

·数字中医药·

本文引用: 邓显光, 刘丽芳, 袁博. 基于 miRNA-mRNA 探讨西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子机制及预后分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(12): 2043-2051.

# 基于 miRNA-mRNA 探讨西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子机制及预后分析

邓显光, 刘丽芳, 袁博\*

(湖南中医药大学第一附属医院乳腺科, 湖南长沙 410007)

**[摘要]** 目的 基于 miRNA-mRNA 互作模式, 明晰西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子机制并进行预后分析, 为乳腺癌骨转移的药物干预靶点及生物标志物的确定提供理论依据。方法 综合 GEO、TCGA、TargetScan、GeneCards、OMIM、TCMSP、STRING、HPA 数据库, 采用 R 语言及 Cytoscape 软件对西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点进行 miRNA-mRNA 互作关系构建; 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 及 Hub 基因拓扑分析; 基因本体论 (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。进一步使用 TCGA 数据库, 分析肿瘤组织与正常组织分子靶点的差异表达, 并通过 HPA 数据库进行免疫组化结果的相互佐证。最后结合患者临床信息, 分析 Lasso 回归后分子靶点的预后相关性, 单因素 Cox 回归分析临床信息与分子靶点预后情况, 并开发乳腺癌骨转移的风险预测模型。结果 西黄丸中的多种成分可作用于乳腺癌骨转移 135 个分子靶点, 与 196 个乳腺癌骨转移差异 miRNA 构建出 2964 组 miRNA-mRNA 互作关系, 锚定了 10 个 Hub 基因与 95 个 miRNA, 构建出 175 组 miRNA-mRNA 核心关系。Lasso 回归聚焦出 ADRB1 是乳腺癌骨转移患者的独立预后因子, 具有良好的诊断价值及生存预后价值, Cox 回归分析发现乳腺癌的 M 分期、年龄是主要危险因素, 而 ADRB1 高表达为保护因素, 三者与患者总生存时间显著相关。基于 8 个 miRNA (hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-3615, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-183-3p) 开发预后模型, 以评估乳腺癌骨转移的预后。结论 本研究阐述了西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子机制。其机制与其多组分调控 ADRB1 等多靶点, 参与多生命进程有关, 以 miRNA-mRNA 互作模式共同调控乳腺癌骨转移不良预后。本研究还建立了乳腺癌骨转移预测模型, 为开发治疗乳腺癌骨转移药物以及乳腺癌骨转移生物标志物的确定提供了潜在价值。

**[关键词]** 乳腺癌; 骨转移; 西黄丸; 生物信息学; 网络药理学; 列线图

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.014

## Molecular mechanism and prognosis of Xihuang Pill intervening breast cancer with bone metastasis based on miRNA-mRNA

DENG Xianguang, LIU Lifang, YUAN Bo\*

(Mammary Department, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** Based on the miRNA-mRNA interaction model, this study clarified the molecular mechanism of Xihuang Pill intervening breast cancer with bone metastasis and analyzed the prognosis, so as to provide a theoretical basis for the determination of drug intervening targets and biomarkers of breast cancer with bone metastasis. **Methods** Synthesizing databases of GEO, TCGA, TargetScan, GeneCards, OMIM, TCMSP, STRING and HPA, protein-protein interaction (PPI) analysis, Hub gene topology analysis, gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were carried by R

**[收稿日期]** 2022-05-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82205128); 湖南省教育厅科学研究项目重点项目 (19A383); 湖南省卫生健康委员会课题 (20200754); 湖南省高等学校“双一流”学科建设项目 (湘教通[2018]469号); 长沙市自然科学基金项目 (kq202461)。

**[第一作者]** 邓显光, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治乳腺疾病。

**[通信作者]** \*袁博, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: 584502864@qq.com。

language and Cytoscape software, through which the miRNA-mRNA interaction relationship for the molecular targets of Xihuang Pill intervening breast cancer with bone metastasis were constructed. Further, TCGA database was used to analyze the differential expression of molecular targets in tumor tissue and normal tissue, and HPA database was used to corroborate the immunohistochemical results. Finally, combined with patients' clinical information, the prognostic relevance of the molecular targets after Lasso regression was analyzed, and univariate Cox regression was used to analyze the clinical information and the prognosis of the molecular targets. Then a risk prediction model for breast cancer with bone metastasis was developed. **Results** Multiple components of Xihuang Pill acted on 135 molecular targets of breast cancer with bone metastasis, and these targets constructed 2964 groups of miRNA-mRNA interactions with 196 differential miRNAs. Moreover, 10 Hub genes and 95 miRNAs were anchored, which constructed 175 groups of miRNA-mRNA core relationships. Lasso regression focused on ADRB1 as an independent prognostic factor for breast cancer with bone metastasis, which had good diagnostic value and predictive value for survival prognosis. Cox regression found that the M stage of breast cancer and age were the main risk factors, while the high expression of ADRB1 was a protective factor. They were significantly related to the patient's overall survival. Finally, based on 8 miRNAs (hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-3615, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-183-3p), a prognostic model was developed that can predict the poor prognosis of breast cancer with bone metastasis. **Conclusion** This study explained the molecular mechanism of Xihuang Pill intervening breast cancer with bone metastasis. The mechanism is related to multiple components of Xihuang Pill regulating various targets such as ADRB1, and participating in multi-life processes. Besides, the miRNA-mRNA interaction model regulates the prognosis of breast cancer with bone metastasis. More importantly, a predictive model has been developed in the study, which provides potential value for the exploration of medication and the determination of biomarkers for breast cancer with bone metastasis.

[**Keywords**] breast cancer; bone metastasis; Xihuang Pill; bioinformatics; network pharmacology; nomogram

乳腺癌是全球第一大恶性肿瘤,发病率 11.7%,死亡率 6.9%,严重危害女性生命健康<sup>[1]</sup>。晚期乳腺癌患者中 65%~75%发生骨转移,常伴有骨痛、骨相关事件、骨损伤等,治疗上以控制肿瘤进展、缓解疼痛、改善生活质量为原则,在化学药物治疗、内分泌治疗、靶向治疗、免疫治疗等多学科综合治疗控制乳腺癌原发灶的基础上,加用双磷酸盐、地舒单抗等骨改良药物,治疗骨相关事件<sup>[2]</sup>。在整体观念、辨证论治理论指导下,中医药治疗乳腺癌骨转移发挥着重要作用,可有效提高乳腺癌患者生存率及生活质量,中西医结合方案具有协同增益的效用<sup>[3]</sup>。西黄丸作为广谱抗肿瘤中成药,联合唑来膦酸能显著提高乳腺癌骨转移患者的临床疗效及生存质量<sup>[4]</sup>。研究表明,miRNA 对乳腺癌的生长以及转移有着重要作用<sup>[5]</sup>,且 miRNA 可作为乳腺癌治疗以及生存预后的生物标志物<sup>[6]</sup>。miRNA-556-5p 能与靶基因 3'UTR 相结合,调控乳腺癌细胞的迁移、侵袭和上皮-间质转化,在乳腺癌骨转移中发挥着调控作用<sup>[7]</sup>。为进一步明确乳腺癌骨转移分子机制,本研究以西黄丸干预乳腺癌骨转移为切入点,以 miRNA-mRNA 互作为落脚点,综合多个数据库信息,采用网络药理学联合生物信息学的方法,明晰西黄丸治疗乳腺癌骨转移的分子机制及药物干预靶点,为乳腺癌骨转移的药物干预靶点及生物标志物的确定提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 西黄丸干预乳腺癌骨转移 miRNA-mRNA 互作关系构建

通过 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 分别获取 GPL21572 探针的乳腺癌 miRNA (GSE143564) 与 GPL570 探针的基因 (GSE42568) 表达微阵列数据。GSE143564 表达矩阵中,将 GSM4262013~GSM4262015 样本分为正常组 (Normal 组), GSM4262016~GSM4262018 样本分为乳腺癌组 (Tumor 组); GSE42568 表达矩阵中,将 GSM1045191~GSM1045207 样本分为正常组 (Normal 组), GSM1045208~GSM1045311 分为乳腺癌组 (Tumor 组)。采用 R 语言 "limma" 包,以  $\log_2FC > 1$  或  $\log_2FC < -1$ , 且  $P < 0.05$  为筛选条件<sup>[8]</sup>, 差异分析 GSE143564、GSE42568 表达矩阵, 分别筛选出差异 miRNA (differentially expressed microRNAs, DEMs) 与差异基因 (differentially expressed genes, DEGs), 绘制 DEMs 环形聚类热图、DEGs 火山图与前 20 位 DEGs 热图 (基于  $\log_2FC$  绝对值)。

通过 TargetScan 数据库 ([http://www.targetscan.org/vert\\_80/](http://www.targetscan.org/vert_80/)), 逐一检索 DEMs 靶基因 (differentially expressed microRNA target genes, DEMTGs), 构建 DEMs-DEMTGs 映射关系。

通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>), 以 "bone metastasis" 为检索词, 获取骨转移基因 (bone metastasis

genes, BMGs)。

通过 TCMSP(<https://tcmsp-e.com/>)、TCMID(<http://47.100.169.139/tcmid/search/>)数据库,获取西黄丸中牛黄、麝香、乳香、没药的有效组分。通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库,获取西黄丸各有效组分 SMILES 号或结构式。通过 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库,获取西黄丸潜在药物靶点(Xi Huang Wan Genes, XHWGs)。

通过在线韦恩图工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>),取 DEGs、DEMTGs、BMGs、XHWGs 4 个分子靶点交集,获取西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点。

通过 DEMs-DEMTGs 映射关系,映射西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点的上游 DEMs,采用 Cytoscape 3.8.2 构建 miRNA-mRNA 互作关系。

## 1.2 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因筛选及富集分析

通过 STRING(<https://cn.string-db.org/>)数据库<sup>[9]</sup>,获取西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。采用 Cytoscape 3.8.2 对 PPI 网络进行可视化,使用 CytoHubba 中 MCC 算法对 PPI 网络进行拓扑分析,获取西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因。采用 R 语言“clusterProfiler”包对西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点进行基因本体论(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。根据 DEMs-DEMTGs 映射关系,采用 Cytoscape 3.8.2 构建西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因 miRNA-mRNA 核心网络。

## 1.3 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因表达差异分析及数据库验证

采用 R 语言,以 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)数据库中乳腺浸润癌患者 RNAseq 数据及临床信息作为验证集,取 1109 例乳腺浸润癌患者 RNAseq 数据与 113 例癌旁样本 RNAseq 数据进行非配对样本 *t* 检验,将 113 例癌旁组织作为正常组,113 例癌旁组织对应的乳腺癌组织作为肿瘤组,进行配对样本 *t* 检验,以验证西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因的表达。

通过 HPA (<https://www.proteinatlas.org/>)数据库,获取西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因的相对表达免疫组化结果。

## 1.4 西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点预后分析

通过 TCGA 数据库,采用 R 语言“glmnet”“survival”包对西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点进行 Lasso 回归分析,十折交叉验证法筛选 Lasso 的值,

构建系数筛选图与变量轨迹图。

通过 TCGA 数据库,采用 R 语言“survminer”“survival”包,Kaplan-Meier 曲线参数法构建分子靶点与患者总体生存期(overall survival, OS)的生存曲线,评判分子靶点高、低表达在乳腺癌中的生存预后价值;采用 R 语言“pROC”包构建受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC),分析 Lasso 回归筛选后的西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点的表达的诊断价值。

通过 TCGA 数据库,采用 R 语言构建西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点的表达与 Hub 基因之间的相关性,将分子靶点表达量的中位数作为截断值,分为高、低表达组,将 Hub 基因的表达量进行 Z-score 转换, $Zscore = (\text{表达量} - \text{均值}) / \text{标准差}$ ,并进行热图可视化。

通过 TCGA 数据库,以临床 TNM 分期、年龄、病理阶段、分子靶点表达为自变量,以生存预后为因变量,采用 R 语言单因素 Cox 回归分析得到风险比(hazard ratio, HR),构建临床信息与分子靶点预后模型,HR>1 为危险因素,HR<1 为保护因素。

## 1.5 统计学分析

通过 TCGA 数据库,采用非配对样本 *t* 检验对 ADRB1 相关的 miRNA 进行差异表达分析,符合正态性和方差齐性时采用独立样本 *t* 检验;仅符合正态性而不满足方差齐性时采用 Welch *t* 检验;均不满足正态性时采用 Wilcoxon 秩和检验。采用 R 语言“pROC”包构建 ROC 曲线,分析 ADRB1 相关差异表达的 miRNA 的诊断价值。采用 R 语言“rms”包对 ADRB1 相关差异表达的 miRNA 构建列线图,设置标尺评分来表征各个 miRNA 的表达情况,计算总评分预测 OS 生存预后的概率。

## 2 结果

### 2.1 西黄丸干预乳腺癌骨转移 miRNA-mRNA 互作关系

以 GPL570 为探针的 GSE42568 芯片差异分析出 3364 个 DEGs,其中 1689 个在乳腺癌中高表达,1675 个在乳腺癌中低表达(图 1A)。根据差异倍数 log<sub>2</sub>FC 的值,分别将高表达、低表达前 20 位 DEGs 可视化并进行欧式聚类,KRT19、COL11A1、EPCAM 等在乳腺中高表达,LEP、RBP4、ADH1B 等在乳腺癌中低表达(图 1B)。以 GPL21572 为探针的 GSE143564 芯片差异分析出 159 个 DEMs,其中 140 个(miR-182、miR-494-3p、miR-3651 等)在乳腺癌中高表达,19 个(miR-6722、miR-6732-5p、miR-8057 等)在乳腺癌中低表达,并将其欧式聚类及环形可视化(图 1C)。

通过 TargetScan 数据库,共构建了 353 583 组



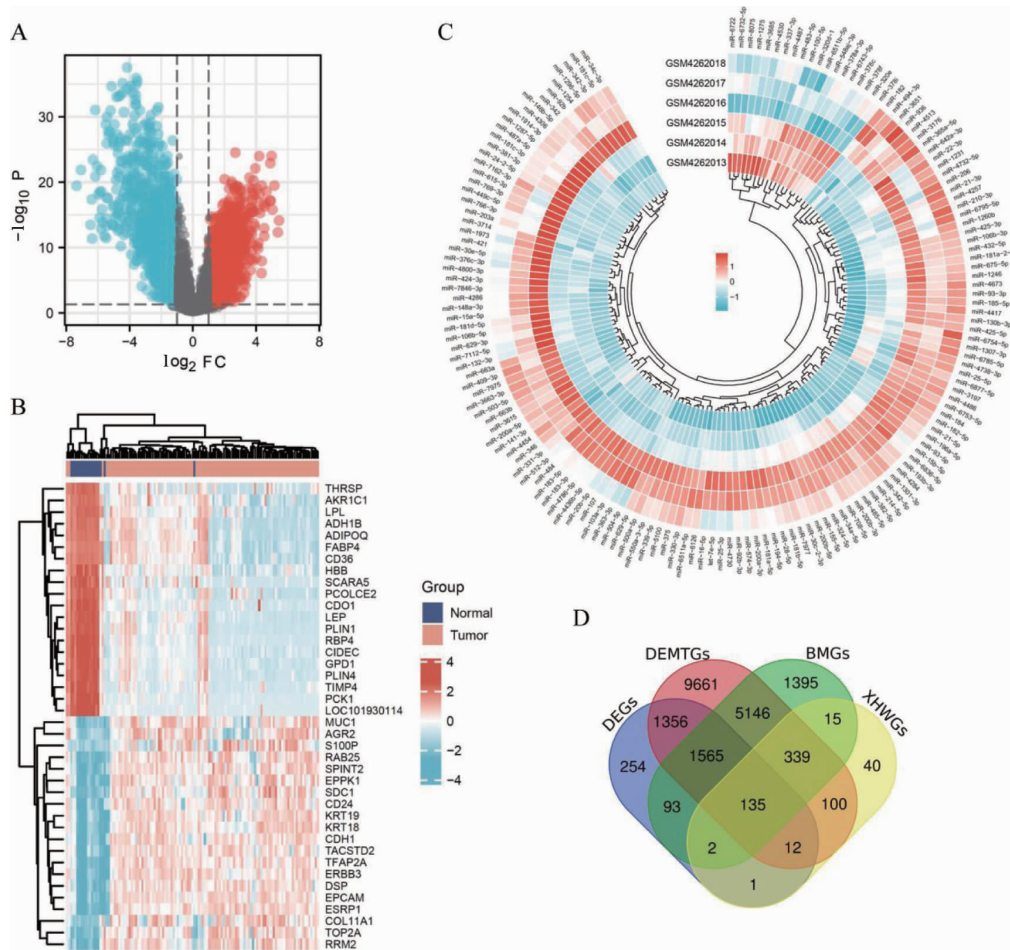


图1 西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点筛选

注:A.DEGs火山图;B.前20位DEGs聚类热图;C.DEMs环形聚类热图;D.西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点韦恩图。

DEMs-DEMTGs 映射关系;通过 GeneCards、OMIM 数据库,共获取 8690 个 BMGs;通过 TCMS、TCMID 数据库,获取牛黄有效组分(脱氧胆酸、甲基脱氧胆酸等)共 5 个、麝香有效组分(17- $\beta$ -雌二醇、麝香醇、尿囊素等)共 59 个、乳香有效组分( $\alpha$ -乳香酸、3-羟基甘遂酸、因香酚等)共 8 个、没药有效组分(逆没食子酸、天竺葵素、植物类固醇 IV 等)共 45 个,进一步通过 SwissTargetPrediction 数据库共获取 644 个 XHWGs;取 DEGs、DEMTGs、BMGs、XHWGs 交集,共获取 135 个西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点(图 1D)。

采用 Cytoscape 3.8.2 对 135 个西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点构建 miRNA-mRNA 互作关系,135 个分子靶点与 196 个 miRNA 构建出 2964 组 miRNA-mRNA 互作关系。详见图 2。

## 2.2 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因筛选及 GO、KEGG 富集分析

通过 STRING 数据库构建的西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点 PPI 网络中,共有 135 个节点蛋白,构成 666 组 PPI 关系( $P < 0.01$ )。PPI 网络初步分析结果发现 EGFR、IL-6、PPARG 蛋白 Degree 值最大,相

互作用最强(图 3A)。MCC 算法拓扑分析筛选出前 10 位作为 Hub 基因,分别为 CCL2、SIRT1、EGFR、PPARG、IL-6、CASP1、PTGS2、MMP-9、BCL2L1、ESR1,并进行可视化(图 3B)。GO、KEGG 共富集出 1589 个生物进程(biological process, BP)、26 个细胞组分(cell component, CC)、133 个分子功能(molecular function, MF)、112 个 KEGG 通路,其中西黄丸治疗乳腺癌骨转移的机制可能与其影响膜上受体蛋白的蛋白酪氨酸激酶活性、激活 MAPK 信号通路、参与乳腺癌骨转移的脂质代谢等生命进程有关(图 3C)。采用 Cytoscape 3.8.2 对 10 个 Hub 基因构建 miRNA-mRNA 核心网络,10 个 Hub 基因与 95 个 miRNA 构建出 175 组 miRNA-mRNA 核心互作关系(图 3D)。

### 2.3 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因表达差异及数据库验证结果

以 TCGA 数据库为验证集,非配对与配对样本 *t* 检验发现(图 4A、B):西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因中,CCL2、SIRT1、EGFR、PPARG、IL-6、CASP1、PTGS2 在乳腺癌中低表达;MMP-9、BCL2L1、ESR1 在乳腺癌样本中高表达。进一步通过 HPA 数据库比较乳腺癌患者中 10 个 Hub 基因免疫组化的相对

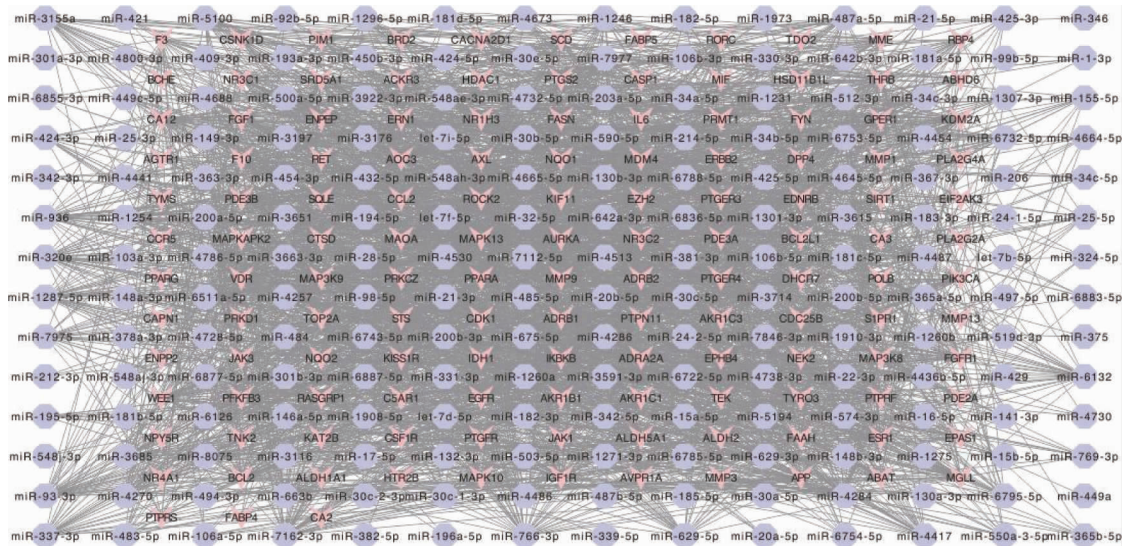


图2 西黄丸干预乳腺癌骨转移 miRNA-mRNA 互作关系

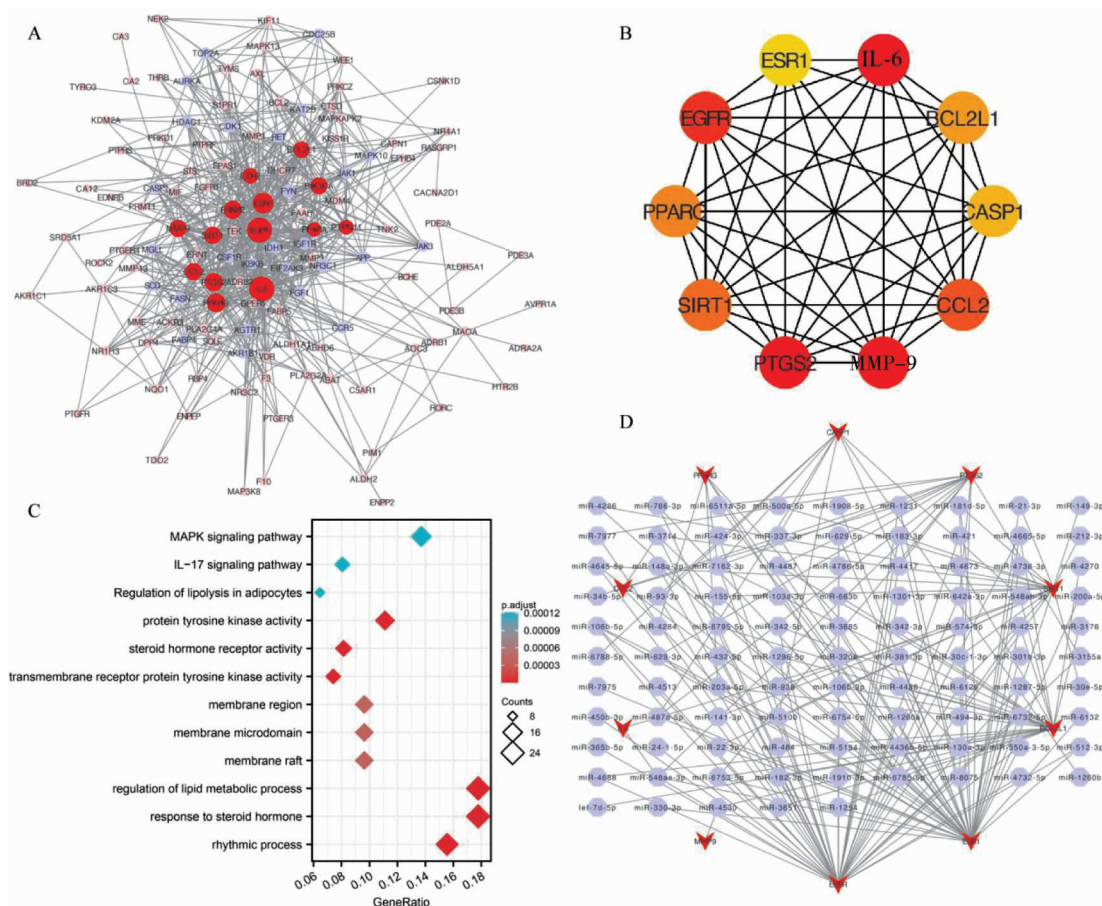


图3 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因及 GO、KEGG 富集分析结果

注:A.分子靶点 PPI 网络图;B.MCC 算法拓扑分析筛选 Hub 基因;C.分子靶点 GO、KEGG 富集分析;D.Hub 基因 miRNA-mRNA 核心网络。

高、低表达的结果(图 4C),此结果与 GSE42568 差异分析结果相互佐证。

### 2.4 西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点预后分析结果

将 135 个西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点纳入 Lasso 回归分析中,构建系数筛选图与变量轨迹图(图 5A、B)对其进行降维处理,结果发现西黄

丸干预乳腺癌骨转移的分子靶点中,ADRB1 可作为乳腺癌独立预后因子。非配对与配对样本 *t* 检验发现(图 5C、D),ADRB1 在乳腺癌患者组织中低表达;Kaplan-Meier 曲线(图 5E)显示,ADRB1 高表达组具有较好的生存预后 ( $P < 0.05$ );ROC 曲线(图 5F)显示,ADRB1 在患者诊断中具有较高的诊断性 ( $AUC = 0.854, 95\% CI = 0.826 \sim 0.882$ )。进一步分析



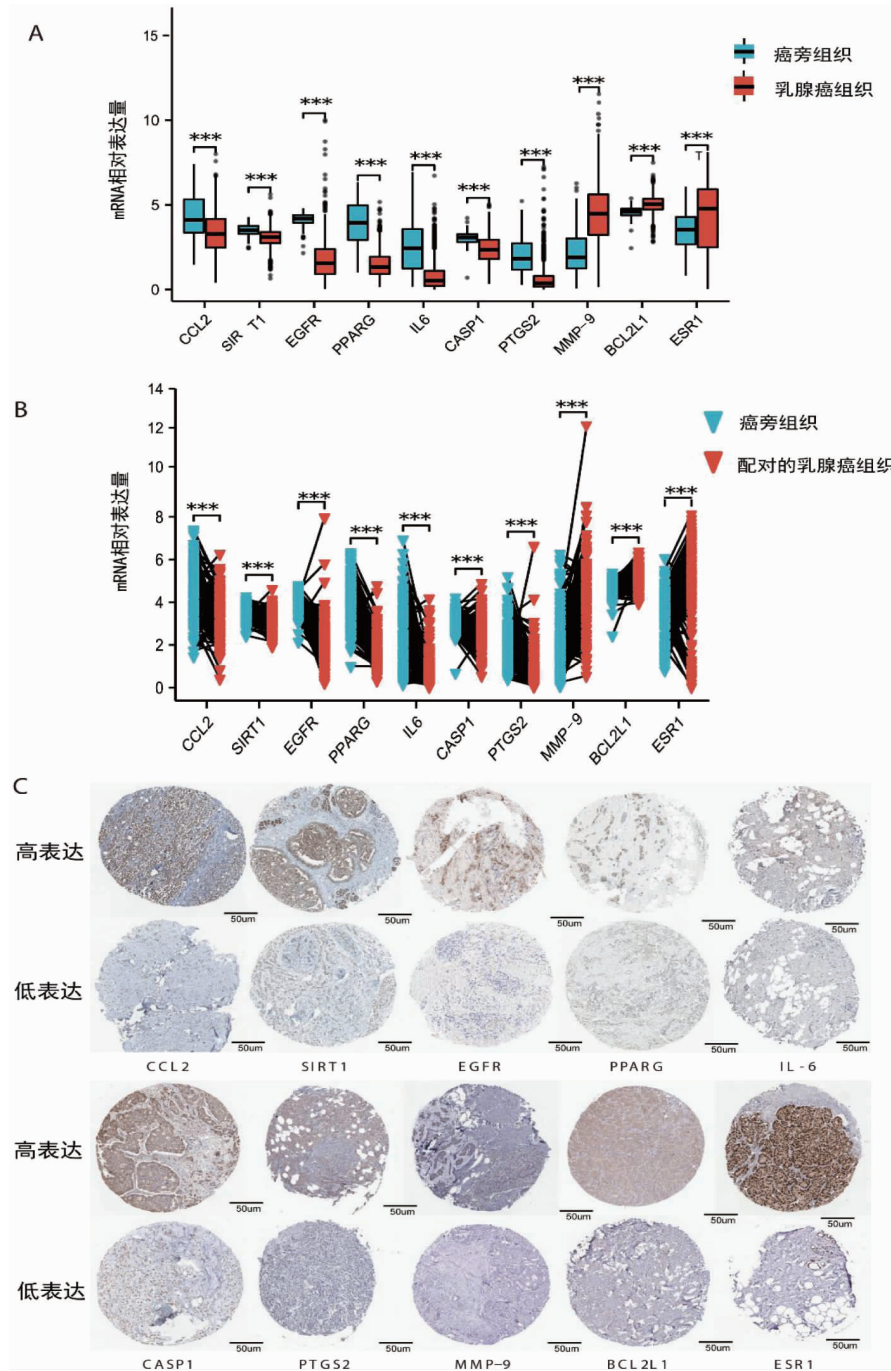


图 4 西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因表达及 HPA 数据库验证结果

注:A.非配对样本 *t* 检验柱状图,\*\*\* $P<0.001$ ;B.配对样本 *t* 检验柱状图,\*\*\* $P<0.001$ ;C.HPA 数据库免疫组化结果验证( $\times 400$ )。

ADRB1 与 10 个 Hub 基因表达的相关性并绘制相关性表达热图(图 5G),发现 ADRB1 与 CCL2、EGFR、PPARG、IL-6、CASP1、PTGS2 表达呈正相关( $P<0.01$ ); ADRB1 与 BCL2L1 表达呈负相关( $P<0.01$ )。

通过单因素 Cox 分析评估 ADRB1 表达及患者多种临床特征(图 6),发现在 TCGA 乳腺癌患者中,  $T_4$  分期、N 分期( $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_3$ )、M 分期、年龄、病理阶段(Stage III、Stage IV)、ADRB1 高表达与患者 OS 显著相关( $P<0.05$ ),进一步多因素 Cox 分析发现 M 分期为危险因素( $P<0.05$ )、年龄为危险因素( $P<0.001$ )、

ADRB1 高表达为保护因素( $P<0.05$ ),与患者 OS 显著相关。

### 2.5 ADRB1 相关 miRNA 差异表达、诊断及预后列线图结果

通过“1.1”构建的 DEMs-DEMTGs 映射关系,映射出与 ADRB1 相关的 miRNA 共 12 个,分别为 hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-629-3p、hsa-miR-1246、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-3615、hsa-miR-4436b-5p、hsa-let-7d-5p、hsa-miR-30a-5p、hsa-miR-93-3p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-183-3p、hsa-miR-

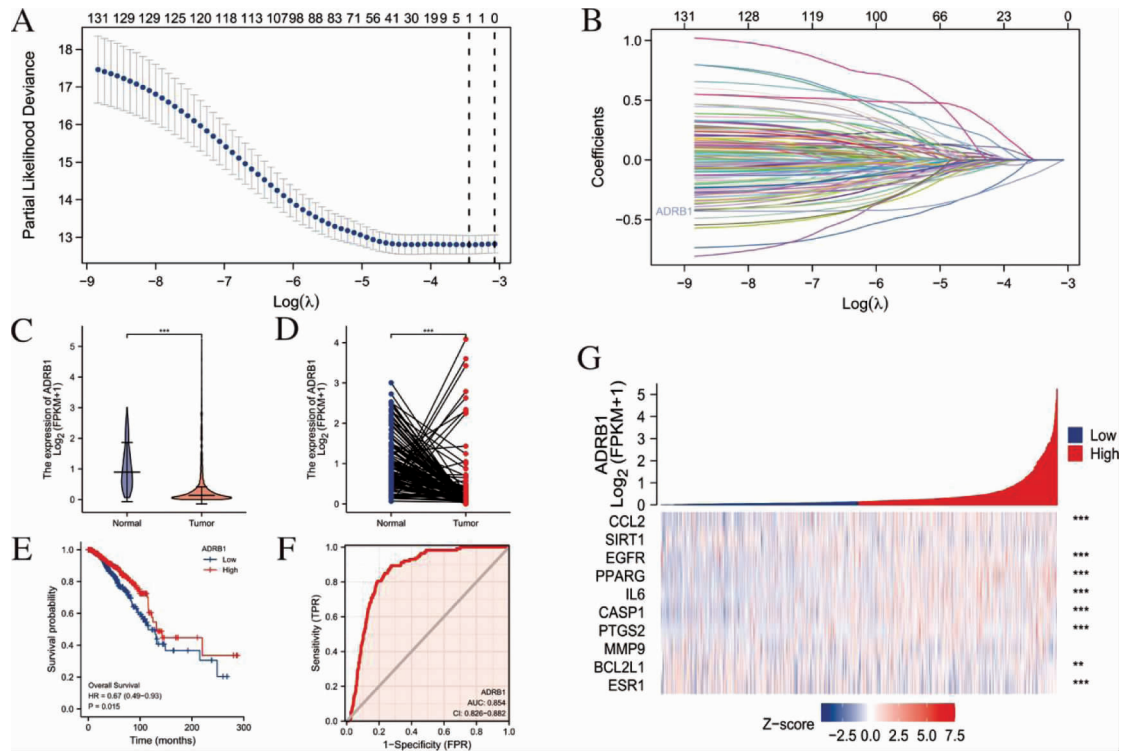


图5 西黄丸干预乳腺癌骨转移分子靶点预后分析

注:A.Lasso 回归系数筛选图;B.Lasso 回归变量轨迹图;C.ADRB1 在乳腺癌中表达非配对样本 *t* 检验小提琴图,\*\*\**P*<0.001; D.ADRB1 在乳腺癌中表达配对样本 *t* 检验散点图,\*\*\**P*<0.001;E.ADRB1 生存曲线;F.ADRB1 诊断 ROC 曲线;G.ADRB1 与西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因相关性热图。

Characteristics	N	HR(95%CI)	<i>P</i> 值
T1	276	Reference	
T2	629	1.334 (0.889-2.002)	0.164
T3	139	1.572 (0.933-2.649)	
T4	35	3.755 (1.957-7.205)	<0.001
N0	514	Reference	
N1	357	1.956 (1.329-2.879)	<0.001
N2	116	2.519 (1.482-4.281)	<0.001
N3	76	4.188 (2.316-7.574)	<0.001
M0	902	Reference	
M1	20	4.254 (2.468-7.334)	<0.001
≤60	601	Reference	
>60	481	2.020 (1.465-2.784)	<0.001
Stage I	180	Reference	
Stage II	619	1.697 (0.985-2.922)	0.057
Stage III	242	2.962 (1.664-5.273)	<0.001
Stage IV	18	11.607 (5.569-24.190)	<0.001
ADRB1(Low)	540	Reference	
ADRB1(High)	542	0.672 (0.487-0.926)	0.015

图6 ADRB1 表达与多个临床特征的单因素 Cox 回归分析森林图

320e。再通过非配对样本 *t* 检验发现 (图7A), hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-4665-5p, hsa-miR-3615, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-183-3p 在乳腺癌组织中过表达 (*P*<0.001), 而 hsa-miR-1246, hsa-miR-

4436b-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-320e 在乳腺癌与正常组织中表达差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

对上述 8 个差异表达的 miRNA 构建诊断 ROC 曲线 (图 7B), 发现均具有诊断价值, 可作为乳腺癌骨转移的生物标志物 (*P*<0.05), 其中 AUC 由高到低排序依次为: hsa-miR-141-3p>hsa-miR-183-3p>hsa-miR-629-3p>hsa-let-7d-5p>hsa-miR-93-3p>hsa-miR-3615>hsa-miR-4665-5p>hsa-miR-500a-5p; 0.5≤AUC<0.7 为较低准确性, 0.7≤AUC<0.9 为中度准确性, 0.9≤AUC 为高度准确性。

对上述 8 个差异表达的 miRNA 构建列线图 (图 7C), 差异表达 miRNA 可用来预测乳腺癌骨转移患者 1、2、3 年生存预后, 此预测模型的一致性指数 C-index 为 0.588(0.556~0.619)。

### 3 讨论

乳腺癌骨转移属于中医学“骨瘤”“顽痹”“骨蚀”等范畴<sup>[9]</sup>。正气不足, 髓不充骨, 癌邪乘虚侵袭入骨, 气、血、痰、毒、湿邪蕴积搏结于局部, 且久郁化火, 阻滞气血津液运行, 搏结伤骨发而为瘤<sup>[11]</sup>。且乳腺癌骨转移多伴有骨痛, 其病性证素多为气滞、血瘀<sup>[12]</sup>。西黄丸由牛黄、麝香、乳香、没药组成, 方中牛黄清热解毒、消肿化痰, 麝香活血散瘀、消肿止痛, 二者配伍, 一寒一温, 共奏透邪行气化瘀之功; 佐以乳香、没药

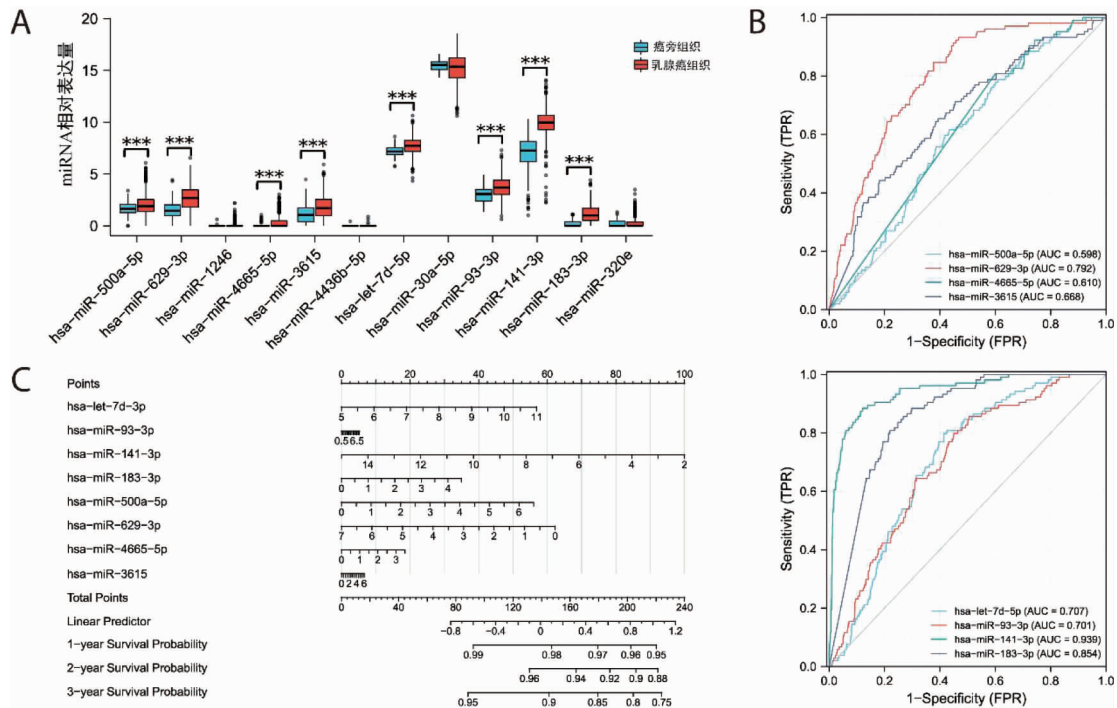


图 7 ADRB1 相关 miRNA 差异表达、诊断及预后列线图结果

注:A.ADRB1 相关的 miRNA 非配对样本 *t* 检验柱状图,\*\*\**P*<0.001;B.差异表达 miRNA 诊断价值 ROC 曲线;C.差异表达 miRNA 列线图。

祛邪扶正、消肿止痛、调气活血,四药合用,共奏软坚散结、清热解毒、散瘀止痛之效<sup>[13]</sup>。研究发现,西黄丸主要活性成分有五环三萜类(如乳香酸类)、挥发油类、甾体类(如猪去氧胆酸),均具有抗肿瘤的作用<sup>[14]</sup>,且西黄丸还有改变乳腺癌的肿瘤炎症微环境的作用<sup>[15]</sup>。研究发现,西黄丸联合唑来膦酸治疗乳腺癌骨转移总有效率为 82.5%,能有效提高机体免疫及骨质修复能力,改善生活质量<sup>[4]</sup>。SINGH 等<sup>[16]</sup>发现 miRNAs 直接参与了骨组织中乳腺肿瘤的转移;CAI 等<sup>[17]</sup>发现,miR-124 被抑制可促进体内乳腺癌细胞的骨转移,且在乳腺癌转移性骨组织中 miR-124 显著减少;FENG 等<sup>[18]</sup>发现 miR-124 过表达可抑制破骨细胞生成,从而抑制乳腺癌骨转移。在西黄丸干预乳腺癌骨转移明显有效的背景下,以 miRNA-mRNA 相互作用为模式,进一步寻找乳腺癌骨转移预后相关的生物标志物、驱动基因及药物干预靶点具有重要意义。

本研究采用生物信息学及网络药理学方法,发现西黄丸中脱氧胆酸、麝香醇、 $\alpha$ -乳香酸、逆没食子酸等多个有效组分,共同调控 EGFR、IL-6、PPARG 等 135 个乳腺癌骨转移的分子靶点。西黄丸干预乳腺癌骨转移的机制可能与干预膜上受体蛋白的酪氨酸激酶活性、激活 MAPK 信号通路以及参与乳腺癌骨转移的脂质代谢等生命进程有关。同时,本研究构建了 135 个乳腺癌骨转移分子靶点与 196 个乳腺癌差异 miRNA 交互作用关系网络,构建出 2964 组 miRNA-mRNA 交互作用关系网络,锚定了 10 个 Hub 基

因与 95 个 miRNA,构建出 175 组 miRNA-mRNA 核心互作关系,为乳腺癌骨转移生物标志物的筛选提供了依据。KIM 等<sup>[19]</sup>研究发现 15d-PGJ2 通过 PPARG 非依赖性途径,在胞内抑制 RANKL 表达及活性,抑制乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和乳腺癌小鼠骨小梁的破坏。

在 TCGA 中验证 Hub 基因差异表达及临床相关性,研究发现西黄丸干预乳腺癌骨转移 Hub 基因中,CCL2、SIRT1、EGFR、PPARG、IL-6、CASPI、PTGS2 在乳腺癌样本中低表达;MMP-9、BCL2L1、ESR1 在乳腺癌样本中高表达,与差异分析结果和免疫组化结果相互佐证。Lasso 回归分析聚焦出 ADRB1 是乳腺癌患者的独立预后因子,具有良好的诊断价值及生存预后预测价值,且与 CCL2、EGFR、PPARG、IL-6、CASPI、PTGS2 表达呈正相关;ADRB1 与 BCL2L1 表达呈负相关,进一步 Cox 回归分析发现乳腺癌远处转移的 M 分期、年龄是主要危险因素,而 ADRB1 高表达为保护因素,三者与患者 OS 显著相关。WANG 等<sup>[20]</sup>通过生物信息学方法,对乳腺癌肿瘤突变负荷和免疫浸润进行分析,鉴定出 ADRB1 是乳腺癌的潜在生物标志物,但是 ADRB1 在乳腺癌骨转移中尚无报道,且未得到实验验证的结果。基于此,认为 ADRB1 可能是乳腺癌骨转移的有效药物干预靶点,为后续实验研究提供了理论依据。

基于 miRNA-mRNA 互作模式,聚焦 ADRB1 的相关 miRNA,进一步寻找乳腺癌骨转移的 miRNA



生物标志物,并构建临床预测模型列线图,发现hsa-miR-500a-5p、hsa-miR-629-3p、hsa-miR-4665-5p、hsa-miR-3615、hsa-let-7d-5p、hsa-miR-93-3p、hsa-miR-141-3p、hsa-miR-183-3p在乳腺癌组织中高表达,且AUC均大于0.5,具有良好的诊断价值,并构建了8个miRNA的列线图(C-index=0.588),可认为此8个miRNA可作为乳腺癌骨转移的生物标志物。KAWAGUCHI等<sup>[21]</sup>综合分析TCGA、GEO数据库,开发了乳腺癌转移和不良预后的miRNA预测模型,其中包括has-miR-19a、has-miR-93和has-miR-106a,与本研究构建的预测模型相互佐证。基于此,本研究认为基于8个miRNA开发的预后模型,可预测乳腺癌骨转移的不良预后。

综上所述,本研究基于miRNA-mRNA互作模式,采用生物信息学联合网络药理学的方法,综合分析多个数据库资源,阐述了西黄丸干预乳腺癌骨转移的分子机制与其多组分调控ADRB1等多靶点、介导MAPK等多通路、参与多生物进程有关,同时聚焦出8个与乳腺癌骨转移预后不良有关的miRNA,建立了预测模型,为开发治疗乳腺癌骨转移药物以及乳腺癌骨转移生物标志物的确定提供了潜在价值,对中医药的现代化推广具有重要意义。

## 参考文献

- [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: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会.中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021年版)[J].*中国癌症杂志*,2021,31(10):954-1040.
- [3] 中国中西医结合学会肿瘤专业委员会.乳腺癌中西医结合诊疗共识[J].*中国医学前沿杂志(电子版)*,2021,13(7):44-64.
- [4] 贾文娟,田菲,邢秀玲,等.西黄丸联合唑来磷酸注射液治疗乳腺癌骨转移瘤的临床研究[J].*世界科学技术(中医药现代化)*,2009,11(3):450-453.
- [5] SUN D P, LI C G, ZHANG F X. microRNA-206 suppresses growth and metastasis of breast cancer stem cells via blocking EVI-1-mediated CALR expression[J]. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0274919.
- [6] BALDASICI O, BALACESCU L, CRUCERIU D, et al. Circulating small EVs miRNAs as predictors of pathological response to neo-adjuvant therapy in breast cancer patients[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12625.
- [7] ZHOU R J, LUO Z, YIN G Q, et al. miR-556-5p modulates migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells via targeting PTHrP[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2022, 53(2): 297-308.
- [8] MIRALAEI N, MAJD A, GHAEDI K, et al. Integrated pan-cancer of AURKA expression and drug sensitivity analysis reveals increased expression of AURKA is responsible for drug resistance[J]. *Cancer Medicine*, 2021, 10(18): 6428-6441.
- [9] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurements sets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49 (D1): D605-D612.
- [10] 毛 昀, 李林璐, 褚雪镭, 等.论乳腺癌骨转移中医病机治法[J].*辽宁中医药大学学报*,2021,23(10):44-47.
- [11] 毛 昀, 陈 峥, 褚雪镭, 等.国医大师朱良春治疗骨转移临证经验[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(9):1101-1105.
- [12] 赖桂花, 闫钰婷, 程雄涛, 等.基于证素辨证理论探讨骨转移癌瘤的中医辨证分型[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(3):324-328.
- [13] 夏顺利, 王 雪, 翟勇聪, 等.西黄丸抗肿瘤作用机制及其联合抗肿瘤研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2021,27(6):217-225.
- [14] 杨雨婷, 曾 瑾, 陈 平, 等.西黄丸抗肿瘤临床应用及药理作用机制研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2022,28(3):250-258.
- [15] WU J F, LUO D P, LI S N. Network pharmacology-oriented identification of key proteins and signaling pathways targeted by xihuang pill in the treatment of breast cancer[J]. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 2020, 12: 267-277.
- [16] SINGH Y, SUBBARAO N, JAIMINI A, et al. Genome-wide expression reveals potential biomarkers in breast cancer bone metastasis[J]. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2022, 19(3): 20210041.
- [17] CAI W L, HUANG W D, LI B, et al. microRNA-124 inhibits bone metastasis of breast cancer by repressing Interleukin-11[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17(1): 9.
- [18] FENG Q, WANG D, FENG J, et al. Denosumab inhibits MCF-7 cell line-induced spontaneous osteoclastogenesis via the RAN-K1/MALAT1/miR-124 axis[J]. *Translational Cancer Research*, 2020, 9(4): 2482-2491.
- [19] KIM K R, KIM H J, LEE S K, et al. 15-deoxy- $\delta$ 12, 14-prostaglandin j2 inhibits osteolytic breast cancer bone metastasis and estrogen deficiency-induced bone loss[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122764.
- [20] WANG J, ZHANG X L, LI J, et al. ADRB1 was identified as a potential biomarker for breast cancer by the co-analysis of tumor mutational burden and immune infiltration[J]. *Aging*, 2020, 13(1): 351-363.
- [21] KAWAGUCHI T, YAN L, QI Q Y, et al. Novel microRNA-based risk score identified by integrated analyses to predict metastasis and poor prognosis in breast cancer[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2018, 25(13): 4037-4046.

(本文编辑 周 旦)