

异甘草素联合阿霉素调控上皮-间质转化抑制三阴性乳腺癌侵袭转移的作用机制

姚 瑛¹, 何雅宁², 左 凤³, 鲁曜铭⁴, 陈红梅^{3*}

1. 宁夏回族自治区人民医院(宁夏医科大学附属医院自治区人民医院) 药学部, 宁夏 银川 750004
2. 天水市中西医结合医院 药剂科, 甘肃 天水 741020
3. 石河子大学 药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832003
4. 石河子市人民医院 放射科, 新疆 石河子 832000

摘要: **目的** 探究异甘草素联合阿霉素对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭和转移的作用机制。**方法** MTT 实验检测异甘草素(10、20、30、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合阿霉素(0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞活力的影响;通过流式细胞术、划痕及 Transwell 侵袭实验分别分析异甘草素(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、阿霉素(1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、异甘草素(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合阿霉素(1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞周期及侵袭能力的影响;Western blotting 检测细胞周期关键蛋白表达;应用转录组学筛选异甘草素联合阿霉素作用于 TNBC 细胞的信号通路,并通过分子对接及 Western blotting 对筛选结果进行验证。**结果** 与对照组相比,异甘草素和阿霉素呈时间和浓度相关性抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖($P<0.05$ 、 0.01),所选浓度组合均表现出协同作用,其对应的联合指数(CI)值均小于 1;当阿霉素浓度为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、异甘草素浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,CI 值达到最低(0.62),协同效应最强。流式细胞术显示异甘草素+阿霉素处理可将细胞阻滞于 S 期,且对 P53 蛋白的上调及 CCND1 蛋白的下调作用显著($P<0.05$ 、 0.01),效果优于单药组。划痕及 Transwell 实验表明,联合用药组抑制细胞迁移及侵袭的抑制作用较单药组更为明显($P<0.01$)。Western blotting 显示,与对照组比较,联合用药组 Vimentin、 β -catenin 表达减少, E-cadherin 表达升高($P<0.05$ 、 0.01),效果优于单药组。转录组分析发现 PI3K-Akt 通路调节上皮-间质转化可能参与联合用药组对 MDA-MB-231 细胞的调节作用;分子对接实验验证,异甘草素+阿霉素组与 PI3K、Akt 靶蛋白的结合能均显著低于单独用药组;Western blotting 结果表明,与对照组比较,异甘草素、阿霉素单独或联合处理 MDA-MB-231 细胞后可抑制 p-PI3K、p-Akt 的表达,联合用药组和异甘草素组差异显著($P<0.05$ 、 0.01),联合给药组作用最明显。**结论** 异甘草素能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,调控 EMT 相关蛋白,从而增效阿霉素抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与迁移的作用。

关键词: 异甘草素;阿霉素;三阴性乳腺癌;侵袭;转移;上皮-间质转化

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)07-2346-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.07.008

Mechanistic study on isoliquiritigenin combined with doxorubicin inhibiting invasion and metastasis of triple-negative breast cancer by regulating epithelial-mesenchymal transition

YAO Ying¹, HE Yaning², ZUO Feng³, LU Yaoming⁴, CHEN Hongmei³

1. Pharmacy Department, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region (Affiliated People's Hospital of Ningxia Medical University), Yinchuan 750004, China
2. Pharmacy Department, Tianshui Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tianshui 741020, China
3. Key Laboratory of Xinjiang Plant Drug Resources Utilization, Ministry of Education, College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China
4. Radiology Department, Shihezi People's Hospital, Shihezi 832000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which isoliquiritigenin combined with doxorubicin affects invasion and metastasis of triple-negative breast cancer (TNBC) MDA-MB-231 cells. **Methods** The effect of isoliquiritigenin (10, 20, 30, and

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(2023AAC03479)

作者简介: 姚 瑛, 研究方向为药理学。E-mail: yaoying1017@sohu.com

*通信作者: 陈红梅, 教授。E-mail: melissa821@foxmail.com

40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) combined with doxorubicin (0.5, 1.0, and 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell viability was assessed using the MTT assay. Flow cytometry, scratch, and Transwell invasion assays were used to analyze the effects of isoliquiritigenin (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), doxorubicin (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and their combination (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ isoliquiritigenin + 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ doxorubicin) on cell cycle progression and invasive capacity. Western blotting was performed to detect expression of key cell cycle proteins. Transcriptomics was applied to screen signaling pathways involved in the action of isoliquiritigenin plus doxorubicin on TNBC cells, and molecular docking and Western blotting were used to validate the results. **Results** Compared with the control group, both isoliquiritigenin and doxorubicin inhibited proliferation of MDA-MB-231 cells in a time- and concentration-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$). All selected concentration combinations showed synergistic effects, with corresponding combination index (CI) values all less than 1. The lowest CI value (0.62), indicating the strongest synergistic effect, was observed at 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ doxorubicin and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ isoliquiritigenin. Flow cytometry revealed that treatment with isoliquiritigenin plus doxorubicin arrested cells in the S phase and significantly upregulated P53 protein while downregulating CCND1 protein ($P < 0.05, 0.01$), with effects superior to those of single-agent treatments. Scratch and Transwell assays demonstrated that the combination therapy more effectively suppressed cell migration and invasion compared to monotherapy ($P < 0.01$). Western blotting showed that, compared with the control group, the combination group exhibited reduced expression of Vimentin, β -catenin and increased expression of E-cadherin ($P < 0.05, 0.01$), with better outcomes than either single agent. Transcriptomic analysis suggested that the PI3K-Akt pathway regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) may be involved in the regulatory effects of the combination on MDA-MB-231 cells. Molecular docking confirmed that the binding energies of isoliquiritigenin and doxorubicin to PI3K and Akt target proteins were significantly lower in the combination group than in the single-agent groups. Western blotting results indicated that, compared with the control group, isoliquiritigenin, doxorubicin, or their combination significantly suppressed p-PI3K and p-Akt expression, with the most pronounced differences observed between the combination group and the control group ($P < 0.05, 0.01$), showing the strongest effect in the combination group. **Conclusion** Isoliquiritigenin enhances the anti-proliferative and anti-migratory effects of doxorubicin on MDA-MB-231 cells by inhibiting the PI3K-Akt signaling pathway and modulating EMT-related proteins.

Key words: isoliquiritigenin; doxorubicin; triple negative breast cancer (TNBC); invasion; metastasis; epithelial-mesenchymal transition

三阴性乳腺癌 (TNBC) 占有乳腺癌病例类型的 15%~20%, 与其他亚型相比, 具有分化差, 侵袭和转移率高等特点, 总体生存率明显低于非 TNBC 乳腺肿瘤患者^[1]。TNBC 患者发生转移后, 术后中位无进展生存期不足 2 年, 3 年生存率仅 16.7%^[2]。以阿霉素为基础的化疗方案, 仍是 2025 年中国临床肿瘤学会 (CSCO) 指南推荐的 TNBC 标准治疗手段^[3]。阿霉素为蒽环类抗肿瘤药物, 主要通过抑制 DNA 复制和 RNA 转录抑制肿瘤生长, 而其心脏毒性以及耐药限制了临床应用。因此, 需要开展更多研究, 探索与阿霉素协同作用的药物, 以期克服耐药性并增强疗效。

上皮-间质转化 (EMT) 是一种细胞表型转换过程, 以上皮标志物如 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 下调, N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 等上调, 及 *Snail*、*Slug* 等转录激活为特征^[4], 肿瘤细胞发生 EMT 后, 细胞间黏附降低、运动与侵袭能力增强, 直接促进肿瘤侵袭、扩散及远处转移^[5]。因此, 逆转这种 EMT 状态可以降低肿瘤的侵袭和转移能力, 从而改善治疗效果。

近年来, 天然活性化合物与化疗药物的联合策

略因能协同增效, 成为 TNBC 治疗研究的热点方向, 其中异甘草素是从甘草中分离得到的黄酮类化合物, 具有抗氧化^[6-7]、免疫调节^[8]、抗肿瘤^[9-10]等多种生物学功能。异甘草素单用或联用阿霉素均可增强如口腔癌^[11]、白血病^[12]、乳腺癌^[13]等化疗效果。此外, 异甘草素还能显著降低化疗药物的不良反应, 如降低阿霉素心脏毒性^[14-16]、肝脏毒性^[17]。本研究评估了异甘草素联合阿霉素对 TNBC 增殖、凋亡及侵袭能力的影响, 并进一步通过检测 EMT 进程中的相关蛋白表达, 以期阐明两药联合抑制转移的作用机制。

1 材料

1.1 药物与主要试剂

异甘草素 (批号 B21525, 质量分数 98.0%, 上海源叶生物科技有限公司); 胎牛血清 (批号 16140071)、L-15 培养基 (批号 11415064), Gibco 公司; MTT 粉末 (批号 M8180, 北京索莱宝科技有限公司); 细胞级二甲基亚砜 (批号 D2650, Sigma-Aldrich 公司); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1052)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0012)、Trizol (批号 343903), 碧云天生物技术

有限公司; β -actin 抗体(批号 81115-1-RR)、P53 抗体(批号 60283-2-Ig)、P27 抗体(批号 25614-1-AP)、ECL 发光试剂盒(批号 PK10002)、波形蛋白(Vimentin, 批号 10366-1-AP)、E-cadherin, 批号 20874-1-AP)、 β -连环蛋白(β -catenin, 批号 51067-2-AP)、磷酸肌醇 3-激酶(PI3K, 批号 60225-1-Ig)、Akt(批号 10176-2-AP)、p-Akt(批号 28731-1-AP)购自 proteintech 公司; 周期蛋白依赖性激酶(CDK2)抗体(批号 D199431)、细胞周期素 D1(CCND1)抗体(批号 D160236)、细胞周期检查点激酶 1(Chk1)抗体(D160169)购自上海生物工程公司; 转化生长因子- β 1(TGF- β 1)(批号 BF8012)、Smad2/3(批号 AF6367)、p-Smad2/3(批号 AF3367)购自 Affinity 公司。

1.2 细胞培养

人 TNBC 细胞 MDA-MB-231, 购自中国科学院上海细胞库。将 MDA-MB-231 细胞株置于 37 °C、无 CO₂ 培养箱中, 并使用 L-15 完全培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素)培养细胞, 平均 2~3 d 换 1 次液, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 主要仪器

BD FACSLyric 流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特有限公司; DYCZ-MINI4 型电泳仪, 北京六一公司; Varioskan LUX 酶标仪、EVOS XL Core 倒置显微镜, 美国赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 细胞存活率检测

采用 MTT 法测定在不同浓度条件下异甘草素、阿霉素单独作用对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响。收集对数期细胞, 接种到 96 孔板(每孔 1.5×10^4 个)中待细胞贴壁后, 加入不同浓度梯度的异甘草素(20、40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、阿霉素(1、2、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)继续培养 24、48 h, 对照组不加药, 向每孔中加入 10 μL MTT 溶液, 避光孵育 4 h 后, 弃掉上清液, 向每个孔中加入 100 μL 的二甲基亚砷溶解甲瓖结晶。最后, 使用酶标仪在 490 nm 测量吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 联合作用效果的评估

将异甘草素(10、20、30、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与阿霉素(0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行配对, 形成 12 种不同的浓度组合(异甘草素/阿霉素: 10/0.5、

20/0.5、30/0.5、40/0.5、10/1.0、20/1.0、30/1.0、40/1.0、10/2.0、20/2.0、30/2.0、40/2.0), MTT 法检测联合作用 48 h 的细胞存活率, 方法同“2.1”项, 采用 CompuSyn 软件计算联合用药作用之后的联合指数(CI)值, 当 $\text{CI} < 1$ 时表示 2 药有协同作用, $\text{CI} = 1$ 时表示加性作用, $\text{CI} > 1$ 时表示 2 药有拮抗作用。

2.3 细胞周期的测定

收集对数期细胞, 以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后加入异甘草素(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、阿霉素(1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、异甘草素(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 阿霉素(1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 48 h, 对照组不加药, 将细胞收集到 1.5 mL 离心管中, 用 70% 乙醇固定细胞 24 h。用碘化丙啶(PI)染色液缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 °C 避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测药物处理后的细胞周期分布。

2.4 伤口愈合

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后用 200 μL 无菌枪头在孔中垂直刮擦细胞, 清洗悬浮细胞后, 给药方式同“2.3”项, 在倒置显微镜下观察 0、48 h 的细胞划痕并拍照, 以测量划痕宽度并计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{0 h 划痕宽度} - \text{48 h 划痕宽度}) / \text{0 h 划痕宽度}$$

2.5 Transwell 小室检测细胞侵袭

胰酶消化细胞后用 L-15 完全培养基收集于离心管中, 800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后弃去上清, 加入 L-15 不完全培养基重悬, 进行细胞计数, 将细胞悬液稀释成浓度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 24 孔板; 向 24 孔板中加入 L-15 完全培养基, 将小室放于上方; 给药方式同“2.3”项, 在 37 °C, 无 CO₂ 培养箱中继续培养 48 h 后, 取出 24 孔板, 吸去小室中及下层的培养基, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 清洗, 加入 0.1% 结晶紫, 染色 30 min, 洗去多余染液, 擦去小室内层的细胞, 小室干燥后, 于显微镜下观察拍照, 并通过 Image J 软件计数, 每组实验组重复 3 次。

2.6 Western blotting 检测

细胞接种及给药方式同“2.3”项, 裂解并定量蛋白总浓度, 经 10% 或 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 随后转移至 PVDF 膜, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中摇晃封闭, 加入蛋白特异性一抗 4 °C 孵育 18 h, 相应二抗室温孵育 1.5 h, ECL 发光试剂盒显

色,放入成像系统曝光显影并拍照,用 Image J 软件分析蛋白条带并计算灰度值。一抗包括 P53、P27、CCND1、CDK2、Vimentin、E-cadherin、 β -catenin、PI3K、Akt、p-Akt、 β -actin。

2.7 RNA-seq

细胞接种及给药方式同“2.3”项,采用 Trizol 试剂提取各组 RNA,每组平行重复 3 次。委托深圳华大基因股份有限公司使用 BGISEQ 平台进行测序服务,使用 DESeq2 对各组进行差异基因表达分析,筛选差异表达基因的条件为: $|\log_2\text{fold change}| > 2$, 且 $P < 0.05$ 。将差异基因与 dbEMT2.0 数据库中 EMT 相关基因取交集得到 EMT 相关差异基因并进行后续京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。

2.8 分子对接

异甘草素、阿霉素的三维结构从 PubChem 数据库中获得, CID 分别为 638278、31703, PI3K、

Akt、TGF β 的三维结构是从 RCSB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获得, PDB ID 依次为: 4J6I、2JDR、3KFD。通过 AutoDock Vina 进行分子对接计算结合能,并使用 PyMOL 进行可视化分析。

2.9 数据统计

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad 8.0.2 统计软件,组间比较用单因素方差分析,采用 Tukey 进行多重比较检验。

3 结果

3.1 异甘草素、阿霉素对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响

结果如图 1 所示,与对照组相比,异甘草素和阿霉素呈时间和浓度相关性抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01),异甘草素作用 24、48 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (51.47 ± 4.16)、(49.40 ± 2.36) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,阿霉素作用 24、48 h IC_{50} 分别为 (32.70 ± 11.13)、(4.79 ± 1.21) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

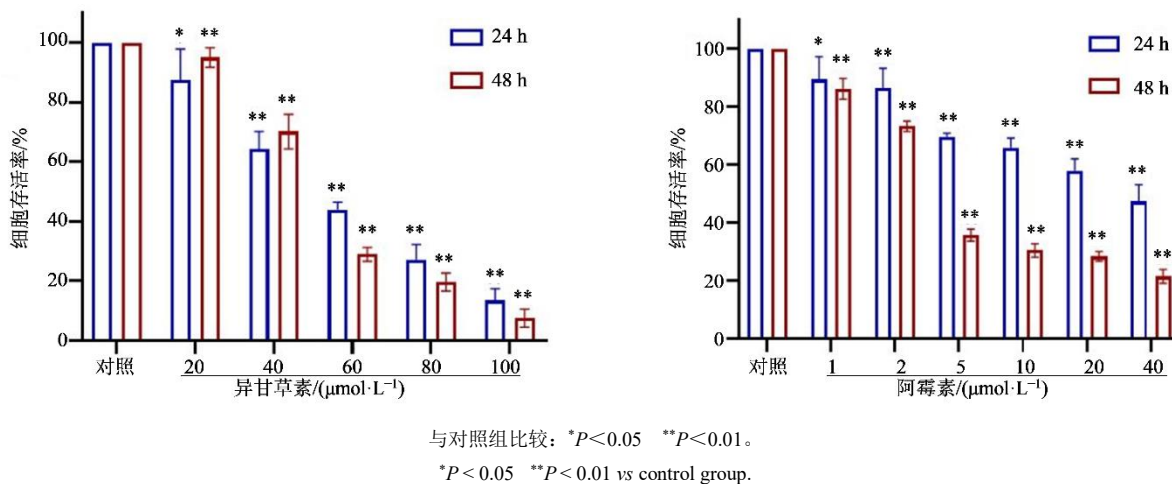


图 1 异甘草素、阿霉素对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effects of isoliquiritigenin and doxorubicin on viability of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 异甘草素提高阿霉素对 MDA-MB-231 细胞的抗肿瘤活性

采用完全交叉设计的给药方式,检测异甘草素与阿霉素联合处理对 MDA-MB-231 细胞活力的影响,结果如图 2 所示,与异甘草素、阿霉素单独给药组相比,异甘草素与阿霉素联合治疗组的细胞存活率进一步降低,提示二者对 MDA-MB-231 细胞可能具有协同抑制作用。为进一步明确联合用药的协同效应,采用 Compusyn 软件计算 CI 值,结果显示,所选浓度组合均表现出协同作用,其对应的 CI 值均小于 1。其中,当阿霉素浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、异

甘草素浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CI 值达到最低 (0.62),协同效应最强。基于上述结果,选择异甘草素:阿霉素=20:1 的浓度比进行后续的实验研究。

3.3 异甘草素、阿霉素单独或联合使用对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

鉴于异甘草素和阿霉素对 TNBC 细胞的协同生长抑制作用,接下来检测该药物组合对细胞周期的影响。 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异甘草素和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿霉素单用或联合处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,采用流式细胞术检测细胞周期,结果显示 (图 3),与对照组相比,阿霉素、异甘草素+阿霉素组 MDA-MB-

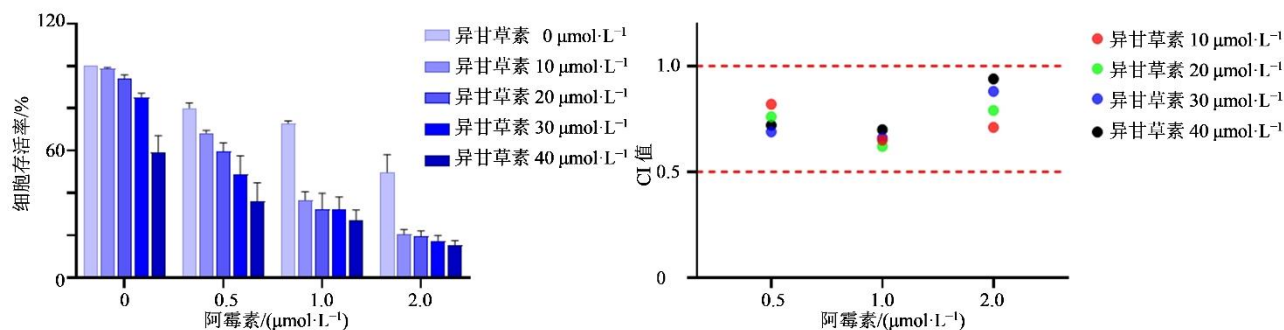


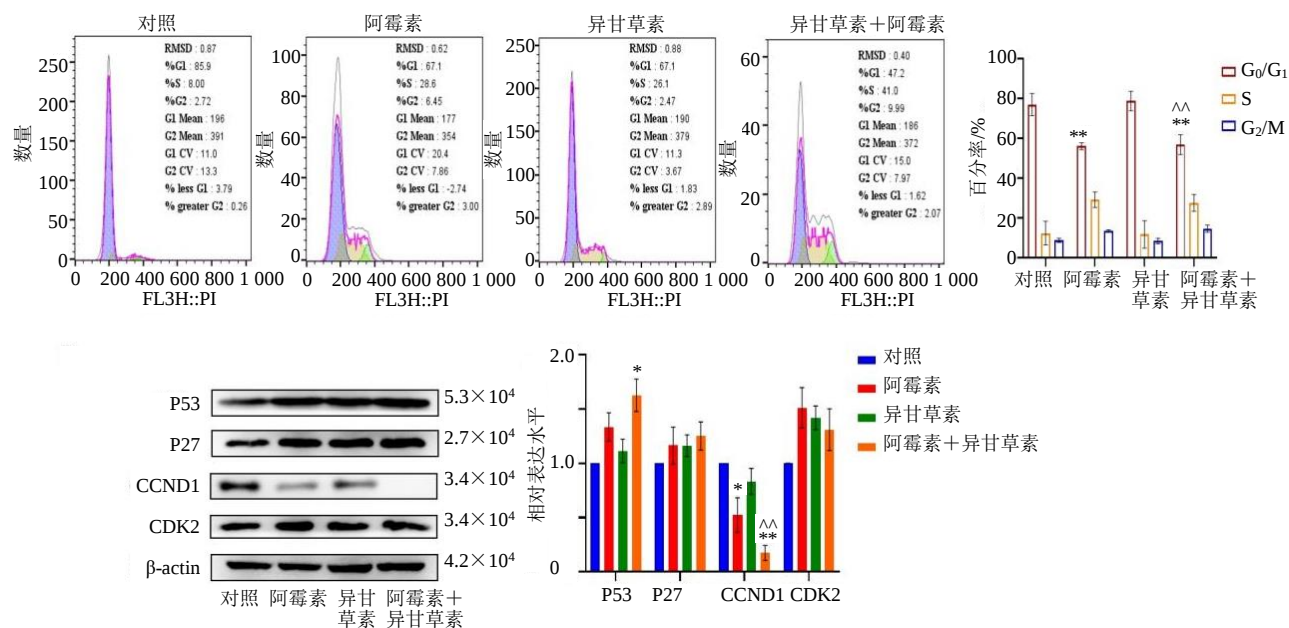
图 2 异甘草素联合阿霉素作用 48 h 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响和 CI 值 ($n=3$)

Fig. 2 Effects of isoliquiritigenin combined with doxorubicin treatment for 48 h on viability of MDA-MB-231 cells and CI values ($n=3$)

231 细胞 G_0/G_1 期比例显著下降 ($P<0.01$), S 期比例呈增加趋势, 异甘草素与阿霉素联合作用细胞后 G_0/G_1 期比例降至 50%。结果表明异甘草素联合阿霉素将 MDA-MB-231 细胞周期阻滞于 S 期。

通过 Western blotting 检测相关蛋白表达发

现, 与对照组比较, 异甘草素、阿霉素单独或联合作用上调 P53、P27、CDK2 的表达, 下调 CCND1 的表达, 且联用后上调结果更明显, 联用组 P53, 阿霉素组、联用组 CCND1 差异显著 ($P<0.05$ 、0.01)。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与异甘草素组比较: ^^ $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; ^^ $P<0.01$ vs isoliquiritigenin group.

图 3 异甘草素联合阿霉素对 MDA-MB-231 细胞周期及相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of isoliquiritigenin combined with doxorubicin on cell cycle and related protein expression in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 异甘草素联合阿霉素协同减少 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭

分别采用划痕实验和 Transwell 实验明确异甘草素和阿霉素单用及联用对 MDA-MB-231 细胞转移和侵袭能力的影响。划痕实验结果显示 (图 4),

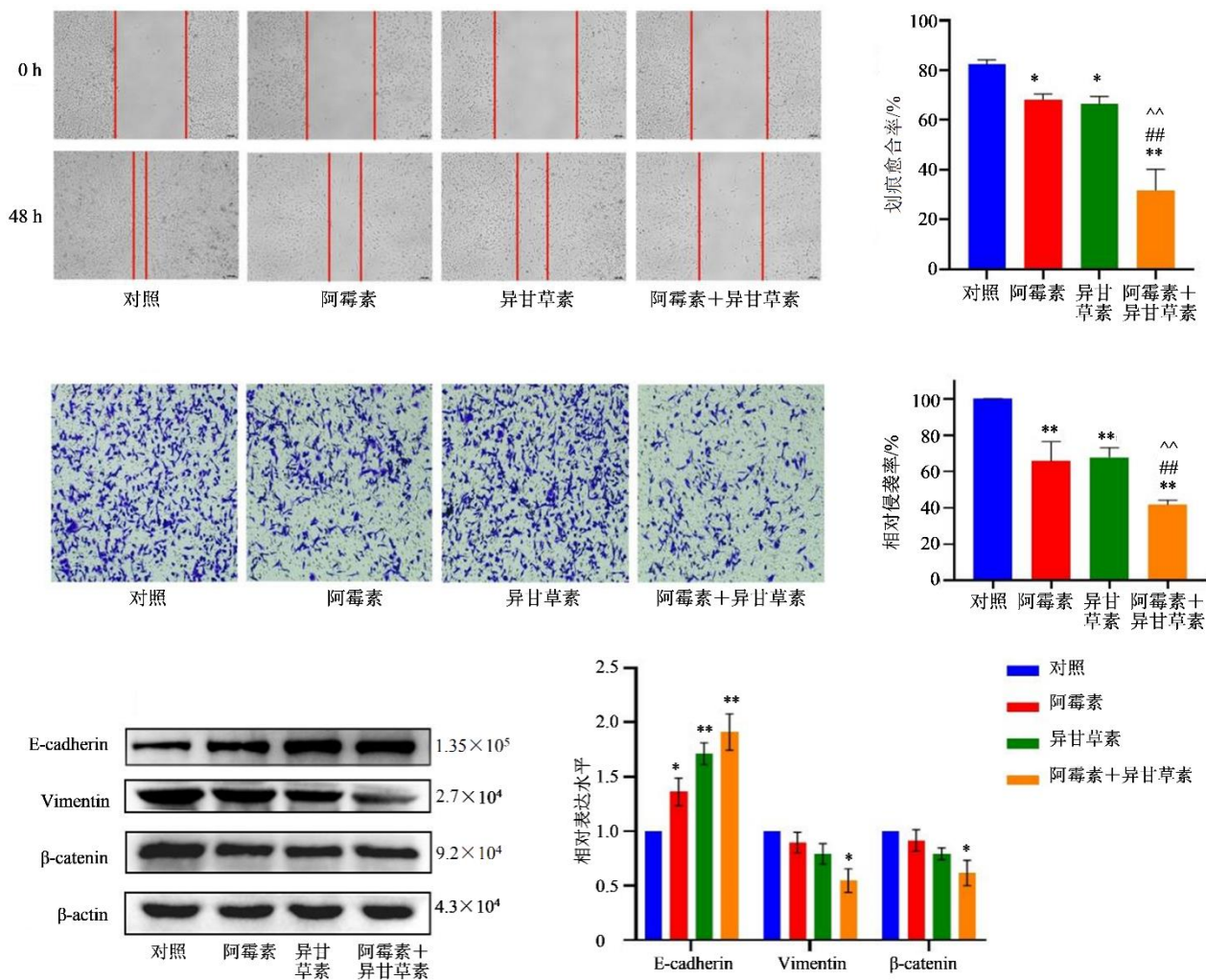
对照组向划痕边缘迁移速度较快, 培养结束后划痕基本愈合, 愈合率为 (82.10 ± 1.61)%; 与对照组相比, 异甘草素或阿霉素单独处理均能明显抑制细胞迁移, 划痕愈合率分别为 (68.13 ± 2.32)% ($P<0.05$)、(66.42 ± 3.03)% ($P<0.05$)。联用组与

单药组相比,对细胞迁移的抑制作用进一步增强,划痕愈合率降至 $(32.63 \pm 8.90)\%$ ($P < 0.01$)。

Transwell 实验结果显示(图 4),对照组穿室膜细胞数量最多。与对照组相比,异甘草素和阿霉素单独作用均能抑制细胞的迁移侵袭,侵袭率分别为 $(65.69 \pm 10.82)\%$ 、 $(67.80 \pm 5.28)\%$ ($P < 0.01$)。两药联用后,抑制效果更为显著,细胞侵袭率为 $(41.79 \pm 2.45)\%$ ($P < 0.01$),且与单药组相比均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

进一步采用 Western blotting 法检测 MDA-MB-231 细胞中与 EMT 相关的生物标志物蛋白表达。结果表明(图 4),与对照组比较,异甘草素或阿霉素单独处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可抑制 Vimentin、 β -catenin 的表达,促进 E-cadherin 表达;联合用药组 Vimentin、 β -catenin 表达进一步减少, E-cadherin 表达进一步增加,与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

结果表明异甘草素联合阿霉素协同减少 MDA-



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与异甘草素组比较: ^^ $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^^ $P < 0.01$ vs isoliquiritigenin group.

图 4 异甘草素联合阿霉素对 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

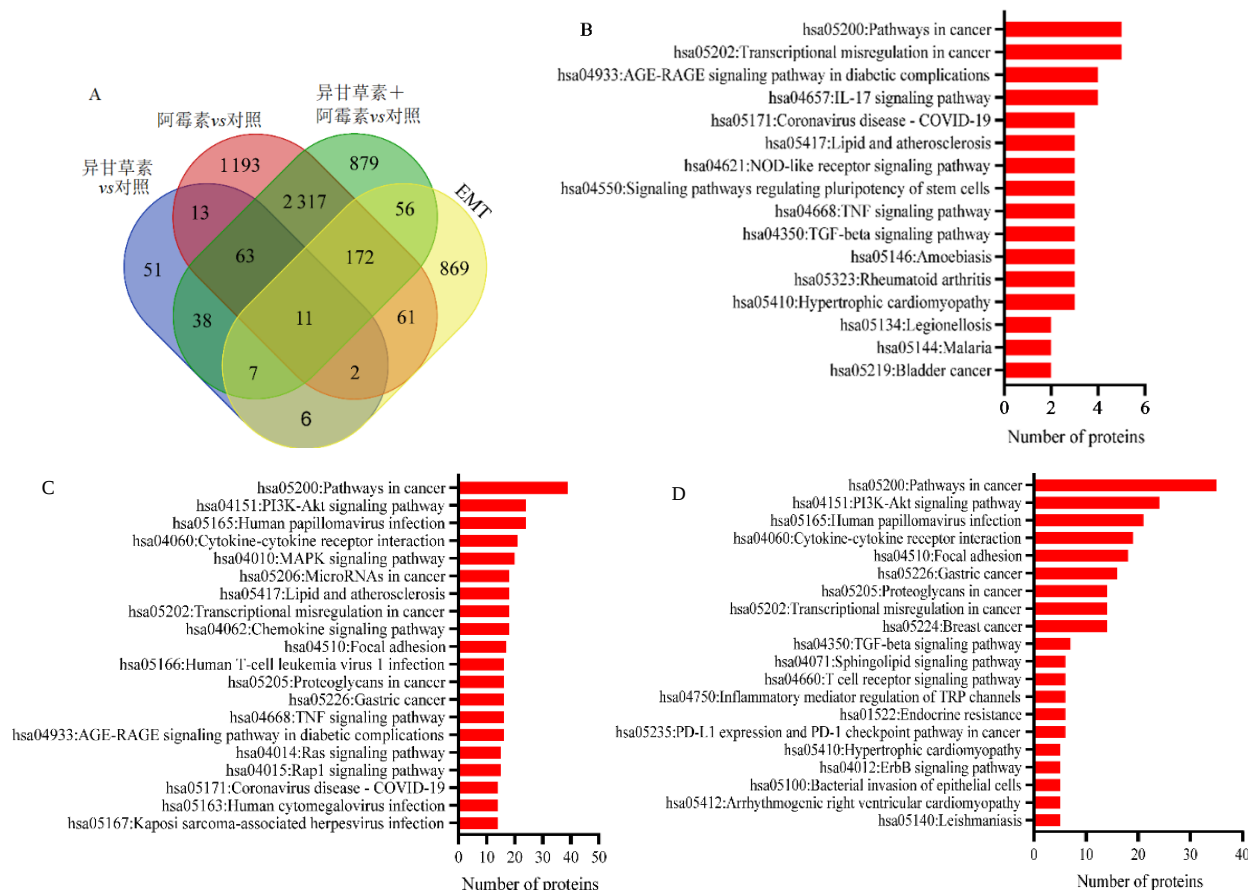
Fig. 4 Effects of isoliquiritigenin combined with doxorubicin on wound healing in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MB-231 细胞的迁移和侵袭。

3.5 异甘草素联合阿霉素对 MDA-MB-231 细胞的转录组影响分析

与对照组相比,阿霉素组、异甘草素组、联用组分别有 3 832 个、191 个、3 543 个差异表达基因

(DEGs) (图 5-A); 进一步的通路富集分析显示,异甘草素组 EMT 相关 DEGs 显著富集于 TGF- β 信号通路(图 5-B),阿霉素组富集于 PI3K-Akt 信号通路及病灶黏附(图 5-C),异甘草素+阿霉素组则同时富集于病灶黏附和 PI3K-Akt 信号通路(图



A-异甘草素单用或联合阿霉素与 EMT 相关差异基因韦恩图; B-异甘草素与 EMT 相关差异基因 KEGG 富集信号通路; C-阿霉素与 EMT 相关差异基因 KEGG 富集信号通路; D-异甘草素+阿霉素与 EMT 相关差异基因 KEGG 富集信号通路。

A-Venn diagram of differentially expressed genes related to EMT when using isoliquiritigenin alone or in combination with doxorubicin; B-KEGG enriched signaling pathways of differentially expressed genes related to EMT when using isoliquiritigenin; C-KEGG enriched signaling pathways of differentially expressed genes related to EMT when using doxorubicin; D-KEGG enriched signaling pathways of differentially expressed genes related to EMT when using isoliquiritigenin in combination with doxorubicin.

图 5 异甘草素单用或联合阿霉素与 EMT 相关差异基因及富集分析

Fig. 5 Analysis of EMT-related differential genes and enrichment when isoliquiritigenin used alone or in combination with doxorubicin

5-D)。其中, PI3K-Akt 信号通路表达差异最为显著, 提示其可能是异甘草素联合阿霉素协同抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭与转移的关键机制, 后续实验将围绕 PI3K-Akt 信号通路进行验证。

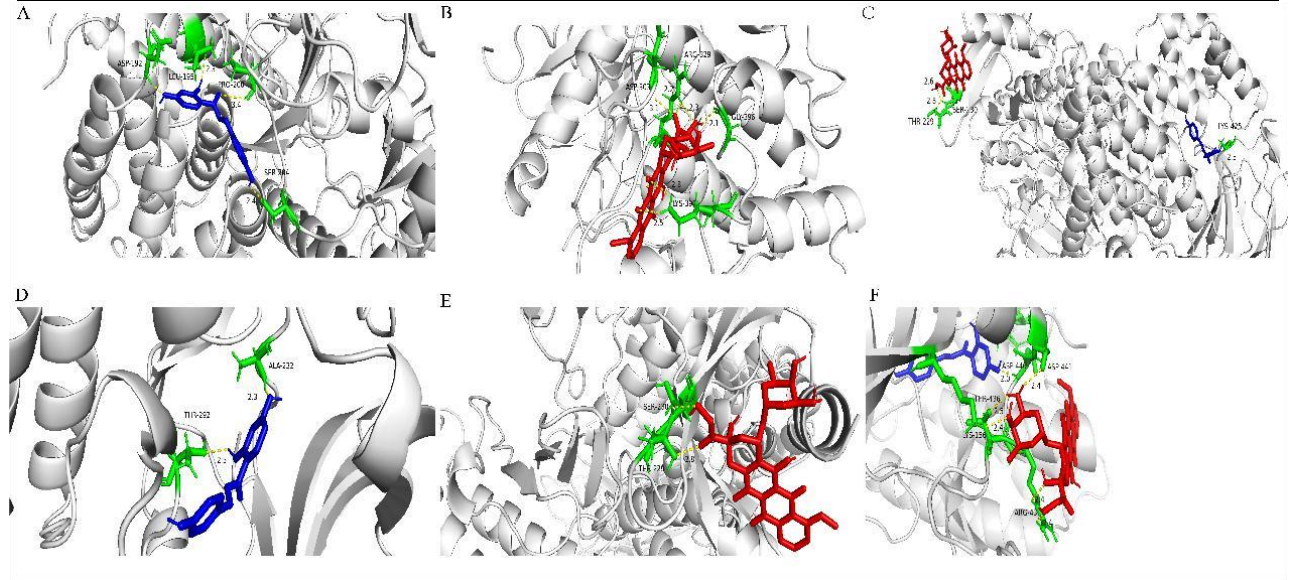
3.6 分子对接再验证异甘草素、阿霉素在靶蛋白上的协同作用

为进一步探讨异甘草素、阿霉素及二者联合作用于 PI3K、Akt 蛋白的潜在分子机制, 本研究采用分子对接技术进行结合模式分析, 结果见表 1、图 6。异甘草素、阿霉素及二者联合用药组均可与 PI3K (4J6I)、Akt (2JDR) 蛋白形成稳定的分子结合。异甘草素与 PI3K、Akt 的结合能分别为-28.87、-37.66 kJ·mol⁻¹; 阿霉素与上述蛋白的结

合能分别为-31.80、-32.64 kJ·mol⁻¹。异甘草素+阿霉素联合组与各靶蛋白的结合能均显著低于单独用药组, 结合能分别低至-45.73、-50.12 kJ·mol⁻¹, 提示联合用药可与靶蛋白形成更稳定的结合构象。在结合残基方面, 异甘草素主要与 SER-204、PRO-200、LEU-195、ALA-232、THR-292 等残基相互作用; 阿霉素主要与 THR-229、SER-230、LYS-390、GLY-396、ARG-329 等残基形成相互作用; 而异甘草素+阿霉素联合组可通过 LYS-425、ARG-437、THR-436、ARG-108 等关键残基与靶蛋白结合, 进一步提示异甘草素与阿霉素联用可能通过增强与 PI3K-Akt 通路关键蛋白的结合能力, 从而发挥更优的抗肿瘤效应。

表 1 分子对接中的结合能与结合位点相互作用残基

Table 1 Binding energy and binding site interaction residues in molecular docking			
配体小分子	受体蛋白	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	结合位点残基
异甘草素	PI3K (4J6I)	-28.87	SER-204、PRO-200、LEU-195、ASP-192
	Akt (2JDR)	-37.66	ALA-232、THR-292
阿霉素	PI3K (4J6I)	-31.80	THR-229、SER-230
	Akt (2JDR)	-32.64	LYS-390、GLY-396、ARG-329、ASP-303、GLY-328
异甘草素+阿霉素	PI3K (4J6I)	-45.73	LYS-425、THR-229、SER-230
	Akt (2JDR)	-50.12	AGR-437、THR-436、LYS-156、ASP-441、ASP-440、ASP-441



A~C-异甘草素、阿霉素、异甘草素+阿霉素与 PI3K 对接模式图；D~F-异甘草素、阿霉素、异甘草素+阿霉素与 Akt 对接模式图；蓝色代表异甘草素、红色代表阿霉素。
A-C-Docking mode diagrams of isoliquiritigenin, adriamycin, and isoliquiritigenin + adriamycin with PI3K; D-F-Docking mode diagrams of isoliquiritigenin, adriamycin, and isoliquiritigenin + adriamycin with Akt; blue represents isoliquiritigenin, and red represents adriamycin.

图 6 分子对接模式图
Fig. 6 Molecular docking patterns

3.7 异甘草素联合阿霉素显著抑制 PI3K-Akt 信号通路激活

为进一步确证异甘草素联合阿霉素抑制 MD-MB-231 细胞发生侵袭、转移的作用机制，检测了相关蛋白（图 7）。与对照组比较，异甘草素或阿霉素单独处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后可抑制 p-PI3K、p-Akt 的表达，联合用药组和异甘草素组差异显著（ $P<0.05、0.01$ ），联合给药组作用最明显。

4 讨论

与单药化疗相比，联合化疗方案在 TNBC 治疗中展现出更优的临床疗效，但部分患者仍出现原发性或获得性耐药，且联合用药常伴随更严重的骨髓抑制、胃肠道反应及心脏毒性等不良反应，因此亟需探索更合理的联合治疗策略以提升疗效并降低毒性。研究证实，异甘草素与化疗药物具有协同抗

肿瘤作用^[18]，减少抗肿瘤治疗的副反应，如 Zhang 等^[19]研究表明，异甘草素通过 p38 MAPK 信号通路阻断自噬，协同增强吉西他滨对胰腺癌的杀伤作用，同时动物实验结果显示异甘草素联用组中性粒细胞减少、贫血、体质量下降等不良反应显著少于化疗单药组。在本研究中，转录组学结果发现 PI3K-Akt 信号通路表达在阿霉素+异甘草素组中最为显著。通过分子对模拟，发现异甘草素+阿霉素与 PI3K、Akt 具有良好结合活性，提示其可能是异甘草素协同阿霉素在 TNBC 中发挥抗肿瘤作用的关键通路。细胞实验证实，异甘草素能抑制 TNBC 细胞的增殖和集落形成，并阻滞细胞周期进展。

同时，Western blotting 结果显示，异甘草素与阿霉素联合作用后，可进一步上调 P53、P27 蛋白表达，并下调 CCND1 表达，且该调控作用较单药

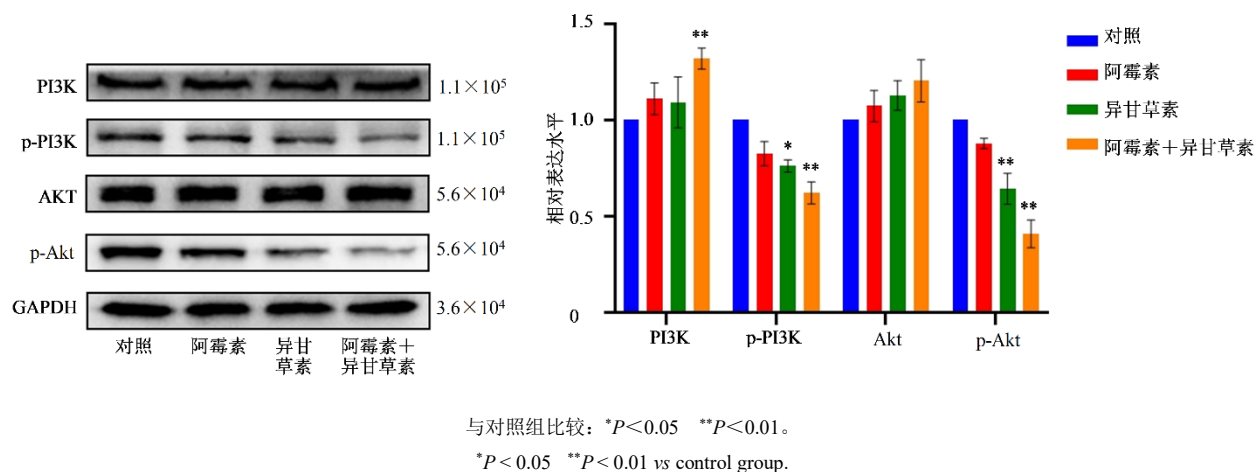


图 7 异甘草素联合阿霉素对 MDA-MB-231 细胞 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of isoliquiritigenin combined with adriamycin on expression of proteins related to PI3K-Akt signaling pathway in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组更为显著。p53-p27-Cyclin D1 信号轴是调控细胞 G₁/S 期检查点的关键通路。DNA 损伤可激活 p53, 进而诱导 p27 表达; p27 进一步抑制 Cyclin A-CDK2 复合物活性, 最终介导细胞周期阻滞^[20]。

转移和侵袭是乳腺癌相关死亡的主要原因^[21], 而 EMT 的激活是调控这一过程的关键环节^[22]。EMT 的发生与 PI3K-Akt 通路的异常激活密切相关, 活化的 Akt 可通过磷酸化修饰抑制 GSK3 β 的活性, 进而减少转录因子 Snail 的泛素化降解, 使其在细胞核内异常累积, 最终抑制上皮标志物 E-cadherin 的表达, 同时上调间质标志物 N-cadherin、Vimentin 的表达, 引发典型的钙黏蛋白转换^[23], 该转换可显著降低细胞间黏附能力, 增强细胞的迁移与侵袭能力, 最终导致肿瘤发生远处转移。Wang^[24]等在胆管癌的相关研究中证实, PLCB1 可通过激活 PI3K-Akt-GSK3 β -Snail 通路诱导 EMT, 不仅促进胆管癌细胞的侵袭转移, 还可诱导吉西他滨产生耐药, 而应用 Akt 抑制剂 MK2206 阻断该通路后, 可有效逆转 EMT 表型, 并恢复化疗敏感性。

本实验结果证实, 在 TNBC 细胞中, 异甘草素可抑制 PI3K-Akt 的活化, 下调 Vimentin、 β -catenin 的表达并上调 E-cadherin 表达, 进而增强阿霉素对 TNBC 细胞的侵袭转移的抑制作用。

异甘草素可作为一种天然化疗增敏剂, 可能通过靶向 PI3K-Akt 信号轴发挥协同抑制作用。受研究周期所限, 本研究尚未开展该通路相关的体内实验及回复实验, 后续将在细胞及动物水平通过回复实验进一步明确 PI3K-Akt 信号轴的关键作用,

从而更全面的验证该通路在二者协同作用中的关键作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee J. Current treatment landscape for early triple-negative breast cancer (TNBC) [J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1524.
- [2] 褚乔, 王小娜, 续佳颖, 等. 白头翁皂苷 D 通过多靶点和多途径抑制三阴性乳腺癌侵袭转移 [J]. 南方医科大学学报, 2025, 45(1): 150-161.
Chu Q, Wang X N, Xu J Y, et al. Pulsatilla saponin D inhibits invasion and metastasis of triple-negative breast cancer cells through multiple targets and pathways [J]. J South Med Univ, 2025, 45(1): 150-161.
- [3] Derakhshan F, Reis-Filho J S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 181-204.
- [4] 常文慧, 张艳丽, 刘子宁, 等. 阿霉素通过循环肿瘤细胞介导三阴性乳腺癌转移 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(5): 585-591.
Chang W H, Zhang Y L, Liu Z N, et al. Doxorubicin mediates triple negative breast cancer metastasis through circulating tumor cells [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2021, 50(5): 585-591.
- [5] Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(14): 11386.
- [6] Chen Z Y, Ding W W, Yang X X, et al. Isoliquiritigenin, a potential therapeutic agent for treatment of inflammation-associated diseases [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318: 117059.

- [7] Qiu M M, Ma K, Zhang J F, et al. Isoliquiritigenin as a modulator of the Nrf2 signaling pathway: Potential therapeutic implications [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1395735.
- [8] Yuan C L, Yang X L, Sun L, et al. Isoliquiritigenin suppresses breast tumor development by enhancing host antitumor immunity [J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52(6): 1819-1841.
- [9] Yu M Z, Pan Q L, Li W B, et al. Isoliquiritigenin inhibits gastric cancer growth through suppressing GLUT4 mediated glucose uptake and inducing PDHK1/PGC-1 α mediated energy metabolic collapse [J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155045.
- [10] Sharma D, Dhobi M, Lather V, et al. An insight into the therapeutic effects of isoliquiritigenin in breast cancer [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024, 397(12): 9503-9519.
- [11] Zhou S Z, Han S Z, Liao J Z, et al. Isoliquiritigenin inhibits oral squamous cell carcinoma and overcomes chemoresistance by destruction of survivin [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(8): 2221-2241.
- [12] Youns M, Fu Y J, Zu Y G, et al. Sensitivity and resistance towards isoliquiritigenin, doxorubicin and methotrexate in T cell acute lymphoblastic leukaemia cell lines by pharmacogenomics [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2010, 382(3): 221-234.
- [13] Peng F, Tang H L, Du J R, et al. Isoliquiritigenin suppresses EMT-induced metastasis in triple-negative breast cancer through miR-200c/C-JUN/ β -catenin [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(2): 505-523.
- [14] Chen X, Liu C, Zhao H, et al. Deep learning-assisted high-content screening identifies isoliquiritigenin as an inhibitor of DNA double-strand breaks for preventing doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Biol Direct*, 2023, 18(1): 63.
- [15] Yuan Hsieh D J, Islam M N, Kuo W W, et al. A combination of isoliquiritigenin with *Artemisia argyi* and *Ohwia caudata* water extracts attenuates oxidative stress, inflammation, and apoptosis by modulating Nrf2/HO-1 signaling pathways in SD rats with doxorubicin-induced acute cardiotoxicity [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(12): 3026-3042.
- [16] Sun P, Chen H, Fan X, et al. Exploring the effective components of honey-processed licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in attenuating doxorubicin-induced myocardial cytotoxicity by combining network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329:118178.
- [17] Al-Qahtani W H, Alshammari G M, Ajarem J S, et al. Isoliquiritigenin prevents doxorubicin-induced hepatic damage in rats by upregulating and activating SIRT1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112594.
- [18] Liao Y F, Luo F L, Tang S S, et al. Network analysis and experimental pharmacology study explore the protective effects of isoliquiritigenin on 5-fluorouracil-Induced intestinal mucositis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1014160.
- [19] Zhang Z, Chen W Q, Zhang S Q, et al. Isoliquiritigenin inhibits pancreatic cancer progression through blockade of p38 MAPK-regulated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154406.
- [20] Sherr C J. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(14): 3689-3695.
- [21] Wu Q T, Siddharth S, Sharma D. Triple negative breast cancer: A mountain yet to be scaled despite the triumphs [J]. *Cancers*, 2021, 13(15): 3697.
- [22] Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(6): 341-352.
- [23] Chi M, Liu J, Mei C, et al. TEAD4 functions as a prognostic biomarker and triggers EMT via PI3K/Akt pathway in bladder cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 175.
- [24] Liang S, Guo H, Ma K, et al. A PLCB1-PI3K-Akt signaling axis activates EMT to promote cholangiocarcinoma progression [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(23): 5889-5903.

[责任编辑 兰新新]