

整合网络药理学与体外实验探究香石竹醇提取物抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的潜在机制

康诗瑶^{1#} 邓旭明^{1#} 李慧敏¹ 汤煜恒¹ 李明¹ 唐文如¹ 周旭红^{2*} 盛苗苗^{1*}
(¹昆明理工大学医学院, 衰老与肿瘤分子遗传学实验室, 昆明 650500; ²云南中医药大学, 科学技术处, 昆明 650205)

摘要 三阴性乳腺癌(TNBC)因缺乏雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体2表达, 呈现高侵袭性、治疗选择有限及预后不良等特征。香石竹虽具抗癌潜力, 但其抗TNBC机制尚未被系统阐明。该研究整合网络药理学-分子对接-体外验证策略, 探究香石竹醇提取物抗TNBC的作用机制。通过HPLC-MS鉴定香石竹中883种次级代谢产物, 经CTD数据库筛选得140种生物活性成分; 结合GeneCards和OMIM数据库的TNBC相关靶点交叉分析, 确定82个潜在治疗靶点。GO和KEGG通路分析显示, 氧化应激水平、PI3K/AKT和FoxO信号通路是香石竹发挥抗TNBC作用的关键调控轴。基于STRING数据库构建PPI网络, 筛选出10个核心靶基因并建立预后风险模型; 分子对接显示, 香石竹的主要活性成分(如白桦脂酸、山奈酚等)与核心靶基因具有显著结合活性。进一步体外实验显示香石竹醇提取物可显著抑制MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞的增殖, 且抑制效果呈浓度和时间依赖性; 此外香石竹醇提取物还能显著升高细胞内活性氧水平; 下调PI3K/AKT和FoxO信号通路关键蛋白表达, 上述结果与网络药理学和分子对接的分析预测一致。综上, 该研究通过“成分-靶点-通路-实验”多维度验证, 阐明香石竹醇提取物通过调控氧化应激及PI3K/AKT-FoxO信号轴发挥抗TNBC作用, 为其作为TNBC辅助治疗药物的开发提供了理论基础和实验依据。

关键词 香石竹; 三阴性乳腺癌; 网络药理学; 信号通路; 分子机制

Integrating Network Pharmacology and *in Vitro* Experiments to Explore the Potential Mechanisms of *Dianthus Caryophyllus* Methanolic Extract in Inhibiting the Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer Cells

KANG Shiyao^{1#}, DENG Xuming^{1#}, LI Huimin¹, TANG Yuheng¹, LI Ming¹, TANG Wenru¹,
ZHOU Xuhong^{2*}, SHENG Miaomiao^{1*}

(¹Laboratory of Molecular Genetics of Aging & Tumor, Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; ²Office of Science and Technology, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650205, China)

Abstract TNBC (triple-negative breast cancer), characterized by the absence of ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), and human HER2 (epidermal growth factor receptor 2) expression, exhibits high ag-

收稿日期: 2025-04-27 接受日期: 2025-08-19

云南省高层次人才支持计划(批准号: YNWR-QNBJ-2020-243)、中央引导地方科技发展专项资金项目(批准号: 202207AB110015)和云南省高校医用食用花卉创新团队(批准号: 2020YGC01)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者。Tel: 13888718329, E-mail: zhouxuhong7801@126.com; Tel: 0871-65920753, E-mail: shengmm@kust.edu.cn

Received: April 27, 2025 Accepted: August 19, 2025

This work was supported by the Yunnan Provincial High-level Talent Training Support Program (Grant No. YNWR-QNBJ-2020-243), the Central Government Guides Local Science and Technology Development Fund Project (Grant No. 202207AB110015), and the Yunnan Provincial University Initiative for Research Innovation Team of Medicinal and Edible Flowers (Grant No. 2020YGC01)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-13888718329, E-mail: zhouxuhong7801@126.com; Tel: +86-871-65920753, E-mail: shengmm@kust.edu.cn

gressiveness, limited therapeutic options, and poor prognosis. Although *Dianthus caryophyllus L.* possesses anticancer potential, its anti-TNBC mechanisms remain incompletely elucidated. This study integrated network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* validation to investigate the mechanism of carnation methanolic extract against TNBC. A total of 883 secondary metabolites were identified in carnation using HPLC-MS, and 140 bioactive components were selected through the CTD (comparative toxicogenomics database). By intersecting TNBC-related targets from GeneCards and OMIM databases, 82 potential therapeutic targets were identified. GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analyses revealed that oxidative stress levels and the PI3K/AKT and FoxO signaling pathways were key regulatory axes for the anticancer effects of carnation against TNBC. Based on the STRING database, a PPI network was constructed, 10 core target genes were screened out, and a prognostic risk model was established. Molecular docking showed that the main bioactive components of carnation (e.g., betulinic acid and kaempferol) have significant binding activity with the core target genes. Further *in vitro* experiments demonstrated that the carnation methanolic extract significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in a concentration- and time-dependent manner. Additionally, it significantly increased intracellular ROS levels and downregulated the expression of key proteins in the PI3K/AKT and FoxO signaling pathways. These results are consistent with the predictions from network pharmacology and molecular docking analyses. In summary, through a multidimensional validation of “components-targets-pathways-experiments,” this study elucidated that the carnation methanolic extract exerts anticancer effects against TNBC by modulating oxidative stress and the PI3K/AKT-FoxO signaling axis. These findings provide experimental evidence for the development of carnation as a potential adjuvant therapeutic agent for TNBC.

Keywords carnations; triple-negative breast cancer; network pharmacology; signaling pathway; molecular mechanism

乳腺癌是全球女性健康的首要威胁。据2025年癌症统计数据显示,乳腺癌已超过肺癌成为女性最常见的恶性肿瘤,发病率位列女性恶性肿瘤的第一位(35%),死亡率居女性恶性肿瘤的第二位(14%)^[1]。乳腺癌具有高度异质性,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)约占所有乳腺癌的15%~20%,因缺乏雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)的表达,使其成为临床治疗难点。TNBC的治疗方案有限,预后较差^[2]。目前, TNBC的主要治疗策略仍以手术、放疗、化疗为主^[3], 尽管靶向治疗和免疫治疗提供了部分新选择,但这些疗法或价格高昂,或存在严重副作用^[4], 对于转移性或晚期患者,因个体差异及耐药性问题,仍有相当比例无法从现有方案中获益。因此,深入探索TNBC抗耐药机制,挖掘非肿瘤药物的潜在抗癌作用,对拓展治疗策略具有重要临床意义。

香石竹(*Dianthus caryophyllus L.*)是石竹科石竹属多年生植物,兼具重要观赏价值与药理学研

究潜力^[5]。药理研究表明,其提取物具有抗癌、抗病毒、抗菌、杀虫、驱避、抗氧化、肾保护、麻醉、镇痛等多种生活性。植物化学分析表明,石竹属植物含有三萜、生物碱、香豆素、生氰苷、花青素、天竺葵素、精油、挥发油等多种化学成分^[6]。这些成分为其传统应用提供了物质基础,如香石竹精油可用于愈合伤口、缓解头晕和提高食欲^[7];而且香石竹的精油成分对蚊子幼虫具有显著杀伤作用^[8]。

近年来,香石竹的抗癌机制研究取得显著进展。在结肠癌模型中,从香石竹中分离得到的山奈酚甘油三酯(kaempferide triglycoside)通过非配体结合依赖性雌激素受体激活途径,抑制结肠癌细胞的增殖,并诱导G₀/G₁期阻滞^[9]。同时石竹素(dianthin)在结肠癌异种移植模型中显著抑制肿瘤生长^[10]。在肝癌模型中,石竹乙醇提取物通过HepG2细胞中的线粒体途径激活caspase通路来诱导细胞凋亡^[11]。针对三阴性乳腺癌,香石竹中提取的鼠尾草酸(carnosic acid, CA)可通过调控STAT3信号通路抑制细胞存活,并下调PD-L1表达,增强免疫检查点抑制剂的协

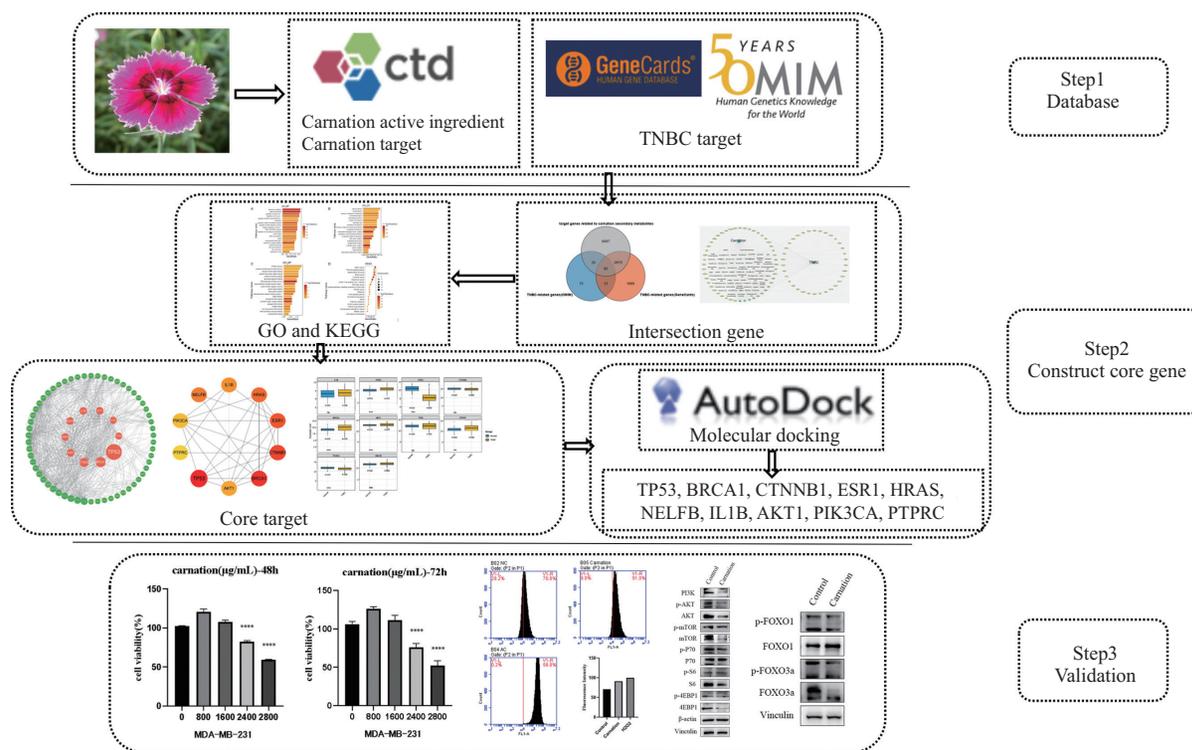


图1 分析工作流程图

Fig.1 Workflow diagram of network pharmacology analysis

同效应^[12-13]。此外,其他成分如黄酮类、多酚类物质则通过调控肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)和表观遗传修饰(如UFM1修饰PD-L1),显著抑制肿瘤转移并增强化疗敏感性^[14-16]。但是香石竹在乳腺癌中的研究报道较少,为进一步研究香石竹在TNBC中的抗癌作用,我们采用网络药理学的方法挖掘香石竹对TNBC的潜在治疗机制。

然而,现有研究存在显著局限:香石竹抗TNBC作用多聚焦于单一成分或特定通路的探索^[12-13],缺乏基于多组分协同效应的系统性活性成分筛选,尤其针对TNBC基底样亚型特有分子网络的调控证据匮乏。为系统解析香石竹抗TNBC的分子机制,本研究利用数据挖掘的方法筛选香石竹对TNBC具有潜在活性的化学成分,并基于网络药理学的方法分析其潜在作用机制。通过整合网络数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,结合基因本体(Gene Ontology, GO)分析和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)信号通路分析,预测香石竹抗TNBC的关键靶点与信号通路。进一步通过分子对接技术验证活性成分与核心靶点的结合活性,并进行体外细胞功能实验,为阐明

香石竹多成分、多靶点、多通路协同抗TNBC的作用机制提供实验依据,以期为临床药物开发提供新思路(图1)。

1 材料和方法

1.1 筛选香石竹的活性成分

通过超高效液相色谱法(ultra-performance liquid chromatography, UPLC)和串联质谱法(tandem mass spectrometry, MS)对香石竹的成分进行了分离和鉴定。利用比较毒物基因组学数据库(comparative toxicogenomics database, CTD)的批量搜索功能,预测了与香石竹所有成分相关的基因,并通过人工筛选排除了氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物以及一些常见的糖类和维生素。

1.2 TNBC相关靶点预测

在GeneCards数据库和OMIM数据库中,以TNBC为检索条件,检索TNBC的相关信息,选择Gifts评分大于20的基因,对两个数据库中的相关基因进行重复比对,得到与TNBC相关的目标基因。

1.3 香石竹和TNBC共同作用靶点筛选与网络构建

首先,通过数据库获得香石竹活性成分的作用

靶点及TNBC的相关靶点, 利用Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index>)工具对两者进行交集分析, 筛选得到82个共同靶基因。这些重叠靶点被认定为香石竹发挥抗TNBC治疗作用的潜在关键靶点, 这一筛选方式不仅有助于提升靶点筛选的精准度, 更能增强研究结果的可靠性。

其次, 利用Cytoscape(<https://cytoscape.org/>, 3.7.1版)构建了“香石竹-活性成分-靶基因-TNBC”网络, 得到了香石竹中与TNBC相关的化合物, 并通过网络图说明了香石竹与活性成分、TNBC与靶基因之间的相互作用。

1.4 GO功能和KEGG信号通路富集分析

GO分析和KEGG信号通路分析使用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)获取相关数据, 并使用R语言读取表格中的数据, 利用R语言中的ClusterProfile数据包对目标信息进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析。GO分析包括三个部分: 生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)^[21]。KEGG是系统分析基因功能和相关高级功能信息的有用资源^[17]。最后, 根据 Q 值(统计校正后的 P 值)对GO功能富集分析和KEGG通路富集分析的结果进行排序, 将结果从小到大排序, 并使用R数据包ggplot2对前20个结果进行可视化处理。

1.5 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络

STRING数据库(<http://string-db.org/>)旨在收集和整合蛋白质之间的相互作用, 包括直接(物理)和间接(功能)相互作用^[18]。我们将82个潜在的目标基因上传到STRING数据库, 并构建了一个PPI网络。将蛋白质种类设为人类, 最低相互作用要求分数设为0.700, 并隐藏自由点以维持PPI网络。将PPI网络数据输入Cytoscape 3.7.1软件, 使用cytoNCA插件分析PPI网络, 并根据Betweenness值选择最相关的目标。在网络中, 一个节点代表一种化合物或一个靶点, 度数越大, 化合物或靶点发挥作用的可能性就越大。

1.6 构建TNBC预后风险模型

本研究基于TCGA数据库中三阴性乳腺癌(TNBC)患者的转录组表达数据与生存信息, 构建了一个基于候选基因的预后风险模型。研究选取10个目标核心靶基因(*TP53*、*BRCA1*、*BRCA2*、*PTEN*、*MYC*、*EGFR*、*VEGFA*、*CD274*、*ESR1*、*AKT1*)作

为模型构建的基础变量。

首先, 采用Lasso回归(最小绝对收缩和选择算子)对这10个基因进行变量选择。Lasso回归是一种带L1正则化的回归方法, 能够在避免过拟合的同时实现特征筛选。使用R语言中的glmnet包进行建模, 通过交叉验证确定最优惩罚参数 λ , 并进一步选取比 λ_{\min} 更小的 λ 值以获得更多保留变量。结果保留了3个非零系数的基因: *CTNNB1*、*BRCA1*和*PIK3CA*。

接着, 基于这3个基因的表达水平, 构建了Cox比例风险回归模型。模型最终的回归系数为: *CTNNB1*(-0.586 6)、*BRCA1*(0.260 3)、*PIK3CA*(0.135 9), 并据此建立风险评分计算公式: 风险评分 = $-0.586 6 \times CTNNB1_exp + 0.260 3 \times BRCA1_exp + 0.135 9 \times PIK3CA_exp$ 。根据风险评分中位数将患者分为高风险组与低风险组, 随后进行生存分析。生存曲线绘制采用Kaplan-Meier法, 使用survival与survminer包完成, 评估不同风险组间的生存差异, 并计算 P 值。

1.7 分子对接

本研究主要采用AutoDock工具(Linux平台, v4.2)进行分子对接和药物筛选。以上述筛选的10个核心靶基因作为靶点蛋白, 开展分子对接分析。共纳入140种小分子药物进行对接筛选。首先, 从CTD数据库检索与预后基因相互作用的小分子化合物目录。随后, 从PubChem数据库获取这些小分子的结构信息。同时, 从UniProt数据库下载与预后基因翻译相关的生物大分子信息。最后, 按照预设的对接流程, 自动完成生物大分子与小分子之间的分子对接过程。为增强结果的可视化与分析效果, 使用PyMol软件(v2.6, 开源)进行后续处理。一般认为, 当结合亲和力小于-4.25 kcal/mol时, 表明活性分子与靶蛋白具有一定的结合活性。当结合亲和力小于-5.0 kcal/mol时, 具有较好的结合活性; 当结合亲和力小于-7.0 kcal/mol时, 具有较强的结合活性。

1.8 体外实验验证

1.8.1 从香石竹和细胞培养物中提取活性成分收集香石竹的根、茎和叶样品, 放入冷冻干燥机(Scientz-100F)中真空冷冻干燥, 用研磨机(MM 400, Retsch)将其研磨(30 Hz、1.5 min)成粉末状, 溶解在1.2 mL 70%甲醇提取液中。样品每30 min涡旋1次, 每次30 s, 共涡旋6次, 然后放入4 °C的冰箱中过夜。

然后,在12 000 r/min转速下4 °C离心10 min,吸出上清液。样品用微孔滤膜(孔径0.22 μm)过滤,并储存在小瓶中,以备UPLC-MS/MS分析之用。

采集数据的仪器系统主要包括UPLC(岛津Nexera X2)和MS/MS(应用生物系统公司4500 QTRAP)。

人类三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231和MDA-MB-468购买于国家生物医学实验细胞资源库。MDA-MB-231和MDA-MB-468均为TNBC细胞系,缺乏ER、PR和HER2表达。MDA-MB-231呈现间充质样表型,高侵袭性且转移潜能显著;MDA-MB-468则因PTEN缺失和EGFR过表达,对EGFR抑制剂敏感,同时也具备高侵袭、低分化特点。培养条件:细胞在添加10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养液中培养,培养温度为37 °C,培养条件为5% CO₂。培养基和血清来自Gibco公司。24 h更换1次培养基,实验以对数生长的细胞为记录对象。

1.8.2 SRB 检测 虽然SRB(sulforhodamine B)实验比MTT实验复杂,但SRB与细胞内碱性氨基酸结合形成的复合物非常稳定,在Tris碱中溶解后可长期保存,重复性较好。同时,SRB实验中集成了两个纯化过程,可以有效去除分离后的残留成分,避免植物色素对D值的影响。

将细胞均匀分布在48孔板上,24 h后加入药物。实验条件分为对照组和不同浓度香石竹醇提取物(0、800、1 600、2 400、2 800 μg/mL)处理组,共设5个重复孔。使用完全培养基计算不同浓度成分的比例,并将梯度稀释和混合。加入药物后,培养48或72 h以检测SRB。

首先,用20% TCA固定孵育的48孔板,在4 °C下处理2 h,固定后用水冲洗4次,晾干,然后用1 mol/L SRB溶液在室温下暗处染色40 min。染色后,用1%乙酸清洗48孔板。48孔板晾干后,加入10 mmol/L三聚酶溶液,室温下以500 r/min的转速振荡10~15 min,SRB染料完全溶解。在510 nm波长下检测每个孔,根据D值绘制生长曲线。

1.8.3 细胞活性氧(ROS)检测 活性氧(reactive oxygen species, ROS),包括超氧自由基、过氧化氢及其衍生物过氧化物和羟基化合物,参与细胞的生长和增殖、发育分化、衰老和凋亡,以及许多生理和病理过程。DCFH-DA(2,7-二氯荧光素二乙酸酯)是迄今为止用于检测细胞内活性氧的最广泛、最

灵敏的探针。用2 400 μg/mL香石竹醇提取物处理MDA-MB-231细胞48 h后,移去细胞培养基,在无血清培养基中加入工作浓度为2 μmol/L的DCFH-DA溶液,避光培养。阳性对照组用H₂O₂预处理30 min,然后在37 °C下培养20~30 min。用无血清细胞培养基洗涤细胞3次,并用胰蛋白酶(0.25%胰酶)37 °C消化,然后加入完全培养基制成细胞悬浮液终止消化。细胞在4 °C、1 500 r/min转速下离心5 min,然后用PBS冲洗1~2次。最后,按照生产商的说明用流式细胞仪(Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)对细胞进行分析。

1.8.4 Western blot印迹检测 用2 400 μg/mL香石竹醇提取物处理MDA-MB-231细胞48 h后,收集细胞放入RIPA缓冲液中裂解细胞并提取蛋白质,用BCA蛋白定量法测定蛋白质浓度。等量蛋白质经10% SDS-PAGE胶(140 V、200 mA、1 h)电泳后转移至PVDF膜(200 V、300 mA、3 h)。膜用5%脱脂奶或2% BSA阻断2 h,用一抗4 °C孵育过夜,一抗包括GAPDH(ABclonal, AC001, 1:1 000)、PI3K(CST, 4257S, 1:1 000)、AKT(CST, 4691S, 1:1 000)、mTOR(CST, 2972S, 1:1 000)、P70(CST, 2708S, 1:1 000)、S6(CST, 2217S, 1:1 000)、4EBP1(CST, 9452S, 1:1 000)、p-AKT(CST, 3787S, 1:1 000)、p-mTOR(CST, 2796S, 1:1 000)、p-P70(CST, 9234S, 1:1 000)、p-S6(CST, 5364S, 1:1 000)、p-4EBP1(CST, 9451S, 1:1 000)、FoxO1(Millipore, 05-1075, 1:1 000)、FoxO3(CST, 12829P, 1:1 000)、p-FoxO1(CST, 9464P, 1:1 000)、p-FoxO3(CST, 9465P, 1:1 000)。然后用TBST洗膜10 min,二抗(1:500)室温孵育2 h。显影液按照辣根过氧化物酶(HRP)说明配制。用增强化学发光(ECL)检测化学发光信号。

1.9 统计分析

所有实验至少重复三次,数据以均值±标准误差表示,采用单因素方差分析确定多组间的显著差异。结果以P<0.05为差异显著。

2 结果

2.1 香石竹的主要活性成分

通过高效液相色谱法,从香石竹中共鉴定出883种化学成分。结合CTD数据库检索及人工筛选,剔除氨基酸及其衍生物、核苷酸及其衍生物、常见的糖类、维生素等非特异性成分后,最终获得140

种潜在有效成分以及和这些成分相关的 8 450 个基因。

2.2 香石竹和TNBC共同作用靶点筛选与网络构建

从GeneCards数据库中共检索到4 913个TNBC相关基因, 基于Gift评分大于20的标准进行筛选, 得到4 608个潜在相关基因; 从OMIM 数据库中共检索到485个TNBC相关基因, 去重后得到198个潜在相关基因。将上述TNBC相关靶基因与香石竹有效成分相关靶基因进行交集分析, 最终得到82个共同靶基因(图2A)。

基于上述结果, 我们使用Cytoscape 3.7.1软件构建了“香石竹活性成分-靶基因-三阴性乳腺癌”网络(图2B)。在香石竹的活性成分中, 筛选得到70个与TNBC相关的主要活性成分, 提示这些成分可能通过作用于共同靶基因, 进而参与TNBC的调控过程。

2.3 基因功能和通路富集分析

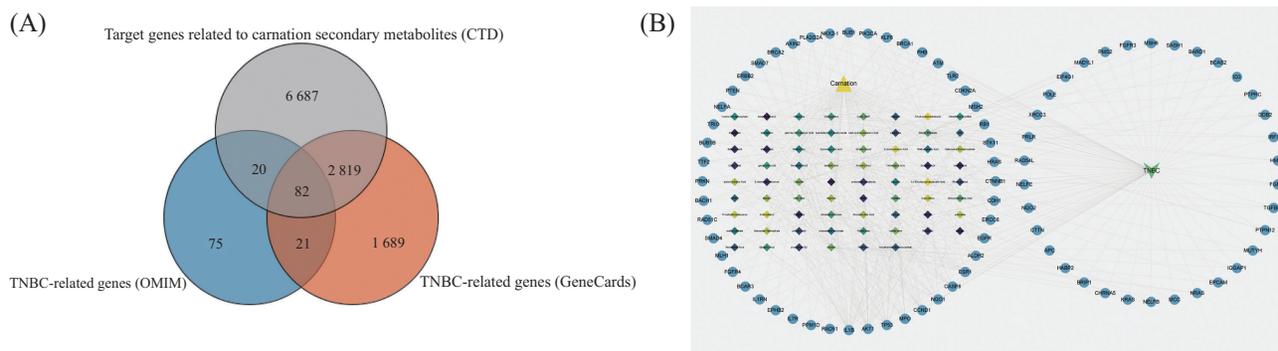
GO富集分析涵盖BP、CC和MF三个维度。如图3A~图3C所示, 前20个生物过程(BP)包括上皮细胞增殖调控、平滑肌细胞增殖调控、细胞凋亡信号通路调控、细胞外凋亡信号通路调控和氧化水平调控。这些功能与细胞凋亡、增殖和氧化应激高度相关。CC面板显示, 前20个显著富集条包括附着点、膜筏、膜微域、顶端质膜、基底质膜、外细胞器膜、RNA聚合酶II转录调控复合物、转录调控复合物等, 提示这些基因可能主要定位于细胞信号转导相关结构及转录调控复合物中, 参与细胞内外信号传递及转录调控过程。MF面板则显示了82

个相关性较高的基因的分子功能, 主要涉及DNA转录因子结合、受体配体活性、细胞因子活性、生长因子活性、激素受体结合、蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白激酶活性和核受体活性, 表明其可能通过调控转录过程、信号分子互作及激酶活性参与TNBC的病理进程。

KEGG通路分析进一步揭示了对乳腺癌有显著影响的相关信号通路(图3D)。其中PI3K/AKT信号通路和FoxO信号通路尤为关键。PI3K/AKT通路在细胞外信号刺激下可促进细胞代谢、增殖和存活; FoxO通路的异常调控则与肿瘤发生发展密切相关, 二者均通过调控细胞增殖、存活及周期进程参与TNBC的病理过程。上述结果表明, 香石竹中的有效成分可能通过调控多种关键基因和信号通路, 从多方面影响TNBC细胞的增殖。

2.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析(PPI)

基于STRING数据库, 对筛选出的82个共同靶基因进行了PPI网络分析, 挖掘其相互作用关系及潜在通路。共获得82个节点和356条边, 并通过Cytoscape 3.7.1软件对进行可视化(图3A)。根据Betweenness值从高到低的顺序, 选出了前10个核心目标基因(图3B), 分别为TP53、BRCA1、CTNNB1、ESR1、HRAS、NELFB、IL1B、AKT1、PIK3CA、PTPRC。多项研究表明, 这些基因在TNBC的发生、发展及耐药机制中具有重要作用, 且与抗TNBC治疗密切相关。因此, 这些枢纽基因可能是香石竹醇提取物发挥抗TNBC作用的关键靶点, 为后续深入研究其作用机制提供了重要依据^[22-30]。



A: 使用GeneCards、OMIM和CTD数据库构建的潜在靶基因维恩图; B: TNBC与香石竹醇提取物的有效成分-靶点-疾病相互作用网络。

A: venn diagram of potential target genes constructed using GeneCards, OMIM and CTD databases; B: effective component-target-disease interaction network of TNBC and *Dianthus caryophyllus L.* methanolic extract.

图2 香石竹和TNBC共同作用靶点筛选与网络构建

Fig.2 Screening and network construction of common targets between *Dianthus caryophyllus L.* and TNBC

2.5 核心靶基因预后模型的构建与验证

首先, 利用TCGA数据库分析10个核心靶基因在TNBC组织中的表达差异, 结果显示: 与正常乳腺组织相比, *HRAS*、*BRCA1*、*AKT1*、*PTPRC*及*NELFB*在TNBC中呈显著高表达, *ESR1*和*PIK3CA*则呈显著低表达(图5)。

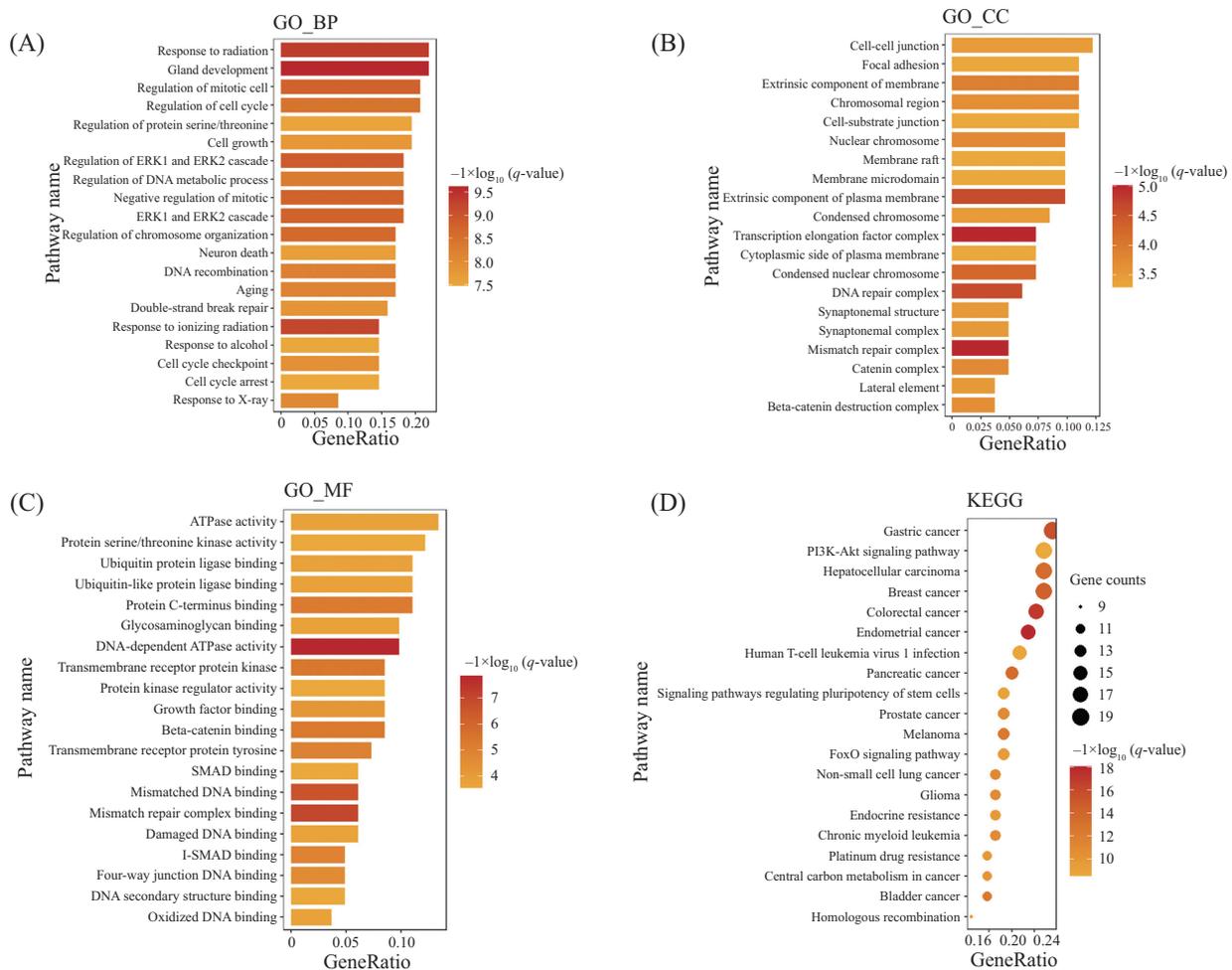
随后, 采用Lasso回归分析对这10个基因进行变量选择。利用R语言中的glmnet包进行建模, 通过交叉验证确定最优惩罚参数 λ , 并进一步选取比 λ_{\min} 更小的 λ 值以获得更多保留变量。最终, 筛选出3个具有非零系数的基因: *CTNNB1*、*BRCA1*和*PIK3CA*。基于这3个基因的表达水平, 构建了Cox比例风险回归模型。模型的回归系数分别为: *CTNNB1*(-0.586 6)、*BRCA1*(0.260 3)和*PIK3CA*(0.135 9)。据此, 建立了风险评分计算公式: 风险评分=-0.586

$6 \times CTNNB1_exp + 0.2603 \times BRCA1_exp + 0.1359 \times PIK3CA_exp$ 。

接着, 根据风险评分的中位数将TNBC患者分为高风险组和低风险组, 并进行生存分析。结果显示, 高风险组患者的预后显著较差(图6)。提示该模型可有效评估TNBC患者的预后, 且*CTNNB1*、*BRCA1*、*PIK3CA*可能作为香石竹干预TNBC的关键预后相关靶基因。

2.6 核心靶基因与香石竹活性成分的分子对接验证

分子对接技术通过匹配目标受体位点的立体结构、作用力及电学特征, 可有效预测小分子化合物与靶点的结合潜能。本研究将筛选获得的10个核心靶基因与香石竹中鉴定出的140个活性成分进行分子对接分析, 结果显示: 香石竹的主要活性成分(包括三萜类的白桦脂酸、黄酮苷类的山

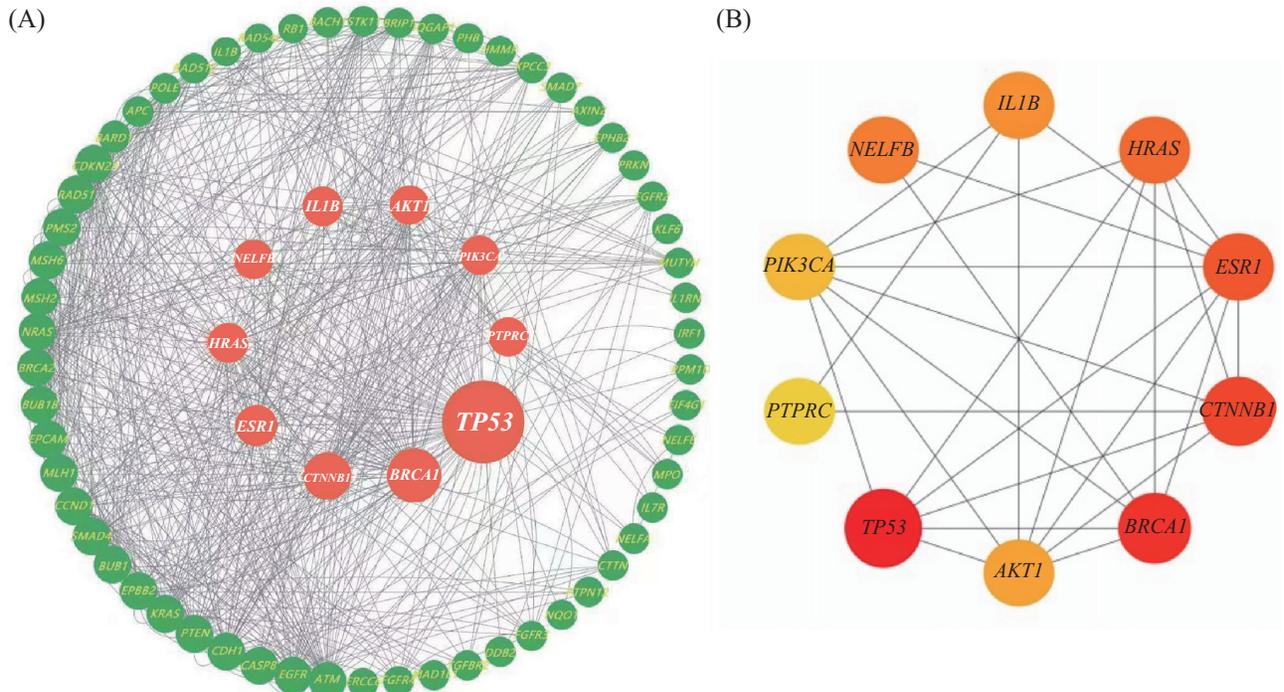


A~C: GO富集分析; D: KEGG富集分析。

A-C: GO enrichment analysis; D: KEGG enrichment analysis.

图3 GO和KEGG富集分析

Fig.3 Enrichment analysis of GO and KEGG



A: 图2A中的PPI网络图。度值越高, 节点越大; B: 图4A中的前10个基因。颜色表示成分与通路的相关性, 深红色表示高度相关。

A: PPI network diagram in Fig.2A. The higher the degree value is, the larger the node size; B: The top 10 genes in Fig.4A. The color indicates the correlations of ingredients and pathways, deep color with red means a high degree of correlation.

图4 蛋白质-蛋白质相互作用网络分析

Fig.4 Protein-protein interaction network analysis

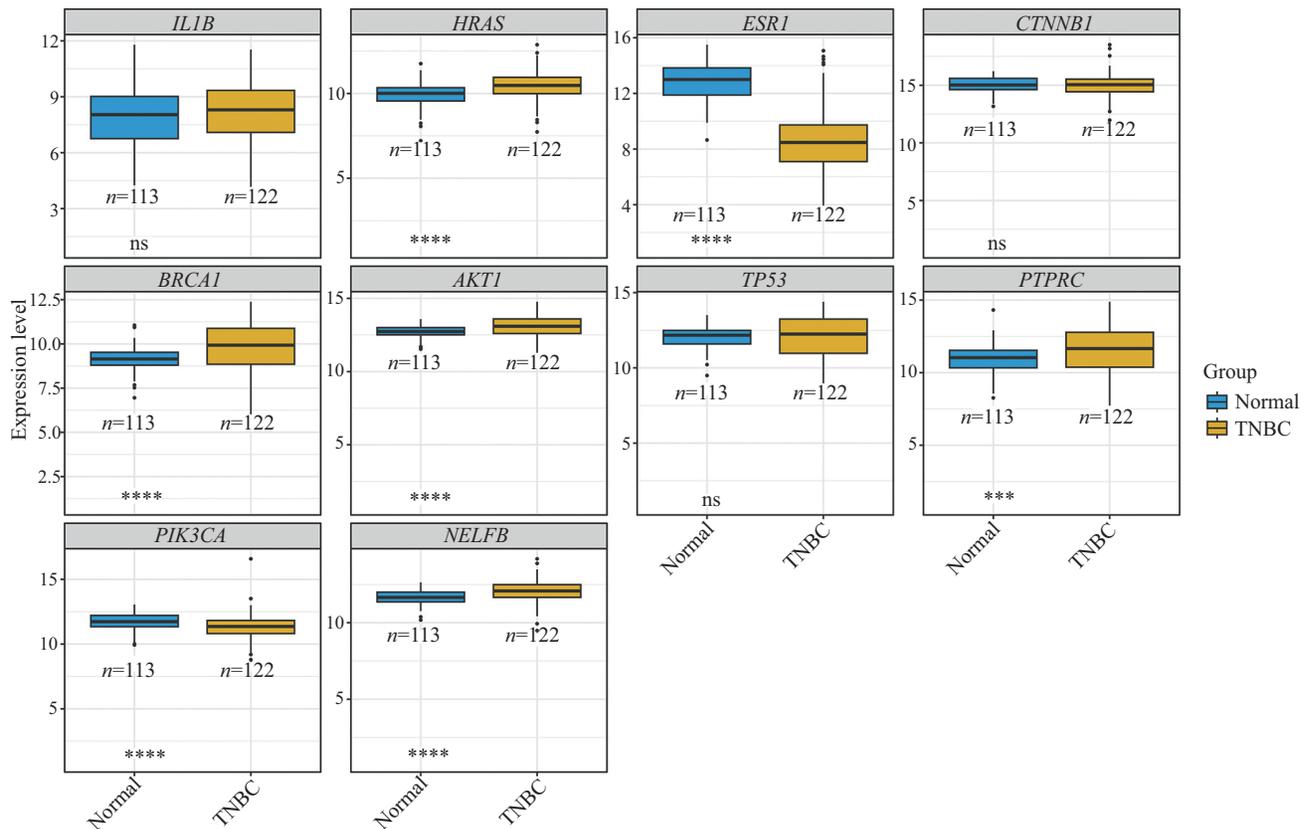


图5 10个核心基因的表达情况

Fig.5 The expression level of 10 core genes

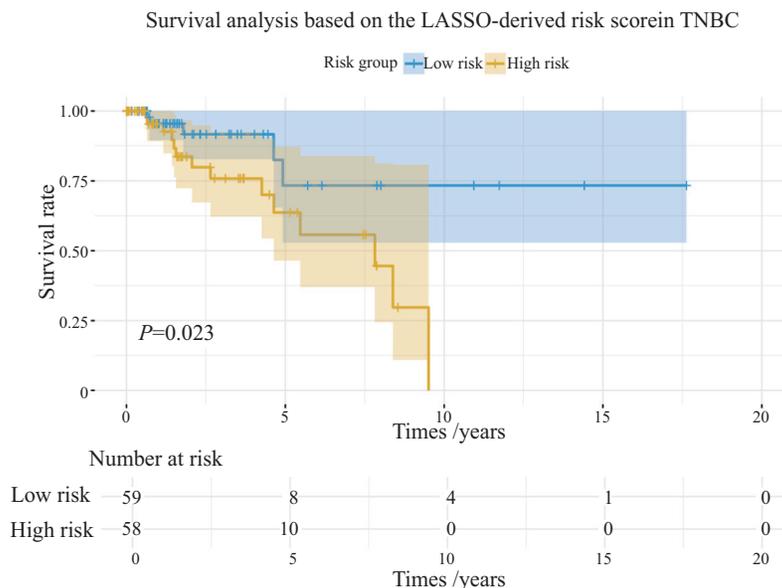


图6 LASSO风险评分生存分析

Fig.6 Survival analysis of LASSO risk score

奈酚, 以及酚酸、生物碱等)与核心靶基因存在显著结合活性。如白桦脂酸能够与TP53、AKT1、PIK3CA、PTPRC、NELFB、IL1B显著结合; 山奈酚及其衍生物能够与AKT1、PIK3CA、NELFB显著结合(表1)。

现有研究表明, 白桦脂酸作为已被广泛证实的天然抗肿瘤三萜类化合物, 可通过与PIK3CA、AKT1等靶基因直接结合, 调控细胞凋亡及自噬相关信号通路。黄酮类成分山奈酚及其衍生物则通过靶向TP53、BRCA1等核心基因, 调节细胞周期蛋白表达及凋亡相关通路^[31-32]。上述结果提示, 香石竹中的多种活性成分可通过与关键靶基因特异性结合, 协同靶向PI3K/AKT-TP53信号枢纽, 破坏TNBC增殖与存活核心机制, 为其抗TNBC作用提供了分子层面的实验依据。这一多元调控模式可能是香石竹发挥抗TNBC效应的重要物质基础, 也为后续明确其具体作用机制及开发新型联合治疗策略提供了关键线索。

2.7 体外实验验证网络药理学分析结果

2.7.1 香石竹醇提取物抑制TNBC细胞增殖

为了验证香石竹醇提取物对TNBC细胞增殖的影响, 我们采用不同浓度的香石竹醇提取物分别处理MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞, 并进行SRB检测。与对照组相比, 香石竹醇提取物对两种TNBC细胞的增殖均具有抑制作用, 且该抑制效应呈现时间和浓

度依赖性(图7A和图7B), 表明香石竹醇提取物能够有效抑制TNBC细胞的增殖。

2.7.2 香石竹醇提取物上调TNBC细胞活性氧水平

基于GO分析中“氧化应激水平调控”相关生物过程的富集结果, 我们进一步通过ROS检测试剂盒分析香石竹水提取物对MDA-MB-231细胞内活性氧水平的影响。结果表明, 经香石竹醇提取物处理后, 细胞内ROS水平显著升高(图7C), 提示其可能通过调控氧化应激水平参与TNBC细胞功能调控。

2.7.3 香石竹醇提取物调控PI3K/AKT和FoxO信号通路

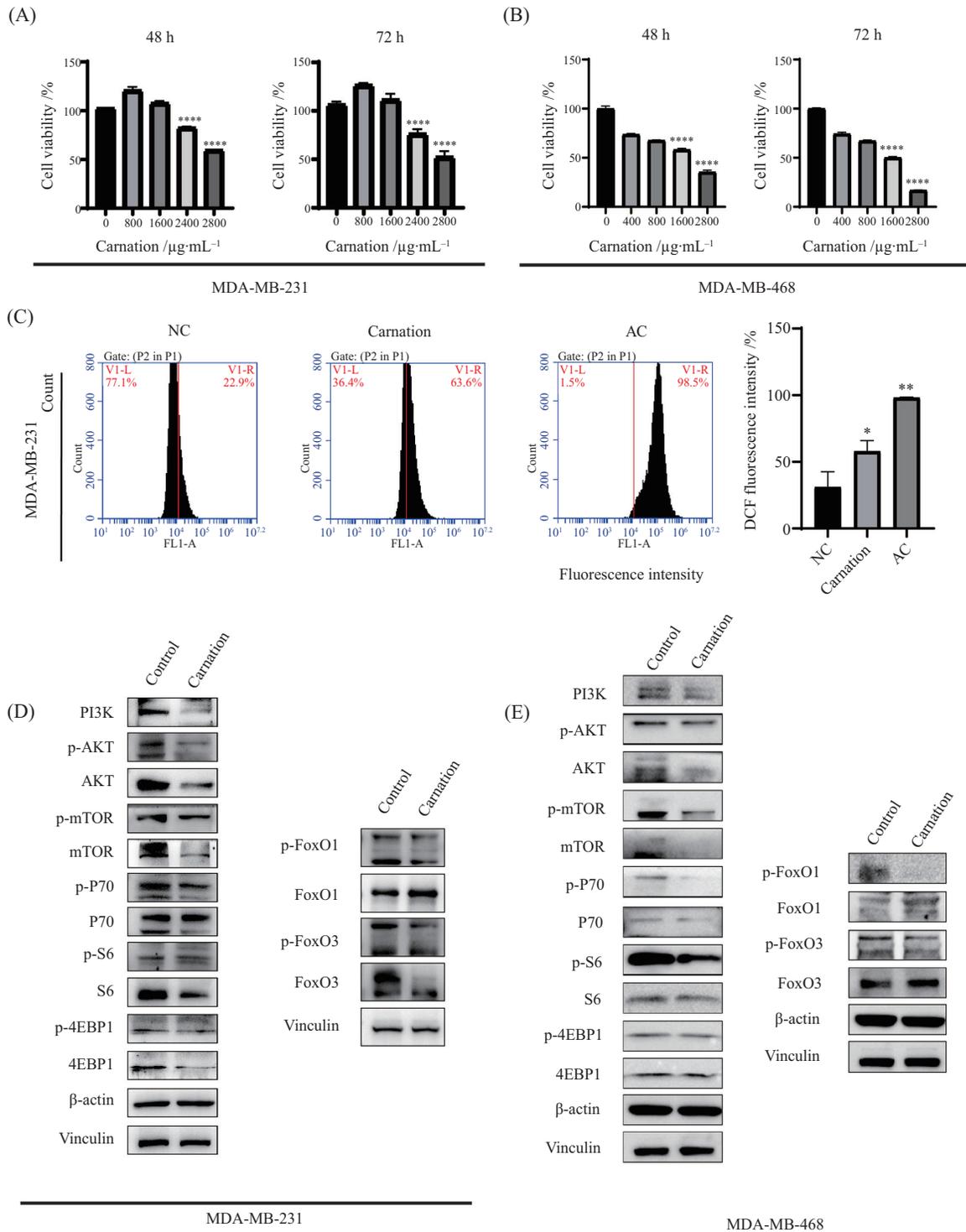
KEGG通路分析提示PI3K/AKT和FoxO信号通路在TNBC中被显著富集, 且分子对接实验也表明PI3K/AKT信号通路中的关键蛋白与香石竹活性成分结合。为了验证这一假设, 我们进行了Western blot实验来分析MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞中PI3K/AKT和FoxO信号通路蛋白的表达情况。如图7D和图7E所示, 香石竹醇提取物处理组的PI3K、AKT、mTOR及其下游蛋白P70、S6和4EBP1的表达水平, 以及p-FoxO1和p-FoxO3的表达水平显著低于对照组。

综上所述, 通过体外实验验证, 香石竹醇提取物不仅能够抑制TNBC细胞的增殖, 还能通过增加细胞内活性氧水平和调控PI3K/AKT和FoxO信号通路发挥抗肿瘤作用。这些实验结果与网络药理学和分子对接分析的预测高度一致, 进一步证实了香石

表1 核心基因与香石竹活性成分分子对接结果

Table 1 Molecular docking results of core genes and active components of *Dianthus caryophyllus L.*

基因名称 Gene name	活性成分名称 Active ingredient name	对接分值/kcal·mol ⁻¹ Docking score /kcal·mol ⁻¹
TP53	Betulinic acid	-7.70
TP53	2,2-dimethylsuccinic acid	-6.84
TP53	Malonic acid	-6.35
TP53	Citraconic acid	-6.22
TP53	Terephthalic acid	-6.14
AKT1	Betulinic acid	-9.17
AKT1	Kaempferol	-7.25
AKT1	Pyridoxal	-4.52
AKT1	Tryptophan	-4.35
AKT1	Phenylpyruvic acid	-3.78
PTPRC	Betulinic acid	-8.11
PTPRC	Pimaric acid	-7.53
PTPRC	Uridine diphosphate xylose	-6.47
PTPRC	Nicotinamide mononucleotide	-5.95
PTPRC	Riboflavin	-5.67
PIK3CA	Betulinic acid	-9.69
PIK3CA	NADP	-8.14
PIK3CA	Rutin	-7.92
PIK3CA	Baicalin	-7.55
PIK3CA	Kaempferol 3-O-sophoroside	-7.17
NELFB	Betulinic acid	-9.90
NELFB	Uridine diphosphate xylose	-9.29
NELFB	Pimaric acid	-7.47
NELFB	Kaempferol 3-O-sophoroside	-7.28
NELFB	Riboflavin	-7.16
IL1B	Betulinic acid	-8.16
IL1B	Pimaric acid	-6.71
IL1B	Baicalin	-5.06
IL1B	5-methoxyindoleacetic acid	-5.02
IL1B	5-hydroxytryptophan	-5.00
BRCA1	Phloretic acid	-4.44
BRCA1	4-nitrophenol	-4.27
BRCA1	Picolinic acid	-3.72
BRCA1	5'-methylthioadenosine	-3.42
BRCA1	Pyridoxic acid	-3.35
HRAS	Phthalic anhydride	-4.87
HRAS	3-hydroxybenzaldehyde	-4.09
HRAS	Nicotinamide mononucleotide	-3.77
HRAS	Beta-hydroxyisovaleric acid	-3.62
HRAS	Sucrose	-3.47
ESR1	Methyl caffeate	-4.62
ESR1	3-hydroxybenzoic acid	-4.48
ESR1	Histamine	-4.42
ESR1	Pantothenic acid	-4.30
ESR1	Arginine	-3.89
CTNNB1	2,6-di-tert-butylphenol	-1.44
CTNNB1	2,2-dimethylsuccinic acid	-1.30
CTNNB1	Anthranilic acid	-1.22
CTNNB1	Vanillic acid	-1.22
CTNNB1	Piperidine	-1.09



A, B: 不同浓度的香石竹醇提取物抑制了MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞的增殖。n=4; C: ROS检测香石竹水提取物对MDA-MB-231细胞活性氧的影响(NC, 阴性对照; AC, 阳性对照, n=3)。D、E: 香石竹醇提取物通过PI3K/AKT和FoxO信号通路调节TNBC的进展。数据以均数 \pm 标准差表示。结果的显著性采用方差分析进行评估。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$, 与对照组相比。

A,B: different concentrations of *Dianthus caryophyllus L.* methanolic extract inhibited the proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. n=4. C: ROS detection of *Dianthus caryophyllus L.* methanolic extract increased reactive oxygen species in MDA-MB-231 cells. (NC: negative control; AC: positive control; n=3). D,E: *Dianthus caryophyllus L.* methanolic extract regulates TNBC progression through the PI3K/AKT and FoxO signaling pathways. The PI3K, AKT, mTOR, P70, S6, 4EBP1, p-FoxO1, and p-FoxO3 protein levels in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 models were assessed using Western blot. Data are shown as the $\bar{x}\pm s$. The significance of the results was assessed using ANOVA. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$ compared with Control group.

图7 体外实验验证网络药理学分析结果

Fig.7 *In vitro* experiments validate the results of network pharmacology analysis

竹在TNBC治疗中的潜在应用价值。

3 讨论

在全球范围内, 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率一直居高不下。与其他主要乳腺癌亚型相比, TNBC患者的特点是复发率高、转移潜力大、总生存期短。由于缺乏有针对性和特异性的药物治疗目标, 蒽环类化疗是目前治疗TNBC的主要手段, 但这类药物在治疗TNBC时常会引发心脏毒性、骨髓抑制、肝肾损伤等不良反应^[19]。尽管细胞毒性化疗方案最初对肿瘤治疗敏感, 但不能维持长期的治疗效果。TNBC具有高度的染色体不稳定性及临床侵袭性表型, 这种不稳定性是导致化疗耐药的主要原因, 其中*MCL1*、*MYC*、*JAK2*和*PIMI*的拷贝数扩增和表达量增加以及*PTEN*的缺失或突变均可能参与化疗耐药过程^[20]。因此, 寻找低毒、多靶点天然来源药物成为TNBC研究热点, 这对开发新型治疗策略、预防转移并提高患者生存率至关重要。

在抗肿瘤植物研究领域, 香石竹是备受关注的对象之一。多项研究证实, 其对结肠癌^[10]、肝癌^[11]等多种癌症具有抗肿瘤活性, 同时对巨噬细胞系存在一定毒副作用^[21]。鉴于TNBC治疗的迫切需求, 探索香石竹关键成分对TNBC的潜在治疗机制, 有助于研发新型治疗药物。网络药理学可揭示药物与疾病关联, 通过网络筛选香石竹代表性活性成分, 结合分子对接验证, 为阐明其治疗TNBC的潜在机制提供有力依据。

本研究采用超高效液相色谱法从香石竹中鉴定出883种次生代谢物, 经CTD数据库筛选获得了140种活性化合物和8 450个靶基因。利用GeneCards和OMIM数据库检索TNBC相关基因并与香石竹靶基因进行匹配, 初步筛选出82个共同靶基因和70种对应化合物。GO和KEGG结果表明, 香石竹水提物活性成分可能通过调控氧化应激以及PI3K/AKT、FoxO信号通路影响TNBC的增殖与凋亡。PPI网络分析识别的核心靶基因(*TP53*、*BRCA1*、*CTNNB1*、*ESR1*、*HRAS*、*NELFB*、*IL1B*、*AKT1*、*PIK3CA*、*PTPRC*)均与TNBC病理进程密切相关, 与既往研究结果一致: *TP53*和*BRCA1*是检测TNBC的生物标志物^[17]。*CTNNB1*作为miR-149-5p的靶基因, 其过表达可逆转*C5orf66-AS1*沉默对TNBC进展的抑制作用^[18]。

抑制*ESR1*能够减少TNBC细胞亚群以及分化的非CSC向CSC的转化^[19]。*HRAS*癌基因激活可诱导正常乳腺细胞向TNBC的转化^[20]。*IL1B*以剂量依赖性方式抑制TNBC细胞的增殖^[21]。PI3K/AKT信号通路是TNBC的核心调控轴^[17], *PTPRC*基因的表达可以帮助预测早期TNBC的预后并为治疗提供指导^[18]。此外, 基于*CTNNB1*-*BRCA1*-*PIK3CA*构建的Cox模型在TCGA-TNBC队列中具有良好的预后分层能力, 进一步支持这些基因作为香石竹干预TNBC的关键节点。

分子对接结果显示, 香石竹的主要活性成分(包括三萜类的白桦脂酸、黄酮苷类的山奈酚, 以及酚酸、生物碱等)与核心靶基因存在显著结合活性, 如白桦脂酸能够与*TP53*、*AKT1*、*PIK3CA*、*PTPRC*、*NELFB*、*IL1B*显著结合; 山奈酚及其衍生物能够与*AKT1*、*PIK3CA*、*NELFB*显著结合。现有研究表明, 白桦酸通过诱导ROS生成来调节*CD81*表达并诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡^[33]。山奈酚可抑制乳腺癌细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞在G₂/M期, 通过上调*H2AX*蛋白, 下调*caspase 9*、*caspase 3*和*p-ATM*蛋白表达水平, 进而诱导TNBC细胞的凋亡和DNA损伤^[21]。芦丁是预防和控制*c-Met*依赖性乳腺恶性肿瘤的潜在先导^[17]。黄芩苷在体外能抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭^[34]。这提示, 香石竹活性成分可通过协同干预多靶点, 实现“单药-多通路”的TNBC抑制模式。

体外实验进一步验证, 香石竹醇提物以时间和浓度依赖方式抑制MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞增殖, 升高ROS水平, 并下调PI3K/AKT及FoxO通路关键蛋白表达, 与网络药理学预测以及分子对接结果一致, 形成了“成分-靶点-通路-表型”的证据链。

综上, 本研究通过多维度分析证实香石竹醇提物通过多成分、多靶点协同调控氧化应激及PI3K/AKT-FoxO信号轴发挥抗TNBC作用, 为其开发为TNBC辅助治疗药物提供了实验依据。未来需进一步分离验证各活性成分在TNBC异种移植模型中的协同剂量效应, 并评估与标准化疗方案的联合策略, 以推动香石竹向TNBC辅助治疗的临床转化。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statis-

- tics, 2025 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75(1): 10-45.
- [2] WEIGELT B, REIS-FILHO J S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy [J]? *Nat Rev Clin Oncol*, 2009, 6(12): 718-30.
- [3] HURVITZ S A, HU Y, O'BRIEN N, et al. Current approaches and future directions in the treatment of HER2-positive breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(3): 219-29.
- [4] MAJUMDER M, DEBNATH S, GAJBHIYE R L, et al. Ricinus communis L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14493.
- [5] CASAS J L, OLMOS E, PIQUERAS A. *In vitro* propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, doi: 10.1007/978-1-60327-114-1_11.
- [6] AL-SNAFI P D A E. Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*- a review [J]. *IOSRPHR*, 2017, 7(3): 61-71.
- [7] YUN B R, YANG H J, WEON J B, et al. Simultaneous determination of eight bioactive compounds in dianthus superbus by high-performance liquid chromatography [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(Suppl 2): S264-9.
- [8] KIMBARIS A C, KOLIOPOULOS G, MICHAELAKIS A, et al. Bioactivity of dianthus caryophyllus, lepidium sativum, pimpinella anisum, and illicium verum essential oils and their major components against the West Nile vector *Culex pipiens* [J]. *Parasitol Res*, 2012, 111(6): 2403-10.
- [9] MARTINETI V, TOGNARINI I, AZZARI C, et al. Inhibition of *in vitro* growth and arrest in the G0/G1 phase of HCT8 line human colon cancer cells by kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus* [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(9): 1302-8.
- [10] VON MALLINCKRODT B T M, WENG A. Dianthin-EGF is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma [J]. *Future Oncol*, 2014, doi: 10.2217/fon.14.164.
- [11] NHO K J, CHUN J M, KIM H K. Ethanol extract of dianthus chinensis l. induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma hepg2 cells *in vitro* [J]. *eCAM*, 2012, doi: 10.1155/2012/573527.
- [12] CHATTERJEE S, CHAKRABORTY P, DUTTA S, et al. Formulation of carnosic-acid-loaded polymeric nanoparticles: an attempt to endorse the bioavailability and anticancer efficacy of carnosic acid against triple-negative breast cancer [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2024, 7(3): 1656-70.
- [13] VASIYANI H, MANE M, RANA K, et al. DNA damage induces STING mediated IL-6-STAT3 survival pathway in triple-negative breast cancer cells and decreased survival of breast cancer patients [J]. *Apoptosis*, 2022, 27(11/12): 961-78.
- [14] BHUTTA Z A, CHOI K C. Phytochemicals as novel therapeutics for triple-negative breast cancer: a comprehensive review of current knowledge [J]. *Phytother Res*, 2025, 39(1): 364-96.
- [15] MAO M, CHEN Y, YANG J, et al. Modification of PLAC8 by UFM1 affects tumorous proliferation and immune response by impacting PD-L1 levels in triple-negative breast cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-005668.
- [16] SINNARKAR S, SURYAWANSHI P, DILIP A, et al. Galangin promotes apoptosis by upregulating the pro-apoptotic gene BAX in triple-negative breast cancer [J]. *J Egypt Natl Cancer*, 2024, 36(1): 41.
- [17] ELSAYED H E, EBRAHIM H Y, MOHYELDIN M M, et al. Rutin as a novel c-met inhibitory lead for the control of triple negative breast malignancies [J]. *Nutr Cancer*, 2017, 69(8): 1256-71.
- [18] SHIMELIS H, LADUCA H, HU C, et al. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing [J]. *J Natl Cancer*, 2018, 110(8): 855-62.
- [19] ROBERTS M E, JACKSON S A, SUSSWEIN L R, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer [J]. *Genet Med*, 2018, 20(10): 1167-74.
- [20] MOTAMEDI B, RAFIEE-POUR H A, KHOSRAVI M R, et al. Prolactin receptor expression as a novel prognostic biomarker for triple negative breast cancer patients [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151507.
- [21] CAO L, LI L S, SPRUELL C, et al. Tumor-selective, futile redox cycle-induced bystander effects elicited by NQO1 bioactivatable radiosensitizing drugs in triple-negative breast cancers [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2014, 21(2): 237-50.
- [22] ZHU S, SUN J, LIU X, et al. CTCF-induced lncRNA C5orf66-AS1 facilitates the progression of triple-negative breast cancer via sponging miR-149-5p to up-regulate CTCF and CTNNB1 to activate Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2022, 42(6): e0018821.
- [23] WANG Z, LI Y, YANG J, et al. CircCFL1 promotes TNBC stemness and immunoescape via deacetylation-mediated c-Myc deubiquitylation to facilitate mutant TP53 transcription [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(34): e2404628.
- [24] TUTT A, TOVEY H, CHEANG M C U, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT trial [J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 628-37.
- [25] SUN Z, XU H, LU G, et al. AKT1 phosphorylates FDX1 to promote cuproptosis resistance in triple-negative breast cancer [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(17): e2408106.
- [26] SGHAIER I, ZIDI S, EL-GHALI R M, et al. Unique ESR1 and ESR2 estrogen receptor gene variants associated with altered risk of triple-negative breast cancer: a case-control study [J]. *Gene*, 2023, 851: 146969.
- [27] SAGARA A, MIURA S, KOBINATA A, et al. COL8A1 enhances the invasion/metastasis in MDA-MB-231 cells via the induction of IL1B and MMP1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 642: 145-53.
- [28] MOSELE F, STEFANOVSKA B, LUSQUE A, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(3): 377-86.
- [29] LI P, WANG W, WANG S, et al. PTPRC promoted CD8⁺ T cell mediated tumor immunity and drug sensitivity in breast cancer: based on pan-cancer analysis and artificial intelligence modeling of immunogenic cell death-based drug sensitivity stratification [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1145481.
- [30] KIM S J, SAEIDI S, CHO N C, et al. Cooperation between oncogenic NRF2 and wild-type HRAS promotes progression of breast cancer [J]. *Cell Signal*, 2025, 134: 111920.
- [31] WANG M, SHEN Q, PANG J, et al. Study on chemical constituents and antioxidant activities of *Dianthus caryophyllus* L [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1438967.

- [32] ZHOU X, WANG M, LI H, et al. Widely targeted metabolomics reveals the antioxidant and anticancer activities of different colors of *Dianthus caryophyllus* [J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1166375.
- [33] LESTARI D Y, MASTUTIK G, MUKONO I S. Betulinic acid and oleanolic acid modulate CD81 expression and induce apoptosis in triple-negative breast cancer cells through ROS generation [J]. *Med Oncol*, 2024, 42(1): 24.
- [34] YANG K, ZENG L, GE A, et al. Investigating the regulation mechanism of baicalin on triple negative breast cancer's biological network by a systematic biological strategy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109253.