

VTCN1 导致 HR+乳腺癌预后不良及内分泌治疗耐药

宋雅雯, 郭联涛, 孔德光, 孙圣荣

(武汉大学人民医院乳腺甲状腺外科, 湖北 武汉 430060)

摘要: **目的** 探讨激素受体阳性(特别是 Luminal A 型)乳腺癌内分泌治疗耐药的相关机制, 以克服其临床治疗挑战并改善患者预后。 **方法** 本研究运用生物信息技术, 筛选出内分泌治疗敏感与耐药患者间差异表达的基因。通过泛癌分析、Kaplan-Meier 生存分析、蛋白质互作网络构建、肿瘤免疫浸润细胞相关性分析以及体外细胞实验, 推测验证目标基因发挥作用的可能机制。 **结果** VTCN1 能减弱他莫昔芬在 MCF7 和 T47D 细胞中的抗癌效果。该基因可能通过 Notch4、Slug、Sox2、LAG3、PD-L1 等调节因子改变肿瘤微环境, 尤其是肿瘤免疫微环境, 促进上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 并影响激素受体表达, 最终导致他莫昔芬耐药。 **结论** VTCN1 通过 EMT 相关因子调控肿瘤微环境, 进而导致激素受体阳性乳腺癌对内分泌治疗耐药。

关键词: 乳腺癌; VTCN1; 内分泌治疗耐药; 他莫昔芬; 肿瘤微环境; 激素受体; 上皮间质转化

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

VTCN1 causes poor prognosis and endocrine therapy resistance in HR+ breast cancer

SONG Yawen, GUO Liantao, KONG Deguang, SUN Shengrong

(Department of Breast and Thyroid Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms associated with endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive (particularly Luminal A subtype) breast cancer, for overcoming clinical treatment challenges and improving patient outcomes. **Methods** Bioinformatics techniques were used to identify differential expression genes between endocrine therapy-sensitive and drug-resistant patients. Through pan-cancer analysis, Kaplan-Meier survival analysis, protein interaction network construction, correlation analysis with tumor-infiltrating immune cells, and in vitro cell experiments, the potential mechanisms underlying the role of the target gene were speculated and validated. **Results** VTCN1 attenuated the anticancer effect of Tamoxifen in MCF7 and T47D cells. This gene might alter the tumor microenvironment, particularly the tumor immune microenvironment, through regulatory factors such as Notch4, Slug, Sox2, LAG3, and PD-L1, promote epithelial-mesenchymal transition (EMT) and affect hormone receptor expression, ultimately lead to Tamoxifen resistance. **Conclusion** VTCN1 regulates the tumor microenvironment through EMT-related factors, thereby contributing to endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer.

Key words: Breast cancer; VTCN1; Endocrine therapy resistance; Tamoxifen; Tumor microenvironment; Hormone receptor; Epithelial-mesenchymal transition

乳腺癌是全球女性中发病率最高的恶性肿瘤^[1]。据统计, 每四位女性癌症患者中就有一人罹患乳腺癌, 每六位因癌症死亡的女性中就有一人归

因于乳腺癌^[2]。近年来, 虽然乳腺癌发病率因筛查技术进步和体检意识增强而上升, 但死亡率自 1989 年峰值后已稳步下降, 这主要得益于早期诊断和针

对性治疗手段的进步,特别是内分泌治疗的发展^[3]。

乳房是一个雌激素敏感的器官,约70%的乳腺癌病例是雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性的^[4]。孕激素受体(progesterone receptor, PR)也是ER信号传导的重要标志^[5]。当样本组织中至少有1%的ER/PR阳性细胞核时,该肿瘤被归类为激素受体阳性乳腺癌(hormone receptor-positive breast cancer, HR+ BC)^[6]。内分泌治疗作为最有效且耐受性良好的靶向疗法,已被证实能显著改善HR+ BC患者的长期预后^[7-9]。内分泌治疗药物包括他莫昔芬、芳香酶抑制剂、促性腺激素释放激素受体激动剂和氟维司群等^[10]。《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范》推荐所有ER和(或)PR阳性的乳腺癌患者接受术后辅助内分泌治疗^[11]。其中他莫昔芬因其广泛应用和卓越效益而备受推崇^[12]。

然而,HR+ BC患者在初次诊断后数10年内仍存在复发风险,这归因于乳腺癌的高度异质性和耐药易感性^[13]。内分泌治疗耐药的发生并不罕见,尤其在晚期和长期治疗的Luminal A型乳腺癌患者中^[14-15]。原发性内分泌耐药定义为最初辅助内分泌治疗2年内的疾病复发或晚期/转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)一线内分泌治疗前6个月内疾病进展。继发性或获得性耐药定义为最初辅助内分泌治疗2年后、完成辅助内分泌治疗后12个月内疾病复发或MBC开始内分泌治疗后6个月疾病进展^[16]。

本研究旨在发现HR+ BC中导致内分泌治疗耐药性的关键基因及其作用机制,研究重点为Luminal A型乳腺癌(即ER+和/或PR+, HER2-, Ki67<14%),因为此类型在乳腺癌中最为常见且内分泌治疗效果显著^[17-18]。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 生物信息学数据来源

研究数据来自MBC(<https://mbcproject.org/>)。该数据库包括379例乳腺癌患者的全外显子组测序、病理报告、诊断和治疗记录、个人生活问卷报告等。所有数据均经过统一处理,以防止个人识别,不改变科学效用。

1.1.2 细胞、试剂与仪器

本研究中人乳腺癌细胞株MCF7和T47D购自

武汉普诺赛生命科技有限公司,标记FAM表位的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)、标记Flag表位的VTCN1(NM_024626.4)过表达质粒购自和元生物技术(上海)股份有限公司,所有引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。DMEM培养基购自美国Gibco公司,4'-羟基他莫昔芬、Basement Membrane Matrix购自美国BD公司,Lipofectamine™ 3000购自美国Invitrogen公司,CCK-8购自Biosharp公司(中国),Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,RNAeasy™ Animal RNA Isolation Kit with Spin Column购自上海碧云天生物技术股份有限公司,HiScript® III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR、Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,无蛋白快速封闭液、无蛋白快速封闭液购自赛维尔生物(中国),VTCN1一抗购自美国ABclonal公司,Estrogen Receptor α 一抗、Progesterone Receptor一抗、HER2/ErbB2一抗购自美国Cell Signaling公司,LAG3一抗、PD-1一抗、山羊兔IgG-HRP二抗购自美国Proteintech Group公司。

微孔板读数器(PerkinElmer, 美国),CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国),UV-Visible Spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, 美国),Roche LightCycler® 480 II Real-Time Fluorescent Quantitative PCR System(Merck KGaA, 德国),ChemiDoc Touch成像系统(Bio-Rad Laboratories, 美国),荧光显微镜(Olympus, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

1.2.1.1 差异性表达基因(differential expression gene, DEG)的筛选

整理数据库信息,纳入具有完整的内分泌治疗,包括他莫昔芬单药或联合其他药物(阿那曲唑、来曲唑、戈舍瑞林、曲普瑞林、醋酸亮丙瑞林、氟维司群、依西美坦)及结局记录的HR+ BC患者数据,使用R软件(版本4.3.0 <http://www.r-project.org>)鉴定内分泌敏感和耐药之间的DEGs。将规律内分泌治疗后达到完全缓解或疾病稳定作为敏感组(Sen组),规律内分泌治疗后疾病进展作为耐药组(Res组)^[19],符合前述原发性耐药定义的作为原发耐药组(pRes组),符合前述继发性耐药定义的为继发耐药组(sRes组)。基因差异表达分析采用Fold change法,并将 $P < 0.05$ 、 $|\log_2 FC| \geq 1$ 作为筛选阈值。

1.2.1.2 基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析

分别使用 GO 和 KEGG 数据库,对筛出的具有统计学意义的差异基因列表进行功能和途径富集分析。

1.2.1.3 突变基因和单细胞 RNA 测序分析

利用 MBC 数据库中的体细胞突变数据,对各组的突变情况进行分析,并通过 cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)进行基因突变位点及频数的可视化展示^[20]。

从基因表达综合数据库(the gene expression omnibus, GEO)中获得需要的单细胞 RNA(single cell RNA, scRNA)测序数据(数据集编号: GSM2813220),根据对内分泌治疗的反应将数据分为 sc 敏感组(sc-Sen 组)和 sc 耐药组(sc-Res 组),在标准化数据后进行 T-分布领域嵌入算法(T-distributed stochastic neighbor embedding, tSNE)降维作图以鉴定相似细胞的簇,利用 CellMarker 2.0(<http://117.50.127.228/CellMarker/>)识别细胞特征性分子,对细胞进行分群标记,以进一步分析细胞异质性和基因表达模式^[21-22]。

1.2.1.4 目的基因选择与泛癌分析

基于前述研究结果及已有文献报道,本研究选定 VTCN1 作为目的基因。为了解 VTCN1 在乳腺癌病理组织中的表达情况,从 The Human Protein Atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)获取了相关免疫组化结果^[23]。使用 TIMER2.0 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)和 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)全面评估 VTCN1 在多种恶性肿瘤及其配对正常组织中的表达水平^[24-25]。根据 VTCN1 表达水平的中位数将纳入的患者分为高表达组和低表达组,结合临床生存数据,绘制 Kaplan-Meier 生存曲线来评估 VTCN1 对 Luminal A 型乳腺癌患者的预后价值。为了避免过拟合,进一步采用了最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO) Cox 回归模型进行验证,以确保目的基因选择的可靠性。

1.2.1.5 蛋白质功能与免疫浸润分析

为了深入探究 VTCN1 导致乳腺癌内分泌治疗耐药的可能机制,利用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)对 VTCN1 进行了蛋白质功能互作分析^[26]。同时,为了分析 VTCN1 表达与各类恶性肿瘤中肿瘤浸润性免疫细胞(tumor infiltrating immune cells, TIICs)之间的关联,利用 TIMER2.0 数据库执

行包括肿瘤免疫评估系统(tumor immune estimation resource, TIMER)、RNA 转录物相对亚群鉴定(cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts, CIBERSORT)、CIBERSORT-ABS、免疫与癌症细胞的比例预测(estimate the proportion of immune and cancer cells, EPIC)在内的多种算法,研究计算乳腺癌中 VTCN1 表达与 TIICs 之间的关系及相关系数,以期揭示 VTCN1 在乳腺癌内分泌治疗耐药中的作用机制。

1.2.2 细胞实验

1.2.2.1 细胞培养与转染

人乳腺癌细胞株 MCF7 和 T47D 在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中进行培养。所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 的条件下孵育,并确认无支原体污染。为模拟体内内分泌治疗环境,使用 4 μmol/L 4'-羟基他莫昔芬处理细胞,该物质为他莫昔芬在人类及其他哺乳动物体内的代谢产物^[27]。

按照说明书,使用 Lipofectamine™ 3000 将目的基因及对对照空白载体转染至 MCF7 和 T47D 细胞系中。阳性对照的细胞组命名为-PC,过表达 VTCN1 的细胞组命名为-OE,阴性对照的细胞组命名为-NC,敲低 VTCN1 的细胞组命名为-KD。针对 VTCN1 的三个位点(322、392、501)进行敲低,分别产生三种敲低细胞组,命名为-KD1、-KD2、-KD3。通过蛋白质印迹(Western blotting, WB)和实时定量 PCR(quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)实验验证转染效率。

1.2.2.2 细胞增殖实验

采用 CCK-8 检测细胞的增殖能力。将各组细胞(约 2.0×10³ 个/mL)接种于 96 孔板中,进行两组实验:第一组实验在 4 μmol/L 他莫昔芬环境下,以时间(0、24、48、72 h)为自变量共培养细胞;第二组实验在 72 h 内,以他莫昔芬物质的量浓度(0、1、2、3、4、5 μmol/L)为自变量共培养细胞。培养结束后,按照试剂盒说明书,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,在细胞培养环境中孵育 2 h 后,使用微孔板读数器在 450 nm 光密度(optical density, OD)下测定。计算抑制率=(OD_{DEME}-OD_{他莫昔芬完全培养基})/OD_{DEME}。每个实验组独立重复进行 3 次。

1.2.2.3 细胞凋亡实验

采用 Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit 检测他莫昔芬处理后各组细胞的凋亡情况。消化细胞后,分别使用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的重组人 Annexin V 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)对膜蛋白进行染色,在 CytoFLEX

流式细胞仪上采集样品,并使用 FlowJo 软件(版本 10.1R5)进行分析。FITC 通道检测波长为 530 nm, PI 通道检测波长为 575 nm。根据染色结果,Annexin V-FITC 与 PI 双阴性细胞为正常细胞,Annexin V-FITC 阴性、PI 阳性细胞为坏死细胞或细胞碎片,Annexin V-FITC 阳性、PI 阴性细胞为早期凋亡细胞,Annexin V-FITC 与 PI 双阳性细胞为晚期凋亡细胞。

1.2.2.4 集落形成实验

将转染后的各组细胞消化成单个细胞,并以约 1×10^3 个/mL 的密度接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后,加入他莫昔芬并培养 8 d。随后,使用光学显微镜观察细胞集落的形成情况。观察到的细胞集落用 4% 多聚甲醛进行固定,再用 0.1% 结晶紫进行染色,最后拍照记录。

1.2.2.5 伤口愈合试验

将转染后的细胞在 6 孔板中培养至 80%~90% 的汇合度。然后,使用 200 μ L 移液管的尖端在孔中央划出一道整齐且笔直的伤痕,并立即用 PBS 缓冲液清洗以去除漂浮的细胞。在含有 4 μ mol/L 他莫昔芬的完全培养基中,于 0、24、48、72 h 时,使用倒置显微镜捕捉细胞迁移的同一位置图像。利用 Image J 软件(<https://imagej.net/>)中的伤口愈合工具测量 6 个独立区域的伤口尺寸,并进行归一化处理,以计算各组的相对迁移面积和迁移率。

1.2.2.6 体外侵袭试验

采用 Transwell 板进行体外侵袭实验。先将不含酚红的 Basement Membrane Matrix 用无血清培养基按 1:8 的比例稀释,然后沿室壁加入 Transwell 上室,确保无气泡产生,并在 37 $^{\circ}$ C 下静置 30 min,直至凝胶形成。接着,用无血清且含有药物的培养基重悬各组细胞,并以约 5×10^5 个/mL 的密度接种于铺好凝胶的 Transwell 上室。下室则加入 600 μ L 的完全培养基。经过 48 h 孵育后,用 4% 多聚甲醛固定迁移通过膜的细胞,并用 0.1% 结晶紫进行染色。使用正置光学显微镜观察并拍照,再利用 Image J 软件中的粒度分析工具计算侵入细胞的数量。

1.2.2.7 RT-qPCR

按照 RNAeasyTM Animal RNA Isolation Kit with Spin Column 的说明书,从他莫昔芬培养 48 h 后的转染细胞中分离并纯化 RNA。使用 UV-Visible Spectrophotometer 测定 RNA 的纯度,确保 A_{260}/A_{280} 比值约为 2.0。随后,利用 HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 和 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 进行扩增和逆转录。配置

好反应体系后,在 Roche LightCycler[®] 480 II Real-Time Fluorescent Quantitative PCR System 上进行测量。对 1 μ g RNA 进行 RT-qPCR 分析,将基因表达量归一化至 GAPDH mRNA ($n=3$),采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法计算目的基因的表达量。

1.2.2.8 WB

将他莫昔芬培养 48 h 后的转染细胞离心,用苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)预处理后,加入 RIPA 裂解缓冲液,在冰上裂解细胞。将 10 μ L 的蛋白裂解物通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE)电泳后,电转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membranes, PVDF)上。根据制造商的说明,用无蛋白快速封闭液封闭膜后,在 4 $^{\circ}$ C 下与特异性一抗孵育过夜。次日,用含 Tween20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(tris-buffered saline and Tween20, TBST)洗涤膜后,与酶标二抗孵育。再次洗涤后,使用 ChemiDoc Touch 成像系统进行化学发光检测。

1.2.2.9 免疫荧光印迹

将转染后的细胞接种于贴壁细胞专用的玻璃盖玻片上,用含他莫昔芬的完全培养基培养至细胞丰度达到 90% 以上。然后收集玻片,用 PBS 缓冲液清洗,再用 4% 多聚甲醛固定 15 min,并在室温下透化处理。按照标准免疫荧光方案,用 ER 和人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的一抗以及 FITC 和 Cy3-伯胺(Cyanine3 amine, CY3)标记的二抗孵育细胞。细胞核用 1 μ g/mL 二氨基苯基吲哚[2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, DAPI]染色。最后,在荧光显微镜下观察并拍摄每个样本的图像。图像中蓝色荧光表示活细胞的细胞核,绿色荧光表示 ER 的表达,红色荧光表示 HER2 的表达。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 软件,对于非正态分布数据,采用 Mann-Whitney 秩和检验进行分析;Student's *t* 检验用于验证两组间是否存在显著差异;若涉及 3 个及以上组别的比较,则使用单因素 ANOVA 检验。此外,通过 Spearman 相关系数来评估两个连续变量之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内分泌治疗敏感与耐药 DEGs 的筛选

敏感组与耐药组进行比较,发现了 26 个

DEGs;原发性耐药组与继发性耐药组进行比较,发现差异性表达。见图1、表1。
发现了176个DEGs。有7个基因在两次比较中均呈

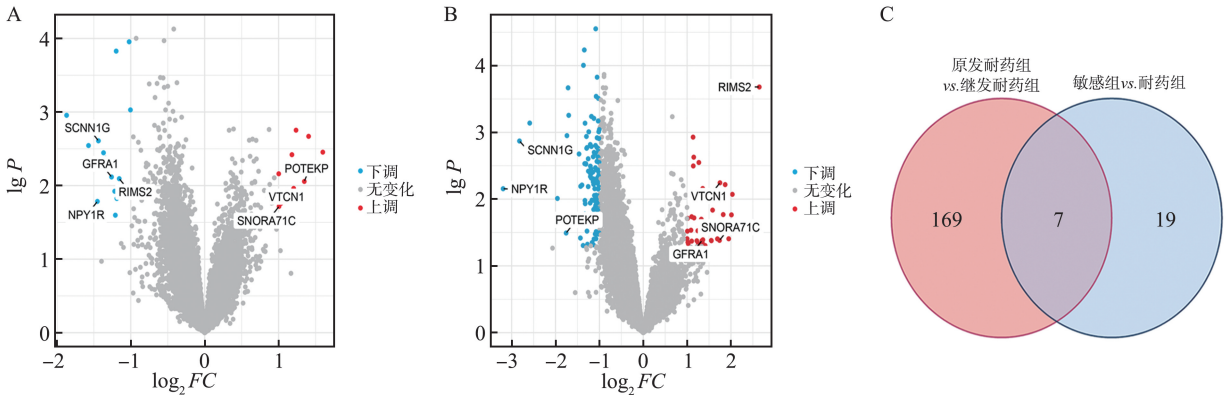


图1 筛选的HR+ BC中参与内分泌治疗耐药机制的DEGs
A:敏感组与耐药组相比较的火山图; B:原发性耐药组与继发性耐药组相比较的火山图; C:维恩图。

Figure 1 Selection of DEGs involved in endocrine therapy resistance mechanisms in HR+ BC

A: Volcano plot of the comparison between the Sen group and Res group; B: Volcano plot of the comparison between the pRes group and sRes group; C: Venn diagram.

表1 DEGs在两次比较中的结果

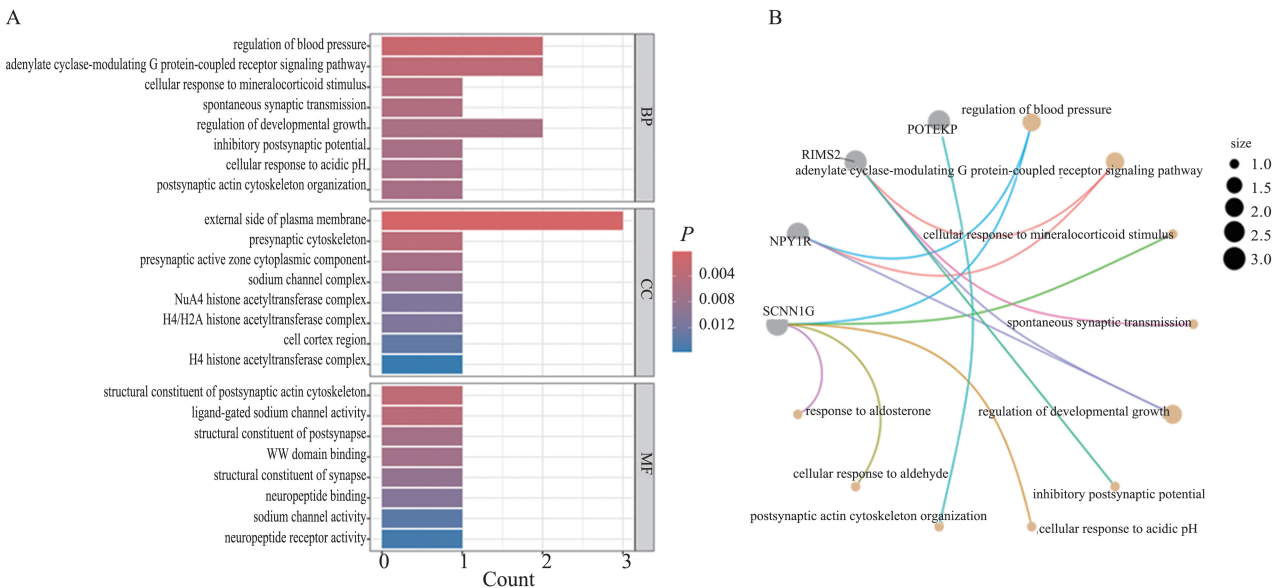
Table 1 Results of DEGs in the two comparisons

基因名称	敏感组 vs. 耐药组			原发性耐药组 vs. 继发性耐药组		
	$ \log_2 FC $	平均表达量	P	$ \log_2 FC $	平均表达量	P
NPY1R	1.452	9.788	0.016	3.196	11.121	0.007
SCNN1G	1.438	5.780	0.002	2.822	7.100	0.001
GFRA1	1.260	4.232	0.008	1.337	5.251	0.042
VTCN1	1.204	2.817	0.011	1.749	3.790	0.006
RIMS2	1.156	1.579	0.008	2.647	2.229	<0.001
SNORA71C	1.006	4.621	0.019	1.740	3.808	0.041
POTEKP	1.348	5.360	0.009	1.758	4.601	0.032

2.2 GO与KEGG对共同DEGs的功能通路分析

7个共同出现的DEGs主要与细胞膜功能、信号转导以及细胞对外界环境的应答反应有关。具体涉及的通路包括:腺苷酸环化酶调节的G蛋白偶联受体信号转导通路、细胞对酸性pH的响应、细胞对

醛类的响应、细胞对矿质皮质激素刺激的反应、抑制性突触后电位、突触后肌动蛋白细胞骨架组织、血压调节、发育生长的调控、对醛固酮的响应以及自发性突触传递等。见图2。



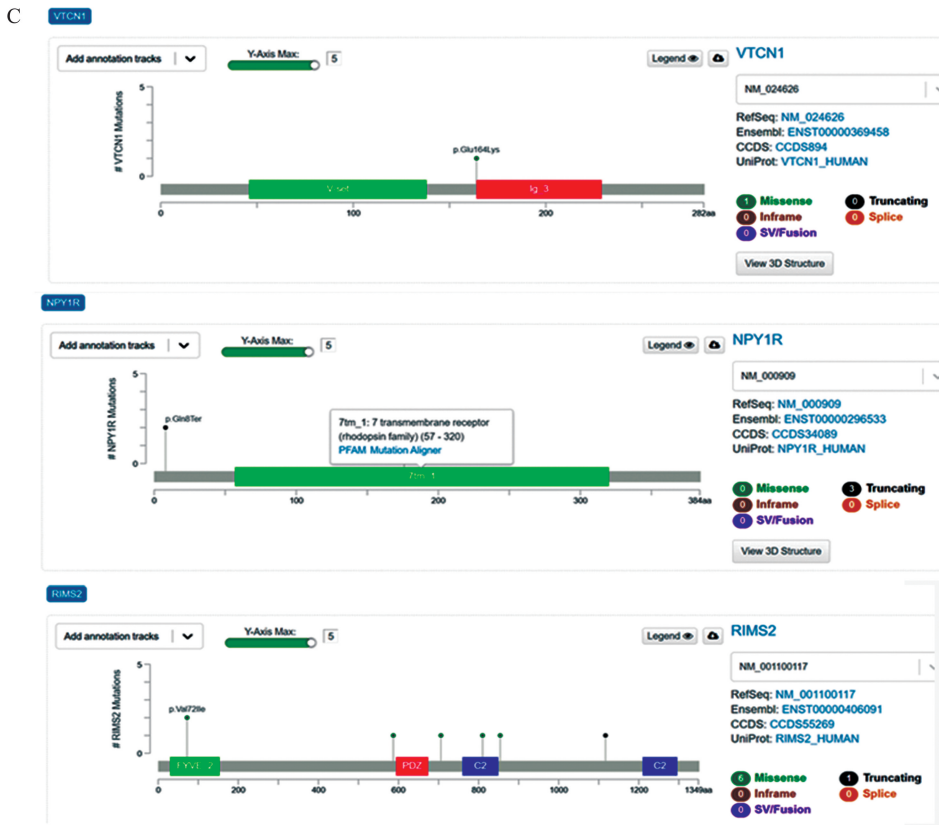


图 2 共同 DEGs 通路分析结果及突变位点分布图

A: GO 分析结果; B: KEGG 分析结果; C: 突变位点分布图。

Figure 2 Pathway analysis results of common DEGs and distribution of mutation sites

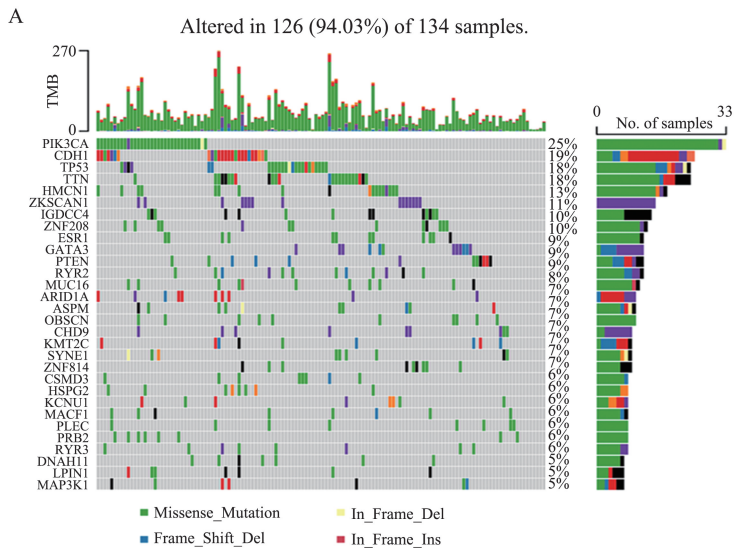
A: GO analysis result; B: KEGG analysis result; C: Mutation site distribution map.

2.3 体细胞基因突变分析

研究对象的体细胞基因突变数据分析显示, 无论是敏感组还是耐药组, 错义突变均占据最高比例, 且以 C>T 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 最为常见。敏感组样本的变异数量中位数为 49, 耐药组为 58。原发性耐药组与继发性耐药组的变异数量中位数分别为 41 和 72。

敏感组与耐药组之间, 有 16 个基因的突变数量差异有统计学意义, 主要涉及代谢过程、刺激响应、稳态调节、生物过程调控、免疫系统过程以及多细胞生物体过程。

原发性耐药组与继发性耐药组之间, 仅有 1 个基因的突变数量差异有统计学意义, 即 ZSKCAN1。见图 3。所确定的 7 个共同 DEGs 中, 已知突变频数和位点的基因如图 2C 所示。



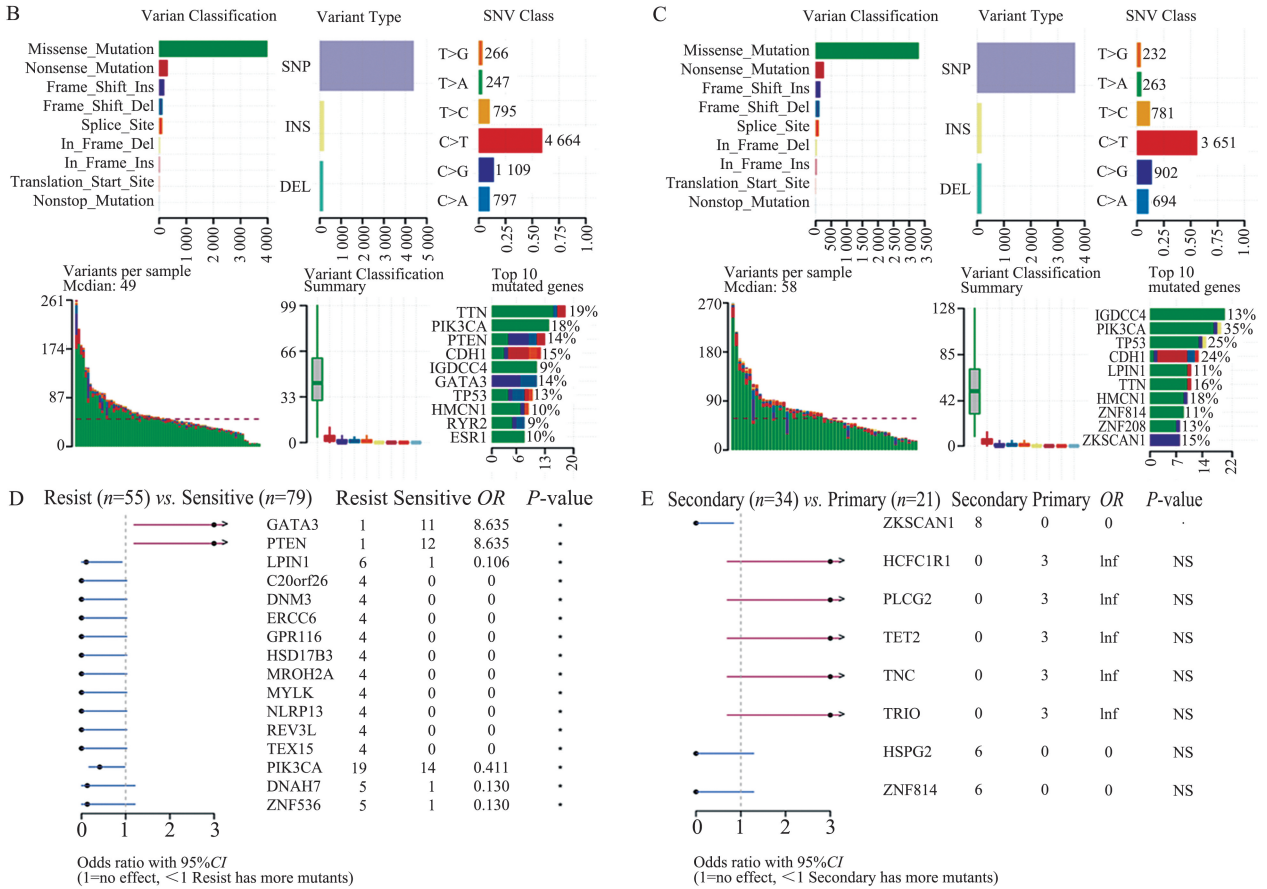


图 3 体细胞基因突变图

A: 瀑布图; B: 敏感组基因突变情况概况; C: 耐药组基因突变情况概况; D: 敏感组与耐药组突变基因相比较的森林图; E: 原发性耐药组与继发性耐药组突变基因相比较的森林图。

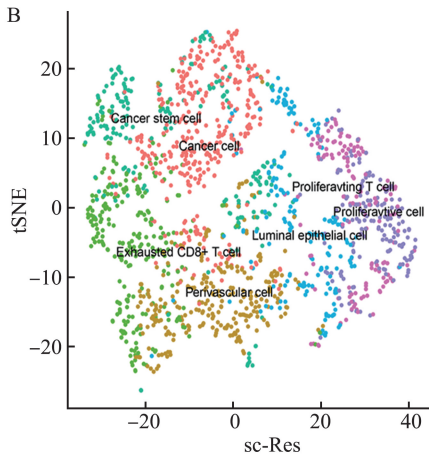
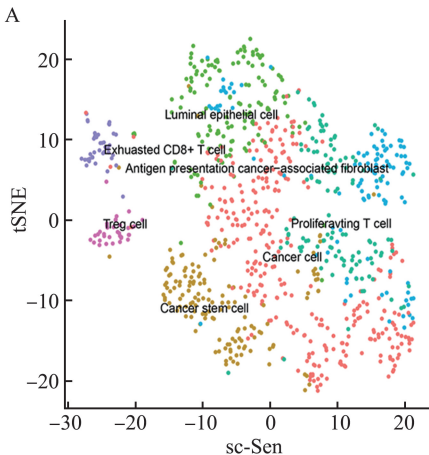
Figure 3 Somatic gene mutation maps

A: Waterfall plot; B: Mutation gene overview in the Sen group; C: Mutation gene overview in the Res group; D: Forest plot of the comparison between mutant genes in the Sen group and Res group; E: Forest plot of the comparison between mutant genes in the pRes group and sRes group.

2.4 单细胞测序分析

根据单细胞 RNA 测序数据对原始 MCF7 细胞及内分泌治疗耐药 MCF7 细胞进行的分群与注释结果表明,肿瘤免疫浸润细胞在 TME 中的变化显著,具体表现为耗竭 CD8⁺ T 细胞明显增多,而增殖性 T 细胞明显减少。同时肿瘤干细胞和血管细胞

增多,见图 4。结合前述实验结果与推测机制,本研究选定了与肿瘤微环境 (the tumor microenvironment, TME)、肿瘤免疫及内分泌治疗耐药性高度相关且尚未见报道的含 V-set 结构域的 T 细胞活化抑制剂 1 (V-set domain-containing T cell activation inhibitor 1, VTCN1) 作为后续研究的目标基因。



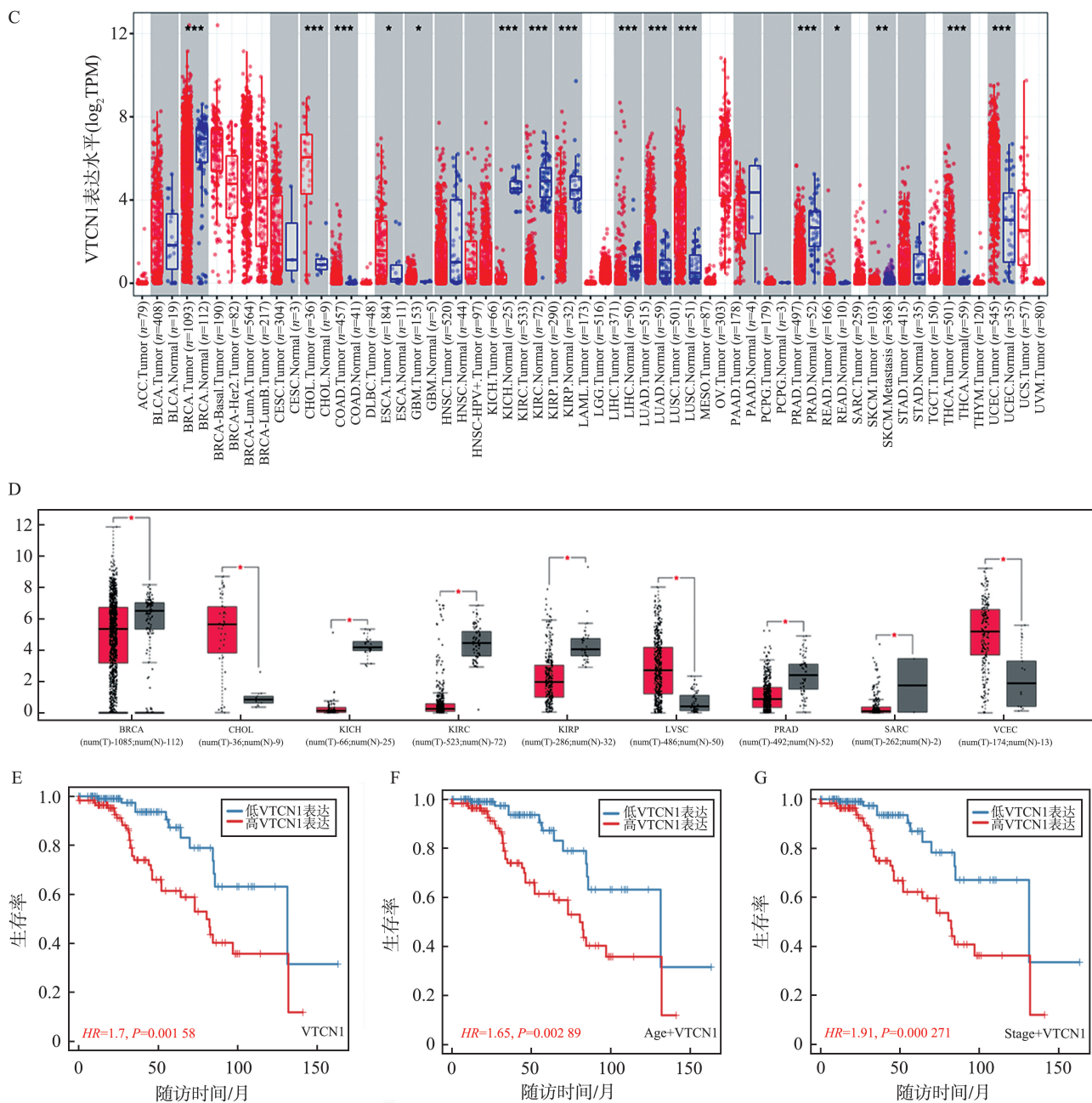


图4 单细胞测序与VTCN1和恶性肿瘤临床预后相关性分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A:敏感组 tSNE 图;B:耐药组 tSNE 图;C:基于 TIMER2.0 数据库的箱线图;D:基于 GEPIA 数据库的箱线图;E:仅考虑 VTCN1 表达为单一因素的 Kaplan-Meier 生存曲线;F:校正年龄分层因素的 Kaplan-Meier 生存曲线;G 校正分期分层因素的 Kaplan-Meier 生存曲线。

Figure 4 Single-cell sequencing and analysis of the correlation between VTCN1 and malignant tumor prognosis (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: t-SNE plot of the Sen group; B: t-SNE plot of the Res group; C: Box plot based on the TIMER2.0 database; D: Box plot based on the GEPIA database; E: Kaplan-Meier survival curve considering VTCN1 expression as a single factor; F: Kaplan-Meier survival curve adjusted for the stratifying factor of age; G: Kaplan-Meier survival curve adjusted for the stratifying factor of stage.

2.5 VTCN1 的泛癌分析与 Kaplan-Meier 生存分析

利用 TIMER2.0 和 GEPIA 数据库,对比了 VTCN1 在多种恶性组织及其对应正常组织中的表达差异:VTCN1 的 mRNA 表达水平在浸润性乳腺癌、胆管癌、结肠癌、食管癌、多形性胶质母细胞瘤、

肺腺癌、肺鳞状细胞癌、直肠腺癌、肉瘤、甲状腺癌、子宫肌体子宫内膜癌显著上调;而在肾嗜色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、肝细胞癌及前列腺腺癌中显著下调。此外,在侵袭性皮肤黑色素瘤中,VTCN1 的 mRNA 表达水平相较于该肿瘤整体表达

水平显著增高,提示 VTCN1 的表达可能与恶性肿瘤侵袭性行为存在潜在关联。通过绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,可知 VTCN1 的表达与 HR+ BC 患者的总生存期(overall survival, OS)存在显著负相关。见图 4。

HaCaT 细胞和 MCF7 细胞在电镜下 VTCN1 的荧光染色图以及切缘正常乳腺组织与乳腺癌组织 VTCN1 的病理切片染色图表明,VTCN1 在乳腺癌组织中高表达,以及在癌细胞分裂过程中 G2 期高度复制。见图 5。

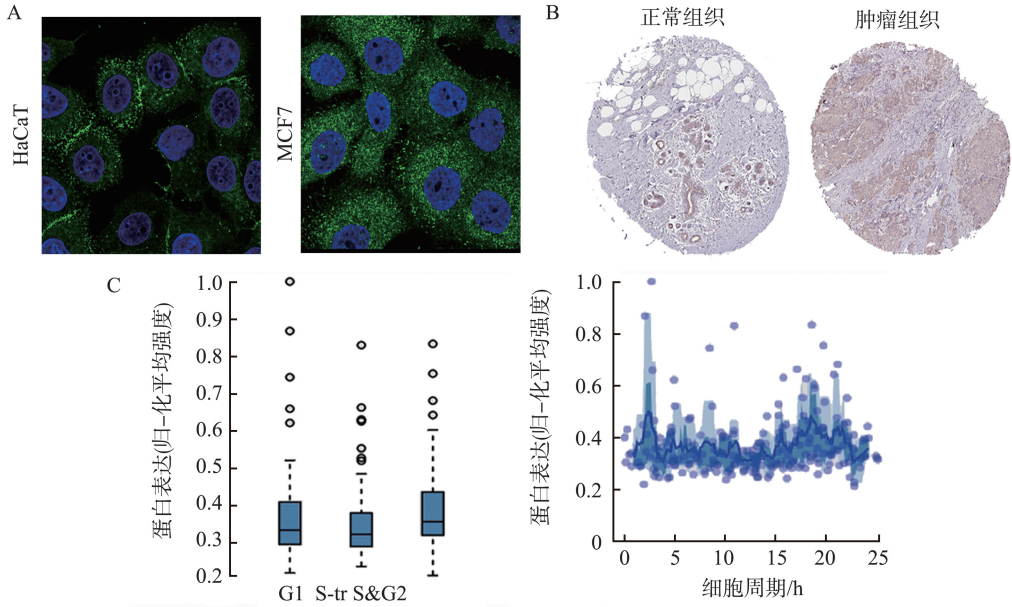


图 5 VTCN1 在乳腺癌细胞与组织中的表达
A: 荧光染色图像;B: 病理组织染色;C: 细胞周期不同阶段乳腺癌细胞中的 VTCN1 表达情况。

Figure 5 Expression of VTCN1 in BC cells and tissues

A: Fluorescent staining images; B: Pathological tissue staining; C: VTCN1 expression levels in BC cells at different stages of the cell cycle.

2.6 VTCN1 与浸润免疫细胞的相关性分析

通过相关性分析可知,VTCN1 表达水平与 Luminal A 型乳腺癌中多数免疫细胞的浸润评分呈现负相

关,包括 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞以及它们的分化细胞。见图 6。

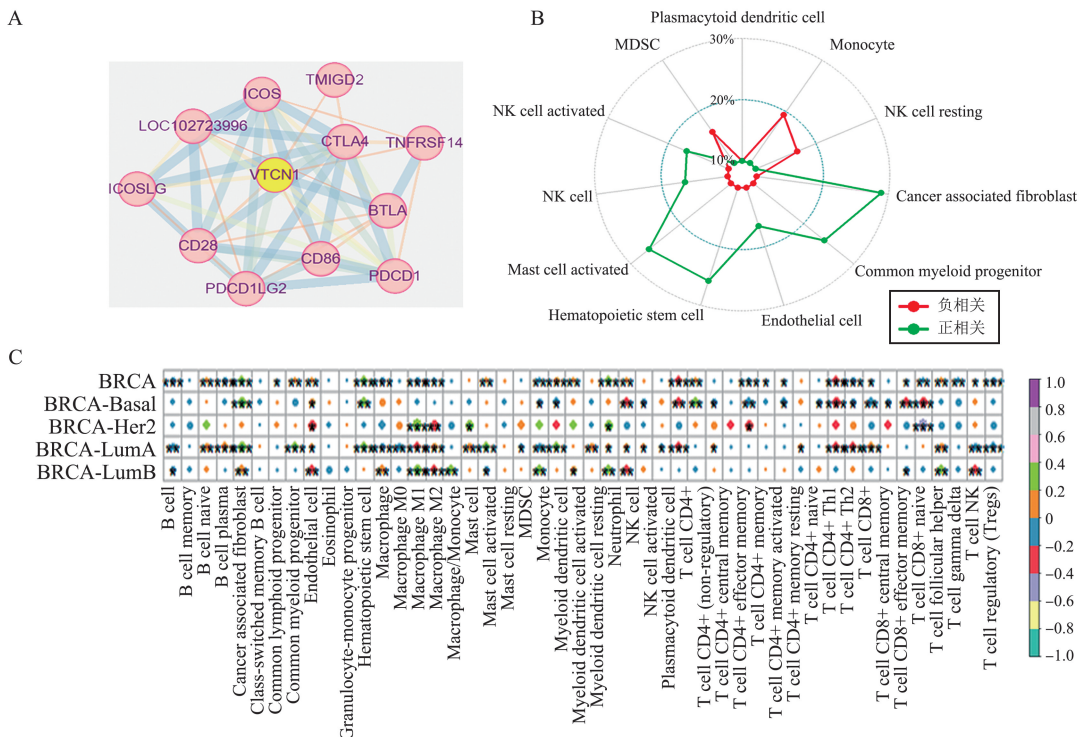


Figure 6 Correlation analysis of VTCN1 expression with immune cell infiltration

D

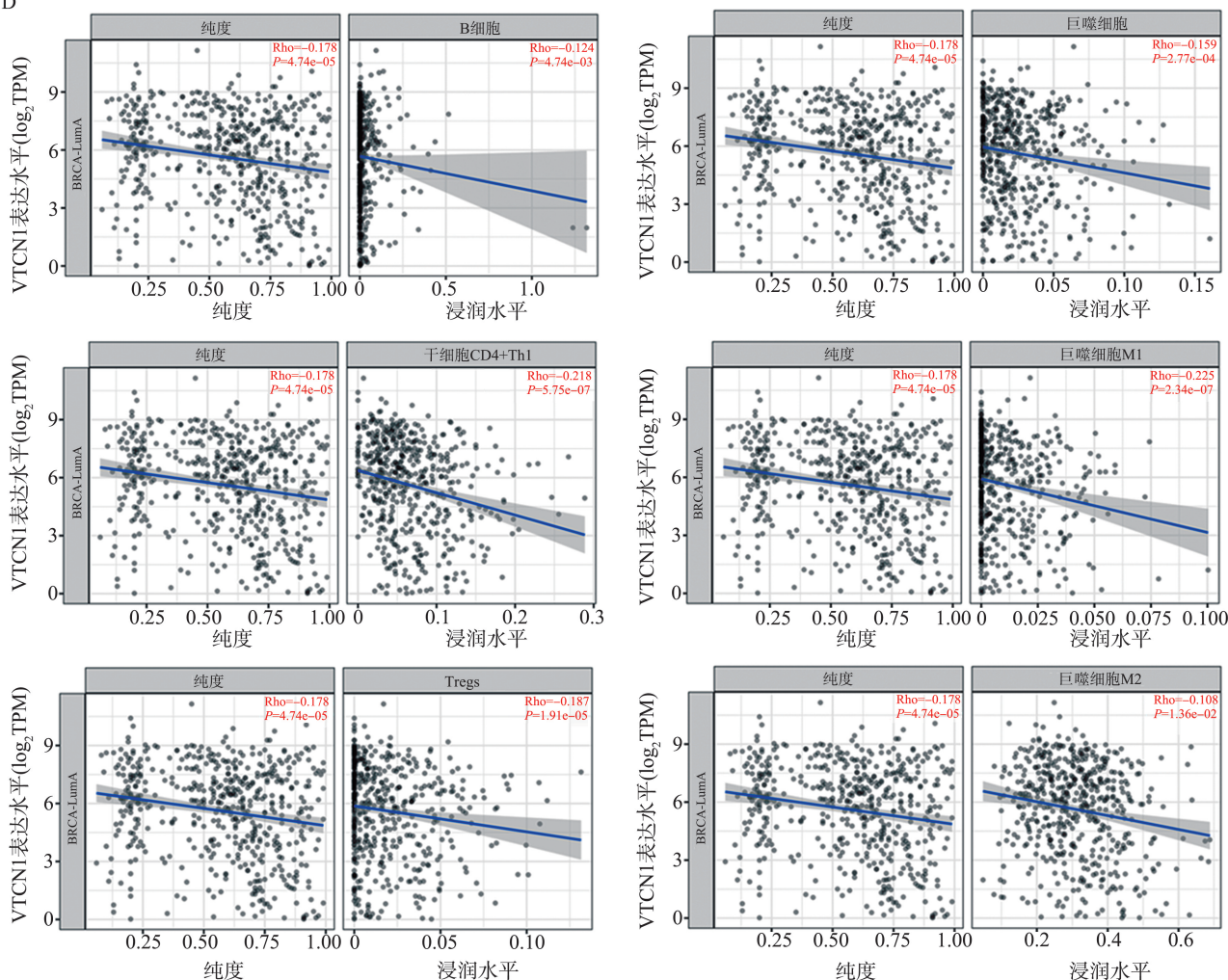


图6 VTCN1与免疫浸润细胞的相关性分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: VTCN1在蛋白质相互作用网络中的作用; B: Luminal A型乳腺癌中免疫浸润细胞与VTCN1表达水平之间相关性的散点图; C: 分析VTCN1在不同类型乳腺癌中的表达水平及其与免疫浸润细胞相关性的热图; D: Luminal A型乳腺癌中免疫浸润细胞与VTCN1表达水平之间相关性的雷达图。

Figure 6 Correlation analysis between VTCN1 and tumor immune infiltrating cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: Role of VTCN1 in the protein-protein interaction network; B: Scatter plot depicting the correlation between tumor immune infiltrating cells and VTCN1 expression levels in Luminal A BC; C: Heatmap analyzing the correlation between TIICs and VTCN1 expression levels across different BC subtypes; D: Radar chart representing the correlation between tumor immune infiltrating cells and VTCN1 expression levels in Luminal A BC.

2.7 VTCN1削弱他莫昔芬对HR+BC细胞增殖的抑制作用

以药物浓度为自变量,由不同VTCN1表达水平的MCF7和T47D细胞增殖速率的变化可知,当他莫昔芬的物质的量浓度 $\leq 4 \mu\text{mol/L}$ 时,PC与OE、NC与KD1/2/3组间的增殖速率差异有统计学意义($P < 0.05$)。当此浓度达到 $5 \mu\text{mol/L}$ 时,这种差异减弱。考虑到临床实际用药中由于药物不良反应限制体内药物浓度,本研究选定 $4 \mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的标准浓度。以时间为自变量,由药物对转染后细胞的持续影响可知,高表达VTCN1的HR+BC细胞在他莫昔芬环境中的增殖速率显著快于低表达VTCN1的癌细胞,且在一定时间内,增殖速率

差与时间呈正相关。这一时间阈值可能位于48~72h之间。见图7A、7B。

凋亡实验结果表明,在MCF7细胞系中,与NC组相比,KD组的早期凋亡细胞明显增多,正常细胞比例减少;而OE组相较于PC组,早期凋亡细胞比例减少,正常细胞比例增加。T47D细胞系中的变化趋势与此一致。见图7C。

集落形成实验的结果与前述两个实验结果相符。OE组在相同药物浓度下形成的集落数量更多,规模更大,集落形成抑制作用减弱;而KD组在他莫昔芬作用下形成的集落数量更少、更小,集落形成抑制更加明显。见图7D。

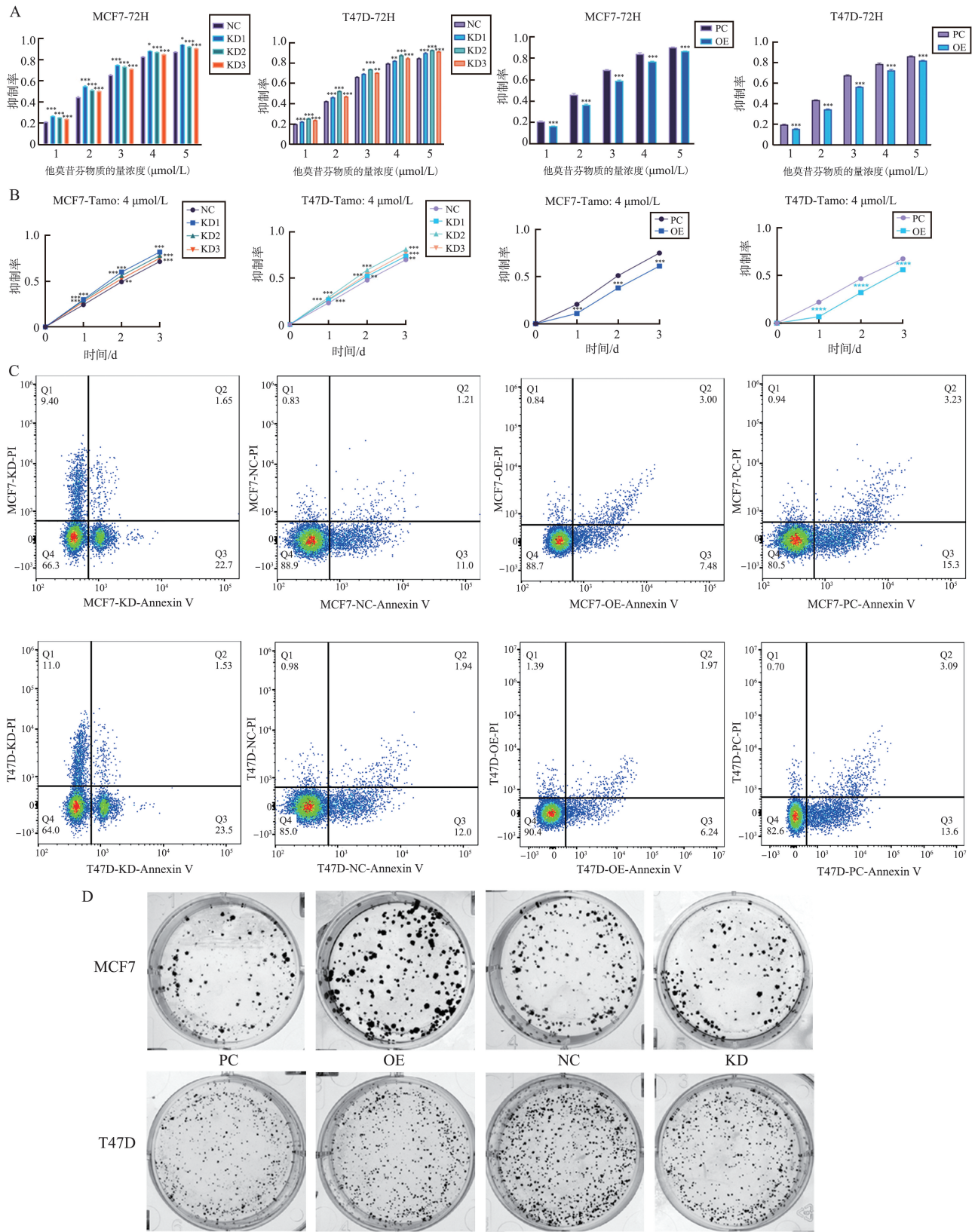


图 7 VTCN1 可削弱他莫昔芬抑制增殖和促进早期凋亡的药理作用 ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$)
 A: 药物浓度对细胞抑制率的箱型图; B: 用药时间对细胞抑制率的线性图; C: 凋亡实验的荧光强度散点图; D: 集落形成实验结果成像。

Figure 7 VTCN1 attenuates the pharmacological effects of tamoxifen on inhibiting proliferation and promoting early apoptosis ($^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$)
 A: Box plot representing cell inhibition rates across various drug concentrations; B: Line graph illustrating cell inhibition rates over time of drug exposure; C: Scatter plot depicting fluorescence intensity in apoptosis experiments; D: Imaging of colony formation assay results.

2.8 VTCN1拮抗他莫昔芬对HR+BC细胞迁移和侵袭的抑制作用

伤口愈合实验结果显示,与PC组对比,OE组中过表达VTCN1的HR+BC细胞在他莫昔芬作用下的迁移速率受抑制程度显著降低,迁移率更高。与NC组对比,KD组中低表达VTCN1的恶性细胞

迁移能力明显减弱,相同时间内的迁移距离明显减少。Transwell体外侵袭实验结果显示,过表达VTCN1的OE细胞侵入多孔膜的数量显著多于PC细胞;相反,低表达VTCN1的KD细胞侵入多孔膜的数量则显著减少。见图8。

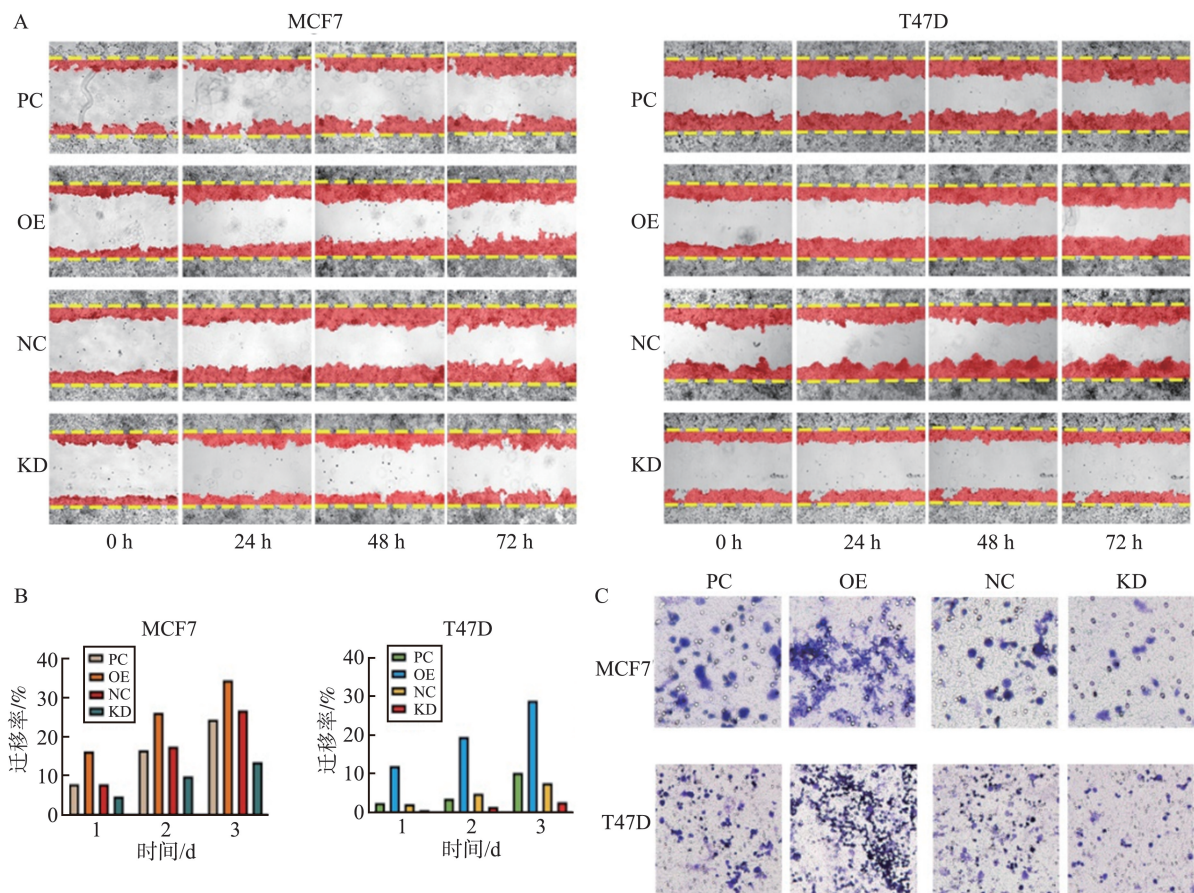


图8 VTCN1可对抗他莫昔芬对迁移和侵袭的抑制作用

A: 伤口愈合实验中,同一划痕区域在0、24、48和72h的代表性照片;B: 伤口愈合实验中迁移率的箱式图;C: Transwell迁移实验中HR+BC细胞的代表性图像。

Figure 8 VTCN1 counteracts the inhibitory effects of tamoxifen on migration and invasion

A: Representative photographs of the same scratch area at 0, 24, 48, and 72 hours in wound healing assays; B: Box plots representing the migration rate in wound healing experiments; C: Representative images of HR+BC cells in Transwell migration assays.

2.9 VTCN1可能通过调控肿瘤免疫微环境和激素受体介导他莫昔芬耐药

RT-qPCR和WB实验表明了OE组VTCN1过表达、KD组VTCN1低表达的转染效率。见图9。

在翻译水平上,VTCN1过表达时,ER和PR的表达量降低,HER2、淋巴细胞活化因子3(lymphocyte activating 3,LAG3)和程序性细胞凋亡基因1(programmed cell death 1,PD-1)的表达量增加;在VTCN1敲低的KD组中,ER和PR的表达量显著增加,PR增加更为明显,而LAG3和PD-1在特定敲低点有不同程度的下降。荧光免疫杂交

实验结果表明,在内分泌治疗环境下,VTCN1的表达与ER表达呈负相关,与HER2表达呈正相关。

在转录水平上,与PC组相比,OE组Notch受体4(Notch receptor 4,Notch4)、Snail家族转录抑制因子2(snail family transcriptional repressor 2,Slug)、SRY-box转录因子2(SRY-box transcription factor 2,Sox2)基因的转录水平均有所增加;而在KD组与NC组的对比中,多个敲低位点呈现出相反的结果($P<0.05$)。

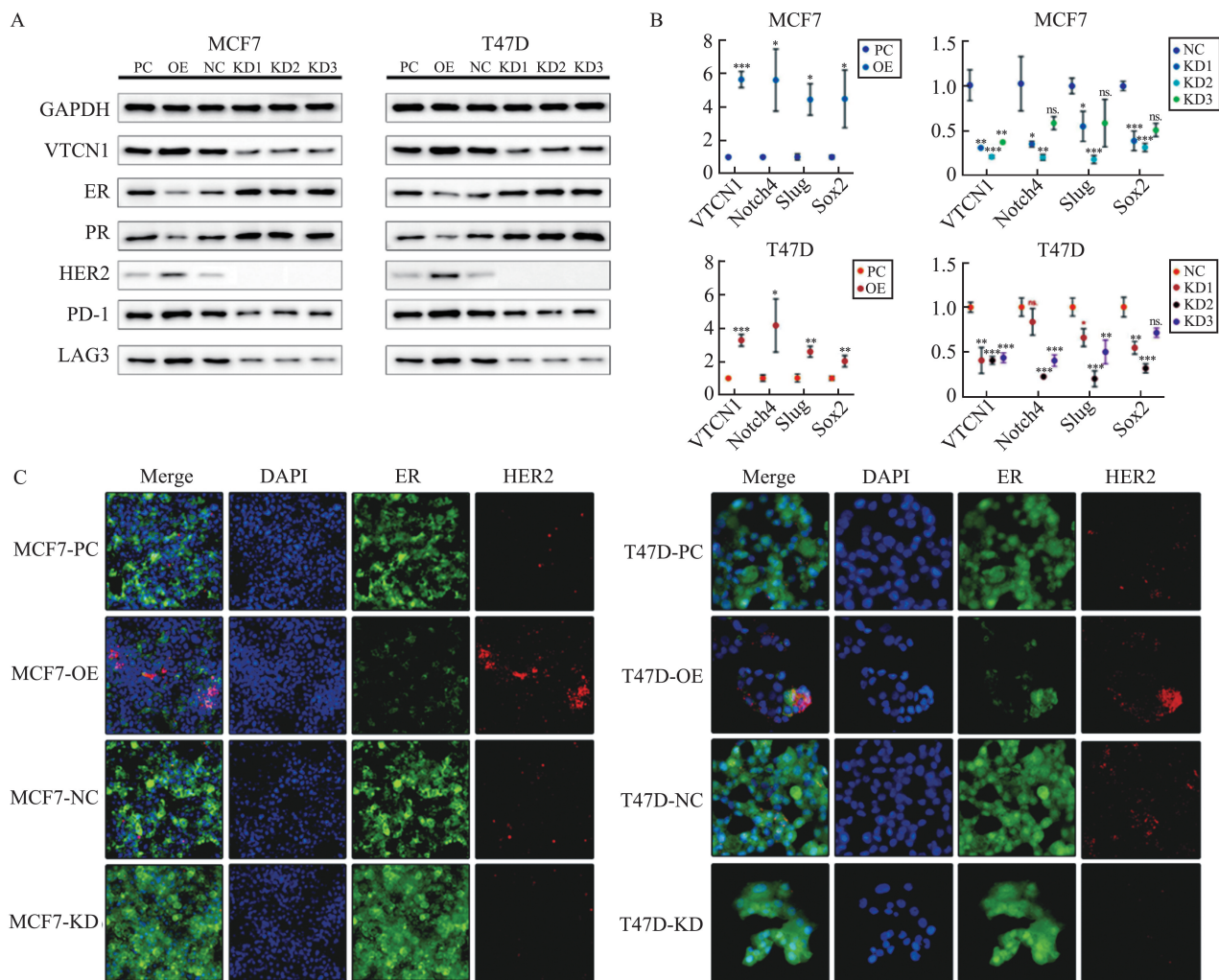


图9 VTCN1的耐药性可能与HR和EMT基因表达的改变有关(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: WB实验的化学发光图像; B: RT-qPCR实验结果的线型图; C: ER和HER2免疫荧光染色的代表性图像。

Figure 9 VTCN1 resistance may be associated with alterations in HR and EMT gene expression (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: Chemiluminescence images of WB; B: Line graphs representing the results of RT-qPCR; C: Representative images of ER and HER2 immunofluorescence staining.

3 讨论

乳腺癌发病率占全球癌症发病率第一位,而HR+(ER+和/或PR+)BC占乳腺癌的75%^[28]。对于HR+(ER+和/或PR+)BC,以他莫昔芬为代表的内分泌治疗是重要的治疗手段。多项研究已证实,他莫昔芬无论是单药还是联合其他药物治疗,均能显著延长ER+乳腺癌患者的无复发生存期(relapse-free survival, RFS)和总生存期(overall survival, OS),即便患者在开始治疗时已处于晚期或伴有恶性转移^[29]。在乳腺癌的各亚型中,Luminal A型乳腺癌对内分泌治疗的获益最为显著,且是目前唯一被推荐可术后单独进行内分泌治疗的病理类型^[30]。研究表明,他莫昔芬治疗是Luminal A型乳腺癌有效的预后因素^[31]。然而,内分泌治疗后耐药性的出

现,却成为了临床医生和患者面临的一大挑战。一项长期随访实验显示,根据TN分期的不同,规范完成5年内分泌治疗的患者,其远处复发的风险范围仍高达10%~41%^[9]。因此,对内分泌耐药性内在原因和机制的研究是非常有必要的,这不仅能够为个性化基因治疗提供科学合理的用药依据,从而优化恶性肿瘤长期治疗方案;还能够指导新药的研发,预测和预防耐药现象的发生,延长药物的有效使用周期,提供更加稳定的治疗效果。

本研究利用MBC数据库,根据内分泌治疗后是否复发及不同的复发情况,筛选出DEGs。通过KEGG和GO数据库进行通路富集分析,发现它们共同参与细胞膜对外环境的感知与响应、细胞信号传导、细胞稳态维持以及免疫反应的调节。体细胞突变分析发现耐药性的产生可能与细胞的稳态和免疫相关,在原发性耐药组与继发性耐药组的突变分

析中仅有 ZSKCAN1 具有统计学差异,现已被证实与非小细胞肺癌中的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号以及肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号相关^[32-33]。而原发性耐药组和继发性耐药组比较中,突变基因发生中位数的巨大差异则暗示长期雌激素抑制治疗可能会诱导体细胞基因突变,进而导致内分泌治疗耐药性的产生。单细胞 RNA 分析发现,耐药组与敏感组相比肿瘤环境中的免疫浸润细胞类型减少、密度降低,肿瘤细胞与血管细胞的数量增加。综合上述研究结果,选定共同 DEGs 中的 VTCN1 作为目标基因,进一步研究其在内分泌耐药过程中发挥的关键作用。

通过 GEPIA 和 TIMER2.0 数据库分析,本研究发现 VTCN1 在多种癌症中的 mRNA 表达水平相较于正常组织存在统计学差异,过表达 VTCN1 与 HR+BC 的预后不良相关。在蛋白质功能互作网络中, VTCN1 主要发挥广谱的免疫抑制功能,抑制作用的对象既包括抑癌的免疫细胞(如 B 细胞、M1 巨噬细胞、Th1 细胞等),也涵盖促癌的免疫细胞(如 Tregs、M2 巨噬细胞等)^[34]。这一发现可能表明, VTCN1 的高表达在 Luminal A 型乳腺癌中营造了一个普遍不利于免疫功能细胞生存和转化的微环境,而这种影响与免疫转化的方向无关。为验证 VTCN1 对耐药特性的作用,本研究采用一线内分泌治疗药物他莫昔芬和 Luminal A 型乳腺癌细胞 MCF7、T47D 进行体外细胞表型实验。细胞增殖实验显示, VTCN1 能拮抗他莫昔芬抑制 HR+BC 细胞增殖的药理作用,而且在一定范围内,随着药物浓度的增加(4~5 $\mu\text{mol/L}$)和药物暴露时间的延长(48~72 h),增殖率的差异逐渐扩大。细胞凋亡实验则表明, VTCN1 能对抗他莫昔芬促进乳腺癌细胞早期凋亡的作用。这种对抗作用在 MCF7 与 T47D 细胞中表现的程度不同,考虑到这两种细胞系的特征,猜想 VTCN1 发挥作用可能与 PR 表达有关,但需要进一步的研究来验证这一假设。集落形成实验也支持了 VTCN1 在拮抗他莫昔芬抑制单个乳腺癌细胞成团中的作用。此外, Transwell 侵袭和伤口愈合实验证明, VTCN1 的高表达能阻碍他莫昔芬抑制 HR+BC 细胞侵袭和迁移的能力,导致单位时间内侵袭细胞数量增加,细胞迁移距离增加;敲低 VTCN1 出现相反的结果。这一发现与内分泌耐药性乳腺癌通常具有更强侵袭性表型的观点相吻合^[35]。这些结果表明, VTCN1 在他莫昔芬处理条件下,能够诱导形成一个

不利于 TICs 生存的免疫微环境,进而广泛性地削弱机体的抗肿瘤免疫反应。这一机制导致他莫昔芬原本具有的抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡、阻碍肿瘤团块形成以及抑制侵袭和迁移等药理功效难以充分展现,从多个层面导致了内分泌治疗耐药性的产生。

本研究亦发现在 VTCN1 高表达的耐药细胞中, Notch4、Slug、Sox2 的转录水平升高, HER2、LAG3、PD-1 的翻译水平显著升高,而 ER、PR 的翻译水平不同程度降低。VTCN1 低表达组细胞则得到相反的结果。这些基因已被证实是肿瘤免疫微环境和上皮-间质转化的重要参与因子,后者在肿瘤的发生、转移和药物治疗反应中发挥着关键作用^[36]。

VTCN1 也被称为 B4H7,在癌症与妊娠共享的免疫耐受机制中扮演着重要角色。VTCN1 的缺陷会在异基因妊娠模型中引发母-胎免疫激活,导致早期妊娠失败^[37]。VTCN1 能够与抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APCs)上的共刺激受体结合,负性调节 T 细胞,从而协助癌细胞实现免疫逃逸^[38]。本研究发现, VTCN1 在多种恶性肿瘤中呈现出差异性的表达模式,这一现象强烈暗示 VTCN1 可能参与了恶性肿瘤发生与发展的某些共通机制。结果建立了 VTCN1 与 HR+BC(尤其是 Luminal A 型乳腺癌)患者预后之间的显著负相关联系,其表达水平的增高显著缩短患者的生存时间。

Notch4 作为 Notch 基因家族中首个被完整报道基因组序列的成员,参与细胞信号的传导过程^[39]。研究表明, Notch4 能够促进体内自发性乳腺肿瘤的形成,并加速正常人乳腺上皮细胞的恶性转化^[40-41]。在他莫昔芬耐药细胞中, Notch4 与 Nicastrin 协同高表达^[42],且 Notch4/信号转导和转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路被证实参与耐药性乳腺癌的 EMT^[43]。Slug 亦称为 Snail2,是发育性 EMT 的调节因子,其异常表达会促进乳腺癌的进展,并与不良预后相关^[44]。在乳腺癌中, Slug 的过表达通过抑制 ER α 的转录,使 MCF7 细胞产生内分泌耐药特性,并可能引发异常的 EMT^[45]。在卵巢癌中,敲低 Slug 可逆转癌细胞的间充质特性,并恢复其对化疗药物的敏感性^[46]。Sox2 是一种具有干细胞潜能的多能性基因,可通过维持乳腺癌干细胞样特性,产生强侵袭性和内分泌治疗耐药性,其表达水平与 HR+BC 的高组织学分级相关,并可作为他莫昔芬耐药的早期预测指标^[47-49]。PD-1 和 LAG3 是已被广泛研究的免疫检查点基因,它们在调节性

T 细胞 (regulatory T cell, Tregs) 中丰富表达^[50]。目前,利用 PD-1/PD-L1 的免疫检查点阻断疗法已在多种癌症中取得显著疗效^[51]。而 LAG3 则被发现与头颈部鳞状细胞癌和皮肤癌中免疫疗法的原发性耐药相关^[52]。这两个肿瘤微环境重要的调节因子在 HR+ BC 中的表达相对较少,它们在内分泌治疗耐药发生过程中的具体作用仍需进一步探究^[53]。

肿瘤微环境 (the tumor microenvironment, TME) 指的是肿瘤或癌症干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 所处的细胞环境,这一环境囊括了免疫细胞、血管、细胞外基质 (the extracellular matrix, ECM)、成纤维细胞、淋巴细胞、骨髓源性炎症细胞及信号分子等多种成分^[54]。其中,由 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等构成的免疫功能部分被称为肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME)^[50]。TME 为癌细胞提供了发生 EMT 的必要条件,EMT 是细胞从具有强细胞间连接的上皮特征向迁徙和侵袭能力增强的间充质细胞转化的过程,被认为是内分泌耐药的可能机制之一。此外,EMT 还是导致肿瘤细胞内部 CSCs 和非 CSCs 差异的主要原因^[55]。CSCs 具有自我更新能力,能够产生新一代 CSCs,并能分化为致瘤性较低的更新细胞,即肿瘤中的非 CSCs^[56]。现有研究日益揭示,常规抗癌治疗往往仅能消除非 CSCs,而隐匿的、更具耐药性的 CSCs 则可能残留,这是恶性肿瘤药物治疗后复发的重要原因^[57-58]。当前研究认为,内分泌药物与肿瘤细胞的相互作用主要发生在 TME 中,不仅涉及肿瘤细胞本身,还包括 TME 中的其他成分,如蛋白质分子或受体,它们之间共同构成了一个复杂的作用网络^[59]。

本文的创新性在于深入探讨了 VTCN1 在他莫昔芬治疗背景下的新角色。当前关于 VTCN1 的研究主要聚焦于其在恶性肿瘤中的免疫功能和靶向应用,而在内分泌治疗耐药性方面的研究较少。本研究不仅证明了 VTCN1 可以诱导产生耐药特性,而且初步证实了其通过发挥广谱的免疫抑制作用进而调控多种 TIME 中有关 EMT 基因的表达;这一机制与他莫昔芬的药理多角度相互作用,最终导致治疗耐药性的出现。这一发现为理解内分泌治疗耐药性的形成提供了全新的视角,并可能为未来开发针对耐药性的治疗策略提供参考。

本研究也存在一定的局限性。首先,本研究主要基于细胞实验,虽然这些结果具有一定的说服力,但仍需在临床样本中进一步验证。其次,尽管阐述了 VTCN1 的作用机制,但对其上游调控因子及下

游信号通路的理解仍不够全面,限制了对整个调控网络的深入认识。再次,由于肿瘤微环境的复杂性,VTCN1 可能与其他多种因子存在交互作用,这些潜在的相互作用尚需进一步探索。

综上所述,本研究表明,VTCN1 的表达能够显著对抗他莫昔芬对 HR+ BC 细胞在增殖、凋亡、成团、迁徙及侵袭等方面的抗癌药理作用。VTCN1 可能通过调控 EMT 相关调节因子 (包括 Notch4、Slug、Sox2) 以及免疫检查点 (如 PD-1、LAG3) 在 TIME 中发挥功能。这种作用进而影响 EMT 进程及 CSCs 的数量,并可能通过上调和/或下调细胞表面激素受体的表达,诱导 HR+ BC 细胞产生对内分泌治疗的原发性或继发性耐药。这些发现为深入理解 VTCN1 在乳腺癌内分泌治疗耐药机制中的作用提供了新的视角,并为未来开发针对耐药性的治疗策略提供了潜在靶点。

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] Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, et al. Breast cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(6): 524-541.
- [3] Tong CWS, Wu M, Cho WCS, et al. Recent advances in the treatment of breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 227. doi: 10.3389/fonc.2018.00227. eCollection 2018.
- [4] Raheem F, Karikalan SA, Batalini F, et al. Metastatic ER+ breast cancer: mechanisms of resistance and future therapeutic approaches[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16198. doi: 10.3390/ijms242216198.
- [5] Boafu GF, Shi Y, Xiao Q, et al. Targeted co-delivery of daunorubicin and cytarabine based on the hyaluronic acid prodrug modified liposomes [M]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(10): 4600-4604.
- [6] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(16): 2784-2795.
- [7] Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, et al. A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6834. doi: 10.3390/ijms24076834.
- [8] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment[J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 288-300.
- [9] Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-year risks of

- breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(19): 1836-1846.
- [10] Bhat R, Thangavel H, Abdulkareem NM, et al. NPY1R exerts inhibitory action on estradiol-stimulated growth and predicts endocrine sensitivity and better survival in ER-positive breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1972. doi: 10.1038/s41598-022-05949-7.
- [11] National Health Commission of The People's Republic of China. National guidelines for diagnosis and treatment of breast cancer 2022 in China (English version)[J]. *Chin J Cancer Res*, 2022, 34(3): 151-175.
- [12] Rajendran S, Swaroop SS, Roy J, et al. p21 activated kinase-1 and tamoxifen—a deadly nexus impacting breast cancer outcomes[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2022, 1877(1): 188668. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188668.
- [13] Turashvili G, Brogi E. Tumor heterogeneity in breast cancer[J]. *Front Med*, 2017, 4: 227. doi:10.3389/fmed.2017.00227.
- [14] Demicheli R, Ardoino I, Boracchi P, et al. Recurrence and mortality according to estrogen receptor status for breast cancer patients undergoing conservative surgery. Ipsilateral breast tumour recurrence dynamics provides clues for tumour biology within the residual breast[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 656. doi:10.1186/1471-2407-10-656.
- [15] Clarke R, Tyson JJ, Michael Dixon J. Endocrine resistance in breast cancer: an overview and update[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 418(3): 220-234.
- [16] Cardoso F, Costa A, Norton L, et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(10): 1871-1888.
- [17] Ojo D, Wei FX, Liu Y, et al. Factors promoting tamoxifen resistance in breast cancer via stimulating breast cancer stem cell expansion[J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(19): 2360-2374.
- [18] Li Z, Wei HR, Li SY, et al. The role of progesterone receptors in breast cancer[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 305-314. doi:10.2147/DDDT.S336643.
- [19] Turner NC, Ro J, André F, et al. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(3): 209-219.
- [20] de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, et al. Analysis and visualization of longitudinal genomic and clinical data from the AACR project GENIE biopharma collaborative in cBioPortal[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(23): 3861-3867.
- [21] Hinohara K, Wu HJ, Vigneau S, et al. KDM5 histone demethylase activity links cellular transcriptomic heterogeneity to therapeutic resistance[J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(6): 939-953.
- [22] Hu CX, Li TY, Xu YQ, et al. CellMarker 2.0: an updated database of manually curated cell markers in human/mouse and web tools based on scRNA-seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D870-D876.
- [23] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. tissue-based map of the human proteome[J]. *Science*, 2015, 347(6220): 1260419. doi:10.1126/science.1260419.
- [24] Li TW, Fu JX, Zeng ZX, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W509-W514.
- [25] Tang ZF, Li CW, Kang BX, et al. GEPIA a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [26] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638-D646.
- [27] Devulapally R, Sekar TV, Paulmurugan R. Formulation of anti-miR-21 and 4-hydroxytamoxifen co-loaded biodegradable polymer nanoparticles and their antiproliferative effect on breast cancer cells[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(6): 2080-2092.
- [28] Tsang JYS, Tse GM. Molecular classification of breast cancer[J]. *Adv Anat Pathol*, 2020, 27(1): 27-35.
- [29] Arimidex T, Forbes JF, Cuzick J, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(1): 45-53.
- [30] Abdalla AN, Qattan A, Malki WH, et al. Significance of targeting VEGFR-2 and cyclin D1 in luminal-A breast cancer[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4606. doi:10.3390/molecules25204606.
- [31] Hwang KT, Kim EK, Jung SH, et al. Tamoxifen therapy improves overall survival in luminal A subtype of ductal carcinoma in situ: a study based on nationwide Korean Breast Cancer Registry database[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 169(2): 311-322.
- [32] Wang YY, Xu RJ, Zhang DY, et al. Circ-ZKSCAN1 regulates FAM83A expression and inactivates MAPK signaling by targeting miR-330-5p to promote non-small cell lung cancer progression[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(6): 862-875.
- [33] Song RJ, Ma SQ, Xu JJ, et al. A novel polypeptide encoded by the circular RNA ZKSCAN1 suppresses HCC via degradation of mTOR[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 16. doi:10.1186/s12943-023-01719-9.
- [34] Ding SN, Qiao N, Zhu QC, et al. Single-cell atlas reveals a distinct immune profile fostered by T cell-B cell crosstalk in triple negative breast cancer[J]. *Cancer*

- Commun, 2023, 43(6): 661-684.
- [35] Hiscox S, Jiang WG, Obermeier K, et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2): 290-301.
- [36] Mallini P, Lennard T, Kirby J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(3): 341-348.
- [37] Yu JL, Yan YJ, Li SS, et al. Progesterone-driven B7-H4 contributes to onco-fetal immune tolerance[J]. Cell, 2024, 187(17): 4713-4732.
- [38] Tsai SM, Wu SH, Hou MF, et al. The immune regulator VTCN1 gene polymorphisms and its impact on susceptibility to breast cancer[J]. J Clin Lab Anal, 2015, 29(5): 412-418.
- [39] Li L, Huang GM, Banta AB, et al. Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene[J]. Genomics, 1998, 51(1): 45-58.
- [40] Callahan R, Raafat A. Notch signaling in mammary gland tumorigenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001, 6(1): 23-36.
- [41] Gallahan D, Jhappan C, Robinson G, et al. Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis[J]. Cancer Res, 1996, 56(8): 1775-1785.
- [42] Lombardo Y, Faronato M, Filipovic A, et al. Nicastrin and Notch4 drive endocrine therapy resistance and epithelial to mesenchymal transition in MCF7 breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3): R62. doi:10.1186/bcr3675.
- [43] Bui QT, Im JH, Jeong SB, et al. Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 390: 115-125. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.014.
- [44] Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134.
- [45] Li YQ, Wu YY, Abbatiello TC, et al. Slug contributes to cancer progression by direct regulation of ER α signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2015, 46(4): 1461-1472.
- [46] Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 91. doi:10.1186/1471-2407-12-91.
- [47] Jin ML, Yang L, Jeong KW. SETD1A-SOX2 axis is involved in tamoxifen resistance in estrogen receptor α -positive breast cancer cells[J]. Theranostics, 2022, 12(13): 5761-5775.
- [48] Gwak JM, Kim M, Kim HJ, et al. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance[J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 36305-36318.
- [49] Zamzam Y, Abdelmonem Zamzam Y, Aboalsoud M, et al. The utility of SOX2 and AGR2 biomarkers as early predictors of tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer patients[J]. Int J Surg Oncol, 2021, 2021: 9947540. doi:10.1155/2021/9947540.
- [50] Mohd Idris RA, Mussa A, Ahmad S, et al. The effects of tamoxifen on tolerogenic cells in cancer[J]. Biology, 2022, 11(8): 1225. doi:10.3390/biology11081225.
- [51] Zhang RN, Yang YJ, Dong WJ, et al. D-mannose facilitates immunotherapy and radiotherapy of triple-negative breast cancer via degradation of PD-L1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(8): e2114851119. doi:10.1073/pnas.2114851119.
- [52] Andrews LP, Somasundaram A, Moskovitz JM, et al. Resistance to PD1 blockade in the absence of metalloprotease-mediated LAG3 shedding[J]. Sci Immunol, 2020, 5(49): eabc2728. doi:10.1126/sciimmunol.abc2728.
- [53] Oner G, Broeckx G, Van Berckelaer C, et al. The immune microenvironment characterisation and dynamics in hormone receptor-positive breast cancer before and after neoadjuvant endocrine therapy[J]. Cancer Med, 2023, 12(17): 17901-17913.
- [54] Arneith B. Tumor microenvironment[J]. Medicina (Kaunas), 2019, 56(1): E15. doi:10.3390/medicina56010015.
- [55] Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(4): 338-344.
- [56] Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(10): 611-629.
- [57] Atashzar MR, Baharlou R, Karami J, et al. Cancer stem cells: a review from origin to therapeutic implications[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 790-803.
- [58] Méry B, Rancoule C, Guy JB, et al. Cancer stem cells: radiotherapeutic features and therapeutic targets[J]. Bull Cancer, 2016, 103(1): 48-54.
- [59] Abrahamsson A, Rodriguez GV, Dabrosin C. Fulvestrant-mediated attenuation of the innate immune response decreases ER+ breast cancer growth in vivo more effectively than tamoxifen[J]. Cancer Res, 2020, 80(20): 4487-4499.