

## 组织蛋白酶 A 维持肿瘤干细胞性状促进三阴性乳腺癌发生发展

吴 洁, 张婷婷, 李 珂\*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** 三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 侵袭性强、复发率高且缺乏有效的治疗方法, 是预后最差的乳腺癌亚型, 因此寻找针对 TNBC 的有效靶向疗法成为当务之急。组织蛋白酶 A (cathepsin A, CTSA) 是一种酸性丝氨酸羧肽酶, 在多种肿瘤组织中高表达, 但是 CTSA 在 TNBC 中的作用及机制尚不明确。本研究发现 CTSA 在 TNBC 中表达上调, 高表达的 CTSA 与 TNBC 患者不良预后呈现正相关。实验结果进一步显示, 敲低 CTSA 抑制 TNBC 细胞的增殖、侵袭和克隆形成能力, 提高其药物敏感性, 抑制 TNBC 疾病进展。机制研究表明, CTSA 通过阻碍早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 与其 E3 泛素连接酶 RNF4 相互作用, 抑制 PML 蛋白泛素化和降解, 进而维持 PML 核小体 (PML nuclear bodies, PML-NBs) 结构稳定性。体外结果显示, CTSA 抑制剂具有抑制 TNBC 干细胞性状的治疗效果。综上, 本研究表明抑制 CTSA 促进 PML 的降解可能作为 TNBC 的潜在治疗策略。本实验所有动物实验获得中国医学科学院医药生物技术研究所伦理委员会批准 (批准号: IMB-20240326D502)。

**关键词:** 三阴性乳腺癌; 组织蛋白酶 A; PML-NBs; 肿瘤干细胞; 泛素化

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2020-10

## Cathepsin A maintains the characteristics of tumor stem cells and promotes the occurrence and development of triple-negative breast cancer

WU Jie, ZHANG Ting-ting, LI Ke\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is a subtype of breast cancer known for the poor prognosis due to its strong invasiveness, high recurrence rate, and lack of effective treatment. Therefore, there is an urgent need to find targeted therapy for TNBC. Cathepsin A (CTSA) is an acidic serine carboxypeptidase that is highly expressed in various tumor tissues. However, the role and molecular mechanism of CTSA in TNBC are still unclear. This study found that the expression of CTSA was upregulated, and the high expression of CTSA was positively correlated with the poor prognosis of TNBC. The results further showed that knocking down CTSA inhibited the proliferation, invasion, and colony formation of TNBC cells, improved drug sensitivity of cells, and inhibited the progression of TNBC. Mechanistically, CTSA inhibited the ubiquitination and degradation of the promyelocytic leukemia protein (PML) protein by blocking the interaction between PML and its E3 ubiquitin ligase RNF4, thus maintaining the stability of PML nuclear bodies (PML-NBs). The inhibitor of CTSA had a positive therapeutic effect on inhibiting the characteristics of TNBC stem cells. In conclusion, this study

收稿日期: 2024-04-27; 修回日期: 2024-05-17.

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFA1106100); 国家自然科学基金资助项目 (82222070).

\*通讯作者 E-mail: like1986@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0406

demonstrates that inhibiting CTSA to decrease the stability of PML protein may be a promising therapeutic strategy for TNBC. All animal experiments in this experiment were approved by the Ethics Committee of Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College (approval number: IMB-20240326D502).

**Key words:** triple-negative breast cancer; cathepsin A; PML-NBs; cancer stem cell; ubiquitination

乳腺癌 (breast cancer, BC) 作为一种高度异质性的恶性肿瘤, 是全球女性癌症相关死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。临床上根据雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和人表皮生长因子受体 2 (HER2) 的表达状态对乳腺癌进行分类, 以指导治疗决策<sup>[2]</sup>。其中, 三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 因 3 种激素受体皆为阴性而无法使用内分泌和抗 HER2 治疗<sup>[3]</sup>。常规的细胞毒性化疗仍然是 TNBC 唯一可用的治疗方法, 并且大部分 TNBC 患者会产生耐药性而导致治疗失败<sup>[4]</sup>。由于侵袭性强、复发率较高且缺乏针对性的治疗方法, TNBC 患者的预后较其他亚型患者更差<sup>[3,5,6]</sup>。因此, 深入研究 TNBC 发病机制并进一步发现潜在治疗靶点迫在眉睫。

组织蛋白酶, 即溶酶体蛋白水解酶, 是存在于大多数动物组织中的细胞内肽键水解酶<sup>[7]</sup>。人体中存在 11 种组织蛋白酶, 其中组织蛋白酶 A (cathepsin A, CTSA) 是一种酸性丝氨酸羧基蛋白酶, 对脱酰胺酶、酯酶和羧基蛋白酶具有独特的水解活性<sup>[8]</sup>。CTSA 在肿瘤和其他疾病中异常表达<sup>[9-11]</sup>。一方面, CTSA 通过与溶酶体糖苷酶形成多酶复合物维持糖苷酶活性, 其缺失将导致半乳糖贮积症<sup>[12]</sup>。另一方面, CTSA 也可以直接降解内皮素调节血管张力, 其缺失或者低表达会提高高血压的患病风险<sup>[13]</sup>。目前, 越来越多的研究表明 CTSA 在恶性肿瘤中发挥重要作用。在肝癌中, 血清中的 CTSA 可以作为肝病诊断指标物, 并且 CTSA 高表达与肝癌患者的不良预后相关<sup>[14]</sup>。过表达 CTSA 促进前列腺癌细胞的生长、迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。相比于正常的乳腺组织, 乳腺肿瘤组织中的 CTSA 高表达, 且其高表达与乳腺癌导管原位癌患者的不良预后相关<sup>[16]</sup>。以上结果提示, CTSA 与乳腺癌发生发展存在相关性, 但其具体机制并不明确。

早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 于 1957 年首次在患有急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 患者中发现<sup>[17]</sup>。PML 蛋白通过 RBCC 区域募集 120 多种伙伴蛋白, 促使伙伴蛋白发生多种翻译后修饰, 进而调节细胞分化、增殖、凋亡、病毒感染、衰老、DNA 修复、RNA 转运等多种生命活动<sup>[18-22]</sup>。长期以来 PML 被认为是肿瘤

抑制因子, 其抑制活性在肺癌、结直肠癌、前列腺癌和膀胱癌等多种癌症类型中得到证实<sup>[23]</sup>。PML 通过调节细胞周期、细胞凋亡、衰老、迁移、血管生成和 DNA 修复途径发挥其肿瘤抑制功能<sup>[24]</sup>。然而, 近期研究发现 PML 在 TNBC、慢性粒细胞白血病及胶质母细胞瘤中高表达, 并且促进肿瘤的发生发展<sup>[25-27]</sup>。在 TNBC 中, PML 通过调控缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  活性和干性基因 SOX9 表达驱动 TNBC 生长和转移<sup>[28,29]</sup>。因此, 靶向 PML 并探索其表达调控的具体机制, 可能为 PML 高表达的乳腺癌等疾病带来新的治疗选择。

首先, 本研究通过数据库和蛋白免疫印迹实验检测 CTSA 在不同乳腺癌亚型中的表达以及 CTSA 和不同乳腺癌亚型患者预后的关系, 提示 CTSA 可能在 TNBC 发生发展中发挥调节作用。随后通过体外增殖、侵袭、成球、半数抑制浓度检测实验、体内皮下模型和有限稀释实验检测 CTSA 对于 TNBC 的调控作用, 结果发现 CTSA 通过维持 TNBC 细胞干性和生长能力促进 TNBC 发生发展。机制上, 本研究通过基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)、实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹实验、免疫共沉淀和激光共聚焦实验解析 CTSA 通过影响 E3 泛素连接酶 RNF4 与 PML 的相互作用, 抑制 PML 泛素化和降解, 维持 PML 核小体 (PML nuclear bodies, PML-NBs) 结构稳定性, 进而促进 TNBC 的发生发展。最后, 本研究以 PML 的抑制剂作为对照检测 CTSA 抑制剂对 PML 表达、细胞增殖、侵袭、成球的作用, 进一步证明 CTSA 通过 PML 蛋白及其下游信号分子促进 TNBC 的发生发展。本研究不仅表明 CTSA 是 TNBC 的潜在治疗靶点, 并为其治疗提供潜在的理论基础和治疗策略。

## 材料与方法

**细胞** MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 HEK293T 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

**质粒** *PLVX*-shRNA2 vector 购自 Clontech 公司; *CTSA*-shRNA vector 为实验室构建; *UB-HA* 质粒购自 Sino Biological 公司。

**试剂及仪器** 紫杉醇 (HY-B0015-33770)、盐酸多柔比星 (HY-15142-251055) 和 lactacystin (HY-16594-

149751) 购自 MedChemExpress;  $As_2O_3$  (BCBL4498V) 购自 Sigma-Aldrich; CCK-8 (T005-00000005) 购自上海陶术生物科技有限公司; 纤维连接蛋白 (354008) 购自康宁公司; CTSA antibody (GR80644-1) 购自 Abcam 公司; PML protein antibody (D115252-1) 购自 Novus Biologicals 公司; PMSF (#8553S) 购自 Cell Signaling Technology 公司; DMEM/F12 (11320033)、B27 (17504044)、基本成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)(100-18B-1MG)、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF)(AF-100-15-1MG) 和 FBS (30067334) 购自 Gibco 公司; 兔二步法检测试剂盒 (PV-6001) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RNA 快速提取试剂盒 (RN001-50Rxns) 购自 ES Science 公司; SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒 (E096-01A) 和 NovoScript®Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒 (E047-01A) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 蛋白酶抑制剂 (539134)、24 孔悬挂式细胞培养小室 (PTHT24H48) 和 RIPA 裂解液 (20-188) 购自德国 Merck Millipore 公司; 实验相关 qPCR 引物序列 (CTSA、PML、GAPDH) 来源于 Origene 官网; DYY-7C 型电泳仪购自北京六一生物技术有限公司; 电泳仪及湿转系统购自美国 Bio-Rad 公司; Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能生命科学有限公司; ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; CKX41 倒置显微镜、CX33 显微镜购自日本 Olympus 公司。

**病毒包装** 将慢病毒骨架蛋白 5.4  $\mu\text{g}$  pMD2.G、2.7  $\mu\text{g}$  psPAX2 以及 10.6  $\mu\text{g}$  目标质粒加入至无血清 DMEM 培养基, 再加入 153  $\mu\text{L}$  PEI 转染试剂并温和混匀, 静置 10 min, 将其均匀地添加到接种有 Lenti-X 293T 细胞的 15 cm 细胞培养皿中, 培养 48 h 后, 收集上清, 加入 6 $\times$ 病毒浓缩试剂, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜静置, 次日 3 500  $\times\text{g}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 25 min, 按照原体积的 1/50 加入完全培养基重悬沉淀, 分装置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**免疫组化实验 (immunohistochemistry, IHC)** 将患者组织石蜡切片 (临床伦理批号: AZLL022020018200116) 放于 56  $^{\circ}\text{C}$  烤箱中过夜后, 浸泡在二甲苯中 30 min, 随后依次在 100%、95%、90%、85%、80%、75% 乙醇中静置 3 min; 依次经过抗原修复 20 min, 0.5% Triton X-100 透化 20 min, 过氧化氢阻断 10 min, 3% BSA 封闭液室温孵育 30 min; 滴加一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 润洗 3 次; 滴加二抗, 室温孵育 2 h, PBS 润洗 3 次; 滴加 DAB, 室温孵育 15 min, PBS 冲洗; 苏木素室温孵育 2 min, 盐酸酒精冲洗, 流水返蓝 1 h; 脱水后中性树脂封片, 最后使用显微镜拍摄。

**半数抑制浓度检测** 细胞计数并接种至 96 孔板; 紫杉醇和盐酸多柔比星分别从 1 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  开始等比梯度稀释 10 个浓度, 每组 4 个复孔; 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内孵育 2 h, 在酶标仪 450 nm 下测定光密度, 用 GraphPad Prism 6.0 计算半数抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )。

**增殖实验** 细胞计数后以每孔 3 000 个细胞铺入 96 孔板, 每天在 6 个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内孵育 2 h, 在酶标仪 450 nm 下测定光密度, 连续测量 5 天。

**蛋白免疫印迹实验** 收集细胞, RIPA 裂解液提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 加入 5 $\times$ loading, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, SDS-PAGE 电泳后进行湿转, 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h; 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 1:1 混合 ECL 发光液后使用 Tanon 发光成像系统进行曝光及图像采集。

**实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)** 采用 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA 进行定量; 根据 NovoScript®Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 说明书进行逆转录反应; 根据 NovoStart SYBR Qpcr SuperMix Plus 说明书进行 qPCR 反应。

**乳腺癌原位模型** 雌性 BALB/c-nu 小鼠, SPF 级别, 20  $\pm$  0.2 g, 6~8 周龄, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [许可证号: SCXK (京) 2020-0004]。乳腺癌原位模型制备方法: 将感染 *shNTC* 和 *shCTSA* 的 MDA-MB-231 细胞分别接种于小鼠的第四乳腺, 每只小鼠接种  $1\times 10^7$  个细胞, 期间量瘤计数, 23 天后取材<sup>[30]</sup>。本研究动物实验在中国医学科学院医药生物技术研究所进行, 经中国医学科学院医药生物技术研究所伦理审查委员会批准 (动物伦理批号为 IMB-20240326D502)。

**克隆形成实验** 将 MDA-MB-231 细胞铺在低吸附的 96 孔板上, 共 7 组, 组别为对照组 1、加 *shCTSA1* 病毒、加 *shCTSA2* 病毒; 对照组 2、5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $As_2O_3$ 、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  lactacystin、5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $As_2O_3$  + 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  lactacystin, 每组 3 个复孔, 每孔 500 个细胞和 100  $\mu\text{L}$  培养基, 培养基为 DMEM/F12, B27 (50 $\times$ ), 20 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$  bFGF, 20 ng $\cdot\text{mL}^{-1}$  EGF; 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $CO_2$  条件下培养 10 天, 利用显微镜观察细胞球的形态和成长情况<sup>[31]</sup>。

**侵袭实验** 将 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  纤维连接蛋白均匀铺于 24 孔悬挂式细胞培养小室外侧, 吹干, 将细胞接种于上室, 每孔  $8\times 10^4$  个细胞, 下室加入 600  $\mu\text{L}$  完全培养

基, 药物处理 12 h 后, 对迁移细胞进行染色和计数。

**有限稀释实验 (limiting dilution assay, LDA)** 雌性 BALB/c-nu 小鼠, SPF 级别,  $20 \pm 0.2$  g, 6~8 周龄, 购自北京华卓康生物科技股份有限公司 [许可证号: SCXK (京) 2020-0004]。将 *shNTC* 和 *shCTSA* 的 MDA-MB-231 细胞计数后梯度接种于小鼠的第四乳腺, 梯度为  $2 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$  个细胞/只, 期间统计不同组别不同梯度的成瘤率<sup>[32]</sup>。

**免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, Co-IP)** 冰上收集细胞, 每皿细胞加入 0.5 mL 裂解液 (预先加入蛋白酶抑制剂与 PMSF), 冰上孵育 30 min 后,  $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 30 min, 吸取上清, 取 40  $\mu\text{L}$  留作 Input, 加入 10  $\mu\text{L}$   $5 \times \text{loading}$ ,  $98\ ^\circ\text{C}$  变性 10 min; 剩余上清加入 5  $\mu\text{L}$  抗体,  $4\ ^\circ\text{C}$  缓慢旋转过夜。次日, 加入抗体偶联的磁珠, 在磁力架上用清洗液清洗 5 遍, 小心吸除上清, 加入 30  $\mu\text{L}$   $2 \times \text{loading}$ ,  $98\ ^\circ\text{C}$  变性 10 min; 随后使用蛋白免疫印迹检测与目标蛋白相互作用的蛋白质。

**统计学分析** 本课题中所有实验数据均采用 SPSS 软件进行统计分析。两组间参数对差异比较采用非配对 Student's *t* 检验; 两组以上参数之间的差异采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 进行比较。所有数据均采用平均值 (mean)  $\pm$  均值标准误 (standard error of mean, SEM) 表示。

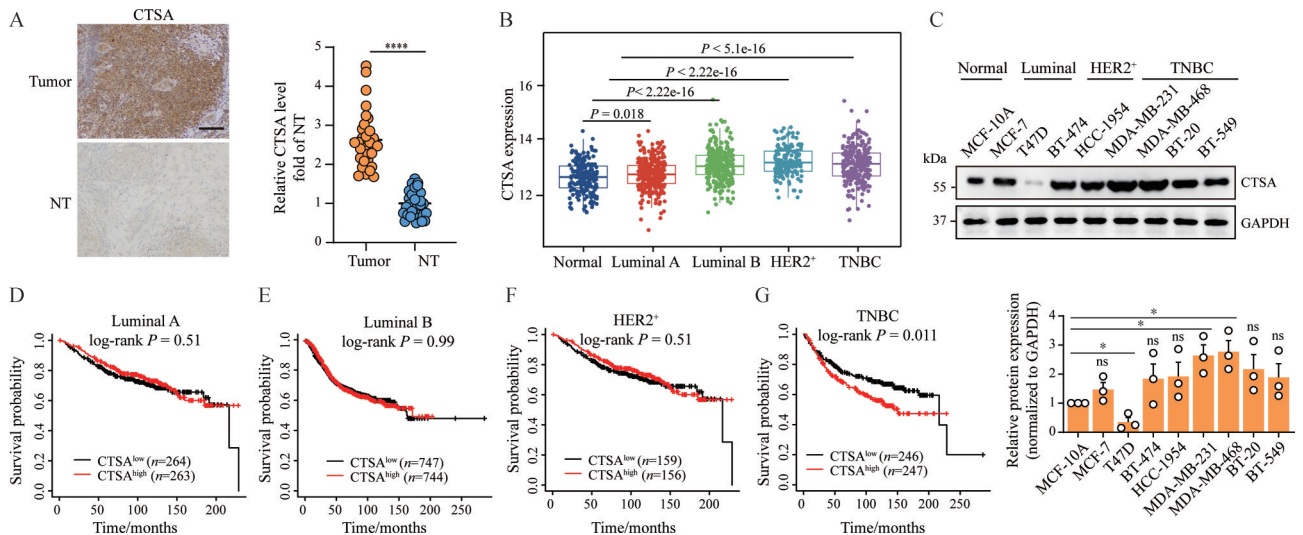
## 结果

### 1 CTSA 在 TNBC 中亚型特异性高表达

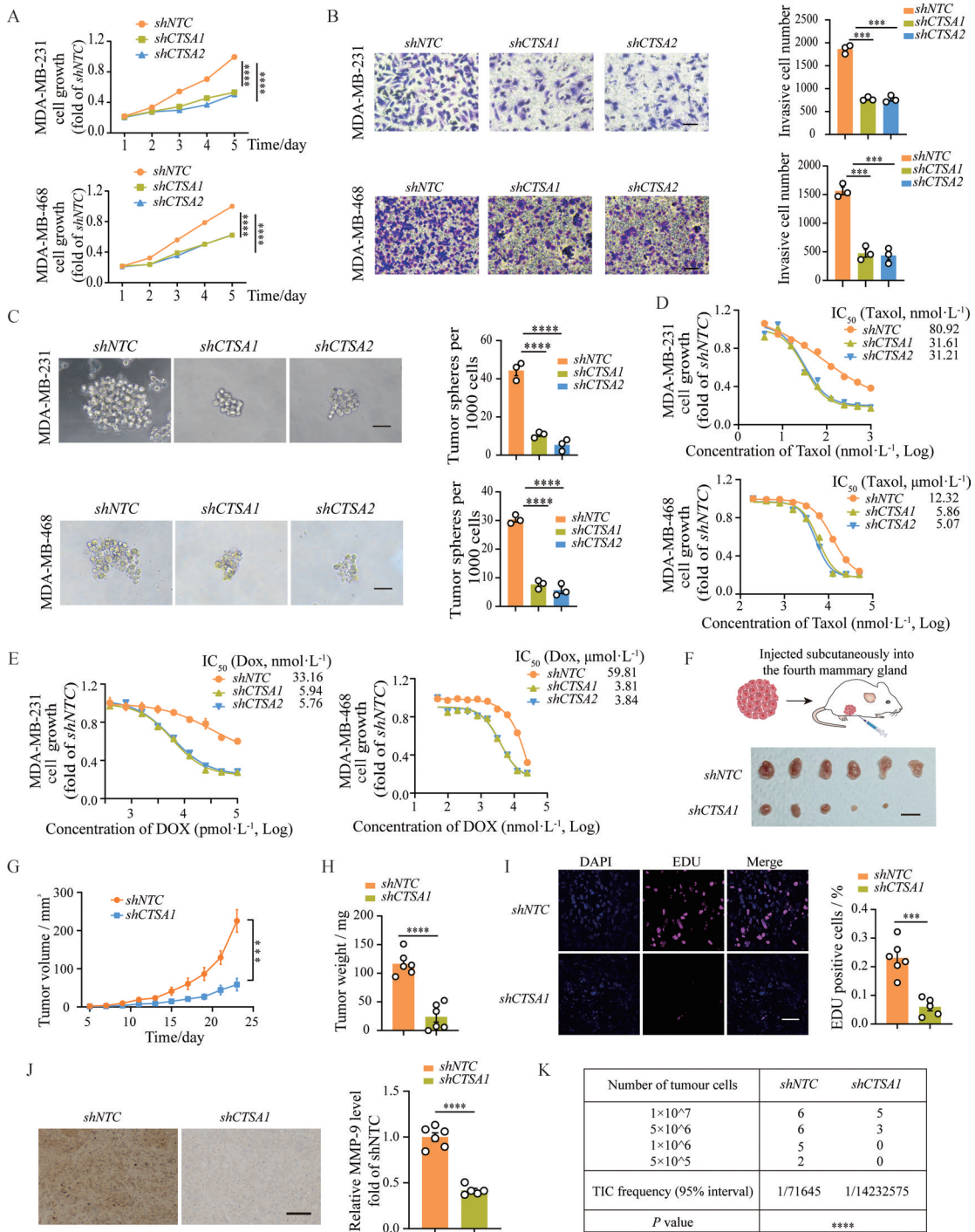
本研究首先通过免疫组化对乳腺癌患者肿瘤和癌旁组织染色, 结果显示, 相比于正常组织, 肿瘤组织中 CTSA 蛋白表达水平显著升高 (图 1A)。随后在基因表达谱交互式分析平台 (gene expression profiling interaction analysis, GEPIA) 分析不同乳腺癌亚型患者中 CTSA 的表达, 结果发现 HER2<sup>+</sup> 和 TNBC 患者中 CTSA 高表达 (图 1B)。蛋白免疫印迹实验显示, 相比于正常乳腺上皮细胞和激素受体阳性 (luminal) 型乳腺癌细胞株, CTSA 在 TNBC 和 HER2<sup>+</sup> 细胞中蛋白水平较高 (图 1C)。同时利用 Kaplan-Meier Plotter 分析 CTSA 和不同乳腺癌亚型患者生存时间的关系, 发现 CTSA 和 TNBC 患者不良预后呈正相关, 但是与其他亚型乳腺癌患者的不良预后没有显著相关性 (图 1D~G)。以上结果提示, CTSA 可能在 TNBC 发生发展中发挥调节作用。

### 2 CTSA 通过维持肿瘤细胞干性和生长能力促进 TNBC 疾病进展

为了进一步探究 CTSA 在 TNBC 发生发展中的作用, 本研究利用短发卡 RNA 质粒 (*shCTSA*) 构建稳定敲低 CTSA 的 MDA-MB-231 细胞和 MDA-MB-468 细胞。CCK-8 和 Transwell 检测结果显示, 敲低 CTSA 抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的增殖活性 (图 2A) 和侵袭能力 (图 2B); 此外, 克隆形成实验显示敲低 CTSA 显著抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468



**Figure 1** The subtype-specific high expression of cathepsin A (CTSA) in triple-negative breast cancer (TNBC). A: Immunohistochemistry (IHC) analysis revealed the expression of CTSA in the tumor tissue and normal tissue of breast cancer (BC) patients ( $n = 30$ ). Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ ; B: The GEPIA database showed expression of CTSA in normal and different subtypes of BC patients; C: Western blot validation of CTSA expression in different subtypes of BC cells; D~G: Kaplan-Meier survival curves stratified by CTSA expression were generated for different subtypes of BC patients. In A, statistical significance between two groups was determined with two-tailed student's *t* test. In B and C, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. In D to G, statistical significance was determined with log-rank test. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  \*\*\*\* $P < 0.0001$



**Figure 2** *CTSA* promotes development and progression of TNBC by supporting cancer stem cell traits. **A**: The relative viability of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells was measured by a CCK-8 assay at the indicated times ( $n = 4$ ); **B**: Representative images and quantification of the invasion assay results for MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells transduced with *shNTC*, *shCTSA1*, and *shCTSA2* are shown. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ ; **C**: Quantification of tumor spheres formed by MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells with *shNTC* and *shCTSA*; **D**, **E**: The effect of *shCTSA* on Taxol and doxorubicin (Dox) sensitivity in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. The data are a summary of the  $\text{IC}_{50}$  values for Taxol and Dox in the *shCTSA* cell lines ( $n = 4$ ); **F**: Effects of *CTSA* on tumor formation from transplanted MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells with *shNTC* and *shCTSA* in nude mice were examined ( $n = 6$ ). Images of tumors are provided; **G**, **H**: Effects of *CTSA* deletion on tumor growth (**G**) and weight (**H**) in nude mice; **I**: 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) in tumor were evaluated by immunofluorescence analysis (IF). Scale bar, 30  $\mu\text{m}$ ; **J**: IHC analysis revealed the expression of MMP-9 in the *shNTC* and *shCTSA* tumor tissue. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ ; **K**: Effects of *CTSA* on the tumor incidence. In **A** to **E**, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. In **F** to **J**, statistical significance between two groups was determined by two-tailed student's *t* test. In **K**, the *P* value was obtained by Pearson's  $\chi^2$  test using extreme limiting dilution analysis (ELDA) software. Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\*\* $P < 0.0001$

细胞的克隆形成能力(图2C)。研究表明治疗耐药性逐渐成为TNBC患者临床治疗上的一个严峻问题,虽然患者在治疗初期对药物有反应,但持续给药往往导致治疗耐药性和不良预后<sup>[33]</sup>。CCK-8实验结果提示,敲低*CTSA*降低TNBC一线化疗药物多柔比星(doxorubicin, Dox)和紫杉醇(Taxol)的 $IC_{50}$ ,显著增加TNBC细胞的化疗药敏感性(图2D、E)。以上结果说明,敲低*CTSA*不仅可以抑制细胞的增殖、侵袭和成球能力,还可以显著提高多柔比星和紫杉醇治疗的敏感性,提示*CTSA*可能通过维持TNBC干细胞活性和功能发挥促进TNBC疾病进展的作用。

为了进一步明确*CTSA*调控肿瘤起始细胞活性促进TNBC发生发展的作用,本研究将对照和敲低*CTSA*的MDA-MB-231细胞分别移植入裸鼠乳腺原位。结果显示,敲低*CTSA*后显著抑制肿瘤的生长(图F~H),表明敲低*CTSA*抑制TNBC细胞的增殖能力。同时,采用免疫荧光检测肿瘤组织切片中的增殖指标5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EDU)和侵袭指标基质金属蛋白酶B(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),结果显示,敲低*CTSA*,肿瘤组织中的EDU和MMP-9表达显著降低,说明敲低*CTSA*通过抑制TNBC细胞的增殖活性(图2I)和侵袭能力(图2J)妨碍TNBC肿瘤生长。随后本研究采用有限稀释实验来评估肿瘤再生能力。结果显示,敲低*CTSA*后肿瘤的发生率明显降低,表明敲低*CTSA*后肿瘤干细胞活性降低(图2K),以上结果表明*CTSA*通过维持TNBC细胞干性和生长能力促进TNBC疾病进展。

### 3 *CTSA*通过阻碍RNF4介导的PML泛素化降解维持其蛋白稳定性

为了进一步探究*CTSA*促进TNBC发生发展的分子机制,本研究通过GSEA分析TNBC患者样本中*CTSA*高表达和低表达组中差异富集的信号通路。结果显示,*CTSA*高表达的样本中*PML*信号通路显著富集(图3A),提示*CTSA*可能通过调控*PML*表达及功能发挥促TNBC作用。通过检测稳定表达Control-shRNA(*shNTC*)和*CTSA*-shRNA(*shCTSA1/shCTSA2*)的MDA-MB-231细胞中*PML*其RNA和蛋白水平,结果发现敲低*CTSA*对*PML*的RNA水平无明显改变(图3B),但显著降低*PML*的蛋白水平(图3C)。研究报道,*PML*调控缺氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 和原癌基因MYC驱动TNBC的生长和转移<sup>[28,34]</sup>。因此本研究检测了敲低*CTSA*对于HIF-1 $\alpha$ 和MYC的蛋白水平影响。结果显示,敲低*CTSA*后,HIF-1 $\alpha$ 和MYC显著降低(图3C)。说明*CTSA*通过上调*PML*下游的信号通路HIF-1 $\alpha$ 和MYC促进TNBC发生发展。*PML*蛋白在细胞中可发

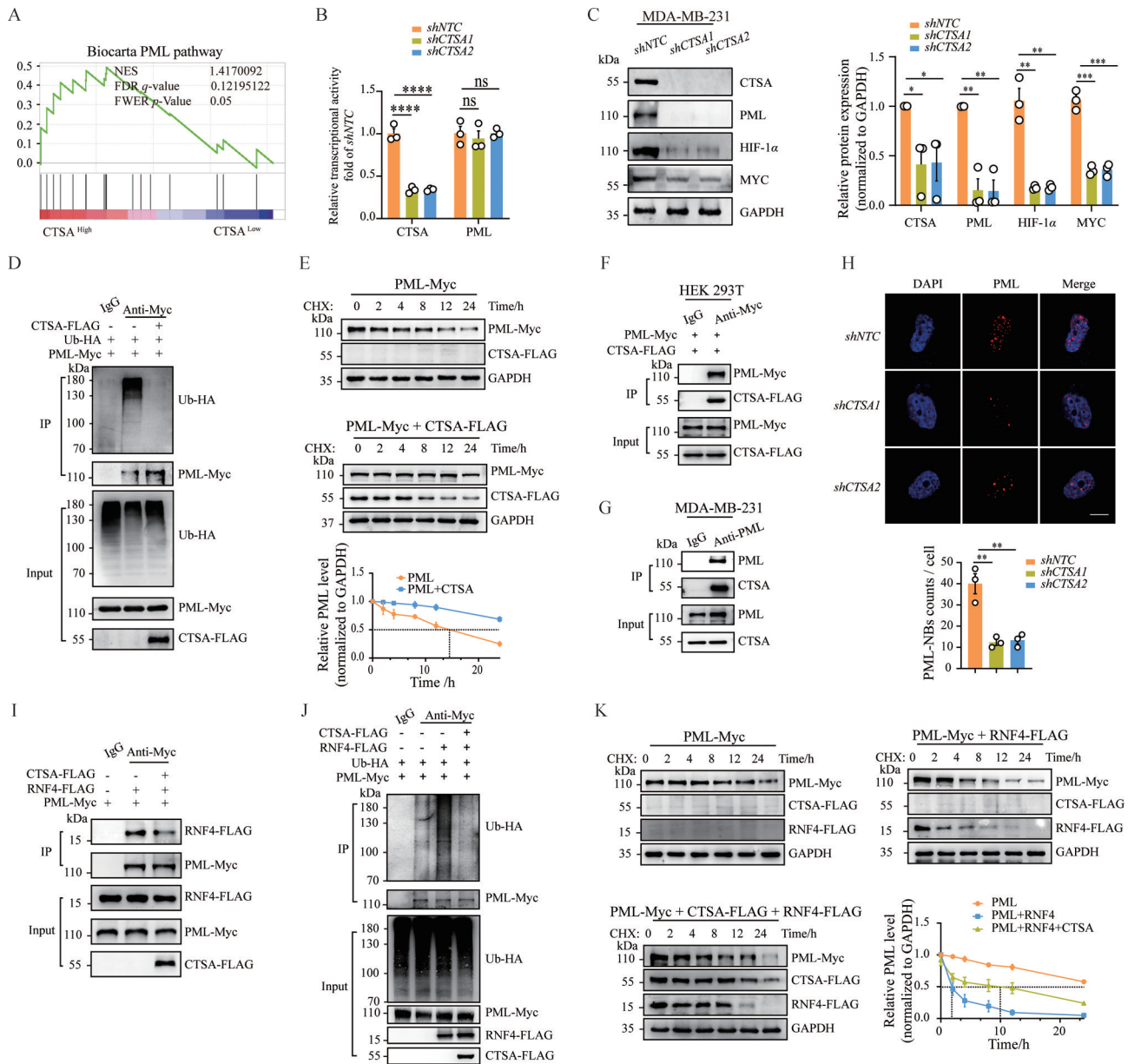
生多种形式的翻译后修饰调控其蛋白稳定性,其中泛素化修饰是一种重要形式<sup>[20]</sup>。因此,本课题组进一步探究*CTSA*是否抑制*PML*蛋白泛素化。免疫共沉淀结果显示,*CTSA*显著抑制*PML*泛素化(图3D),并延长*PML*蛋白的降解半衰期(图3E)。以上结果说明,*CTSA*通过抑制*PML*泛素化降解维持*PML*的蛋白稳定性。

*CTSA*作为组织蛋白酶易与蛋白发生相互作用<sup>[35]</sup>。免疫共沉淀结果显示外源性和内源性*CTSA*与*PML*均存在相互作用(图3F、G)。*PML*蛋白主要定位于核亚细胞器PML-NBs,并且依赖PML-NBs发挥功能<sup>[9]</sup>。激光共聚焦结果显示,敲低*CTSA*后细胞核内PML-NBs数量显著减少(图3H),提示*CTSA*可以维持PML-NBs的稳定性。泛素连接酶E3具有严格的底物识别和泛素链生成特异性,在泛素化过程中扮演了关键的角色<sup>[36]</sup>。为了探索*CTSA*抑制*PML*蛋白泛素化的机制,本研究利用免疫共沉淀实验证实,*CTSA*可以降低*PML*和RNF4的相互作用(图3I),并且抑制由RNF4介导的*PML*泛素化(图3J)和降解(图3K)。以上结果表明,*CTSA*通过阻碍E3泛素连接酶RNF4介导的*PML*泛素化和降解维持其蛋白稳定性。

### 4 *CTSA*通过维持PML蛋白表达及核小体形成促进TNBC细胞增殖、侵袭和成球能力

以上结果表明,*CTSA*在维持肿瘤干细胞性状促进TNBC发生发展中发挥关键作用,提示其可以作为遏制TNBC疾病进展的治疗靶点。因此,本研究进一步检测*CTSA*抑制剂lactacystin在不同时间和浓度下对于*CTSA*和*PML*的影响。Western blot结果表明,lactacystin以时间及剂量依赖性地抑制*CTSA*和*PML*的表达(图4A、B)。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>被报道可以有效靶向促进*PML*蛋白降解<sup>[37]</sup>。因此,以As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作为阳性对照检测*CTSA*抑制剂对*PML*及其下游信号分子表达的作用。结果显示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可以有效降低*PML*、HIF-1 $\alpha$ 和MYC表达,*CTSA*抑制剂不会进一步促进As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>剂对*PML*表达的抑制作用(图4C)。激光共聚焦实验表明,单独给予*CTSA*抑制剂和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>均可以有效降低*PML*核小体数量,但二者联用则不能进一步抑制*PML*核小体形成(图4D)。以上结果说明,*CTSA*的促TNBC作用依赖于*PML*表达及核小体的形成。

本课题组进一步在细胞水平探究*CTSA*抑制剂对于肿瘤细胞生长、侵袭和成球的影响。结果显示,单独给予lactacystin和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>均有效抑制TNBC细胞的增殖(图4E)、侵袭(图4F)和成球能力(图4G)。但是二者联用不能进一步抑制TNBC细胞上述的干细胞性状(图4E~G)。以上结果进一步表明,*CTSA*通过*PML*蛋白促进TNBC细胞增殖、侵袭和成球能力。

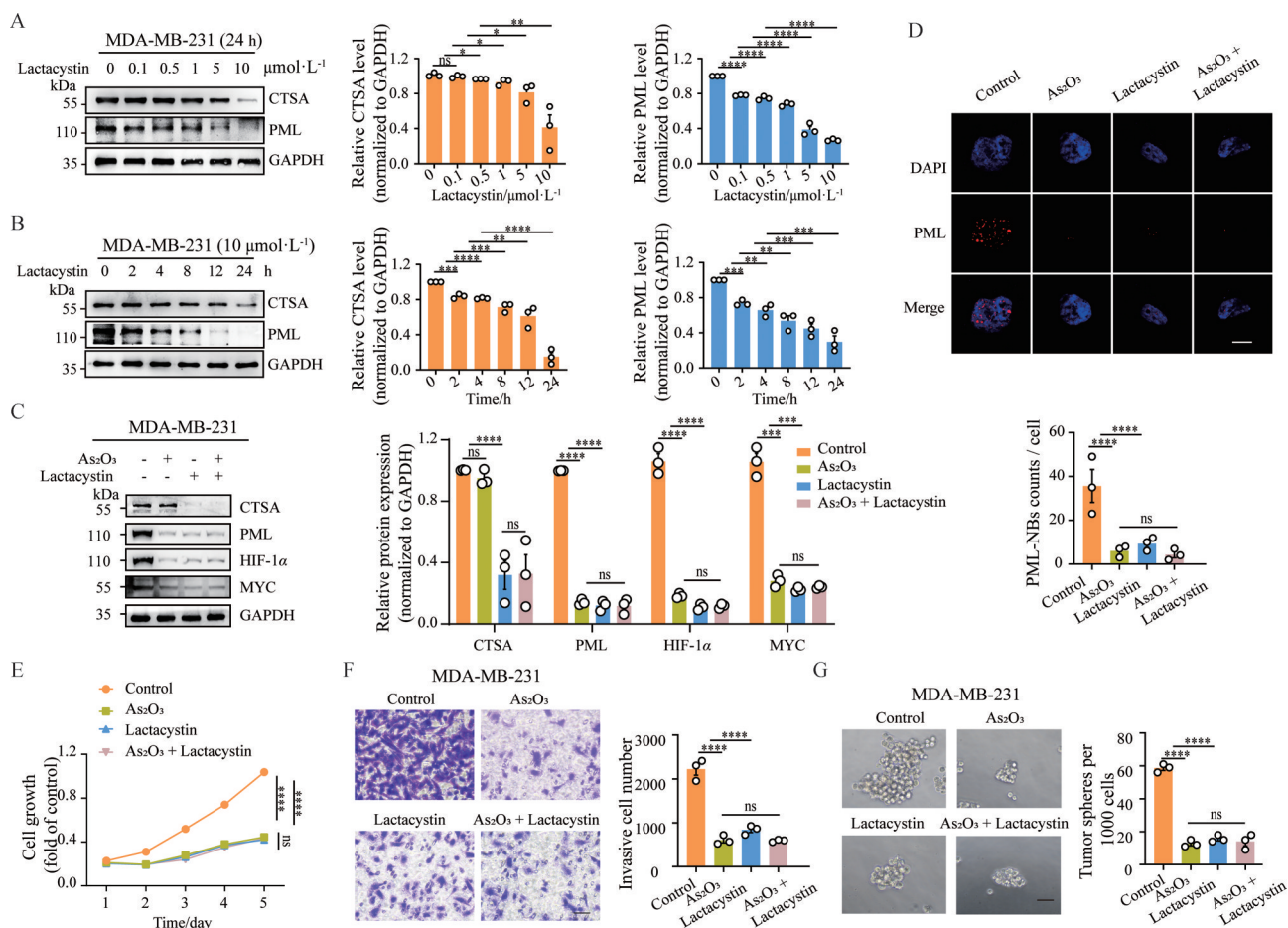


**Figure 3** CTSA maintains protein stability by blocking RNF4-mediated ubiquitination degradation of PML. A: Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed to identify the pathways of CTSA target genes. All gene sets showed a positive normalized enrichment score (NES) and false discovery rate (FDR)  $q$ -values of less than 0.25; B: The mRNA levels of *CTSA* and *PML* were analyzed by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) in *shCTSA1* and *shNTC* MDA-MB-231 cells; C: Western blot validation of CTSA, PML, HIF-1 $\alpha$ , and MYC expression in *shCTSA1*, and *shNTC* MDA-MB-231 cells; D: The effect of CTSA on PML ubiquitylation *in vivo* was assessed in HEK 293T cells; E: Effect of CTSA on PML degradation was investigated in HEK 293T cells treated with cycloheximide (CHX, 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The PML relative quantification is shown; F, G: The interaction between CTSA and PML in HEK 293T cells (F) and MDA-MB-231 cells (G) was evaluated with CO-IP assay; H: PML-NBs in MDA-MB-231 cells was evaluated by IF. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ ; I: The interaction of RNF4 and PML was evaluated with CO-IP assay; J: The effect of CTSA and RNF4 on PML ubiquitylation *in vivo*; K: Effect of CTSA and RNF4 on PML degradation in HEK 293T cells treated with CHX (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The PML relative quantification is shown. In A and E, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. In F to H, Statistical significance between two groups was determined by two-tailed student's  $t$  test. In B, C, H, and K, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

### 讨论

TNBC 具有高度异质性, 与其他乳腺癌亚型相比, 侵袭性更强, 远端转移率更高, 预后效果最差, 并且一

直缺乏有效的治疗靶点, 因此找寻驱动 TNBC 进展的治疗靶点迫在眉睫<sup>[38]</sup>。研究者根据分子特征将 TNBC 分成间充质样、管腔雄激素受体、免疫调节以及基底样



**Figure 4** Effect of lactacystin and  $As_2O_3$  on the expression of PML and cancer stem cell traits of TNBC cells. A, B: Western blot validation of CTSA and PML expression by lactacystin with different concentrations (A) and time (B); C: Western blot validation of CTSA, PML, HIF-1 $\alpha$ , and MYC expression by  $As_2O_3$  ( $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) and lactacystin ( $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ ); D: PML-NBs in MDA-MB-231 cells was evaluated by IF analysis, scale bar, 5  $\mu m$ ; E: Relative viability of MDA-MB-231 cells with  $As_2O_3$  ( $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) and lactacystin ( $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) was measured by a CCK-8 assay at different time; F: Representative images and quantification of the invasion assay results for MDA-MB-231 cells treated with  $As_2O_3$  ( $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) and lactacystin ( $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ ); G: Quantification of tumorspheres treated with  $As_2O_3$  ( $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ ) and lactacystin ( $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ ). Scale bar, 40  $\mu m$ . In A to G, statistical significance among groups was determined by one-way ANOVA. Mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

和免疫抑制4种不同的转录组亚型<sup>[39]</sup>,其中间充质样亚型的靶向治疗结果最差,并显示出癌症干细胞的特征<sup>[39]</sup>,提示肿瘤干细胞可能是导致TNBC预后效果差的主要原因。越来越多研究表明,与非TNBC亚型相比,TNBC富含癌症干细胞<sup>[40-42]</sup>,特异性靶向TNBC干细胞可能是一个潜在治疗策略。本研究通过数据库分析和IHC染色发现,CTSA在TNBC患者以及癌组织中高表达,并且CTSA的高表达与患者的不良预后密切相关,提示CTSA可能在TNBC发生发展中具有调节作用。进一步研究发现,敲低CTSA抑制TNBC细胞增殖、侵袭、耐药等侵袭性表型,肿瘤3D成球实验和有限稀释实验显示,敲低CTSA,TNBC细胞的体外克隆形成能力和体内二次成瘤能力显著降低,说明CTSA通过维持TNBC细胞干性和生长能力促进TNBC疾病

进展。本研究提示靶向CTSA可能是有效消除肿瘤干细胞,改善TNBC患者治疗和预后的有效策略,为TNBC治疗提供新的治疗选择。

CTSA是组织蛋白酶家族成员之一,主要存在于溶酶体中,具有水解蛋白活性<sup>[8]</sup>。CTSA最初发现与半乳糖贮积症、高血压、脑卒中等疾病相关,但近期有文献表明,CTSA在转移性结肠癌组织、肝癌组织、前列腺癌、肺腺癌、乳腺癌等肿瘤中显著高表达,并且与患者不良预后相关<sup>[15,16,43,44]</sup>。一方面,CTSA作为一种丝氨酸羧基蛋白酶,其蛋白水解活性可以在肿瘤细胞转移定植过程中直接破坏细胞外基质,促进肿瘤的侵袭和转移。另一方面,CTSA通过其非蛋白水解酶活性调控细胞周期蛋白Cdk2、cyclin B1、增殖蛋白PCNA以及肿瘤抑制基因p53和p21表达,抑制肿瘤细胞周期停

滞、衰老或者凋亡<sup>[45]</sup>。虽然有研究证明 CTSA 在乳腺癌组织中高表达, 并且伴随着淋巴细胞的浸润, 但是 CTSA 促进 TNBC 发生发展的机制研究尚未可知<sup>[16]</sup>。本研究发现 CTSA 通过妨碍 RNF4 介导 PML 降解参与调控 PML 蛋白泛素化及核小体的形成, 维持 PML 稳定性进而促进 TNBC 疾病进程。该研究可能为 TNBC 的治疗提供潜在的理论基础和策略。

PML 蛋白在肿瘤中发挥双重作用, 在 APL、肺癌、结肠癌等肿瘤中发挥抑癌因子作用, 而在慢性粒细胞白血病、胶质瘤、乳腺癌中作为肿瘤启动子导致癌症发生<sup>[17,46,47]</sup>。在乳腺癌中, 早期研究发现 PML 在乳腺癌中低表达<sup>[23]</sup>, 但是目前也有研究表明 PML 促进 TNBC 发展和转移<sup>[28]</sup>。这提示 PML 在不同亚型乳腺癌中发挥差异调控作用。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是传统中药砒霜的有效成分之一, 可以与 PML 直接结合, 诱导 PML 寡聚化, 从而增强 PML 的降解, 或者通过产生活性氧的间接途径降解 PML, 达到疾病治疗的作用<sup>[48-50]</sup>。同时 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 也被发现能诱导乳腺癌细胞的凋亡<sup>[51]</sup>, 进一步说明靶向 PML 降解是有效抑制乳腺癌疾病进展的潜在治疗策略。本研究以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作为阳性对照探索 CTSA 抑制剂调控 PML 表达抑制 TNBC 进展的作用。CTSA 抑制剂不会进一步促进 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 PML 表达以及 TNBC 细胞增殖、侵袭和成球能力的抑制作用, 进一步表明, CTSA 通过维持 PML 蛋白表达及核小体形成促进 TNBC 干细胞性状, 驱动肿瘤发生发展。综上所述, 本研究探索了 CTSA/RNF4/PML-NBs 在 TNBC 发生发展中的作用和机制, 为 TNBC 提供潜在治疗靶点, 但是 CTSA 在 TNBC 的高表达原因以及 PML 核小体促进 TNBC 发生发展的机制有待进一步研究。

**作者贡献:** 吴洁负责 Western blot、qPCR、动物实验以及数据整理等实验工作; 张婷婷负责细胞实验和部分数据分析工作; 李珂为文章框架的构思者及负责人。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Pellacani D, Tan S, Lefort S, et al. Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer [J]. EMBO J, 2019, 38: e100330.
- [2] Yeo SK, Guan JL. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor? [J]. Trends Cancer, 2017, 3: 753-760.
- [3] Malorni L, Shetty PB, De angelis C, et al. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136: 795-804.
- [4] Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13: 674-690.
- [5] Billar JA, Dueck AC, Stucky CC, et al. Triple-negative breast cancers: unique clinical presentations and outcomes [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17 Suppl 3: 384-390.
- [6] Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer--current status and future directions [J]. Ann Oncol, 2009, 20: 1913-1927.
- [7] Toss MS, Miligy IM, Gorringer KL, et al. Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 (P4HA2) expression is a predictor of poor outcome in breast ductal carcinoma *in situ* (DCIS) [J]. Br J Cancer, 2018, 119: 1518-1526.
- [8] Nakanishi H. Cathepsin regulation on microglial function [J]. Biochim Biophys Acta Proteom, 2020, 1868: 140465.
- [9] Park S, Huang H, Kwon W, et al. Cathepsin A regulates pluripotency, proliferation and differentiation in mouse embryonic stem cells [J]. Cell Biochem Funct, 2021, 39: 67-76.
- [10] Hohl M, Mayr M, Lang L, et al. Cathepsin A contributes to left ventricular remodeling by degrading extracellular superoxide dismutase in mice [J]. J Biol Chem, 2020, 295: 12605-12617.
- [11] Calhan OY, Seyrantepe V. Mice with catalytically inactive cathepsin A display neurobehavioral alterations [J]. Behav Neurol, 2017, 2017: 4261873.
- [12] Cadaoas J, Hu H, Boyle G, et al. Galactosialidosis: preclinical enzyme replacement therapy in a mouse model of the disease, a proof of concept [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2021, 20: 191-203.
- [13] Zhao X, Chai W, Wang T, et al. Identification of the prognostic, diagnostic, and biological significance of the miR-148a-3p/cathepsin A axis in hepatocellular carcinoma [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36: e23208.
- [14] Wang H, Xu F, Yang F, et al. Prognostic significance and oncogene function of cathepsin A in hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2021, 11: 14611.
- [15] Park S, Kwon W, Park JK, et al. Suppression of cathepsin A inhibits growth, migration, and invasion by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in prostate cancer [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 688: 108407.
- [16] Toss MS, Miligy IM, Haj-ahmad R, et al. The prognostic significance of lysosomal protective protein (cathepsin A) in breast ductal carcinoma *in situ* [J]. Histopathology, 2019, 74: 1025-1035.
- [17] Li Y, Ma X, Wu W, et al. PML nuclear body biogenesis, carcinogenesis, and targeted therapy [J]. Trends Cancer, 2020, 6: 889-906.
- [18] Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor [J]. Cell, 2006, 126: 269-283.
- [19] Li Y, Ma X, Chen Z, et al. B1 oligomerization regulates PML nuclear body biogenesis and leukemogenesis [J]. Nat Commun, 2019, 10: 3789.
- [20] Fracassi C, Ugge M, Abdelhalim M, et al. PML modulates

- epigenetic composition of chromatin to regulate expression of pro-metastatic genes in triple-negative breast cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: 11024-11039.
- [21] Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 1006-1016.
- [22] Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, et al. The mechanisms of PML-nuclear body formation [J]. *Mol Cell*, 2006, 24: 805.
- [23] Gurrieri C, Capodiceci P, Bernardi R, et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96: 269-279.
- [24] Guan D, Kao HY. The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 60.
- [25] Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2008, 453: 1072-1078.
- [26] Carracedo A, Weiss D, Leliaert AK, et al. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3088-3100.
- [27] Wen L, Wang XZ, Qiu Y, et al. SOX2 downregulation of PML increases HCMV gene expression and growth of glioma cells [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19: e1011316.
- [28] Ponente M, Campanini L, Cuttano R, et al. PML promotes metastasis of triple-negative breast cancer through transcriptional regulation of HIF1A target genes [J]. *JCI Insight*, 2017, 2: e87380.
- [29] Martin-martin N, Piva M, Urosevic J, et al. Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12595.
- [30] Rossi M, Altea-manzano P, Demicco M, et al. PHGDH heterogeneity potentiates cancer cell dissemination and metastasis [J]. *Nature*, 2022, 605: 747-753.
- [31] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-marie V. Spherical cancer models in tumor biology [J]. *Neoplasia*, 2015, 17: 1-15.
- [32] Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14: R6.
- [33] Zhao Y, Yu Y, Li X, et al. CCAAT enhancer binding protein delta activates vesicle associated membrane protein 3 transcription to enhance chemoresistance and extracellular PD-L1 expression in triple-negative breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43: 115.
- [34] Arreal L, Piva M, Fernandez S, et al. Targeting PML in triple negative breast cancer elicits growth suppression and senescence [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 1186-1199.
- [35] Gorelik A, Illes K, Mazhab-jafari MT, et al. Structure of the immunoregulatory sialidase NEU1 [J]. *Sci Adv*, 2023, 9: eadf8169.
- [36] Pan M, Zheng Q, Wang T, et al. Structural insights into Ubr1-mediated N-degron polyubiquitination [J]. *Nature*, 2021, 600: 334-338.
- [37] De brackeleer E, Douet-guilbert N, De brackeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review [J]. *Expert Rev Hematol*, 2014, 7: 347-357.
- [38] Deng L, Liao L, Zhang YL, et al. SF3A2 promotes progression and cisplatin resistance in triple-negative breast cancer *via* alternative splicing of MKRN1 [J]. *Sci Adv*, 2024, 10: ead4009.
- [39] Fan L, Wang ZH, Ma LX, et al. Optimising first-line subtyping-based therapy in triple-negative breast cancer (FUTURE-SUPER): a multi-cohort, randomised, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2024, 25: 184-197.
- [40] Ma F, Li H, Wang H, et al. Enriched CD44(+)/CD24(-) population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC)[J]. *Cancer Lett*, 2014, 353: 153-159.
- [41] Li H, Ma F, Wang H, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) -expressing cells are enriched in triple-negative breast cancer [J]. *Int J Biol Markers*, 2013, 28: e357-e364.
- [42] Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10: R53.
- [43] Ni S, Weng W, Xu M, et al. miR-106b-5p inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer by targeting CTSA [J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 3835-3845.
- [44] Du Z, Liu X, Wei X, et al. Quantitative proteomics identifies a plasma multi-protein model for detection of hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 15552.
- [45] Joe AK, Liu H, Suzui M, et al. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 893-903.
- [46] Tampakaki M, Oraiopoulou ME, Tzamali E, et al. PML differentially regulates growth and invasion in brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 6289.
- [47] Gentric G, Kieffer Y, Mieulet V, et al. PML-regulated mitochondrial metabolism enhances chemosensitivity in human ovarian cancers [J]. *Cell Metab*, 2019, 29: 156-173.e10.
- [48] Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML [J]. *Science*, 2010, 328: 240-243.
- [49] Niwa-kawakita M, Wu HC, Thé H, et al. PML nuclear bodies, membrane-less domains acting as ROS sensors? [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 29-34.
- [50] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB<sub>4</sub> cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins [J]. *Blood*, 1996, 88: 1052-1061.
- [51] Wang Y, Zhang Y, Yang L, et al. Arsenic trioxide induces the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through activation of caspase-3 and inhibition of HERG channels [J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2: 481-486.