

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research棟酰胺通过调控细胞自噬影响乳腺癌耐药
细胞株 MCF-7/PTX 对紫杉醇耐药的研究Rocaglamide reverses paclitaxel resistance of drug resistant breast cancer cell line
MCF-7/PTX by regulating cell autophagy张立柱^{1a}, 韩长辉^{1b}, 范焕芳^{1b},
张 洋², 赵康超³(1. 河北省中医院, a. 外一科; b. 肿瘤二科,
河北 石家庄 050011; 2. 南宫市人民医院 肿瘤
科, 河北 邢台 055750; 3. 河北中医学院 中西医
结合学院, 河北 石家庄 050020)ZHANG Li-zhu^{1a},
HAN Chang-hui^{1b},
FAN Huan-fang^{1b}, ZHANG Yang²,
ZHAO Kang-chao³(1. a. Department of Surgery I;
b. Department of Oncology II, Hebei
Province Hospital of Traditional Chinese
Medicine, Shijiazhuang 050011, Hebei
Province, China; 2. Department of
Oncology, Nangong People's Hospital,
Xingtai 055750, Hebei Province, China;
3. Institute of Integrated Traditional and
Western Medicine, Hebei College of
Traditional Chinese Medicine,
Shijiazhuang 050020, Hebei Province,
China)基金项目: 河北省中医药管理局科研计划基金
资助项目(2021024)作者简介: 张立柱(1973-), 男, 副主任医师, 主要
从事乳腺癌临床及基础方向的研究通信作者: 范焕芳, 教授, 主任医师
MP: 15690318188

E-mail: fhf701024@163.com

摘要:目的 探讨棟酰胺(Roc-A)对乳腺癌 MCF-7/PTX 细胞株紫杉醇(PTX)耐药的影响及其作用机制。**方法** 以乳腺癌 MCF-7 细胞为研究对象, 用 PTX 低浓度加量持续诱导法获得 PTX 耐药株 MCF-7/PTX, 用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定 MCF-7/PTX 细胞株的耐药指数及 Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞株增殖活性的影响及耐药逆转倍数。将 MCF-7/PTX 细胞株分为对照组(正常培养的细胞)、PTX 组(40.8 nmol · L⁻¹ PTX)、PTX + Roc-A-L 组(40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 25 nmol · L⁻¹ Roc-A)、PTX + Roc-A-M 组(40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 50 nmol · L⁻¹ Roc-A)和 PTX + Roc-A-H 组(40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 100 nmol · L⁻¹ Roc-A)。用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 用免疫荧光法检测细胞自噬相关蛋白 LC3 的相对表达水平, 用蛋白质印迹法检测细胞凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)和自噬相关蛋白自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3)的相对表达水平。**结果** 成功构建乳腺癌 PTX 耐药细胞株 MCF-7/PTX, 耐药指数为 5.49; Roc-A 可呈浓度依赖性抑制 MCF-7/PTX 细胞株增殖活性, 而不同浓度(25、50、100 nmol · L⁻¹) Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞株 PTX 耐药性的逆转倍数分别为 1.57、2.68 和 6.16。对照组、PTX 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-M 组和 PTX + Roc-A-H 组的细胞凋亡率分别为 (4.75 ± 2.10)%、(21.79 ± 3.61)%、(32.54 ± 3.43)%、(39.82 ± 3.26)% 和 (55.61 ± 4.22)%, LC3 荧光相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08、0.77 ± 0.06、0.60 ± 0.06、0.41 ± 0.04 和 0.26 ± 0.03, Bax 蛋白相对表达水平分别为 0.12 ± 0.04、0.25 ± 0.09、0.48 ± 0.10、0.86 ± 0.12 和 1.10 ± 0.13, LC3 II/LC3 I 蛋白比值分别为 6.52 ± 0.27、3.75 ± 0.23、1.76 ± 0.17、1.31 ± 0.10 和 1.02 ± 0.06。PTX 组、PTX + Roc-A-M 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-H 组的上述指标与对照组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); PTX + Roc-A-M 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-H 组的上述指标与 PTX 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** Roc-A 能逆转乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/PTX 对 PTX 的耐药性, 其机制可能与降低自噬有关。

关键词: 棟酰胺; 紫杉醇; 乳腺癌耐药株; 细胞凋亡; 自噬

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.11.013

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)11-1569-06

Abstract: Objective To investigate the effect of Rocaglamide (Roc-A) on paclitaxel (PTX) resistance in breast cancer MCF-7/PTX cell line and its mechanism. **Methods** With breast cancer MCF-7 cells as the research object, PTX resistant MCF-7/PTX cell line was obtained by continuous induction with low concentration of PTX. Methyl thiazolyl

tetrazolium (MTT) method was used to determine the drug resistance index of MCF-7/PTX cell line, the effect of Roc-A on the proliferation activity of MCF-7/PTX cell line and the drug resistance reversal multiple. MCF-7/PTX cell lines were divided into control group (normal cultured cells), PTX group ($40.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTX), PTX + Roc-A-L group ($40.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTX + $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Roc-A), PTX + Roc-A-M group ($40.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTX + $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Roc-A) and PTX + Roc-A-H group ($40.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTX + $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Roc-A). The apoptosis level of each group was detected by flow cytometry; the relative expression levels of cell autophagy related protein LC3 were detected by immunofluorescence assay; Western blotting was used to detect the relative expression levels of cell apoptosis related proteins, such as B cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) and autophagy associated protein autophagy microtubule associated protein light chains 3 (LC3). **Results** The PTX resistant cell line MCF-7/PTX of breast cancer was successfully constructed with a drug resistance index of 5.49; Roc-A could inhibit the proliferation activity of MCF-7/PTX cell lines in a concentration dependent manner, while the reversal multiples of PTX resistance of MCF-7/PTX cell lines to Roc-A at different concentrations (25, 50, 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) were 1.57, 2.68 and 6.16, respectively. The apoptosis rates of the control group, PTX group, PTX + Roc-A-L group, PTX + Roc-A-M group and PTX + Roc-A-H group were $(4.75 \pm 2.10)\%$, $(21.79 \pm 3.61)\%$, $(32.54 \pm 3.43)\%$, $(39.82 \pm 3.26)\%$ and $(55.61 \pm 4.22)\%$, respectively; the relative expression levels of LC3 fluorescence were 1.00 ± 0.08 , 0.77 ± 0.06 , 0.60 ± 0.06 , 0.41 ± 0.04 and 0.26 ± 0.03 , respectively; the relative expression levels of Bax protein were 0.12 ± 0.04 , 0.25 ± 0.09 , 0.48 ± 0.10 , 0.86 ± 0.12 and 1.10 ± 0.13 , respectively; the LC3 II/LC3 I protein ratio were 6.52 ± 0.27 , 3.75 ± 0.23 , 1.76 ± 0.17 , 1.31 ± 0.10 and 1.02 ± 0.06 , respectively. Compared with the control group, the PTX group, PTX + Roc-A-L group, PTX + Roc-A-M group, PTX + Roc-A-H group showed statistically significant differences in the above indicators (all $P < 0.05$); the above indicators in the PTX + Roc-A-L group, PTX + Roc-A-M group and PTX + Roc-A-H group were compared with those in the PTX group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$), showing a dose-dependent relationship. **Conclusion** Roc-A can reverse the resistance of breast cancer drug resistant cell line MCF-7/PTX to PTX, and the mechanism may be related to the reduction of autophagy.

Key words: rocaglamidel; paclitaxel; resistant breast cancer cell line; apoptosis; autophagy

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[1]。化疗在乳腺癌的常规治疗中起着至关重要的作用。然而,化疗药物的多药耐药,极大地限制了药物的临床疗效^[2]。紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是临床治疗乳腺癌的常用化疗药物,通过诱导与促进微管蛋白聚合,抑制癌细胞的有丝分裂和促进细胞凋亡,从而发挥抗癌作用^[3]。楝酰胺 (rocaglamide, Roc-A) 是从楝科植物中分离出来的天然化合物,具有天然抗肿瘤活性^[4-6]。自噬是一种溶酶体介导的生物降解过程,调控着细胞内的稳定状态。研究发现,在药物治疗肿瘤的过程中肿瘤细胞的自噬信号通路被激活,提高其对药物的耐受性,阻碍药物诱导的细胞凋亡^[7-8]。本研究以 MCF-7/PTX 耐药株作为研究对象,探讨 Roc-A 是否改善乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/PTX 对 PTX 耐药性及其作用机制是否与调节自噬有关,旨在为克服乳腺癌耐药的药物研究提供实验依据,并为临床用药提供数据支持。

材料与方法

1 材料

细胞 人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞,购自中国科学院上海细胞库。

试剂 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测试剂盒,购自美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司; 抗荧光淬灭封片液 [含核酸染料 (dihydrochloride, DAPI)]、二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒,均购自北京索莱宝科技有限公司; 裂解的胱天蛋白酶-3 (cleaved cysteine aspartate proteinase-3, cleaved-caspase-3) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (B cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、自噬微管相关蛋白轻链 3 (autophagy microtubule-associated protein light chains 3, LC3) 抗体、自噬效应蛋白 (autophagy effector

protein Beclin1, Beclin1) 抗体和自噬体吞噬蛋白 (autophagosome phagocytosis protein p62, p62) 抗体, 均购自英国 Abcam 公司。

仪器 MCO-18AC CO₂ 培养箱, 日本松下公司产品; F200 酶标分析仪, 瑞士 TECAN 公司产品; NovoCyte 2040R 流式细胞仪, 美国 ACEA 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养与耐药细胞株的构建^[5]

将亲本 MCF-7 细胞复苏在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养传代。用 PTX 低浓度加量持续诱导法诱导 MCF-7 细胞建立 PTX 耐药株 MCF-7/PTX。MCF-7/PTX 细胞的培养方法同 MCF-7 细胞。

2.2 MTT 法检测耐药株药敏性^[2]

分别收集对数期的耐药株 MCF-7/PTX 细胞及其亲本 MCF-7 细胞接种于 96 孔板中, 不同浓度 PTX (0、5、10、20、40、80、160 nmol · L⁻¹) 处理 24 h, 取出培养板, 每孔加入 MTT 试剂 10 μL, 培养箱中继续培养 4 h, 小心弃去培养基, 每孔加入甲瓚溶解液 150 μL 后振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 490 nm 波长处的光密度值。计算各组细胞增殖率, 绘制折线图, 并分别计算 PTX 对亲本细胞及耐药株的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC₅₀) 值 (a 和 b), 耐药指数 (resistance index, RI) = b/a, RI > 5 则认为耐药细胞系构建成功。

2.3 MTT 法检测 Roc-A 对耐药株 MCF-7/PTX 细胞增殖活性的影响^[2]

收集对数期的耐药株 MCF-7/PTX 细胞接种于 96 孔板中, 不同浓度 Roc-A (0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 nmol · L⁻¹) 处理 24 h, 后续检测方法同“2.2”项下。计算各组细胞增殖率, 绘制折线图。为排除细胞增殖抑制作用是由 Roc-A 引起的情况, 本研究选择细胞增殖活性约为 90% 的药物浓度作为低浓度, 按照 1:2:4 比例, 设置低、中、高剂量, 即 25、50、100 nmol · L⁻¹。

2.4 MTT 法检测 Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞 PTX 耐药的逆转作用^[2]

收集对数期的耐药株 MCF-7/PTX 细胞接种于 96 孔板中, 随机将 MCF-7/PTX 细胞分为 4 组: MCF-7/PTX 组、MCF-7/PTX + Roc-A-L 组、MCF-7/PTX + Roc-A-M 组和 MCF-7/PTX + Roc-A-H 组, 分别用不同浓度 PTX (0、5、10、20、40、80、160 nmol · L⁻¹) 处理 24 h, 后续检测方法同“2.2”项下。计算各组细胞增殖率, 绘制折线图, 并分别计算出对照组的 IC₅₀ 值和实验组的 IC₅₀ 值, 再依次计算出

Roc-A 对耐药株 MCF-7/PTX 的耐药逆转倍数, 耐药逆转倍数 = 对照组 IC₅₀/实验组 IC₅₀。

2.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况^[9]

收集对数期的耐药株 MCF-7/PTX 细胞接种于 6 孔板中, 随机将 MCF-7/PTX 细胞分为 5 组: 对照组 (正常培养的细胞)、PTX 组 (40.8 nmol · L⁻¹ PTX)、PTX + Roc-A-L 组 (40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 25 nmol · L⁻¹ Roc-A)、PTX + Roc-A-M 组 (40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 50 nmol · L⁻¹ Roc-A) 和 PTX + Roc-A-H 组 (40.8 nmol · L⁻¹ PTX + 100 nmol · L⁻¹ Roc-A), 药物作用 24 h 后收集各组细胞, 取 1 × 10⁶ 个细胞, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 200 μL 重悬, 加入 Annexin V-FITC 10 μL 和 PI 10 μL 孵育 30 min 后进行流式检测, 用 NovoExpress 分析软件进行分析。

2.6 免疫荧光法观察自噬标志蛋白 LC3 表达情况^[9]

药物分组及药物处理同“2.5”项下, 药物作用 24 h 后, 分别用 4% 多聚甲醛 1 mL 室温固定 30 min, 0.5% Triton X-100 1 mL 室温通透 30 min, 5% BSA 1 mL, 37 °C 封闭 1 h, 用 PBS 稀释 100 倍的 LC3 抗体 1 mL 4 °C 孵育过夜, 用 PBS 稀释 200 倍的 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔二抗 1 mL 37 °C 孵育 1 h, 抗荧光淬灭封片液 300 μL (含 DAPI), 用荧光显微镜观察拍照。

2.7 用蛋白质印迹法检测各组细胞相关蛋白相对表达水平^[8]

药物分组及药物处理同“2.5”项下, 药物作用 24 h 后收集各组细胞, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白。将待测蛋白以每孔 20 μg 上样进行电泳, 转膜后加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 分别加入甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、cleaved-caspase-3 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、LC3 抗体、Beclin1 抗体和 p62 抗体 (1:1 000 稀释), 4 °C 过夜, 加入膜与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔/鼠二抗 (1:1 × 10⁴ 稀释), 室温孵育 1 h, 滴加 ECL 发光液显色。以 GAPDH 作为上样参照, 用 Image J 软件分析待测蛋白的相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间分析用单因素方差分析, 2 组间比较用 *t* 检验。

结 果

1 耐药株 MCF-7/PTX 药敏性鉴定

PTX 对亲本 MCF-7 细胞的 IC₅₀ 值为

14.86 nmol · L⁻¹,对耐药株 MCF-7/PTX 细胞的 IC₅₀ 值为 81.59,耐药指数为 5.49,结果见图 1A。

2 Roc-A 对耐药株 MCF-7/PTX 细胞增殖活性的影响

如图 1B 所示,Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞的抑制率呈剂量依赖升高,IC₅₀ 值为 496.87 nmol · L⁻¹。为排除细胞增殖抑制作用是由 Roc-A 引起的,本研究后续实验选择细胞增殖活性约为 90% 的药物浓度作为低浓度,按照 1:2:4 比例,设置低、中、高剂量组,即 25、50、100 nmol · L⁻¹。

3 Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞 PTX 耐药的逆转作用

MCF-7/PTX 组为常规培养,MCF-7/PTX + Roc-A-L 组、MCF-7/PTX + Roc-A-M 组和 MCF-7/PTX + Roc-A-H 组分别用 25、50、100 nmol · L⁻¹ Roc-A 处理 24 h,然后分别用不同浓度 PTX(0、5、10、20、40、80、160 nmol · L⁻¹) 处理 24 h。

如图 1C 所示,MCF-7/PTX 组的 IC₅₀ 值为 76.64 nmol · L⁻¹,MCF-7/PTX + Roc-A 低、中、高剂量实验组的 IC₅₀ 值分别为 48.82、28.55、12.44 nmol · L⁻¹,

Roc-A 对 MCF-7/PTX 细胞 PTX 耐药的逆转倍数分别为 1.57、2.68 和 6.16,且 Roc-A 浓度越高,逆转倍数越大。

4 Roc-A 联合 PTX 对 MCF-7/PTX 细胞凋亡的影响

如图 2 所示,对照组、PTX 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-M 组和 PTX + Roc-A-H 组的细胞凋亡率分别为 (4.75 ± 2.10)%、(21.79 ± 3.61)%、(32.54 ± 3.43)%、(39.82 ± 3.26)% 和 (55.61 ± 4.22)%。与对照组比较,PTX 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-M 组和 PTX + Roc-A-H 组细胞的凋亡水平均显著升高 (均 $P < 0.05$);与 PTX 组比较,PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-M 组和 PTX + Roc-A-H 组细胞的凋亡水平均显著升高 (均 $P < 0.05$),并呈剂量依赖性。

5 Roc-A 联合 PTX 对 MCF-7/PTX 细胞 cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

如表 1 所示,与对照组比较,PTX 组、PTX + Roc-A-L 组、PTX + Roc-A-M 组和 PTX + Roc-A-H 组 cleaved-caspase-3 蛋白和 Bax 蛋白表达均显著升高 (均 $P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达均显著降低 (均

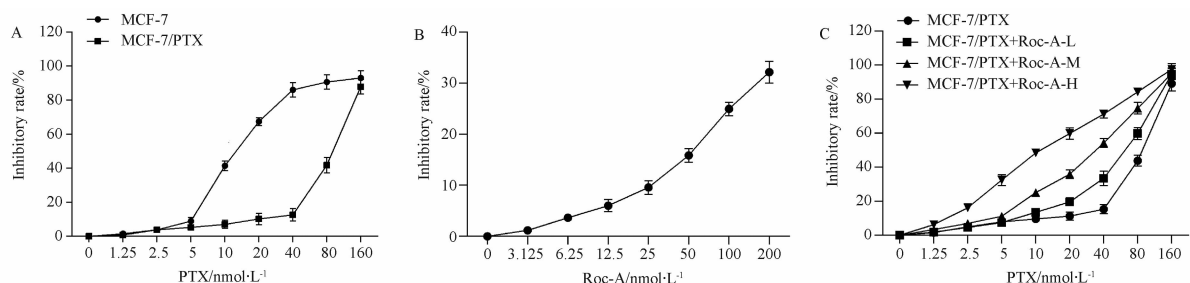


图 1 用四甲基偶氮唑蓝法检测细胞活性

Figure 1 Cell activity detected by methyl thiazolyl tetrazolium assay

A; Inhibition rates of parent MCF-7 cells and drug-resistant MCF-7/PTX cells under the effect of different concentrations of PTX; B; Effect of Roc-A on the inhibition rates of drug-resistant MCF-7/PTX cells; C; Reverse effect of rocaglamide on paclitaxel resistance in MCF-7/PTX cells.

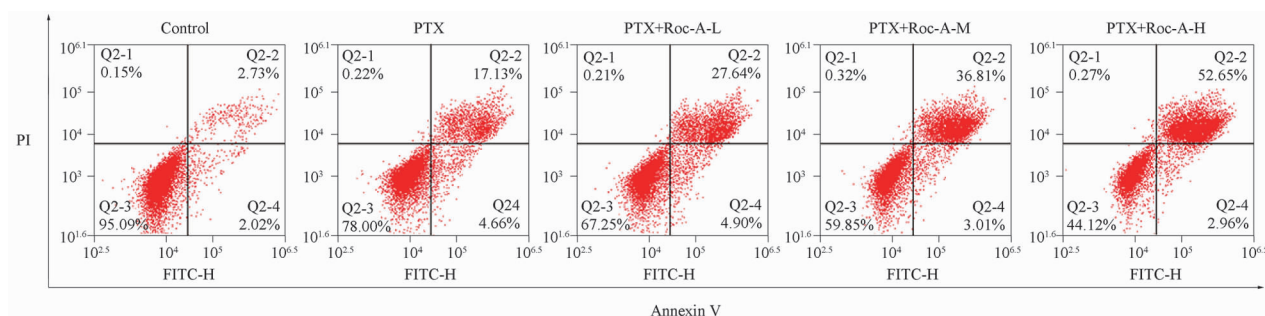


图 2 槲皮素 (Roc-A) 联合紫杉醇 (PTX) 对 MCF-7/PTX 细胞凋亡的影响

Figure 2 Effects of rocaglamide (Roc-A) combined with paclitaxel (PTX) on apoptosis of MCF-7/PTX cells

Control group: Cultured normally; PTX group: 40.8 nmol · L⁻¹ paclitaxel; PTX + Roc-A-L group: 40.8 nmol · L⁻¹ paclitaxel + 25 nmol · L⁻¹ rocaglamide; PTX + Roc-A-M group: 40.8 nmol · L⁻¹ paclitaxel + 50 nmol · L⁻¹ rocaglamide; PTX + Roc-A-H group: 40.8 nmol · L⁻¹ paclitaxel + 100 nmol · L⁻¹ rocaglamide.

$P<0.05$);与 PTX 组比较,PTX + Roc - A - L 组、PTX + Roc - A - M 组和 PTX + Roc - A - H 组细胞 cleaved - caspase - 3 蛋白和 Bax 蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$),Bcl - 2 蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$),并呈剂量依赖性。

6 免疫荧光观察自噬标志蛋白 LC3 表达情况

如图 3 所示,对照组、PTX 组、PTX + Roc - A - L 组、PTX + Roc - A - M 组和 PTX + Roc - A - H 组的荧光相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.77 ± 0.06 、 0.60 ± 0.06 、 0.41 ± 0.04 和 0.26 ± 0.03 。与对照组比较,各组细胞的 LC3 荧光表达强度均显著降低(均 $P<0.05$);与 PTX 组比较,PTX + Roc - A - L 组、PTX +

Roc - A - M 组和 PTX + Roc - A - H 组细胞的 LC3 荧光表达强度均显著降低(均 $P<0.05$),并呈剂量依赖性。

7 Roc - A 联合 PTX 对 MCF - 7/PTX 细胞 LC3、Beclin1 和 p62 自噬蛋白表达水平的影响

如表 2 所示,与对照组比较,各组细胞 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P<0.05$),p62 相对蛋白表达水平均显著升高(均 $P<0.05$);与 PTX 组比较,PTX + Roc - A - L 组、PTX + Roc - A - M 组和 PTX + Roc - A - H 组细胞 LC3 II/LC3 I 比值和 Beclin1 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P<0.05$),p62 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P<0.05$),并呈剂量依赖性。

表 1 Roc - A 联合 PTX 对 MCF - 7/PTX 细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Roc - A combined with PTX on apoptosis proteins expression levels of MCF - 7/PTX cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose(nmol · L ⁻¹)	n	Cleaved - caspase - 3	Bax	Bcl - 2
Control	-	3	0.04 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.62 ± 0.06
PTX	-	3	0.10 ± 0.03	0.25 ± 0.09 *	0.48 ± 0.09 *
PTX + Roc - A - L	25	3	0.21 ± 0.07 * #	0.48 ± 0.10 * #	0.27 ± 0.08 * #
PTX + Roc - A - M	50	3	1.03 ± 0.11 * #	0.86 ± 0.12 * #	0.16 ± 0.07 * #
PTX + Roc - A - H	100	3	1.62 ± 0.12 * #	1.10 ± 0.13 * #	0.11 ± 0.06 * #

Cleaved - caspase - 3; Cleaved cysteine aspartate proteinase - 3; Bax; B cell lymphoma - 2 associated X protein; Bcl - 2; B cell lymphoma - 2; Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with PTX group, # $P<0.05$.

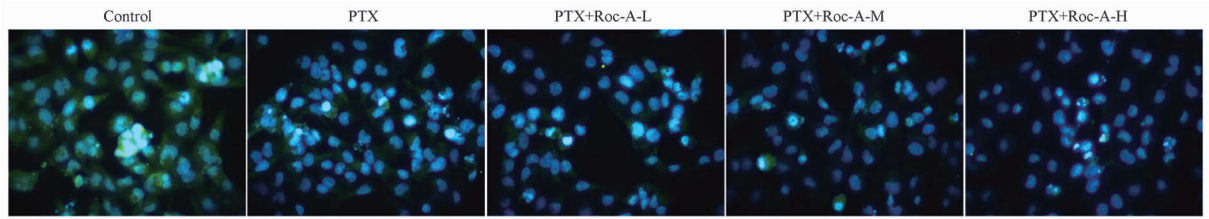


图 3 Roc - A 联合 PTX 对 MCF - 7/PTX 细胞自噬标志蛋白自噬微管相关蛋白轻链 3 表达的影响 (×200)

Figure 3 Effects of Roc - A combined with PTX on the expression of autophagy associated protein autophagy microtubule associated protein light chains 3 in MCF - 7/PTX cells (×200)

表 2 Roc - A 联合 PTX 对 MCF - 7/PTX 细胞自噬蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Roc - A combined with PTX on autophagy proteins expression levels of MCF - 7/PTX cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Beclin1	LC3 II/LC3 I	p62
Control	0.95 ± 0.10	6.52 ± 0.27	0.09 ± 0.04
PTX	0.37 ± 0.08 *	3.75 ± 0.23 *	0.62 ± 0.10 *
PTX + Roc - A - L	0.20 ± 0.05 * #	1.76 ± 0.17 * #	1.03 ± 0.11 * #
PTX + Roc - A - M	0.11 ± 0.04 * #	1.31 ± 0.10 * #	1.35 ± 0.12 * #
PTX + Roc - A - H	0.03 ± 0.01 * #	1.02 ± 0.06 * #	1.63 ± 0.14 * #

Dose and n refer to table 1; Beclin1; Autophagy effector protein Beclin1; LC3; Autophagy microtubule - associated protein light chains 3; p62; Autophagosome phagocytosis protein p62; Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with PTX group, # $P<0.05$.

讨 论

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤。PTK 是乳腺癌化学治疗的一线药物,其耐药性与肿瘤治疗的矛盾日益突出^[10]。克服耐药一直是相关科研工作者必须思考的问题。

Roc - A 具有较好的抗癌或细胞毒性。研究发现,Roc - A 可通过激活凋亡通路,抑制自噬和活性氧的产生,诱导结直肠癌细胞凋亡^[11]。本研究发现,Roc - A 对 MCF - 7/PTX 耐药细胞株具有一定的抗肿瘤活性,并且 Roc - A 联合 PTX 能逆转乳腺癌耐药细

胞株 MCF-7/PTX 的多药耐药性。

自噬是一种细胞在受到不良生长环境刺激时的重要保护机制。研究表明,自噬与肿瘤细胞的发生发展密切相关,在肿瘤发展不同阶段,自噬所扮演的角色也不同,在肿瘤起始阶段,自噬抑制肿瘤的形成,在肿瘤发展阶段,自噬促进肿瘤细胞存活及耐药^[12-15]。自噬的完成需要多种自噬相关因子参与,其中 LC3、Beclin1 和 p62 是自噬形成与发生的重要标志物^[16]。细胞凋亡是一种细胞自发性的程序性死亡的过程,与肿瘤的发生发展密切相关,其中 Bax、Bcl-2 和 cleaved-caspase-3 是凋亡过程的关键蛋白^[17]。为进一步探讨 Roc-A 逆转 MCF-7/PTX 细胞多药耐药的机制,检测发现 Roc-A 联合 PTX 处理 MCF-7/PTX 细胞后细胞凋亡水平显著升高,自噬表达显著降低,并呈剂量依赖性,Roc-A 浓度越高,MCF-7/PTX 细胞凋亡水平越高、自噬表达越低。由此可见,Roc-A 的逆转耐药性功能与细胞自噬关系密切。

本研究提示:Roc-A 通过调控细胞自噬逆转乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/PTX 对 PTX 耐药,旨在为乳腺癌细胞的耐药机制研究提供实验依据,并为临床应用药提供数据支持。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J clin*, 2017, 67(1):7—30.
- [2] 宁玉明,潘一帆,李范珠. 丹参酮 II-A 对阿霉素耐药人乳腺癌细胞的多药耐药逆转作用及机制研究[J]. *中草药*, 2021, 52(22):6890—6896.
- [3] 覃佐东,李珊,金志远,等. 简析紫杉醇的相关研究进展[J]. *科技通报*, 2018, 34(4):15—20.
- [4] 谭文莉,李从文,魏云林. 槲酰胺类化合物的抗肿瘤活性探究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(4):1896—1903.
- [5] 张小平,陶永辉,陈其亮,等. 人乳腺癌细胞 MCF-7 紫杉醇耐药株的建立及其生物学特性研究[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(6):804—809.
- [6] YAO C, NI Z, GONG C, *et al*. Rocaglamide enhances NK cell-mediated killing of non-small cell lung cancer cells by inhibiting autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(10):1831—1844.
- [7] PAN Z, ZHENG J, ZHANG J, *et al*. A novel protein encoded by Exosomal CircATG4B induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer by promoting autophagy[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9:e2204513. 2022-10-26 [2023-09-17]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.202204513>.
- [8] 刘小平,王劲进,王铭远,等. 姜黄素逆转卵巢癌细胞紫杉醇耐药的机制研究[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2021, 18(3):109—113.
- [9] 宋涛涛,李梦一,袁冰凡,等. 小檗碱通过抑制 ALDH1 活性降低卵巢癌细胞药物转运蛋白的表达逆转紫杉醇耐药[J]. *中国药师*, 2022, 25(7):1144—1150.
- [10] 喻经纬,鲁智豪,高静,等. 紫杉醇耐药机制研究进展及研究方向[J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(14):1147—1150.
- [11] LI C, ZHU G, CUI Z, *et al*. The strong inhibitory effect of combining anti-cancer drugs AT406 and rocaglamide with blue LED irradiation on colorectal cancer cells [J/OL]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2020, 30:101797. 2020-04-29 [2023-09-17]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100020301514?via%3Dihub>.
- [12] LI Z, LU C, WANG F, *et al*. Heat treatment-induced autophagy promotes breast cancer cell invasion and metastasis via TGF- β 2-mediated epithelial-mesenchymal transitions [J/OL]. *PeerJ*, 2023, 11:e14640. 2023-01-12 [2023-09-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36650834/>.
- [13] XU L N, LIU S L, YANG Y, *et al*. CircLASP1 silence strengthens therapeutic effects of MK-2206 on nasopharyngeal cancer through upregulating miR-625 [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(5):2123—2138.
- [14] ZHOU Y, PANG J, LIU H, *et al*. Fibronectin type III domain-containing protein 5 promotes autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells, contributing to nab-paclitaxel chemoresistance[J]. *Med Oncol*, 2022, 40(1):53.
- [15] YIN W, PHAM C V, WANG T, *et al*. Inhibition of autophagy promotes the elimination of liver cancer stem cells by CD133 aptamer-targeted delivery of doxorubicin [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11):1623.
- [16] CONDELLO M, VONA R, MESCHINI S. Prunus spinosa extract sensitized HCT116 spheroids to 5-Fluorouracil toxicity, inhibiting autophagy [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23. 2022-12-17 [2023-09-17]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/16098>.
- [17] 钟大仓,陈超,李桐,等. 胡椒碱诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(14):1687—1691.

(收稿日期 2024-12-26)