



乳腺癌中 ASS1 的表达及其与临床病理特征和预后的相关性

聂雅婷^{1,2}, 丁 兰², 袁 媛², 刘 磊², 沈立新¹

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 空军军医大学 基础医学院, 陕西 西安 710032)

摘要 探究乳腺癌组织中尿素循环关键分子及其与乳腺癌临床病理特征和预后的关系。首先,通过 TCGA 及 GTEx 数据库筛选乳腺癌中差异表达的尿素循环关键分子,分析其与乳腺癌患者预后的关系。然后,收集 2010 年 11 月至 2016 年 12 月在西京医院进行手术治疗的 97 例乳腺癌患者以及 54 例非肿瘤(乳腺腺病)患者的手术标本,制作组织芯片,利用免疫组化染色法研究乳腺癌和正常乳腺(乳腺腺病)组织中精氨酸代琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase 1, ASS1)的表达情况,并确定其与临床病理特征和预后之间的关系。分析 TCGA 及 GTEx 数据库发现,尿素循环关键分子 ASS1 在乳腺癌中表达下降,并与患者的预后显著相关($p < 0.05$)。免疫组化染色显示 ASS1 主要定位于胞浆,在乳腺癌中表达下降,且与 Ki-67 表达及分子分型显著相关($p = 0.0215, 0.0005$)。ASS1 在乳腺癌中表达显著下降,与肿瘤的分型、Ki-67 表达密切相关,推测其在肿瘤发生发展中起着重要的作用。因此,ASS1 低表达可以作为评估乳腺癌预后的潜在指标。

关键词 尿素循环; ASS1(精氨酸代琥珀酸合成酶); 乳腺癌; 预后

中图分类号: R737.9 **DOI:** 10.16152/j.cnki.xdxbr.2023-04-014

ASS1 expression and its correlation with clinicopathological features and prognosis in breast cancer

NIE Yating^{1,2}, DING Lan², YUAN Yuan², LIU Lei², SHEN Lixin¹

(1. The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China;

2. Basic Medical Science Academy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract To determine the key molecule in breast cancer pathology and clinical prognosis by data analysis as well as surgical specimens immunohistochemical staining analysis. TCGA and GTEx databases were used to screen key molecules in the urea cycle with differential expression in breast, and their relationship with the prognosis of breast cancer patients was also analyzed. Then, the surgical specimens of 97 breast cancer patients and 54 non-neoplastic (mammary gland disease) patients who underwent surgical treatment in Xijing Hospital from November 2010 to December 2016 were collected to produce breast cancer tissue chips. Immunohistochemical staining was employed to determine the expression of ASS1 (argininosuccinate synthase 1) in breast cancer and adjacent normal tissues, and to verify its relationship with pathological features and prognosis of breast cancer. TCGA and GTEx database analysis showed that the expression of ASS1 decreased in breast

收稿日期: 2022-11-15

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2022JM-536); 陕西化生基础科学研究项目(22JHZ008)

第一作者: 聂雅婷, 女, 从事胶质瘤代谢相关研究, nieyt1071@163.com。

通信作者: 沈立新, 女, 教授, 博士生导师, 从事病原微生物致病及耐药机制等研究, shenlx@nwu.edu.cn。

cancer, significantly correlated with the prognosis of patients ($p < 0.05$). Immunohistochemical results demonstrated that ASS1 is mainly located in cytoplasm. Its expression decreased in breast cancer, and significantly correlated with Ki-67 level and molecular typing ($p = 0.0215$, $p = 0.0005$). The expression of ASS1 significantly decreased in breast cancer, and closely related to molecular typing and Ki-67 level, suggesting that ASS1 plays an important role in the occurrence and development of tumor. Therefore, low ASS1 expression can be used as a potential indicator to evaluate the prognosis of breast cancer.

Keywords urea cycle; argininosuccinate synthase 1 (ASS1); breast cancer; prognosis

2020 年,世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer)公布的最新数据显示,乳腺癌占全球所有新增癌症病例的 11.7%,取代肺癌成为世界第一大癌症^[1]。在中国,乳腺癌发病率约等于妇科宫颈癌、卵巢癌、内膜癌总和的 1.7 倍,是威胁我国女性生命健康的最主要疾病^[1-2]。乳腺癌的异质性很强,针对不同的乳腺癌分型,寻找特异性靶点并采取精准的个体化治疗是当前的研究热点^[3-4]。越来越多的研究发现,尿素循环关键分子表达与肿瘤的增殖、侵袭、转移和预后密切相关。

尿素循环主要发生在哺乳动物的肝脏,以氨基酸等含氮化合物代谢产生的游离氨以及天冬氨酸为底物生成尿素,避免了机体中过量氨蓄积,维持机体的氮氮平衡。在其他器官中,尿素循环(urea cycle)是内源性精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸的唯一来源^[5]。同时,尿素循环也为多胺、一氧化氮、脯氨酸的合成提供底物,维持细胞的生存和增殖^[6-9]。在尿素循环中,精氨酸代琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthase 1, ASS1)和精氨酸代琥珀酸裂解酶(argininosuccinate lyase, ASL)催化瓜氨酸至精氨酸的反应,为细胞提供内源性精氨酸。

本研究通过 TCGA 及 GTEx 数据库分析 1 212 例乳腺癌患者,以及 90 例正常乳腺组织的 RNA-seq 数据,确定尿素循环关键分子在乳腺癌中的表达,进一步分析差异表达分子与患者预后的关系。收集 97 例乳腺癌患者以及 54 例正常乳腺组织临床病理标本进行石蜡包埋、切片以及免疫组化染色,确定乳腺癌中尿素循环关键分子 ASS1 的表达,及其与乳腺癌临床病理特征和预后的关系。旨在探讨尿素循环在乳腺癌中的作用,为乳腺癌的精准治疗提供理论基础。

1 研究对象与方法

1.1 TCGA 数据的获取和分析

1 212 例乳腺癌患者尿素循环关键分子 RNA-

seq 数据以及 1 214 名乳腺癌患者生存时间数据来自 UCSC Xena 数据库(<https://xenabrowser.net/heatmap/>)中的 TCGA Breast Cancer (BRCA), 90 例正常乳腺组织尿素循环关键分子 mRNA 数据来源于 GTEx 数据集,非配对 t 检验分析基因表达差异, Kaplan-Meier 进行生存分析。

1.2 人乳腺癌标本的临床资料

选取 2010 年 11 月至 2016 年 12 月在西京医院进行乳腺癌手术治疗的 97 例乳腺癌组织以及 54 例非肿瘤组织(距肿瘤 > 5 cm),固定、制作组织芯片、切片染色。肿瘤组织经病理诊断均为浸润性乳腺癌,非肿瘤组织为乳腺腺病。所有患者均为首次确诊,术前均未接受任何放化疗治疗、内分泌治疗且未合并其他恶性肿瘤,排除妊娠期女性、男性乳腺癌患者、不能明确分子分型者,临床病理资料完整。

1.3 乳腺癌分子分型的判定

基于不同的基因表达特点收集各个乳腺癌分子亚型病例,主要包括: Luminal A 型(10 例)、Luminal B 型(47 例)、过表达型(30 例)和 Basal-like 型(10 例)。本研究通过了西京医院医学伦理委员会审批,患者及家属知情。

1.4 免疫组化染色检测 ASS1 的表达

正常乳腺组织以及乳腺癌组织石蜡样本切片、二甲苯、梯度乙醇脱蜡,自来水冲洗 10 min; $1 \times$ Tris-EDTA (10 $\times$ Tris-EDTA 碱修复液; Tris 12.1 g, EDTA 3.7 g, 去离子水定容至 500 mL) 碱修复液进行高压抗原修复; 1% Triton X-100 水溶液处理 15 ~ 30 min 进行透化, $1 \times$ PBS 清洗 3 次, 每次 3 min; 滴加 3% H_2O_2 , 避光放置 10 ~ 20 min, 结束后 $1 \times$ PBS 清洗 3 次, 每次 3 min; 采用非一抗来源的山羊血清封闭 30 min; 滴加兔来源抗人 ASS1 抗体(1: 300, Abcam, 货号: ab170952) 4 $^{\circ}C$ 过夜孵育; 室温复苏 1 h, $1 \times$ PBS 清洗 3 次, 每次 3 min; 二抗(山羊抗兔 IgG, 1: 10 000, Jackson, 货号: 111-035-003) 室温孵育 1 h, $1 \times$ PBS 清洗 3 次,

每次 3 min。DAB 染色液显色(ultra view universal DAB detection kit,中山金桥,ZLI-9018),并在显微镜(10×)下观察,看到淡黄色着色后立即将切片置于自来水中终止着色。苏木素复染 5~10 s,1%盐酸-酒精分化 3~5 s,自来水冲洗 10~20 min 返蓝;脱水中性树胶封片。

结果判读采用半定量评分标准,于高倍镜下随机选取 10 个视野进行阳性细胞计数。评分标准:① 染色程度。无染色(0 分),淡黄色(1 分),棕黄色(2 分),黄褐色(3 分)。② 阳性细胞数计数。 $\leq 5\%$ (0 分), $6\% \sim 25\%$ (1 分), $26\% \sim 50\%$ (2 分), $51\% \sim 74\%$ (3 分), $\geq 75\%$ (4 分)。依据上述两项积分乘积进行判定:0 分记为(-)/阴性,1~4 分记为(+)/弱阳性,5~8 分记为(++)/阳性, >8 分记为(+++)/强阳性。

1.5 统计方法

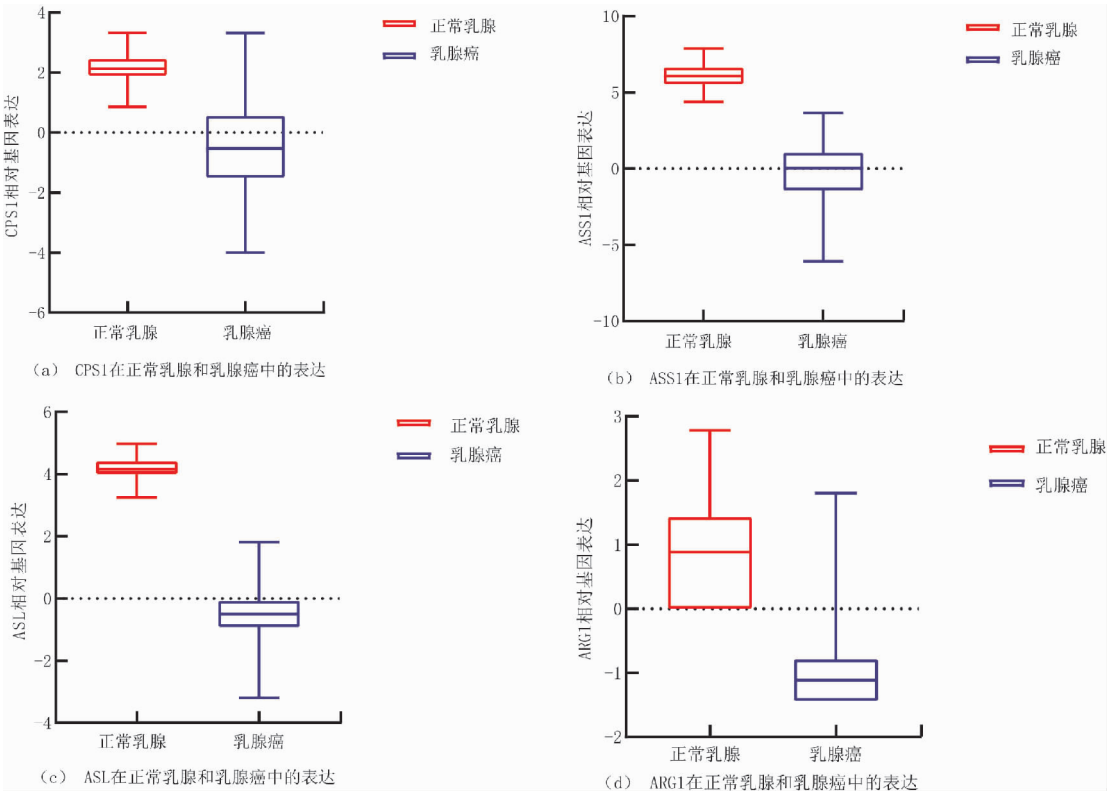
采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8.0 统计软件进行生存曲线制作。服从正态分布的计量数据用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用方差分析进行比较;不服从正态分布的计量资料采用四分位间距进行统计描

述,采用非参数检验(Kruskal-Wallis 秩和检验)进行组间比较。ASS1 蛋白水平与乳腺癌患者临床病理特征的关系分析采用 Spearman 秩相关性分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 法并进行 Log-rank 检验。

2 研究结果

2.1 TCGA 数据库分析乳腺癌中尿素循环关键分子的表达

氨基甲酰磷酸合成酶 1(carbamoyl phosphate synthetase 1,CPS1)、ASS1、ASL 和精氨酸酶(arginase,ARG1)等是催化尿素循环的代谢酶。主要表达于肝脏,其他组织中发生一定程度的特异性表达。其中 CPS1 和 ASS1 是尿素循环的关键限速酶,确保尿素循环得以顺利进行。通过分析 1 212 例 TCGA 数据库乳腺癌患者及 90 例 GTEx 正常乳腺组织 mRNA 数据发现,这 4 种酶在乳腺癌中的表达均下调,且差异具有统计学意义($p < 0.000 1$)(见图 1)。提示乳腺癌患者存在尿素循环障碍。



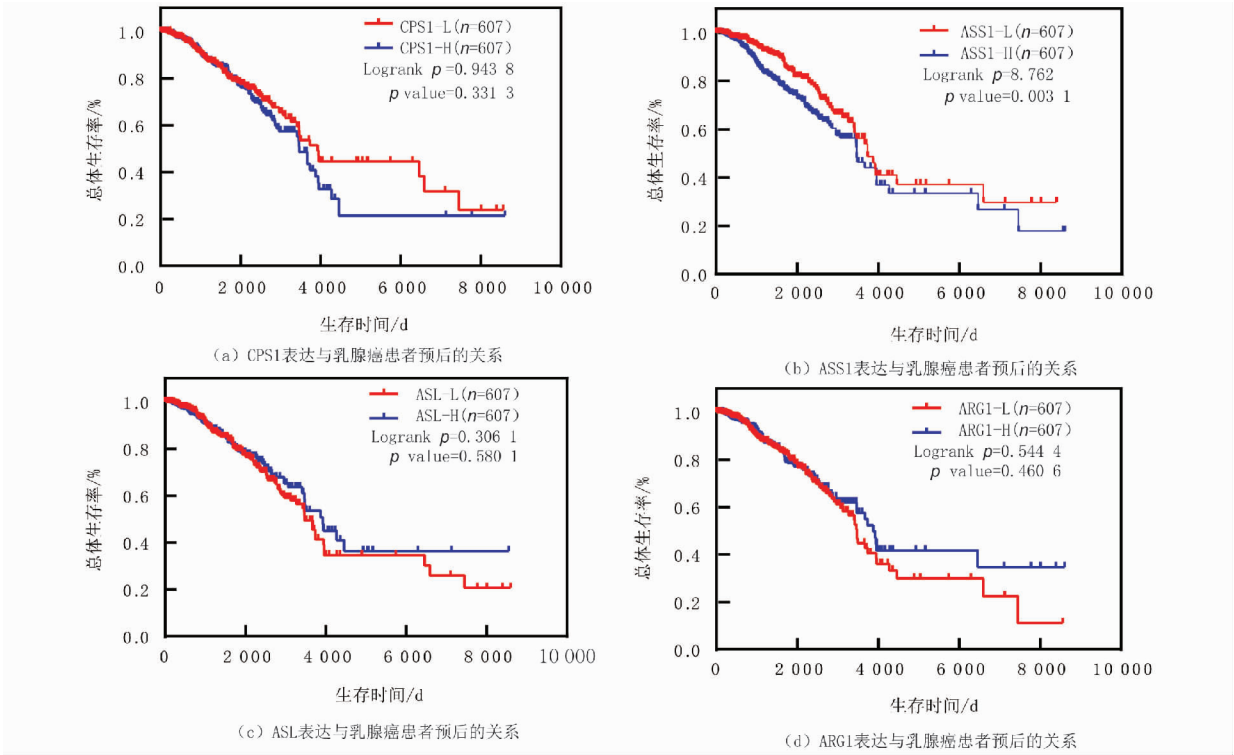
注:(a)~(d)结果表明,尿素循环分子 CPS1、ASS1、ASL、ARG1 在乳腺癌中的表达均下调,且差异具有统计学意义($p < 0.000 1$)。

图 1 尿素循环关键分子在乳腺癌中的表达
Fig. 1 Expression of key molecules of urea cycle in breast cancer

2.2 尿素循环关键分子 ASS1 表达与预后的相关性

基于以上结果,进一步分析 TCGA 数据库中 1 217 例乳腺癌患者的生存时间发现,尿素循环关键分子 ASS1 和 CPS1 低表达乳腺癌患者总体生存率均高于高表达患者,而 ASL 和 ARG1 高表达患者总体生存率高于低表达患者。通过 Kaplan-

Meier 分析并进行 Log-rank 检验,说明 ASS1 低表达对患者预后无显著影响($p = 0.003\ 1$)〔见图 2(b)〕。而 CPS1、ASL 和 ARG1 表达水平对乳腺癌患者的预后无显著影响($p = 0.331\ 3, 0.580\ 1, 0.460\ 4$)〔见图 2(a)、图 2(c)、图 2(d)〕。选择与预后有关的 ASS1 基因进行后续研究。



注:经 Kaplan-Meier 分析和 log-rank 检验显示,ASS1 高表达组患者总体生存率均低于低表达组患者($p < 0.05$)〔见图 2(b)〕。CPS1、ASL、ARG1 表达与乳腺癌患者预后无关($p > 0.05$)〔见图 2(a)、图 2(c)、图 2(d)〕。

图 2 CPS1、ASS1、ASL、ARG1 表达与乳腺癌患者预后的关系

Fig. 2 Relationship between the expression of CPS1, ASS1, ASL, ARG1 and the prognosis of breast cancer patients

2.3 免疫组化分析 ASS1 在乳腺癌组织及非肿瘤组织的表达

对乳腺癌组织芯片进行 ASS1 免疫组化染色,定义 ASS1 阴性(-)以及弱阳性(+)为 ASS1 低表达(ASS1-L),ASS1 阳性(++)及强阳性(+++)为高表达(ASS1-H)。免疫组化染色显示 ASS1 在正常乳腺组织中高表达〔见图 3(a)~(b)〕,而在肿瘤组织中呈现异质性表达〔见图 3(c)~(f)〕。免疫组化结果显示,97 例乳腺癌组织中 74 例(76.29%)为 ASS1-L,23 例(23.71%)为 ASS1-H,而在 54 例正常乳腺组织中 47 例(87.03%)为 ASS1-H。与正常乳腺组织相比,ASS1 在乳腺癌中的表达下降,且差异具有统计学意义($p < 0.05$,见表 1)。

2.4 ASS1 评分与乳腺癌临床病理特征的关系

对乳腺癌患者临床病理信息进行 Spearman 秩相关性分析发现,ASS1 表达与患者分子分型、Ki-67 显著相关($p = 0.000\ 5, 0.021\ 5$,见表 1)。而与肿瘤直径、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor 2,HER-2)以及淋巴结转移无关($p = 0.340\ 3, 0.091\ 0, 0.123\ 3, 0.051\ 4, 0.116\ 6$,见表 2)。其中 Ki-67 为细胞核内分裂增殖相关蛋白,临床上常作为肿瘤细胞增殖活性的可靠标记,与患者预后有关。实验发现 ASS1 低表达与 Ki-67 呈正相关,即 ASS1 低表达患者预后差。前期根据以下标准 Luminal A 型:ER 阳性和(或)PR 阳性,HER-2 阴性,Ki-67 < 14%。Luminal B 型:

ER 阳性和 (或) PR 阳性,HER-2 阴性,Ki-67 $\geq 14\%$ 或者 ER 阳性和 (或) PR 阳性,HER-2 阳性。
HER-2 过表达型:ER 阴性,PR 阴性,HER-2 阳性。
Basal-like 型:ER 阴性,PR 阴性,HER-2 阴

性。对收集的临床病人信息进行整合发现,ASS1 低表达与分子分型显著相关,可以针对不同的分子分型采取精准治疗。

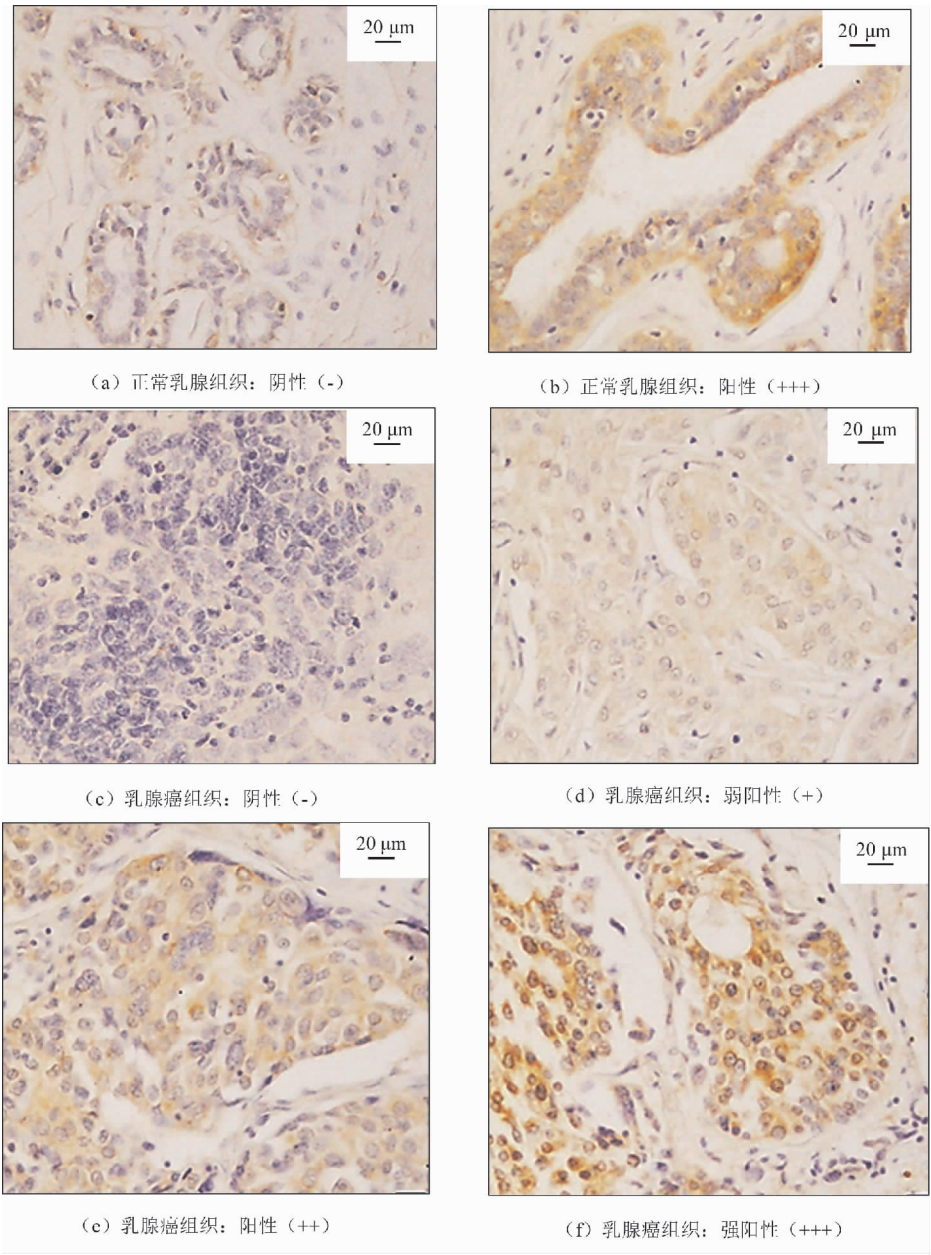


图 3 ASS1 在正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表达

Fig. 3 Expression of ASS1 in normal breast tissues and breast cancer tissues

表 1 ASS1 在正常乳腺组织和乳腺癌组织中的表达

Tab. 1 Expression of ASS1 in normal breast tissues and breast cancer tissues

	ASS1 表达		总计	p 值
	低表达	高表达		
乳腺腺病组织	7	47	54	<0. 001
乳腺癌组织	74	23	97	
总计	81	70	151	

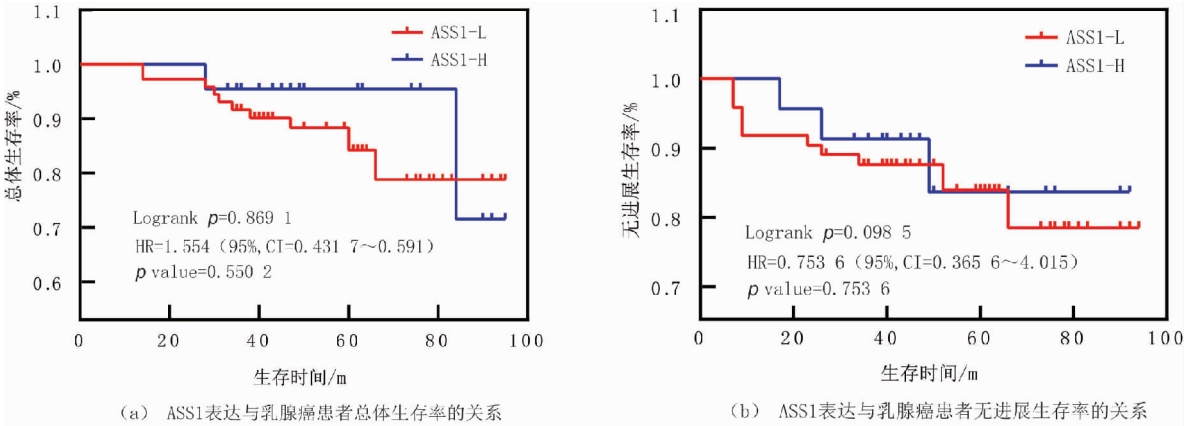
表 2 ASS1 表达与乳腺癌患者临床病理参数的关系
Tab. 2 Relationship between ASS1 expression and clinicopathological parameters in breast cancer patients

临床病理参数	例数	ASS1		Rho	p 值
		低表达	高表达		
肿瘤 T 分级				0. 042 1	0. 340 3
T1b	8	6	2		
T1c	47	38	9		
T2	40	28	12		
T4	2	2			
分子分型				0. 329 0	0. 000 5
Luminal A	10	10			
Luminal B	47	42	5		
Her-2	30	14	16		
Basal-like	10	8	2		
ER				-0. 136 6	0. 091 0
阳性	53	44	9		
阴性	44	30	14		
PR				-0. 118 1	0. 123 3
阳性	46	38	8		
阴性	51	36	15		
HER-2				0. 165 8	0. 051 4
阳性	72	54	18		
阴性	25	20	5		
Ki-67				0. 210 3	0. 021 5
阳性 (> 14%)	64	49	15		
阴性 (≤ 14%)	33	25	8		
淋巴结转移				-0. 121 5	0. 116 6
有	56	45	11		
无	36	25	11		
不确定	5	4	1		

2. 5 ASS1 表达水平与乳腺癌患者预后的关系

总体生存率和无进展生存期是乳腺癌患者的预后指标,研究中免疫组化染色的 97 例乳腺癌患者中 ASS1 低表达的患者 74 例,截至随访结束生存 60 例(81. 08%),ASS1 高表达的 23 例患者中生存 20 例(86. 96%),即 ASS1 低表达患者总体生存率低。ASS1 低表达的 73 例患者中生存 62

例(84. 9%),ASS1 高表达的 24 例患者中生存 20 例(83. 3%),即 ASS1 低表达患者的无进展生存率较高表达组高。但是通过 Kaplan-Meier 生存分析发现,ASS1 表达水平和患者总体生存率($p > 0. 05$)〔见图 4(a)〕、无进展生存期无相关性($p > 0. 05$)〔见图 4(b)〕。



(a) ASS1表达与乳腺癌患者总体生存率的关系

(b) ASS1表达与乳腺癌患者无进展生存率的关系

注:(a) ASS1 低表达组患者总体生存率较高表达组低,但差异无统计学意义, $p > 0.05$; (b) ASS1 低表达组患者无进展生存率较高表达组低,但差异无统计学意义, $p > 0.05$ 。

图 4 ASS1 表达与乳腺癌患者总体生存率以及无进展生存率的关系

Fig.4 Association between ASS1 expression and overall survival and progression-free survival in breast cancer patients

3 分析及结论

全球乳腺癌的发病率呈上升趋势,位居女性恶性肿瘤之首^[10]。目前,手术结合放化疗是治疗乳腺癌的主要手段,但其高度异质性、高复发率、耐药性使治疗效果不可观^[4, 11-12]。因此,探讨乳腺癌的发生、发展及其转移复发的分子机制,寻找潜在的特异性分子生物靶点对于乳腺癌诊断治疗有着极其重要的意义。

研究发现,ASS1 低表达与骨肉瘤患者术后转移以及不良预后显著相关^[13]。此外,ASS1 低表达与黏液纤维肉瘤的分级和分期密切相关,并且可以独立预测肿瘤的无转移生存期和疾病特异性生存期^[14]。本实验通过分析 TCGA 以及 GTEx 数据库发现,乳腺癌中 ASS1、CPS1、ASL 和 ARG1 表达均显著下调,提示乳腺癌存在尿素循环障碍。其中,ASS1 下降与乳腺癌患者预后显著相关($p = 0.0031$),与低表达组相比,ASS1 高表达组预后较差。基于以上分析,本研究制作了乳腺癌以及乳腺腺病组织芯片,进行免疫组化染色,发现 ASS1 在乳腺癌患者中的表达显著下调,且 ASS1 低表达与乳腺癌预后以及无病生存期具有一定相关性。本实验病例主要处于乳腺癌早期,各分子分型病人所占比重不同,同时存活率较高,故总体生存率以及无进展生存期差异不显著。进一步分析临床病理特征发现,ASS1 表达与 Ki-67 以及乳腺分子分型显著相关,而与肿瘤 T 分期、淋巴结

转移、ER、PR、HER-2 等无关。本研究为单中心小样本研究,所得结果可能存在偏倚,后期还需继续扩大临床样本量对研究结果进一步补充说明,以便得出更为可靠的结果,用于临床诊断及参考。

尿素循环缺陷也是乳腺癌治疗的潜在代谢靶点。研究发现,ASS1 在一些乳腺癌细胞中表达低或者缺失,这意味着乳腺癌细胞自身不能通过尿素循环合成内源性精氨酸^[15],所以癌细胞生长和增殖所需的精氨酸必须从循环血液中获得,导致产生精氨酸依赖^[16]。若血清中精氨酸含量降低,则乳腺癌细胞会因为缺乏营养而死亡^[17]。聚乙二醇修饰的精氨酸脱亚胺酶(ADI-PEG20)促进精氨酸转变为瓜氨酸,从而降低血液中的精氨酸含量,有望用于 ASS1 低表达乳腺癌患者的治疗。此外,mTOR 抑制剂通过抑制 CAD(carbamoylphosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase)的磷酸化,与 ASS1 竞争底物天冬氨酸,从而竞争性抑制精氨酸生成,也可以抑制 ASS1 低表达乳腺癌细胞的增殖生长^[18]。因此,ASS1 的表达水平对于乳腺癌具有重要的生物学意义,可成为治疗乳腺癌值得关注的新靶点。

综上,本研究发现 ASS1 在乳腺癌中呈现异质性,但总体表达水平低于正常乳腺组织,并且 ASS1 低表达与乳腺癌 Ki-67、患者预后及分子分型等存在显著相关性。因此,ASS1 在乳腺癌的发生发展中具有重要作用,有望作为乳腺癌诊断及治疗的重要靶标。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2021, 7(2):1-14.
LIU Z C, LI Z X, ZHANG Y, et al. Interpretation on the report of global cancer statistics 2020[J]. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management (Electronic Version)*, 2021, 7(2):1-14.
- [3] WEI J L, JIANG Y Z, SHAO Z M. The survival benefit of postmastectomy radiotherapy for breast cancer patients with T1-2N1 disease according to molecular subtype[J]. *The Breast*, 2020, 51:40-49.
- [4] 蒋梦怡, 陆言巧, 王红霞. 乳腺癌异质性的研究进展及临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(5):394-400.
JIANG M Y, LU Y Q, WANG H X. Research progress and clinical significance of breast cancer heterogeneity[J]. *China Oncology*, 2020, 30(5):394-400.
- [5] KESHET R, SZLOSAREK P, CARRACEDO A, et al. Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(10):634-645.
- [6] EREZ A, NAGAMANI S C, LEE B. Argininosuccinate lyase deficiency-argininosuccinic aciduria and beyond[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2011, 157C(1):45-53.
- [7] HUSSON A, BRASSE-LAGNEL C, FAIRAND A, et al. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(9):1887-1899.
- [8] 王冰梅. 一氧化氮合成与尿素循环酶的关系:“瓜氨酸-一氧化氮循环”[J]. *中国体育科技*, 2005, 41(5):130-131, 140.
WANG B M. The relation of nitric oxide synthesis and urea cycle enzymes[J]. *China Sport Science and Technology*, 2005, 41(5):130-131, 140.
- [9] MORRIS S M. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism[J]. *Annu Rev Nutr*, 2002, 22:87-105.
- [10] HOOPER R C, HSU J, DUNCAN A, et al. Breast cancer knowledge and decisions made for contralateral prophylactic mastectomy: A survey of surgeons and women in the general population[J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2019, 143(5):936e-945e.
- [11] LEE J G. A meta-analysis of the association between physical activity and breast cancer mortality[J]. *Cancer Nursing*, 2019, 42(4):271-285.
- [12] 林燕, 徐颖, 曹希, 等. 老年乳腺癌患者的综合治疗方式选择及其影响因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2022, 102(6):428-434.
LIN Y, XU Y, CAO X, et al. Comprehensive treatment options and influencing factors in elderly patients with breast cancer[J]. *National Medical Journal of China*, 2022, 102(6):428-434.
- [13] KOBAYASHI E, MASUDA M, NAKAYAMA R, et al. Reduced argininosuccinate synthetase is a predictive biomarker for the development of pulmonary metastasis in patients with osteosarcoma[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9(3):535-544.
- [14] HUANG H Y, WU W R, WANG Y H, et al. ASS1 as a novel tumor suppressor gene in myxofibrosarcomas: Aberrant loss via epigenetic DNA methylation confers aggressive phenotypes, negative prognostic impact, and therapeutic relevance[J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(11):2861-2872.
- [15] XIONG L F, TENG J L L, BOTELHO M G, et al. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3):363.
- [16] MORRIS S M. Recent advances in arginine metabolism: Roles and regulation of the arginases[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(6):922-930.
- [17] MARION V, SANKARANARAYANAN S, THEIJE C, et al. Hepatic adaptation compensates inactivation of intestinal arginine biosynthesis in suckling mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e67021.
- [18] RABINOVICH S, ADLER L, YIZHAK K, et al. Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis[J]. *Nature*, 2015, 527(7578):379-383.

(编辑 张欢)