婆罗双树样基因 4 对乳腺癌细胞阿霉素耐药的影响及其机制探究

王 茂[1,2]，代引海[1,2]*，李 宏[1,4]，周智辉[1,3]，李媛媛[1,3]，李福平[1]，程 瑞[1]，李尚鹏[1]
（1. 陕西中医药大学第二临床医学院，陕西咸阳 712046；2. 陕西中医药大学第二附属医院肿瘤乳腺外科，陕西咸阳 712000；
3. 陕西中医药大学第二附属医院科研部，陕西咸阳 712000；4. 陕西中医药大学制药厂，陕西咸阳 712000）

摘要：目的 探讨婆罗双树样基因 4（Spalt-like transcription factor 4，*SALL4*）对乳腺癌细胞阿霉素（adriamycin，ADR）耐药的影响及其调控机制。**方法** 采用定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）法及免疫印迹法（western blot，WB）分别检测乳腺癌细胞系中 SALL4 表达；构建沉默 *SALL4* 的乳腺癌耐药细胞系短发夹 RNA（short hairpin RNA，shRNA）-SALL4 巨噬细胞趋化因子（macrophage chemotactic factor，MCF）-7/ADR，采用细胞增殖实验及流式细胞仪检测 SALL4 对细胞增殖活性、半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）及细胞凋亡率的影响；分别检测 SALL4 对人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因（phosphate and tension homology deleted on chromsome ten，*PTEN*）表达，PTEN/ 蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB）/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路关键基因及细胞耐药基因表达的影响。**结果** 乳腺癌细胞系中 SALL4 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）和蛋白水平较正常乳腺细胞系明显升高（$P < 0.05$）。shRNA-SALL4 MCF-7/ADR 组细胞 IC_{50} 值显著降低，细胞增殖活性下降，细胞凋亡率显著升高；细胞耐药基因 *ABCB1*、*C-myc* 和 *ABCG2* 表达显著降低（$P < 0.05$）。shRNA-SALL4 MCF-7/ADR 组细胞 PTEN 表达量显著上升磷酸化 PKB（phosphorylated PKB，p-PKB）、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（phosphorylated mTOR，p-mTOR）表达量显著下降（$P < 0.05$）。在阿霉素处理细胞后加入 PTEN 抑制剂，shRNA-SALL4 MCF-7/ADR 组细胞凋亡率及细胞耐药基因表达量无显著变化。**结论** SALL4 可能通过 PTEN/PKB/mTOR 通路增强乳腺癌细胞增殖，抑制细胞死亡，一定程度上逆转了阿霉素耐药进程。

关键词：婆罗双树样基因 4（*SALL4*）；乳腺癌；PTEN/PKB/mTOR；阿霉素
中图分类号：R737.9 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2022）05-0523-10
DOI：10.13683/j.wph.2022.05.007

Effect of Spalt-like transcription factor 4 on adriamycin resistance in breast cancer cells and its mechanism

WANG Mao[1,2], DAI Yinhai[1,2]*, LI Hong[1,4], ZHOU Zhihui[1,3], LI Yuanyuan[1,3], LI Fuping[1], CHENG Rui[1], LI Shangpeng[1]
(*1. The Second Clinical Medical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; 2. Department of Oncology and Breast Surgery, the Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China; 3. Scientific Research Department of the Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China; 4. Pharmaceutical Factory of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of Spalt-like transcription factor 4（*SALL4*）on adriamycin（ADR）resistance of breast cancer cells and its regulation mechanism. ***Methods*** Quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction（qRT-PCR）and western blot（WB）were used to detect the expression of SALL4 in breast cancer cell lines. *SALL4*-silenced breast cancer drug resistant cell line short hairpin RNA（shRNA）-SALL4 macrophage

收稿日期：2021-07-27
作者简介：王茂，主治医师，研究方向：乳腺癌的诊治。
通信作者：代引海，主任医师，研究方向：乳腺癌的诊治。
基金项目：陕西省教育厅专项科学研究计划（17JK0209）；陕西省中医药管理局共建类项目（2021-GJ-LC012）；陕西中医药大学学科创新团队项目（2019-YS03）；咸阳市科技局科学技术研究攻关项目（2016K02-94）

chemotactic factor (MCF)-7/ADR was constructed and the effects of SALL4 on cell proliferation activity, half inhibitory concentration (IC_{50}) and apoptosis rate were detected by cell proliferation assay and flow cytometry. The effect of SALL4 on the expression of gene of phosphate and tension homology deleted on chromsome ten (*PTEN*), key genes of PTEN/protein kinase B (PKB)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and cell resistance genes were detected, respectively. ***Results*** The messenger RNA (mRNA) and protein levels of SALL4 in breast cancer cell lines were significantly higher than those in normal breast cell lines ($P<0.05$). The IC_{50} value of shRNA-SALL4 MCF-7/ADR group was significantly decreased, the proliferation activity was decreased, and the apoptosis rate was significantly increased. The expression of drug resistance genes *ABCB1, C-myc* and *ABCG2* were significantly decreased ($P<0.05$). The expression of PTEN in shRNA-SALL4 MCF-7/ADR group was significantly increased, and the expression of p-PKB and p-mTOR were significantly decreased ($P<0.05$). There was no significant change in apoptosis rate and expression level of drug-resistant genes in shRNA-SALL4 MCF-7/ADR group after ADR treatment with PTEN inhibitor. ***Conclusions*** SALL4 may enhance the proliferation of breast cancer cells and inhibit cell death through the PTEN/PKB/mTOR pathway, reverse the process of ADR resistance to some extent.

Key words: spalt-like transcription factor 4 (*SALL4*); breast cancer; PTEN/PKB/mTOR; adriamycin

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，据统计其患病率、死亡率分别占女性恶性肿瘤患病率和死亡率的24.2%和15.0%[1]。阿霉素（adriamycin，ADR）又称多柔比星，是蒽环类抗肿瘤药，对临床各期恶性肿瘤均有较强活性，但乳腺癌细胞易产生ADR耐药，导致化学治疗效果不满意，使其在乳腺癌治疗中的应用受到限制[2]。

研究认为，乳腺癌耐药是多因子通过多种多重通路共同作用的结果[3]，因此明确乳腺癌耐药机制、提高化疗敏感性是近年来科研工作关注的重点。婆罗双树样基因4（Spalt-like transcription factor 4，*SALL4*）是果蝇*Spalt*基因的同源异型基因家族中的一员，位于第20号染色体q13.13-q13.2[4-5]。近年研究发现*SALL4*作为癌基因参与肿瘤的发生发展进程，与肺癌[6]、急性髓细胞白血病[7]、子宫内膜癌[8]等肿瘤细胞耐药密切相关。陈园园等[9]研究发现，沉默*SALL4*基因表达能够抑制乳腺癌耐药细胞巨噬细胞趋化因子（macrophage chemotactic factor，MCF)-7/A的增殖，增强细胞化学治疗的敏感性，提示*SALL4*基因可作为乳腺癌化学治疗的新靶点。另有研究表明[10-11]，抑癌基因人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因（phosphate and tension homology deleted on chromsome ten，*PTEN*）能够调控蛋白激酶B（protein kinase B, PKB），并使其发生异常激活，上调下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR），加快细胞中蛋白的合成，参与肿瘤细胞发生发展及耐药过程，指出PTEN/PKB/mTOR通路在抑制多种肿瘤细胞生物学行为及逆转多药耐药信号转导中起重要作用。基于此，本研究拟探讨*SALL4*在乳腺癌细胞中的表达及其通过PTEN/PKB/mTOR通路逆转乳腺癌细胞耐药的分子机制，以期为临床攻克乳腺癌耐药提供参考。

1 研究材料及方法

1.1 材料

正常乳腺细胞系MCF-10A，乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MCF-7及乳腺癌耐药细胞株MCF-7/ADR均购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司。

胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、DMEM培养基、胰蛋白酶、聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜、ECL发光显色液购自美国Thermo Fisher公司。TRIzol试剂、脂质体2000、逆转录试剂盒及定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司。

ADR 购自大连美仑生物技术有限公司。SF1670 购自美国 MedChemExpress。BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。内参甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体购自美国 Boster 公司，兔抗人 SALL4 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司，鼠抗人 p-PKB、PKB、p-mTOR、mTOR 抗体购自上海信裕生物科技有限公司，鼠抗人 C-myc、ABCG2 抗体购自上海科敏生物科技有限公司，兔抗人 ABCB1 抗体购自天津赛尔生物技术有限公司。MTT 购自美国 Sigma 公司。细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。恒温培养箱购自上海跃进医疗器械厂。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养与传代

将上述细胞置于 5% CO_2、温度 37 ℃、湿度 95% 的培养箱中培养，培养基为 10% DMEM ＋ 10% FBS。当细胞贴壁率约 90% 时进行细胞传代。

1.2.2 细胞转染及分组

以转染干扰 SALL4 表达的短发夹 RNA（short hairpin RNA，shRNA）的细胞作为 shSALL4 MCF-7/ADR 组，转染无意义的阴性对照 shRNA 的细胞作为 MCF-7/ADR 组，shRNA 的具体序列信息见表 1，MCF-7 组细胞不作任何干预。当细胞生长至约 90% 时常规转染，按照 4×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，培养 24 h。操作参照 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行，转染后的细胞放置于 5% CO_2、37 ℃条件下常规培养。2 d 后使用胰蛋白酶消化，收集细胞用于后续实验。

1.2.3 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA，使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 检测各组细胞中 *PTEN* 的表达水平，以 *GAPDH* 作为内参基因，扩增体系为：SYBR Premix Eaq TMII（2×）10 μl；正向（Forward，F）、反向（Reverse，R）引物各 0.5 μl，模板 cDNA 1 μl，总体积 20 μl。反应条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 5 min，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量，重复 3 次取平均值，具体序列信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 及 SALL4-shRNA 序列

Table 1 qRT-PCR and SALL4-shRNA sequences

名称	序列信息
SALL4	F：5'-CGATAACTGAACAACGC-3'
	R：5'-ATGCCTGCGACGTTCGATC-3'
PTEN	F：5'-TGGCGCAAGTTCGAATCGTCAGT-3'
	R：5'-TCGCGTGCTGTCGGTGCTGA-3'
GAPDH	F：5'-GAACGTGCGACTGAAGCGAT -3'
	R：5'-CCTGCAAGATCGTGATCGGAT-3'
SALL4-shRNA	5'-GCCTTCAAACAAGCGAAGCTA-3'
阴性对照shRNA	5'-TTCTCGGAACGTCTGACGT-3'

1.2.4 免疫印迹法（western blot，WB）检测蛋白水平表达

加入适量的 RIPA 裂解液裂解细胞后提取总蛋白，用 BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度，采用 WB 法检测磷酸化蛋白激酶 B（phosphorylated PKB，p-PKB）、PKB、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（phosphorylated mTOR，p-mTOR）、mTOR、ABCB1、C-myc、ABCG2 蛋白的表达水平，取总蛋白样品 10 μg，蛋白变性后用 8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，电转移到 PVDF 膜上，室温封闭 2 h，加入 1 ∶ 3 000 稀释的一抗，4 ℃孵育过夜；次日加入 1 ∶ 10 000 稀释的二抗，室温孵育 1 h。将 ECL 发光显色液加于膜上，暗室中使胶片曝光 1 ～ 5 min，定影。采用 GAPDH 作为内参蛋白，目的蛋白表达水平使用 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

每组加入 5 μmol/L ADR 处理 48 h 后收集细胞，用流式细胞仪检测，使用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗涤，加入结合缓冲液制成细胞悬液。取 100 μg 上述细胞悬液分别加入 5 μl 膜联蛋白 V-FITC，室温避光孵育 5 min，再加入 20 mg/L

碘化丙啶 10 μg，设置调整流式细胞仪进行流式细胞检测。

1.2.6 MTT 法检测细胞活性

将 MCF-7、MCF-7/ADR、shSALL4 MCF-7/ADR 细胞以 3×10^3 个 / 孔接种于 96 孔板中，细胞贴壁后在不同浓度（0.5、1、2 μmol/L）的 ADR 培养基中处理 24 h，每孔加入 5 μl MTT 液继续培养 4 h，吸除上清液，加入 200 μl 二甲亚砜振荡溶解，采用酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测得光密度（optical density，OD）值，重复 3 次取平均值。

1.3 统计学分析

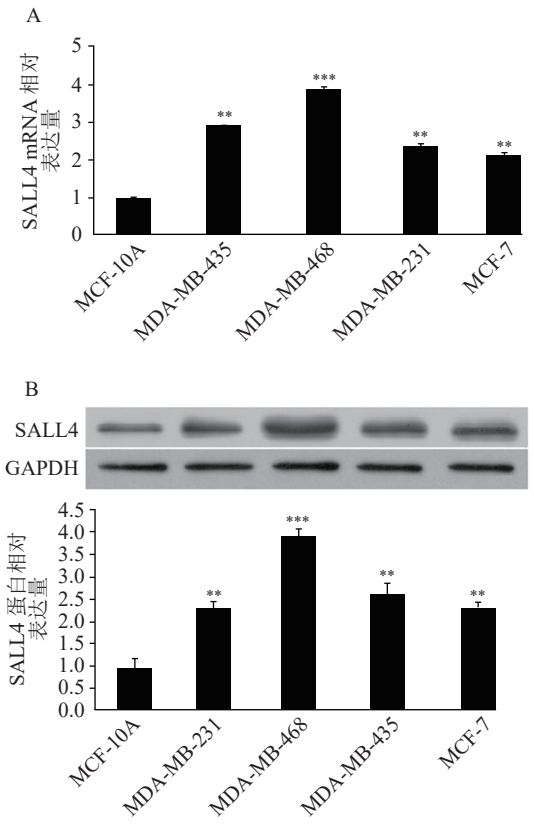
采用 SPSS22.0 软件进行分析，每个试验均重复 3 次，本研究数据均符合正态分布，用（均数 ± 标准差）表示，多组样本比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SALL4 在乳腺癌细胞系中的表达

qRT-PCR 检测乳腺癌细胞系中 SALL4 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）表达，结果显示：与 MCF-10A 细胞系相比，MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MCF-7 细胞系中 SALL4 显著高表达，其中 MDA-MB-435、MDA-MB-468 细胞系中 SALL4 表达水平较高（$P < 0.01$），见图 1A。

WB 法检测乳腺癌细胞系中 SALL4 表达，结果显示：MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MCF-7 细胞系中 SALL4 蛋白水平较 MCF-10A 细胞系显著升高（$P < 0.01$），见图 1B。



A：qRT-PCR 法；B：WB 法

A：qRT-PCR；B：WB

注：与正常乳腺癌细胞系 MCF-10A 相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$

Note: *vs* normal breast cancer cell line MCF-10A, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

图 1 乳腺癌细胞系中 SALL4 表达情况

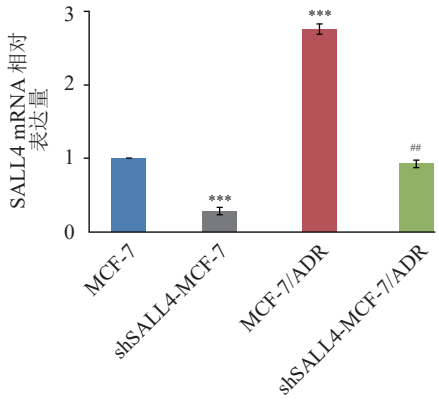
Figure 1 SALL4 expression in breast cancer cell lines

2.2 沉默 *SALL4* 的 shSALL4 MCF-7/ADR 细胞系的构建及验证筛选

选择乳腺癌 ADR 耐药细胞株 MCF-7/ADR 进行研究，以 MCF-7 为对照，经分别转染干扰 shRNA 序列沉默 *SALL4* 表达，构建 shSALL4 MCF-7/ADR 细胞系。采用 qRT-PCR 检测显示：MCF-7/ADR 组细胞中 SALL4 表达较 MCF-7 组细胞显著上调（$P < 0.001$），而 shSALL4 MCF-7 和 shSALL4 MCF-7/ADR 组细胞系中 SALL4 表达较对应 MCF-7 和 MCF-7/ADR 组细胞系显著下调（$P < 0.01$），见图 2，提示沉默 *SALL4* 的 MCF-7/ADR 细胞系构建成功且有效，可用于后续实验。

2.3 沉默 *SALL4* 增强 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性

以不同浓度（0.5、1、2 μmol/L）ADR 培养基分别处理 MCF-7、MCF-7/ADR、shSALL4 MCF-7/ADR 细胞 24 和 48 h，采用 MTT 法检测各组细胞增殖活性并计算不同处理时间下的 IC_{50} 值。结果显示：随着 ADR 浓度升高，shRNA-SALL4 MCF-7/ADR



注：与 MCF-7 细胞系相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与 MCF-7/ADR 细胞系相比，$^{\#\#}P < 0.01$

Note: *vs* MCF-7 cell line, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; *vs* MCF-7/ADR cell line, $^{\#\#}P < 0.01$

图 2　shSALL4 MCF-7/ADR 细胞系的构建验证

Figure 2　Construction and validation of shSALL4 MCF-7/ADR cell line

细胞在 24、48 h 时的 IC_{50} 值显著降低（表 2），细胞增殖活性下降（$P < 0.01$），见图 3，说明沉默 *SALL4* 基因可增强 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性，降低细胞耐药性。

以 5 μmol/L ADR 分别处理 MCF-7、MCF-7/ADR、shSALL4 MCF-7/ADR 细胞 48 h，采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况，结果显示：与 MCF-7 组相比，MCF-7/ADR 组细胞凋亡率显著降低，而 shSALL4 MCF-7/ADR 组细胞凋亡率较 MCF-7/ADR 组显著上升（$P < 0.01$），详见图 4，进一步说明沉默 *SALL4* 基因可增强 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性，降低细胞耐药性。

表 2　ADR 处理后各细胞 IC_{50} 值

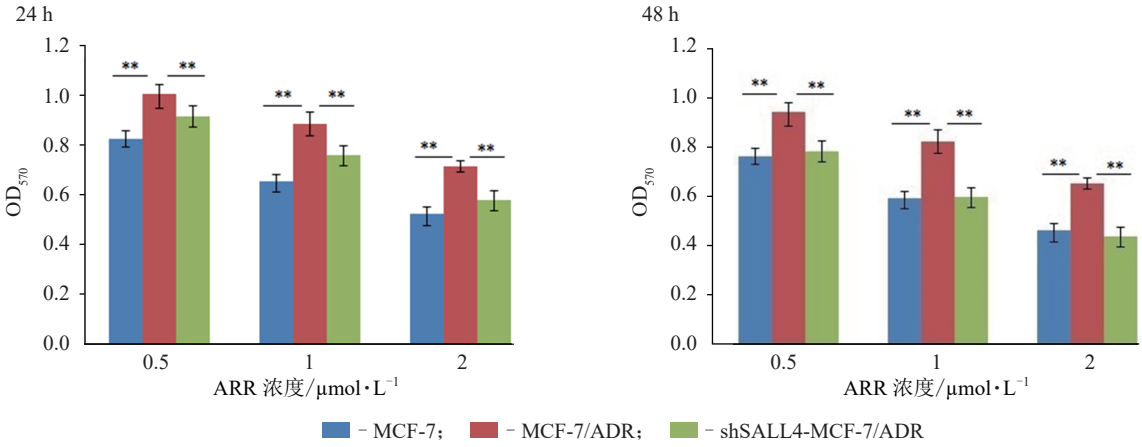
Table 2　IC_{50} values of each cell after ADR treatment

时间/h	IC_{50}/μmol·L^{-1}		
	MCF-7	MCF-7/ADR	shSALL4 MCF-7/ADR
24	1.46	135.98	45.36
48	0.17	28.65	6.43

2.4　检测 SALL4 通过 PTEN/AKT/mTOR 通路影响细胞耐药性

2.4.1　SALL4 对 PTEN/AKT/mTOR 通路的影响

研究采用 qRT-PCR 和 WB 法检测 SALL4 对 MCF-7、MCF-7/ADR、shSALL4 MCF-7/ADR 细胞系 PTEN 表达的影响，采用 WB 检测 p-PKB、PKB、p-mTOR、mTOR 蛋白表达水平。结果显示：沉默 *SALL4* 表达后 PTEN mRNA 和蛋白表达量显著上升（$P < 0.05$），见图 5；p-PKB、p-mTOR 表达量显著下降（$P < 0.05$），PKB、mTOR 表达量无明显变化

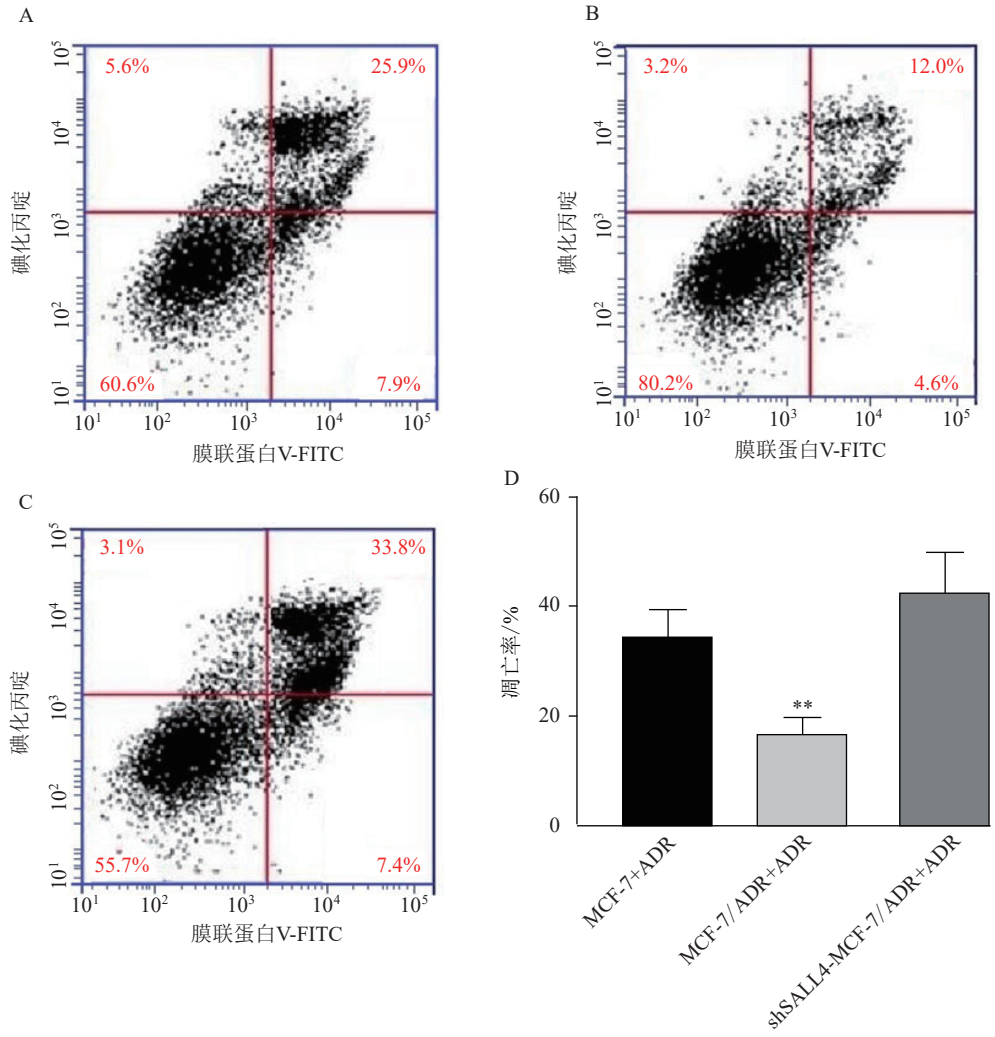


注：与 MCF-7 或 shSALL4 MCF-7/ADR 组比，$^{**}P < 0.01$

Note: *vs* MCF-7 or shSALL4 McF-7/ADR group, $^{**}P < 0.01$

图 3　MTT 检测不同浓度 ADR 对各组细胞增殖活性的影响

Figure 3　Effects of ADR at different concentrations on cell proliferation in each group by MTT assay



A：MCF-7；B：MCF-7/ADR；C：shSALL4 MCF-7/ADR；D：凋亡率

A：MCF-7；B：MCF-7/ADR；C：shSALL4 MCF-7/ADR；D：apoptosis rate

注：与 MCF-7 + 5 μmol/LADR 组和 shSALL4 MCF-7/ADR + 5 μmol/LADR 组相比，$^{**}P < 0.01$

Note: *vs* MCF-7 + 5 μmol/L ADR group and shSALL4 MCF-7/ADR + 5 μmol/L ADR group, $^{**}P < 0.01$

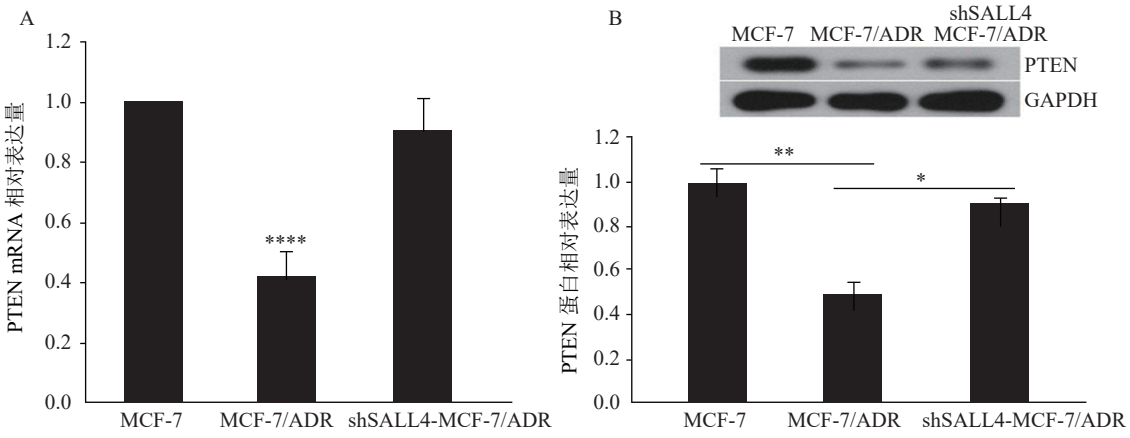
图 4　流式细胞仪检测 ADR 处理后各组细胞凋亡率

Figure 4　Apoptosis rate of each group after ADR treatment was detected by flow cytometry

（$P > 0.05$），详见图 6、图 7。表明沉默 *SALL4* 能够影响 PTEN/AKT/mTOR 通路关键基因的表达。

2.4.2　加入 PTEN 抑制剂后沉默 *SALL4* 对细胞 ADR 耐药的影响

在 MCF-7/ADR、shSALL4-MCF-7/ADR 细胞中分别加入 5 μmol/L ADR 处理细胞 48 h，流式细胞仪检测细胞凋亡率，结果显示：shSALL4-MCF-7/ADR 组凋亡率明显上升（$P < 0.05$）；在 MCF-7/ADR、shSALL4-MCF-7/ADR 细胞中分别加入 PTEN 表达抑制剂 SF1670 预处理 1 h 后再加入 5 μmol/L ADR 处理 48 h，流式细胞仪检测细胞凋亡率，结果显示：经 SF1670 处理后的 shSALL4 MCF-7/ADR 细胞凋亡率上升不明显（$P > 0.05$），见图 8，说明 SALL4 系通过调节 PTEN 影响乳腺癌细胞的耐药性。



A：qRT-PCR 法；B：WB 法

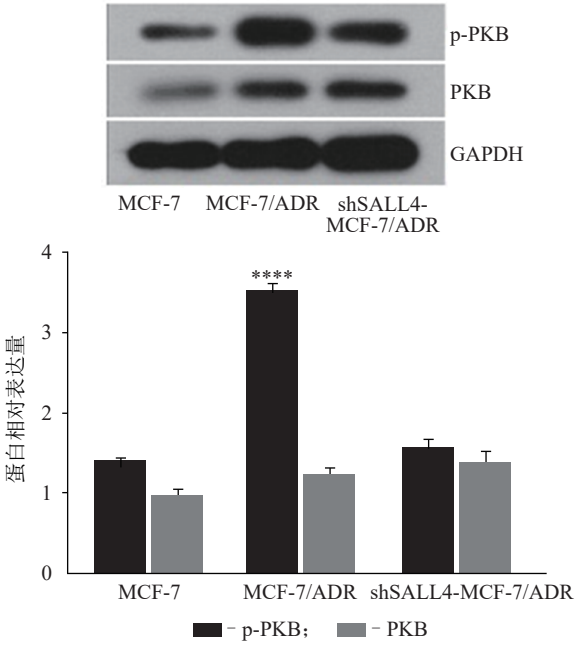
A：qRT-PCR；B：WB

注：与 MCF-7 和 shSALL4-MCF-7/ADR 组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，****$P < 0.000\ 1$

Note: *vs* MCF-7 and shSALL4-MCF-7/ADR group, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ****$P < 0.000\ 1$

图 5　沉默 *SALL4* 对各组细胞 PTEN 表达的影响

Figure 5　Effect of silencing *SALL4* on PTEN expression in each group cells

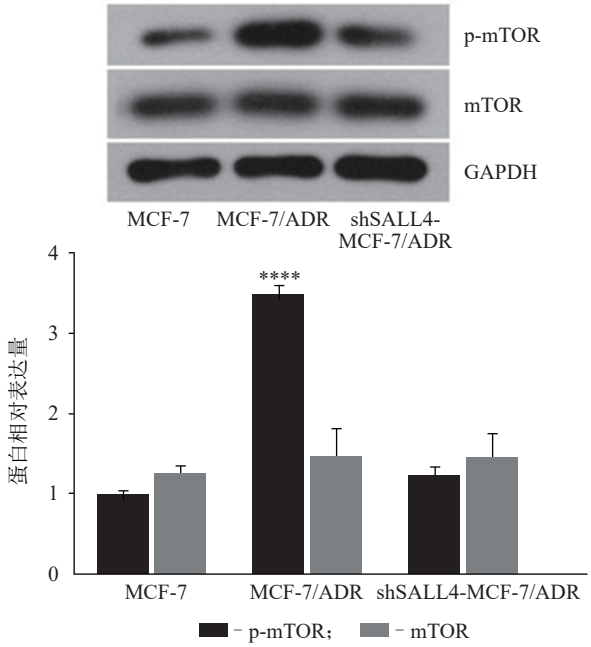


注：MCF-7 和 shSALL4-MCF-7/ADR 组相比，****$P < 0.000\ 1$

Note: *vs* MCF-7 and shSALL4-MCF-7/ADR groups, ****$P < 0.000\ 1$

图 6　WB 检测 SALL4 对各组细胞 p-PKB 和 PKB 表达的影响

Figure 6　WB analysis of the effects of SALL4 on p-PKB and PKB expression in each group cells



注：MCF-7 和 shSALL4-MCF-7/ADR 组相比，****$P < 0.000\ 1$

Note: *vs* MCF-7 and shSALL4-MCF-7/ADR groups, ****$P < 0.000\ 1$

图 7　WB 检测 SALL4 对各组细胞 p-mTOR 和 mTOR 表达的影响

Figure 7　WB analysis of the effects of SALL4 on p-MTOR and mTOR expression in each group cells

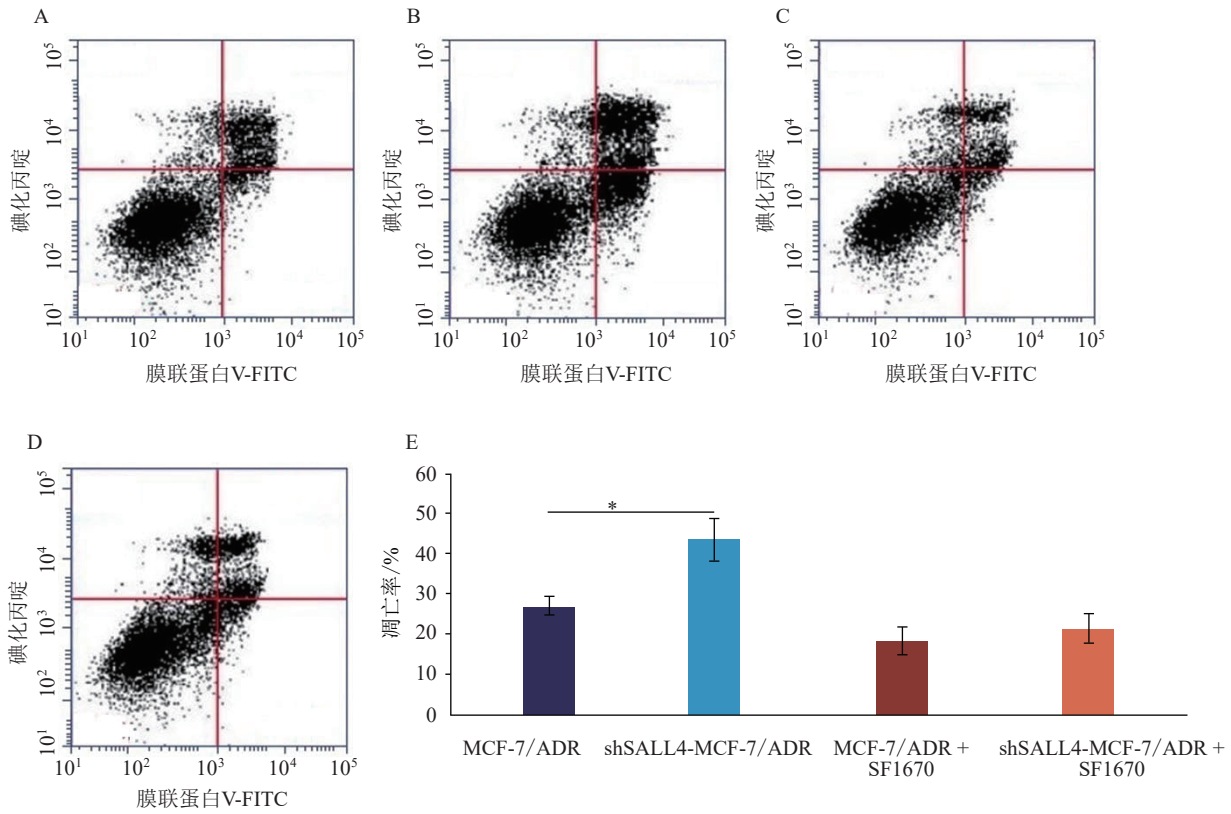
2.4.3 加入 PTEN 抑制剂后沉默 *SALL4* 对耐药基因表达量的影响

在 MCF-7/ADR、shSALL4-MCF-7/ADR 细胞中分别加入 5 μmol/L ADR 处理细胞 48 h 后采用 WB 检测，结果显示：沉默 *SALL4* 表达后耐药基因 *ABCB1*、*ABCG2*、*C-myc* 表达量均明显下降（$P < 0.05$）；在 MCF-7/ADR、shSALL4-MCF-7/ADR 细胞中分别加入 PTEN 表达抑制剂 SF1670 预处理 1 h 后再加入 5 μmol/L ADR 处理 48 h，WB 检测结果显示：shSALL4-MCF-7/ADR 组耐药基因 *ABCB1*、*ABCG2*、*C-myc* 表达量与 MCF-7/ADR 组无显著差异（$P > 0.05$），见图 9 ～图 11。说明 *SALL4* 可以通过 PTEN 通路影响乳腺癌细胞耐药基因的表达量。

3 讨论

乳腺癌作为女性主要恶性肿瘤，目前治疗以手术为主，放射治疗和化学治疗为辅，但长期使用化学治疗药物容易使乳腺癌细胞产生耐药，导致化学治疗效果不理想[12]。ADR 为广谱抗肿瘤药，抗肿瘤机制为镶嵌入细胞 DNA 来抑制核酸合成，细胞毒性强烈[13]。因此，研究乳腺癌 ADR 耐药机制至关重要。

近年随着基因分子生物学的研究进展，发现 SALL4 在包括结肠癌[14]、食管癌[15]、肺癌[6]、子宫内膜癌[16]、胃癌[17]和卵巢癌[4,18]等在内的许多肿瘤细胞中异常表达，与细胞耐药有关。研究显示，



A：MCF-7/ADR；B：shSALL4-MCF-7/ADR；C：MCF-7/ADR ＋ SF1670；D：shSALL4-MCF-7/ADR ＋ SF1670；E：凋亡率

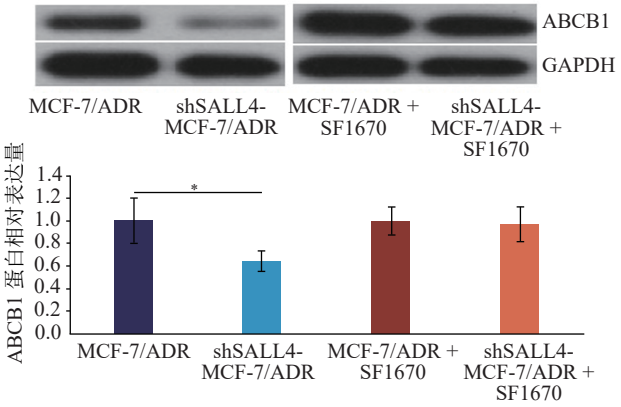
A：MCF-7/ADR；B：shSALL4-MCF-7/ADR；C：MCF-7/ADR ＋ SF1670；D：shSALL4-MCF-7/ADR ＋ SF1670；E：apoptosis rate

注：与 MCF-7/ADR 组相比，*$P < 0.05$

Note: *vs* MCF-7/ADR group, *$P < 0.05$

图 8 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率变化

Figure 8 Apoptosis rate of each group was detected by flow cytometry

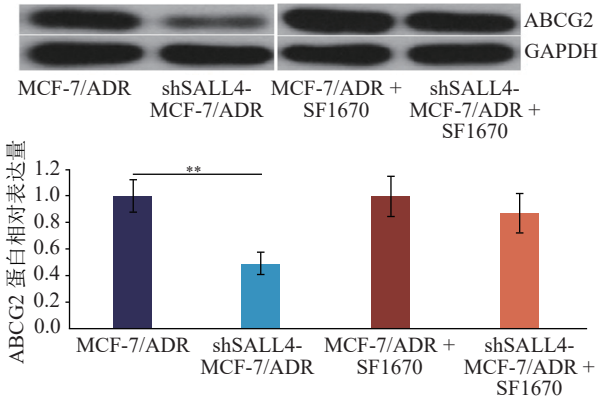


注：与 MCF-7/ADR 组相比，*$P < 0.05$.

Note: *vs* MCF-7/ADR group, *$P < 0.05$

图 9 WB 检测各组细胞 ABCB1 蛋白表达量

Figure 9 WB analysis of ABCB1 protein expression in each group

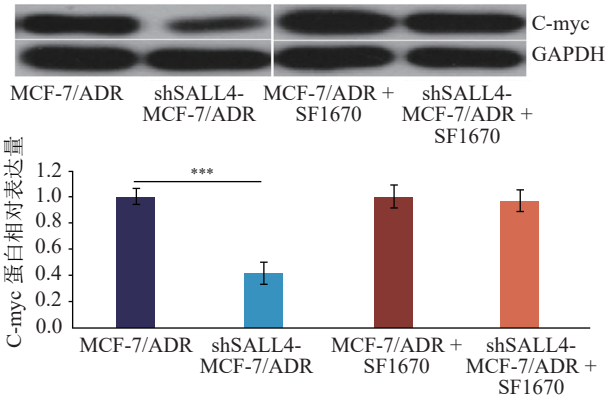


注：MCF-7/ADR 组相比，**$P < 0.01$

Note: *vs* MCF-7/ADR group, **$P < 0.01$

图 10 WB 检测各组细胞 ABCG2 蛋白表达量

Figure 10 WB analysis of ABCG2 protein expression in each group



注：与 MCF-7/ADR 组相比，***$P < 0.001$

Note: *vs* MCF-7/ADR group, ***$P < 0.001$

图 11 WB 检测各组细胞 C-myc 蛋白表达量

Figure 11 Expression of C-myc protein in each group detected by WB analysis

下调肺癌细胞中 SALL4 可提高肺癌细胞对多种化学治疗药物的敏感性 [6]。*SALL4* 基因表达是急性髓系白血病产生耐药的正性调节因素 [7]。*SALL4* 基因敲减可通过下调 *ABCG2* 和 *C-myc* 表达，逆转 MCF-7/ADR 细胞耐药性 [19]。Kim 等 [20] 发现 SALL4 可通过募集 E3 泛素连接酶 CUL4B（cullin 4B）降解 HP1α（heterochromatin protein 1α）蛋白，上调 *Glut1*（glucose transporter 1）基因表达，促进糖酵解发生，增强肿瘤细胞 DNA 损伤修复能力，诱导化学治疗耐药。陈园园等 [9] 研究发现沉默 *SALL4* 能够增强乳腺癌耐药细胞 MCF-7/A 对表柔比星的敏感性，证实 *SALL4* 基因沉默可能是乳腺癌治疗的新靶点。而本研究探究发现，乳腺癌细胞系中 SALL4 显著高表达，乳腺癌 ADR 耐药细胞系 MCF-7/ADR 中 SALL4 表达较乳腺癌 MCF-7 细胞显著上调，通过构建验证沉默 *SALL4* 表达的乳腺癌耐药细胞系 shSALL4-MCF-7/ADR，经 ADR 处理后通过细胞实验证实，随着 ADR 浓度升高，shRNA-SALL4 MCF-7/ADR 组细胞 IC_{50} 值显著降低，细胞增殖活性下降，细胞凋亡率显著升高，提示沉默 *SALL4* 基因可增强 MCF-7/ADR 细胞对 ADR 的敏感性，降低细胞耐药性。

基于细胞耐药信号通路，相关研究证实，PTEN 通过磷酸酶活性调控 PKB/mTOR 去磷酸化，可影响肿瘤的生物学功能及其耐药 [10-11]。刘芳等 [21] 研究发现，调高 PTEN 表达可抑制 PKB/mTOR 信号通路，促进乳腺癌细胞凋亡，降低细胞增殖活性，发挥抑癌作用。PTEN 过表达可增强 PKB/m-TOR 信号通路，活化细胞凋亡途径，抑制细胞内三羧酸循环过程，抑制肿瘤细胞耐药 [11]。以上研究表明，PTEN/

PKB/mTOR 信号通路是细胞产生耐药作用的关键通路之一。因此，本研究进一步探究了沉默 *SALL4* 对乳腺癌细胞 ADR 耐药的逆转作用及与 PTEN/PKB/mTOR 信号通路间的作用关系。结果显示，shRNA-SALL4 MCF-7/ADR 组细胞 PTEN 表达量显著上升，PKB/mTOR 信号通路中 p-PKB、p-mTOR 表达量显著降低；同时耐药基因 *ABCB1*、*C-myc*、*ABCG2* 表达也显著降低，提示沉默 *SALL4* 表达能够影响 PTEN/PKB/mTOR 通路关键基因和细胞耐药基因的表达。而在 ADR 处理的细胞中加入 PTEN 抑制剂后，shSALL4 MCF-7/ADR 组细胞凋亡率升高及耐药基因表达量下降不显著，说明 SALL4 可能通过调节 PTEN 影响乳腺癌细胞的耐药性及耐药基因的表达量，进而影响细胞耐药。本研究对乳腺癌细胞 ADR 耐药提供了实验基础和理论依据，*SALL4* 可能为乳腺癌防治提供新的靶点。但本研究仅在 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞株上验证了 SALL4 通过 PTEN/PKB/mTOR 通路来影响细胞耐药，尚未在人组织标本中研究，也未探索其他通路，故还需进一步探究分析。

4 结论

综上所述，SALL4 可能通过 PTEN/PKB/mTOR 通路增强乳腺癌细胞增殖，抑制细胞死亡，一定程度上逆转了 ADR 耐药进程。

参考文献：

[1] 王宁, 刘硕, 杨雷, 等. 2018全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 87-97.

[2] 陈平, 吴正升, 吴强, 等. 抑制自噬对乳腺癌阿霉素耐药的逆转作用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(5): 528-532.

[3] 金颖, 刘振宇, 高品, 等. 乳腺癌相关基础研究最新动态及发展方向[J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41(1): 80-84.

[4] 张鹏, 邵孟, 钱晖, 等. *SALL4*在肿瘤中的作用及临床应用价值[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(2): 130-132.

[5] Raphaël P, Kashyap C, Timo Q, *et al*. *SALL4* controls cell fate in response to DNA base composition[J]. Molecular Cell, 2021, 81(4): 845-858.

[6] Yanagihara N, Kobayashi D, Kuribayashi K, *et al*. Significance of *SALL4* as a drug resistant factor in lung cancer[J]. Int J Oncol, 2015, 46(4): 15274-15374.

[7] 郭野. *SALL4*基因表达与急性髓细胞白血病细胞系*KG1a*耐药相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2749-2751.

[8] Liu L, Zhang J, Yang X, *et al*. SALL4 as an epithelial-mesenchymal transition and drug resistance inducer through the regulation of c-Myc in endometrial cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138515.

[9] 陈园园, 叶园园, 李志臻, 等. *SALL4*基因沉默对MCF-7/A细胞增殖和化疗敏感性的影响[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(2): 132-137.

[10] Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Molina MÁ, *et al*. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer[J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(16): 1843-1862.

[11] 肖志中, 韩光, 周娟, 等. PTEN通过抑制PI3K/AKT-mTOR通路增强卡博替尼抗肿瘤作用[J]. 遵义医学院学报, 2019, 42(1): 57-63.

[12] Basso SM, Santeufemia DA, Fadda GM, *et al*. Advances in the treatment of triple-negative early breast cancer[J]. Med Chem, 2016, 12(3): 268-272.

[13] 李芷君, 徐兵河. 乳腺癌芳香化酶抑制剂耐药的研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(2): 81-89.

[14] Cheng J, Deng R,Wu C, *et al*. Inhibition of SALL4 suppresses carcinogenesis of colorectal cancer via regulating Glil expression[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10092-10101.

[15] He J, Zhou M, Chen X, *et al*. Inhibition of SALL4 reduces tumorigenicity involving epithelial-mesenchymal transition *via* Wnt/β-catenin pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 98.

[16] Li A, Jiao Y, Yong KJ, *et al*. SALL4 is a new target in endometrial cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(1): 63-72.

[17] Yuan X, Zhang X, Zhang W, *et al*. SALL4 promotes gastric cancer progression through activating CD44 expression[J]. Oncogenesis, 2016, 5(11): e268.

[18] Yang M, Xie X, Ding Y. SALL4 is a marker of poor prognosis in serous ovarian carcinoma promoting invasion and metastasis[J]. Oncol Rep, 2016, 35(3): 1796-1806.

[19] Chen YY, Li ZZ, Ye YY, *et al*. Knockdown of SALL4 inhibits the proliferation and reverses the resistance of MCF-/ADR cells to doxorubicin hydrochloride[J]. BMC Mol Biol, 2016, 17: 6.

[20] Kim J, Xu S, Xiong L, *et al*. SALL4 promotes glycolysis and chromatin remodeling via modulating HP1 a Glutl pathway[J]. Oncogene, 2017, 36(46): 6472-6479.

[21] 刘芳, 戴经纬, 刘丽娜, 等. *PTEN*基因通过Akt-mTOR对乳腺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(12): 2048-2051.

（编辑：沈佳婕）