

DOI:10.12113/j.issn.1672-5565.201806002

NOP56 在乳腺癌组织中的表达情况及对临床预后的意义

曲 杰¹,林萍萍¹,吕喜英¹,吴练练²,李青山^{1*}

(1.河北承德医学院附属医院 肿瘤科,河北 承德 067000;2.武汉大学人民医院 消化内科,武汉 430060)

摘 要:NOP56 是一种与癌基因表达密切相关的核仁蛋白。本文通过对在线数据进行差异表达基因分析,发现 NOP56 在乳腺癌组织中高表达。再以 NOP56 的表达高低为表型,分析不同表型与临床预后的差异,结果表明 NOP56 高表达与乳腺癌不良临床病理参数和预后密切相关。通过富集分析获得 NOP56 的蛋白互作网络、计算共表达基因语义相似性。最后通过在线数据库获得 NOP56 及其共表达基因的的临床靶向药物放线菌素 D(更生霉素)。这些结果为乳腺癌防治提供了潜在的新的预测指标,完善了临床靶向药物使用的分子机制,为靶向药物的临床使用提供依据和线索。

关键词:乳腺癌;NOP56 核糖核蛋白;生物信息学;预后;靶向药物

中图分类号:Q344+.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2019)02-122-09

Expression of NOP56 in breast cancer and its significance for clinical prognosis

QU Jie¹, LIN Pingping¹, LÜ Xiyi¹, WU Lianlian², LI Qingshan^{1*}

(1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei, China;
2. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: NOP56 is a nucleolar protein that closely relates to the expression oncogene. In this paper, the differential expression gene analysis of the data from online database revealed that NOP56 is overexpressed in breast cancer tissues. The expression of NOP56 was used as a phenotype to analyze the difference between different phenotypes and clinical prognosis. Results showed that the high expression of NOP56 was closely related to the poor clinical pathological parameters and prognosis of breast cancer. The protein interaction network of NOP56 was obtained by differential gene enrichment analysis, and the semantic similarity of co-expressed genes was calculated. Finally, the clinically targeted drug actinomycin D (dactinomycin) of NOP56 and its co-expressed genes were obtained from an online database. These results provide potential new predictive indicators for breast cancer prevention and treatment, improve the molecular mechanism of clinical targeted drug use, and provide evidence and clues for the clinical use of targeted drugs.

Keywords: Breast cancer; NOP56; Bioinformatics; Prognosis; Targeted drug

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率逐年升高,严重威胁女性生命健康^[1]。NOP56 核糖核蛋白(NOP56 ribonucleoprotein, NOP56)是一种核仁蛋白,是 C/D 盒小核仁核糖核酸复合物(snoRNPs)的重要组成部分,在 60S 核糖体亚基组装中发挥关键作用,涉及 rRNA 前体的早中期加工^[2](MIM # 614154)。研究报道,NOP56 表达受原癌基因 c-Myc 调控^[3],同时, NOP56 也可调节 c-Myc 从而促进 Burkitt 淋巴瘤生长^[4]。NOP56 可以与 hPygo2 蛋白结合,促进人卵巢癌细胞生长^[5]。在人乳腺癌细胞中,NOP56 基因敲除后细胞集落形成能力和生长能力明显降低^[6]。然而,NOP56 在人乳腺癌组织中的表达情况及临床意义的大数据分析尚未见报道。

通过对美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)^[7]和美国

收稿日期:2018-06-30;修回日期:2018-12-15.

基金项目:承德市科学技术研究与发展计划项目(No. 20157043).

作者简介:曲杰,男,主治医师,研究方向:肿瘤放化疗研究.E-mail:28269525@qq.com.

* 通信作者:李青山,男,教授,研究方向:肿瘤化疗以及肺癌的耐药机制研究.E-mail: libing200865@126.com.

国立健康中心 (The National Institute of Health, NIH) 的癌症基因组数据库 (The Cancer Genome Atlas,TCGA)^[8] 公共数据集进行分析,探索 NOP56 在人乳腺癌组织中的表达及临床病理关系,同时在 K-M plotter 在线数据库中研究 NOP56 的预后价值。进一步利用 String、GSEA 数据库,挖掘乳腺癌中与 NOP56 存在互相作用的蛋白网络,筛选与 NOP56 存在相互作用的基因并建立基因调控网络,WebGestalt 数据库寻找靶向药物^[9],为乳腺癌的分子机制研究提供新的切入点和同时进一步探讨临床靶向药物治

疗的分子机制。

1 材料与方法

1.1 数据资料收集

从 NCBI 的 GEO 数据库下载原始数据,通过 MAS5 进行标准化,乳腺癌组织登录号为 GSE42568、GSE15852、GSE10780 和 GSE45255。从 TCGA 数据库下载原始数据,通过 RSEM 标准化。纳入的数据基本信息见表 1。

表 1 纳入的 4 套乳腺癌基因芯片基本信息
Table 1 Basic information of four GEO datasets of breast cancer

数据库	芯片	数据信息/个		设计类型
		阴性样本数	阳性样本数	
GEO 登录号	GSE15852	43	43	配对组织
	GSE10780	41	143	非配对组织
	GSE42568	104	16	非配对组织
	GSE45255	139	0	肿瘤组织
TCGA	高通量测序	1 093	112	非配对组织

1.2 差异表达基因分析

在数据集 GSE15852 中,通过配对样本 T 检验比较乳腺癌和配对癌旁组织 NOP56 表达差异。在数据集 GSE42568 和 GSE10780 中,通过非配对样本 T 检验比较乳腺癌和正常组织 NOP56 表达差异;在 TCGA 数据库中,通过非配对样本 T 检验比较不同临床病理分期的乳腺癌和配对癌旁组织 NOP56 表达差异;在 TCGA 数据库中,通过非配对样本 T 检验比较不同临床病理分期乳腺癌组织和配对癌旁组织 NOP56 表达差异。

1.3 数据集筛选与临床病理学参数相关性研究

TCGA 数据集和 GSE45255 基因样本量大且附带临床信息,利用此数据集进行进一步的相关性研究。其中临床资料缺失的样本被排除,根据表达谱数据,对样本的 NOP56 表达进行由高到低排序,高于信号 log2 中位数的样本作为高表达组,低于信号 log2 中位数的样本作为低表达组。

1.4 Kaplan-Meier plotter 在线数据库分析

利用在线数据库 Kaplan-Meier plotter (<http://www.kmplot.com/breast>) 获得的 3 951 例乳腺癌患者信息,以 NOP56 表达中位值 (Median) 将样本分为低表达和高表达组,利用缺省设置,在线分析 NOP56 对乳腺癌患者总生存期和无病生存期的预后价值。

1.5 NOP56 互相作用基因筛选和功能富集分析

利用 String (<https://string-db.org>) 在线数据库筛选人乳腺癌样本中与 NOP56 存在互作关系的蛋

白质并且获得互作蛋白网络图。通过 R3.5 软件计算互作基因在分子功能、生物过程、细胞组分以及三者平均的语义相似性并绘制热图。利用 GSEA3.0 软件对上述互作基因进行富集分析。

1.6 靶向药物富集分析

利用 WebGestalt (<http://www.webgestalt.org>) 在线数据库富集分析互作基因的靶向药物。

1.7 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析

生存分析采用 Kaplan-Meier 和 log-rank 检验法。临床病理参数相关性分析,组间比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。筛选共表达基因采用 spearman 和 Pearson 检验,spearman 分数和 Pearson 分数均大于 0.3 的基因被认为有共表达关系。功能分析采用 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 的功能集合被认为差异有统计学意义。

2 结果分析

2.1 NOP56 在人乳腺癌组织中高表达

在 GEO 数据库的 3 个独立数据集 GSE42568、GSE15852 和 GSE10780 中,与正常组织相比,NOP56 在人乳腺癌组织中显著高表达。在 TCGA 数据库的数据集中,1 093 例乳腺癌组织与 112 例正常组织相比,NOP56 在人乳腺癌组织中显著高表达 (见图 1);不同临床病理分期的乳腺癌组织与正常组织相比,NOP56 均高表达 ($P < 0.001$) (见表 2)。

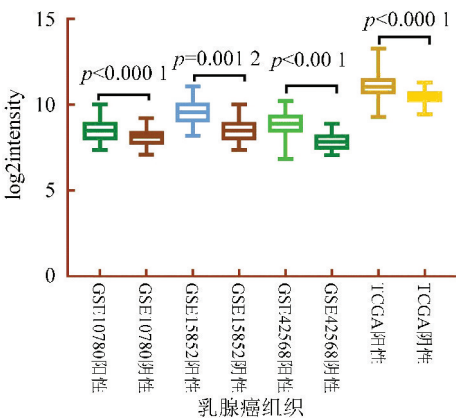


图 1 NOP56 在人乳腺癌组织中高表达
Fig.1 Overexpressed NOP56 in human breast cancer

表 2 分期与 p 值
Table 2 Stage and P

数据来源	分期	P 值
TCGA	Stage I	<0.001
	Stage II	<0.001
	Stage III	<0.001
	Stage IV	<0.001

2.2 NOP56 高表达与患者不良临床病理参数相关
2.2.1 分析GSE45255 数据集中年龄、淋巴结转移、雌激素受体(ER)状态、孕激素受体

(PRG)状态、人表皮生长因子受体 2(HER2)状态、组织学分级和肿瘤大小等临床病理参数与 NOP56 表达高低的相关性。结果显示,NOP56 高表

达在组织学分级为 G3 的肿瘤样本中更常见,而在分化程度较高的 G1、G2 肿瘤样本中,NOP56 低表达更多见($P < 0.001$),提示 NOP56 高表达与乳腺癌的进展呈正相关。同时,NOP56 与乳腺癌 HER2 状态相关,在 HER2 状态阳性的患者中高表达($P = 0.019$)。NOP56 的表达与年龄、淋巴结转移、PRG 状态、ER 状态和肿瘤大小无显著相关性(见表 3)。

2.2.2 分析TCGA 数据集中年龄、淋巴结转移、雌激素受体(ER)状态、孕激素受体

(PRG)状态、人表皮生长因子受体 2(HER2)状态和病理分期等临床病理参数与 NOP56 表达高低的相关性。结果显示, NOP56 与乳腺癌 HER2 状态、年龄、PRG 状态相关,在 HER2 状态阳性的患者中高表达($P = 0.019$),在年龄< 55 岁的患者中高表达($P < 0.001$),在 PRG 阴性的患者中高表达($P < 0.0001$)。NOP56 的表达与年龄、淋巴结转移和 ER 状态无显著相关性(见表 4)。GEO 数据库与 TCGA 数据库结果一致。

2.3 NOP56 高表达提示不良预后

K-M plotter 生存分析显示,NOP56 高表达患者的无进展存活期(Disease free survival, DFS)和总存活期(Overall survival, OS)均明显较低表达患者短($P < 0.001$,见图 2)。这表明 NOP56 低表达与患者生存期缩短显著相关,NOP56 可能成为预测乳腺癌的预后指标(见图 2)。

表 3 不同 NOP56 表达与 GEO 数据库 139 例乳腺癌患者临床病理参数的关系

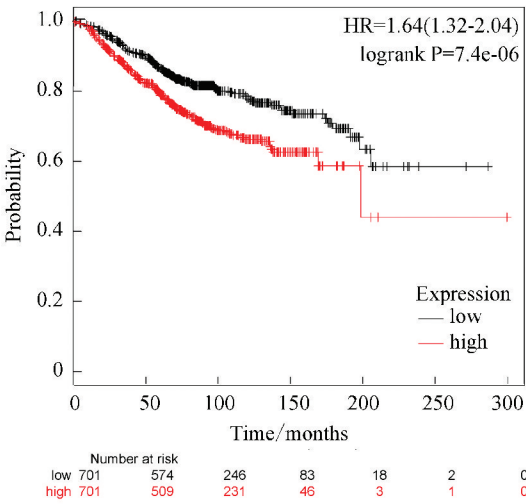
Table 3 Correlation between NOP56 expression and clinicopathological parameters in 139 patients with breast cancer

临床病理指标	样本总量	NOP56 表达量		χ ² 值	p 值
		低	高		
年龄(岁)					
< 55	76	37	39	0.061	0.804
≥ 55	63	32	31		
淋巴结转移					
阴性	94	46	48	0.058	0.810
阳性	45	23	22		
ER 状态					
阴性	48	21	27	0.786	0.375
阳性	89	46	43		
PRG 状态					
阴性	60	28	32	0.489	0.484
阳性	72	38	34		
HER2 状态					
阴性	69	42	27	5.518	0.019 *
阳性	62	25	37		
组织学分级					
G1	17	11	6	18.491	< 0.001 **
G2	52	36	16		
G3	67	21	46		
肿瘤大小(mm)					
≤ 25	71	39	32	1.624	0.203
> 25	68	30	38		

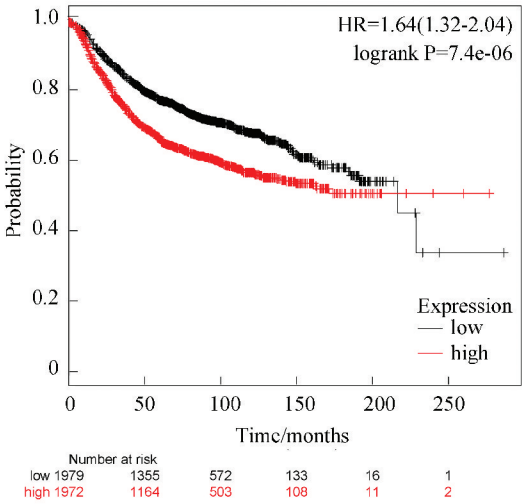
表 4 不同 NOP56 表达与数据 TCGA 数据库库 1 093 例乳腺癌患者临床病理参数的关系

Table 4 Correlation between NOP56 expression and clinicopathological parameters in 1 093 patients with breast cancer in TCGA

临床病理指标	样本总量	NOP56 表达量		χ ² 值	p 值
		低	高		
年龄(岁)					
< 55	434	186	248	13.31	< 0.001 **
≥ 55	646	350	296		
淋巴结转移					
阴性	588	286	302	0.880	0.348
阳性	505	260	245		
ER 状态					
阴性	238	71	67	0.909	0.340
阳性	808	451	357		
PRG 状态					
阴性	342	120	222	45.33	< 0.000 1 ****
阳性	698	400	298		
HER2 状态					
阴性	560	297	263	9.961	0.002 **
阳性	164	64	100		
病理分期					
Stage I	181	104	77		
Stage II	619	304	315	7.515	< 0.057
Stage III	249	122	127		
Stage IV	20	6	14		



(a) NOP56的表达量与乳腺癌患者的总生存期呈负相关



(b) NOP56 的表达量与乳腺癌患者的无病生存期呈负相关

图 2 NOP56 表达水平与乳腺癌患者生存时间关系

Fig.2 Correlation between NOP56 expression and the prognosis of breast cancer patients

2.4 NOP56 互作及其功能

String 在线数据库筛选人乳腺癌样本中与 NOP56 存在互作关系较强的基因 10 个。(见图 3

(a)) R3.5 进行语义相似性分析(见图 3(b)、(c)、(d)、(e))

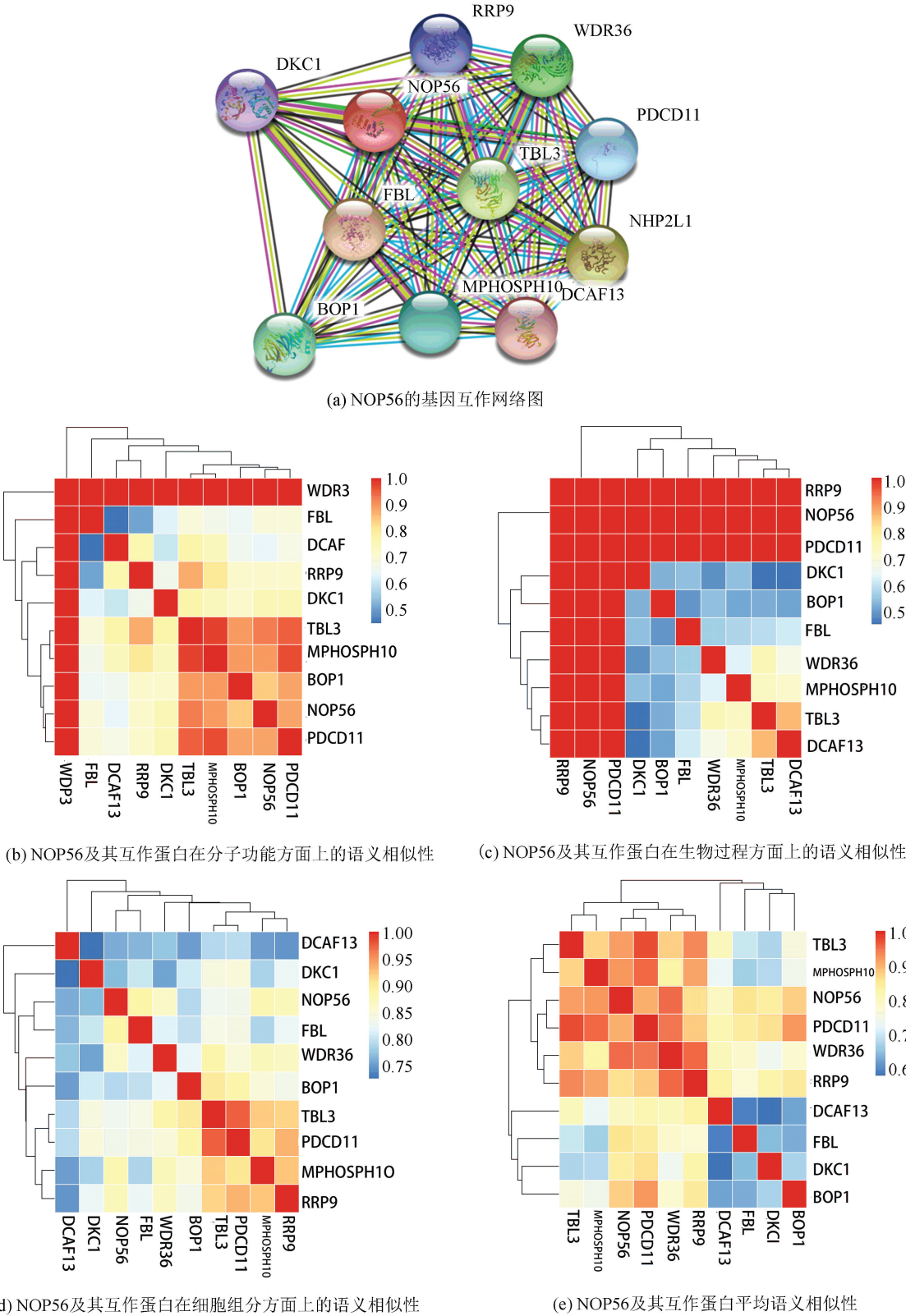


图 3 NOP56 蛋白互作网络以及共表达基因与 NOP56 分子功能、生物过程、细胞组分以及平均语义相似性
Fig.3 Gene interaction network diagram of NOP56 and the molecular function ,biological process ,cellular component ,and the mean semantic similarity between NOP56 and its co-expressed genes

利用 GSEA 数据库对互作基因进行富集分析，结果显示这些基因主要富集在 RNA 加工，细胞分裂和 DNA 复制等与肿瘤发生发展关系密切的功能上（见图 4）。

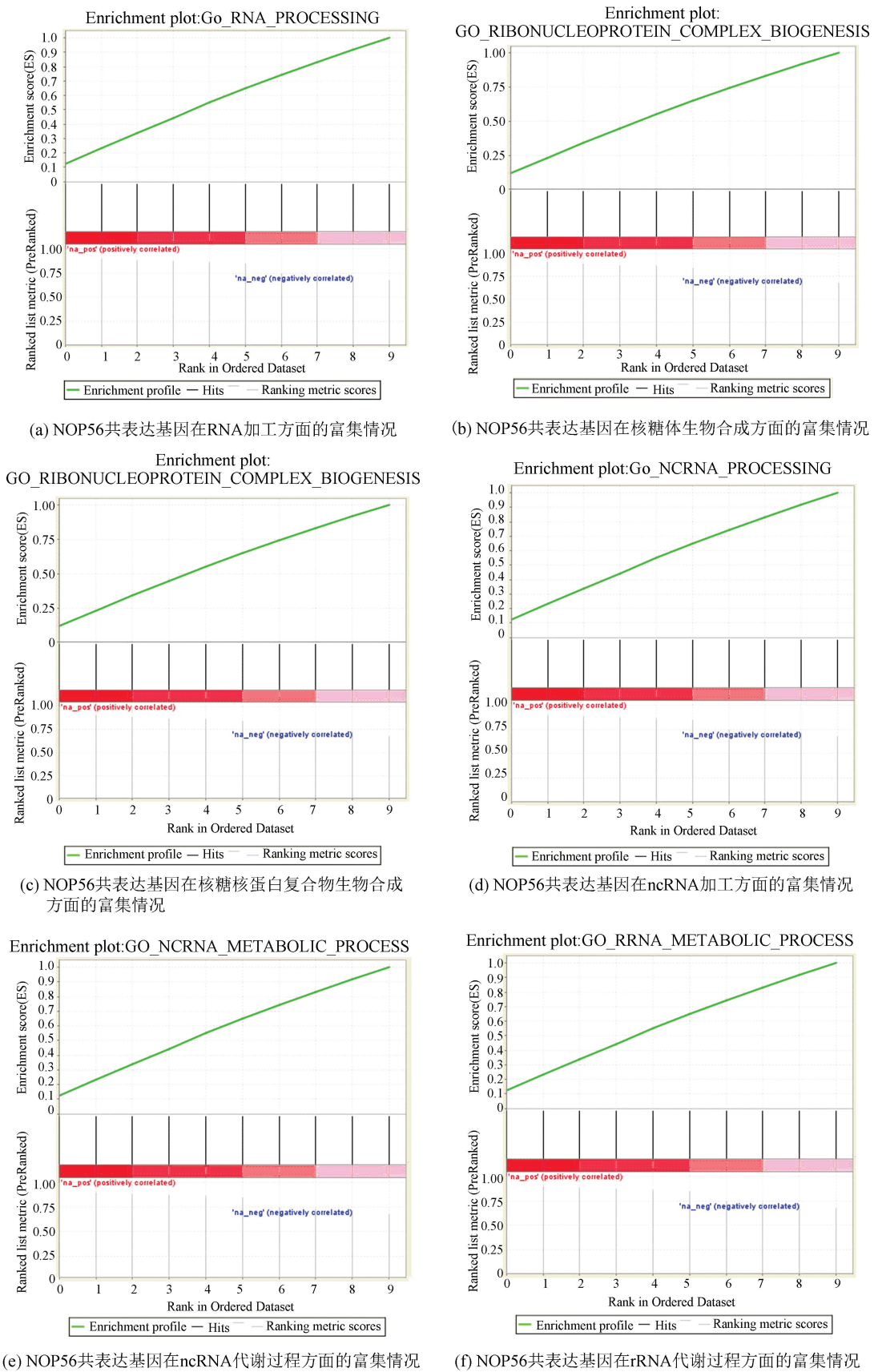


图 4 NOP56 共表达基因主要富集在 RNA 加工和细胞分裂等与肿瘤发生发展关系密切的功能上

Fig.4 NOP56 co-expression genes are mainly enriched in the functions closely related to the tumor development such as RNA processing and cell division

2.5 NOP56 互作基因靶向药物

WebGestalt 网站分析显示,以上互作基因靶向

药物有 5 种,其中互作基因作为靶基因最多的为放线菌素 D(见表 5)

表 5 靶向基因药物
Table 5 Targeted gene drugs

编号	药物名称	靶向基因	FDR	P 值
PA151917012	放线菌素	MPHOSPH10、NOP56、TBL3、	2.38×10 ⁻⁹	2.22×10 ⁻¹²
	Ddactinomycin	DKC1、FBL、BOP1、RRP9		
PA164712314	更生霉素	MPHOSPH10、NOP56、TBL3、	2.38×10 ⁻⁹	2.22×10 ⁻¹²
	Actinomycines	DKC1、FBL、BOP1、RRP9		
PA164712371	抗结核分支杆菌素	MPHOSPH10、TBL3、FBL	1.12×10 ⁻¹	1.98×10 ⁻⁴
PA164712406	抗生素	MPHOSPH10、TBL3、FBL	1.12×10 ⁻¹	1.98×10 ⁻⁴
	Antibiotics			

3 讨 论

乳腺癌的发生发展离不开异常的蛋白质生物合成^[6],而细胞中蛋白质的合成需求与核糖体生物合成活性相协调,当某些关键的核糖体蛋白水平上调后,可通过调节其他蛋白的表达影响细胞生长代谢^[10]。研究表明,核糖体生物合成速率增加促进原癌基因 Myc 表达,增加癌细胞增殖能力^[8],同时可通过释放 MDM2 蛋白降解抑癌基因 p53^[12]和 pRb^[13],增加癌症患病风险。核糖体生物合成活跃可促进乳腺癌细胞侵袭能力,增加乳腺癌恶性程度^[14]。NOP56 是小分子核仁核糖核蛋白(snoRNP)复合体的核心蛋白质成员,直接对 rRNA 前体核糖部分进行甲基化修饰,在核糖体生物合成中发挥重要作用^[15]。NOP56 突变可导致 60S 核糖体亚基装配缺陷,rRNA 加工受抑^[15]。研究表明,NOP56 可调节原癌基因 c-Myc 促进 Burkitt 淋巴瘤细胞生长^[4],同时可以与 hPygo2 蛋白结合,促进卵巢癌细胞生长^[5]。本研究通过生物信息学分析,首次在人乳腺癌组织中发现 NOP56 显著高表达,且 NOP56 高表达与乳腺癌不良临床病理参数和预后相关。为进一步揭示其作用机制,我们探索了乳腺癌中 NOP56 共表达基因、互作蛋白及其功能,并构建蛋白互作网络图。

通过 GEO 和 TCGA 数据库,我们首次发现 NOP56 在人乳腺癌中显著高表达。在 GSE45255 中,数据显示 NOP56 高表达患者乳腺癌分化程度低。这与已有的研究一致,Su H 等人发现 NOP56 促进人乳腺癌细胞集落形成能力和生长能力^[6]。此外,我们发现 NOP56 在 HER2 阳性患者中高表达。HER2 过表达与乳腺癌的发生、发展、侵袭和转

移密切相关^[16]。HER2 基因编码酪氨酸激酶活性跨膜糖蛋白,与相应配体结合导致胞内酪氨酸激酶磷酸化,引起细胞生长、增殖相关信号通路如 NF-κB 等的连锁反应,促进细胞增殖分化^[17]。HER2 阳性乳腺癌细胞 c-Myc 表达水平高,敲低 HER2 基因后 c-Myc 表达降低^[18],而 c-Myc 可直接促进 NOP56 表达^[3]。这说明乳腺癌中 HER2 可能通过激活细胞生长增殖相关信号通路上调 c-Myc 等原癌基因从而促进 NOP56 表达。我们进一步利用在线数据库 K-M plotter,对 3 951 例乳腺癌患者进行预后分析,发现 NOP56 高表达乳腺癌患者生存期显著降低。乳腺癌组织中 NOP56 表达水平,或许可以作为乳腺癌患者新的检测指标和远期预后评价指标,但还需大样本的临床数据进一步验证。

为了进一步理解乳腺癌中 NOP56 异常表达的机制,筛选出 NOP56 最显著的互作基因 10 个。单一的基因异常往往伴随下游基因的连锁异常反应,这是多种癌症相关基因异常促进癌症发展的重要原因之一。功能分析显示,NOP56 共表达基因主要参与 RNA 加工、细胞分裂和 DNA 复制等与肿瘤发生发展关系密切的功能。这些结果与现有的实验结果一致,Victoria H.等^[5]发现 NOP56 基因过表达后,Burkitt 淋巴瘤细胞的增殖明显加快;Yuichi J.等^[19]发现在乳腺癌上皮细胞中 Nop56 促进细胞周期 G1 期缩短,是细胞周期进程的重要介质。研究证明 NOP56 共表达网络的准确性,提示 NOP56 可能通过影响这些共表达基因来发挥其促癌作用。

最后,我们筛选出了 NOP56 互作基因富集的靶向药物,选取了富集基因最多的放线菌素类中的放线菌素 D。放线菌素 D(更生霉素)是第一种显示出具有抗肿瘤活性的抗生素,是临床上广泛使用的抗肿瘤药物,现在常用于各种小儿肿瘤,如肾母细胞

瘤,横纹肌肉瘤和尤因氏肉瘤的治疗^[20-22]。放线菌素 D 是一种 DNA 嵌入剂,它更偏向于富含 GC 的 DNA 序列^[23]。Perry RP 等人发现低浓度的放线菌素 D 可以破坏核糖体正常的生物过程,最终导致细胞周期停滞和细胞凋亡^[23-25]。Das T 等人研究发现放线菌素 D 可以下调 SOX2 表达,从而诱导乳腺癌干细胞死亡^[26]。通过这些研究我们可以假设,放线菌素 D 通过靶向作用于 NOP56 及其互作基因达到对乳腺癌的治疗作用,放线菌素 D 的治疗作用可能与 NOP56 的表达量相关,而这些假设还需要进一步的实验以及临床验证。

综上所述,利用公共数据库证明乳腺癌组织中 NOP56 高表达,NOP56 促进肿瘤分化,在 HER 阳性患者中表达量高,且与乳腺癌患者的不良预后密切相关。机制上,我们研究了乳腺癌中 NOP56 共表达基因,其功能主要为 RNA 加工,细胞分裂和 DNA 复制等与肿瘤发生发展关系密切的功能,并构建基因互作网络图,发现互作基因靶向药物明显富集在放线菌素 D 上。系统地研究了 NOP56 在乳腺癌中的表达与临床预后、临床病理状态以及组织学分级的关系,探讨了分子机制以及与临床靶向药物的关系,为乳腺癌防治提供潜在的新的预测指标,完善了临床靶向药物使用的分子机制。

参考文献(References)

[1]TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 69-90. DOI:10.3322 / caac.21262.

[2]LYKKE-ANDERSEN S, ARDAL B K, HOLLESEN A K, et al. Box C/D snoRNP autoregulation by a cis-Acting snoRNA in the NOP56 pre-mRNA [J]. Molecular Cell, 2018, 72(1): 99-111.e115. DOI:10.1016/j.molcel.2018.08.017.

[3]RUGGERO D. The role of Myc-induced protein synthesis in cancer[J]. Cancer Research, 2009, 69(23): 8839-8843. DOI:10.1158/0008-5472.Can-09-1970.

[4]COWLING V H, TURNER S A , COLE M D. Burkitt's lymphoma-associated c-Myc mutations converge on a dramatically altered target gene response and implicate Nof5a/Nop56 in oncogenesis[J]. Oncogene, 2014, 33(27): 3519-3527. DOI:10.1038/onc.2013.338.

[5]HE Zhijian. Identification of pygopus 2 as a component of the ribosomal RNA transcription complex in cancer [D]. Newfoundland;Memorial University of Newfoundland, 2008.

[6]SU H, XU T, GANAPATHY S, et al. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(11): 1348-1358. DOI:10.1038/onc.2013.89.

[7]BARRETT T, TROUPD B, WILHITE S E, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets--10 year on[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39 (Database issue):D1005-D1010. 41: D991-995. DOI:10.1093/nar/gks1184.

[8]TOMCZAK K, CZERWINSKA P , WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge[J]. Contemporary Oncology , 2015, 19(1a): A68-77. DOI:10.5114/wo.2014.47136.

[9]WANG J, VASAIKAR S, SHI Z, et al. WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W130-w137. DOI:10.1093/nar/gkx356.

[10]GENTILELLA A, KOZMA S C , THOMAS G. A liaison between mTOR signaling, ribosome biogenesis and cancer [J]. BBA. Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849 (7): 812-820. DOI:10.1016/j.bbagr.2015.02.005.

[11]GOMEZ-ROMAN N, FELTON-EDKINS Z A, KENNETH N S, et al. Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III[J]. Biochemical Society Symposium, 2006, (73): 141-154. DOI:10.1042/bss0730141.

[12]MONTANARO L, TRERÉ D , DERENZINI M. Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulating the cell tumor suppressor potential[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer,2012, 1825(1): 101-110. DOI:10.1016/j.bbcan.2011.10.006.

[13]RIDDLE V G H, PARDEE A B, ROSSOW P W. Growth control of normal and transformed cells[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, 11 (4): 529-538. DOI:10.1002/jss.400110411.

[14]BELIN S, BEGHIN A, SOLANOGONZÁLEZ E, et al. Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells[J]. Plos One,2009, 4(9): e7147. DOI:10.1371/journal.pone.0007147.

[15]HAYANO T, YANAGIDA M, YAMAUCHI Y, et al. Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes: Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(36): 34309-34319. DOI:10.1074/jbc.M304304200.

[16]IRVIN W J R, MUSS H B , MAYER D K J O. Symptom management in metastatic breast cancer [J]. Oncologist, 2011, 16(9): 1203-1214. DOI:10.1634/theoncologist.2011-0159.

[17]GUPTA P , SRIVASTAVA S J M O. HER2 mediated *de novo* production of TGFβ leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer [J]. Molecular Oncology,2014, 8(8): 1532-1547. DOI:

- 10.1016 / j.molonc.2014.06.006.
- [18] PAPANIKOLAOU V, ILIOPOULOS D, DIMOU I, et al. Survivin regulation by HER2 through NF-kappaB and c-myc in irradiated breast cancer cells[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2011, 15(7): 1542–1550. DOI:10.1111/j.1582-4934.2010.01149.x.
- [19] MACHIDA Y J, CHEN Y, MACHIDA Y, et al. Targeted comparative RNA interference analysis reveals differential requirement of genes essential for cell proliferation [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(11): 4837–4845. DOI:10.1091/mbc.e06-04-0340.
- [20] HOLLSTEIN U J C L. Actinomycin, chemistry and mechanism of action[J]. *Chemistry Letters*, 1974, 74(6): 625–652. DOI:10.1021/cr60292a002.
- [21] MALOGOLOWKIN M, COTTON C A, GREEN D M. Treatment of Wilms tumor relapsing after initial treatment with vincristine and actinomycin D: A report from the National Wilms Tumor Study Group[J]. *Pediatric Blood & Cancer*, 2008, 50(2): 236–241. DOI: 10.1002/pbc.21267.
- [22] JAFFE N, PAED D, TRAGGIS D, et al. Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy[J]. *Cancer*, 1976, 38(5): 1925–1930. DOI: 10.1002/1097-0142(197611)38:5<1925::aid-cnrcr2820380510>3.0.co;2-.
- [23] PERRY R P, KELLEY D E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: Characteristic dose-response of different RNA species[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1970, 76(2): 127. DOI:10.1002/jcp.1040760202.
- [24] DONATI G, PEDDIGARI S, MERCER C A, et al. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint[J]. *Cell Reports*, 2013, 4(1): 87–98. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.05.045.
- [25] HILL C R, COLE M, ERRINGTON J, et al. Characterisation of the clinical pharmacokinetics of actinomycin D and the influence of ABCB1 pharmacogenetic variation on actinomycin D disposition in children with cancer[J]. *Clinical Pharmacokinetics*, 2014, 53(8): 741–751. DOI: 10.1007/s40262-014-0153-2.
- [26] DAS T, NAIR R R, GREEN R, et al. Actinomycin D down-regulates SOX2 expression and induces death in breast cancer stem cells[J]. *Anticancer Research*, 2017, 37(4): 1655–1663. DOI:10.21873/anticancer.11496.