

γ-干扰素联合顺铂通过调控 xCT 抑制三阴性乳腺癌转移的实验研究

孙闻悦^{1,2}, 宗丹¹, 葛宜枝¹, 何侠^{1,2,3}

(1. 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 江苏 南京 210009;

2. 南京医科大学第四临床医学院, 江苏 南京 210029; 3. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221004)

摘要: [目的] 探讨 γ-干扰素(interferon-gamma, IFN-γ)联合顺铂(cisplatin, DDP)抑制三阴性乳腺癌转移的机制。[方法] 采用 BALB/c 小鼠构建三阴性乳腺癌模型, 观察 IFN-γ 联合 DDP 的治疗效果。用流式细胞术检测细胞凋亡水平; CCK-8 实验检测细胞增殖; 实时荧光定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测相关基因的表达; UALCAN 和 Kaplan-Meier Plotter 数据平台分析目的基因表达与乳腺癌预后的相关性; 免疫组化检测肿瘤组织中目的蛋白的表达。[结果] 各治疗组小鼠原位肿瘤体积均显著性缩小($P<0.05$), 而 IFN-γ 与 DDP 联合治疗组小鼠肺转移灶数目显著减少($P<0.01$)。IFN-γ 联合 DDP 促进小鼠三阴性乳腺癌细胞 4T1 凋亡($P<0.001$), 并显著性抑制肿瘤细胞增殖($P<0.001$)。成纤维细胞 L929 上清能促进 4T1 细胞增殖($P<0.01$), 且该作用被 IFN-γ 抑制($P<0.01$)。谷胱甘肽促进 4T1 细胞增殖($P<0.001$), 并且消除了 IFN-γ 对 L929 上清促肿瘤增殖的抑制作用($P<0.01$)。qRT-PCR 结果显示, L929 中胱氨酸/谷氨酸反转运体 x(xCT) mRNA 表达水平显著性下调($P<0.05$)。数据库分析结果显示, 乳腺癌患者的 xCT 表达水平明显高于正常乳腺组织($P<0.001$), xCT 高表达与较差的无远处转移生存期存在显著性相关($P<0.01$)。免疫组化结果表明, 发生肺转移的乳腺癌患者肿瘤组织中 xCT 表达水平显著性高于未发生肺转移者($P<0.001$)。[结论] IFN-γ 联合 DDP 可能通过抑制 L929 xCT 的表达减少谷胱甘肽分泌, 从而抑制三阴性乳腺癌转移。研究有望为三阴性乳腺癌转移的临床治疗提供新思路。

关键词: γ-干扰素; 顺铂; xCT; 谷胱甘肽; 三阴性乳腺癌; 转移

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2023)09-0759-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2023.09.B007

Experimental Study on IFN-γ Combined with Cisplatin Inhibiting Triple-Negative Breast Cancer Metastasis by Regulating xCT

SUN Wenye^{1,2}, ZONG Dan¹, GE Yizhi¹, HE Xia^{1,2,3}

(1. The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, China; 2. The Fourth School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract: [Objective] To explore the mechanism of interferon-gamma(IFN-γ) and cisplatin(DDP) on inhibiting triple-negative breast cancer metastasis. [Methods] BALB/c mouse was used to construct triple-negative breast cancer model to evaluate the combined effect of IFN-γ and DDP. Cell apoptosis level was measured by flow cytometry and proliferation ability was measured by CCK-8 assay. Reverse transcriptional quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect expression levels of relative genes. UALCAN and Kaplan-Meier plotter data platforms were used to analyze the correlation between prognosis and expression level of target gene. Immunohistochemistry staining was performed to detect protein expression level in clinical tumor samples. [Results] Tumor volume *in situ* greatly decreased in all groups ($P<0.05$). Combined therapy of IFN-γ and DDP significantly inhibited lung metastasis ($P<0.01$). IFN-γ combined with DDP promoted apoptosis of triple-negative breast cancer cell 4T1 ($P<0.001$), and greatly restrained cell proliferation ($P<0.001$). Fibroblast L929 supernatant activated 4T1 cell proliferation($P<0.01$), which was obviously suppressed by IFN-γ($P<0.01$). Glutathione notably increased 4T1 proliferation ability($P<0.001$) and relieved the inhibition of IFN-γ on L929 supernatant's promoting 4T1 proliferation ($P<0.01$). qRT-PCR results revealed that mRNA expression level of cystine-glutamate transporter (xCT) in L929 incredibly declined($P<0.05$). Database analysis results showed that xCT expression in cancer tissue was apparently higher than that in normal breast tissue ($P<0.001$). High level of xCT expression had incredible relevance with poor distant metastasis-free survival in patients ($P<0.01$). Results from immunohistochemistry demonstrated that xCT expression level in breast cancer tissues was greatly higher in patients with lung metastasis than that without lung metastasis($P<0.001$). [Conclusion] Combined therapy of IFN-γ and DDP decreases glutathione secretion by inhibiting xCT expression in L929, thereby suppressing triple-negative breast cancer metastasis. Our study is supposed to provide a new perspective for clinical treatment of triple-negative breast cancer metastasis.

Subject words: interferon-gamma; cisplatin; xCT; glutathione; triple-negative breast cancer; metastasis

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81872192); 江苏省科技厅重点研发计划(BE2019756);

江苏省卫生健康委委员会科研项目(K2019028)

通信作者: 何侠, E-mail: hexiabm@163.com

收稿日期: 2023-03-26 ; **修回日期:** 2023-05-22

乳腺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,是仅次于肺癌的第二大癌症致死原因^[1]。乳腺癌具有显著的异质性,三阴性乳腺癌是其中一种不表达雌激素受体、孕激素受体及人表皮生长因子受体 2 的乳腺癌亚型,主要发生于 40 岁以下绝经前的年轻女性,约占所有乳腺癌患者的 20%。三阴性乳腺癌表现出高度的侵袭性和转移潜能,恶性程度高,近 50% 的患者会发生远处转移,转移后中位生存期仅为 13.3 个月,5 年内死亡率高达 40%,预后较差^[2-5]。

20 世纪 70 年代,顺铂(cisplatin, DDP)抗癌活性的偶然发现和临床应用是抗癌药物成功史上的一个重要里程碑。DDP 作为第一代铂类抗癌药物,对乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤有明显疗效^[6-7]。近几年的研究表明,在新辅助化疗中加入铂类药物可以提高三阴性乳腺癌患者的病理完全缓解率^[8]。尽管 DDP 和其他一线临床铂类药物对肿瘤的治疗效果显著,但其对正常组织严重损害的副作用迫使研究人员开发出新的治疗方案来克服这一缺点^[9]。 γ -干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)是一种具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节特性的多效性细胞因子,最早被发现由植物血凝素刺激单核细胞释放,具有抗病毒作用。在肿瘤微环境中主要由活化的淋巴细胞,如 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞分泌。IFN- γ 通过激活 γ -干扰素受体传递信号,该受体由 γ -干扰素受体 1 链(IFN- γ receptor 1, IFN γ R1)和 γ -干扰素受体 2 链(IFN- γ receptor 2, IFN γ R2)两个亚基组成,其中 IFN γ R1 在不同细胞中稳定表达,而 IFN γ R2 的表达受到严格的调控。这种对受体亚基的不同调节被认为影响了 IFN- γ 促进细胞增殖和生长抑制效应之间的平衡^[10-12]。肿瘤微环境中活化的成纤维细胞又称为肿瘤相关成纤维细胞,能够产生细胞因子、蛋白酶和生长因子,从而改变炎症反应、细胞运动和增殖以及细胞外基质沉积和重塑,在肿瘤的发生及进展过程中起到重要的调节作用^[13]。本研究旨在探讨 IFN- γ 联合 DDP 对三阴性乳腺癌转移的疗效,以及肿瘤微环境中的成纤维细胞在该过程中扮演的角色,希望能为治疗转移性三阴性乳腺癌提供新的思路和理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2016 年 1 月至 2017 年 4 月收治的 20 例

浸润性乳腺癌病例,其中 10 例发生肺转移,10 例未发生肺转移,所有患者均病理确诊。本文内容经过医院伦理委员会审批。

1.2 细胞与主要试剂

小鼠三阴性乳腺癌细胞株 4T1,小鼠成纤维细胞株 L929 购于中国科学院细胞库。6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。RPMI-1640 培养基购于美国 Corning 公司, PBS 缓冲液、胰酶购于江苏凯基生物科技股份有限公司,胎牛血清购于南京森贝伽生物科技股份有限公司。Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基, CCK-8 试剂盒购于美国 MCE 公司,反转录试剂盒购于 TAKARA 公司, SYBR qPCR Master Mix 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 胱氨酸/谷氨酸反转运体 x(xCT)免疫组化抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞培养和处理

小鼠三阴性乳腺癌细胞株 4T1 和小鼠成纤维细胞株 L929 均接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,培养于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中。所有实验使用对数生长期细胞,当细胞融合度达到 80% 时胰酶消化,按 1:3 比例传代培养。L929 细胞上清的获取方式:细胞铺板过夜,待细胞贴壁,弃去培养基, PBS 清洗细胞, 更换适量完全培养基继续孵育 24 h 后收集细胞上清。IFN- γ 预处理 L929 细胞上清的获取方式:100 ng/mL 的 IFN- γ 处理铺板后过夜贴壁的 L929 细胞 4 h, PBS 清洗后, 加入新鲜培养基, 24 h 后收集上清。细胞上清于 -80 °C 冻存,使用时取上清和完全培养基按 1:1 比例处理细胞。体外细胞实验谷胱甘肽(glutathione, GSH)的使用浓度为 50 μ mol/L。

1.3.2 小鼠三阴性乳腺癌模型的构建

将 1×10^6 个/100 μ L 的 4T1 单细胞悬液,种植于 BALB/c 小鼠右侧第二乳房垫,构建小鼠原位乳腺癌模型。种植后第 7 d 起,分别随机给予荷瘤小鼠等体积的 PBS、IFN- γ 、DDP、IFN- γ 和 DDP 联合处理,并且每 3 d 测量一次肿瘤大小。IFN- γ 处理方式为 1 mg/kg 瘤内注射, DDP 处理方式为 1 mg/kg 腹腔注射。种植后第 28 d 处死小鼠,取小鼠乳腺和肺组织,分别观察原位肿瘤的大小及肺转移灶数目。肿瘤体积(mm^3)= $0.5 \times \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}(\text{mm})^2$ 。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期细胞铺六孔板,分别设置对照组、

IFN- γ 组、DDP 组、IFN- γ 和 DDP 联合处理组,IFN- γ 处理浓度为 100 ng/mL,DDP 处理浓度为 1 μ g/mL。用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,500 μ L 结合缓冲液重悬细胞,分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶混匀,室温避光反应 10 min 后用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.3.4 CCK-8 实验检测细胞活性

收集处于对数生长期的 4T1 细胞铺 96 孔板,细胞密度为每孔 3 000 个/100 μ L,每组设置 3 个复孔,培养细胞过夜贴壁后进行实验。实验中 IFN- γ 处理浓度为 100 ng/mL,DDP 处理浓度为 1 μ g/mL 和 1.5 μ g/mL。细胞加入药物处理后继续培养 48 h。弃去孔内培养基,每孔加入 100 μ L 含 10% CCK-8 溶液的培养基,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱里避光孵育 1 h,室温下用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度值。

1.3.5 qRT-PCR 检测成纤维细胞 L929 目的基因表达水平

Trizol 法提取 L929 细胞的总 RNA,使用反转录试剂盒合成 cDNA 后进行荧光定量 PCR 实验,对 L929 细胞中 *GGT1*、*GGT5*、*GGT7*、*SLC3A2* 和 *xCT* 的表达水平进行检测,以 *HPRT* 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各目的基因的相对表达量。

GGT1 上游引物序列为 5'-ATCAATGCCCCGTGAGGTAGC-3',下游引物序列为 5'-CACGGATTTCACCAAGGACA-3'。*GGT5* 上游引物序列为 5'-GTCAAGCCTCTTGTGGTCCC-3',下游引物序列为 5'-ACAACACCAGTACAGACCAGG-3'。*GGT7* 上游引物序列为 5'-GTGTTTGGGGATTGTGGCTC-3',下游引物序列为 5'-CAAGAGCCCAGGCTTGGA-3'。*SLC3A2* 上游引物序列为 5'-CCAACTACCAGGGCCAGAAT-3',下游引物序列为 5'-GAAACCATCCACACCGTCCT-3'。*xCT* 上游引物序列为 5'-GCTCGTAATACGCCCTGAG-3',下游引物序列为 5'-GGAAAATCTGGATCCG-GGCA-3'。

1.3.6 公共数据平台上进行乳腺癌生存分析

UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) 数据分析 TCGA 来源的 1 211 例乳腺样本中 (其中正常乳腺组织 114 例,肿瘤组织 1 097 例) 目的基因的表达水平。Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 数据平台进行乳腺癌无远处转移生存期 (distant metastasis-free survival, DMFS) 的 Kaplan-

Meier 生存分析。

1.3.7 免疫组化染色检测肿瘤组织中 *xCT* 的表达

收集 20 例浸润性乳腺癌患者原发肿瘤组织石蜡包埋的病理切片。二甲苯依次脱蜡清洗后,用 pH=9.0 的 EDTA 抗原修复液进行抗原修复,再用血清封闭,*xCT* 一抗 (1:200) 覆盖组织置于冰箱 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日清洗后二抗室温孵育 1 h,DAB 显色至合适强度终止,苏木素复染细胞核,酒精梯度脱水后封片。使用组织切片成像系统采集图像。苏木素染细胞核为蓝色,DAB 显出的棕黄色表达为阳性。采用平均光密度值 (mean density, MD) 方法计算阳性信号的平均值。MD = 阳性累积光密度值/阳性面积。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计分析。结果均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组数据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 IFN- γ 和 DDP 联合治疗抑制小鼠三阴性乳腺癌肺转移

本研究构建了小鼠原位乳腺癌模型。与对照组相比,各治疗组小鼠乳腺肿瘤体积均缩小 ($P<0.05$),但各治疗组间无明显差异,而 IFN- γ 和 DDP 联合治疗显著性减少小鼠肺转移灶的数目 ($P<0.01$) (Figure 1)。

2.2 IFN- γ 联合 DDP 通过影响成纤维细胞 L929 上清中 GSH 成分抑制 4T1 细胞增殖

体外检测了 IFN- γ 联合 DDP 对小鼠三阴性乳腺癌细胞 4T1 凋亡水平的影响。结果表明,相比于对照组,IFN- γ 联合 DDP 显著性增加 4T1 细胞凋亡 ($P<0.001$) (Figure 2A)。CCK-8 结果显示,IFN- γ 联合 DDP 能显著性抑制肿瘤细胞增殖 ($P<0.001$) (Figure 2B)。探究微环境中成纤维细胞在药物联合抑制三阴性乳腺癌转移过程中的作用,发现不同 DDP 治疗浓度、L929 上清能显著性刺激 4T1 细胞增殖 ($P<0.01$),并且该作用受 IFN- γ 的抑制 ($P<0.01$) (Figure 2C)。以上结果表明,IFN- γ 处理成纤维细胞后可能通过影响成纤维细胞上清中的某些成分来实现抑制三阴性乳腺癌细胞增殖作用。

为了研究成纤维细胞上清中的有效成分,我们

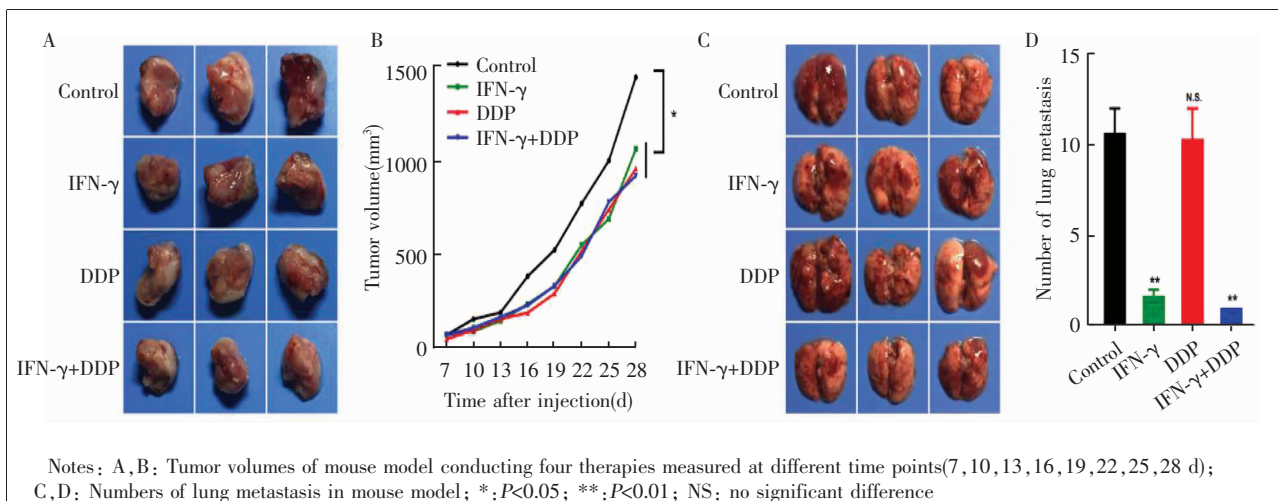


Figure 1 Combined therapy of IFN- γ and DDP inhibited lung metastasis of triple-negative breast cancer *in vivo*

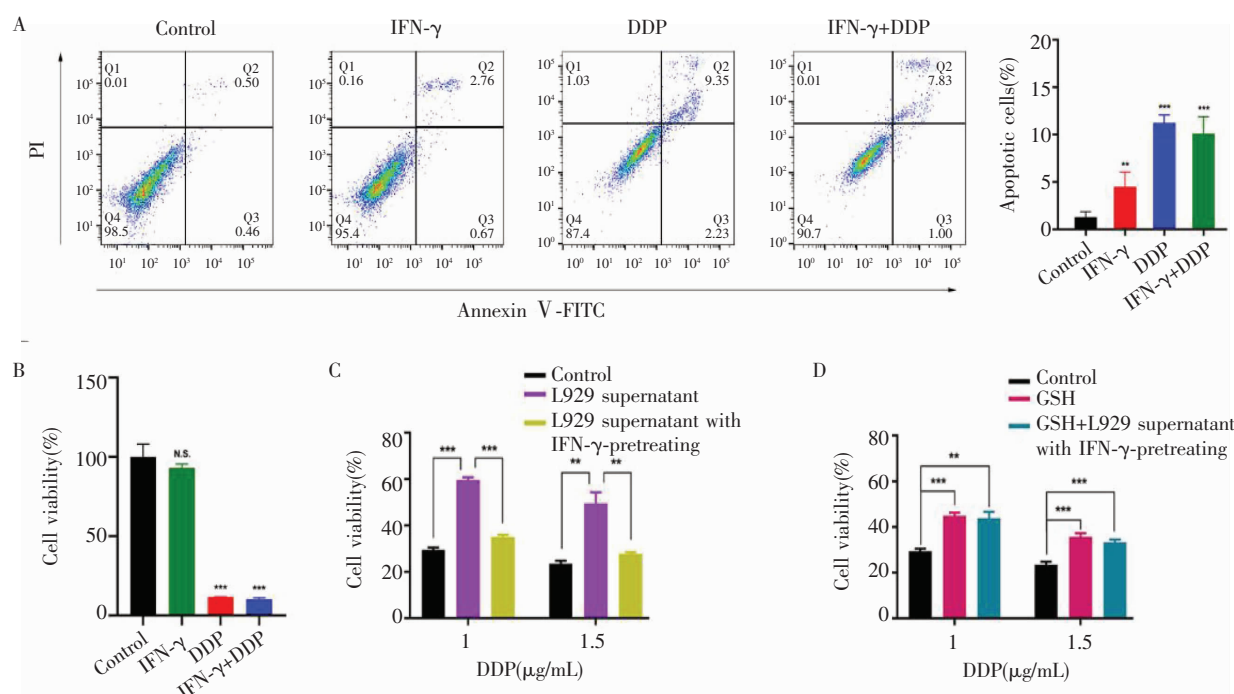


Figure 2 IFN- γ combined with DDP affected GSH level in supernatant of L929 which restrained 4T1 proliferation

查阅文献,最终选择了 GSH 作为探究对象。在不同 DDP 浓度作用下, GSH 显著性促进肿瘤细胞增殖 ($P<0.001$), 并且可以消除 IFN- γ 对 L929 上清促细胞增殖的抑制作用 ($P<0.01$) (Figure 2D)。由此可见, 成纤维细胞上清中促进肿瘤细胞增殖的有效成分可能是 GSH, 并且其促增殖作用是可以被 IFN- γ 抑

制的。

2.3 IFN- γ 下调 xCT 表达影响成纤维细胞上清 GSH 水平

通过 qRT-PCR 检测发现, 基因 *GGT1*, *GGT5*, *GGT7* 和 *SLC3A2* 表达水平显著上调 ($P<0.05$) (Figure 3A-3D), 而 xCT mRNA 水平显著性下调 ($P<0.05$) (Figure 3E)。

2.4 xCT 表达水平在乳腺癌患者中上调

通过 UALCAN 数据平台分析发现,乳腺癌患者的 xCT 表达量明显高于正常乳腺组织 ($P<0.001$) (Figure 4A)。此外,Kaplan-Meier Plotter 分析发现,乳腺癌患者 xCT 高表达与较差的DMFS 之间存在明

显相关性($P=0.0082$) (Figure 4B)。亚组分析发现,在具有高转移风险的三阴性乳腺癌患者中,xCT 高表达与较差的 DMFS 显著性相关($P=0.0065$) (Figure 4C)。免疫组化染色结果表明,发生肺转移的乳腺癌患者的肿瘤组织中 xCT 的表达水平明显高于诊断时未发

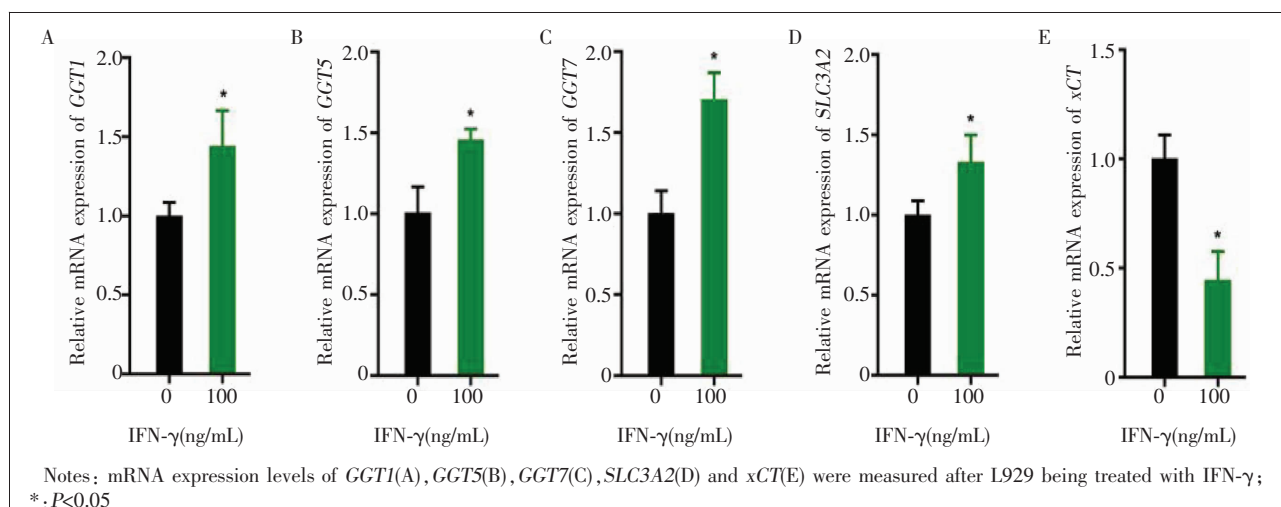
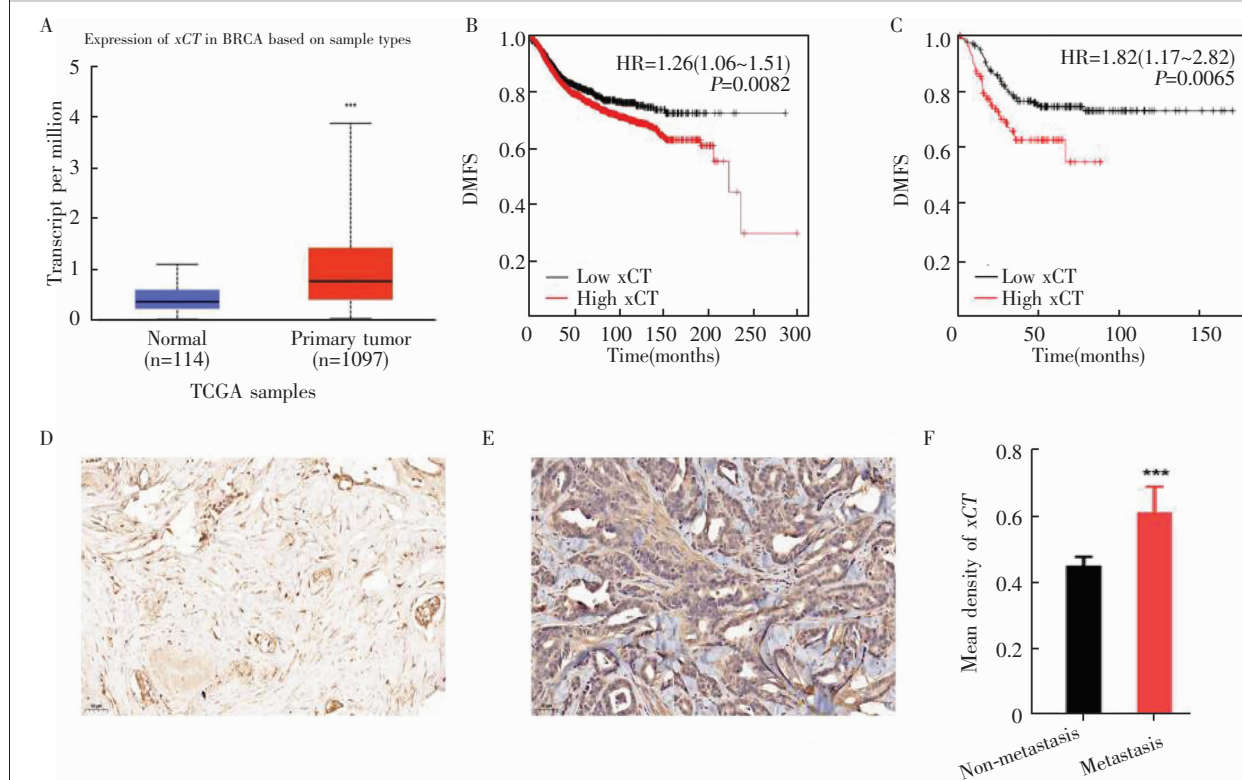


Figure 3 IFN-γ decreased xCT expression in fibroblast L929



Notes: A: Expression of xCT in normal breast tissue and primary tumor tissue from 1 211 samples in TCGA database; B~C: Kaplan-Meier analysis of DMFS according to xCT expression level in breast cancer (B) and triple-negative breast cancer (C); D~F: Histological analysis in breast cancer patients. Representative immunohistochemistry staining images of patients with(E) and without(D) lung metastasis, and mean density of xCT(F). DMFS: distant metastasis-free survival; Scale bar = 50 μ m; ***, $P<0.001$

Figure 4 xCT expression was upregulated in breast cancer patients

生肺转移的患者 ($P < 0.001$) (Figure 4D~4F)。xCT 高表达与乳腺癌高转移风险和不良预后呈正相关。

3 讨论

乳腺癌是世界范围内的常见肿瘤, 每年约有 230 万新发病例和超过 60 万死亡病例^[14]。早期乳腺癌, 即肿瘤局限于乳房内或仅扩散到腋窝淋巴结, 被认为是可治愈的, 可采取手术、放疗、靶向治疗、全身治疗、内分泌治疗等多种治疗方式, 患者预后较好。晚期乳腺癌包括局部晚期乳腺癌和转移性乳腺癌, 转移是乳腺癌患者死亡的主要原因。转移性乳腺癌的中位生存期小于 3 年, 5 年生存率小于 25%^[15]。晚期乳腺癌患者治疗的主要目标是延长生存期和以低毒性的治疗手段控制症状, 改善患者生活质量^[16]。因此, 寻找乳腺癌转移发生的可能机制以及有效的药物治疗手段, 将极大地改善晚期乳腺癌的预后。

对于晚期乳腺癌, 尤其是三阴性乳腺癌, 化疗一直是主要的治疗方案, 其中紫杉烷类和蒽环类药物是主要药物。然而, 蒽环类药物不可逆转的心脏毒性和耐药性也不容忽视, 因此研究人员逐渐将目光转向以铂为基础的化疗方案^[17]。铂类药物作为亲核试剂, 核 DNA 为其重要靶点。铂类化疗药可引起 DNA 解离和弯曲, 阻止 DNA 的转录和复制, 从而启动细胞凋亡, 达到杀伤肿瘤细胞的目的^[18]。在临床治疗中常用的铂类药物主要包括 DDP、卡铂和奥沙利铂^[17]。DDP 作为第一代铂类抗癌药物, 早在 1965 年其抑制细胞分裂的作用就被生物物理学家 Barnett Rosenberg 发现, 随后开始广泛被用于治疗多种实体肿瘤^[19-20]。然而, 由于 DDP 严重毒副反应和耐药性, 人们开始研究铂类药物联合治疗的可能性。IFN- γ 是 II 型干扰素家族成员, 具有抗病毒、抗肿瘤以及免疫调节等多种功能, 在先天性和适应性免疫中发挥重要作用^[21-22]。随着研究的深入, 其肿瘤免疫原性并促进肿瘤免疫逃避的特征也逐渐被揭示^[23]。因此, 探究 IFN- γ 与 DDP 联用对转移性三阴性乳腺癌的治疗作用及相关机制将为改善三阴性乳腺癌患者预后提供新的思路。

本研究构建了小鼠三阴性乳腺癌模型, 发现 IFN- γ 与 DDP 联用并未在减小小鼠乳腺肿瘤体积上展现优势, 而是能够显著性抑制肺转移; IFN- γ 联

合 DDP 促进三阴性乳腺癌细胞凋亡的发生, CCK-8 结果显示两者联合能显著性抑制肿瘤细胞增殖。

肿瘤进展是癌细胞和肿瘤微环境之间相互作用的结果, 成纤维细胞作为肿瘤微环境中的重要成分, 其促癌作用在多种肿瘤中都已报道, 可通过分泌细胞因子和重塑细胞外基质或细胞黏附促进肿瘤进展和转移^[24-25]。本研究发现, 在 DDP 治疗时, 经成纤维细胞 L929 上清处理过的三阴性乳腺癌细胞增殖能力显著性加强, 且该作用可被 IFN- γ 所抑制。该结果表明, 成纤维细胞上清中可能存在某种有效成分, 能够影响三阴性乳腺癌细胞的增殖水平, 并且该成分的作用可以被 IFN- γ 所抑制。肿瘤细胞通过有氧代谢产生大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 以支持其快速进展。为了抵抗氧化应激对 DNA、蛋白质和脂质造成的损伤, 清除 ROS 的抗氧化系统水平也相应地提高。GSH 是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽, 是细胞抗氧化系统中的主要抗氧化剂。大多数细胞内的 GSH 以还原形式存在, 它可以与 ROS 等氧化性物质反应, 同时被氧化为氧化形式——谷胱甘肽二硫化物 (glutathione disulfide, GSSG), 起到清除自由基和解毒剂的作用^[26-27]。本研究发现, 在 DDP 作用下, GSH 可以增强肿瘤细胞增殖能力, 并且向 IFN- γ 预处理的成纤维细胞上清中外源性添加 GSH 可以消除 IFN- γ 对 L929 细胞上清促三阴性乳腺癌细胞增殖的抑制作用。因此, 成纤维细胞上清中的有效成分可能是 GSH。

我们进一步探究了 IFN- γ 影响 L929 细胞上清中 GSH 水平的机制。作为 GSH 合成的限速氨基酸, 半胱氨酸以其氧化形式——胱氨酸通过胱氨酸/谷氨酸反向转运系统被导入细胞中, 与还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 进行氧化还原反应后再被还原为半胱氨酸用于 GSH 的合成。该转运系统由一个轻链亚基 (xCT, SLC7A11) 和一个重链亚基 (CD98hc, SLC3A2) 组成, 其中轻链亚基 xCT 介导了该系统的反向转运蛋白活性, 而重链亚基 SLC3A2 将 xCT 锚定在质膜上, 维持 xCT 蛋白的稳定性^[28-30]。本研究通过 qRT-PCR 实验检测发现, IFN- γ 处理成纤维细胞后, 细胞 xCT mRNA 表达水平显著性下调。

UALCAN 数据平台分析发现 TCGA 来源的样本中, 乳腺癌组织中 xCT 表达量显著高于正常乳腺

组织。Kaplan-Meier Plotter 数据平台分析发现 xCT 的高表达与乳腺癌患者较差的 DMFS 显著性相关;在三阴性乳腺癌患者中也可得到相似结论。免疫组化染色发现,发生肺转移的乳腺癌患者肿瘤组织中 xCT 的表达水平明显高于未转移者。以上结果表明,xCT 高表达与乳腺癌高转移风险和不良预后存在明显相关性。

综上所述,IFN- γ 联合 DDP 可以抑制三阴性乳腺癌肺转移,其机制可能是抑制肿瘤相关成纤维细胞 L929 xCT 的表达以减少 GSH 的分泌,从而抑制三阴性乳腺癌转移的发生。本研究为 IFN- γ 联合 DDP 应用于三阴性乳腺癌转移的临床治疗提供了一定的理论基础。随着对肿瘤微环境了解的深入,靶向肿瘤相关成纤维细胞的治疗将会有较好的临床应用前景。此外,xCT 可预测乳腺癌肺转移高风险人群,是独立的预后风险因素,有望成为早期识别肺转移的生物标志物和治疗的靶标。

但是,本研究也存在一定的局限性:一是临床样本分析只纳入了 20 例乳腺癌患者,样本量偏少。二是本研究对于成纤维细胞上清中 GSH 成分作用的研讨尚不完善。三是未探究 DDP 与 IFN- γ 多浓度联合作用对三阴性乳腺癌转移的影响。但基于本研究的实验结果和大样本量的数据库分析支持,结果是具有可靠性的。

参考文献:

- [1] Gradishar WJ, Moran MS, Abraham J, et al. NCCN guidelines® insights: breast cancer, version 4.2021 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2021, 19(5):484-493.
- [2] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1):61.
- [3] Morris GJ, Naidu S, Topham AK, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database[J]. Cancer, 2007, 110(4):876-884.
- [4] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(15 Pt 1):4429-4434.
- [5] Lin NU, Claus E, Sohl J, et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases[J]. Cancer, 2008, 113(10):2638-2645.
- [6] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(8):573-584.
- [7] Zhang C, Xu C, Gao X, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies[J]. Theranostics, 2022, 12(5):2115-2132.
- [8] Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Oncol, 2018, 29(7):1497-1508.
- [9] Xue YY, Gao S, Gou JX, et al. Platinum-based chemotherapy in combination with PD-1/PD-L1 inhibitors: preclinical and clinical studies and mechanism of action[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2021, 18(2):187-203.
- [10] Burke JD, Young HA. IFN- γ : a cytokine at the right time, is in the right place[J]. Semin Immunol, 2019, (43):101280.
- [11] Gocher AM, Workman CJ, Vignali DAA. Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(3):158-172.
- [12] Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, et al. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion[J]. Front Immunol, 2018, (9):847.
- [13] Unterleuthner D, Neuhold P, Schwarz K, et al. Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer[J]. Angiogenesis, 2020, 23(2):159-177.
- [14] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [15] Cardoso F, Senkus E, Costa A, et al. 4th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer(ABC 4)[J]. Ann Oncol, 2018, 29(8):1634-1657.
- [16] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1):66.
- [17] Zhu Y, Hu Y, Tang C, et al. Platinum-based systematic therapy in triple-negative breast cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2022, 1877(1):188678.
- [18] Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists[J]. Dalton Trans, 2018, 47(19):6645-6653.
- [19] Trimmer EE, Essigmann JM. Cisplatin [J]. Essays Biochem, 1999, (34):191-211.

- [20] Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug [J]. Bioorg Chem, 2019, 88:102925.
- [21] Jorgovanovic D, Song M, Wang L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review [J]. Biomark Res, 2020, 8:49.
- [22] Mendoza JL, Escalante NK, Jude KM, et al. Structure of the IFN γ receptor complex guides design of biased agonists[J]. Nature, 2019, 567(7746):56–60.
- [23] Mojic M, Takeda K, Hayakawa Y. The dark side of IFN- γ : its role in promoting cancer immunoevasion [J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1):89.
- [24] Meurette O, Mehlen P. Notch signaling in the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell, 2018, 34(4):536–548.
- [25] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2021(221):107753.
- [26] Niu BY, Liao KX, Zhou YX, et al. Application of glutathione depletion in cancer therapy: enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy[J]. Biomaterials, 2021, 277:121110.
- [27] Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance [J]. J Cell Biol, 2018, 217(7):2291–2298.
- [28] Liu JY, Xia XJ, Huang P. xCT: a critical molecule that links cancer metabolism to redox signaling [J]. Mol Ther, 2020, 28(11):2358–2366.
- [29] Koppula P, Zhuang L, Gan BY. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8):599–620.
- [30] Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(–) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(5):522–555.

《肿瘤学杂志》作者/通信作者校对文稿须知

作者/通信作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通信作者务必按以下要求进行校对:

(1)首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。

(2)所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

(3)文题、作者、单位名称、邮政编码、通信作者等信息,务必确认无误。

(4)对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

(5)参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

(6)校对完毕请作者/通信作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

(7)由于出版周期的限制,如作者/通信作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。