胸腺嘧啶合成酶调控乳腺癌细胞转移的作用及机制

朱梦迪, 史钱枫, 李玉东, 刘玉洁*

中山大学孙逸仙纪念医院乳腺肿瘤中心, 广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室, 广州 510120

* 联系人, E-mail: liuyujie554@163.com

收稿日期: 2020-01-19; 接受日期: 2020-03-04; 网络版发表日期: 2020-06-04

国家自然科学基金(批准号: 81672622)和广东省自然科学基金(批准号: 2019A1515010146)资助

摘要 胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthase, TYMS)是胸苷酸从头合成途径的关键酶, 对于DNA合成和修复非常必要. TYMS在多种肿瘤中表达上调与患者的不良预后相关. 许多研究证实, 高表达TYMS促进了肿瘤生长和化疗抵抗, 然而它对于乳腺肿瘤细胞转移的作用目前还存在争议. 本研究探讨了TYMS调控乳腺癌细胞转移的作用及机制. 通过对网上公开数据库的分析发现, 高表达TYMS与患者较短的无转移生存相关. 在体外细胞模型中, 敲低TYMS的表达可抑制乳腺癌细胞的增殖、转移及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程. RNA测序数据分析显示, HIF1 α -CXCL12-ACKR3通路分子、PLK1和SMAD5在TYMS敲低的MCF-7细胞中表达下调, 提示这些分子作为TYMS的下游效应分子介导了TYMS调控的细胞增殖、迁移和EMT.

关键词 胸腺嘧啶合成酶, 转移, 上皮间质转化, 乳腺癌

全球每年有约209万女性罹患乳腺癌, 约63万死于乳腺癌, 发病率居女性恶性肿瘤之首, 死亡率仅次于肺癌, 严重危害全世界女性的生命和健康^[1,2]. 近年来, 乳腺癌的治疗已经逐步趋向于个体化治疗及精准治疗, 并取得了较好的疗效, 但仍有部分病人最后会发生转移. 早期乳腺癌被认为是可治愈的疾病, 而转移后的乳腺癌即被认为是目前的治疗手段所不能治愈的疾病, 不仅是由于转移后的乳腺癌恶性程度更高, 也与转移后的乳腺癌耐药程度更高, 更难治疗有关^[3]. 乳腺癌转移是乳腺癌死亡的主要原因, 寻找调控肿瘤转移的靶点或者探索监测乳腺癌转移的标志物对于预测患者的预后及设计进一步治疗方案有重要意义.

胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthase, TYMS)是胸腺嘧啶核苷酸从头合成途径的限速酶, 在没有外源性胸腺嘧啶供应的条件下, TYMS所催化生成的胸腺嘧啶脱氧核苷酸(deoxythymidine-5-monophosphate, dTMP)是DNA生物合成原料的唯一来源. TYMS在大部分肿瘤(如宫颈癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌、肺癌和胃肠道肿瘤)中的表达较正常组织明显上调, 与肿瘤细胞活跃的增殖相关, 并在多项临床研究中预示着患者的不良预后^[4,5]. 嘧啶类似物5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是最早应用于临床的TYMS抑制剂, 能有效降低肿瘤细胞内dTMP的合成, 从而导致肿瘤DNA生成减少或损伤的DNA生成增加, 最终致使肿瘤细胞增

引用格式: 朱梦迪, 史钱枫, 李玉东, 等. 胸腺嘧啶合成酶调控乳腺癌细胞转移的作用及机制. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1103–1113
Zhu M D, Shi Q F, Li Y D, et al. The role of thymidylate synthase in regulating breast cancer migration (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1103–1113, doi: 10.1360/SSV-2020-0015

殖减缓, 细胞凋亡。然而, 原发的TYMS高表达或者化疗药物诱导的TYMS表达快速上调又成为肿瘤继发性化疗耐药的根源, TYMS表达成为预测5-FU等化疗药物敏感性的标志物^[6,7]。此外, 研究发现, 在NIH/3T3细胞中过表达TYMS后, 可以诱导细胞球囊形成能力和体内成瘤能力增加, 显示TYMS可以作为癌基因, 促进细胞表型的恶性转化^[8]。在三阴型乳腺癌和肝癌细胞中, TYMS还被证实作用于上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程, 以及干细胞特性和细胞去分化状态的维持^[9,10]。有学者认为, TYMS可作为结直肠癌中淋巴结转移的预测因子, 显示TYMS可能在调控肿瘤转移中也发挥作用^[11]。

EMT在肿瘤转移的病理过程中占有重要地位。在此过程中上皮表型的肿瘤细胞获得间质细胞表型, 且肿瘤细胞侵袭、迁移能力及恶性程度增强^[12]。间充质细胞的相关研究表明, EMT在胚胎发育、纤维化、损伤修复、肿瘤转移等生理病理过程中起重要作用^[13]。虽然近年来有学者认为, EMT可能并不是所有肿瘤转移过程中的关键步骤^[14], 但大部分研究表明, EMT在乳腺癌的转移过程中仍担负重要角色^[15,16]。在胰腺癌中, TYMS被报道可通过影响EMT影响胰腺癌转移^[17], 在乳腺癌中有文献报道TYMS与EMT及乳腺癌细胞逆分化过程有关^[9,10]。然而在乳腺癌中, TYMS是否通过EMT影响肿瘤转移, 目前的研究还有相互矛盾之处, 需要进一步探索。

本课题组通过对Curtis等数据库分析发现, TYMS在乳腺癌中的高表达不仅与较短的总体生存(overall survival, OS)相关, 还与较低的远处无转移生存(distant metastatic-free survival, DMFS)有关。因此, 本文在不同转移能力的乳腺癌细胞株中探讨了TYMS与增殖、转移的关系, 并分析了可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231, MCF-7及SKBR3均购自ATCC(美国); DMEM培养基、0.25%胰酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、免疫荧光染色荧光二抗、Lipo3000等购自Thermo Fisher(美国); E-cadherin, Vimentin, GAPDH抗体为Cell Signaling Technology公司(美国)购入; Transwell小室及12孔板购自康宁生

物公司(武汉)。

蛋白电泳时一抗浓度为1:1000, 用5% BSA稀释; 免疫荧光染色时一抗稀释浓度为1:200, 5% BSA稀释。蛋白电泳二抗为抗鼠及抗兔二抗, 稀释浓度为1:3000。

1.2 细胞培养

人MDA-MB-231, MCF-7及SKBR3细胞株购于ATCC, 均由加入了10%胎牛血清的DMEM培养基(Life Technologies, 美国)培养。将细胞置于37℃含5% CO₂的培养箱中培养。

1.3 SiRNA敲低体系

TYMS siRNA(small interfering RNA)及阴性对照(negative control, NC)由上海吉玛制药技术公司设计及合成, 序列分别为: TYMS siRNA-1(sense: 5'-CCAA-CUGCAAAGAGUGAUUTT-3'; antisense: 5'-AAUCA-CUCUUUGCAGUUGGTT-3'); TYMS siRNA-2(sense: 5'-CCUGAAGCCAGGUGACUUUTT-3', antisense: 5'-AAAGUCACCUGGCUUCAGGTT-3'); NC(sense: 5'-GCGACGAUCUGCCUAAGAUTT-3', antisense: 5'-AUCUUAGGCAGAUUCGUCGCTT-3')。使用Lipo3000作为转染试剂, 根据说明书转染体系为每6孔板内加入5 μL siRNA及3.75 μL Lipo3000, 转染24 h后qPCR验证敲低效率及敲低后功能。实验独立重复3次。

1.4 免疫荧光染色

将贴壁细胞消化重悬后计数, 按每皿 1×10^5 个细胞种于共聚焦皿中, 尽量使细胞种得均匀分散, 24 h细胞贴壁后弃去培养基; 用PBS清洗细胞后用4%多聚甲醛固定15 min, 封闭后用500 μL 5% BSA封闭30 min; 使用相应的一抗(1:200)孵育1 h, PBST清洗两次, 荧光二抗避光, 室温孵育1 h, 再用PBST清洗后加入抗荧光淬灭剂保存。染色后在Confocal共聚焦显微镜下用40倍油镜观察并拍照记录染色情况。实验独立重复3次。

1.5 平板克隆

将贴壁细胞消化重悬后计数, 将细胞以1000个/孔种于6孔板中, 用3 mL DMEM完全培养基连续培养7天。培养结束后用PBS清洗细胞, 再用4%多聚甲醛固定15 min, 0.1%结晶紫染色10 min, 染色后PBS清洗, 使多余的浮色尽量被洗净, 孔板倒扣, 充分晾干, 在倒

置显微镜下观察结果并拍照记录. 实验独立重复3次.

1.6 细胞增殖实验

将贴壁细胞消化重悬后计数, 将细胞1000个/孔种于96孔板, 每孔100 μ L完全培养基, 连续培养4天, 分别在第0天、第1天、第2天、第3天、第4天用噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测相应组的细胞活力. 实验独立重复3次.

1.7 Transwell

使用Transwell小室检测肿瘤细胞转移. 乳腺肿瘤细胞分别转染TYMS的siRNAs和NC后培养48 h, 然后将贴壁细胞用胰酶消化后重悬, PBS冲洗细胞两次后用100 μ L无血清培养基重悬, 将 1×10^5 个细胞置于8 μ m transwell上室, 同时下室加入500 μ L含20%血清的DMEM培养基. 分别继续培养6 h(MDA-MB-231细胞)和8 h(MCF-7细胞)后将小室取出, 4%多聚甲醛固定15 min后0.01%结晶紫染色10 min, 小心擦去上室层细胞后用PBS将细胞碎片冲洗干净, 于200倍光学倒置显微镜下随机取10个视野观察并拍照记录上室下层穿过的细胞数量. 实验独立重复3次.

1.8 统计分析

对Curtis数据库中乳腺癌患者数据进行分析, 比较不同临床特征分组患者TYMS的表达差异. 对于符合正态分布及方差齐的数据使用*t*检验或方差分析, 不符合正态分布或方差不齐的数据使用秩和检验. 使用GraphPad Prism 6.0软件Kaplan-Meier生存分析计算Curtis, Bos, Schmidt, Symmans和VantVeer数据库(www.oncomine.org)中TYMS表达对乳腺癌患者的生存和无转移生存预后的影响. TYMS高表达和低表达组以中位数作为cut-off值. 测序数据用华大基因分析平台(<http://report.bgi.com>)进行分析. 体外实验组间比较采用*t*检验(两组)及ANOVA方差分析(3组及以上), 认为 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果使用GraphPad Prism进行绘图.

2 结果

2.1 TYMS在乳腺癌中高表达与患者不良预后相关

为了解TYMS表达与乳腺癌不同临床病理学特征

及预后的关系, 本课题组对Curtis乳腺癌数据库中1972例病例进行分析, 分别比较不同年龄、TNM分期、临床分期、病理分级、淋巴结浸润等级中TYMS表达量的差异. 统计学分析发现, 在有远处转移的患者中, TYMS表达较高. 此外, 在年龄较低(≤ 35 岁)、临床分期较晚、病理分级较高、有淋巴结转移及淋巴结浸润程度高的患者中, TYMS的表达较高(表1). 在肿瘤分期中, 随着分期的升高, TYMS表达量也相应升高, 其中第2期及第3/4期与第0/1期比较差异均具有统计学意义(P 值分别为0.001和0.011), 但第3/4期与第2期比较差异不具有统计学意义($P=0.413$). 在病理分级中, 也可见到分级越高, TYMS表达量越高, 且两两比较差异均具有统计学意义(P 值均小于0.0001). 同时, 本课题组对

表 1 Curtis数据库中TYMS表达与临床病理特征的相关性分析

Table 1 Correlation between the clinicopathologic features and expression of TYMS in Curtis database

	TYMS表达量	P 值
年龄(岁)		
≤ 35	3.099 $\pm$ 0.900	<0.0001 ^γ
>35	2.460 $\pm$ 0.872	
肿瘤大小(cm)		
≤ 5	2.467 $\pm$ 0.870	0.166 ^α
>5	2.593 $\pm$ 0.920	
N分期		
N0	2.402 $\pm$ 0.888	<0.0001 ^α
N1	2.552 $\pm$ 0.875	
M分期		
M0	2.478 $\pm$ 0.876	0.049 ^α
M1	2.914 $\pm$ 0.539	
肿瘤分期		
0/1期	2.405 $\pm$ 0.814	0.001 ^α
2期	2.569 $\pm$ 0.963	0.011 ^α
3/4期	2.623 $\pm$ 0.779	0.413 ^α
病理分级		
I级	1.818 $\pm$ 0.429	<0.0001 ^α
II级	2.236 $\pm$ 0.706	<0.0001 ^α
III级	2.808 $\pm$ 0.910	<0.0001 ^α
淋巴结病理浸润		
无/轻度	2.126 $\pm$ 0.682	0.001 ^β
中/重	2.542 $\pm$ 0.777	

α: 秩和检验; β: 方差分析; γ: *t*检验

TYMS表达与乳腺癌预后关系进行生存分析发现, TYMS高表达与乳腺癌患者较低的OS有关($P=0.001$) (图1A)。此外, 本课题组检测了Bos, Schmidt, Symmans和VantVeer数据库中TYMS表达与肿瘤转移的相关性, 发现高表达TYMS与较短的无转移生存有关(P 值分别为0.0054, 0.0357, 0.0350和0.0344)(图1B)。进一步进行了体外实验, 在不同类型的乳腺癌细胞中检测TYMS的表达, 结果显示, 在恶性程度最高、转移能力最强的间质表型的乳腺癌细胞株MDA-MB-231中TYMS表达量最高(图1C)。以上结果提示TYMS与乳腺癌的转移能力相关。

2.2 敲低TYMS可抑制乳腺癌细胞的增殖及转移能力

由于TYMS的主要作用在于为DNA合成提供dTMP原料, 本课题组首先检测了TYMS在乳腺癌细胞增殖中的作用。用两条siRNA在MDA-MB-231及MCF-7中瞬时敲低TYMS的表达, qPCR及Western Blot都显示在siRNAs处理组, TYMS mRNA和蛋白的表达较MOCK组和NC组显著降低(图2A和B)。进一步检测敲低TYMS表达后细胞的增殖能力发现, 降低TYMS水平

后, MTT测试显示的细胞增殖曲线斜率明显下降(图2C), 在MDA-MB-231及MCF-7中敲低组与NC组比较差异均有统计学意义(P 值均小于0.0001)。在平板克隆实验中也显示了同样的趋势, 敲低TYMS后种板连续培养7天, 可见TYMS siRNAs处理组细胞克隆形成明显减少(图2D和E)。MTT及平板克隆实验结果表明, 降低乳腺癌细胞中TYMS的表达, 可明显抑制乳腺癌细胞的增殖能力。

既往有临床研究显示, TYMS的表达也与肿瘤的淋巴结转移相关, 而在乳腺癌中TYMS在转移中的作用还不明确。因此, 本课题组进一步使用Transwell小室评估敲低TYMS后细胞的迁移能力, 结果发现, 与MOCK对照及NC组相比, 敲低TYMS组细胞在同等时间内穿过Transwell小室的细胞数量明显减少, 说明应用TYMS siRNAs后, MDA-MB-231及MCF-7细胞的迁移能力均明显下降, 表明敲低TYMS可抑制乳腺癌细胞的迁移能力(图3A和B)。

2.3 TYMS通过EMT影响乳腺癌细胞株转移

EMT过程伴随着细胞的形态学改变, 表现为细胞-细胞间的黏附降低, 而细胞的运动能力增强, 这一过程

图1 TYMS与乳腺癌的预后关系分析及其在乳腺癌细胞株中的表达。A: 对Curtis数据库进行分析, TYMS的高表达与乳腺癌患者的较短OS相关; B: 对Bos, Schmidt, Symmans和VantVeer数据库进行分析, TYMS高表达与乳腺癌患者的较低无转移生存相关; C: qPCR检测TYMS在乳腺癌不同细胞株中的表达

Figure 1 Relative TYMS expression in breast cancer cell lines and its relationship with patients' prognosis. A: High expression of TYMS is correlated with shorter OS of breast cancer patients based on the analysis of Curtis database; B: high TYMS expression level is associated with shorter metastatic survival time in breast cancer patients based on the analysis of Bos, Schmidt, Symmans and VantVeer databases; C: the expression of TYMS in different breast cancer cell lines is detected by qPCR

图 2 降低TYMS的表达抑制乳腺癌细胞增殖. A: 在MDA-MB-231细胞中, 用两条siRNA序列可以敲低TYMS的mRNA和蛋白表达; B: 在MCF-7细胞中, 应用两条siRNA序列可以敲低TYMS的mRNA和蛋白表达; C: MTT实验显示, 使用siRNAs降低TYMS表达, 细胞增殖速度显著减慢; D和E: 敲低TYMS后, 乳腺肿瘤细胞MDA-MB-231和MCF-7的克隆形成能力降低. A~C中结果显示为means±SD($n=3$), 与MOCK组比较, ***: $P<0.001$

Figure 2 Reduced TYMS inhibits the proliferation of breast cancer cells. A: The knockdown efficiency of two specific siRNAs against TYMS is examined by qPCR and Western Blot in MDA-MB-231 cells; B: the knockdown efficiency of two specific siRNAs against TYMS is examined by qPCR and Western Blot in MCF-7 cells; C: MTT experiments showed silencing TYMS slows down breast cancer cell proliferation; D and E: knockdown of TYMS decreases clonal formation ability of breast tumor cells MDA-MB-231 and MCF-7. In A~C, data shows means±SD ($n=3$) and compared with MOCK, ***: $P<0.001$

在肿瘤进展及转移中发挥重要作用. 在研究中本课题组发现, 敲低TYMS可抑制乳腺癌细胞的迁移能力, 并进一步推测, TYMS是否通过促进乳腺癌细胞的EMT从而影响乳腺癌细胞的转移. E-cadherin及Vimentin^[18]为EMT过程中发生改变的重要分子. 因此, 本课题组在敲低TYMS后检测E-cadherin及Vimentin的表达变化. Western blot结果显示, 敲低TYMS后, MDA-MB-231及MCF-7细胞中E-cadherin蛋白表达量上升, Vimentin表达量下降(图4A和B). 同时, 本课题组也用免疫荧光染

色的方法检测了这两个分子的表达, 结果发现, 在MDA-MB-231中, 由于E-cadherin基础表达量较低, 其表达量在敲低TYMS组和对照组间变化不明显, 但Vimentin的荧光强度在敲低TYMS后出现明显下调. 在MCF-7细胞中, E-cadherin荧光强度在敲低TYMS后出现明显上调, 但由于Vimentin基础表达量较低, 其荧光强度在TYMS敲低组和对照组间变化不显著(图4C和D). 以上实验结果表明, 敲低TYMS后, 乳腺癌细胞向上皮表型转化, 间质细胞的特征减弱. 本课题组推测,

图3 降低TYMS表达抑制乳腺癌细胞迁移。A: Transwell实验显示, 敲低TYMS后MDA-MB-231细胞的转移能力较MOCK组和NC组显著降低, 左侧为代表性图片, 右侧为统计图; B: Transwell实验显示, 敲低TYMS后MCF-7细胞的转移能力较MOCK组和NC组显著降低, 左侧为代表性图片, 右侧为统计图。统计图表示为means±SD($n=3$), 与MOCK组比较, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

Figure 3 Decreased TYMS inhibits breast cancer cell migration. A: Transwell experiment shows that the transfer ability of MDA-MB-231 cells after knocking down TYMS is significantly reduced compared to MOCK group and The NC group. The left side is the representative picture, and the right side is the statistical picture. B: Transwell experiment shows that the transfer ability of MCF-7 cells after knocking down TYMS is significantly reduced compared to MOCK group and The NC group. The left side is the representative picture, and the right side is the statistical picture. Data shows means±SD ($n=3$) and compared with MOCK group, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$

TYMS在乳腺癌中可能通过作用于EMT相关过程影响乳腺癌细胞的迁移及转移。

2.4 敲低TYMS后乳腺癌细胞中细胞增殖及炎症相关通路发生改变

为了探索TYMS影响EMT及乳腺癌细胞转移的可能机制, 本课题组在MCF-7细胞株中敲低TYMS后进行转录组测序, 并对敲低TYMS后测序结果进行差异分析(图5A)和KEGG基因富集分析(图5B)。分析结果以气泡图显示, 气泡大小代表富集基因数量, 气泡颜色深浅代表P值大小, P值越小颜色越深, 横轴代表相关度, 值越小代表相关度越高。在KEGG富集结果中筛选 $P<0.05$ 且两个siRNA敲低后富集一致的通路, 发现细胞因子-细胞因子受体相关信号通路在敲低TYMS后改变最显著。分析信号通路中的关键分子发现, HIF1 α -CXCL12-ACKR3(CXCR7)炎症信号通路在敲低TYMS后显著下

调(图5C)。既往研究报道这条炎症信号通路在乳腺癌、神经系统肿瘤、头颈部肿瘤中都发挥促进肿瘤转移的作用。因此, 本课题组推测, 敲低TYMS后降低的HIF1 α -CXCL12-ACKR3(CXCR7)通路是降低肿瘤转移能力的原因。此外, PLK1在敲低TYMS的细胞中的表达下调至NC组的36%, SMAD5下调至NC组的43%, 而两者分别是公认的调控细胞增殖和EMT过程的关键分子。由此推测, TYMS通过调控这些信号分子的表达发挥促进细胞增殖、EMT和转移的功能。

3 讨论

肿瘤的核苷酸代谢异常旺盛, 为肿瘤的快速增殖提供原料, TYMS是核苷酸代谢过程中的关键酶, 它的表达异常直接影响肿瘤的生长和对化疗药物特别是氟尿嘧啶类核苷类似物的敏感性。近年来, 有研究证明二

图 4 降低TYMS表达调控细胞的EMT过程. A和B: 在MDA-MB-231(A)及MCF-7(B)细胞株中敲低TYMS后, Western blot实验检测E-cadherin及Vimentin蛋白表达量; C和D: 在MDA-MB-231(C)及MCF-7(D)细胞中敲低TYMS表达后, 免疫荧光染色检测E-cadherin及Vimentin荧光表达情况

Figure 4 Decreased TYMS blocks breast cancer cell EMT. A and B: The levels of E-cadherin and Vimentin protein in MDA-MB-231 cells (A) and MCF-7 cells (B), examined by Western Blot; C and D: the levels of E-cadherin and Vimentin protein in MDA-MB-231 cells (C) and MCF-7 cells (D), examined by immunofluorescence staining

氢嘧啶脱氢酶DPYD在肿瘤转移及EMT过程中起决定性作用^[19], 表明DNA代谢相关过程可能参与肿瘤转移. 同时, 学者在一项泛癌研究中发现, TYMS在侵袭性高

的肿瘤细胞株中表达较高, 且其在乳腺癌中与乳腺癌的EMT及分化过程有关^[10]. 但TYMS在乳腺癌中对转移的作用还不明确, 具体机制仍有待继续深入研究,

图 5 敲低*TYMS*后差异基因富集分析. 在MCF-7细胞株中敲低*TYMS*后行转录组测序, A: 差异基因表达热图; B: *TYMS* siRNA组与NC相比差异基因KEGG富集气泡图; C: 调控细胞增殖、EMT及转移的信号分子在芯片中的表达变化

Figure 5 Enrichment analysis of differentially expressed genes after *TYMS* knockdown. A: Heat map of differential gene expression; B: bubble plot of the top 20 enrichment of KEGG pathways in *TYMS* siRNA group and NC group; C: the expression changes of signal molecules associated with cell proliferation, EMT and metastasis

并且*TYMS*在临床中对转移的预测应用价值也尚未被阐明. 因此, 本文着重探讨了*TYMS*对乳腺癌转移的作用和机制.

首先, 本课题组通过对Curtis数据库分析发现, *TYMS*在乳腺癌中高表达, 且在间质表型及转移能力强的细胞株中表达量更高. 对临床特征进一步分析发现, *TYMS*在乳腺癌中与远处转移、较晚的临床分期、较高的病理分级、淋巴结转移及淋巴结浸润程度等不良临床特征相关. 高表达*TYMS*预示着较短的整体生存率和较低的无转移生存率, 提示*TYMS*除了与肿瘤生长相关, 可能还调控了肿瘤的转移. 课题组选择高转移的MDA-MB-231细胞和低转移的MCF-7细胞进行体外实验, 发现敲低*TYMS*的表达确实可以降低两种细胞的增殖和Transwell小室的细胞迁移. 随后, 进一步探讨*TYMS*调控肿瘤转移的机制, 发现敲低*TYMS*影响了细胞的EMT过程, 提示*TYMS*可能通过调控乳腺肿瘤细胞的EMT过程影响细胞转移. 本课题组对敲低*TYMS*后的MCF-7细胞表达谱变化进行了分析, 发现细胞因子-细胞因子相关分子在敲低*TYMS*后变化最显著, 其中*HIF1α*-*CXCL12*-*ACKR3*(*CXCR7*)炎症信号通路在敲低*TYMS*后显著下调, 提示这条通路可能在调控*TYMS*介导的转移中发挥作用.

*CXCL12*是CXC趋化因子家族成员, 属于稳态趋化因子. 它在许多生理过程, 如胚胎发育、造血和血管生成等方面发挥作用^[20]. 相比这些生理功能, *CXCL12*或其受体*CXCR4*和*ACKR3*表达上调会导致

疾病包括肿瘤的发生和进展. *CXCR4*和*ACKR3*(*CXCR7*)都是*CXCL12*的受体, 它们可以表达在同一个细胞, 也可以表达在不同类型的细胞上^[21]. 在本实验的表达谱测序结果中, *CXCR4*在*TYMS* siRNA处理组的变化较NC组不明显, 而*ACKR3*则在*TYMS* siRNA组显著降低, 因此, 本课题组认为, 本实验的细胞模型中主要是*CXCL12*-*ACKR3*受体-配体复合物发挥作用. *CXCL12*作用于*ACKR3*可以促进VEGF的生成, 从而促进肿瘤的生长. 在移植瘤模型中敲低*ACKR3*的表达可显著降低肿瘤的体积^[22,23]. 此外, *ACKR3*也可以抑制胶质瘤细胞的凋亡^[24]. 在本研究中敲低*TYMS*的表达, 乳腺肿瘤细胞株生长减缓, 也可能是下调的*CXCL12*-*ACKR3*信号发挥的作用. *CXCL12*-*ACKR3*也在多种肿瘤中发挥调控转移的作用, 然而其作用在不同的模型中不一致. 有研究显示, *ACKR3*不参与调控非小细胞肺癌的转移^[25], 甚至在乳腺癌还降低细胞的迁移^[26]. 然而在头颈部肿瘤中, *ACKR3*通过激活EMT过程促进肿瘤的转移^[23]. 在前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌和其他的乳腺癌研究中, *CXCL12*通过激活*ACKR3*促进肿瘤的侵袭和迁移^[24,27-29]. 在本研究中, 乳腺肿瘤细胞自身分泌*CXCL12*, 通过自分泌的方式作用于*ACKR3*受体, 激活炎症信号通路促进肿瘤细胞的增殖和转移. 同时肿瘤细胞上的*ACKR3*受体也可以接受来自微环境的信号, 例如巨噬细胞转移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)也是*ACKR3*的配体, 可以激活*ACKR3*影响前列腺癌细胞

的增殖和迁移^[30]。因此, CXCL12-ACKR3轴作用于肿瘤微环境与肿瘤细胞相互作用的界面, 在肿瘤进展中发挥重要作用, 也是本研究中TYMS影响乳腺癌细胞增殖和迁移的重要调控通路, 可作为肿瘤治疗的靶点。此外, 无论是CXCL12还是ACKR3都受到HIF1 α 的转录调控, 从测序结果中可以发现, HIF1 α 的表达在TYMS敲低组也是下调的, HIF1 α -CXCL12-ACKR3整条信号通路都与TYMS的表达密切相关。因此, 本课题组推测该通路介导了TYMS的作用。

从本研究的测序结果还可以发现, PLK1的表达在TYMS敲低组下调。PLK1是有丝分裂过程的关键调控激酶, 抑制PLK1活性导致多种肿瘤细胞的有丝分裂灾难和细胞凋亡^[31]。因此, 本课题组推测, TYMS对肿瘤细胞增殖的调控也可能通过PLK1通路。此外, 测序结果还显示, SMAD5在TYMS敲低组表达下调。近年来研究显示, TGF- β 除了通过激活SMAD2/3激活EMT过程外^[32,33], 也可以通过SMAD1/5的激活促进EMT进程^[34]。提示TYMS调控的EMT过程可能有SMAD5的参与。

乳腺癌的转移是临床上治疗乳腺癌工作中一个巨大的阻碍, 乳腺癌一旦发生转移, 在临床上即被认为是晚期不可治愈的疾病, 且发生转移后的患者会出现对多种治疗药物的耐药, 肿瘤恶性程度也会在一定程度上增加^[35]。目前, 临床工作中主要通过影像学检查监测乳腺癌患者有无转移, 近年来, 研究显示, 可通过检

测术后患者的循环肿瘤细胞或代谢组学监测患者的早期转移^[36,37], 但以上方法都只能在乳腺癌已发生转移或微转移时才能发挥作用。本课题组的研究显示, TYMS在具有较高病理分级、高间充质表型及高侵袭转移能力的乳腺癌中高表达, 且其高表达与不良预后和转移能力相关, 表明在早期穿刺时检测TYMS表达量可预测乳腺癌的转移能力。TYMS在肿瘤中高表达可作为一项临床上的高危因素被纳入患者临床评估中。此外, 本研究发现的CXCL12-ACKR3信号通路作用于微环境与肿瘤细胞相互作用界面, 介导了TYMS调控的肿瘤增殖和转移作用, 因此, CXCL12-ACKR3也是TYMS高表达乳腺癌的治疗靶点, 可以联合使用ACKR3抑制剂来增强化疗药物的治疗效果和减少化疗抵抗的发生。

本文的结果可为临床工作中筛选高转移风险的乳腺癌患者提供新的标志物和治疗靶点。本课题组将在后续的工作中进一步探讨CXCL12-ACKR3通路在TYMS调控的肿瘤生长和转移中的作用, 以及在微环境共培养模型中该通道接收微环境信号促进肿瘤进展的机制。此外, 本课题组还将开展前瞻性研究证实TYMS是否可作为预测乳腺癌转移能力和预后的指标, 筛选出高复发风险和预后较差的患者, 在乳腺癌早期进行更为有效和强化的治疗, 降低乳腺癌复发转移风险, 改善乳腺癌患者预后, 提高生存率。

参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394–424
- 2 DeSantis C E, Ma J, Gaudet M M, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69: 438–451
- 3 Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*, 2017, 389: 1134–1150
- 4 Zhao M, Tan B, Dai X, et al. DHFR/TYMS are positive regulators of glioma cell growth and modulate chemo-sensitivity to temozolomide. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863: 172665
- 5 Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, et al. Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2⁺ colon cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 5828–5836
- 6 Intuyod K, Saavedra-García P, Zona S, et al. FOXM1 modulates 5-fluorouracil sensitivity in cholangiocarcinoma through thymidylate synthase (TYMS): Implications of FOXM1-TYMS axis uncoupling in 5-FU resistance. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1185
- 7 Liu T, Han Y, Yu C, et al. MYC predetermines the sensitivity of gastrointestinal cancer to antifolate drugs through regulating TYMS transcription. *EBioMedicine*, 2019, 48: 289–300
- 8 Rahman L, Voeller D, Rahman M, et al. Thymidylate synthase as an oncogene. *Cancer Cell*, 2004, 5: 341–351
- 9 Siddiqui A, Gollavilli P N, Schwab A, et al. Thymidylate synthase maintains the de-differentiated state of triple negative breast cancers. *Cell Death Differ*, 2019, 26: 2223–2236

- 10 Siddiqui A, Vazakidou M E, Schwab A, et al. Thymidylate synthase is functionally associated with ZEB1 and contributes to the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. *J Pathol*, 2017, 242: 221–233
- 11 Lu Y, Zhuo C, Cui B, et al. TYMS serves as a prognostic indicator to predict the lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. *Clin Biochem*, 2013, 46: 1478–1483
- 12 Díaz V M, de Herreros A G. F-box proteins: Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check. *Semin Cancer Biol*, 2016, 36: 71–79
- 13 Ma Z, Xin Z, Hu W, et al. Forkhead box O proteins: Crucial regulators of cancer EMT. *Semin Cancer Biol*, 2018, 50: 21–31
- 14 Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 43: 7–13
- 15 Ye X, Brabletz T, Kang Y, et al. Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis. *Nature*, 2017, 547: E1–E3
- 16 Neelakantan D, Zhou H, Oliphant M U J, et al. EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells. *Nat Commun*, 2017, 8: 15773
- 17 Kang M, Zheng W, Chen Q, et al. Thymidylate synthase prompts metastatic progression through the dTMP associated EMT process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 2018, 419: 40–52
- 18 Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, 2019, 573: 439–444
- 19 Shaul Y D, Freinkman E, Comb W C, et al. Dihydropyrimidine accumulation is required for the epithelial-mesenchymal transition. *Cell*, 2014, 158: 1094–1109
- 20 Cheng H, Cheng T. Hematopoietic stem cell niches (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 1242–1252 [程辉, 程涛. 造血微环境研究进展与发展方向. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47: 1242–1252]
- 21 Janssens R, Struyf S, Proost P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 51–68
- 22 Zheng K, Li H Y, Su X L, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 31
- 23 Wang J, Shiozawa Y, Wang J, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*, 2008, 283: 4283–4294
- 24 Kim N, Ryu H, Kim S, et al. CXCR7 promotes migration and invasion in head and neck squamous cell carcinoma by upregulating TGF- β 1/Smad2/3 signaling. *Sci Rep*, 2019, 9: 18100
- 25 Choi Y H, Burdick M D, Strieter B A, et al. CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2014, 12: 38–47
- 26 Inaguma S, Riku M, Ito H, et al. GLI1 orchestrates CXCR4/CXCR7 signaling to enhance migration and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*, 2015, 6: 33648–33657
- 27 Saha A, Ahn S, Blando J, et al. Proinflammatory CXCL12-CXCR4/CXCR7 signaling axis drives Myc-induced prostate cancer in obese mice. *Cancer Res*, 2017, 77: 5158–5168
- 28 Guo J C, Li J, Zhou L, et al. CXCL12-CXCR7 axis contributes to the invasive phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 62006–62018
- 29 Ieranò C, Santagata S, Napolitano M, et al. CXCR4 and CXCR7 transduce through mTOR in human renal cancer cells. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1310
- 30 Rafiei S, Gui B, Wu J, et al. Targeting the MIF/CXCR7/AKT signaling pathway in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Res*, 2019, 17: 263–276
- 31 Christoph D C, Schuler M. Polo-like kinase 1 inhibitors in mono- and combination therapies: A new strategy for treating malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11: 1117–1132
- 32 Roberts A B, Tian F, Byfield S D C, et al. Smad3 is key to TGF- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17: 19–27
- 33 Yeh H W, Hsu E C, Lee S S, et al. PSpC1 mediates TGF- β 1 autocrine signalling and Smad2/3 target switching to promote EMT, stemness and metastasis. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 479–491
- 34 Ramachandran A, Vizán P, Das D, et al. TGF- β uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *eLife*, 2018, 7: e31756
- 35 Bottos A, Hynes N E. Cancer: Staying together on the road to metastasis. *Nature*, 2014, 514: 309–310
- 36 Tan B B, Xiang D, Jia M, et al. The current status and perspective of metabonomics in breast cancer biomarker research (in Chinese). *Sci Sin*

- Vitae, 2018, 48: 15–23 [谭斌斌, 向迪, 贾蒙, 等. 代谢组学在乳腺癌生物标志物研究中的现状及展望. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 15–23]
- 37 Lu Y X, Li C P, Zhao H. Advances in detection of nucleic acid tumor biomarkers via electrochemical biosensors (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 814–827 [卢宇勋, 李灿鹏, 赵卉. 基于电化学生物传感器的核酸肿瘤标志物检测研究进展. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 814–827]

The role of thymidylate synthase in regulating breast cancer migration

ZHU MengDi, SHI QianFeng, LI YuDong & LIU YuJie

Guangdong Provincial Key Laboratory of Malignant Tumour Epigenetics and Gene Regulation, Breast Tumor Center, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China

Thymidylate synthase (TYMS) is a fundamental enzyme of the sole *de novo* pathway for thymidylate production. It is essential for DNA synthesis and repair and is known as a target of chemotherapy. TYMS is greatly elevated in a diverse range of human cancers and associated with poor clinical outcomes. Accumulating evidence has proved that higher expression of TYMS contributed to tumor growth and chemoresistance. However, the consequences of elevated TYMS on breast cancer metastasis are still controversial. We find in the present study that higher TYMS in breast cancer is associated with shorter distant metastasis-free survival (DMFS) based on analysis of the publicly available online databases. The *in vitro* experiments show that knockdown of TYMS decreases proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells. RNA sequence analysis of the differentially expressed genes reveals that HIF1 α -CXCL12-ACKR3 signaling molecules, PLK1 and SMAD5, are downregulated in TYMS knockdown MCF-7 cells compared with that in control cells, indicating that these molecules serve as downstream effectors of TYMS and mediate TYMS-regulated cell proliferation, migration and EMT.

thymidylate synthase, migration, EMT, breast cancer

doi: [10.1360/SSV-2020-0015](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0015)