

隐丹参酮对乳腺癌他莫昔芬耐药细胞的生长抑制作用与机制研究

刘 航¹, 夏丽洁¹, 李金耀^{1*}, 张 英^{2*}

(1. 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046;

2. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要: 本研究探讨了隐丹参酮 (cryptotanshinone, CPT) 对乳腺癌他莫昔芬耐药细胞 MCF7-TAMR 的抑制作用及机制。采用 MTT 法检测 CPT 对 MCF7-TAMR 细胞的生长抑制作用, 发现 CPT 剂量与时间依赖性抑制 MCF7-TAMR 细胞的生长, 24 h 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 $15.14 \pm 2.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CPT 可阻滞细胞周期于 G0/G1 期, 并通过上调细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平促进细胞凋亡。Transwell 结果显示 CPT 对 MCF7-TAMR 细胞的迁移有显著抑制作用。此外, CPT 降低了 MCF7-TAMR 细胞来源微球体中 CD24^{low}CD44⁺ 细胞群。Western blot 结果证明, CPT 有效抑制雌激素受体- α (estrogen receptor α , ER- α) 磷酸化, 抑制磷酸肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K-p85) 与丝氨酸-苏氨酸激酶 (serine-threonine protein kinase, Akt) 蛋白的表达, 同时降低了多重药物转运蛋白 ABCG2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2) 的表达。本研究结果表明, CPT 通过诱导细胞凋亡, 引起细胞周期阻滞, 抑制细胞迁移、ER- α 磷酸化及 PI3K/Akt 信号通路, 降低 CD24^{low}CD44⁺ 细胞群数量及 ABCG2 的表达, 并可克服细胞耐药性。

关键词: 隐丹参酮; 乳腺癌; 他莫昔芬耐药细胞; 凋亡; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)09-2751-08

Inhibitory effects and mechanisms of cryptotanshinone on the growth of tamoxifen resistant breast cancer cells

LIU Hang¹, XIA Li-jie¹, LI Jin-yao^{1*}, ZHANG Ying^{2*}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology,

Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese

Medicine, Beijing 100053, China)

Abstract: This study investigated the inhibitory effect and mechanisms of cryptotanshinone (CPT) on tamoxifen resistant cell MCF7-TAMR. The inhibitory effect of CPT on the viability of MCF7-TAMR cells was evaluated using the MTT assay. We found that CPT significantly inhibited the growth of MCF7-TAMR cells in a dose- and time-dependent manner. The half inhibitory concentration (IC₅₀) is $15.14 \pm 2.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 24 h. CPT induced cell cycle arrest of MCF7-TAMR cells at G0/G1 phase, and promoted apoptosis of MCF7-TAMR cells by upregulating intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). Transwell results showed that CPT significantly inhibited the migration of MCF7-TAMR cells. Furthermore, CPT decreased the CD24^{low}CD44⁺ cell population in MCF7-TAMR cell-derived microspheres. Western blot results showed that CPT effectively inhibited the phosphorylation of estrogen receptor α (ER- α), and reduced the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K-p85), serine-threonine protein kinase (Akt) and multidrug transporter ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2). These

收稿日期: 2022-03-24; 修回日期: 2022-05-13.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7192181).

*通讯作者 Tel: 86-10-88001500, E-mail: zylzy501@163.com;

Tel: 86-991-8583451, E-mail: ljyxju@xju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0348

results showed that CPT can induce cell apoptosis, cause cell cycle arrest, inhibit cell migration and inhibit ER- α phosphorylation, inhibit PI3K/Akt signaling pathway, reduce the number of CD24^{low}CD44⁺ cells and the expression of ABCG2, overcome cell drug resistance.

Key words: cryptotanshinone; breast cancer; tamoxifen-resistant cell; apoptosis; mechanism of action

乳腺癌是女性癌症死亡的主要原因之一,其新发病例占新诊断病例的31%^[1],已日渐成为威胁女性健康的头号癌症。超过70%的乳腺癌是雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性的,多数最初依赖于类固醇激素雌激素的激活。ER- α 是一种在乳腺癌进程中发挥关键作用的核受体,也是乳腺癌发病与治疗的主要分子靶点之一^[2]。因乳腺癌的发生依赖于雌激素-ER信号通路及下游信号通路,故雌激素抑制剂与ER拮抗剂一直是ER⁺乳腺癌治疗的主要药物^[3]。他莫昔芬(tamoxifen)是一种选择性雌激素受体调节剂,可与ER结合,同雌激素与ER的结合是竞争关系,属于竞争性拮抗剂。虽然通过他莫昔芬等内分泌疗法的药物大幅降低了乳腺癌的复发率和死亡率,但依然约有30%的患者在经过内分泌疗法治疗后会产生产耐药性,导致肿瘤的复发与转移,同时发展为ER⁺转移性的乳腺癌会不可避免地出现内分泌疗法的耐药性,故该疗法存在的获得性耐药问题仍是一个挑战^[4]。

肿瘤干细胞是一组具有高自我更新与迁移功能的细胞,被认为是肿瘤耐药的根本原因,最终促进癌症复发,针对肿瘤干细胞可能是乳腺癌治疗中的潜在策略。研究发现,经雌激素诱导可增加乳腺癌细胞系中CD24^{low}CD44⁺细胞群数量^[5],且由ER- α 介导的雌激素信号对ER⁺乳腺癌干细胞的调节与维持有重要作用^[6]。此外,研究表明磷酸肌醇3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase, PI3K/Akt)信号通路与肿瘤干细胞生物学存在联系,靶向PI3K可消除肿瘤干细胞并有益于癌症的治疗^[7],Akt可调节肿瘤干细胞标志物多重药物转运蛋白ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)^[8],故PI3K/Akt抑制剂是癌症药物开发的有效策略。

隐丹参酮(cryptotanshinone, CPT)是植物丹参根中主要的二萜醌类化合物,分子式为C₁₉H₂₀O₃,相对分子质量296.35,外观为橙红色针状结晶^[9]。研究报道CPT表现出较好的抗肿瘤活性,具有很高的药用价值^[10]。本研究采取乳腺癌他莫昔芬耐药细胞MCF7-TAMR为实验对象,初步探究了CPT对MCF7-TAMR细胞的生长抑制作用及其机制。

材料与方法

试剂 人乳腺癌他莫昔芬耐药细胞株MCF7-TAMR、人乳腺癌细胞株MCF7细胞(美国模式培养物集存库);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, MRC公司);青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶(全式金公司);CPT、他莫昔芬、顺铂(cisplatin)、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、人胰岛素(源叶生物公司);FxCycle™ PI/RNase staining solution、B27、KnockOut™血清代替物(Gibco公司);Hoechst 33258染色液、Annexin V-FITC/PI(propidium iodide)凋亡检测试剂盒、兔抗人PI3K-p85多抗、兔抗人Akt1/2/3单抗、兔抗人 β -actin单抗、抗氧化剂NAC(*N*-acetyl-L-cysteine)、BCA(bicinchoninic acid)蛋白浓度测定试剂盒、ECL(enhanced chemiluminescence)化学发光试剂盒(碧云天公司);兔抗人p-ER- α (phospho S118 ER- α)单抗、兔抗人ABCG2单抗(Abcam公司);PE mouse anti-human CD24、APC mouse anti-human CD44、 β -成纤维细胞生长因子(β -FGF)、重组表皮生长因子(EGF)(BD公司);ROS检测试剂盒(翌圣生物公司);Transwell小室(Nest公司);Matrigel(Corning公司)。

主要仪器 流式细胞仪(BD公司);荧光倒置显微镜(Nikon公司)。

MTT法检测细胞活力 取对数生长期的乳腺癌细胞MCF7-TAMR与MCF7,接种于96孔板中,细胞密度为每毫升 6×10^4 个,每孔100 μ L,待细胞完全贴壁后,以不同浓度药物进行处理,每组设置6个复孔。放置于培养箱继续培养24、48、72 h,离心后弃上清,每孔加入100 μ L MTT溶液(终浓度0.5 mg·mL⁻¹),继续培养4 h,离心后弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO),于490 nm测定吸光度(*A*)值,计算细胞活力,绘制生长曲线。

流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的乳腺癌细胞MCF7-TAMR,以每孔每毫升 1.2×10^5 个的密度接种于60 mm培养皿中,置于培养箱继续培养至完全贴壁,弃旧培养基,以不同浓度CPT(5、15和25 μ mol·L⁻¹)给药处理24 h后收集细胞,离心后以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗,弃上清。加入100 μ L 1 \times binding buffer混匀并重悬细胞,每组加入10 μ L 染液(Annexin V-FITC:PI = 1:2),混匀室温避光

孵育 15 min 后, 加入 300 μL 1 \times binding buffer, 采用流式细胞仪检测。

Hoechst 33258 荧光染色观察细胞形态学变化 取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF7-TAMR, 以每孔每毫升 1.2×10^5 个的密度接种于 12 孔板中, 置于培养箱继续培养至完全贴壁, 弃旧培养基, 以不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 24 h 后弃上清, 以 4% 多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min 后 PBS 清洗, 吸尽液体后每孔加入 Hoechst 33258 1 mL, 染色 10 min 后, 以 PBS 清洗 2 次, 于荧光倒置显微镜下观察并拍照细胞形态变化。

流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF7-TAMR, 以每孔每毫升 1.2×10^5 个的密度接种于 60 mm 培养皿中, 置于培养箱继续培养至完全贴壁, 弃旧培养基, 以不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤后, 调整细胞浓度至每毫升 10^6 个, 以 70% 冰乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定细胞 30 min; 离心后 PBS 洗涤, 加入 300 μL PI/RNase A 染液, 混匀后室温避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测与分析细胞周期分布情况。

流式细胞术检测细胞内活性氧 ROS 取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF7-TAMR, 以每孔每毫升 1.2×10^5 个的密度接种于 60 mm 培养皿中, 置于培养箱继续培养至完全贴壁, 弃旧培养基, 以不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理后收集细胞, 按照下述两种方式处理: ① 原位装载探针: 去除旧培养基, 并以 DCFH-DA 稀释溶液 (DCFH-DA 以无血清培养基 1:1 000 稀释) 覆盖细胞, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 20 min。用无血清培养基洗涤细胞, 于荧光显微镜下观察并拍照; ② 收集细胞后转载探针: 细胞收集后悬浮于 DCFH-DA 稀释溶液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 洗涤细胞后, 采用流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量。

Transwell 检测细胞迁移与侵袭 应用 Transwell 小室进行迁移能力检测。在小室下室加入含有 60% FBS 的完全培养基, 上室以每孔 10^5 个的密度接种细胞, 并加入不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 放入培养箱培养 24 h。结束后, 弃上室培养基, 将小室浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 使用 0.1% 结晶紫染液染色 30 min, 以 PBS 清洗 3 次, 棉签去除未转移的细胞, 显微镜下拍照结束后, 用 33% 冰乙酸将小室上的细胞洗脱收集, 酶标仪 570 nm 处测量 A 值。侵袭实验中, 将 100 μL 基质胶 (Matrigel: 培养基 = 1:30) 铺于 Transwell 小室上部, 4 h 后基质胶可固定与小室形成基底膜, 之后操作同迁移实验, 小室接种细胞并培养 72 h 后, 固定, 染色, 拍照, 测量 A 值。

微球体培养及流式细胞术检测微球体表面分子 CD44 与 CD24 将乳腺癌细胞 MCF7-TAMR 接种于超低吸附性 6 孔板, 使用无血清培养基 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -FGF、20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGF、1:50 B27、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素、0.4% BSA、2% KnockOut™ 血清代替物及 1% 双抗) 连续悬浮培养 3 代后, 以不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 24 h 后收集细胞, 每组加入 PE-CD24 与 APC-CD44 染液各 1 μL , 避光冰上孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测 CD44 与 CD24 表达情况。

Western blot 检测细胞中 p-ER- α 、ABCG2、PI3K-p85 与 Akt 蛋白的表达 取对数生长期的乳腺癌细胞 MCF7-TAMR, 以每孔每毫升 1.2×10^5 个的密度接种于 60 mm 培养皿中, 置于培养箱继续培养至完全贴壁, 弃旧培养基, 以不同浓度 CPT (5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 24 h 后收集细胞, 使用 RAPI 裂解缓冲液冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\times g$ 离心 20 min 后, 收集上清。使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。样品经过 12% SDS-PAGE 分离并转移至 PVDF 膜上, 使用含 5% 脱脂奶粉的 PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 封闭非特异性抗原 1 h 后, 加入一抗并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, 使用 PBST 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 再经 PBST 洗膜后, 使用 ECL 检测试剂盒检测目标蛋白, 使用 Image Lab 进行图像分析。

统计学方法 实验数据采用统计软件 GraphPad Prism 8 进行分析与作图。计量资料使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较使用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

结果

1 CPT 抑制 MCF7-TAMR 细胞的生长

使用 MTT 法检测药物对 MCF7-TAMR 与 MCF7 细胞的抑制作用。如图 1 所示, 与 MCF7 相比, MCF7-TAMR 对他莫昔芬有高度的耐药性, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 17.54 ± 0.82 和 $268.4 \pm 57.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 耐药倍数为 15 倍。顺铂对 MCF7 细胞的 IC_{50} 为 $165.6 \pm 17.9 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而对 MCF7-TAMR 细胞的 IC_{50} 为 $312.5 \pm 36.3 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CPT 对 MCF7 细胞与 MCF7-TAMR 细胞均有明显的生长抑制作用, 药物作用 MCF7-TAMR 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 $15.14 \pm 2.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且抑制作用具有浓度和时间依赖性。

2 CPT 诱导 MCF7-TAMR 细胞凋亡

采用 5、15 和 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT 处理 MCF7-TAMR 细胞, 24 h 后进行 Hoechst 33258 染色。结果如图 2A 所示, 对照组细胞呈现均匀的蓝色荧光, 随着 CPT 浓

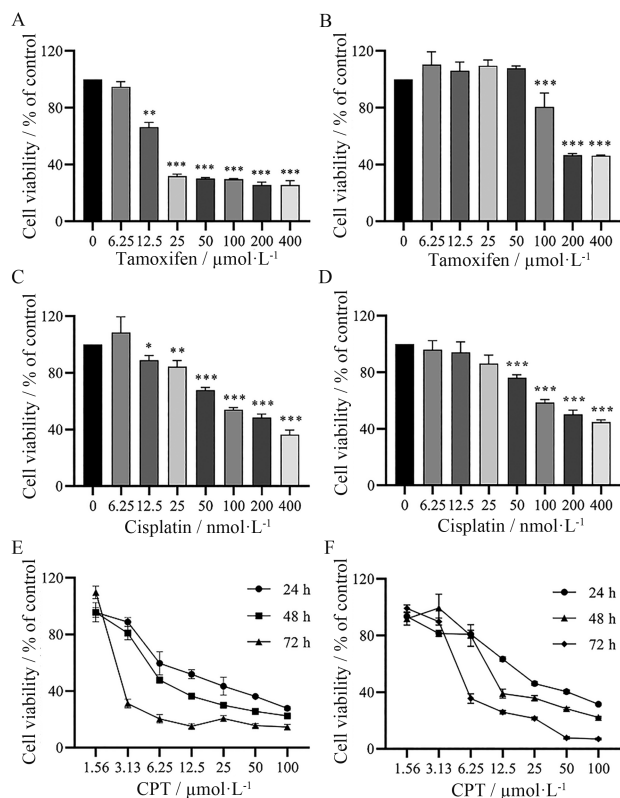


Figure 1 Cell viability of MCF7 cells and MCF7-TAMR cells. A, B: Cell viability of MCF7 cells (A) and MCF7-TAMR cells (B) after treatment with various concentrations of tamoxifen for 24 h; C, D: Cell viability of MCF7 cells (C) and MCF7-TAMR cells (D) after treatment with various concentrations of cisplatin for 24 h; E, F: Cell viability of MCF7 cells (E) and MCF7-TAMR cells (F) after treatment with various concentrations of cryptotanshinone (CPT) for 24, 48 and 72 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group (0)

度的增加,细胞数量逐渐减少,凋亡细胞增多,细胞核呈现浓缩、致密的强蓝色荧光,出现凋亡小体,存在典型的凋亡细胞核的特征。

为了进一步检测 MCF7-TAMR 细胞凋亡,采用不同浓度 CPT 处理 MCF7-TAMR 细胞,24 h 后进行 Annexin V-FITC 与 PI 染色,采用流式细胞术检测细胞凋亡。结果如图 2B 所示,与对照组相比,不同浓度 CPT 处理 MCF7-TAMR 细胞后均可显著诱导细胞凋亡的发生,凋亡细胞 (Q2 + Q3) 随着 CPT 浓度增加显著上升,凋亡率由 $37.75\% \pm 3.46\%$ ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT) 上升为 $72.53\% \pm 6.31\%$ ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT)。结果表明 CPT 可诱导 MCF7-TAMR 细胞凋亡。

3 CPT 诱导 MCF7-TAMR 细胞周期阻滞

细胞周期分布能够反映细胞增殖状态,为了进一步分析 CPT 对 MCF7-TAMR 细胞的影响,采用流式细胞术检测了不同浓度 CPT 处理 24 h 后的细胞周期变

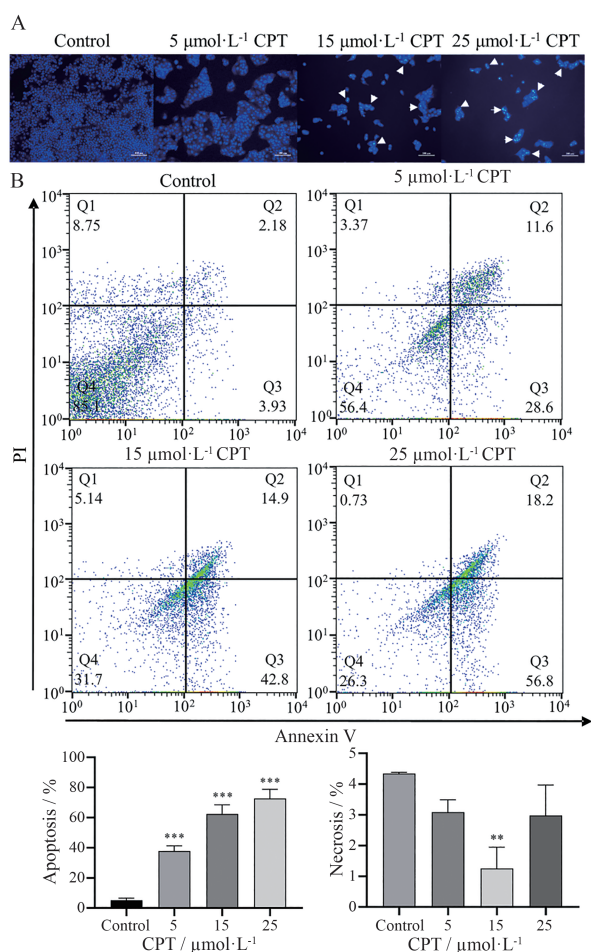


Figure 2 Apoptosis of MCF7-TAMR cells induced by CPT. A: Effect of CPT on nucleus morphology of MCF7-TAMR cells. The apoptotic cells were indicated by white arrows. Scale bar: 100 μm; B: Flow cytometry analyzes the apoptosis rates induced by CPT. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group. PI: Propidium iodide

化。结果如图 3A 所示,与对照组相比,不同浓度 CPT 处理 MCF7-TAMR 细胞后, G0/G1 期细胞比例均显著增加, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT 作用下, G0/G1 期细胞比例由 $47.90\% \pm 3.84\%$ 上升至 $64.84\% \pm 1.61\%$ 。同时 G2/M 期细胞比例显著减少, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPT 作用下, G2/M 期细胞比例由 $22.80\% \pm 3.84\%$ 下降至 $13.22\% \pm 2.20\%$,有效抑制了细胞周期的进程。使用 NAC 预处理,再加入药物刺激,但并没有改变药物作用效果 (图 3B)。

4 CPT 诱导 MCF7-TAMR 细胞内 ROS 产生

肿瘤细胞长期处于高水平的 ROS 环境中,更易发生氧化应激反应,过量的 ROS 将激活细胞凋亡途径^[1]。使用活性氧检测试剂盒分析了不同浓度 CPT 处理后的 MCF7-TAMR 细胞内 ROS 水平的变化情况。DCFH-DA 染色后采用倒置荧光显微镜观察发现,与对照组相比, CPT 处理组荧光强度显著增强 (图 4A)。流式细胞术检测结果显示, CPT 以剂量依赖性的方式

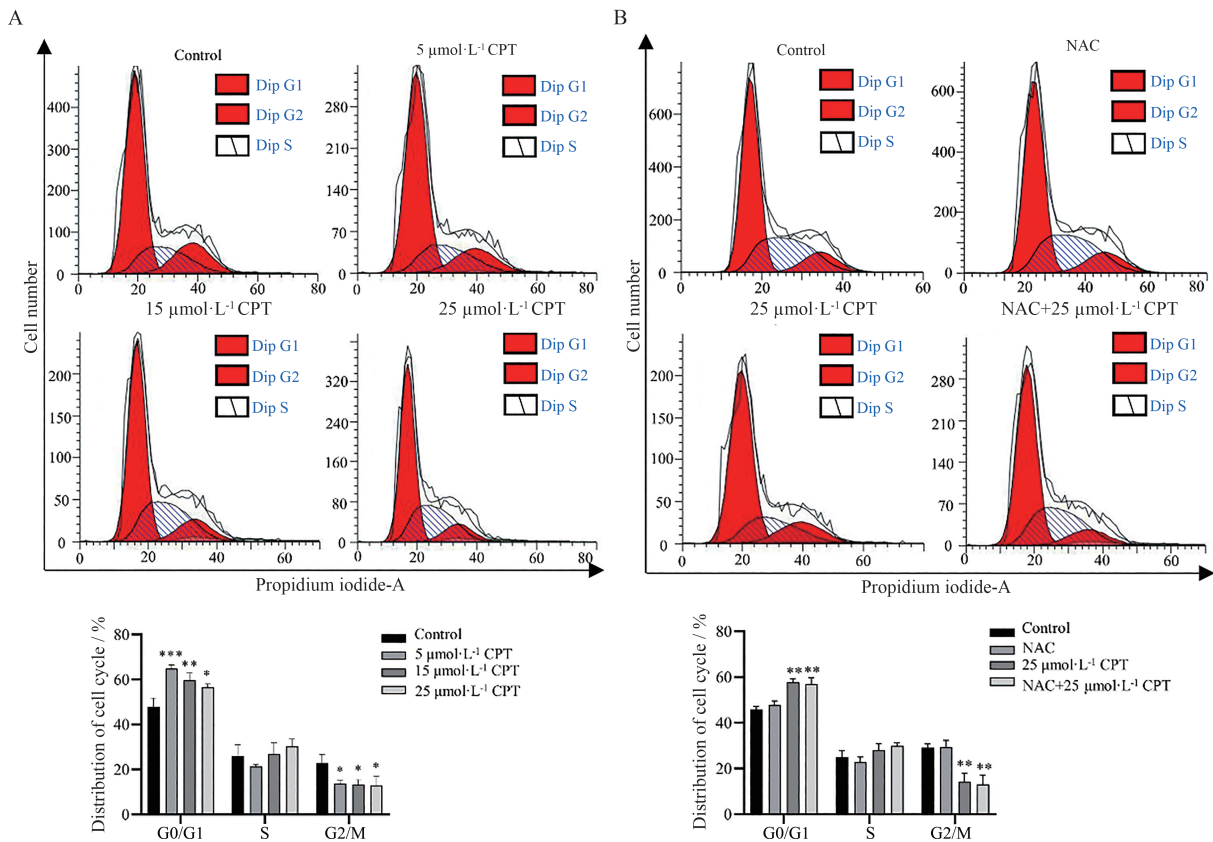


Figure 3 Effect of CPT on the distribution of MCF7-TAMR cell cycle. Cells were treated with or without CPT and NAC for 24 h, and stained with PI, then analyzed by flow cytometry. A: Cells were treated with CPT for 24 h; B: Cells were treated with CPT and NAC for 24 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group. NAC: *N*-Acetyl-*L*-cysteine

增加MCF7-TAMR细胞内ROS的生成(图4B)。

5 CPT抑制MCF7-TAMR细胞迁移与侵袭

肿瘤细胞从原发部位转移扩散被认为是癌症相关

死亡的主要原因,以Transwell检测不同浓度CPT处理后MCF7-TAMR细胞迁移能力。结果如图5所示,与未处理组相比,CPT剂量依赖性地显著抑制了MCF7-TAMR细胞的迁移与侵袭能力。

6 CPT减少CD24^{low}CD44⁺细胞群

悬浮球状培养方法是最常用的肿瘤干细胞培养方法,在无血清细胞培养基中的干细胞球在体外实验中可评价干细胞的自我更新能力^[12]。利用不同浓度CPT对经过培养所形成的微球体进行24 h的干预,并通过流式细胞术检测微球体CD24^{low}CD44⁺细胞群数量变化。结果如图6所示,经微球体培养后的CD24^{low}CD44⁺细胞群占比为45.0% ± 3.51%; 5、15、25 μmol·L⁻¹ CPT干预下,CD24^{low}CD44⁺细胞群比例分别下降为24.97% ± 3.35%、23.37% ± 2.27%与17.53% ± 3.23% (图6A)。使用NAC预处理,再加入药物刺激,结果显示NAC可降低CD24^{low}CD44⁺细胞群数量,但没有抑制CPT的作用效果(图6B)。

7 CPT对p-ER-α、ABCG2、PI3K-p85与Akt蛋白质表达的影响

Western blot检测CPT处理前后MCF7-TAMR细

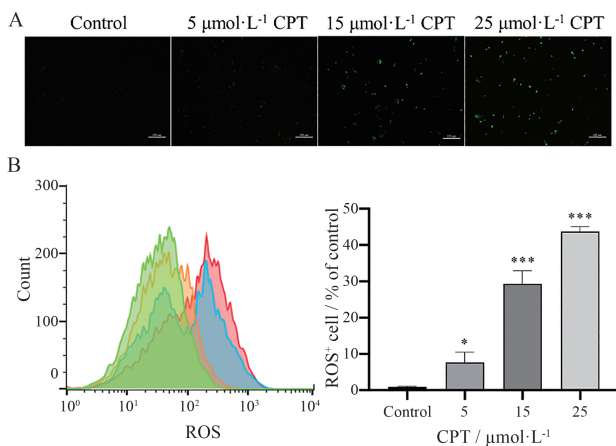


Figure 4 Effects of CPT on the production of reactive oxygen species (ROS) in MCF7-TAMR cells. Cells were treated with or without CPT, and stained with DCFH-DA, then observed by inverted fluorescence microscope (A) or analyzed by flow cytometry (B). Scale bar: 100 μm. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

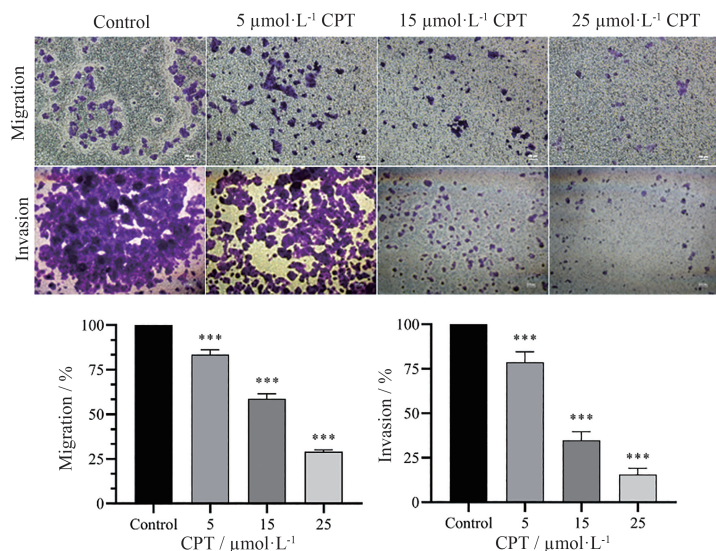


Figure 5 CPT inhibited migration and invasion of MCF7-TAMR cells. Scale bar: 100 μm . $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

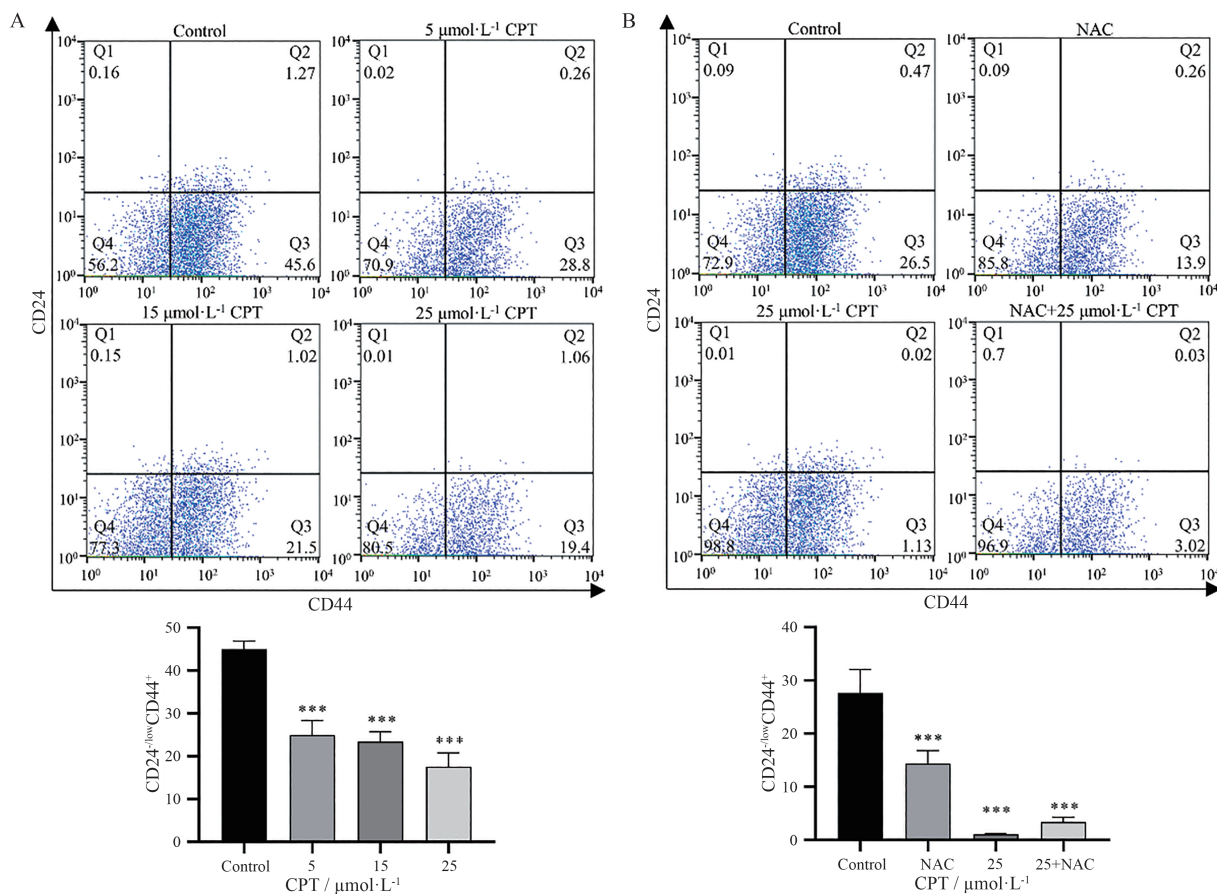


Figure 6 Detection of CD24 and CD44 on the surface of microspheres by flow cytometry. A: Cells were treated with CPT for 24 h; B: Cells were treated with CPT and NAC for 24 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

胞内 p-ER- α 、ABCG2、PI3K-p85 与 Akt 蛋白质的表达。结果如图 7 所示，与对照组相比，不同浓度 CPT 处理 MCF7-TAMR 细胞 24 h 后，p-ER- α 、PI3K-p85 与 Akt 蛋白的表达量显著下降，结果提示 CPT 可能通过调控 ER- α 的磷酸化、同时抑制 PI3K/Akt 信号通路从而发挥

抑制肿瘤增殖的作用。

ABCG2 又称乳腺癌耐药蛋白，在各种癌细胞中的过表达并与细胞的多药耐药相关，对 PI3K/Akt 的抑制可下调 ABCG2 的表达。在本研究中，不同浓度的 CPT 均显著性地抑制了 ABCG2 表达。使用 NAC 预处理，

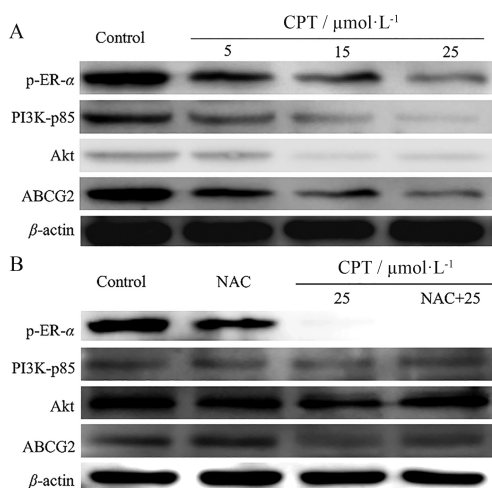


Figure 7 Effect of CPT on the protein expression of phospho S118 estrogen receptor α (p-ER- α), ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K-p85) and serine-threonine protein kinase (Akt) in MCF7-TAMR cells. A: Cells were treated with CPT for 24 h; B: Cells were treated with CPT and NAC for 24 h. The protein expression was detected by Western blot

再加入药物刺激, PI3K-p85、Akt及ABCG2蛋白表达有所上升,但对p-ER- α 没有影响。结果提示CPT具有降低药物外排,克服耐药性的潜能。

讨论

ER- α 的磷酸化发生在对多种刺激的反应中, p-ER- α 促进ER- α 与配体的结合,降低ER- α 与他莫昔芬的亲合力,并参与ER- α 依赖的基因转录^[13],预防该蛋白的磷酸化是ER⁺乳腺癌潜在的治疗方法。他莫昔芬作为ER⁺早期乳腺癌患者的标准内分泌治疗药物已被使用多年,然而其应用受到内在和获得性耐药的限制。虽然近年来已有多种机制可解释他莫昔芬耐药性的发生,包括受体酪氨酸激酶(RTKs)的异常激活、转录因子(Sox9^[14]和Sail2^[15])的异常变化、细胞周期调节剂^[16]与自噬^[17]等,但临床治疗中,其耐药问题一直未得到有效解决。CPT作为中药丹参的有效成分之一,已被证实对肝癌、肺癌等有良好的抗肿瘤活性。结果表明,CPT降低ER- α 磷酸化,从而对ER- α 与他莫昔芬的亲合力及ER- α 依赖的基因转录产生影响,将MCF7-TAMR细胞周期阻滞在G0/G1期,抑制MCF7-TAMR细胞增殖,并提升ROS水平来促进细胞的凋亡,且具有浓度与时间依赖性。

肿瘤细胞转移是从肿瘤细胞获得侵袭性表型开始,最终在次级地点定植,成为癌症相关死亡的主要原因^[18],ER⁺转移性乳腺癌会不可避免地出现他莫昔

芬的耐药性^[19]。此外,肿瘤干细胞亦被认为与肿瘤耐药和肿瘤转移有关,CD24^{-low}CD44⁺是典型肿瘤起始特征的癌细胞群,而经过他莫昔芬治疗后存活的残留肿瘤可富含此类细胞^[20]。PI3K/Akt信号通路可有助于肿瘤干细胞维持干细胞特异性的同时亦与细胞迁移相关,包括PI3K与Akt在内的关键蛋白异常活性可促进获得性内分泌治疗的耐药性^[21],研究显示PI3K抑制剂是有希望的乳腺癌治疗方向^[22]。本研究表明CPT对MCF7-TAMR细胞迁移与侵袭有抑制作用。乳腺癌干细胞是一组特殊的细胞,利用微球体培养技术悬浮培养MCF7-TAMR细胞诱导CD24^{-low}CD44⁺细胞群并以药物刺激,结果显示经微球体培养后MCF7-TAMR细胞中CD24^{-low}CD44⁺细胞群比例接近一半,同时CPT显著降低该细胞群的比例,这可能与CPT对PI3K/Akt及ABCG2的抑制有关。这表明CPT能降低MCF7-TAMR肿瘤细胞干性,抑制其迁移能力,防止肿瘤转移。ABCG2是ABC转运蛋白家族成员之一,与药物的吸收、分布与消除有关^[23],在耐药细胞中发挥了重要作用,目前也被认为是一种癌症干细胞标记物^[24],其表达受到PI3K/Akt信号通路的调控^[25]。本研究显示,CPT可抑制PI3K/Akt信号通路,降低ABCG2蛋白表达,从而抑制药物外排并降低细胞肿瘤干细胞特异性,这可能是CPT克服他莫昔芬耐药性的机制之一。

综上所述,CPT通过诱导细胞凋亡,引起细胞周期阻滞,抑制细胞迁移,抑制ER- α 磷酸化,抑制PI3K/Akt信号通路,降低CD24^{-low}CD44⁺细胞群数量及ABCG2的表达,克服细胞耐药性,从而为乳腺癌他莫昔芬耐药细胞的治疗提供了潜在候选药物。

作者贡献: 张英与李金耀进行实验设计;刘航为实验实施者;李金耀和夏丽洁进行实验评估;刘航执笔、李金耀与夏丽洁审核。

利益冲突: 文章内容不涉及相关利益冲突,无作者署名争议。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72: 7-33.
- [2] Tang JN, Wu ZY, Tian ZL, et al. OTUD7B stabilizes estrogen receptor α and promotes breast cancer cell proliferation [J]. Cell Death Dis, 2021, 12: 534.
- [3] Kim H, Park S, Lee J, et al. TNF α enhances tamoxifen sensitivity through dissociation of ER α -p53-NCOR1 complexes in ER α -positive breast cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13: 2601.
- [4] Ariella BH, Dhivya RS, Carlos LA. Overcoming endocrine resis-

- tance in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37: 496-513.
- [5] Wang KH, Kao AP, Lin TC, et al. Promotion of epithelial-mesenchymal transition and tumor growth by 17β -estradiol in an ER⁺/HER2⁺ cell line derived from human breast epithelial stem cells [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2012, 59: 262-267.
- [6] Deng H, Zhang XT, Wang ML, et al. ER- α 36-mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e88034.
- [7] Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 268-273.
- [8] Bleau AM, Hambarzumyan D, Ozawa T, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 226-235.
- [9] Li H, Gao C, Liu C, et al. A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111332.
- [10] Li H, Gao C, Liang Q, et al. Cryptotanshinone is a intervention for ER-positive breast cancer: an integrated approach to the study of natural product intervention mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 592109.
- [11] Saito T, Nah J, Oka S, et al. An alternative mitophagy pathway mediated by Rab9 protects the heart against ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129: 802-819.
- [12] Yakisich JS, Azad N, Kaushik V, et al. Cancer cell plasticity: rapid reversal of chemosensitivity and expression of stemness markers in lung and breast cancer tumorspheres [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2280-2286.
- [13] Zhang Z, Song XX, Chi JL, et al. Regulation of KLF4 by post-translational modification circuitry in endocrine resistance [J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109574.
- [14] Jeselsohn R, Cornwell M, Pun M, et al. Embryonic transcription factor SOX9 drives breast cancer endocrine resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E4482-E4491.
- [15] Ye L, Lin C, Wang X, et al. Epigenetic silencing of SALL2 confers tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *EMBO Mol Med*, 2022, 14: e15618.
- [16] Viedma RG, Baiza GL, Salamanca GF, et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review) [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32: 3-15.
- [17] Liu JX, Yue W, Chen HY. The correlation between autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12: 2066-2074.
- [18] Wang J, Wang S, Chen L, et al. SCARA5 suppresses the proliferation and migration, and promotes the apoptosis of human retinoblastoma cells by inhibiting the PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: 202.
- [19] Punturi NB, Seker S, Devarakonda V, et al. Mismatch repair deficiency predicts response to HER2 blockade in HER2-negative breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2940.
- [20] Ma F, Li H, Wang H, et al. Enriched CD44⁺/CD24⁻ population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC) [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353: 153-159.
- [21] Shi W, Zhang G, Ma Z, et al. Hyperactivation of HER2-SHCBP1-PLK1 axis promotes tumor cell mitosis and impairs trastuzumab sensitivity to gastric cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2812.
- [22] Schöffski P, Cresta S, Mayer IA, et al. A phase Ib study of pictilisib (GDC-0941) in combination with paclitaxel, with and without bevacizumab or trastuzumab, and with letrozole in advanced breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20: 109.
- [23] Bram EE, Stark M, Raz S, et al. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance [J]. *Neoplasia*, 2009, 11: 1359-1370.
- [24] Xie ZY, Liu MS, Zhang C, et al. Aspirin enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma side population cells to doxorubicin via miR-491/ABCG2 [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38: BSR20180854.
- [25] Tang HJ, Huang WJ, Yang Q, et al. Jianpi Yangwei decoction promotes apoptosis and suppresses proliferation of 5-fluorouracil resistant [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20: 337.