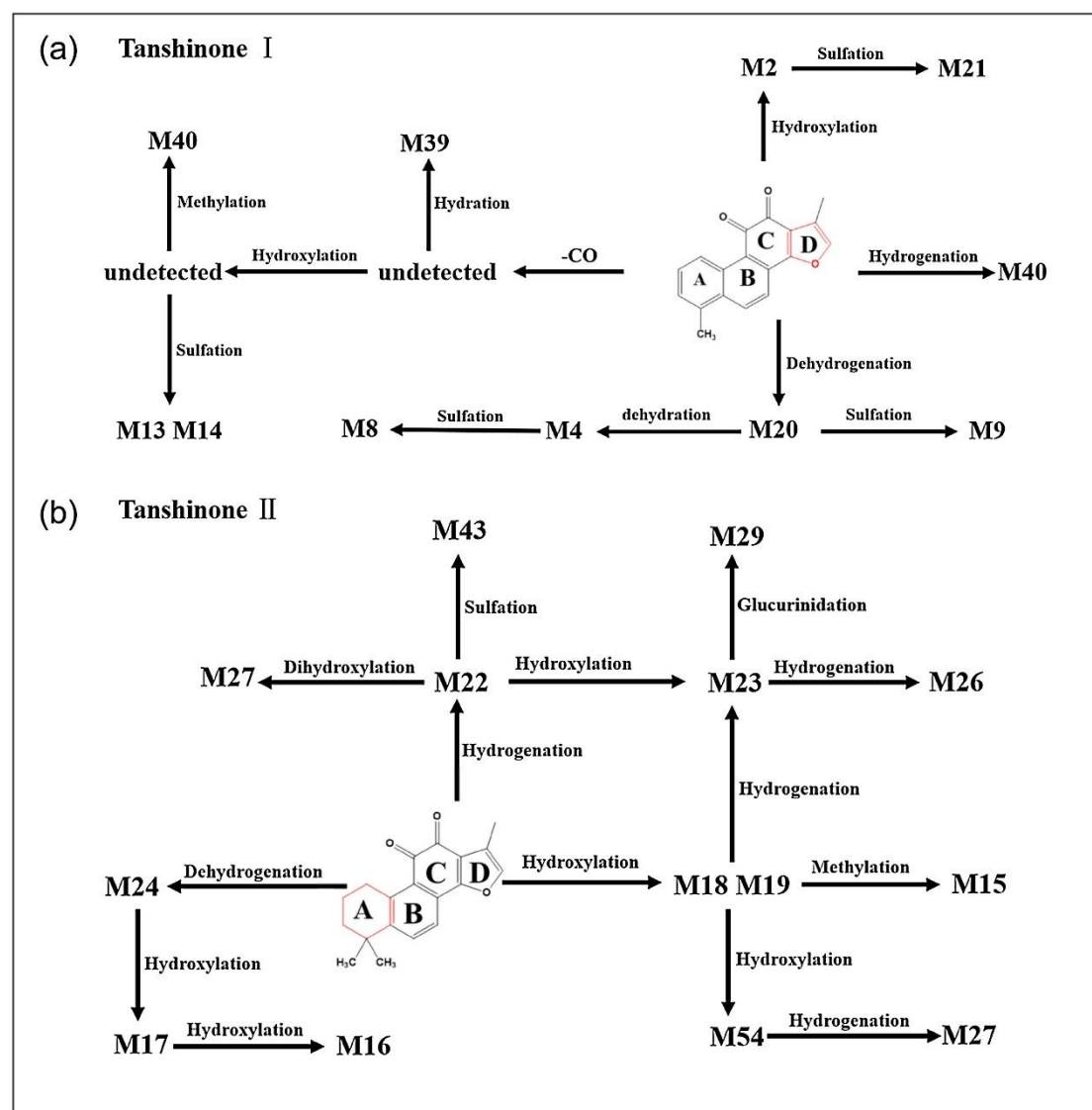


图 2

(a) 血清中丹参酮 I 的代谢途径; (b) 血清中丹参酮 II 的代谢途径。

在消癥颗粒处理血清中鉴定出的 63 种化合物中，丹参酮类化合物占 24 种，相对百分比为 38.09%（表 1），远高于其他物质的百分比。因此，丹参酮相关代谢物被认为是体内的主要代谢物，包括 10 种丹参酮 I 相关代谢物（M2、M4、M8、M9、M13、M14、M20–21、M39 和 M40）和 14 种丹参酮 II 相关代谢物（M15–19、M22–24、M26–29、M43 和 M54）。结果表明丹参酮 I 在血清中主要发生羟基化(M2)、脱水（M4）、硫酸化（M8–9、M13–14、M21）、水化（M39）、氢化（M40）和脱氢（M20），而在丹参酮 II 的代谢物中观察到羟基化（M16–19、M23、M54）、硫酸化（M43）、氢化（M22、M26–28）、脱氢（M24）、甲基化(M15)和葡萄糖醛酸化(M29)。同时，前 20 种增加物质的结果（表 2）揭示了 5 种丹参酮 II 相关代谢物和 4 种丹参酮 I 相关代谢物的参与。因此，推测的大鼠血清中丹参酮 I 和丹参酮 II 的代谢途径如图 2a 和图 2b 所示。通过分析丹参酮 I 和丹参酮 II 的代谢产物，发现丹参酮 I 的 D 环更不稳定，容易通过各种代谢酶的反应失去一分子 CO 和一分子 CH3，而丹参酮 II 则不是这样。由于不饱和 A 环，丹参酮 II 容易发生加氢反应，进而形成稳定的  $\pi - \pi$  共轭体系，生成其他代谢物。总的来说，研究结果表明丹参酮相关代谢途径可用于消癥颗粒的质量控制。

**Table 2**  
The Top 20 of identified components in serum.

Top	No	[M-H] <sup>-</sup> (mass error, ppm)	[M-H] <sup>+</sup> (mass error, ppm)	Formula	Identification	log2_FC(case_mean/control_mean)	KEGG
1	M41	335.08978		C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Dan-shexinkum d	11.82728115	Parent
2	M22		297.14766	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	Cryptotanshinone	11.01319561	Tanshinone II
3	M17		309.1111	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	dehydro tanshinone II	10.36244479	Tanshinone II
4	M54	325.10746		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	Dihydroxyl tanshinone II	9.983432388	Tanshinone II
5	M55	329.05062		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Methyl 3,4-dihydroxyphenethyl glycoside	9.976572263	Parent
6	M57	363.1121		C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	Harpagide	8.788678183	Parent
7	M31		339.08301	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Demethylicaritin	8.455807488	Icaritin
8	M39	265.03478		C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O	Dihydrotanshinlactone	8.423007043	Tanshinone I
9	M29		489.18951	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	Hydroxyl crytotanshinone glucuronide	8.375378919	Tanshinone II
10	M8		337.13984	C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	Dehydrat-Hydroxyl-Tanshinone I sulfate	8.315000037	Tanshinone I
11	M9		355.04644	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> S	Hydrotanshinone I sulfate	8.301346677	Tanshinone I
12	M32		337.13986	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Dehydro-demethylicaritin	8.301346677	Icaritin
13	M58	345.11824		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	Galiridoside	8.174395438	Parent
14	M44	303.15962		C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Arachidonic acid	8.161827053	Parent
15	M53	551.17596		C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	4'-Methyl lithospermic acid	7.906181202	Parent
16	M51	355.06635		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	3-(3,4-Dihydroxyphenyl) acrylic acid glucuronide	7.812973044	Other
17	M56	329.13885		C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Dihydroxyl crytotanshinone II	7.783119282	Tanshinone II
18	M46	373.07671		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	Geniposidic acid	7.754617754	Parent
19	M40	277.95818		C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Dihydrotanshinone I	7.678339624	Tanshinone I
20	M7		303.12185	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Quercetin	7.614412199	Parent

表 2 血清中已鉴定成分的 Top 20

3. 3. 通过代谢组学分析对差异代谢物进行 KEGG 分析

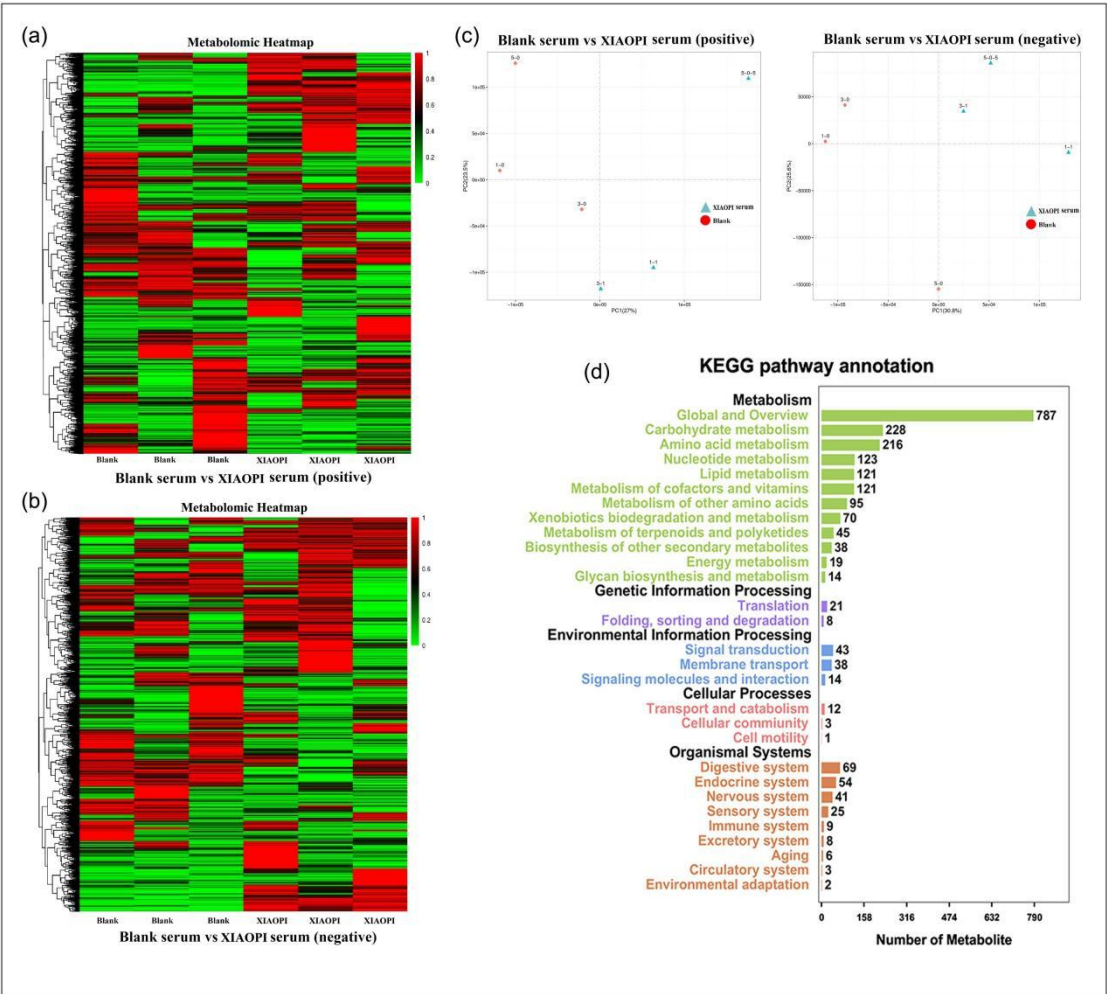


图 3

- (a) 口服消癍颗粒后血清中所有成分的热图（阳性模式）；
- (b) 口服消癍颗粒后血清中所有成分的热图（阴性模式）；
- (c) 消癍颗粒治疗前后大鼠血清中所有成分的 PCA 分析；
- (d) 前 20 个干扰了所有成分的 KEGG 通路。

为了找到具有显著变化的内源性代谢物，我们将变化阈值设置为 $[1\log_2FC]>1$ 。根据预测中的变量重要性指标 (VIP) 分数对最能区分两组的代谢物进行排序。POS 和 NEG 中所有不同内源性代谢物的热图统计数据分别显示在图 3a 和图 3b 中。主成分分析 (PCA) 进一步显示，空白组和消癍颗粒组的图谱是独立聚类的，表明消癍颗粒给药后大鼠血清中的成分发生显著变化（图 3c）。KEGG 通路注释分析表明，所有内源性代谢物对氨基酸代谢(216)、碳水化合物代谢(228)和核苷酸代谢(123)都有很大影响（图 3d）。

筛选结果显示，POS 中共有 1142 种代谢物上调，775 种化学物质下调，而 NEG 中 911 种代谢物增加，442 种化学物质下调（图 4a）。差异物质统计数据如图 4b 所示。KEGG 分析表明，受干扰的通路包括 112 个信号通路，前 20 个通路见表 3 和图 4c。主要的途径包括胆汁分泌（P=0.001534）、萜类骨干生物合成（P=0.010400）、初级胆汁酸生物合成（P=0.025424）和甲状腺激素信号传导（P=0.028516）（图 4d）。

**Table 3**  
The top 20 pathways changed by differential metabolites following XIAOPI treatment.

Pathway	Candidate metabolites with pathway annotation (186)	All metabolites with pathway annotation (1099)	P value	Qvalue	Pathway ID
1 Bile secretion	13(6.99%)	33 (3%)	0.001534	0.171802	ko04976
2 Terpenoid backbone biosynthesis	7 (3.76%)	16 (1.46%)	0.010400	0.582381	ko00900
3 Primary bile acid biosynthesis	5 (2.69%)	11 (1%)	0.025424	0.798441	ko00120
4 Thyroid hormone signaling pathway	2 (1.08%)	2 (0.18%)	0.028516	0.798441	ko04919
5 Porphyrin and chlorophyll metabolism	5 (2.69%)	14 (1.27%)	0.071625	0.974447	ko00860
6 Vascular smooth muscle contraction	2 (1.08%)	3 (0.27%)	0.075981	0.974447	ko04270
7 Gap junction	2 (1.08%)	3 (0.27%)	0.075981	0.974447	ko04540
8 Long-term depression	2 (1.08%)	3 (0.27%)	0.075981	0.974447	ko04730
9 Retrograde endocannabinoid signaling	5 (2.69%)	16 (1.46%)	0.117755	0.974447	ko04723
10 Biosynthesis of antibiotics	50 (26.88%)	260 (23.66%)	0.149221	0.974447	ko01130
11 PPAR signaling pathway	1 (0.54%)	1 (0.09%)	0.169245	0.974447	ko03320
12 Phototransduction - fly	1 (0.54%)	1 (0.09%)	0.169245	0.974447	ko04745
13 Insulin signaling pathway	1 (0.54%)	1 (0.09%)	0.169245	0.974447	ko04910
14 GnRH signaling pathway	1 (0.54%)	1 (0.09%)	0.169245	0.974447	ko04912
15 Carbohydrate digestion and absorption	1 (0.54%)	1 (0.09%)	0.169245	0.974447	ko04973
16 Metabolic pathways	99 (53.23%)	547 (49.77%)	0.170302	0.974447	ko01100
17 Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	3 (1.61%)	9 (0.82%)	0.183638	0.974447	ko00563
18 Regulation of autophagy	3 (1.61%)	9 (0.82%)	0.183638	0.974447	ko04140
19 Starch and sucrose metabolism	3 (1.61%)	10 (0.91%)	0.231385	0.974447	ko00500
20 Platelet activation	2 (1.08%)	6 (0.55%)	0.269280	0.974447	ko04611

表 3 消癖颗粒处理后差异代谢物改变的前 20 条通路。

1 胆汁分泌；2 萜类骨架生物合成；3 初级胆汁酸生物合成；4 甲状腺激素信号通路；5 卟啉和叶绿素代谢；6 血管平滑肌收缩；7 间隙连接；8 长期抑制；9 逆行内源性大麻素信号；10 抗生素的生物合成；11 PPAR 信号通路；12 光转导；13 胰岛素信号通路；14 GnRH 信号通路；15 碳水化合物消化和吸收；16 代谢通路；17 糖基磷脂酰肌醇（GPI）-锚生物合成；18 自噬调节；19 淀粉和蔗糖代谢；20 血小板活化；

删除[DAVE]:

删除[DAVE]:

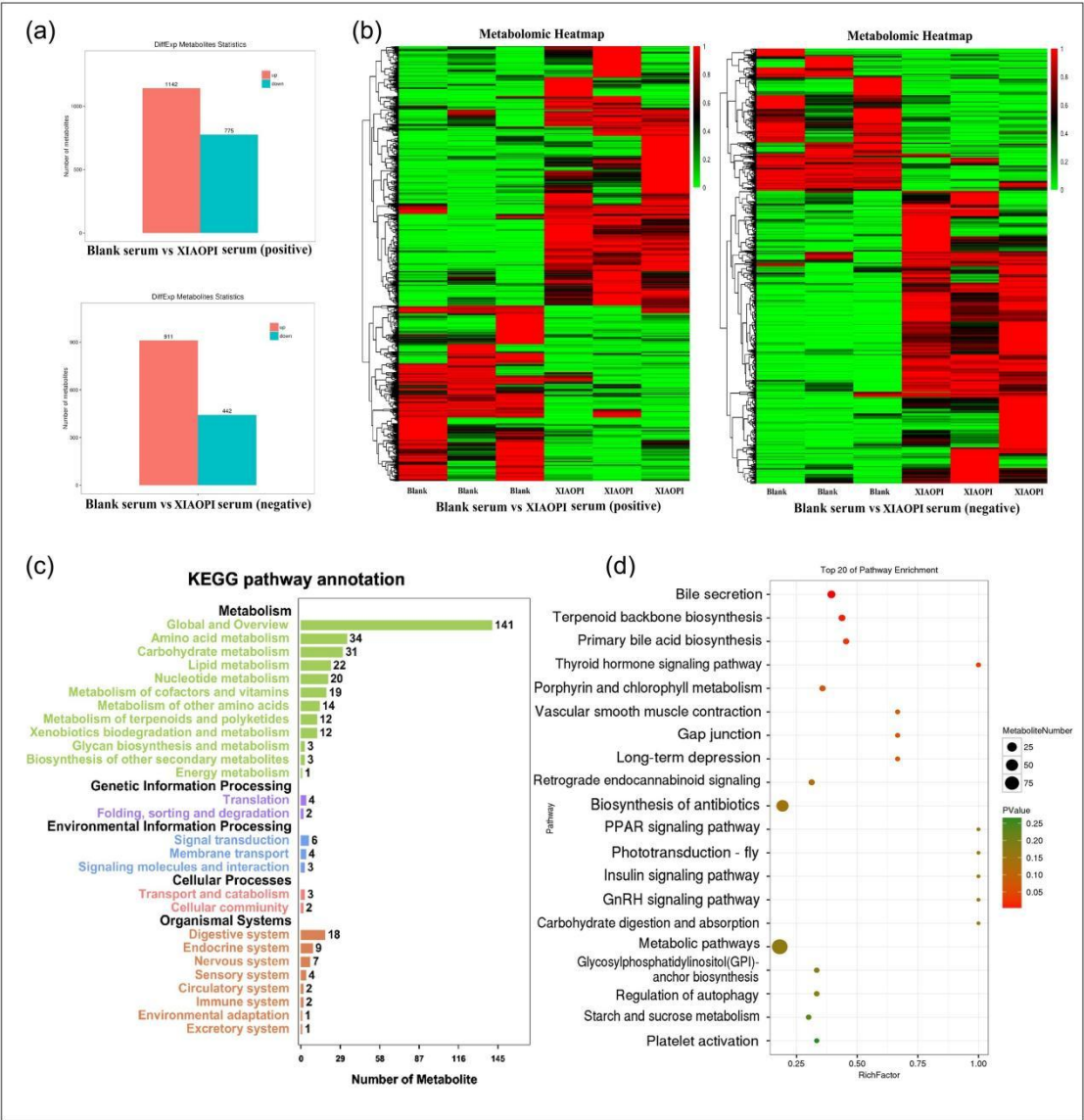


图 4

(a) 正负模式下所有不同内源代谢物的柱状统计数据；

(b) 正负模式下所有不同内源性代谢物的热图；

(c) 所有不同内源性代谢物的前 20 个干扰 KEGG 途径；

(d) 所有不同内源性代谢物的 KEGG 通路富集分析。



3. 4. 消癥颗粒对胆汁酸代谢途径的影响

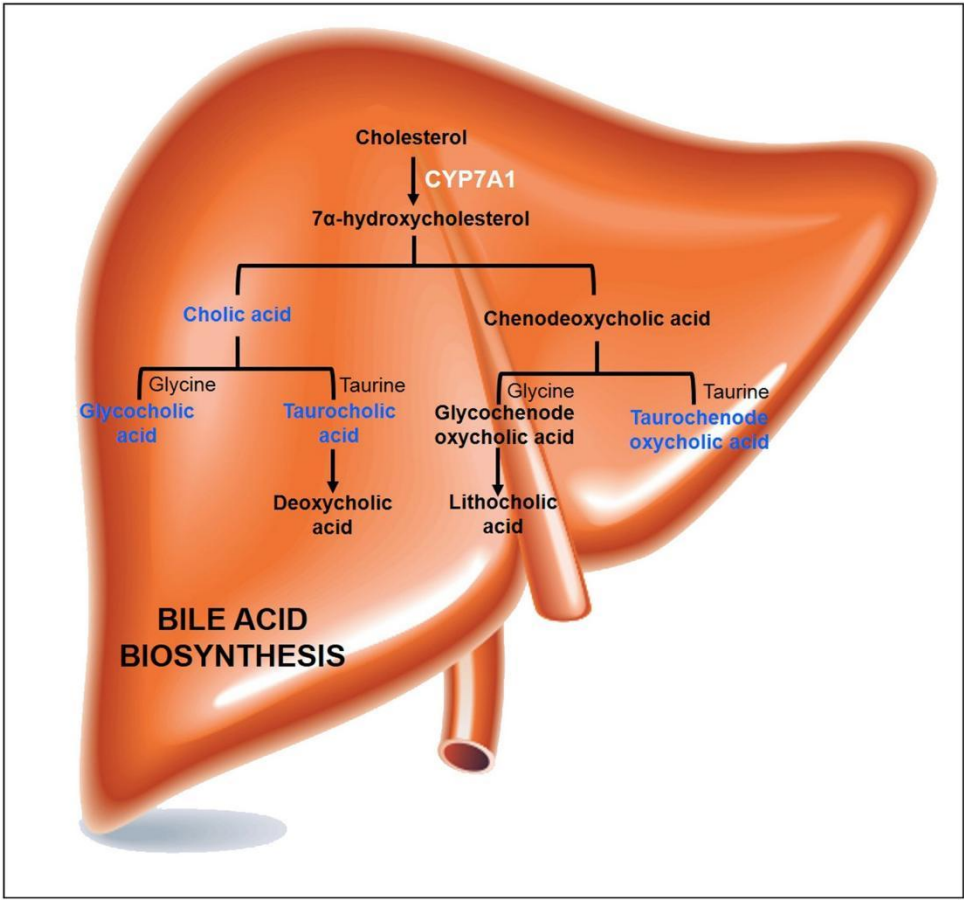


图 5. 消癥颗粒对初级胆汁酸生物合成的可能机制。

说明消癥颗粒对胆汁酸生物合成的调控作用可能与关键酶 CYP7A1 有关。

根据代谢研究结果，胆汁酸代谢途径被认为是消癥颗粒干预的主要信号通路。关于参考途径，表明胆酸、甘氨胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺胆酸的合成是该途径的关键点（蓝色突出显示，图 5）。定量分析还显示，消癥颗粒处理后血清中所有四种物质的含量水平均显著提高（图 6a）。由于胆固醇 7 α -羟化酶（CYP7A1）是胆汁酸合成的关键酶（白色突出显示，图 5），我们随后在消癥颗粒给药后检测了其在大鼠肝组织中的表达。结果表明，消癥颗粒在免疫印迹和免疫组织化学分析中均显著增强了 CYP7A1 的表达（图 6b-c）。体外实验还表明，消癥颗粒能以时间和剂量依赖性方式显著增加人正常肝细胞 L02 细胞系中 CYP7A1 的表达（图 6d），提示 CYP7A1 可能是调节消癥颗粒药物生物活性的关键酶之一。

删除[DAVE]: 增加

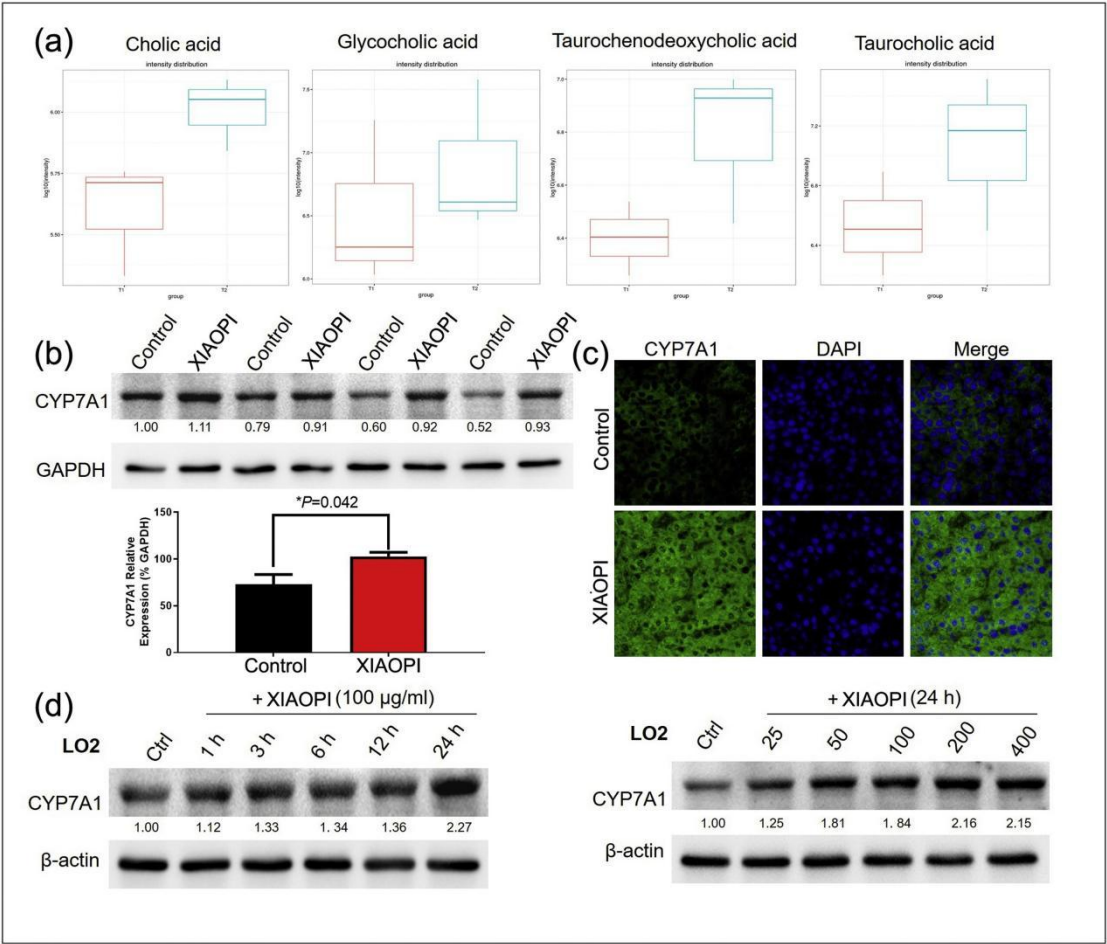


图 6 消癥颗粒对胆汁酸代谢途径的影响。

- (a) 消癥颗粒治疗后血清中胆酸、甘氨胆酸、牛磺鹅去氧胆酸和牛磺胆酸水平显著升高；
- (b) - (c) 大鼠模型在消癥颗粒治疗前后 CYP7A1 表达的免疫印迹和免疫荧光分析；
- (d) 在指定浓度和持续时间下，用蛋白质印迹分析经消癥颗粒处理的人正常肝细胞 LO2 细胞系中 CYP7A1 的表达。

4. 讨论

在过去的十年中，包括基因组学、转录组学和蛋白质组学在内的多组学技术，已被开发用于高通量筛选和鉴定中药配方中涉及的靶点<sup>[14]</sup>。尽管在解释中药的分子机制方面取得了很大进展，但阐明可吸收物质并建立化合物-靶点相关性仍然是一个巨大的挑战。代谢组学作为组学家族的一员，可以为生物体中发生的事情提供新的见解。目前，在代谢组学研究中识别和量化小分子的常规分析方法，要么基于核磁共振波谱，要么基于质谱。质谱技术与液相色谱相结合，为后续的通

路分析和目标识别提供了大量的化学信息。特别是，超高液相色谱-质谱系统联用已被视为表征复杂生物样品中全局代谢特征的主要工具之一，并广泛应用于中药研究<sup>[15, 16]</sup>。例如，据报道，Zhu 等人，通过使用超高液相色谱-质谱分析，黄连解毒汤通过协调代谢应激、谷氨酸代谢和乙酰胆碱水平的网络达到治疗作用<sup>[17]</sup>。同样，张等人，通过使用液质联用技术，共鉴定出 PHY906 配方中的 57 种化合物和 27 种代谢物。然而，液相-质谱分析中吸收物质的鉴定却很少受到重视<sup>[18]</sup>。

通过将消癥颗粒的质谱与大鼠血清中发现的化学物质进行交叉，共检测到 196 种化合物，并作为相关成分进行过滤。在这些化学物质中，已知 38 种为阳性和 25 种为阴性，包括 40 种代谢物和 23 种原始化合物。在充分理解裂解规律和母体化合物特征产物的基础上，对不同代谢途径形成的代谢物类型进行了表征。通常，体内代谢包含例如氧化、还原、水解和结合反应等 I 相和 II 相转化。在本研究中观察到羟基化(16Da)、甲基化(14Da)、氢化(2Da)、葡萄糖醛酸化(176Da)和硫酸化(80Da)。代谢物的鉴定是通过比较代谢物的分子( $\Delta M$ )和 MS<sup>2</sup> 光谱模式与母体化合物的变化来进行的<sup>[19, 20]</sup>。在我们的研究中，结果表明丹参酮 II 和丹参酮 I 的途径是主要的代谢途径。一些证据表明，丹参酮 II 减弱了乳腺癌干细胞的活性<sup>[21-27]</sup>。同时，丹参酮 I 也是被证明可以诱导乳腺癌的抗增殖活性和细胞周期停滞<sup>[28, 29]</sup>。由于丹参是消癥颗粒中的主要草药，丹参酮可以被认为是配方质量控制的主要化学标准。

对于内源性代谢物分析，通路富集分析最终显示胆汁酸分泌信号受到最显著的影响。在上调的物质中，胆酸、甘氨胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸和牛磺胆酸的含量水平均被上调。同时 CYP7A1 酶的表达也显著增加，说明消癥颗粒可加速胆汁酸代谢。据报道，胆汁酸水平的增加有利于乳腺癌的治疗。卢等人，发现石胆酸通过显著减少细胞内的脂滴和 ER  $\alpha$  的表达，对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞具有抗增殖和促凋亡作用<sup>[30]</sup>。

另一项研究报告称，胆汁酸为他莫昔芬的负载提供了新的支架，与母体药物他莫昔芬相比，胆酸-他莫昔芬缀合物被认为是最有效的抗癌组合物<sup>[31]</sup>。同时，许多胆汁酸衍生物也通过 p53 非依赖性途径在人乳腺癌细胞中表现出诱导凋亡作用<sup>[32]</sup>。所有这些发现都表明胆汁酸的合成可能是影响消癥颗粒抗癌活性的一个重要因素。

## 5. 结论

综上所述，我们的结果清晰地展示了消癥颗粒在体内的代谢途径，不仅提供了吸收的成分，还突出了胆汁酸合成途径在介导消癥颗粒药理活性中的潜在关键作用。更重要的是，液质联用-网络药理学的应用将为未来揭示中药的潜在靶点和生物加工机制提供更可靠、更令人信服的方法。

## 利益冲突

作者声明他们没有利益冲突。

## 补充材料

与本文相关的补充材料可在在线版本 doi 中找到：  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109569>。

## 基金

这项工作得到了国家自然科学基金（81573651、81873306、81973526、81703764 和 81703749），广东省科技厅（2016A030306025），广东省特殊支持计划高层次人才（A1-3002-16-111-003），广东省教育厅（2018KZDXM022 和 A1-2606-19-111-009），广东省中医药局（20181132 和 20182044），广东省自然科学基金博士启动基金（2017A030310213 和 2018A030310506），广东省科技计划项目（2017B030314166），广州市科技项目（201904010407），广东省中医院中医药科技专项研究基金（YN207QN2018MJ07 和 YN2018QJ08）的支持。

## 参考文献

- 【1】H.-L. Situ, Q.-j. Chen, The clinical research of "Xiaopi" oral liquids in reversing precancerosis of breast and affecting the secretion of E2 and P in Luteal Phase, *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment* 9 (2) (2002) 176–178.
- 【2】X. Meng, D. Shou, L. Chen, The effects of Xiaopi Granules on the mastoplasia model of rats, *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica* 21 (1) (2005) 34–35.
- 【3】J. Chen, B.-w. LI, X.-b. MENG, D.-w. SHOU, The effects of Xiaopi Granules on of the rabbit mastoplasia model, *Qilu Pharmaceutical Affairs* 26 (7) (2007) 427–428.
- 【4】Q.-j. Chen, B. Xu, H.-l. Situ, Y. Dai, R.-d. Guan, Y. Lin, The effect of "xiaopi granule" on the SD rate pre-cancerosis models and on the pathway of EGFR-STAT3, *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine* 14 (8) (2012) 19–21.
- 【5】N. Wang, Y. Zheng, J. Gu, Y. Cai, S. Wang, F. Zhang, J. Chen, H. Situ, Y. Lin, Z. Wang, Network-pharmacology-based validation of TAMS/CXCL-1 as key mediator of XIAOPI formula preventing breast cancer development and metastasis, *Sci.Rep.* 7 (1) (2017) 14513.
- 【6】H. Liu, Study on determination of Xiaopi Granules by HPLC, *China Medical herald* 7(27) (2010) 47–50.
- 【7】D. Wang, N. Huang, Determination of tanshinone in Xiaopi Granules by TLC, *Guangzhou Medical Journal* 41 (5) (2010) 59–60.
- 【8】T.T. Luo, Y. Lu, S.K. Yan, X. Xiao, X.L. Rong, J. Guo, Network pharmacology in research of chinese medicine formula: methodology, application and prospective, *Chinese journal of integrative medicine* undefined (2019) undefined.
- 【9】S. Li, B. Zhang, Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application, *Chin. J. Nat. Med.* 11 (2) (2013) 110–120.
- 【10】H. Liu, J. Wang, W. Zhou, Y. Wang, L. Yang, Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: an example using licorice, *J. Ethnopharmacol.* 146 (3) (2013) 773–793.
- 【11】G.B. Zhang, Q.Y. Li, Q.L. Chen, S.B. Su, Network pharmacology: a new approach for chinese herbal medicine research, *Evid. Complement. Alternat. Med.* 2013 (2013) 621423.
- 【12】M. Xu, Z. Xu, Q. Xu, H. Zhang, M. Liu, F. Geng, N. Zhang, UPLC-MS/MS method for the determination of 14 compounds in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study of orally administered xiaoyao powder, *Molecules* 23 (10) (2018) undefined..
- 【13】Q. Zhai, J. Pang, G. Li, C. Li, X. Yang, L. Yu, Y. Wang, J. Li, X. You, Validated LC-MS/MS method for determination of YH-8, a novel PKnB inhibitor, in rat plasma and its application to pharmacokinetic study, *Acta Pharm. Sin. B* 5 (5) (2015) 467–472.
- 【14】T. Xu, Z. Pi, S. Liu, F. Song, Z. Liu, Chemical profiling combined with "Omics" technologies (CP-Omics): a strategy to understand the compatibility mechanisms and simplify herb formulas in traditional chinese medicines, *Phytochem. Anal.* 28(5) (2017) 381–391.
- 【15】Y.Y. Zhao, R.C. Lin, UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: the discoveries in



proteomics to metabolomics, *Chem. Biol. Interact.* 215 (undefined)(2014) 7–16.

【16】 I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, E.M. Lenz, HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 817 (1) (2005) 67–76.

【17】 B. Zhu, H. Cao, L. Sun, B. Li, L. Guo, J. Duan, H. Zhu, Q. Zhang, Metabolomics-based mechanisms exploration of Huang-Lian Jie-Du decoction on cerebral ischemia via UPLC-Q-TOF/MS analysis on rat serum, *J. Ethnopharmacol.* 216 (2018) 147–156.

【18】 W. Zhang, M.W. Saif, G.E. Dutschman, X. Li, W. Lam, S. Bussom, Z. Jiang, M. Ye, E. Chu, Y.C. Cheng, Identification of chemicals and their metabolites from PHY906, a Chinese medicine formulation, in the plasma of a patient treated with irinotecan and PHY906 using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), *J. Chromatogr. A* 1217 (37) (2010) 5785–5793.

【19】 H. Ma, Y. Liu, X. Mai, Y. Liao, K. Zhang, B. Liu, X. Xie, Q. Du, Identification of the constituents and metabolites in rat plasma after oral administration of HuanglianShangqing pills by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 125 (2016)194–204.

【20】 Z.F. Qin, Y. Dai, Z.H. Yao, L.L. He, Q.Y. Wang, J.L. Geng, H.F. Chen, X.S. Yao, Study on chemical profiles and metabolites of *Allii Macrostemonis Bulbus* as well as its representative steroidal saponins in rats by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 192 (2016) 499–515.

【21】 S. Gao, Z. Liu, H. Li, P.J. Little, P. Liu, S. Xu, Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone IIA, *Atherosclerosis* 220 (1) (2012) 3–10.

【22】 K. Li, W. Liu, Q. Zhao, C. Wu, C. Fan, H. Lai, S. Li, Combination of tanshinone IIA and doxorubicin possesses synergism and attenuation effects on doxorubicin in the treatment of breast cancer, *Phytother. Res.* 33 (6) (2019) 1658–1669.

【23】 H. Lin, L. Zheng, S. Li, B. Xie, B. Cui, A. Xia, Z. Lin, P. Zhou, Cytotoxicity of Tanshinone IIA combined with Taxol on drug-resist breast cancer cells MCF-7 through inhibition of Tau, *Phytother. Res.* 32 (4) (2018) 667–671.

【24】 S. He, M. Wang, Y. Zhang, J. Luo, Monitoring the early response of fulvestrant plus tanshinone IIA combination therapy to estrogen receptor-positive breast Cancer by longitudinal (18)F-FES PET/CT, *Contrast Media Mol. Imaging* (2019)2374565.

【25】 C. Lin, L. Wang, H. Wang, L. Yang, H. Guo, X. Wang, Tanshinone IIA inhibits breast cancer stem cells growth in vitro and in vivo through attenuation of IL-6/STAT3/NF-kB signaling pathways, *J. Cell. Biochem.* 114 (9) (2013) 2061–2070.

【26】 P. Fu, F. Du, W. Chen, M. Yao, K. Lv, Y. Liu, Tanshinone IIA blocks epithelialmesenchymal transition through HIF-1alpha downregulation, reversing hypoxia-induced chemotherapy resistance in breast cancer cell lines, *Oncol. Rep.* 31 (6)(2014) 2561–2568.

【27】 G. Li, C. Shan, L. Liu, T. Zhou, J. Zhou, X. Hu, Y. Chen, H. Cui, N. Gao, Tanshinone IIA inhibits HIF-1alpha and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway, *PLoS One* 10 (2) (2015) e0117440.

【28】 L. Wang, J. Wu, J. Lu, R. Ma, D. Sun, J. Tang, Regulation of the cell cycle and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by tanshinone I in human breast cancer cell lines, *Mol. Med. Rep.* 11 (2) (2015) 931–939.

【29】 M. Lu, C. Wang, J. Wang, Tanshinone I induces human colorectal cancer cell apoptosis: the potential roles of Aurora A-p53 and survivin-mediated signaling pathways, *Int. J. Oncol.* 49 (2) (2016) 603–610.

【30】 T.H. Luu, J.M. Bard, D. Carbonnelle, C. Chaillou, J.M. Huvelin, C. Bobin-Dubigeon, H. Nazih, Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells, *Cell. Oncol. Dordr. (Dordr)* 41 (1) (2018) 13–24.

【31】 V. Sreekanth, S. Bansal, R.K. Motiani, S. Kundu, S.K. Muppu, T.D. Majumdar, K. Panjamurthy, S. Sengupta, A. Bajaj, Design, synthesis, and mechanistic investigations of bile acid-tamoxifen conjugates for breast cancer therapy, *Bioconjug. Chem.* 24 (9) (2013) 1468–1484.

【32】 E.O. Im, Y.H. Choi, K.J. Paik, H. Suh, Y. Jin, K.W. Kim, Y.H. Yoo, N.D. Kim, Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells, *Cancer Lett.* 163 (1) (2001) 83–93.