

探究仙方活命饮抑制三阴性乳腺癌的作用机制 及其君药金银花的作用

陆东宇¹ 孙博宇¹ 王睿¹ 赵润¹ 王大维¹ 兰天^{1,2} 曾以德^{1,2*}

(¹山东中医药大学中医药创新研究院, 济南 250355; ²山东中医药大学针灸研究院, 济南 250355)

摘要 该文探究中药方剂仙方活命饮抑制三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)的作用机制及其君药金银花在其中的作用。通过代谢组学结合网络药理学分析以仙方活命饮(仙方组)、仙方活命饮减金银花(减金组)与金银花水煎液(金银花组)制备的大鼠含药血清中的差异成分并检索靶点,将三组差异成分对应的靶点分别与TNBC差异基因表达的靶点进行交集,筛选核心靶点并进行通路富集。接着以仙方活命饮和君药金银花抑瘤效应及对关键通路的调控作用进行验证:在小鼠体内构建TNBC原位移植瘤模型进行药物干预,将建模成功的小鼠分为模型组、仙方组、减金组、金银花组、阳性药组(顺铂组),另放置正常组,进行动物实验;以MDA-MB-231细胞为载体进行加药,分为Control组、仙方组、减金组、金银花组进行细胞实验。LC-MS检测显示,仙方组、减金组与金银花组含药血清分别鉴定出151种、131种和65种差异成分,对应1 338个、1 316个和1 181个靶点,通过与TNBC靶点互作关系后均富集于Cell cycle、PI3K-AKT及Apoptosis等通路,表明仙方活命饮可通过凋亡途径对TNBC产生影响。体内实验发现仙方组、减金组与金银花组水煎液对小鼠肝肾均无明显毒性;同时,这些组均能抑制TNBC肿瘤生长;免疫组化结果显示,相较于模型组,仙方组与金银花组的Bcl-xl表达水平显著降低;Western blot结果显示仙方组与金银花组比模型组的Caspase-3和Bax表达水平显著增加,而仙方组、减金组与金银花组比模型组的Bcl-xl表达水平显著降低;体外实验则发现,与Control组比较,仙方组、减金组与金银花组含药血清均能显著抑制MDA-MB-231细胞活性;Western blot结果表明,与Control组比较,仙方组的Caspase-3表达水平显著增加,同时仙方组、减金组与金银花组的Bcl-xl表达水平均显著下降。该研究通过代谢组学和网络药理学,经由体内与体外实验的相互印证,发现仙方活命饮及君药金银花通过多成分-多靶点调控凋亡途径,在体内抑制肿瘤生长与体外抑制MDA-MB-231细胞活性方面发挥抗TNBC作用。

关键词 仙方活命饮; 金银花; 三阴性乳腺癌; 网络药理学; 代谢组学

Exploring the Mechanism of Action of Xianfang Huoming Decoction in Inhibiting Triple-Negative Breast Cancer and the Action of Its Principal Medicine, *Lonicera japonica*

LU Dongyu¹, SUN Boyu¹, WANG Rui¹, ZHAO Run¹, WANG Dawei¹, LAN Tian^{1,2}, TSENG Yiider^{1,2*}

(¹Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; ²Institute of Acupuncture and Moxibustion, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

收稿日期: 2026-01-16 接受日期: 2026-02-02

国家自然科学基金青年基金(批准号: 82305051)、山东省泰山学者基金(批准号: tstp20221125)和仙方活命饮抗乳腺相关疾病的主要活性成分与药效评估(批准号: 061-761473)资助的课题

*通信作者。Tel: 0531-89628012, E-mail: ytseng@sducm.edu.cn

Received: January 16, 2026 Accepted: February 2, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (Grant No.82305051), Taishan Scholar Foundation of Shandong Province (Grant No.tstp20221125) and the Main Active Ingredients and Efficacy Assessment of Xianfang Huoming Decoction in Combating Breast-Related Diseases (Grant No.061-761473)

*Corresponding author. Tel: +86-531-89628012, E-mail: ytseng@sducm.edu.cn

Abstract This study was to explore the mechanism of action of the Traditional Chinese Medicine formula XHD (Xianfang huoming decoction) in inhibiting TNBC (triple-negative breast cancer) and the action of its principal medicine, *Lonicera japonica*. By using metabolomics combined with network pharmacology to analyze the differential components in the drug-containing serum of rats prepared with XHD (Xianfang group), XHD without *Lonicera japonica* (Jianjin group), *Lonicera japonica* decoction (*Lonicera japonica* group), and by searching for the targets, the intersection of the targets corresponding to the differential components of the three groups with the targets of the differential gene expression in TNBC was conducted to screen the core targets, and pathway enrichment was performed. Then, the inhibitory effect of XHD and *Lonicera japonica* on tumor growth and their regulatory effects on key pathways were verified: a TNBC *in situ* transplanted tumor model was constructed in mice for drug intervention. The groups included the normal group, the model group, the Xianfang group, the Jianjin group, the *Lonicera japonica* group, and the positive drug group (cisplatin group). Animal experiments were conducted. The MDA-MB-231 cells were used as the carrier for drug addition, and the experiments were carried out in the Control group, the Xianfang group, the Jianjin group, and the *Lonicera japonica* group. LC-MS analysis revealed that the drug-containing serum samples from the Xianfang group, the Jianjin group, and the *Lonicera japonica* group identified 151, 131, and 65 different components respectively, corresponding to 1 338, 1 316, and 1 181 targets. After interacting with the TNBC targets, all of them were enriched in pathways such as Cell cycle, PI3K-AKT, and Apoptosis, indicating that XHD can affect TNBC through the apoptotic pathway. *In vivo* experiments found that the decoction of the Xianfang group, the Jianjin group, and the *Lonicera japonica* group had no obvious toxicity to the liver and kidneys of mice; at the same time, all of these groups could inhibit the growth of TNBC tumors. Immunohistochemical results showed that, compared with the model group, the levels of Bcl-xl expression in the Xianfang group and the *Lonicera japonica* group were significantly reduced. Western blot results showed that the expression of Caspase-3 and Bax was significantly increased in the Xianfang group and *Lonicera japonica* group, compared with the model group, and the expression of Bcl-xl was significantly reduced in the Xianfang group, Jianjin group, and *Lonicera japonica* group, compared with the model group. *In vitro* experiments found that, compared with the Control group, the drug-containing serum of the Xianfang group, Jianjin group, and *Lonicera japonica* group could significantly inhibit the activity of MDA-MB-231 cells. The Western blot results showed that compared with the Control group, the expression level of Caspase-3 in the Xianfang group significantly increased, while the expression levels of Bcl-xl in the Xianfang group, Jianjin group and *Lonicera japonica* group all significantly decreased. Through metabolomics and network pharmacology, and with the mutual verification of *in vivo* and *in vitro* experiments, this study found that XHD and its principal medicine *Lonicera japonica* exerted anti-TNBC effects by regulating the apoptotic pathway through multi-component, multi-target, inhibiting tumor growth *in vivo* and inhibiting the activity of MDA-MB-231 cells *in vitro*.

Keywords Xianfang huoming decoction; *Lonicera japonica*; triple-negative breast cancer; network pharmacology; metabolomics

乳腺癌作为全球女性发病率最高的恶性肿瘤,其亚型分类对治疗策略的制定至关重要^[1]。其中,三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)因雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)以及人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均呈阴性表达而得名,约占所有乳腺癌病例中的

15%~20%^[2]。相较于其他亚型, TNBC具有显著的侵袭性与异质性,早期即可发生远处转移,且缺乏明确的内分泌治疗及分子靶向治疗靶点;因此,化疗仍是当前临床的核心治疗手段^[3-4]。然而, TNBC对于常用化疗药物产生耐药性的问题日益突出,导致治疗无效,成为临床肿瘤治疗领域亟待突破的难题^[5]。

在肿瘤治疗的多元化探索中,中药以其整体调

控、多靶点作用的独特优势, 为治疗 TNBC 提供了新的研究视角^[6]。中医理论认为, TNBC 的核心病机在于热毒壅聚、气滞血瘀痰结, 与“乳岩”、“痈疽”等病症的病机高度契合, 因此清热解毒、活血散结成为其主要治则^[7]。仙方活命饮(Xianfang huoming decoction)作为中医外科经典方剂, 源自《校注妇人良方》, 初用于痈疽疮疡初起之证, 因其“未成者即散, 已成者即溃”的显著疗效, 被誉为“疡门开手攻毒之第一方”^[8]。该方由金银花、当归尾、乳香、没药等十三味药材组成, 兼具清热解毒、消肿溃坚、活血止痛之功效, 现代临床已成功拓展至乳腺癌、乳腺炎等的辅助治疗中^[9-10]。对于任何方剂, 配伍规律的解析是揭示其疗效机制的关键; 而君药作为方剂的核心药材, 往往决定着方剂的主要功效。在仙方活命饮中, 金银花作为君药, 其味甘性寒, 芳香透达, 既能清热解毒以挫病邪之势, 又能消肿疗疮以除病灶之患, 素有“疮疡圣药”之称。同时, 现代药理学研究亦明确表明金银花的主要活性成分绿原酸、木犀草素等, 可通过多种途径发挥抗肿瘤作用^[11-12]。

尽管仙方活命饮及金银花在乳腺癌治疗中展现出潜在优势, 目前针对其作用于 TNBC 的系统性研究仍较为匮乏。同时, 在现代医学中作为君药的金银花在仙方活命饮中对于整体疗效的贡献度亦不甚明确。鉴于仙方活命饮在 TNBC 的临床治疗中具有的獨特优势, 本研究以仙方活命饮为研究载体, 并聚焦于金银花, 通过代谢组学与网络药理学深入探讨其抑制 TNBC 的作用机制, 旨在为阐明仙方活命饮及其君药金银花抗肿瘤的功效提供实验依据, 同时为临床中 TNBC 的治疗开发新型中医药制剂并提供新思路与理论支撑。

1 试剂和材料

1.1 细胞与动物

人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(货号: HTB-26)。实验动物选用 6 周龄, 体质量(200±20) g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量为(20±2) g 的 SPF 级雌性 NOD SCID 小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证号 SCXK(京)2021-0006], 温度为 22~25 °C、相对湿度为(50±5)%, 昼/夜节律为 12/12 h(照明时间为 7:00 至 19:00), 适应性饲养 7 天后开展动物实验。本实验内容与步骤经山东中医药大学实验动物伦理

委员会批准(批准号: SDUTCM20241008001)。

1.2 试剂

仙方活命饮药材, 购自北京药匣子就势中医药文化有限公司; D-荧光素钾盐溶液(货号: ST196)、顺铂(货号: S1552)、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)(货号: P0131)购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基(货号: 10-013-CV)、胎牛血清(货号: 35-081-CV)、基质胶(matrigel)(货号: 354262)购自美国 Corning 公司; 0.25% 胰蛋白酶(货号: 25200-114)、HBSS 缓冲液(货号: 14170-112)、PBS 缓冲液(货号: 10010-023)购自美国 Gibco 公司; CCK-8(货号: E-CK-A362)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 青霉素-链霉素溶液(货号: LA660100)购自济南蓝格莎生物技术有限公司; 4× 蛋白上样缓冲液(货号: 1610747)、PVDF 膜(货号: 1620177)购自上海伯乐生命医学产品有限公司; RIPA 裂解液(货号: G2002)、β-actin 抗体(货号: GB11001)购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司; 蛋白酶抑制剂(货号: GRF101)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: ZJ102)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; Bax 抗体(货号: 2772S)、Bcl-xl 抗体(货号: 2764S)、Caspase-3 抗体(货号: 9662S)、Cleaved Caspase-3 抗体(货号: 9664S)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; HRP-conjugated 山羊抗兔二抗 IgG(货号: AS014)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; 山羊抗兔抗体 IgG H&L(Alexa Fluor® 568)(货号: ab175471)购自英国 Abcam 公司; 山羊血清(货号: S9070)购自北京索莱宝科技有限公司; 异氟烷(货号: R510-22)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.3 仪器

All-in-One 荧光显微成像系统(型号: BZ-X800)购自日本基恩士有限公司; 冷冻干燥机(型号: LGJ-12D)购自北京四环冻干科技发展有限公司; 高速冷冻离心机(型号: LX-165T2R)购自中国海尔生物医疗股份有限公司; 超高效液相色谱(型号: Vanquish-Horizonsystem)、质谱仪(型号: UHPLC-Exploris240)购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; 酶标仪(型号: CLARIOstar Plus ACU) 购自德国 BMG LABTECH 公司; 电泳发生器(型号: PowerPacBasic) 购自上海伯乐生命医学产品有限公司; 双层低温恒温摇床(型号: MQD-S2R)、转膜仪(BIO-RAD, 型号: 690LS096069) 购自上海旻泉仪器有限公司; 超灵敏多功能成像仪(型号: Amersham ImageQuant) 购自上海格来赛生命

科技有限公司。

2 方法

2.1 冻干粉、含药血清制备

取仙方活命饮组(仙方组)(金银花和陈皮各9 g, 白芷、浙贝母、防风、赤芍药、当归尾、皂角刺、炮山甲、天花粉、醋乳香、醋没药和生甘草各6 g)、仙方活命饮减金银花组(减金组)、金银花组,加水浸泡30 min,至各组中药质量10倍水量,煎煮40 min收取药液;第2次加至各组中药质量8倍水量,煎煮40 min收取药液,两次药液合并,以4 °C、8 000 ×g离心30 min。冷冻3天后进行冷冻干燥机冻干,冻干粉放入-80 °C冰箱后续灌胃使用。

将24只雄性SD大鼠分为空白组、仙方组、减金组、金银花组,每组6只,按照人与大鼠体表面积折算法(以成人质量60 kg计算,换算系数6.3)^[13],每天进行1次灌胃,共7天。末次灌胃1 h后,以异氟烷麻醉,进行腹主动脉采血,采出血液在4 °C静置1 h,以4 °C、3 000 r/min离心10 min,得到含药血清。其中一部分置于-80 °C冰箱待后续使用,一部分以56 °C进行灭活,并以0.22 μm滤膜过滤。

2.2 LC-MS检测血清

空白血清、仙方组、减金组和金银花组血清进行LC-MS检测。色谱条件:色谱柱为ACQUITYU-PLCHSST3[100 mm×2.1 mm i.d., 1.8 μm; 100 mm为色谱柱长度,2.1 mm i.d.为色谱柱内径(i.d.=inner diameter),1.8 μm为色谱柱粒径;美国ThermoFisher Scientific公司];流动相A为95%水+5%乙腈(含0.1%甲酸),流动相B为47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含0.1%甲酸),进样量为3 μL,柱温为40 °C。质谱条件:样品经电喷雾电离,分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。加热温度350 °C,毛细管温度350 °C,喷雾电压为正模式:3 400 V,负模式:-3 000 V,扫描范围70~1 050(*m/z*)。原始数据导入ProgenesisQI v3.0(Waters)进行基线过滤、峰识别、保留时间校正、峰对齐等,最终得到含保留时间、质荷比和峰强度等信息的数据矩阵。含药血清成分比对在<http://www.hmdb.ca/>、<https://metlin.scripps.edu/>公共数据库及美吉生物公司自建数据库中进行。

2.3 网络药理学分析含药血清差异成分对TNBC的抑制作用

2.3.1 仙方组、减金组与金银花组含药血清差异成

分靶点检索 通过PubChem数据库查询含药血清差异成分SMILES结构式,在SwissTargetPrediction数据库中,设定物种为*Homo sapiens*,输入SMILES结构式,预测得出含药血清差异成分靶点。

2.3.2 TNBC差异基因分析 从GEO数据库下载并导入TNBC数据GSE38959。下载完成后,将其整理为ExpressionSet对象,并提取表达矩阵和样本注释信息。接着,利用Limma包中的normalizeBetweenArrays函数对表达矩阵进行标准化,以消除批次效应和样本间系统误差。通过idmap2包获取注释信息,将探针ID映射为基因符号,并按照中位数表达量选择代表性探针,去除重复注释,最终得到以基因符号为行名的表达矩阵并利用差异分析结果可视化。

2.3.3 核心靶点筛选 将仙方组、减金组与金银花组含药血清差异成分对应的靶点分别与TNBC筛选的差异基因表达的靶点取交集,随即导入STRING数据库,参数设定:选择物种为*Homo sapiens*,设置作用评分为0.7,隐藏无链接的靶点。将得到的结果导入Cytoscape 3.9.1,绘制蛋白-蛋白互作网络,得到含药血清差异成分治疗TNBC的核心靶点。

2.3.4 生理功能和通路富集分析 将上述核心靶点数据上传到DAVID数据库中,进行通路富集、生物过程、细胞成分和分子功能分析,进一步解释仙方活命饮介导着不同生理功能及途径对TNBC发挥着正反馈作用。

2.4 仙方活命饮及君药金银花体内实验对TNBC的影响

2.4.1 动物分组、造模、给药 取36只雌性NOD SCID小鼠,适应性喂养1周后,在左侧第四对乳房垫接种MDA-MB-231细胞,浓度为 2×10^7 /mL,体积为100 μL。30只小鼠造模1周后将其随机分为5组:模型组、仙方组、减金组、金银花组和顺铂组,每组6只。此外,准备正常组,正常组不造模。正常组和模型组给予生理盐水;仙方组、减金组及金银花组分别给予14.796、13.211、1.585 g/kg的冻干粉溶液(生理盐水稀释),每天灌胃100 μL,顺铂组(2 mg/kg)每次腹腔注射100 μL,每周2次,共给药3周。

2.4.2 观测指标及实验终点 造模后,每周进行活体成像观测,观测前10 min腹腔注射200 μL D-萤光素钾盐溶液(15 mg/mL)。给药阶段每3天测量肿瘤体积[体积=(长径×短径²)/2]及体质量,末次灌胃1 h后,瘤体拍照称重,肝肾则取样进行后续分子生物学

及组织病理学检测。

2.4.3 HE染色 将肿瘤和肝肾组织放置于4%多聚甲醛、4℃固定24 h后,进行石蜡包埋切片。65℃烤片2 h,二甲苯脱蜡后,经100%、95%、90%、80%、70%乙醇各3 min脱水。苏木素染色5 min,分化液作用30 s,双蒸水冲洗5 min,伊红溶液染色40 s。70%、80%、90%、95%、100%乙醇各1 min复水,并以二甲苯透明化2次,每次1 min,最后中性树脂胶封片。

2.4.4 免疫组化 切片常规脱蜡,双蒸水洗5 min,微波炉中火抗原修复15 min,PBS洗3次,每次5 min;使用免疫组化笔圈出组织并将组织浸润在3% H₂O₂室温30 min,PBS洗3次;0.5% Triton X-100透膜10 min,PBS洗3次;5%山羊血清37℃封闭1 h。弃封闭液滴加一抗Bcl-xl(1:800)、Cleaved Caspase-3(1:400),4℃过夜孵育。复温后PBS洗3次,滴加二抗(1:1 000)室温下避光孵育1 h,洗涤后滴加抗荧光淬灭封片液,封片拍照评估肿瘤组织凋亡情况。

2.4.5 Western blot 取20 mg肿瘤组织充分剪碎,加入适量RIPA裂解液与蛋白酶抑制剂,研磨5 min,4℃、12 000 r/min离心20 min。上清液使用BCA法测定蛋白浓度后煮沸保存。蛋白上样量统一为20 μg,上层胶85 V,下层胶125 V,过程中用甲醇将PVDF膜活化,滤纸提前浸泡在转膜液中。待Marker在下层胶完全分散停止电泳进行转膜,条件为2.5 A、25 V、7 min。封闭液室温封闭10 min,加入一抗Bcl-xl(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Caspase-3(1:800)、β-actin(1:5 000),4℃过夜孵育后TBST洗3次,二抗(1:5 000)孵育1 h后TBST洗3次,进行显影。

2.5 仙方活命饮及君药金银花体外实验对TNBC的影响

2.5.1 CCK-8 取对数生长期MDA-MB-231细胞,以每孔 5×10^3 接种于96孔板中,待细胞完全贴壁,将细胞分别用不同含量含药血清的基础培养基(Control组0%含药血清,治疗组2.5%、5%、10%、15%、20%含药血清,均用空白血清补充至20%)培养24 h、48 h和72 h,每24 h换药。加药结束后每孔加入10 μL CCK-8,置于37℃培养箱孵育3 h,酶标仪在波长450 nm处测量吸光度值,计算细胞活性。

2.5.2 Western blot 将药物处理好的细胞置于4℃,PBS洗3次;用RIPA裂解液:蛋白酶抑制剂(99:1)进行裂解10 min后刮细胞,细胞裂解液15 000 r/min、4℃离心20 min。后续步骤与2.4.5一致。

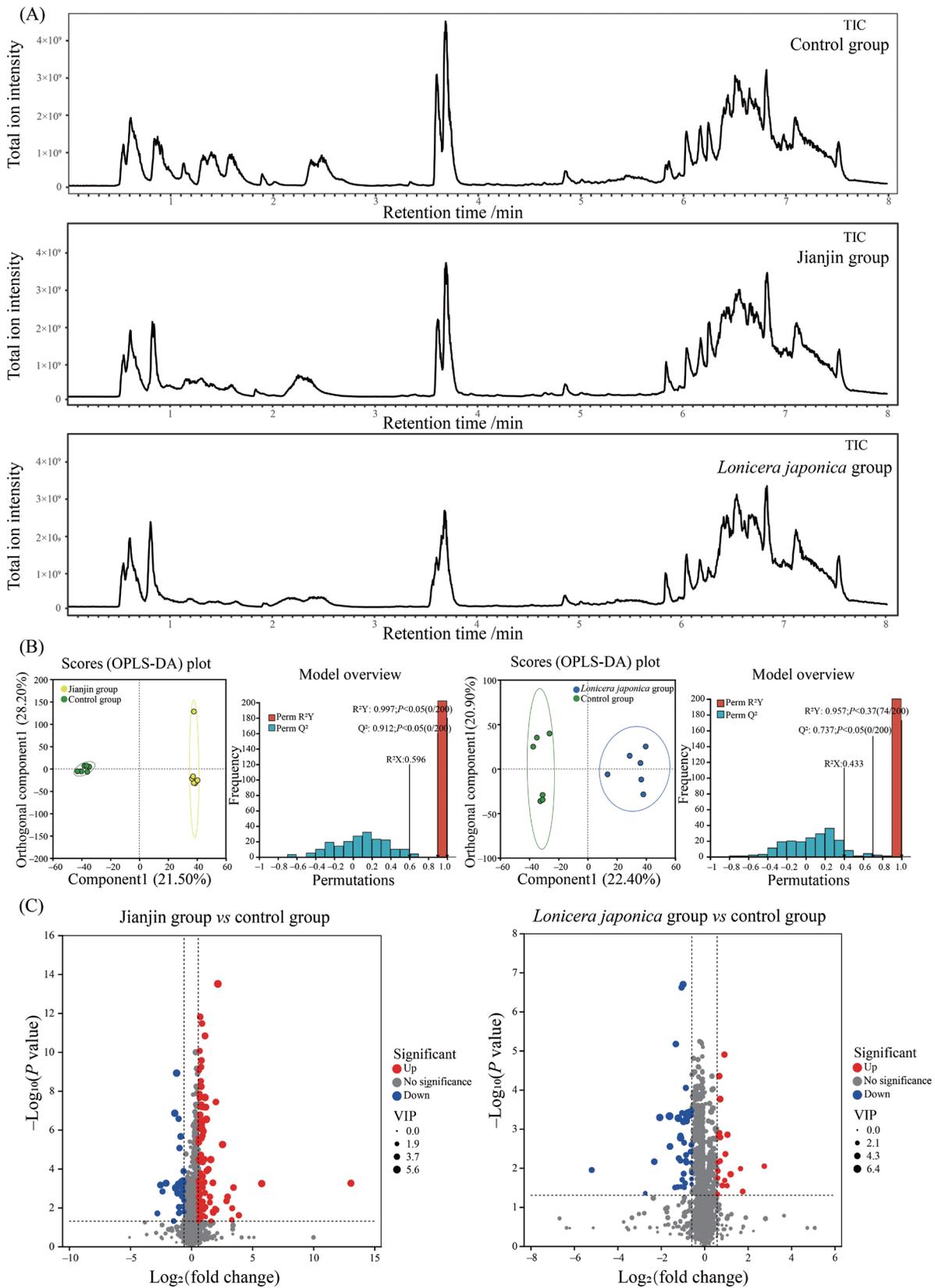
2.6 统计学方法

本研究使用R语言(version 4.4.1)作为主要数据分析平台。采用Limma包对表达矩阵进行线性建模与贝叶斯调整,筛选标准为 $P < 0.05$ 且 $|\text{Log}_2(\text{fold change})| \geq 1$,得到差异表达基因。利用ggplot2和ggrepel包绘制火山图,以区分上调、下调及无显著差异基因,并在图中标注部分关键基因。使用pheatmap包绘制聚类热图,采用Z-score标准化行表达量,样本按分组进行注释。使用SPSS 22.0软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析,测量数据采用非配对、双尾t检验进行分析。在 $P < 0.05$ 时视为差异有统计学意义(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$)。

3 结果

3.1 代谢组学与网络药理学分析含药血清对TNBC的影响

3.1.1 含药血清差异成分分析 为探究含药血清中可能作用于TNBC的差异成分,我们首先进行了LC-MS检测与差异成分分析。本团队前期已在条件相同的状况下对仙方活命饮含药血清进行LC-MS检测,并在对比空白组血清后鉴定出151种差异成分,同时构建OPLS-DA模型验证其有效性(附录A和附录B)。在此继续以减金组和金银花组含药血清LC-MS检测的结果分别与空白组血清检测的结果相对比,发现减金组与金银花组血清的离子图信号包含众多不同强度的离子峰(图1A),这间接反映仙方活命饮由多味中药所组成,且其成分具有多样性。通过OPLS-DA处理显示,减金组血清和金银花组血清成分均与空白组血清成分存在分布差异(图1B)。与仙方组和空白组血清比对时设置的阈值一样,VIP(variable importance in projection) > 1 、 $P < 0.05$ 、 $|\text{fold change}| > 1.5$ 对差异成分进行可视化(图1C)。在这个条件下,减金组中血清差异成分为131种化合物,金银花组中血清差异成分为65种化合物。接着,将仙方组151种差异成分、减金组131种差异成分、金银花组65种差异成分在SwissTargetPrediction数据库中预测,发现在仙方组血清中有139种差异成分能找到对应靶点,共1 338个;减金组血清中有120种差异成分能找到对应靶点,共1 316个;金银花组血清中有55种差异成分能找到对应靶点,共对应1 181个靶点。

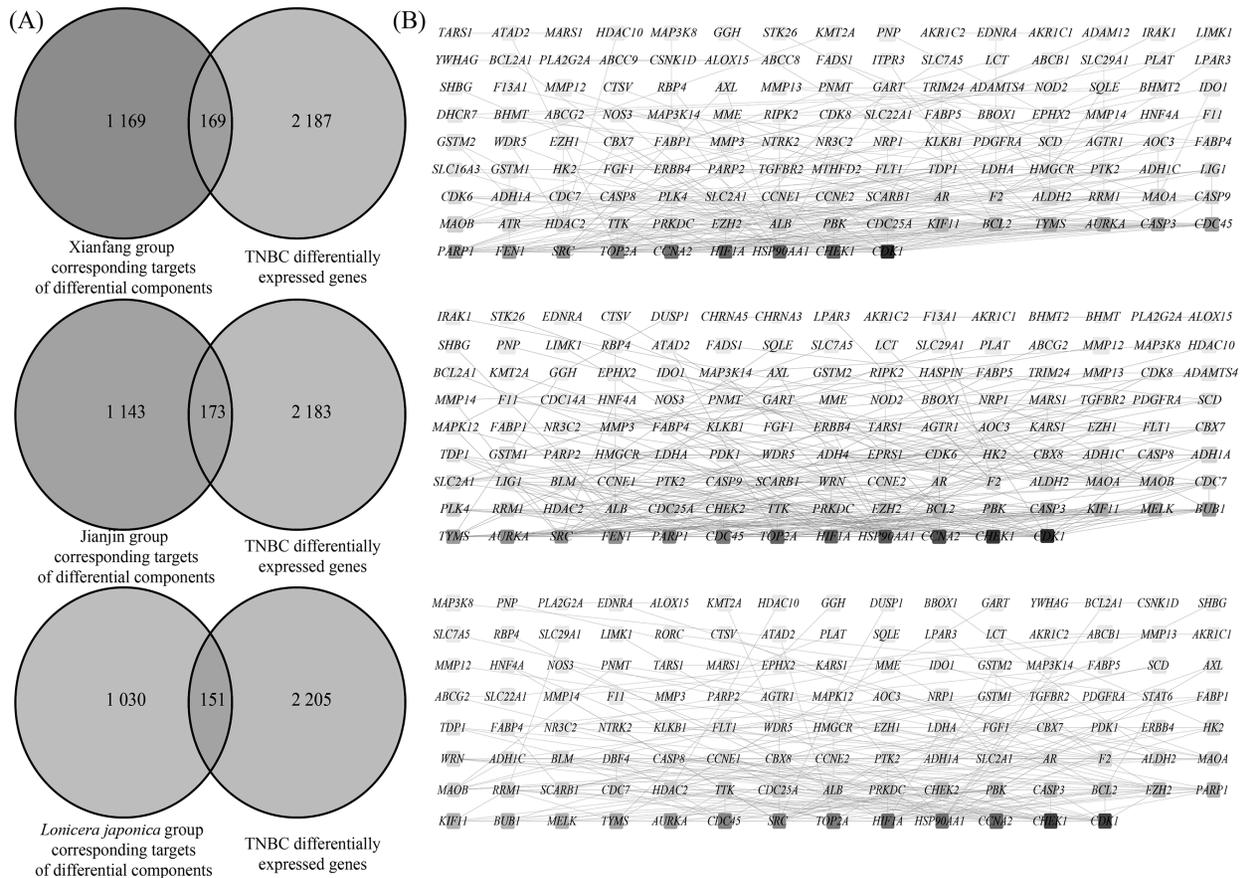


A: 血清离子图; B: 含药血清成分的OPLS-DA评分表及OPLS-DA验证图; C: 差异成分火山图。

A: serum ionogram; B: OPLS-DA score table of drug-containing serum components and OPLS-DA validation chart; C: volcano plot of differential components.

图1 空白血清与含药血清差异成分分析

Fig.1 Analysis of differential components between blank serum and drug-containing serum



A: 仙方组、减金组和金银花组差异成分对应靶点与TNBC差异基因表达的靶点交集; B: 仙方组、减金组和金银花组差异成分对应靶点与TNBC差异基因表达的靶点PPI图。

A: the intersection of the target points corresponding to the differential components in the Xianfang group, Jianjin group and *Lonicera japonica* group and the target points of TNBC differential gene expression; B: PPI map of the targets corresponding to the differential components of the Xianfang group, the Jianjin group and the *Lonicera japonica* group and the targets of TNBC differential gene expression.

图3 仙方活命饮及金银花对TNBC的影响

Fig.3 Effect of XHD and *Lonicera japonica* on TNBC

银花均可以显著上调TNBC肿瘤组织Caspase-3和Bax蛋白表达;各治疗组Bcl-x1的表达,与模型组相比均有显著下调,表明仙方活命饮及君药金银花可诱导TNBC细胞凋亡。

3.3 仙方活命饮及君药金银花体外对TNBC凋亡的影响

3.3.1 不同时间不同浓度含药血清对MDA-MB-231细胞活性的影响 CCK-8结果显示,在加入20%的含药血清后,除减金组在24 h外,在不同给药时间各组与Control组相比均存在统计学差异。由于仙方组在48 h、20%的含药血清对MDA-MB-231细胞活性接近50%,故后续实验在各组均选择48 h、20%的含药血清进行。

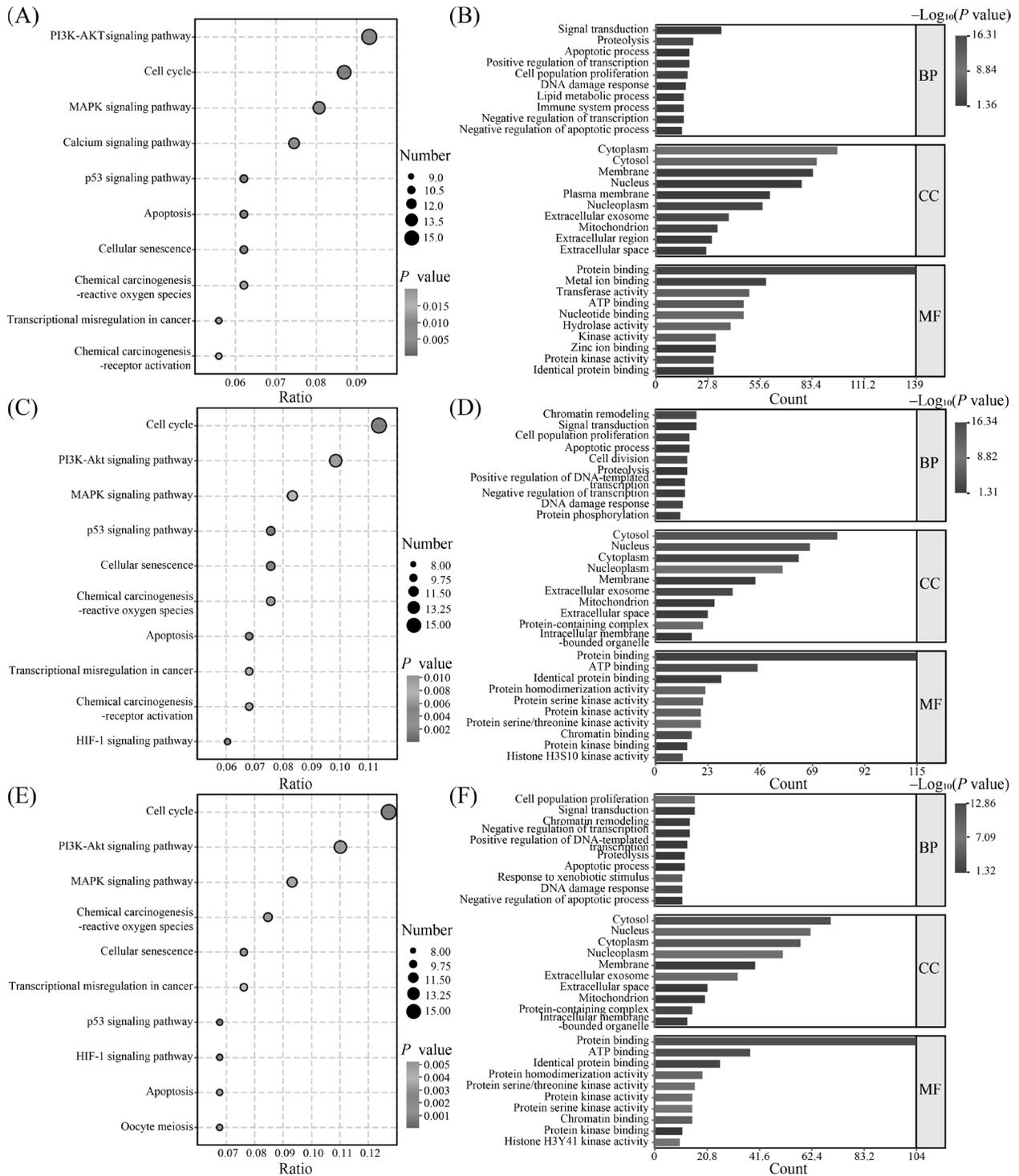
3.3.2 仙方活命饮及君药金银花对MDA-MB-231凋亡的影响 Western blot结果显示,与Control组相

比较,仙方组显著上调了Caspase-3的蛋白表达;同时各组含药血清对MDA-MB-231细胞的抗凋亡蛋白Bcl-x1的表达均有不同程度下调;但对促凋亡蛋白BAX的表达无统计学差异(图8)。

4 讨论

TNBC因缺乏明确治疗靶点及化疗耐药性问题,临床治疗陷入困境^[14]。中医药以整体调控、多靶点作用优势为TNBC治疗提供新思路^[3,15],仙方活命饮作为中医外科经典方剂,其抗肿瘤潜力已得到初步证实,但针对TNBC的作用机制及金银花作为君药在方剂中的作用尚未明确。

网络药理学是解析中药复方多成分、多靶点作用机制的核心技术^[16]。本研究通过LC-MS检测发现,仙方组、减金组和金银花组含药血清包含大量代谢



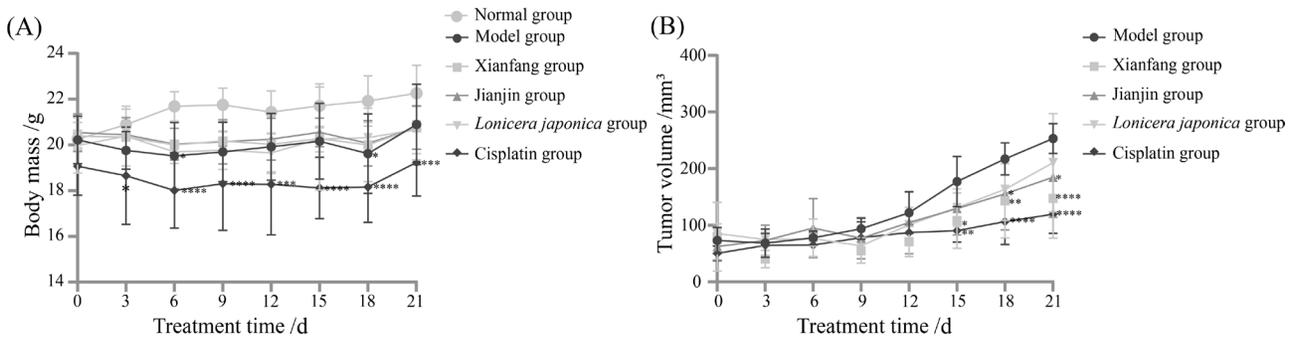
A、C、E: 仙方组、减金组和金银花组差异成分对应靶点与TNBC差异基因表达的靶点交集核心靶点富集KEGG图; B、D、F: GO图。
A,C,E: the core targets of the intersection of the target points corresponding to the differential components in the Xianfang group, Jianjin group and *Lonicera japonica* group and the target points of the differential gene expression of TNBC were enriched; KEGG diagram; B,D,F: GO diagram.

图4 仙方活命饮及金银花对TNBC的调控

Fig.4 Regulation of XHD and *Lonicera japonica* on TNBC

成分, 印证了仙方活命饮其多成分特性, 为多靶点调控肿瘤提供物质基础。OPLS-DA分析显示含药血清与空白血清成分差异显著, 表明药物成分可经体内代谢进入血液发挥作用。对3组含药血清筛选的

靶点与TNBC差异基因表达的靶点交集进行蛋白互作, 核心靶点均集中于 *CDK1*、*CHEK1*、*CCNA2*等核心基因^[17-20], 这些基因在TNBC中扮演着细胞周期的关键调控分子, 提示仙方活命饮及君药金银花可

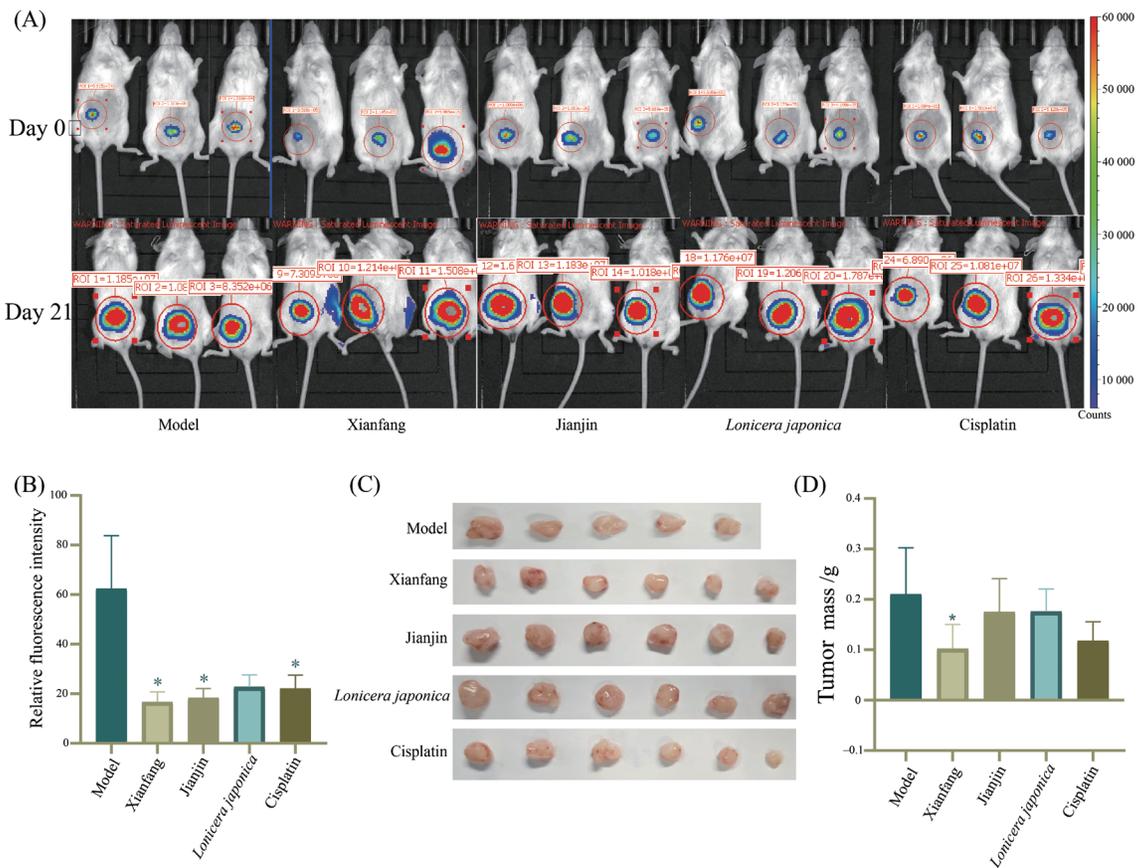


A: 各组小鼠体质量变化, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 与正常组比较; B: 各组小鼠肿瘤体积变化, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, 与模型组比较。n=6。

A: changes in body mass of mice in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with the normal group; B: changes in tumor volume in each group of mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ compared with the model group. n=6.

图5 TNBC小鼠药物治疗的宏观表征

Fig.5 Macroscopic characterization of drug treatment in TNBC mice



A, B: 小鼠在体肿瘤活体成像; C, D: 小鼠肿瘤质量大小; * $P < 0.05$ 与模型组比较, n=6。

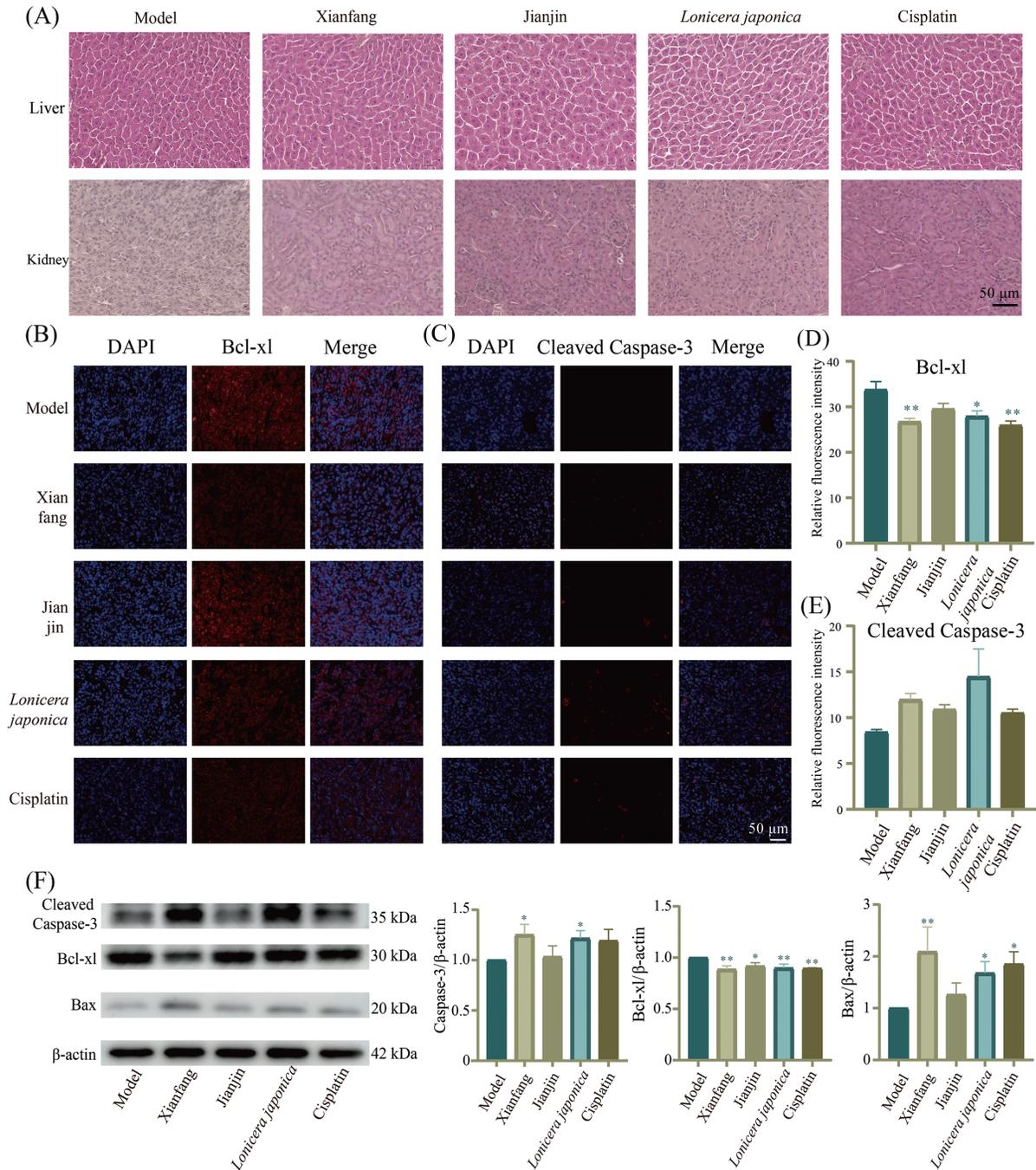
A,B: *in vivo* tumor imaging in mice; C,D: tumor mass size of mice; * $P < 0.05$ compared with the model group, n=6.

图6 仙方活命饮及金银花对TNBC的抑制作用

Fig.6 Inhibitory effect of XHD and *Lonicera japonica* on TNBC

能直接调控细胞周期发挥抗TNBC作用。KEGG富集于Cell cycle、PI3K-AKT、Apoptosis等经典肿瘤凋亡相关通路^[21-23], 其中PI3K-AKT通路是肿瘤细胞增殖、凋亡调控的核心通路^[23], 其异常激活与TNBC的发生发展及化疗耐药密切相关^[24], 而凋亡通路的

调控则直接影响肿瘤细胞的存活^[25], 多篇报道也证实了通过靶向PI3K-AKT介导的细胞周期进展, 可以使得肿瘤细胞发生凋亡达到抗癌效果^[26-27], 这与中医“清热解毒、活血散结”的治则相契合, 为阐明仙方活命饮对TNBC的抑制提供了方向。



A: 小鼠肝肾HE染色; B、D: 肿瘤Bcl-x1的荧光表达情况; C、E: 肿瘤Cleaved Caspase-3的荧光表达情况; F: Western blot检测凋亡相关蛋白表达情况; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与模型组比较, $n = 3$ 。

A: HE staining of mouse liver and kidney; B,D: fluorescence expression of Bcl-x1 in tumors; C,E: fluorescence expression of tumor Cleaved Caspase-3; F: expression of apoptosis-related proteins was detected by Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the model group, $n = 3$ 。

图7 仙方活命饮及金银花对TNBC产生凋亡作用

Fig.7 XHD and *Lonicera japonica* had apoptotic effects on TNBC

基于网络药理学预测的凋亡调控方向, 本研究通过体内外实验验证了仙方活命饮及金银花的抗TNBC效应。在体内实验中, 仙方活命饮与金银花均能抑制TNBC移植瘤生长, 降低肿瘤荧光强度及瘤重, 且对小鼠肝肾无明显毒性, 提示其临床应用的安

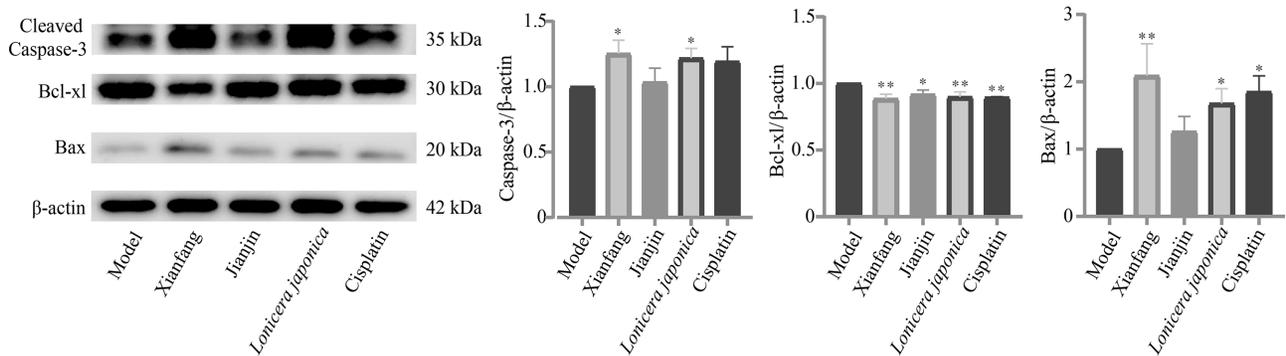
全性; 免疫组化及Western blot显示, 仙方活命饮与金银花可调控TNBC肿瘤组织凋亡信号, 明确了其诱导肿瘤细胞凋亡为抑制TNBC的核心机制。在体外实验中, CCK-8显示20%含药血清作用48 h为最佳实验条件, 在此浓度下仙方组对MDA-MB-231细胞活

表1 CCK-8检测含药血清对MDA-MB-231细胞活性的影响
Table 1 CCK-8 assay of drug-containing serum on MDA-MB-231 cell viability

组别 Group	时间/h Time /h	浓度 Concentration					
		0%	2.5%	5%	10%	15%	20%
Xianfang group	24	100.00±2.95	100.70±3.23	101.80±2.57	96.19±3.04	93.06±4.17	82.60±7.59****
	48	100.00±10.37	96.16±10.15	90.73±10.15	76.88±8.60**	66.13±8.66****	57.67±8.80****
	72	100.00±18.46	94.48±8.22	85.02±10.37	69.98±3.42***	57.45±3.97****	45.98±6.46****
Jianjin group	24	100.00±10.58	100.8±9.98	103.6±19.16	98.48±7.81	99.33±14.87	94.39±11.80
	48	100.00±2.72	99.16±6.62	97.00±1.05	93.55±5.00	92.80±3.34	92.06±4.39*
	72	100.00±7.56	97.84±4.86	95.68±4.74	93.11±1.92	85.95±4.08***	84.39±3.80***
<i>Lonicera ja-</i> <i>ponica</i> group	24	100.00±2.55	100.00±2.68	99.90±7.32	99.06±4.06	93.71±4.05	92.25±1.28*
	48	100.00±4.25	99.37±6.35	97.61±3.79	95.65±3.73	90.78±5.68*	87.91±4.39**
	72	100.00±2.33	99.27±3.23	98.27±2.90	93.14±6.93	87.23±6.54***	77.03±2.67****

$n=5$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与对照组(0%)比较。

$n=5$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with the control group (0%)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组比较, $n=3$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the model group, $n=3$ 。

图8 Western blot检测凋亡相关蛋白表达情况

Fig.8 Expression of apoptosis-related proteins detected by Western blot

性的抑制作用显著优于减金组及金银花组。Western blot检测进一步验证了凋亡通路的激活,这一结果与体内实验相互印证,形成了完整的“药物-靶点-通路-效应”证据链。值得注意的是,单味君药金银花和减金组在TNBC中均有一定治疗效果,但仙方活命饮的抑瘤效果明显优于这两组,进一步证实复方配伍的协同作用^[28]。

本研究仍存在一定局限:网络药理学预测的差异成分及靶点需进一步通过实验验证;体内外实验未设置低、中、高不同剂量组,无法明确药物剂量与抑瘤效应、通路调控效果之间的依赖关系;未深入探究细胞周期调控与凋亡通路的交互作用机制。未来研究可聚焦仙方活命饮中含量较高的核心差异成分及其对应的关联性较强的靶点,采用分子对接与分子动力学模拟检测结合亲和力,明确两者的直

接相互作用关系;同时,通过基因沉默/过表达技术(如siRNA干扰、慢病毒介导的过表达载体构建)调控核心靶点的表达水平,观察不同浓度的仙方活命饮核心成分对多种TNBC细胞(如MDA-MB-468、MDA-MB-231等,避免不同亚型TNBC细胞对药物敏感性具有差异)的增殖、凋亡的影响是否随之改变,从而验证核心靶点在药物作用机制中的关键介导作用,进一步夯实“成分-靶点-通路-效应”的完整证据链。

此外,本研究的体内实验在小鼠模型中进行,需充分考虑仙方活命饮在人类与小鼠之间可能存在的重大差异。中医方剂的作用效果与机体的体质状态密切相关,而小鼠模型无法模拟人类复杂的体质差异,如TNBC患者的肝郁气滞、脾胃虚弱、热毒蕴结等不同证型^[29],这也可能导致药物在临床应用中的效果与小鼠实验结果存在偏差。未来研究应加强

临床转化相关的实验设计,如采用人源化小鼠模型。

5 结论

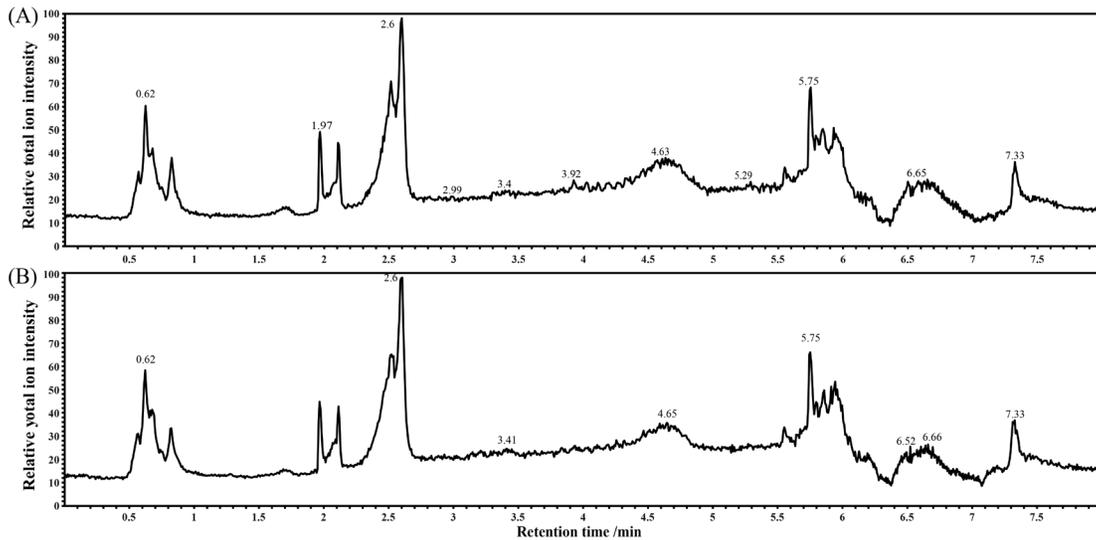
本研究证实了仙方活命饮及其君药金银花具有良好的安全性,可通过多成分多靶点介导凋亡途径抑制 TNBC 进一步发展,发挥抑制 TNBC 作用,为 TNBC 中医药治疗提供实验依据与新思路。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] GARRIDO-CASTRO A C, LIN N U, POLYAK K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176-98.
- [3] ZHU M, LIU Y, WEN Z, et al. Exploration of traditional chinese medicine comprehensive treatment of triple negative breast cancer based on molecular pathological mechanism [J]. *Breast cancer*, 2025, 17: 289-304.
- [4] MENG H, PENG N, YU M, et al. Treatment of triple-negative breast cancer with Chinese herbal medicine: a prospective cohort study protocol [J]. *Medicine*, 2017, 96(44): e8408.
- [5] ANURAG M, JAEHNIG E J, KRUG K, et al. Proteogenomic markers of chemotherapy resistance and response in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(11): 2586-605.
- [6] YANG Z, ZHANG Q, YU L, 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.
- [7] 胡升芳, 谷焕鹏, 陈红凤, 等. 陆德铭教授扶正祛邪法治疗乳腺癌经验[J]. *中华中医药学刊*(HU S F, GU H P, CHEN H F, et al. Professor LU Deming's experience of treating breast cancer by strengthening healthy qi to eliminate pathogens [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*), 2013, 31(12): 2732-4.
- [8] 黎清斌, 张兆华, 潘海文, 等. 仙方活命饮在伤科疾病中的应用体会[J]. *中医药导报*(LI Q B, ZHANG Z H, PAN H W, et al. Experience in the application of xianfang huoming decoction in orthopedic diseases [J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*), 2017, 23(8): 102-4.
- [9] 张全辉, 喻文球, 吴允波. 喻文球名老中医仙方活命饮临床治验[J]. *实用中西医结合临床*(ZHANG Q H, YU W Q, WU Y B. Yue Wenqiu, known as an elderly traditional Chinese medicine doctor, has published a clinical treatment experience report on xianfang huoming decoction [J]. *Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*), 2020, 20(7): 97-9.
- [10] 杨争, 胡金辉, 方颖, 等. 清热解毒法治疗肿块型浆细胞性乳腺炎25例临床观察[J]. *湖南中医杂志*(YANG Z, HU J H, FANG Y, et al. Clinical observation of 25 cases of mass-type plasma cell breast inflammation treated with the method of clearing heat and detoxifying [J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2016, 32(5): 68-9.
- [11] 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.
- [12] 吴娇, 王聪, 于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*(WU J, WANG C, YU H C, et al. Chemical constituents and pharmacological effect of *Lonicerae Japonicae Flos* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2019, 25(4): 225-34.
- [13] 何治宏, 张丰川, 杨顶权, 等. 基于AhR/CYP1A1信号通路探讨散结祛瘀方对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*(HE Z H, ZHANG F C, YANG D Q, et al. Investigating effects of Sanjie Quban Formula on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of human keloid fibroblasts via AhR/CYP1A1 signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2026, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20251806.
- [14] RAMAN R, DEBATA S, GOVINDARAJAN T, et al. Targeting triple-negative breast cancer: resistance mechanisms and therapeutic advancements [J]. *Cancer medicine*, 2025, 14(9): e70803.
- [15] WU Q, YAN H, KANG Z. A review of traditional chinese medicine for triple negative breast cancer and the pharmacological mechanisms [J]. *Am J Chin Med*, 2024, 52(4): 987-1011.
- [16] LIU Y, LI X, CHEN C, et al. Exploration of compatibility rules and discovery of active ingredients in TCM formulas by network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 572-88.
- [17] SINGH D D, YADAV D K. TNBC: potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough, nanomedicine, and immunotherapy [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 876.
- [18] SHI Y, SANG X, DENG J, et al. Six cell cycle-related genes serve as potential prognostic biomarkers and correlated with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer*, 2023, 14(1): 9-23.
- [19] SMITH J, THO L M, XU N, et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer [J]. *Adv Cancer Res*, 2010, 108: 73-112.
- [20] ALEEM E, ARCECI R J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 16.
- [21] MILLIANA A, LISTIYANA A, MUTIAH R, et al. The potential of eleutherine bulbosa in inducing apoptosis and inhibiting cell cycle in breast cancer: a network pharmacology approach and *in vitro* experiments [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24(11): 3783-94.
- [22] LI J, ZHOU F, SHANG L, et al. Integrated network pharmacology and experimental verification to investigate the mechanisms of YYFZBJS against colorectal cancer via CDK1/PI3K/AKT signaling [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 961653.
- [23] HASSAN A, AUBEL C. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in triple-negative breast cancer: a resistance pathway and a prime target for targeted therapies [J]. *Cancers*, 2025, 17(13): 2232.
- [24] ZHANG C, YU Z, YANG S, et al. ZNF460-mediated circRPPH1 promotes TNBC progression through ITGA5-induced FAK/PI3K/AKT activation in a ceRNA manner [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 33.
- [25] SU H, PENG C, LIU Y. Regulation of ferroptosis by PI3K/AKT

- signaling pathway: a promising therapeutic axis in cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1372330.
- [26] WAN MOHD TAJUDDIN W N B, ABAS F, OTHMAN I, et al. molecular mechanisms of antiproliferative and apoptosis activity by 1,5-Bis(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)1,4-Pentadiene-3-one (MS13) on human non-small cell lung cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7424.
- [27] ZHANG Y, LÜ P, MA J, et al. *Antrodia cinnamomea* exerts an anti-hepatoma effect by targeting PI3K/AKT-mediated cell cycle progression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(2): 890-906.
- [28] 于海艳. 方剂配伍理论框架的研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [29] 梅荷婷, 卢雯平, 卓至丽, 等. 从中医证型角度探讨三阴性乳腺癌转移的相关因素[J]. *中国医药导报*(MEI H T, LU W P, ZHUO Z L, et al. Discussion on the relevant factors of metastasis of triple negative breast cancer from the perspective of traditional Chinese medicine syndrome types [J]. *China Medical Herald*), 2022, 9(33): 104-7.

附录

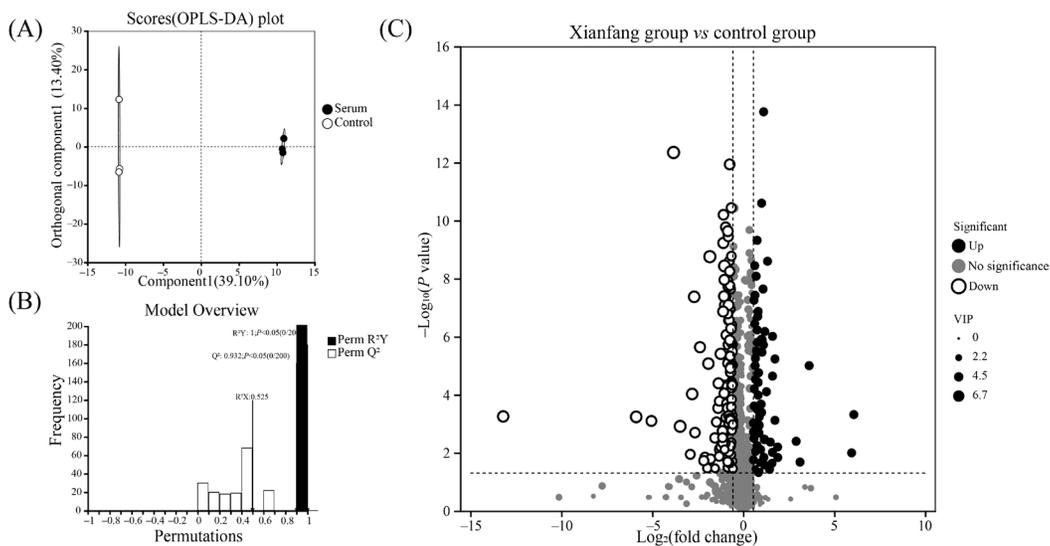


A: 空白组血清离子图; B: 仙方活命饮组血清离子图。

A: serum ionograms of the blank group; B: serum ionogram of Xianfang group.

附录A 血清离子图

Appendix A Serum ionogram



A: OPLS-DA评分表; B: OPLS-DA验证图; C: 空白组与仙方活命饮组差异成分火山图。

A: OPLS-DA score table; B: OPLS-DA validation graph; C: volcano diagram of difference components between blank group and Xianfang group.

附录B 含药血清差异成分分析

Appendix B Analysis of differential components in drug-containing serum