

基于网络药理学和体外实验探讨六味地黄丸治疗乳腺癌的作用机制

李 涛^{1,2}, 葛银芳¹, 陈洪晓³, 刘 苏³, 陈昭琳^{1,3*}

1. 安徽医科大学 药学科学学院, 安徽 合肥 230032

2. 安徽医科大学附属六安医院 药学部, 安徽 六安 237000

3. 中国科学技术大学附属第一医院 药学部, 精准药物制剂与临床药学安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘 要: **目的** 通过网络药理学和体外实验探讨六味地黄丸治疗乳腺癌的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取中药有效活性成分; GeneCards、OMIM 等数据库筛选六味地黄丸与乳腺癌的相关靶点, 并通过 Venny 2.1.0 取二者交集; Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点”网络图, DAVID 数据库进行基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析; 将筛选出的活性成分和核心靶点进行分子对接验证。采用 CCK-8 法及平板克隆检测细胞活力及增殖能力, 细胞划痕实验检测迁移能力, 流式细胞技术实验检测凋亡; Western blotting 法检测蛋白激酶 B(AKT1)、p-丝氨酸和苏氨酸激酶 1(p-AKT1)、兔抗人单克隆抗体(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、cleaved Caspase-3 的蛋白表达水平。**结果** 通过数据分析共筛选出有效成分 39 个, 交集靶点 171 个, 其核心成分是槲皮素、豆甾醇、山柰酚; 通过蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图得出核心靶点为 TP53、JUN 及 AKT1; GO 分析包含生物过程(BP) 772 条、细胞组成(CC) 80 条、分子功能(MF) 192 条富集结果, KEGG 分析共包含 155 条富集通路; 分子对接显示豆甾醇与 AKT1 结合稳定性最好。细胞实验证明, 豆甾醇能够抑制 MDA-MB-231 细胞的生长并诱导其凋亡, 并下调 p-AKT1/AKT1 的蛋白表达, 上调 Bax/Bcl-2 及 cleaved Caspase-3 的蛋白表达。**结论** 六味地黄丸的活性成分豆甾醇能抑制 MDA-MB-231 细胞增殖并诱导其凋亡, 作用机制可能是通过调节 PI3K/Akt 信号通路而发挥作用。

关键词: 六味地黄丸; 乳腺癌; 网络药理学; 分子对接; 细胞实验; 豆甾醇

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0156-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.014

Mechanism of Liuwei Dihuang Pills in treatment of breast cancer based on network pharmacology and *in vitro* experiments

LI Tao^{1,2}, GE Yinfang¹, CHEN Hongxiao³, LIU Su³, CHEN Zhaolin^{1,3}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Department of Pharmacy, Affiliated Lu'an Hospital of Anhui Medical University, Lu'an 237000, China

3. Anhui Provincial Key Laboratory of Precision Medicine and Clinical Pharmacy, Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230031, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of action of Liuwei Dihuang Pills in treating breast cancer through network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** The effective active components of the traditional Chinese medicine were obtained using TCMSP; The relevant targets of Liuwei Dihuang Pills and breast cancer were screened using GeneCards, OMIM, etc., and the intersection of the two was obtained using Venny2.1.0; The “drug-component-target” network diagram was constructed using Cytoscape software, and GO and KEGG enrichment analysis was performed using the DAVID database; The active components and core targets were verified by molecular docking. The cell viability and proliferation ability were detected using the CCK-8 method and plate cloning, the migration ability was detected using the cell scratch assay, and the apoptosis was detected using flow cytometry; The protein expression levels of AKT1, p-AKT1, Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 were detected using Western blotting. **Results** A total of 39 active components were screened, and 171 intersection targets were obtained. The core components were quercetin,

收稿日期: 2025-08-06

基金项目: 安徽省高校优秀青年科研项目(2023AH030114); 安徽省重点研究与开发计划项目(202204295107020023)

作者简介: 李 涛, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为临床药学。E-mail: 1193609760@qq.com

*通信作者: 陈昭琳, 女, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: czl0808@ustc.edu.cn

stigmaterol, and kaempferol. The core targets were determined to be TP53, JUN, and AKT1 using the protein-protein interaction (PPI) network. GO analysis included 772 biological process (BP), 80 cellular component (CC), and 192 molecular function (MF) enrichment results, and KEGG analysis included 155 enriched pathways. Molecular docking showed that stigmaterol had the best binding stability with AKT1. Cell experiments demonstrated that stigmaterol could inhibit the growth of MDA-MB-231 cells and induce their apoptosis, and down-regulate the protein expression of p-AKT1/AKT1, up-regulate the protein expression of Bax/Bcl-2 and cleaved Caspase-3. **Conclusion** The active component stigmaterol of Liuwei Dihuang Pills can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells and induce their apoptosis. The mechanism may be through regulating the PI3K/Akt signaling pathways.

Key words: Liuwei Dihuang Pills; breast cancer; network pharmacology; molecular docking; cell experiments; stigmaterol

乳腺癌是全球女性中发病率最高的恶性肿瘤, 2022 年全球新诊断癌症病例约 1 996 万, 死亡病例约 970 万, 其中中国发病率和死亡率分别占比为 24.1% 和 26.5%, 位居首位, 且乳腺癌占全球女性新诊断癌症病例的 1/4 和癌症死亡病例的 1/6, 严重威胁女性身心健康^[1]。新型抗癌药物层出不穷, 却仍难以实现乳腺癌的全面治愈, 因此, 以多学科研究制定优化治疗策略, 是乳腺癌治疗取得突破的关键所在。传统中医药在肿瘤治疗中发挥着独特优势, 已成为中西医结合治疗方案中的重要组成部分, 随着临床研究的不断深入, 中医药在延长生存时间、增强机体免疫力、减轻不良反应、防治复发转移等方面取得了显著成果^[2-4]。《乳腺癌中西医结合诊疗共识》《乳腺癌中西医结合诊疗指南》也提及对于早期巩固康复治疗的乳腺癌患者, 中医辨证为肝肾阴虚, 可予以六味地黄丸加减治疗。六味地黄丸作为滋补肝肾的常用基础方由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻 6 味中药组成, 临床研究和动物实验都提示其对肝癌、卵巢癌等有较好的治疗效果^[5-7]。既往也有六味地黄丸对乳腺癌的研究, 但缺乏系统性的分析。网络药理学通过从整体和系统生物学的角度出发, 分析药物与疾病之间的分子相互作用模式, 因而被普遍应用于识别活性成分和揭示中医药的整体作用机制^[8-9]。

本研究主要利用网络药理学方法筛选六味地黄丸用于治疗乳腺癌的潜在靶点, 并通过体外细胞实验验证并探讨六味地黄丸作用乳腺癌的可能机制, 为六味地黄丸临床辅助治疗乳腺癌提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞和试剂

MDA-MB-231 (人乳腺癌细胞株) 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。豆甾醇 (货号: HY-NO131S1, 质量分数: 98.48%, 购自美国 MedChemExpress 公司); RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司; 货号: 11875093) 胎牛血清 (以色列

Biological Industries 公司; 货号: 04-001-IACS); CCK-8 试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司, 货号: MA0218-2-Oct-11F); cleaved-Caspase 3、p-丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT1) 单克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 25128-1-AP、66444-1-Ig); AKT1、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、兔抗 Bax 单克隆抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 货号: HA721364、M1206-4、ET1603-34); β -actin 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 4967S); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司, 货号: 556547)。

1.2 仪器

SpectraMax i3x 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); LD5-10B 冷冻高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); Tanon VE-180 电泳仪 (上海天能科技有限公司); Tanon 5200 化学发光成像仪 (上海培清科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 六味地黄丸的活性成分及靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3) 检索六味地黄丸组方中药有效活性成分, 筛选条件为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 。经过筛选, 对符合条件的活性成分进行整理, 再通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行靶点匹配。

2.1.2 乳腺癌靶点的获取 以 “breast cancer” 为关键词, 通过检索 Genecards (<https://www.genecards.org/>, Relevance score > 10)、OMIM (<https://omim.org/search/advanced/geneMap>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DisGeNet (<https://disgenet.com/>) 数据库, 获得乳腺癌的疾病靶点。并将得到的靶点进行合并去重后得到唯一的靶点。

2.1.3 构建“药物-成分-靶点”网络图 通过 Venny2.1.0 对药物和疾病靶点取交集。利用 Excel 表格将得到的交集靶点与中药有效成分一一对应。利用 Cytoscape 3.9.1 以药物、成分和相关靶点为节点, 构建“药物-成分-靶点”网络。

2.1.4 基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 运用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 在线数据库, 进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 分析包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组成 (CC) 3 个方面, KEGG 主要为通路富集分析, 并利用微生信-在线生物信息分析进行可视化分析。

2.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图的构建 在 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中, Organisms 设置为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络图。并在 Cytoscape3.9.1 中根据度 (degree) 值筛选核心靶点。

2.1.6 分子对接 将六味地黄丸关键活性成分与关键靶点的三维结构分别从 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>) 数据库下载。利用 Autodock Vina (1.5.6) 进行分子对接, PyMOL 进行可视化。

2.2 体外细胞实验

2.2.1 细胞培养 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 采用 RPMI 1640 培养基培养 MDA-MB-231 细胞, 待细胞进入对数生长期后, 选取该时期的细胞用于后续各项实验研究。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 以每孔 4×10³ 个细胞接种于 96 孔板内培养 24 h, 加入不同质量浓度 (0、5、10、20、40、80、160 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇^[10-12], 分别作用 24、48 h。并加入 CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h, 于 450 nm 波长下检测吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

2.2.3 Transwell 实验检测细胞侵袭 将 Matrigel 胶按比例稀释后铺于 Transwell 上室, 37 °C 孵育使其凝固, 同时将数期细胞用无血清培养基饥饿处理, 用不同质量浓度 (0、20、40、80 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇处理 24 h, 消化收集细胞, 取 200 μL 细胞悬液加入上室, 下室加入含 10%~20% 胎牛血清的培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤小室, 棉签轻轻擦去上室未侵袭细胞, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 15

min, 显微镜下拍照计数。

2.2.4 平板克隆检测细胞增殖 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞, 消化后计数, 以每孔 1×10³ 个细胞接种于 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养, 用不同质量浓度 (0、20、40、80 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇处理 24 h。待细胞形成克隆后, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 拍照观察并比较各组克隆形成的差异。

2.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数期 MDA-MB-231 细胞, 消化计数后以每孔 5×10⁵ 个接种于 6 孔板, 经不同质量浓度 (0、20、40、80 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇处理 24 h 后收集细胞。1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀用预冷 PBS 洗 2 次, 加 Binding Buffer 重悬。取 100 μL 细胞悬液加流式管, 加 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL, 孵育 15 min, 再加 400 μL Binding Buffer, 1 h 内上机检测。

2.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数期 MDA-MB-231 细胞以每孔 5×10⁵ 个接种至 6 孔板, 培养 24 h 至细胞汇合度约 90% 时, 用无菌枪头在细胞层上均匀划痕, 然后分别加入不同质量浓度 (0、20、40、80 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇处理。在培养 12、24 h 时拍照。

2.2.7 Western blotting 法检测蛋白的表达 取对数期 MDA-MB-231 细胞, 按每孔 5×10⁵ 个接种于 6 孔板, 培养至 70%~80% 融合后, 以不同质量浓度 (0、20、40、80 μg·mL⁻¹) 的豆甾醇处理 24 h 收集细胞蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 300 mA 冰浴转膜 1 h 至 PVDF 膜。TBST 洗膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 依次加入 1:1 000 一抗 4 °C 孵育过夜、1:5 000~1:10 000 二抗室温孵育 1 h, 显影成像。

2.3 统计学方法

使用 Image J 软件处理得到的图片, GraphPad Prism 10.5.0 对所获取的数据进行统计学分析并绘图, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有实验均重复 3 次以上, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, *P*<0.05 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 “药物-成分-靶点”网络分析

通过 TCMSP 检索获取符合条件的活性成分 528 个, 去重后得到 39 个, 与 Uniprot 数据库进行匹配后, 得到 528 个靶点, 去重后得到 207 个。以“breast cancer”为关键词, 通过 Genecards 等数据库

检索并对检索后的靶点进行整理去重后, 最终获得 7 494 个乳腺癌相关靶点。

基于 Venny 2.1.0 得到 171 个“药物-疾病”交集靶点(图 1-A)。基于 Cytoscape3.9.1 构建“药物-成分-靶点”网络图(图 1-B), 219 个节点, 218 个边。根据 degree 值可确定槲皮素、山柰酚、豆甾醇是六味地黄丸治疗乳腺癌的 3 种关键活性成分。

3.2 GO 和 KEGG 通路富集分析

对药物-疾病交集靶点进行富集分析, GO 富集分析显示交集靶点主要富集的 BP 包括对基因表达的正向调控(positive regulation of gene expression)、DNA 模板转录的正向调节(positive regulation of

DNA-templated transcription)、对外源刺激的反应(response to xenobiotic stimulus)、低氧反应(response to hypoxia)等; CC 包括细胞外空间(extracellular space)、胞质(cytosol)、核浆(nucleoplasm)、蛋白质复合物(protein-containing complex)等; MF 功能包括酶结合(enzyme binding)、相同蛋白结合(identical protein binding)、蛋白质同源二聚化活性(protein homodimerization activity)、核受体活性(nuclear receptor activity)、DNA 结合转录因子活性(DNA-binding transcription factor activity)等。KEGG 富集分析显示交集靶点主要富集在 PI3K-Akt、AGE-RAGE、MAPK 等信号通路。见图 2。

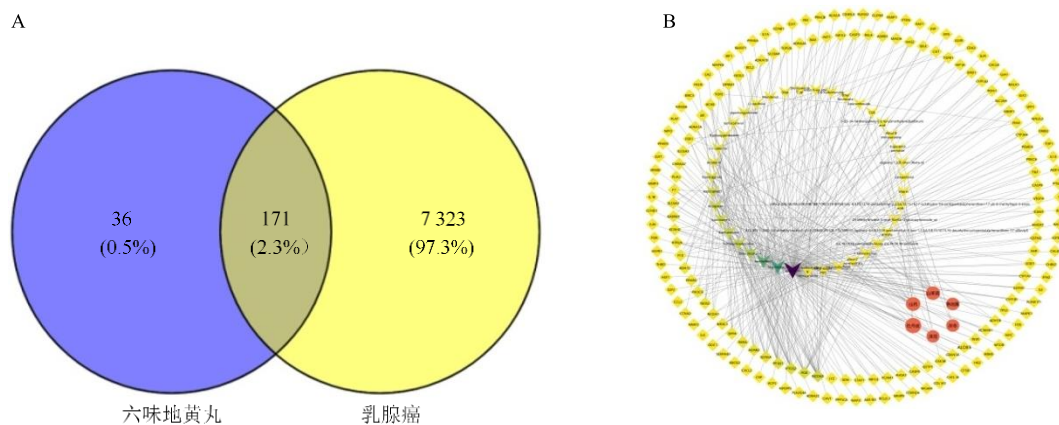


图 1 六味地黄丸与乳腺癌的交集靶点 (A) 和“药物-成分-靶点”网络图 (B)

Fig. 1 Intersection targets of Liuwei Dihuang Pills and breast cancer (A) and “drug-component-target” network diagram (B)

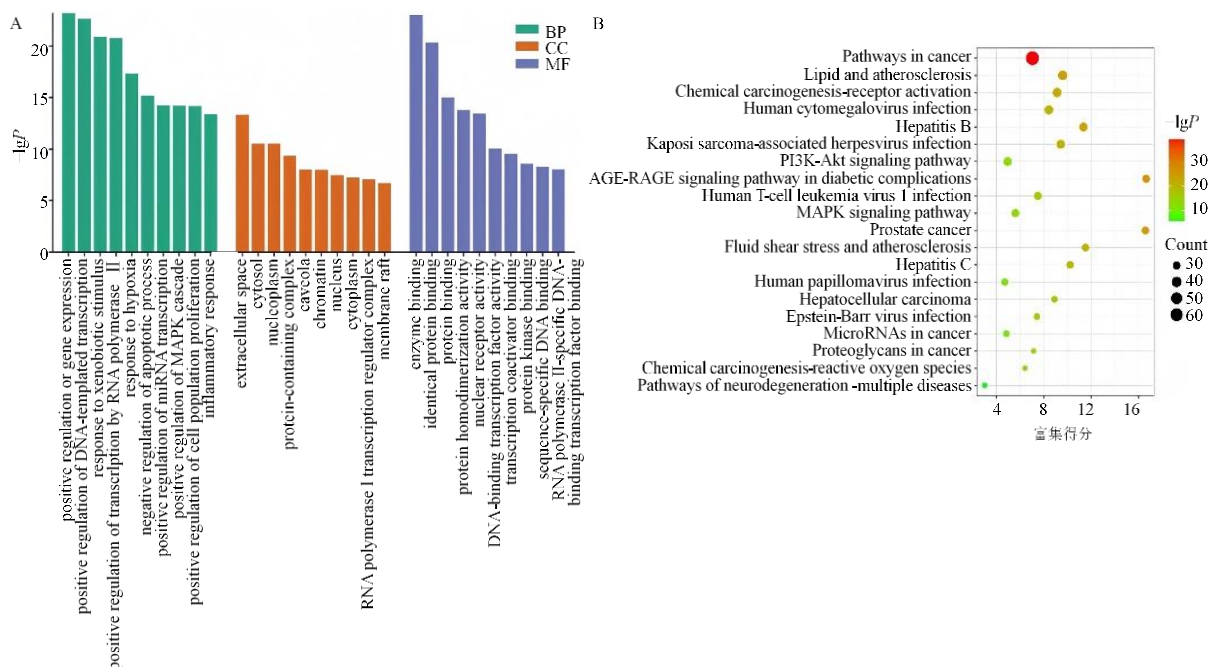


图 2 GO (A) 和 KEGG (B) 功能富集分析

Fig. 2 GO (A) and KEGG (B) functional enrichment analysis

3.3 PPI 网络分析

利用 STRING 数据库构建交集基因的 PPI 网络图, 并通过 Cytoscape 3.9.1 对 PPI 网络进行可视化, 利用 CytoHubba 插件筛选 degree 值排名前 3 位的靶点依次为 TP53、JUN 及 AKT1。见图 3。

3.4 分子对接结果

利用 Autodock1.5.6 将 3 个核心成分分别与 3 个核心靶点 TP53、JUN、AKT1 进行分子对接, 绘制对接能量热图 (图 4-A)。分子对接反映的是受体蛋白和配体结合构象的稳定性, 当结合能低于 $-29.26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时, 表明配体与蛋白具有强烈的结合活性^[13]。结果显示, AKT1 与豆甾醇的对接能量为 $-47.23 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 最低, 说明两者结合活性最强。运用 PyMol 将豆甾醇与 AKT1 可视化 (图 4-B)。因此选择活性成分豆甾醇和 AKT1 进行体外细胞实验验证。

3.5 豆甾醇对乳腺癌细胞存活率的影响

CCK-8 法检测豆甾醇对 MDA-MB-231 细胞的存活率的影响, 不同浓度 (5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇分别作用 24、48 h 后均可抑制 MDA-MB-231 细胞的活力 ($P<0.01$), 随着质量浓度的增加和时间的延长细胞数量显著减少, 存活率

显著降低 ($P<0.01$), 说明豆甾醇可以抑制乳腺癌细胞的增殖。豆甾醇作用 24、48 h 的 MDA-MB-231 的 IC_{50} 分别为 31.78、19.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。见图 5。因此, 选用 20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为豆甾醇低、中、高质量浓度进行后续实验。

3.6 豆甾醇对乳腺癌细胞侵袭的影响

Transwell 实验结果显示, MDA-MB-231 细胞经不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇处理后, 与对照组相比, 各组 MDA-MB-231 细胞侵袭数均显著降低 ($P<0.01$), 说明豆甾醇能抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭。见图 6。

3.7 豆甾醇对乳腺癌细胞增殖的影响

平板克隆结果显示, MDA-MB-231 细胞经不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇处理 24 h 后, 与对照组相比, 不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇组平板中的细胞克隆数随药物质量浓度增加而逐渐减少 ($P<0.01$ 、 0.001), 说明豆甾醇能抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。见图 7。

3.8 豆甾醇对乳腺癌细胞凋亡的影响

流式细胞检测显示, MDA-MB-231 细胞经不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇处理后, 与

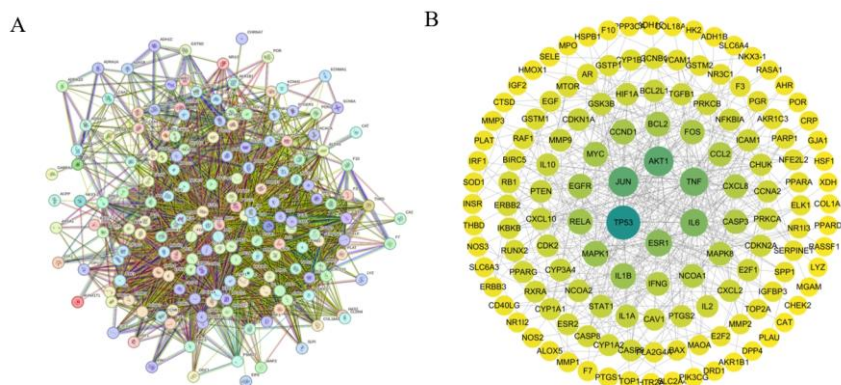


图 3 交集靶点 PPI 网络图 (A) 和可视化 (B)

Fig. 3 Intersection target PPI network (A) and visualization (B)

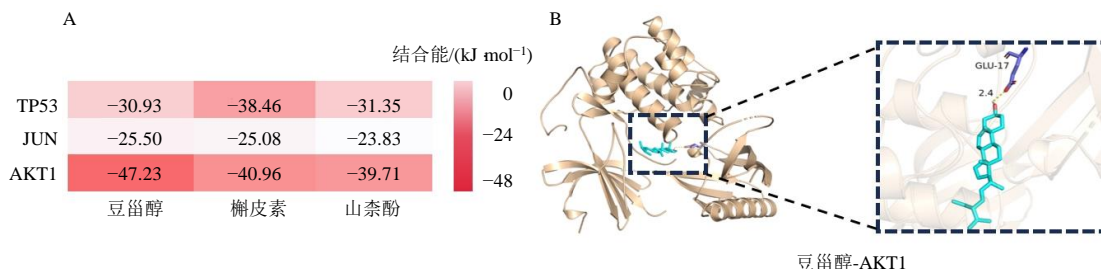
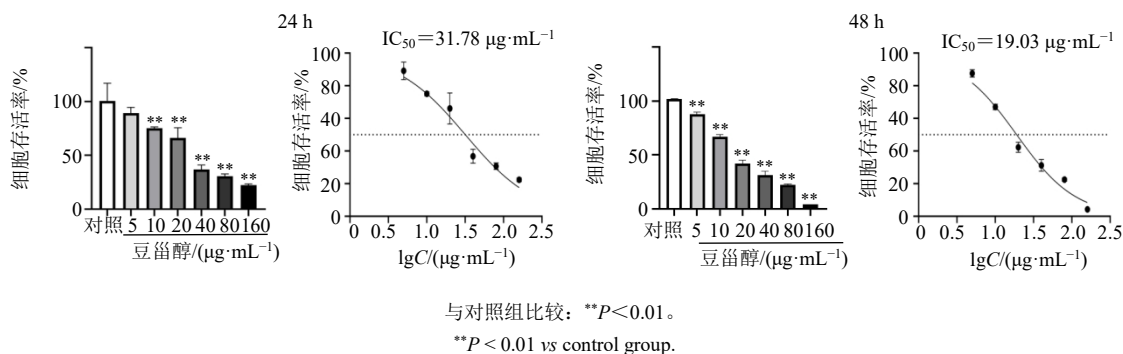
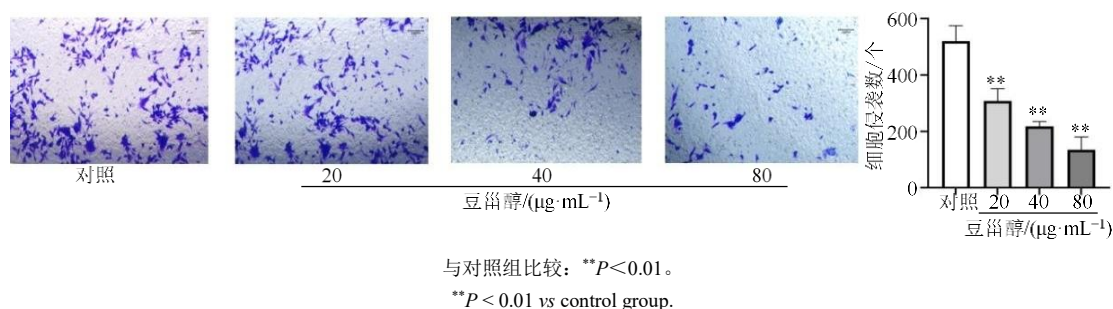
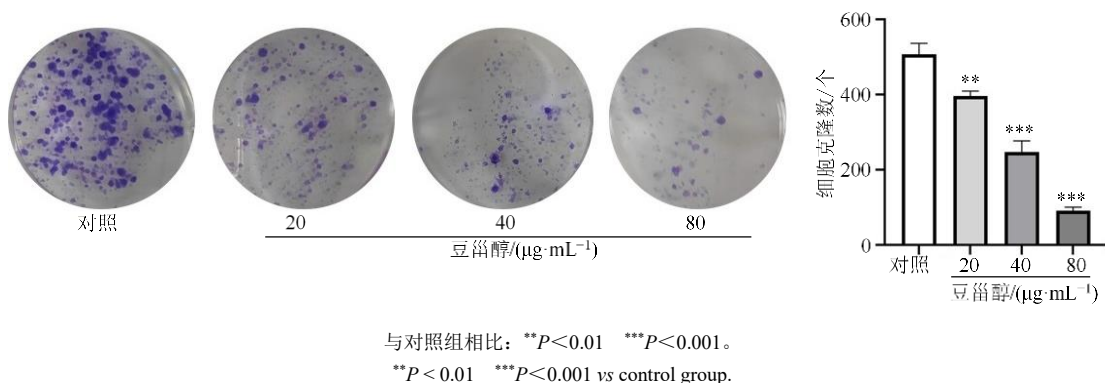


图 4 分子对接能量热图 (A) 与可视化分析 (B)

Fig. 4 Molecular docking energy heat map (A) and visualization analysis (B)

图 5 豆甾醇对乳腺癌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Effect of stigmasterol on breast cancer cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 6 豆甾醇抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭能力 ($\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 Stigmasterol inhibits the invasive ability of MDA-MB-231 cells ($\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$)图 7 豆甾醇抑制 MDA-MB-231 细胞增殖能力 ($\times 40, \bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Sterol inhibits proliferation ability of MDA-MB-231 cells ($\times 40, \bar{x} \pm s, n=3$)

对照组相比, 豆甾醇各剂量组细胞凋亡率随药物质量浓度增加而逐渐上升 ($P < 0.05, 0.01$)。说明豆甾醇可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡, 且具有剂量相关性。见图 8。

3.9 豆甾醇对乳腺癌细胞迁移的影响

划痕实验结果显示, MDA-MB-231 细胞经不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇处理后, 与对照组相比, 在 12、24 h 后均可抑制 MDA-MB-231 细胞的横向迁移, 且具有剂量相关性, 表明豆甾醇对 MDA-MB-231 细胞的横向迁移能力的抑制作用随着

药物质量浓度的增加和时间的延长而增强 ($P < 0.01$)。见图 9。

3.10 豆甾醇对乳腺癌细胞中 PI3K-Akt 通路表达的影响

Western blotting 结果显示, MDA-MB-231 细胞经不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 豆甾醇处理后, AKT1 蛋白表达水平未发生变化, 40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 p-AKT1/AKT1 均下调 ($P < 0.01, 0.001$), Bax/Bcl-2 及 cleaved-Caspase3/ β -actin 表达量上调 ($P < 0.01, 0.001$), 表明豆甾醇可能通过调控 Akt 活性、激活凋亡蛋白发挥潜在抗肿瘤作用。见图 10。

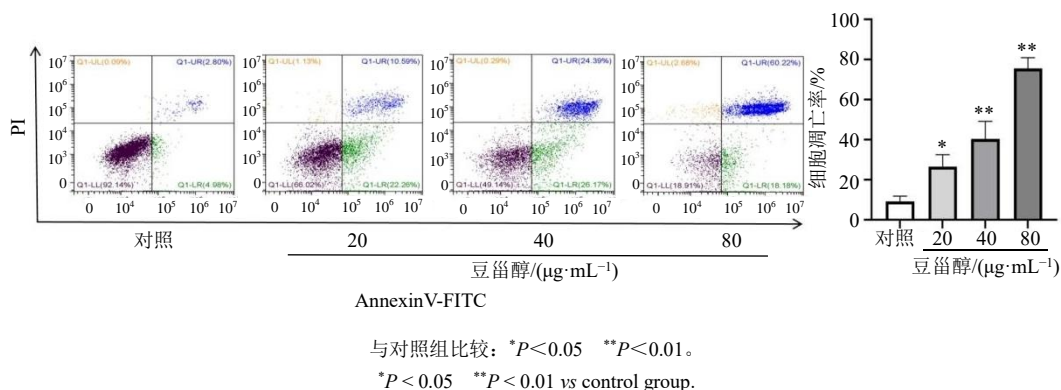


图 8 豆甾醇诱导 MDA-MB-231 细胞的凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Stigmaterol-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

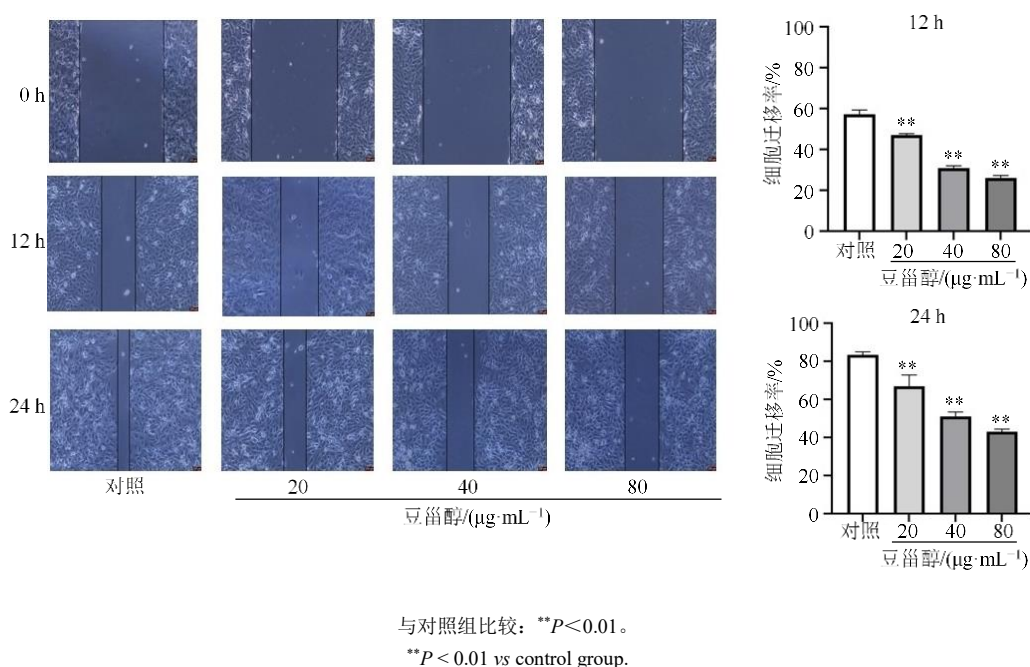


图 9 豆甾醇抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移 ($\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Stigmaterol inhibits the migration of MDA-MB-231 cells ($\times 200, \bar{x} \pm s, n=3$)

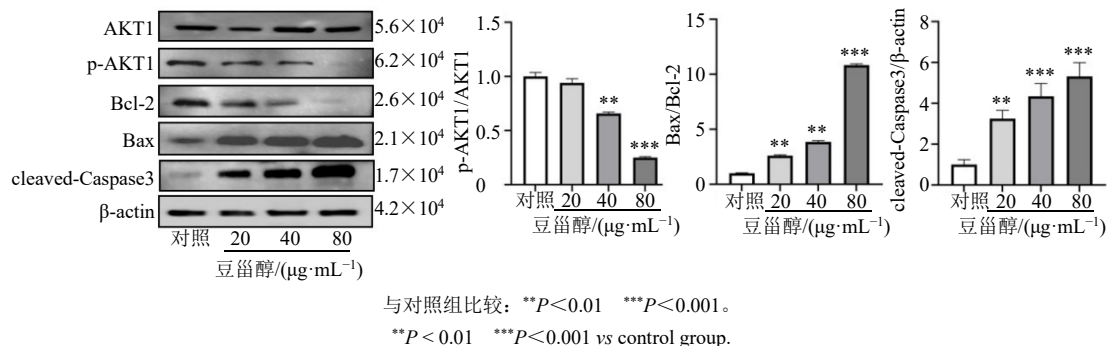


图 10 豆甾醇对 MDA-MB-231 细胞中 p-AKT1/AKT1、Bax/Bcl2、cleaved-Caspase3/β-actin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of stigmaterol on p-AKT1/AKT1, Bax/Bcl2 and cleave-caspase3/β-actin in MDA-MB-231 cells Effects on protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

乳腺癌在古代常被称为“乳岩”“乳核”“乳石痛”“妒乳”等,其发病与肝气郁结、气血亏虚、冲任失调以及热毒痰凝有关^[14]。中药能够通过多途径、多靶点来延缓或控制肿瘤细胞的生长增殖,包括抑制肿瘤生长的信号通路,改善肿瘤生长的微环境等^[15-16]。

本研究通过分析获得六味地黄丸的 3 个主要活性成分,分别为槲皮素、山柰酚及豆甾醇。有研究表明,槲皮素可通过抑制 MCF-7 细胞 AKT1/ β -Catenin 信号通路,促进乳腺癌细胞凋亡^[17];其次,山柰酚可能通过调控 Notch1、cleaved Caspase-3 蛋白表达,从而抑制乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖,并诱导其发生凋亡^[18];最后,豆甾醇可降低乳腺癌 MCF-7 细胞 Bcl-2 和 BCL-XL 基因的表达,诱导细胞凋亡,降低细胞增殖^[19]。说明六味地黄丸 3 种主要活性成分有助于乳腺癌的缓解和治疗。

药物-疾病交集靶点 PPI 网络提示 TP53、JUN、AKT1 是最重要的靶点。TP53 是位于人类 17 号染色体短臂 17p13.1 区域的抑癌基因,在炎症性乳腺癌中 TP53 突变显著富集,尤其是在人表皮生长因子受体-2 (HER2+) 和激素受体阳性 (HR+) 2 种亚型中;同时,突变也导致了肿瘤细胞转移活性增加^[20-21]。JUN 基因是 AP-1 转录因子亚单位,其缺失可能增强 PI3K/Akt 信号,进而增加 PTEN 缺失前列腺癌的进展;此外还可导致免疫细胞吸引减少,加速肿瘤的生长^[22]。AKT1 是一种属于 AGC 家族的丝氨酸/苏氨酸激酶,可磷酸化 ME2f1 增强体内外肿瘤细胞的糖酵解能力,为肿瘤生长提供了有利条件^[23]。

KEGG 分析发现“药物-疾病”交集靶点主要富集在 PI3K-Akt、AGE-RAGE、MAPK 等信号通路,且分子对接发现,豆甾醇与 AKT1 的结合能显著低于其他配体,表明两者结合最牢固。由此推断,豆甾醇可能是作用于 PI3K/Akt 信号通路进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、侵袭和迁移。p-AKT1 作为 AKT1 的活化形式,可作为乳腺癌 2 种亚型 HR+ 和 HER2+ 的不良预后指标,也能够增强曲妥珠单抗的治疗效果,甚至能克服部分耐药性^[24]。同时有研究发现,活化的 Akt1 通过上调 FBXO6 增强 U87 细胞的增殖、侵袭及抗凋亡能力;而抑制 AKT1 磷酸化可显著增加 Bax、减少 Bcl-2 的表达,诱导胃癌细胞凋亡并降低肺转移^[25-26]。本研究体外细胞实验发现豆甾醇可抑制 p-AKT1 及 Bcl-2 蛋白的表

达,并促进 Bax、cleaved-caspase3 蛋白的表达。因此,豆甾醇可能通过调控乳腺癌 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞增殖和促进凋亡。

本研究基于网络药理学方法筛选出了六味地黄丸治疗乳腺癌的活性成分及靶点,并利用分子对接预测了药物活性成分与核心靶点的结合稳定性,之后又通过体外细胞实验进一步验证了药物核心活性成分可能通过 PI3K/Akt 通路发挥抗乳腺癌作用。但本研究仅只关注了单一活性成分,忽视了中药复方多成分、多靶点的协同作用,且细胞实验缺乏体内代谢过程,未考察评估其药动力学、生物利用度等。下一步将采用动物实验,对复方成分及其余的关键靶点进行分析和验证,以期开发出治疗乳腺癌的药物提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭昊,吕青. 全球及中国乳腺癌的流行病学趋势及防控启示: 2018-2022 年《全球癌症统计报告》解读 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(7): 796-802.
Wu H, Lü Q. Epidemiological trends and implications of breast cancer prevention and control in China and the world: An interpretation of the Global Cancer Statistics Report 2018-2022 [J]. Chin J Bases Clin Gen Surg, 2024, 31(7): 796-802.
- [2] 李萍萍. 中医药治疗乳腺癌述评 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(11): 1616-1622.
Li P P. Review of traditional Chinese medicine treatment for breast cancer [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(11): 1616-1622.
- [3] Ho V W, Tan H Y, Guo W, et al. Efficacy and safety of Chinese herbal medicine on treatment of breast cancer: A Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(7): 1557-1575.
- [4] Liu H X, Lian L, Hou L L, et al. Herb pair of Huangqi-Danggui exerts anti-tumor immunity to breast cancer by upregulating PIK3R1 [J]. Animal Model Exp Med, 2024, 7(3): 234-258.
- [5] 易华, 苏俊芳, 李雪, 等. 基于 Cx32 探讨六味地黄丸增效自杀基因抗肝癌的缝隙连接机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 76-81.
Yi H, Su J F, Li X, et al. Mechanism of Liuwei Dihuangwan in enhancing hepatocarcinoma suicide gene therapy from Cx32 [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(1): 76-81.

- [6] 曹知勇, 陈静芹, 吴小芳, 等. 基于网络药理学探讨六味地黄丸治疗卵巢癌的作用机制 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(8): 1001-1009.
Cao Z Y, Chen J Q, Wu X F, et al. Study on the mechanism of Liuweidihuang Pill in the treatment of ovarian cancer based on bioinformatics [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2022, 39(8): 1001-1009.
- [7] 许晓霞, 王亚君, 喜雷, 等. 六味地黄丸联合醋酸亮丙瑞林治疗女童中枢性性早熟的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 878-883.
Xu X X, Wang Y J, Xi L, et al. Clinical study of Liuwei Dihuang Pills combined with leuporelin acetate in treatment of central precocious puberty in girls [J]. Drugs Clin, 2023, 38(4): 878-883.
- [8] Liu Y, Cui X, Zhang X M, et al. Exploring the potential mechanisms of Tongmai Jiangtang Capsules in treating diabetic nephropathy through multi-dimensional data [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1172226.
- [9] 郭紫文, 王艳, 陶伟伟, 等. 基于网络药理学、分子对接及细胞实验验证探讨藏红花素改善阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4712-4723.
Guo Z W, Wang Y, Tao W W, et al. Mechanism of crocin in improving Alzheimer's disease based on network pharmacology, molecular docking and cellular validation [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(13): 4712-4723.
- [10] 吴力超, 李俊峰, 张婷婷, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨豆甾醇抗炎作用 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 609-615.
Wu L C, Li J F, Zhang T T, et al. Exploring the anti-inflammatory effect of stigmasterol based on network pharmacology and cell experiments [J]. Chin Tradit Patent Med, 2022, 44(2): 609-615.
- [11] 李梦. 逍遥散有效成分豆甾醇和新型化合物通过 PI3K 信号通路抗卵巢癌的作用及机制研究 [D]. 石家庄: 河北中医学院, 2022.
Li M, Novel compounds DDTC, PCDH and Stigmasterol, the effective ingredient of Xiaoyao San (XYS), against ovarian cancer via PI3K signaling pathway [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Chinese Medicine, 2022.
- [12] 于春, 马燕花. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨豆甾醇抗肝细胞癌的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2025, 41(5): 867-873.
Yu C, Ma C H. Study on mechanism of Stigmasterol inhibiting hepatocellular carcinoma based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin Pharm Bulletin, 2025, 41(5): 867-873.
- [13] 刘苏, 陈洪晓, 金乐, 等. 整合网络药理学和体外实验探究夏枯草-半枝莲药对治疗乳腺癌的作用及机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(7): 1134-1142.
Liu S, Chen H X, Jin L, et al. The effect and mechanism of *Prunella vulgaris*-*Scutellaria barbata* herb pairs in the treatment of breast cancer by integrating network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(7): 1134-1142.
- [14] 王鲁娇, 李育林, 司文涛, 等. 中医药治疗乳腺癌内分泌耐药的研究进展 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2023, 5(5): 84-94.
Wang L J, Li Y L, Si W T, et al. Research progress in traditional Chinese medicine treatment for endocrine resistance in breast cancer [J]. J Oncol Chin Med, 2023, 5(5): 84-94.
- [15] 陈虎虎, 周姣含, 邱倩, 等. 中医药治疗乳腺癌的研究进展 [J]. 西部中医药, 2023, 36(12): 152-155.
Chen H H, Zhou J H, Qiu Q, et al. The research progress of traditional Chinese medicine treatment of breast cancer [J]. West J Tradit Chin Med, 2023, 36(12): 152-155.
- [16] 杨国旺. 乳腺癌中西医结合治疗研究进展 [J]. 北京中医药, 2024, 43(1): 2-6.
Yang G W. Treatment and research progress of integrated traditional Chinese medicine and western medicine for breast cancer [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2024, 43(1): 2-6.
- [17] 陈洪晓, 刘苏, 金乐, 等. 基于网络药理学探讨平消胶囊通过 AKT1/ β -catenin 信号促进乳腺癌凋亡的作用机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28(12): 1321-1330.
Chen H X, Liu S, Jin L, et al. Mechanism of Pingxiao capsule promoting breast cancer apoptosis through AKT1/ β -catenin signal based on network pharmacology [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2023, 28(12): 1321-1330.
- [18] 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.
Li Y F, Zeng S B, Qiu H P, et al. Effect and mechanism of kaempferol on proliferation and apoptosis of breast cancer cells [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(22): 3679-3682.
- [19] AmeliMojarad M, AmeliMojarad M, Pourmahdian A. The inhibitory role of stigmasterol on tumor growth by inducing apoptosis in Balb/c mouse with spontaneous

- breast tumor (SMMT) [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2022, 23(1): 42.
- [20] Priedigkeit N, Harrison B, Shue R, et al. Clinicogenomic characterization of inflammatory breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2025, 31(14): 3072-3083.
- [21] Chakraborty R, Dutta A, Mukhopadhyay R. TP53 mutations and MDM2 polymorphisms in breast and ovarian cancers: Amelioration by drugs and natural compounds [J]. Clin Transl Oncol, 2025, 27(7): 2789-2800.
- [22] Redmer T, Raigel M, Sternberg C, et al. JUN mediates the senescence associated secretory phenotype and immune cell recruitment to prevent prostate cancer progression [J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 114.
- [23] Chen T Q, Xie S Y, Cheng J, et al. AKT1 phosphorylation of cytoplasmic ME2 induces a metabolic switch to glycolysis for tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 686.
- [24] Kim J Y, Park C S, Jang S K, et al. The significance of p-AKT1 as a prognostic marker and therapeutic target in patients with hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor-2-positive early breast cancer [J]. J Breast Cancer, 2022, 25(5): 387-403.
- [25] 高彩月, 曹丹丹, 倪思琦, 等. Akt1 上调 FBXO6 表达对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2025, 45(6): 777-785.
- Gao C Y, Cao D D, Ni S Q, et al. The effects of Akt1 upregulated FBXO6 expression on the proliferation and invasive of glioma cells [J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2025, 45(6): 777-785.
- [26] Wu X R, Li Y F, Wang W W, et al. DRAM1 enhances the proliferation and metastasis of gastric cancer through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and energy metabolism [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 3542.

[责任编辑 齐静雯]