

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.007

· 基础研究 ·

## 芳香烃受体通过抑制MYC表达调控乳腺癌细胞的增殖、凋亡及多柔比星敏感性

康利春, 王会敏, 邓海霞, 李文静, 曹芳, 周春雷, 穆红(天津市第一中心医院 检验科, 天津 300192)

**[摘要]** **目的:** 研究芳香烃受体(AHR)在乳腺癌中的表达及其对乳腺癌细胞增殖、凋亡和药物敏感性的调控机制。**方法:** 通过GEPIA数据库数据分析乳腺癌组织及癌旁组织中AHR的表达水平, 探讨其与患者生存期的关联。利用基因敲低和过表达技术构建AHR表达变化的乳腺癌细胞, 采用CCK-8实验、细胞计数和流式细胞分析等方法评估AHR对细胞增殖、凋亡和药物敏感性的影响, 通过免疫印迹法验证相关分子机制。此外, 利用AHR激动剂6-甲酰基吲哚并[3,2-B]咔唑(FICZ)研究外源性激活AHR对乳腺癌细胞多柔比星(DOX)敏感性的影响。**结果:** GEPIA数据库数据分析结果显示, 乳腺癌组织中AHR呈明显低表达( $P < 0.05$ ); 对155例乳腺癌患者的生存期进行统计分析也显示AHR低表达与不良预后呈正相关( $P < 0.05$ )。敲低AHR促进细胞增殖( $P < 0.05$ ), 过表达则能抑制其增殖( $P < 0.05$ )并促进其凋亡( $P < 0.05$ )。外源激活AHR能增强乳腺癌细胞对DOX的敏感性( $P < 0.05$ )。AHR可与MYC基因启动子结合, 抑制MYC表达( $P < 0.05$ ), 从而影响乳腺癌的进展。**结论:** AHR在乳腺癌中通过调控MYC表达影响细胞增殖和凋亡, 外源激活AHR可能成为提高乳腺癌细胞对DOX敏感性的治疗策略。

**[关键词]** 乳腺癌; 芳香烃受体; 细胞增殖; 细胞凋亡; 化疗敏感性; MYC基因

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)11-1101-08

## Aryl hydrocarbon receptor modulates the proliferation, apoptosis and sensitivity to doxorubicin of breast cancer cells by suppressing MYC expression

KANG Lichun, WANG Huimin, DENG Haixia, LI Wenjing, CAO Fang, ZHOU Chunlei, MU Hong (Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) in breast cancer and its regulatory mechanisms in the proliferation, apoptosis, and drug sensitivity of breast cancer cells. **Methods:** The GEPIA database was used to analyze the expression levels of AHR in tumor tissues and adjacent normal tissues of breast cancer patients and explore its correlation with patient survival. Gene knockdown and overexpression techniques were employed to establish breast cancer cell lines with varying AHR expression levels. The impact of AHR on cell proliferation, apoptosis, and drug sensitivity was evaluated using CCK-8 assays, cell counting, and flow cytometry. The molecular mechanisms were validated through WB. Additionally, the effect of exogenous AHR activation using the AHR agonist 6-Formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ) on the doxorubicin (DOX) chemosensitivity of breast cancer was investigated. **Results:** GEPIA database analysis revealed a significant decrease in AHR expression in breast cancer tissues ( $P < 0.05$ ); statistical analysis of the survival data from 155 breast cancer patients also indicated that low AHR expression was associated with poor prognosis ( $P < 0.05$ ). AHR gene knockdown promoted cell proliferation ( $P < 0.05$ ), while overexpression inhibited proliferation ( $P < 0.05$ ) and promoted apoptosis ( $P < 0.05$ ). Exogenous AHR activation enhanced the sensitivity of breast cancer cells to DOX ( $P < 0.05$ ). AHR was found to bind to the MYC promoter, suppressing MYC expression, thereby influencing the progression of breast cancer. **Conclusion:** AHR regulates cell proliferation and apoptosis in breast cancer by modulating MYC expression. Exogenous activation of AHR may serve as a promising therapeutic strategy to enhance the sensitivity of breast cancer cells to DOX.

**[Key words]** breast cancer; aryl hydrocarbon receptor; cell proliferation; apoptosis; chemotherapy sensitivity; MYC

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(11): 1101-1108. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.007]

乳腺癌是威胁全球女性生命健康的一种恶性疾病, 其发病率在女性恶性肿瘤中居首, 每年新增患者接近170万人, 成为导致女性死亡的第二大疾病, 仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。尽管近年来手术结合新辅助治疗方案逐渐成熟, 但乳腺癌仍面临频繁的转移复发和耐药

**[基金项目]** 天津市医学重点学科(专科)建设项目(No. TJYXZDXK-015A); 天津市卫生健康科技项目(No. TJWJ2023QN030)

**[作者简介]** 康利春(1993—), 女, 博士, 技师, 主要从事肿瘤基础与临床的研究。E-mail: kanglichun1118@163.com

**[通信作者]** 穆红, E-mail: muhongyzx@126.com

等临床难题。因此,深入了解乳腺癌的进展调控机制对制定精准靶向治疗策略至关重要。芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)作为一种配体激活的转录因子,属于碱性螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族<sup>[2-3]</sup>。AHR在受到配体激活后从细胞质迁移到细胞核,调控多种靶基因的转录,从而影响细胞的增殖、凋亡和迁移等功能<sup>[4]</sup>。AHR的表达水平以及特定配体对其活性的调节能够影响肿瘤的发展,但在不同类型的肿瘤中其功能和作用机制存在差异<sup>[5]</sup>。在结直肠癌、甲状腺乳头状癌中均观察到AHR表达水平及活性的升高,然而在嗜铬细胞瘤、肾上腺皮质癌中AHR的表达水平低于正常组织<sup>[6-7]</sup>。肿瘤微环境中的代谢产物可作为AHR配体激活下游信号通路,促进或抑制肿瘤进展<sup>[8-9]</sup>。AHR在乳腺癌中的表达水平及具体调控机制尚不清楚,本研究旨在分析乳腺癌患者中AHR表达水平并探讨AHR基因敲低和过表达对乳腺癌细胞增殖、凋亡以及多柔比星(doxorubicin, DOX)敏感性的影响,以期为以AHR为靶点的乳腺癌靶向治疗提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7、SK-BR-3及T47D均购自美国ATCC。胎牛血清、DMEM培养液、RPMI 1640培养液均购自BI公司。胰蛋白酶(0.25% trypsin-EDTA)购自Gibco公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,反转录试剂盒购自Transgen公司,qPCR试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒及CCK-8细胞活性试剂盒均购自翌圣公司,转染试剂Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司,pLKO.1载体购自Addgene公司,BCA蛋白定量试剂盒、蛋白相对质量标准均购自Thermo公司,ECL化学发光底物购自Millipore公司,AHR(#83200)抗体购自CST公司、Pro-Apoptosis Bcl Family Antibody Sampler Panel(ab228527)购自Abcam公司,MYC(ab32072)抗体购自Abcam公司, $\beta$ -actin(sc-47778)抗体购自Santa公司,qPCR引物及分子克隆引物由上海生工公司合成,过表达阴性对照质粒(pLV-3xflag-EV)、AHR过表达质粒(pLV-3xflag-AHR)、AHR转录活性激活突变质粒(pLV-3xflag-AHR-CA)及AHR转录活性缺失突变质粒(pLV-3xflag-AHR-R40D)质粒由苏州金唯智公司合成,阴性对照(shNC)及shAHR质粒通过分子克隆的方法克隆到pLKO.1载体,shNC上游引物为5'-CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAG

GTTTTTG-3',下游引物为5'-AATTCAAAA ACC TAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGC GACTTAACCTTAGG-3';shAHR上游引物为5'-CCG GCGGCATAGAGACCGACTTAATCTCGAGATTA AGTCGGTCTCTATGCCGTTTTTG-3',下游引物为5'-AATTCAAAAACGGCATAGAGACCGACTTAAT CTGAGATTAAGTCGGTCTCTATGCCG-3'。

### 1.2 GEPIA数据库分析乳腺癌肿瘤组织及癌旁组织中AHR的表达水平及其与患者生存期的关系

通过GEPIA数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)对来自肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库的转录组数据进行分析,比较乳腺癌组织及癌旁组织中AHR的mRNA表达水平。利用Kaplan-Meier生存曲线分析AHR表达水平与乳腺癌患者生存期的相关性。

### 1.3 慢病毒包装

将HEK293T细胞复苏,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,用含10%FBS的DMEM培养液培养直至生长到约80%的汇合度后用胰酶进行消化,稀释细胞到5 × 10<sup>5</sup>个/mL,在6孔板中的每个孔中加入2 mL稀释好的细胞悬液,将细胞放入37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中继续培养。将构建好的慢病毒载体质粒与其他3种包装质粒分别混合,体系为载体质粒1.5 μg、包装质粒1 μg、包膜质粒0.5 μg,总量3 μg,对HEK293T细胞进行转染,在1.5 mL离心管中将7.5 μL的Lipofectamine™2000与0.25 mL的Opti-MEM混合,同时将混好的质粒也与0.25 mL的Opti-MEM混合,室温放置5 min后,将两个离心管中的液体混合在一起。室温放置20 min,此时质粒被Lipofectamine™2000包被。对铺好的HEK293T细胞换液,更换成1 mL新鲜全培养液,20 min后将0.5 mL混合液缓慢加入细胞中。转染12~16 h后,用3 mL全培养液给转染后的HEK293T细胞换液。转染40 h后,用移液器小心吸取6孔板中的上清液到离心管中,以800 × g离心5 min沉淀细胞碎片,收集上清液,分装后放入-80 °C冰箱中保存。

### 1.4 细胞培养、AHR基因敲低及过表达细胞的构建

MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中,SK-BR-3、MCF-7和T47D细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中。以上细胞均置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中,选择对数生长期的细胞进行后续实验。将对数生长期的MDA-MB-231细胞及SK-BR-3细胞分别接种于6孔板中,每孔1 × 10<sup>5</sup>个细胞,将细胞放入培养箱后过夜培养使其贴壁。对6孔板中的细胞进行换液,每孔加入2 mL不含双抗的全培养液,同时

加入 1 mL 解冻后的慢病毒和 3  $\mu$ L 聚凝胺 (polybrene, 0.8 mg/ $\mu$ L), 混匀后将细胞放入细胞培养箱中过夜培养。翌日弃去孔中培养液, 加入 2 mL 新鲜全培养液, 继续培养 48 h 后加入嘌呤霉素 (2  $\mu$ g/mL) 杀死未被感染的细胞, 将剩余细胞进行扩大培养得到 AHR 基因敲低及过表达的稳定细胞系。

#### 1.5 CCK-8 实验检测过表达/敲低 AHR 对细胞活性的影响

用胰蛋白酶消化对数生长期的细胞, 用全培养液重悬细胞制备单细胞悬液, 以  $1 \times 10^4$ /孔的密度接种于 96 孔板, 每组 4 个重复, 培养 3 d 后, 向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱处理 2 h, 通过酶标仪测定 450 nm 波长处光密度 ( $D$ ) 值, 比较各组细胞相对细胞活性。

#### 1.6 细胞增殖实验检测过表达/敲低 AHR 对细胞增殖的影响

收集对数生长期的细胞制备单细胞悬液, 将细胞接种于 24 孔板, 每孔 1 mL 的细胞悬液中包含  $1 \times 10^5$  个细胞, 每组 4 个复孔, 分别于接种第 3 天、第 6 天通过锥虫蓝染色, 用细胞计数仪对孔内细胞进行计数, 绘制细胞增殖曲线, 比较各组细胞在不同时间段的生长差异。

#### 1.7 WB 法检测细胞内 AHR、MYC 表达水平

收集各组细胞, 利用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 定量试剂盒测定蛋白质浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 转印至 PVDF 膜上, 用含 5% BSA 的封闭液室温封闭 1 h, 按照对应蛋白温育相应的抗 AHR (1:1 000)、MYC (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:5 000) 抗体并置于摇床上 4  $^{\circ}$ C 过夜, 利用 TBST 缓冲液洗膜后, 加入二抗 (1:5 000) 溶液于室温下反应 1 h, TBST 洗膜后, 利用化学发光成像仪曝光成像。通过 Image J 软件对免疫印迹结果进行灰度值分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参统计目标蛋白的相对表达量。

#### 1.8 qPCR 法检测细胞中 AHR、MYC mRNA 表达

利用 TRIzol 试剂提取细胞中总 RNA, 通过 nanophotometer 仪器测定 RNA 浓度及纯度。使用反转录试剂盒以 RNA 为模板反转录为 cDNA。AHR 上游引物: 5'-AGCCGGTGCAGAAAACAG-3', 下游引物: 5'-CTATGCCGCTTGAAGGAT-3'; MYC 上游引物: 5'-GTCAAGAGGCGAACACACAAC-3', 下游引物: TTGGACGGACAGGATGTATGC; GAPDH 上游引物: 5'-CGGGAACTGTGGCGTGAT-3', 下游引物: 5'-AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT-3'。采用 qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 qPCR 扩增检测, PCR 参数: 95  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s, 58  $^{\circ}$ C 20 s,

72  $^{\circ}$ C 20 s, 循环数为 40。以 GAPDH 作为内参基因, 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  公式计算 AHR、MYC mRNA 的相对表达量。

#### 1.9 流式细胞术检测药物处理对细胞凋亡的影响

分别用对照溶剂 DMSO、AHR 激动剂 FICZ (1  $\mu$ mol/L)、DOX (3  $\mu$ mol/L) 及 DOX + FICZ 联用处理乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 药物处理 3 d 后, 用胰蛋白酶消化各组细胞, PBS 清洗、计数并用结合缓冲液重悬细胞, 加入 PI/Annexin V 染液, 室温避光温育 15 min, 每个待测样本再加入 400  $\mu$ L 结合缓冲液, 混匀, 流式细胞仪上机检测, 用 FlowJo 7.6.1 软件进行结果分析并统计凋亡细胞比例。

#### 1.10 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。本实验数据均使用 Graphpad prism 6 软件进行统计学分析, 两组数据间比较采用独立样本  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AHR 在乳腺癌肿瘤组织中呈低表达且与患者不良预后有关联

基于 GEPIA 数据库对 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 中的乳腺癌数据集进行详细分析, 结果显示, 与癌旁组织相比, 乳腺癌组织中的 AHR mRNA 表达水平显著降低 (图 1A,  $P < 0.05$ )。对 155 例乳腺癌患者的生存期进行统计分析, 结果显示, AHR 低表达的患者生存期明显缩短 (图 1B,  $P = 0.0245$ ), 进一步支持了 AHR 的表达水平与乳腺癌的发生和发展之间存在关联的观点。

### 2.2 敲低 AHR 表达促进 MDA-MB-231 细胞的增殖

对 5 种乳腺癌细胞中 AHR 的蛋白表达水平进行检测, 结果如图 2A 所示, 选取高表达 AHR 的 MDA-MB-231 细胞以及低表达 AHR 的 SK-BR-3 细胞进行后续实验 ( $P < 0.001$ )。为了探讨 AHR 在乳腺癌细胞中的作用, 本研究在 MDA-MB-231 细胞中稳定敲低 AHR 基因, 检测了细胞增殖相关基因 Ki-67 的表达, 结果 (图 2B) 显示, 敲低 AHR 能显著增加 Ki-67 的蛋白水平 ( $P < 0.001$ )。随后进行 CCK-8 实验以评估细胞活性, 结果表明, 与对照组相比, 敲低 AHR 的乳腺癌细胞能明显增强细胞增殖活性 (图 2C,  $P < 0.01$ )。细胞增殖实验的结果也进一步验证了这一观点, 与对照细胞相比, 敲低 AHR 的乳腺癌细胞在培养 3 d 和 6 d 后都显示更强的增殖能力 (图 2D,  $P < 0.001$ )。

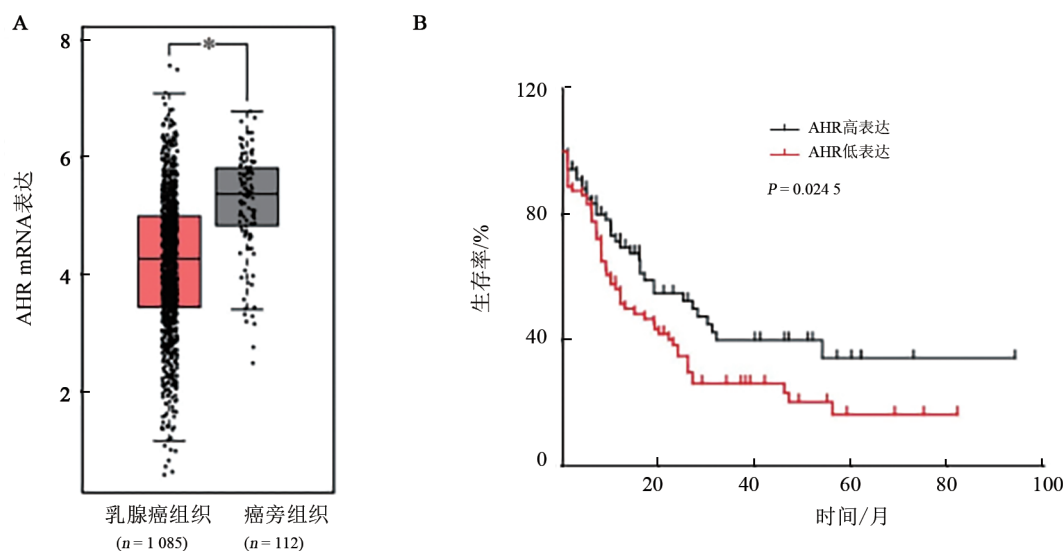
### 2.3 过表达 AHR 抑制 MDA-MB-231 细胞的生长并促进其凋亡

在低表达 AHR 的 SK-BR-3 乳腺癌细胞中稳定过



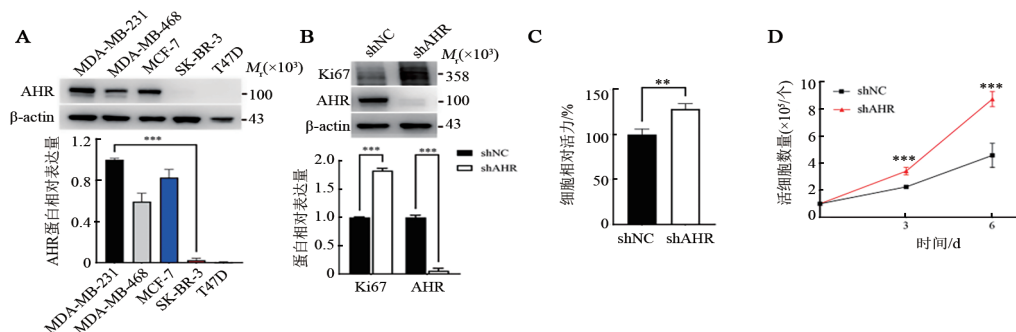
表达 AHR 基因,通过 WB 实验验证 AHR 过表达效率(图 3A,  $P < 0.001$ )。CCK-8 实验结果显示,过表达 AHR 的乳腺癌细胞活性显著降低(图 3B,  $P < 0.01$ ),细胞增殖实验进一步证实了 AHR 过表达对乳腺癌细胞增殖的抑制作用(图 3C),培养 3 d ( $P < 0.01$ )和 6 d ( $P < 0.01$ )后过表达组细胞均呈现增殖能力显著减弱的趋势。通过 PI/Annexin V 染色检测细胞凋亡情况,

流式细胞分析及统计结果显示,过表达 AHR 组细胞凋亡水平显著增加(图 3D,  $P < 0.01$ )。进一步对细胞凋亡相关标志物进行检测,结果表明,促凋亡蛋白 BAX 表达上调 ( $P < 0.01$ ),而抑凋亡蛋白 Bcl-2、MCL-1 及 Bcl-xL 表达下调 ( $P < 0.001$ )(图 3E)。这些结果表明过表达 AHR 不仅抑制了乳腺癌细胞的生长,而且促进了细胞凋亡。



A:使用 GEPIA 数据库分析乳腺癌组织和癌旁组织中 AHR mRNA 的表达;B:GEPIA 数据库分析不同 AHR 表达水平的乳腺癌患者生存期。\* $P < 0.05$ 。

图1 数据库数据分析 AHR 在乳腺癌肿瘤组织中的表达及其与患者生存期的相关性



A:WB 法检测 5 种乳腺癌细胞中 AHR 的蛋白表达水平;B:WB 法检测 MDA-MB-231 细胞中敲低 AHR 后 Ki-67 和 AHR 蛋白的表达;C:CCK-8 检测敲低 AHR 后 MDA-MB-231 细胞的细胞活性;D:细胞计数法检测敲低 AHR 后 MDA-MB-231 细胞培养 3 d 和 6 d 的细胞增殖情况。与 shNC 组相比,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图2 敲低 AHR 表达对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的影响

#### 2.4 FICZ 外源性激活 AHR 增强 MDA-MB-31 细胞对 DOX 的敏感性

流式细胞术分析结果显示(图 4A),加入 FICZ 激活 AHR 可以将 DOX 诱导的 MDA-MB-231 细胞凋亡比例从  $(17.6 \pm 0.6)\%$  增加至  $(26.0 \pm 0.7)\%$ ,明显增强 MDA-MB-23 细胞对 DOX 的敏感性(图 4B,  $P < 0.001$ )。

#### 2.5 AHR 通过下调 MYC 的表达调控乳腺癌进展

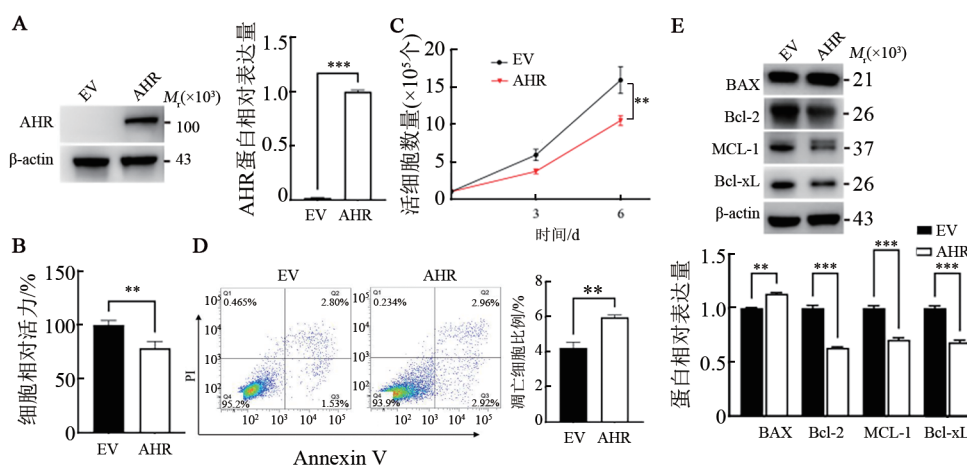
通过生物信息学分析,本研究发现 MYC 启动子

中包含 6 个 AHR 结合位点,即 AHR 反应元件(5'-T/GCGTG-3'),于是推测 AHR 通过调控 MYC 的表达,从而影响乳腺癌的进展。通过 WB 和 qPCR 检测对照组细胞及敲低 AHR 的 MDA-MB-231 细胞中 MYC 的表达,结果显示,敲低 AHR 后,MYC 蛋白水平显著上调(图 5A,  $P < 0.001$ ),mRNA 表达水平也有显著增加(图 5B,  $P < 0.001$ )。

为了进一步确认 AHR 是否通过其转录活性调控

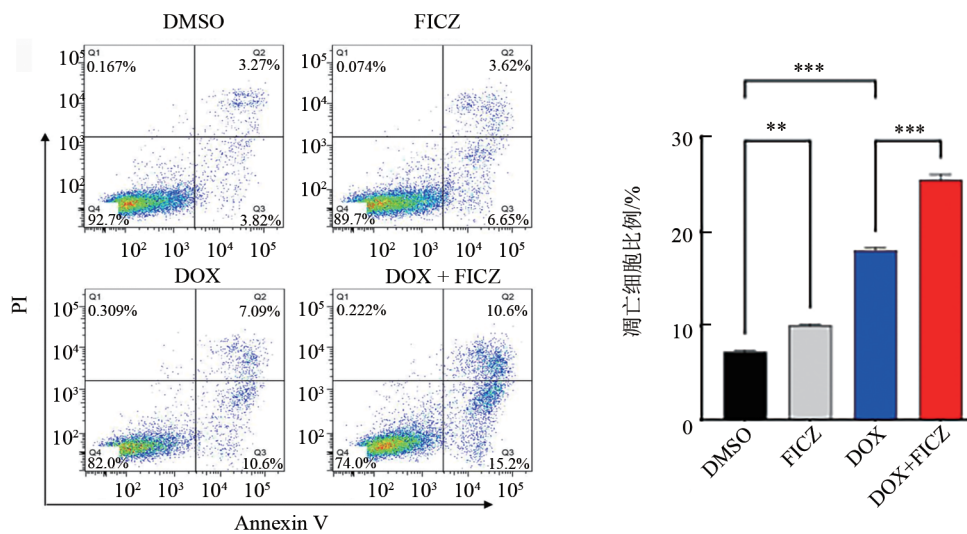
MYC的表达,本课题组在野生型AHR质粒(WT)的基础上构建了AHR转录活性持续激活突变体质粒(AHR-CA)及AHR转录活性失活突变体质粒(AHR-R40D)(图5C)。通过慢病毒系统,构建SK-BR-3中稳定过表达野生型AHR及两种AHR突变体的细胞系。利用WB和qPCR实验对上述细胞中MYC蛋白及mRNA表达水平进行检测,结果显示与对照组相

比,过表达野生型AHR组细胞MYC蛋白及mRNA表达水平均有下调( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ),过表达AHR-CA组细胞中MYC蛋白及mRNA表达水平进一步下调( $P < 0.001$ ),而过表达AHR-R40D细胞MYC蛋白及mRNA表达水平与对照组无显著差异(图5D-F)。以上结果提示AHR对MYC的负调控依赖其转录活性,从而影响乳腺癌的进展。



A: WB法检测SK-BR-3细胞中AHR过表达效率及其统计结果;B:CCK-8检测过表达AHR后SK-BR-3细胞的细胞活性;C:细胞计数检测过表达AHR后SK-BR-3细胞培养3 d和6 d的细胞增殖情况及其统计结果。D:PI/Annexin V染色检测过表达AHR后SK-BR-3的细胞凋亡情况及其统计;E:WB法检测过表达AHR后凋亡相关标志物BAX、Bcl-2、MCL-1和Bcl-xL的表达及其统计结果。 $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。

图3 过表达AHR对乳腺癌细胞SK-BR-3增殖及凋亡的影响



$**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。

图4 外源激活AHR增强MDAMB-23细胞对DOX的敏感性

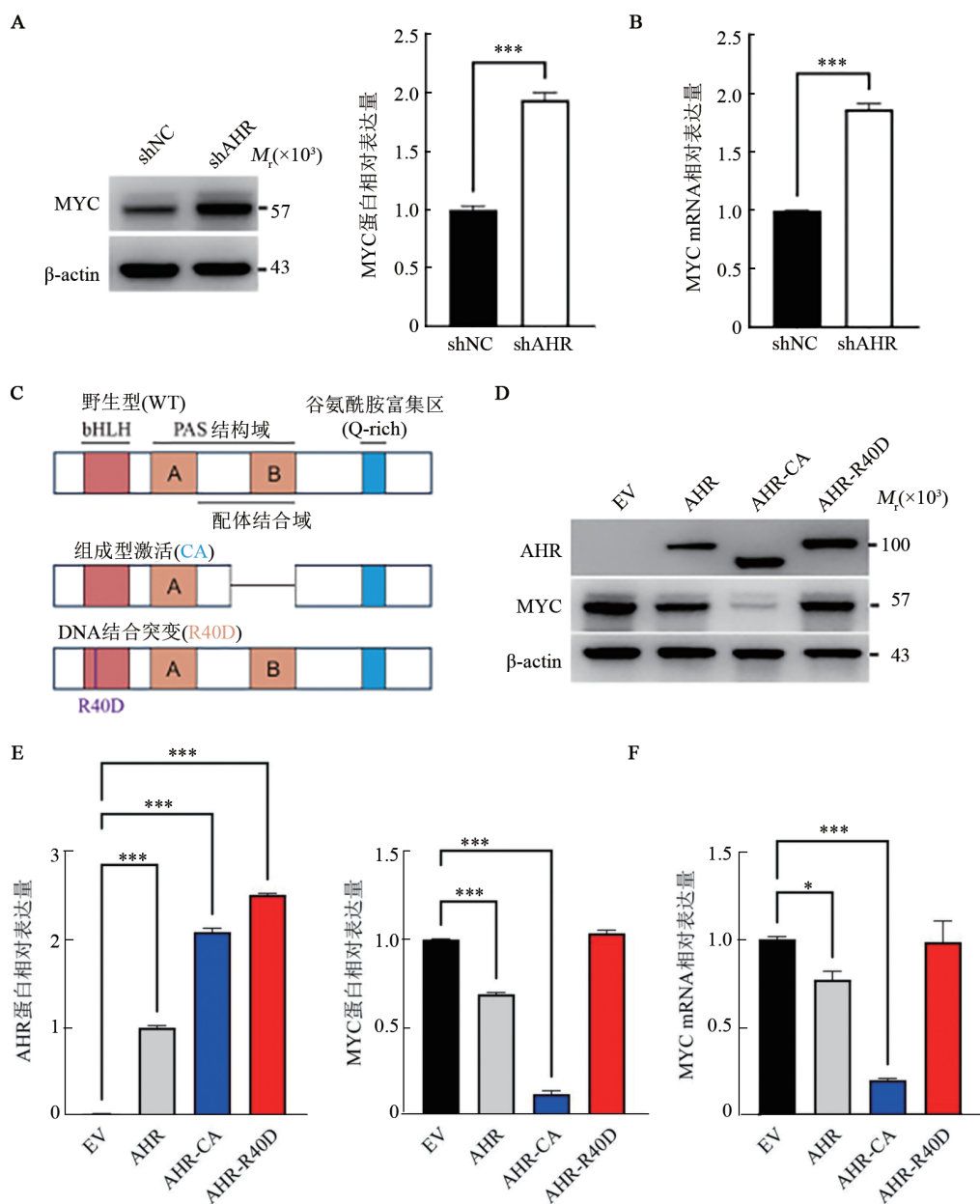
### 3 讨论

AHR是一种配体激活的转录因子。多种化学物质能够以配体形式与AHR高亲和力结合并激活其相应功能<sup>[10-17]</sup>。生理条件下,AHR存在于细胞质内,与

热激蛋白90(HSP90)、AHR相互作用蛋白(aryl hydrocarbon receptor-interacting protein, AIP)、端粒酶结合蛋白23(p23)以及c-SRC蛋白激酶形成复合物。与配体结合后AHR被激活,从细胞质迁移到细胞核内,与芳香烃受体核转运蛋白(Aryl hydrocarbon

receptor nuclear translocator, ARNT)形成异二聚体。随后结合到靶基因启动子区域的 AHR 反应元件 (5'-T/GCGTG-3'), 调控下游靶基因的转录<sup>[18-19]</sup>。AHR

已被报道参与多种细胞生物学过程, 包括细胞周期、上皮屏障功能、细胞迁移及免疫功能等<sup>[19-22]</sup>。



A: WB法检测敲低AHR后MYC的蛋白表达; B: qPCR检测敲低AHR后MYC的mRNA水平; C: 野生型及突变型AHR载体构建示意图; D: WB法检测过表达野生型及突变型AHR后AHR及MYC的蛋白水平; E: WB法检测AHR及MYC蛋白表达的统计结果; F: qPCR检测过表达野生型及突变型AHR后MYC的mRNA水平。\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001。

图5 AHR抑制MYC的表达依赖其转录活性

AHR在肿瘤中的表达及发挥的作用具有肿瘤类型特异性。AHR mRNA在肺癌、结直肠癌中呈现高表达, 相反, 在前列腺癌、慢性粒细胞白血病等恶性肿瘤中的表达低于正常组织<sup>[8]</sup>。在胶质瘤中, Kyn结合并激活AHR, 通过AQP4信号通路促进胶质瘤细胞的迁移<sup>[23]</sup>。结直肠癌中AHR的激活促进ALDH1A3转录水平的上调, 介导铁死亡抑制蛋白1依赖的肿瘤

细胞铁死亡抵抗<sup>[20,24-26]</sup>。肿瘤微环境相关的代谢产物可以产生AHR配体并激活AHR信号通路, 从而在肿瘤免疫逃逸中发挥促进作用<sup>[8, 18]</sup>。黑色素瘤肿瘤微环境内益生菌释放的AHR激动剂吡啶-3-乙醛以AHR依赖的方式直接作用于CD8<sup>+</sup> T细胞, 激活CREB信号通路促进干扰素IFN- $\gamma$ 的产生, 激活抗肿瘤免疫<sup>[27-30]</sup>。

目前,AHR在乳腺癌发生、发展中的作用机制尚不清楚,因此,本研究探讨了临床数据库中AHR表达与乳腺癌发生、发展的相关性,结果显示AHR mRNA在乳腺癌组织中低表达,且低表达AHR通常预示着患者的不良预后,提示AHR在乳腺癌中可能发挥抑癌作用。随后本研究以乳腺癌细胞MDA-MB-231和SK-BR-3作为研究对象,通过在细胞中过表达与敲低AHR等方法,结合CCK-8实验、细胞增殖及凋亡实验,发现在AHR高表达的MDA-MB-231细胞中敲低AHR能够促进乳腺癌的增殖,而在低表达AHR的SK-BR-3细胞中过表达AHR能够抑制乳腺癌增殖并促进凋亡,推断AHR的过表达能抑制乳腺癌发展。同时本项目检测了外源激活AHR后乳腺癌细胞对化疗药物DOX的敏感性。

MYC是最常见的原癌基因之一,通过多种机制调控细胞的增殖、分化和凋亡。在多种肿瘤中,MYC存在基因突变或异常表达,导致细胞不受限制的分裂和增殖<sup>[31]</sup>。探索靶向MYC或其通路的抑制剂,调控其表达和活性,已成为肿瘤治疗的研究热点。本研究发现,乳腺癌细胞中敲低AHR能促进MYC的表达,而过表达AHR则显著抑制MYC的表达。这种调控作用依赖AHR的转录活性,表明AHR对乳腺癌增殖、凋亡及化疗敏感性的作用是通过其对MYC的调控介导的。然而,AHR调控MYC表达的具体分子机制有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明,AHR基因过表达可通过下调MYC的表达水平抑制乳腺癌细胞的增殖并促进其凋亡,外源性激活AHR能增强乳腺癌对化疗的敏感性。因此,靶向AHR的策略,包括使用AHR激动剂及联合用药等,可能成为潜在的乳腺癌治疗方法,为临床肿瘤治疗提供新的方向。

### 利益冲突声明

本文的研究工作无任何形式的利益冲突,不受资助方的任何影响,作者独立取得实验数据,并对数据及其统计分析的准确性和可靠性负完全责任。

### 参考文献

- [1] SIEGEL R, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2024, 74: 12-49. DOI: 10.3322/caac.21820.
- [2] LARIGOT L, JURICEK L, DAIROU J, *et al.* AhR signaling pathways and regulatory functions[J]. *Biochim Open*, 2018, 7: 1-9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
- [3] ANDERSSON P, MCGUIRE J, RUBIO C, *et al.* A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(15): 9990-9995[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126612/>. DOI: 10.1073/pnas.152706299.
- [4] PARIS A, TARDIF N, GALIBERT M D, *et al.* AhR and cancer: from gene profiling to targeted therapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 752[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7828536/>. DOI: 10.3390/ijms22020752.
- [5] BONATI L, MOTTA S, CALLEA L. The AhR signaling mechanism: a structural point of view[J]. *J Mol Biol*, 2024, 436(3): 168296. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.168296.
- [6] FONG W, LI Q, JI F F, *et al.* Lactobacillus gallinarum-derived metabolites boost anti-PD1 efficacy in colorectal cancer by inhibiting regulatory T cells through modulating IDO1/Kyn/AHR axis[J/OL]. *Gut*, 2023, 72(12): 2272-2285[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10715476/>. DOI: 10.1136/gutjnl-2023-329543.
- [7] YANG L Y, ZHAO R Y, QIAO P P, *et al.* The novel oncogenic factor TET3 combines with AHR to promote thyroid cancer lymphangiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 206[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10506260/>. DOI: 10.1186/s12935-023-03021-6.
- [8] MURRAY I A, PATTERSON A D, PERDEW G H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(12): 801-814. DOI: 10.1038/nrc3846.
- [9] CELIK-TURGUT G, OLMEZ N, KOC T, *et al.* Role of AHR, NF- $\kappa$ B and CYP1A1 crosstalk with the X protein of Hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gene*, 2023, 853: 147099. DOI: 10.1016/j.gene.2022.147099.
- [10] MOTTA S, BONATI L. TCDD-induced allosteric perturbation of the AhR: ARNT binding to DNA[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9339[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10253319/>. DOI: 10.3390/ijms24119339.
- [11] WIGGINS B G, WANG Y F, BURKE A, *et al.* Endothelial sensing of AHR ligands regulates intestinal homeostasis[J]. *Nature*, 2023, 621(7980): 821-829. DOI: 10.1038/s41586-023-06508-4.
- [12] PATRIZI B, SICILIANI DE CUMIS M. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 4101[2024-09-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30567322/>. DOI: 10.3390/ijms19124101.
- [13] PROKOPEC S D, LU A, LEE S C S, *et al.* Comparative toxicoproteogenomics of mouse and rat liver identifies TCDD-resistance genes[J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(10): 2961-2978. DOI: 10.1007/s00204-019-02560-0.
- [14] NUKAYA M, MORAN S S, BRADFIELD C A. The role of the dioxin-responsive element cluster between the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci in aryl hydrocarbon receptor biology[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4923-4928. DOI: 10.1073/pnas.0809613106.
- [15] YANG X H, LI C, YU G C, *et al.* Ligand-independent activation of AhR by hydroquinone mediates benzene-induced hematopoietic toxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 355: 109845. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109845.
- [16] YANG T, FENG Y L, CHEN L, *et al.* Dietary natural flavonoids treating cancer by targeting aryl hydrocarbon receptor[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2019, 49(5): 445-460. DOI: 10.1080/10408444.2019.1635987.
- [17] SCHULTE K W, GREEN E, WILZ A, *et al.* Structural basis for aryl hydrocarbon receptor-mediated gene activation[J]. *Structure*, 2017, 25(7): 1025-1033.e3. DOI: 10.1016/j.str.2017.05.008.



- [18] ROTHHAMMER V, QUINTANA F J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(3): 184-197. DOI: 10.1038/s41577-019-0125-8.
- [19] IIZUKA T, YIN P, ZUBERI A, *et al.* Mono- (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate promotes uterine leiomyoma cell survival through tryptophan-kynurenine-AHR pathway activation[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(47): e2208886119[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9704719/>. DOI: 10.1073/pnas.2208886119.
- [20] ZABLON H A, KO C I, PUGA A. Converging roles of the aryl hydrocarbon receptor in early embryonic development, maintenance of stemness, and tissue repair[J]. *Toxicol Sci*, 2021, 182(1): 1-9. DOI: 10.1093/toxsci/kfab050.
- [21] SHADBOORESTAN A, KOUAL M, DAIROU J, *et al.* The role of the kynurenine/AhR pathway in diseases related to metabolism and cancer [J/OL]. *Int J Tryptophan Res*, 2023, 16: 11786469231185102[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10503295/>. DOI: 10.1177/11786469231185102.
- [22] WANG Z W, FU Y, SENO A, *et al.* Tumor suppressive activity of AHR in environmental arsenic-induced carcinogenesis[J/OL]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 480: 116747[2024-09-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37935250/>. DOI: 10.1016/j.taap.2023.116747.
- [23] DU L S, XING Z K, TAO B B, *et al.* Both IDO1 and TDO contribute to the malignancy of gliomas *via* the Kyn-AhR-AQP4 signaling pathway[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 10[2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033114/>. DOI: 10.1038/s41392-019-0103-4.
- [24] CUI W W, GUO M, LIU D, *et al.* Gut microbial metabolite facilitates colorectal cancer development *via* ferroptosis inhibition [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(1): 124-137. DOI: 10.1038/s41556-023-01314-6.
- [25] SCOVILLE S D, NALIN A P, CHEN L X, *et al.* Human AML activates the aryl hydrocarbon receptor pathway to impair NK cell development and function[J]. *Blood*, 2018, 132(17): 1792-1804. DOI: 10.1182/blood-2018-03-838474.
- [26] WU P Y, YU I S, LIN Y C, *et al.* Activation of aryl hydrocarbon receptor by kynurenine impairs progression and metastasis of neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(21): 5550-5562. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3272.
- [27] BENDER M J, MCPHERSON A C, PHELPS C M, *et al.* Dietary tryptophan metabolite released by intratumoral *Lactobacillus reuteri* facilitates immune checkpoint inhibitor treatment[J]. *Cell*, 2023, 186(9): 1846-1862.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.011.
- [28] O'DONNELL E F, KOPPARAPU P R, KOCH D C, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor mediates leflunomide-induced growth inhibition of melanoma cells[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40926 [2024-09-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398955/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0040926.
- [29] CHU M L, ZHANG C Y. Inhibition of angiogenesis by leflunomide *via* targeting the soluble ephrin-A1/EphA2 system in bladder cancer [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1539[2024-09-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29367676/>. DOI: 10.1038/s41598-018-19788-y.
- [30] REN A S, FU G, QIU Y, *et al.* Leflunomide inhibits proliferation and tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9125-9130. DOI: 10.3892/mmr.2017.7755.
- [31] LOURENCO C, RESETCA D, REDEL C, *et al.* MYC protein interactors in gene transcription and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(9): 579-591. DOI: 10.1038/s41568-021-00367-9.
- [收稿日期] 2024-04-23 [修回日期] 2024-09-15  
[本文编辑] 黄静怡