

基于生物信息学与实验验证的柴胡-白芍抗乳腺癌机制研究

鲍宁¹, 李肖^{2*}

(1. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355;
2. 山东中医药大学 中医药创新研究院, 山东 济南 250355)

摘要:通过生物信息学、网络药理学以及实验验证相结合的方法,预测并验证柴胡-白芍药对抗乳腺癌配伍机制。获取癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中乳腺癌基因表达数据,筛选得到乳腺癌靶点;通过中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database, TCMSP)数据库、SEA(Similarity Ensemble Approach)数据库、Swiss Target Prediction数据库和Super PRED数据库收集柴胡、白芍潜在活性成分及靶点,对靶点进行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;构建蛋白质-蛋白质相互作用网络与成分-靶点网络,筛选得到乳腺癌关键靶点丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Polo-like kinase 1, PLK1)、细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)及柴胡-白芍抗乳腺癌关键成分柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D和芍药苷;通过Autodock软件对关键成分及靶点进行分子对接验证,并通过细胞实验验证关键成分的抗乳腺癌活性,其中通过Chou-Talalay模型证明了柴胡皂苷D与芍药苷之间存在协同增效作用;通过流式细胞术及蛋白质印迹(Western blot)实验证明了柴胡皂苷D和芍药苷能够通过阻滞细胞周期于G2/M期发挥抗乳腺癌作用。

关键词:生物信息学;网络药理学;柴胡;白芍;乳腺癌

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2395(2025)02-0278-11

The Mechanism of Chaihu-Baishao Herb Against Breast Cancer Based on Bioinformatics and Experimental Verification

BAO Ning¹, LI Xiao^{2*}

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. Innovation Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: The anti-breast cancer compatibility mechanism of Chaihu-Baishao herb pair was predicted and verified by combining bioinformatics, network pharmacology and experimental methods. The breast cancer gene expression data from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database were obtained, and breast cancer targets were screened. The ingredients and targets were collected through the TCMSP (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database) database, SEA (Similarity Ensemble Approach) database, Swiss Target Prediction database and Super PRED databases, and the targets were enriched by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis. Protein-protein interaction (PPI) network and component-target (C-T) network were used to select key breast cancer targets, including Polo-like kinase 1 and cyclin dependent kinase 1, and the key anti-breast cancer components of Chaihu-Baishao herb pair, including saikosaponin A, saikosaponin B2, saikosaponin D and paeoniflorin. The key components and targets PLK1 (Polo-like kinase 1) and CDK1 (cyclin dependent kinase 1) were molecularly docked and verified by Autodock

收稿日期:2024-08-31;接受日期:2024-12-31

基金项目:国家自然科学基金(82204656);中国博士后科学基金特别资助(2024T173534)

作者简介:鲍宁(1999-),女,山东临沂人,硕士,研究方向为中药药理学。E-mail:bn990918@163.com

* 通信作者:李肖(LI Xiao),E-mail:lixiaoedu@126.com

引文格式:鲍宁,李肖.基于生物信息学与实验验证的柴胡-白芍抗乳腺癌机制研究[J].山西大学学报(自然科学版),2025,48(2):278-288. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024175.

software, and the anti-breast cancer activity of the key components was verified by cell experiments. The Chou-Talalay model was used to prove the synergistic effect between saikosaponin D and paeoniflorin. Flow cytometry and Western blot experiments proved that saikosaponin D and paeoniflorin could inhibit the breast cancer by blocking the cell cycle at the G2/M phase.

Key words: bioinformatics; network pharmacology; Chaihu; Baishao; breast cancer

0 引言

乳腺癌是发生于乳腺上皮组织的恶性肿瘤,现有统计显示我国乳腺癌发病率在女性恶性肿瘤中位于首位,中国的乳腺癌发病率每年以2%~3%的速度增长,全国每年新增约21万乳腺癌患者^[1]。乳腺癌属中医学“乳岩”“乳石痛”等范畴,名老中医们认为乳腺癌是由于正气不足,七情所伤,肝、脾、肾等脏腑功能失调,气血不足、冲任失调等多种致病因素长期作用下导致的气滞、痰浊、瘀血、邪毒等相互作用于乳房而形成的肿块^[2]。中医药对于乳腺癌的治疗原则基于“瘀、毒、虚”这一基本病机,多采用疏肝健脾、化痰解毒等法,常见的方剂有逍遥散(柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、甘草、生姜、薄荷)、柴胡疏肝散(柴胡、陈皮、川芎、香附、枳壳、芍药、甘草)、四逆散(柴胡、白芍、枳实、甘草)等调肝理脾方剂^[3-4]。刘杉杉通过对乳腺癌患者的中药处方进行药物组合规律统计,发现高频药物组合及药对组合主要以逍遥散药物加减组成为主,其中柴胡-白芍为最常用的药物组合之一,并且在临床常用于I、II期乳腺癌,注重疏肝解郁、调肝理脾的主要治法。柴胡升发阳气、疏肝解郁,白芍柔肝且养血,与柴胡相辅相成,两者联用即可疏肝行气,又可调肝郁血虚之证^[4]。

网络药理学是一种利用系统生物学方法研究药物作用机制的学科,其已在中药抗乳腺癌的研究中得到越来越多的应用。近年来有大量研究通过网络药理学方法揭示了中药抗乳腺癌的作用机制,如四物汤中的山柰酚、 β -谷甾醇、没食子酸等能通过调控细胞周期进程、血管生成等通路发挥治疗乳腺癌的作用,表明了其具有多成分和多通路协同作用的特点^[5]。通过网络药理学方法也发现了逍遥散能够通过干预肿瘤免疫、炎症反应等多类型细胞通路协同发挥抗三阴性乳腺癌的作用^[6]。中药复方中的药物常包含多种活性成分,各自

具有不同的药理活性,作为逍遥散的主要组成部分,柴胡-白芍药对抗乳腺癌的作用有待进一步探究。

本研究基于基因表达数据,将生物信息学与网络药理学方法相结合,筛选柴胡-白芍发挥抗乳腺癌作用的成分、靶点和通路,预测得到的潜在活性成分与靶蛋白进行分子对接,通过体外细胞实验进行初步验证,阐明柴胡-白芍抗乳腺癌的作用机制,不仅能为以该药为基础的中药复方抗乳腺癌研究提供科学依据,同时也为含该药对的中药复方临床治疗乳腺癌提供应用参考,有助于揭示传统中药的作用机制,促进中药现代化发展。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠乳腺癌细胞(4T1)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640培养基、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;胰蛋白酶、Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA)强裂解液、噻唑蓝(MTT)购自上海碧云天生物科技有限公司;柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D、芍药苷购自成都埃法生物科技有限公司;细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、Horseradish Peroxidase (HRP)标记的二抗PLK1抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

CO₂细胞培养箱、酶标仪购自Thermo Fisher Scientific公司;流式细胞仪购自美国BD公司(Becton, Dickinson and Company);低温高速离心机购自Eppendorf公司;垂直电泳仪、凝胶成像仪购自Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 乳腺癌靶点获取

在癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中获取乳腺癌基因表达数据,将基因表达谱进行 \log_2 转换,差异表达基因(differential expression genes, DEGs)分析使用limma软件包,并以 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 2$ 和 $P < 0.05$ 为条件进行筛选,筛选后得到的差异基因作为乳腺癌靶点^[7]。

2.2 乳腺癌关键靶点筛选

String在线网站用于构建乳腺癌靶点的蛋白-蛋白互作(PPI)网络,导出文件并使用Cytoscape 3.9.1软件中的分子复合体检测(Molecular Complex Detection, MCODE)插件进行高密度子网的分析,所有条件为默认值:度阈值(Degree Cutoff)=2,节点评分阈值(Node Score Cutoff)=0.2, k-核心(k-Core)=2,最大深度(Max.Depth)=100;将得分最高的子网作为乳腺癌关键靶点。

2.3 柴胡、白芍潜在活性成分收集及靶点预测

在TCMSP数据库(<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>)中以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(drug-like properties, DL) ≥ 0.18 为条件,筛选柴胡、白芍潜在活性成分,并获取活性成分对应的靶点。此外,通过查询文献,补充数据库中未收录但具有抗癌活性的成分,获取成分的简化分子线性输入规范(Simplified Molecular Input Line Entry System, SMILES)号,并导入到SEA数据库、Super PRED数据库和Swiss Target Prediction数据库,进行靶点预测,将上述靶点合并、去重即为柴胡-白芍靶点^[8]。

2.4 拓补网络构建及通路富集分析

将乳腺癌靶点与柴胡-白芍靶点取交集,即为柴胡-白芍抗乳腺癌靶点。在Cytoscape软件中构建成分-靶点(C-T)网络,用于分析成分与靶点之间的相互作用关系。在DAVID网站(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)中进行柴胡-白芍抗乳腺癌靶点的KEGG通路富集分析^[9]。

2.5 关键活性成分及靶点筛选

将乳腺癌关键靶点与柴胡-白芍靶点取交集,即得柴胡-白芍抗乳腺癌关键成分及靶点。

2.6 关键成分与靶点分子对接验证

通过Autodock软件进行分子对接验证,简单来说,分别从Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)及RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取小分子sdf文件及蛋白pdb结构,使用Autodock Tools进行蛋白和小分子的前处理,然后进行对接。分子对接得到的结合能越低表示结构越稳定,最后使用Pymol软件进行可视化处理。

2.7 关键靶点生物信息学分析

在UCSC数据库(<https://xenabrowser.net/>)中下载经统一标准化的泛癌数据集,并提取关键靶点在乳腺癌各个样本中的表达数据,进行 \log_2 转换,绘制靶点在肿瘤组织及正常组织中的基因表达量图。提取TCGA数据库中乳腺癌的临床信息,绘制关键靶点的临床分期、生存时间与表达量的关系图,以及免疫细胞浸润的相关性等。

2.8 细胞存活实验及药物协同作用验证

将处于对数生长期的4T1细胞接种于96孔板中,每孔5 000个细胞,同时设置对照组,待细胞贴壁后进行药物处理,然后每孔加入10 μL 的MTT,孵育4 h后加入DMSO置于酶标仪上测定吸光度,检测细胞存活率。通过Chou-Tatalay模型探究两个单体成分之间的协同关系,药物组合指数(CI) < 1 为协同作用。

2.9 流式细胞术检测细胞周期分布

将细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁后进行药物处理,然后收集细胞使用体积分数75%乙醇4 $^{\circ}\text{C}$ 固定,使用PI进行染色,置于BD Accuri C6流式细胞仪检测,使用Modfit软件分析各周期的分布情况。

2.10 Western blot法检测蛋白表达

将细胞接种于6孔板中,进行给药处理,收集细胞后使用RIPA裂解液在冰上裂解细胞,离心获取上清液,蛋白变性后进行电泳、转膜,使用快速封闭液进行封闭,对应的一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后二抗室温孵育1 h,置于化学发光成像仪上检测蛋白表达情况。

2.11 统计学分析

数据采用GraphPad Prism 9.0软件进行处理,方法采用单因素方差分析(One-way ANO-

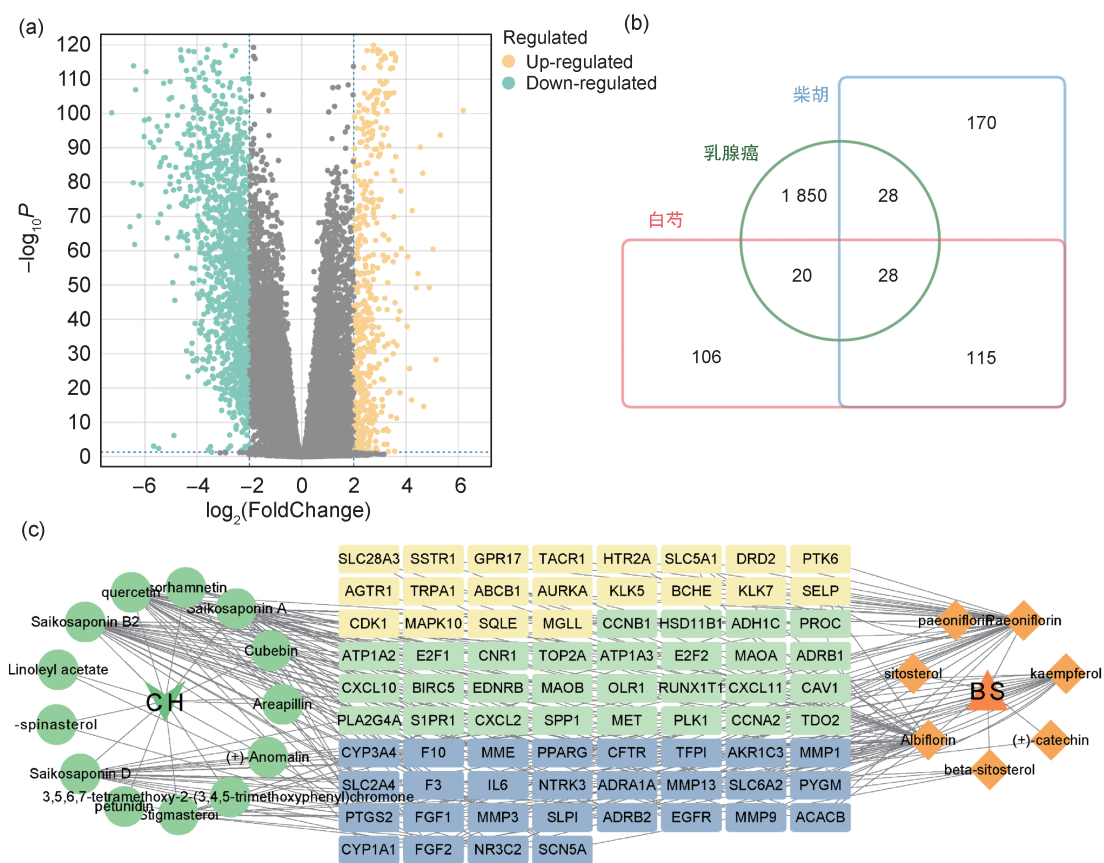


图1 乳腺癌靶点及柴胡-白芍抗乳腺癌靶点

(a) 差异基因火山图; (b) Venn图; (c)成分-靶点网络图。

Fig. 1 Breast cancer targets and Chaihu-Baishao anti-breast cancer targets

(a) Differential gene volcano map; (b) Venn map; (c) Component-target network map.

VA), $P < 0.05$ 表示有差异。

3 结果

3.1 柴胡-白芍抗乳腺癌成分及靶点

对TCGA基因表达数据进行差异基因分析,结果显示共有1926个差异基因,其中上调550个,下调1376个(图1(a))。通过检索TCMSP数据库筛选并进行文献补充,整理得到柴胡有17个潜在活性成分,白芍有10个活性成分(表1)。通过TCMSP数据库、SEA数据库、Swiss target prediction数据库及Super PRED数据库预测得到柴胡靶点341个、白芍靶点269个,与乳腺癌靶点取交集得到柴胡-白芍潜在抗乳腺癌成分20个,其中柴胡13个,白芍7个,对应抗乳腺癌靶点76个,其中柴胡独自调控28个,白芍独自调控20个,两者共同调控28个(图1(b),图1(c))。

3.2 KEGG通路富集分析

分别对柴胡及白芍抗乳腺癌靶点进行通路

富集,根据pvalue进行排序,分析可发现,柴胡和白芍所调节的20条通路中,两药共同调控的通路有11条。其中柴胡调控的前5条通路分别为癌症通路、钙信号通路、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂抵抗、白细胞介素17(IL-17)信号通路、膀胱癌;白芍调控的前5条通路分别为癌症通路、钙信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗、IL-17信号通路、神经活性配体-受体相互作用(图2)。

3.3 关键活性成分及靶点筛选

为了进一步探索柴胡-白芍抗乳腺癌的关键成分及靶点,首先对乳腺癌靶点进行关键靶点分析,通过Cytoscape软件中的MCODE插件分析得到关联最密切的PPI网络包含靶点99个(图3(a)),再与柴胡、白芍靶点取交集得到柴胡抗乳腺癌靶点5个(BIRC5、CCNA2、CCNB1、PLK1、TOP2A),白芍抗乳腺癌靶点2个(AURKA、CDK1)(图3(b)),对应的成分有芍药内酯苷(AURKA)、芍药苷

表1 柴胡、白芍活性成分

Table 1 Active ingredients of Chaihu and Baishao

名称	ID	Molecule Name	MW	OB/%	DL	CAS
豆甾醇	CH-1	Stigmasterol	412.70	43.83	0.76	83-48-7
α -菠菜甾醇	CH-2	Alpha-Spinasterol	412.70	42.98	0.76	481-18-5
白花前胡乙素	CH-3	Praeruptorin B	426.47	46.06	0.66	81740-07-0
黄芩苷	CH-4	Baicalin	446.36	40.12	0.75	21967-41-9
葎澄茄素	CH-5	Cubebin	356.37	57.13	0.64	18423-69-3
—	CH-6	3',4',5',3,5,6,7-Heptamethoxyflavone	432.43	31.97	0.59	17245-30-6
长管贝壳杉素 A	CH-7	Longikaurin A	348.44	47.72	0.53	75207-67-9
茵陈黄酮	CH-8	Arcapillin	360.32	48.96	0.41	83162-82-7
异鼠李素	CH-9	Isorhamnetin	316.27	49.6	0.31	480-19-3
木犀草苷	CH-10	Petunidin	317.27	30.05	0.31	13270-60-5
槲皮素	CH-11	Quercetin	302.24	46.43	0.28	117-39-5
山柰酚	CH-12	Kaempferol	286.24	41.88	0.24	520-18-3
—	CH-13	Sainfuran	286.28	79.91	0.23	90664-32-7
乙酸亚油醇酯	CH-14	Linoleyl acetate	308.51	42.10	0.20	5999-95-1
柴胡皂苷 A	CH-15	Saikosaponin A	781.00	32.39	0.09	20736-09-8
柴胡皂苷 B2	CH-16	Saikosaponin B2	781.10	20.45	0.13	58316-41-9
柴胡皂苷 D	CH-17	Saikosaponin D	781.10	34.39	0.09	20874-52-6
芍药新苷	BS-1	Lactiflorin	462.45	49.12	0.80	88623-95-4
芍药苷	BS-2	Paeoniflorin	480.47	53.87	0.79	23180-57-6
白桦脂酸	BS-3	Mairin	456.71	55.38	0.78	472-15-1
β -谷甾醇	BS-4	Beta-sitosterol	414.72	36.91	0.75	83-46-5
苯甲酰芍药苷	BS-5	Benzoylpaeoniflorin	584.57	31.27	0.75	38642-49-8
芍药二酮	BS-6	Palbinone	358.49	43.56	0.53	139954-00-0
芍药苷元	BS-7	Paeoniflorgenone	318.34	87.59	0.37	80454-42-8
(+)-儿茶素水合物	BS-8	Catechin	290.27	54.83	0.24	154-23-4
山柰酚	BS-9	Kaempferol	286.24	41.88	0.24	520-18-3
芍药内酯苷	BS-10	Albiflorin	480.47	12.09	0.77	39011-90-0

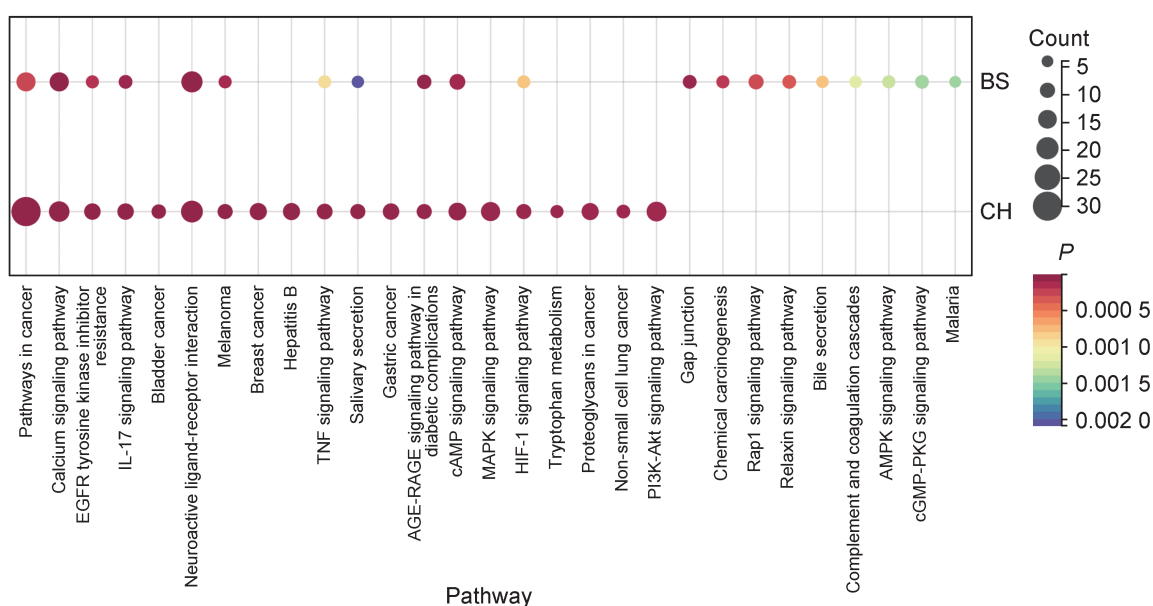


图2 KEGG通路富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis on KEGG pathway

(CDK1)、槲皮素(BIRC5、CCNB1、TOP2A)、异鼠李素(CCNA2)、柴胡皂苷A(PLK1)、柴胡皂苷B2(PLK1)、柴胡皂苷D(PLK1)。

3.4 分子对接验证结果

使用分子对接技术预测柴胡、白芍关键成分与靶点之间的结合活性,在3.3所筛选的关键成分中,槲皮素和异鼠李素存在于较多中药,不具有相对的特异性,同时依据文献报道成分所在中药中的含量及其抗肝癌活性,最终选取柴胡中的柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D及白芍中的成分芍药苷,与对应的靶点PLK1和CDK1进行对接,通过Pymol软件对关键成分及靶点对接情况进行可视化,结果如图4所示,各

成分与靶点之间均能通过形成氢键的方式进行结合,且结合活性均较强,各单体与靶点之间的结合能分别为-3.37 kJ/mol、-5.32 kJ/mol、-4.66 kJ/mol、-5.37 kJ/mol。

3.5 关键靶点的生物信息学分析

为了探究关键靶点在乳腺癌进展中的作用,通过生物信息学对关键靶点在肿瘤组织及正常组织中的表达、关键靶点与乳腺癌临床分期、关键靶点在乳腺癌中的免疫浸润等进行分析。结果显示PLK1和CDK1在乳腺癌组织和正常组织中的表达据有显著性差异,见图5(a)、图5(d),并且这两个基因的高表达与乳腺癌的生存时间缩短以及临床分期有明显相关性

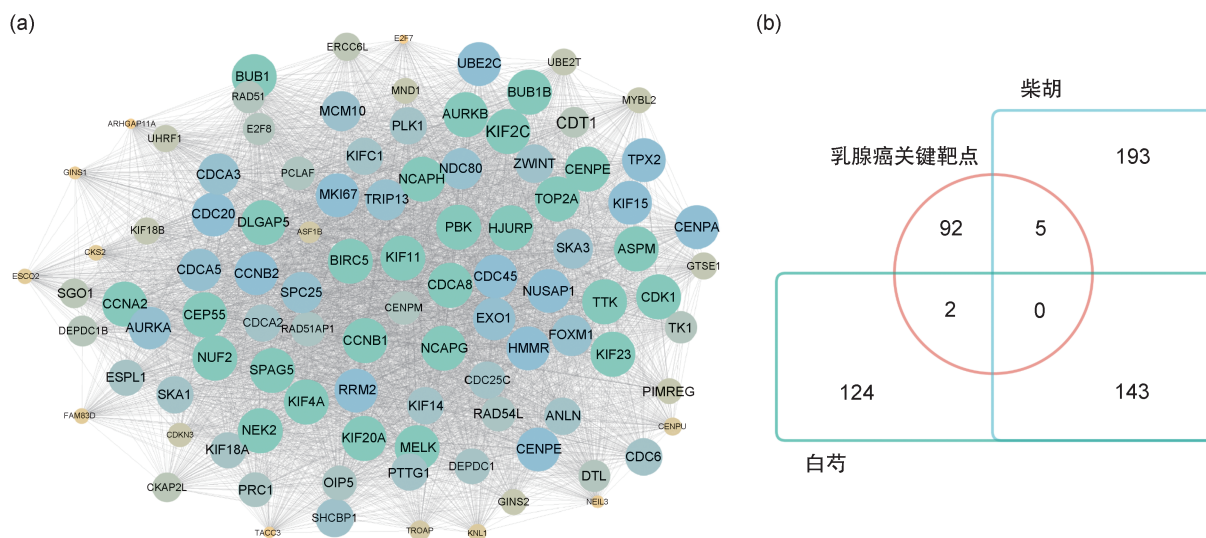


图3 关键活性成分及靶点筛选

(a) 乳腺癌关键靶点; (b) Venn图

Fig. 3 Screening of key active ingredients and targets

(a) Key targets for breast cancer; (b) Venn diagram

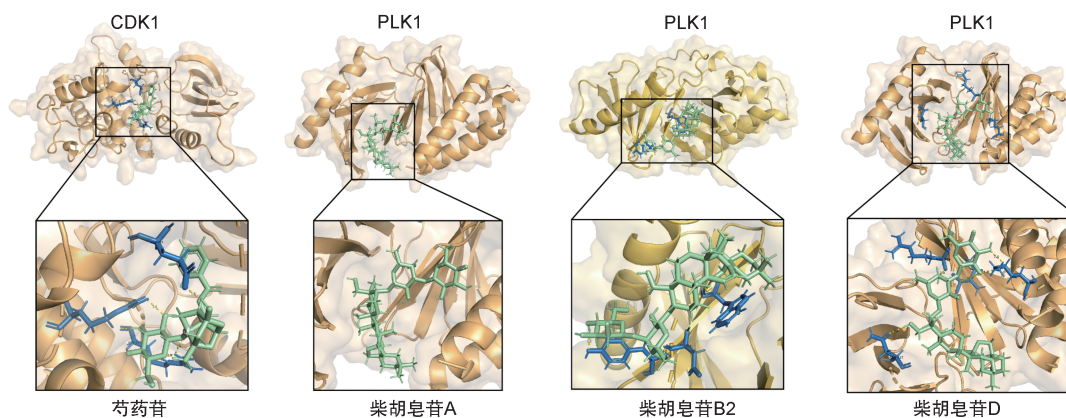


图4 分子对接结构示意图

Fig. 4 Schematic diagram of molecular docking structures

见图 5(b)、图 5(c)、图 5(e)、图 5(f),以及免疫浸润分析结果显示 PLK1 和 CDK1 与免疫细胞浸润均显著相关,见图 5(g)。

3.6 柴胡、白芍活性成分抗乳腺癌作用及药物协同作用研究

如图 6(a)所示,不同浓度的柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B2、柴胡皂苷 D、芍药苷作用 24 h 后对乳

腺癌细胞的增殖有抑制作用,且呈剂量依赖性,各成分作用的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为柴胡皂苷 A 8.01 μmol/L,柴胡皂苷 B2 75.84 μmol/L,柴胡皂苷 D 4.89 μmol/L,芍药苷 104.40 μmol/L。

为了进一步探究柴胡-白芍药对成分伍的抗乳腺癌协同作用,根据各单体药物对细胞存活率的影响,分别在柴胡和白芍中选取毒性

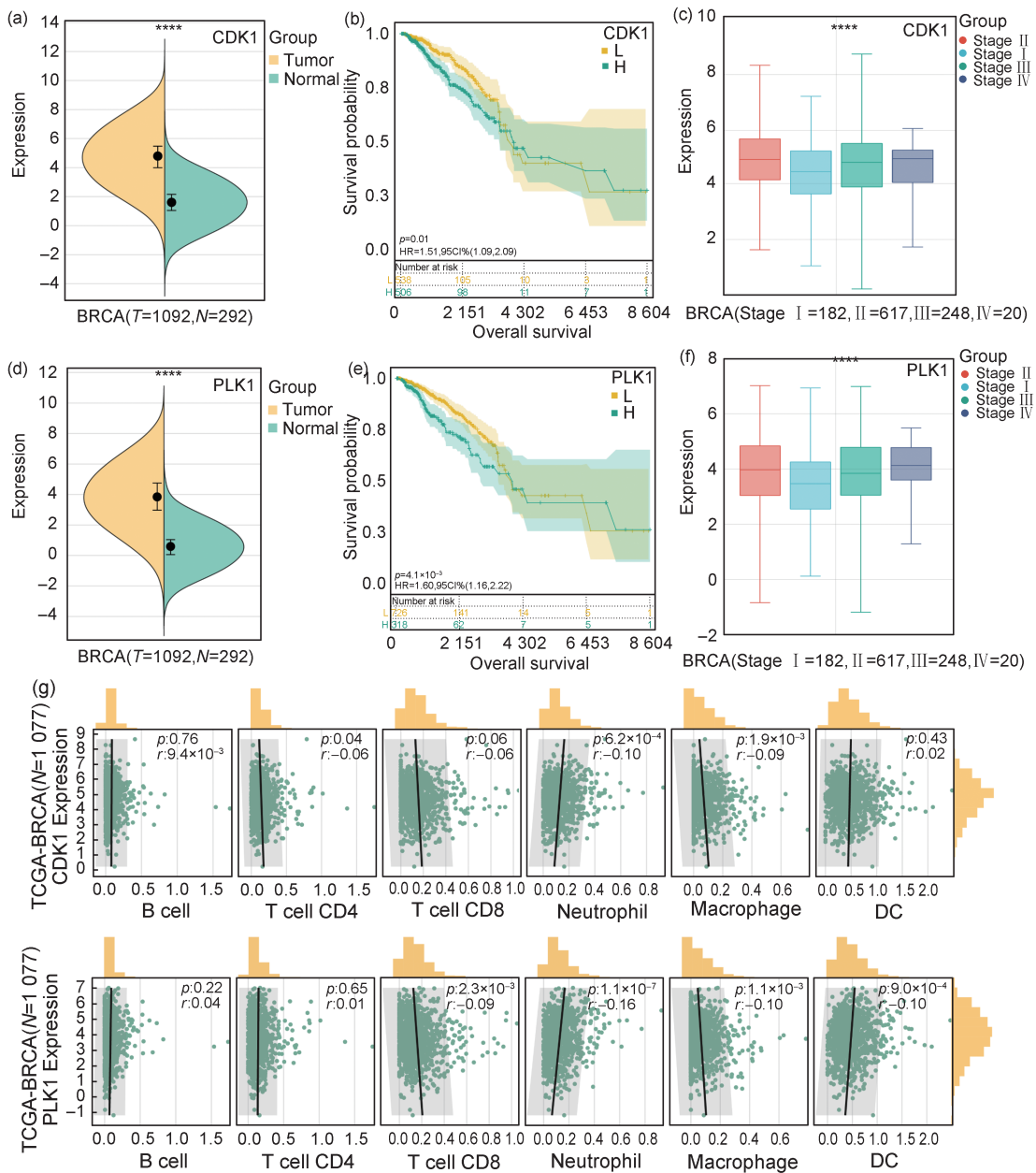


图5 关键靶点生物信息学分析

(a), (d): CDK1 和 PLK1 的差异表达分析; (b)、(e): CDK1 和 PLK1 的生存分析; (c)、(f): CDK1 和 PLK1 的临床分期; (g): 免疫浸润分析(*** $P < 0.0001$)。

Fig. 5 Bioinformatics analysis of key targets

(a), (d): Differential expression analyses; (b), (e): Survival analyses; (c), (f): Clinical staging; (g) Immune infiltration analyses. (*** $P < 0.0001$)

最强的单体,利用 Chou-Talalay 数学模型来评价筛选得到的关键成分——柴胡皂苷 D 和芍药苷之间是否存在一种协同作用。结果显示,相较于单独使用柴胡皂苷 D 或芍药苷,两者联合使用显示出了更强的抑制作用。为了探究两药组合是否具有协同作用,使用 CompuSyn 软件进行协同作用的计算,将所得抑制率输入到软件中,结果表明除了 6 $\mu\text{mol/L}$ 的组合之外,其余组合均表现出协同作用($\text{CI}<1$),且最佳协同剂

量为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的组合。

3.7 柴胡皂苷 D 与芍药苷对细胞周期的影响

流式细胞术结果显示,各浓度的柴胡皂苷 D 和芍药苷均能将细胞周期阻滞于 G₂/M 期,且呈剂量依赖性。相对于单用药来看,柴胡皂苷 D 与芍药苷联合使用 (10 $\mu\text{mol/L}$ + 10 $\mu\text{mol/L}$) 表现出明显的增效作用 ($P<0.01$)。

3.8 Western blotting 法检测蛋白表达

蛋白表达结果显示,柴胡皂苷 D (10 $\mu\text{mol/L}$)、

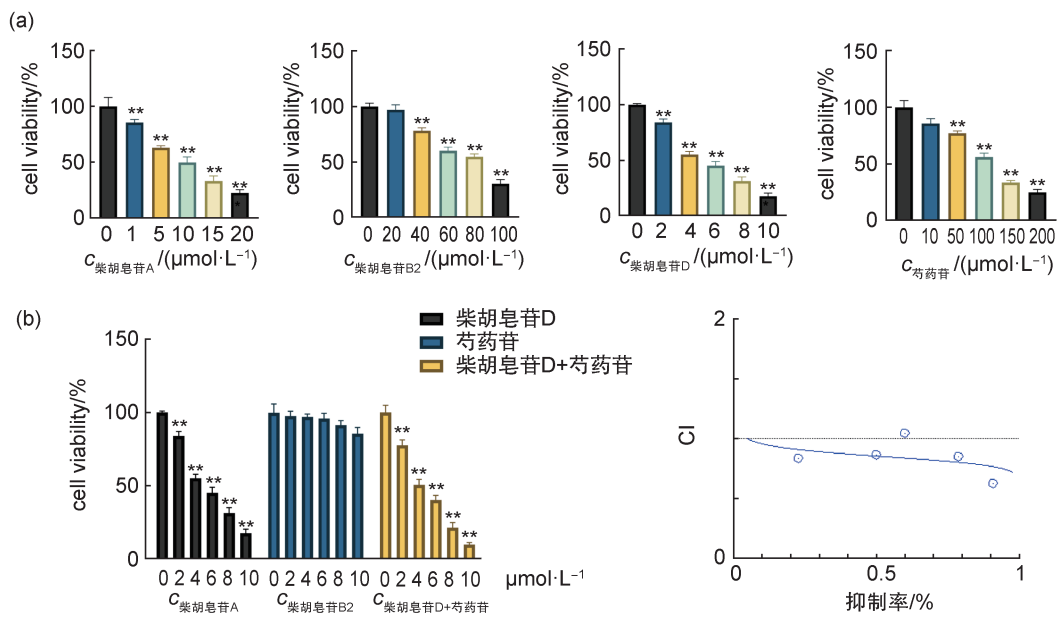


图6 细胞存活率及药物协同作用评价

(a) 各单体对乳腺癌细胞 4T1 增殖的影响; (b) 柴胡皂苷 D 与芍药苷的协同抗乳腺癌作用 ($P<0.05$, $**P<0.01$)。

Fig. 6 Evaluation of cell survival rate and drug synergy

(a) Effects of each ingredient on the proliferation of breast cancer cell 4T1; (b) Synergistic anti-breast cancer effect of saikosaponin D and paeoniflorin ($P<0.05$, $**P<0.01$).

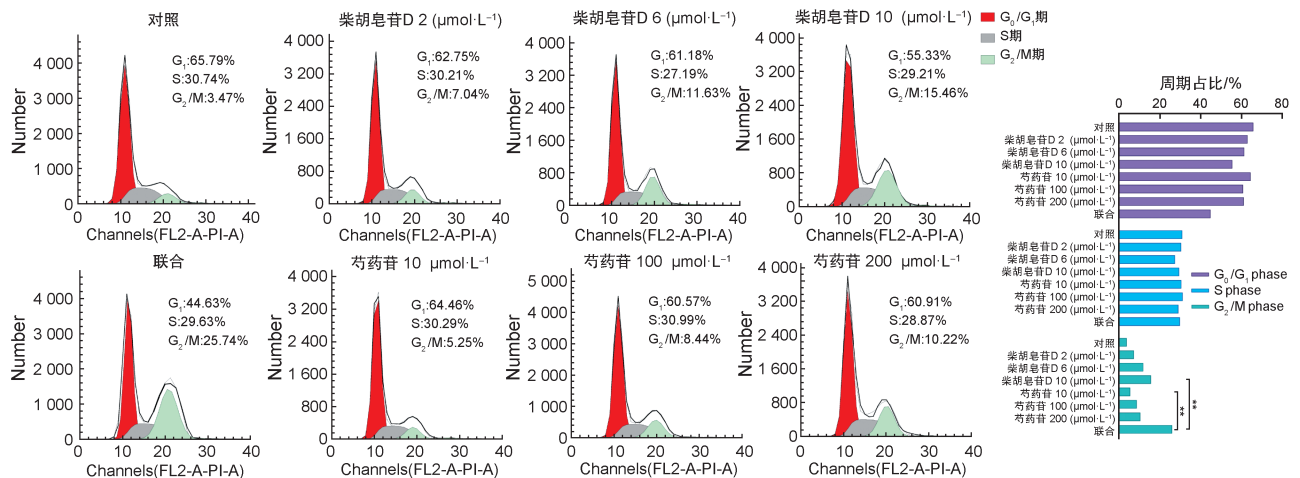


图7 柴胡皂苷 D、芍药苷以及联合组对 4T1 细胞周期的影响 ($P<0.05$, $**P<0.01$)

Fig. 7 Effects of saikosaponin D, paeoniflorin and their combination on 4T1 cell cycle ($P<0.05$, $**P<0.01$)

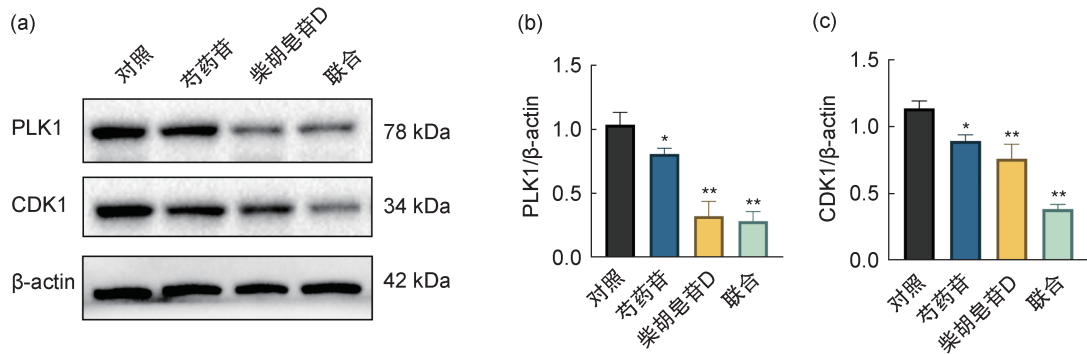


图8 柴胡皂苷D、芍药苷以及联合组对4T1细胞周期蛋白表达的影响(* $P<0.05$,** $P<0.01$)

(a) 柴胡皂苷D、芍药苷以及联合组处理后PLK1和CDK1蛋白表达结果;(b) PLK1蛋白表达统计图;(c) CDK1蛋白表达统计图。

Fig. 8 Effects of saikosaponin D, paeoniflorin and their combination on the expression of cyclin in 4T1 cells (* $P<0.05$,** $P<0.01$)

(a) Protein expression results of PLK1 and CDK1 after treatment with saikosaponin D, paeoniflorin, and the combination group; (b) Statistical graph of PLK1 protein expression; (c) Statistical graph of CDK1 protein expression.

芍药苷 (10 $\mu\text{mol/L}$) 均能降低细胞周期调控蛋白CDK1及激酶PLK1的表达,且两药联合使用 (10 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用更显著。

4 讨论

中医多认为乳腺癌早期常为肝气郁结,其后则出现气滞血瘀的症状,因此通常将温阳扶正、疏肝解郁、补益冲任作为治疗原则^[10]。逍遥散组方严谨,首载于宋代《太平惠民和剂局方》卷九:“治妇人诸疾”,是常用的疏肝解郁类方剂,目前临床上广泛应用于乳腺癌及乳腺癌患者相关性疲乏、乳腺癌相关抑郁发展等疾病的治疗^[11-14]。柴胡-白芍为逍遥散中的君药、臣药,柴胡苦、辛,归肝、胆经,具有疏肝解郁,升举阳气的功效;白芍柔肝止痛,归肝、脾经^[15]。作为逍遥散中的核心药对,柴胡-白芍抗乳腺癌的潜在作用机制有待进一步研究。

本研究旨在通过结合多种药理研究中常用的方法如生物信息学、网络药理学和分子对接等预测柴胡-白芍抗乳腺癌的作用成分和机制,同时探究其配伍协同机制。结果显示,柴胡-白芍抗乳腺癌成分共20个,其中柴胡13个,白芍7个,对应76个抗乳腺癌靶点,其中柴胡独立调控28个,白芍独立调控20个,共同调节28个。通过KEGG通路富集分析预测得到柴胡和白芍共调节29条抗乳腺癌通路,共同调控11条,以上结果从成分到通路都说明柴胡和白芍之前的协同配伍组作用。

为了进一步明确其发挥抗乳腺癌作用的关键成分及靶点,首先对乳腺癌靶点进行关键子网的筛选,进一步得到柴胡-白芍中主要是柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D以及芍药苷发挥关键抗乳腺癌作用,其作用靶点为CDK1和PLK1。PLK1是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,能够通过调节细胞有丝分裂、G2/M的DNA损伤应答等,已被证实在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中高表达^[16-17]。同样,CDK1作为调控G2/M期的关键蛋白,也在肿瘤增殖进程的调控中起着关键作用,CDK1过表达使肿瘤细胞过度增殖^[18]。分子对接结果显示芍药苷、柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D与CDK1和PLK1均有较高的结合活性,研究发现柴胡皂苷D能够降低MDA-MB-231细胞周期调控因子cyclin B1的表达,将细胞周期阻滞于G2/M期,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[19-20]。通过细胞实验验证了该药对中4个关键成分柴胡皂苷A、柴胡皂苷B2、柴胡皂苷D和芍药苷,均能显示出抗乳腺癌细胞生长的作用;选取柴胡中效果最佳的柴胡皂苷D与芍药苷进行协同作用评价,发现两药之间确实存在协同作用,最佳浓度协同剂量为10 $\mu\text{mol/L}$ 。流式细胞术结果与western blot结果也显示,两成分使用能够诱导乳腺癌细胞周期阻滞于G2/M期,且能够协同抑制周期蛋白CDK1及PLK1的表达。

本研究基于TCGA数据库乳腺癌基因表达数据,结合网络药理学分析方法及体外细胞实

验验证了柴胡、白芍能够通过多成分间的协同作用以及诱导细胞周期停滞发挥抗乳腺癌的作用,并存在协同增效作用。本研究可为柴胡-白芍抗乳腺癌应用提供一定参考,在中药研究领域具有重要意义,有助于推动中药在癌症治疗中的发展,为中药的临床应用提供更深入的理论支持,但有关结果有待进一步的体内试验加以验证。

参考文献:

- [1] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, *et al.* Breast Cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, **15**(7): e279-89. DOI:10.1016/s1470-2045(13)70567-9.
- [2] 郑婉群,周岱磐,季乔雪,等. 乳腺癌发病与中医体质及辨证分型的相关性研究[J]. 中国临床保健杂志, 2024, **27**(3): 361-365.
ZHENG W Q, ZHOU D P, JI Q X, *et al.* Correlation between Breast Cancer Incidence and Traditional Chinese Medicine Constitution and Syndrome Differentiation [J]. *Chin J Clin Healthc*, 2024, **27**(3): 361-365.
- [3] 朱梦鸽. 柴胡疏肝散加减改善肝郁脾虚型乳腺癌患者化疗后不良反应的临床观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2024. DOI: 10.27253/d.cnki.gnjzu.2024.000277.
ZHU M G. Observation on The Improvement of Adverse Reactions After Chemotherapy in Patients with Liver Depression and Spleen Deficiency Breast Cancer with Chaihu Shugan San[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2024. DOI: 10.27253/d.cnki.gnjzu.2024.000277.
- [4] 刘彬彬. 基于数据挖掘的中医药治疗乳腺癌用药经验研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023. DOI: 10.26980/d.cnki.gcczc.2023.000788.
LIU S S. Study on Drug Use Experience of Traditional Chinese Medicine for Breast Cancer Based on Data Mining [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023. DOI: 10.26980/d.cnki.gcczc.2023.000788.
- [5] 单丽芳,康国娇,张超,等. 基于网络药理学和分子对接探讨四物汤抗乳腺癌的作用机制[J]. 中草药, 2021, **52**(13): 3943-3953. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.018.
SHAN L F, KANG G J, ZHANG C, *et al.* Mechanism of Siwu Decoction on Breast Cancer Based on Network Pharmacology and Molecular Docking[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, **52**(13): 3943-3953. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.018.
- [6] 张占伟,刘丽芳. 基于单细胞RNA测序及网络药理学方法探讨逍遥散治疗三阴性乳腺癌的潜在分子机制[J]. 中药新药与临床药理, 2022, **33**(11): 1519-1527. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.11.011.
- ZHANG Z W, LIU L F. Exploring the Potential Molecular Mechanism of Xiaoyao Powder for the Treatment of Triple-negative Breast Cancer Based on Single-cell RNA-seq and Network Pharmacology Approach[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2022, **33**(11): 1519-1527. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.11.011.
- [7] 鲍宁,陈子超,刘名玉,等. 整合生物信息学与实验验证解析黄芪-莪术药对抗肝癌配伍机制[J]. 中草药, 2024, **55**(1): 114-126.
BAO N, CHEN Z C, LIU M Y, *et al.* Mechanisms of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma Herb Pair for Anti-hepatocellular Carcinoma by Integrating Bioinformatics and Experimental Validation[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, **55**(1): 114-126.
- [8] 李肖. 柴胡-白芍药对及其成分伍增效抗抑郁作用与协同机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2021. DOI: 10.27284/d.cnki.gsxiu.2021.000177.
LI X. Study on The Enhanced Antidepressant Effects and Synergistic Mechanisms of Chaihu-Baishao Herb Pair and The Combination of its Ingredients[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021. DOI: 10.27284/d.cnki.gsxiu.2021.000177.
- [9] SHANG L, WANG Y, LI J, *et al.* Mechanism of Sijunzi Decoction in the Treatment of Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology and Experimental Validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, **302**(pt a): 115876. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115876.
- [10] 王怡,刘胜. 刘胜教授治疗三阴性乳腺癌经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, **43**(7): 675-678. DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2019.07.012.
WANG Y, LIU S. Professor LIU Sheng's Experience in Treating Triple-negative Breast Cancer[J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2019, **43**(7): 675-678. DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2019.07.012.
- [11] 谢贞明,罗莉,杨柱,等. 逍遥散加减方联合化疗治疗乳腺癌的Meta分析[J]. 时珍国医国药, 2021, **32**(7): 1779-1785. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.71.
XIE Z M, LUO L, YANG Z, *et al.* Meta-analysis of Xiaoyaosan Plus or Minus Prescription Unite Chemotherapy for Treating Breast Cancer[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2021, **32**(7): 1779-1785. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.71.
- [12] 胡正军,任广胜,金益峰,等. 逍遥散加减治疗肝郁脾虚型乳腺癌患者癌症相关性疲乏疗效观察[J]. 中医药信息, 2024, **41**(8): 52-57. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20240809.
HU Z J, REN G S, JIN Y F, *et al.* Clinical Observation on the Efficacy of Modified Free Wanderer Powder in

- Treating Cancer-related Fatigue in Breast Cancer Patients of Liver Qi Stagnation and Spleen Deficiency Type[J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2024, **41**(8): 52–57. DOI: 10.19656/j.cnki.1002-2406.20240809.
- [13] 焦蕉, 罗康华, 黎月恒, 等. 逍遥散加减方治疗乳腺癌术后化疗患者肝郁脾虚型抑郁综合征的临床观察[J]. *肿瘤药学*, 2019, **9**(1): 107–111. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2019.01.23.
JIAO J, LUO K H, LI Y H, *et al*. Clinical Observation on Modified Xiaoyao Powder Treatment for Patients with Depression Syndrome of Liver Depression and Spleen Deficiency during Adjuvant Chemotherapy after Breast Cancer Operation[J]. *Anti Tumor Pharm*, 2019, **9**(1): 107–111. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2019.01.23.
- [14] WANG C, YIN L F. Xiaoyaosan Formula Augments Adjuvant Therapy and Enhances Postoperative Breast Cancer Care[J]. *Front Pharmacol*, 2024, **15**: 1388646. DOI: 10.3389/fphar.2024.1388646.
- [15] 李静, 曹兰秀, 郑文. 白芍常用药对配伍探析[J]. *中医学报*, 2024, **39**(6): 1214–1219. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2024.06.203.
LI J, CAO L X, ZHENG W. Compatibility of Commonly Used Drug Pairs of Baishao (*Paeonia Radix Alba*) in Prescriptions[J]. *Acta Chin Med*, 2024, **39**(6): 1214–1219. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2024.06.203.
- [16] WANG B Y, HUANG X T, LIANG H P, *et al*. PLK1 Inhibition Sensitizes Breast Cancer Cells to Radiation via Suppressing Autophagy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021, **110**(4): 1234–1247. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2021.02.025.
- [17] TAKAI N, HAMANAKA R, YOSHIMATSU J, *et al*. Polo-like Kinases (PLKS) and Cancer[J]. *Oncogene*, 2005, **24**(2): 287–291. DOI: 10.1038/sj.onc.1208272.
- [18] HAN Z T, JIA Q, ZHANG J, *et al*. Deubiquitylase YOD1 Regulates CDK1 Stability and Drives Triple-negative Breast Cancer Tumorigenesis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, **42**(1): 228. DOI: 10.1186/s13046-023-02781-3.
- [19] 罗燕, 蒋益兰, 李勇敏, 等. 柴胡皂苷 D 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、周期及周期相关调控因子表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, **39**(5): 572–576. DOI: 10.7661/j.cjim.20190322.104.
LUO Y, JIANG Y L, LI Y M, *et al*. Effects of Saikosaponin D on the Proliferation, Cell Cycle and the Expressions of Cyclins in Breast Cancer MDA-MB-231 Cells[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, **39**(5): 572–576. DOI: 10.7661/j.cjim.20190322.104.
- [20] WANG J X, QI H, ZHANG X L, *et al*. Saikosaponin D from *Radix Bupleuri* Suppresses Triple-negative Breast Cancer Cell Growth by Targeting B-catenin Signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **108**: 724–733. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.038.