

• 数据挖掘与循证医学 •

探讨自噬相关基因介导乳腺癌预后及免疫浸润的潜在机制及干预中药预测

钟悦¹, 王志宇^{2,3,4}, 杨博文^{2,3,4}, 王能^{1,2}

1. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006

2. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广东 广州 510120

3. 粤港澳中医药与免疫疾病研究联合实验室, 广东 广州 510120

4. 省部共建中医湿证国家重点实验室(广州中医药大学第二附属医院), 广东 广州 510120

摘要:目的 利用生物信息学研究乳腺癌自噬相关分子模式和肿瘤微环境免疫细胞浸润特征, 同时预测具有潜在治疗作用的中药。方法 从TCGA和GEO数据库下载乳腺癌数据, 从UCSC Xena数据库获得乳腺癌拷贝数相关数据。使用R语言和Perl分析乳腺癌自噬相关基因在肿瘤组织和癌旁组织表达以及自噬相关基因的拷贝数情况。通过单因素Cox分析、Kaplan-Meier生存分析、最小绝对收缩和选择算子(logistic least absolute shrinkage and selection operator, Lasso)分析、受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)、列线图构建自噬相关预后模型并评估其预后价值。利用基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)、京都百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、单样本基因集富集分析(single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)和CIBERSORT算法, 探索其在乳腺癌中的潜在生物学功能和免疫细胞浸润情况。在此基础上, 将关键基因导入SymMap数据库获取相关中药, 采用Cytoscape构建“中药-成分-靶点”网络图, 并通过体外实验验证代表性自噬相关中药对乳腺癌细胞增殖及侵袭的影响。结果 大部分自噬相关基因在乳腺癌肿瘤组织和癌旁组织中有表达差异和拷贝数变异, 其中肿瘤蛋白P53(tumor protein P53, TP53)的突变频率最高。构建的自噬相关预后模型提示高风险乳腺癌患者预后更差。通过ssGSEA、ESTIMATE和CIBERSORT进一步表明, 所建立的模型可能对免疫细胞丰度、免疫细胞类型等产生影响。此外, 预测结果提示调控乳腺癌自噬的中药功效以清热解毒、活血化瘀、补阳类为主, 药性以辛、苦、甘、寒为主, 主要归肝、肺、胃经。实验验证进一步表明, 清热解毒药白花蛇舌草、活血化瘀药郁金、补阳药肉苁蓉/淫羊藿可通过调控自噬活性抑制乳腺癌发展。结论 自噬指示乳腺癌不良预后, 并与肿瘤免疫浸润密切相关。调控乳腺癌自噬的中药以清热解毒、活血化瘀、补阳类为主, 为乳腺癌的免疫和中医药治疗提供新的方向。

关键词: 生物信息学; 自噬调控; 乳腺癌预后; 肿瘤微环境; 白花蛇舌草; 郁金; 肉苁蓉; 淫羊藿

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4463-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.018

Exploration on potential mechanism of autophagy-related genes mediating prognosis and immune infiltration of breast cancer and prediction of intervention in traditional Chinese medicine

ZHONG Yue¹, WANG Zhiyu^{2,3,4}, YANG Bowen^{2,3,4}, WANG Neng^{1,2}

1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120, China

3. Guangdong-Hong Kong-Macau Joint Laboratory on Chinese Medicine and Immune Disease Research, Guangzhou 510120, China

4. Provincial-Ministry Co-constructed State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Dampness Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To study the molecular patterns related to autophagy in breast cancer and the characteristics of immune cell

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973526); 省部共建中医湿证国家重点实验室专项(SZ2021ZZ19); 广东省科技计划项目(2023B1212060063, 2022B1515230002, 2017B030314166); 2020广东省科技创新战略专项资金(粤港澳联合实验室)项目(2020B1212030006); 广东省中医院院内专项(YN2018MJ07)

作者简介: 钟悦(1994—), 女, 博士研究生, 研究方向为中西医防治肿瘤疾病。E-mail: zhong243409844@163.com

*通信作者: 王能(1985—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中西医防治肿瘤疾病。E-mail: ellen0000@gzucm.edu.cn

infiltration in tumor microenvironment by bioinformatics, and to predict the potential traditional Chinese Medicine (TCM) with therapeutic effects. **Methods** Breast cancer data was downloaded from TCGA and GEO databases, and breast cancer copy number-related data were obtained from UCSC Xena database. R language and Perl were used to analyze the expression of breast cancer autophagy-related genes in tumor tissues and adjacent tissues, as well as the copy number of autophagy-related genes. Autophagy-related prognostic models were constructed using single-factor Cox analysis, Kaplan-Meier survival analysis, least absolute shrinkage and selection operator (Lasso) regression analysis, receiver operating characteristic (ROC), and column charts, and their prognostic value was evaluated. Gene set variation analysis (GSVA), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA), and CIBERSORT algorithm were used to explore its potential biological function and immune infiltration in breast cancer. On such basis, autophagy-related TCM were obtained through importing the key genes into the SymMap database to construct the network diagram of TCM-components-targets based on Cytoscape, and the effects of representative autophagy-related TCM on the proliferation and invasion of breast cancer cells were verified by *in vitro* experiments. **Results** Most of the autophagy-related genes were differentially expressed and existed copy number variations between breast cancer tissues and adjacent tissues. Among them, tumor protein P53 (TP53) had the highest mutation frequency. The autophagy-related prognostic models indicated a worse prognosis for high-risk breast cancer patients. ssGSEA, ESTIMATE and CIBERSORT algorithms further point out that the established model might have an impact on the abundance of immune cells, the type of immune cells and so on. Furthermore, the results indicated that TCM regulating breast cancer autophagy was mainly heat-clearing and detoxifying, blood circulation-promoting & blood stasis-removing, and yang-tonifying. The TCM taste was mainly spicy, bitter, sweet, and cold within the sites of liver, lung, and stomach. The experimental results further indicated that the clearing heat and removing toxicity drug Baihuasheshecao (*Scleromitrion diffusum*), the activating blood and dissolving stasis drug Yujin (*Curcumae Radix*) and yang-tonifying drugs Roucongong (*Cistanches Herba*)/Yinyanghuo (*Epimedii Folium*) could inhibit the development of breast cancer by regulating autophagy activity. **Conclusion** Autophagy indicates poor prognosis of breast cancer and is closely related to tumor immune infiltration. TCM that regulate breast cancer autophagy is mainly clearing heat and removing toxicity, activating blood and dissolving stasis, and yang-tonifying, which can provide new directions for the immunotherapy and TCM treatment of breast cancer.

Key words: bioinformatics; autophagy regulation; breast cancer prognosis; tumor microenvironment; *Scleromitrion diffusum* (Willd.) R. J. Wang; *Curcumae Radix*; *Cistanches Herba*; *Epimedii Folium*

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，发病率占女性癌症的 30%，也是癌症死亡的主要原因^[1]。尽管乳腺癌治疗手段多样，包括手术切除、化疗、放疗和内分泌治疗等，但仍有 20%~50%乳腺癌患者会发生转移，转移患者 5 年生存率仅为 26%^[2]。此外，乳腺肿瘤具有异质性，肿瘤细胞和免疫细胞相互关系错综复杂，致使单一药物疗法不能有效克服免疫逃逸^[3]。因此，寻找高效、低毒的药物已成为抗乳腺癌的重要研究方向。中医药多靶点、多途径，并具有较好的安全性和良好的抗癌效果。现有研究缺乏将乳腺癌预后模型和中药预测联合分析评价的方法^[4]，建立模型挖掘具有临床应用价值的中药可为中医药防治乳腺癌开辟新的思路。

自噬作为一种维持细胞稳态的重要途径，可被缺氧、氧化应激等条件激活，继而将受损细胞器、细胞残留物、错误折叠蛋白质等进行分解，给细胞提供能量^[5]。恶性肿瘤可通过激活细胞自噬相关基因 (autophagy-related genes, Atgs)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /哺乳

动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、肿瘤蛋白 P53 (tumor protein P53, TP53)、腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 等多条自噬通路调控肿瘤发展^[6]。同时，自噬异常可作为一种肿瘤免疫微环境与肿瘤细胞之间交叉对话的媒介。占据肿瘤实质 30%~50%的肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAMs) 被证明可通过分泌诸多趋化或炎症因子与肿瘤细胞直接互作触发自噬，最终影响肿瘤的发生发展、治疗效果、耐药抵抗、复发转移等生存预后环节。由此可见，深入探索自噬对肿瘤形成的意义并开发自噬靶向药物，将为提高肿瘤治疗效果和改善预后提供特异而高效的突破口。

本研究对乳腺癌自噬相关基因进行综合分析，从遗传特征、转录学景观、预后价值、临床相关性、生物学功能和途径、免疫学特征等多角度进行分析，构建自噬相关预后模型，探索其与免疫细胞浸润的联系，并寻找有效调控乳腺癌自噬的中药，以期乳腺癌防治提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 数据下载及处理

从TCGA (<http://portal.gdc.cancer.gov/>) 分别下载乳腺癌基因表达转录组、体细胞突变组数据和相应的临床信息, 使用 R 语言 (<https://www.r-project.org/>)“limma”包^[7]将FPKM数据转换为TPM值, 并使用 R“SVA”包 ComBat 函数进行批次矫正。从 GEO 数据库下载 GSE37751 数据集的数据。并使用 R 语言进行合并, 进行后续分析。从 UCSC Xena 数据库 (<http://xena.ucsc.edu/>) 获得乳腺癌拷贝数相关数据, 并使用 perl (<https://www.perl.org/>) 提取自噬相关基因的拷贝数。从人类自噬数据库 (Human Autophagy Database, HADBb) (<http://www.autophagy.lu/>) 下载获得自噬相关基因。

1.2 筛选有预后价值的乳腺癌自噬相关基因

通过基因表达差异分析和生存分析, 筛选有预后价值的乳腺癌自噬相关基因。首先, 通过 Wilcoxon 检验, 比较乳腺癌肿瘤组织和正常组织中基因的表达差异, 并使用 R 包“ggplot”^[8]绘制图形。使用 survival 包^[9]进行单因素 Cox 分析进一步分析自噬相关基因对乳腺癌患者总生存期 (overall survival, OS) 的影响。以 $P < 0.05$ 为阈值, 选取同时在差异表达分析和生存分析中具有显著性差异的基因进行后续分析, 并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.3 一致性聚类

本研究应用共识聚类方法, 使用 R 包“ConsensusClusterPlus”^[10]探讨自噬相关基因和乳腺癌不同分型表达的关系。随机执行 1 000 次重复以确保结果的稳定性。每个聚类绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 比较亚组之间的 OS。采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 验证聚类的稳定性。

1.4 基因集富集分析

为了研究不同自噬相关基因之间的生物学过程, 从 MSigDB 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>) 中提取基因集 (c2.cp.kegg.v7.4), 使用基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA), 利用“GSVA”^[11]R 包进行分析。同时, 以 $P < 0.05$ 为阈值, 利用 R 包“clusterProfiler”^[12]和“ggplot2”^[8], 探讨京都百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路途径。

1.5 预后模型的构建和临床相关性探索

使用 R 包“caret”^[13]将队列随机划分为训练集 (train) 和测试集 (test)。通过单变量 Cox 回归分析

将符合 $P < 0.05$ 的基因被视为预后相关基因。采用最小绝对收缩和选择算子 (least absolute shrinkage and selection operator, Lasso) 基于 R 包“glmnet”^[14]将过度拟合的风险降至最低。使用 Cox 回归分析选择候选基因, 建立预后模型。根据中位风险评分将患者分为高、低风险组, 并通过 Kaplan-Meier 生存分析比较两组的 OS。为进一步验证模型的准确性和特异性, 采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC)、列线图和风险曲线对模型深入探讨。

1.6 肿瘤微环境免疫特征分析

通过 Wilcoxon 检验比较分型间的肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 组成成分分数的差异情况。ESTIMATE 算法用于计算肿瘤微环境中组成成分评分评估浸润免疫水平, 包括基质细胞、免疫细胞评分和 ESTIMATE 细胞评分, 分数越高表示相应细胞的含量也越高。ESTIMATE 分数由基质细胞评分和免疫细胞评分相加所得^[15]。基于单样本基因集富集分析 (single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法, 计算每个乳腺癌样本中免疫细胞浸润的相对丰度。采用 CIBERSORT 算法评估各个样本中 22 种不同免疫细胞分型的分数^[16]。

1.7 构建中药-靶点网络图

将关键基因输入到 SymMap 数据库^[17] (<http://www.symmap.org/>) 中, 以 $P < 0.01$ 、错误发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.01 为阈值, 获得相关的靶向中药。使用 Cytoscape 软件^[18]构建“中药-靶点”网络图。

1.8 体外实验验证

1.8.1 材料 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 来自 American Type Culture Collection 中心; 紫杉醇 (批号 2412200402) 购自四川汇宇制药股份有限公司; 胎牛血清 (货号 164210-50) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4, 货号 200-04) 购自苏州派普泰克生物科技有限公司; 1%青霉素-链霉素双抗 (货号 15140-122)、DMEM 高糖培养基 (货号 C11995500BT) 均购自中国赛默飞世尔科技公司; PMA/TPA (蛋白激酶 C 激活剂, 货号 S1819)、结晶紫 (货号 C0121)、Hoechst 33342 活细胞染色液 (货号 C1025) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 4%多聚甲醛 (货号 BL539A) 购自北京兰杰柯科技有限公司; 自噬慢病毒 AVV-mRFP-GRP-LC3 (货号 HB-LP210 0001) 购自上海汉恒生物科技有限公司; Puromycin (货号 ant-pr-1)

购自法国 invivoGen 公司; Transwell 小室 (8.0 μm , 货号 353097) 和 Matrigel 基质胶 (货号 354248) 均购自美国 Corning 公司。

1.8.2 中药冻干粉制备 白花蛇舌草 30 g (批号 HX23M01)、淫羊藿 30 g (批号 HX23K01)、肉苁蓉 30 g (批号 HX22C01)、郁金 30 g (批号 HX23H01) 购自广州中医药大学门诊部, 由杨博文博士鉴定符合《中国药典》2020 年版规定。将以上药物分别加入 10 倍体积的水浸泡 0.5 h, 煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过后离心收集上清。取 3 次提取的上清合并, 文火浓缩, 最终分别浓缩至 30 mL 的药液, 分装后置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 24 h, 至真空冻干机干燥 48 h。采用 HPLC 分析, 白花蛇舌草中对香豆酸 $>0.2\%$, 郁金中姜黄素 $>0.01\%$, 肉苁蓉中松果菊苷 $>0.3\%$, 淫羊藿中淫羊藿苷 $>0.5\%$, 均符合相关文献报道^[19-20]及《中国药典》2020 年版标准。

1.8.3 细胞培养 用添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基培养人乳腺癌细胞 MDA-MB-231。用 100 ng/mL PMA/TPA 作用于人单核巨噬细胞 (human myeloid leukemia mononuclear cells, THP1) 24 h, 获得未分化巨噬细胞 (M0); 并用 10 ng/mL IL-4 继续孵育 24 h, 诱导出 M2 型 TAMs (M2-TAMs)。向 M2-TAMs 培养体系中单独加入自噬激活剂 (紫杉醇) 或将其分别联合白花蛇舌草、淫羊藿、肉苁蓉及郁金冻干粉 48 h 后, 弃去含药培养基, 换新鲜完全培养液后继续培养 6 h 后收集培养上清, 获得 TAMs 条件培养基 (TAMs conditioned medium, TAMs-CM) 用于后续实验。以上细胞均在 5% CO_2 加湿培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。

1.8.4 自噬双标慢病毒检测 用自噬慢病毒 AVV-mRFP-GRP-LC3 感染 MDA-MB-231 细胞, 并经 Puromycin 筛选构建 MDA-MB-231-LC3 稳定细胞株。分为正常组、模型组 (自噬激活剂紫杉醇 50 nmol/L) 组、白花蛇舌草组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白花蛇舌草冻干粉 + 50 nmol/L 紫杉醇)、TAMs-CM + 紫杉醇 (50 nmol/L) 组、淫羊藿组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿冻干粉 + TAMs-CM + 50 nmol/L 紫杉醇)、肉苁蓉组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肉苁蓉冻干粉 + TAMs-CM + 50 nmol/L 紫杉醇) 和郁金组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 郁金冻干粉 + TAMs-CM + 50 nmol/L 紫杉醇)。实验终点采用 Hoechst 33342 活细胞染色液避光染色 10 min, 记录细胞自噬活性, 其中黄点代表自噬小体, 游离红点代表自噬溶酶体。

1.8.5 细胞侵袭和迁移检测

(1) 划痕实验: 将细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板内, 待细胞培育到融合率为 100% 时, 用 200 μL 枪头在细胞上层进行划痕, 分组同“1.8.4 项”。于加药后 0 h 和 48 h 分别进行显微镜拍照, 并使用 Image J 统计其迁移面积。

(2) Transwell 实验: 分组同“1.8.4 项”。Matrigel 基质胶稀释液 (1:8) 包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 将有基质胶的 Transwell 小室放入 24 孔板中, 在上室加入细胞悬液 500 μL (密度为 1×10^5 个/孔) 并进行给药处理 48 h, 下室加入 1 mL 含 10% FBS 的完全培养基。实验结束后, 将小室取下, 用 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 结晶紫染色 2 h。棉签去除小室上层未迁移细胞, 随机选择 3 个视野显微镜下观察计数, 并用 Image J 统计。

1.9 统计学分析

本研究实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 绘图用 GraphPad prism 8.0 软件。多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

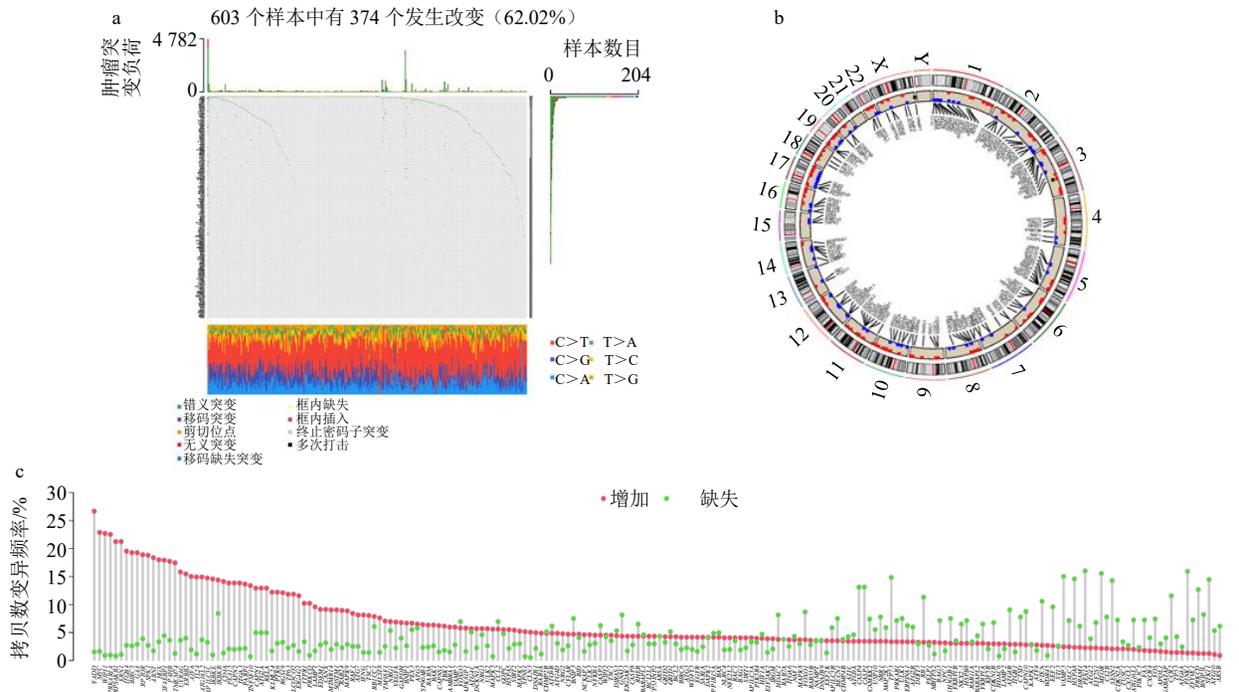
2 结果

2.1 乳腺癌自噬相关基因遗传特征和转录模式景观

从人类自噬数据库下载获得 222 个自噬相关基因, 并研究了 TCGA 中乳腺癌样本中与自噬相关的基因突变情况。如图 1-a 所示, 603 个样本中有 374 个 (62.02%) 出现基因突变。其中, *TP53* 的突变频率最高, 达 34%。其次是磷酸酯酶与张力蛋白 (phosphatase and tensin homolog, *PTEN*), 突变频率为 5%。而杆状病毒 IAP 重复蛋白 6 (baculoviral IAP repeat containing 6, *BIRC6*) 突变频率为 3%。自噬相关基因中拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 的位置如图 1-b 所示。CNV 频率结果表明, 大部分自噬相关基因都存在 CNV, 拷贝数增加的频率比拷贝数缺失频率高 (图 1-c)。

2.2 乳腺癌自噬相关基因识别

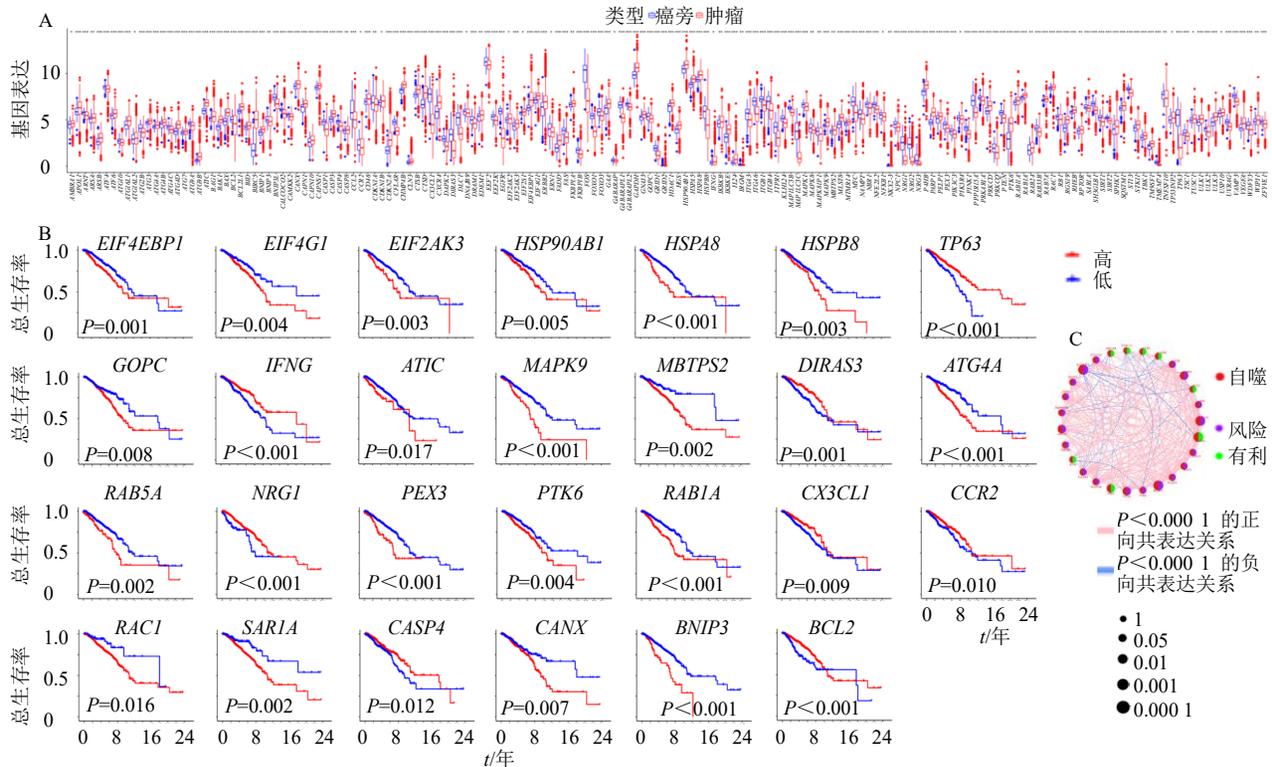
为鉴定出乳腺癌自噬相关基因, 对 222 个自噬相关基因进行了表达差异分析和生存分析。如图 2-A 所示, 基因表达差异分析结果表明 170 个自噬相关基因在乳腺癌组织中表达异常, 这些基因的表达上调预示着患者的不良预后。提示它们可能是乳腺癌的潜在预后因子。对上述 170 个自噬相关基因进行单因素 Cox 回归分析, 结果表明共有 27 个基因的表达与乳腺癌患者的 OS 明显相关 ($P < 0.05$), 见表 1 和图 2-B。随后, 筛选出与预后相关的基因



a-自噬基因突变频率瀑布图; b-自噬基因拷贝数圈图; c-自噬基因拷贝数变异频率统计图。
a-waterfall diagram of mutation frequency of autophagy gene; b-copy number loop map of autophagy gene; c-statistical map of copy number variation frequency of autophagy genes.

图1 乳腺癌自噬基因突变、拷贝数变异分析

Fig. 1 Analysis of mutation and copy number variation of autophagy gene in breast cancer



A-乳腺癌自噬相关基因在乳腺癌肿瘤组织和癌旁组织的表达差异; B-有预后价值的自噬基因生存曲线; C-自噬相关基因预后网络; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

A-differences expression of autophagy related genes in breast cancer tumor tissues and adjacent tissues; B-survival curves of autophagy genes with prognostic value; C-prognostic network of autophagy related genes; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.

图2 乳腺癌自噬相关基因在乳腺癌癌旁组织和肿瘤组织中的表达差异和生存预后分析

Fig. 2 Difference expression and survival prognosis analysis of autophagy related genes in breast cancer adjacent tissues and tumor tissues

表 1 差异表达的自噬相关基因的单因素 Cox 分析结果 ($P < 0.05$)

Table 1 Univariate Cox analysis results of differentially expressed autophagy related genes ($P < 0.05$)

基因	风险比	P 值	基因	风险比	P 值
<i>ATG4A</i>	1.693 37	0.000 26	<i>PTK6</i>	1.159 03	0.020 95
<i>RAB1A</i>	1.862 54	0.000 43	<i>EIF2AK3</i>	1.314 33	0.024 65
<i>TP63</i>	0.833 64	0.000 66	<i>BCL2</i>	0.888 35	0.027 73
<i>EIF4EBP1</i>	1.239 54	0.000 95	<i>MAPK9</i>	1.294 22	0.028 02
<i>BNIP3</i>	1.346 77	0.001 71	<i>ATIC</i>	1.370 23	0.030 91
<i>HSPA8</i>	1.344 28	0.002 72	<i>HSPB8</i>	1.086 18	0.032 89
<i>NRG1</i>	0.709 36	0.003 44	<i>CCR2</i>	0.867 83	0.033 02
<i>PEX3</i>	1.388 62	0.007 80	<i>CANX</i>	1.260 68	0.040 17
<i>IFNG</i>	0.769 43	0.010 24	<i>CX3CL1</i>	0.898 47	0.041 07
<i>SARIA</i>	1.377 18	0.011 90	<i>CASP4</i>	0.808 89	0.045 34
<i>RAC1</i>	1.600 21	0.012 14	<i>HSP90AB1</i>	1.258 30	0.045 35
<i>MBTPS2</i>	1.281 48	0.014 20	<i>GOPC</i>	1.297 31	0.049 46
<i>DIRAS3</i>	0.859 14	0.016 54	<i>RAB5A</i>	1.353 38	0.049 46
<i>EIF4G1</i>	1.358 27	0.019 70			

进一步构建预后网络图，分析基因间的相关性，如图 2-C 所示，节点大小与 P 值的大小相关，紫色节点表示高风险基因，绿色节点代表对预后有利的基因，粉色连线代表与生存正相关共表达的基因，蓝色连线代表与生存负相关共表达的基因。

2.3 基于乳腺癌自噬相关基因的分型

根据上述获得的与乳腺癌预后相关的自噬相关基因，对患者进行一致性聚类分析。结果提示，当聚类变量 $k=3$ ，组间相关性最低，组内相关性最高，即根据自噬预后相关基因将乳腺癌患者分成 3 个分型（图 3-a），包括 A ($n=351$)、B ($n=405$) 和 C ($n=398$)。生存分析显示（图 3-b），3 个分型的总生存期存在差异 ($P=0.003$)。主成分分析表明，3 个分型的自噬转录谱存在显著差异，可明显区分（图 3-c）。不同分型与不同临床特征的关系方面，结果如图 3-d 所示，与年龄、N 分期及 T 分期都有关联性。

2.4 自噬分型的 GSVA、免疫浸润相关性分析及 KEGG 通路分析

3 个分型的 GSVA 结果显示，A 分型主要富集在多种癌症的相关通路，如丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路、转化生长因子- β （transforming growth factor- β , TGF- β ）信号通路、Janus 激酶（Janus kinase, JAK）/信号转导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）信号通路、内吞作用以及与肿瘤转移相关的通路（黏着斑、黏附分子）等。B 分型主要与免疫相关，如原发性免疫缺

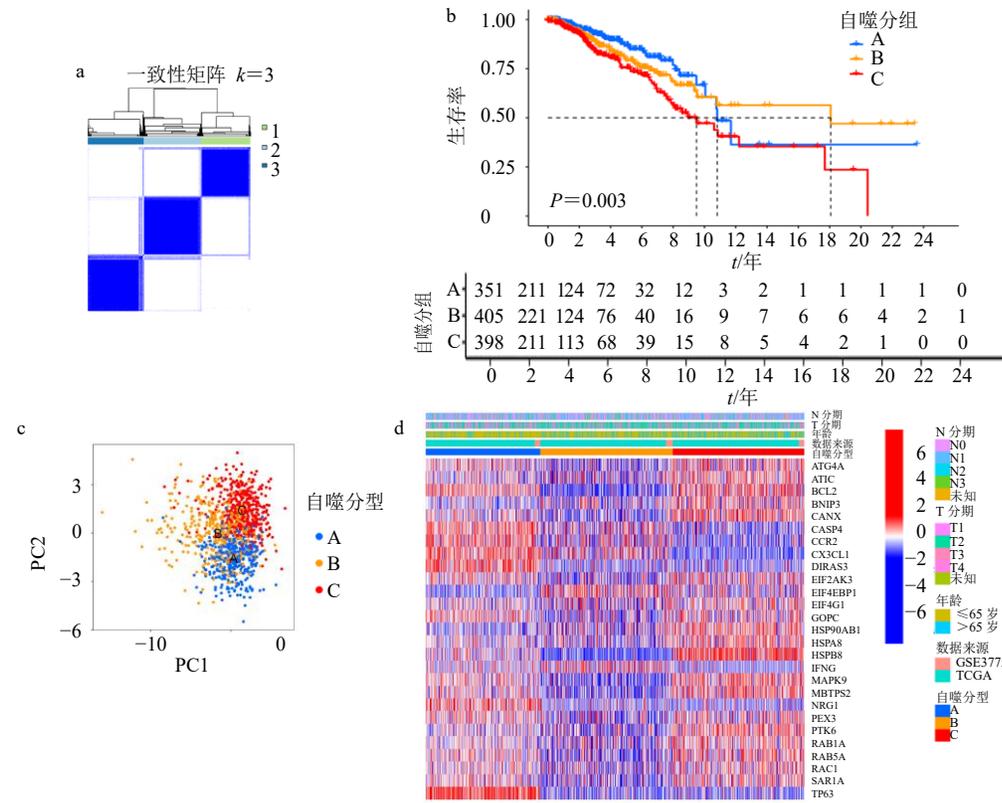
陷、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、免疫球蛋白（IgA）的肠道免疫网络等。C 分型主要与代谢相关，如嘧啶代谢、缬氨酸和亮氨酸生物合成和糖基磷脂酰肌醇生物合成等（图 4-a）。通过 ssGSEA 算法计算自噬 3 个分型的免疫细胞差异分析，结果提示 23 种免疫细胞在不同的自噬分型都存在显著差异，如巨噬细胞、骨髓源性抑制性细胞、自然杀伤细胞等（图 4-b）。这证明了自噬在肿瘤微环境的关键作用。KEGG 分析结果表明，这些基因主要富集在自噬-动物等信号通路有关（图 4-c），再次证实了这些基因与自噬密切相关。

2.5 乳腺癌自噬分型预后相关差异基因再聚类

为了深入分析调控机制，基于上述 3 个分型间的乳腺癌自噬分型预后相关差异基因进行了再次聚类，结果分成 2 个分型，分别为基因分型 a 和分型 b（图 5-I），2 个分型之间的生存率具有显著差异 ($P=0.001$)（图 5-II）。临床相关性如图 5-III 所示。自噬基因分型差异分析结果显示，大部分基因在 a 分型中高表达（图 5-IV）。

2.6 构建预后模型

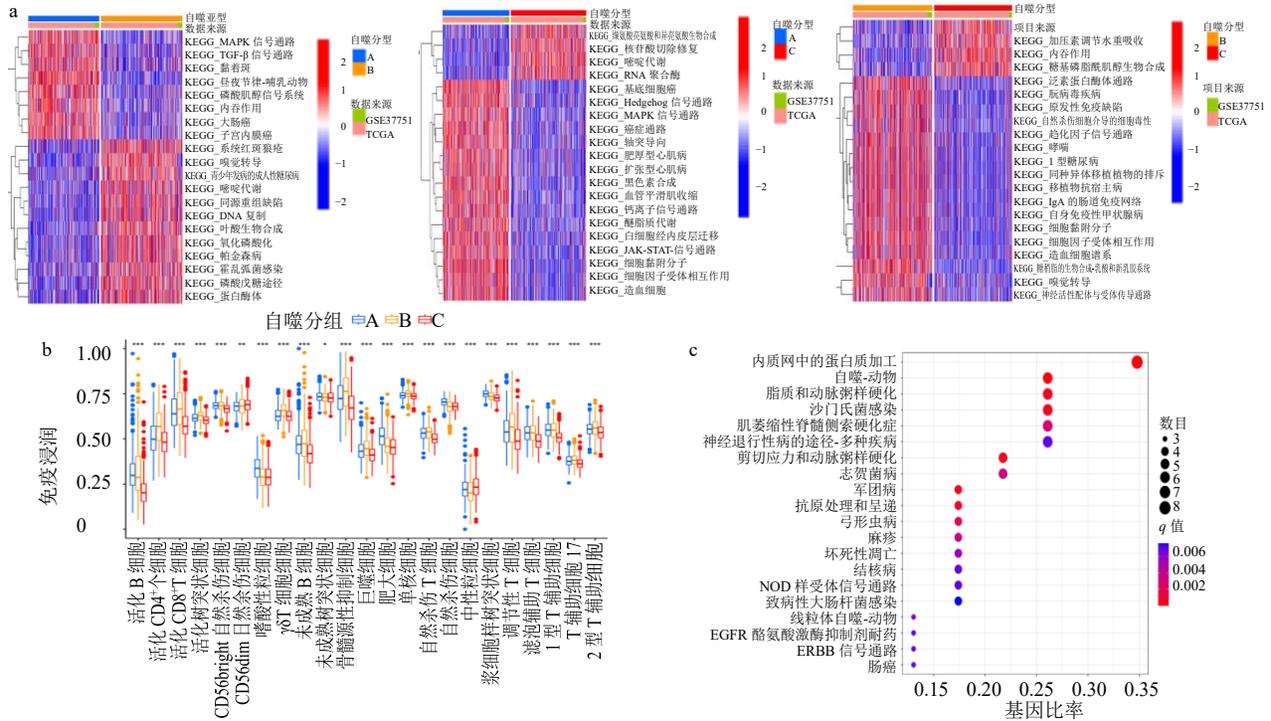
采用 LASSO Cox 回归法确定 λ 的最优值，确定出 6 个关键基因：自噬调节蛋白酶 Atg4（autophagy-regulating protease Atg4, *ATG4A*）、B 淋巴细胞瘤-2 基因（B-cell lymphoma-2, *BCL2*）、GTP 结合 RAS 类蛋白 3（DIRAS family GTPase 3, *DIRAS3*）、 γ 干扰素（interferon gamma, *IFNG*）、神经调节蛋白 1（neuregulin 1, *NRG1*）和 Rac 家族小



a-乳腺癌自噬聚类分型结果; b-自噬分型生存曲线; c-自噬分型主成分分析 (PCA) 散点图; d-自噬分型热图。 a-results of autophagy cluster typing of breast cancer; b-autophagy type survival curve; c-autophagy typing PCA scatter plo; d-autophagy typing heat map.

图3 自噬分型及相关性分析

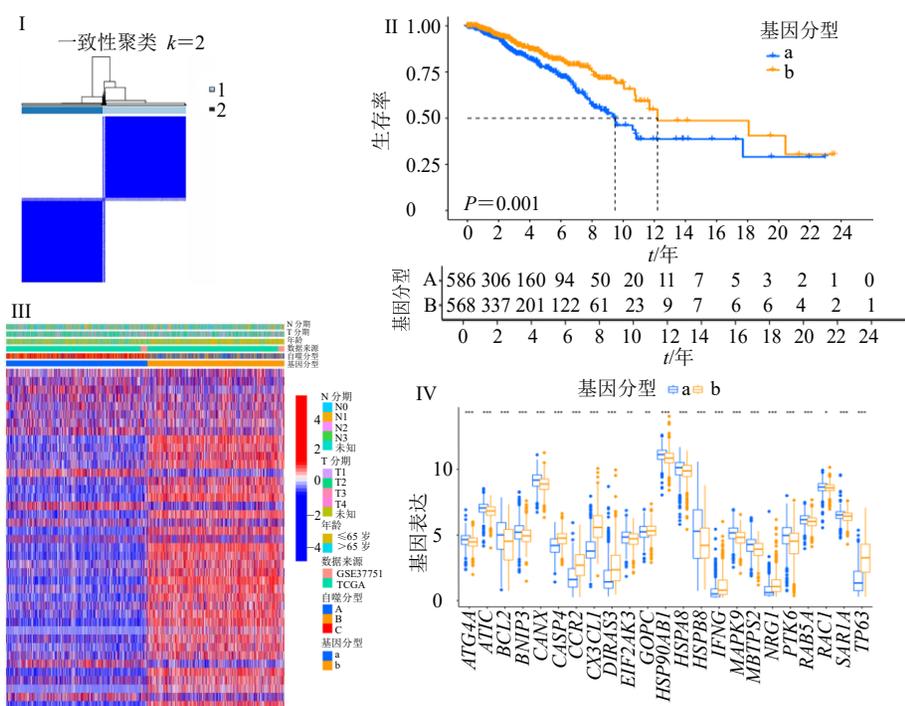
Fig. 3 Autophagy typing and correlation analysis



a-3 个自噬分型 GSEA 分析热图; b-自噬分型免疫细胞浸润箱型图; c-KEGG 富集分析; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。 a-heat maps for GSEA analysis of three autophagy typing; b-infiltration box diagram of autophagy type immune cells; c-KEGG enrichment analysis; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$.

图4 自噬分型的 GSEA、免疫浸润相关性分析及 KEGG 通路分析

Fig. 4 Analysis of GSEA, immune infiltration correlation and KEGG pathway of autophagy typing



I-自噬分型预后差异基因 2 次聚类分型结果；II-预后差异基因生存曲线；III-预后差异基因热图；IV-自噬分型基因表达箱线图。

I-secondary cluster typing results of autophagy prognostic differential genes; II-survival curve of prognostic differential gene; III-heat map of prognostic differential gene; IV-box map of autophagy typing gene expression.

图 5 乳腺癌自噬分型相关预后差异基因分型

Fig. 5 Autophagy typing related prognostic differential genotyping of breast cancer

三磷酸鸟苷酶 1 (Rac family small GTPase 1, *RAC1*), 建立自噬预后模型 (图 6-A、B)。ROC 曲线显示, 无论是总体组、训练组和验证组的 ROC 曲线下面积都大于 0.65, 说明该模型可有效预测乳腺癌预后 (图 6-C)。根据自噬风险评分, 将乳腺癌患者分为高风险组和低风险组。总体组、训练组和验证组的结果一致表明, 与低风险组患者相比, 高风险组患者预后更差 (图 6-D)。图 6-E 提示随着风险的增高, 患者死亡人数增加, 这与预期结果一致。通过热图展示构建模型的基因与风险的相关性, 见图 6-F。列线图结果显示, 1 年、3 年、5 年生存率分别为 98.1%、90.6%、83.5% (图 6-G)。图 6-H 展示了列线图生存率预测的准确度。

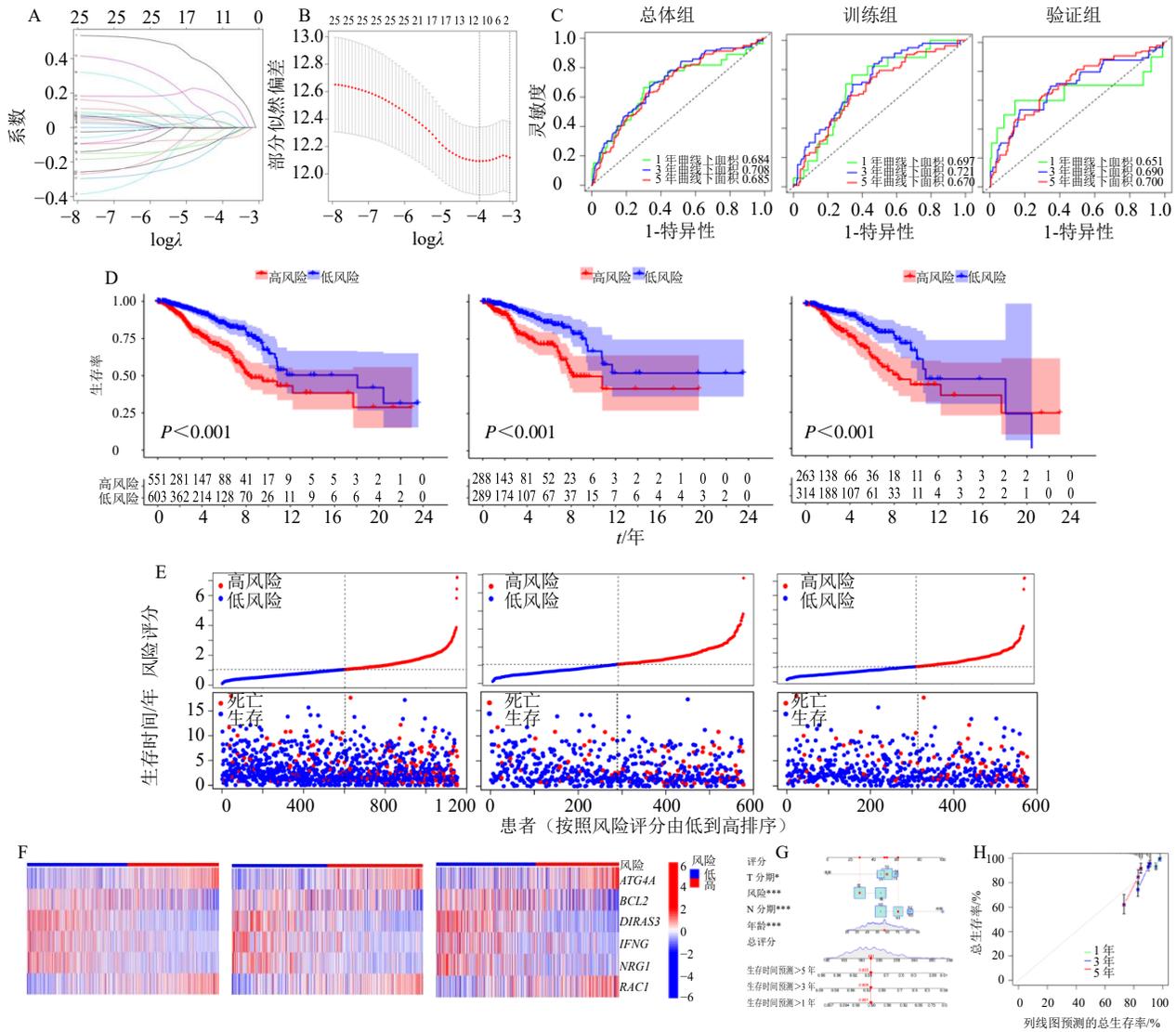
2.7 免疫细胞浸润分析

进一步基于该模型分析了乳腺癌患者的免疫细胞浸润水平。CIBERSORT 是目前最常用的评估免疫细胞浸润估的方法, 利用其探讨风险评分与免疫细胞相关性。结果显示 CD8⁺T 细胞、活化 CD4 记忆 T 细胞、幼稚 B 细胞、记忆 B 细胞、静息树突状细胞、静息自然杀伤细胞、活化自然杀伤细胞、单核细胞、中性粒细胞、M0 巨噬细胞、M2 巨噬细胞

与风险评分有相关性 (图 7-A)。预后模型构建中的 6 个基因与免疫细胞的相关性见图 7-B。红色表示正相关, 蓝色表示负相关。这些结果均强调了自噬对乳腺癌肿瘤微环境的影响。

2.8 体细胞突变、肿瘤微环境及肿瘤突变负荷分析

构建了一个量化患者自噬模型的风险评分系统, 分别揭示该风险评分系统与体细胞突变、免疫微环境评分以及肿瘤突变负荷的关系。根据中位值, 将该风险评分分为高风险组和低风险组。已有研究表明, 体细胞突变模式与免疫治疗的反应息息相关^[21]。使用 R 包 “maftools”^[22]探索高、低风险组评分中体细胞突变分布的差异。结果表明, 高风险组比低风险组的体细胞突变率要低 (85.61% vs 86.75%), 其中最显著的突变基因是磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸-3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha, *PIK3CA*) 和 *TP53* (图 8-A、B)。图 8-C 显示高、低风险组和肿瘤微环境打分相互联系。与高风险组相比, 低风险组的基质细胞、免疫细胞和 ESTIMATE 评分更高。图 8-D 表明高风险组的肿瘤突变负荷风险评分更高。



A-Lasso 回归; B-交叉验证; C-预后模型的 ROC 曲线; D-预后模型高、低风险组生存分析曲线; E-预后模型风险曲线及散点图; F-预后模型高、低风险组热图; G-生存期预测列线图; H-列线图校准曲线。

A-Lasso return; B-Cross-validation; C-ROC curve of prognostic model; D-survival analysis curve of high and low risk group in prognostic model; E-risk curve and scatter plot of prognostic model; F-heat map of high and low risk group in prognostic model; G-survival prediction nomogram; H-nomogram calibration curve.

图 6 乳腺癌自噬相关基因预后模型的构建及预后分析

Fig. 6 Construction and prognosis analysis of autophagy related gene prognostic model of breast cancer

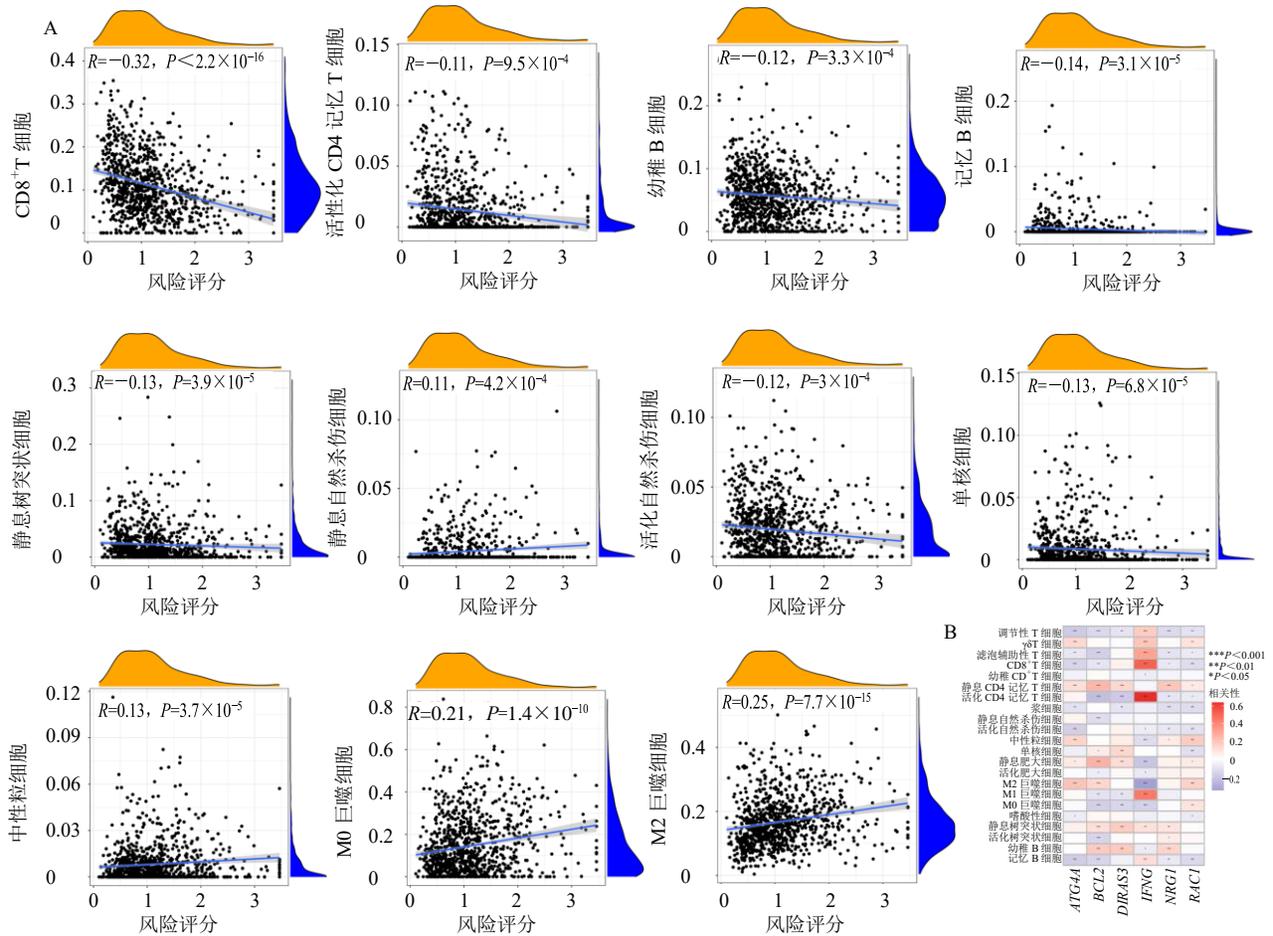
2.9 自噬相关中药预测

基于构建的自噬相关乳腺癌预后模型，以 6 个关键基为关键词在 SymMap 数据库中进行检索，以 $P < 0.01$ 、FDR (BH) < 0.01 为筛选条件，预测出 298 味自噬相关中药，出现频次 390 次，用 Cytoscape 软件构建中药-靶点网络图 (图 9-A)。其功效统计结果如图 9-B 所示，排名前 10 分别为清热解毒药、活血祛瘀药、理气药、利水渗湿药、化痰药、祛风湿散寒药、辛凉解表药、辛温解表药、补阳药和止咳平喘药。根据《中国药典》《中药大辞典》《中华本

草》和《中药学》将以上中药进行性味、归经统计，剔除未收录的中药，最终获得 272 味中药。中药性味主要以辛、苦、甘、寒为主 (图 9-C、D)，归经以肝、肺、胃经为主 (图 9-E)。

2.10 代表性自噬相关中药对乳腺癌细胞自噬水平、迁移及侵袭的影响

在此基础上，选取具有抗乳腺癌自噬活性的中药 (需属于上述预测的 272 种自噬相关中药)，检测其对乳腺癌自噬调控及生长进程的影响，从而对预测结果进行初步验证，并为其后续应用提供实



A-风险评分与免疫细胞相关性分析图; B-预后模型中6个基因与免疫细胞的相关性热图。

A-correlation analysis diagram of risk score and immune cell; B-heat map of correlation between six genes and immune cells in prognostic model.

图7 免疫细胞浸润分析

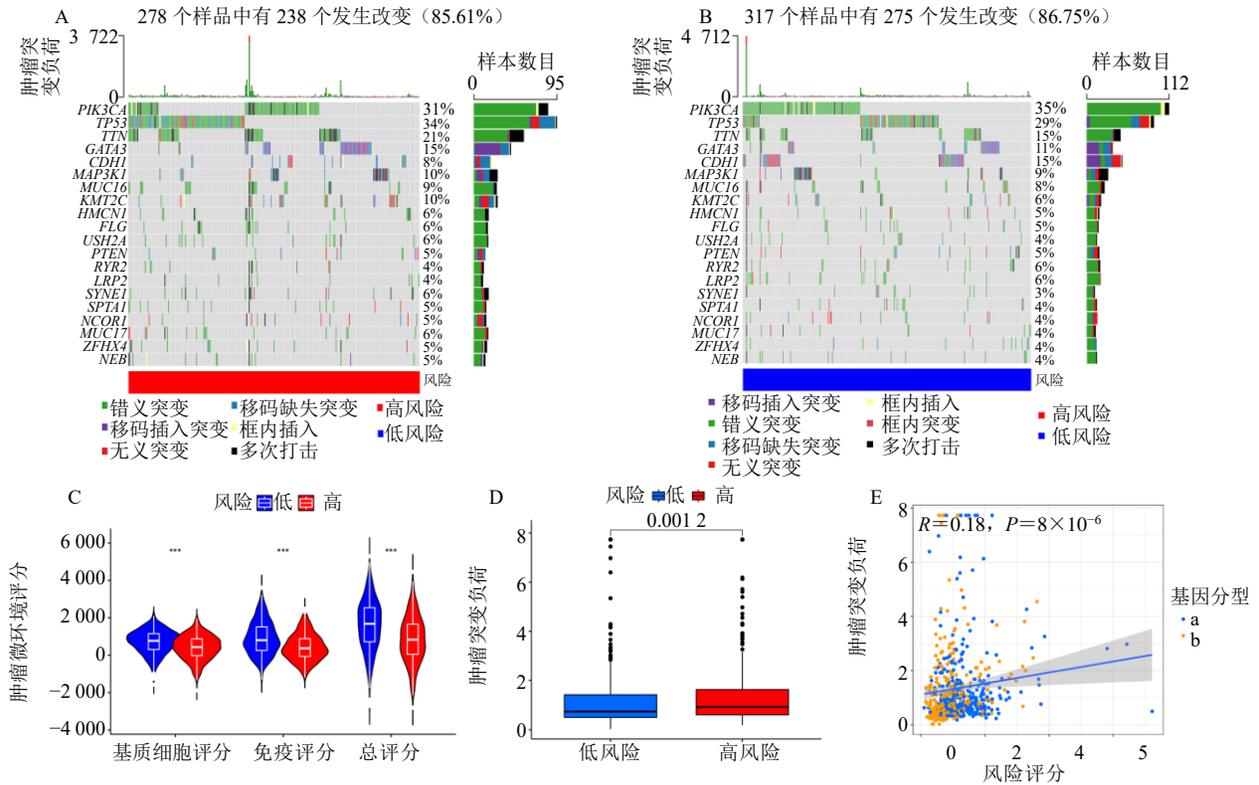
Fig. 7 Immune cell infiltration analysis

验临床前证据。课题组前期证实了中药复方癌毒清可直接杀伤乳腺癌细胞抑制肿瘤进程^[23]，而消癖方能靶向调节免疫微环境中 TAMs 间接抑制乳腺癌生长，其抗乳腺癌作用均与自噬调控相关^[24]。有趣的是，上述复方君药均属于本研究预测中药，癌毒清的君药为白花蛇舌草；消癖方中肉苁蓉、淫羊藿补肾助阳，郁金疏肝散结、活血止痛，3药共为君药，以达补肾助阳、疏肝活血、调摄冲任之功。按前述自噬中药功效进行分类，白花蛇舌草属于清热解毒类，肉苁蓉、淫羊藿属于补阳类，郁金属于活血化瘀类。实验验证中，观察了以上药物对乳腺癌高转移细胞株 MDA-MB-231 的自噬调控及迁移和侵袭的抑制作用。首先利用 mRFP-GFP-LC3 自噬双荧光体系，发现白花蛇舌草可直接抑制紫杉醇（50 nmol/L）激活的 MDA-MB-231 细胞自噬活性增加，表现为单个细胞中黄色斑点

（mRFP 和 GFP 的共定位）和游离红色斑点（mRFP）数量增加。TAMs-CM 使得紫杉醇激活的乳腺癌细胞自噬活性增加进一步加剧，而肉苁蓉、淫羊藿、郁金处理后的 TAMs-CM 可逆转紫杉醇对 MDA-MB-231 自噬流的促进作用，提示其对肿瘤细胞自噬活性的间接抑制作用。划痕实验和 Transwell 检测随即证明，白花蛇舌草对 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭有直接抑制作用，表现为划痕面积和侵袭细胞数目的显著减少；而肉苁蓉、淫羊藿、郁金主要通过抑制 TAMs 而间接削弱 MDA-MB-231 细胞的转移和侵袭能力(图 10)。以上实验初步印证了本研究的预测，即清热解毒类、活血化瘀类、补阳类等预测中药可调控自噬活性抑制乳腺癌的进展。

3 讨论

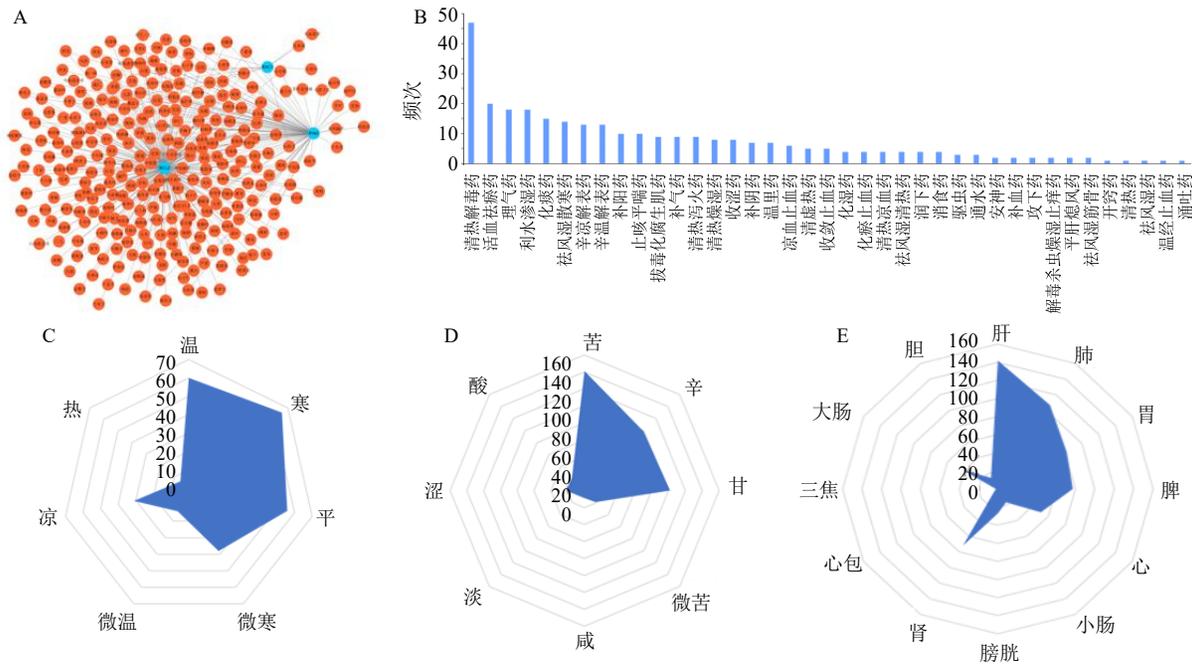
自噬受自噬相关基因的调控，可通过蛋白质和



A-高风险组基因突变频率瀑布图; B-低风险组基因突变频率瀑布图; C-高、低风险组肿瘤微环境评分差异图; D-高、低风险组肿瘤突变负荷差异分析图; E-肿瘤突变负荷和风险评分相关性散点图; *** $P < 0.001$ 。
A-waterfall chart of gene mutation frequency of high risk group; B-waterfall chart of gene mutation frequency of low risk group; C-tumor microenvironment score difference map of high and low risk groups; D-tumor mutation burden difference analysis diagram of high and low risk groups; E-scatter plot of correlation between tumor mutation burden and risk score; *** $P < 0.001$.

图 8 高、低风险组体细胞突变、肿瘤微环境及肿瘤突变负荷分析

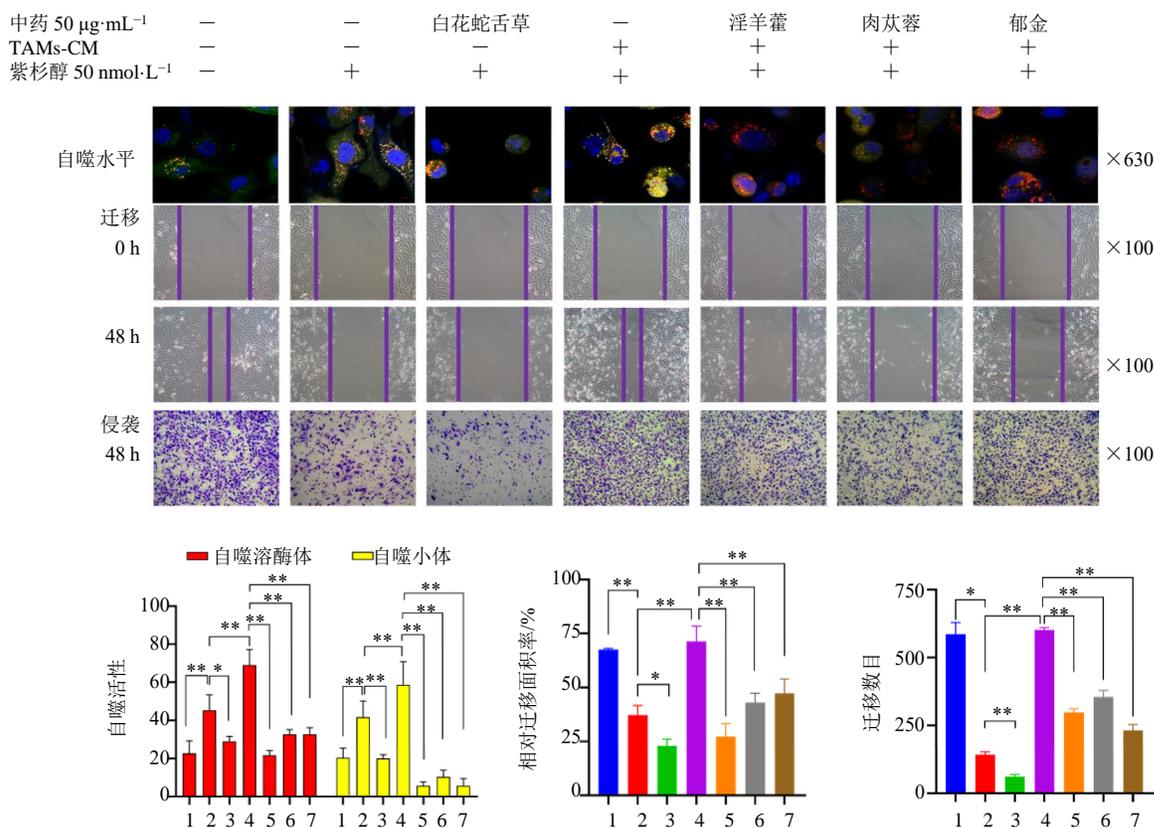
Fig. 8 Analysis of somatic cell mutation, tumor microenvironment and tumor mutation burden in high and low risk groups



A-关键基因-中药网络图; B-中药功效频次统计图; C-中药四气统计图; D-中药五味统计图; E-中药归经统计图。
A-key gene-traditional Chinese medicine network diagram; B-statistical chart of efficacy frequency of traditional Chinese medicine; C-statistical diagram of four qi of traditional Chinese medicine; D-statistical diagram of five flavors of traditional Chinese medicine; E-statistical diagram of channel tropism of traditional Chinese medicine.

图 9 靶点-中药网络的构建及相关中药筛选

Fig. 9 Construction of target-traditional Chinese medicine network and screening of relevant traditional Chinese medicine



1-正常; 2-模型; 3-白花蛇舌草; 4-TAMs-CM+自噬激活剂; 5-淫羊藿; 6-肉苁蓉; 7-郁金; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

1-normal; 2-model; 3-*Scleromitron diffusum*; 4-TAMs-CM + autophagy activator; 5-*Epimedii Folium*; 6-*Cistanches Herba*; 7-*Curcumae Radix*; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

图 10 代表性自噬相关中药对乳腺癌细胞自噬水平、迁移以及侵袭的影响 (n = 3)

Fig. 10 Effects of representative autophagy-related traditional Chinese medicines on autophagy levels, migration and invasion of breast cancer cell (n = 3)

细胞器的溶酶体降解来维持细胞稳态^[25]。自噬在乳腺癌发挥双重调节作用，具有肿瘤环境依赖性。在早期乳腺癌中，自噬起到抑制作用，从而限制乳腺癌的生长。而在晚期乳腺癌中，自噬可以通过破坏应激反应或通过肿瘤浸润免疫细胞抑制免疫监视来促进肿瘤发生，从而促进癌症的进展和转移^[26]。更重要的是，自噬被证明是免疫细胞调节中的重要细胞过程^[27]。构建反映免疫细胞浸润的基因预后模型对于评估免疫相关疗法必不可少。已有许多研究表明自噬相关基因预后模型在各类癌症中显示出良好的预后预测价值，如前列腺癌^[28]、肝癌^[29]、卵巢癌^[30]等，但在乳腺癌中尚未深入探讨。虽然之前也有一些关于乳腺癌自噬相关模型的文献报道，如 Zhong 等^[31]、Cao 等^[32]和 Lai 等^[33]分别构建了不同的基因自噬相关预后模型，以预测乳腺癌的总生存期。但上述研究缺乏对肿瘤微环境、免疫治疗和中

药方面的探索。故本研究在之前研究的基础上，深入探讨了自噬相关基因在乳腺癌的分子分型和肿瘤微环境中的综合作用。此外，还探索与自噬调控相关的中药，有助于预测乳腺癌中自噬分型、预后和免疫治疗的效果，从而为治疗乳腺癌提供新的治疗靶点和免疫治疗方向，以及推动中医药进程。

本研究通过构建 6 个自噬相关基因的预后模型量化自噬风险评分。结果发现自噬风险评分低的患者生存率更高，并发现自噬低风险的肿瘤微环境评分更高。这些结果都表明自噬和乳腺癌的预后以及肿瘤微环境密切相关。针对上述发现，可以根据自噬风险模型评分来预测乳腺癌患者的预后，为研究乳腺癌自噬相关基因的肿瘤微环境相关性提供新的见解，以及为患者提供个体化治疗。肿瘤微环境是一个复杂动态的生态系统，由基质细胞、细胞外基质和免疫细胞共同组成^[34]。目前针对肿瘤微

环境开发安全有效的免疫治疗成为了癌症治疗的研究热点,将肿瘤遗传状态和肿瘤微环境中细胞免疫浸润相结合,可为免疫治疗提供参考。例如,本研究发现 *TP53* 在乳腺癌自噬基因突变频率较高,抑制自噬可能会改善靶向突变基因的治疗效果。此外,还发现高风险组患者的肿瘤突变负荷更高。已有研究证实自噬可以通过肿瘤突变负荷来影响肿瘤的进程。高肿瘤突变负荷状态下,自噬抑制可增强抗肿瘤 T 细胞反应^[26]。由于高突变负荷的肿瘤可能在免疫细胞浸润增加的同时表达相对高水平的抗原呈递,自噬抑制则可能通过降低 MHC-I 类基因表达和抗原呈递,从而提高免疫反应,抑制肿瘤发展^[35]。因此,将免疫治疗与自噬抑制相结合可能是一种对高突变负荷肿瘤和基因突变有用的治疗方法。

乳腺癌属于“乳岩”范畴。本病以正气亏虚为发病的内在基础,气滞、血瘀、痰凝为重要的病理因素,导致脏腑经络气血阴阳失调,引起癌毒结聚与乳房,日久成瘤^[36]。中医药治疗肿瘤具有显著的优势,如生物利用度高、毒性小、长期临床疗效好等。本研究对自噬相关中药进行了预测,首先发现其性味以辛、苦、甘、寒为主。辛味“能散能行”,即行气行血、活血化瘀,同时避免苦寒损伤正气;苦味“能泄、能燥”,即清热解毒燥湿,针对癌毒本身可用苦寒祛邪;甘味“能补能缓”,即扶正补虚、缓急止痛。说明针对乳腺肿瘤本身,祛邪应以苦寒药为主,扶正应以辛甘化阳温补机体。这与乳腺癌的治法治则相符合,即活血化瘀、清热解毒、扶正补虚。其次,中药预测指出归经以肝、肺、胃为主。《薛氏医案选》中乳腺癌的病因归结为“乳岩乃七情所伤,肝经血气枯槁之证”。乳腺癌的发生与情志密不可分。而肝主疏泄为乳腺癌发病的核心病机。张宗岐教授认为乳房为胸部体表的器官,位于皮肤肌肉中,因肺主皮毛,同时乳房为阳明胃经循行部位,故乳房疾病可从肺、胃论治^[37]。更重要的是,本研究还对自噬相关中药进行了功效统计,结果表明排名前 10 分别为清热解毒药、活血祛瘀药、理气药、利水渗湿药、化痰药、祛风湿散寒药、辛凉解表药、辛温解表药、补阳药和止咳平喘药。本课题组在既往研究中发现,中药复方癌毒清和消癥方可分别通过影响肿瘤自身或其局部微环境而发挥抗乳腺癌作用,其作用机制都与自噬调控密切相关。君药是整体方剂的主要成分,对药物功效起着主导作用,研

究君药能够更好地揭示中药复方的科学内涵^[38]。本研究发现癌毒清君药白花蛇舌草及消癥方君药郁金、淫羊藿、肉苁蓉均属于自噬相关中药 272 种预测范围之内,并通过自噬活性检测、细胞划痕以及 Transwell 实验证实了其通过调节自噬水平抑制乳腺癌生长及转移。一方面,白花蛇舌草可直接抑制紫杉醇激活的自噬水平升高,从而抑制乳腺癌的进展。这与本课题组前期的研究结果一致^[19]。另一方面, TAMs-CM 导致了紫杉醇介导的肿瘤细胞自噬活性增加,而肉苁蓉、淫羊藿、郁金的干预逆转了 TAMs 对自噬流的促进作用,且可抑制 TAMs 诱导的乳腺癌细胞生长和转移,表现为划痕面积和侵袭细胞数目的减少。以上结果也提示了抗乳腺癌药物优选具有清热解毒功效药物的理念,并同时注重活血化瘀、扶阳固本、扶正祛邪。首先,清热解毒药可用于临床治疗乳腺癌,其抗肿瘤药理与血管生成抑制、炎症反应降低、肿瘤转移抑制密切相关^[39]。预测的清热解毒类药物还有半枝莲,临床上常与白花蛇舌草配伍,被证实可通过上调 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、下调 β -连环蛋白 (β -catenin)、波形蛋白 (vimentin) 抑制乳腺癌肺部转移^[40]。其次,活血化瘀药可改善血液高凝性,降低血液黏度、改善肿瘤乏氧微环境和间质高压等方法抑制癌转移^[41]。预测的活血化瘀类中药除郁金外,丹参及其活性成分也可通过作用于雌激素受体、诱导自噬、促进凋亡等途径抑制乳腺癌的生长^[42]。此外,人体正气是无形的,属阳,补阳药可扶阳固本、扶正祛邪,达到提高机体免疫功能的效果,起到协同增效和减毒作用^[43]。预测的补阳药除了淫羊藿、肉苁蓉外,还有骨碎补,已被证明可抑制乳腺癌骨转移和减轻骨质破坏的功效^[44]。综上所述,本研究通过关键基因寻找相关中药并进行实验验证,将基因与四气五味和归经相联系,发现微观基因角度和中医理论具有一致性,两者相结合可深入了解中药调节乳腺癌自噬的内在机制。

4 结论

本研究基于生物信息学,利用 TCGA 和 GEO 数据库,综合分析乳腺癌自噬相关分子模型、免疫浸润模式和构建了 6 个基因的自噬相关预后模型。在此基础上,筛选并验证了可调控乳腺癌自噬活性的中药类别,为乳腺癌的免疫治疗提供潜在的治疗靶点,为临床中医用药提供新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, *et al.* Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] Lu J, Steeg P S, Price J E, *et al.* Breast cancer metastasis: Challenges and opportunities [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 4951-4953.
- [3] 黄超. 肺癌肿瘤微环境的系统解析及靶向中药发现 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [4] 刘毅, 谢雁鸣, 黎元元, 等. 基于生物信息学的乳腺癌细胞焦亡相关基因多组学分析及相关中药筛选预测 [J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5768-5785.
- [5] Li Z L, Zhang H L, Huang Y, *et al.* Autophagy deficiency promotes triple-negative breast cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity by blocking tenascin-C degradation [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3806.
- [6] Levine B, Klionsky D J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 463-477.
- [7] Ritchie M E, Phipson B, Wu D, *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [8] Cedric G. ggplot2: Elegant graphics for data analysis [J]. *J Royal Statistical Society Series A: Statistics Society*, 2011, 174(1): 245-246.
- [9] Therneau T M, Grambsch P M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model* [M]. New York: Springer New York, 2000: 261-287.
- [10] Wilkerson M D, Hayes D N. Consensus ClusterPlus: A class discovery tool with confidence assessments and item tracking [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(12): 1572-1573.
- [11] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7.
- [12] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [13] Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package [J]. *J Statistical Software*, 2008, 28(5): 1-26.
- [14] Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent [J]. *J Stat Softw*, 2010, 33(1): 1-22.
- [15] Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, *et al.* Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612.
- [16] Newman A M, Liu C L, Green M R, *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-457.
- [17] Wu Y, Zhang F L, Yang K, *et al.* SymMap: An integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1110-D1117.
- [18] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [19] Yang B, Wang N, Wang S, *et al.* Network-pharmacology-based identification of caveolin-1 as a key target of *Oldenlandia diffusa* to suppress breast cancer metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108607.
- [20] Wang N, Zheng Y, Gu J, *et al.* Network-pharmacology-based validation of TAMS/CXCL-1 as key mediator of XIAOPI formula preventing breast cancer development and metastasis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14513.
- [21] 赵光, 李珺, 杨捷. 中药砂仁、虎杖及桂枝萃取液对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制作用 [J]. *中国医学装备*, 2016, 13(6): 94-98.
- [22] Mayakonda A, Lin D C, Assenov Y, *et al.* Maftools: Efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer [J]. *Genome Res*, 2018, 28(11): 1747-1756.
- [23] Yang B W, Peng F, Zhang Y, *et al.* Aiduqing formula suppresses breast cancer metastasis via inhibiting CXCL1-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153628.
- [24] Wang N, Yang B W, Muhetaer G, *et al.* XIAOPI formula promotes breast cancer chemosensitivity via inhibiting CXCL1/HMGB1-mediated autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109519.
- [25] White E, Mehnert J M, Chan C S. Autophagy, metabolism, and cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(22): 5037-5046.
- [26] Flynn A B, Schiemann W P. Autophagy in breast cancer metastatic dormancy: Tumor suppressing or tumor promoting functions? [J]. *J Cancer Metastasis Treat*, 2019, 5: 43.
- [27] Yamamoto K, Venida A, Yano J, *et al.* Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I [J]. *Nature*, 2020, 581(7806): 100-105.
- [28] Wen C H, Ge Q T, Dai B S, *et al.* Signature for prostate cancer based on autophagy-related genes and a nomogram for quantitative risk stratification [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 7598942.
- [29] Ye W, Shi Z H, Zhou Y L, *et al.* Autophagy-related signatures as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 654449.
- [30] Ding J Y, Wang C Y, Sun Y Q, *et al.* Identification of an autophagy-related signature for prognosis and immunotherapy response prediction in ovarian cancer [J].

- Biomolecules*, 2023, 13(2): 339.
- [31] Zhong S L, Chen H W, Yang S J, *et al.* Identification and validation of prognostic signature for breast cancer based on genes potentially involved in autophagy [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9621.
- [32] Cao L, Huang N, Wang J, *et al.* An autophagy-associated prognostic gene signature for breast cancer [J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(4): 1282-1299.
- [33] Lai J G, Chen B, Mok H, *et al.* Comprehensive analysis of autophagy-related prognostic genes in breast cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 9145-9153.
- [34] Chao Y, Liu Z. Biomaterials tools to modulate the tumour microenvironment in immunotherapy [J]. *Nat Rev Bioeng*, 2023, 1: 125-138.
- [35] Xia H J, Green D R, Zou W P. Autophagy in tumour immunity and therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(5): 281-297.
- [36] 李孟, 梁则徐, 李冠男, 等. 中医中药治疗乳腺癌的研究进展 [J]. *中医学报*, 2023, 51(2): 103-108.
- [37] 李雨, 张宇清, 林越. 张宗岐教授从肺脾胃扶正祛邪论治乳腺癌经验 [A] // 湖南中医药大学学报 2016/专集: 国际数字医学会数字中医药分会成立大会暨首届数字
- 中医药学术交流会议论文集 [C]. 珠海: 湖南中医药大学学报, 2016: 1077-1078.
- [38] 宋小莉. 复方君药实验研究方法探讨 [J]. *江苏中医药*, 2008, 40(12): 85-86.
- [39] 刘洪瑞, 齐元富, 刘寨东, 等. 运用清热解毒药治疗恶性肿瘤经验 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(7): 3874-3877.
- [40] 曾丽红. 基于 Wnt 信号诱导 EMT 探讨半枝莲-白花蛇舌草药对抑制乳腺癌肺转移的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [41] 闫梓乔, 张佳艺, 顾伟, 等. 活血化痰中药调节肿瘤微环境研究进展 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(5): 120-123.
- [42] 刘磊, 张光霁, 楼招欢, 等. 丹参有效成分防治恶性肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(6): 2472-2475.
- [43] 刘智勤, 陈鹤汀, 李岩, 等. 肉苁蓉对化疗荷瘤小鼠增效减毒作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 1037-1038.
- [44] Wang S, Wang N, Huang X, *et al.* Baohuoside i suppresses breast cancer metastasis by downregulating the tumor-associated macrophages/C-X-C motif chemokine ligand 1 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153331.

[责任编辑 潘明佳]