·实验研究·

基于生物利用度－肠道代谢差异－多靶点整合分析哈巴苷抗乳腺癌的作用机制*

苏思佳，周静娜，高俊峰，唐旭，肖婷婷，温彬宇✉

北京中医药大学东方医院，北京 100078

摘要：目的：基于生物利用度、肠道菌群代谢产物、网络药理学及分子对接探讨哈巴苷抗乳腺癌的作用机制。方法：将 66 只雌性 Balb/c 小鼠随机分为哈巴苷灌胃组（10 mg·kg^{-1}）和尾静脉注射组（2 mg·kg^{-1}），采集不同时间点血浆，采用 UPLC－MS/MS 法测定血药浓度，基于非房室模型以统计矩方法计算药物动力学参数，得出绝对生物利用度。将 10 只雌性 Balb/c 小鼠随机分为正常组和乳腺癌组，收集新鲜粪便，孵育肠道菌群，以 0.064 g·L^{-1}哈巴苷进行干预，采用 UPLC－Q－TOF－MS 法结合 UNIFI 软件分析代谢产物。通过 Swiss Target Prediction、GeneCards 等数据库检索哈巴苷、代谢产物及乳腺癌的靶点，Cytoscape 3.9.1 软件进行网络拓扑学分析，从而筛选关键靶点。利用 DAVID 数据库进行 KEGG 通路分析，AutoDock Vina 1.5.7 软件进行分子对接验证。结果：（1）方法学验证：稳定性、精密度、专属性、基质效应、线性、回收率等均符合要求。（2）哈巴苷在 Balb/c 小鼠中绝对生物利用度为 14.83%。（3）体外肠道菌群孵育代谢产物鉴定：正常组与乳腺癌组均鉴定到原型成分，分别鉴定出 15 个和 12 个代谢产物，4 个代谢产物相同；代谢产物涉及氧化、脱水、乙酰化及葡糖醛酸化等反应。（4）网络药理学分析：哈巴苷及其代谢产物抗乳腺癌关键靶点 15 个，包括表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、蛋白激酶 B1（protein kinase B1，AKT1）等；KEGG 通路主要富集于 MAPK、EGFR 等信号通路。（5）分子对接：含哈巴苷在内的 24 个潜在活性成分与关键靶点结合良好（结合能 < －5.0 kcal·mol^{-1}）。结论：哈巴苷生物利用度低，在体外肠道菌群孵育液中被代谢为多个代谢产物，包括水解还原代谢产物等，这些差异代谢产物可能具有潜在抗乳腺癌活性。

关键词：哈巴苷；乳腺癌；生物利用度；肠道菌群代谢；网络药理学；小鼠

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.07.225

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2026）07－1522－09

Mechanism Analysis of Anti－Breast Cancer Effect of Harpagide Based on Bioavailability－Gut Metabolism Differences－Multi－Target Integratiion

SU Sijia，ZHOU Jingna，GAO Junfeng，TANG Xu，XIAO Tingting，WEN Binyu

Dongfang Hospital，Beijing University of Chinese Medicine，Beijing China 100078

Abstract：Objective：To explore the mechanism of harpagide′s anti－breast cancer effect based on bioavailability，gut microbiota metabolites，network pharmacology，and molecular docking. Methods：Sixty－six female Balb/c mice were randomly divided into a hesperidin oral gavage group（10 mg·kg^{-1}）and a tail vein injection group（2 mg·kg^{-1}）. Plasma was collected at different time points，and drug concentrations were measured using UPLC－MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated using the non－compartmental

*基金项目：中央高水平中医医院临床科研业务费资助项目（DFGZRB－2024GJRC018）；北京市中医药科技发展资金项目（JJ－2020－39）

作者简介：苏思佳（2001－），女，四川眉山人，硕士研究生，研究方向：中药药效物质及作用机制研究。

✉通信作者：温彬宇，医学博士，副研究员，硕士研究生导师，研究方向：中药药效物质及作用机制研究。E－mail：wen－binyu@163.com

model and statistical moment method, yielding absolute bioavailability. Ten female Balb/c mice were randomly divided into a normal group and a breast cancer group. Fresh feces were collected and incubated with gut microbiota and intervened with 0.064 g · L^{-1} hesperidin. Metabolites were analyzed using UPLC – Q – TOF – MS combined with UNIFI software. Targets of hesperidin, its metabolites, and breast cancer were retrieved from databases such as Swiss Target Prediction and GeneCards, and network topology analysis was performed using Cytoscape 3.9.1 to screen key targets. KEGG pathway analysis was conducted using the DAVID database, and molecular docking validation was performed with AutoDock Vina 1.5.7. Results: (1) Methodological validation: Stability, precision, specificity, matrix effect, linearity, recovery, etc., all met the requirements. (2) Absolute bioavailability of harpagide in Balb/c mice was 14.83%. (3) Identification of in vitro gut microbiota incubation metabolites: Both the normal group and the breast cancer group identified the prototype compound, with 15 and 12 metabolites identified respectively, 4 of which were identical; the metabolites involved reactions such as oxidation, dehydration, acetylation, and glucuronidation. (4) Network pharmacology analysis: harpagide and its metabolites had 15 key anti – breast cancer targets, including epidermal growth factor receptor (EGFR), protein kinase B1 (AKT1), etc.; KEGG pathways were mainly enriched in MAPK, EGFR, and other signaling pathways. (5) Molecular docking: 24 potential active compounds including harpagide showed good binding with key targets (binding energy < –5.0 kcal · mol^{-1}). Conclusion: Harpagide has low bioavailability and is metabolized into multiple metabolites in in vitro gut microbiota incubation, including hydrolytic and reduction metabolites, which may have potential anti – breast cancer activity.

Key words: harpagide; breast cancer; bioavailability; gut microbiota metabolism; network pharmacology; mouse

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤。全球癌症统计数据显示，乳腺癌新发病例占所有新发癌症病例的 11.6%[1]。目前，乳腺癌临床常规治疗方式包括手术切除、放射治疗、化学药物治疗及分子靶向治疗等[2]。这些治疗方式虽可有效降低肿瘤负荷，但仍可能导致患者免疫功能受损及药物心脏毒性等诸多不良反应[3]。天然产物来源的小分子物质被认为是理想的抗癌用药，美国食品药品监督管理局批准的抗肿瘤临床用药中近 60% 源于植物，如阿霉素、紫杉醇和长春碱等[4]。基于其毒性低、疗效显著且易获得等优势，天然产物已成为药物开发的重要来源[5]。

筋骨草性寒味苦，具有清热解毒、凉血消肿等功效，在消癌解毒方中作为君药发挥抗乳腺癌作用[6]。研究表明，筋骨草提取物对乳腺癌细胞增殖及其转移过程具有显著抑制作用，其核心药效物质基础为总环烯醚萜类化合物[7]。筋骨草主要活性成分为乙酰哈巴苷和哈巴苷，两者占环烯醚萜提取物平均质量分数的 88% 以上[8]。乙酰哈巴苷已被证实具有抗乳腺癌作用，且本课题组前期发现该成分能够被肠道菌群代谢为关键代谢产物，并通过抑制 AKT/NF – κB/MMP – 9 信号轴相关蛋白的表达发挥抗乳腺癌作用[9]。值得注意的是，乙酰哈巴苷生物利用度低[10]，而乙酰哈巴苷和哈巴苷在化学结构上仅存在一个乙酰基的差异，且前期代谢研究表明乙酰哈巴苷能够被代谢成哈巴苷[11]。因此，哈巴苷是否通过类似代谢途径转化产生具有抗乳腺癌活性的代谢产物，目前尚缺乏系统性研究证据。

基于此，本研究首先采用 UPLC – MS/MS 法探究哈巴苷在小鼠体内的生物利用度；其次，采用高分辨质谱研究哈巴苷在乳腺癌小鼠体内的代谢产物及其代谢途径，并与正常小鼠体内的代谢过程进行比较；最后通过网络药理学与分子对接验证其抗乳腺癌的通路与靶点，以期为阐明哈巴苷抗乳腺癌的作用机制提供科学依据。

1　材料

1.1　动物　雌性 Balb/c 小鼠 76 只，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（京）2021 – 0011。动物饲养于北京中医药大学东方医院 SPF 级动物中心，温度 23 ~ 25 ℃，相对湿度（50 ± 10）%，12 h/12 h 明暗交替，自由进食饮水。本研究经北京中医药大学东方医院动物伦理委员会批准，伦理批号：DFYY20241022M。

1.2　药物和试剂　哈巴苷（成都曼思特生物科技有限公司，批号：MUST – 24071010）；山栀苷甲酯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，批号：C2306457）；维生素 K1 溶液、GAM 培养基、氯化血红素（青岛海博生物科技有限公司，批号：2100501、HB8518 – 1、2100500）；无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司，批号：10009268）；氢氧化钠（天津市大茂化学试剂厂）；质谱级甲醇、甲酸、乙腈（赛默飞世尔科技有限公司）。

1.3　仪器　Shimadzu LCMS – 8045CL 串联质谱仪、LC – 40D CL 溶剂管理系统（日本岛津公司）；Waters Acquity UPLC 型超高效液相色谱仪、Waters Synapt G2 型四极杆飞行时间质谱仪（美国 Waters 公司）；

Sartorius BP121S 型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);5427R 型高速冷冻离心机(德国艾本德股份公司);JM80 低温冷阱、Auto R1 自动化样本处理仪(北京吉艾姆科技有限公司)。

2　方法

2.1　哈巴苷绝对生物利用度检测

2.1.1　色谱条件　色谱柱:ACQUITY UPLC ® HSS T3 色谱柱(100.0 mm × 2.1 mm,1.8 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液(含 2 mmol · L^{-1} 乙酸铵)(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0—1 min,5% B→95% B;1—2.5 min,95% B;2.5—2.6 min,95% B→5% B;2.6—5.0 min,5% B;流速:0.4 mL · min^{-1};柱温:45 ℃;进样体积:1 μL。

2.1.2　质谱条件　离子模式:ESI^+;检测方式:多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM);雾化气流速:3.0 L · min^{-1};干燥气流速:5.0 L · min^{-1};加热气流速:15.0 L · min^{-1};脱溶剂管温度:150 ℃;加热模块温度:400 ℃;离子源温度:300 ℃。哈巴苷及其内标 MRM 参数见表 1。

表 1　哈巴苷及其内标 MRM 参数

名称	母离子/m/z	子离子/m/z	Q1 预偏置电压(*U*/V)	碰撞能量(*U*/V)	Q3 预偏置电压(*U*/V)
哈巴苷	382.2	167.1	-15	-18	-30
山栀苷甲酯	429.1	267.2	-12	-24	-10

2.1.3　溶液配制　对照品溶液配制:精密称取适量哈巴苷对照品,加入适量甲醇溶解,配成质量浓度为 0.1 g · L^{-1} 的哈巴苷储备液。将储备液用甲醇依次稀释,得到质量浓度为 1、5、10、50、100、500、1 000、3 000、5 000 μg · L^{-1} 的哈巴苷对照品溶液,-20 ℃保存,备用。

内标溶液配制:精密称取适量山栀苷甲酯,用甲醇配制成质量浓度为 270 μg · L^{-1} 的内标溶液,-20 ℃保存,备用。

2.1.4　动物分组与干预　66 只雌性 Balb/c 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为哈巴苷灌胃组(10 mg · kg^{-1})和尾静脉注射组(2 mg · kg^{-1}),每组 33 只。两组小鼠禁食 12 h 后,灌胃或注射相应剂量哈巴苷溶液,12 h 后恢复进食,其间自由饮水,分别于给药前及给药后 0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24 h 经目内眦取血,置于肝素化离心试管中,4 ℃、4 000 r · min^{-1} 离心 10 min,分离血浆,-80 ℃保存待测。

2.1.5　血浆样品处理　对照品血浆制备:取 100 μL 小鼠空白血浆(两组小鼠给药前血浆),分别加入 100 μL 不同浓度哈巴苷对照品溶液及 300 μL 山栀苷甲酯内标溶液,涡旋混匀 20 min,4 ℃、13 000 r · min^{-1} 离心 15 min,取上清液至干净 EP 管中,40 ℃氮气流下吹干,加入 100 μL 乙腈复溶,涡旋混匀 20 min,4 ℃、13 000 r · min^{-1} 离心15 min,取上清液置进样瓶,待测。

给药血浆处理:取 100 μL 小鼠给药后血浆,加入 300 μL 山栀苷甲酯内标溶液,涡旋混匀 20 min,4 ℃、13 000 r · min^{-1} 离心 15 min,取上清液至干净 EP 管中,40 ℃氮气流下吹干,加入 100 μL 乙腈复溶,涡旋混匀 20 min,4 ℃、13 000 r · min^{-1} 离心 15 min,取上清液置进样瓶,待测。

2.1.6　分析方法验证　稳定性考察:将对照品血浆在 4 ℃下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 后分别进样,考察静置稳定性,分别测定 6 次;将对照品血浆于 -80 ℃冻融循环 3 次,分别进样,考察冻融稳定性,分别测定 6 次。

专属性考察:对小鼠空白血浆、对照品血浆、给药血浆分别进样分析,检验方法专属性。

基质效应考察:取小鼠空白血浆 100 μL,配制成低、中、高浓度哈巴苷质控溶液(1、500、5 000 μg · L^{-1})作为基质溶液;将 10 μL 低、中、高浓度对照品溶液(1、500、5 000 μg · L^{-1})与 10 μL 内标溶液、480 μL 甲醇混匀作为无基质溶液;每份溶液平行测定 6 次,根据峰面积计算 RSD,以基质溶液与无基质溶液响应值的比值评价基质效应。

精密度考察:对低、中、高浓度哈巴苷溶液(1、500、5 000 μg · L^{-1})分别测定 6 次,根据峰面积计算批内精密度;各浓度平行配制 5 份溶液进样分析,根据峰面积计算批间精密度。

线性关系考察:以哈巴苷浓度 X(mg · L^{-1})为横坐标,样品与内标峰面积比值 Y 为纵坐标,进行加权线性回归。以绝对进样量 3 倍于信噪比的比值为检测限,以绝对进样量 10 倍于信噪比的比值为定量限,对样品进行定量检测。

回收率考察:向给药血浆中加入已知浓度对照品溶液,进样分析,计算回收率。

2.1.7　绝对生物利用度计算　基于非房室模型理论框架,以统计矩方法计算药物动力学参数。以小鼠静脉注射哈巴苷(2 mg · kg^{-1})后血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{0-\infty}$ 为参比,计算灌胃哈巴苷

（10 mg · kg^{-1}）后哈巴苷入血的绝对生物利用度，计算公式如下。

$$F_{absolute}(\%) = \frac{AUC_{0-\infty(i.g.)} \times Dose_{i.v.}}{AUC_{0-\infty(i.v.)} \times Dose_{i.p.}} \times 100\%$$

式中，$AUC_{0-\infty(i.g.)}$表示灌胃后药物从开始至所有原形药物全部消除的血药浓度－时间曲线下面积；$AUC_{0-\infty(i.v.)}$表示静脉注射后药物从开始至所有原形药物全部消除的血药浓度－时间曲线下面积；$Dose_{i.g.}$表示灌胃剂量；$Dose_{i.v.}$表示静脉注射剂量。

2.2　哈巴苷体外肠道菌群代谢产物比较分析

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Waters ACQUITY UPLC ® HSS T3 色谱柱（100.0 mm × 2.1 mm，1.8 μm）；流动相：0.1% 甲酸乙腈溶液（A）－0.1% 甲酸水溶液（B）；梯度洗脱：0—24 min，5% ~ 60% A；24—36 min，60% ~ 100% A；36—40 min，100% A；40—41 min，100% ~ 5% A；41—45 min，5% A；流速：0.3 mL · min^{-1}，进样量：5 μL，柱温：40 ℃，样品室温度 15 ℃。

2.2.2　质谱条件　电喷雾离子源（ESI），正、负离子模式检测，MS^E 模式扫描，毛细管电压 3 kV，锥孔电压 40 V，碰撞能 10 ~ 80 V，离子源温度 120 ℃，锥孔气流速 50 L · h^{-1}，脱溶剂气流速 800 L · h^{-1}，扫描范围 m/z 50 ~ 1 500。正离子模式检测电压 3 375 V，脱溶剂温度 500 ℃；负离子模式检测电压 3 000 V，脱溶剂温度 400 ℃。亮氨酸脑啡肽：m/z 556.277 1$[M+H]^+$，m/z 554.261 5$[M-H]^-$作为校对液，采集并校对。

2.2.3　动物分组与粪便收集　雌性 Balb/c 小鼠 10 只，适应性饲养 1 周后，随机分为正常组和乳腺癌组。将含 1 × 10^6 mL^{-1} 4T1 细胞的 PBS－基质胶混合溶液接种于小鼠右侧腋窝皮下，观察接种小鼠情况，若 1 周内出现直径 2 ~ 4 mm 的结节性肿瘤视为建模成功。建模成功次日收集正常组和乳腺癌组小鼠的新鲜粪便，用于体外孵育培养。

2.2.4　肠道菌群孵育　取 4.9 g GAM 培养基溶于 100 mL 水中，121 ℃高压灭菌 15 min，冷却至室温，加入无菌 0.1% 维生素 K1 溶液与 5 g · L^{-1}氯化血红素溶液各 0.1 mL，混合备用。将两组小鼠新鲜粪便与生理盐水（1 ∶ 4）混合，涡旋振荡后 37 ℃、2 000 r · min^{-1} 离心 10 min 取上清，加入 GAM 培养基混匀，37 ℃厌氧恒温振荡培养 24 h，制备肠道菌群培养液。两组分别加入 0.064 g · L^{-1}哈巴苷溶液 0.1 mL，于 37 ℃厌氧条件下恒温振荡孵育，于加入哈巴苷后 0、2、4、24 h 取样 600 μL（每个时间点取 3 份样品）。每份样品加入甲醇溶液 600 μL，涡旋振荡后离心 15 min（13 000 r · min^{-1}，4 °C），取上清。分别取 2、4、24 h 上清液 200 μL 混合，37 ℃氮吹浓缩。每份样品用 100 μL 甲醇复溶，涡旋振荡后离心 15 min（13 000 r · min^{-1}，4 ℃），取上清液 80 μL，采用 UPLC－Q－TOF－MS 技术进行检测。

2.2.5　代谢产物鉴定　采集肠道菌群孵育样品的质谱数据，采用 MassLynx 4.1 软件进行预处理，结合 UNIFI 软件进行分析。设定目标筛选参数、特定分析设置及哈巴苷可能的转化途径，包括Ⅰ相代谢和Ⅱ相代谢途径，通过质谱碎片离子和精确质量数对相应的化合物进行过滤、筛选和鉴定。

2.3　哈巴苷及其代谢产物的网络药理学及分子对接分析

2.3.1　关键靶点筛选　通过 Swiss Target Prediction 数据库（http://swisstargetprediction.ch/）、PharmMapper 数据库（https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html）、Similarity ensemble approach（https://sea.bkslab.org/search）数据库预测哈巴苷及其代谢产物的靶点，合并删除重复项。以“breast cancer”为关键词，挖掘 GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMMI（https://www.omim.org/）、TTD（https://db.idrblab.net/ttd/）和 CTD（https://ctdbase.org/）数据库中乳腺癌的靶点信息，合并删除重复项。将哈巴苷及其代谢产物靶点与乳腺癌靶点输入 Venny 2.1.0，取交集靶点，导入 STRING 数据库（https://cn.string-db.org/），物种选择“Homo sapiens”，置信度得分设置为≥0.7，隐藏游离靶点，构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络拓扑学分析，利用 CytoNCA 插件计算连接度中心度（degree centrality，DC）、紧密度中心性（closeness centrality，CC）、介度中心度（betweenness centrality，BC）及特征向量中心性（eigenvector centrality，EC），以 DC、CC、BC、EC 大于各自中位数为筛选标准，获得关键靶点。

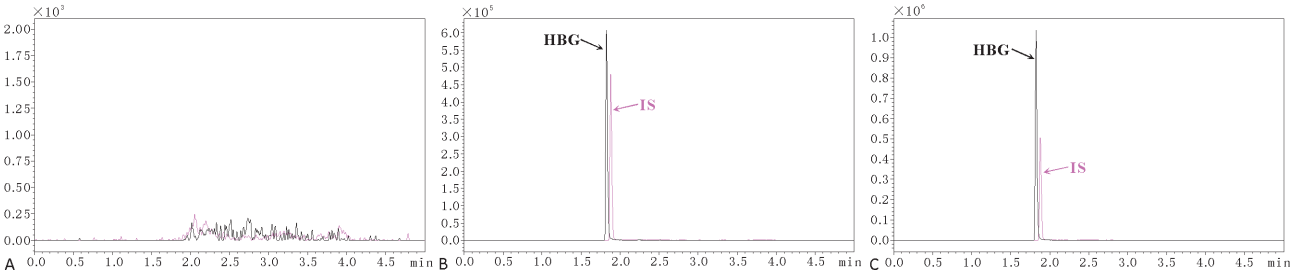
2.3.2　基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析　将交集靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 通路分析，运用微生信平台（https://www.bioinformatics.com.cn/）实现数据可视化。其中，GO 分析包括生物过程（biological process，BP）、分子功能（molecular function，MF）及细胞组分（cellular component，CC）。

2.3.3　分子对接　根据网络药理学拓扑分析结果，选取 15 个关键靶点与 24 个哈巴苷及其代谢产物进行分子对接。从 RCSB 数据库（https://www.rcsb.org/）获取蛋白结构，通过 AutoDock Tools 1.5.7 软件对蛋白质进行去除原始配体和水分子、添加氢原子等处理。将哈巴苷等成分结构导入 Chem 3D 22.0.0 软件进行结构优化，利用 AutoDock Tools 1.5.7 软件对小分子配体进行电荷平衡、可旋转键检查，根据受体活性中心选择对接盒子参数。通过 AutoDock Vina 1.5.7 软件进行分子对接并计算结合能，使用 Hiplot 数据库（https://hiplot.com.cn）进行距离矩阵聚类分析，最后通过 Pymol 软件进行可视化处理。

3　结果

3.1　方法学考察结果　稳定性：哈巴苷静置稳定性检测峰面积为（3 268 591 ± 61 219），RSD = 3.9% < 4%，表明血浆样品在 24 h 内稳定性良好；冻融稳定性检测峰面积为（2 894 216 ± 117 182），RSD 为 4.8% < 5%，表明血浆样品冻融稳定性良好。

专属性：除目标组分外，无其他杂峰及假阳性离子峰的干扰，说明该方法能够准确检测目标成分且无干扰，检测专属性良好，见图 1。



注：A：空白血浆；B：对照品血浆；C：给药血浆；HBG：乙酰哈巴苷；IS：山栀苷甲酯。

图 1　专属性考察结果

基质效应：低、中、高浓度哈巴苷基质溶液的基质效应值分别为 101.6、98.2、99.5，表明基质效应对实验结果的影响较小，符合实验要求；低、中、高浓度哈巴苷基质溶液峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.8%、2.1%，均 <3%，表明实验数据可靠。

精密度：批内精密度检测显示，低、中、高浓度哈巴苷溶液检测峰面积分别为（32 681 ± 1 824）、（7 247 152 ± 190 826）、（63 892 757 ± 2 738 950），峰面积的 RSD 分别为 4.7%、3.8%、3.2%，均 < 6%，表明方法精密度良好。批间精密度检测显示，低、中、高浓度哈巴苷溶液检测峰面积分别为（25 381 ± 1 529）、（5 637 811 ± 128 693）、（72 653 899 ± 1 726 783），峰面积的 RSD 分别为 5.1%、4.4%、3.9%，均 <6%，表明方法精密度良好。

线性关系：线性回归方程为 Y = 0.035 2X − 0.331 1，r = 0.998 8 > 0.998，线性范围为 0.054 1 ~ 52.250 0 mg · L^{-1}，LOD = 0.436 ng，LOQ = 1.12 ng，RSD = 2.5%，表明回归方程相关性良好。

回收率：试验结果见表 2，回收率范围为 96% ~ 102%，表明方法准确度良好。

表 2　回收率考察结果　（$\bar{x} \pm s$）

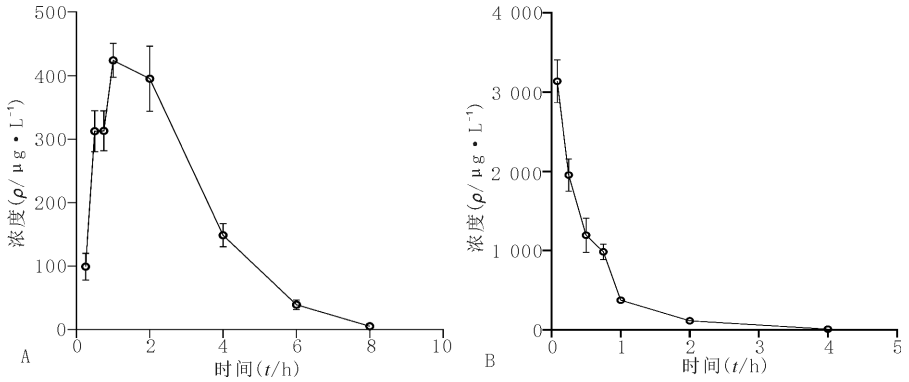
成分	本底量（m/μg）	加入量（m/μg）	实测值（m/μg）	回收率/%	RSD/%
哈巴苷	7.87	5.75	14.58 ± 0.24	98.6	1.3
		8.26	15.31 ± 0.21	96.8	1.7
		6.13	16.16 ± 0.25	101.4	1.4

3.2　绝对生物利用度　采用 UPLC − MS/MS 技术测定小鼠血浆中哈巴苷浓度，药物动力学参数见表 3，血药浓度 − 时间曲线见图 2，经计算得出哈巴苷在 Balb/c 小鼠体内的绝对生物利用度为 14.83%。

表 3　小鼠血浆中哈巴苷药代动力学参数

干预方式	n	C_{max}（ρ/μg · L^{-1}）	T_{max}（t/h）	$T_{1/2}$（t/h）	AUC_{0-t}/h · ng^{-1} · mL^{-1}	$AUC_{0-\infty}$/h · ng^{-1} · mL^{-1}
灌胃	3	464.55	1.41	0.84	1 419.74	1 426.30
静脉注射	3	3 628.15	–	0.51	1 918.54	1 923.28

注：C_{max}（达峰浓度）：给药哈巴苷后达到的最高血药浓度；T_{max}（达峰时间）：给药哈巴苷后达到 C_{max} 所需的时间；$T_{1/2}$（半衰期）：哈巴苷血药浓度下降 50% 所需的时间；AUC_{0-t}（曲线下面积 0 到 t）：从零到最后一个测量时间点的血药浓度 − 时间曲线下面积。

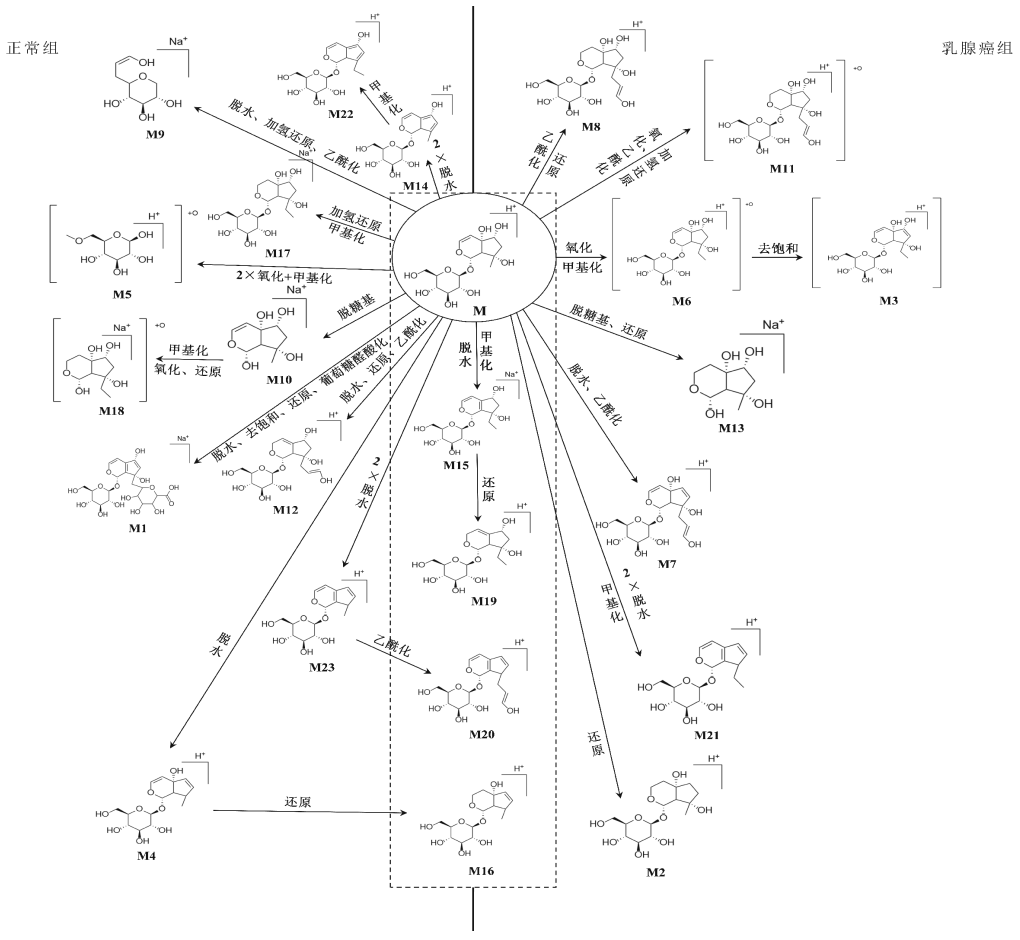


注：A：灌胃；B：静脉注射。

图 2　小鼠血浆中哈巴苷血药浓度－时间曲线图

3.3　体外肠道菌群代谢产物比较分析　采用 UPLC－Q－TOF－MS 技术分析正常组和乳腺癌组小鼠体外肠道菌群孵育液样品。哈巴苷在正离子模式下的离子化响应较好，故对其原型及代谢产物正离子质谱数据进行分析。

将采集到的样本数据导入 UNIFI 软件，导入哈巴苷信息（$C_{15}H_{24}O_{10}$，m/z 364.345）作为母体化合物，参照可能的加合离子，与空白样品对比扣除干扰，根据碎片离子信息、准确度、理论碎片及响应度对代谢产物进行鉴定。结果显示，从正常组和乳腺癌组小鼠样品中均鉴定到原型成分，正常组鉴定出 15 个代谢产物，乳腺癌组鉴定出 12 个代谢产物，两组共有 4 个相同代谢产物（M15、M16、M19、M20）。代谢产物涉及氧化、脱水、乙酰化及葡糖醛酸化等代谢反应，推测代谢途径见图 3。

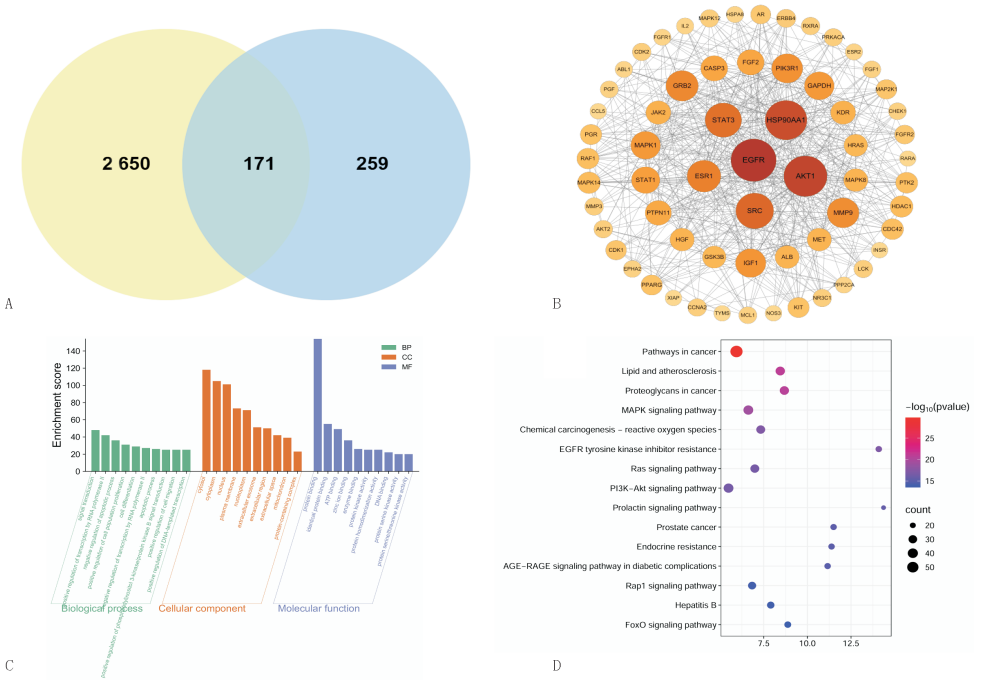


注：虚线框内为两组共有化合物。

图 3　正常组与乳腺癌组小鼠肠道菌群孵育哈巴苷的代谢产物及代谢途径图

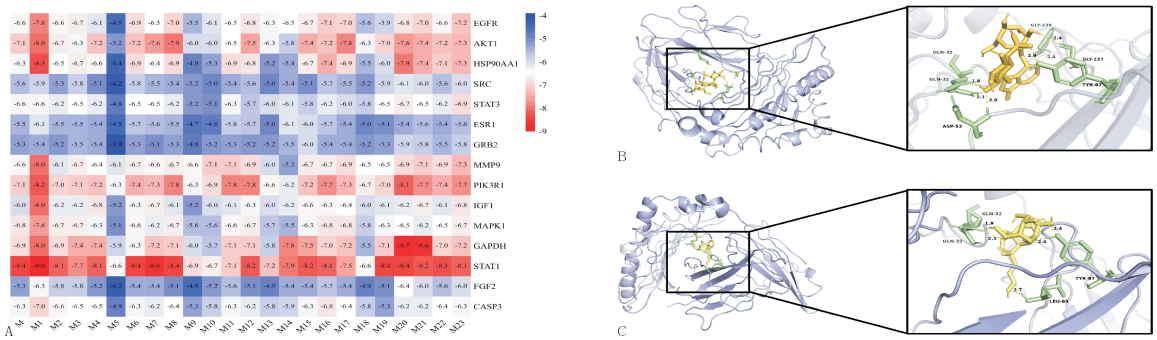
3.4　网络药理学及分子对接结果　哈巴苷及其代谢产物共 430 个靶点，乳腺癌疾病靶点 2 821 个，两者的交集靶点 171 个，见图 4A。PPI 网络图包括 826 条边，平均节点度数为 9.66，平均局部聚类系数为 0.472。根据 DC≥6、EC≥0.020 8、BC≥59.450 4、CC≥0.350 9，筛选出关键靶点 54 个。其中，DC 前 15 位的关键靶点包括表皮生长因子受体（EGFR）、蛋白激酶 B1（AKT1）、热休克蛋白 90α 家族成员 1（HSP90AA1）、原癌基因酪氨酸蛋白激酶（SRC）、信号转导与转录激活因子 3（STAT3）、雌激素受体 1（ESR1）、生长因子受体结合蛋白 2（GRB2）、基质金属蛋白酶 -9（MMP -9）、磷脂酰肌醇 3 - 激酶调节亚基 1（PIK3R1）、胰岛素样生长因子 1（IGF1）、促分裂原活化蛋白激酶 1（MAPK1）、甘油醛 -3 - 磷酸脱氢酶（GAPDH）、信号转导与转录激活因子 1（STAT1）、成纤维细胞生长因子 2（FGF2）、胱天蛋白酶 3（CASP3），见图 4B。

GO 富集分析得到 635 个 BP、67 个 CC 及 213 个 MF。哈巴苷及其代谢产物治疗乳腺癌的 BP 主要涉及信号转导、细胞分化等，MF 主要涉及 RNA 聚合酶Ⅱ等，CC 主要涉及细胞质等，见图 4C。KEGG 富集分析得到 168 条相关通路（$P<0.01$），主要包括 MAPK 信号通路、EGFR 信号通路等，见图 4D。研究表明，结合能 < -5.0 kcal · mol^{-1}（1 kcal = 4.19 kJ）有较好的结合活性[12]，结合能越低构象越稳定，活性成分与靶点结合的可能性越高。分子对接结果显示，95.8% 以上的对接结合能 < -5.0 kcal · mol^{-1}，说明 24 个潜在活性成分与关键靶点结合良好，其中 14 个代谢产物的结合能低于哈巴苷，值得重点关注，见图 5。



注：A：交集靶点韦恩图；B：关键靶点 PPI 网络图；C：GO 分析柱状图；D：KEGG 分析气泡图。

图 4　哈巴苷及其代谢产物抗乳腺癌的网络药理学分析结果



注：A：分子对接结合能聚类热图；B：STAT1 - M1 结合模式图；C：STAT1 - M7 结合模式图。

图 5　哈巴苷及其代谢产物与关键靶点分子对接结果

4　讨论

筋骨草为唇形科植物，具有抗炎、免疫调节及抗肿瘤等药理活性[13]。筋骨草总环烯醚萜提取物能有效地抑制乳腺癌发生发展[14]。哈巴苷作为筋骨草的主要活性成分之一，已被证实具有抗炎等多种药理学作用[15]。本课题组前期研究发现，筋骨草总环烯醚萜提取物抗乳腺癌活性成分之一乙酰哈巴苷在大鼠体内能够被代谢为活性更强的代谢产物[9]。鉴于哈巴苷是乙酰哈巴苷的代谢产物之一，其是否通过类似代谢途径转化产生活性代谢产物尚未可知。本研究首先检测哈巴苷的绝对生物利用度，经过系统性方法学验证后，基于 UPLC－MS/MS 血药浓度分析方法测定哈巴苷在 Balb/c 小鼠体内的绝对生物利用度仅为 14.83%。这一结果证实哈巴苷作为原型成分在体内暴露量低，提示哈巴苷可能通过代谢转化发挥药效。

研究表明，处于病理状态的动物体内微环境发生变化，对药物的代谢也存在影响[16]。乳腺癌患者与健康女性相比，微生物多样性降低，尤其是拟杆菌门和厚壁菌门的比例发生改变[17]。正常与乳腺癌状态下大鼠肠道菌群存在差异，导致代谢途径发生变化[18]。因此，本研究选择体外肠道菌群孵育方法检测代谢产物的差异。代谢产物鉴定结果显示，正常组和乳腺癌组小鼠体外肠道菌群孵育液中均能检测到哈巴苷原型成分，正常组鉴定出 15 个代谢产物，乳腺癌组鉴定出 12 个代谢产物，两组有 4 个相同代谢产物。哈巴苷在正常和乳腺癌小鼠体外肠道菌群孵育后的代谢过程存在显著差异，相较于乳腺癌组，哈巴苷在正常组中多发生脱水反应（M1、M4、M9、M12、M14、M22、M23）。2017 年发表于 Science 的一项研究指出，肠道微生物的外源性转化无法被明确关联到特定的酶或微生物种类[19]。鉴于肠道微环境的高度复杂性，仅依据肠道菌群的差异，不足以推断代谢产物谱的相应变化。

网络药理学结果显示，哈巴苷及其代谢产物抗乳腺癌的潜在靶点 171 个，与 EGFR、AKT1、HSP90AA1、MMP－9 等 15 个关键靶点密切相关[20]。其中，AKT1 是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的关键效应分子，通过磷酸化下游靶点加速细胞周期进程从而促进肿瘤细胞生长，AKT1 与 MMP－9 存在协同调控作用，AKT1 激活可间接上调 MMP－9 表达，增强乳腺癌细胞的侵袭性和化疗耐药性[21]。研究发现，筋骨草总环烯醚萜通过调控 PI3K/AKT 信号通路有效抑制乳腺癌干细胞的自我更新和转移[22]，并通过调节乳腺癌细胞 MMP－9 的表达发挥抗乳腺癌及其转移的作用[23]。乙酰哈巴苷被代谢为关键代谢产物后通过调节 AKT/NF－κB/MMP－9 信号轴发挥抗乳腺癌作用[24]。分子对接结果显示，大多数结合能 $< -5.0\ kcal \cdot mol^{-1}$，说明哈巴苷及其 23 个潜在活性代谢产物与关键靶点结合良好。前期研究发现，乙酰哈巴苷在大鼠体内被代谢为抗乳腺癌活性更强的水解还原性代谢产物（M13），该化合物也存在于口服哈巴苷后的大鼠小肠内[25]。本研究中，乳腺癌组也发现了 M13，且网络药理学结果表明其活性优于哈巴苷，因此该化合物可能具有抗乳腺癌潜力。

综上，哈巴苷生物利用度低，在体外肠道菌群孵育液中被代谢为多个代谢产物，包括水解还原代谢产物等，这些差异代谢产物可能具有潜在抗乳腺癌活性。

参考文献：

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229－263.

[2] Pial M M H, Tomitaka A, Pala N, et al. Implantable devices for the treatment of breast cancer[J]. J Nanotheranostics, 2022, 3(1): 19－38.

[3] Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast cancer treatments: updates and new challenges[J]. J Pers Med, 2021, 11(8): 808.

[4] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629－661.

[5] Ahmad B, Tian C, Tang J X, et al. Anticancer activities of natural abietic acid[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1392203.

[6] 赵鑫宇，钱嘉惠，高俊峰，等. 筋骨草属植物药理学活性及药代动力学研究进展[J]. 北京中医药，2023，42(4)：458－462.

[7] Peng B, He R, Xu Q H, et al. Correlation between antimetastatic action of Ajuga decumbens and expression of MMPs

and TIMPs[J]. China J Chin Mater Med,2011,36(24):3511 - 3514.

[8]温彬宇,李建荣. HPLC - ELSD 同时测定筋骨草药材中乙酰哈巴苷和哈巴苷含量[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(7):89 - 91,92.

[9]Zhao X Y,Su S J,Zhou J N,et al. Metabolism and excretion of 8 - O - acetylharpagide in rats and identification of its potential anti - breast cancer active metabolites[J]. Drug Des Devel Ther,2025,19:2795 - 2815.

[10]Shen X W,Chen C,Wen C C,et al. A newly developed UPLC - MS/MS method for simultaneous quantitative analysis of ajuforrestin A,ajuforrestin B,ajugamacrin and 8 - O - acetylharpagide derived from Ajuga plants in mice blood and the in vivo pharmacokinetics[J]. Drug Dev Ind Pharm,2024,50(4):354 - 362.

[11]Wen B Y,Li J R. Pharmacokinetics of 8 - O - acetylharpagide and harpagide after oral administration of Ajuga decumbens extract in beagle dog[J]. China J Chin Mater Med,2013,38(12):2015 - 2018.

[12]Hsin K Y,Ghosh S,Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. PLoS One,2013,8(12):e83922.

[13]王晶晶. 筋骨草和茯苓配伍抑制乳腺癌侵袭转移及作用机制研究[D]. 大连:辽宁师范大学,2017.

[14]彭博,杨依霏,王晶晶,等. 筋骨草总环烯醚萜对三阴性乳腺癌转移的抑制作用及其机制研究[J]. 中国药学杂志,2017,52(21):1903 - 1908.

[15]冷婧,郭彦青,杨鹏,等. 哈巴苷对心梗后心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及心室重构的影响[J]. 中药材,2023,46(12):3127 - 3130.

[16]Yang L,Liang J,Zheng Q,et al. A comparative study of serum pharmacochemistry of Kai - Xin - San in normal and AD rats using UPLC - LTQ - orbitrap - MS[J]. Pharmaceuticals (Basel),2022,16(1):30.

[17]Bobin - Dubigeon C,Luu H T,Leuillet S,et al. Faecal microbiota composition varies between patients with breast cancer and healthy women: a comparative case - control study[J]. Nutrients,2021,13(8):2705.

[18]Qian J H,Zhao X Y,Yuan S Y,et al. Metabolome - microbiome insights into therapeutic impact of 8 - O - acetylharpagide against breast cancer in a murine model[J]. Biomed Chromatogr,2024,38(7):e5880.

[19]Koppel N,Maini Rekdal V,Balskus E P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota[J]. Science,2017,356(6344):eaag2770.

[20]Zhou J,Tu D Y,Peng R,et al. RNF173 suppresses RAF/MEK/ERK signaling to regulate invasion and metastasis via GRB2 ubiquitination in Hepatocellular Carcinoma[J]. Cell Commun Signal,2023,21(1):224.

[21]Hinz N,Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review[J]. Cell Commun Signal,2019,17(1):154.

[22]彭博,贺蓉,韩靖雅,等. 筋骨草总环烯醚萜对乳腺癌干细胞特性的干预作用及其机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):94 - 99.

[23]彭博,贺蓉,徐启华,等. 筋骨草提取物抑制乳腺癌转移与 MMPs 和 TIMPs 表达的关系研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(24):3511 - 3514.

[24]王建湘,沈浮,杨雷. 基于单细胞测序技术探讨柴胡清肝汤干预三阴性乳腺癌免疫微环境潜在分子机制[J]. 中医学报,2024,39(6):1301 - 1313.

[25]刘震,徐风,王静哲,等. 哈巴苷在大鼠体内代谢产物的鉴定与分析[J]. 中国药房,2017,28(10):1310 - 1315.

收稿日期:2026 - 02 - 12
编辑:刘凯歌