

左归丸对乳腺癌骨转移“标本同治”的潜在机制研究^{*}

赵旭^{*} 周才杰 陈龙娇

摘要 目的:通过基因表达谱分析、网络药理学分析及生物信息学挖掘,构建乳腺癌骨转移疾病分子模型并系统探索左归丸“标本同治”的理论依据。**方法:**①下载GEO数据库相关数据后以表达谱分析筛选差异基因,使用韦恩分析求得其与CTD、GeneCards数据库中乳腺癌、肿瘤转移及骨质疏松症的交集作为乳腺癌骨转移的可能核心靶点;使用蛋白质互作分析构建疾病分子模型后以Cytoscape软件实行可视化,挖掘其中的功能模块并行GO和KEGG生物信息学富集分析。②在TCMSP和TCMID数据库中筛选左归丸的活性成分,使用BATMAN预测其靶点后获取与疾病靶点的交集基因,使用Cytoscape软件构建药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理学网络,根据连接度筛选重要节点以预测该方的关键药物、活性成分及相应靶标和生物学通路。**结果:**①乳腺癌骨转移的224个潜在核心靶点可划分为上下调趋势高度统一的两个功能模块,细胞分裂、细胞周期等相关基因下调,而PI3K-Akt信号通路、局灶性黏附等生物学通路相关基因上调。②枸杞子、山茱萸、山药可能是左归丸治疗本病的核心药物;烟酸、马兜铃酮、瓜氨酸,豆甾醇、胡萝卜素类等是其活性成分;潜在关键靶点为ASPA、RARRES1、SRD5A1、GOT1、PPAT、HSP90AB1和AURKA等;而“流体剪切应力和粥样硬化通路”则可能是该方调控的重要通路。**结论:**与未发生骨转移者比较,乳腺癌骨转移可能存在某些特异性分子靶点及通路;左归丸通过调控部分特异性靶点和通路发挥对乳腺癌骨转移的“标本同治”功效。

关键词 乳腺癌;骨转移;基因表达谱分析;网络药理学;生物信息学;左归丸;标本同治

乳腺癌素有“世界女性第一癌”之称,而骨骼作为乳腺癌最常见的转移部位之一,在疾病发生、发展中扮演着重要角色^[1]。据报道,约25%早期乳腺癌患者可出现骨转移^[2],晚期患者合并骨转移的比率高达70%~80%^[3,4]。乳腺癌骨转移常表现为剧烈骨痛、病理性骨折、高钙血症和脊髓压迫等,严重影响患者生活质量并明显缩短生存期^[5,6]。目前临床常规治疗方法如手术、放疗、化疗及免疫治疗等,虽可在一定程度上延缓疾病进展,但并非根治措施^[7-9]。乳腺癌骨转移的具体发病机制尚未完全明确,其病理改变多为溶骨性病变,故而与骨质疏松症具有一定相似性和相关性^[10,11]。研究证实,应用双膦酸盐等抑制骨转换、增加骨密度的药物,可在一定程度上延缓乳腺癌骨转移并

改善预后^[10,12],但由于该类药仅靶向破骨细胞,其抗肿瘤的作用并不明显^[13]。因此,深入挖掘乳腺癌骨转移的病变机制,并探索可同时靶向骨修复和抗肿瘤生长的“标本同治”策略,对攻克本病意义重大。

补肾填精名方左归丸对于骨质疏松症疗效确切且作用途径广泛^[14-17]。研究发现,该方可抑制乳腺癌骨转移的骨质破坏^[18-20],但其深层作用机制及是否具有抗癌效应,目前鲜有报道。中药复方成分复杂、作用靶点多样,因此,采用高通量检测和大数据挖掘为循证基础的主动性探索策略,可能更有利于凸显其多途径、多靶点的整体调节优势。本研究基于基因组学表达谱分析、网络药理学和生物信息学分析等大数据方法,在构建乳腺癌骨转移潜在分子疾病模型基础上,对左归丸的作用靶点及药效基础进行探索,旨在为系统阐释该方“标本同治”防治乳腺癌骨转移的科学内涵提供依据,也为其后期应用奠定理论基础。

^{*} 基金项目 深圳市基础研究面上项目(No. JCYJ20210324134610029)

^{*} 作者简介 赵旭,女,医学博士,副教授。研究方向:中医药“异病同治”机制及临床研究。

• 作者单位 北京中医药大学深圳医院(龙岗)(广东 深圳 518116)

1 材料与方法

1.1 乳腺癌骨转移的关键分子靶点筛选 目前常用的疾病靶点数据库未直接收录“乳腺癌骨转移”信息,故对与其相关度较高的3种疾病的靶点求取交集,以基因表达谱数据作参证,继续筛选出其中的重叠基因作为本病潜在的关键靶点。

1.1.1 基因表达谱数据获取与分析 从权威的基因表达谱数据库GEO(Gene Expression Omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>)中下载乳腺癌骨转移和乳腺癌非骨转移表达谱数据6例纳入分析(编号:GSE137842)。采用R软件中Affy包(<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/affy.html>,版本号:1.64.0)^[21]对原始数据进行背景校正、归一化和表达式计算。利用limma包(version 3.10.3, <http://www.bioconductor.org/packages/2.9/bioc/html/limma.html>)提供的经典贝叶斯方法^[22],筛选乳腺癌骨转移和非转移之间的差异表达基因并进行多重检验校正。筛选标准是校正后 $P < 0.05$ 且差异倍数 > 2 ($\log_2 \text{FC} > 2$)。

1.1.2 相关疾病基因筛选 介于“乳腺癌骨转移”的相关疾病背景包括乳腺癌、肿瘤转移等,且溶骨性的骨质破坏与骨质疏松症相类似,本研究以“乳腺癌(breast cancer)”“肿瘤转移(metastasis)”“骨质疏松症(osteoporosis)”为检索词,通过公认的疾病靶点数据库CTD(<https://ctdbase.org/>)、GeneCards(<https://www.genecards.org/>)查询相关基因,剔除其中重复基因后进行合并,再以在线工具韦恩分析“VENNY2.1”(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)获得3种疾病的交集基因。

1.1.3 乳腺癌骨转移的潜在核心基因筛选 使用韦恩分析继续求取以上2步的交集基因,锁定可能的核心基因。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 基因功能富集分析 使用R软件的clusterProfiler^[23]分析包对共有靶点参与的基因本体(Gene Ontology, GO)注释中的生物学过程和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway, KEGG)生物学通路进行富集分析,采用Benjamini-Hochberg方法进行多重检验校正^[23]。显著性富集结果的筛选阈值为:校正后 $P < 0.05$ 且富集基因个数 > 2 。

1.2.2 蛋白质互作网络分析 使用STRING11.0数

据库(<http://www.string-db.org/>)对共有靶点进行蛋白质与蛋白质互作关系分析(Protein-Protein Interaction, PPI),限定物种为“人”(Homo sapiens)。PPI关系对的筛选阈值为combined score > 0.400 。基于得到的PPI关系对,使用Cytoscape V3.7.2(<https://cytoscape.org/>)对其进行PPI网络的可视化。利用网络拓扑性指标“连接度(Degree Centrality)”计算节点在网络中的分值,依据分值从高到低筛选关键节点,并以cytoscape软件中的MCODE(<http://apps.cytoscape.org/apps/mcode>)插件进行功能模块分析,挖掘整体网络中紧密联系、发挥相同或相似功能的子网络,筛选阈值为score > 10 ^[24]。

1.3 左归丸治疗乳腺癌骨转移的药理学网络构建

1.3.1 药物成分检索 左归丸药物组成包括熟地黄、山茱萸、山药、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、龟板胶和川牛膝。以中药成分靶点权威数据库TCMSP^[25](<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和TCMID(<https://bidd.group/TCMID/index.html>)数据库互为补充,检索以上药物的化学成分。

1.3.2 活性成分筛选及靶点预测 将以上药物有效成分导入BATMAN在线工具(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>),预测活性成分的作用靶点,筛选得分(Score Cut-off值) > 20 的分子作为关键活性成分进入后续网络药理学分析。BATMAN-TCM(Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine)是首个特异性针对中药分子设计的权威生信分析工具,其包含数千味中药信息,可直接查询药物成分的潜在药效靶标,并支持同时检索多个中药,以研究药物配伍规律。此外,该分析由于可直接检索到靶点的常规基因名称而无需转化格式,已成为网络药理学分析的公认热点工具^[26]。

1.3.3 左归丸药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理学网络构建 使用韦恩分析获取BATMAN预测靶点与“1.1”中疾病关键分子的共有基因作为左归丸抗乳腺癌骨转移的可能靶标;整合富集分析提示的重要生物学通路,以Cytoscape软件构建药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理学网络。

2 结果

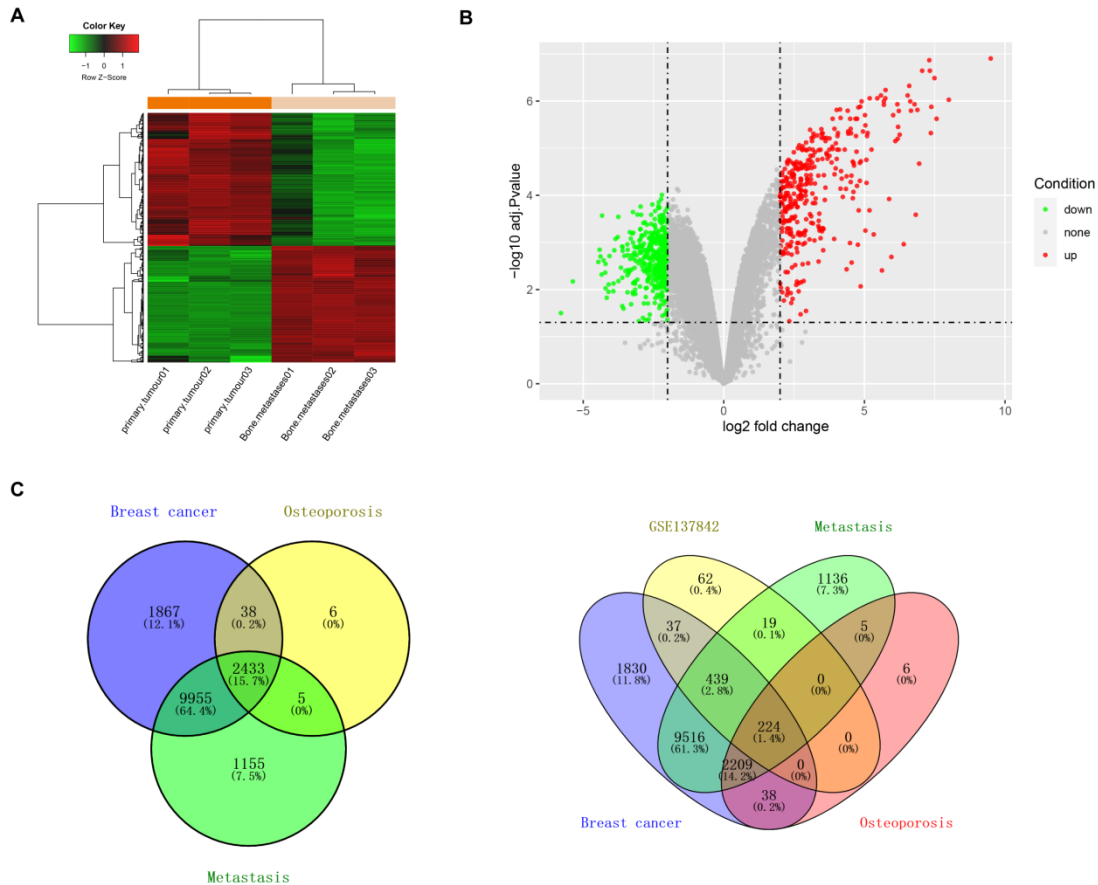
2.1 乳腺癌骨转移疾病分子模型构建与特征挖掘

2.1.1 基因表达谱生物信息学分析 GSE137842数据集中,与乳腺癌非骨转移样本相比,781个基因在乳

腺癌骨转移样本中显著差异表达,其中365个基因上调,416个基因下调(图1A及图1B)。

2.1.2 乳腺癌骨转移潜在关键基因的筛选 通过韦恩分析,在乳腺癌、骨质疏松症和肿瘤转移相关基因

中共发现2433个交集基因;将这些疾病的重叠基因与上步中得到的781个差异表达基因进一步取交集,最终锁定的224个共有基因(图1C)即为“乳腺癌骨转移”可能的核心靶点。



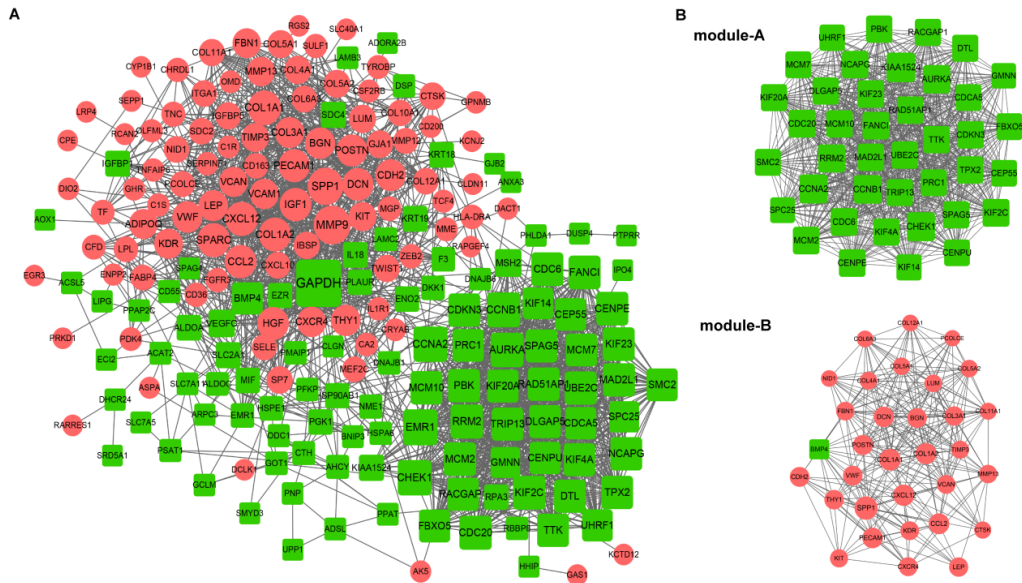
A为GSE137842数据集差异基因热图;B为GSE137842数据集差异基因火山图;C为韦恩图筛选各基因集的共有基因

图1 乳腺癌骨转移疾病潜在靶点筛选图

2.1.3 疾病分子模型构建及特征分析 用以上筛选出的224个潜在关键靶点,构建乳腺癌骨转移的疾病分子模型,并进一步通过PPI分析和基因功能富集等生物信息学分析挖掘疾病分子规律。PPI网络共包括208个节点分子(见图2A),通过MCODE分析可提取出两个子网络功能模块(见图2B),且两个模块内部靶点的上调或下调属性高度趋同,即模块A中的40个分子均为下调靶点,显著富集于细胞周期、卵母细胞减数分裂孕激素介导的卵母细胞成熟等通路,以及有丝核分裂、姐妹染色单体分离等生物学过程(见表1);模块B中包含32个靶点,除BMP4外都属上调分子,其主要参与蛋白质消化吸收、PI3K-Akt信号通路、局灶性黏附等信号通路,以及细胞外基质的组织、结缔组织发展、软骨发育等生物学过程(见表2)。在整个网

络中,连接度排名前10位的靶点中下调者有7个,如GAPDH、KIAA1524、CHEK1、CCNA2、CCNB1、AURKA和RRM2,而MMP9、SPP1、COL1A1表达上调。

2.2 左归丸活性成分筛选 通过检索TCMSP和TCMID数据库,共获得左归丸全方8味中药所包含的化合物总数为640种,其中,熟地黄76种,山茱萸226种,山药71种,枸杞子188种,菟丝子29种,鹿角胶2种,龟板胶7种,川牛膝41种。将以上药物有效成分导入BATMAN数据库中查询相关草药成分以及靶蛋白信息,设定score值>20作为筛选标准,共获得108种关键活性成分纳入后续分析。各药贡献的关键活性成分数量分别为:熟地黄2种,山茱萸20种,山药16种,枸杞子45种,菟丝子12种,鹿角胶2种,龟板胶7种,川牛膝4种。



A 为疾病潜在靶点的蛋白质互作网络图,绿色方形代表下调基因,红色圆形代表上调基因;B 为蛋白质互作网络中的两个功能模块

图 2 乳腺癌骨转移潜在靶点的互作分析图

表 1 乳腺癌骨转移潜在靶点的蛋白质互作网络模块 A 中基因显著富集的生物学过程和信号通路(排名前 10 位)

项目	描述	校正 P 值	基因
GO:0140014	有丝核分裂	2.36E-30	CHEK1, CCNB1, AURKA, CDC20, KIF2C, KIF23, CDC6, CENPE, MAD2L1, NCAPG, etc.
GO:0000070	有丝分裂姐妹染色单体分离	1.16E-27	CCNB1, CDC20, KIF2C, KIF23, CDC6, CENPE, MAD2L1, NCAPG, TTK, RACGAP1, etc.
GO:0000280	核分裂	2.09E-26	CHEK1, CCNB1, AURKA, CDC20, KIF2C, KIF23, CDC6, CENPE, MAD2L1, NCAPG, etc.
GO:0000819	姐妹染色单体分离	5.06E-26	CCNB1, CDC20, KIF2C, KIF23, CDC6, CENPE, MAD2L1, NCAPG, TTK, RACGAP1, etc.
GO:0048285	细胞器裂变	1.23E-25	CHEK1, CCNB1, AURKA, CDC20, KIF2C, KIF23, CDC6, CENPE, MAD2L1, NCAPG, etc.
hsa04110	细胞周期	8.86E-12	CCNA2, CHEK1, CCNB1, CDC20, MCM2, CDC6, MAD2L1, TTK, MCM7
hsa04114	卵母细胞减数分裂	4.13E-05	CCNB1, AURKA, CDC20, MAD2L1, FBXO5
hsa04914	黄体酮诱导的卵母细胞成熟	0.0002696	CCNA2, CCNB1, AURKA, MAD2L1
hsa04115	p53 信号通路	0.0020403	CHEK1, CCNB1, RRM2
hsa05166	人类 T 细胞白血病病毒 1 感染	0.0034666	CCNA2, CHEK1, CDC20, MAD2L1

表 2 乳腺癌骨转移潜在靶点的蛋白质互作网络模块 B 中基因显著富集的生物学过程和信号通路(排名前 10 位)

项目	描述	校正 P 值	基因
GO:0030198	细胞外基质的组织	1.48E-27	SPP1, COL1A1, COL1A2, PECAM1, DCN, POSTN, VWF, BGN, COL3A1, VCAN, etc.
GO:0043062	细胞外结构组织	1.59E-26	SPP1, COL1A1, COL1A2, PECAM1, DCN, POSTN, VWF, BGN, COL3A1, VCAN, etc.
GO:0030199	胶原原纤维组织	1.60E-11	COL1A1, COL1A2, COL3A1, LUM, COL5A1, COL5A2, COL11A1, COL12A1
GO:0061448	结缔组织发展	7.79E-09	COL1A1, BMP4, LEP, MMP13, LUM, COL5A1, CTSK, COL11A1, COL6A3, COL12A1
GO:0051216	软骨发育	1.76E-08	COL1A1, BMP4, LEP, MMP13, LUM, CTSK, COL11A1, COL6A3, COL12A1,
hsa04974	蛋白质消化吸收	1.14E-09	COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL11A1, COL6A3, COL12A1
hsa04512	细胞外基质受体交互	1.46E-05	SPP1, COL1A1, COL1A2, VWF, COL4A1, COL6A3
hsa04151	PI3K-Akt 信号通路	8.46E-05	SPP1, COL1A1, COL1A2, VWF, KDR, KIT, COL4A1, COL6A3
hsa04510	局灶性黏附	0.000274	SPP1, COL1A1, COL1A2, VWF, KDR, COL4A1, COL6A3
hsa05205	癌症蛋白聚糖	0.000653	COL1A1, COL1A2, DCN, KDR, TIMP3, LUM

2.3 药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理学网络构建与分析

2.3.1 左归丸的可能核心靶标筛选与生物信息学分

析 通过逐层筛选,最终确定 34 个关键靶标,这些靶标可能是左归丸改善骨质破坏并抗肿瘤,发挥防治乳腺癌骨转移“标本同治”功效的核心靶标。对这 34 个

关键分子进行GO生物学过程和KEGG通路富集分析,结果显示,细胞外基质结构成分、受体配体活动、细胞因子活性等可能是该方调控的重要生物学功能,

而其调控的关键生物学通路则为“流体剪切应力和动脉粥样硬化”和“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”等,见表3。

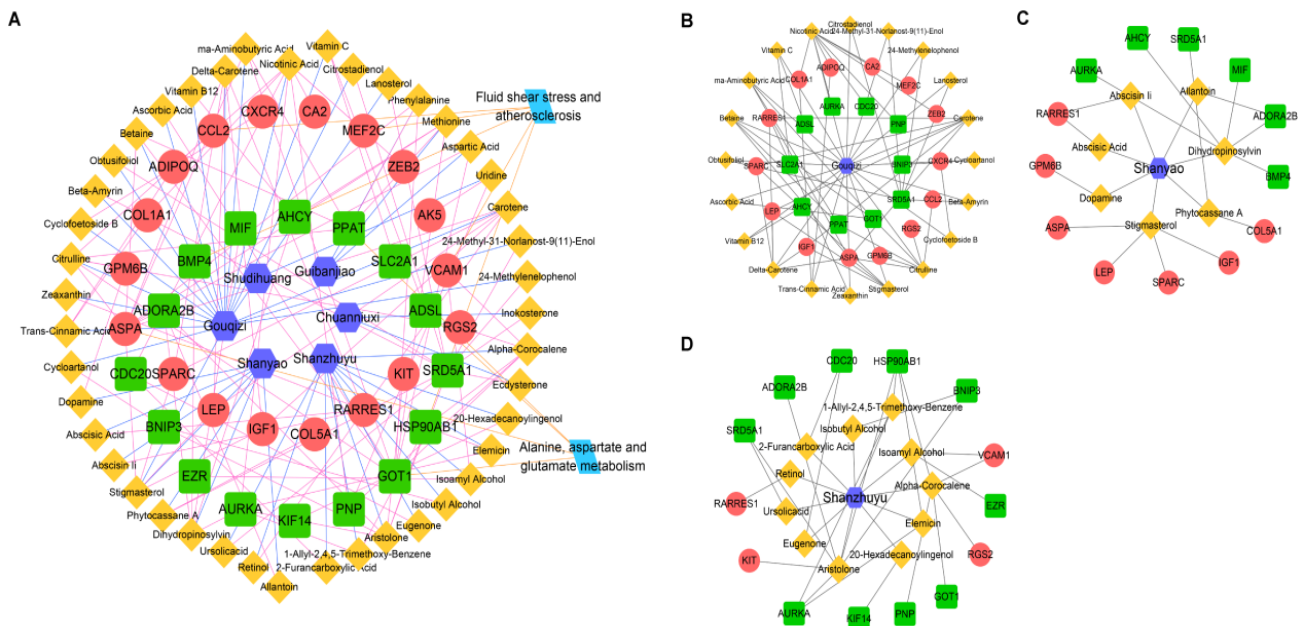
表3 关键靶标分子显著富集的生物学过程和信号通路(排名前10位)

项目	描述	校正P值	基因
GO:0005201	细胞外基质结构成分	0.0159531	COL1A1, COL5A1, ADIPOQ, SPARC
GO:0048018	受体配体活动	0.0159531	IGF1, CCL2, BMP4, LEP, ADIPOQ, MIF
GO:0005125	细胞因子的活性	0.0345872	CCL2, BMP4, ADIPOQ, MIF
GO:0042826	组蛋白脱乙酰酶结合	0.0386695	CDC20, HSP90AB1, MEF2C
GO:0097718	无序结构域特异性结合	0.0386695	HSP90AB1, EZR
GO:0042056	趋化因子活性	0.0386695	BMP4, MIF
GO:0050839	细胞粘附分子结合	0.0386695	VCAM1, IGF1, HSP90AB1, EZR, COL5A1
GO:0016763	转移酶活性	0.0485411	PNP, PPAT
hsa00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	0.0010712	GOT1, PPAT, ADSL, ASPA
hsa05418	流体剪切应力与动脉粥样硬化	0.0090747	VCAM1, CCL2, HSP90AB1, BMP4, MEF2C

2.3.2 药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合网络构建 整合上步富集所得的2条生物学通路,运用Cytoscape软件绘制药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理学网络图。如图3A所示,该网络包含6味中药,即枸杞子、山茱萸、山药、川牛膝、龟板胶和熟地黄(鹿角胶和菟丝子无映射关系对),关联34个靶蛋白、43个关键活性分子及2个生物学通路,共计85个节点,149组关系对。

根据连接度分值筛选网络核心节点,结果显示:

枸杞子、山茱萸、山药可能是组方中的核心药物,这3种核心药物分别对应的活性成分与靶点见图3B、图3C、图3D;烟酸(Nicotinic Acid)、马兜铃酮(Aristolone)、瓜氨酸(Citrulline)、甾甾醇(Stigmasterol)、胡萝卜素类(Carotene)等则是其主要活性成分;该方核心靶点包括2个疾病上调靶点(ASPA和RARRES1)和5个下调靶点(SRD5A1, GOT1, PPAT, HSP90AB1, AURKA);所涉及的2条生物学通路中,“流体剪切应力和粥样硬化”通路可能发挥更为关键的作用(见表4)。



蓝色六边形代表中药;黄色菱形代表化学成分;绿色方形代表下调靶点;红色圆形代表上调靶点;蓝色四边形代表生物学通路;A为药物-化合物-共有靶点-通路网络图;B为枸杞子活性成分-靶点网络图;C为山药活性成分-靶点网络图;D为山茱萸活性成分-靶点网络图

图3 左归丸治疗乳腺癌骨转移的药理学网络图

表 4 复合药理学网络中各节点的连接度分析结果

节点类型	名称	连接度
药物	枸杞子 (gouqizi)	20
	山茱萸 (shanzhuyu)	11
	山药 (shanyao)	7
	龟板胶 (guibanjiao)	3
	川牛膝 (chuanniuxi)	2
	熟地黄 (shudihuang)	1
活性成分	烟酸 (Nicotinic Acid)	9
	马兜铃酮 (Aristolone)	7
	瓜氨酸 (Citrulline)	7
	豆甾醇 (Stigmasterol)	6
	δ-胡萝卜素 (Delta-Carotene)	6
	胡萝卜素 (Carotene)	6
	甲硫氨酸 (Methionine)	5
靶基因	SRD5A1	11
	ASPA	10
	GOT1	9
	RARRES1	6
	PPAT	6
	HSP90AB1	5
	AURKA	5
生物学通路	流体剪切应力和粥样硬化	5
	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	4

3 讨论

鉴于乳腺癌骨转移致病因素复杂、机制尚未完全明确,目前乳腺癌骨转移尚无理想的西医根治措施,而中医学多层次、多途径、多靶点之作用特点,对于此类多因素、复杂性疾病可能具有独特优势。本研究基于基因表达谱分析、网络药理学及生物信息学的大数据挖掘方法,初步探索了乳腺癌骨转移的分子模型规律,并对补肾填精经典名方左归丸的物质基础和可能作用靶点等进行了预测分析,取得了一定进展。本文拟从左归丸治疗乳腺癌骨转移的理法依据、研究结果分析、方法学探索与研究展望等方面进行探讨,以期深入开展中医药防治乳腺癌骨转移的系统研究提供新的思路与方向。

3.1 左归丸治疗乳腺癌骨转移的理法依据

3.1.1 理—乳腺癌骨转移的病理属性 乳腺癌骨转移以溶骨性病变为主,癌细胞刺激破骨细胞过度活化,引发蚀骨性破坏,而骨质破坏后释放的大量细胞因子又可促进肿瘤细胞的快速克隆与增殖,形成溶骨性转移的恶性循环^[2]。因此,从骨质破坏角度看,乳腺癌骨转移的病理变化与骨质疏松症有一定相似性,但

其并非肿瘤转移的被动产物,而是促进肿瘤进展的重要因素。乳腺癌在中医学中归属于“乳岩”范畴,病性为本虚标实,标实系痰瘀互结、化毒成癥,本虚则以肾、肝、脾不足为主。肾虚与“乳岩”的发生、发展关系密切。肾藏真阴真阳,充养冲任二脉。冲任二脉上贯于乳,下养胞宫,皆由肾所主。若肾精亏虚,冲任二脉空虚,推动无力,可致气血津液凝滞阻于乳中,日久酿毒为“岩”^[16,27]。尽管古代医籍未直接记载“乳腺癌骨转移”这一病名,但其骨质破坏的临床表现与中医所述“骨枯”“骨痿”等证候(类似于西医学的“骨质疏松症”)有相似之处。根据“肾主骨生髓”理论,骨质疏松症多责之于肾精亏虚、骨髓不充。综上,结合现代医学对乳腺癌骨转移病理机制的认识,可以认为“肾虚精亏”不仅是乳腺癌发生与发展的根本内因,也是骨转移阶段骨质破坏的核心病机。

3.1.2 法与方—补肾填精法及左归丸的应用 当前,中医药治疗乳腺癌骨转移多以补肾为常法。现有研究多聚焦于补肾药物在骨骼局部的修复作用,而关于其直接抗肿瘤效应的报道相对较少。鉴于“肾虚精亏”是贯穿乳腺癌及其骨转移过程的病机关键,遵循“法随证立”的原则,可推测本方不仅可以强骨以“治标”,亦可抗癌以“治本”。左归丸始载于《景岳全书·新方八阵》,由熟地黄、山茱萸、山药、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、龟板胶、川牛膝 8 味药物组成,是补肾填精之经典名方。近年来,左归丸广泛应用于骨质疏松症、生殖系统疾病、慢性肾病、免疫性疾病及神经退行性病变和抗衰老等领域,有力地证实了其疗效的可靠性,也体现了中医“治病求本”“异病同治”的优势^[15,16,28,29],这为将其用于乳腺癌骨转移的“标本同治”提供了前期依据。据此,本研究提出“左归丸可同时靶向骨修复和肿瘤抑制,实现抗乳腺癌骨转移的‘标本同治’效应”的作用机制假说,并通过大数据分析得到了理论层面的初步论证。

3.2 研究结果分析

3.2.1 疾病分子模型分析 从某种意义上说,机制尚未完全阐明是攻克乳腺癌骨转移的重要瓶颈之一。本研究通过大数据分析构建了其分子模型,并通过 224 个重要潜在靶点进行深层生物信息学挖掘,得到以下信息。

(1) 疾病分子网络中包含 2 个功能模块子网络,同一模块中的基因彼此紧密联系并呈现高度一致的表达趋势,即模块 A 中的 40 个分子全部为下调靶点,

而模块B中包含的32个靶点中除BMP4外均为上调分子。

(2)模块A的基因显著富集于细胞周期、卵母细胞减数分裂、孕激素介导的卵母细胞成熟等通路;模块B中包含的32个靶点则主要参与蛋白消化吸收、PI3K-Akt信号通路、局灶性黏附等。已有多项研究^[30-32]证实,以上通路同时与乳腺癌和骨质疏松症高度相关。

(3)在整个网络中,连接度排名前10位的靶点中下调基因有7个,如GAPDH、KIAA1524、CHEK1、CCNA2、CCNB1、AURKA和RRM2;上调基因则只有MMP9、SPP1、COL1A1等3个。这一结果表明,乳腺癌合并骨转移患者较之于未发生骨转移者,下调基因在数量上可能占优势,对治疗靶标筛选具有一定的导向意义。

此外,本研究在分析乳腺癌骨转移分子模型时,还观察到一些值得关注的现象,这些现象为后续研究提供了线索。如某些肿瘤疾病中高表达的基因在乳腺癌合并骨转移后继续上调;而表达谱分析识别出的多数下调基因原本在肿瘤中呈高表达状态,却在乳腺癌合并骨转移后表达水平降低^[33,34]。这些基因表达模式的分歧究竟有何意义?其能否作为突破乳腺癌骨转移机制的切入点?值得进一步深入探究。

3.2.2 左归丸核心药物、活性成分及靶点分析 通过对药物-活性成分-靶点-生物学通路的复合药理网络进行分析,本研究鉴定出枸杞子、山茱萸、山药可能是左归丸干预乳腺癌骨转移的核心药物,其相应的主要活性成分如烟酸、马兜铃酮、瓜氨酸、豆甾醇、胡萝卜素类等;左归丸潜在关键靶标方面,属于疾病上调基因的是ASPA和RARRES1,而GOT1、SRN5A1、PPAT、HSP90AB1和AURKA等为乳腺癌骨转移的下调分子。此外,该网络还包括2个通路,即“流体剪切应力和粥样硬化”及“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”。

其一是药物及其活性成分方面。烟酸、瓜氨酸、胡萝卜素类和豆甾醇是枸杞子的主要活性化学成分。研究表明,较高浓度的烟酸会导致细胞骨架解体,进而抑制肿瘤的进展及转移^[35],提示其可能是枸杞子抗乳腺癌的关键成分。含瓜氨酸的营养组合可抑制骨吸收并增加钙沉积以提高骨密度^[36],表明其可能是修复骨转移引起的骨质破坏的重要物质基础。胡萝卜素类对乳腺癌的防治作用一直是近年来的研究热

点^[37]。研究^[38]证实,豆甾醇通过降低细胞迁移发挥抗胃癌作用,为其治疗乳腺癌等其他肿瘤疾病埋下伏笔。豆甾醇也是山药的重要活性成分。Zhang等^[39]研究证实,山药提取物通过抑制骨重构中的细胞周期进展,表现出抗骨量减少的作用。山茱萸已被报道具有广泛的药理活性,如心脏保护、神经保护、抗肿瘤、抗炎、免疫调节、抗骨质疏松等,其中马兜铃酮即其主要活性成分之一^[40]。综上,网络药理学筛选出的以上核心药物及其有效成分,可能是左归丸同时靶向骨修复和抗肿瘤,发挥对乳腺癌骨转移“标本同治”功效的重要载体。

其二是左归丸的关键靶点方面。Sales等^[41]认为,ASPA与n-乙酰天冬氨酸的增加相关,且在乳腺肿瘤中高表达。本研究中基因表达谱分析表明,发生骨转移时ASPA上调更加显著,其可能是左归丸重要的潜在靶标之一。RARRES1是一种肿瘤抑制蛋白,Peterfi等^[42]证实,其阳性表达预示肿瘤进展风险相对较低,而阴性表达则表明癌症复发风险增加了5倍,故该分子是左归丸的可能关键靶点。此外,左归丸核心靶点中,那些在乳腺癌骨转移时发生下调的关键分子,也被证明对肿瘤的发生、发展具有重大意义。如早有学者发现SRD5A1等孕激素代谢酶基因在乳腺癌中表达发生改变^[42];GOT1在大多数癌细胞中表达升高并诱导增殖,是抗肿瘤药物筛选靶标的新热点^[43];Manabu等^[44]研究表明,氮代谢在癌症的恶性进展中发生改变,而在所有代谢酶中PPAT与恶性肿瘤的相关性最强;HSP90AB1被称为分子伴侣,常在肿瘤中表达并促进肿瘤演进,已成为肿瘤治疗的重要新靶标^[45];AURKA是一种正常的细胞增殖诱导酶,可通过增强乳腺癌干细胞的表型而发挥致癌作用^[46],且该分子也是构建乳腺骨转移分子模型排名前10位中的重要靶点,值得深究。可见,以上靶标可能是左归丸抗肿瘤“治本”效应的关键切入点。本研究基因表达谱数据源自乳腺癌中发生骨转移与未发生骨转移的患者,对在乳腺癌背景下骨转移的特征性改变提出了新的分子线索。然而,这些分子在骨质疏松及骨破坏中的作用目前研究尚少,其如何与乳腺癌骨转移中的骨质破坏机制相偶联,仍有待深入探索。

其三是候选生物学通路方面。“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路”以及“流体剪切应力和粥样硬化通路”可能是左归丸抗乳腺癌骨转移的重要调控途径,且以后者更为关键。研究^[47]显示,氨基酸代谢基

因在肿瘤的发生、发展中具有重要作用,并可能成为治疗乳腺癌的潜在药物靶点。另有学者证实,液体流动引起的液体剪切应力在细胞凋亡、增殖、侵袭和肿瘤转移过程中发挥着关键作用^[48],而低剪切应力状态可以显著促进乳腺癌细胞的增殖^[49,50]。

3.3 方法学探索与展望 首先,笔者研究团队对优化疾病靶点筛选及分子模型构建进行了探索。目前常用的疾病靶点数据库如 TTD、CTD、GeneCards、OMIM 等多以疾病名称为检索词,往往未充分涵盖合并症或特定病理表现。基于乳腺癌骨转移的发生背景涉及“乳腺癌”及“肿瘤转移”,且其溶骨性病变类似于“骨质疏松症”,故本研究以这3种疾病为检索词,提取其中的重叠基因作为候选靶点,以更全面反映疾病本质。其次,现有疾病靶点数据库信息存在部分理论预测成分且不包含基因的上调、下调表达信息,不利于深层破译疾病发生、发展的分子机制,如能采用组学大数据分析对其进行参校,则更利于核心靶标及其属性的科学挖掘。最后,从某种意义上说,药物成分及靶点数据的完整性是保证网络药理学分析科学性的重要前提,而现有数据库中某些药物,尤其是动物类药物(如本研究中鹿角胶)收录信息相对不足,可能导致其无法有效纳入分析,进而影响整体结果的全面性。因此,后续亟需发展更适合的研究方法对此类药物的成分和作用靶点进行探索,以完善数据资源,保障网络药理学的可持续发展。综上所述,本研究以大数据预测为主要手段,初步揭示了乳腺癌骨转移关键分子特征以及左归丸的药物-活性成分-靶点网络机制,但尚需后期严谨的实验论证。

参考文献

- [1] WANG Y, HU Y, WANG M, et al. The role of breast cancer cells in bone metastasis: suitable seeds for nourishing soil [J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2024, 22(1): 28–43.
- [2] KREMER R, GAGNON B, MEGUERDITCHIAN A N, et al. Effect of oral bisphosphonates for osteoporosis on development of skeletal metastases in women with breast cancer: results from a pharmaco-epidemiological study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(11): dju264.
- [3] YOUNG S A E, HELLER A D, GARSKE D S, et al. From breast cancer cell homing to the onset of early bone metastasis: the role of bone (re)modeling in early lesion formation [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(8): eadj0975.
- [4] WANG Y, PING Z, GAO H, et al. LYC inhibits the AKT signaling pathway to activate autophagy and ameliorate TGF β -induced renal fibrosis [J]. *Autophagy*, 2024, 20(5): 1114–1133.
- [5] LI Y, LIU F, CAI Q, et al. Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 57.
- [6] 王亮, 卫宜锐, 黄博臻, 等. 中医药治疗乳腺癌骨转移研究进展 [J]. *光明中医*, 2025, 40(4): 786–790.
- [7] YANG Z, YUE Z, MA X, et al. Calcium Homeostasis: a potential vicious cycle of bone metastasis in breast cancers [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 293.
- [8] LEFLEY D, HOWARD F, ARSHAD F, et al. Development of clinically relevant in vivo metastasis models using human bone discs and breast cancer patient-derived xenografts [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 130.
- [9] MAGNO E, BUSSARD K M. A representative clinical course of progression, with molecular insights, of hormone receptor-positive, HER2-negative bone metastatic breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3407.
- [10] BISWAS S, NYMAN J S, ALVAREZ J, et al. Anti-transforming growth factor β antibody treatment rescues bone loss and prevents breast cancer metastasis to bone [J]. *PLoS one*, 2011, 6(11): e27090.
- [11] MOHAMMAD K S, AKHUND S A. From tumor to bone: growth factor receptors as key players in cancer metastasis [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024, 29(5): 184.
- [12] MBESE Z, ADERIBIGBE B A. Bisphosphonate-based conjugates and derivatives as potential therapeutic agents in osteoporosis, bone cancer and metastatic bone cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6869.
- [13] CICEK M, OURSLER M J. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(4): 635–644.
- [14] LI W, LIU Z, LIU L, et al. Effect of Zuogui pill and Yougui pill on osteoporosis: a randomized controlled trial [J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(1): 33–42.
- [15] LI X, TAN F, WU D, et al. Zuogui Wan alleviates ovariectomy-induced osteoporosis by maintaining FoxO3 and increasing NK1R [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2023, 69(10): 195–200.
- [16] SHEN C, DENG M, WANG X, et al. Zuogui Wan modulates macrophage polarization and promotes osteogenic differentiation through regulation of CD51-positive bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 26130.
- [17] YANCHEN F, YALI L, XUE D, et al. Exploring the multicomponent synergy mechanism of Zuogui Wan on postmenopausal osteoporosis by a systems pharmacology strategy [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 44(3): 489–495.
- [18] 刘梓燊, 郑瑛瑛, 袁梦琪, 等. 基于“肝肾同源”理论防治乳腺癌内分泌治疗相关性骨质疏松症的思路探讨 [J]. *广州中医药大学学报*, 2025, 42(2): 293–297.
- [19] 付剑江, 梅殷琰, 麻俊超, 等. 左归丸通过调控 p38 MAPK/ERK 信号通路抑制乳腺癌诱导的破骨细胞活化及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(1): 1–9.
- [20] 付剑江, 刘婷, 墨啸箏, 等. 左归丸抗乳腺癌破骨性骨转移机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(12): 123–127.
- [21] GAUTIER L, COPE L, BOLSTAD B M, et al. Affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 307–315.
- [22] SMYTH G K. Limma: linear models for microarray data [A]//GEN-

- TLEMAN R, CAREY V J, HUBER W, et al. Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. New York: Springer, 2005: 397–420.
- [23] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterprofiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.
- [24] BANDETTINI W P, KELLMAN P, MANCINI C, et al. MultiContrast Delayed Enhancement (MCOE) improves detection of subendocardial myocardial infarction by late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance: a clinical validation study [J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2012, 14: 83.
- [25] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [26] KONG X, LIU C, ZHANG Z, et al. BATMAN-TCM 2.0: an enhanced integrative database for known and predicted interactions between traditional Chinese medicine ingredients and target proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D1110–D1120.
- [27] 朱明玥, 吕志刚. 近代名老中医治疗乳腺癌经验浅析 [J]. 中华中医药杂志 [J]. 2019, 34(7): 3162–3166.
- [28] LI X, DONG L, WANG J, et al. Effects of Zuogui Wan on testis structure and expression of c-Kit and Oct4 in rats with impaired spermatogenesis [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 44–50.
- [29] ZHU B, FANG J, JU Z, et al. Zuogui Wan ameliorates high glucose-induced podocyte apoptosis and improves diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 991976.
- [30] BROWNE I M, ANDRÉ F, CHANDARLAPATY S, et al. Optimal targeting of PI3K-AKT and mTOR in advanced oestrogen receptor-positive breast cancer [J]. Lancet Oncol, 2024, 25(4): e139–e151.
- [31] CHAI S, YANG Y, WEI L, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155516.
- [32] LIN Y, HE Q, CHEN B, et al. Zuogui Pills alleviate iron overload-induced osteoporosis by attenuating ROS-mediated osteoblast apoptosis via the PI3K-AKT pathway and mitigating mitochondrial damage [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 344: 119455.
- [33] DAHN M L, DEAN C A, JO D B, et al. Human-specific GAPDH qRT-PCR is an accurate and sensitive method of xenograft metastasis quantification [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2021, 20: 398–408.
- [34] CHAO H H, KARAGOUNIS I V, THOMAS C, et al. Combination of CHEK1/2 inhibition and ionizing radiation results in abscopal tumor response through increased micronuclei formation [J]. Oncogene, 2020, 39(22): 4344–4357.
- [35] PAN L, YU G, CHEN X, et al. Nicotinic acid inhibits angiogenesis likely through cytoskeleton remodeling [J]. Organogenesis, 2017, 13(4): 183–191.
- [36] RAJFER R A, FLORES M, ABRAHAM A, et al. Prevention of osteoporosis in the ovariectomized rat by oral administration of a nutraceutical combination that stimulates nitric oxide production [J]. J Osteoporos, 2019, 2019: 1592328.
- [37] DEHNAVI M K, EBRAHIMPOUR-KOUJAN S, LOTFI K, et al. The association between circulating carotenoids and risk of breast cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies [J]. Adv Nutr, 2024, 15(1): 100135.
- [38] LI K, YUAN D, YAN R, et al. Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway [J]. J BUON, 2018, 23(5): 1420–1425.
- [39] ZHANG Z G, SONG C H, ZHANG F Z, et al. Rhizoma dioscoreae extract protects against alveolar bone loss by regulating the cell cycle: a predictive study based on the protein-protein interaction network [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 5342–5348.
- [40] DONG Y, FENG Z L, CHEN H B, et al. Corni fructus: a review of chemical constituents and pharmacological activities [J]. Chin Med, 2018, 13: 34.
- [41] SALES G, CALURA E, ROMUALDI C. Meta graphite—a new layer of pathway annotation to get metabolite networks [J]. Bioinformatics, 2019, 35(7): 1258–1260.
- [42] PETERFI L, BANYAI D, YUSENKO M V, et al. Expression of RARRES1 and AGL2 and progression of conventional renal cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2020, 122(12): 1818–1824.
- [43] SUN W, LUAN S, QI C, et al. Aspulvinone O, a natural inhibitor of GOT1 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma cells growth by interfering glutamine metabolism [J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 111.
- [44] KODAMA M O K, SHIMIZU H, YOSHIOKA S, et al. A shift in glutamine nitrogen metabolism contributes to the malignant progression of cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1320.
- [45] WANG D, ZUO S, GE J, et al. Circ TP63-N suppresses the proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma via engaging with HSP90AB1 to modulate the YAP1/Hippo signaling pathway [J]. Sci China Life Sci, 2025, 68(3): 689–705.
- [46] ZHENG F, YUE C, LI G, et al. Nuclear AURKA acquires kinase-independent transactivating function to enhance breast cancer stem cell phenotype [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10180.
- [47] WANG C Y, CHIAO C C, PHAN N N, et al. Gene signatures and potential therapeutic targets of amino acid metabolism in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(1): 95–113.
- [48] HUANG Q, HU X, HE W, et al. Fluid shear stress and tumor metastasis [J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(5): 763–777.
- [49] BROWN S R, RADCLIFFE M E, DANNER J T, et al. Extracellular vesicle-mediated modulation of stem-like phenotype in breast cancer cells under fluid shear stress [J]. Biomolecules, 2024, 14(7): 757.
- [50] PARK H A, BROWN S R, JANSEN J, et al. Fluid shear stress enhances proliferation of breast cancer cells via downregulation of the c-subunit of the F₁F₀ ATP synthase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 632: 173–180.

(收稿日期: 2025-05-26)

(本文编辑: 金冠羽)