

基于功能代谢组学筛选并验证毛兰素体内的活性代谢物

辛绍晨[#] 吴艳彬[#] 康诗瑶 李慧敏 黄平媛 高欣 盛苗苗^{*}
(昆明理工大学医学院, 衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650500)

摘要 该研究旨在系统筛选毛兰素体内的活性代谢产物, 并验证其抗乳腺癌活性, 为理解毛兰素的体内药效物质基础提供依据。通过小鼠尾静脉注射毛兰素(4 mg/kg), 小鼠给药后1 h采集血清, 血清采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)进行非靶向代谢组学分析。通过主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)筛选差异代谢物, 结合KEGG通路富集分析明确代谢扰动的生物学过程。将差异代谢物导入TCMSP、ChEMBL和STITCH数据库预测靶点, 与GeneCards、OMIM和TTD数据库获取的乳腺癌疾病靶点进行交集分析, 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络并筛选核心靶点。基于“代谢物-靶点-通路”网络筛选候选代谢物, 采用CCK-8法、Transwell实验、划痕实验及Western blot验证其对三阴性乳腺癌MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞的增殖、迁移及上皮-间质转化的影响。代谢组学共鉴定出226个差异代谢物, KEGG富集分析显示其显著富集于氨基酸代谢、ABC转运蛋白及蛋白质消化吸收等通路。网络药理学分析获得209个代谢物-疾病共同靶点, 核心靶点包括p53、EGFR、STAT3等。通过“代谢物-靶点-通路”网络筛选出7种候选代谢物, 体外功能验证表明lusianthrindin对两种乳腺癌细胞具有剂量依赖性增殖抑制作用; 同时可显著抑制细胞迁移, 并下调Fibronectin和Snail表达、上调E-cadherin水平。其余6种候选代谢物未见明显活性或有效浓度过高。总之, 该研究采用功能代谢组学策略, 从毛兰素体内给药的血清中成功筛选到毛兰素体内代谢物lusianthrindin, 经验证lusianthrindin可发挥抗乳腺癌作用。尽管lusianthrindin的体外活性强度低于母药毛兰素, 但其保留了与母药一致的抗肿瘤功能谱, 提示毛兰素的核心药效团在代谢过程中得以保留。该研究为毛兰素的构效关系研究提供了线索, 表明了功能代谢组学策略在天然产物活性代谢物发现中的可行性。

关键词 毛兰素; 功能代谢组学; 候选活性代谢物; 功能验证; 乳腺癌

Screening and Validation of *In Vivo* Active Metabolites of Erianin Based on Functional Metabolomics

XIN Shaochen[#], WU Yanbin[#], KANG Shiyao, LI Huimin, HUANG Pingyuan, GAO Xin, SHENG Miaomiao^{*}
(Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract This study aims to systematically screen the *in vivo*-formed bioactive metabolites of erianin and validate their anti-breast-carcinoma activities, so as to furnish experimental evidence for elucidating the material

收稿日期: 2026-05-11

接受日期: 2026-08-22

国家自然科学基金(批准号: 82360796)和云南省高层次人才支持计划(批准号: YNWR-QNBJ-2020-243)资助的课题

*通信作者。Tel: 0871-65920753, E-mail: shengmm@kust.edu.cn

Received: May 11, 2026

Accepted: August 22, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82360796), and the Yunnan High-Level Personnel Training Support Program (Grant No.YNWR-QNBJ-2020-243)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65920753, E-mail: shengmm@kust.edu.cn

basis responsible for the *in vivo* pharmacological efficacy of erianin. Mice were intravenously injected with erianin (4 mg/kg), and serum samples were collected 1 h post-administration. Non-targeted metabolomics analysis was performed using UPLC-Q-TOF-MS (ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry). PCA (principal component analysis) and OPLS-DA (orthogonal partial least squares discriminant analysis) were employed to screen differential metabolites, and KEGG pathway enrichment analysis was conducted to identify perturbed biological processes. Targets of differential metabolites were predicted using TC-MSP, ChEMBL and STITCH databases, and breast cancer-related targets were retrieved from GeneCards, OMIM and TTD databases. Intersection analysis was performed to obtain common targets, followed by PPI (protein-protein interaction) network construction and core target identification. Candidate metabolites were selected based on “metabolite-target-pathway” network analysis, and their effects on proliferation, migration and EMT (epithelial-mesenchymal transition) of triple-negative breast cancer MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were validated using CCK-8 assay, Transwell assay, wound healing assay and Western blot. Metabolomics analysis identified 226 differential metabolites, which were significantly enriched in amino acid metabolism, ABC transporters and protein digestion and absorption pathways. Network pharmacology analysis yielded 209 common targets of metabolites and breast cancer, with core targets including p53, EGFR and STAT3, et al. Seven candidate metabolites were selected through “metabolite-target-pathway” network analysis. *In vitro* functional validation demonstrated that lusianthrindin exerted dose-dependent inhibitory effects on proliferation of both breast cancer cell lines, significantly suppressed cell migration, down-regulated Fibronectin and Snail expression, and up-regulated E-cadherin levels. The remaining six candidate metabolites showed no significant activity or required excessively high effective concentrations. This study successfully employed a functional metabolomics strategy, identified lusianthrindin as an *in vivo* metabolite of erianin from serum samples after *in vivo* administration, and further validated that lusianthrindin exerts potent anti-breast cancer effects. Although the *in vitro* activity of lusianthrindin was lower than that of the parent compound erianin, it retained a consistent anti-tumor functional profile, suggesting that the core pharmacophore of erianin is preserved during metabolism. This study provides clues for structure-activity relationship research of erianin and suggests the feasibility of functional metabolomics in discovering bioactive metabolites of natural products.

Keywords erianin; functional metabolomics; candidate bioactive metabolites; functional validation; breast cancer

乳腺癌作为全球女性发病率最高的恶性肿瘤, 严重威胁女性健康。尽管化疗、靶向治疗等手段不断进步, 但药物耐受性、剂量限制性毒性以及肿瘤转移复发等问题仍是临床治疗面临的主要挑战^[1-2]。在此背景下, 从天然产物中寻找高效低毒的抗肿瘤先导化合物, 一直是新药研发的重要方向^[3-4]。

毛兰素(erianin)是从兰科植物鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.)中分离得到的联苄类化合物, 近年来因其具有显著的抗肿瘤活性而备受关注^[5]。研究表明, 毛兰素对肺癌、肝癌、胃癌、结肠癌及宫颈癌等多种肿瘤细胞均表现出强烈的增殖抑制作用^[6-8]。在作用机制方面, 毛兰素可通过调控多条信号通路, 包括PI3K/AKT、MAPK/ERK、ROS/JNK等通路发挥抗肿瘤效应, 最终诱导肿瘤细胞凋亡、细胞周期

阻滞、焦亡, 并抑制细胞迁移、细胞侵袭和血管生成^[9-11]。在雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌细胞T47D中, 毛兰素能有效抑制细胞增殖并诱导凋亡^[12]; 同时, 它对正常乳腺上皮细胞系MCF-10A的增殖无明显影响, 提示其具有良好的选择性^[12]。此外, 本课题组前期研究也证实, 毛兰素在体内外水平上均具有良好的抗三阴性乳腺癌的活性^[13-14]。这些发现提示毛兰素是一个极具开发潜力的抗肿瘤先导化合物。

然而, 毛兰素的临床应用面临两大瓶颈: 其一, 是其水溶性差导致生物利用度低, 其二, 是其体内代谢迅速、半衰期短^[5]。Yi等^[15]建立LC-MS/MS方法研究毛兰素在大鼠体内的药代动力学特征, 发现其经静脉注射后半衰期约为1.5 h, 口服生物利用度

仅8.7%。随后, Liu等^[16]进一步采用液质联用技术系统鉴定了毛兰素在大鼠和人体内的代谢产物, 共检测到24种代谢物, 其中I相代谢包括羟基化、去甲基化和脱氢反应, II相代谢主要为葡萄糖醛酸结合、谷胱甘肽结合及N-乙酰半胱氨酸结合等。这些研究为理解毛兰素在体内的代谢过程奠定了重要基础。Ma等^[17]在其综述中系统总结了毛兰素的抗肿瘤机制、药代动力学特征及结构修饰研究进展, 指出了毛兰素在体内经历快速代谢转化, 但其代谢产物是否具有生物活性、是否有助于母药的抗肿瘤效应, 目前尚缺乏系统研究。

上述研究虽然明确了毛兰素的药代动力学行为和代谢产物谱, 但仍有一个关键的科学问题悬而未决: 在毛兰素产生的众多代谢物中, 哪些真正具有生物活性, 并可能贡献于其整体药效? 传统代谢物研究主要聚焦于药物的体内命运, 回答“是什么”和“有多少”的问题, 而缺乏从功能角度对代谢物进行系统筛选和评估。事实上, 许多天然产物本身就是“前药”, 需要在体内经代谢转化后产生活性更强的代谢物, 或通过多组分协同发挥作用。因此, 系统鉴定毛兰素的活性代谢物, 对于全面理解其抗肿瘤机制、优化临床用药策略具有重要意义。

为此, 本研究采用一种整合非靶向代谢组学与网络药理学功能筛选策略, 旨在从毛兰素体内给药的血清中快速锁定其潜在的活性代谢物。具体而言, 我们先对毛兰素给药后小鼠的血清进行代谢组学分析, 筛选差异表达的外源性代谢物; 再结合网络药理学预测其潜在靶点与通路; 最后通过体外细胞实验对候选代谢物进行抗乳腺癌活性验证。本研究首次将毛兰素的代谢研究从“代谢物鉴定”层面推进至“功能筛选与验证”层面, 为揭示其药效物质基础提供了新视角, 也为天然产物活性代谢物的发现策略提供了方法学参考。

1 材料与方法

1.1 小鼠实验及血清收集

实验选用雌性Balb/c小鼠, 6~8周龄, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证编号: SCXK(京)2019-0010。所有小鼠在温度为(23±3)℃、相对湿度为55%±15%的可调节屏障系统中饲养, 驯化后将其随机分为空白组(3只)和毛兰素组(3只)。毛兰素(高效液相色谱法检测纯度≥98%)(货

号: B20844)购自上海源叶生物科技有限公司。毛兰素以DMSO溶解后用玉米油稀释, 空白组给予等体积DMSO+玉米油溶剂。采用三次给药法, 每次4 mg/kg, 第一次和第二次间隔20 h, 第二次和第三次间隔4 h, 1 h后经眼球取血。血液收集在离心管中并于37℃(或室温)静置1 h进行凝固分层。然后3 000 r/min室温离心10 min, 取上清并将其转至干净的离心管中。12 000 r/min、4℃离心10 min, 取上清分装到1.5 mL离心管中, 每管0.2 mL, -80℃冻存。参照上海百趣生物科技有限公司中药入血代谢组学样本收集方法操作实施。足量干冰寄送上海百趣生物科技有限公司开展非靶标代谢组学检测分析。所有实验方案均经昆明理工大学动物伦理委员会批准(批准号: PZWH(滇)K2024-0001)。

1.2 血清代谢组学检测

1.2.1 血清代谢物提取标准品溶液制备 样本解冻后, 涡旋30 s; 将样本稀释1 000倍, 上机检测样品准备: 将样本置于干净的碎冰上; 移液枪准确吸取150 μL样本于2 mL EP管中, 加入15 μL盐酸溶液(2 mol/L), 涡旋30 s, 冰水浴超声5 min; 加入585 μL乙腈, 涡旋30 s, 冰水浴超声5 min; 放入-40℃冰箱中静置30 min; 于4℃、12 000 r/min(离心机的离心力为13 800 ×g, 离心机转子半径为8.6 cm)离心15 min; 吸取600 μL上清液于2 mL EP管中, 氮气吹干; 加入60 μL提取液(甲醇:乙腈:水的体积比为2:2:1)复溶, 提取液含同位素标记内标, 涡旋30 s, 冰水浴超声1 min; 于4℃、12 000 r/min(离心机的离心力为13 800 ×g, 离心机转子半径为8.6 cm)离心15 min; 取上层清液至进样小瓶中, 上机检测。

1.2.2 LC-MS/MS上机检测分析 使用Vanquish超高效液相色谱仪(ThermoFisher Scientific公司), 通过Phenomenex Kinetex C18(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱A相为水相, 含0.01%乙酸, B相为体积比为1:1的异丙醇和乙腈。样品盘温度为4℃, 进样体积为2 μL。Orbitrap Exploris 120质谱仪能够在控制软件(Xcalibur, 版本: 4.4, ThermoFisher Scientific公司)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下, Sheath gas flow rate: 50 Arb; Aux gas flow rate: 15 Arb; Capillary temperature: 320℃; Full ms resolution: 60 000; MS/MS resolution: 15 000; Collision energy: SNCE 20/30/40; Spray Voltage: 3.8 kV(positive)或-3.4

kV(negative)。

1.2.3 数据预处理 将原始数据通过ProteoWizard软件转换为mzXML格式, 并使用基于R语言开发、以XCMS为核心的自建程序进行处理, 实现峰检测、提取、对齐及积分功能。代谢物鉴定环节采用了R程序包与BiotreeDB(V3.0)数据库。

1.3 数据分析并筛选差异代谢物

在本研究中, 为了降低检测系统误差对结果的影响, 使结果更好地凸显生物学意义, 我们对原始数据进行一系列的准备和整理。首先偏离值过滤, 对单个Feature进行过滤以去除噪音, 基于四分位距对偏离值进行过滤。其次缺失值过滤, 对单个Feature进行过滤, 只保留单组空值不多于50%或所有组中空值不多于50%的峰面积数据。随后, 采用最小值的一半对缺失值进行填补, 并在数据分析中应用了内标归一化方法。最终包含峰编号、样本名称及归一化峰面积信息的数据集被导入SIMCA 18.0.1软件包(Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden)进行多元统计分析。对所有样品进行聚类热图分析, 并绘制聚类热图。

为降低噪声及变量高方差的影响, 对数据进行了缩放和对数转换。经上述预处理后, 首先进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 一种降低数据维度的无监督分析方法, 以可视化样本的分布及聚类情况。在PCA得分图中, 以95%置信区间作为阈值, 用于识别数据集中的潜在离群值。

为进一步可视化组间分离并筛选显著差异代谢物, 采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal projections to latent structures discriminant analysis, OPLS-DA)。随后进行7折交叉验证, 以计算 R^2 和 Q^2 值, 其中, R^2 表示模型对变量变异的解释能力, Q^2 则反映变量的预测能力。为评估OPLS-DA模型的稳健性与预测能力, 进一步进行了200次置换检验, 并获得了 R^2 和 Q^2 的截距值。其中, Q^2 的截距值可反映模型的稳健性、过拟合风险及可靠性, 该值越小表明模型越可靠。

此外, 获取了OPLS-DA分析第一主成分中各变量的投影重要性(variable importance in the projection, VIP)值, 用于综合评估各变量对模型的贡献度。筛选VIP>1, 入血血清比空白血清的FC $\geq$ 1.2且 $P<0.05$ (Student's t 检验)的代谢物作为显著差异代谢物, 并将筛选差异代谢物的结果以火山图(volcano

plot)的形式进行可视化。

1.4 差异代谢物通路富集分析

京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG, <http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)通路数据库以基因和基因组的功能信息为基础, 以代谢反应为线索, 串联可能的代谢途径及对应的调控蛋白, 以图解的方式展示细胞生理生化过程。我们整理出对应物种 *Mus musculus*(house mouse)差异代谢物映射的所有通路。将差异代谢物在KEGG通路图上进行标记。根据差异代谢物在KEGG代谢通路中的富集结果, 计算rich factor(某一通路中注释到的差异代谢物数量与该通路中所有代谢物数量的比值), 该值越大表示富集程度越大。 P 值通过Fisher's test获得。

KEGG注释分析仅是将差异代谢物所参与的通路注释出来, 但若想进一步分析实验条件导致物质的变化与其所在的通路影响, 则需要分析差异代谢物对其所在通路的影响进行深入分析。通过对差异代谢物所在通路的综合分析(包括富集分析和拓扑分析), 我们可以对通路进行进一步的筛选, 找到与差异代谢物相关性最高的关键通路。我们通过差异代谢物对KEGG、PubChem等权威代谢物数据库进行映射, 在取得差异代谢物的匹配信息后, 我们对对应物种 *Mus musculus*(house mouse)的通路数据库进行搜索和代谢通路分析。代谢通路分析的结果以气泡图(bubble plot)展示。气泡图中每一个气泡代表一个代谢通路, 气泡所在横坐标和气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小, 大小越大影响因子越大; 气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 P 值[取负自然对数, 即 $-\ln(P\text{-value})$], 颜色越深 P 值越小, 富集程度越显著。

1.5 网络药理学分析

1.5.1 差异代谢物和乳腺癌共同作用靶点筛选 首先, 将筛选得到的代谢物成分在TCMSP、ChEMBL和STITCH数据库中预测对应靶点。其中ChEMBL筛选80%置信度“active”和“both”中threshold>6的靶点, STITCH筛选score>300的靶点。然后, 在GeneCards、OMIM和TTD数据库中分别查找乳腺癌对应的靶点。随后利用Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)工具对两者进行交集分析, 筛选得到209个共同靶基因。

1.5.2 靶蛋白的PPI网络构建分析 靶点蛋白质—

靶点蛋白质相互作用网络分析 (protein-protein interaction network analysis, PPI network analysis), 是蛋白质组学的重要研究内容之一。我们采用 STRING 数据库 (v11, string-db.org) 构建上述共同作用靶点的 PPI 网络图。在 PPI 网络中, degree 值是一个关键的拓扑参数, 代表了一个节点 (即蛋白质) 在网络中连接的其他节点 (蛋白质) 的数量。degree 值高的节点通常被认为是网络中的“枢纽”或“中心”节点, 在生物学过程中可能扮演更关键的角色。接下来, 利用 network python 库计算网络互作图中各节点的 degree 值, 将其从大到小进行排列, 绘制核心靶点网络互作图。

1.5.3 GO功能和KEGG通路富集分析 GO (Gene Ontology) 数据库 (geneontology.org) 包含了基因参与的生物过程 (biological process, BP)、所处的细胞位置、发挥的分子功能 (molecular function, MF) 三方面信息, 比较全面地概括了基因的功能信息, 纠正了传统功能分类体系中常见的维度混淆问题。我们将基因向 GO 数据库的各节点映射, 并利用 GO 进行功能富集性分析。靶点蛋白按照 BP、细胞组分 (cellular component, CC)、MF 三种独立的方式进行分类展示, 并进一步在 KEGG 网站选择 *Homo sapiens* (human) 数据库, 利用其提供的绘图模块进行 KEGG 通路分析。

1.5.4 “药物-代谢物-靶点-通路-疾病”的网络构建分析 利用 Cytoscape 3.7.1 软件 (<https://cytoscape.org/>) 构建了“药物-代谢物-靶点-通路-疾病”网络, 得到了毛兰素代谢物中调控乳腺癌进展的活性成分, 并通过网络图说明了毛兰素与活性成分、乳腺癌与靶基因之间的相互作用。

1.6 实验验证

1.6.1 细胞及试剂 人类三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 购买于国家生物医学实验细胞资源库。培养条件: 细胞在添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中培养, 培养温度为 37 °C, 培养条件为 5% CO₂。DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。

lusiathridin (7-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5-diol, 货号: HY-121418)、五味子醇乙 (schisandrol B, 货号: HY-N0692)、秦皮素 (fraxetin, 货号: HY-N0580)、二氢辣椒素 (dihydrocapsaicin, 货号: HY-N0361)、环巴胺 (cyclopamine, 货号: HY-

17024)、6-姜酚 ([6]-gingerol, 货号: HY-14615) 及阿魏酸 (ferulic acid, 货号: HY-N0060) 购自 MCE 公司; CCK-8 试剂盒 (货号: 40203ES76) 购自上海翊圣生物科技有限公司; Transwell 小室 (货号: 3422) 购自美国 Corning 公司; FN (fibronectin) 抗体 (1:5 000, 货号: 15613-1-AP) 购自 Proteintech 公司; E-cadherin 抗体 (1:1 000, 货号: 610182) 购自 BD 公司; Snail 抗体 (1:1 000, 货号: 3879S) 购自 CST 公司; β -tubulin (1:1 000, 货号: GB15140-100) 购自 Servicebio 公司。细胞实验中 lusiathridin 的溶剂为 DMSO, 对照组给予等体积 DMSO。

1.6.2 CCK-8检测实验 将 2×10^4 个细胞植入 48 孔板中, 37 °C 培养; 次日, 取出 48 孔板, 吸走旧培养基, 用 $1 \times$ PBS 清洗干净细胞, 按浓度加入药物, 37 °C 培养 24 h; 取出 48 孔板, 吸走旧培养基, 用 $1 \times$ PBS 清洗干净细胞, 加入配制好的 CCK-8 工作液, 37 °C 孵育 2 h。使用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (D_{450}) 值, 同时设置空白对照孔用于校准基线值。

1.6.3 Transwell实验 在 24 孔板中加入 600 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 将各组细胞消化制备成细胞悬液, 取 2×10^4 个细胞, 用 200 μ L 无血清培养基进行重悬稀释, 将稀释好的悬液加入小室的上室, 将小室置于 24 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h; 在室温条件下, 取出小室, 用 $1 \times$ PBS 清洗干净, 加入 500 μ L 预冷甲醇, 固定 30 min; 吸走甲醇, 用 $1 \times$ PBS 清洗小室, 加入 500 μ L 0.3% 结晶紫染液室温染色 30 min; 吸走结晶紫染色液, 用棉棒擦干净上室细胞, 用 $1 \times$ PBS 清洗小室后拍照记录。

1.6.4 划痕实验 将各组细胞消化成细胞悬液, 将 5×10^5 个细胞加入 6 孔板中, 37 °C 培养 24 h; 取出 6 孔板, 用 10 μ L 吸头在孔中央划一条直线, 吸走培养基, 用 $1 \times$ PBS 清洗细胞, 加入 3 mL 含 1% FBS 的 DMEM 培养基, 拍照记录为 0 h, 37 °C 培养 24 h; 取出 6 孔板, 用 $1 \times$ PBS 清洗细胞, 拍照记录为 24 h。

1.6.5 Western blot实验 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液, 4 °C 裂解 30 min, 提取总蛋白, 用 BCA 法检测蛋白浓度。每孔上样 10 μ g 蛋白, 体积 20 μ L。经 SDS-PAGE 电泳转膜后, 将 PVDF 膜用 5% 牛奶封闭液室温封闭 2 h, 分别用 FN、E-cadherin、Snail 及 β -tubulin 一抗 4 °C 过夜孵育; 取出 PVDF 膜, 用 $1 \times$ TBST 清洗, 然后室温敷育二抗 (1:5 000) 2 h, 用 $1 \times$ TBST 清洗后用 ECL 发光试剂进行显影。

1.7 统计学分析

所有实验均独立重复至少3次, 每次设3个技术复孔。Western blot条带使用ImageJ软件进行灰度扫描, 以 β -tubulin为内参计算相对表达量, 并以对照组标准化。所有统计数据均使用GraphPad Prism 8.0软件进行分析。数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。* $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义, *** $P<0.001$ 代表差异具有高度统计学意义, **** $P<0.0001$ 代表差异具有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 毛兰素给药后血清代谢轮廓的全局分析

为系统探究毛兰素给药后对小鼠血清代谢谱的影响, 我们对给药组与对照组血清样本进行了基于LC-MS/MS的非靶向代谢组学分析(图1A)。经数据预处理后, 共获得65 085个代谢物特征峰, 其中873个代谢物获得二级质谱鉴定信息(附图1A)。为消除系统误差并保证数据的可比性, 我们对原始数据进行归一化处理, 并采用层次聚类分析对全体样本进行聚类热图展示, 结果显示给药组与对照组样本呈现明显的聚类趋势(附图1B)。

首先采用PCA进行无监督降维与模式识别。结果显示, 所有样本均处于95%置信区间(Hotelling's T^2 椭圆)内, 无异常样本检出, 且给药组与对照组在PC1轴上呈现明显的分离趋势(图1B, 附图1C), 提示毛兰素给药引起了显著的代谢表型改变。为最大化组间差异并筛选差异代谢标志物, 我们进一步采用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。OPLS-DA得分图显示, 给药组与对照组样本沿预测主成分($t[1]$ 轴)显著分离, 且所有样本均处于95%置信区间内, 表明两组血清代谢谱存在系统性差异(图1C)。为确保模型的稳健性并排除过拟合风险, 我们采用200次置换检验进行模型验证。结果显示, 随机排列后的 Q^2 值均显著低于原始模型的 Q^2 值, 且回归线与纵轴截距为负值(附图1D), 证实所建立的OPLS-DA模型具有良好的稳健性和统计学显著性, 未发生过拟合。

上述结果表明, 非靶向代谢组学分析结合多元统计模型证实, 毛兰素给药后显著改变了小鼠血清代谢谱。

2.2 差异代谢物筛选及信号通路富集分析

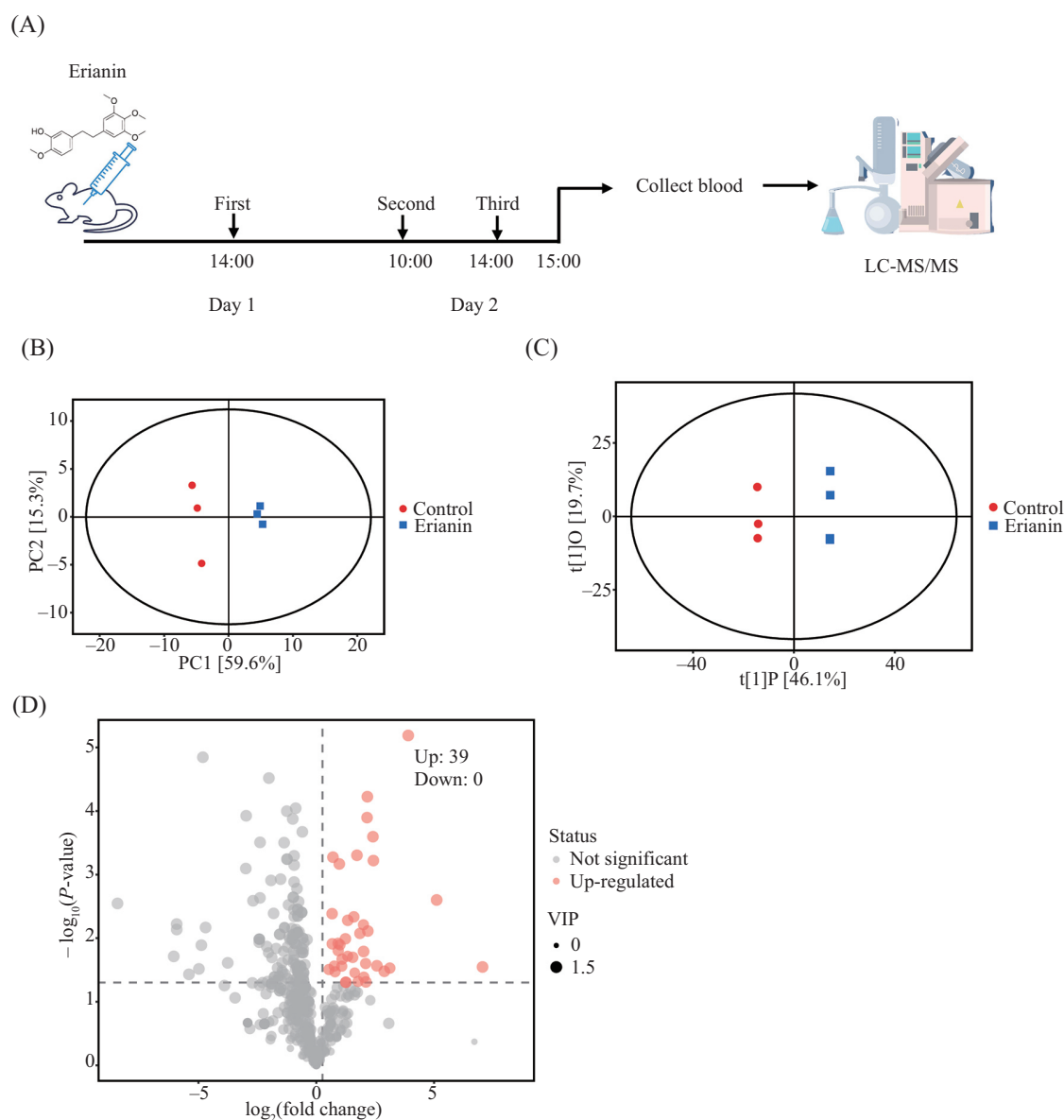
为筛选毛兰素给药后血清中的差异代谢物, 我们以VIP>1.0、 $P<0.05$ 及FC ≥ 1.2 为阈值, 筛选上调差异代谢物, 共鉴定出39种差异代谢物(图1D)。由于本研究旨在发现毛兰素体内来源的代谢物, 而非评估宿主代谢的整体扰动, 因此未纳入下调代谢物。此外, 考虑到部分代谢物仅在给药组血清中出现, 我们将这些“毛兰素组独有”的187个代谢物也纳入后续分析, 共计获得226个候选差异代谢物。

为揭示这些差异代谢物涉及的生物学过程, 我们首先对其进行KEGG通路富集分析。结果显示, 差异代谢物显著富集于“代谢通路”(metabolic pathways)、“ABC转运蛋白”(ABC transporters)及“蛋白质消化吸收”(protein digestion and absorption)等通路(图2A)。进一步采用拓扑分析评估差异代谢物对通路的影响程度, 发现“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成”(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)、“乙醛酸和二羧酸代谢”(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)等通路发生显著变化(图2B)。上述通路与氨基酸代谢、能量代谢及外源性物质的跨膜转运密切相关, 提示毛兰素体内给药后可能通过调节多条代谢通路发挥生物学效应。

2.3 基于网络药理学的活性代谢物-靶点-通路关联分析

为从226个候选代谢物中系统筛选具有抗乳腺癌肿瘤活性的功能分子, 我们进一步引入网络药理学分析。将筛选得到的差异代谢物分别导入TCMSP、ChEMBL和STITCH数据库进行靶点预测。韦恩图分析显示, 3个数据库预测结果交集共获得839个代谢物相关靶基因(图3A)。同时, 利用GeneCards、OMIM和TTD数据库检索乳腺癌相关靶点, 合并去重后获得1 928个疾病靶基因(图3B)。将代谢物相关靶点与乳腺癌疾病靶点进行交集分析, 最终得到209个共同靶基因(图3C), 提示毛兰素可能通过调控这些靶点发挥抗肿瘤效应。

为阐明上述共同靶点之间的相互作用关系, 我们基于STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 并采用Cytoscape 3.7.1软件进行可视化分析(图3D)。利用Degree、Betweenness Centrality和Closeness Centrality三项拓扑参数综合评估节点重要性, 筛选出前10位核心基因: TP53、EGFR、TNF、IL6、ESR1、HIF1A、STAT3、CASP3、PTEN、



A: 实验流程示意图; B: 主成分分析(PCA)模型得分散点图; C: 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型得分散点图; D: Control与Erianin组差异代谢物火山图。PCA: 主成分分析; OPLS-DA: 正交偏最小二乘法-判别分析。

A: schematic of the experimental workflow; B: score scatter plot of PCA mode; C: score scatter plot of OPLS-DA model; D: volcano plot for group Control vs Erianin. PCA: principal component analysis; OPLS-DA: orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis.

图1 毛兰素诱导的小鼠血清代谢组学变化

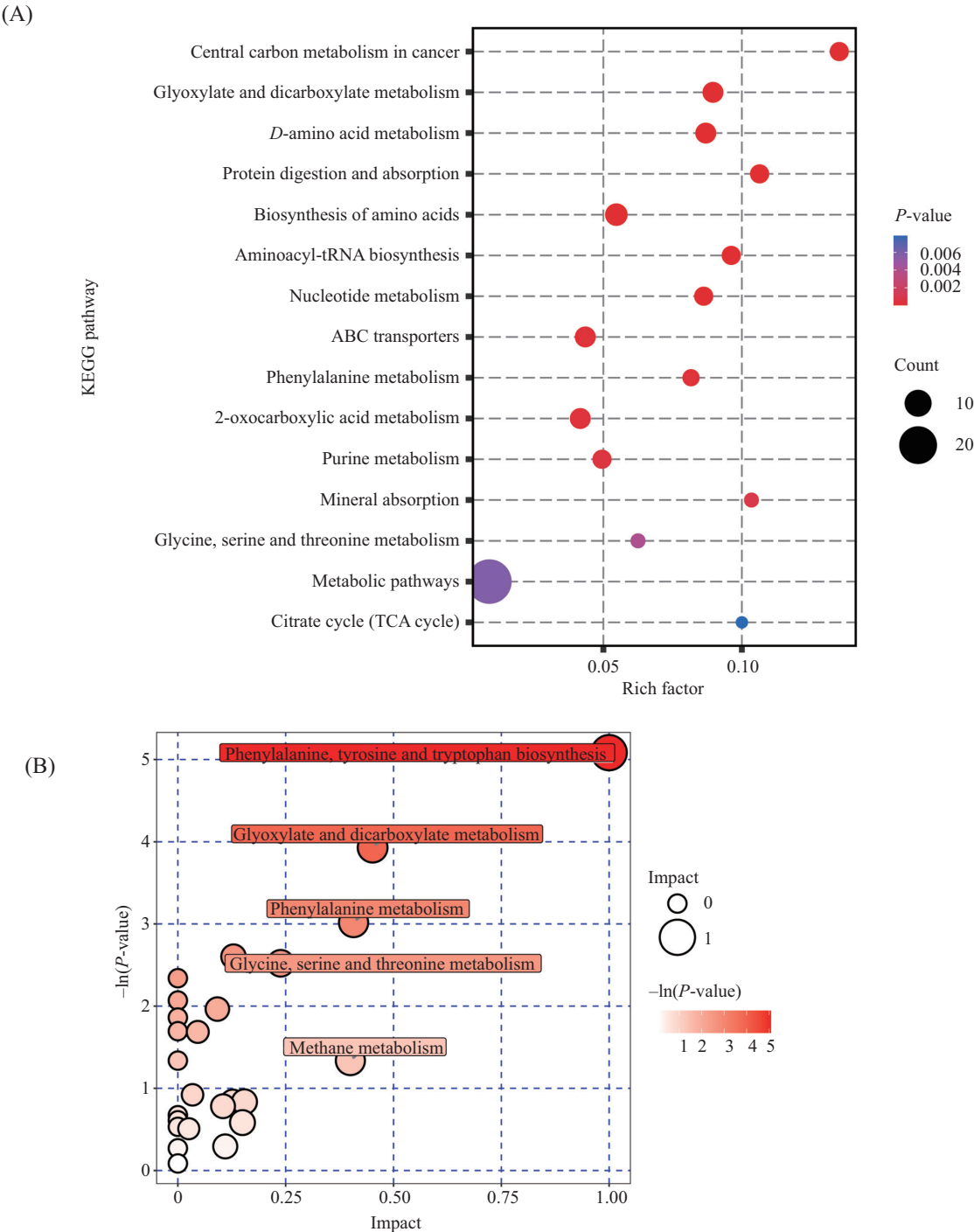
Fig.1 Erianin-induced metabolic changes in mouse serum

ERBB2。这些枢纽基因主要富集于细胞增殖凋亡调控、血管生成及耐药相关通路,与乳腺癌发生发展机制高度吻合。

为进一步揭示这些核心靶点的生物学功能,我们进行了GO功能富集分析(图4A)。结果表明,生物过程(BP)主要涉及基因表达调控、细胞增殖与凋亡、蛋白质磷酸化修饰及细胞内信号转导;细胞组分(CC)集中于膜结合细胞器、质膜区室及蛋白质复合物;分子功能(MF)以激酶结合、转录因子结合

及类固醇羟化酶活性为主。KEGG通路富集分析揭示,关键通路包括癌症相关通路、脂质代谢及PI3K-AKT信号通路(图4B),这些通路与乳腺癌的发生发展密切相关。

基于上述分析,我们进一步整合差异代谢物、核心靶点及关键通路,构建了“药物-代谢物-靶点-通路-疾病”多维网络图。该网络包含233个节点,涉及20个差异代谢物、30个靶基因及10条信号通路(图4C)。提示毛兰素通过多组分-多靶点-多通路协同



A: Control与Erianin组的KEGG通路富集分析比较; B: Control与Erianin组的代谢通路分析比较。

A: KEGG enrichment for group Control vs Erianin; B: pathway analysis for group Control vs Erianin.

图2 差异代谢物的通路富集分析

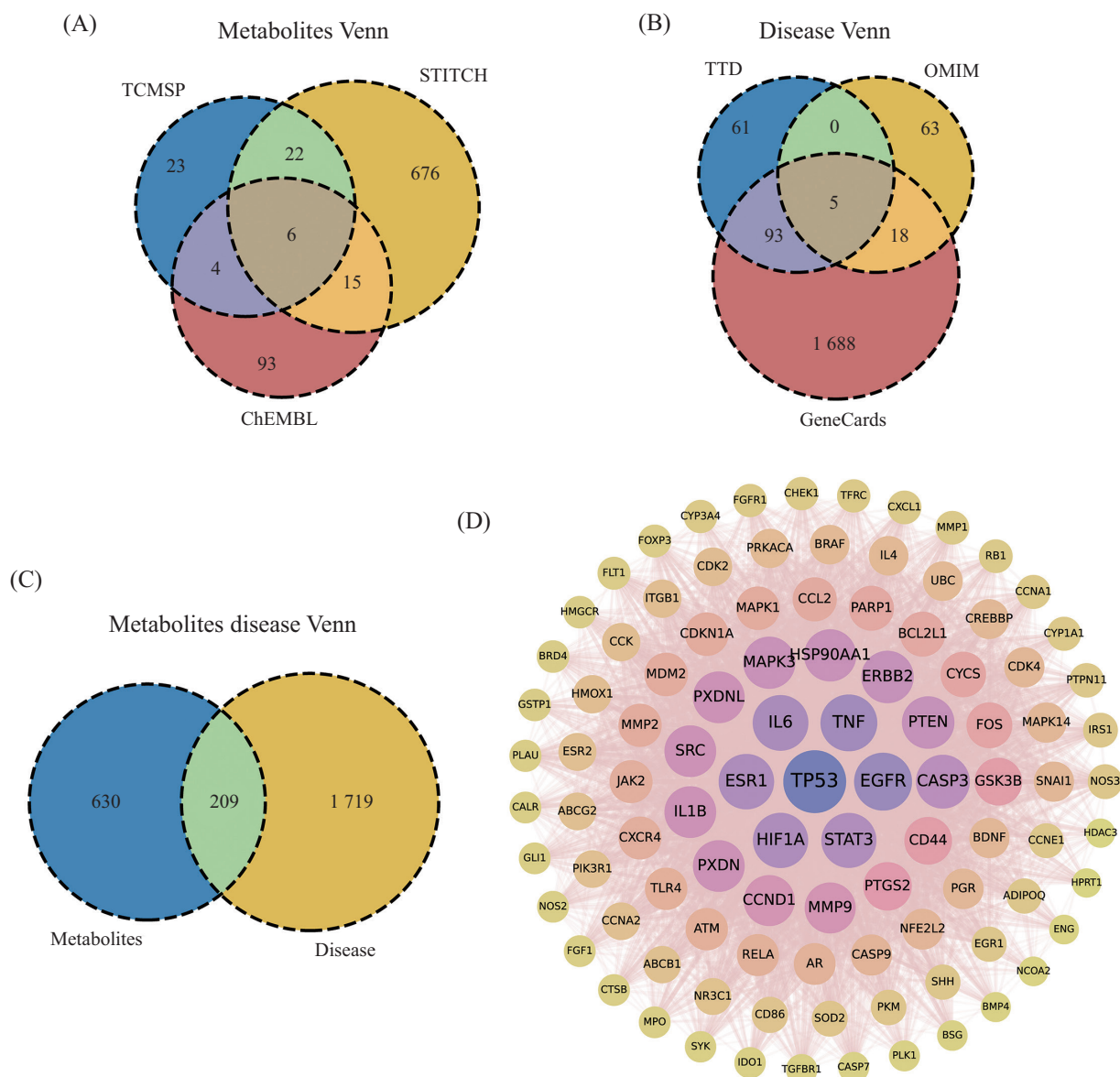
Fig.2 Pathway enrichment analysis of differential metabolites

调控乳腺癌的分子机制。

2.4 lusianthrindin的体外抗乳腺癌活性验证

为从网络药理学预测的候选代谢物中筛选功能活性分子, 结合我们前期研究脂代谢在毛兰素抗乳腺癌进展中发挥的重要作用^[14], 于是我们将脂代

谢通路相关差异基因与网络中的30个核心靶基因取交集, 获得16个共有基因(附图2A)。通过映射“靶点-代谢物”网络并排除重复以及无法购买的化合物, 初步得到7种差异的候选化合物: lusianthrindin、schisandrol B、fraxetin、dihydrocapsaicin、cyclopa-



A: 差异代谢物相关靶点的韦恩图; B: 乳腺癌相关靶点的韦恩图; C: 交集靶点分析; D: 核心靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。

A: Venn diagram of differential metabolites-related targets; B: Venn diagram of breast cancer-related targets; C: intersection analysis; D: PPI (protein-protein interaction) network of core targets.

图3 差异代谢物与乳腺癌相关靶点的整合分析

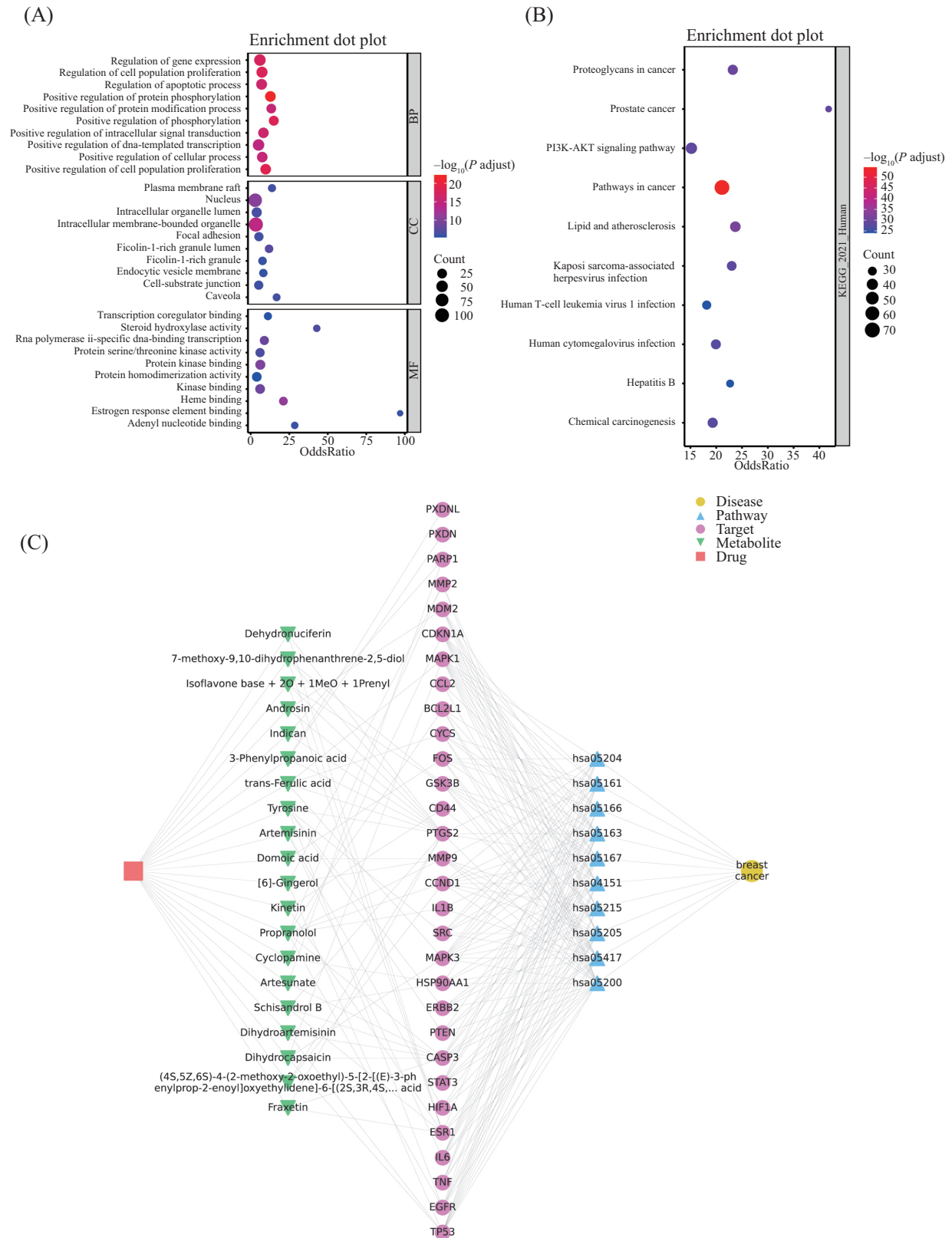
Fig.3 Integrated analysis of differential metabolites and breast cancer-related targets

mine、[6]-gingerol及ferulic acid。

首先采用CCK-8法检测上述7种化合物对三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞的增殖抑制作用。其中schisandrol B、fraxetin和ferulic acid在实验最高浓度80 $\mu\text{mol/L}$ 、160 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 处理下,对MDA-MB-468细胞未显示明显细胞毒性。dihydrocapsaicin、cyclopamine和[6]-gingerol的 IC_{50} 分别为130 $\mu\text{mol/L}$ 、75.41 $\mu\text{mol/L}$ 和219.2 $\mu\text{mol/L}$, lusianthridin对MDA-MB-468细胞的 IC_{50} 最低,为29.07 $\mu\text{mol/L}$ (附

图2B)。进一步我们又在MDA-MB-231细胞中验证上述四种化合物的活性,结果显示, lusianthridin、dihydrocapsaicin和cyclopamine的 IC_{50} 分别为12.39 $\mu\text{mol/L}$ 、157.2 $\mu\text{mol/L}$ 和91.6 $\mu\text{mol/L}$, [6]-gingerol在实验最高浓度300 $\mu\text{mol/L}$ 处理下,对MDA-MB-231细胞未显示明显细胞毒性(附图2C)。基于上述结果,本研究将lusianthridin选定为最具潜力的候选代谢物,并开展后续功能验证实验。

迁移能力是乳腺癌恶性进展的关键特征,我们



A: 潜在靶点的基因本体论(Gene Ontology, GO)分析, 涵盖生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三大类别; B: 潜在靶点的 KEGG 通路富集分析; C: 药物-代谢物-靶点-通路-疾病整合网络。

A: GO (Gene Ontology) analysis of the potential targets, including BP (biological process), CC (cellular component) and MF (molecular function) categories; B: KEGG pathway enrichment analysis of the potential targets; C: drug-metabolite-target-pathway-disease integrated network.

图4 乳腺癌中差异代谢物的功能富集与整合网络分析

Fig.4 Functional enrichment and integrated network analysis of differential metabolites in breast cancer

进一步通过 Transwell 和划痕实验评估 lusianthridin 对细胞迁移的影响。结果表明, lusianthridin 处理 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 细胞的迁移能力均被显著抑制(图 5A~图 5H)。Western blot 检测进一步显示, lusianthridin 处理可下调间质标志物 FN 和转录因子 Snail 的表达, 同时上调上皮标志物 E-cadherin 的水平(图 5I 和图 5J), 提示其具有调控上皮-间质转化(EMT)的活性。

综上, 本研究从毛兰素给药后的血清代谢物中, 成功筛选并验证了 lusianthridin 的体外抗乳腺癌活性, 从而为后续机制研究提供了方向性线索。

3 讨论

毛兰素作为石斛中分离的联苳类化合物, 近年来因其纳摩尔级别的抗肿瘤活性而受到广泛关注^[5-10]。既往研究已系统阐明了毛兰素在大鼠和人体内的药代动力学特征及代谢产物, 明确了其主要代谢途径包括甲基化、羟基化及葡萄糖醛酸结合反应^[15-17]。然而, 这些研究主要聚焦于药物的体内命运——即“毛兰素在体内变成了什么”, 而未回答一个更为关键的药理学问题, 在这些代谢产物中, 哪些真正具有生物活性, 并可能贡献于母药的抗肿瘤效应?

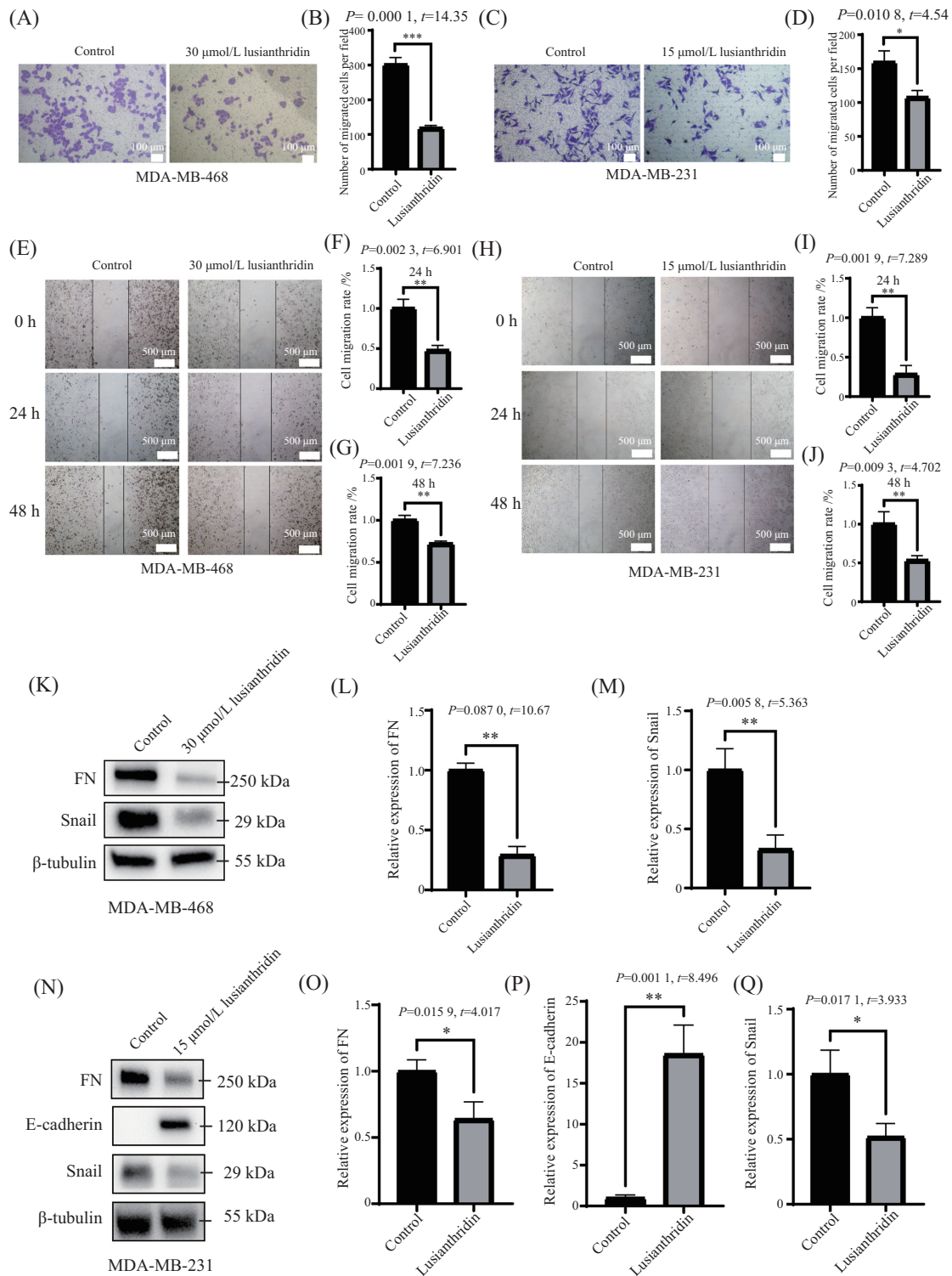
近年来, 功能代谢组学已被提出作为连接代谢表型与生物学功能的有效策略, 在天然产物活性成分发现中展现出独特优势。本研究通过整合非靶向代谢组学、网络药理学与体外功能验证, 将毛兰素的代谢研究从“代谢物鉴定”层面推进至“功能筛选与验证”层面。利用非靶向代谢组学分析毛兰素给药后小鼠血清, 结合网络药理学预测, 并整合脂代谢通路相关差异基因, 通过映射“靶点-代谢物”网络并排除重复以及无法购买的化合物, 最终我们从 226 个候选差异代谢物中筛选出 7 种潜在的差异候选代谢物, 并最终发现 lusianthridin 具有抑制乳腺癌细胞增殖、迁移及 EMT 的活性。这一发现为毛兰素给药后血清中活性代谢物的筛选提供了线索。

值得注意的是, 本研究在筛选过程中重点关注了脂代谢相关差异基因。一方面, KEGG 通路富集分析显示, 差异代谢物显著富集于脂代谢通路; 另一方面, 本课题组前期研究表明, 脂代谢重编程在毛兰素抗乳腺癌进展中发挥了重要作用^[14]。脂代谢与上皮-间质转化之间存在密切的内在联系。现有研究表明, EMT 不仅是乳腺癌转移的关键步骤, 同时也是

驱动脂质代谢异质性的重要机制。首先, EMT 过程伴随着显著的脂质谱变化。例如, 间质样乳腺癌细胞表现出胆固醇酯水平升高, 同时磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)水平降低。这种脂质组成的变化可能有助于维持间质样细胞的膜流动性、信号转导能力以及对氧化应激的抵抗能力, 从而促进其侵袭性和转移潜能^[18]。其次, EMT 通过调控关键脂代谢酶或转录因子来重塑脂质代谢。例如, EMT 相关转录因子 ZEB2 可与长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)形成一个致癌-代谢反馈环路, 促进细胞内脂质的储存, 进而支持肿瘤细胞在转移过程中的能量需求和膜合成^[19]。此外, 胆固醇及其氧化产物[如 27-HC(27-羟基胆固醇)]也被证实可通过激活 ERRA 等通路诱导 EMT, 并改变肿瘤微环境中的炎症状态, 进一步促进肿瘤进展^[20]。基于上述线索, 我们推测 lusianthridin 抑制 EMT 的活性可能与其干预肿瘤细胞脂质代谢稳态有关, 然而, 该推测尚需进一步实验验证。

另外, 本文所筛选的这 7 种候选代谢物并非全部都是毛兰素的直接代谢产物。lusianthridin 属于二氢菲类化合物, 与毛兰素的联苳母核结构类型不同, 提示其可能是毛兰素经多步代谢转化后的产物, 而非简单的一步脱糖基反应生成。其他 6 种化合物(schisandrol B、fraxetin、dihydrocapsaicin、cyclopamine、[6]-gingerol、ferulic acid)在代谢组学分析中表现为“毛兰素组独有”或“显著上调”的差异代谢物, 这些化合物可能是毛兰素的间接代谢产物, 毛兰素诱导的内源性代谢物变化, 甚至有可能是数据库匹配过程中的假阳性识别。因此尚需实验进一步验证毛兰素与这些代谢物的代谢转化关系。值得注意的是, 7 种候选代谢物中仅 lusianthridin 表现出明确的体外抗乳腺癌活性, 其余 6 种或活性极弱或无效。这一较低的命中率提示, 单纯依赖数据库预测和商业可及性筛选存在一定的局限性。后续研究可通过引入更精准的预测模型或采用活性导向的分离策略, 进一步提高筛选效率。

但是 lusianthridin 的体外活性强度远低于母药毛兰素。在细胞毒方面, lusianthridin 对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞的 IC₅₀ 分别为 29.07 μmol/L 和 12.39 μmol/L, 而毛兰素在上述细胞中的 IC₅₀ 约为 20 nmol/L^[13-14]; 在抗迁移及 EMT 调控方面,



A、B: MDA-MB-468细胞Transwell迁移实验及定量分析; C、D: MDA-MB-231细胞Transwell迁移实验及定量分析; E~G: MDA-MB-468细胞划痕愈合实验及定量分析; H~J: MDA-MB-231细胞划痕愈合实验及定量分析; K~M: MDA-MB-468细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物的蛋白免疫印迹(Western blot)分析; N~Q: MDA-MB-231细胞上皮-间质转化(EMT)标志物的蛋白免疫印迹(Western blot)分析。数据以均值 $\pm$ 标准差表示。

A,B: Transwell migration assay and quantification in MDA-MB-468 cells; C,D: Transwell migration assay and quantification in MDA-MB-231 cells; E-G: wound healing assay and quantification in MDA-MB-468 cells; H-J: wound healing assay and quantification in MDA-MB-231 cells; K-M: Western blot analysis of EMT (epithelial-mesenchymal transition) markers in MDA-MB-468 cells; N-Q: Western blot analysis of EMT (epithelial-mesenchymal transition) markers in MDA-MB-231 cells. The data are presented as the $\bar{x} \pm s$.

图5 lusianthridin抑制乳腺癌细胞的迁移与侵袭

Fig.5 lusianthridin suppresses migration and invasion of breast cancer cells

lusianthridin的有效浓度同样显著高于毛兰素。这一差异提示, lusianthridin不太可能通过直接细胞毒作用主导毛兰素的体内疗效。然而, 已有文献报道 lusianthridin通过下调 c-Myc减轻炎症反应并增强保护性自噬, 从而减轻急性肺损伤^[21]; 并具有抗血小板聚集等活性^[22]。本研究中 lusianthridin在抑制细胞迁移及调控 EMT 方面的明确效应, 进一步丰富了其功能谱。

那么 lusianthridin作为候选代谢物的筛选价值何在? 首先, 本研究的意义在于建立了一套从复杂代谢组学数据中高效聚焦候选分子的功能筛选策略。从 226 个差异代谢物出发, 经靶点预测、PPI 网络分析、功能富集及脂代谢通路聚焦等多轮筛选, 最终从 7 种可获取的候选化合物中锁定 lusianthridin。尽管该策略的绝对命中率有限, 但若无此系统筛选流程, lusianthridin极难从海量代谢数据中被发现。该筛选流程具有一定的方法学参考价值, 后续可通过优化预测模型或引入活性导向分离策略进一步提升筛选效率。

其次, 从药代动力学角度, 体外活性弱不等于体内无效。文献报道毛兰素在大鼠体内半衰期短、代谢迅速^[15-16], 而代谢物可能在体内具有更长的滞留时间或更好的组织分布。本研究的代谢物检测基于血清样本, 而肿瘤组织局部的 lusianthridin浓度可能远高于血清检测值。类似地, 姜黄素的代谢物四氢姜黄素体外活性弱于母药, 但在体内因更好的生物利用度而成为药效的重要贡献者^[23-25]。因此, lusianthridin是否在肿瘤组织中富集、是否以持续低浓度发挥生物学效应, 有待后续进一步研究验证。

既往工作明确了毛兰素的代谢物“是什么”以及“有多少”, 而本研究揭示了这些代谢物中“哪个有用”以及“有什么用”。即使 lusianthridin对乳腺癌细胞杀伤的 IC₅₀相对与毛兰素稍高, 但至少提示毛兰素代谢后并未产生功能完全丧失的“死端代谢物”, 也未产生功能异常的“毒性代谢物”, 而是产生了功能方向一致的“弱效代谢物”。这一发现为全面理解毛兰素的体内过程提供了关键拼图。从更广泛的视角来看, 天然产物代谢物的活性往往弱于母药, 但这并不意味着其研究价值缺失。阐明代谢物的功能谱, 即使活性较弱, 仍然有助于完整理解药物的体内处置过程, 避免将药效简单归因于母药而忽视代谢系统的整体贡献。

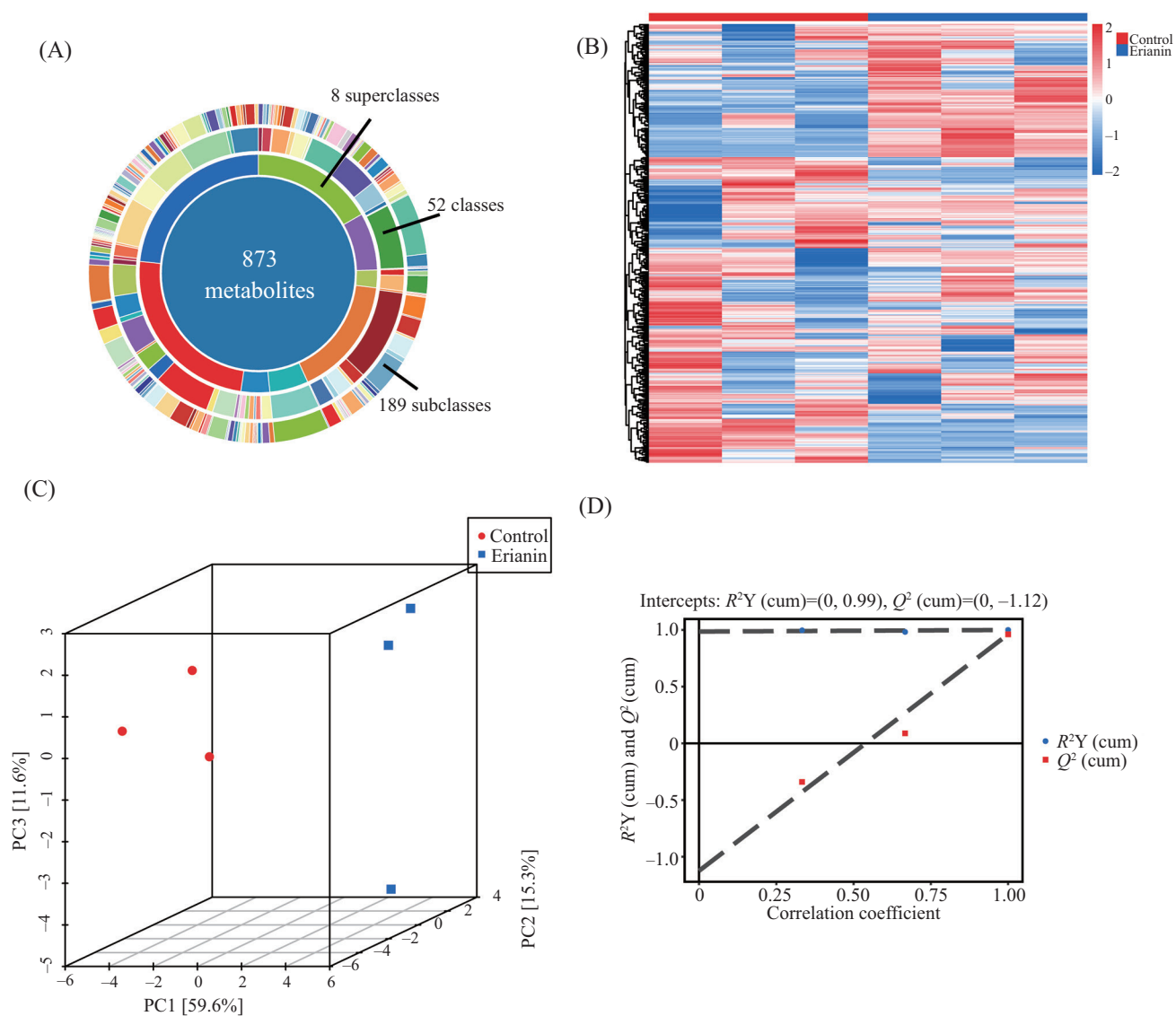
本研究也存在一定局限性。第一, 本研究仅在肿瘤细胞系中验证了 lusianthridin的活性, 未评估其对正常乳腺上皮细胞(如 MCF-10A)的毒性, 其选择性及安全性尚不明确。第二, 未测定 lusianthridin在肿瘤组织中的实际浓度, 无法直接建立体外有效浓度与体内暴露水平之间的关联; 本研究每组仅 3 只小鼠用于代谢组学分析, 样本量偏小, 可能引入个体差异对结果的干扰。尽管 OPLS-DA 结合 200 次置换检验证实模型稳健、未发生过拟合, 且后续体外实验对筛选结果进行了交叉验证, 但小样本量仍是本研究的局限之一。后续研究需扩大样本量, 同时增加多个取样时间点以进一步验证结论的可靠性。第三, 本研究仅在体外细胞模型中验证了 lusianthridin的抗乳腺癌活性, 未在荷瘤动物模型中评估其体内药效及药代动力学特征, 限制了对其体内实际贡献的全面判断; 第四, 毛兰素与 lusianthridin的代谢转化关系尚需通过肝微粒体温孵实验等加以证实; 第五, 本研究在候选代谢物的筛选中, 受限于商业化可及性, 排除了 *trans*-ferulic acid, domoic acid 和 gancanoin A 3 种无法购买的候选化合物, 这可能导致某些尚未商业化、但可能具有更强活性的代谢物被遗漏。第六, 本研究在差异代谢物筛选中仅纳入上调代谢物 (FC ≥ 1.2), 下调代谢物未被纳入后续网络药理学分析。这些下调代谢物多为毛兰素引起的宿主内源性代谢扰动, 与筛选外源性来源代谢物的研究目标不符, 但也不排除同样具有重要生物学意义。

综上所述, 本研究首次证实毛兰素给药后血清中鉴定到的差异代谢物 lusianthridin具有与母药方向一致的抗乳腺癌活性。尽管其体外活性强度远低于毛兰素, 但这一发现为毛兰素的构效关系研究提供了线索, 并为后续研究指明了方向, 同时也提示功能代谢组学策略在天然产物活性代谢物发现中的可行性。未来研究应从“单一原型药物”思维转向“原型-代谢物系统”思维, 全面评估母药与代谢物在体内的协同或互补关系, 从而更完整地理解天然产物的体内作用模式。

参考文献 (References)

- [1] Zhang J, Wu Y Y, Li Y H, et al. Natural products and derivatives for breast cancer treatment: from drug discovery to molecular mechanism [J]. *Phytochemistry*, 2024, 129: 155600.
- [2] Wang P P, He C X, Shuai Y Y, et al. The combination of natural products: a promising therapeutical way for management of

- breast cancers [J]. *Phytotherapy Research*, 2025, 39(9): 3886-3902.
- [3] Rui R C, Li Y, Liu Y M, et al. Nanoassemblies of the redox paclitaxel prodrug with the natural active ingredient dihydroartemisinin for therapy of breast cancer [J]. *Nanoscale*, 2025, 17(13): 8069-8083.
 - [4] Zhao W, Zheng X D, Tang P Y, et al. Advances of antitumor drug discovery in traditional Chinese medicine and natural active products by using multi-active components combination [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2023, 43(5): 1778-1808.
 - [5] Li G M, Zhang H Q, Lai H, et al. Erianin: a phytoestrogen with therapeutic potential [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1197056.
 - [6] Chen P, Wu Q B, Feng J, et al. Erianin, a novel dibenzyl compound in *Dendrobium* extract, inhibits lung cancer cell growth and migration via calcium/calmodulin-dependent ferroptosis [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 51.
 - [7] Yang L, Hu Y, Zhou G B, et al. Erianin suppresses hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of PI3K/AKT, p38 and ERK MAPK signaling pathways [J]. *Bioscience Reports*, 2020, 40(7): BSR20193137.
 - [8] Yang A, Li M Y, Zhang Z H, et al. Erianin regulates programmed cell death ligand 1 expression and enhances cytotoxic T lymphocyte activity [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 273: 113598.
 - [9] Zhang Q N, Qiu M H, Liu J P, et al. Erianin induces apoptosis and pyroptosis via MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways and synergizes with anlotinib in anaplastic thyroid carcinoma [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 16: 1596873.
 - [10] Wang H, Zhang T, Sun W, et al. Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7(6): e2247.
 - [11] Zhu Q Y, Sheng Y W, Li W H, et al. Erianin, a novel dibenzyl compound in *Dendrobium* extract, inhibits bladder cancer cell growth via the mitochondrial apoptosis and JNK pathways [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 371: 41-54.
 - [12] Sun J, Fu X Q, Wang Y S, et al. Erianin inhibits the proliferation of T47D cells by inhibiting cell cycles, inducing apoptosis and suppressing migration [J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(7): 3077-3086.
 - [13] Li M, Zhao Y, Li H M, et al. Mechanism of erianin anti-triple negative breast cancer based on transcriptomics methods and network pharmacology [J]. *Aging*, 2024, 16(3): 2848-2865.
 - [14] Li M, Kang S Y, Deng X M, et al. Erianin inhibits the progression of triple-negative breast cancer by suppressing SRC-mediated cholesterol metabolism [J]. *Cancer Cell International*, 2024, 24(1): 166.
 - [15] Yi X F, Lan X P. LC-MS/MS method for the determination of erianin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomedical Chromatography*, 2020, 34(7): e4826.
 - [16] Liu N, Wang X G, Liu H Q, et al. Identification of the metabolites of erianin in rat and human by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2020, 34(7): e8661.
 - [17] Ma L, Li M L, Zhang Y T, et al. Recent advances of antitumor leading compound erianin: mechanisms of action and structural modification [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 261: 115844.
 - [18] Huang X Y, Di X Y, Zuiderwijk M C, et al. Lipidomic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals distinct metabolic signatures associated with EpCAM expression [J]. *Talanta*, 2025, 283: 127127.
 - [19] Lin J M, Zhang P P, Liu W, et al. A positive feedback loop between ZEB2 and ACSL4 regulates lipid metabolism to promote breast cancer metastasis [J]. *eLife*, 2023, 12: RP87510.
 - [20] Brindisi M, Frattaruolo L, Fiorillo M, et al. New insights into cholesterol-mediated $ERR\alpha$ activation in breast cancer progression and pro-tumoral microenvironment orchestration [J]. *The FEBS Journal*, 2023, 290(6): 1481-1501.
 - [21] Li Y, Li A, Zhang W Q, et al. lusianthridin alleviates inflammatory responses and enhances protective autophagy via downregulation of c-Myc to ameliorate acute lung injury [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2026, 370: 122026.
 - [22] Swe H N, Sritularak B, Rojnuckarin P, et al. Inhibitory mechanisms of lusianthridin on human platelet aggregation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6846.
 - [23] Konaktchieva M, Stojchevski R, Hadzi-Petrushev N, et al. Curcumin and tetrahydrocurcumin as multi-organ modulators of the adipose tissue-gut-liver axis: mechanistic insights, therapeutic potential, and translational challenges [J]. *Pharmaceuticals*, 2025, 18(12): 1791.
 - [24] Liu W H, Zhang Z B, Lin G S, et al. Tetrahydrocurcumin is more effective than curcumin in inducing the apoptosis of H22 cells via regulation of a mitochondrial apoptosis pathway in ascites tumor-bearing mice [J]. *Food & Function*, 2017, 8(9): 3120-3129.
 - [25] Prasad S, Tyagi A K. Curcumin and its analogues: a potential natural compound against HIV infection and AIDS [J]. *Food & Function*, 2015, 6(11): 3412-3419.

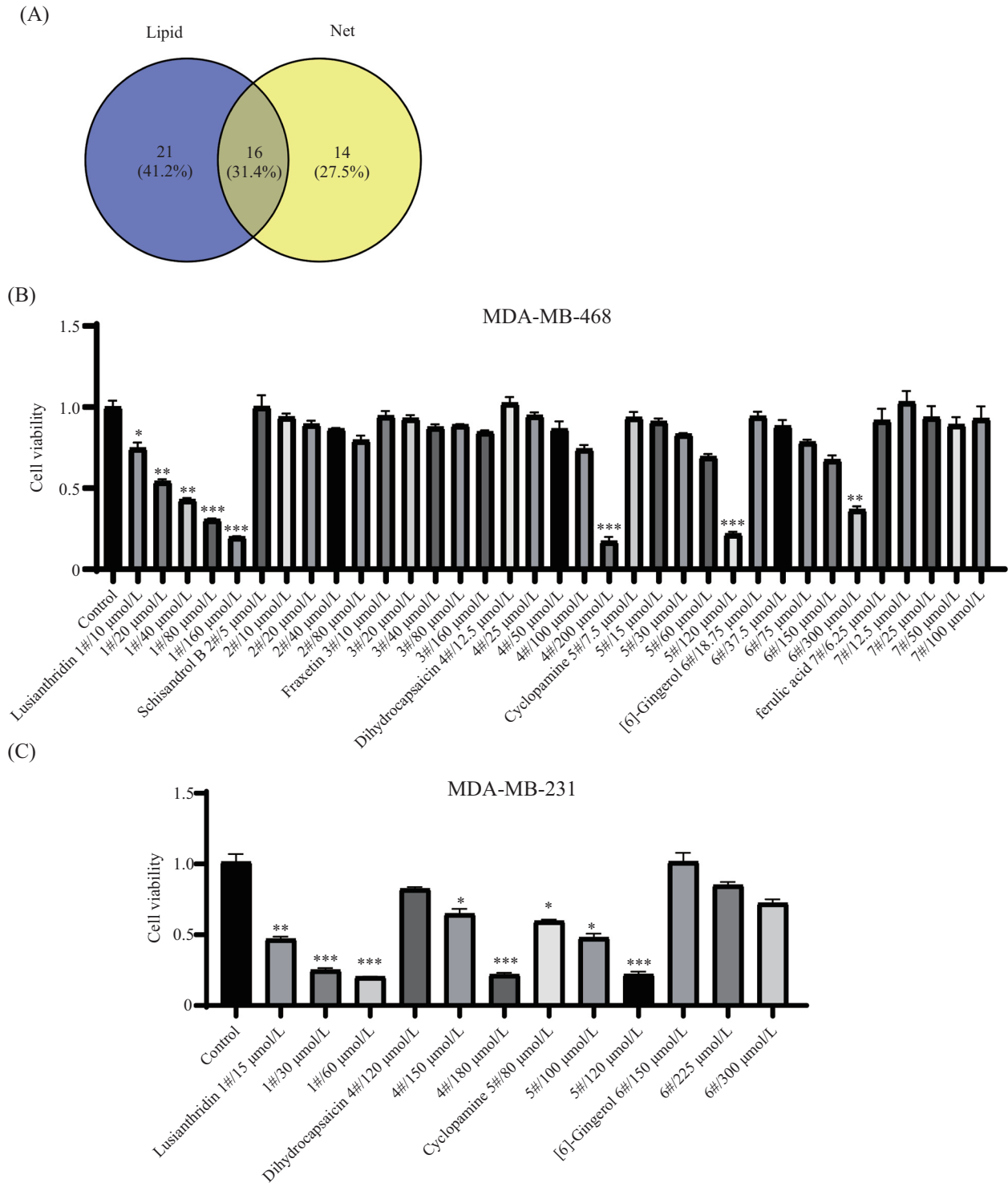


A: 代谢物的二级质谱鉴定信息; B: 样本的聚类热图展示; C: 主成分分析; D: OPLS-DA模型验证。

A: secondary-mass-spectrometry identification information of metabolites; B: cluster heatmap of samples; C: principal component analysis; D: validation of the OPLS-DA model.

附图1 毛兰素诱导的小鼠血清代谢组学分析

Supplementary Fig.1 Metabolomic analysis of mouse serum induced by erianin



A: 通过韦恩图选取共有基因; B: CCK-8法检测7种化合物对三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞的增殖抑制作用; C: CCK-8法检测4种化合物对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖抑制作用。数据以均值±标准差表示; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与control组比较。
A: selection of common genes via Venn diagram; B: proliferation-inhibitory effects of seven compounds on triple-negative breast cancer MDA-MB-468 cells detected by the CCK-8 assay; C: proliferation-inhibitory effects of four compounds on triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells detected by the CCK-8 assay component analysis. The data are presented as the $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

附图2 血清代谢物对乳腺癌细胞增殖的影响

Supplementary Fig.2 Effects of serum metabolites on the proliferation of breast cancer cells