临床研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003620

IGBP1对ER阳性乳腺癌增殖和他莫昔芬耐药的影响

谭文浩，刘胜春

（重庆医科大学附属第一医院乳腺甲状腺外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：通过CRISPR Screen正向基因筛选技术，筛选出他莫昔芬耐药靶点基因免疫球蛋白结合蛋白1（immunoglobulin binding protein 1，IGBP1）。验证IGBP1在临床乳腺癌患者肿瘤组织中是否高表达，并探讨IGBP1对雌激素受体阳性（ER^+）乳腺癌细胞增殖、细胞周期和耐药性等表型的影响，为诊断和治疗提供潜在靶点。**方法：**应用公共数据库分析IGBP1在乳腺癌患者肿瘤组织及配对癌旁组织中的表达是否有所不同。Kaplan-Meier Plotter用于预测IGBP1对乳腺癌患者总体生存率（the overall survival，OS）是否有所影响。应用慢病毒感染ER^+乳腺癌细胞，再进行功能实验验证IGBP1过表达及敲低对ER^+乳腺癌细胞增殖、细胞周期和耐药性的影响。最后用公共数据库鉴定出可能与IGBP1正、负相关的基因。**结果：**公共数据库的结果表明，IGBP1在乳腺癌组织中高表达。生存分析表明，IGBP1高表达的患者的OS较差。细胞功能实验显示，过表达IGBP1的细胞增殖、细胞周期明显快于对照组细胞，耐药性增强；而敲低IGBP1的结果相反。与IGBP1正相关的基因里有已知的癌基因如NOP53。**结论：**IGBP1在ER^+乳腺癌中高表达，IGBP1的过表达和敲低均影响ER^+乳腺癌细胞系的增殖、细胞周期和耐药性，提示IGBP1在ER^+乳腺癌中可能能够改善其耐药，表明IGBP1可能作为ER^+乳腺癌的潜在治疗靶点之一。

【关键词】免疫球蛋白结合蛋白1；乳腺癌；雌激素受体阳性；他莫昔芬耐药

【中图分类号】R737.9 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-08-31

Effects of IGBP1 on proliferation and tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer

Tan Wenhao, Liu Shengchun

(*Department of Breast and Thyroid Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Used CRISPR Screen, a forward gene screening technique, to screen for the tamoxifen-resistant target gene, immunoglobulin binding protein 1 (IGBP1). Then we verified whether IGBP1 was overexpressed in tumor tissues of clinical patients with breast cancer and explored the impact of IGBP1 on cell proliferation, cell cycle, drug resistance, and other phenotypes in patients with estrogen receptor-positive (ER^+) breast cancer, with the aim to provide potential targets for the diagnosis and treatment of the disease. ***Methods*:** Public databases were used to analyze whether the expression of IGBP1 was different in the tumor tissue and paracancerous tissue of patients with breast cancer. Kaplan Meier Plotter was used to predict the impact of IGBP1 on the overall survival (OS) of patients with breast cancer. The impact of IGBP1 overexpression and knockdown on cell proliferation, cell cycle, and drug resistance of ER^+ breast cancer cells was verified using functional experiments following ER^+ breast cancer cell infection with lentivirus. Finally, public databases were used to identify genes that may be positively or negatively correlated with IGBP1. ***Results*:** The results from the public databases showed that IGBP1 was highly expressed in breast cancer tissue. Survival analysis showed that patients with high expression of IGBP1 had poorer OS. Cell functional experiments showed that cells overexpressing IGBP1 had significantly faster proliferation and cell cycle and increased drug resistance than control cells, while the results were opposite for cells with IGBP1 knockdown. There were known oncogenes such as NOP53 among genes that were positively correlated with IGBP1. ***Conclusion*:** IGBP1 is highly expressed in ER^+ breast cancer. Either overexpression or knockdown of IGBP1 will affect the proliferation, cell cycle, and drug resistance of ER^+ breast cancer cell lines, suggesting that IGBP1 may improve drug resistance in ER^+ breast cancer and thus be one of the potential therapeutic targets for ER^+ breast cancer.

【Key words】 immunoglobulin binding protein 1; breast cancer; estrogen receptor-positive; tamoxifen-resistant

作者介绍：谭文浩，Email：1434100166@qq.com，研究方向：乳腺肿瘤。

通信作者：刘胜春，Email：liushengchun1968@163.com。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241114.1824.020（2024-11-18）

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一。根据对中国女性的调查，乳腺癌在女性癌症新增病例中排名第二[1]。根据2023圣加仑共识，在临床治疗中将癌症主要分为4种分子亚型，即Luminal A型、Luminal B型、HER-2过表达型和TNBC型[2]。不同亚型的癌症在危险因素、发病率、治疗敏感性和预后方面存在显著差异[3,8]。其中，Luminal A型和Luminal B型乳腺癌可以从内分泌治疗中受益更多，因为它们的雌激素受体是阳性的[9]，HER-2过表达型对靶向治疗更敏感[10-11]，而TNBC型缺乏明确的靶点[12-13]。目前，内分泌治疗是ER$^+$乳腺癌的主要药物治疗方法。

临床实践中常见的内分泌治疗药物包括激素受体拮抗剂、激素受体降解剂和芳香化酶抑制剂[14]。激素受体拮抗剂如他莫昔芬在ER$^+$乳腺癌患者内分泌治疗中的应用大大改善了患者的预后。然而，约40%接受他莫昔芬治疗的患者会产生获得性耐药[15-16]。获得性耐药的出现对临床患者的预后构成了巨大威胁。他莫昔芬耐药性仍然是ER$^+$乳腺癌的临床挑战。近年来，ER的变化被认为是他莫昔芬耐药性的重要机制[14]，但是调节ER途径的确切机制尚未完全明确。

免疫球蛋白结合蛋白1（immunoglobulin binding protein 1，IGBP1）参与抗原与特定B细胞受体的结合，主要是通过特异性结合蛋白磷酸酶2A（protein phosphatase 2A，PP2A），并调节PP2A的催化活性[17]。据文献报道，IGBP1通过PP2A途径激活细胞周期并抑制细胞凋亡[18]。IGBP1的高表达与食管鳞状细胞癌[19]和肺腺癌等疾病的预后不良有关[20-22]。来源于该基因的LncRNA IGBP1-AS1的过表达在体内外对乳腺癌细胞的侵袭和增殖具有抑制作用[23]。这表明IGBP1在癌细胞中可能起癌症启动子的作用。通过这项研究，本课题组表明靶向IGBP1可以改善ER$^+$乳腺癌的耐药性，表明IGBP1可能是ER$^+$乳腺癌的潜在治疗靶点之一。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人ER$^+$乳腺癌细胞（MCF-7和T47D）和三阴性乳腺癌细胞（BT-549和MDA-MB-231）在培养箱中以5% CO_2和37 ℃维持在补充有丙酮酸盐的高葡萄糖DMEM（Gibco，Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA，USA）、10%胎牛血清（FBS）（ExCell Bio）和1%青霉素/链霉素（Thermo Fisher Scientific，Walterham，MA，US）中。

1.2 RNA分离、逆转录反应和定量实时PCR

使用总RNA提取试剂盒（Tiangen，Beijing，China）从培养的细胞中提取总RNA，然后用4×RT混合物（MedChemExpress，Shanghai，China）进行逆转录。定量RT-PCR在10 μL PCR混合物中使用SYBR Premix Ex Taq™ Ⅱ（MedChemExpress）在Bio-Rad CFX96实时PCR系统（Bio-Rad Laboratories，Inc，Hercules，CA，USA）上进行。热循环条件包括在95 ℃下进行2 min的初始循环，然后在95 ℃、58 ℃和72 ℃下分别进行39个循环30 s、30 s和20 s。每组进行3次独立的实验。将相对基因表达以GAPDH标化，并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法进行评估。

1.3 蛋白质印迹分析

使用了以下抗体：抗IGBP1（IGBP1多克隆抗体）（Proteintech，14952-1-AP）、抗GAPDH（Proteinteech，60004-1-Ig）、抗CCND1（Proteintetech，60186-1-Ig），抗P21（Proteintench，10355-1-AP）和抗ER（Proteinteght，21244-1-AP）。用预冷PBS（4 ℃）洗涤2次后，在冰上获取细胞。使用含有蛋白酶抑制剂（Beyotime，Shanghai，China）和磷酸酶抑制剂（Beyotime，Shanghai，China）的RIPA裂解缓冲液（Beyotime，Shanghai，China）制备蛋白质裂解液，并使用BCA检测试剂盒（Beyotome，Shanghai，China）测定蛋白质浓度。通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS‐PAGE）（Bio-Rad Laboratories，Inc.）分离每组提取的蛋白质（20 μg/10 μL/泳道）。在室温下用快速阻断缓冲液（New Cell & Molecular Biotech，Suzhou，China）阻断10 min后，将膜与特异性一抗（稀释度1∶1 000）在4 ℃下孵育过夜。随后，用含吐温-20的Tris缓冲盐水（TBST）洗涤3次后，在室温下将膜用二抗（稀释率1∶1 000）处理60 min。使用增强的化学发光底物（Bio-Rad Laboratories，Inc.）通过化学发光观察蛋白质条带，并使用化学成像系统检测免疫反应条带。GAPDH被用作对照。

1.4 慢病毒感染过表达和杂合敲除质粒及shRNA的构建

IGBP1的正向引物为5′-GGACGAAGTAGAGTGGC-3′，反向引物为5′-AGGTCGGTGGAAGCA-3′。根据制造商的指南，按照标准方案，使用Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA，USA）进行质粒DNA转染。由于是杂合敲除，其与敲减组在后面的功能表型和蛋白质水平验证中显示出相似的结果。

1.5 患者和样本

从重庆医科大学附属第一医院接受治疗的乳腺癌患者身上获得配对的乳腺临床人体标本，包括癌组织和癌旁组织。这些患者通过病理活检被诊断为浸润性乳腺癌，并在同一医院接受了手术。根据重庆医科大学临床诊断病理中心进行的免疫组织化学结果，确定患者的ER和孕激素受体（PR）状态。研究方案经重庆医科大学伦理委员会审查和批准，所有参与的患者均提供了参与研究的知情同意书。

1.6 IHC分析

收集的人体组织最初使用4%甲醛缓冲液固定。随后，将包埋的组织切成4 μm厚的切片。然后将这些组织切片在60 ℃下热孵育2 h以促进脱蜡，然后在115 ℃下高压灭菌

3 min 并在柠檬酸缓冲液（pH 6.0）中修复抗原。使用0.3%的H_2O_2溶液淬灭内源性过氧化物酶活性15 min。接下来，用正常山羊血清阻断溶液处理切片，使其非特异性结合45 min，然后在4 ℃下以1∶100的稀释度与特异性一抗一起孵育过夜。随后，将切片在室温下暴露于山羊抗兔二抗30 min。使用3,3′-二氨基联苯胺可视化蛋白质表达，并用Leica显微镜（Leica，Germany）捕获图像。

1.7 细胞增殖和药物敏感性试验

将细胞铺在96孔板上进行增殖试验，每孔约有3 000个细胞悬浮在100 μL中。使用细胞计数试剂盒-8（CCK-8）试剂（Beyotime，Shanghai，China）评估细胞存活率。在2 h的孵育期后，在450 nm处测量细胞的吸光度。在药物敏感性实验中，每孔放置5 000个细胞并孵育24 h。随后，用不同浓度（0、4、8、12、16、20 μmol/L）的4-羟基他莫昔芬（4-OHT）处理细胞72 h。使用与上述相同的方法测定细胞存活率。

1.8 5-乙炔基-2′-脱氧尿苷染色

根据制造商的方案，使用BeyoClick™ EdU细胞增殖试剂盒（C0075S，Beyotime，Shanghai，China）评估癌症乳腺细胞的增殖。最初，将2×10^5个细胞铺在12孔板上，孵育24 h。随后，将细胞在37 ℃下用EdU工作溶液（10 μmol/L）在黑暗中孵育2 h。之后，用PBS洗涤细胞3次，然后用4%多聚甲醛固定15 min。固定后，用0.1%的Triton X-100使细胞通透15 min，并用PBS洗涤3次。接下来，用DAPI（C0075S，Beyotime，Shanghai，China）染色5 min。使用荧光显微镜（Leica，Germany）捕获图像，其中在孵育时进行DNA复制的细胞显示红色荧光，而所有细胞核显示蓝色荧光（DAPI），将所得的两张图进行叠合显示红色荧光所占的比例，即增殖细胞数占总细胞数的比例（Merge）。

1.9 细胞周期测定和流式细胞术分析

吸取培养上清液后，用不含钙和镁离子的PBS洗涤细胞1次。2～5 min后停止胰酶消化。然后将样品转移到离心管中，以1 000 r/min的速度离心5 min。该过程重复1～2次，包括洗涤和离心步骤。用洗涤液将细胞浓度调节至1×10^6/mL。随后，将样品转移到BD FACS Verse流式细胞仪中进行检测。使用FlowJo软件对获得的数据进行分析。

1.10 集落形成试验

将ER^+乳腺癌细胞（MCF-7和T47D）接种到6孔板中。孵育2周后，用4%多聚甲醛固定细胞15 min。随后，在室温下用结晶紫染色20 min后观察。

1.11 生物信息学数据分析

选择TCGA数据库中的ESR1及其下游，以探讨它们在乳腺癌中与IGBP1的正负相关。对于基因集功能富集分析，本研究使用KEGG rest API获得最新的KEGG通路基因注释，作为背景将基因映射到背景集。CPTAC数据库包含基因组测序数据和蛋白质组数据。本研究使用CPTAC分析IGBP1在肿瘤和邻近组织中的丰度差异，并将P值临界值设置为0.05。Kaplan-Meier Plotter是一个常用的生存分析网站。进入网站癌症板块，检索IGBP1并设置参数，将其分为高表达组和低表达组，检查其表达水平对患者OS的影响，以P值和HR表示。

1.12 统计学方法

所有数据结果均表示为均数±标准差（$\bar{x}\pm s$），并使用GraphPad Prism 9（San Diego，CA，USA）进行统计分析和制图。使用单因素方差分析进行多组比较，2组之间的比较使用Student's t检验进行。所有实验均独立重复3次。检验水准α=0.05。

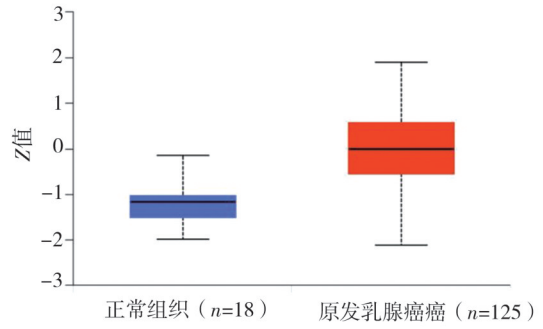
2 结 果

2.1 IGBP1在癌症中的表达明显上调，其高表达提示患者预后较差

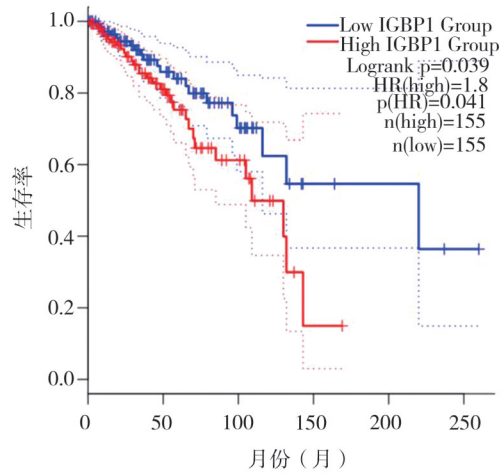
免费网站CPTAC整理了不同肿瘤样本中每个可检索基因编码蛋白的表达值，可以计算出IGBP1在乳腺癌及其相应正常组织中的表达水平。如图1A所示，可以看出IGBP1在乳腺癌中的表达高于正常组织。通过免费网站上的Kaplan-Meier Plotter生存分析，发现IGBP1的高表达表明患者的预后较差（图1B，P<0.05）。接下来，使用CPTAC数据库分析IGBP1在癌症四种亚型中的表达：Luminal A型、Luminal B型、HER-2过表达型和TNBC型。结果显示，其在前两种类型的乳腺癌中的表达显著高于正常组织和TNBC型（图1C）。在上述不同亚型的乳腺癌细胞系中，对所选蛋白质表达水平的验证也表明，IGBP1在ER^+乳腺癌细胞中表达增加，但在雌激素受体阴性（ER^-）乳腺癌细胞中表达减少（图1D，E，P<0.001）。上述结果表明，IGBP1的表达随ER状态的不同而不同，在ER^+乳腺癌中IGBP1表达增加，而编码ER-α蛋白的基因为ESR1，表明IGBP1与ESR1的表达呈正相关，提示IGBP1可能影响ER^+乳腺癌的发生和发展。同时，IHC染色结果的比较也证实了CPTAC中获得的结果。IGBP1在乳腺癌组织中的表达明显高于配对癌旁组织。图1F显示了选定的典型IHC染色图像。

2.2 IGBP1的过表达促进ER^+乳腺癌细胞的增殖

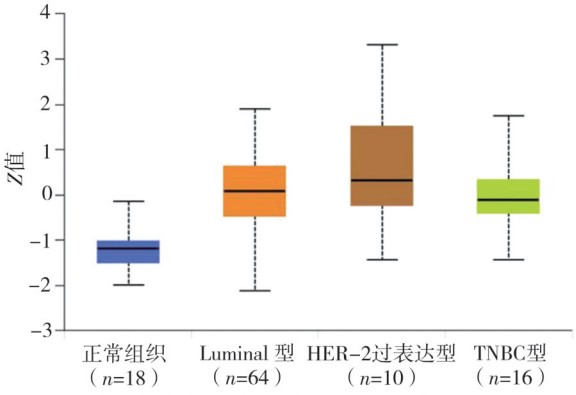
为了分析IGBP1在ER^+乳腺癌中的作用，本研究通过包装慢病毒构建了IGBP1过表达和杂合敲除质粒，并感染了两种ER^+乳腺癌细胞系细胞（MCF-7和T47D）。本研究使用WB验证了IGBP1的过表达和杂合敲除效率（图2A，P<0.05）。通过分析PRISM基因依赖性CRISPR Screen数据集，发现IGBP1可能促进细胞增殖（图2B）。接下来，使用CCK-8方法检测体外细胞增殖能力，结果如图2C和D所示。IGBP1过表达后，ER^+乳腺癌细胞的增殖能力显著提高（图2C），而IGBP1的敲低明显降低了ER^+乳腺癌细胞的增殖能力（图2D）。通过EdU实验检测IGBP1对ER^+乳腺癌细胞增殖的影响。结果显示，当IGBP1被杂合敲除时，细胞增殖明显减慢（图2E）。流式细胞术检测过表达和敲低IGBP1的细胞表明，IGBP1过表达加速了细胞周期，而敲除IGBP1导致细胞周期积聚在S期（图2F），表明DNA复制过程受阻。结果表明，IGBP1的过表达可影响体外培养的ER^+乳腺癌细胞的增殖和细胞周期。



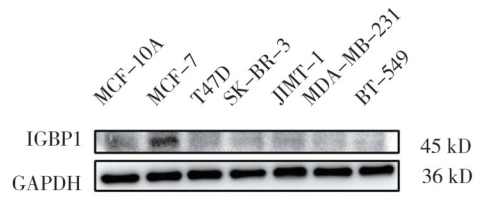
A. CPTAC计算IGBP1在乳腺癌中的蛋白质表达水平及其在正常组织中的相应表达水平



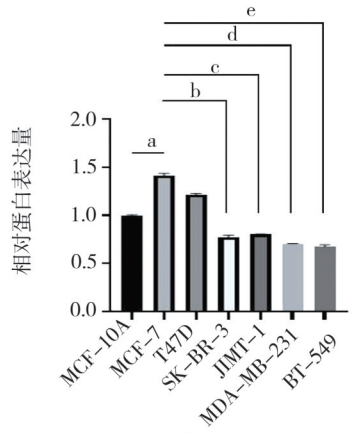
B. Kaplan–Meier Plotter提示IGBP1在乳腺癌中的高表达提示预后较差（$P<0.05$）



C. 正常组织和癌症4种亚型：Luminal A型及Luminal B型、HER–2过表达型和TNBC型中IGBP1蛋白表达的CPTAC数据库分析

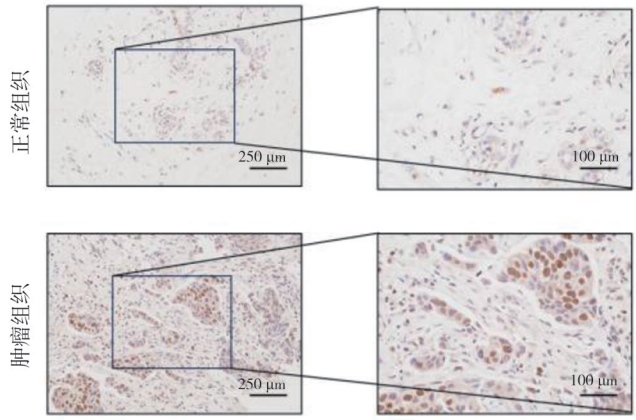


D. IGBP1蛋白在不同细胞系中的表达



注：a, 与MCF–10A比较, $P<0.001$；b, 与SK–BR–3比较, $P<0.001$; c,与JIMT–1比较, $P<0.001$; d, 与MDA–MB–231比较, $P<0.001$; e, 与BT–549比较, $P<0.001$

E. 条形图表示3次的代表性实验的（$\bar{x}\pm s$）

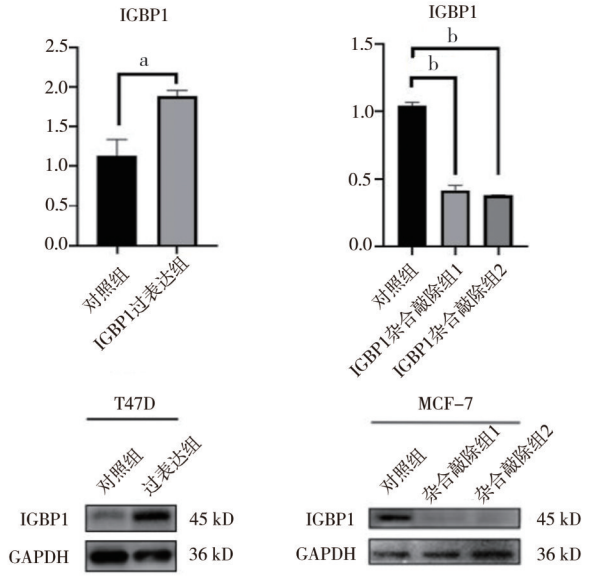


F. IHC染色显示，乳腺癌组织中IGBP1的表达明显高于配对的正常组织

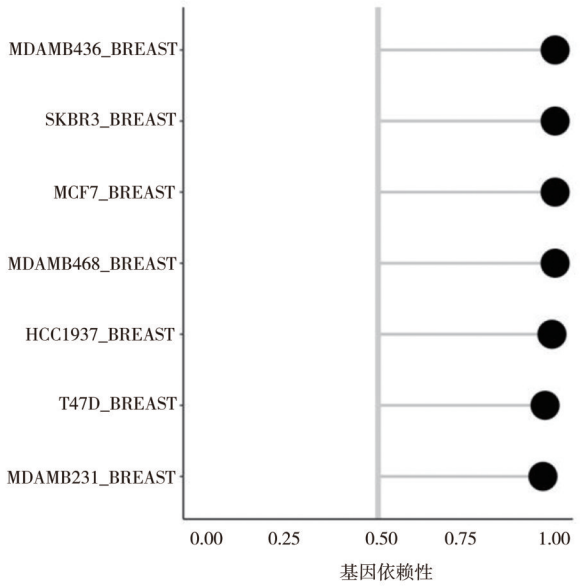
图1　IGBP1的表达与乳腺癌的肿瘤发生有关

2.3　敲低IGBP1增加ER⁺乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性

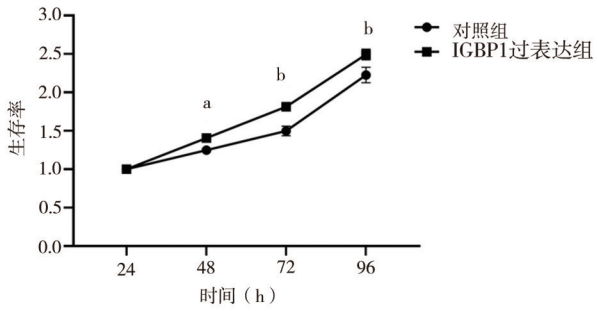
他莫昔芬的CRISPR筛选表明，IGBP1可能介导他莫昔芬耐药性（图3A）。对GEO数据集的进一步分析显示，他莫昔芬耐药后IGBP1表达上调。他莫昔芬耐药MCF–7（MCF–7–TAMR）细胞中IGBP1的表达明显高于亲本细胞（图3B）。蛋白质印迹分析显示，MCF–7–TAMR细胞中IGBP1的表达上调（图3C）。然后本课题组检查了IGBP1在他莫昔芬敏感性中的作用。本研究制备了过表达和敲低IGBP1的MCF–7和T47D细胞，并用不同剂量的4–OHT对其处理72 h后进行CCK–8检测，以检测细胞存活率并显示对4–OHT的耐药性。本研究发现，在用4–OHT处理的MCF–7细胞中，过表达IGBP1增加了细胞对4–OHT的耐药性及半数抑制浓度（IC_{50}）（图3D）。相反，降低T47D细胞中IGBP1的表达降低了它们对4–OHT的耐药性及IC50（图3E）。集落形成试验还表明，当细胞用2 μmol/L 4–OHT处理时，IGBP1过表达的MCF–7细胞的存活率更高（图3F）。基于这些发现，证明低IGBP1表达会增加ER⁺乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性。



A. 使用蛋白质印迹验证了IGBP1在T47D和MCF-7中的过表达和杂合敲除效率

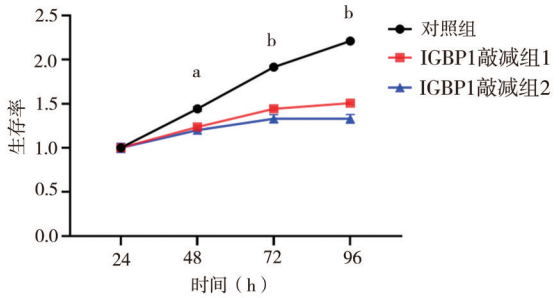


B. 通过分析PRISM基因依赖性CRISPR Screen数据集，发现IGBP1可能促进细胞增殖



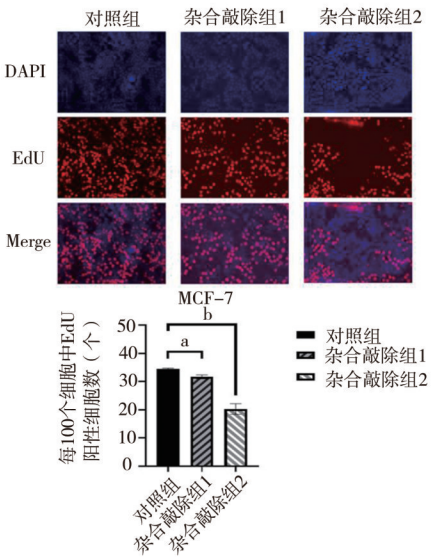
注：a, 与对照组比较, $P<0.01$；b,与对照组比较，$P<0.05$

C. 通过CCK-8检测IGBP1过表达对MCF-7细胞增殖的影响



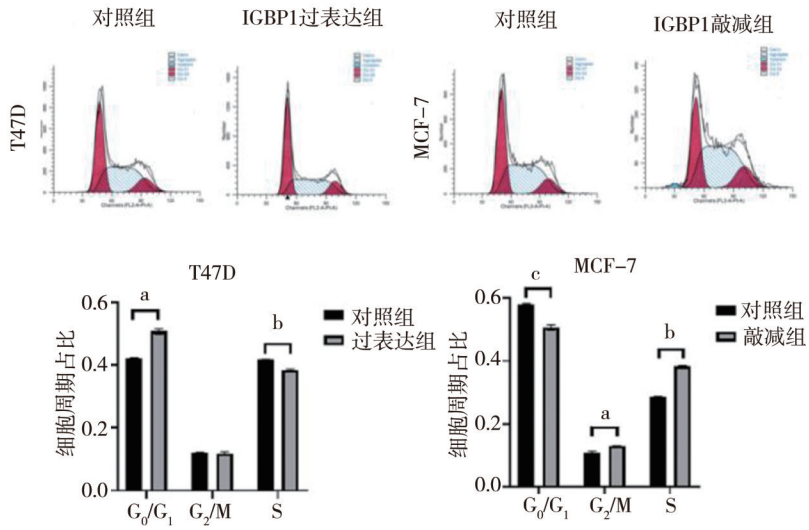
注：a, 与对照组比较, $P<0.001$；b, 与对照组比较, $P<0.001$

D. 通过CCK-8检测IGBP1敲低对MCF-7细胞增殖的影响



注：a, 与对照组比较, $P<0.05$；b,与对照组比较，$P<0.001$

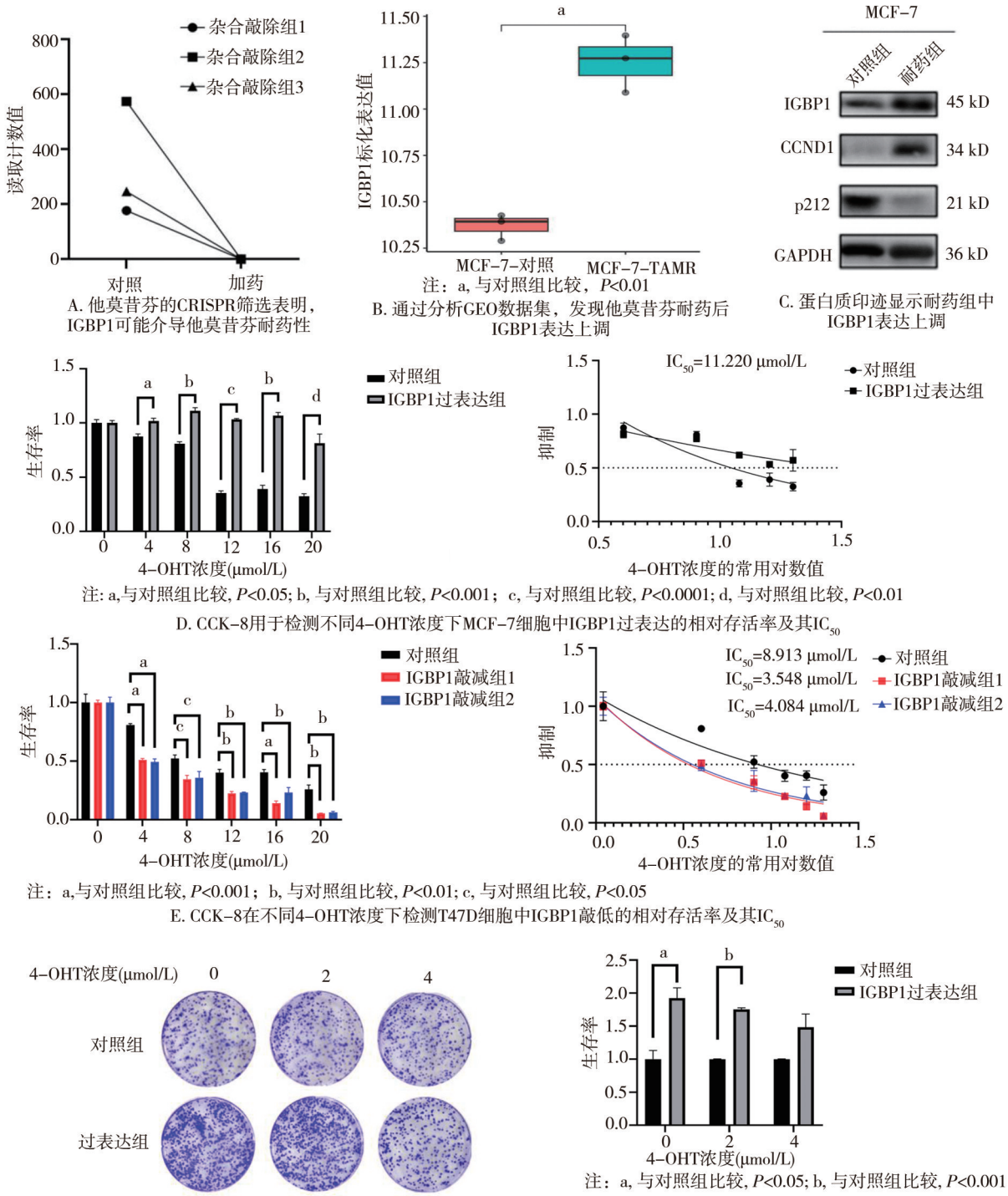
E. 通过EdU实验检测IGBP1对ER+乳腺癌细胞体外增殖能力的影响, 条形长度表示750 μm, 增殖细胞(红色)与总细胞核(蓝色)的比例图; GraphPad Prism 9用于创建数据统计条形图, 显示统计学差异



注：a,与对照组比较, $P<0.05$; b,与对照组比较, $P<0.001$; c, 与对照组比较, $P<0.01$

F. 使用流式细胞术检测过表达和敲低IGBP1的细胞从一次分裂完成到下一次分裂结束的整个分裂过程，并获得统计数据

图2　IGBP1的过表达促进ER⁺乳腺癌细胞的增殖



A. 他莫昔芬的CRISPR筛选表明，IGBP1可能介导他莫昔芬耐药性

B. 通过分析GEO数据集，发现他莫昔芬耐药后IGBP1表达上调

注：a, 与对照组比较，P<0.01

C. 蛋白质印迹显示耐药组中IGBP1表达上调

注: a,与对照组比较, P<0.05; b, 与对照组比较, P<0.001； c, 与对照组比较, P<0.0001; d, 与对照组比较, P<0.01

D. CCK-8用于检测不同4-OHT浓度下MCF-7细胞中IGBP1过表达的相对存活率及其IC_{50}

注：a,与对照组比较, P<0.001； b, 与对照组比较, P<0.01; c, 与对照组比较, P<0.05

E. CCK-8在不同4-OHT浓度下检测T47D细胞中IGBP1敲低的相对存活率及其IC_{50}

注：a, 与对照组比较, P<0.05; b, 与对照组比较, P<0.001

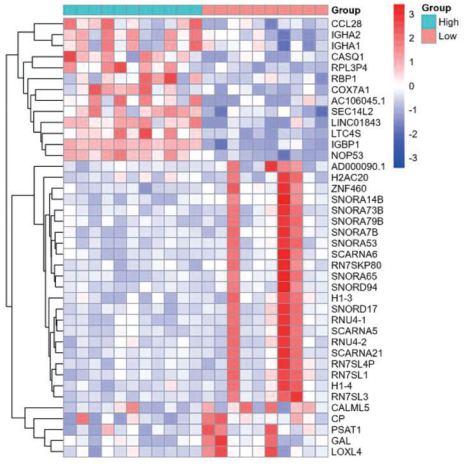
F. 采用集落形成试验检测细胞耐药性，并进行统计分析

图3　IGBP1的下调增加了ER⁺乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性

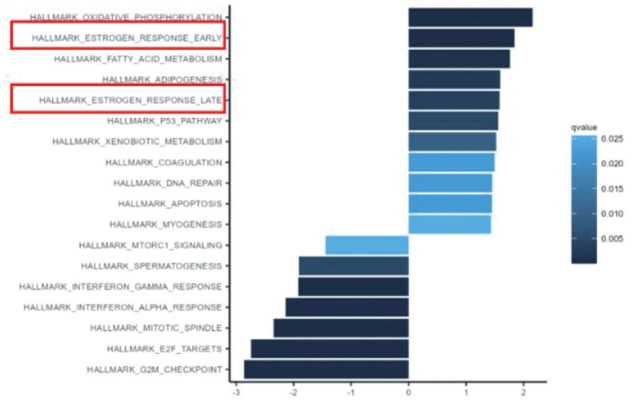
2.4　IGBP1相关基因的生物学功能分析

自从IGBP1在癌症中的功能得到证实以来，本课题组在不同的数据库中研究了与癌症相关的途径和分子功能。首先，本课题组在TCGA数据库中探索了与IGBP1呈正相关和负相关的基因（图4A）。对于基因集功能富集分析，使用KEGG rest API获得最新的KEGG通路基因注释，作为背景将基因映射到背景集。最小基因集大小设置为5，最大基因集大小设为5 000。P值小于0.01且FDR小于0.25被认为具有统计学意义。在阳性富集的GO图中，与氧化磷酸化、早期雌激素反应和脂肪酸代谢相关的基因以及与凋亡、p53信号通路和DNA修复相关的基因显著富集（图4B）。在阴性富集中，与G_2/M检查点、有丝分裂纺锤体、干扰素α/γ和MTORC1信号通路相关的基因富集，表明与IGBP1呈负相关（图4B）。同时，基因集功能富集分析显示ER相关途径显著正富集（图4C）。

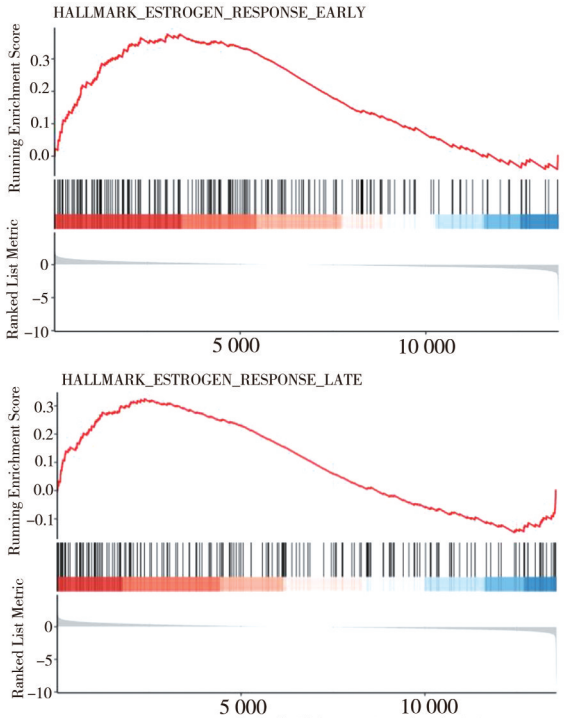
本研究在TCGA数据库中选择了ESR1及其下游CCND1，发现它们与IGBP1呈正相关（图4D）。为了验证上述结论，在蛋白质水平验证了IGBP1过表达和杂合敲除对ER和细胞周期相关分子的影响，这与上述公共数据库中获得的结果一致。IGBP1过表达后，ER和CCND1的表达上调，而p21的表达下调（图4E）。在IGBP1杂合敲除后，ER和CCND1的表达下调，而p21的表达上调（图4F）。这些结果表明，IGBP1通过ER信号通路介导其促癌作用。



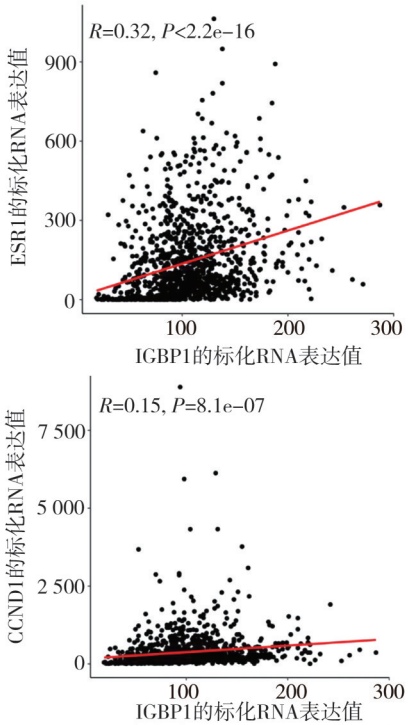
A. TCGA数据库中与IGBP1呈正相关和负相关的基因热图



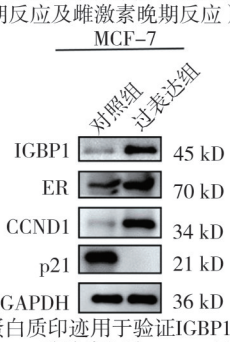
B. IGBP1正相关和负相关基因的KEGG图



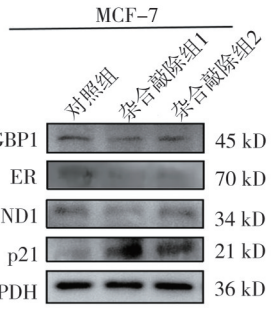
C. 基因集富集分析显示ER相关途径（雌激素早期反应及雌激素晚期反应）中存在显著的阳性富集



D. 从TCGA数据库中选择ESR1及其下游CCND1，发现其与癌症中的IGBP1呈正相关



E. 蛋白质印迹用于验证IGBP1过表达对ER+乳腺癌细胞MCF−7的影响



F. 用蛋白质印迹验证了IGBP1杂合敲除对ER+乳腺癌细胞MCF−7的影响

图4　探讨IGBP1促进癌症的机制

3 讨 论

乳腺癌仍然是全世界女性发病率和死亡率较高的疾病之一，这突出表明迫切需要深入了解其发展和新的治疗方法。癌症的进展，甚至因他莫昔芬耐药性而死亡，已成为威胁 ER⁺乳腺癌患者生存率的主要问题[24]。在他莫昔芬治疗期间导致他莫昔芬耐药性的确切机制尚不清楚。近年来，大量证据表明，ER 的改变被认为是他莫昔芬耐药性的重要机制[14]。

本研究首次检测了 IGBP1 在癌症中的表达水平及其在内分泌治疗中的作用。IGBP1 参与抗原与特定 B 细胞受体的结合，主要是通过特异性结合 PP2A 并参与调节 PP2A 的催化活性[17]。文献报道 IGBP1 通过 PP2A 途径激活细胞周期并抑制凋亡[18]。先前的研究表明，IGBP1 的高表达与各种疾病的预后不良有关，包括食管鳞状细胞癌[19]、肺腺癌[20-22]、狼疮肾炎[25]和胼胝体发育不全等[26-29]。LncRNA-IGBP1-AS1 可通过下调 IGBP1 降低乳腺癌的增殖和侵袭能力[23]，提示 IGBP1 可促进癌症的发生和发展。本研究发现 IGBP1 在乳腺癌组织和细胞中的蛋白表达升高，其过表达促进了 ER⁺乳腺癌细胞的增殖。

此外，本研究还探讨了 IGBP1 对最常见的内分泌疗法他莫昔芬耐药性的影响。本课题组观察到，在 ER⁺乳腺癌中，IGBP1 的过表达显著增加了他莫昔芬的耐药性，而 IGBP1 敲低显著降低了 ER⁺乳腺癌细胞对他莫昔芬的耐药性。这表明 IGBP1 可能是干预 ER⁺乳腺癌他莫昔芬耐药性的潜在靶点。在敲低或杂合敲除 IGBP1 后，ER⁺乳腺癌对他莫昔芬的耐药性可能有一定的改善，这表明 IGBP1 可能是 ER⁺乳腺癌的潜在治疗靶点。本研究还发现 IGBP1 表达与 ER 表达相关，IGBP1 的表达与 ESR1 表达呈正相关。这将是未来调查的重点。例如，对 AI 的耐药性通常源于 ESR1 基因突变。本课题组将进一步深入探索相关通路分子。

总之，来自公共数据库、临床乳腺癌患者的肿瘤标本和体外细胞学实验的数据表明，IGBP1 在乳腺癌中高度表达，且在 ER⁺乳腺癌中表达更高。IGBP1 的过表达和敲低影响 ER⁺乳腺癌细胞系的增殖、细胞周期和他莫昔芬耐药性，表明 IGBP1 可能改善 ER⁺乳腺癌治疗中的耐药性问题。这意味着 IGBP1 可能作为 ER⁺乳腺癌的潜在治疗靶点。此外，本课题组发现 IGBP1 可能通过 ER 信号通路介导上述致癌作用。未来，IGBP1 在 ER 信号通路上的具体激活机制可能会被探索。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Curigliano G, Burstein HJ, Gnant M, et al. Understanding breast cancer complexity to improve patient outcomes: the St Gallen International Consensus Conference for the Primary Therapy of Individuals with Early Breast Cancer 2023[J]. Ann Oncol, 2023, 34(11): 970-986.

[3] Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797): 747-752.

[4] Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer[J]. Mol Oncol, 2011, 5(1): 5-23.

[5] Prat A, Parker JS, Fan C, et al. PAM50 assay and the three-gene model for identifying the major and clinically relevant molecular subtypes of breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 135(1): 301-306.

[6] Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(5): R68.

[7] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2012, 490(7418): 61-70.

[8] Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer[J]. Cell, 2015, 163(2): 506-519.

[9] Hugh J, Hanson J, Cheang MC, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(8): 1168-1176.

[10] Vaz-Luis I, Ottesen RA, Hughes ME, et al. Impact of hormone receptor status on patterns of recurrence and clinical outcomes among patients with human epidermal growth factor-2-positive breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network: a prospective cohort study [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(5): R129.

[11] Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data

from NCCTG N9831 and NSABP B-31[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(25): 3366-3373.

[12] Cortazar P, Zhang LJ, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis[J]. Lancet, 2014, 384(9938): 164-172.

[13] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2023, 41(10): 1809-1815.

[14] Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming endocrine resistance in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2020, 37(4): 496-513.

[15] Will M, Liang J, Metcalfe C, et al. Therapeutic resistance to anti-oestrogen therapy in breast cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(10): 673-685.

[16] Mishra A, Srivastava A, Pateriya A, et al. Metabolic reprograming confers tamoxifen resistance in breast cancer[J]. Chem Biol Interact, 2021, 347: 109602.

[17] Onda M, Inui S, Maeda K, et al. Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/*IGBP1* gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway[J]. Genomics, 1997, 46(3): 373-378.

[18] Kong M, Fox CJ, Mu J, et al. The PP2A-associated protein alpha4 is an essential inhibitor of apoptosis[J]. Science, 2004, 306(5696): 695-698.

[19] Jiang SC, Li DJ, Liang ZB, et al. High expression of IGBP1 correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Biol Markers, 2020, 35(1): 33-40.

[20] Li DP, Sakashita S, Morishita Y, et al. Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line[J]. Anticancer Res, 2011, 31(2): 529-534.

[21] Sato T, Shiba-Ishii A, Kim Y, et al. miR-3941: a novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2017, 108(3): 536-542.

[22] Sakashita S, Li DP, Nashima N, et al. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance[J]. Pathol Int, 2011, 61(3): 130-137.

[23] Chen DQ, Fan YF, Wan F. LncRNA IGBP1-AS1/miR-24-1/ZIC3 loop regulates the proliferation and invasion ability in breast cancer[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 153.

[24] Szostakowska M, Trębińska-Stryjewska A, Grzybowska EA, et al. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 173(3): 489-497.

[25] Kwon OC, Lee EJ, Oh JS, et al. Plasma immunoglobulin binding protein 1 as a predictor of development of lupus nephritis[J]. Lupus, 2020, 29(6): 547-553.

[26] Graham JM Jr, Wheeler P, Tackels-Horne D, et al. A new X-linked syndrome with agenesis of the corpus callosum, mental retardation, coloboma, micrognathia, and a mutation in the Alpha 4 gene at Xq13[J]. Am J Med Genet A, 2003, 123(1): 37-44.

[27] Liu M, Wang YH, Yang SJ, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis uncovers a large, novel duplication in Xq13.1 in a floppy infant syndrome patient[J]. Int J Dev Neurosci, 2019, 74: 56-60.

[28] Du HJ, Huang YZ, Zaghlula M, et al. The MID1 E3 ligase catalyzes the polyubiquitination of Alpha4 (α4), a regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A): novel insights into MID1-mediated regulation of PP2A[J]. J Biol Chem, 2013, 288(29): 21341-21350.

[29] Du HJ, Massiah MA. NMR studies of the C-terminus of alpha4 reveal possible mechanism of its interaction with MID1 and protein phosphatase 2A[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28877.

（责任编辑：周一青）