

整合网络药理学和体外实验探究夏枯草-半枝莲药对治疗乳腺癌的作用及机制

刘 苏^{1,2} 陈洪晓² 金 乐² 张慧慧³ 张 蕾² 陈昭琳^{1,2}

摘要 目的 采用网络药理学和体外细胞实验探究夏枯草-半枝莲药对抗乳腺癌的作用机制。方法 运用中药系统药理学数据库与分析平台筛选出夏枯草-半枝莲药对的有效成分和靶点;利用 GeneCards、OMIM 数据库找到乳腺癌靶点,进而构建药物-活性成分-关键靶点网络和蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络;运用 R 语言进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析以及生存分析;将筛选出的活性成分和核心靶点进行分子对接验证;采用 CCK-8 法检测细胞活力;EdU、流式实验检测细胞增殖和凋亡情况;Western blot 法检测 p-AKT1、AKT1、 β -catenin 和 c-MYC 的蛋白表达水平。结果 通过数据分析共筛选出有效成分 36 个,交集靶点 105 个,其核心成分是槲皮素、木犀草素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素;通过 PPI 和生存分析得出其关键靶点是 AKT1、ESR1、CASP3、MYC;GO 分析共包含 4 303 条富集结果,KEGG 分析共包含 232 条通路;分子对接显示核心成分与关键靶点均具有较强的结合能力。细胞实验证明核心活性成分槲皮素可以抑制乳腺癌细胞的增殖并促进其凋亡($P < 0.05$),下调 p-AKT1、 β -catenin 和 c-MYC 蛋白的表达水平($P < 0.05$)。结论 夏枯草-半枝莲药对中活性成分槲皮素可能通过 AKT1/ β -catenin 信号通路来发挥作用,为其治疗乳腺癌的作用机制研究提供了科学参考。

关键词 网络药理学;夏枯草;半枝莲;分子对接;细胞实验;作用机制

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1134-09
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.005

2024-02-19 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2208085MH252、2108085MH311);安徽省高校优秀青年科研项目(编号:2023AH030114)

作者单位:¹安徽医科大学药学院,合肥 230032

²中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)药学部,合肥 230001

³安徽医科大学临床药理研究所 抗炎免疫药物教育部重点实验室,合肥 230032

作者简介:刘 苏,男,硕士研究生;

陈昭琳,女,副主任药师,硕士生导师,责任作者,E-mail: czl0808@ustc.edu.cn

乳腺癌是威胁女性生命和健康的常见疾病之一,其发病率位居女性恶性肿瘤之首。现代乳腺癌的治疗主要包括手术治疗、放化疗、内分泌治疗、靶向治疗等,但往往都存在严重的不良反应^[1]。中医作为乳腺癌一种常见的辅助治疗手段,可以帮助患者减轻放化疗、内分泌治疗等引起的不良反应,调节患者免疫功能和体质,改善患者生存质量,提高生存率^[2]。

夏枯草最早记载于《神农本草经》中,具有抗菌消炎、免疫抑制、抗氧化、抗肿瘤、抑制病毒生长等多种药理作用^[3];半枝莲,一种清热药,具有清热解毒、化瘀利尿的功效^[4]。江苏省名中医尤建良教授认为恶性乳腺癌为恶毒蕴积所致,日久必生邪火,常以夏枯草-半枝莲药对为基础,同时配合临床辨证应用,有良好效果^[5]。该研究通过网络药理学,筛选出夏枯草-半枝莲药对的核心成分槲皮素,结合课题组前期在槲皮素促进乳腺癌凋亡方面的研究^[6],深入探讨槲皮素可能通过 AKT1/ β -catenin 信号通路来发挥作用,为药对抗乳腺癌的机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 药物活性成分及靶点的筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)分别检索“夏枯草”和“半枝莲”得到其所有化学成分,并按照口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 为条件筛选出活性成分和对应靶点,将结果导入到 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)转化为统一的基因名。

1.1.2 疾病靶点的筛选 分别在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)中以“breast cancer”为关键词进行检索,其中 GeneCards 数据库里以 Relevance score ≥ 15 为筛选值,再将 2 个数据库的靶点合并去重,得到乳腺癌的最终靶点。

1.1.3 核心成分的筛选和蛋白-蛋白相互作用

(protein-protein interaction, PPI) 网络图的构建 在 Venny2.1 在线作图平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), 输入药物靶点和疾病靶点, 获得两者靶点交集的韦恩图。构建夏枯草和半枝莲成分、靶点相关的属性文件和网络文件, 导入到 Cytoscape3.8.2 软件中, 构建药物-活性成分-关键靶点网络图, 筛选核心活性成分。将共同靶点导入到 String 数据库 (<https://www.string-db.org/>) 构建 PPI 网络图, 再将获得的 tsv 格式文件导入到 Cytoscape3.8.2 软件中进行可视化分析。

1.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 打开 R (4.1.1) 软件, 安装并运行“DOSE、org. Hs. eg. db、clusterProfiler”等程序包, 对共同靶点基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 并对结果进行可视化。筛选条件为 $P < 0.01$ 。

1.1.5 生存分析 打开 R (4.1.1) 软件, 运用“survival”程序包, 将“1.1.3”项下度值靠前的 6 个靶点导入到 TCGA 数据库中作生存预后分析。根据 Log-Rank 检验 $P < 0.05$ 说明基因与疾病生存率具有相关性。

1.1.6 分子对接 下载 AutoDockTools 1.5.7 软件、PyMol 2.4.0 安装包。打开 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载“1.1.3”项下前 5 位核心成分的 3D 结构, 打开 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载关键靶点的蛋白分子结构文件, 通过去除配体和水、加氢、计算电荷数等, 进行分子对接, 得出结合能, 再通过 PyMol 对结果可视化。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 细胞与药物 人乳腺癌细胞株 MCF-7 由中国科学技术大学朱涛教授课题组馈赠、人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。槲皮素(批号: Q4951-10G, 纯度 >95%, 美国 Sigma 公司)。

1.2.2 试剂与仪器 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); CCK-8(大连美仑生物技术有限公司, 货号 MA0218-2-Oct-11F); p-AKT1 单克隆抗体、AKT1 单克隆抗体、c-MYC 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 66444-1-Ig、80457-1-RR、10828-1-AP); β -catenin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 8480s); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司, 货号: 556547); 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公

司); BCA 试剂盒、EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 型号: P0010、C0071S); 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司, 型号: DMI3000B); 冷冻高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司, 型号: HC-3018R); 电泳仪(上海天能科技有限公司, 型号: EPS300)。

1.2.3 细胞培养 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞分别用 RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基(均含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗)在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞处于对数生长期时开始后续实验。

1.2.4 CCK-8 法测定细胞活力 取对数生长期的 MDA-MB-468 细胞, 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板内培养 24 h, 加入 100 μ l 不同浓度的槲皮素(10、20、40、80、160、320 μ mol/L)作用 24、48 和 72 h, 再加入 CCK-8 试剂, 避光孵育 2 h 后, 在酶标仪上测定 450 nm 处吸光度, 计算细胞活力。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将 MDA-MB-468 细胞以每孔 1×10^4 个接种于 6 孔板内, 用不同浓度的槲皮素(40、80、160 μ mol/L)处理 48 h 后收集细胞, 加入 100 μ l Binding Buffer 缓冲液将细胞重悬, 依次加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 染色液, 避光孵育 15 min, 再加入 300 μ l Binding Buffer 混悬细胞后, 用流式细胞仪检测。

1.2.6 EdU 检测细胞增殖 在 24 孔板中加入不同浓度槲皮素(40、80、160 μ mol/L)处理 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞 48 h, 将 37 °C 预热的 EdU (2 \times) 工作液等体积加入到 24 孔板中, 继续孵育 2~3 h 后去培养基, 加固定液 15 min; 去固定液, 洗涤 3 次后加通透液 10 min; 加 Click 反应液避光 30 min, 加 Hoechst 液 10 min 后在荧光显微镜中观察荧光的相对比例。

1.2.7 Western blot 法检测 p-AKT1、AKT1、 β -catenin、c-MYC 蛋白的表达 用不同浓度的槲皮素(40、80、160 μ mol/L)处理 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞 48 h 后, 提取细胞, 经凝胶电泳、转膜、牛奶封闭 1.5 h 后, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗涤 3 次后显影。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 9.5 软件对数据进行统计分析, 所有实验均重复 3 次以上。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组资料间比较采用单因素方差分析, 两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物活性成分及靶点的筛选结果 通过 TCM-SP 数据库,共得到有效成分 36 个,其中夏枯草有效成分 11 个,半枝莲有效成分 29 个,重复成分 4 个,具体见表 1。通过有效成分筛选靶点,共得到药物靶点 187 个。

表 1 药物活性成分筛选结果

成分编号	分子名称	口服生物利用度(%)	类药性	来源
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	夏枯草
MOL000422	山奈酚	41.88	0.24	夏枯草
MOL004355	芥甾醇	42.98	0.76	夏枯草
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	夏枯草
MOL004798	飞燕草素	40.63	0.28	夏枯草
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25	夏枯草
MOL006767	仙人掌黄素-1	56.14	0.26	夏枯草
MOL006772	豆甾醇葡萄糖苷	43.83	0.76	夏枯草
MOL006774	豆甾-7-烯醇	37.42	0.75	夏枯草
MOL000737	桑色素	46.23	0.27	夏枯草
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	夏枯草
MOL001040	(2R)-5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)苯并吡喃-4-酮	42.36	0.21	半枝莲
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮	36.63	0.27	半枝莲
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	74.24	0.26	半枝莲
MOL012248	5-羟基-7,8-二甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)色酮	65.82	0.33	半枝莲
MOL012250	7-羟基-5,8-二甲氧基-2-苯基色酮	43.72	0.25	半枝莲
MOL012251	白杨素-5-甲醚	37.27	0.20	半枝莲
MOL012252	9,19-环醇甾-24-烯-3-醇	38.69	0.78	半枝莲
MOL002776	黄芩苷	40.12	0.75	半枝莲
MOL012254	菜油甾醇	37.58	0.71	半枝莲
MOL000953	胆甾烷醇	37.87	0.68	半枝莲
MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	半枝莲
MOL012266	黄芩黄酮	37.94	0.37	半枝莲
MOL001973	乙酸谷甾醇酯	40.39	0.85	半枝莲
MOL012269	豆甾-5,22-二烯-3-醇乙酸酯	46.44	0.86	半枝莲
MOL012270	豆甾烷-3,5,22-三烯	45.03	0.71	半枝莲
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	半枝莲
MOL000173	汉黄芩素	30.68	0.23	半枝莲
MOL001735	高车前素	30.97	0.27	半枝莲
MOL001755	24-乙基胆甾-4-烯-3-酮	36.08	0.76	半枝莲
MOL002714	黄芩素	33.52	0.21	半枝莲
MOL002719	6-羟基柚皮素	33.23	0.24	半枝莲
MOL002915	丹参素	49.07	0.33	半枝莲
MOL000351	鼠李素	47.14	0.34	半枝莲
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	半枝莲
MOL005190	圣草酚	71.79	0.24	半枝莲
MOL005869	胡萝卜苷	36.91	0.75	半枝莲
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25	半枝莲
MOL008206	苏莽苜黄酮	44.09	0.25	半枝莲
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	半枝莲

2.2 疾病靶点的筛选及网络图的构建与分析 最终得到 1 616 个乳腺癌靶点和 105 个交集靶点,见图 1A。将 36 个活性成分和 105 个交集靶点通过 Cytoscape3.8.2 软件构建药物-活性成分-关键靶点网络图,如图 1B 所示。其中三角形代表中药,正方形代表活性成分,圆形代表靶点。通过拓扑数据分析,度值靠前的成分节点依次为槲皮素、木犀草素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素,对应的度值大小分别为 81、42、28、26、21,说明它们可能是夏枯草-半枝莲药对治疗乳腺癌的关键活性成分。

2.3 PPI 网络互作结果 将 105 个交集靶点导入到 String 数据库,得到 PPI 网络图,见图 1C。进一步导入到 Cytoscape3.8.2 中,根据节点的度值大小进行核心靶点的筛选,见图 1D。其中度值越大,节点越大,颜色越深,其生物学功能越多。利用 CytoHubba 插件得到度值排名前 6 的靶点依次为 TP53、AKT1、MYC、ESR1、CCND1、CASP3,对应的度值分别为 96、86、86、85、80、80,提示可能为夏枯草-半枝莲药对治疗乳腺癌的核心靶点。

2.4 功能与通路分析结果 富集分析结果得到 GO 条目 4 303 个($P < 0.01$),其中生物过程 3 714 个、细胞成分 205 个、分子功能 384 个。生物过程主要集中于细胞对化学应激反应、类固醇激素反应等;细胞成分主要涉及膜筏、膜微区等;分子功能主要包含 DNA 转录因子结合、核受体活性等,见图 2A。KEGG 通路富集分析结果显示,共得到 232 个条目($P < 0.01$),主要涉及脂质和动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路等,见图 2B。

2.5 生存分析结果 随着随访时间的延长,AKT1、ESR1、CASP3 低表达组患者生存率均高于高表达组,MYC 高表达患者组生存率高于低表达组(均 $P < 0.05$)。而 TP53、CCND1 两组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 3。

2.6 分子对接结果 将 4 个核心靶点 AKT1 (PDBID: 4EKL)、MYC (PDBID: 6U80)、ESR1 (PDBID: 5GS4)、CASP3 (PDBID: 1GFV) 与 5 个核心成分分别进行分子对接,绘制最小结合能数值热图,见图 4A。其中,槲皮素与 AKT1 运用 PyMol 可视化见图 4B。分子对接反映的是受体蛋白和配体结合构象的稳定性,当结合能低于 -7.0 kcal/mol 时,表明配体与蛋白具有强烈的结合活性。结果显示,有多个蛋白与靶点有着强烈的结合活性,再综合前面的度值和生存分析结果,因此选择主要成分槲皮素和靶点 AKT1 进行后续体外实验验证。

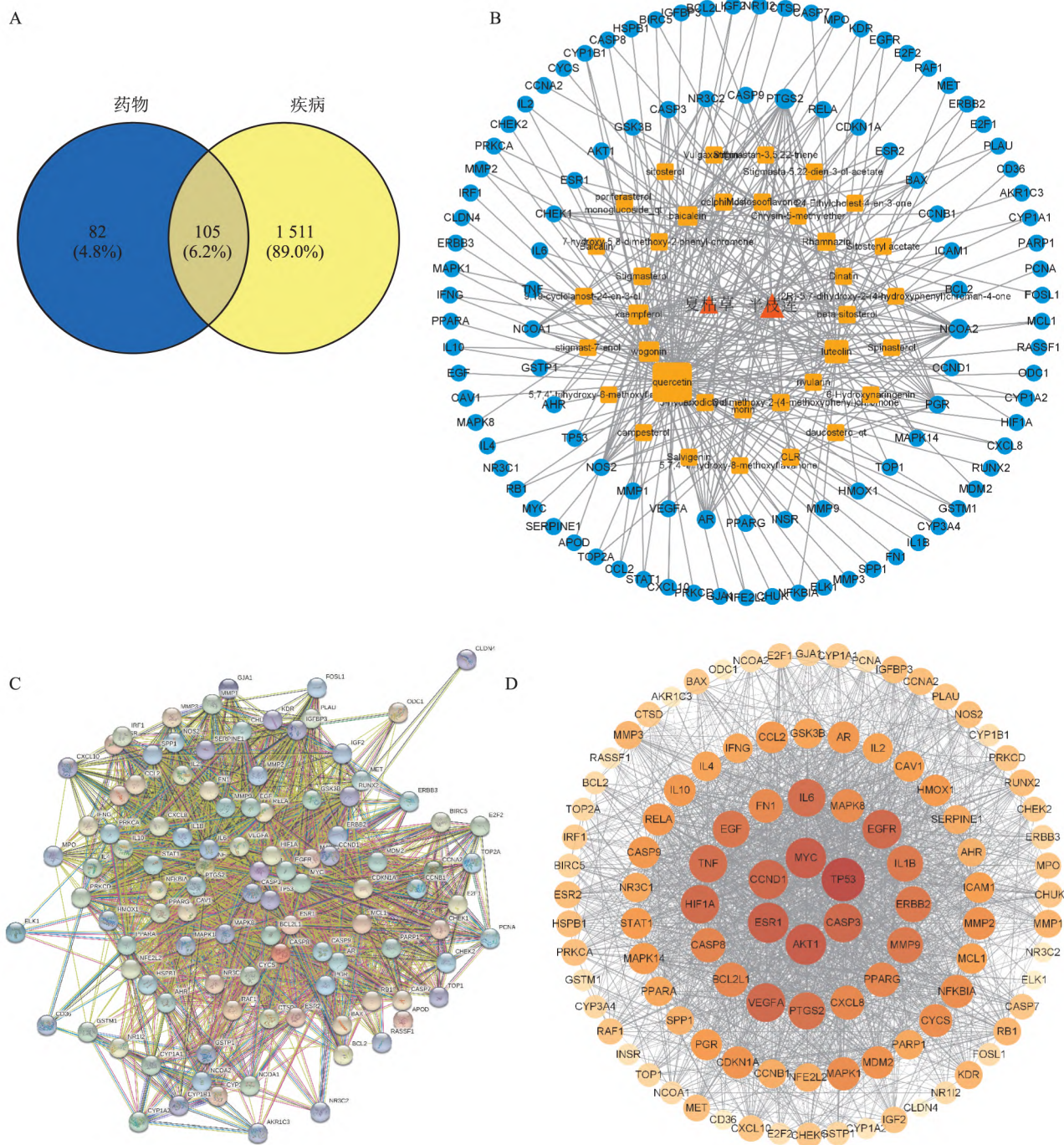


图1 靶点网络图

A: 夏枯草-半枝莲药对与乳腺癌的共同靶点; B: 药物-活性成分-关键靶点网络图; C: 夏枯草-半枝莲药对与乳腺癌交集靶点 PPI 网络图; D: 核心靶点可视化

2.7 槲皮素对乳腺癌细胞活力的影响 课题组前期通过实验证明 槲皮素作用 24、48 和 72 h 后均可抑制 MCF-7 细胞的活力,呈时间和浓度依赖性^[6]。如图 5 所示 槲皮素作用 MDA-MB-468 细胞时亦出现相似结果,与对照组比较,24 h ($F = 419.1, P < 0.05$)、48 h ($F = 837.6, P < 0.05$)、72 h ($F = 230.5,$

$P < 0.05$) 的细胞活力均显著降低。因此,本研究采用 40、80 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 的槲皮素浓度作用 48 h 进行后续实验。

2.8 槲皮素对乳腺癌细胞凋亡的影响 不同浓度 (40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 的槲皮素作用 MDA-MB-468 细胞后,凋亡率分别为 $(7.54 \pm 1.60)\%$ 、 $(21.18 \pm$

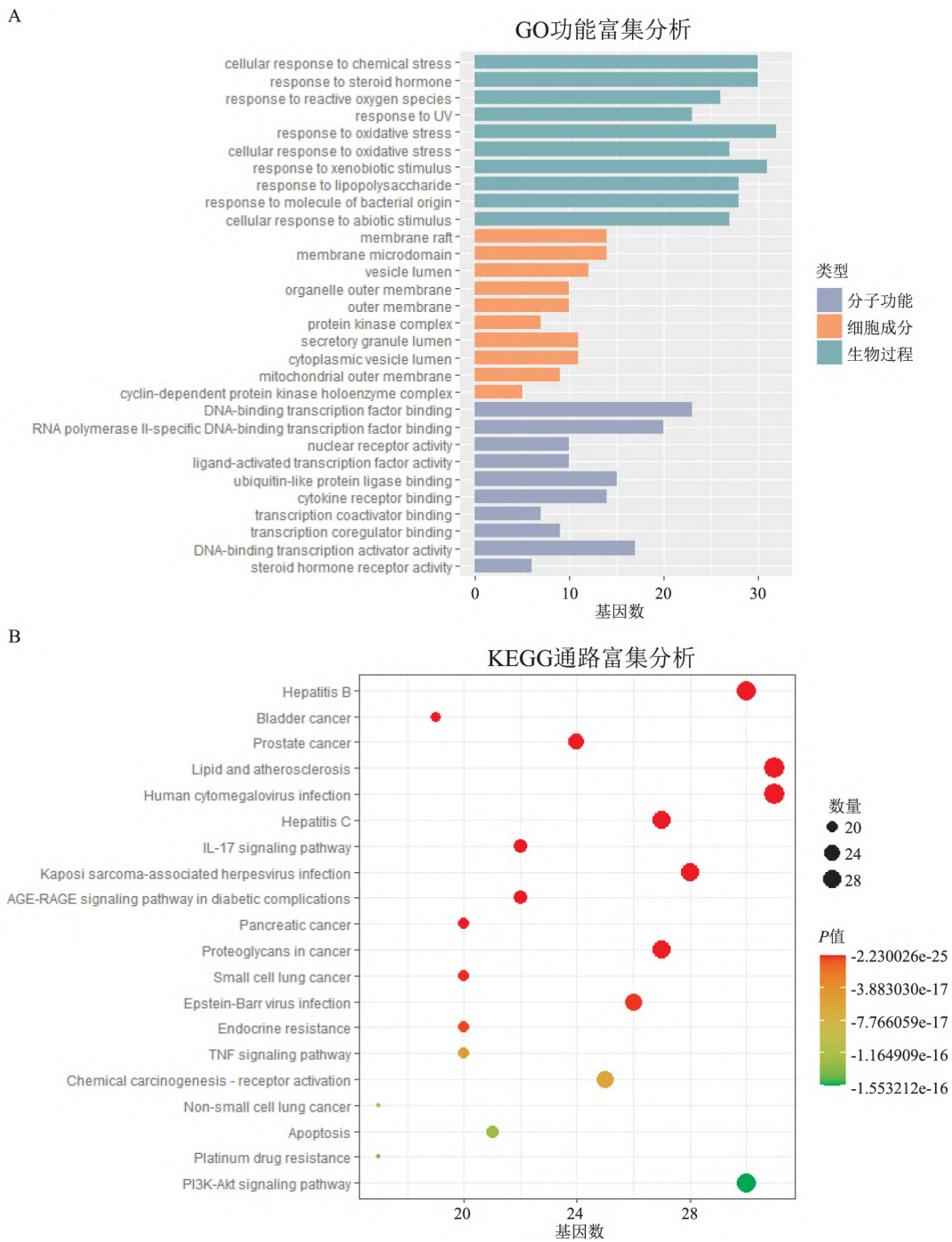


图2 富集分析
A: GO 功能富集分析; B: KEGG 通路富集分析

4.90) %、(27.76 ± 1.79) % ,细胞总凋亡率随着槲皮素浓度的增加而逐渐升高。与对照组比较,40 μmol/L 槲皮素的抑制作用相对较弱(*t* = 3.96, *P* > 0.05) ,而80 μmol/L 和160 μmol/L 槲皮素的抑制作用显著增强(*t* = 6.23、20.57 ,均 *P* < 0.001) 。见

图6。

2.9 槲皮素对乳腺癌细胞增殖的影响 不同浓度槲皮素(40、80、160 μmol/L) 作用于 MCF-7、MDA-MB-468 细胞后,随着槲皮素浓度逐渐增大,绿色荧光数量逐渐减少,细胞增殖受到明显抑制。见图7。

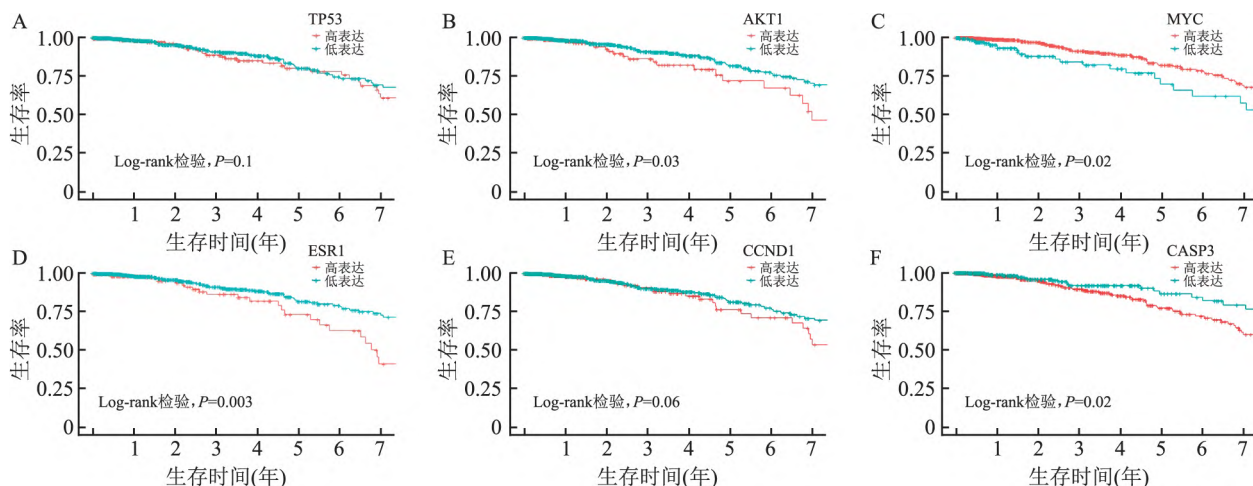


图3 不同靶点表达水平乳腺癌患者的Kaplan-Meier生存分析

A: TP53; B: AKT1; C: MYC; D: ESR1; E: CCND1; F: CASP3

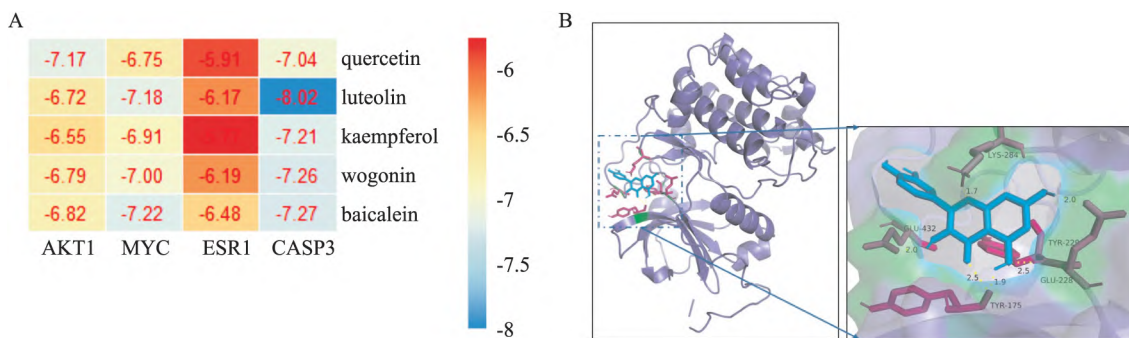


图4 分子对接

A: 热图; B: 槲皮素与AKT1对接的可视化分析

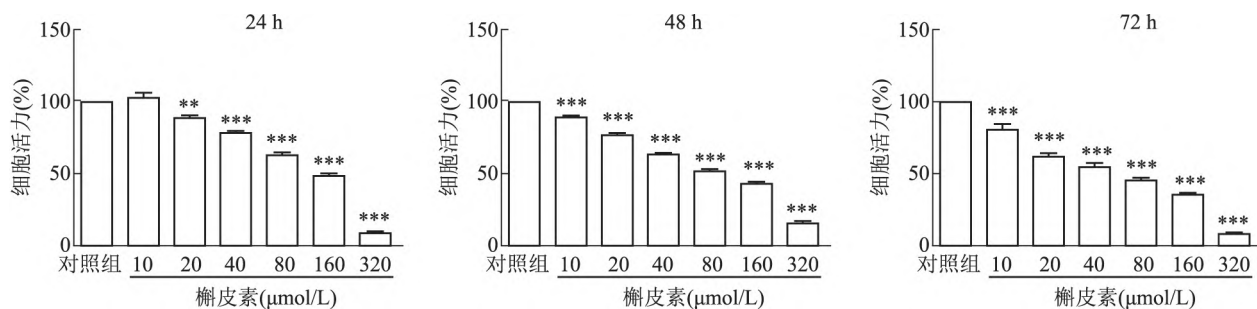


图5 槲皮素作用不同时间对MDA-MB-468细胞活力的影响

与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

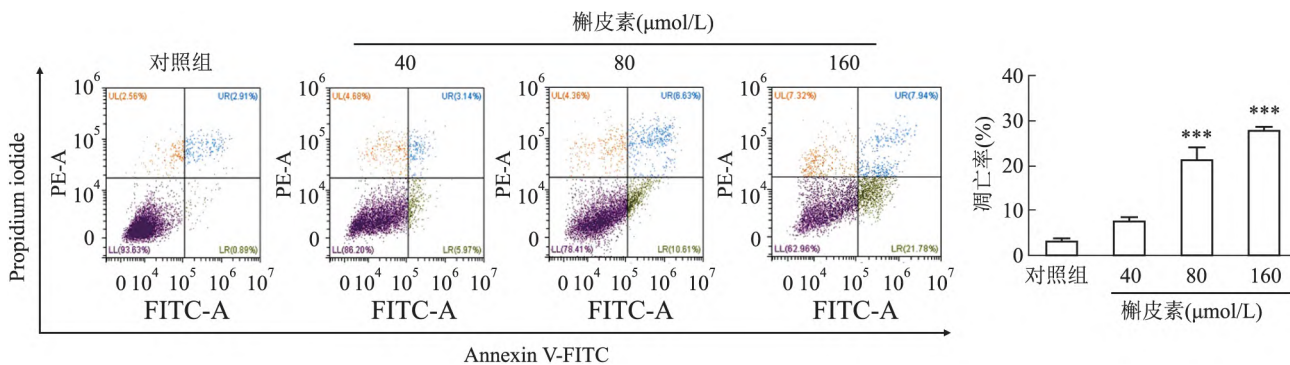


图6 槲皮素对MDA-MB-468细胞凋亡的影响

与对照组比较: *** $P < 0.001$

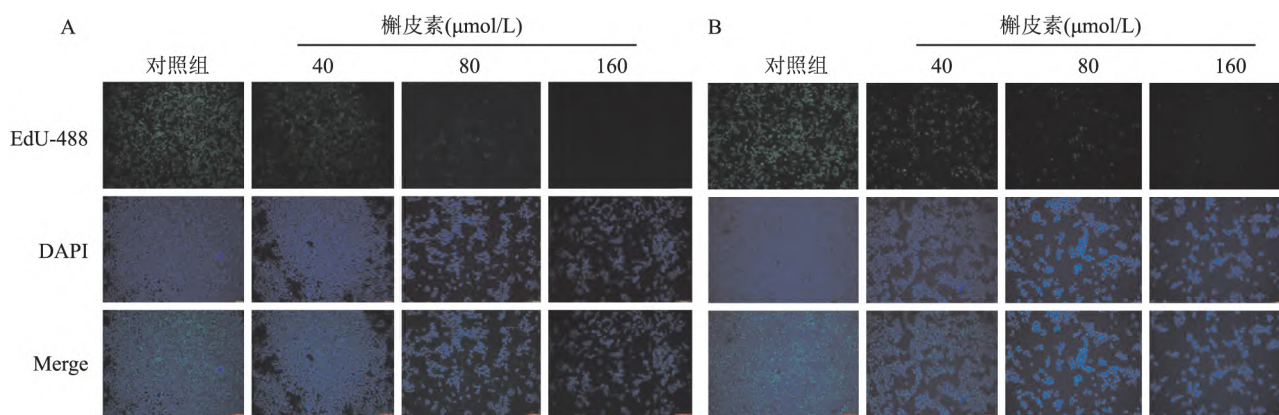


图7 槲皮素对 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞增殖的影响 ×100

A: MCF-7 细胞; B: MDA-MB-468 细胞

2.10 槲皮素对乳腺癌细胞中 AKT1 及下游蛋白表达的影响 与对照组比较,不同浓度槲皮素分别处理后 MCF-7、MDA-MB-468 细胞中 AKT1 蛋白表达几乎不变 ($F = 0.4, P > 0.05; F = 5.5, P > 0.05$), p-AKT1 蛋白表达明显下降 ($F = 412.2, P < 0.05; F$

$= 43.0, P < 0.05$), β -catenin ($F = 60.4, P < 0.05; F = 62.4, P < 0.05$) 和 c-MYC ($F = 19.6, P < 0.05; F = 26.9, P < 0.05$) 蛋白表达也不同程度的降低。见图 8。

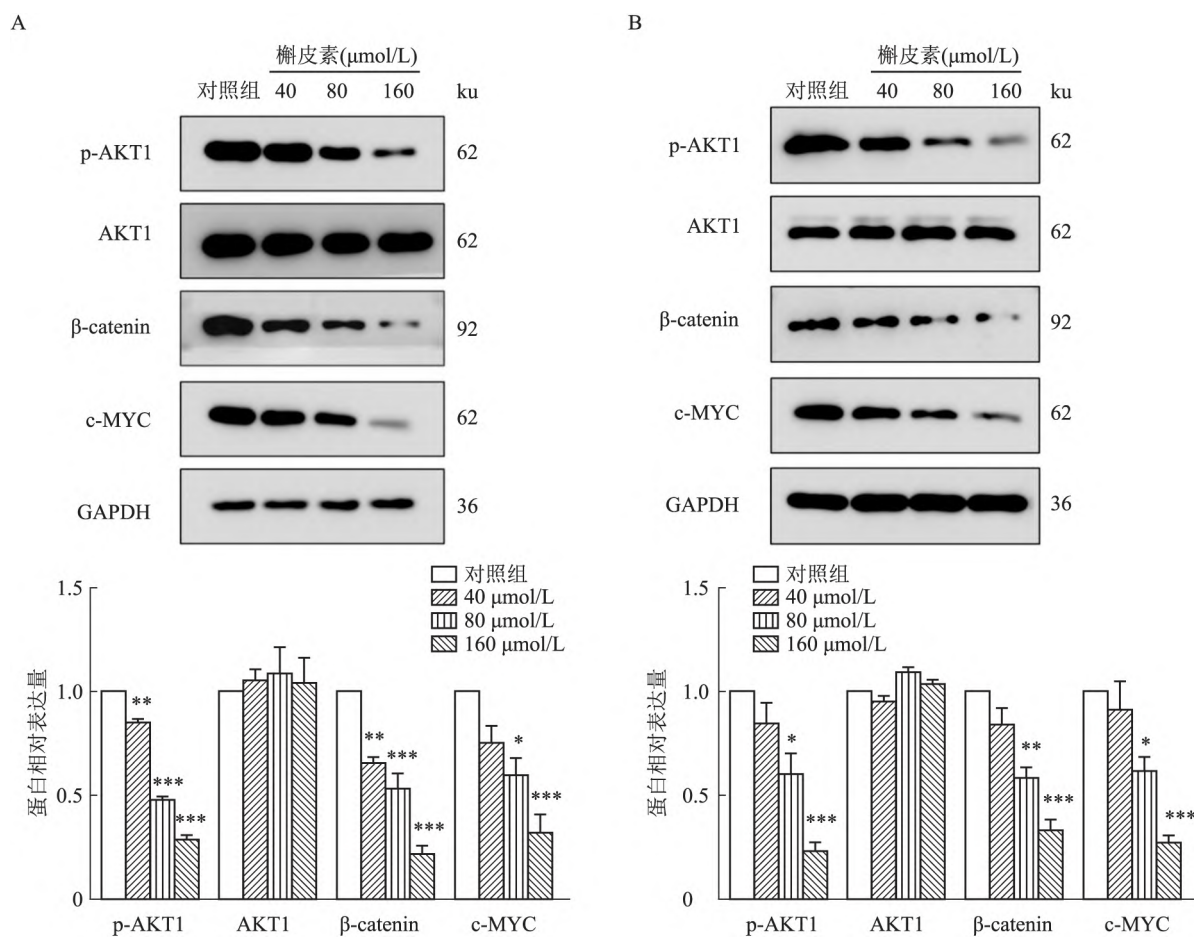


图8 槲皮素对 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞中 p-AKT1、AKT1、 β -catenin 和 c-MYC 蛋白表达的影响

A: MCF-7 细胞; B: MDA-MB-468 细胞; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

在中医学中,乳腺癌属于乳岩、乳疔、乳石痈等范畴,主要由于正气不足、痰瘀互结、内伤情志所致,早期表现为乳房肿块,热毒蕴结^[7]。临床常用夏枯草-半枝莲药对用于乳腺癌治疗,二者配伍,相须而用,协同增效,共奏清热解毒、散结抗癌之效。

本研究结果提示夏枯草-半枝莲药对乳腺癌的主要活性成分为槲皮素。槲皮素是一种天然的小分子黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化和免疫调节等功能。有研究^[8]表明在肺癌细胞中,槲皮素可通过改变 AKT/MAPK/ β -catenin 信号通路和抑制 β -catenin 的核易位来抑制肺癌的转移能力。课题组前期研究^[6]也发现,槲皮素可以抑制乳腺癌细胞增殖,并可逆转乳腺癌阿霉素耐药^[9]。本研究进一步证实槲皮素可以抑制乳腺癌的增殖并诱导其凋亡。

PPI 网络和生存分析结果提示 AKT1、ESR1、CASP3、MYC 与乳腺癌患者总体生存密切相关。ESR1 是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子,其突变是乳腺癌内分泌治疗耐药的一个主要驱动因素,导致转录活性和治疗敏感性降低^[10]。CASP3 是一种细胞凋亡介质,在细胞毒性药物、放疗或免疫治疗中,通过激活 Caspase-3 诱导肿瘤细胞死亡并抑制其侵袭和转移^[11]。MYC 是一种重要的转录因子,可调节参与细胞生长、增殖和代谢途径基因的表达,是人类肿瘤发生的主要驱动因素^[12]。分子对接结果亦显示 ESR1、CASP3、MYC 都与槲皮素有着较强的结合活性。AKT1 是 AKT 的一种亚型,可通过 p21、p27 和细胞周期蛋白 D1 等蛋白促进肿瘤细胞增殖,并通过 p53 等蛋白抑制肿瘤细胞凋亡,还可通过调节 TSC2、palladin 和 EMT 蛋白来影响癌细胞的迁移^[13]。本研究通过网络药理学和分子对接分析发现槲皮素可与 AKT1 结合且结合活性最强。p-AKT1 作为 AKT 的功能亚型,是激素受体阳性和人表皮生长因子受体-2 阳性乳腺癌患者不良结局的预后标志物^[14],本研究发现槲皮素可抑制 p-AKT1 蛋白的表达。Wang et al^[15] 研究发现 c-MYC 的激活也与 AKT1 的表达密切相关,激活的 AKT1 和低表达的 Fbxw7 可诱导 c-MYC 的激活促进胆管癌的生成。本研究结果发现槲皮素也可抑制下游 β -catenin 和 c-MYC 蛋白的表达。综上所述,槲皮素可能通过抑制 AKT1/ β -catenin/c-MYC 的表达从而抑制乳腺癌细胞的增殖并促进其凋亡。

本研究利用网络药理学的方法对夏枯草-半枝

莲药对乳腺癌的成分、靶点和作用机制进行了初步预测,再通过分子对接和体外细胞实验验证了网络药理学分析结果的可靠性,为今后更深层次的药理学探索奠定了基础。由于本研究只用了核心成分槲皮素进行体外实验还存在一定的局限性,下一步将对这个复方成分进行分析,采用药对的含药血清开展体内实验验证,以期对治疗乳腺癌的机制进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Tang T Q, Shah Z, Bonyah E, et al. Modeling and analysis of breast cancer with adverse reactions of chemotherapy treatment through fractional derivative [J]. *Comput Math Methods Med* 2022; 2022: 5636844.
- [2] 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.
- [3] Hao J, Ding X L, Yang X, et al. Prunella vulgaris polysaccharide inhibits growth and migration of breast carcinoma-associated fibroblasts by suppressing expression of basic fibroblast growth factor [J]. *Chin J Integr Med* 2020; 26(4): 270-6.
- [4] Wang M, Ma C, Chen Y, et al. Cytotoxic neo-clerodane diterpenoids from *scutellaria barbata* D. Don [J]. *Chem Biodivers* 2019; 16(2): e1800499.
- [5] 方丽,朱晓丹,鲍静,等.中药饮片治疗乳腺癌的用药规律 [J]. *世界中医药* 2022; 17(12): 1765-8.
- [6] 蒋多晨,金乐,陈洪晓,等.槲皮素通过靶向 GAS5/Notch1 信号通路促进乳腺癌细胞凋亡的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2021; 37(5): 637-44.
- [7] 董青,董雪燕,李忠,等.基于中医古籍探索乳腺癌认知源流 [J]. *北京中医药* 2019; 38(4): 355-9.
- [8] Elumalai P, Ezhilarasan D, Raghunandhakumar S. Quercetin inhibits the epithelial to mesenchymal transition through suppressing akt mediated nuclear translocation of beta-catenin in lung cancer cell line [J]. *Nutr Cancer* 2022; 74(5): 1894-906.
- [9] Chen Z, Pan T, Jiang D, et al. The lncRNA-GAS5/miR-221-3p/DKK2 axis modulates ABCB1-mediated adriamycin resistance of breast cancer via the wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020; 19: 1434-48.
- [10] Herzog S K, Fuqua S. ESR1 mutations and therapeutic resistance in metastatic breast cancer: progress and remaining challenges [J]. *Br J Cancer* 2022; 126(2): 174-86.
- [11] Zhou M, Liu X, Li Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells [J]. *Int J Cancer* 2018; 143(4): 921-30.
- [12] Baluapuri A, Wolf E, Eilers M. Target gene-independent functions of myc oncoproteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(5): 255-67.
- [13] Hinz N, Jucker M. Distinct functions of akt isoforms in breast cancer: A comprehensive review [J]. *Cell Commun Signal* 2019; 17

(1): 154.

- 403.

[14] Kim J Y, Park C S, Jang S K, et al. The significance of p-akt1 as a prognostic marker and therapeutic target in patients with hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor-2-positive early breast cancer[J]. *J Breast Cancer* 2022 25(5): 387

[15] Wang J, Wang H, Peters M, et al. Loss of fbw7 synergizes with activated akt signaling to promote c-myc dependent cholangiocarcinogenesis[J]. *J Hepatol* 2019 71(4): 742-52.

The effect and mechanism of *Prunella vulgaris*-*Scutellaria barbata* herb pairs in the treatment of breast cancer by integrating network pharmacology and *in vitro* experiments

Liu Su^{1,2}, Chen Hongxiao², Jin Le², Zhang Huihui³, Zhang Lei², Chen Zhaolin^{1,2}

[¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of USTC (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001; ³Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032]

Abstract *Objective* To explore the mechanism of *Prunella vulgaris* and *Scutellaria barbata* herb pair against breast cancer based on network pharmacology and *in vitro* cell experiments. *Methods* The effective components and targets of *Prunella vulgaris* and *Scutellaria barbata* herb pair were screened. GeneCards and OMIM databases were used to find breast cancer targets, and then drug-active ingredient-key target network and protein-protein interaction (PPI) were constructed. R language was used to perform GO function and KEGG pathway enrichment analysis and survival analysis. Then the screened active components and core targets were verified by molecular docking. Cell viability was detected by CCK-8 assay. EdU and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. The protein expression levels of p-AKT1, AKT1, β -catenin and c-MYC were detected by Western blot. *Results* Through databases analysis, a total of 36 active components and 105 intersection targets were screened out, the core components were quercetin, luteolin, kaempferol, wogonin and baicalein. Through PPI and survival analysis, the key targets were AKT1, ESR1, CASP3 and MYC. GO analysis contained 4 303 enrichment results, KEGG analysis contained 232 pathways. Molecular docking showed that the core components had strong binding ability with the key targets. Cell experiments showed that the core active ingredient quercetin could inhibit the proliferation of breast cancer cells and promote their apoptosis ($P < 0.05$) and down-regulate the expression levels of p-AKT1, β -catenin and c-MYC proteins ($P < 0.05$). *Conclusion* The active components quercetin in *Prunella vulgaris* and *Scutellaria barbata* herb pair may play a role through AKT1/ β -catenin signaling pathway, which provides a scientific reference for the study of its mechanism of action in the treatment of breast cancer.

Key words network pharmacology; *Prunella vulgaris*; *Scutellaria barbata*; molecular docking; cell experiments; mechanism of action