

基于网络药理学与实验验证探讨柴胡-当归挥发油抑制大鼠乳腺增生的作用机制

丁潇滢¹, 梁新丽¹, 周家华¹, 杨明¹, 管咏梅¹, 黄小英^{1,2*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西古香今韵大健康产业有限公司, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 通过网络药理学和动物实验验证探讨柴胡-当归挥发油 (*Bupleuri Radix-Angelicae Sinensis Radix* essential oil, BAO) 对乳腺增生 (hyperplasia of mammary gland, HMG) 大鼠的影响及其作用机制。方法 采用水蒸气蒸馏法提取 BAO, 通过气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 进行成分分析; 基于 TCMSP、PubChem 及 SwissTargetPrediction 数据库筛选 BAO 活性成分作用靶点, 结合 GeneCards、OMIM 数据库获取 HMG 相关靶点, 构建蛋白互作网络筛选核心靶点, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。建立 HMG 大鼠模型, 给予药物干预 30 d 后, 采用 ELISA 法检测血清中雌二醇、孕酮和催乳素水平, 采用生化法测定血清中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 水平, 采用试剂盒检测血清中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 水平; 采用免疫组化法测定乳腺组织中雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 及细胞增殖标志物 Ki-67 的表达; 采用 qRT-PCR 检测乳腺组织中磷酸酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤超大蛋白 (B-cell lymphoma-2-extra-large, Bcl-xl)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 和 Bcl-2 关联死亡促进因子 (Bcl-2 associated agonist of cell death, Bad) mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测乳腺组织中 ER α 、PR、PTEN、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达。结果 GC-MS 鉴定出 20 个挥发性成分, 其中 Z-藁本内酯含量最高 (39.24%)。网络药理学筛选出 95 个交集靶点, AKT1 为核心靶点, 主要富集于 PI3K/Akt 信号通路及雌激素信号通路。动物实验结果显示, 与模型组比较, BAO 组大鼠血清中雌二醇、催乳素、MDA、VEGF、bFGF 水平显著降低 ($P < 0.05$), 血清中孕酮水平及 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$), 乳腺组织中 PCNA、Ki-67、ER α 、PR、Bcl-2 和 Bcl-xl 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), PTEN、Bax 和 Bad 表达水平升高 ($P < 0.05$), PI3K/Akt 通路活化水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。结论 BAO 通过抑制 ER α /PR 及 PI3K/Akt 信号通路, 降低雌二醇和催乳素水平, 抑制血管异常增生, 提高抗氧化能力, 从而抑制大鼠 HMG 的发生发展。

关键词: 乳腺增生; 柴胡-当归挥发油; 雌激素受体 α /孕激素受体通路; PI3K/Akt 通路; 氧化应激; 血管生成; Z-藁本内酯
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)15-5476-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.15.014

Mechanism of essential oil from *Bupleuri Radix-Angelicae Sinensis Radix* in inhibiting hyperplasia of mammary gland in rats based on network pharmacology and experimental validation

DING Xiaoying¹, LIANG Xinli¹, ZHOU Jiahua¹, YANG Ming¹, GUAN Yongmei¹, HUANG Xiaoying^{1,2}

1. Key Laboratory of Modern traditional Chinese Medicine Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Guxiang Jinyunda Health Industry Co., Ltd., Nanchang 330004, China

收稿日期: 2025-04-17

基金项目: 江西省重大科技研发专项 (20194ABC28009); 江西中医药大学重点学科建设 (2024jzzdxk001); 校级研究生创新专项资金 (XJ-S202414); 中西医结合江西省一流学科 (zxylxk20220103)

作者简介: 丁潇滢, 硕士研究生, 研究方向为中药免疫药理和中医香疗。E-mail: 15638298318@163.com

*通信作者: 黄小英, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药免疫药理和中医香疗。E-mail: jxutcm0689@163.com

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of essential oil from Chaihu (*Bupleuri Radix*)-Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*) (BAO) on hyperplasia of mammary gland (HMG) in rats through network pharmacology and animal experimental validation. **Methods** BAO was extracted via steam distillation and its constituents were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The targets of active ingredients in BAO were screened based on TCMSP, PubChem, and SwissTarget Prediction databases, HMG-related targets were obtained from GeneCards and OMIM databases, and a protein interaction network was constructed to identify core targets, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. An HMG rat model was established, after 30 d of drug intervention, levels of estradiol, progesterone and prolactin in serum were measured by ELISA, levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum were measured by biochemical methods, levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in serum were determined by kits. Immunohistochemistry was used to measure the expressions of estrogen receptor α (ER α), progesterone receptor (PR) and cell proliferation marker Ki-67 in mammary gland tissue; qRT-PCR was used to detect mRNA expressions of phosphatase and tension homolog (*PTEN*), phosphatidylinositol 3-kinase (*PI3K*), protein kinase B (*Akt*), proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*), B-cell lymphoma-2 (*Bcl-2*), B-cell lymphoma-2-extra-large (*Bcl-xl*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*) and Bcl-2 associated agonist of cell death (*Bad*) in mammary gland tissue; Western blotting was used to detect the protein expressions of ER α , PR, PTEN, PI3K, Akt, and p-Akt in mammary gland tissue. **Results** A total of 20 volatile components were identified by GC-MS, among which Z-ligustilide had the highest content (39.24%). Network pharmacology screened 95 intersecting targets, with AKT1 as the core target, mainly enriched in PI3K/Akt signaling pathway and estrogen signaling pathway. The animal experiment results showed that compared with model group, the levels of estradiol, prolactin, MDA, VEGF and bFGF in serum of rats in BAO group were significantly reduced ($P < 0.05$), while the levels of progesterone and activities of SOD, GSH-Px in serum were significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of PCNA, Ki-67, ER α , PR, Bcl-2 and Bcl-xl in mammary gland tissue were significantly reduced ($P < 0.05$), while the expression levels of PTEN, Bax and Bad were increased ($P < 0.05$), the activation level of PI3K/Akt pathway was significantly reduced ($P < 0.05$), in a dose-dependent manner. **Conclusion** BAO inhibits the occurrence and development of HMG in rats by suppressing ER α /PR and PI3K/Akt signaling pathways, reducing levels of estradiol and prolactin, inhibiting abnormal angiogenesis and enhancing antioxidant capacity.

Key words: hyperplasia mammary of gland; essential oil from *Bupleuri Radix-Angelicae Sinensis Radix*; estrogen receptor α /progesterone receptor pathway; PI3K/Akt pathway; oxidative stress; angiogenesis; Z-ligustilide

乳腺增生是指雌激素、孕激素比例失衡, 导致乳腺腺体、导管或间质增生的良性增生性疾病^[1-2]。我国乳腺增生的发病率约为 40%, 占中青年女性乳腺疾病的 70% 以上^[3-4], 主要症状包括乳房疼痛、肿块和乳头溢液等^[5-6]。近年来, 乳腺增生的年发病率增加了 2.7 倍, 且愈发年轻化, 其诱发乳腺癌的风险是普通人群的 1.5 倍, 对女性健康构成重大威胁^[7]。世界卫生组织于 21 世纪初提出“乳腺增生早期干预”战略, 进一步推动其防治研究。目前西医治疗以手术切除与激素调节为主。手术虽可快速去除病灶, 但创伤大、复发率高; 激素疗法虽能有效缓解症状, 但长期使用易引发恶心、头痛等不良反应^[8], 临床证据表明, 长期服用他莫昔芬可引起乳腺癌内分泌综合征^[9]。相较于西医激素或手术的单靶点干预, 中医药通过多成分协同调控雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)/孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 通路、抑制氧化应激及细胞增殖, 兼具整体调节与安全性优势^[10-11]。

中医认为乳腺增生为“乳癖”, 病机以肝郁气滞、痰凝血瘀、冲任失调为主, 临床分肝郁痰凝、冲任失调等证型, 治以疏肝理气、化痰散结、调摄冲任为原则^[12]。柴胡-当归是解郁第一要方逍遥散的核心药对, 是治疗乳腺增生和乳腺癌的经典药对^[13]。乳腺增生中药专利及临床经验处方分析表明, 柴胡与当归不仅是高频单味药, 更是方剂配伍中的核心药对^[14-15]。二者相配, 具有舒肝健脾、理气活血之效, 从而发挥疏肝解郁、祛邪不伤正的功效^[16]。柴胡挥发油是柴胡 *Bupleuri Radix* 的主要有效成分之一, 其疏肝解郁功效与调控肝脏代谢酶及抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 介导的炎症通路密切相关^[17]; 当归挥发油是当归 *Angelicae Sinensis Radix* 的主要有效成分之一, 其中藁本内酯质量分数大于 60%, 通过下调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达实现活血通络^[18]。然而, 尽管单味药的挥发油成分已较为明确, 但柴胡-当归挥发油 (essential oil from *Bupleuri*

Radix-Angelicae Sinensis Radix, BAO) 的化学成分及其协同作用机制尚未明晰^[19-20]。本研究基于网络药理学预测 BAO 的活性成分与乳腺增生的潜在靶点及通路,在此基础上构建乳腺增生大鼠模型,验证 BAO 对乳腺增生模型大鼠的影响及其作用机制,为其临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性成熟未孕 SD 大鼠 72 只,8 周龄,体质量(200±20)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2024-0001。动物饲养于江西中医药大学 SPF 级动物房,许可证号 SCXK(赣)2024-0001,温度(22±1)℃,相对湿度(50±5)%,12 h 光暗循环,自由进食饮水。动物实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 JZLLSC20250292)。

1.2 药材

柴胡和当归饮片购自江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学杨明教授鉴定分别为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

1.3 药品与试剂

苯甲酸雌二醇注射液(批号 230424)、黄体酮注射液(批号 230512-1)购自杭州动物制药厂;乳癖消片(批号 240105,0.34 g/片)购自辽宁好护士药业有限公司;大鼠孕激素 ELLSA 试剂盒(批号 H102-1-2)、雌二醇 ELLSA 试剂盒(批号 H089-1-2)、催乳素 ELLSA 试剂盒(批号 H095-1-1)、VEGF ELLSA 试剂盒(批号 H044-2-2)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) ELLSA 试剂盒(批号 H039)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 A001-3-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号 A005-1-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;大鼠磷酸酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, *PI3K*)、蛋白激酶 B(protein kinase B, *Akt*)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, *PCNA*)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、B 细胞淋巴瘤超大蛋白(B-cell lymphoma-2-extra-large, *Bcl-xl*)、

Bcl-2 相关 X 蛋白(*Bcl-2* associated X protein, *Bax*)、*Bcl-2* 关联死亡促进因子(*Bcl-2* associated agonist of cell death, *Bad*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)引物购自 Genscript 生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒(批号 No.2310004)购自北京索莱宝科技有限公司、一管化一步法基因组 DNA 去除与逆转录试剂盒(批号 MPC2401011)、2×通用型彩色示踪染料法 SYBR Green qPCR 预混液(批号 MPC2309029)、*GAPDH* 兔抗(批号 AC240320067)、*PTEN* 兔抗(批号 AC240523030)、*Akt* 兔抗(批号 AC240529079)、磷酸化 *Akt*(phosphorylated *Akt*, p-*Akt*)兔抗(批号 AC240524072)、细胞增殖标志物 Ki-67 兔抗(批号 AC240525011)、HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 AC2405126)、RIPA 裂解液(批号 CR2404066)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 CR2404029)、DAB 显色试剂盒(批号 CR2404052)均购自武汉赛维尔生物技术有限公司;*PI3K* 兔抗(批号 60225-1-Ig)、*PR* 兔抗(批号 25871-1-AP)、*ERα* 兔抗(批号 21244-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;薇婷脱毛膏(批号 3242539)购自利洁时(中国)投资有限公司;PEG-60 氢化蓖麻油(PEG-60 hydrogenated castor oil, RH60, 批号 S12715148)购自山东优索化工科技有限公司;戊巴比妥钠(批号 M50179)购自上海氟德化工有限公司。

1.4 仪器

C2936342 型电子数显卡尺(得力集团有限公司);Infinite F Plex 多功能酶标仪;Quant Studio 5 型荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher);Power Ease Touch 350W 型电泳仪(美国 Thermo 公司);TP1020 型组织脱水机、RM2245 型组织切片机(德国 Leica 公司);SCG-W2000 型化学发光成像系统(武汉赛维尔生物科技有限公司);研究级全自动正置荧光显微镜(UPC/HDS-FLS-BX43-L1F);超高分辨率小动物超声系统(Vevo2100)。

2 方法

2.1 BAO 的制备

参照逍遥散经典配比(柴胡:当归=1:1),精密称取柴胡、当归饮片各 300 g,使用粉碎机进行粉碎(过 40 目筛),置 10 L 圆底烧瓶内,加入 2.4 L 超纯水(料液比 1:8),添加适量的沸石作为助沸剂,浸润 1 h 后连接挥发油测定器。加热装置采用程序控温电热套,初始功率 800 W 至沸腾后调整至

300 W 维持微沸回流状态,连续回流提取 8 h,至挥发油体积不再增加时收集挥发油。收集的挥发油采用无水硫酸钠脱水处理 24 h,滤过后转移至棕色精油瓶内,于 4 ℃ 保存备用。

2.2 BAO 的成分分析

2.2.1 样品的制备 采用微量移液器移取 BAO 样品 50 μL ,加入无水乙醇溶解后转移至 10 mL 棕色量瓶中,定容后加入适量无水硫酸钠脱水处理,涡旋振荡 2 min,静置 30 min 后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,收集滤液于 2 mL 自动进样瓶中,得样品溶液,于 -20 ℃ 避光保存至进样分析。

2.2.2 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析

(1) 色谱条件:采用 Agilent HP-5MS 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm),以高纯氦气 (体积分数 $\geq$ 99.999 5%)为载气,恒流模式体积流量 1.0 mL/min;进样口温度 240 ℃,分流进样模式 (分流比 50:1),进样量 0.5 μL 。柱温箱程序升温设置:初始温度 50 ℃ 保持 1 min,以 2 ℃/min 升至 120 ℃ 并保持 3 min,随后以 10 ℃/min 升至 220 ℃ 保持 5 min。

(2) 质谱条件:离子源温度 25 ℃,传输线温度 260 ℃;质量扫描范围 m/z 50~550,采用全扫描模式,溶剂延迟时间 3 min。

(3) 数据处理:利用 NIST14.L 质谱库进行数据匹配,并选择匹配度超过 80%的质谱峰,参考相关文献对 BAO 的活性成分进行筛选并深入解析。

2.3 网络药理学分析^[21]

2.3.1 BAO 活性成分与靶点获取 基于 GC-MS 分析结果,选取含量排名前 10 的成分作为 BAO 活性成分,利用 TCMSPP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/index.php>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 预测其潜在作用靶点及对应基因。

2.3.2 乳腺增生疾病靶点筛选 通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 和 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>),以关键词“hyperplasia of mammary glands”(物种为人)检索乳腺增生相关疾病靶点,合并各数据库结果并去重。

2.3.3 BAO-乳腺增生相互作用网络构建 采用 Venny 2.1.0 工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 绘制韦恩图,筛选 BAO 活性成分靶点与乳

腺增生疾病靶点的交集靶点;将交集靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,并借助 Cytoscape 3.9.1 软件分析网络拓扑参数 (度值、介数中心性和接近中心性),筛选核心靶点。

2.3.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 通过 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) 对 BAO-乳腺增生核心靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 对分析结果进行可视化。以 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2.4 动物实验验证

2.4.1 BAO 给药溶液的制备:取 200 μL BAO、1 mL RH60,加入适当生理盐水,涡旋振荡至油滴完全分散;随后加入生理盐水使总体积达到 100 mL,再次涡旋震荡,制得质量浓度为 1.6 mg/mL 的溶液,用于 BAO 高剂量组给药。BAO 低、中剂量组给药溶液同法制备。

2.4.2 分组、造模与给药 72 只雌性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、乳癖消片 (0.5 g/kg) 组和 BAO 低、中、高剂量 (4、8、16 mg/kg,分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍) 组,每组 12 只。除对照组外,其余大鼠按照文献方法^[22]构建大鼠乳腺增生模型,大鼠每日定时 im 苯甲酸雌二醇 (0.5 mg/kg),连续 25 d;随后每日定时 im 黄体酮注射液 (1 mg/kg),连续 5 d,造模期间严格保持昼夜节律和恒温环境。以造模组大鼠乳头高度和直径均明显大于对照组,乳头增大、乳腺导管增生、乳腺小叶数目增多等病理变化判定模型成功。造模成功后 (依据前期预实验,造模 1 周后乳腺增生模型可成功构建) 各给药组每日下午 ig 相应药物,对照组和模型组 ig 等体积含 3% RH60 的生理盐水,1 次/d,连续给药 30 d。实验期间观察大鼠的一般状况,测量并记录大鼠的体质量和进食量。

2.4.3 大鼠体质量、乳头参数及脏器指数测定 每组大鼠剃去第 2 对乳头部位毛发,采用电子数显卡尺 (精度 0.01 mm) 测量第 2 对乳区乳头高度及直径。用超高分辨率小动物超声系统 (Vevo2100) 测量大鼠乳腺的厚度,电子天平测定体质量以及肝脏、脾脏、子宫、卵巢和胸腺的质量,并计算脏器指数和体质量差。

脏器指数=器官质量/体质量

体质量差=最终体质量-初始体质量

2.4.4 取材 末次给药 2 h 后,大鼠 ip 2.5%戊巴比妥钠溶液 (2.5 mL/kg) 麻醉,腹主动脉采集血液样本,4 000 r/min 离心 15 min 以分离血清,分装后于-80 ℃冰箱保存备用。取乳腺组织,一部分用 4%多聚甲醛固定,用于病理切片和免疫组化;另一部分在液氮中速冻,保存在-80 ℃冰箱中,用于后续实验。

2.4.5 大鼠乳腺组织病理学评价 乳腺组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,依次进行梯度乙醇 (70%~100%) 脱水、二甲苯透明、石蜡浸渍 (60 ℃、12 h) 及包埋,制备 4 μm 连续切片,进行常规苏木素-伊红 (HE) 染色后,在光学显微镜下观察乳腺形态学改变,每组随机选取 8 个非重叠视野,分析单位视野内乳腺小叶数目及腺泡数量。

2.4.6 大鼠血清中雌二醇、孕激素、催乳素、SOD、MDA、GSH-Px、VEGF 和 bFGF 水平的测定 血清由-80 ℃冰箱取出,检测前梯度复温 (4 ℃静置 1 h,室温平衡 30 min),3 000 r/min 离心 15 min 取上清。按照试剂盒说明书检测雌二醇、孕激素、催乳素、

SOD、MDA、GSH-Px、VEGF 和 bFGF 水平。

2.4.7 免疫组化法检测大鼠乳腺组织 ERα、PR 和 Ki-67 表达 乳腺组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋并制备 4 μm 切片。切片经高压柠檬酸盐缓冲液抗原修复后,使用 3%牛血清白蛋白封闭非特异性结合,分别滴加 ERα (1:200)、PR (1:150)、Ki-67 (1:100) 兔抗,4 ℃孵育过夜;滴加二抗,37 ℃孵育 30 min, DAB 显色、苏木素复染封片。于显微镜下观察并拍照,每组随机选取 8 个非重叠视野,通过 Image Pro Plus 6.0 软件评估阳性区域面积占比及平均吸亮度 (A) 值。

2.4.8 qRT-PCR 检测大鼠乳腺组织 PTEN、PI3K、Akt、PCNA、Bcl-2、Bcl-xl、Bax 和 Bad 的 mRNA 表达 取 0.1 g 乳腺组织,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA。以 cDNA 为模板、GAPDH 为内参基因进行 qRT-PCR,设定程序为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 15 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')	长度/bp
PTEN	CCAATGGCTAAGTGAAGACGACAA	CATAGCGCCTCTGACTGGGAATA	197
PI3k	CTGGAGAGCTTGAGGACGA	TCGCAAGAACCAGAATAAGAAGTG	159
Akt	ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA	GCCCTTGCCAGTAGCTTCA	126
PCNA	TTGCACGTATATGCCGAGACC	GGTGAACAGGCTCATTCTCTCT	183
Bcl-2	CGACTTTGCAGAGATGTCCA	CATCCACAGAGCGATGTTGT	202
Bcl-xl	GCCTTTTCTCCTTTGGCGG	TCCACAAAAGTGTCAGCC	155
Bax	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	155
Bad	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	CCCATCCCTTCGTCGTCCT	249
GAPDH	AACGGCACAGTCAAGGCTGA	ACGCCAGTAGACTCCACGACAT	134

2.4.9 Western blotting 检测大鼠乳腺组织 ERα、PR、PTEN、PI3K、AKT、p-Akt 的蛋白表达 将大鼠乳腺组织匀浆裂解,提取蛋白,用 BCA 蛋白检测试剂盒测定匀浆上清液的蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶 (TBST 配制),室温封闭 1 h;分别加入相应一抗 (1:1 000),4 ℃孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:5 000),室温孵育 2 h。加入 ECL 化学发光试剂显影,采用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 26.0 软件进

行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 BAO 主要成分分析

通过检索 NIST14.L 质谱库,对比离子峰相关信息,结合相关文献,对 20 种化学成分进行了鉴定,并以色谱图中不含溶剂峰的所有峰面积为 100%,采用归一化方法计算了 BAO 中各成分的相对含量。BAO 的总离子流图见图 1,BAO 中鉴定的 20 个化学成分占总成分的 93.63% (表 2),其中 Z-藁本内酯 (39.24%) 含量最高,其次是乙酸葵酯 (25.37%)、正己酸 (3.68%) 和乙酸冰片酯 (2.92%)。

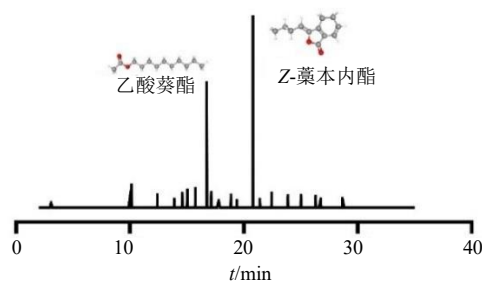


图 1 BAO 的总离子流图

Fig. 1 Total ion current plot of BAO

表 2 BAO 中的 20 个化学成分

Table 2 20 chemical components in BAO

序号	<i>t</i> _R /min	化合物	分子式	相对质量分数/%
1	10.077	(+)-花侧柏烯	C ₁₅ H ₂₂	2.60
2	10.163	正己酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	3.68
3	12.422	α -红没药烯	C ₁₅ H ₂₄	1.65
4	13.902	<i>E</i> -藁本内酯	C ₁₂ H ₄ O ₂	0.75
5	15.041	正十二醇	C ₁₂ H ₂₆ O	1.92
6	15.609	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	2.29
7	15.754	乙酸冰片酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.92
8	16.748	乙酸葵酯	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	25.37
9	17.148	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	2.08
10	17.791	<i>E</i> -丁烯基酚内酯	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	0.44
11	18.866	1-辛基-环丙烷	C ₁₁ H ₂₂	1.57
12	19.401	匙叶桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	0.44
13	20.816	<i>Z</i> -藁本内酯	C ₁₂ H ₄ O ₂	39.24
14	21.405	(+)-香橙烯	C ₁₅ H ₂₄	0.72
15	22.442	甲基-2-戊醇	C ₆ H ₁₄ O	2.03
16	23.884	肉豆蔻醛	C ₁₄ H ₂₈ O	1.44
17	25.019	<i>Z</i> -丁烯基酚内酯	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	1.50
18	26.299	榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	1.38
19	26.450	3,4-二甲基环氧苯基丁酸	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	0.74
20	28.654	α -倍半水芹烯	C ₁₅ H ₂₄	0.87

3.2 网络药理学分析结果

3.2.1 BAO 活性成分与乳腺增生靶点的获取 通过 GC-MS 分析结合文献挖掘,筛选出 BAO 中含量排名前 10 的活性成分,获得相应的基因靶标 258 个。通过 OMIM、TTD 及 GeneCards 数据库,获取乳腺增生相关靶标 1 699 个。利用 Venny 2.1.0 进行靶点交集分析,构建了 BAO 和乳腺增生靶点的韦恩图(图 2),二者之间有 95 个交叉基因靶点。

3.2.2 PPI 网络构建 将获得的交叉基因靶点上传到 STRING 数据库,利用 STRING 数据库分析交叉靶点的 PPI 网络,并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建 PPI 网络,得到了 1 个包含 95 个点和 792 条边的网络(图 3-A)。使用 cytoHubba 插件计算每个靶点的连接度,按节点度排名得出 AKT1、BCL2、SRC、PPARG、PTEN、PTGS2、GSK3B、CXCL8、IGF1R、PARP1 等核心靶点(图 3-B)。

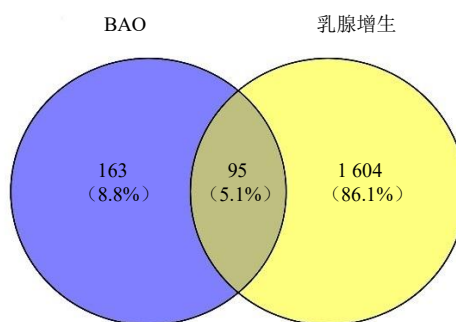


图 2 BAO 与乳腺增生交集靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of intersection targets of BAO and hyperplasia of mammary gland

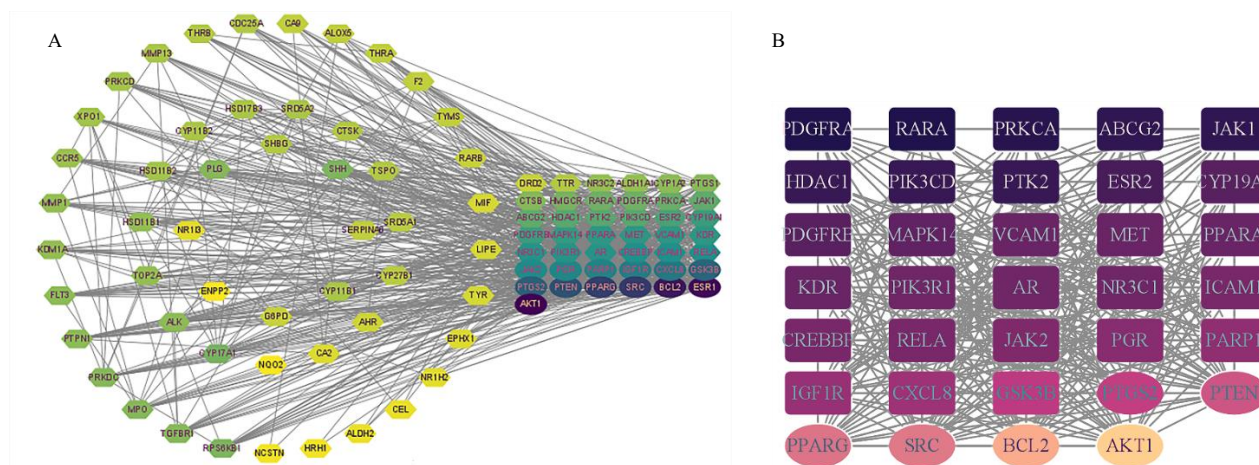


图 3 BAO 与乳腺增生靶点 (A) 及核心靶点 (B) 之间交互 PPI 网络

Fig. 3 Interacting PPI network between BAO and hyperplasia of mammary gland targets (A) or core targets (B)

3.2.3 GO 功能注释分析与 KEGG 通路富集分析
为了阐明 BAO 调控乳腺增生的多靶点作用机制,进行 GO 功能注释分析与 KEGG 通路富集分析。GO 功能注释分析共筛选出 504 个具有显著统计学差异的功能条目 ($P < 0.05$, $FDR < 0.1$), 其中生物过程 332 项, 主要涉及代谢稳态调控、蛋白质磷酸化级联反应、细胞增殖正调控以及类固醇激素生物合成等关键生理过程; 细胞组分 44 项, 主要涉及核染色质复合物、内质网膜系统及转录因子结合位点等亚细胞

结构; 分子功能 110 项, 与酶活性调控、核受体共激活结合及酪氨酸激酶信号转导等功能模块密切相关。各条目取前 10 进行可视化, 结果见图 4。通过 KEGG 通路富集分析发现, 核心信号网络主要涉及催乳素介导的通路、VEGF 信号通路、PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 级联反应以及雌激素受体调控的类固醇生物合成通路 (图 5)。以上结果表明, BAO 通过多途径、多靶点、整体协同治疗乳腺增生。

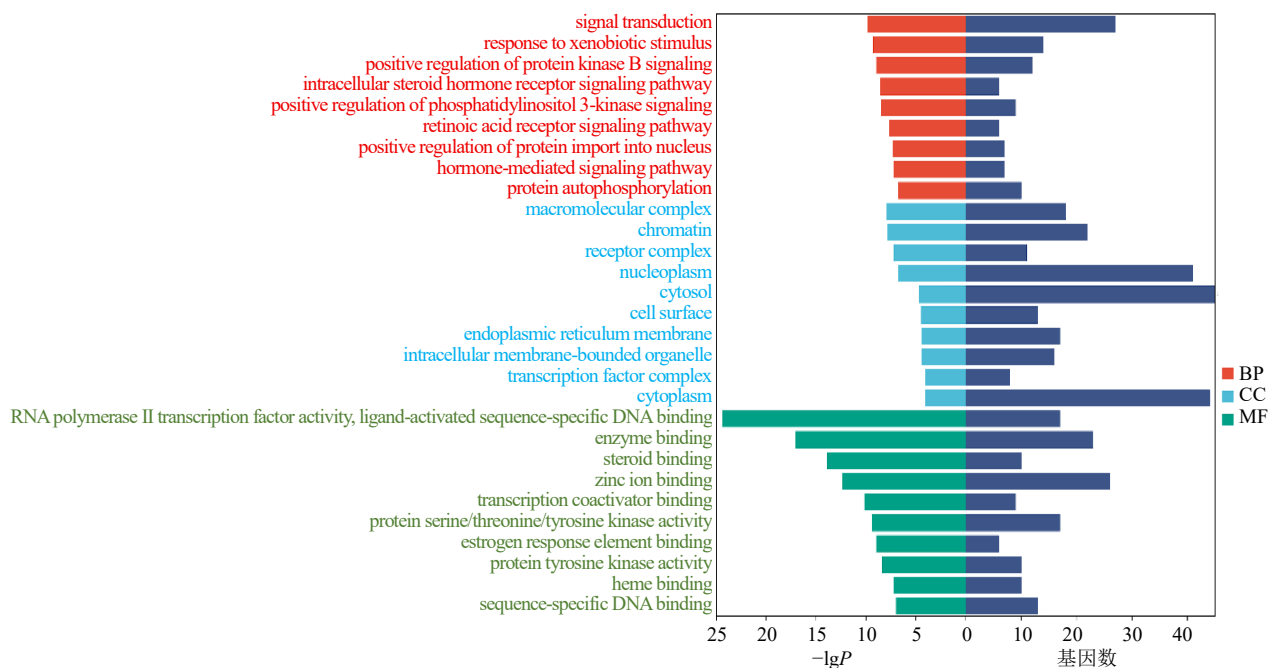


图 4 BAO 治疗乳腺增生潜在作用靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of potential targets of BAO in treatment of hyperplasia of mammary gland

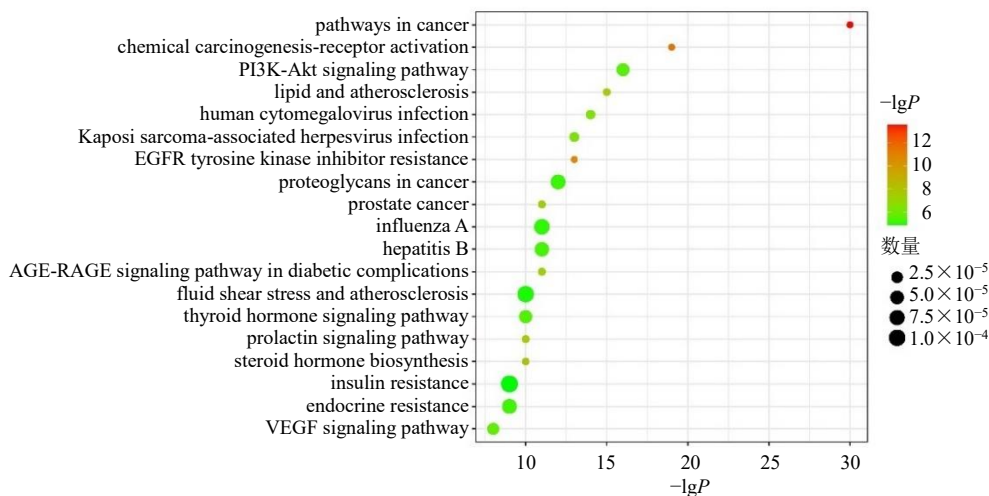


图 5 BAO 治疗乳腺增生潜在作用靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of potential targets of BAO in treatment of hyperplasia of mammary gland

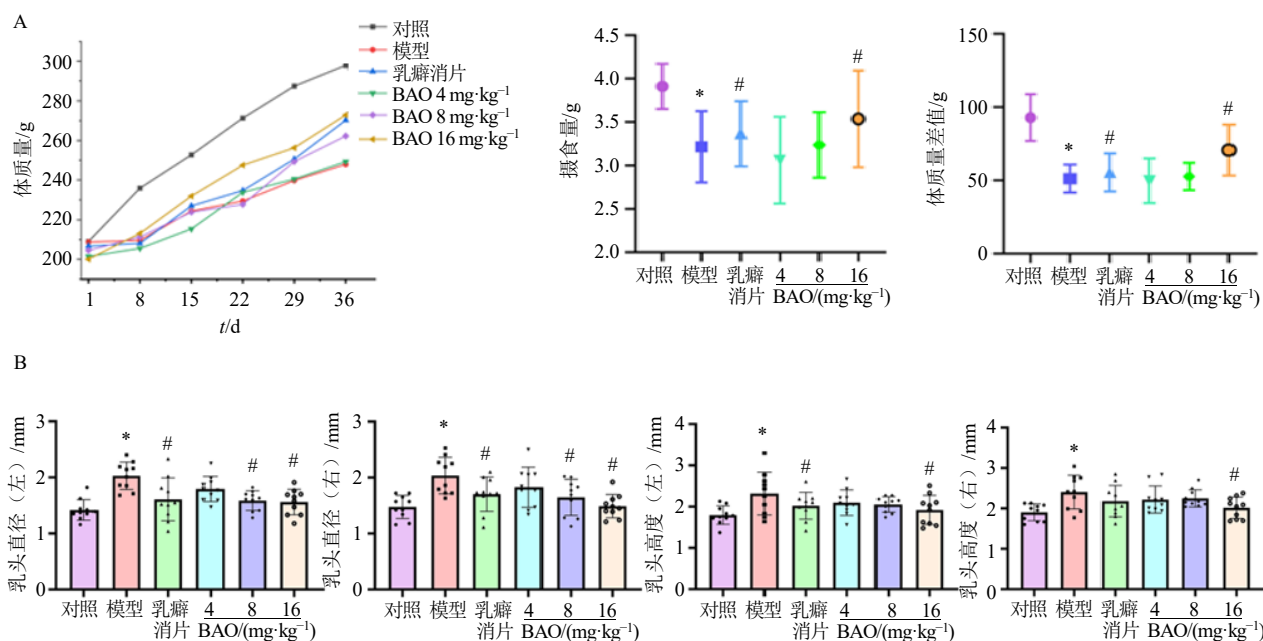
3.3 动物实验结果

3.3.1 BAO 对乳腺增生大鼠一般情况的影响 对照组大鼠状况良好，食欲正常，体质量持续增长，乳头色浅且被毛发掩盖；与对照组比较，模型组大鼠摄食量显著减少 ($P<0.05$ ，图 6-A)，体质量增长减缓 ($P<0.05$)，毛发脱落伴乳头红肿、体积增大；与模型组比较，各给药组以上症状均有所改善，其中 BAO 高剂量组乳头形态接近对照组，且对大鼠摄食量和体质量减轻具有显著的改善作用 ($P<0.05$)。以上结果表明，BAO 能够改善乳腺增生大鼠体质量增长减缓、摄食量降低等变化。

3.3.2 BAO 对乳腺增生大鼠乳头直径、高度及乳腺

厚度的影响 如图 6-B 所示，与对照组比较，模型组大鼠乳头直径与高度显著增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠乳头直径和高度均有不同程度的缩小，其中 BAO 高剂量组大鼠乳头直径和高度的缩小最为明显 ($P<0.05$)。如图 7 所示，对照组大鼠乳腺较薄；与对照组比较，模型组大鼠的乳腺明显增厚 ($P<0.05$)；与模型组比较，乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠的乳腺厚度均显著减少 ($P<0.05$)。

3.3.3 BAO 对乳腺增生大鼠脏器指数的影响 如图 8 所示，与对照组比较，模型组大鼠肝脏、胸腺、子宫和卵巢指数明显升高 ($P<0.05$)；与模型组比



与对照组比较：* $P<0.05$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ，下图同。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group, same as below figures.

图 6 BAO 对乳腺增生大鼠体质量、摄食量和体质量差值 (A) 及第 2 对胸部乳头直径和高度 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Fig. 6 Effect of BAO on body weight, food intake and body weight difference (A) and diameter, height of second pair of breast nipples (B) in rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s, n=12$)

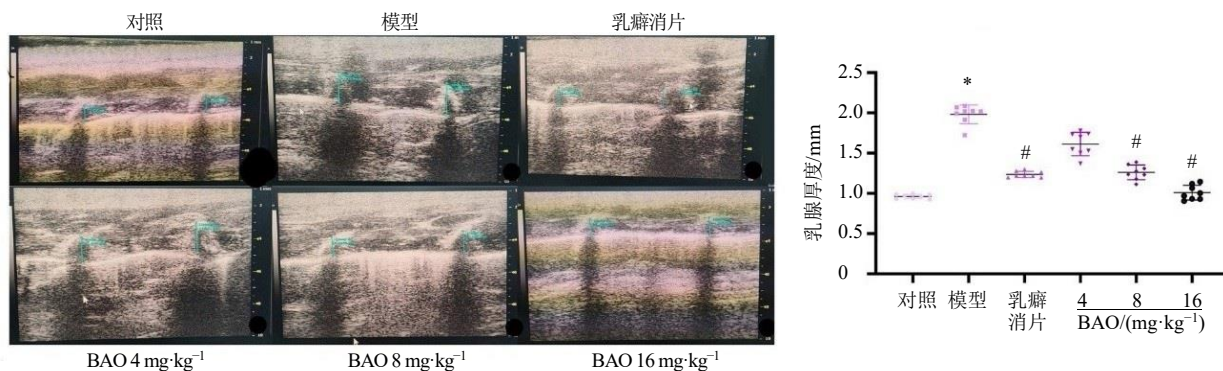
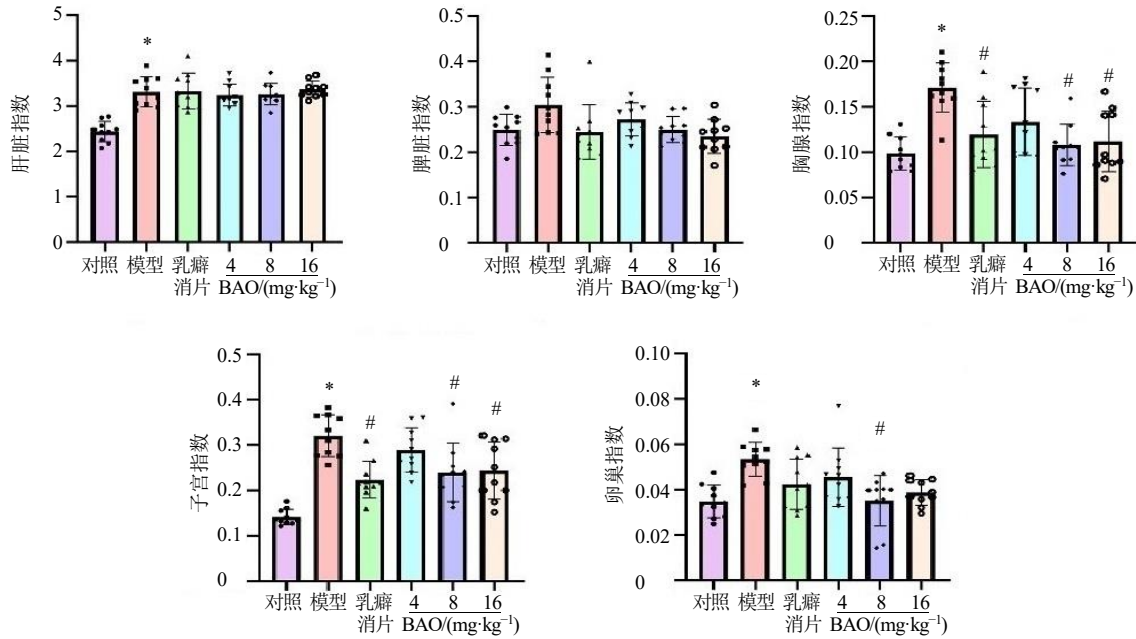


图 7 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺厚度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

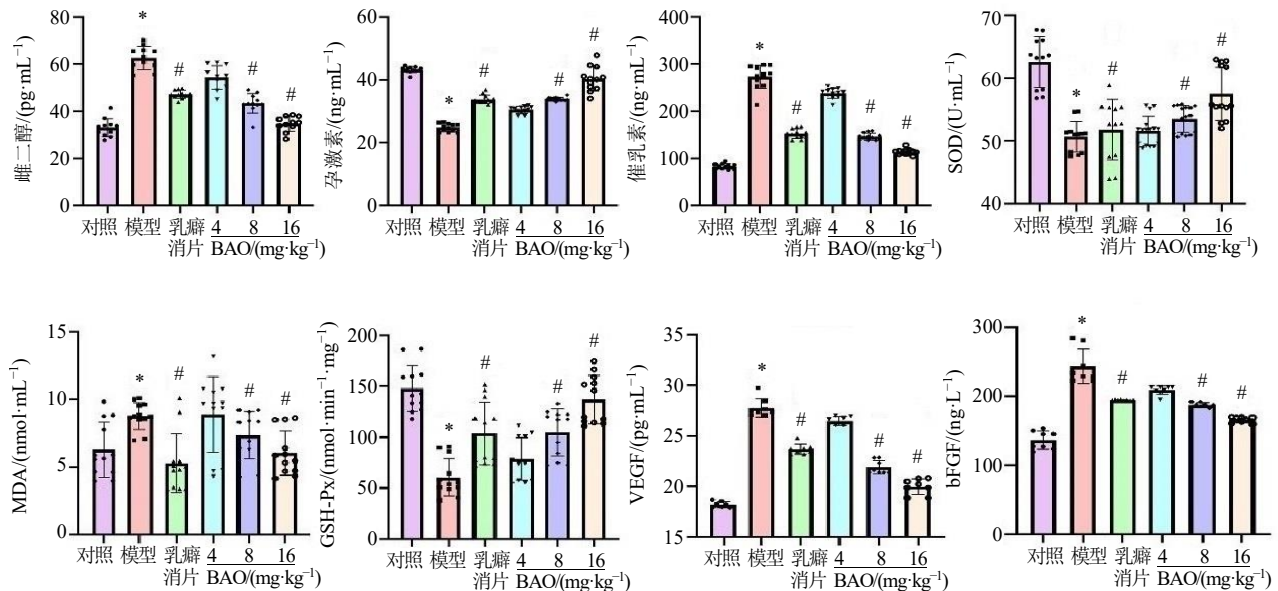
Fig. 7 Effect of BAO on mammary gland thickness in rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s, n=8$)

图 8 BAO 对乳腺增生大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 8 Effect of BAO on organ indexes in rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

较, 乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠胸腺和子宫指数均显著降低 ($P < 0.05$), BAO 中剂量组大鼠卵巢器官指数显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3.4 BAO 对乳腺增生大鼠血清中雌二醇、孕激素和催乳素水平的影响 如图 9 所示, 与对照组比较,

模型组大鼠血清中雌二醇和催乳素水平显著升高 ($P < 0.05$), 孕激素水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠血清中雌二醇和催乳素水平均显著降低 ($P < 0.05$), 孕激素水平显著升高 ($P < 0.05$), 其中以 BAO 高剂

图 9 BAO 对乳腺增生大鼠血清雌二醇、孕激素、催乳素、SOD、MDA、GSH-Px、VEGF 和 bFGF 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)Fig. 9 Effect of BAO on levels of estradiol, progesterone, prolactin, SOD, MDA, GSH-Px, VEGF and bFGF in serum of rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

量组差异最为明显。

3.3.5 BAO 对乳腺增生大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平的影响 如图 9 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 水平明显降低 ($P<0.05$),MDA 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 水平显著升高 ($P<0.05$),MDA 水平明显降低 ($P<0.05$),其中 BAO 高剂量组差异最为明显。表明 BAO 能够显著缓解乳腺增生大鼠的氧化应激反应,提高其抗氧化能力。

3.3.6 BAO 对乳腺增生大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 水平的影响 如图 9 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 水平均显著降低 ($P<0.05$),其中 BAO 高剂量组差异最为明显。表明 BAO 能够呈剂量相关性地阻断病理性血管生成,从血管微环境重塑方面干预大鼠乳腺增生的发生发展。

3.3.7 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织病理变化的影响 如图 10 所示,对照组大鼠乳腺组织结构完整,乳腺小叶和导管均匀分散分布,无明显异常增生;模型组大鼠乳腺组织呈现典型增生性病变,乳腺小叶和腺泡数量较对照组显著增加 ($P<0.05$);与模型组比较,乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组大鼠乳腺组织的乳腺小叶和腺泡数量均显著减少 ($P<0.05$),分泌物减少,其中 BAO 高剂量组乳腺组织病理变化改善效果最明显。

3.3.8 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 ER α 、PR 和 Ki-67 表达的影响 如图 11 所示,对照组大鼠乳腺组织中 ER α 和 PR 的阳性表达较少;与对照组比较,模型组 ER α 和 PR 的阳性表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,乳癖消片和 BAO 中、高剂量组 ER α 阳性表达显著降低 ($P<0.05$),各给药组 PR 的阳性表达显著降低 ($P<0.05$)。对照组大鼠乳腺组织中增殖标志物 Ki-67 表达量较低;与对照组比较,模型组 Ki-67 表达明显升高 ($P<0.05$),表明乳腺增生与上皮细胞异常增殖有关;与模型组比

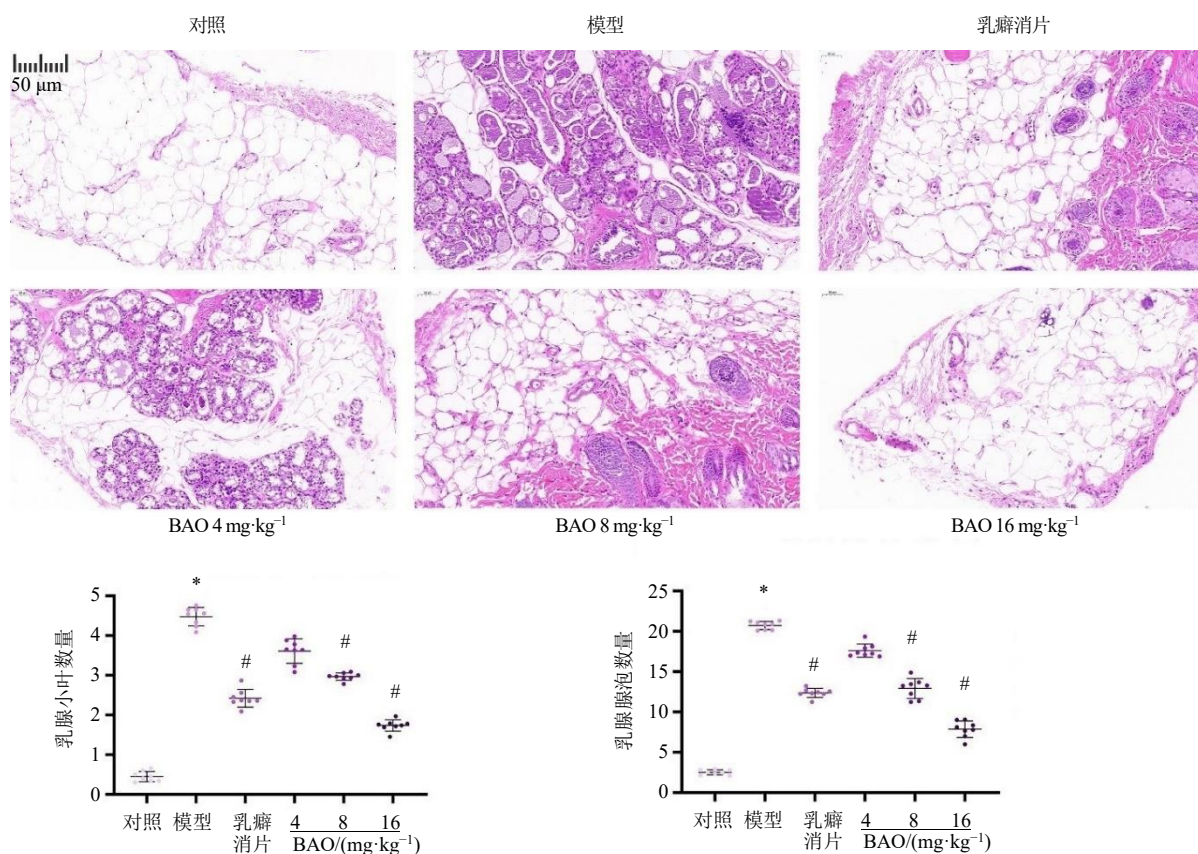


图 10 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织病理变化的影响 (HE, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 10 Effect of BAO on pathological changes in mammary gland tissue of rats with hyperplasia of mammary gland (HE, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

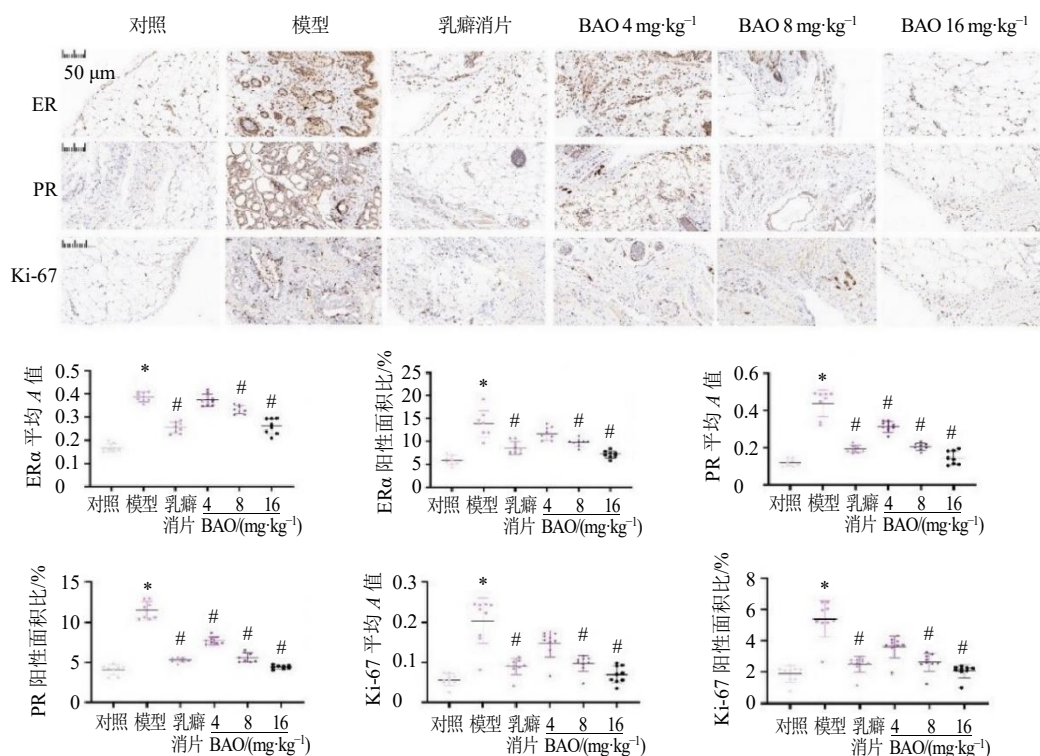


图 11 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 ERα、PR 和 Ki-67 表达的影响 (免疫组化, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 11 Effect of BAO on expressions of ERα, PR and Ki-67 in mammary gland tissue of rats with hyperplasia of mammary gland (immunohistochemistry, $\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

较, 乳癖消片和 BAO 干预可显著抑制 Ki-67 的表达 ($P < 0.05$)。以上结果表明 BAO 能够通过抑制 ERα 与 PR 信号轴过度活化和降低 Ki-67 蛋白表达, 逆转乳腺增生的病理过程。

3.3.9 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 *PTEN*、*PI3K*、*Akt*、*PCNA*、*Bcl-2*、*Bcl-xl*、*Bax* 和 *Bad* mRNA 表达的影响 如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠乳腺组织中 *PTEN*、*Bax* 和 *Bad* mRNA 表达水

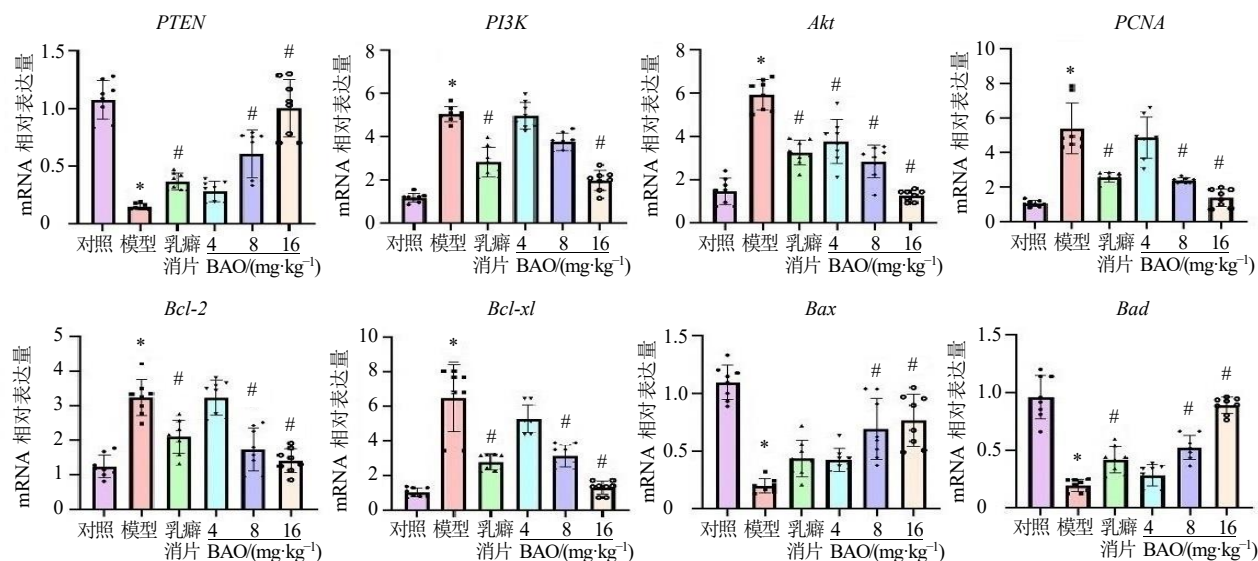


图 12 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 *PTEN*、*PI3K*、*Akt*、*PCNA*、*Bcl-2*、*Bcl-xl*、*Bax* 和 *Bad* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 12 Effect of BAO on mRNA expressions of *PTEN*, *PI3K*, *Akt*, *PCNA*, *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bax* and *Bad* in mammary gland tissue of rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

平明显降低 ($P<0.05$), *PI3K*、*Akt*、*PCNA*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xl* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组 *PTEN* 和 *Bad* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$), *PI3K*、*Akt*、*PCNA*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xl* mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 此外, BAO 中、高剂量组 *Bax* mRNA 表达明显增加 ($P<0.05$), BAO 低剂量组 *Akt* mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。

3.3.10 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 ER α 、PR、PTEN、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达的影响 如图

13 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠乳腺组织中 ER α 、PR、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), PTEN 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组乳腺组织 ER α 、PR 和 PI3K 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 乳癖消片组和 BAO 中、高剂量组乳腺组织 p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), PTEN 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。表明 BAO 能够通过协同靶向 ER α /PR 和 PTEN-PI3K/Akt 信号轴双重维度阻断乳腺增生病理进程。

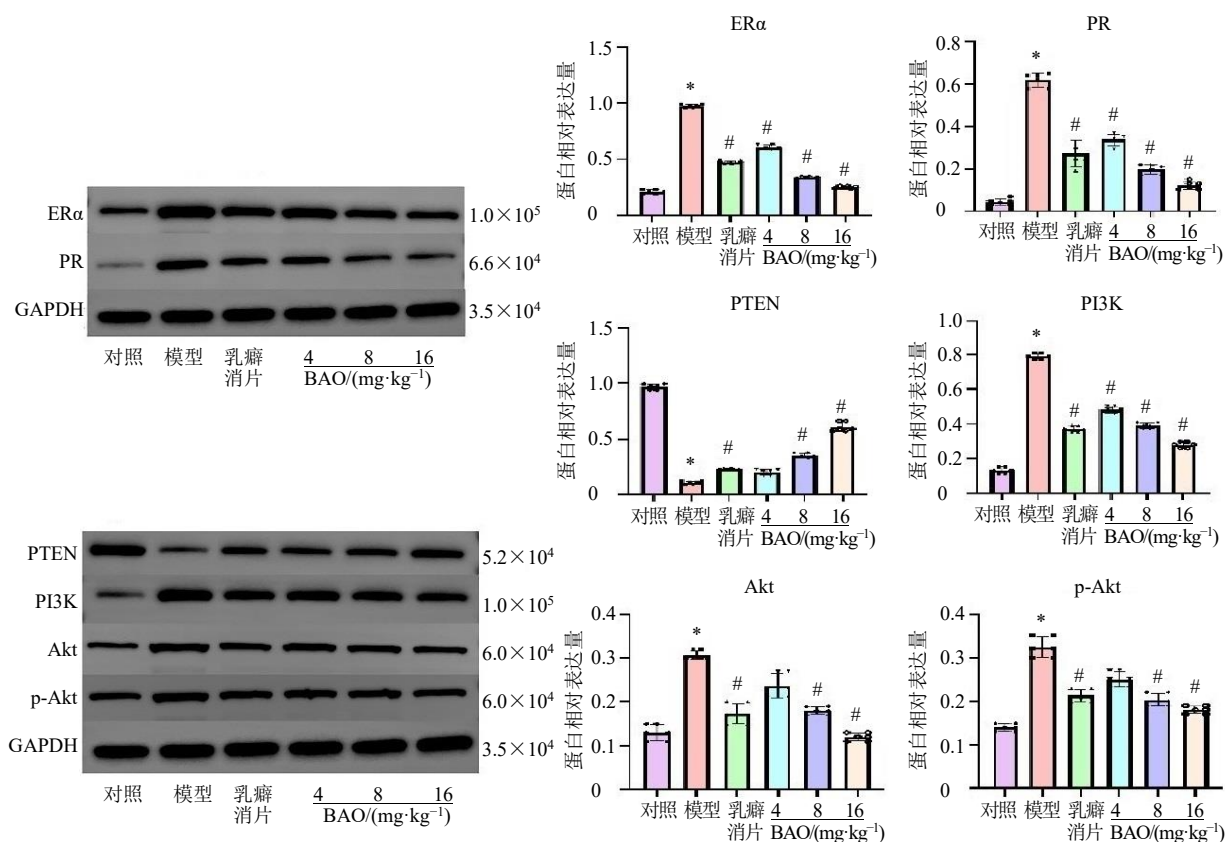


图 13 BAO 对乳腺增生大鼠乳腺组织中 ER α 、PR、PTEN、PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Effect of BAO on protein expressions of ER α , PR, PTEN, PI3K, Akt and p-Akt in mammary gland tissue of rats with hyperplasia of mammary gland ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

乳腺增生是育龄妇女的一个重要危险因素, 其病理发展与乳腺癌的发生密切相关。柴胡-当归作为疏肝理气与活血调经的经典药对, 通过多靶点协同作用治疗乳腺增生, 其机制涉及调控雌孕激素稳态、抑制炎症因子级联反应及重建乳腺细胞增殖与凋亡动态平衡网络等多个方面, 且该药对的肝肾毒性低于常规化学药^[23-24]。本研究通过网络药理学方法结合动物实验揭示了柴胡-当归药对核心药效组

分 BAO 通过调控 PI3K/Akt 及雌激素信号通路, 抑制乳腺增生大鼠激素失衡与病理增殖, 为中药复方多靶点治疗乳腺疾病提供科学依据。

本研究通过 GC-MS 鉴定出 BAO 中 20 种主要活性成分, 其中 Z-藁本内酯 (39.24%)、乙酸萹酯 (25.37%)、正己酸 (3.68%) 和乙酸冰片酯 (2.92%) 为含量较高的核心成分。藁本内酯是含量最高的成分, 可通过与 ER 竞争性结合和抑制 NF- κ B/环氧合酶-2 通路, 调节雌激素信号和炎症微环境, 从而干

预乳腺增生^[25-26]；乙酸葵酯通过调节脂质过氧化或胆固醇代谢间接改善乳腺组织的病理状态^[27]；正己酸通过调节肠道 β -葡萄糖醛酸酶活性，减少雌激素的肝肠循环重吸收，从而干预乳腺增生的发生发展^[28-29]；乙酸冰片酯具有抗炎与抗氧化特性^[30]。网络药理学预测表明，BAO 核心成分通过靶向调控 AKT1、BCL2、PTEN 等关键节点，干预 PI3K/Akt、催乳素及血管生成信号通路，ER α /PR 与 PI3K/Akt 通路在乳腺增生病理中通过调控细胞增殖与凋亡发挥核心作用。

研究表明，雌二醇水平异常升高与孕激素绝对或相对不足引发雌二醇与孕激素比值失衡，进而破坏乳腺上皮细胞增殖与凋亡的动态平衡，促进乳腺增生的发生发展^[3,31]。催乳素对乳腺的正常发育和泌乳至关重要，在乳腺生长中起着关键作用^[32-33]。动物研究结果证实，模型组大鼠血清中雌二醇、催乳素水平显著升高，乳腺组织腺泡增生、导管扩张，乳头红肿体积增大，体质量增长减缓，表明本研究乳腺增生大鼠模型制备成功。给予 BAO 干预后，血清中雌二醇、催乳素水平显著降低，乳腺组织腺泡增生及导管扩张减轻，乳头红肿消退，体质量增长速率恢复，提示 BAO 可通过直接调控性激素分泌紊乱缓解乳腺增生。进一步研究发现，BAO 通过抑制氧化应激及血管生成缓解乳腺增生大鼠模型的病理损伤。研究表明，雌激素水平升高会导致活性氧异常积聚，导致血清中抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性降低，同时脂质过氧化产物增加，加快乳腺增生的发病^[34-35]。本研究结果显示，给予 BAO 干预后，可显著提升血清中 SOD、GSH-Px 活性，降低 MDA 含量，表明 BAO 通过清除氧自由基减轻氧化损伤。此外，微循环障碍是乳腺增生的重要病理特征。VEGF 能促进血管内皮细胞增殖、生长和迁移，增加血管通透性，诱导乳腺组织形成新生血管；bFGF 与 VEGF 协同作用，诱导内皮细胞增殖和迁移，促进新生血管形成^[36]。BAO 组 VEGF、bFGF 水平较模型组降低，表明 BAO 可缓解乳腺增生大鼠模型的血管过度生成和微循环障碍，改善乳腺组织灌注并逆转乳腺组织缺氧微环境。

研究表明，柴胡-当归等配伍可靶向抑制 ER α （由 ESR1 基因编码），ER α 和 PR 可通过多途径调控 PI3K-Akt 信号通路，下调 PI3K/Akt/mTOR 信号轴活性，重建雌二醇与孕激素的比例平衡^[37]。ER α 的过度表达会降低乳腺上皮细胞的修复能力，而过

量的 PR 会诱导病理变化^[38]。BAO 通过竞争性结合 ER α ，同时下调 PR 表达，与网络药理学预测的 ESR1 靶向调控高度吻合，且 BAO 显著降低增殖标志物 Ki-67 表达，表明 BAO 通过降低乳腺组织 ER α 和 PR 的表达抑制乳腺上皮异常增殖。PTEN 是 PI3K/Akt 通路的关键负调控因子，其表达减少会导致磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸异常积累、PI3K 激活和 Akt 磷酸化^[39]。磷酸化的 Akt 通过激活 mTOR 信号转导，抑制促凋亡蛋白 Bax 与 Bad 的表达，进而发挥抗凋亡作用，最终导致乳腺上皮细胞异常增殖^[40]。网络药理学结果显示，AKT1、BCL2 与 PTEN 均为核心作用靶点。BAO 通过上调 PTEN mRNA 及蛋白表达，抑制 PI3K 及 p-Akt 磷酸化，阻断下游增殖信号；同时，通过降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 与 Bcl-xl 的 mRNA 表达并升高促凋亡蛋白 Bax 与 Bad 的 mRNA 表达，重建乳腺增生大鼠乳腺组织增殖与凋亡动态平衡。本研究中，BAO 抑制 ER α /PR 表达后，伴随 PTEN 上调及 p-Akt 下调，表明 ER/PR 可能通过抑制 PTEN、增强 PI3K 活性驱动 Akt 磷酸化。

本研究成功构建大鼠乳腺增生模型，并通过一般状态、乳头形态、乳腺厚度及病理学变化考察 BAO 对乳腺增生大鼠的影响，结果表明 BAO 通过协同靶向 ER α /PR 与 PI3K/Akt 通路，系统调控激素失衡、氧化应激及细胞凋亡，为中药复方治疗乳腺增生提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li P, Huang J L, Wu H N, *et al*. Impact of lifestyle and psychological stress on the development of early onset breast cancer [J]. *Medicine*, 2016, 95(50): e5529.
- [2] Xu Y C, Huangyang P W, Wang Y, *et al*. ER α is an RNA-binding protein sustaining tumor cell survival and drug resistance [J]. *Cell*, 2021, 184(20): 5215-5229.
- [3] Li X, Shi G B. Therapeutic effects and mechanism of ferulic acid and icariin in mammary gland hyperplasia model rats via regulation of the ERK pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 666.
- [4] Yang X J, Pei X H. Value and influencing factors of valid traditional Chinese medicine compound prescription patents for mammary gland hyperplasia [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(6): 1012-1018.
- [5] Adeniji-Sofoluwe A T, Obajimi G O, Obajimi M O. Pregnancy related breast diseases in a developing African country: Initial sonographic evaluation [J]. *Pan Afr Med J*, 2015, 20: 239.

- [6] Zhang W X, Xu C, Li R, *et al.* Correlation analysis between ultrasonography and mammography with other risk factors related to breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6): 5511-5516.
- [7] Smolarz B, Nowak A Z, Romanowicz H. Breast cancer-epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature) [J]. *Cancers*, 2022, 14(10): 2569.
- [8] Bergman L, Beelen M L, Gallee M P, *et al.* Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of liver and endometrial cancer risk following tamoxifen [J]. *Lancet*, 2000, 356(9233): 881-887.
- [9] Yuan J, Liu Y, Zhang T T, *et al.* Traditional Chinese medicine for breast cancer treatment: A bibliometric and visualization analysis [J]. *Pharm Biol*, 2024, 62(1): 499-512.
- [10] 童玉春, 宋捷, 江一鸣, 等. 乳腺增生病药物治疗机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(10): 2106-2110.
- [11] Wang Y, Liu S Y, Zhang Y, *et al.* Effect of traditional Chinese medicine on postoperative depression of breast cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1019049.
- [12] 胡晶, 庄爱文, 李晓寅, 等. “乳癖”病名源流考证. *中华中医药杂志*, 2024, 39(8): 4294-4297.
- [13] Pan J H, Fu S L, Zhou Q, *et al.* Modified Xiaoyao San combined with chemotherapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1050337.
- [14] Mothana R A, Al-Said M S, Al-Yahya M A, *et al.* GC and GC/MS analysis of essential oil composition of the endemic Soqatraea *Leucas virgata* Balf. f. and its antimicrobial and antioxidant activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 23129-23139.
- [15] Sun Z Y, Gao S L, Zhang Y, *et al.* Study on the potential mechanism of Pu Gong Ying in treating breast hyperplasia based on network pharmacology and molecular docking [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2023, 32(11): 893-910.
- [16] Li P Z, Tai Y X, Zhang L, *et al.* Mechanisms underlying the therapeutic effects of Xiaoyaosan in treating hyperplasia of mammary glands based on network pharmacology [J]. *Medicine*, 2024, 103(12): e36263.
- [17] 仇慧鑫, 张淑敏, 舒乐新, 等. 柴胡的毒性辨析及影响因素研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(18): 6150-6158.
- [18] 石玉, 李梦琦, 杨诗宇, 等. 当归挥发油的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(7): 1006-1014.
- [19] 胡倩, 金司仪, 李丹清, 等. 柴胡挥发油的研究进展 [J]. *中南药学*, 2019, 17(9): 1499-1503.
- [20] 刘方舟, 杨阳, 李萌, 等. 基于网络药理学研究陇产当归挥发油类成分多维药理的作用机制 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(16): 2258-2262.
- [21] 宋辉, 黄晓俏, 孙向明, 等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨菟丝子醇提取物抗乳腺癌作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(14): 4747-4758.
- [22] 中华中医药学会, 中药实验药理专业委员会. 乳腺增生动物模型制备规范 (草案) [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 17-22.
- [23] Li H T, Liu H H, Yang Y X, *et al.* Therapeutic effects of a traditional Chinese medicine formula plus tamoxifen vs. tamoxifen for the treatment of mammary gland hyperplasia: A meta-analysis of randomized trials [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 45.
- [24] Wang Y Y, Wei S Z, Gao T, *et al.* Anti-inflammatory effect of a TCM formula Li-Ru-Kang in rats with hyperplasia of mammary gland and the underlying biological mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1318.
- [25] Li G, Hu C X, Liu Y, *et al.* Ligustilide, a novel SIRT1 agonist, alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through deacetylation of NICD [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 121: 110486.
- [26] Liu H, Huang M R, Xin D D, *et al.* Natural products with anti-tumorigenesis potential targeting macrophage [J]. *Phytomedicine*, 2024, 131: 155794.
- [27] Qu H, Long Y Q, Chen L, *et al.* Metabolomic profiling identifies metabolites in the pheromone glands of *Agriophara rhombata* associated with the synthesis and release of female pheromone signals [J]. *Heliyon*, 2024, 10(23): e40768.
- [28] Dell'Olio A, Scott W T Jr, Taroncher-Ferrer S, *et al.* Tailored impact of dietary fibers on gut microbiota: A multi-omics comparison on the lean and obese microbial communities [J]. *Microbiome*, 2024, 12(1): 250.
- [29] Tang M Y, Zhao L, Huang F C, *et al.* Liuweizhiji Gegen-Sangshen beverage protects against alcoholic liver disease in mice through the gut microbiota mediated SCFAs/GPR43/GLP-1 pathway [J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1495695.
- [30] Noor N, Alamgeer, Ali Alyami B, *et al.* Appraisal of hypotensive effect of natural monoterpene: Bornyl acetate and *in-silico* molecular docking analysis [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2021, 34(2(Supplementary)): 731-735.
- [31] Román M, Louro J, Posso M, *et al.* Breast density, benign breast disease, and risk of breast cancer over time [J]. *Eur Radiol*, 2021, 31(7): 4839-4847.
- [32] Karayazi Atıcı Ö, Govindarajan N, Lopetegui-González I, *et al.* Prolactin: A hormone with diverse functions from mammary gland development to cancer metastasis [J].

- Semin Cell Dev Biol*, 2021, 114: 159-170.
- [33] O'Leary K A, Shea M P, Salituro S, *et al.* Prolactin alters the mammary epithelial hierarchy, increasing progenitors and facilitating ovarian steroid action [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(4): 1167-1179.
- [34] Tchoupang E N, Yajji V, Wangbara J B, *et al.* *In vitro* and *In vivo* antiproliferative actions of *Solanum gilo* Raddi (Solanaceae) fruit extract on breast tissues [J]. *Adv Pharmacol Pharm Sci*, 2022, 2022: 6834626.
- [35] You Z Q, Sun J Y, Xie F, *et al.* Modulatory effect of fermented *Papaya* extracts on mammary gland hyperplasia induced by estrogen and progestin in female rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8235069.
- [36] Gjedde S, Vestergaard E T, Gormsen L C, *et al.* Serum ghrelin levels are increased in hypothyroid patients and become normalized by L-thyroxine treatment [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(6): 2277-2280.
- [37] 袁名扬, 周学刚, 扈丹丹, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨“柴胡-当归”药对治疗乳腺增生的作用机制 [J]. *药学研究*, 2022, 41(2): 71-78.
- [38] 刘景楠, 赵敏, 吴平安, 等. 西黄丸对大鼠乳腺上皮细胞凋亡及 ER、PR 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 710-715.
- [39] Wei Y, Stec B, Redfield A G, *et al.* Phospholipid-binding sites of phosphatase and tensin homolog (PTEN): Exploring the mechanism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate activation [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(3): 1592-1606.
- [40] Zhou Y J, Liu X D. The role of estrogen receptor beta in breast cancer [J]. *Biomark Res*, 2020, 8: 39.

[责任编辑 李亚楠]