

DOI: 10.3969/j.issn.2096-8248.2025.04.007

引用格式: 王宇, 储著荣, 吴函哲, 等. 基于非靶向代谢组学的晚期 Luminal 型乳腺癌哌柏西利耐药生物标志物研究 [J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2025, 34(4): 62-74.

## 基于非靶向代谢组学的晚期 Luminal 型乳腺癌 哌柏西利耐药生物标志物研究

王宇<sup>1</sup>, 储著荣<sup>1</sup>, 吴函哲<sup>1</sup>, 郑朋飞<sup>1,2</sup>, 司鑫鑫<sup>1</sup>

(1. 江苏海洋大学药学院, 江苏连云港 222005; 2. 南京医科大学附属儿童医院 骨科, 江苏南京 210026)

**摘要:** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 的非靶向代谢组学方法进行代谢物丰度检测和鉴定, 结合多元统计方法比较健康对照组、晚期 Luminal 型乳腺癌 (luminal advanced breast cancer, Luminal ABC) 哌柏西利耐药组和敏感组患者中代谢谱趋势差异, 以变量权重值 (variable importance in projection, VIP) >1、 $P < 0.05$  和差异倍数 (fold change, FC) >1.2 或 <0.833 标准筛选差异代谢物, 对鉴定到的代谢物通过加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 来确定与耐药相关的共表达模块, 京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析和代谢物集富集分析 (metabolite set enrichment analysis, MSEA) 识别与耐药相关的关键代谢通路和生物学功能。结果显示, 共鉴定出 583 种代谢物, 依据筛选标准筛选出 54 种差异代谢物, 通过 WGCNA 分析构建出 8 个共表达模块。其中青绿色模块 (MEturquoise) 与哌柏西利耐药表型显著相关 ( $r=0.46$ ,  $P < 0.05$ ), 共包含 179 种关键代谢物, 且有 22 个关键代谢物同为差异代谢物, 即精氨酸和苯丙氨酸等 16 种显著上调, 胆碱和辛酸等 6 种显著下调。模块内整体代谢物与差异代谢物具有相似的代谢功能和生物学作用 ( $P < 0.05$ )。因此, Luminal ABC 患者血清代谢水平与健康人群存在显著差异, 结合 WGCNA 识别哌柏西利耐药相关的差异代谢物, 以期 Luminal ABC 哌柏西利耐药患者的代谢异常调控提供数据支持和研究依据。

**关键词:** 晚期 Luminal 型乳腺癌; 哌柏西利耐药; 非靶向代谢组学; 加权基因共表达网络分析  
中图分类号: R9 文献标志码: A 文章编号: 2096-8248 (2025) 04-0062-13

## Study on palbociclib resistance biomarkers for luminal advanced breast cancer based on untargeted metabolomics

WANG Yu<sup>1</sup>, CHU Zhurong<sup>1</sup>, WU Hanzhe<sup>1</sup>, ZHENG Pengfei<sup>1,2</sup>, SI Xinxin<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Orthopedics Department, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210026, China)

**Abstract:** Employed a non-targeted metabolomics approach using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) to detect and identify metabolite abundance. Multivariate statistical methods were applied to compare metabolic profile trends among healthy controls,

收稿日期: 2024-10-04; 修订日期: 2024-11-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81703557)

作者简介: 王宇, 硕士研究生, 研究方向为质谱检测分析, (E-mail) mtnhwy@126.com。

通信作者: 司鑫鑫, 副教授, 博士, 研究方向为肿瘤细胞耐药的机制, (E-mail) sixx@jou.edu.cn。

Luminal ABC palbociclib-resistant patients, and palbociclib-sensitive patients. Differential metabolites were screened based on a variable importance in projection (VIP) >1,  $P < 0.05$ , and fold change (FC) >1.2 or <0.833. The identified metabolites were subjected to weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) to determine co-expression modules associated with drug resistance. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis and metabolite set enrichment analysis (MSEA) were performed to identify key metabolic pathways and biological functions related to drug resistance. The results showed that a total of 583 metabolites were identified, and 54 differential metabolites were screened based on the criteria. WGCNA analysis constructed eight co-expression modules, among which the turquoise module (MEturquoise) was significantly correlated with the palbociclib-resistant phenotype ( $r = 0.46$ ,  $P < 0.05$ ). This module contained 179 key metabolites, including 22 overlapping differential metabolites, such as arginine and phenylalanine (16 significantly upregulated) and choline and octanoic acid (6 significantly downregulated). The overall metabolites within the module exhibited similar metabolic functions and biological roles as the differential metabolites ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the serum metabolic levels of Luminal ABC patients significantly differed from those of healthy individuals. By integrating WGCNA, palbociclib resistance-related differential metabolites were identified, providing data support and research evidence for understanding metabolic dysregulation in Luminal ABC patients with palbociclib resistance.

**Key words:** Luminal advanced breast cancer; palbociclib resistance; untargeted metabolomics; WGCNA

## 0 引言

乳腺癌已成为全球女性中第一大癌症,也是导致女性癌症死亡的最主要健康问题<sup>[1]</sup>。根据基因表达谱和生物学特性,乳腺癌可以分为多种亚型<sup>[2]</sup>。其中,Luminal型是一种依赖于激素受体的乳腺癌主要类型,约占所有乳腺癌患者的70%,通常对内分泌治疗敏感。尽管大多 Luminal 型乳腺癌在早期阶段可以得到有效控制,但仍约有20%会发生远端转移,晚期患者临床表现不佳,生存期较短<sup>[3-4]</sup>。

近年来,随着乳腺癌基于分子层面的诊断和治疗策略快速发展,靶向治疗如细胞周期蛋白依赖性激酶4/6(cyclin-dependent protein kinase 4/6, CDK4/6)抑制剂的开发应用<sup>[5]</sup>,为那些对内分泌治疗不敏感的患者提供了新的治疗选择,在晚期 Luminal 型乳腺癌(luminal advanced breast cancer, Luminal ABC)治疗中展现了巨大的临床价值。在首个获批的 CDK/46 抑制剂中,哌柏西利被用于 Luminal ABC 的一线治疗,初期疗效显著<sup>[6]</sup>。但随着使用临床普及率和使用率的增加,先天性或后天获得的耐药性问题日益突出<sup>[7-10]</sup>。哌柏西利耐药患者数量的积累,极大限制了该药物的临床发展,患者临床获益率较低也造成极大医疗资源浪费。现有研究表明,哌柏西利耐药涉及多种机制,包括细胞周

期检查点失调、旁路信号通路激活以及肿瘤微环境适应性改变等。尽管多组学分析(如基因组学、转录组学和蛋白组学)已鉴定出部分耐药相关分子特征,但其在临床上用于耐药性的早期诊断和逆转治疗方面仍面临挑战<sup>[11-12]</sup>。因此,探索代谢重编程在耐药形成中的作用,寻找基于代谢组学的生物标志物,可能为哌柏西利耐药的早期监测和逆转提供新的突破口。

Luminal ABC 作为一种代谢性疾病,其自身可以发生代谢重编程。肿瘤细胞可通过加快能量代谢为自身的增殖提供动力和物质基础,从而导致参与能量产生和生物合成的代谢过程发生异常<sup>[13]</sup>,包括核苷酸代谢、氨基酸代谢、脂肪酸氧化等改变,最终会引发整个生物体内代谢谱异常表达。非靶代谢组学是一项系统生物学技术,可直观、全面地反应生物体在疾病治疗过程中发生的代谢终产物变化<sup>[14-16]</sup>,致力于检测出与生理或病理改变相关的代谢物,揭示疾病的代谢本质。因此,本文拟采用非靶代谢组学技术研究 Luminal ABC 哌柏西利耐药患者血清代谢谱的改变,挖掘出与耐药相关的关键代谢物,以期阐述耐药患者代谢异常调控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

Allegra 64 R 台式高速冷冻离心机(美国 Beck-

man Coulter 公司); 涡旋振荡仪(美国 Scientific Industries 公司); 真空离心浓缩机(美国 Labconco 公司); AYW220D 电子天平(日本 Shimadzu 公司); 色谱级甲醇(质量分数 $\geq 99.9\%$ , 德国 Sigma 公司)和色谱级乙腈(质量分数 $\geq 99.9\%$ , 德国 Sigma 公司)。

## 1.2 临床入组及分组信息

本研究共分3组,即 Luminal ABC 哌柏西利耐药组(palbociclib resistance, PR)、敏感组(palbociclib sensitivity, PS)与健康对照组(healthy controls, HC),共50人,均来自江苏省肿瘤医院。其中耐药组和敏感组共纳入了20名患者(即 Luminal ABC 组),所有患者均在2021年10月至2023年12月期间收治。本研究 Luminal ABC 患者纳入标准:①年龄 $\geq 18$ ;②接受基于哌柏西利的一线治疗方案;③远端转移到淋巴结外的其他器官,如肝、肺或中枢神经系统。根据实体瘤反应评估标准评估哌柏西利耐药性,在第12周和第24周评估患者反应,每12周评估一次疾病进展。排除不符合指标标准:①病历资料缺失者;②血清质量不达标者(如溶血)。健康对照组:无实质性疾病、无乳腺癌相关疾病史的健康成年人。

## 1.3 临床样本采集与处理

### 1.3.1 临床样本采集

采集受试者空腹状态下的全血样本,放入含有乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)的抗凝采血管中后贴上标签。倒置采血管8~10次后,室温下静置15~20 min。样本转移至离心机中,以2000 r/min在4℃下离心15 min实现血清分离。将上层血清分离后,分装200  $\mu\text{L}$ 至新的离心管中,并保存在-80℃下待后续分析。本实验中的30例健康人群和20例 Luminal ABC 患者全血由江苏省肿瘤医院收集。

### 1.3.2 血清样本前处理

取出保存在-80℃的200  $\mu\text{L}$ 血清样本,并在4℃冰上充分融化。加入4倍预冷至-80℃的甲醇,充分涡旋5 min后,将样本放置在-80℃冰箱中孵育6 h,充分淬灭蛋白质并萃取小分子代谢物。然后以12000 r/min在4℃下离心15 min,小心取出上清液并转移至新的离心管中。向沉淀中加入200  $\mu\text{L}$ 预冷至-80℃本积分数为80%甲醇水溶液,在4℃下超声处理5 min后,剧烈涡旋5 min以充分重悬。再次以12000 r/min在4℃下离心15 min,吸取上

清液,与前述保留上清液合并。将合并的上清液在4℃下真空离心浓缩至干燥。最后,用100  $\mu\text{L}$  80%甲醇水溶液复溶干燥的样品,经过12000 r/min在4℃下离心15 min,取上清液并装入质谱瓶中,在4℃下保存以备后续代谢检测。此外,另吸取各血清样本5  $\mu\text{L}$ ,参照上述提取步骤处理,用于制备质控样本(quality control, QC)。

## 1.4 色谱与质谱参数

实验中所用的仪器为超高效液相色谱(Exion-LCT<sup>TM</sup> AD, SCIEX, 美国)串联四极杆飞行时间质谱(TripeTOF<sup>TM</sup> 5600, SCIEX, 美国)。

### 1.4.1 色谱条件

色谱柱采用 Kinetex EVO C18 100A (100 mm $\times$  2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为体积分数 0.1% 甲酸乙腈溶液。色谱分离采用梯度洗脱, 线性梯度为 A 的体积分数 90% (0 min)  $\rightarrow$  体积分数 70% (1 min)  $\rightarrow$  体积分数 30% (15 min)  $\rightarrow$  体积分数 5% (20 min)  $\rightarrow$  体积分数 90% (20.1 min)  $\rightarrow$  体积分数 90% (21 min)。柱温: 25℃, 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 5  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4.2 质谱条件

质谱分析采用数据依赖性采集模式, 离子源选择电喷雾电离离子源, 扫描方式采用正离子与负离子两种模式分开检测, 前体离子扫描范围:  $m/z$  70~1000, 碰撞能量和去簇电压分别设置为: (30 $\pm$ 15)/(-30 $\pm$ 15) V, 碎片离子扫描范围:  $m/z$  30~1000。毛细管电压为 5500/-4500 V, 离子源温度为 550℃, 雾化气 GS1、辅助加热气 GS2 以及气帘气压力分别为 55, 55 和 35 psi。

## 1.5 数据处理和分析

本研究使用 MS-DIAL (version 4.9.2) 软件对原始质谱数据进行峰提取、峰对齐以及归一化等预处理以减少实验过程中带来的误差。分别使用 R (version 4.3.0), pca 和 ropls 程序包对数据进行统计分析。统计学方法采用 T-test 双尾分布检验; 以  $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$  和  $FC > 1.2$  或  $FC < 0.833$  为代谢物显著上调或下调的标准。ComplexHeatmap 程序包绘制代谢物的火山图和差异表达代谢物的热图; MetaboAnalyst 程序包实现 KEGG 分析和 MSEA 富集显示对差异代谢物功能注释; WGCNA 程序包构建加权基因共表达网络来对代谢物表达数据进行模块化分析。ggplot2 和 circlize 程序包用于分析结果可视化。

## 2 结果

### 2.1 研究参与者人口统计和临床特征

本研究共有 50 名参与者, 包括 20 名被诊断患有 Luminal ABC 患者和 30 名健康人群。在接受初始哌

柏西利治疗的 Luminal ABC 患者中, 13 例表现出缓解, 这些患者定义为 PS 组。7 名患者在开始哌柏西利治疗后 12 或 24 周内出现疾病进展, 在治疗期间或治疗 1 年后出现复发或保持疾病稳定, 这些患者定义为 PR 组。所有参与者的人口统计和临床特征见表 1。

表 1 参与者人口统计和临床特征

Table 1 Demographic and clinical characteristics of participants

临床特征	参考类别	HC (n=30)	PS (n=13)	PR (n=7)	P 值
年龄 / 岁	中位数 范围	56 42~70	57 46~75	57 46~72	0.754
CEA/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )			21.1 $\pm$ 4.4	22.4 $\pm$ 3.6	0.435
Ki-67 数量 (占比 /%)	<14% >14%		7 (53.8) 6 (46.2)	3 (42.9) 4 (57.1)	<0.001
PR 数量 (占比 /%)	阴性 阳性		11 (84.6) 2 (15.4)	6 (85.7) 1 (14.3)	<0.001
临床分期	IV		13	7	
T 数量 (占比 /%)	T1~T3 T4		13 (100) 0 (0)	3 (42.9) 4 (57.1)	<0.001
N 数量 (占比 /%)	N1~N2 N3		9 (69.2) 4 (30.8)	2 (28.6) 5 (71.4)	<0.001
器官转移数量 (占比 /%)	$\leq 1$ >1		10 (76.9) 3 (23.0)	1 (14.3) 6 (85.7)	<0.001

### 2.2 多元统计分析识别组间组内存在显著差异

#### 2.2.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

PCA 分析是用于多元统计分析的无监督模式识别方法, 用以观察分组自然聚类趋势。如图 1 所示, 在电喷雾电离正离子模式 (electrospray ionization positive mode, ESI+) 和电喷雾电离负离子模式 (electrospray ionization negative mode, ESI-) 模式下, QC 样本组内聚集程度高表明进样过程中设备具有较高的稳定性, 实验数据可靠。血清样本在不同生理状态下分离趋势较为明显, 说明代谢物成分和不同生理状态存在显著性差异。它揭示了 Luminal ABC 会引起人体代谢途径的紊乱。

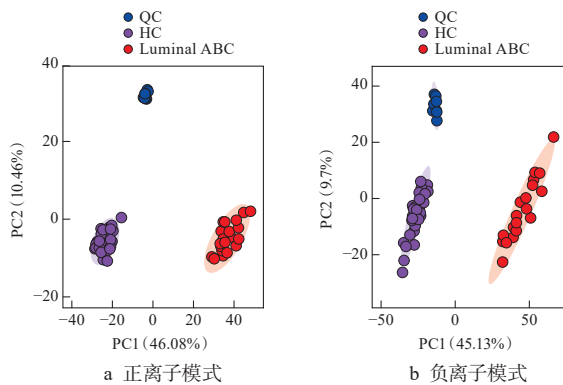


图 1 QC, HC 和 Luminal ABC 组的 PCA 得分图  
Fig. 1 PCA score plots of the QC, HC and Luminal ABC group

#### 2.2.2 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)

OPLS-DA 是用于多元统计分析的有监督模式识别方法。相对于 PCA 分析, OPLS-DA 模型注重组间差异, 在组间代谢差异的深度数据挖掘方面优势明显且精确度较高。在 ESI+ ( $R^2X=0.556$ ,  $R^2Y=0.996$ ,  $Q^2=0.993$ ) 和 ESI- ( $R^2X=0.565$ ,  $R^2Y=0.995$ ,  $Q^2=0.991$ ) 模式下, 模型拟合性较好, 模型预测能力较强 (见图 2)。通过 200 次置换检验分析结果表明,  $R^2$  和  $Q^2$  在  $y$  轴上的截距分别小于 0.4 和 0.05, 证明 OPLS-DA 模型未出现过拟合 (见图 3)。结果表明, 其中 HC 和 Luminal ABC 组内聚集, 组间分离趋势明显, 说明两组代谢物之间存在显著性差异。

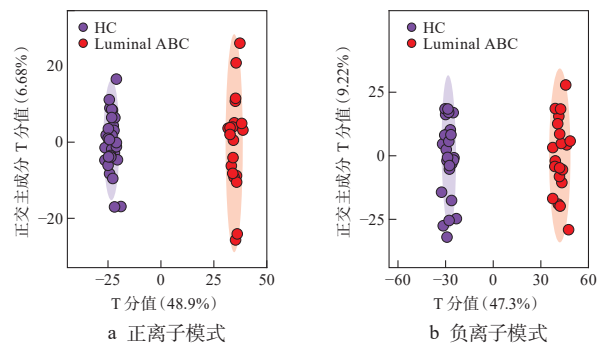
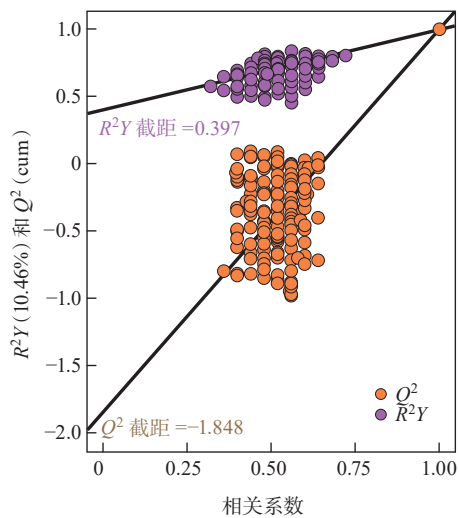
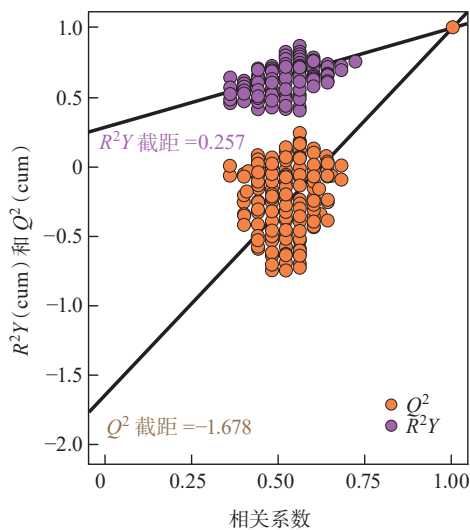


图 2 HC 和 Luminal ABC 组的 OPLS-DA 得分图  
Fig. 2 OPLS-DA score plots of the HC and Luminal ABC group



a 正离子模式



b 负离子模式

图3 HC和Luminal ABC组的置换检验图

Fig. 3 OPLS-DA permutation test plots of the HC and Luminal ABC group

### 2.2.3 偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)

相比于 OPLS-DA 模型两组分类分析, PLS-DA 模型通常用于处理多个类别的分类问题。因此更适用于探究 Luminal ABC 中 PS, PR 与 HC 组之间的差异表达分析。如图 4 所示, 在 ESI+ ( $R^2X=0.516$ ,  $R^2Y=0.828$ ,  $Q^2=0.618$ ) 和 ESI- ( $R^2X=0.544$ ,  $R^2Y=0.842$ ,  $Q^2=0.763$ ) 模式下 HC, PS 和 PR 3 组间均能明显分离, 且任意两两组之间也能有效分离。以上结果表明, 代谢物在对照组、哌柏西利敏感组和耐药组之中存在差异表达模式, 可用于进一步差异分析。

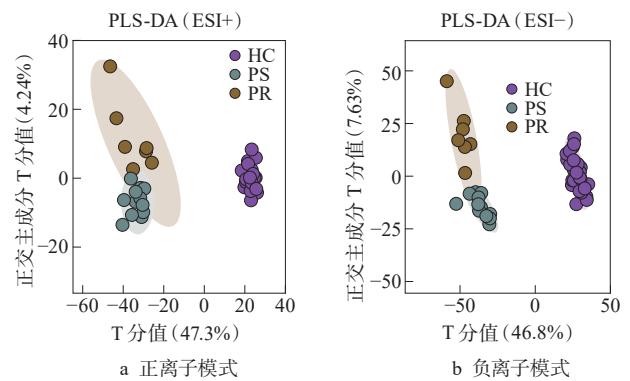


图4 HC, PS 和 PR 组的 PLS-DA 得分图

Fig. 4 PLS-DA score plots of the HC, PS and PR group

## 2.3 血清样本代谢物谱差异可视化分析

### 2.3.1 代谢数据鉴定识别

基于数据在 ESI+ 模式下共识别出 4 087 个峰, 在 ESI- 模式下共识别出 2 188 个峰, 而后使用 HMDB 和 ChEBI 数据库共鉴定出 583 种代谢物。代谢物通过火山图可视化 (见图 5)。

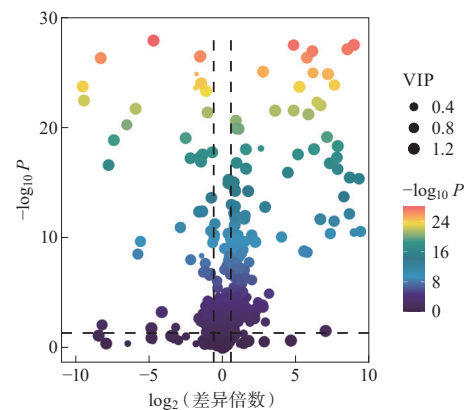


图5 代谢物火山图分布

Fig. 5 Distribution of metabolite volcano plot

### 2.3.2 差异代谢物筛选

基于 OPLS-DA 模型已表明 HC 和 Luminal ABC 存在显著性差异的基础上, 以  $VIP>1$ ,  $P<0.05$ ,  $FC>1.2$  或  $FC<0.833$  的筛选标准对两组之间的差异代谢物进行筛选, 最终共鉴定出 54 种内源性差异代谢物, 即精氨酸等 36 种差异代谢物上调, 以及柠檬酸等 18 种差异代谢物下调。聚类结果表明有机酸及其衍生物 15 个, 脂类及类脂分子 13 个, 有机杂环化合物 7 个, 核苷、核苷酸及其类似物 5 个, 有机含氮化合物 4 个, 芳香烃类化合物 4 个, 有机含氧化合物 3 个, 苯丙素类化合物 3 个。如图 6 所示, 利用层次聚类可视化分析各样本之间的关联性, 表明组内样本的同质性和组间样本的差异性。

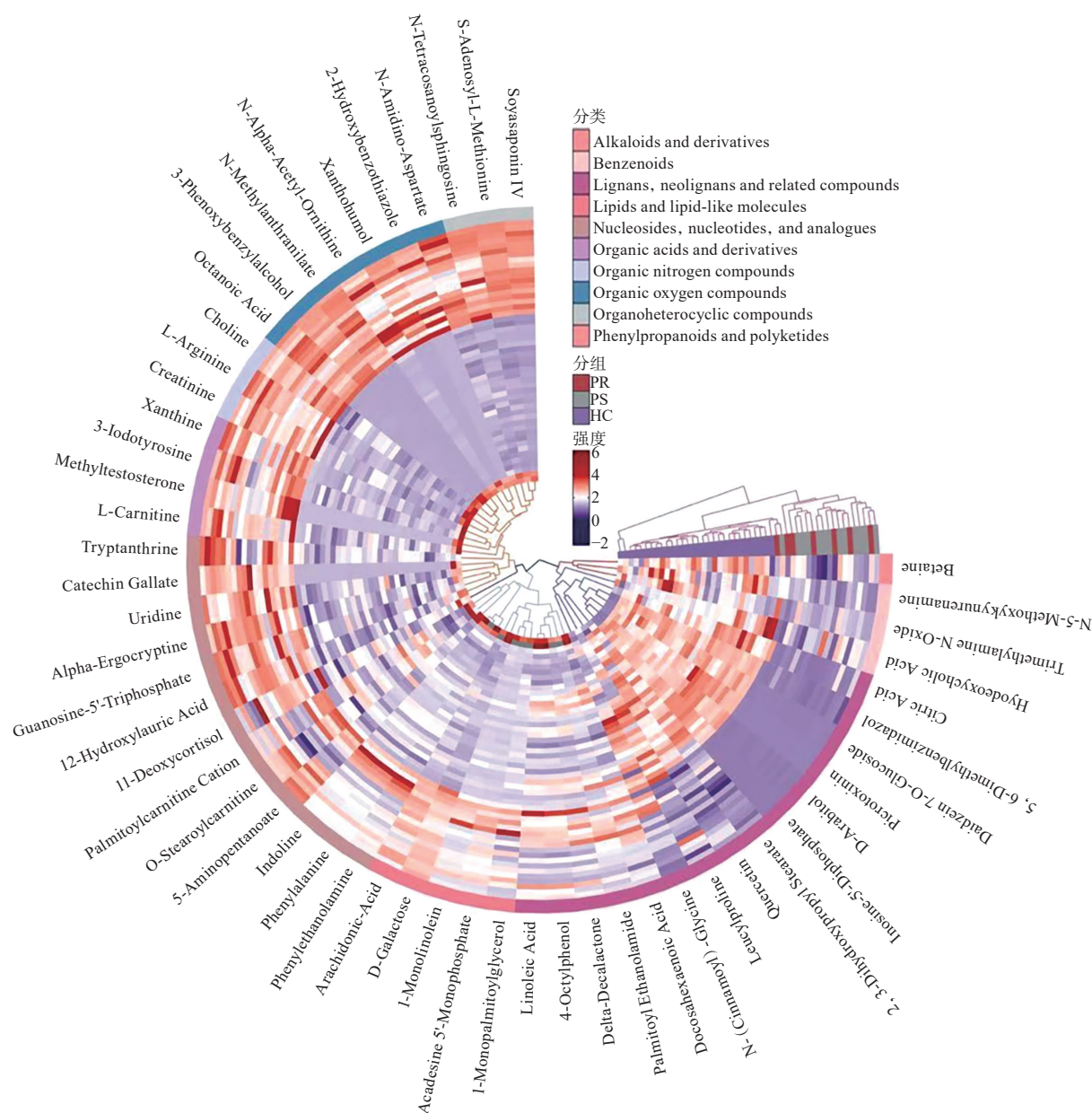


图 6 差异代谢物热图  
Fig. 6 Heatmap of differential metabolites

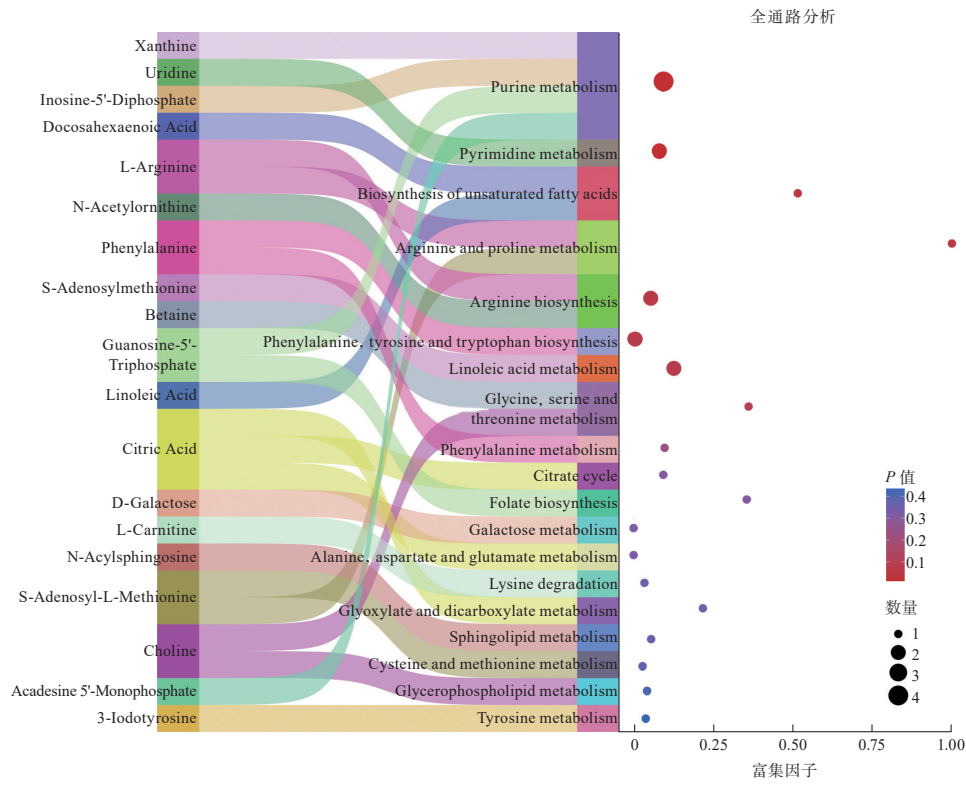
### 2.3.3 差异代谢物功能分析

为从整体及通路水平发掘 Luminal ABC 患者血清代谢特征, 将上述 54 种差异代谢物映射到 KEGG 和 MSEA 进行差异通路分析和富集分析。通过 KEGG 通路分析便于识别差异代谢物所涉及的生物通路。Luminal ABC 组与 HC 组之间的差异代谢物主要包括嘌呤、尿苷二磷酸、L-精氨酸、鸟苷-5'-三磷酸、S-腺苷-L-蛋氨酸和苯丙氨酸(见表 2), 这些差异代谢物主要表现在嘌呤代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成以及精氨酸生物合成 3 条通路上 ( $P < 0.05$ ) (见图 7a)。通过 MSEA

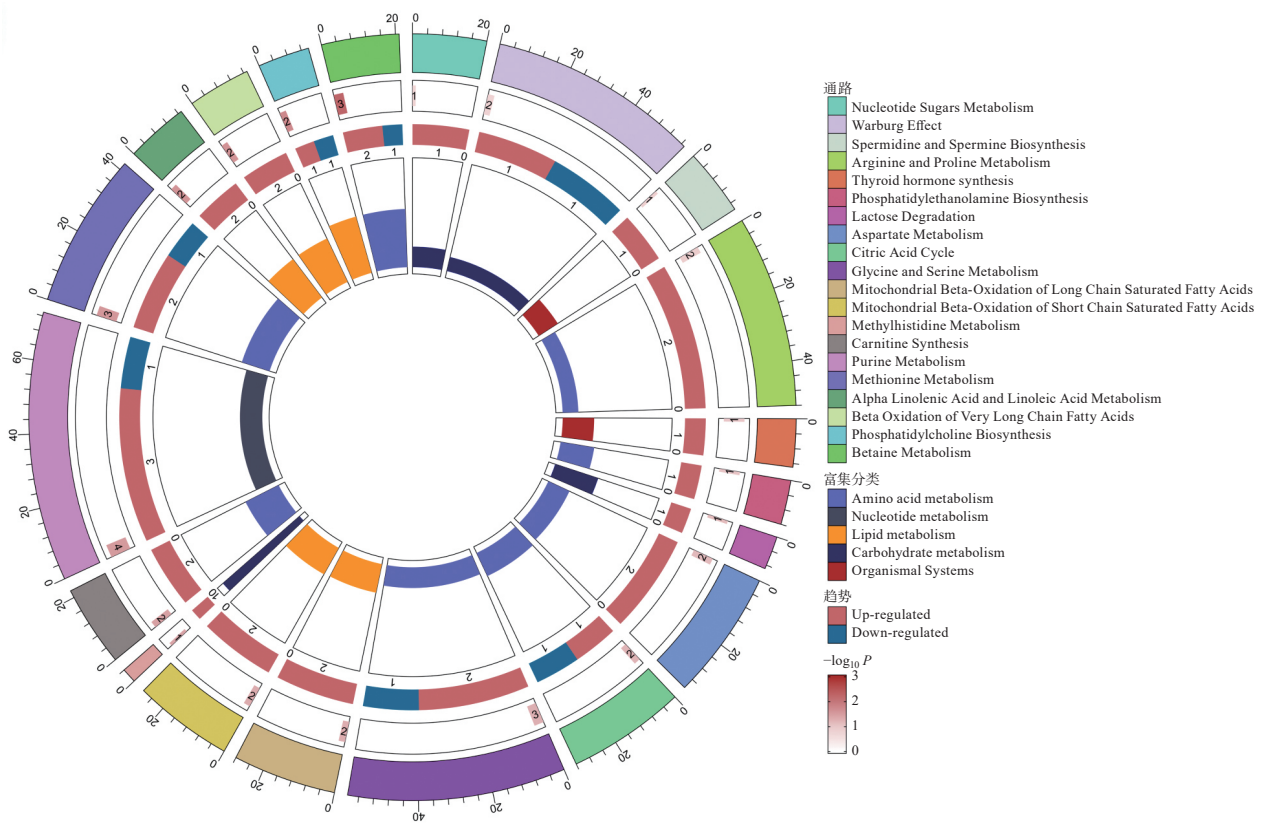
富集显示提供更广泛的代谢物功能富集视角, 如图 7b 所示, 差异代谢物主要富集在氨基酸代谢、脂质代谢 ( $P < 0.05$ )。

表 2 显著性富集通路  
Table 2 Significantly enriched pathways

代谢通路	通路中代谢物总数	差异代谢物	富集因子	P 值
嘌呤代谢	70	嘌呤, 尿苷二磷酸, 鸟苷-5'-三磷酸	8.333	0.012
精氨酸生物合成	14	L-精氨酸, S-腺苷-L-蛋氨酸	6.430	0.001
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	4	苯丙氨酸	4.167	0.004



a KEGG 通路分析



b MSEA

图7 差异代谢物功能分析  
Fig.7 Functional analysis of differential metabolites

### 2.4 加权基因共表达网络 (WGCNA) 发现耐药相关差异代谢物

#### 2.4.1 共表达网络的构建及模块分析

在加权基因共表达网络的构建过程中, 基于层次聚类分析显示了患者聚类分布及其临床特征 (见图 8a)。同时计算无尺度网络拟合指数, 以无尺度拓扑模型拟合指标 ( $r^2 > 0.8$ ) 为截断值进行软阈值的筛选, 对应的软阈值为 4 (见图 8b), 此时无尺度表达网络平均连接性小于 100, 生成邻接矩阵。

基于代谢物的拓扑重叠相异度 (1-TOM) 得到层次聚类树, 并根据代谢物表达模式的相似性进行动态树切割, 以模块内最小代谢物数量阈值 (minimum module size=15) 将代谢物聚类到不同颜色模块中, 最终鉴定出 8 个共表达模块 (见图 8c)。通过计算每个模块内代谢物之间的拓扑重叠, 构建拓扑重叠矩阵热图 (见图 8d)。其中每一个分支代表一个代谢物, 显示出共享同一颜色模块的代谢物之间存在高度的相关性。

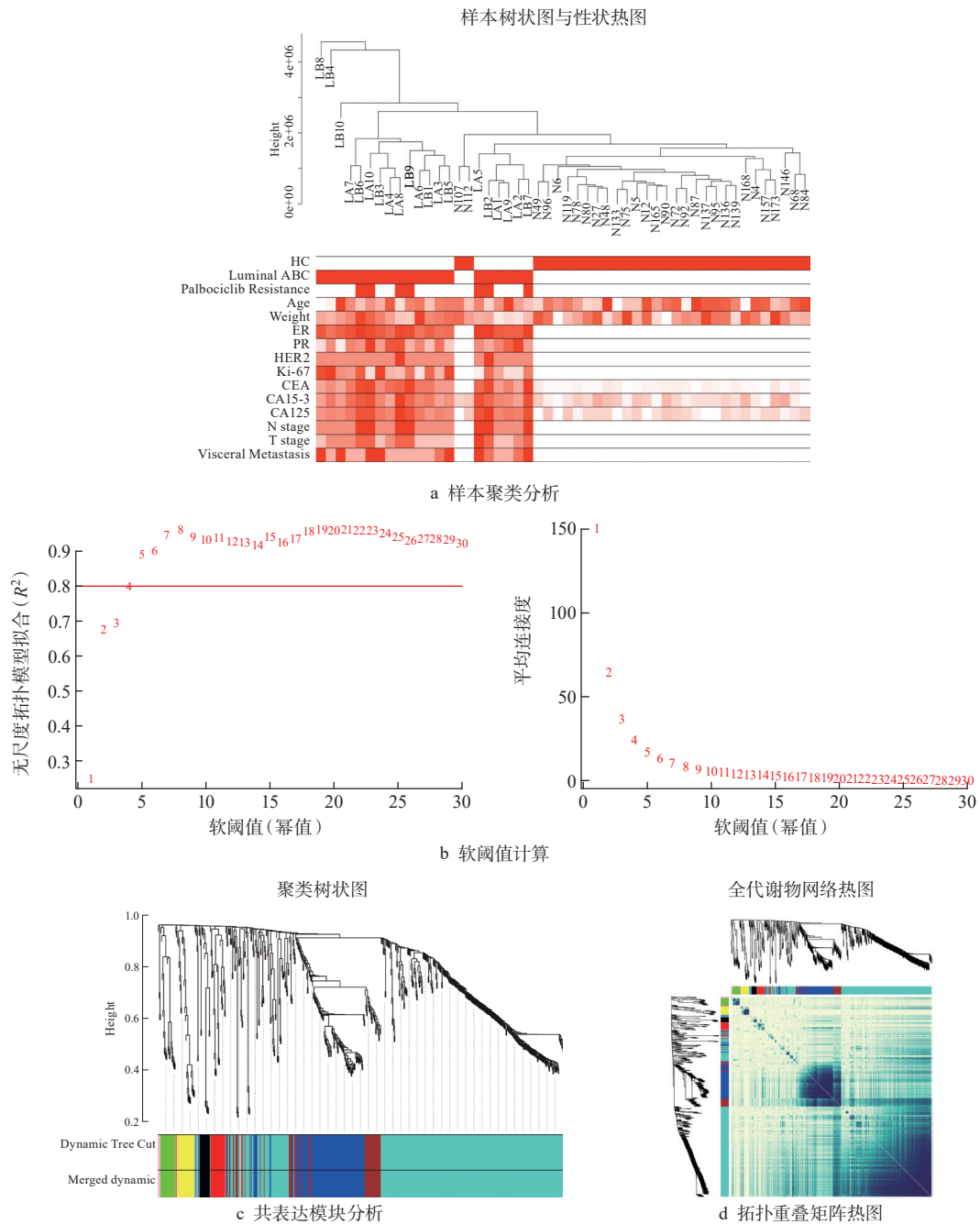


图 8 WGCNA 构建及模块分析  
Fig. 8 WGCNA construction and module analysis

2.4.2 哌柏西利耐药关键模块筛选

将相邻模块特征进行层次聚类分析,热图可视化结果显示这些模块之间表现出较高的独立性(见图9a)。代谢物共表达模块与临床表型皮尔逊相关性分析显示青绿色模块(MEturquoise)与

Luminal ABC 高度相关( $r=0.97, P<0.001$ ), 并且与 Palbociclib Resistance 表型呈现出显著正相关( $r=0.45, P<0.001$ ) (见图9b)。结果显示,青绿色模块可作为与耐药相关的关键模块进行后续分析。

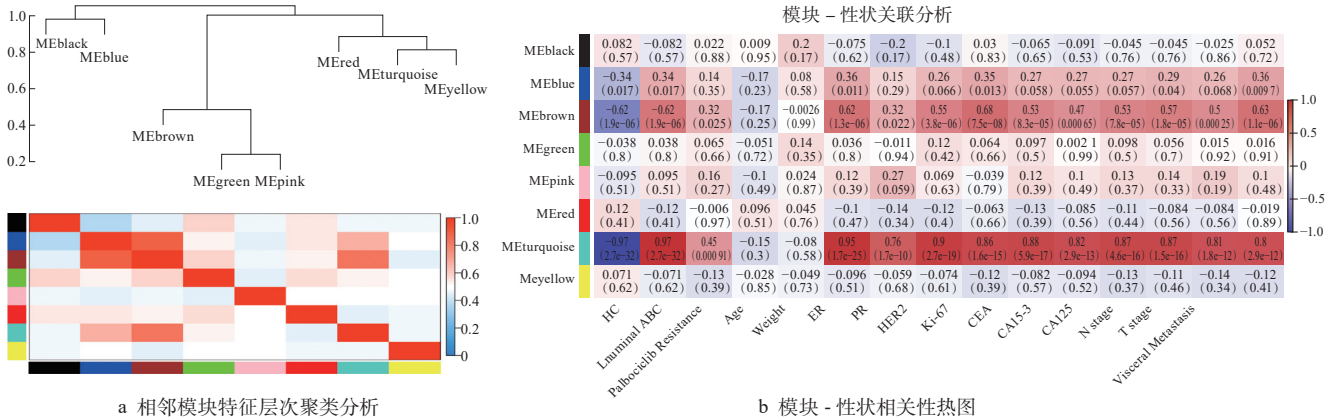


图9 WGCNA 关键模块筛选  
Fig. 9 Screening of key modules in WGCNA

2.4.3 耐药相关差异代谢物确定

青绿色模块与哌柏西利耐药表型相关的关键代谢物共有 179 种, 且同样为差异代谢物有 22 种, 即

精氨酸和苯丙氨酸等 16 种显著上调, 胆碱和辛酸等 6 种显著下调(见表3), 接着对这 179 种关键代谢物进行深入的功能分析。

表3 与哌柏西利耐药表型相关的差异代谢物  
Table 3 Differential metabolites associated with the palbociclib resistance phenotype

差异代谢物名称	分子式	m/z	离子模式	FC	P 值	VIP
尿苷	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	245.20	[M+H] <sup>+</sup>	1.50	<0.001	1.41
胆碱	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	122.18	[M+H] <sup>+</sup>	1.81	<0.001	1.44
肌酐	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	114.15	[M+H] <sup>+</sup>	1.77	<0.001	1.44
苯丙氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	166.10	[M+H] <sup>+</sup>	1.41	<0.001	1.44
亮酰脯氨酸	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	229.30	[M+H] <sup>+</sup>	0.75	<0.001	1.42
3- 碘酪氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> INO <sub>3</sub>	306.12	[M-H] <sup>-</sup>	2.57	<0.001	1.44
N- 酰胺基天冬氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	175.24	[M+H] <sup>+</sup>	3.03	<0.001	1.43
S- 腺苷-L- 蛋氨酸	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	400.34	[M+H] <sup>+</sup>	2.28	<0.001	1.42
12- 羟基月桂酸	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	217.10	[M+H] <sup>+</sup>	1.33	<0.001	1.42
甲基睾酮	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	303.13	[M+H] <sup>+</sup>	4.72	<0.001	1.40
黄嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	151.10	[M-H] <sup>-</sup>	0.72	<0.001	1.12
柠檬酸	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.25	[M-H] <sup>-</sup>	0.22	<0.001	1.06
L- 精氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	175.10	[M+H] <sup>+</sup>	2.78	<0.001	1.43
棕榈酰肉碱	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>4</sub>	386.34	[M+H] <sup>+</sup>	0.45	0.036	1.18
辛酸	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	143.10	[M-H] <sup>-</sup>	2.88	<0.001	1.37
儿茶素没食子酸	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	442.37	[M+H] <sup>+</sup>	1.94	<0.001	1.19
肌苷-5'-二磷酸	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub>	427.10	[M-H] <sup>-</sup>	0.03	<0.001	1.42
L- 左旋肉碱	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	162.13	[M+H] <sup>+</sup>	1.69	<0.001	1.43
N-α- 乙酰鸟氨酸	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	175.13	[M+H] <sup>+</sup>	1.62	<0.001	1.16
鸟苷-5'-三磷酸	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub> P <sub>3</sub>	522.10	[M-H] <sup>-</sup>	1.53	<0.001	2.04
O- 硬脂酰肉碱	C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	428.01	[M+H] <sup>+</sup>	0.65	0.026	1.03
棕榈酰乙醇酰胺	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	298.04	[M-H] <sup>-</sup>	1.71	0.002	1.35

注: FC>1.2 为上调, FC<0.833 为下调。

通路分析如图 10a 所示, 关键代谢物通路主要显著在酪氨酸代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成以及精氨酸生物合成 ( $P<0.05$ )。富集分析如图 10b 所示, 关键代谢物主要富集在氨基酸代谢、

脂质代谢 ( $P<0.05$ )。结果显示, 与之前的 54 种差异代谢物的主要代谢通路和生物学功能分析相似, 这表明 22 种关键差异代谢物可能在代谢过程中发挥着耐药作用。

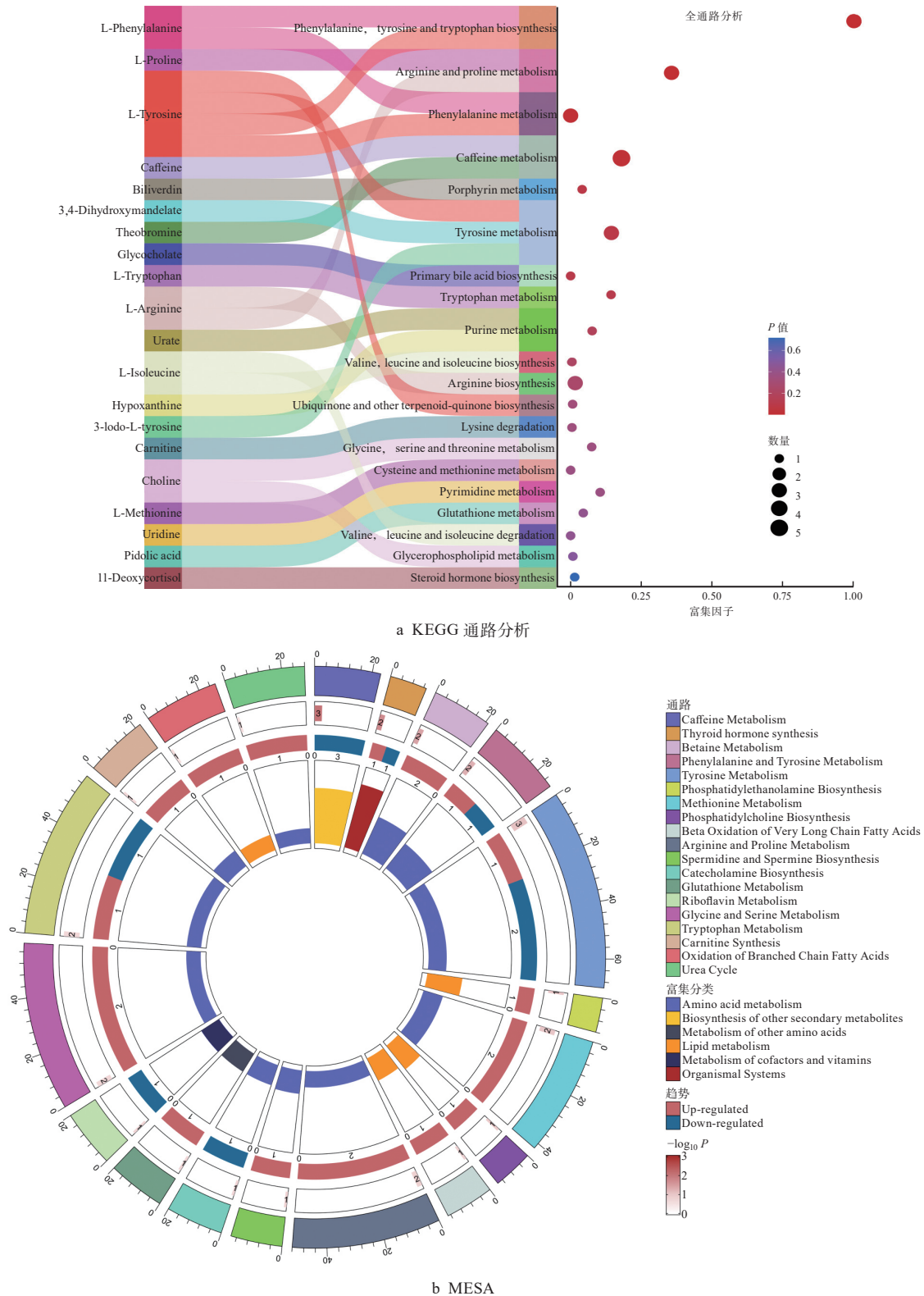


图 10 关键代谢物功能分析  
Fig. 10 Functional analysis of key metabolites

### 3 讨论

Luminal ABC 的主要特点是恶性程度高、易转移且极易耐药。而 Luminal ABC 哌柏西利耐药在病理表型、生物学特征及治疗策略等方面展现出独特的生物学行为和治疗挑战。现如今, 制约疾病研究进展的主要核心问题在于高质量临床样本的匮乏。此外, 分子表征及系统生物学研究不足极大限制了 Luminal ABC 哌柏西利耐药的临床进展。迄今为止, 与表型最接近的代谢组特征更是鲜有报道。因此, 整合组学技术构建代谢特征谱图, 能够加速和深化肿瘤耐药相关的分子机制和代谢通路变化研究, 在临床研究中具有重要意义。

本研究基于非靶代谢组学技术分析受试者血清代谢水平变化, 证实了 Luminal ABC 哌柏西利耐药患者与哌柏西利敏感患者和健康人群存在代谢轮廓谱差异。结合 WGCNA 分析, 判别出 Luminal ABC 哌柏西利耐药患者血清代谢谱改变涉及 22 种耐药相关的差异代谢物, 其中 16 种差异代谢物显著上调, 6 种差异代谢物显著下调。上述耐药相关的差异代谢物, 通过通路富集发现主要涉及苯丙氨酸和精氨酸生物合成等氨基酸代谢。

需要强调的是, 上述耐药相关的差异代谢物筛选及代谢通路富集均以代谢物鉴定为基础。研究中涉及耐药相关的差异代谢物共有 22 种, 其中包含精氨酸、苯丙氨酸等 7 种差异氨基酸及其衍生物, 这表明氨基酸代谢可作为主要代谢通路用于后续研究。这种代谢通路可能是引起 Luminal ABC 发生哌柏西利耐药的主要原因。前人研究表明, 氨基酸代谢在生物体内发挥着重要作用, 氨基酸是各种生物分子合成的必须物质, 可以为细胞生长提供所需的物质<sup>[17]</sup>。肿瘤细胞生活在营养相对匮乏的微环境中, 因此它们必须调整其代谢以支持营养供应、ATP 生成和维持氧化还原稳态<sup>[18-19]</sup>, 而破坏这些过程会干扰肿瘤的生长和增殖<sup>[20]</sup>。氨基酸与其他生物大分子一样, 在癌细胞快速增殖过程中发挥关键作用, 作为碳和氮的供体, 使癌细胞摆脱营养限制<sup>[21]</sup>。Zou 等<sup>[22]</sup>发现肿瘤细胞通过重塑精氨酸分解代谢从而维持胞内精氨酸在较高水平, 而高浓度精氨酸通过与 ASS1 结合进而发挥促癌作用。同理, 本文中 Luminal ABC 患者血清中精氨酸通路发生显著改变, 可能是乳腺癌细胞重塑氨基酸代谢利用机制以获得更多的能

量和营养, 这与有关结直肠癌及黑色素瘤代谢重编程的研究结果较为一致<sup>[23-24]</sup>。Jobard 等<sup>[25]</sup>使用 <sup>1</sup>H-NMR 技术对患者血清代谢谱进行分析后发现, 组氨酸、甜菜碱和丙氨酸的浓度在非转移性患者体内升高, 血清中的乙酰乙酸酯和 3- 羟基丁酸酯、甘油、N- 乙酰糖蛋白、丙酮酸、苯丙氨酸、谷氨酸和甘露糖浓度在转移性乳腺癌患者体内升高。以往研究表明在转移性乳腺癌患者体内的苯丙氨酸的浓度均升高, 提示苯丙氨酸代谢可能是转移性乳腺癌的 1 个治疗的方向。Cao 等<sup>[26]</sup>通过对血清中的氨基酸水平进行靶向代谢组学分析后发现乳腺癌患者血清中色氨酸水平显著升高, 在细胞培养液中加入色氨酸后发现色氨酸可以抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌 IL-10, 提示乳腺癌的发病机制可能与 CD4<sup>+</sup>T 细胞分泌 IL-10 这一过程被色氨酸抑制有关。Kou 等<sup>[27]</sup>对乳腺癌细胞培养后发现乳腺癌细胞对于支链氨基酸的摄取增加, 对谷氨酸、半胱氨酸、乙酰蛋氨酸、谷胱甘肽的排泄量增加, 提示乳腺癌发生代谢重编程可能与支链氨基酸的异常高表达也有关。

近年来, 生物信息学逐渐被应用于疾病检测领域。然而生物信息学分析普遍是筛选代谢物, 缺少临床信息和代谢物之间以及代谢物与代谢物之间内部的联系, 单一的筛选模式极大限制了疾病的生物学研究和临床进展。WGCNA 则是一种用来探索代谢物 / 基因与表型之间关系的分析方法, 有效弥补了单一筛选代谢物临床信息表达不足。这些方法已成功应用于各种生物学背景, 如癌症、小鼠遗传学和脑成像数据分析<sup>[28]</sup>。本研究中, 采用 WGCNA 算法对受试者代谢数据进行分析, 通过对代谢数据的挖掘, 筛选出与哌柏西利耐药表型表达模式相类似的青绿色模块, 得到 179 种关键代谢物。模块结果已显示 22 种关键代谢物同为耐药相关的差异代谢物。其次对青绿色模块内代谢物的 KEGG 分析和 MSEA 分析, 可以发现部分代谢物与氨基酸代谢关系密切, 揭示了部分代谢物可能在氨基酸代谢通路中发挥耐药功能作用。

在本文研究中, 通过对 Luminal ABC 患者血清的代谢谱分析, 初步发现了精氨酸和苯丙氨酸等差异代谢物作为辅助诊断哌柏西利耐药的價值。另外在氨基酸代谢通路中所涉及的小分子代谢物可能是治疗哌柏西利耐药的潜在靶点。由于研究是基于少量临床患者样本筛选出的代谢物差异, 目前尚缺乏完整的研究表明这些代谢物与哌柏西利耐药存在因

果关系。因此,需要通过更大规模的临床样本分析和靶向代谢组学方法对这些初步结果进行进一步验证,在后续对氨基酸代谢途径的潜在靶点进行更深入的生物学研究。此外, Luminal ABC 是一种涉及基因、蛋白质和代谢等多层次改变的复杂疾病,单一组学难以全面揭示其耐药机制。整合基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等多组学联用方法,不仅能系统解析不同分子层面的改变,还能通过数据交叉验证提高结果可靠性,为阐明耐药机制提供更全面的研究策略。

## 4 结论

综上所述,本研究基于 UHPLC-MS/MS 技术,采用 WGCNA 算法分析 Luminal ABC 派柏西利耐药表型,筛选出 22 种关键差异代谢物,挖掘出 1 条最为显著变化的代谢通路 ( $P < 0.05$ )。从代谢通路可能寻找到一些与逆转派柏西利耐药有关的潜在靶点,将有助于未来研究相关疾病诊断、靶向治疗及新型抗代谢药物研发;运用代谢物与表型分析方法构建信息网络,确定各因素之间的因果关系,发现 Luminal ABC 背景下生物系统的真实代谢水平变化,实现对肿瘤耐药等机制的初步探索,为乳腺癌精准医疗的发展提供重要支撑。

### 参考文献:

- [1] WILKINSON L, GATHANI T. Understanding breast cancer as a global health concern [J]. *The British Journal of Radiology*, 2022, 95 (11): 20211033.
- [2] LI Zhuo, WEI Hongrui, LI Siyan, et al. The role of progesterone receptors in breast cancer [J]. *Drug Design Development and Therapy*, 2022, 16: 305-314.
- [3] WILLMAN M, WILLMAN J, LUCKE-WOLD B. Endocrine resistant breast cancer: brain metastasis [J]. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, 2022, 3 (2): 240-251.
- [4] GARCÍA-BECERRA R, SANTOS N, DÍAZ L, et al. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14 (1): 108-145.
- [5] SCOTT S C, LEE S S, ABRAHAM L. Mechanisms of therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer [J]. *Seminars In Oncology*, 2017, 44 (6): 385-394.
- [6] RUGO H S, BRUFISKY A, LIU X, et al. Real-world study of overall survival with palbociclib plus aromatase inhibitor in HR+/HER2- metastatic breast cancer [J]. *NPJ Breast Cancer*, 2022, 8 (1): 114.
- [7] PANDEY K, AN H J, KIM S K, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: a review [J]. *International Journal of Cancer*, 2019, 145 (5): 1179-1188.
- [8] NAVARRO-YEPES J, KETTNER N M, RAO X, et al. Abemaciclib is effective in palbociclib-resistant hormone receptor-positive metastatic breast cancers [J]. *Cancer Research*, 2023, 83 (19): 3264-3283.
- [9] CAI Zijie, WANG Jingru, LI Yudong, et al. Overexpressed Cyclin D1 and CDK4 proteins are responsible for the resistance to CDK4/6 inhibitor in breast cancer that can be reversed by PI3K/mTOR inhibitors [J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66 (1): 94-109.
- [10] SCHEIDEMANN E R, SHAJAHAN H. Resistance to CDK4/6 inhibitors in estrogen receptor positive breast cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (22): 12292.
- [11] HRISTOVA V A, CHAN D W. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond [J]. *Expert Review of Proteomics*, 2019, 16 (2): 93-103.
- [12] GUEST P, GOTTSCHALK M, BAHIN S. Proteomics: improving biomarker translation to modern medicine [J]. *Genome Medicine*, 2013, 5 (2): 17.
- [13] CHA Y J, KIM E S, KOO J S. Amino acid transporters and glutamine metabolism in breast cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (3): 907.
- [14] 田鹤, 税光厚. 基于质谱技术的代谢组学分析方法研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2021, 37 (1): 24-31
- [15] WANG Siyu, BLAIR I A, MESAROS C. Analytical methods for mass spectrometry-based metabolomics studies [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 11 (40): 635-647.
- [16] NICHOLSON J K, LINDON J C. Systems biology: metabolomics [J]. *Nature*, 2008, 455 (7216): 1054-1060.
- [17] LUKEY M J, KATT W P, CERIONE R A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy [J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22 (5): 796-804.

- [18] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23 (1) : 27-47.
- [19] ZHANG Yi, MORAR M, EALICK S E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65 (23) : 3699-3724.
- [20] SIVANAND S, VANDER H M. Emerging roles for branched-chain amino acid metabolism in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37 (2) : 147-156.
- [21] BUTLER M, VANDER M, LEEUWEN F N. Amino acid depletion therapies: starving cancer cells to death [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2021, 32 (6) : 367-381.
- [22] ZOU Songyun, WANG Xiangmei, LIU Po, et al. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy [J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109210.
- [23] HUANG A, FUCHS D, WIDNER B, et al. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer [J]. *British Journal of Cancer*, 2002, 86 (11) : 1691-1696.
- [24] WEINLICH G, MURR C, RICHARDSSEN L, et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients [J]. *Dermatology*, 2007, 214 (1) : 8-14.
- [25] JOBARD E, PONTOIZEAU C, BLAISE B J, et al. A serum nuclear magnetic resonance based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer [J]. *Cancer Letters*, 2014, 343 (1) : 33
- [26] CAO Zhugen, QIN Xiaobing, LIU Fangfang, et al. Tryptophan-induced pathogenesis of breast cancer [J]. *African Health Sciences*, 2015, 15 (3) : 982
- [27] KOU Fang, ZHU Bangjie, ZHOU Wenbin, et al. Targeted metabolomics in the cell culture media reveals increased uptake of branched amino acids by breast cancer cells [J]. *Analytical Biochemistry*, 2021, 624: 114192
- [28] LANGFELDER P, HORVATH S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.

(责任编辑:李琴)

## 郑重声明

为了适应我国信息化建设发展的需要,有力地促进科研学术信息交流和信息资源开发利用的有效性,严肃科学研究成果发布的科学化和规范化,从根本上杜绝和防范学术不端行为发生,打击学术成果造假和学术剽窃,本刊根据已先后加入《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国期刊网》《中国学术期刊(光盘版)》《中国学术期刊综合评价数据库》“万方数据网”和“万方数据——数字化期刊群”,以及《中文科技期刊数据库》《教育阅读网》全文收录期刊序列的实际情况,从2011年6月30日起,正式签约并执行“《中国学术期刊网络出版总库》删除学术不端文献暂行办法”(简称《暂行办法》)。同时在此郑重声明,本刊根据《暂行办法》的规定,要求投稿本刊的所有作者应自觉查阅和遵守相关规定要求,并按照文责自负的原则对所投稿件承担相应学术责任,一经“学术不端文献检测系统”(简称 AMLC)检测发现有严重抄袭、一稿多投,或不当署名、伪造、篡改等学术不端行为者,均在本刊所加入的文献收录数据库和文献资料信息存储单位中自动删除该文献,并在此基础上由作者承担因学术不端行为所造成的其他后果。

特此声明,望所有投稿本刊的作者充分理解和自觉遵守,同时知会其他同行和好友悉知。

《江苏海洋大学学报(自然科学版)》编辑部