·药学研究·

四味颗粒改善三阴性乳腺癌的活性物质筛选及作用研究Δ

程　林[1,2*]，王晓雯[2]，翁邦碧[2]，黄　维[1#]（1.成都中医药大学药学院，成都　611130；2.陆军军医大学第一附属医院药剂科，重庆　400038）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2026）20-2660-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2026.20.06

摘　要　目的　筛选四味颗粒改善三阴性乳腺癌（TNBC）的活性物质，并探讨其抗TNBC作用。**方法**　采用网络药理学方法，筛选四味颗粒活性成分、对应靶点及TNBC相关靶点，构建“成分-靶点”互作调控网络，并进行基因本体（GO）、京都基因和基因组数据库富集分析。以MDA-MB-231、4T1细胞为对象，筛选四味颗粒抗TNBC的活性物质；以MDA-MB-231细胞为对象，探讨活性物质单用或联用对细胞凋亡、迁移、周期、活性氧（ROS）生成以及富集通路相关蛋白表达的影响。**结果**　通过网络药理学方法共获得活性成分67个，成分靶点与TNBC靶点的交集靶点131个；核心关键作用靶点包括磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸3-激酶催化亚基α等6个；交集靶点富集于增殖、含磷基团转移酶复合物、蛋白酪氨酸激酶活性等GO功能，以及磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）、ROS等信号通路。通过细胞实验共筛选得到4个活性物质，其中熊果酸对2种细胞的半数抑制浓度为25 μmol/L，甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大黄素（仅对4T1细胞有作用）对2种细胞的半数抑制浓度均为50 μmol/L；4种物质单用（20 μmol/L）或联用（各10 μmol/L），可显著升高MDA-MB-231细胞的凋亡率（仅联合组）、相对ROS水平（仅联合组）和G_2期细胞比例（仅木犀草素组、甘草查尔酮A组和联合组），并显著降低G_1期细胞比例（仅甘草查尔酮A组和联合组）、划痕愈合率和PI3K（芦荟大黄素组除外）、Akt（芦荟大黄素组除外）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的磷酸化水平（$P<0.05$）。**结论**　四味颗粒抗TNBC的活性物质可能为熊果酸、甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大黄素，这些物质可不同程度地抑制TNBC细胞增殖和迁移，促进其凋亡，阻滞细胞周期于G_2期，诱导ROS的生成，并抑制PI3K/Akt信号通路相关蛋白的磷酸化。

关键词　四味颗粒；三阴性乳腺癌；活性物质；网络药理学

Screening of bioactive compounds and ameliorative effects of Siwei granules on triple-negative breast cancer

CHENG Lin[1,2], WANG Xiaowen[2], WENG Bangbi[2], HUANG Wei[1]（1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China; 2. Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To screen for bioactive compounds in Siwei granules against triple-negative breast cancer (TNBC), and explore their anti-TNBC effects. **METHODS** Network pharmacology was applied to screen bioactive compounds of Siwei granules, corresponding targets and TNBC-related targets. A "component-target" interaction regulatory network was constructed, followed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. Using MDA-MB-231 and 4T1 cells as subjects, bioactive compounds from Siwei granules against TNBC were screened. Using MDA-MB-231 cells as the subject, the effects of these bioactive compounds, either alone or in combination, on cell apoptosis, migration, cell cycle, reactive oxygen species (ROS) generation, and the expression of proteins related to enriched pathways were explored. **RESULTS** A total of 67 bioactive compounds were identified by network pharmacology, with 131 overlapping targets between the compound targets and TNBC targets. Six core key targets were identified, including the phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, etc. The overlapping targets were enriched in GO functions such as proliferation, phosphotransferase complexes, and protein tyrosine kinase activity, as well as in signaling pathways including phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and ROS. A total of 4 bioactive compounds were identified by cell experiments. Among them, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ursolic acid for both cell lines was 25 μmol/L, while that of licochalcone A, luteolin, and aloe-emodin (for 4T1 cells only) was 50 μmol/L for both cell lines. When administered alone (all 20 μmol/L) or in combination (10 μmol/L each), the four compounds significantly increased the apoptosis rate in MDA-MB-231 cells (only in the combination group only), relative ROS levels (only in the combination group) and the proportion of cells in the G_2 phase (only in the luteolin group, licochalcone A group, and combination group), while they significantly

Δ **基金项目** 国家自然科学基金重点国际（地区）合作研究项目（No.W2511087）

＊**第一作者** 副主任药师，博士研究生。研究方向：中药药效物质基础及其作用机理。E-mail：chenglin@tmmu.edu.cn

\# **通信作者** 教授，博士。研究方向：中药活性成分机制及构效关系。E-mail：huangwei@cdutcm.edu.cn

reduced the proportion of cells in the G_1 phase (only in the licochalcone A group and the combination group), scratch healing rate, and the phosphorylation levels of PI3K (except in the aloe-emodin group), Akt (except in the aloe-emodin group), and the mammalian target of rapamycin ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The bioactive compounds in Siwei granules responsible for its anti-TNBC activity may be ursolic acid, licochalcone A, luteolin, and aloe-emodin; these compounds can, to varying degrees, inhibit TNBC cell proliferation and migration, promote apoptosis, arrest the cell cycle in the G_2 phase, induce ROS production, and inhibit the phosphorylation the related proteins of the PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Siwei granule; triple-negative breast cancer; bioactive compounds; network pharmacology

根据国家癌症中心发布的2022年中国恶性肿瘤疾病负担数据，乳腺癌已成为我国女性发病率第2位、病死率第5位的恶性肿瘤，严重威胁女性健康[1]。其中，三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）恶性程度较高，患者易发生远处转移，复发转移后的中位生存期仅12～18个月，5年生存率仅为20%，预后极差[2]。目前，临床治疗TNBC的主要手段是以紫杉醇、蒽环类药物为基础的化疗，铂类化合物在部分治疗场景中也能表现出良好效果。然而，上述化疗药物在早期治疗中易诱导内源性或获得性耐药，从而引发显著不良反应，加之存在潜在的非特异性脱靶效应，故此类方案的临床应用严重受限[3]。

中药作为补充及替代药物，具有显著的抗癌潜力，其所含天然化合物具有毒性小、不良反应轻微、原料易得等优势[4]。其中，紫杉醇、长春花碱、秋水仙碱等天然产物，已在激素不依赖型乳腺癌的临床治疗中占据了重要地位[5－6]。因此，从天然产物中挖掘潜在抗乳腺癌药物已成为当前研究热点之一。四味颗粒是陆军军医大学第一附属医院（以下简称“我院”）院内制剂，由通草、鸡血藤、麦芽、山楂4味药材配伍而成，具有活血化瘀、软坚散结、镇痛消胀的功效，用于各类乳腺增生性疾病及乳腺结节的疗效确切。乳腺增生归为中医学的“乳癖”范畴。研究表明，“乳癖”患者乳腺组织内促癌/增殖相关蛋白表达异常，可通过异常激活磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路来广泛调控下游靶蛋白，从而介导细胞异常增殖、凋亡、迁移、侵袭等恶性生物学过程[7]。这种分子层面的改变，既是囊性乳腺增生向肿瘤性增生演进而诱发乳腺癌的重要机制，也是乳腺癌与乳腺增生共同发病机制中的关键环节[7]。基于此，本课题组推测，四味颗粒中可能存在治疗乳腺癌的药效物质。网络药理学可识别中药活性成分，预测其作用靶点及相关通路，并有助于挖掘新的适应证及活性化合物[8]。基于上述背景，本研究首先通过网络药理学方法，预测四味颗粒组方药材山楂、鸡血藤、麦芽、通草改善TNBC的活性成分群、作用靶点及相关信号通路，筛选潜在的、新的抗TNBC活性成分；随后，通过体外实验初步验证所得活性成分对TNBC细胞的影响及潜在机制，以期为该药用于TNBC的临床治疗奠定实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

3110型CO_2培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司；Novocyte型流式细胞仪购自美国ACEA公司；SpectraMax型酶标仪购自美国Molecular Devices公司；DMi型高速扫描荧光显微镜购自德国Leica公司；ChemiDOC型蛋白质印迹检测系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

紫杉醇对照品（阳性对照，批号254689）购自重庆柏欧尼生物技术有限公司；儿茶素（+）对照品（批号405292）购自重庆满欣畅生物技术有限公司；芦荟大黄素、白芷内酯、毛蕊异黄酮苷、翠雀素、表儿茶素、异黄酮素、木犀草素对照品（批号分别为241408、118307、381894、119624、25040、319507、240057）均购自重庆鑫雅锦生物技术有限公司；甘草查尔酮A、熊果酸对照品（批号分别为146196、152344）均购自重庆璟瑞生物科技有限公司。上述对照品的纯度均不低于98%。

DMEM培养基（批号152344612603）购自美国Gibco公司；胎牛血清（批号020501）购自上海淳麦生物科技有限公司；活性氧（reactive oxygen species，ROS）试剂盒[2′，7′-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）荧光探针法]、磷酸盐缓冲液（PBS）（批号分别为APC041004、232517327）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；CCK-8试剂盒（批号AT007131）购自上海碧云天生物技术有限公司；细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡相关试剂（批号分别为a643360451、ATXE28081）均购自亚科因（武汉）生物技术有限公司；兔抗PI3K、磷酸化PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）、磷酸化Akt（phosphorylated Akt，p-Akt）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）、磷酸化mTOR（phosphorylated mTOR，p-mTOR）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体和辣根过氧化酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为3600006473、5500043266、3600003598、3600004742、4588751384、3455786、9300014001）均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；兔抗Akt抗体（批号10005702）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 实验细胞

人TNBC细胞MDA-MB-231（货号CL-0150）、小鼠TNBC细胞4T1（货号CL-0007）均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 活性成分筛选

以“通草”“鸡血藤”“麦芽”“山楂”为检索词，以口服生物利用度≥30%、类药性≥0.18为筛选阈值[8]，在TCMSP、Herb数据库中检索四味颗粒组方药材的相关成分；同时，根据Herb数据库中的成分编号及名称，以分子量＜500为筛选阈值[8]，在PubMed数据库中进行补充检索。将所得成分信息录入Swiss TargetPrediction、ADME数据库（设置种属为“人”），以肠道高吸收、类药性≥2为筛选标准[8]，获得四味颗粒的活性成分。结果显示，本研究共得到67个活性成分，其中3个来自通草，15个来自鸡血藤，9个来自麦芽，40个来自山楂。

2.1.2 四味颗粒和TNBC靶点筛选

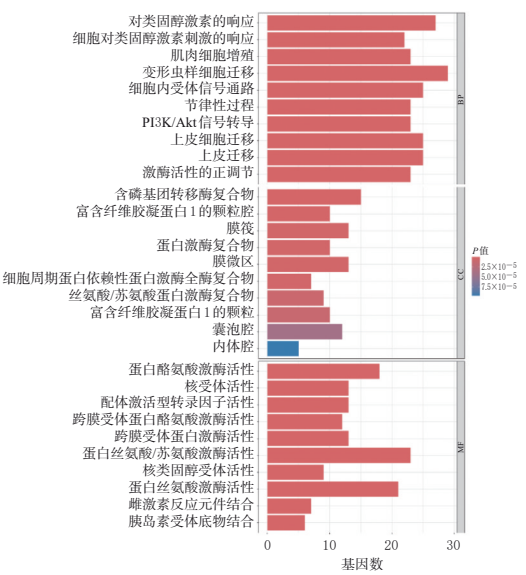
基于“2.1.1”项下所得四味颗粒活性成分，系统检索Swiss TargetPrediction数据库（设置种属为“人”），进行活性成分靶点预测；同时，在PharmMapper数据库中进行补充检索。经去重、校正后，本研究共得到431个四味颗粒活性成分潜在靶点。以“negative breast cancer”“triple-negative breast cancer”为关键词，系统检索GeneCards、Disgenet、OMIM数据库，进行疾病靶点预测。经去重、校正后，本研究共得到1 922个TNBC相关靶点。对上述四味颗粒活性成分潜在靶点与TNBC相关靶点取交集，本研究共得到131个交集靶点。

2.1.3 “成分-靶点”互作调控网络绘制

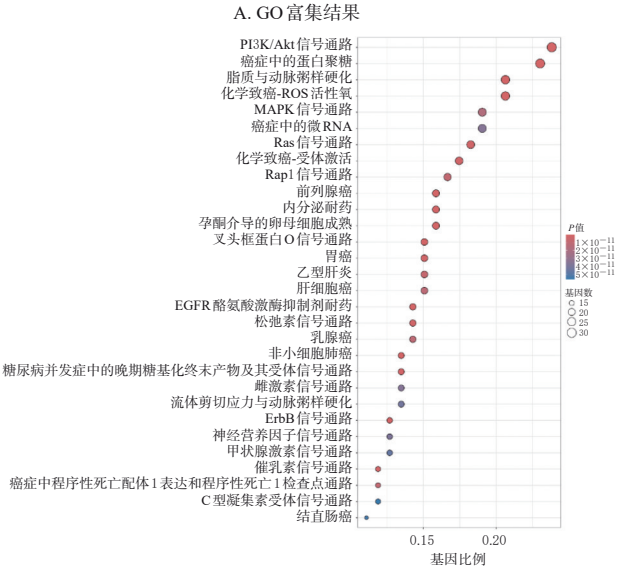
将四味颗粒各药材的活性成分及其对应靶点导入Cytoscape 3.6.0软件，分别绘制麦芽、通草、鸡血藤、山楂的“成分-靶点”互作调控网络（图略）。对所得网络进行拓扑学分析，结果显示，该图共有198个节点（活性成分67个，靶点131个）和338条边。基于该图的拓扑学属性，本研究优先选取相互作用频次排名靠前的靶点子集，再以该子集的关联度中位数作为筛选阈值完成2轮递进筛选，最终共确定6个关键作用靶点：磷脂酰肌醇-4，5-二磷酸3-激酶催化亚基α（phosphatidylinositol-4，5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha，PIK3CA）、哈维大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog，HRAS）、磷脂酰肌醇3-激酶调节亚基1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1，PIK3R1）、酪氨酸蛋白激酶Src（proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src，SRC）、雌激素受体1（estrogen receptor 1，ESR1）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）。

2.1.4 交集靶点的富集分析

将四味颗粒与TNBC的交集靶点导入DAVID数据库（设置种属为“人”），以P＜0.01为标准[8]，进行基因本体（Gene Ontology，GO）功能富集、京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。结果显示，两者交集靶点富集于细胞增殖、迁移、细胞内受体信号通路等生物过程（biological process，BP），含磷基团转移酶复合物、膜筏、蛋白激酶复合物等细胞组分（cell composition，CC），以及蛋白酪氨酸激酶活性、核受体活性、配体激活型转录因子活性等分子功能（molecular function，MF）。同时，两者交集靶点富集于TNBC相关PI3K/Akt、ROS、丝裂原激活的蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）等信号通路。结果见图1。



A. GO富集结果



B. KEGG富集结果

图1 四味颗粒与TNBC交集靶点的富集结果

2.2 四味颗粒抗TNBC的活性物质筛选及机制验证

基于网络药理学结果（67个活性成分及PI3K/Akt、ROS等信号通路），本研究进一步对四味颗粒改善

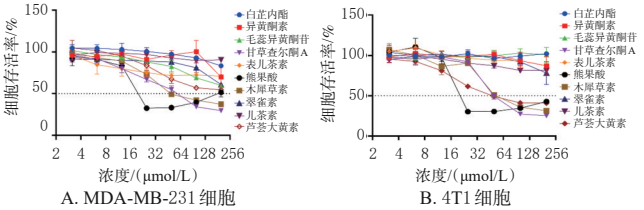
TNBC的活性物质及潜在机制进行初步验证。

2.2.1　活性物质筛选

本研究结合成药性评估、文献药效佐证、成分差异化互补分析等方式对网络药理学所得67个活性成分进行筛选，最终确定10个兼具高靶点亲和性、高成药性、高病理调控价值的核心活性成分作为实验验证对象，这10个成分为儿茶素(+)、芦荟大黄素、白芷内酯、毛蕊异黄酮苷、翠雀素、表儿茶素、异黄酮素、甘草查尔酮A、木犀草素、熊果酸[9—10]。

取对数生长期的MDA-MB-231、4T1细胞，按每孔2 000个接种于96孔板中，分别加入不同浓度(均为3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L，根据预实验设置)的儿茶素(+)、芦荟大黄素、白芷内酯、毛蕊异黄酮苷、翠雀素、表儿茶素、异黄酮素、甘草查尔酮A、木犀草素、熊果酸，并设置不含药物的对照组和不含细胞、不含药物的空白组，每组设置3个复孔。培养48 h后，加入CCK-8试液适量，于37 ℃下孵育30 min，使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的吸光度(OD)值，计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(实验组OD值−空白组OD值)/(对照组OD值−空白组OD值)×100%]及半数抑制浓度(IC_{50})。采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$(统计学方法下同)。

结果(图2)显示，对于2种细胞，熊果酸的IC_{50}为25 μmol/L，甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大黄素(仅对4T1细胞有作用)的IC_{50}为50 μmol/L，其余成分均未测到IC_{50}。因此，本研究以MDA-MB-231细胞为对象，熊果酸(20 μmol/L)、甘草查尔酮A(20 μmol/L)、木犀草素(20 μmol/L)、芦荟大黄素(20 μmol/L)及四者联合(各成分均为10 μmol/L)为干预措施，进行后续实验。



A. MDA-MB-231细胞　　B. 4T1细胞

图2　四味颗粒中10个活性成分对TNBC细胞增殖活性的影响

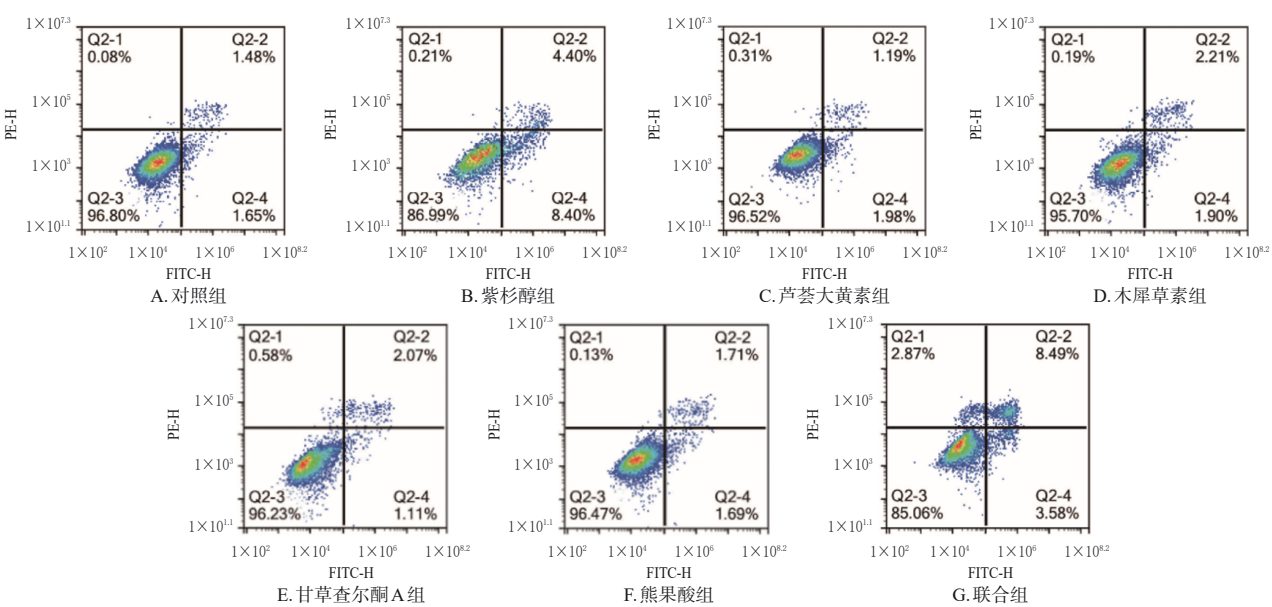
2.2.2　活性物质对TNBC细胞凋亡的影响

取对数生长期的MDA-MB-231细胞，按每孔3×10^6个接种于6孔板中，分为对照组、紫杉醇组(10 ng/mL，根据预实验设置)、芦荟大黄素组(20 μmol/L)、甘草查尔酮A组(20 μmol/L)、木犀草素组(20 μmol/L)、熊果酸组(20 μmol/L)和联合组(4种成分各10 μmol/L)，每组设置3个复孔。各药物组加入相应药液，对照组加入等体积培养基。培养48 h后，收集细胞，以PBS清洗后，依次加入Annexin Ⅴ缓冲液500 μL、Annexin Ⅴ-FITC染液2 μL、PI染液2.5 μL，于室温下孵育30 min，再使用流式细胞仪检测各组细胞的总凋亡率(即早期凋亡、晚期凋亡细胞之和与总细胞数的比值)。

结果(图3、表1)显示，与对照组比较，紫杉醇组和联合组细胞的总凋亡率均显著升高($P<0.05$)，而熊果酸组、芦荟大黄素组、木犀草素组、甘草查尔酮A组细胞凋亡率的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2.3　活性物质对TNBC细胞迁移能力的影响

取对数生长期的MDA-MB-231细胞，按每孔1×10^6个接种于6孔板中，待细胞汇合度为90%～100%时，于各孔底部划线，用PBS清洗后，按“2.2.2”项下方法分组、处理。分别于培养0、24 h时记录各组细胞的划痕愈合情况，并使用ImageJ软件计算划痕愈合率[划痕愈合率(%)=(0 h时的划痕宽度−24 h时的划痕宽度)/0 h时的划痕宽度×100%]。



A. 对照组　B. 紫杉醇组　C. 芦荟大黄素组　D. 木犀草素组

E. 甘草查尔酮A组　F. 熊果酸组　G. 联合组

图3　活性物质对MDA-MB-231细胞凋亡影响的流式细胞图

表1　活性物质对MDA-MB-231细胞凋亡、迁移能力及ROS水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	凋亡率	划痕愈合率	相对ROS水平
对照组	3.08±0.04	90.10±3.93	1.43±0.95
紫杉醇组	13.31±0.85[a]	60.35±1.99[a]	5.09±0.33
芦荟大黄素组	3.11±0.37	49.85±4.55[a]	0.57±0.13
木犀草素组	4.09±0.10	68.48±4.60[a]	0.61±0.09
甘草查尔酮A组	3.50±0.51	26.84±3.46[a]	8.48±5.05
熊果酸组	3.14±0.19	39.77±7.08[a]	1.07±0.15
联合组	13.82±1.52[a]	5.36±2.38[a]	54.56±13.00[a]
F	99.687	84.590	27.937
P	<0.001	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$。

结果（图4、表1）显示，与对照组比较，各药物组细胞的划痕愈合率均显著降低（$P<0.05$）。

2.2.4　活性物质对TNBC细胞中ROS水平的影响

取对数生长期的MDA-MB-231细胞，按每孔3×10^6个接种于6孔板中，按“2.2.2”项下方法分组、处理，并设置不加荧光染料的空白组。培养48 h后，收集细胞，以PBS清洗，按ROS试剂盒说明书方法操作，使用流式细胞仪于激发波长488 nm、发射波长525 nm下检测阳性探针（FITC）荧光强度，结果以空白组为参照进行归一化处理，用以表示细胞的相对ROS水平。

结果（图5、表1）显示，紫杉醇组和各单用组细胞的相对ROS水平与对照组比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；4个活性物质联用，则可显著诱导细胞ROS的产生（$P<0.05$）。

2.2.5　活性物质对TNBC细胞周期的影响

取对数生长期的MDA-MB-231细胞，按每孔20 000个接种于6孔板中，分为对照组、芦荟大黄素组（20 μmol/L）、甘草查尔酮A组（20 μmol/L）、木犀草素组（20 μmol/L）、熊果酸组（20 μmol/L）和联合组（各成分均为10 μmol/L），每组设置3个复孔。各药物组加入相应药液，对照组加入等体积培养基。培养48 h后，加入70%乙醇，于−20 ℃下固定过夜；离心，弃去乙醇，加入由PI和RNase配制的染色液（两者体积比为1∶2.5），于37 ℃下孵育20 min，使用流式细胞仪检测各组细胞的周期分布。

结果（表2）显示，与对照组比较，甘草查尔酮A组、联合组G_1期细胞比例均显著降低（$P<0.05$），木犀草素组、甘草查尔酮A组、联合组G_2期细胞比例均显著升高（$P<0.05$）。

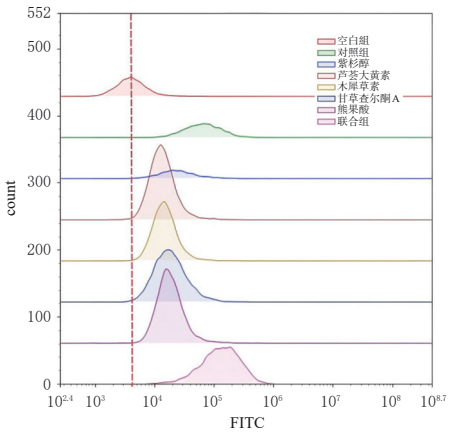


图5　活性物质对MDA-MB-231细胞ROS生成的影响

表2　活性物质对MDA-MB-231细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	G_1期	S期	G_2期
对照组	51.55±0.17	31.71±1.34	16.06±0.72
芦荟大黄素组	51.94±0.57	27.27±2.44	19.45±2.68
木犀草素组	53.80±1.40	26.62±1.07	21.35±4.46[a]
甘草查尔酮A组	46.74±2.31[a]	28.79±4.65	24.16±2.46[a]
熊果酸组	54.27±3.50	29.04±4.66	15.64±1.26
联合组	41.78±1.30[a]	28.72±1.16	28.79±0.90[a]
F	19.487	1.044	12.628
P	<0.001	0.436	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$。

2.2.6　活性物质对TNBC细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期的MDA-MB-231细胞，按每孔3×10^6个接种于6孔板中，按“2.2.5”项下方法分组、处理。培养48 h后，收集细胞，经PBS清洗，加入细胞裂解液适量，于冰上裂解30 min，再于4 ℃下以14 000 r/min离心15 min，吸取上清液，即得细胞总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度，进行变性处理并进行电泳分离、转膜，于室温下封闭1 h；以TBST洗膜后，加入相应一抗（mTOR的稀释比例为1∶10 000，内参GAPDH为1∶10 000，其余均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；以TBST洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶5 000），于室温下孵育1 h；以TBST洗膜后，通过化学发光法显影、成像。通过ImageJ软件分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白的条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量，以p-mTOR

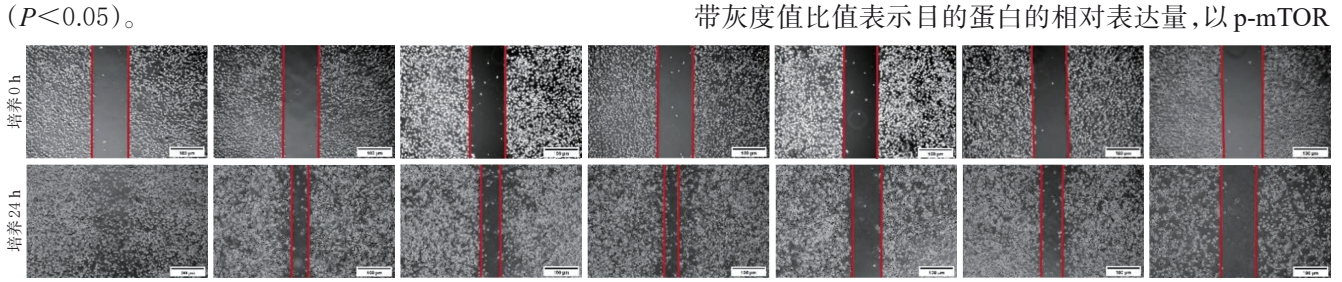
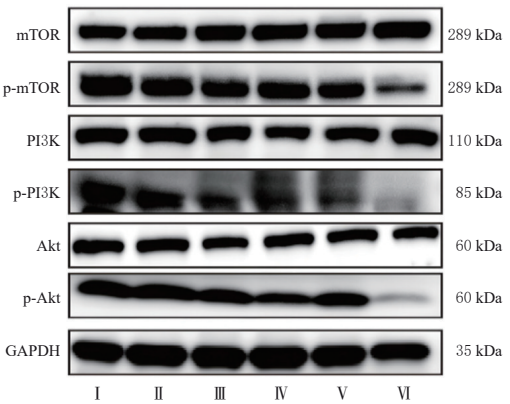


图4　活性物质对MDA-MB-231细胞迁移能力影响的显微图（标尺：100 μm）

与mTOR、p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt的相对表达量的比值表示mTOR、PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平（结果以对照组为参照进行归一化处理）。

结果（图6、表3）显示，与对照组比较，各药物组细胞中mTOR、PI3K、Akt蛋白（芦荟大黄素组PI3K、Akt蛋白除外）的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：芦荟大黄素组；Ⅲ：木犀草素组；Ⅳ：甘草查尔酮A组；Ⅴ：熊果酸组；Ⅵ：联合组。

图6　活性物质对MDA-MB-231细胞中PI3K/Akt通路相关蛋白表达影响的电泳图

表3　活性物质对MDA-MB-231细胞中PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	p-mTOR/mTOR	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照组	100.00±0.95	99.98±4.76	99.99±4.25
芦荟大黄素组	86.82±0.48[a]	93.61±6.12	98.88±3.41
木犀草素组	73.58±0.58[a]	72.37±6.05[a]	82.09±3.33[a]
甘草查尔酮A组	80.95±0.36[a]	78.98±13.59[a]	64.44±0.93[a]
熊果酸组	72.41±0.86[a]	74.08±1.21[a]	92.65±0.89[a]
联合组	52.47±0.33[a]	24.63±1.08[a]	23.30±1.93[a]
F	1 243.594	29.807	224.662
P	<0.001	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$。

3　讨论

本研究首先采用网络药理学方法，对我院制剂四味颗粒抗TNBC的活性成分及作用靶点进行系统性预测，得到67个活性成分和131个交集靶点；通过对组方药材“成分-靶点”互作网络的拓扑学属性进行量化分析，进一步明确了PIK3CA、HRAS、PIK3R1等6个关键作用靶点；GO功能富集结果显示，交集靶点富集于增殖、含磷基团转移酶复合物、蛋白酪氨酸激酶活性等BP、CC、MF；KEGG通路富集分析结果提示，PI3K/Akt、ROS、MAPK等信号通路是该药发挥抗TNBC作用的核心通路。在此基础上，本研究结合成药性评估、已报道文献药效佐证、成分作用差异化互补分析等多重策略，最终确定了10个核心活性成分作为后续实验验证对象；同时，通过体外CCK-8实验进行药效验证，最终筛选得到熊果酸、甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大黄素4个具有明确抗TNBC作用的活性物质。

本研究筛选所得的4个活性物质中，熊果酸是山楂的主要活性成分之一。山楂味酸、甘，性微温，归脾、胃、肝经，具有消食健胃、行气散瘀、化浊降脂的功效。现代药理研究表明，山楂具有抑菌、抗肿瘤、保护人血管内皮细胞等多种药理活性[11]。已有研究证实，熊果酸可通过多种途径诱导肿瘤细胞凋亡，进而发挥抗TNBC作用[12]。此外，熊果酸还可与其他天然化合物协同作用，增强抗乳腺癌效果：低剂量齐墩果酸与熊果酸联用，可通过抑制PI3K而阻断Akt/mTOR的磷酸化激活，诱导细胞自噬，对MDA-MB-231细胞表现出显著的细胞毒性[13]；槲皮素与熊果酸联用，则可有效抑制乳腺癌细胞增殖，显著降低其线粒体膜电位，抑制PI3K/Akt信号通路激活，最终诱导细胞凋亡[14]。另有研究显示，熊果酸还可逆转紫杉醇、多柔比星、表柔比星等化疗药物对TNBC的耐药性[15—18]。甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大黄素均为鸡血藤的活性成分[19]。鸡血藤始载于《本草纲目拾遗》，味苦、甘，性温，归肝、肾经，具有活血补血、调经止痛、舒筋活络的功效，被广泛用于抗炎镇痛、抗肿瘤、抗病毒等临床领域。研究表明，甘草查尔酮A可通过抑制细胞增殖、增加ROS产生、诱导细胞凋亡等方式，抑制MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭[20]。木犀草素可通过诱导细胞凋亡与自噬、调控表观遗传等途径抑制TNBC进展[21—22]，且与姜黄素联用可产生协同抗TNBC效应[23]。芦荟大黄素也被证实可显著抑制乳腺癌细胞的增殖及转移，具有明确的抗乳腺癌作用[24]。本研究也观察到，上述活性物质单用或四者联用，对MDA-MB-231细胞增殖、迁移、周期均有不同程度的诱导、抑制或调节作用。

PI3K/Akt信号通路在肿瘤细胞存活、增殖及治疗耐药中具有关键作用，同时也是乳腺癌中最常发生异常激活的信号级联通路之一，故靶向该信号通路已成为乳腺瘤治疗领域的重要策略[25—26]。本研究结果显示，熊果酸、甘草查尔酮A、木犀草素和芦荟大黄素各10 μmol/L联用，可协同诱导MDA-MB-231细胞凋亡，抑制其迁移；同时，可诱导细胞ROS生成，并抑制mTOR、PI3K、Akt蛋白的磷酸化，提示四味颗粒的抗TNBC作用可能与其活性物质抑制PI3K/Akt信号通路激活、诱导ROS生成有关，但具体机制尚需挽救实验进一步验证。

四味颗粒中的麦芽具有“大剂量回乳”的传统功效，相关古籍记载及临床实践已证实，大剂量麦芽可有效降低机体泌乳素水平，能用于治疗高泌乳素血症[27]。通草始载于《神农本草经》，具有清热利尿、通气下乳的功效，被用于湿热淋证、水肿尿少、乳汁不下等病症的临床治疗。但本研究并未发现麦芽和通草中含有抗TNBC的活性物质，提示二者在全方中可能不直接参与体外抗TNBC药效的发挥，其配伍作用及机制尚需体内实验进一步探讨。

综上，四味颗粒抗TNBC的活性物质可能为源自山楂和鸡血藤的熊果酸、甘草查尔酮A、木犀草素、芦荟大

黄素，上述物质可不同程度地抑制TNBC细胞增殖和迁移，诱导其凋亡，阻滞细胞周期于G_2期，诱导ROS的生成，并抑制PI3K/Akt信号通路相关蛋白的磷酸化。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.

[2] Karim A M, Eun Kwon J, Ali T, et al. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 212: 115545.

[3] Wu G Y, Xiao M Z, Hao W C, et al. Drug resistance in breast cancer: mechanisms and strategies for management [J]. Drug Resist Updat, 2025, 83: 101288.

[4] Yang Z M, Zhang Q H, Yu L H, et al. The signaling pathways and targets of traditional Chinese medicine and natural medicine in triple-negative breast cancer[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 264: 113249.

[5] Zhang Y B, Ma X R, Li H Y, et al. Identifying the effect of ursolic acid against triple-negative breast cancer: coupling network pharmacology with experiments verification [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 685773.

[6] Ke D Y J, El-Sahli S, Wang L S. The potential of natural products in the treatment of triple-negative breast cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2022, 22(5): 388-403.

[7] 魏天睿，田雨宁，张子彦，等. 基于PI3K/AKT途径探讨乳腺癌与乳腺增生发病机制及中医药干预作用研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报，2025(1)：97-103.

[8] 庄延双，蔡宝昌，张自力. 网络药理学在中药研究中的应用进展[J]. 南京中医药大学学报，2021，37(1)：156-160.

[9] 贾征，张双庆. 中药有效成分抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册)，2025，46(3)：163-170.

[10] Thilagavathi R, Priyankha S, Kannan M, et al. Compounds from diverse natural origin against triple-negative breast cancer: a comprehensive review[J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101(1): 218-243.

[11] 张祺嘉钰，赵佩媛，孙静，等. 山楂的化学成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志，2021，36(3)：521-523.

[12] Mallepogu V, Sankaran K R, Pasala C, et al. Ursolic acid regulates key EMT transcription factors, induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, an *in-vitro* and in silico studies[J]. J Cell Biochem, 2023, 124(12): 1900-1918.

[13] Gupta K B, Gao J, Li X, et al. Cytotoxic autophagy: a novel treatment paradigm against breast cancer using oleanolic acid and ursolic acid[J]. Cancers, 2024, 16(19): 3367.

[14] Li Y Y, Li R, Zeng Z W, et al. Prediction of the mechanisms of Xiaoai Jiedu Recipe in the treatment of breast cancer: a comprehensive approach study with experimental validation[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 252: 112603.

[15] Xiang F F, Fan Y, Ni Z H, et al. Ursolic acid reverses the chemoresistance of breast cancer cells to paclitaxel by targeting miRNA-149-5p/MyD88[J]. Front Oncol, 2019, 9: 501.

[16] Lu Q, Chen W L, Ji Y J, et al. Ursolic acid enhances cytotoxicity of doxorubicin-resistant triple-negative breast cancer cells via ZEB1-AS1/miR-186-5p/ABCC1 axis[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2022, 37(8): 673-683.

[17] Luo F Z, Zhao J J, Liu S, et al. Ursolic acid augments the chemosensitivity of drug-resistant breast cancer cells to doxorubicin by AMPK-mediated mitochondrial dysfunction[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 205: 115278.

[18] Wang Z N, Zhang P P, Jiang H, et al. Ursolic acid enhances the sensitivity of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to epirubicin by modulating the autophagy pathway[J]. Molecules, 2022, 27(11): 3399.

[19] 廖佳伟，金晨，陈志，等. 鸡血藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测[J]. 中草药，2023，54(20)：6866-6877.

[20] Huang W C, Su H H, Fang L W, et al. Licochalcone A inhibits cellular motility by suppressing E-cadherin and MAPK signaling in breast cancer[J]. Cells, 2019, 8(3): 218.

[21] Wu L, Lin Y D, Gao S Y, et al. Luteolin inhibits triple-negative breast cancer by inducing apoptosis and autophagy through SGK1-FOXO3a-BNIP3 signaling[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1200843.

[22] Wu H T, Lin J, Liu Y E, et al. Luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 81: 153437.

[23] Wang X Y, Zhang L J, Si H W. Combining luteolin and curcumin synergistically suppresses triple-negative breast cancer by regulating IFN and TGF-β signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 178: 117221.

[24] Abdellatef A A, Fathy M, Mohammed A E I, et al. Inhibition of cell-intrinsic NF-κB activity and metastatic abilities of breast cancer by aloe-emodin and emodic-acid isolated from *Asphodelus microcarpus*[J]. J Nat Med, 2021, 75(4): 840-853.

[25] Mandal S K, Samanta S K. A perspective of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors to overcome drug-resistance in breast cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2025, 32(10): 1865-1873.

[26] Dong C, Wu J, Chen Y, et al. Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 628690.

[27] 尹沁怡，陈清光，许嘉慧，等. 麦芽治疗高泌乳素血症的临床认识及研究进展[J]. 上海中医药杂志，2023，57(3)：93-97.

(收稿日期：2026-05-20 修回日期：2026-10-08)

(本文责编：张元媛)