

囊泡转运因子USO1通过mTOR/4EBP1信号通路 调控三阴性乳腺癌细胞的增殖

裴延庆^{1*} 陈晓南²

(¹山东第一医科大学附属山东省肿瘤医院肿瘤内科, 济南 250014;

²山东第一医科大学附属山东省肿瘤医院乳腺外科, 济南 250014)

摘要 为了探究囊泡转运因子USO1在三阴性乳腺癌中的作用和机制, 该研究首先比较不同乳腺癌细胞株中USO1的表达水平, 然后选择MDA-MB-231和MDA-MB-453两种细胞, 采用慢病毒和质粒转染构建USO1低表达和过表达的细胞系。采用RT-PCR检测USO1的mRNA表达水平, Western blot检测蛋白表达水平, CCK-8检测细胞增殖活性, 集落实验检测细胞集落形成能力, 流式细胞术检测细胞周期, 以及裸鼠荷瘤实验检测肿瘤生长。结果表明, USO1在乳腺癌组织中表达升高, 与患者的不良预后密切相关, 并且USO1在TNBC细胞和组织中的表达水平高于non-TNBC细胞和组织。敲低USO1可导致细胞周期G₁/S期阻滞, 抑制TNBC细胞增殖、集落形成能力以及荷瘤生长。敲低或过表达USO1抑制或促进p-mTOR、p-4EBP1、Cyclin D和Cyclin E等蛋白的表达。综上所述, USO1通过激活mTOR/4EBP1信号通路加速TNBC细胞周期G₁/S期转换, 从而促进肿瘤生长, 是TNBC的潜在治疗靶点。

关键词 USO1; 三阴性乳腺癌; 细胞增殖; 细胞周期; mTOR

Vesicle Transporter USO1 Regulates Triple Negative Breast Cancer Cell Growth through mTOR/4EBP1 Pathway

PEI Yanqing^{1*}, CHEN Xiaonan²

(¹Department of Oncology, Shandong Cancer Hospital and Institute, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250014, China; ²Department of Breast Surgery, Shandong Cancer Hospital and Institute, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250014, China)

Abstract To explore the role and mechanism of USO1 in TNBC (triple negative breast cancer), this study first compared the expression level of USO1 in different breast cancer cells, and selected MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells to construct USO1 knockdown and overexpression cell lines. The mRNA expression level of USO1 was detected by RT-PCR, protein expression level was detected by Western blot, cell proliferation activity was detected by CCK-8, colony formation ability was detected by colony assay, cell cycle was detected by flow cytometry, and tumor growth was detected by tumor bearing assay in nude mice. The results showed that USO1 expression was elevated in breast cancer tissues, which was closely associated with poor prognosis of the patients, and the expression level of USO1 in TNBC cells was higher than that in non-TNBC cells. Knockdown of USO1 resulted in G₁/S cell cycle arrest and inhibited TNBC cell proliferation, colony formation and tumor-

收稿日期: 2022-01-17 接受日期: 2022-02-28

山东省医学科学院青年基金(批准号: 2018-35)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0531-67626257, E-mail: doctorpeiyyq@126.com

Received: January 17, 2022

Accepted: February 28, 2022

This work was supported by the Youth Fund Project of Shandong Academy of Medical Sciences (Grant No.2018-35)

*Corresponding author. Tel: +86-531-67626257, E-mail: doctorpeiyyq@126.com

bearing growth. Knockdown or overexpression of USO1 inhibits or promotes the expression of p-mTOR, p-4EBP1, Cyclin D and Cyclin E. In conclusion, USO1 accelerates the G₁/S phase transformation of TNBC cell cycle by activating the mTOR/4EBP1 signaling pathway, thus promoting tumor growth, and it is a potential therapeutic target of TNBC.

Keywords USO1; triple negative breast cancer; cell proliferation; cell cycle; mammalian target of rapamycin

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一, 其中10%~20%为三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)^[1]。TNBC的雌激素受体ER、孕激素受体PR和人表皮生长因子受体HER2均为阴性表达, 和其他亚型相比, TNBC的异质性和恶性程度高, 容易发生转移, 并且对内分泌药物和靶向药物治疗不敏感, 总体预后更差^[2-3]。因此, 深入研究TNBC发生发展的机制, 寻找新的分子诊断和治疗靶点对于乳腺癌的治疗具有重要的意义。

囊泡转运因子USO1又被称为P115或TAP, 在内质网和高尔基体之间囊泡转运过程中发挥着重要作用^[4-5]。近年来, 已有文献报道, USO1在胃癌^[6]、结直肠癌^[7]以及多发性骨髓瘤^[8]等多种恶性肿瘤中高表达, 并与肿瘤的发生发展密切相关。然而, 目前关于USO1在乳腺癌, 尤其是TNBC中的表达特点和作用机制仍然不清楚。本研究不仅发现USO1在乳腺癌患者中高表达且与患者预后不良密切相关, 还表明USO1在TNBC细胞和组织中表达高于non-TNBC。同时, USO1可能通过激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/4EBP1信号通路加速细胞周期G₁/S期转换而促进TNBC细胞生长, 它是TNBC的潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MCF10A、BT-474、MCF-7、MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞均购自中国科学院细胞库; 雌性裸鼠购自山东省实验动物中心; DMEM高糖培养基、胰酶和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)等购自美国Hyclone公司; CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司; 碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞周期检测试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒、Western封闭液和RIPA裂解液等购自上海碧云天生物科技有限公司; USO1基因的干扰慢病毒和过表达质粒购自广州锐博生物科技有限公司; RNA引物购自上海生工生物

工程有限公司; 逆转录试剂盒和RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent和TRIZOL购自美国Invitrogen公司; Puromycin公司; USO1抗体购自美国Sigma公司; β -actin、p-mTOR、mTOR、p-4EBP1、4EBP1、p-AKT、AKT、Cyclin D和Cyclin E抗体等购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 BT-474、MCF-7、MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞均采用含10% FBS的DMEM高糖培养基培养, MCF10A细胞采用配套的专用培养基, 均置于5% CO₂、37 °C、97%湿度的恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 将MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞消化、吹散并接种于6孔板中, 待细胞密度至50%左右时, 根据两种细胞的MOI值, 加入USO1基因敲低组(shUSO-1: 5'-GCA GCT TTG TAC TAT CCT AAT-3', shUSO-2: 5'-GCA AGG ATC TAG ATC ATA T-3')和对照组慢病毒。12 h后换液, 待细胞密度至90%, 将各组细胞传代培养, 贴壁后采用puromycin进行药筛, 直至获得稳定敲低USO1的细胞株。

1.2.3 细胞增殖活性检测 实验分组为NC组、shUSO-1组和shUSO-2组。将各组细胞消化计数, 以每孔1 000个的密度将细胞接种于96孔板, 置于5% CO₂、37 °C、97%湿度的恒温培养箱中培养。于1天、2天、3天、4天取出96孔板, 对应的每孔加入10 μ L CCK-8试剂, 室温避光孵育2 h后, 用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度值, 并绘制对应的生长曲线。

1.2.4 集落形成实验 实验分组为NC组、shUSO-1组和shUSO-2组。将各组细胞消化计数, 以每孔2 000个的密度将细胞接种于6孔板, 置于5% CO₂、37 °C、97%湿度的恒温培养箱中培养。每隔3天换液, 并观察集落生长情况。14天后, 用4%多聚甲醛固定细胞, 采用结晶紫染色15 min, 拍照并比较各组集落

形成情况。

1.2.5 流式检测细胞周期 实验分组为NC组、shUSO-1组和shUSO-2组。收集各组细胞, PBS清洗重悬细胞后, 加入无水乙醇至最终浓度为75%乙醇, 4 °C静置过夜。PBS清洗重悬细胞, 加入RNAase和PI(工作浓度为50 µg/mL), 室温避光孵育30 min。过滤细胞, 使用流式细胞仪收集并进行分析。

1.2.6 RT-PCR检测mRNA表达 TRIZOL提取各组细胞的总RNA, 并逆转录为cDNA, 按照SYBR Green 10 µL, cDNA 2 µL, 上下游引物各1 µL, 水6 µL的体系进行RT-PCR实验。循环条件: 95 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s, 62 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 共37个循环。引物序列: *USO1* Forward 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3', Reverse 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'; *β-actin* Forward 5'-CGC CGC CAG CTC ACC ATG-3', Reverse 5'-CAC GAT GGA GGG GAA GAC GG-3'。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达 使用RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA试剂盒测量蛋白浓度, 加入加样缓冲液后进行高温变性。采用12%的胶进行SDS-PAGE电泳(80 V~120 V), 湿转法转膜后将PVDF膜室温封闭2 h, 加入对应的一抗(USO1、*β-actin*、p-AKT、AKT、p-4EBP1、4EBP1、p-mTOR、mTOR、Cyclin D和Cyclin E等均按照1:1 000稀释) 4 °C孵育过夜。TBST洗膜3次, 再加入二抗(1:1 000稀释)室温孵育2 h。TBST洗膜3次后进行采用ECL显影液进行显影和拍照。

1.2.8 裸鼠荷瘤实验 选择6周大小的雌性裸鼠, 实验分组为NC组和shUSO1组, 将NC组细胞接种于同一只鼠的左腿皮下, 将USO1稳定低表达MDA-MB-231细胞接种于裸鼠右腿皮下, 接种的细胞数量为 5×10^6 个/只。每隔2天记录并观察皮下荷瘤生长情况, 并使用游标卡尺测量肿瘤的长和宽并计算荷瘤体积(体积=长 $\times$ 宽²/2)。于实验终点处死老鼠, 取出荷瘤, 拍照并称重, 将瘤体一部分置于液氮中保存, 另一部分组织置于4%多聚甲醛中固定。

1.2.9 统计学分析 采用SPSS 18.0进行统计分析, 本研究实验数据属于计量资料并符合正态分布, 表示为平均数 $\pm$ 标准差, 每组至少有3个独立样本重复。两组间实验数据比较采取独立样本 t 检验, 多组间实验数据比较采取单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 USO1在乳腺癌组织中表达水平升高, 并且其与患者的不良预后密切相关

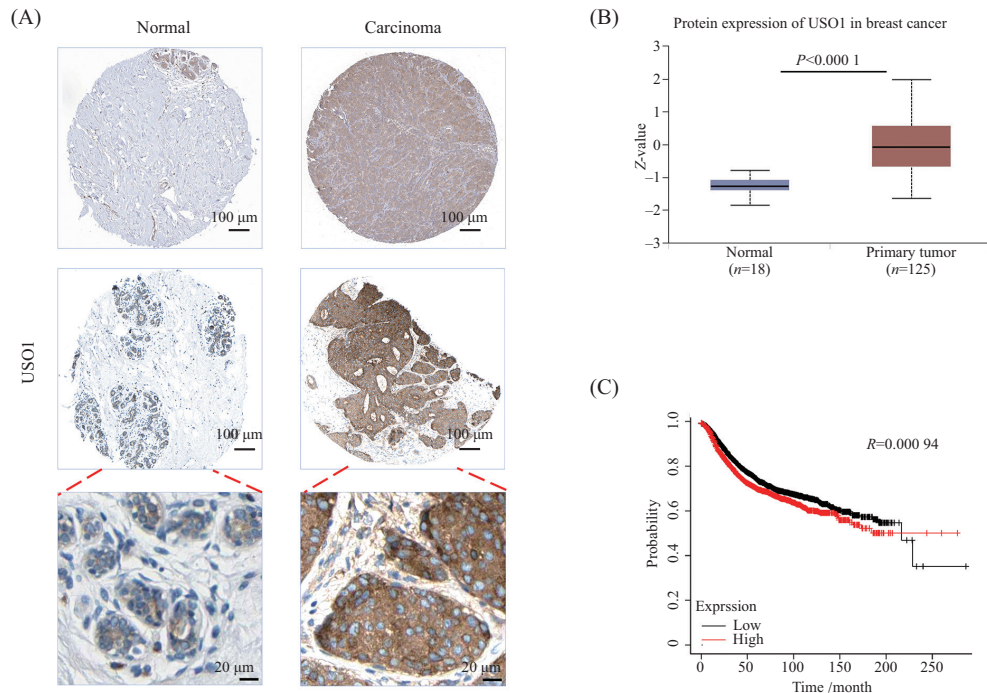
通过分析人类蛋白图谱(Human Protein Atlas, HPA)数据库, 如图1A所示, USO1蛋白主要定位于细胞质, 且乳腺癌组织中的USO1表达水平远高于正常的乳腺组织。临床蛋白质组肿瘤分析协作组(clinical proteomic tumor analysis consortium, CPTAC)数据库的结果也提示乳腺癌组织中的USO1蛋白表达水平高于正常的乳腺组织(图1B, $P < 0.000 1$)。同时, 通过分析预后生存数据库Kaplan-Meier plotter, 发现USO1高表达组($n=2 464$)比USO1低表达组($n=2 465$)的预后更差(图1C, $P < 0.001$)。以上结果提示USO1可能与乳腺癌的发生发展相关。

2.2 USO1在TNBC细胞中的表达水平高于non-TNBC细胞

为进一步探究USO1在细胞中的表达情况, 选择正常的人乳腺上皮细胞系MCF10A和四种乳腺癌细胞系(BT-474、MCF-7、MDA-MB-231和MDA-MB-453)进行后续实验。mRNA和蛋白结果(图2A和图2B)表明, USO1在乳腺癌细胞中的表达水平远高于正常乳腺上皮细胞, 并且USO1在TNBC细胞中(MDA-MB-231和MDA-MB-453)的表达水平高于non-TNBC细胞(BT-474和MCF-7)。此外, 通过提取TNBC和non-TNBC的病理组织, Western blot和RT-PCR检测发现USO1在TNBC组织中的表达水平高于non-TNBC组织(图2C和图2D)。TNBC是恶性程度最高的乳腺癌之一, 以上结果提示USO1可能与TNBC的进展相关。

2.3 敲低USO1抑制TNBC细胞增殖和集落形成能力

为进一步研究USO1在TNBC细胞中高表达的生物学意义, 选择MDA-MB-231和MDA-MB-453两种TNBC细胞系, 采用慢病毒转染构建USO1稳定低表达的细胞株。mRNA和蛋白结果(图3A和图3B)表明USO1的表达被显著抑制。CCK-8检测发现, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 敲低USO1可抑制TNBC的细胞增殖活力(图3C)。集落实验表明, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 敲低USO1可减弱TNBC的集落形成能力(图3D和图3E)。以上结果表明, 敲低USO1抑制TNBC细胞生长。

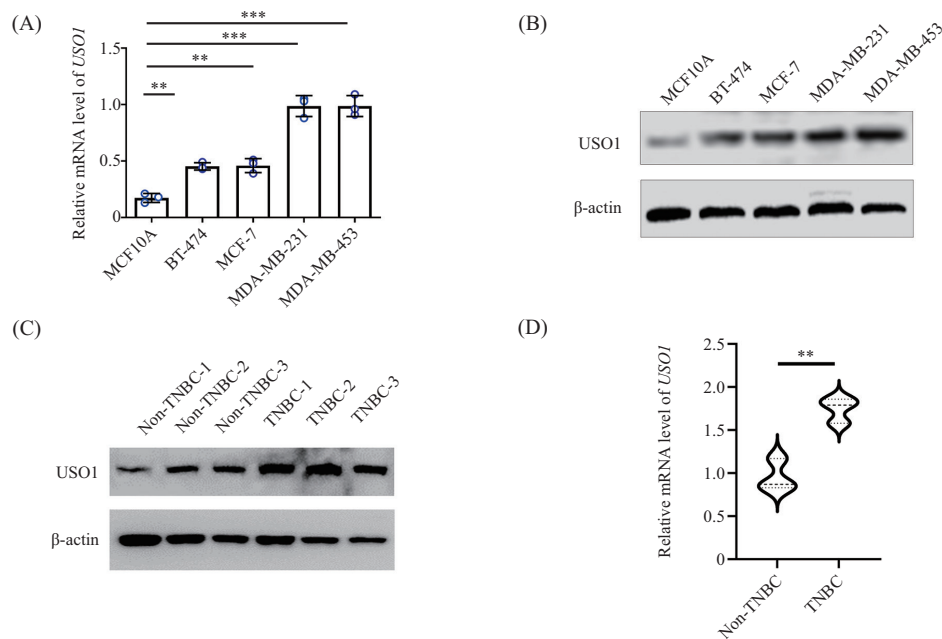


A: USO1蛋白在乳腺癌组织和正常乳腺组织中的表达情况; B: USO1蛋白在乳腺癌组织和正常乳腺组织中表达的统计学分析; C: USO1表达水平和乳腺癌患者预后的相关性分析。

A: the expression of USO1 protein in breast cancer and paired normal tissues; B: statistic analysis of USO1 protein level in breast cancer and paired normal tissues; C: correlation between USO1 expression level and prognosis of breast cancer patients.

图1 USO1在乳腺癌组织中的表达及其与预后的相关性

Fig.1 The expression of USO1 and its correlation to prognosis in breast cancer tissues

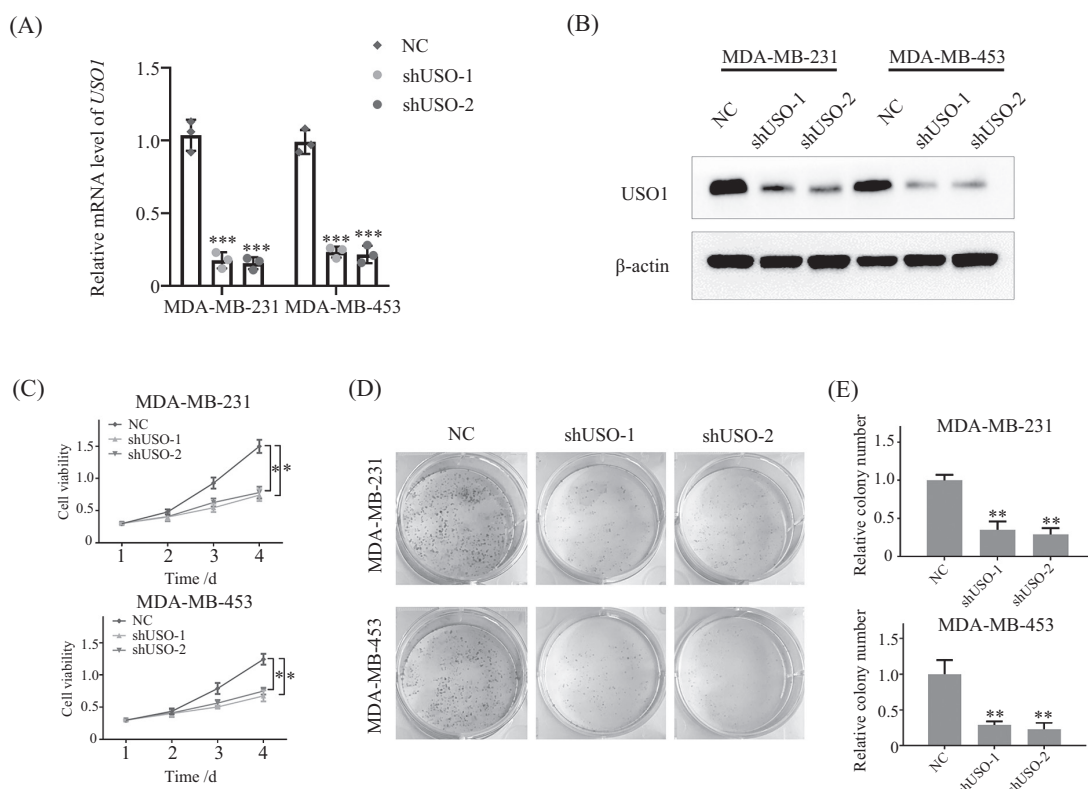


A: *USO1* mRNA在MCF10A、BT-474、MCF-7、MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞中的表达水平; B: USO1蛋白在MCF10A、BT-474、MCF-7、MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞中的表达水平; C: USO1蛋白在TNBC和non-TNBC病理组织中的表达水平; D: *USO1* mRNA在TNBC和non-TNBC病理组织中的表达水平。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the mRNA level of *USO1* in MCF10A, BT-474, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells; B: the protein level of USO1 in MCF10A, BT-474, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells; C: the protein level of USO1 in TNBC and non-TNBC tissues; D: the mRNA level of *USO1* in TNBC and non-TNBC tissues. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 USO1在TNBC和non-TNBC的细胞和病理组织中的mRNA和蛋白表达水平

Fig.2 The mRNA and protein expression levels of USO1 in TNBC and non-TNBC cells and tissues



A: 敲低USO1后的USO1 mRNA表达水平; B: 敲低USO1后的USO1蛋白表达水平; C: 敲低USO1对TNBC细胞增殖的影响; D、E: 敲低USO1对TNBC集落形成能力的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较。

A: *USO1* mRNA expression level after *USO1* knockdown; B: *USO1* protein expression level after *USO1* knockdown; C: effects of *USO1* knockdown on the proliferation of TNBC cells; D,E: effects of *USO1* knockdown on the colony formation of TNBC cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC group.

图3 敲低USO1对TNBC细胞生长的影响

Fig.3 Effects of *USO1* knockdown on the growth of TNBC cells

2.4 过表达USO1促进TNBC细胞增殖和集落形成能力

采用质粒转染, 构建USO1过表达的MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞株。USO1 mRNA和蛋白结果(图4A和4B)表明USO1的表达被上调。CCK-8检测发现, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 过表达USO1可促进TNBC的细胞增殖活力(图4C)。集落实验表明, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 过表达USO1可增强TNBC的集落形成能力(图4D和图4E)。以上结果表明, 过表达USO1促进TNBC细胞生长。

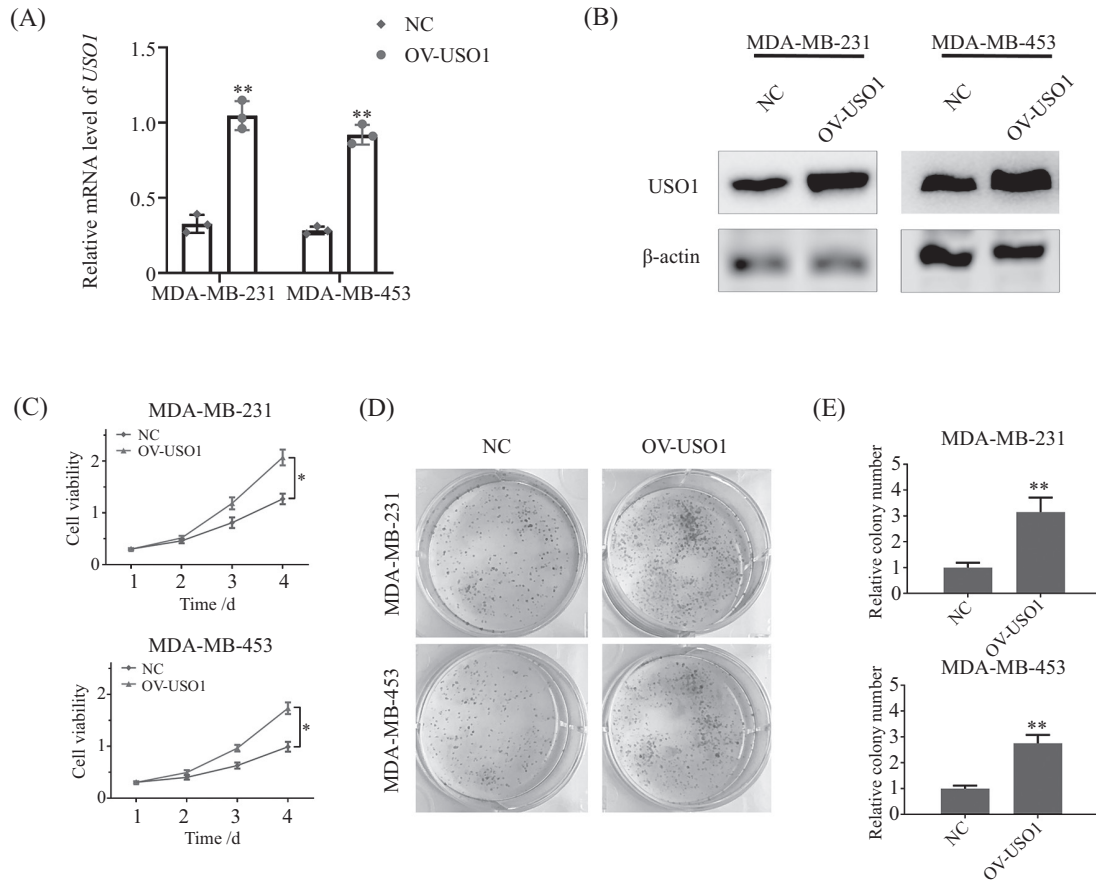
2.5 敲低USO1导致TNBC细胞周期G₁/S期阻滞

通过流式细胞术检测细胞周期分布发现, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 敲低USO1会导致MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞的G₁期显著增多, S期减少, 即引起G₁/S期阻滞(图5A和图5B)。以上结果说明, USO1可能通过调控细胞周

期G₁/S期转换而影响TNBC细胞增殖。

2.6 敲低或过表达USO1可通过抑制或促进mTOR/4EBP1信号通路和细胞周期相关蛋白的表达, 影响TNBC细胞增殖

为进一步探究USO1调控TNBC细胞周期的机制, 检测相关信号通路发现, 与NC组(MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞)比较, 敲低USO1可抑制MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞中p-mTOR和p-4EBP1的蛋白表达, 以及Cyclin D、Cyclin E等细胞周期相关蛋白表达(图6A)。同时, 过表达USO1可促进MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞中p-mTOR和p-4EBP1的蛋白表达, 以及Cyclin D、Cyclin E等细胞周期相关蛋白表达(图6B)。此外, 结果还表明敲低或过表达USO1对p-AKT蛋白表达水平并无明显影响。以上结果提示, USO1可能通过调控mTOR/4EBP1介导的细胞周期相关蛋白表达, 进而影响TNBC细胞增殖。



A: 过表达 $USO1$ 后的mRNA表达水平; B: 过表达 $USO1$ 后的蛋白表达水平; C: 过表达 $USO1$ 对TNBC细胞增殖的影响; D、E: 过表达 $USO1$ 对TNBC集落形成能力的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC组比较。

A: $USO1$ mRNA expression level after $USO1$ overexpression; B: $USO1$ protein expression level after $USO1$ overexpression; C: effects of $USO1$ overexpression on the proliferation of TNBC cells; D,E: effects of $USO1$ overexpression on the colony formation of TNBC cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with NC group.

图4 过表达 $USO1$ 对TNBC细胞生长的影响

Fig.4 Effects of $USO1$ overexpression on the growth of TNBC cells

2.7 敲低 $USO1$ 抑制MDA-MB-231细胞荷瘤鼠的肿瘤生长

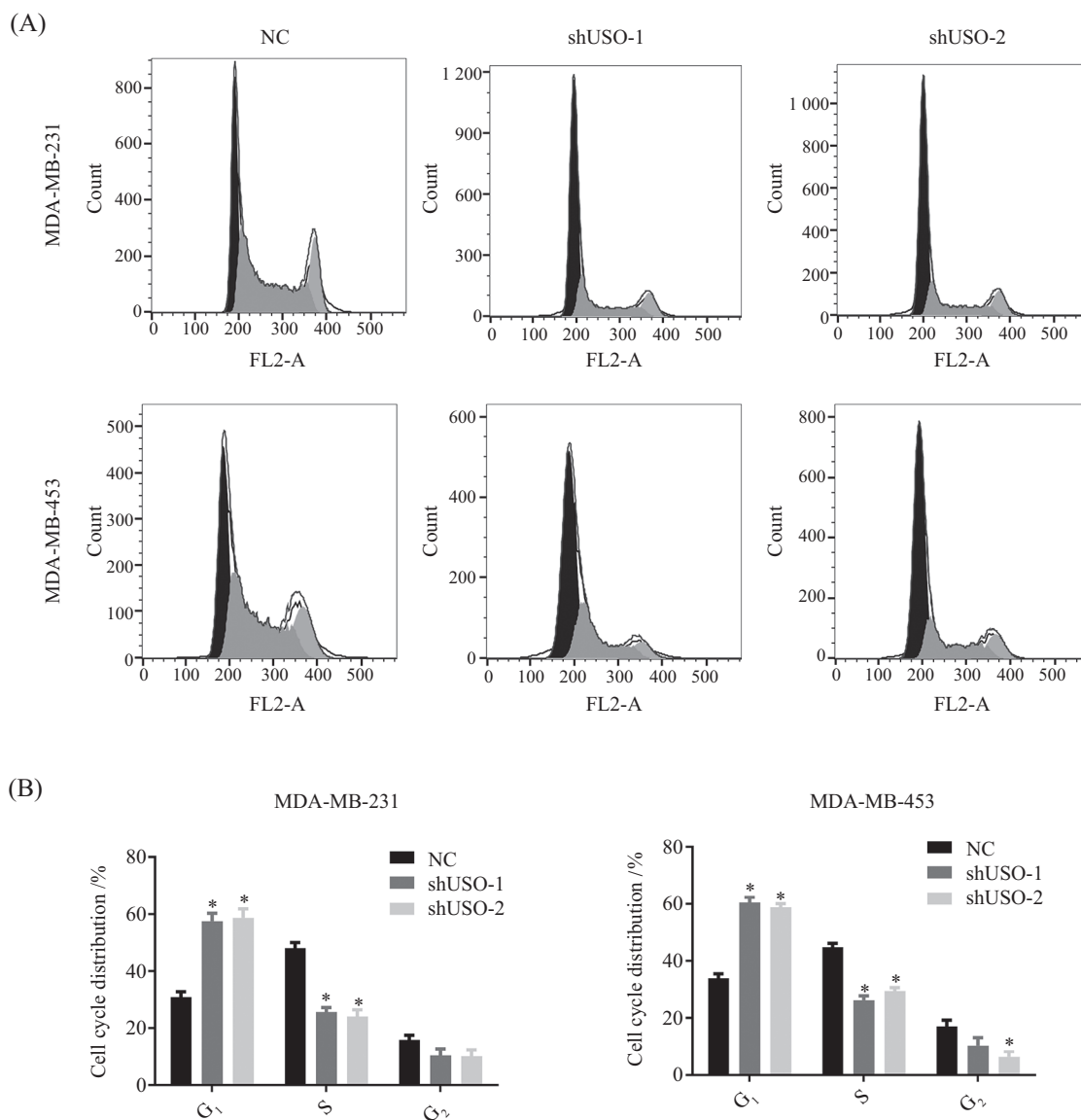
为进一步验证 $USO1$ 的体内作用,选择稳定低表达 $USO1$ 的MDA-MB-231细胞对裸鼠进行荷瘤,观察肿瘤生长。结果如图7所示,与NC组(MDA-MB-231细胞)相比较, $USO1$ 敲低组的肿瘤体积、质量和生长曲线均等被显著抑制。以上结果表明,敲低 $USO1$ 可在体内抑制肿瘤的生长,可能是TNBC的潜在治疗靶点。

3 讨论

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,随着诊疗手段的提高和靶向药物的发展,乳腺癌的整体生存率已大幅提高^[9]。但是,TNBC作为乳腺癌各种分型中恶性程度最高、预后最差的一种,对激素和靶向治

疗都不敏感,并且常规的化疗对其效果也不佳^[2-3]。TNBC发生发展的机制复杂,涉及众多表观遗传、细胞过程和信号通路的改变,所以鉴定新的分子诊断和治疗靶点对于改善TNBC患者的预后具有重要的意义。

囊泡运输途径介导的蛋白质等物质在内质网到高尔基体间的运输对于细胞生长具有重要的作用,可以促进恶性肿瘤的发生发展^[10]。 $USO1$ 是一种囊泡转运因子,在内质网到高尔基体间的物质运输中发挥着重要的作用^[4-5]。RADULESCU等^[11]研究发现, $USO1$ 通过调控微管蛋白而促进细胞分裂。同时,也有文献报道 $USO1$ 在胃癌^[6]、结直肠癌^[7]和多发性骨髓瘤^[8]等多种恶性肿瘤中高表达,并与肿瘤的恶性行为密切相关。本研究发现了 $USO1$ 在乳腺患者中高表达且与患者预后不良密切相关,还首次证明



A、B: 敲低USO1对MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞的G₁、S和G₂期分布的影响。* $P < 0.05$, 与NC组比较。

A,B: effects of USO1 knockdown on the G₁, S and G₂ phase distribution in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells. * $P < 0.05$ compared with NC group.

图5 敲低USO1对TNBC细胞周期的影响

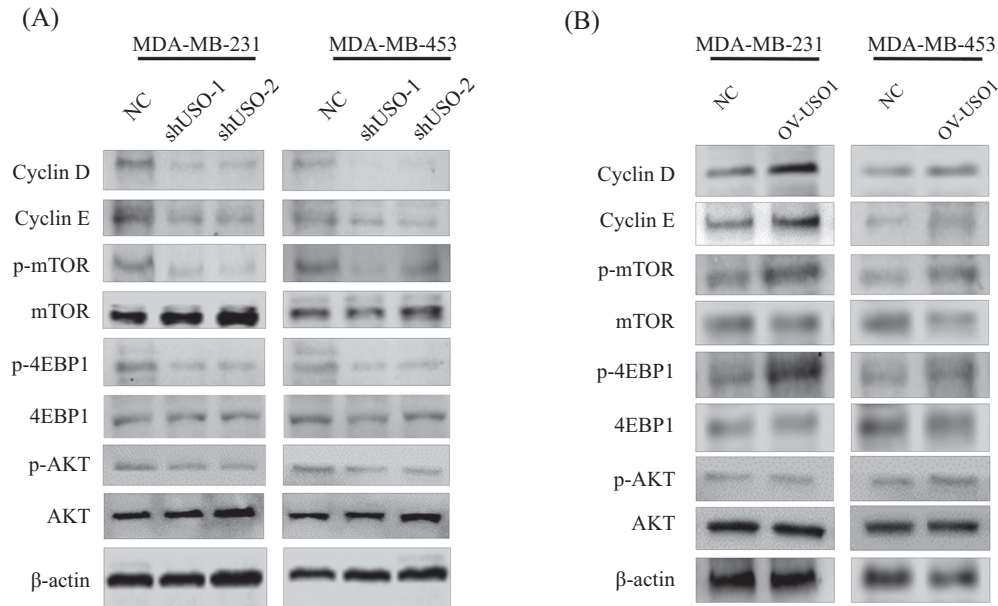
Fig.5 Effects of USO1 knockdown on the cell cycle distribution of TNBC cells

USO1在TNBC细胞中表达高于non-TNBC细胞。进一步通过体内外实验研究还发现, USO1可能通过激活mTOR信号通路而促进TNBC细胞生长。

mTOR是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶, 可以感受上游生长因子、营养和能量状态等细胞内外信号, 并促进细胞的合成代谢和生长^[12-13]。近年来大量研究表明, 肿瘤中的mTOR信号通路异常激活^[12-15]。与其他类型的乳腺癌比较, TNBC细胞的mTOR信号通路过度激活, 并且与患者的治疗反应性和预后不良等密切相关。本研究发现USO1可以

激活mTOR/4EBP1信号通路, 而作为mTOR的重要作用靶点之一, 4EBP1被磷酸化后会失去结合eIF4E的能力, 被释放出的eIF4E能够促进细胞周期相关蛋白的Cyclin D和Cyclin E mRNA的翻译^[14-15]。Cyclin D可与CDK4/6结合, Cyclin E可与CDK2结合, 二者均能调控细胞从G₁期进入S期, 进而促进细胞分裂和生长^[16]。

综上所述, 囊泡转运因子USO1在TNBC细胞中高表达, 可通过调控mTOR/4EBP1信号通路, 加速细胞周期G₁/S期转换, 促进肿瘤细胞生长。它是TNBC的潜在治疗靶点。

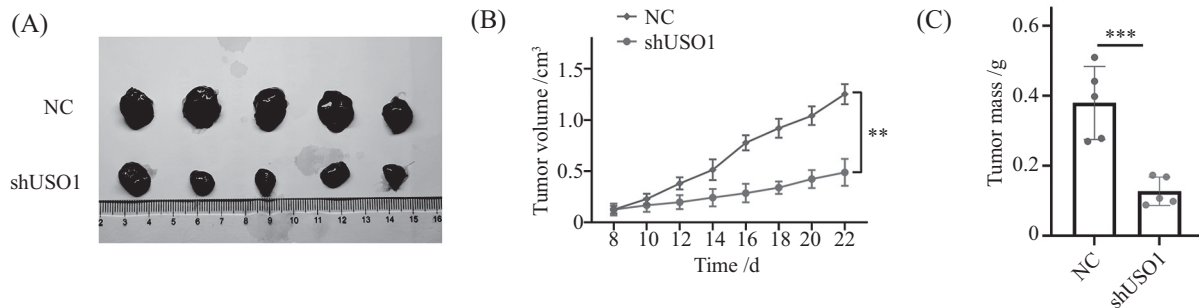


A: 敲低USO1对MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞中的p-mTOR、p-4EBP1、p-AKT、Cyclin D、Cyclin E蛋白表达的影响。B: 过表达USO1对MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞的p-mTOR、p-4EBP1、p-AKT、Cyclin D和Cyclin E蛋白表达的影响。

A: effects of USO1 knockdown on the p-mTOR, p-4EBP1, Cyclin D and Cyclin E expression in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells; B: effects of USO1 overexpression on the p-mTOR, p-4EBP1, p-AKT, Cyclin D and Cyclin E expression in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells.

图6 敲低和过表达USO1对TNBC细胞mTOR/4EBP1信号通路和细胞周期相关蛋白的影响

Fig.6 Effects of USO1 knockdown and overexpression on the AKT/m-TOR pathway and cell cycle related protein of TNBC cells



A: 荷瘤大体图片; B: 肿瘤生长曲线; C: 肿瘤质量。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: general graph of xenograft; B: tumor growth curve; C: tumor mass. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图7 敲低USO1对MDA-MB-231细胞荷瘤鼠肿瘤生长的影响

Fig.7 Effects of USO1 knockdown on the tumor growth of MDA-MB-231 cells in nude mice

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] GARRIDO-CASTRO A C, LIN N U, POLYAK K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment [J]. Cancer Discov, 2019, 9(2): 176-98.
- [3] KARAAHYVAZ M, CRISTEA S, GILLESPIE S M, et al. Unravelling subclonal heterogeneity and aggressive disease states in TNBC through single-cell RNA-seq [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3588-97.
- [4] ALVAREZ C, FUJITA H, HUBBARD A, et al. ER to Golgi transport: requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage [J]. J Cell Biol, 1999, 147(6): 1205-22.
- [5] NODA Y, YAMAGISHI T, YODA K. Specific membrane recruitment of USO1 protein, the essential endoplasmic reticulum-to-Golgi tethering factor in yeast vesicular transport [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 686-94.
- [6] LI X J, LUO Y, YI Y F. P115 promotes growth of gastric cancer through interaction with macrophage migration inhibitory factor [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(46): 8619-29.
- [7] SUI J, LI X, XING J, et al. Lentivirus-mediated silencing of USO1 inhibits cell proliferation and migration of human colon cancer cells [J]. Med Oncol, 2015, 32(8): 218-24.
- [8] JIN Y, DAI Z. USO1 promotes tumor progression via activating

- Erk pathway in multiple myeloma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 264-71.
- [9] GLUZ O, LIEDTKE C, GOTTSCHALK N, et al. Triple-Negative breast cancer: current status and future directions [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(12): 1913-27.
- [10] HOWLEY B V, LINK L A, GRELET S, et al. A CREB3-regulated ER-Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(10): 1308-25.
- [11] RADULESCU A E, MUKHERJEE S, SHIELDS D. The Golgi protein p115 associates with gamma-tubulin and plays a role in Golgi structure and mitosis progression [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(24): 21915-26.
- [12] MOSSMANN D, PARK S, HALL M N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18 (12): 744-57.
- [13] LIU G Y, SABATINI D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.
- [14] LEE B J, BOYER J A, BURNETT G L, et al. Selective inhibitors of mTORC1 activate 4EBP1 and suppress tumor growth [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(10): 1065-74.
- [15] TIAN B, LIU J, ZHANG N, et al. Oncogenic SNORD12B activates the AKT-mTOR-4EBP1 signaling in esophageal squamous cell carcinoma via nucleus partitioning of PP-1 α [J]. *Oncogene*, 2021, 40(21): 3734-47.
- [16] OTTO T, SICINSKI P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 93-115.