

• 论 著 •

脂质转运蛋白 StarD4 促乳腺癌细胞增殖的作用及其机制



黄腾¹, 单蓉¹, 张敏¹, 李玲², 黄隽³, 刘保安⁴, 周卫兵¹

1. 中南大学湘雅医院 肿瘤科 (长沙 410008)
2. 中南大学湘雅医院 分子医学研究中心 (长沙 410008)
3. 中南大学湘雅医院 普外乳腺外科 (长沙 410008)
4. 中南大学湘雅医院 病理科 (长沙 410008)

【摘要】 StarD4 具有促三阴乳腺癌 (TNBC) 增殖转移功能, 但临床价值和分子机制未明。本文发现 StarD4 在 TNBC 癌组织高表达, 且高表达患者生存预后不良。通过 TNBC 细胞模型的转录组检测和分析发现: StarD4 敲减表达引发胆固醇通路基因的整体下调和 TNBC 肿瘤通路的显著富集。进一步分析验证了 StarD4 可能通过胆固醇通路交叉调控细胞膜受体 ITGA5 的蛋白稳定性, 发挥促癌的分子机制, 为临床 TNBC 的诊疗应用提供了指导。

【关键词】 三阴乳腺癌; StarD4; 胆固醇代谢稳态; ITGA5

Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer 4 (StarD4) promotes breast cancer cell proliferation and its mechanism

HUANG Teng¹, SHAN Rong¹, ZHANG Min¹, LI Ling², HUANG Juan³, LIU Baoan⁴, ZHOU Weibing¹

1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, P.R.China
 2. Center for Molecular Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, P.R.China
 3. Hunan Province Clinic Meditech Research Center for Breast Cancer, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, P.R.China
 4. Department of Pathology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, P.R.China
- Corresponding author: ZHOU Weibing, Email: zhouweibing298@csu.edu.cn

【Abstract】 Oncogene StarD4 had the function of promoting proliferation and metastasis of triple-negative breast cancer (TNBC), but its clinical value and molecular mechanism are unknown. This paper found that StarD4 was highly expressed in cancer tissues of TNBC patients, and higher expression level of StarD4 in TNBC patient resulted in poorer prognosis. Based on transcriptomics of MDA-MB-231 cell model, the results of bioinformatics analysis showed that down-regulated expression level of StarD4 led to overall downregulation of cholesterol-related genes and significant enrichment of cancer mechanism and pathway. Further analysis and investigation verified that StarD4 might cross-promote the protein stability of receptor ITGA5 through the cholesterol pathway to enhance TNBC progression, which provides guidance for clinical application of TNBC diagnosis and treatment.

【Key words】 triple negative breast cancer; StarD4; cholesterol metabolism; ITGA5

引言

乳腺癌是女性首发恶性肿瘤^[1], 每年国内乳腺癌新增人数近 30 万, 年死亡人数近 7 万, 是威胁妇女健康的主要原因。其中, 三阴乳腺癌 (triple

negative breast cancer, TNBC) 是乳腺癌细胞雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和表皮生长因子受体 (HER2) 均表达阴性的乳腺癌亚型^[2-3]。TNBC 年轻女性易发, 异质性强, 临床以放化疗为主要治疗方式, 但预后差, 致死率高^[2-3]。为解决该临床问题, 急需开发 TNBC 患者新的关键靶点基因, 研究其详细机制^[4-5]。

DOI: 10.7507/1001-5515.202105008

基金项目: 国家自然科学基金 (81572612)

通信作者: 周卫兵, Email: zhouweibing298@csu.edu.cn



脂质胆固醇代谢相关途径的异常调节与肿瘤发生和人类癌症的发育有关^[6-10]。胆固醇作为细胞膜和血浆中的关键物质,其代谢稳态在肿瘤免疫细胞膜的受体调控^[11-12]、肿瘤干细胞特性^[13]和肿瘤临床进展^[14-15]中具有重要的作用。TNBC 临床样本的转录组测序发现,免疫抑制的患者胆固醇合成途径显著上调^[15]。而 TNBC 临床样本的人源肿瘤异种移植 (patient derived tumor xenograft, PDX) 模型的转录组测序发现,胆固醇合成途径是维持乳腺癌肿瘤干性的关键^[13]。因此,胆固醇合成途径对 TNBC 肿瘤干细胞特性的维持具有重要作用。胆固醇代谢稳态具有调控细胞膜受体含量的功能^[11-12],我们推测在 TNBC 的干细胞特性维持过程中,胆固醇合成途径可能通过调控 TNBC 的细胞膜受体蛋白含量的方式,发挥促进 TNBC 进展的功能。

StarD4 是一个包含 START [steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer] 结构域的蛋白^[16]。我们前期针对 StarD4 基因在 TNBC 患者中的临床相关性和基因功能进行研究,结果发现:① StarD4 基因高表达与 TNBC 患者的生存预后不良显著相关;② TNBC 体外细胞模型中敲减 StarD4 基因表达,可显著抑制肿瘤细胞增殖和阻滞肿瘤细胞周期,同时增加肿瘤细胞的凋亡水平;③ TNBC 体内皮下裸鼠成瘤模型中敲减 StarD4 基因表达,可显著抑制裸鼠皮下成瘤的瘤体大小^[17],这些实验结果证实 StarD4 可能是 TNBC 临床促癌靶点。但 StarD4 促进 TNBC 进展的分子机制仍不清楚。

StarD4 蛋白位于细胞核和细胞质中,文献报道在骨肉瘤的研究中发现 StarD4 基因表达受脂质调控蛋白 SREBP2 调控,参与细胞膜和内吞循环小体 (endocytic recycling compartment, ERC) 之间的胆固醇双向转运^[18]以及胆固醇稳态调控^[19]。StarD4 蛋白在乳腺癌细胞中是否通过调控胆固醇代谢稳态促进 TNBC 进展,需要进一步论证。我们前期研究发现,在 TNBC 细胞模型中敲减 StarD4 基因表达能够抑制乳腺癌干细胞特性基因 PAK2 和乳腺癌染色质重编程基因 H3.3 的表达^[17]。这些结果表明 StarD4 与 TNBC 的干细胞特性相关,而胆固醇代谢稳态亦与 TNBC 的干细胞特性相关^[13],因此 StarD4 可能是通过调控 TNBC 的胆固醇代谢来影响肿瘤干细胞特性从而促进 TNBC 进展。

文献报道 ITGA5 蛋白是 TNBC 肿瘤干细胞特性的关键细胞膜蛋白^[20-21],因此,我们推测 TNBC 的胆固醇合成途径可能是通过调控 ITGA5

蛋白含量的变化,发挥调控 TNBC 干细胞特性的功能,促进 TNBC 进展。基于以上分析,本研究采用 TNBC 细胞系 StarD4 敲减的细胞模型,进行转录组检测、生物信息学数据挖掘,以及细胞模型的验证,探讨 StarD4 促进 TNBC 进展的分子机制,为 StarD4 在 TNBC 临床治疗的靶点开发提供重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

MDA-MB-231 细胞系:由中南大学分子医学研究中心实验室留存。

TNBC 临床样本:收集中南大学湘雅医院乳腺外科术后病理报告诊断为 TNBC 的样本共 11 例,已排除有其他恶性肿瘤病史,病理报告详细记录了患者组织的免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色为 ER、PR、HER2 阴性,分别取癌组织和癌旁组织样本 (癌旁组织定义为离肿瘤大于 5 cm 的正常乳腺组织) 进行入组检测。这项研究获得湘雅医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒感染 TNBC 细胞系的增殖检测

StarD4 敲减靶点序列 CTATACTGTGGGCTATAAAA 和对照序列 TTCTCCGAACGTGTCACGT,分别构建到 shRNA 敲减慢病毒载体 GV115 (上海吉凯公司),并包装成慢病毒。慢病毒以 MOI = 10 进行 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 细胞的感染,感染过夜后换培养基培养 3 天,使用荧光显微镜在明场视野和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光视野下,观察慢病毒感染效率达到 80% 以上,细胞状态正常。收集感染细胞,一部分进行 Real-time PCR 检测,一部分调整起始细胞量到 4 000 个细胞/孔,连续培养 3~5 天,荧光显微镜下拍照和计数细胞增殖数目变化。

1.2.2 Real-time PCR 和 Western blot 检测 取 6 孔板 80% 细胞密度的细胞样本或新鲜 TNBC 冻存组织 100 mg 加液氮重复研磨,加入 1 mL Trizol 裂解液,提取总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度,取 2 μ g RNA,按照 Promega M-MLV 试剂盒进行反转录生成 cDNA。StarD4 (forward primer: GATGCGTTACACTACTGCTGG; reverse primer: AAAAGACTCTGGTTTGGGTTG)、ITGA5 (forward primer: GGCTTCAACTTAGACGCGGAG; reverse primer: TGGCTGGTATTAGCCTTGGGT) 和内参基因 GAPDH (forward primer: TGACTTCAA

CAGCGACACCCA; reverse primer: CACCCTGT TGCTGTAGCCAAA)引物,由上海生物工程公司合成提供。

Real-time PCR 检测:采用 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒(北京全式金公司)对 StarD4、ITGA5 和内参基因 GAPDH mRNA 水平进行 Real-time PCR 检测,每个样本进行 3 次重复,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

Western blot 检测:收集细胞样本,冰上超声破碎细胞,BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,电转 PVDF 膜,使用 ITGA5 抗体(兔单克隆抗体,Abcam 批号 ab150361,100 μ L,适用于 Western blot 等)进行 4 $^{\circ}$ C 过夜杂交,替换二抗 IgG-HRP(羊抗兔单抗,Santa Cruz 批号 sc-2004,200 μ g,适用于 Western blot 等)孵育 1 h 后,进行 ECL 化学发光压片 X 曝光检测。内参用 GAPDH 抗体(鼠单抗,Abcam 批号 ab8245,100 μ g,适用于 Western blot 等)和对应二抗 IgG-HRP(羊抗鼠单抗,Santa Cruz 批号 sc-2005,200 μ g,适用于 Western blot 等)进行 Western blot 检测。Western blot 显影结果进行灰度分析,比较相对差异。

1.2.3 全转录组芯片检测和数据分析 准备 StarD4 敲减的细胞样本和对照细胞样本,各重复 3 次,委托上海伯豪公司进行转录组芯片(Affymetrix 公司,PrimeView)检测。总体流程:抽提 RNA,取 5 μ L 共 100 ng 总 RNA,使用 GeneChip 3' IVT PLUS Kit 进行 cRNA 扩增和 Biotin 标记,然后和 Affymetrix 公司的人基因表达谱芯片 PrimeView 进行孵育杂交,最后进行杂交信号读取。芯片数据进行原始数据质量评估、数据过滤处理和显著性差异分析。差异基因进行 GeneOntology (GO) 和 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 生物信息学分析。

GO 分析:利用 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)进行生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cellular Component, CC) 的聚类分析。

IPA 分析:利用 QIAGEN 公司的 IPA 数据库和软件进行经典信号通路分析、上游调控分析、疾病功能分析和调控效应的显著性分析。

1.2.4 TCGA 数据库预后相关性分析 利用 TCGA 在线分析工具 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)^[22],选用乳腺癌的 TNBC 人群资料进行 TNBC 肿瘤组织和正常组织的 StarD4 表达水平比较分析,以及 TNBC 患者 StarD4 高低表达的

生存期比较分析。

1.2.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。各组数据之间比较,计量资料采用 t 检验;相关性检验采用 Spearman 相关性分析;生存分析采用 Kaplan-Meier 生存分析,并采用 Log-rank 法进行检验。检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 高表达 StarD4 的 TNBC 患者预后显著差于低表达患者

通过对 TCGA 数据库 116 例 TNBC 的癌组织样本表达水平和 114 例正常或癌旁对照样本进行比较分析,结果发现:TNBC 癌组织中的 StarD4 表达水平显著高于正常组织样本,如图 1 所示。进一步对 TCGA 数据库的 116 例 TNBC 患者进行 StarD4 高低表达分组的预后相关性分析,结果显示:高表达 StarD4 的 TNBC 患者的生存期显著差于低表达 StarD4 的 TNBC 患者 ($P < 0.01$)。在湘雅医院收集的 11 例 TNBC 患者的癌组织和癌旁组织样本进行 qPCR 检测,结果发现相对于癌旁组织,在癌组织表达水平大于 1.5 倍差异的患者有 8 例 (P4~P11 病例),占比 72.7%,如图 1 所示。

2.2 敲减 StarD4 表达显著抑制 TNBC 细胞增殖

将 StarD4 敲减慢病毒感染 MDA-MB-231,感染 3 天后,在明场和荧光显微镜下观察到细胞感染效率达 80%,使用 Real-time PCR 检测 StarD4 敲减效率,结果显示:相比对照组细胞,实验组细胞的 StarD4 敲减效率达到 90%,如图 2 所示。

将 StarD4 敲减慢病毒感染 MDA-MB-231 的细胞组和未感染的对照组,以相同起始量细胞分别铺板 24 孔板,密度约 50%,连续培养 5 天后,进行细胞增殖生长量计数。结果显示:相比于对照组细胞,StarD4 敲减组细胞的细胞增殖数量降低了约 40%,如图 2 所示。

2.3 基于 StarD4 敲减表达 TNBC 细胞系的转录组学数据进行机制分析

利用 MDA-MB-231 细胞系 StarD4 敲减表达组和对照组,进行全转录组表达谱芯片检测,获得差异倍数 (Fold Change, FC) > 1.3 的差异基因共 772 个,上调基因 350 个,下调基因 422 个,如图 3 所示。利用生物信息学 IPA 数据库,针对 StarD4 调控的差异基因,进行疾病和功能的脂质代谢功能富集分析,结果发现:脂质代谢功能的胆固醇合成和代谢调控功能显著富集,其中胆固醇浓度功能显著被抑制 ($Z = -2.97$),如图 3 所示。进一步

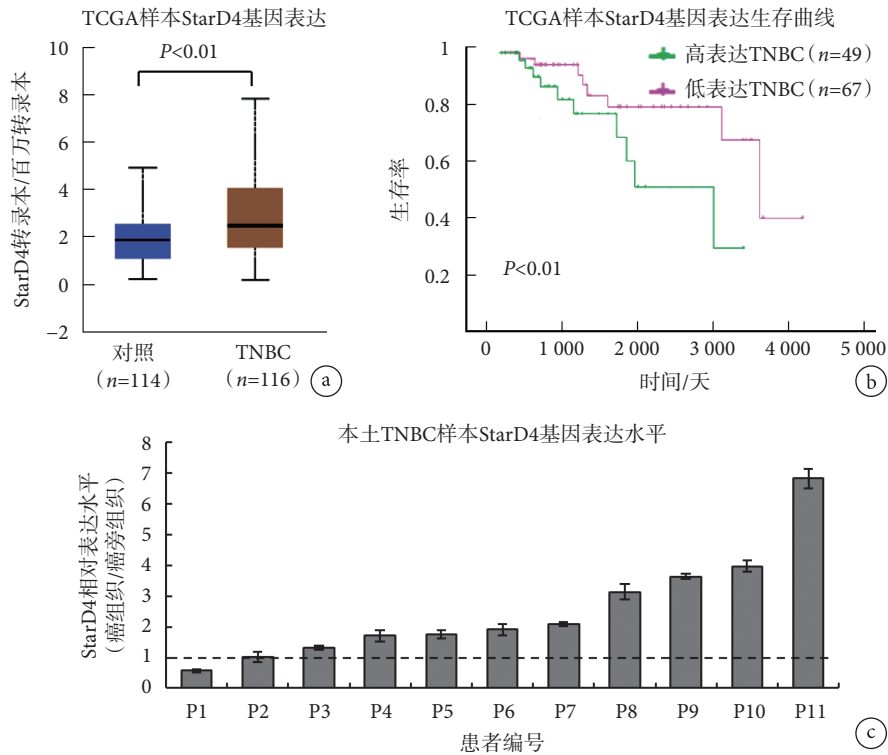


图1 TNBC患者中StarD4基因表达水平的临床相关性 a-b. TCGA数据库中TNBC的表达水平和不同表达水平的生存曲线；c. 湘雅医院TNBC患者StarD4基因的相对表达水平

Fig.1 The clinical correlation of the expression level of StarD4 in TNBC patients a-b. the relative expression level of StarD4 from TNBC patients and survival curves of them in TCGA database; c. the relative expression level of StarD4 from TNBC patients in Xiangya Hospital

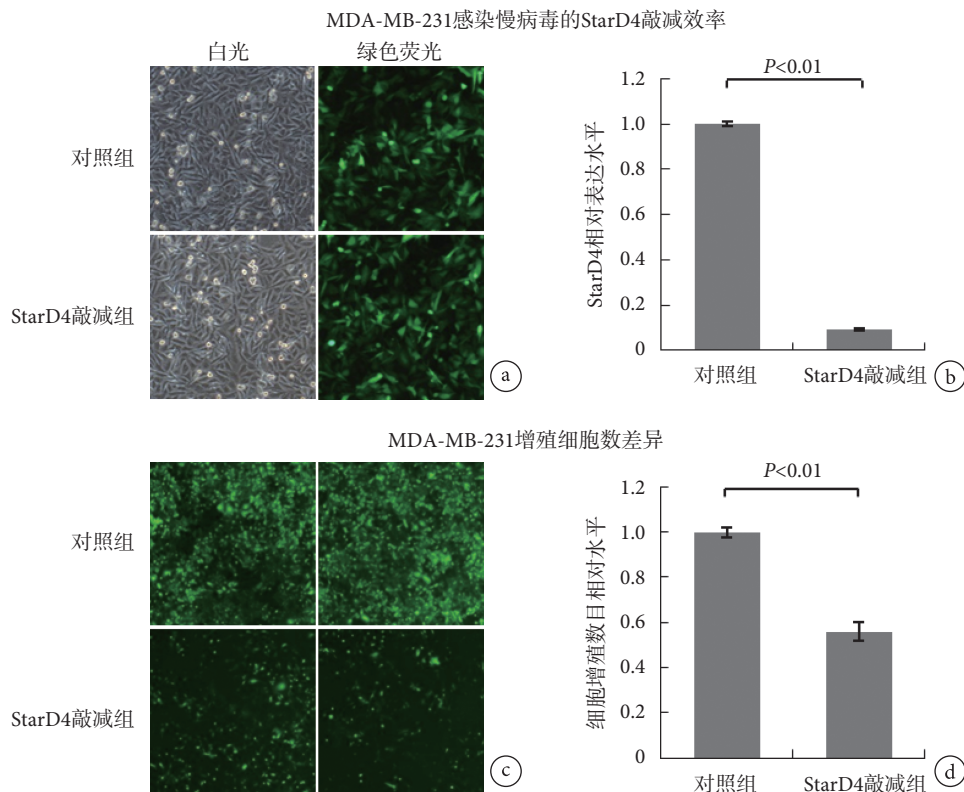


图2 慢病毒介导的StarD4敲减对TNBC细胞系MDA-MB-231增殖的影响 a-b. StarD4敲减表达细胞系模型构建；c-d. StarD4敲减表达细胞系的细胞增殖数目差异

Fig.2 Inhibiting effect on MDA-MB-231 cells with knocked-down StarD4 expression level by using lentivirus system a-b. MDA-MB-231 cells was used for cell model for StarD4 project; c-d. the cell growth with the knocked-down expression of StarD4 was significantly repressed

针对 StarD4 引发的差异基因, 进行上游调控子分析, 结果发现了胆固醇合成途径调控的关键基因 SREBP2, 且它们在 StarD4 敲减组中显著被抑制, 如图 3 所示。对 IPA 经典信号通路之胆固醇合成通路的催化酶基因进行分析, 结果发现: 胆固醇合成通路的 11 个催化酶基因的表达被显著抑制, 其中包括进化保守且参与内吞 endosome 的 ERC 循环调控基因 SC4MOL, 如图 3 所示, SC4MOL 具有调

控细胞膜蛋白稳定性的作用。

进一步利用差异基因, 进行生物信息学 GO 分析, 结果发现: 差异基因生物学过程富集于脂质和胆固醇合成; 细胞组分富集细胞黏附和连接和内质网 ER; 分子功能富集细胞膜 Integrin 受体结合蛋白等, 如图 4 所示。对差异基因利用 IPA 生物信息学数据库进行经典信号通路分析, 结果发现: StarD4 引发的差异基因主要富集于胆固醇信号通

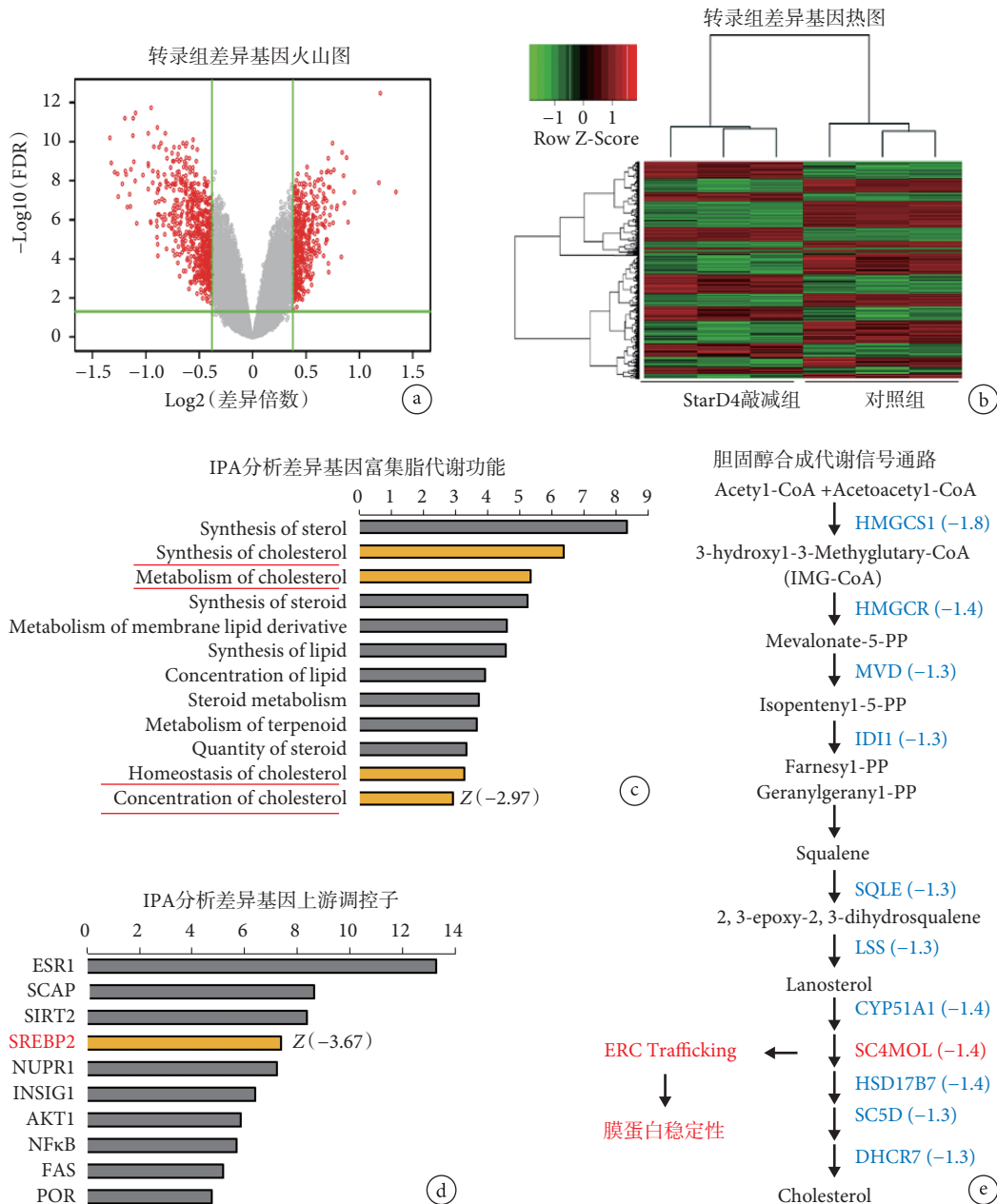


图 3 StarD4 敲减表达 MDA-MB-231 细胞系转录组差异基因胆固醇代谢稳态分析 a-b. 转录组差异基因火山图和热图; c-d. 转录组差异基因 IPA 脂代谢功能分析和上游调控子分析(“Z”负值代表抑制程度); e. 胆固醇合成信号通路和转录组数据催化酶差异变化, 其中催化酶 SC4MOL 通过 ERC 途径调控膜蛋白稳定性(括号内数字代表两组基因的差异倍数)

Fig.3 Cholesterol metabolism was analyzed for transcriptome data of MDA-MB-231 cells a-b. volcano map and heat map of differential genes from transcriptome between test and control; c-d. IPA analyzed metabolism of lipid and upstream regulator (“Z” negative value indicates significant inhibition); e. cholesterol synthesis signaling pathway with differential genes from transcriptome, SC4MOL of which can regulate stability of membrane protein through ERC trafficking (numbers in brackets stand for fold change between test and control groups)

路和肿瘤增殖相关的信号通路,如图4所示。对肿瘤分子机制的相关基因进行分析,结果发现了Integrin家族的细胞膜差异蛋白ITGA5,如图4所示。最后,通过Real-time PCR和Western blot验证ITGA5的表达差异,结果发现:相比于对照组,StarD4敲减组细胞ITGA5的mRNA水平和蛋白水平都显著下调,如图4所示。

3 讨论

TNBC治疗手段有限、预后差、致死率高,是乳腺癌临床面临的关键问题。临床发现鉴定TNBC的关键靶点、探究其详细的分子机制是TNBC转化医学研究的关键。在本研究中,对TCGA数据库的TNBC临床样本进行StarD4表达水平的临床相关性分析,结果发现:StarD4在TNBC患者的癌组织显著高表达,且StarD4高表达的TNBC患者生存期显著低于StarD4低表达患者

(如图1所示)。这些临床数据结果提示,StarD4是TNBC的重要促癌基因。

前期研究中,我们选择两株TNBC细胞系HCC1937和MDA-MB-231细胞,分别进行StarD4的敲减表达,同时进行增殖MTT、凋亡、划痕转移相关的细胞学功能实验以及动物学功能,证明StarD4在乳腺癌中的促癌功能^[17]。在本项目中,课题组采用Celligo增殖荧光拍照计数的方法,选用TNBC细胞系MDA-MB-231进行StarD4的敲减,并进行细胞增殖能力变化的评估。结果发现在StarD4敲减的细胞系中,细胞增殖能力降低40%(如图2所示),该结果与我们前期研究的MTT检测、周期和凋亡检测的结果一致^[17]。这些实验表明:StarD4在TNBC中具有促进细胞增殖的重要功能。前期研究中,我们曾尝试用StarD4低表达的TNBC细胞系进行StarD4过表达操作和功能检测,但未找到合适的细胞系;另外,我们尝

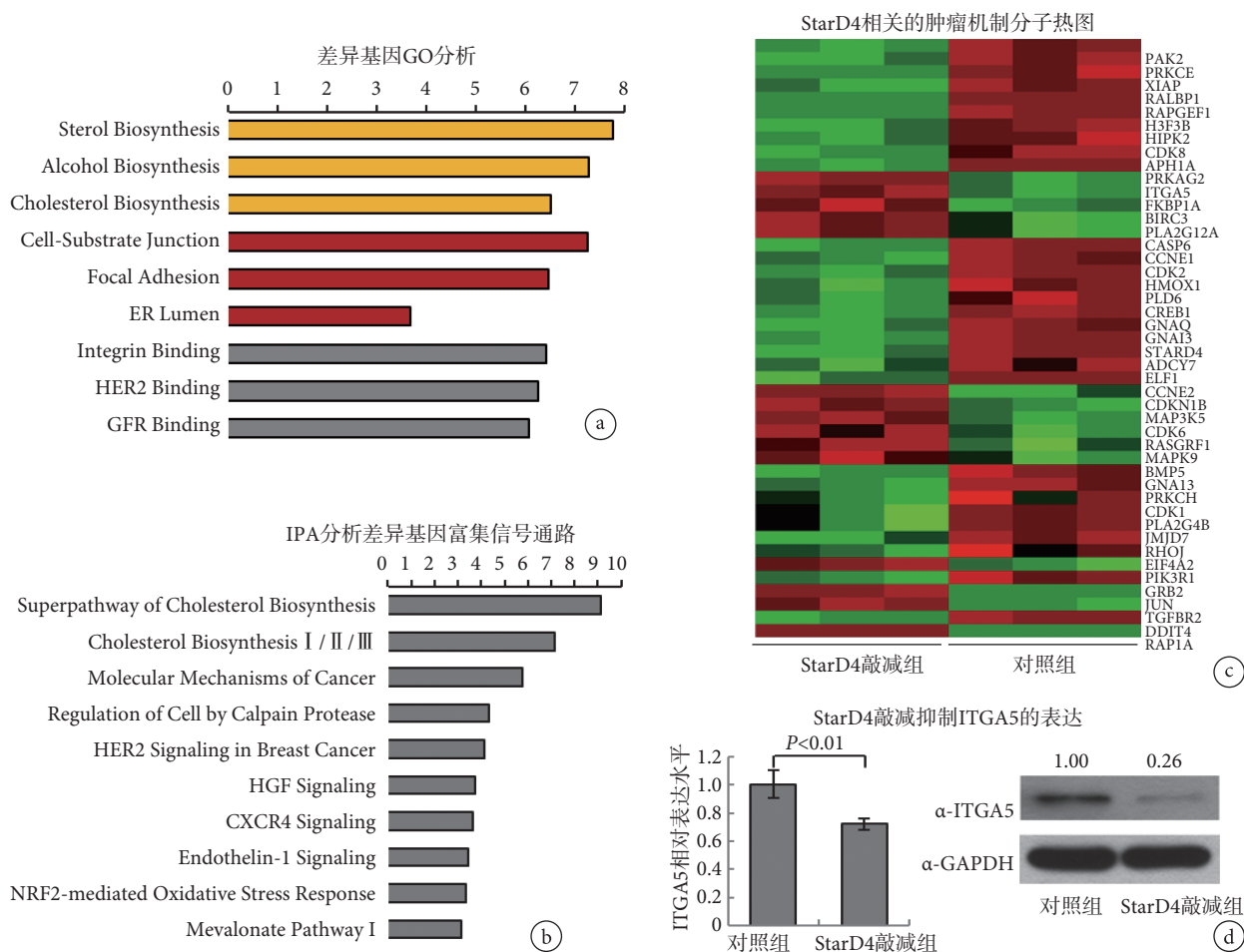


图4 StarD4敲减MDA-MB-231细胞系转录组差异基因生物信息学分析和数据验证 a-b. GO分析和IPA信号通路分析; c. IPA肿瘤机制分子热图; d. ITGA5在StarD4敲减组和对照组中的Real-time PCR和Western blot检测

Fig.4 Bioinformatics analysis for transcriptome data of StarD4-knocked down TNBC cell line MDA-MB-231 to verify molecular mechanism of cancer a-b. GO analysis and IPA analysis of pathway; c. heat map of cancer mechanism molecular on IPA database; d. detection of expression level of ITGA5 between test and control groups using real-time PCR and Western blot

试对 HCC1937 细胞和 MDA-MB-231 细胞进行过表达 StarD4 遗传操作, 但是因为 StarD4 本底表达水平比较高, 导致过表达效果不明显。基于这些结果, 课题组进一步选用 StarD4 敲减表达细胞体系, 进行 StarD4 促癌功能的机制研究。

利用 TNBC 细胞系的 StarD4 敲减细胞模型进行全转录组芯片检测和分析, 结果发现 StarD4 敲减引发的差异基因主要富集于胆固醇信号通路和肿瘤增殖相关的信号通路(如图 4 所示)。胆固醇合成途径是维持 TNBC 肿瘤干性的关键^[19]。在肿瘤中, 胆固醇代谢稳态受到严格调控, 其代谢途径的关键蛋白或代谢产物参与对肿瘤的调控^[23-25]。StarD4 是一个参与胆固醇运输的载体蛋白, 为了进一步分析 StarD4 可能的调控机制, 我们深入分析了 StarD4 对脂质相关疾病功能和上游调控蛋白的影响, 结果发现: 在 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 中, 敲减 StarD4 表达, 可显著抑制胆固醇浓度(如图 3 所示), 并显著抑制了胆固醇合成通路上游关键调控蛋白 SREBP2 以及胆固醇合成酶的表达水平(如图 3 所示)。胆固醇合成代谢稳态受到胞内脂质水平的影响, 其关键调控因子 SREBP2 从内质网向高尔基体转移, SREBP2 在高尔基体内被剪切修饰后释放入细胞核, 最终促进胆固醇合成途径的基因表达^[25], 包括胆固醇合成通路下游关键酶 SC4MOL 的表达(如图 3 所示)。胆固醇合成途径关键酶 SC4MOL 具有促进肿瘤受体的内吞 ERC 循环、阻止受体降解的作用^[24], 与肿瘤进展具有密切关系。这些数据分析表明, StarD4 蛋白可能通过调控胆固醇合成代谢稳态通路的 SREBP2-SC4MOL 调控轴, 交叉调控 TNBC 肿瘤细胞膜受体蛋白的稳定性, 从而促进乳腺癌进展(如图 3 所示)。

我们利用差异基因进行生物信息学 GO 分析, 发现了 StarD4 引发的差异基因聚集在 Integrin 相关蛋白(如图 4 所示)。且通过 IPA 分析 StarD4 调控的肿瘤相关的信号通路和关键蛋白, 结果发现 Integrin 蛋白 ITGA5 受到调控(如图 4 所示)。我们进一步通过 TNBC 的体外细胞 StarD4 敲减模型进行验证, 结果发现 StarD4 抑制 ITGA5 的 mRNA 水平只有 30% 左右, 但是抑制 ITGA5 蛋白水平高达 74%(如图 4 所示)。这些结果表明 StarD4 可能具有调控膜蛋白 ITGA5 稳定性的功能, 而 ITGA5 是涉及 TNBC 肿瘤干细胞特性的关键明星分子。我们前期研究还发现 StarD4 敲减能够抑制 PAK2 和 H3.3 蛋白^[5], 而 PAK2 和 H3.3 是调控乳腺癌干性和肿瘤重编程的关键蛋白^[26-27]。综合这些

数据表明, StarD4 蛋白可能是通过调控 ITGA5 膜受体来调控 TNBC 干细胞特性分子, 维持 TNBC 肿瘤干细胞特性, 发挥促癌功能^[28-29]。

4 总结

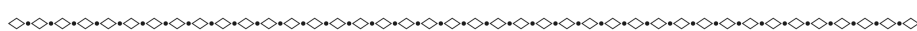
TNBC 生存期相关基因 StarD4 可能通过调控胆固醇代谢稳态的 SREBP2-SC4MOL 调控轴, 参与细胞膜 ITGA5 受体蛋白的稳定性调控, 从而促进 TNBC 的进展。该研究为进一步深入研究 StarD 家族基因胆固醇运输蛋白 StarD4 作为 TNBC 生存期的关键候选药靶, 以及 StarD4 调控乳腺癌细胞膜受体和干细胞特性的机制打下基础, 为深层次理解 TNBC 预后与胆固醇代谢稳态的关系以及转化医学提供理论依据。

利益冲突声明: 本文全体作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- Chen W, Zheng R, Baade P, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA-Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- Jiang Y, Ma D, Suo C, *et al.* Genomic and transcriptomic landscape of triple-negative breast cancers: subtypes and treatment strategies. *Cancer cell*, 2019, 35(3): 428-440.
- Denkert C, Liedtke C, Tutt A, *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *Lancet*, 2017, 389(10087): 2430-2442.
- Wang Z, Chen J, Zhong M Z, *et al.* Overexpression of ANLN contributed to poor prognosis of anthracycline-based chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Chemoth Pharm*, 2017, 79(3): 1-9.
- Garrido-Castro A, Lin N, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176-198.
- Zhu J, Thompson C. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2019, 20(7): 436-450.
- Kamphorst J, Gottlieb E. Cancer metabolism: friendly neighbours feed tumour cells. *Nature*, 2016, 536(7617): 401-402.
- Wagner E, Petruzzelli M. Cancer metabolism: A waste of insulin interference. *Nature*, 2015, 521(7553): 430-431.
- Tasselli L, Chua K. Cancer: metabolism in 'the driver's seat'. *Nature*, 2012, 492(7429): 362-363.
- Cao Y. Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3006-3017.
- Yang W, Bai Y, Xiong Y, *et al.* Potentiating the antitumour response of CD8⁺ T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature*, 2016, 531(7596): 651-655.
- Ma X, Bi E, Lu Y, *et al.* Cholesterol induces CD8⁺ T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 143-156.
- Ehmsen S, Pedersen M H, Wang G, *et al.* Increased cholesterol biosynthesis is a key characteristic of breast cancer stem cells influencing patient outcome. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3927-3938.
- Jiang Y, Sun A, Zhao Y, *et al.* Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261.

- 15 Grusso T, Gigoux M, Vsk M, *et al.* Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *J Clin Invest*, 2019, 129: 1785-1800.
 - 16 Soccio R E. The STARD4 subfamily: STARD4 and STARD5 in cholesterol metabolism// Clark B J, Stocco D M. Cholesterol transporters of the START domain protein family in health and disease. New York: Springer, 2015: 139-171.
 - 17 Zhang M, Xiang Z, Wang F, *et al.* STARD4 promotes breast cancer cell malignancy. *Oncol Rep*, 2020, 44(6): 2487-2502.
 - 18 Iaea D B, Mao S, Lund F W, *et al.* Role of STARD4 in sterol transport between the endocytic recycling compartment and the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(8): 1111-1122.
 - 19 Calderon-Dominguez M, Gil G, Medina M A, *et al.* The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: New players in cholesterol metabolism. *Int J Biochem Cell B*, 2014, 49: 64-68.
 - 20 Shen M, Jiang Y Z, Wei Y, *et al.* Tinag11 suppresses triple-negative breast cancer progression and metastasis by simultaneously inhibiting Integrin/FAK and EGFR signaling. *Cancer Cell*, 2019, 35(1): 64-80.
 - 21 Xiao Y, Li Y, Tao H, *et al.* Integrin $\alpha 5$ down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway. *Cancer Lett*, 2018, 433: 199-209.
 - 22 Chandrashekar D S, Bashel B, Balasubramanya S A H, *et al.* UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658.
 - 23 Yu R, Longo J, Van Leeuwen J, *et al.* Statin-induced cancer cell death can be mechanistically uncoupled from prenylation of RAS family proteins. *Cancer Res*, 2018, 78(5): 1347-1357.
 - 24 Sukhanova A, Gorin A, Serebriiskii I G, *et al.* Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation. *Cancer Discov*, 2013, 3(1): 96-111.
 - 25 Luo J, Yang H, Song B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2020, 21(4): 225-245.
 - 26 Liu X, Taftaf R, Kawaguchi M, *et al.* Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discov*, 2018, 9(1): 96-113.
 - 27 Gomes A P, Ilter D, Low V, *et al.* Dynamic incorporation of histone H3 variants into chromatin is essential for acquisition of aggressive traits and metastatic colonization. *Cancer Cell*, 2019, 36(4): 402-417.
 - 28 Plaks V, Kong N, Werb Z. The Cancer Stem Cell Niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(3): 225-238.
 - 29 Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(9): 533-548.
- 收稿日期: 2021-05-06 修回日期: 2021-08-27
本文编辑: 李蓓兰



(上接第 1117 页; *Continued from Page 1117*)

- 9 Ma X K, Liu Z Y, Zhang Z Y, *et al.* Multiple network algorithm for epigenetic modules via the integration of genome-wide DNA methylation and gene expression data. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 72.
 - 10 Chen J Y, Zhang S H. Integrative analysis for identifying joint modular patterns of gene-expression and drug-response data. *Bioinformatics*, 2016, 32(11): 1724-1732.
 - 11 Zhou D Y, Bousquet O, Lal T N, *et al.* Learning with local and global consistency. *Adv Neural Inf Proc Syst*, 2003, 16(3): 321-328.
 - 12 Page L, Brin S, Motwani R, *et al.* The PageRank citation ranking: bringing order to the Web. *Stanford Digital Libraries Working Paper*, 1998, 9(1): 1-14.
 - 13 Cho M S, Lee J M, Lee K M. Reweighted random walks for graph matching. *Lect Notes Comput Sc*, 2010, 6315: 492-505.
 - 14 Chen J Z, Peng H, Han G Q, *et al.* HOGMMNC: a higher order graph matching with multiple network constraints model for gene-drug regulatory modules identification. *Bioinformatics*, 2019, 35(4): 602-610.
 - 15 Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*, 2003, 94(7): 575-581.
 - 16 Liang Zhongxing, Brooks J, Willard M, *et al.* CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3): 716-722.
 - 17 Lin L P, Asthana S, Chan E, *et al.* Mapping the molecular determinants of BRAF oncogene dependence in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(7): E748-E757.
 - 18 Robert C, Karaszewska B, Schachter J, *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med*, 2015, 372(1): 30-39.
 - 19 Kim K B, Kefford R, Pavlick A C, *et al.* Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol*, 2013, 31(4): 482-489.
- 收稿日期: 2021-02-02 修回日期: 2021-09-17
本文编辑: 陈咏竹