基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003536

BRD4/NF-κB信号通路介导的铁死亡参与三阴性乳腺癌化疗耐药的机制

张硕稳[1]，李　丹[1]，贺　静[1]，杜志兴[1]，裴永彬[2]

（1.河北医科大学第一医院健康管理中心，石家庄　050000；2.河北医科大学第一医院普外科，石家庄　050000）

【摘　要】目的：探讨溴域蛋白亚家族4（bromodomain protein subfamily 4，BRD4）/核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）信号通路介导的铁死亡参与乳腺癌恶性生物学行为的机制。**方法：**多柔比星（Doxorubicin，DOX）抗性MDA-MB-231细胞（MDA-MB-231/DOX）分为对照（Con）组、DOX组和si-BRD4+DOX组。si-BRD4+DOX组在用si-BRD4转染MDA-MB-231/DOX细胞48 h后，用1 μmol/L DOX处理细胞24 h。通过集落形成试验和5-乙炔基-2′-脱氧尿苷（5-Ethynyl-2′-deoxyuridine，EdU）分析评估细胞增殖能力。通过FerroOrange、liperfloo检测细胞亚铁离子浓度和脂质过氧化水平。将15只雌性BALB/c-nu小鼠随机分为3组：对照组、DOX组、DOX+si-BRD4组，每组5只，用于建立MDA-MB-231/DOX细胞皮下接种模型。通过qRT-PCR、蛋白质印迹、免疫组化分析BRD4/NF-κB信号通路表达。**结果：**与si-NC组相比，si-BRD4#1和si-BRD4#2组MDA-MB-231、BT549细胞的细胞克隆数、EDU阳性染色、谷胱甘肽（glutathione，GSH）水平均降低（$P<0.001$），和MDA-MB-231、BT549细胞亚铁离子水平、活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平、氧化型谷胱甘肽（Oxidized glutathione，GSSG）/GSH比值升高（$P<0.01$）。与亲代细胞（MDA-MB-231）相比，在MDA-MB-231/DOX中BRD4的mRNA和蛋白质表达水平升高。与Con组相比，DOX组细胞中IKβ-α、NF-κB、BRD4表达和ROS水平增加（$P<0.05$），和细胞克隆数和EDU阳性染色均降低（$P<0.05$）；与DOX组相比，si-BRD4+DOX组细胞中核因子κB抑制蛋白α（Anti-IKB alpha，IKβ-α）、NF-κB表达、细胞克隆数、EDU阳性染色降低（$P<0.05$），ROS水平升高（$P<0.05$）。与对照组相比，DOX组肿瘤重量和体积均减少（$P<0.05$），并且肿瘤组织中TUNEL染色细胞增加（$P<0.05$）。此外，BRD4+DOX组肿瘤重量和体积较DOX组进一步降低（$P<0.001$），TUNEL染色细胞进一步增加（$P<0.001$）。BRD4+DOX组肿瘤组织中Ki-67、BRD4、NF-κB较DOX组下调（$P<0.01$），4-羟基壬烯醛（4-Hydroxynonenal，4-HNE）上调（$P<0.01$）。**结论：**BRD4是一个重要的耐药因子，它可以通过促进NF-κB信号通路的激活来抑制乳腺癌化疗诱导的铁死亡。

【关键词】溴域蛋白亚家族4；核因子κB；铁死亡；乳腺癌

【中图分类号】R737.9　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-08-31

Mechanism of ferroptosis mediated by the bromodomain protein subfamily 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway in chemotherapy resistance of triple-negative breast cancer

Zhang Shuowen[1]，*Li Dan*[1]，*He Jing*[1]，*Du Zhixing*[1]，*Pei Yongbin*[2]

（*1. Health Management Center，The First Hospital of Hebei Medical University；*

2. Department of General Surgery，The First Hospital of Hebei Medical University）

【Abstract】*Objective*：To investigate the mechanism of ferroptosis mediated by the bromodomain protein subfamily 4（BRD4）/nuclear factor-kappa B（NF-κB）signaling pathway in the malignant biological behavior of breast cancer. ***Methods*：**Doxorubicin-resistant MDA-MB-231 cells（MDA-MB-231/DOX）were divided into control group（Con group），DOX group，and si-BRD4+DOX group. In the si-BRD4+DOX group，MDA-MB-231/DOX cells were transfected with si-BRD4 for 48 hours and were then treated with 1 μmol/L DOX for 24 hours. Colony formation assay and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine（EdU）analysis were used to evaluate the proliferation ability of cells，and FerroOrange and liperfloo were used to measure the concentration of ferrous ion and the level of lipid peroxidation. A total of 15 female BALB/c-nu mice were randomly divided into control group，DOX group，and DOX+Si-BRD group，with 5 mice in

作者介绍：张硕稳，Email：zswykd@qq.com，研究方向：乳腺肿瘤，健康管理。

通信作者：裴永彬，Email：zswykd@qq.com。

基金项目：河北省卫生健康委科研基金资助项目（编号：20190484）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240716.1704.004（2024-07-17）

each group, and a subcutaneous inoculation model of MDA-MB-231/DOX cells was established. The methods of qRT-PCR, Western blotting, and immunohistochemistry were used to measure the expression of the BRD4/NF-κB signaling pathway. ***Results***: Compared with the si-NC group, the si-BRD4#1 group and the si-BRD4#2 group had significant reductions in the number of cell clones, positive EDU staining, and glutathione level in MDA-MB-231 and BT549 cells (P<0.001), as well as significant increases in the level of ferrous ion, the level of reactive oxygen species (ROS), and oxidized glutathione/glutathione ratio (P<0.01). Compared with the parental cells (MDA-MB-231), there were increases in the mRNA and protein expression levels of BRD4 in MDA-MB-231/DOX cells. Compared with the Con group, the DOX group had significant increases in the expression levels of IKβ-α, NF-κB, and BRD4 and the level of ROS (P<0.05) and significant reductions in the number of cell clones and positive EDU staining (P<0.05); compared with the DOX group, the si-BRD4+DOX group had significant reductions in the expression levels of IKβ-α and NF-κB, the number of cell clones, and positive EDU staining (P<0.05) and a significant increase in the level of ROS (P<0.05). Compared with the control group, the DOX group had significant reductions in tumor weight and volume (P<0.05) and a significant increase in the number of TUNEL-stained cells in tumor tissue (P<0.05). In addition, compared with the DOX group, the BRD4+DOX group had further reductions in tumor weight and volume (P<0.001) and a significant increase in the number of TUNEL-stained cells (P<0.001). Compared with the DOX group, the BRD4+DOX group had significant reductions in Ki-67, BRD-4, and NF-κB (P<0.01) and a significant increase in 4-hydroxynonenal (P<0.01) in tumor tissue. ***Conclusion***: BRD4 is an important drug resistance factor, which can inhibit ferroptosis induced by chemotherapy in breast cancer by promoting the activation of the NF-κB signaling pathway.

【Key words】bromodomain protein subfamily 4; nuclear factor-kappa B; ferroptosis; breast cancer

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一，占全球女性癌症新发病例的24%以上，约占癌症相关死亡的15%[1]。三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）是乳腺癌的一个亚型，占所有浸润性乳腺癌的15%~20%[2]。由于TNBC缺乏可用药的分子驱动因素，化疗仍然是TNBC患者全身治疗的主要手段[3]。然而，内在和获得性耐药性极大地限制了化疗的效率，导致乳腺癌患者的高转移率和不良预后[4]。因此，对化疗耐药性的潜在分子机制的表征将有助于开发新的治疗策略，以增强乳腺癌患者的化疗效果。

铁死亡是最近发现的一种细胞死亡形式，主要由过度的铁依赖性脂质过氧化引起，并导致铁介导的细胞膜氧化损伤，细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平增加[5-6]。积累的证据表明，铁死亡在癌细胞的命运和对各种癌症治疗（如化疗、放疗和免疫疗法）的反应中起着重要作用[7]。具有耐药性和高转移倾向的肿瘤细胞表现出对铁死亡的更高敏感性，表明靶向铁死亡的负调节因子可能会进一步使化学抗性癌细胞对铁死亡敏感[8]。此外，铁死亡癌细胞释放的损伤相关分子模式可以通过作用于周围细胞来增强炎症和免疫反应[9]。因此，需要进一步的研究来阐明铁死亡的分子机制，这将有助于实施新的方法来克服耐药性。

肿瘤细胞具有明显的表观基因组特征，如DNA甲基化、组蛋白共价修饰和染色质重塑，极大地影响了它们的发生或发展[10]。越来越多的证据表明，表观遗传调控与铁死亡密切相关[11]。溴域蛋白亚家族（bromodomain protein subfamily，BRDs）是癌细胞中最重要的表观遗传转录调节因子之一，其特征在于代表性的溴域和末端外结构域[12]。BRDs的4个家族成员已被鉴定：BRD2、BRD3、BRD4和BRDT；其中BRD4在癌症中的作用被研究得最充分[13]。最近研究证实，BRD4作为铁死亡的表观遗传调控因子，抑制其表达被认为是对血液和固体恶性肿瘤的一种有前途的治疗[14-15]。然而，很少数研究探讨BRD4介导的铁死亡在乳腺癌化疗耐药性调节中的作用。本研究中，探讨了BRD4敲低对乳腺癌细胞增殖和铁死亡的影响，并进一步以多柔比星抗性MDA-MB-231细胞（MDA-MB-231/DOX细胞）为对象，体外、体内分析BRD4敲除对细胞DOX耐药的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系和动物

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞系（MDA-MB-231和BT549）购

自美国典型培养物保藏中心，将细胞培养在补充有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 g/mL链霉素的DMEM培养基中（美国Gibco公司）。多柔比星（Doxorubicin，DOX）抗性MDA-MB-231细胞亚系，称为MDA-MB-231/DOX细胞，通过将亲代细胞连续暴露于浓度从10 nmol/L逐步增加至1 μmol/L的多柔比星达约半年的时间建立，具体操作详见课题组前期研究成果[16]。将MDA-MB-231/DOX细胞分为对照（Con）组、DOX组和si-BRD4+DOX组。si-BRD4+DOX组在用si-BRD4转染MDA-MB-231/DOX细胞48 h后，用1 μmol/L DOX处理细胞24 h。Con组、DOX组分别用载体或1 μmol/L DOX处理细胞24 h。

1.1.2 动物 SPF级4周龄雌性BALB/c-nu小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。所有小鼠饲养在无病原体环境下。

1.2 *方法*

1.2.1 定量实时聚合酶链反应（qRT-PCR）分析 分别使用RNAiso Plus、PrimeScript RT试剂盒和TB Green Premix Ex Taq（Tli RNase H Plus）（日本Takara公司）对细胞进行RNA提取、逆转录和qRT-PCR分析。由上海Sangon Biotech公司合成BRD4和GAPDH的引物。序列如下：GAPDH-F：5'-CCTCTGACTTCAACAGCGAC-3'和GAPDH-R：5'-TCCTTTGTGCTCTTGCTGGC-3'和BRD4-F：5'-TGCCCAGATAGCATCGTCC-3'和BRD4-R：5'-TCTTCTTCTGGTACAACTTCCAGT-3'。

1.2.2 细胞亚铁离子、脂质过氧化和谷胱甘肽/GSSG定量 通过FerroOrange（日本dojindo公司）检测细胞亚铁离子浓度，和通过liperfloo（日本dojindo公司）测量细胞脂质过氧化水平，并在Axiovert A1荧光显微镜（德国Carl Zeiss公司）观察。使用GSSG/谷胱甘肽定量试剂盒Ⅱ（日本dojindo公司）测定氧化型谷胱甘肽（Oxidized glutathione，GSSG）/谷胱甘肽含量。

1.2.3 siRNA、慢病毒合成和细胞转染 广州RiboBio公司设计并合成了针对BRD4的小干扰RNA（siRNA）。在敲除效率验证后，将si-BRD4#1包装到pGLV-h1-GFP-puro载体中用于进一步的体内实验（慢病毒购自上海Genomeditech公司）。siRNAs的序列如下：si-NC：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'；si-BRD4# 1：5'-CCUCUCUAUAAGUAUAAU-3'；si-BRD4# 2：5'-GAACGUUAUACAUAAGGU-3'；si-BRD4#3：5'-CGACGACGAAAGUUACGU-3'。siRNA转染试剂为Lipofectamine RNAiMax试剂，购自美国Thermo Fisher公司。

1.2.4 细胞增殖能力和EdU分析 将用siRNA转染的MDA-MB-231和BT549细胞或用DOX处理DOX抗性乳腺癌细胞（MDA-MB-231/DOX）接种到平板中。通过集落形成试验评估细胞增殖能力，和5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（EdU）分析（广州RiboBio公司）DNA复制能力。

1.2.5 蛋白质印迹分析 使用RIPA裂解缓冲液（上海Beyotime公司）从细胞组织中提取总蛋白。使用BCA蛋白检测试剂盒（上海Beyotime公司）测定蛋白浓度。蛋白质样品通过10% SDS-PAGE凝胶分离，然后转移到0.22 μm聚偏二氟乙烯膜（美国Millipore公司）上。在室温下用5%脱脂乳封闭膜1 h，并在4 ℃下与IKβ-α（1∶1 000，美国Proteintech公司）、核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司）、BRD4（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司）和GAPDH（1∶2 000，美国Proteintech公司）第一抗体温育过夜。第2天，在室温下与辣根过氧化物酶标记的第二抗体（美国Cell Signaling Technology公司）一起温育1 h后，用增强化学发光试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）观察目标蛋白。

1.2.6 体内动物研究 将15只雌性BALB/c-nu小鼠随机分为3组：对照组、DOX组、DOX+si-BRD4组，每组5只，用于建立皮下接种模型。将1×10^7 MDA-MB-231/DOX细胞或稳定敲低BRD4的MDA-MB-231/DOX细胞重悬于200 μL PBS中，并皮下植入小鼠的右侧区域。当皮下肿瘤达到50 mm^3的平均尺寸时，DOX组和DOX+si-BRD4组每3天通过静脉注射用2 mg/kg的DOX，对照组给予等体积的载体治疗，共治疗7次。每隔5 d用卡尺测量肿瘤大小，计算肿瘤体积：长×（宽）^{2}/2。最后1次治疗后第2天处死小鼠，对皮下肿瘤称重、拍照，并用于IHC分析。

1.2.7 免疫组织化学（IHC）和TUNEL分析 参照文献方法[17]进行IHC分析。本研究中使用的初级抗体如下：NF-κB（1∶200）、BRD4（1∶200）、4-羟基壬烯醛（1∶150，美国R&D system公司）和Ki-67（1∶200，美国Cell Signaling Technology公司）。染色强度估计如下：0=阴性；1=弱；2=中等；3=强。通过将染色强度乘以阳性细胞的百分比来计算染色分数。通过末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记（TUNEL）分析（上海Beyotime公司）肿瘤组织中的凋亡细胞。

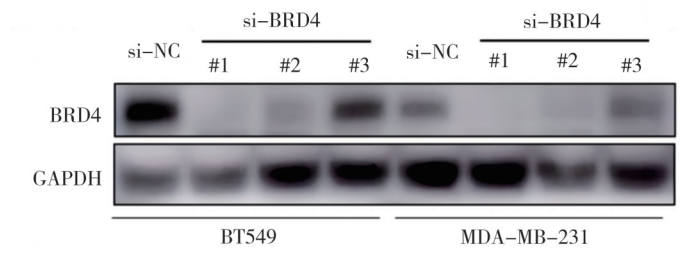
1.3 *统计学方法*

使用GraphPad Prism 8.0软件进行分析。正态分布计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）形式表达。2组或2组以上的比较用t检验或单因素方差分析。检验水准α=0.05。

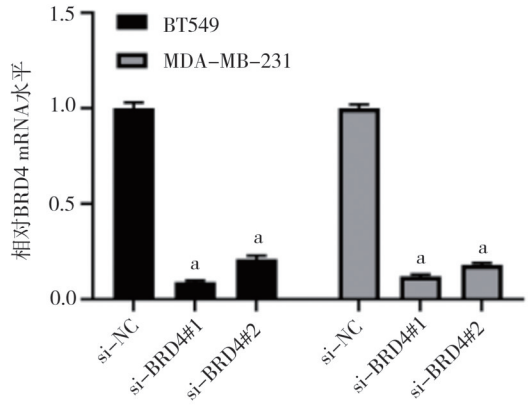
2 结 果

2.1 BRD4敲除抑制乳腺癌体外增殖

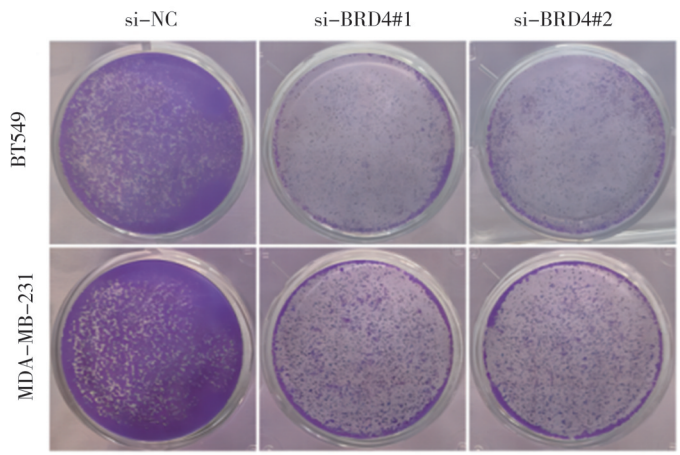
为了确定BRD4的生物学功能，设计了3个siRNA序列并转染到MDA-MB-231、BT549细胞中。蛋白质印迹和qRT-PCR分析显示序列#1和#2具有高敲除效率，并可用于随后的实验（图1A、B）。与si-NC组相比，si-BRD4#1和si-BRD4#2组MDA-MB-231、BT549细胞的细胞克隆数（F=14.510、15.020，P<0.001）和EDU阳性染色（F=22.630、19.840，P<0.001）均显著降低（图1C、D）。这些发现表明BRD4敲除可以抑制乳腺癌增殖。

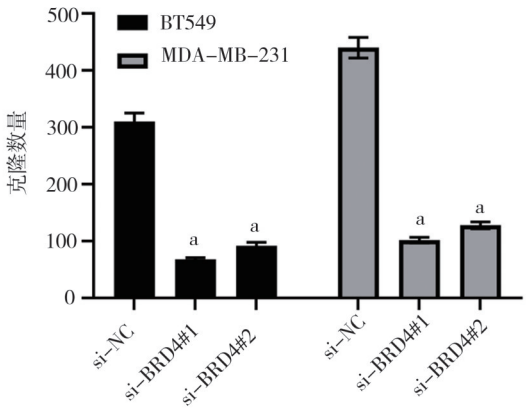


A. 蛋白质印迹检测BRD4蛋白表达

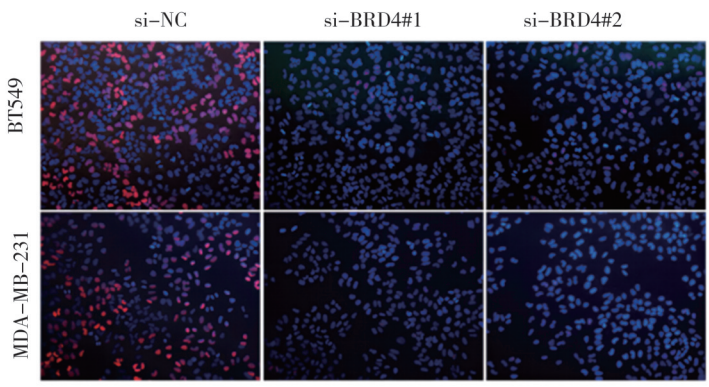


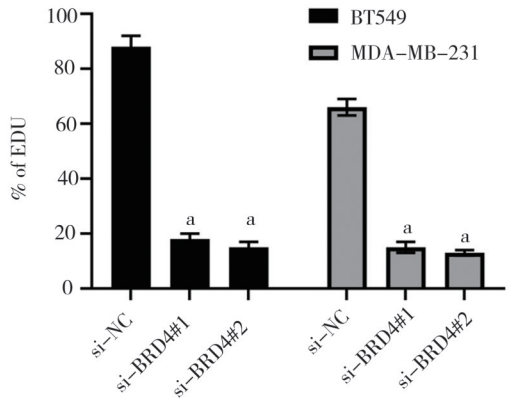
B. MDA-MB-231、BT549细胞中BRD4蛋白相对表达水平





C. 集落形成试验检测si-BRD4转染MDA-MB-231、BT549细胞的克隆数





D. EdU试验评估BRD4敲除后MDA-MB-231、BT549细胞的DNA复制能力

注：a，与si-NC组相比，$P < 0.001$

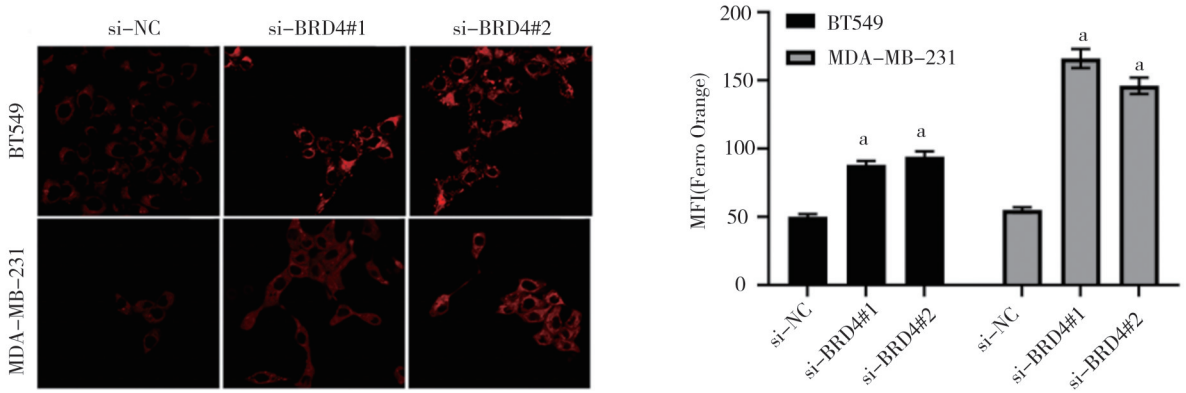
图1　BRD4敲除抑制乳腺癌细胞体外增殖。

2.2　BRD4敲除诱发乳腺癌细胞铁死亡

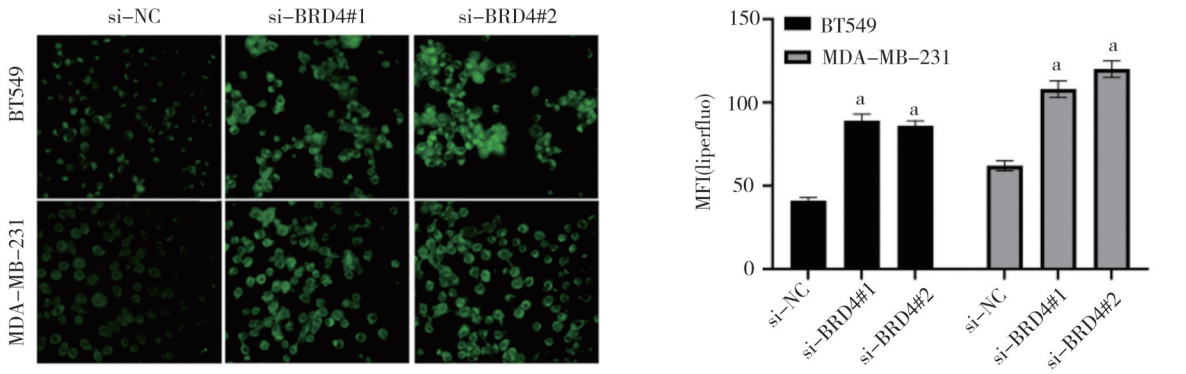
使用铁橙荧光探针、Liperfluo探针观察到细胞内亚铁离子和ROS水平。与si-NC组相比，si-BRD4#1和si-BRD4#2组MDA-MB-231、BT549细胞亚铁离子水平（F=6.840、7.410，均P<0.001）和ROS水平（F=7.820、8.260，均P<0.001）显著升高（图2A、B）。此外，si-BRD4#1和si-BRD4#2组MDA-MB-231、BT549细胞中GSSG/GSH比值较si-NC组均升高（F=12.810、14.520，P<0.001），GSH水平降低（F=5.430、18.050，P<0.01）（图2C、D）。

2.3　BRD4/NF-κB信号通路参与乳腺癌细胞体外DOX耐药

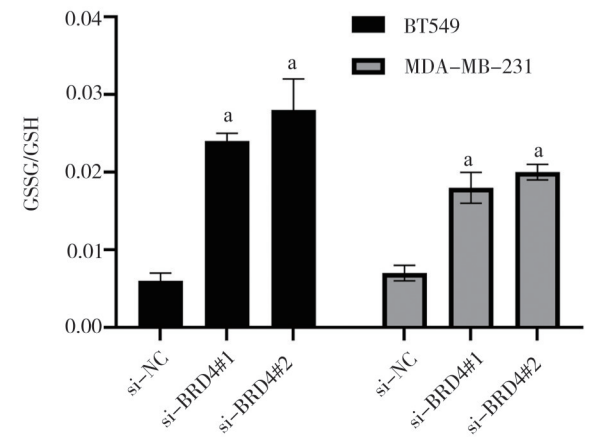
与亲代细胞（MDA-MB-231）相比，在DOX抗性乳腺癌细胞（MDA-MB-231/DOX）中检测到BRD4的mRNA（t=3.840，P=0.013）和蛋白质表达水平升高（图3A、B），表明其在DOX耐药中的促进作用。此外，DOX治疗以剂量依赖和



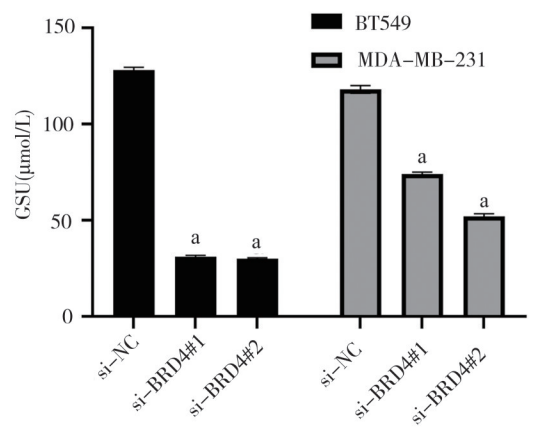
A. FerroOrange试剂盒测定MDA-MB-231、BT549细胞内亚铁含量



B. Liperfluo试剂盒测定MDA-MB-231、BT549细胞内脂质过氧化



C. MDA-MB-231、BT549细胞内GSSG与谷胱甘肽的比值



D. MDA-MB-231、BT549细胞内GSH水平

注：a，与si-NC组比较，$P < 0.05$

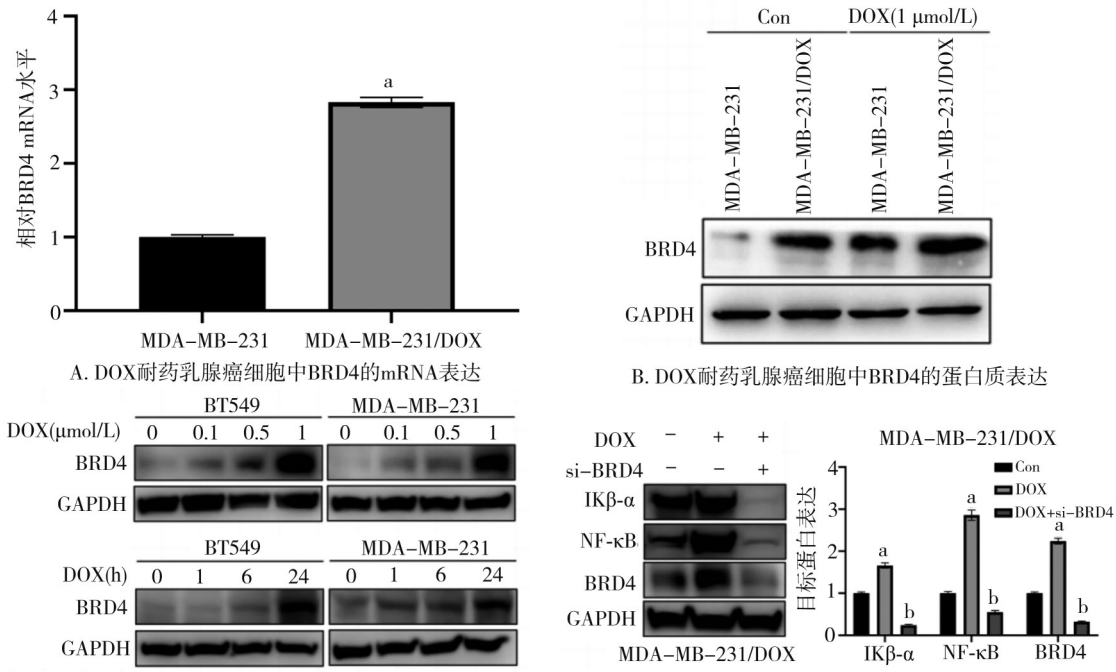
图2　BRD4敲除在乳腺癌诱发铁死亡

时间依赖的方式导致BRD4表达增加（图3C）。

先前研究证实，BRD4/NF-κB信号通路参与介导乳腺癌进展[18]。为了确定BRD4/NF-κB信号通路是否参与乳腺癌细胞体外DOX耐药，研究以MDA-MB-231/DOX细胞作为研究对象，用siRNA敲低BRD4表达。结果显示，与Con组相比，DOX组细胞中IKβ-α、NF-κB、BRD4表达增加（$P<0.05$），相反，si-BRD4+DOX组细胞中IKβ-α、NF-κB、BRD4表达较DOX组降低（F=21.860、45.370、25.630，均$P<0.001$）（图3D、E）。

2.4　BRD4敲除体外降低MDA-MB-231/DOX细胞的DOX耐药

与Con组相比，DOX组MDA-MB-231/DOX细胞的细胞克隆数和EDU阳性染色均降低（$P<0.05$），ROS水平升高（$P<0.05$）。与DOX组相比，DOX+si-BRD4组MDA-MB-231/DOX细胞的细胞克隆数和EDU阳性染色进一步降低（F=21.030、26.680，均$P<0.001$），ROS水平进一步升高（F=35.760，$P<0.001$）（图4）。



A. DOX耐药乳腺癌细胞中BRD4的mRNA表达

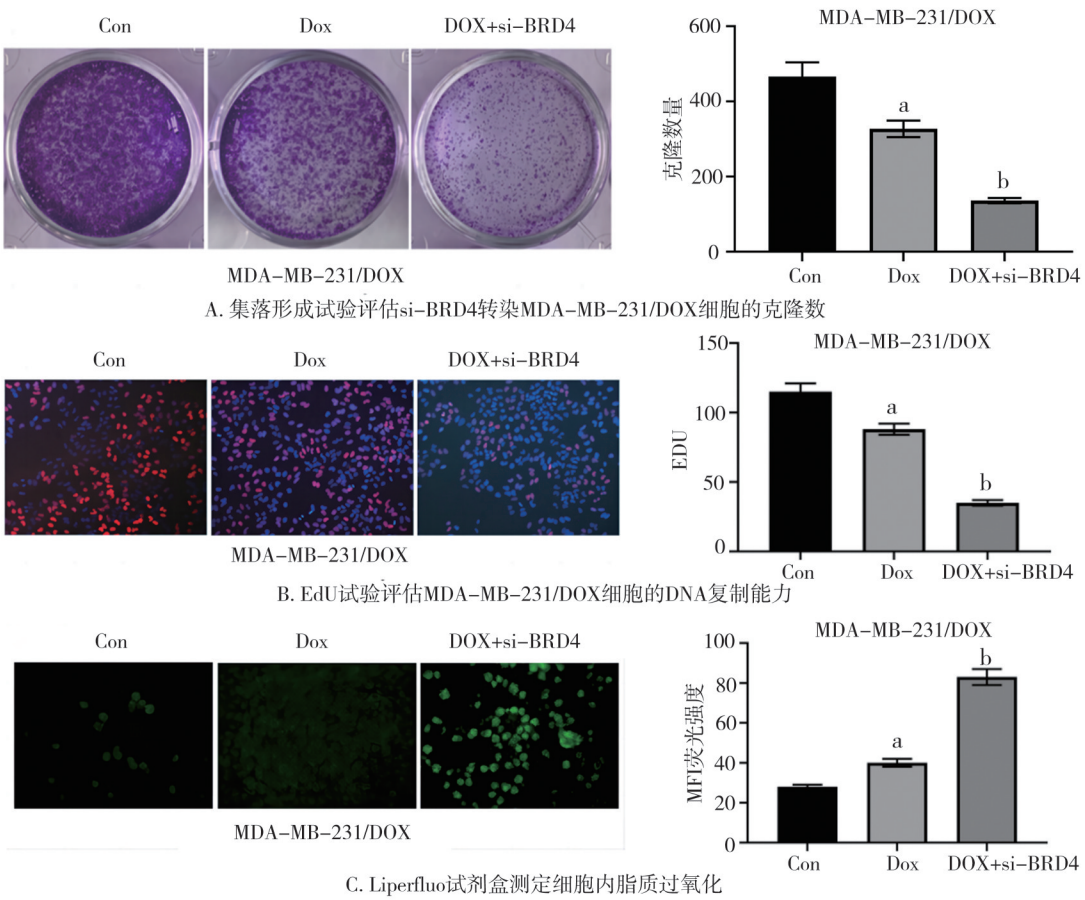
B. DOX耐药乳腺癌细胞中BRD4的蛋白质表达

C. 蛋白质印迹检测MDA-MB-231、BT549细胞的BRD4表达

D. 蛋白质印迹检测BRD4/NF-κB信号通路表达

注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b：与DOX组比较，$P<0.05$

图3　BRD4/NF-κB信号通路参与乳腺癌细胞体外DOX耐药



A. 集落形成试验评估si-BRD4转染MDA-MB-231/DOX细胞的克隆数

B. EdU试验评估MDA-MB-231/DOX细胞的DNA复制能力

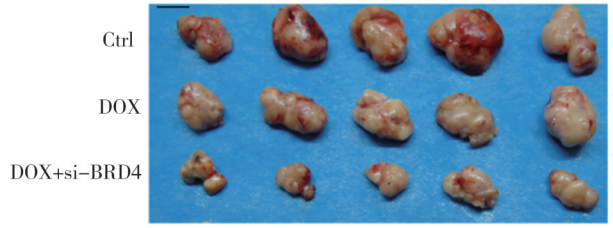
C. Liperfluo试剂盒测定细胞内脂质过氧化

注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b，与DOX组比较，$P<0.01$

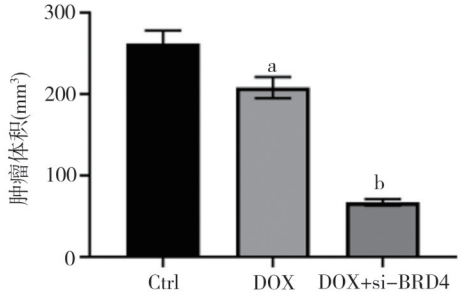
图4　BRD4敲除体外降低MDA-MB-231/DOX细胞的DOX耐药

2.5　BRD4 敲除增强了 DOX 的体内抗肿瘤作用

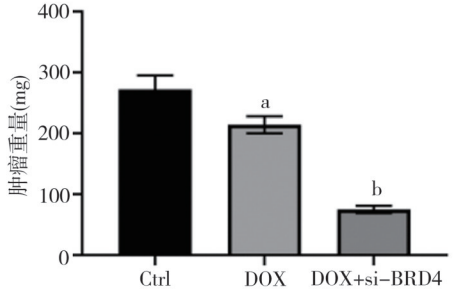
为了研究体内铁死亡，将用 si-BRD4 转导 MDA-MB-231/DOX 细胞注射入 BALB/c-nu 小鼠，随后接受 DOX 治疗。与对照组相比，DOX 组肿瘤重量和体积均减少（P<0.05），并且肿瘤组织中 TUNEL 染色细胞增加（P<0.05）。此外，BRD4+DOX 组肿瘤重量和体积较 DOX 组进一步降低（F=19.130、21.740，均 P<0.001），和 TUNEL 染色细胞进一步增加（F=32.050，P<0.001）（图 5A~D）。IHC 分析了异种移植物，BRD4+DOX 组肿瘤组织中 Ki-67、BRD4、NF-κB 较 DOX 组下调（F=15.620、32.150、18.090，均 P<0.001），4-HNE 上调（F=11.240，P<0.01）（图 5E）。4-HNE 是代表脂质过氧化活化和铁死亡的重要指标。这些发现表明，BRD4 敲除在体内诱导铁死亡。



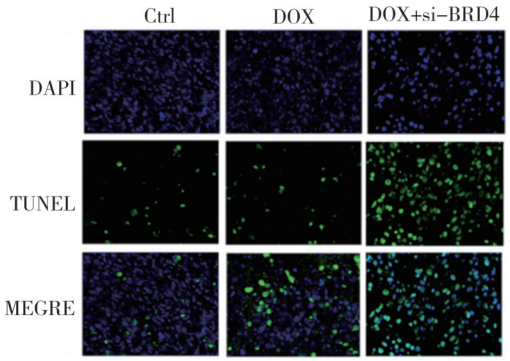
A.源自MDA-MB-231/DOX细胞的异种移植物的代表性图像

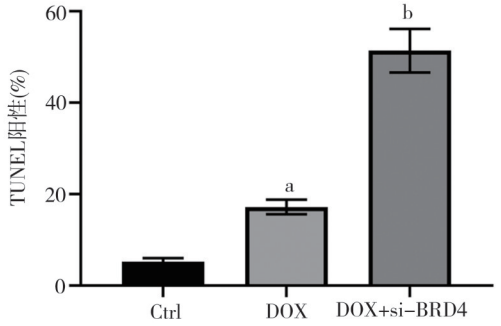


B. 各组的肿瘤重量

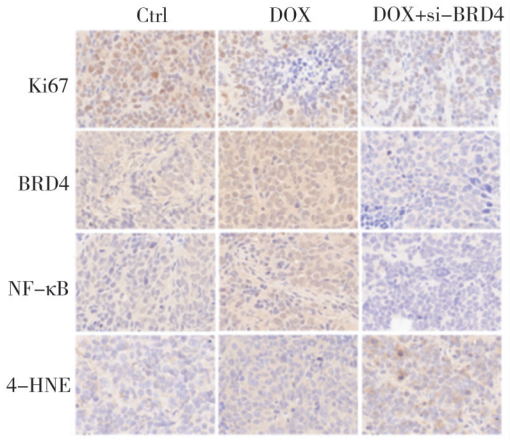


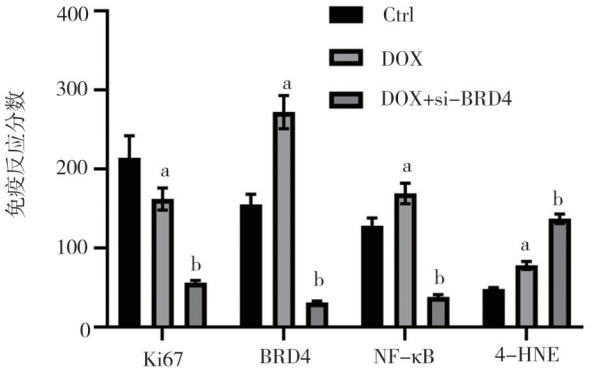
C. 各组的肿瘤体积





D. TUNEL染色检测肿瘤细胞凋亡情况





E. 异种移植肿瘤中NF-κB、BRD4、Ki67、4-HNE的免疫反应评分

注：a，与 Ctrl 组比较，P < 0.05；b：与 DOX 组比较，P < 0.01

图 5　BRD4 敲除增强了 DOX 的体内抗肿瘤作用

3 讨 论

由于缺乏ER、PR和HER2受体，没有理想的目标可用于有效治疗TNBC[19]。化疗仍然是大多数TNBC患者的一线治疗方案[20]。然而，TNBC是一种侵袭性表型，通常对化疗耐药，导致疾病进展、复发和转移，这是超过90%的TNBC患者死亡的原因[21]。因此，寻找能够阐明潜在机制并用于克服耐药性的新靶点对于改善乳腺癌患者的预后至关重要。在目前的研究中，本研究证实BRD4可以防止乳腺癌细胞化疗诱导的铁死亡，并在介导乳腺癌化疗耐药中发挥重要作用。

铁死亡是一种程序性细胞死亡的非凋亡形式，其特征是磷脂的铁依赖性过氧化积累，由细胞代谢、氧化还原稳态和各种癌症相关信号通路调节[6]。据报道，铁死亡通过调节各种肿瘤特性在抑制乳腺癌生长中起着关键作用[22-23]。因此，通过靶向铁死亡相关基因诱导铁死亡已成为对抗肿瘤进展和化疗耐药的治疗策略。新出现的证据表明，铁死亡相关基因（如ACSL4、GPX4）可以作为患者预后和治疗效果的指标[24]。然而，许多分子可能在铁死亡的整个过程中起重要作用。因此，需要更多的研究来揭示铁死亡在乳腺癌进展和化疗耐药中的作用和机制。表观遗传读码器BRD4是溴域和末端外蛋白家族的成员，其特征在于2个保守的N-末端溴域和一个末端外域[25]。全基因组研究表明，BRD4存在于相当大比例的活性启动子和增强子区域，包括超级增强子[26]。最近研究发现BRD4在基因表达调节中的作用涉及铁死亡相关基因GPX4、BRD4和SLC3A2的表达，并且BRD4敲除可以在各种癌细胞系和小鼠肿瘤异种移植物中增加铁水平，导致ROS积累，并最终诱导铁死亡[27]。与先前研究一致，发现BRD4敲除通过诱导铁死亡抑制乳腺癌细胞的体外增殖。这些发现有助于在TNBC治疗中靶向BRD4。

DOX是一种细胞毒性蒽环类抗生素，广泛用于治疗多种癌症，被认为是乳腺癌化疗的基础。越来越多的研究表明，DOX通过抑制DNA复制和产生H_2O_2来促进癌细胞死亡，H_2O_2是导致ROS产生增加的芬顿反应底物[28]。因此，DOX可能通过间接诱导铁死亡来杀死癌细胞。最近研究报道，DOX治疗显著增加了乳腺癌细胞中的ROS和MDA水平，乳腺癌细胞是铁死亡的关键执行者[7]。本研究结果揭示了乳腺癌中DOX介导的BRD4的上调，表明BRD4可能参与了DOX诱导的铁死亡的调节，并与DOX耐药性相关。考虑到铁死亡以ROS水平升高和脂质过氧化为特征，研究将DOX和BRD4抑制诱导的铁死亡结合起来，并发现BRD4敲除体外、体内降低了MDA-MB-231/DOX细胞的DOX耐药。

NF-κB在人类癌症的发生、发展、转移和耐药中起着重要作用。由于炎症微环境和各种致癌突变，许多人类癌症表现出组成型NF-κB活性，促进肿瘤细胞增殖，增加血管生成，抑制凋亡，还诱导上皮-间质转化和远处转移[17]。NF-κB在赖氨酸-310（AcLys310）的乙酰化促进NF-κB靶基因表达，并有助于在癌症中维持组成型NF-κB活性[29]。BRD4与AcLys310结合，作为一种调节NF-κB转录活性的共激活因子。此外，最近研究发现BRD4可以与IKβ-α结合，并促进泛素化介导的IKβ-α降解，从而导致骨髓细胞中核转位和NF-κB活性增强[30]。在进一步研究中，发现在DOX处理的MDA-MB-231/DOX细胞和异种移植肿瘤中IKβ-α、NF-κB、BRD4表达增加，用siRNA敲低BRD4表达导致细胞中IKβ-α、NF-κB表达降低，并且细胞增殖和肿瘤进展速度较单用DOX组进一步减缓，表明BRD4/NF-κB信号通路可能与乳腺癌细胞耐药相关。因此，靶向BRD4可能体现了一种治疗具有组成型活性NF-κB的癌症新策略。

总之，本课题组的研究结果揭示了BRD4是一个重要的耐药因子，它可以通过促进NF-κB信号通路的激活来抑制乳腺癌化疗诱导的铁死亡。因此，靶向BRD4和联合使用抗癌药物诱导铁死亡将是一种克服乳腺癌化疗耐药性的潜在治疗策略。然而，本研究仅以三阴性乳腺癌细胞系作为研究模型，得出的结果结论仅能一定程度上代表三阴性乳腺癌相关特征与机制，其他分子分型是否相同尚未知，在未来的研究中旨在进一步深入分子位点机制研究，并扩大到其他分子分型乳腺癌。

参 考 文 献

[1] Sun JJ, Zhao HY, Xu WX, et al. Recent advances in photothermal therapy-based multifunctional nanoplatforms for breast cancer[J]. Front Chem, 2022, 10: 1024177.

[2] Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of triple-negative breast cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 181-204.

[3] Li Y, Zhang HJ, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 121.

[4] Asleh K, Riaz N, Nielsen TO. Heterogeneity of triple negative breast cancer: current advances in subtyping and treatment implications [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 265.

[5] Zhang Z, Lu ML, Chen CL, et al. Holo-lactoferrin: the link between ferroptosis and radiotherapy in triple-negative breast cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3167-3182.

[6] Xie YZ, Wang BY, Zhao YN, et al. Mammary adipocytes protect triple-negative breast cancer cells from ferroptosis[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 72.

[7] Li K, Xu K, He Y, et al. Oxygen self-generating nanoreactor mediated ferroptosis activation and immunotherapy in triple-negative breast cancer[J]. ACS Nano, 2023, 17(5): 4667-4687.

[8] Li K, Lin CC, Li MH, et al. Multienzyme-like reactivity cooperatively impairs glutathione peroxidase 4 and ferroptosis suppressor protein 1 pathways in triple-negative breast cancer for sensitized ferroptosis therapy[J]. ACS Nano, 2022, 16(2): 2381-2398.

[9] Liu J, Zhu S, Zeng L, et al. DCN released from ferroptotic cells ignites AGER-dependent immune responses[J]. Autophagy, 2022, 18(9): 2036-2049.

[10] Ushijima T, Clark SJ, Tan P. Mapping genomic and epigenomic evolution in cancer ecosystems[J]. Science, 2021, 373(6562): 1474-1479.

[11] Wu YQ, Zhang SW, Gong XX, et al. The epigenetic regulators and metabolic changes in ferroptosis-associated cancer progression[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 39.

[12] Zhang JF, Tang P, Zou L, et al. Discovery of novel dual-target inhibitor of bromodomain-containing protein 4/casein kinase 2 inducing apoptosis and autophagy-associated cell death for triple-negative breast cancer therapy[J]. J Med Chem, 2021, 64(24): 18025-18053.

[13] Chang XS, Sun DJ, Shi DF, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives co-targeting poly (ADP-ribose) polymerase-1 and bromodomain containing protein 4 for breast cancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(1): 156-180.

[14] Schmitt A, Grimm M, Kreienkamp N, et al. BRD4 inhibition sensitizes diffuse large B-cell lymphoma cells to ferroptosis[J]. Blood, 2023, 142(13): 1143-1155.

[15] Yang MH, Liu K, Chen P, et al. Bromodomain-containing protein 4(BRD4) as an epigenetic regulator of fatty acid metabolism genes and ferroptosis[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(10): 912.

[16] Huang JF, Wen CJ, Zhao GZ, et al. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells *in vitro*[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 82(2): 199-210.

[17] Zhou TQ, Zhou MM, Tong CC, et al. Cauliflower bioactive compound sulforaphane inhibits breast cancer development by suppressing NF-κB/MMP-9 signaling pathway expression[J]. Cell Mol Biol, 2022, 68(4): 134-143.

[18] Yang GJ, Song YQ, Wang WH, et al. An optimized BRD4 inhibitor effectively eliminates NF-κB-driven triple-negative breast cancer cells[J]. Bioorg Chem, 2021, 114: 105158.

[19] Komohara Y, Kurotaki D, Tsukamoto H, et al. Involvement of protumor macrophages in breast cancer progression and characterization of macrophage phenotypes[J]. Cancer Sci, 2023, 114(6): 2220-2229.

[20] Greco S, Fabbri N, Spaggiari R, et al. Update on classic and novel approaches in metastatic triple-negative breast cancer treatment: a comprehensive review[J]. Biomedicines, 2023, 11(6): 1772.

[21] Sarnella A, Ferrara Y, Albanese S, et al. Inhibition of bone marrow-mesenchymal stem cell-induced carbonic anhydrase IX potentiates chemotherapy efficacy in triple-negative breast cancer cells[J]. Cells, 2023, 12(2): 298.

[22] Sen U, Coleman C, Sen T. Stearoyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis[J]. Trends Cancer, 2023, 9(6): 480-489.

[23] Li PY, Lin QH, Sun SY, et al. Inhibition of cannabinoid receptor type 1 sensitizes triple-negative breast cancer cells to ferroptosis via regulating fatty acid metabolism[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(9): 808.

[24] Sha R, Xu YQ, Yuan CW, et al. Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes *ACSL4* and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. EBioMedicine, 2021, 71: 103560.

[25] Hu JF, Pan D, Li G, et al. Regulation of programmed cell death by Brd4[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1059.

[26] Donati B, Lorenzini E, Ciarrocchi A. BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 164.

[27] Sui SY, Zhang J, Xu SP, et al. Ferritinophagy is required for the induction of ferroptosis by the bromodomain protein BRD4 inhibitor(+)-JQ1 in cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(5): 331.

[28] Luo S, Qin SJ, Oudeng G, et al. Iron-based hollow nanoplatforms for cancer imaging and theranostics[J]. Nanomaterials, 2022, 12(17): 3023.

[29] Yang GJ, Wang WH, Lei PM, et al. A 7-methoxybicoumarin derivative selectively inhibits BRD4 BD2 for anti-melanoma therapy[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 3204-3220.

[30] Song MG, Li JY, Sun J, et al. DNMT1-mediated DNA methylation in toll-like receptor 4(TLR4) inactivates NF-κB signal pathway-triggered pyroptotic cell death and cellular inflammation to ameliorate lipopolysaccharides (LPS)-induced osteomyelitis[J]. Mol Cell Probes, 2023, 71: 101922.

（责任编辑：周一青）