

基于转录组学探讨欧前胡素改善乳腺癌多柔比星耐药的机制[△]

李意婷^{1*},董伟²,梁新丽²,王虎¹,邱雨美¹,丁小云¹,张浩¹,鲍会云¹,李娴晰¹,汤喜兰^{1#}(1.江西科技师范大学药学院,南昌 330013;2.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)05-0529-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.05.04



摘要 目的 研究欧前胡素(IMP)对乳腺癌多柔比星(DOX)耐药的逆转作用及可能机制。方法 采用MTT法考察IMP最大无毒质量浓度(100 μg/mL)与DOX不同质量浓度(12.5、25、50、75、100 μg/mL)联用对MCF-7/DOX细胞增殖的影响;将MCF-7/DOX细胞分为空白对照组(1%二甲亚砜)、DOX组(50 μg/mL)、IMP+DOX组(100 μg/mL IMP+50 μg/mL DOX)和IMP组(100 μg/mL),检测各组细胞中多药耐药蛋白1(MDR1)、多药耐药相关蛋白1的mRNA及其蛋白表达水平;采用转录组测序技术及基因本体(GO)富集分析、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析筛选IMP改善乳腺癌DOX耐药相关的通路和靶点,并进行验证。结果 与单用DOX比较,IMP与DOX联用后,DOX对MCF-7/DOX细胞的半数抑制浓度从81.965 μg/mL下降至43.170 μg/mL,耐药逆转倍数为1.90;且联用可显著下调MDR1的mRNA表达($P<0.05$)。GO富集分析和KEGG通路富集分析结果显示,IMP逆转乳腺癌DOX耐药主要与调节解毒、多生物过程、细胞杀伤等生物过程有关,主要涉及p53信号通路,关键靶点为组成型光形态建成蛋白1(COP1)、细胞周期蛋白E1(CCNE1)、生长停滞和DNA损伤诱导蛋白45A(GADD45A)及GADD45B。验证实验结果显示,与DOX组比较,IMP+DOX组细胞中COP1的mRNA表达有上调趋势,但CCNE1、GADD45A及GADD45B的mRNA表达均显著下调($P<0.05$)。结论 IMP逆转乳腺癌DOX耐药的作用可能与调控p53信号通路中COP1、CCNE1、GADD45A及GADD45B的表达有关。

关键词 欧前胡素;乳腺癌;多柔比星耐药;转录组学;p53信号通路

Mechanism of imperatorin in ameliorating doxorubicin resistance of breast cancer based on transcriptomics

LI Yiting¹, DONG Wei², LIANG Xinli², WANG Hu¹, QIU Yumei¹, DING Xiaoyun¹, ZHANG Hao¹, BAO Huiyun¹, LI Xianxi¹, TANG Xilan¹(1. School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the ameliorative effect and potential mechanism of imperatorin (IMP) on doxorubicin (DOX) resistance in breast cancer. **METHODS** The effects of maximum non-toxic concentration (100 μg/mL) of IMP combined with different concentrations of DOX (12.5, 25, 50, 75, 100 μg/mL) on the proliferation of MCF-7/DOX cells were determined by MTT method. MCF-7/DOX cells were divided into blank control group (1% dimethyl sulfoxide), DOX group (50 μg/mL), IMP+DOX group (100 μg/mL IMP+50 μg/mL DOX) and IMP group (100 μg/mL). mRNA and protein expressions of multidrug resistance protein 1 (MDR1) and multidrug resistance-associated protein 1 in each group were measured. The relevant pathways and targets involved in the improvement of DOX resistance in breast cancer cells by IMP were screened and validated by using transcriptome sequencing technology, along with gene ontology (GO) enrichment analyses and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. **RESULTS** Compared with DOX alone, the combination of IMP and DOX reduced the half inhibitory concentration of DOX on MCF-7/DOX cells from 81.965 μg/mL to 43.170 μg/mL, the reverse fold was 1.90, and the mRNA expression of MDR1 was significantly down-regulated ($P<0.05$). The results of GO enrichment analyses and KEGG pathway enrichment analyses indicated that the reversal of DOX resistance in breast cancer by IMP was mainly associated

[△]基金项目 国家自然科学基金项目(No.82060733);江西省卫生健康委科研课题(No.202311141);江西科技师范大学创新训练项目(No.XJ202411318115);江西中医药大学校级课题(No.jzyjg-2023-07)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail: 1550142502@qq.com

通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理。E-mail: tangxilan1983@163.com

with the regulation of biological processes such as detoxification, multiple biological processes, and cell killing. The main pathway involved was the p53 signaling pathway, and the key targets mainly included constitutively photomorphogenic protein 1 (COP1), cyclin E1 (CCNE1), growth arrest and DNA damage-inducible protein 45A (GADD45A) and GADD45B. The results of the verification

experiments showed that compared with DOX group, there was a trend of up-regulation of COP1 mRNA, and significant down-regulation of CCNE1, GADD45A, and GADD45B mRNA expression in IMP+DOX group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The effect of IMP in ameliorating DOX resistance in breast cancer is related to its regulation of COP1, CCNE1, GADD45A and GADD45B targets in the p53 signaling pathway.

KEYWORDS imperatorin; breast cancer; doxorubicin resistance; transcriptomics; p53 signaling pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,已成为全球女性癌症死亡的主要原因^[1]。目前,对乳腺癌的治疗方法主要有手术治疗、放疗、化疗等。多柔比星(doxorubicin, DOX)是一种蒽环类抗生素,对乳腺癌以及多种恶性肿瘤有效,是临床应用广泛的抗癌化疗药。然而,部分患者在经DOX治疗后会出 现耐药性,使其应用受到限制^[2]。因此,寻找化疗增敏剂、改善乳腺癌耐药是亟待解决的关键问题。

欧前胡素(imperatorin, IMP)是一种天然的呋喃香豆素,存在于白芷、大戟和当归根等多种中药中,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和保护心血管等多种药理作用^[3]。近年来,IMP作为潜在的抗癌药物引起了人们的关注。IMP可抑制肝癌、结肠癌、肺癌等多种不同肿瘤细胞的生长,其作用机制主要包括抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、迁移,诱导肿瘤细胞凋亡、自噬和阻滞肿瘤细胞周期^[3]。有研究发现,IMP可拮抗药物外排蛋白的功能^[4],增强DOX、紫杉醇、吉西他滨等化疗药物对肿瘤耐药细胞的细胞毒作用^[5-6],靶向髓样细胞白血病蛋白1(myeloid cell leukemia-1, MCL-1)逆转肝癌细胞对顺铂的耐药性^[7],靶向MCL-1促进非特异性免疫T淋巴细胞诱导CD133⁺肺癌细胞凋亡^[8]。上述研究提示,IMP具有抑制多种肿瘤细胞耐药的作用,然而关于其对乳腺癌DOX耐药是否有逆转作用尚不明确。因此,本研究以人乳腺癌DOX耐药株MCF-7/DOX为研究对象,考察IMP对乳腺癌DOX耐药的影响,通过转录组学筛选IMP对乳腺癌DOX耐药的关键靶点,分析IMP改善乳腺癌DOX耐药的生物学途径及相关信号通路,并对关键靶点进行验证,旨在为阐明IMP缓解乳腺癌DOX耐药的作用及可能机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括SpectraMax Plus384型全波长酶标仪(美国Molecular Devices公司),T100™ Thermal Cycler型PCR仪、CFX96™型Real-Time PCR仪、Mini-PROTEAN®Tetra Cell型电泳系统(美国Bio-Rad公司),MI52-N型倒置生物显微镜(广州市明美光电技术有限公司),WJ-III型二氧化碳细胞培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

IMP对照品(批号PS000723,纯度>98.0%)购自成都普思生物科技股份有限公司;盐酸DOX原料药(批号827G033,纯度≥99%)购自北京索莱宝科技有限公司;MTT试剂(批号EZ7890B104)购自德国BioFroxx公司;总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(批号分别为AM91949A、AM62046A、AMF1769A)均购自日本Takara公司;兔源多药耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)单克隆抗体(批号Ab260038)购自英国Abcam公司;鼠源多药耐药蛋白1(multidrug resistance protein 1, MDR1)单克隆抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号分别为sc-55510、sc-47778)均购自美国Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗及山羊抗小鼠二抗(批号分别为H681481011、H681006001)均购自杭州华安生物技术有限公司;MEM培养基(批号MA0217-Nov-08H)购自大连美仑生物技术有限公司;胎牛血清(批号A121028)购自美国Gemini公司;RIPA裂解缓冲液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL发光试剂盒及显影定影试剂盒(批号分别为112023240207、070721211202、022823230802、042420201023)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞

人乳腺癌耐DOX细胞株MCF-7/DOX购自中国科学院细胞库。

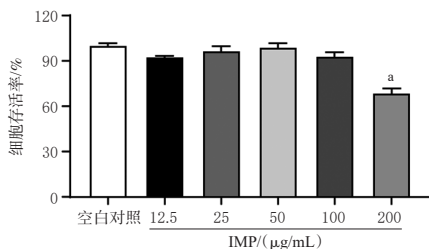
2 方法与结果

2.1 细胞培养

参考文献[9]方法培养MCF-7/DOX细胞。

2.2 IMP对MCF-7/DOX细胞活力的影响

参考文献[9]方法,采用MTT法考察12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的IMP对MCF-7/DOX细胞活力的影响,每个质量浓度设置6个复孔;以含1%二甲基亚砜(DMSO)的培养基为空白对照。药物作用48 h后,采用酶标仪于492 nm波长处检测各孔光密度(optical density, OD)值并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=药物孔OD值/空白对照孔OD值 $\times 100\%$ 。采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析;符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,进一步组间两两比较采用Tukey检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果见图1。



a: 与空白对照比较, $P < 0.05$ 。

图1 IMP对MCF-7/DOX细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

由图1可知,与空白对照比较,200 $\mu\text{g/mL}$ 的IMP可显著降低MCF-7/DOX细胞存活率($P < 0.05$),而12.5~100 $\mu\text{g/mL}$ 的IMP对该细胞存活率无明显影响($P > 0.05$)。因此,本研究选用100 $\mu\text{g/mL}$ 作为最大无毒质量浓度继续后续实验。

2.3 IMP与DOX联用对MCF-7/DOX细胞增殖的影响

将细胞以8 000个/孔的密度接种于96孔板中,培养24 h后加药。细胞分为空白对照组、DOX不同质量浓度组、IMP(100 $\mu\text{g/mL}$)+DOX不同质量浓度组,每组设置6个复孔。根据本课题组前期研究^[9]将DOX质量浓度设定为12.5、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$,空白对照组加入1.5% DMSO。药物作用48 h后,采用MTT法测定各孔OD值,计算细胞增殖抑制率,并计算药物对细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})和耐药逆转倍数(reverse fold, RF)。细胞增殖抑制率($\%$)=(空白对照组OD值-药物组OD值)/空白对照组OD值 $\times 100\%$; $\text{RF} = \text{DOX}$ 单用组 IC_{50} /IMP和DOX联用组 IC_{50} 。结果显示,DOX不同质量浓度组、IMP+DOX不同质量浓度组细胞的增殖均受到不同程度影响,且细胞增殖抑制率随着DOX质量浓度的升高而升高。DOX单独使用时,其对MCF-7/DOX细胞的 IC_{50} 为81.965 $\mu\text{g/mL}$; DOX和IMP联用时,其对细胞的 IC_{50} 下降为43.170 $\mu\text{g/mL}$,RF为1.90。

2.4 IMP与DOX联用对MCF-7/DOX细胞耐药相关基因表达的影响

参考文献^[9]方法,将MCF-7/DOX细胞以 1×10^5 个/皿的密度接种于直径35 mm的培养皿中,培养24 h后,随机分为空白对照组(1% DMSO)、DOX组(50 $\mu\text{g/mL}$)、IMP+DOX组(100 $\mu\text{g/mL}$ IMP+50 $\mu\text{g/mL}$ DOX)和IMP组(100 $\mu\text{g/mL}$),每组设置6个复孔。药物作用48 h后,按照Trizol试剂盒说明书方法提取细胞中总RNA,并对其纯度进行检验。取1 μg RNA逆转录为cDNA,并以cDNA为模板采用荧光定量PCR仪进行扩增[引物序列由本课题组自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及产物长度见表1]。PCR反应体系(20 μL)如下:cDNA模板2 μL ,PCR试剂10 μL ,正、反向引物各1 μL ,dd H₂O 6 μL 。扩增条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用双标准

曲线法计算目的基因MDR1、MRP1的相对表达量,并以空白对照组为参照进行归一化处理。按“2.2”项下方法进行数据分析。结果(表2)显示,与空白对照组比较,DOX组、IMP+DOX组细胞中MDR1、MRP1的mRNA以及IMP组细胞中MDR1的mRNA表达均显著下调($P < 0.05$);与DOX组比较,IMP+DOX组细胞中MDR1的mRNA表达进一步下调($P < 0.05$)。

表1 引物序列及产物长度

目的基因	正向(5'→3')	反向(5'→3')	产物长度/bp
MRP1	AGGACACGTCGGAACAAGTC	TGACGATCAAAGCCTCCACC	168
MDR1	GCTCCTGACTATGCCAAAGC	TCITCACCTCCAGGCTCAGT	202
COPI	AGACAACTCAGTGCAAGCA	AGCTGACTGTCTGTGAGGC	231
CCNE1	TGTCCTGGATGTTGACTGCC	TCAGTTTTGAGCTCCCGTC	185
GADD45A	CTGGAGAGCAGAAGACCGAA	CAGGTGGAAGTGGATCTGCA	209
GADD45B	TGAATGTGGACCCAGACAGC	TCGTGACCCAGGAGACAATGC	231
GAPDH	GATTTGGTCGTATTGGGCGC	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	169

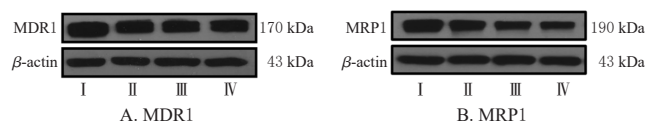
表2 各组细胞中MDR1、MRP1 mRNA及其蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDR1		MRP1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
空白对照组	1.00±0.01	1.00±0.07	1.00±0.02	1.00±0.03
DOX组	0.80±0.04 ^a	0.82±0.05	0.45±0.03 ^a	0.89±0.02
IMP+DOX组	0.34±0.03 ^{ab}	0.62±0.06 ^a	0.41±0.01 ^a	0.81±0.02 ^a
IMP组	0.60±0.04 ^a	0.74±0.07 ^a	1.08±0.02	0.90±0.05

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与DOX组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 IMP与DOX联用对MCF-7/DOX细胞耐药相关蛋白表达的影响

细胞接种、分组和加药同“2.4”项下。药物作用48 h后,提取细胞中总蛋白,采用BCA试剂盒测定总蛋白浓度,100 $^{\circ}\text{C}$ 下加热6 min进行蛋白变性。取10 μg 蛋白样品经10% SDS-PAGE凝胶电泳(100 V恒压)分离,电泳结束后,在90 V恒压下转至PVDF膜,采用5%牛血清白蛋白室温封闭1 h;加入MDR1(稀释比例1:500)、MRP1(稀释比例1:1 500)、 β -actin(稀释比例1:500)一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;以PBST漂洗,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(稀释比例1:20 000)、山羊抗小鼠二抗(稀释比例1:10 000),室温孵育1 h;以PBST再次漂洗,利用ECL发光液显影,采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值,并以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平(结果以空白对照组为参照进行归一化处理)。按“2.2”项下方法进行数据分析。结果(表2、图2)显示,与空白对照组比较,IMP+DOX组细胞中MDR1、MRP1蛋白及IMP组细胞中MDR1蛋白的表达均显著下调($P < 0.05$)。



I: 空白对照组; II: DOX组; III: IMP+DOX组; IV: IMP组。

图2 各组细胞中MDR1、MRP1蛋白表达的电泳图

2.6 转录组学实验筛选IMP逆转乳腺癌DOX耐药的关键靶点

2.6.1 RNA测序及cDNA文库构建

细胞接种、分组和加药同“2.4”项下。药物作用48 h后,每组收集3个样本,快速冻存于液氮中,采用干冰保存运输至北京百迈客生物科技有限公司进行RNA测序,并通过PCR富集得到cDNA文库。将转录组测序所得的“Raw Data”过滤,得到“Clean Data”,并将后者与指定的参考基因组进行序列比对,得到“Mapped Data”,然后通过插入片段长度检测、随机性检验等进行cDNA文库质量评估。

2.6.2 生物信息学分析

根据转录本在各样本中的表达量进行差异表达分析:采用DESeq2_EBSeq软件筛选差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),筛选标准为错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.01且 $|\log_2FC| \geq 2$ [式中,FC为差异倍数(fold change)]^[10]。采用R包clusterProfiler对DEGs进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,通过CytoScape 3.7.2软件将结果进行可视化展示。

DEGs分析结果(图3)显示,与空白对照组比较,DOX组细胞中上调基因1134个,下调基因91个;与DOX组比较,IMP+DOX组细胞中上调基因641个,下调基因998个。

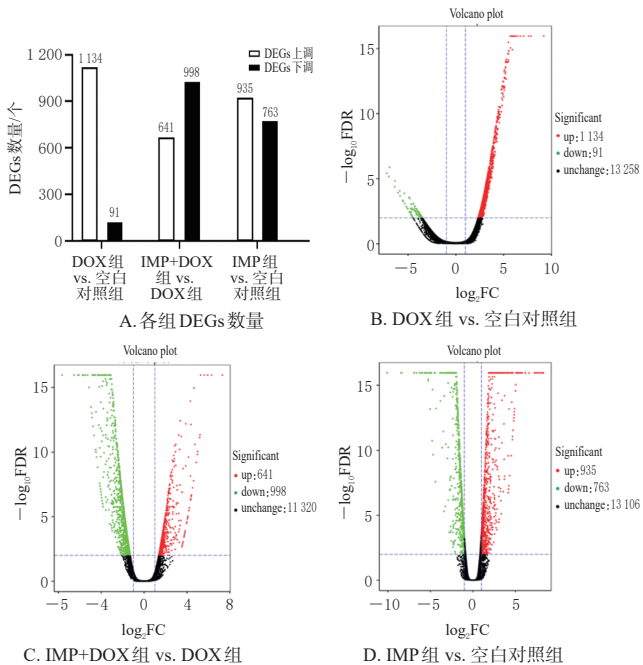


图3 各组间DEGs分析结果及其对应的火山图

GO富集分析结果表明,所有DEGs被注释到60个功能类别中,包括24个生物过程、19个细胞组分、17个分子功能,详见表3(该表仅列出了每个功能类别的前10项)。

表3 DEGs的GO分类注释统计结果(个)

GO分类	GO注释	DOX组与空白对照组比较		IMP+DOX组与DOX组比较	
		所有基因	DEGs	所有基因	DEGs
生物过程	解毒	49	10	49	5
	多生物过程	1434	136	1434	107
	细胞杀伤	35	3	35	4
	免疫系统过程	1200	100	1200	99
	生物附着	509	42	509	35
	细胞组分或生物合成	3007	242	3007	280
	生长	222	17	222	22
	生殖过程	819	58	819	65
	生殖	822	58	822	65
	代谢过程	5217	367	5217	425
细胞组分	其他有机体系	13	2	13	1
	其他有机体系组分	13	2	13	1
	胞外区部分	2167	251	2167	133
	胞外区	2632	272	2632	151
	细胞连接点	699	64	699	57
	大分子复合物	2793	225	2793	262
	膜封闭腔	2671	200	2671	265
	细胞器部分	5178	378	5178	454
	细胞器	8023	535	8023	683
	细胞膜	5981	365	5981	377
分子功能	金属伴侣活性	4	2	4	0
	抗氧化活性	43	9	43	5
	蛋白质标签	6	1	6	0
	电子载体活性	64	8	64	2
	结构分子活性	477	56	477	25
	化学排斥活性	12	1	12	2
	转运活性	752	56	752	41
	翻译调节器活性	28	2	28	2
	分子功能调节剂	772	49	772	68
	蛋白质结合转录因子活性	340	21	340	46

KEGG通路富集分析结果显示,与空白对照组比较,DOX组细胞中有500个DEGs,涉及核糖体、溶酶体、抗原加工和呈递、吞噬体以及p53信号通路等270条信号通路;与DOX组比较,IMP+DOX组细胞中有514个DEGs,涉及叉头框蛋白O(forkhead box protein O, FoxO)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)以及p53等271条信号通路。选取排前20名的信号通路绘制可视化气泡图,详见图4。由图4可知,在空白对照组和DOX组、DOX组和IMP+DOX组DEGs富集得到的前20条信号通路中,p53信号通路为二者共有,因此,本研究进一步对与p53信号通路相关的DEGs进行可视化分析。结果发现,空白对照组和DOX组、DOX组和IMP+DOX组之间存在共同的DEGs,分别为*COPI1*、*CCNE1*、*GADD45A*和*GADD45B*。

2.7 关键靶点的基因表达验证

采用荧光定量PCR实验验证组成型光形态建成蛋白1(constitutively photomorphogenic 1, COP1)、细胞周期蛋白E1(cyclin E1, CCNE1)、生长停滞和DNA损伤诱导蛋白45A(growth arrest and DNA damage inducible protein 45A, GADD45A)、GADD45B等关键靶点的基因表达情况。其引物序列及产物长度见表1,具体测定方法同“2.4”项下,数据分析方法同“2.2”项下。

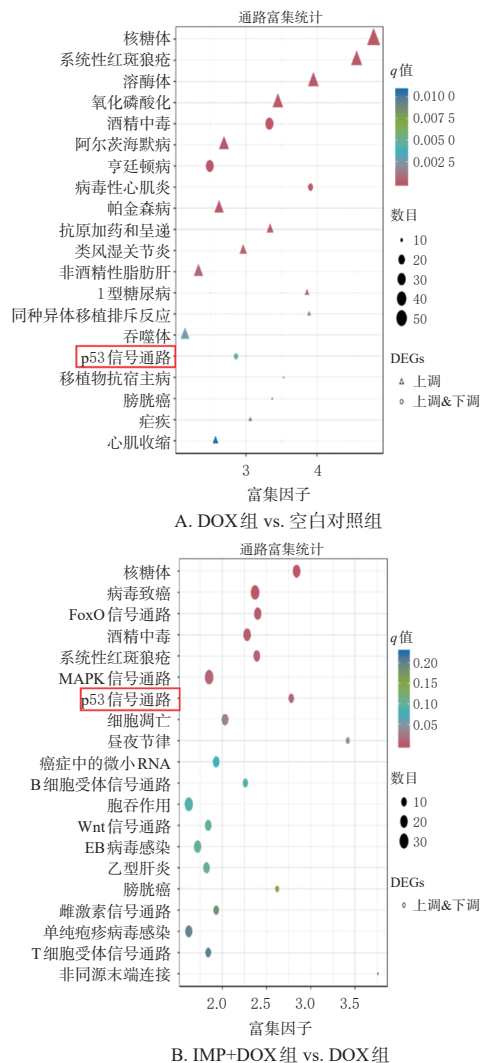


图4 各组间DEGs的KEGG通路富集分析的可视化气泡图

结果(表4)显示,与空白对照组比较,DOX组细胞中COP1的mRNA表达显著下调($P < 0.05$),CCNE1、GADD45B的mRNA表达显著上调($P < 0.05$);IMP+DOX组细胞中COP1、CCNE1、GADD45A、GADD45B的mRNA表达均显著下调($P < 0.05$);IMP组细胞中COP1的mRNA表达显著下调($P < 0.05$)。与DOX组比较,IMP+DOX组细胞中COP1的mRNA表达呈上调趋势,但CCNE1、GADD45A、GADD45B的mRNA表达均显著下调($P < 0.05$)。

表4 各组细胞中关键靶点的mRNA表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	COP1/GAPDH	CCNE1/GAPDH	GADD45A/GAPDH	GADD45B/GAPDH
空白对照组	1.000 ± 0.022	1.000 ± 0.027	1.000 ± 0.019	1.000 ± 0.024
DOX组	0.052 ± 0.003 ^a	1.292 ± 0.047 ^a	1.124 ± 0.074	1.478 ± 0.043 ^a
IMP+DOX组	0.108 ± 0.010 ^a	0.578 ± 0.017 ^{ab}	0.467 ± 0.013 ^{ab}	0.835 ± 0.026 ^{ab}
IMP组	0.818 ± 0.027 ^a	1.020 ± 0.029	0.970 ± 0.020	1.085 ± 0.039

a:与空白对照组比较, $P < 0.05$;b:与DOX组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

DOX属于蒽环类抗生素,是临床乳腺癌治疗的常用

一线化疗药物,但部分乳腺癌患者对蒽环类抗生素具有耐药性,限制了该类药物的临床使用。ATP结合盒转运蛋白(如MDR1和MRP1等)高表达是肿瘤细胞耐药的主要原因,其可外排抗肿瘤药物,减弱抗肿瘤药物的细胞毒作用^[11]。一些中药单体成分如香豆素类化合物、黄酮类化合物可通过作用于MDR1和MRP1来增强蒽环类药物的抗肿瘤作用^[12]。现有研究显示,IMP不论单独使用还是与蒽环类药物联用均可下调MDR1表达,抑制MDR1介导的药物外排,逆转肿瘤化疗耐药^[9]。本研究结果显示,IMP可增强乳腺癌MCF-7/DOX细胞对DOX的敏感性,且IMP与DOX联用可协同降低细胞中MDR1、MRP1的mRNA及其蛋白表达水平,逆转MCF-7/DOX细胞的DOX耐药。

研究表明,p53是一种重要的肿瘤抑制因子,其被激活后可调控细胞周期阻滞、DNA修复、细胞凋亡等多种生物学过程,从而抑制肿瘤细胞的生长或恶性转化^[13]。已有研究证实,IMP可通过调节p53信号通路和胱天蛋白酶级联反应来诱导肿瘤细胞凋亡^[14]。本研究选择p53信号通路进行DEGs的KEGG通路富集分析,结果发现,空白对照组和DOX组、DOX组和IMP+DOX组之间存在4种共同的DEGs,分别为COP1、CCNE1、GADD45A和GADD45B。COP1具有E3泛素连接酶活性,其在乳腺癌中呈双重作用——在雌激素受体 α 阳性乳腺癌患者中高表达,诱导细胞增殖;而在三阴性乳腺癌患者中低表达,导致他莫昔芬耐药^[15]。CCNE1是细胞周期进程中的重要调控因子。研究显示,CCNE1在人乳腺癌帕博西尼耐药细胞MCF7-palR和T47D-palR中高表达,沉默CCNE1基因可恢复乳腺癌耐药细胞对帕博西尼的敏感性^[16]。GADD45是DNA损伤修复的关键基因,GADD45表达水平的高低对不同类型肿瘤细胞的耐药性会产生不同的影响。有研究显示,上调伊马替尼耐药株人慢性髓系白血病细胞K562IR中GADD45A的表达,可增强其对伊马替尼的敏感性^[17];而高水平的GADD45B可增强前列腺癌细胞对化疗药物的敏感性^[18]。也有研究认为,下调GADD45A的表达可增强黑色素瘤细胞对顺铂的敏感性^[19],下调GADD45B的表达可提高人肺癌细胞PC-9对吉非替尼的敏感性^[20]。本研究结果显示,IMP可通过调节p53信号通路,作用于COP1、CCNE1、GADD45A及GADD45B靶点,发挥逆转乳腺癌DOX耐药作用。

综上所述,IMP联合DOX可增强MCF-7/DOX细胞对DOX的敏感性,抑制细胞增殖,协同降低细胞中MDR1、MRP1的mRNA及其蛋白表达水平。IMP改善MCF-7/DOX细胞DOX耐药的作用机制与调控p53信号通路中COP1、CCNE1、GADD45A及GADD45B的表达有关。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] AL-MALKY H S, AL HARTHI S E, OSMAN A M. Major obstacles to doxorubicin therapy: cardiotoxicity and drug resistance[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2020, 26(2): 434-444.
- [3] NASSER M I, ZHU S J, HU H Y, et al. Effects of imperatorin in the cardiovascular system and cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109401.
- [4] WU C P, MURAKAMI M, LI Y C, et al. Imperatorin restores chemosensitivity of multidrug-resistant cancer cells by antagonizing ABCG2-mediated drug transport[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(11): 1595.
- [5] LIANG X L, JI M M, LIAO Z G, et al. Chemosensitizing effect and mechanism of imperatorin on the anti-tumor activity of doxorubicin in tumor cells and transplantation tumor model[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2022, 26(3): 145-155.
- [6] MA M J, SHI Y H, LIU Z D, et al. N6-methyladenosine modified TGFB2 triggers lipid metabolism reprogramming to confer pancreatic ductal adenocarcinoma gemcitabine resistance[J]. *Oncogene*, 2024, 43(31): 2405-2420.
- [7] HU J J, XU C L, CHENG B H, et al. Imperatorin acts as a cisplatin sensitizer via downregulating Mcl-1 expression in HCC chemotherapy[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 331-339.
- [8] YOU C X, YANG Y, GAO B L. Imperatorin targets MCL-1 to sensitize CD133⁺ lung cancer cells to $\gamma\delta$ -T cell-mediated cytotoxicity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 235-244.
- [9] 汤喜兰, 李洪铭, 梁新丽, 等. 苦瓜素 I 抑制乳腺癌 MCF-7/DOX 细胞多柔比星耐药的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(13): 1293-1298.
- TANG X L, LI H M, LIANG X L, et al. Suppression of momordicin I on the resistance of breast cancer MCF-7/DOX cells to doxorubicin[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2021, 41(13): 1293-1298.
- [10] 谭睿陟, 钟霞, 王丽, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对小鼠脑出血及长链非编码 RNA 和靶基因的影响[J]. *中国药房*, 2022, 33(12): 1421-1429.
- TAN R Z, ZHONG X, WANG L, et al. Effects of Zhilong huoxue tongyu capsules on intracerebral hemorrhage, LncRNA and target genes in mice[J]. *China Pharm*, 2022, 33(12): 1421-1429.
- [11] ALKETBI L, AL-ALI A, TALAAT I M, et al. The role of ATP-binding cassette subfamily A in colorectal cancer progression and resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1344.
- [12] 吴杰, 叶娟, 曾智, 等. 中药单体对阿霉素增效减毒作用研究进展[J]. *中医药学报*, 2021, 49(9): 111-120.
- WU J, YE J, ZENG Z, et al. Research progress on synergy and attenuation of adriamycin by Chinese medicine monomer[J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2021, 49(9): 111-120.
- [13] HUANG J. Current developments of targeting the p53 signaling pathway for cancer treatment[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 220: 107720.
- [14] ZHENG Y M, LU A X, SHEN J Z, et al. Imperatorin exhibits anticancer activities in human colon cancer cells via the caspase cascade[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4): 1995-2002.
- [15] TANG S C, LION Q, PEULEN O, et al. The E3 ligase COP1 promotes ER α signaling and suppresses EMT in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2022, 41(2): 173-190.
- [16] CAI Z J, WANG J R, LI Y D, et al. Overexpressed Cyclin D1 and CDK4 proteins are responsible for the resistance to CDK4/6 inhibitor in breast cancer that can be reversed by PI3K/mTOR inhibitors[J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(1): 94-109.
- [17] 刘雪妮, 王超, 程艳红, 等. 慢病毒载体上调 GADD45 α 增强伊马替尼耐药株 K562IR 细胞的药物敏感性[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(12): 1920-1924.
- LIU X N, WANG C, CHENG Y H, et al. Upregulation of GADD45 α by lentivirus vector enhances the drug-sensitivity of imatinib-resistant K562IR cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(12): 1920-1924.
- [18] WANG Q, WU W H, GAO Z, et al. GADD45B is a potential diagnostic and therapeutic target gene in chemotherapy-resistant prostate cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 716501.
- [19] LIU J, JIANG G Q, MAO P, et al. Down-regulation of GADD45A enhances chemosensitivity in melanoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4111.
- [20] 胡皓, 阙凯琳, 彭昊, 等. 下调生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45 β 表达对 PC9 肺腺癌细胞的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43(11): 1209-1215.
- HU H, QUE K L, PENG H, et al. Effect of down-regulation of growth arrest and DNA damage inducible protein 45 β on PC9 lung adenocarcinoma cells[J]. *J Cent South Univ Med Sci*, 2018, 43(11): 1209-1215.

(收稿日期: 2024-08-26 修回日期: 2025-02-17)

(编辑: 林 静)