

基于蛋白质组学探讨白藜芦醇逆转乳腺癌他莫昔芬耐药的作用及机制

李娟, 沈丽洁*

常州市妇幼保健院 药学部, 江苏 常州 213003

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇逆转乳腺癌他莫昔芬 (TAM) 耐药的作用及分子机制。 **方法** 采用 CCK-8 法检测 TAM 作用 24、48、72 h 对 MCF-7 亲本细胞及 MCF-7/TAM 耐药细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}), 鉴定耐药模型; 以白藜芦醇 (10、20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 联合 TAM 干预 MCF-7/TAM 细胞, 检测细胞增殖、凋亡与细胞周期; 利用数据非依赖性采集 (DIA) 定量蛋白质组学筛选差异蛋白, 进行基因本体 (GO) 功能、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路及蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 分析; 采用 Western blotting 验证 PI3K/Akt 通路关键蛋白表达。 **结果** MCF-7/TAM 细胞各时间点 IC_{50} 显著高于亲本细胞 ($P < 0.05$), 成功构建稳定耐药模型。与单给 TAM 组比较, 白藜芦醇联合 TAM 可显著抑制 MCF-7/TAM 细胞增殖、提高总凋亡率并将细胞阻滞于 G_1 期 (均 $P < 0.05$)。蛋白质组学共鉴定到 491 个显著差异蛋白 (上调 239 个、下调 252 个), 主要富集于细胞周期、细胞凋亡及药物转运过程, 涉及原纤维蛋白 1 (Fbn1)、髓系细胞核分化抗原 (Mnda)、高迁移率核小体结合域 2 (Hmgn2)、ATP 酶 9A (Atp9a) 等关键蛋白。GO 分析显示, 差异蛋白主要富集于分子功能调节因子活性、胞内解剖结构及免疫系统过程。KEGG 与 PPI 分析提示, PI3K/Akt 信号通路为核心通路。Western blotting 证实, 与单给 TAM 组比较, 联合给药可显著下调 p-PI3K、p-Akt 表达水平 ($P < 0.05$)。 **结论** 白藜芦醇可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 调控细胞周期、凋亡与药物转运相关蛋白表达, 有效逆转 MCF-7/TAM 细胞对 TAM 的耐药性。

关键词: 白藜芦醇; 乳腺肿瘤; 他莫昔芬; 耐药; 蛋白质组学

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)09-3066-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.008

Investigation into effect and mechanism of resveratrol in reversing tamoxifen resistance in breast cancer using DIA proteomics

LI Juan, SHEN Lijie

Department of Pharmacy, Changzhou Maternity and Child Health Hospital, Changzhou 213003, China

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of resveratrol in reversing tamoxifen resistance in breast cancer. **Methods** The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of TAM on MCF-7 parental cells and MCF-7/TAM resistant cells was determined at 24, 48, and 72 hours using the CCK-8 assay to establish the resistance model. Resveratrol (10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was combined with TAM to treat MCF-7/TAM cells, and cell proliferation, apoptosis, and cell cycle were assessed. Differential proteins were identified via DIA-based quantitative proteomics, followed by gene ontology (GO) functional analysis, KEGG pathway analysis, and protein-protein interaction (PPI) network analysis. Western blotting was used to validate the expression of key proteins in the PI3K/Akt signaling pathway. **Results** The IC_{50} values of MCF-7/TAM cells at all time points were significantly higher than those of parental cells ($P < 0.05$), confirming successful establishment of a stable resistant model. Compared with TAM alone, the combination of resveratrol and TAM significantly suppressed MCF-7/TAM cell proliferation, increased total apoptosis rate, and arrested cells in the G_1 phase (all $P < 0.05$). Proteomic analysis identified 491 differentially expressed proteins (239 upregulated, 252 downregulated), primarily enriched in cell cycle regulation, apoptosis, and drug transport processes, including key proteins such as fibrillin 1 (Fbn1), myeloid nuclear differentiation antigen (Mnda), high-mobility group nucleosome-binding domain 2 (Hmgn2), and ATPase 9A (Atp9a). GO analysis revealed that differentially expressed proteins were mainly involved in molecular function regulation, intracellular anatomical structure, and immune system processes. KEGG and PPI analyses indicated that the PI3K/Akt signaling pathway was the

收稿日期: 2026-05-09

基金项目: 常州市晋陵药理学发展基金项目 (应用基础研究指导性) (2025YXHCG12)

作者简介: 李娟, 女, 硕士, 初级药师, 研究方向: 疾病标志物的发现与治疗, 药学。E-mail: 927624485@qq.com

*通信作者: 沈丽洁, 女, 本科, 副主任药师, 研究方向: 疾病标志物的发现与治疗, 药学。E-mail: 2497869093@qq.com

central pathway. Western blotting confirmed that compared with TAM treatment alone, the combination therapy significantly reduced the expression levels of p-PI3K and p-Akt ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can effectively reverse tamoxifen resistance in MCF-7/TAM cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway and regulating the expression of proteins related to cell cycle, apoptosis and drug transport.

Key words: resveratrol; breast neoplasms; tamoxifen; drug resistance; proteomics

乳腺癌是全球女性发病率与死亡率均居首位的恶性肿瘤,激素受体阳性乳腺癌占比超过 70%,内分泌治疗是其贯穿全程的核心治疗策略^[1]。他莫昔芬(TAM)作为经典选择性雌激素受体调节剂,凭借确切疗效与良好安全性,在绝经前及绝经后患者中广泛应用^[2]。然而,临床中原发性或继发性 TAM 耐药发生率高,是导致治疗失败、肿瘤复发转移及患者预后不良的关键瓶颈^[3]。当前耐药机制研究多集中于单一信号通路或个别靶点,难以全面解析耐药网络,因此亟需从全景式、高通量层面系统揭示耐药调控规律,并寻找可有效逆转耐药的天然活性物质。

白藜芦醇是一类广泛存在于虎杖、葡萄、桑葚等植物中的天然多酚类活性成分,已被证实具有抗炎、抗氧化、抑制增殖、诱导凋亡、调控自噬与肿瘤干性等多重抗肿瘤效应^[4]。近年来多项研究提示^[5-6],白藜芦醇可增强乳腺癌细胞对化疗及内分泌药物的敏感性,具备耐药逆转潜力。但其调控乳腺癌 TAM 耐药的整体分子网络、关键效应蛋白及核心通路尚未被系统阐明,尤其缺乏从蛋白质组层面的全景式解析。

蛋白质组学技术是后基因组时代生命科学研究的核心手段之一,可在整体水平上高通量、无偏倚地检测药物干预前后细胞内全部蛋白质的表达变化,精准筛选差异表达蛋白,并通过生物信息学分析富集关键信号通路、蛋白互作网络及生物学过程,能够突破传统“单基因-单蛋白-单通路”的研究局限,为揭示药物作用靶点、阐明药理机制、挖掘生物标志物提供系统性证据^[7-8]。非标记定量蛋白质组学具有样本用量少、重复性好、定量准确、覆盖度高等优势,已成为肿瘤耐药机制与天然药物药理研究的主流技术。

本研究以乳腺癌 TAM 耐药细胞为实验模型,采用非标记定量蛋白质组学结合生物信息学分析,全景式筛选白藜芦醇干预后的差异表达蛋白与核心信号通路,联合分子生物学实验进行验证,系统揭示白藜芦醇逆转乳腺癌 TAM 耐药的调控机制,

为临床克服内分泌耐药、开发天然来源抗肿瘤增敏剂提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

乳腺癌 MCF-7 细胞株由中国科学院细胞库(上海)提供。

1.2 药品与试剂

白藜芦醇(质量分数 $\geq 98\%$,批号 38963-95-0)购自上海源叶生物科技有限公司;TAM(质量分数 $\geq 98\%$,货号 10540-29-1)购自上海卡努生物科技有限公司;胎牛血清(货号 164210-500)、RPMI 1640 培养基(货号 PM150110)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;MTT 试剂盒(批号 E606334)购自广州赛维尔生物科技有限公司;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号 KGA107)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;BCA 试剂盒(批号 E112-01)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;RIPA 裂解液(批号 20115E)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;蛋白激酶 B(Akt)抗体(Proteintech,货号 10176-2-AP)、p-Akt 抗体(北京鼎国昌盛公司,货号 AF324 1)、磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)抗体(Proteintech 公司,货号 20584-1-AP)、p-PI3K 抗体(西宝生物科技,货号 BS4605)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉三鹰生物有限公司,货号 66009-1-Ig)。

1.3 实验仪器

Varioskan LUX 多功能酶标仪、Attune NxT 流式细胞仪、Vanquish Neo UHPLC 系统(货号 VN-S10-A-01)、Orbitrap Astral 质谱仪(货号 BRE725600)及 iBright CL750 成像系统(货号 A44116)均购自美国赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 构建乳腺癌 MCF-7 的 TAM 耐药株(MCF-7/TAM)

采用浓度梯度递增持续诱导法构建 MCF-7/TAM^[9]。取对数生长期 MCF-7 亲本细胞,以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板中,贴壁培养 24 h

后, 使用含低浓度 TAM 的完全培养基进行培养, 初始药物质量浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 待细胞适应并恢复稳定增殖后, 逐步提高药物质量浓度 (依次为 2、5、10、15、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 每个浓度梯度驯化培养 2~3 代, 每 2~3 天更换 1 次含相应浓度 TAM 的新鲜培养基, 持续诱导 6 个月以上。诱导期间每 2 周采用 CCK-8 法检测细胞对 TAM 的敏感性, 以半数抑制浓度 (IC_{50}) 为评价指标, 最终获得可在 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TAM 培养基中稳定生长、耐药表型稳定的耐药细胞株, 命名为 MCF-7/TAM。所有耐药细胞株在后续实验前均以无 TAM 培养基同步化培养 48 h, 以消除 TAM 对后续给药处理的即时干扰。

2.2 CCK-8 法检测细胞耐药性

取亲本 MCF-7 及 MCF-7/TAM 耐药细胞, 以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL 培养基, 边缘孔加入无菌 PBS 以防止边缘效应, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养 24 h 后, 给予 2、5、10、15、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TAM 干预 24、48、72 h, 干预结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续孵育 2 h, 每个组重复 3 个孔, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率, 并拟合得到 IC_{50} , 鉴定耐药模型。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞凋亡与细胞周期检测

取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养 24 h 后, 分为 5 组: 对照组 (含等体积 DMSO 溶剂的完全培养基)、TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 白藜芦醇 (10 、 20 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。各组分别给予相应药物处理 48 h 后, CCK-8 法检测细胞存活率, 并计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}}$$

2.4 细胞凋亡与细胞周期检测

细胞接种及给药同“2.3”项, 各组分别给予相应药物处理 48 h 后, 收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 按试剂盒说明书操作, 室温避光染色 15 min 后上流式细胞仪检测细胞总凋亡率; 采用 PI 单染法检测细胞周期分布, 收集细胞后用 70% 乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, PI 染色 30 min 后上流式细胞仪检测, ModFit 软件拟合分析各组细胞周期阻滞情况。每组设 3 个复孔, 独立重复 3 次。

2.5 DIA 定量蛋白质组学分析

取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养 24 h 后, 分为 2 组: TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 白藜芦醇 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。各组分别给予相应药物处理 48 h 后, 收集细胞, 每例样品加入适量 SDT 裂解液 (4% SDS、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.6) 提取蛋白, BCA 法定量。各取 15 μg 蛋白, 加入 $5\times$ 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 经 4%~20% 预制梯度胶、恒压 180 V 电泳 45 min, R-250 染色。取各样品适量蛋白混合为 Pool 样品作质控。所有样品及 Pool 样品采用 FASP 法胰蛋白酶酶解, 酶解肽段经 C_{18} 脱盐、冻干, 用 40 μL 0.1% 甲酸复溶, 280 nm 波长下测肽段浓度。每样品酶解肽段中加入 iRT 标准肽段, 进行 Astral 高分辨质谱 DIA 检测。

DIA 分析采用 Vanquish Neo 系统 (赛默飞) 进行纳升色谱分离, 分离后样品经 Astral 质谱仪 (Thermo Scientific) 行 DIA 质谱分析。参数: 正离子模式, 母离子扫描范围 380~980 m/z , 一级分辨率 240 000 at 200 m/z , Normalized AGC Target 500%, Maximum IT 5 ms。MS² 采用 DIA 模式, 299 个扫描窗口, 隔离窗口 2 m/z , HCD 碰撞能 25 eV, Normalized AGC Target 500%, Maximum IT 3 ms。

提取各组细胞总蛋白, 酶解后进行 DIA 定量蛋白质组学检测, 数据经 DIA NN 软件分析, 以 $\text{FC} > 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为标准筛选显著差异表达蛋白。对差异蛋白采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (GO) 功能注释 [分子功能 (MF)、细胞组分 (CC)、生物过程 (BP)] 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集, 利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析, PPI 网络结果通过 Cytoscape 软件 (<https://cytoscape.org/>) 进行可视化展示与核心模块分析, 从而挖掘核心通路与关键靶蛋白。

2.6 Western blotting 检测通路蛋白表达

取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中贴壁培养 24 h 后, 分为 5 组: 对照组 (含等体积 DMSO 溶剂的完全培养基)、TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、TAM ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 白藜芦醇 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。各组分别给予相应药物处

理 48 h, 处理结束后提取细胞总蛋白, 使用 RIPA 裂解液 (含 PMSF 蛋白酶抑制剂) 于冰上裂解 30 min, 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, BCA 法定量后进行 SDS-PAGE 电泳 (每孔上样 30 μg 总蛋白)、转膜 (PVDF 膜, 300 mA 恒流转膜 90 min)、5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h, 加入一抗 (p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 均以 1:1 000 稀释; GAPDH 为内参, 1:5 000 稀释) 4 ℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 化学发光显影, Image J 定量灰度值, 以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示相对表达量, 比较各组的蛋白表达水平。每个实验独立重复 3 次。

2.7 统计学方法

所有实验均独立重复 3 次, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 MCF-7/TAM 耐药细胞模型验证

结果 (表 1) 表明, TAM 干预后, MCF-7 亲本细胞在 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 (4.47±0.78)、(3.38±0.52)、(3.11±0.33) μg·mL⁻¹; 而 MCF-7/TAM 耐药细胞对应时间点的 IC₅₀ 分别高达 (22.18±2.14)、(17.54±1.87)、(11.47±1.43) μg·mL⁻¹。结

表 1 TAM 对 MCF-7 细胞和 MCF-7/TAM 耐药细胞的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)
Table 1 IC₅₀ values of TAM against MCF-7 cells and MCF-7/TAM-resistant cells ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

组别	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
MCF-7 细胞	4.47±0.78	3.38±0.52	3.11±0.33
MCF-7/TAM 耐药细胞	22.18±2.14***	17.54±1.87***	11.47±1.43***

与 MCF-7 细胞比较: ****P*<0.001。

****P*<0.001 vs MCF-7 cell.

果证实, MCF-7/TAM 细胞已形成稳定的 TAM 耐药表型, 对药物敏感性显著下降 (*P*<0.001)。

3.2 白藜芦醇逆转 MCF-7/TAM 耐药细胞的功能验证

3.2.1 联合用药对 MCF-7/TAM 耐药细胞增殖能力的影响 有研究表明^[10], 白藜芦醇在低于 50 μmol·L⁻¹ 浓度范围内对 MCF-7 细胞活力无显著抑制作用, 安全性良好; 当浓度高于 100 μmol·L⁻¹ 时, 白藜芦醇开始呈现一定增殖抑制作用; 当浓度高于 200 μmol·L⁻¹ 可明显降低细胞存活率, 不宜作为耐药逆转的安全干预浓度。本研究选取 10、20、50 μmol·L⁻¹ 白藜芦醇作为实验浓度。

结果 (表 2) 显示, 白藜芦醇 (20、50 μmol·L⁻¹) +

TAM 组细胞存活率显著低于 TAM 组, 增殖抑制率显著高于 TAM 组, 差异具有统计学意义 (*P*<0.05), 且呈剂量相关性; TAM 对 MCF-7/TAM 耐药细胞的增殖抑制能力虽高于对照组, 但抑制效果较弱, 差异无统计学意义 (*P*>0.05)。表明随着白藜芦醇浓度升高, 可显著增强 TAM 对 MCF-7/TAM 耐药细胞的增殖抑制作用, 逆转其耐药性。

3.2.2 联合用药对 MCF-7/TAM 耐药细胞凋亡及周期的影响 结果显示 (图 1、表 3), 与 TAM 组比较, TAM+白藜芦醇组的 MCF-7/TAM 细胞总凋亡率及 G₁ 期细胞占比明显增加, 且呈剂量相关性, 差异具有统计学意义 (*P*<0.05)。

表 2 联合用药对 MCF-7/TAM 耐药细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)
Table 2 Effect of combination therapy on proliferative capacity of MCF-7/TAM-resistant cells ($\bar{x} \pm s$, *n*=3)

组别	浓度	细胞存活率/%	增殖抑制率/%
对照	—	93.62±1.35	6.38±1.35
TAM	10 μg·mL ⁻¹	76.35±2.18	23.65±2.18
TAM+白藜芦醇	10 μg·mL ⁻¹ +10 μmol·L ⁻¹	61.09±2.63	39.91±2.63
	10 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	50.37±1.88*	49.63±1.88*
	10 μg·mL ⁻¹ +50 μmol·L ⁻¹	42.18±3.02*	57.82±3.02*

与 TAM 组比较: **P*<0.05。

**P*<0.05 vs TAM group.

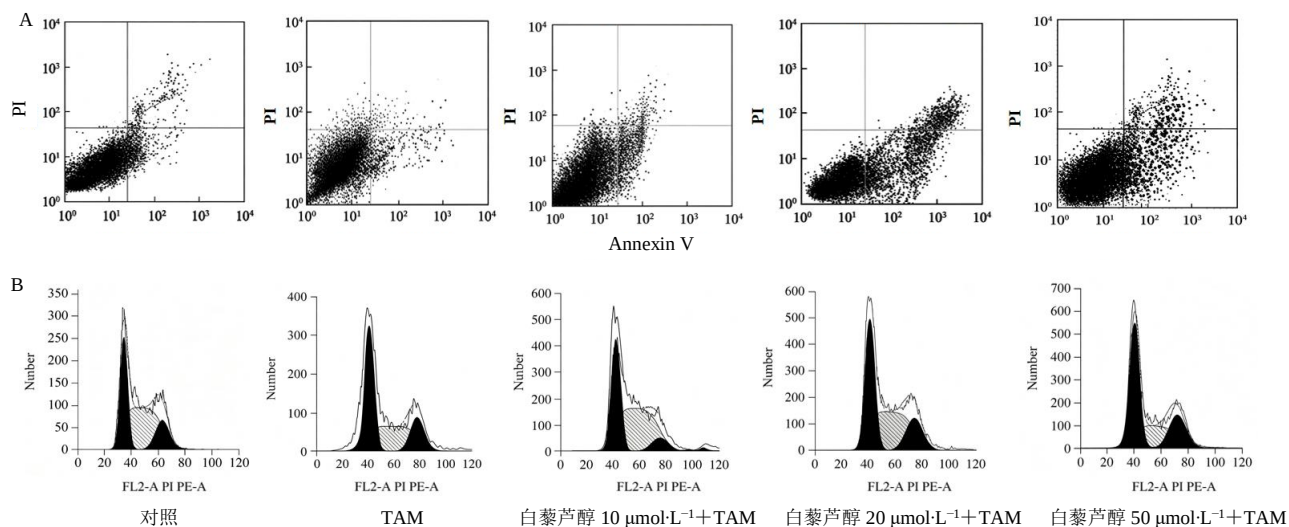


图 1 流式细胞术检测白藜芦醇联合 TAM 对 MCF-7/TAM 细胞凋亡 (A) 及细胞周期分布 (B) 的影响
Fig. 1 Effects of resveratrol combined with tamoxifen on apoptosis (A) and cell cycle distribution (B) in MCF-7/TAM cells detected by flow cytometry

表 3 联合用药对 MCF-7/TAM 耐药细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of combination therapy on apoptosis in MCF-7/TAM-resistant cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	总凋亡率/%	G ₁ /%
对照	—	9.32 ± 1.83	58.92 ± 5.45
TAM	10 μg·mL ⁻¹	10.39 ± 2.03	60.34 ± 5.98
TAM+白藜芦醇	10 μg·mL ⁻¹ +10 μmol·L ⁻¹	12.71 ± 3.44*	63.12 ± 6.02*
	10 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	15.38 ± 3.19*	67.48 ± 5.76*
	10 μg·mL ⁻¹ +50 μmol·L ⁻¹	18.39 ± 3.32*	71.29 ± 5.12*

与 TAM 组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.01$ vs TAM group.

3.3 白藜芦醇逆转 MCF-7/TAM 耐药细胞的机制研究

3.3.1 表达差异分析 为了进一步探究白藜芦醇逆转 MCF-7/TAM 耐药细胞的作用机制,通过 DIA 蛋白质组学技术对 TAM 组与 TAM (10 μg·mL⁻¹) + 白藜芦醇 (50 μmol·L⁻¹) 组进行定量比较,共鉴定到 491 个显著差异蛋白,其中上调蛋白 239 种,下调蛋白 252 种,结果见图 2。针对包含 T -test P 值的比较组绘制火山图,结果如图 3 所示,其中,差异蛋白主要涉及细胞周期调控、细胞凋亡及药物转运三大核心生物学过程:在细胞周期方面,原纤维蛋白 1 (Fbn1) 表达改变可调控细胞周期进程,阻滞耐药细胞增殖;在细胞凋亡方面,髓系细胞核分化抗原 (Mnda)、高迁移率基团核小体结合域 2 (Hmgn2) 表达异常可调控凋亡相关信号通路,促进耐药细胞凋亡;在药物转运方面,ATP 酶 9A (Atp9a) 作为 ATP 结合盒转运蛋白相关家族成员,其表达改变可

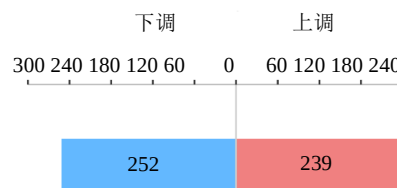


图 2 蛋白质定量差异结果统计图
Fig. 2 Statistical chart showing the results of protein quantification analysis

影响 TAM 在细胞内的蓄积与代谢,从而增强药物作用效果。

3.3.2 GO 富集分析 GO 功能分类如图 4 所示, MF 主要富集到分子功能调节因子活性 (molecular function regulator acivity) 蛋白 95 种; CC 主要富集到细胞内解剖结构 (cellular anatomical entity) 蛋白 641 种; BP 主要富集生物调控 (biological regulation) 蛋白 430 种。

如 GO 富集分析柱状图 (图 5) 所示,在 MF

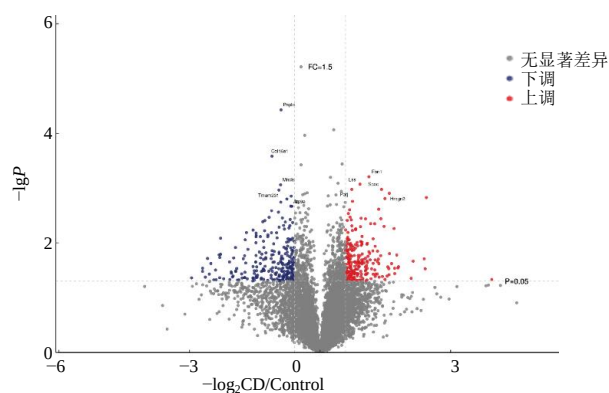


图 3 火山图

Fig. 3 Volcano plot

分析中, 结果注释主要富集在分子功能调节因子活性; 在 CC 分析中, 结果注释主要富集在胞内解剖结构; 在 BP 分析中, 结果注释主要富集在免疫系统过程 (immune system process)。

3.3.3 差异蛋白的 KEGG 通路分析 KEGG 通路分类如图 6 所示, 主要富集到癌症中的信号通路 (pathways in cancer)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway) 等。而 PI3K-Akt 信号通路尤为关键, 白藜芦醇可通过抑制 PI3K-Akt 信号通路逆转 MCF-7/TAM 细胞对 TAM 的耐药性。该通路异常激活会促进耐药细胞增殖、抑制凋亡并增强药物外排; 白藜芦醇可能通过降低 PI3K 活性或 Akt 磷酸化水平,

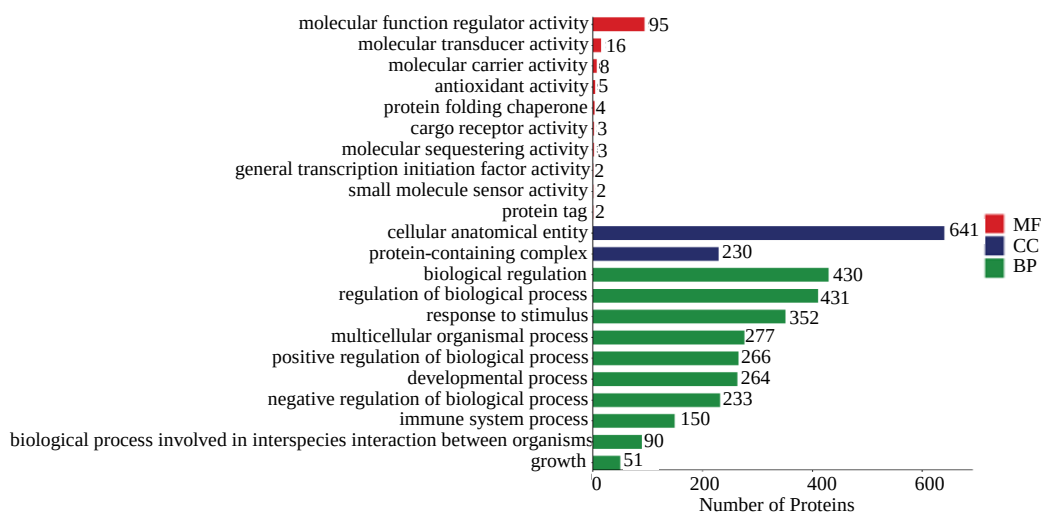


图 4 蛋白 GO 功能分类

Fig. 4 GO functional classification of proteins

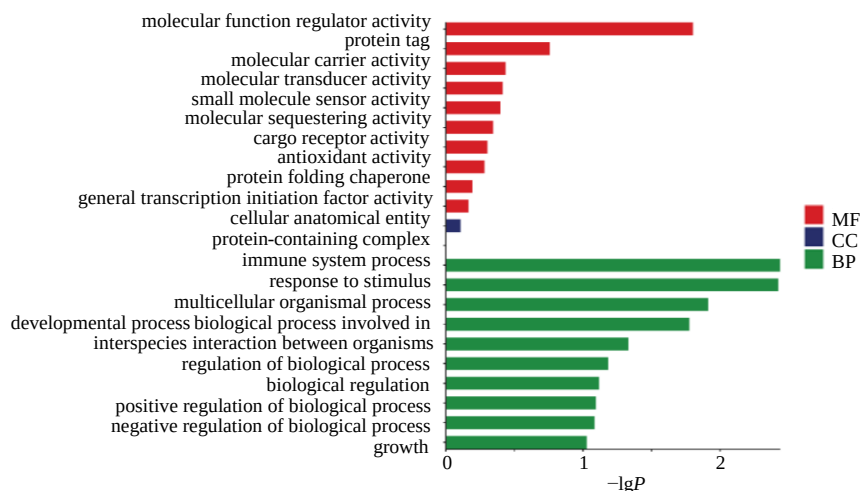


图 5 MF、CC、BP 差异蛋白的 GO 富集分析柱状图

Fig. 5 Bar chart showing GO enrichment analysis of differentially expressed proteins in MF, CC and BP

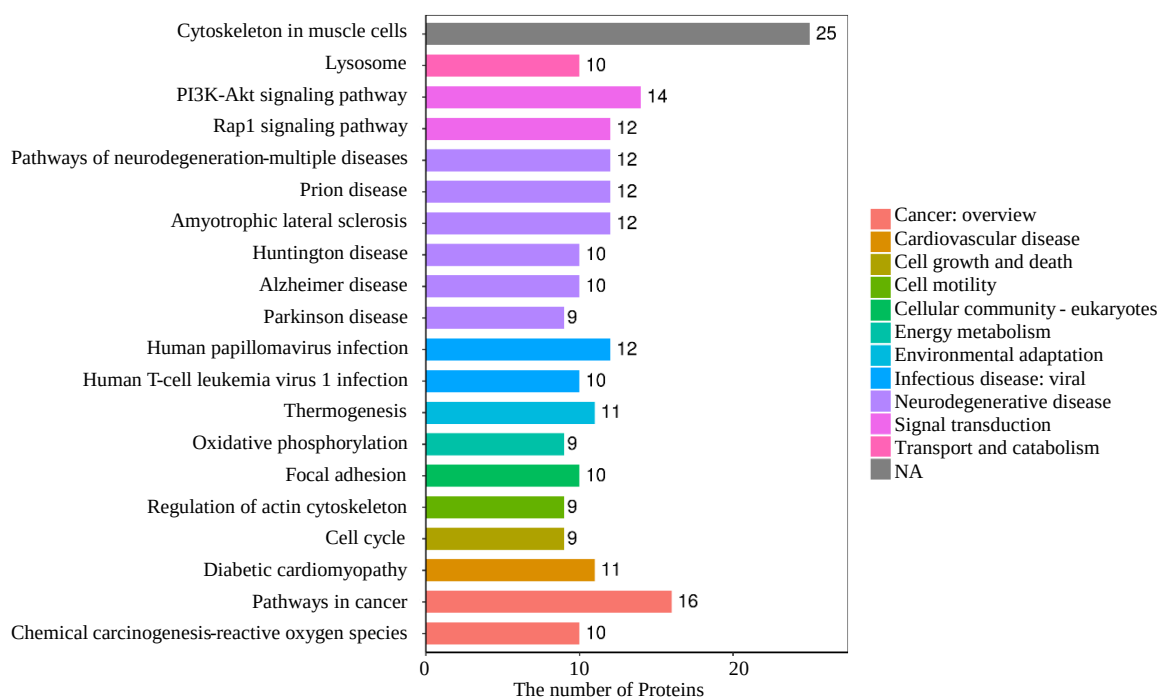


图 6 显著差异蛋白质的 KEGG 通路注释及归属柱状图

Fig. 6 Bar chart showing the KEGG pathway annotations and classifications of significantly differentially expressed proteins

阻断上述过程。GO 富集中的细胞周期、凋亡、物质转运等条目与 PI3K-Akt 靶点高度重合，进一步支持该调控模式。白藜芦醇可能以 PI3K-Akt 通路为核心，多途径增强 TAM 治疗效果。

3.3.4 差异蛋白 PPI 互作网络分析 借助 STRING 数据库对差异蛋白进行分析，构建了 PPI 互作网络，如图 7、8 所示，以深入探究其相互作用机制。结果显示，PI3K-Akt 信号通路在其中扮演关键角色，因此推测白藜芦醇可能通过调控该通路逆转 TAM 耐药。

3.3.5 联合给药对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blotting 结果显示，与 MCF-7 细胞相比，TAM 作用下 MCF-7/TAM 中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)；与 TAM 组比较，TAM+白藜芦醇明显下调了 p-PI3K、p-Akt 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。结果见图 9、表 4。

4 讨论

TAM 作为雌激素受体阳性乳腺癌内分泌治疗的一线药物，其耐药性的产生严重制约了临床疗效^[1]。逆转耐药已成为改善患者预后的关键策略之一。本研究以白藜芦醇为干预药物，通过建立稳定的 MCF-7/TAM 耐药细胞模型，综合运用 CCK-8、流

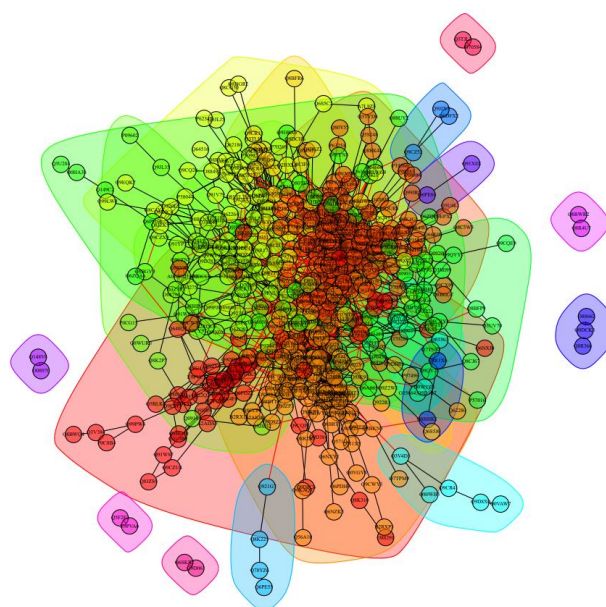


图 7 差异 PPI 网络分析结果

Fig. 7 Results of differential PPI network analysis

式细胞术、DIA 定量蛋白质组学及 Western blotting 等技术，系统探讨了白藜芦醇逆转 TAM 耐药的作用及其分子机制。结果证实，白藜芦醇联合 TAM 可显著抑制耐药细胞增殖、诱导凋亡并引起 G₁ 期阻滞，有效恢复细胞对 TAM 的敏感性。蛋白质组学

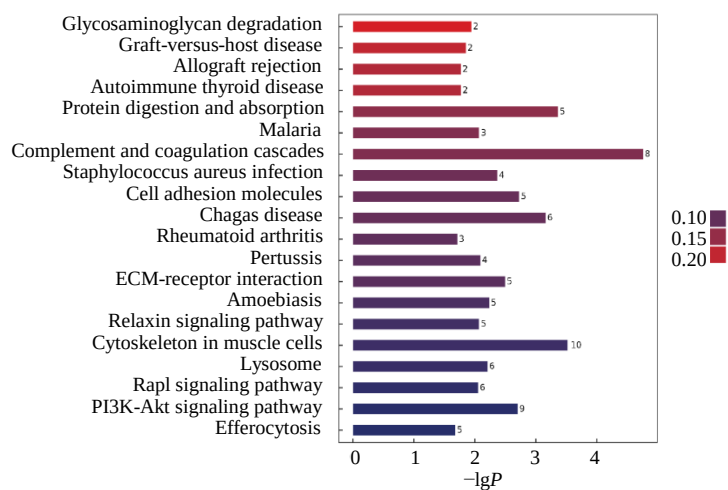


图 8 显著差异蛋白质的通路注释统计图 (Top 20)

Fig. 8 Statistical chart of pathway annotations for significantly differentially expressed proteins (Top 20)

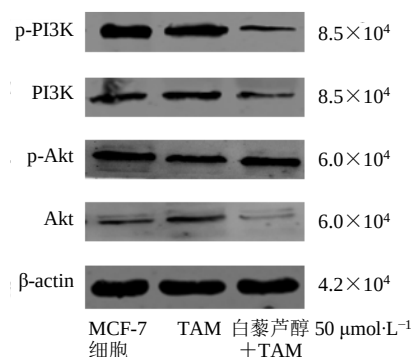


图 9 Western blotting 检测联合给药对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Western blotting analysis of effects of combination therapy on expression of proteins associated with PI3K/Akt signaling pathway

筛选出的 491 个差异蛋白及相关功能富集分析, 为揭示其逆转机制提供了全景式分子证据。

本研究发现, PI3K-Akt 信号通路在白藜芦醇逆转耐药过程中处于核心调控地位。Western blotting 验证结果表明, 联合给药后 p-PI3K、p-Akt 水平显著下调, 提示白藜芦醇可有效阻断该通路的异常激活。PI3K-Akt 信号通路是调控细胞存活、增殖、凋亡及药物外排的关键枢纽, 其在多种肿瘤耐药细胞中常呈持续性激活状态^[12]。白藜芦醇作为天然多酚类化合物, 此前已被报道可通过抑制 PI3K-Akt 通路增强化疗敏感性^[13], 本研究进一步证实了该机制在 TAM 耐药中的适用性。值得注意的是, KEGG 与 PPI 网络分析均将 PI3K-Akt 通路列为核心节点, 且 GO 功能富集分析中“分子功能调节因子活性”“胞

表 4 联合给药对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effects of combination therapy on expression of proteins associated with PI3K/Akt signaling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	PI3K/β-actin	p-PI3K/β-actin	Akt/β-actin	p-Akt/β-actin
MCF-7 细胞	—	1.15 ± 0.11	0.84 ± 0.22	1.02 ± 0.15	0.94 ± 0.18
TAM	10 μg·mL ⁻¹	1.13 ± 0.09	1.31 ± 0.28 [#]	1.06 ± 0.17	1.24 ± 0.24 [#]
TAM + 白藜芦醇	10 μg·mL ⁻¹ + 50 μmol·L ⁻¹	0.78 ± 0.12 [*]	0.92 ± 0.19 [*]	1.04 ± 0.12	0.66 ± 0.13 [*]

与 MCF-7 细胞组比较: [#] $P < 0.05$; 与 TAM 组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。

[#] $P < 0.05$ vs MCF-7 cell group; ^{*} $P < 0.01$ vs TAM group.

内解剖结构”及“免疫系统过程”等条目均与该通路下游效应高度契合, 提示白藜芦醇的调控作用可能涉及信号转导、细胞器区室化及免疫微环境重塑等多个生物学层面。

在具体效应蛋白层面, 本研究筛选并验证了多个与耐药逆转密切相关的差异蛋白, 包括 Fbn1、

Mnda、Hmgn2 及 Atp9a。其中, Atp9a 属于 P 型 ATP 酶家族, 参与药物跨膜转运过程。PI3K-Akt 通路受抑后, Atp9a 表达下调可减少 TAM 的外排, 增加胞内药物蓄积, 从而增强杀伤效应^[14]。Mnda 和 Hmgn2 则与细胞凋亡调控相关: Mnda 可介导干扰素诱导的凋亡信号^[15], Hmgn2 参与染色质重塑及凋亡相关

基因转录^[16]；白藜芦醇通过抑制 PI3K-Akt 信号，可能解除上述蛋白所受的负调控，促进耐药细胞进入凋亡程序。Fbn1 作为细胞外基质蛋白，参与肿瘤微环境的结构重塑与存活信号传导^[17]。本研究中 Fbn1 的差异表达提示白藜芦醇还可通过改善基质微环境，削弱耐药细胞的生存优势，协同增强 TAM 的抑增殖效果。上述蛋白的协同变化，从“外排减少-凋亡促进-微环境逆转”3 个维度，共同解释了白藜芦醇逆转耐药的多途径调控特征。

值得注意的是，GO 分析中“免疫系统过程”的显著富集，揭示了白藜芦醇可能同时影响耐药细胞与微环境之间的免疫对话。已有研究表明^[18]，PI3K-Akt 通路可调节免疫检查点分子及炎症因子的表达，参与免疫逃逸。尽管本研究未直接检测免疫相关指标，但该富集结果提示，白藜芦醇的逆转效应或许还涉及肿瘤相关巨噬细胞极化、T 细胞浸润等宿主免疫应答，这将是后续研究的重要方向。

本研究存在一定局限性：首先，差异蛋白的生物学功能主要基于生物信息学预测和文献支持，尚需通过基因敲减/过表达及回补实验进一步验证各蛋白在耐药逆转中的直接作用；其次，PI3K-Akt 通路上下游节点众多，白藜芦醇是否直接结合 PI3K 激酶结构域，或通过其他受体（如 PTEN、mTOR 等）间接调控，仍需分子对接及表面等离子体共振等实验阐明；最后，体内动物模型及临床样本的验证将有助于评估白藜芦醇的转化潜力。

本研究基于蛋白质组学与功能验证，首次系统揭示了白藜芦醇通过抑制 PI3K-Akt 信号通路，从细胞增殖、凋亡、药物外排及微环境重塑等多维度逆转乳腺癌 TAM 耐药的新机制。该发现为白藜芦醇作为内分泌治疗辅助药物提供了实验依据，也为克服 TAM 耐药提供了潜在的联合治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Khan M M, Yalamarty S S K, Rajmalani B A, et al. Recent strategies to overcome breast cancer resistance [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 197: 104351.
- [2] Zhuang T, Zhang S Q, Liu D Y, et al. USP36 promotes tumorigenesis and tamoxifen resistance in breast cancer by deubiquitinating and stabilizing ER α [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 249.
- [3] 孙燕, 刘竞阳, 罗飘, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨槲皮素对乳腺癌 MCF-7 他莫昔芬耐药细胞的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2025, 41(11): 2199-2200.
- [4] Sun Y, Liu J Y, Luo P, et al. Quercetin inhibits breast cancer MCF-7 cells to tamoxifen via PI3K/AKT signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2025, 41(11): 2199-2200.
- [5] Ren B X, Kwah M X, Liu C L, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives [J]. Cancer Lett, 2021, 515: 63-72.
- [6] Rezakhani L, Salmani S, Eliyasi Dashtaki M, et al. Resveratrol: Targeting cancer stem cells and ncRNAs to overcome cancer drug resistance [J]. Curr Mol Med, 2024, 24(8): 951-961.
- [7] 王丽, 庞静, 沈慧, 等. 白藜芦醇通过 EGFR/AKT/mTOR 通路改善结直肠癌细胞伊立替康化疗耐药性 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(12): 2280-2287.
- [8] Wang L, Pang J, Shen H, et al. Resveratrol ameliorates irinotecan chemoresistance of colorectal cancer cells by down-regulating EGFR/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(12): 2280-2287.
- [9] Lou R H, Shui W Q. Acquisition and analysis of DIA-based proteomic data: A comprehensive survey in 2023 [J]. Mol Cell Proteomics, 2024, 23(2): 100712.
- [10] Zhang F F, Ge W G, Huang L L, et al. A comparative analysis of data analysis tools for data-independent acquisition mass spectrometry [J]. Mol Cell Proteom, 2023, 22(9): 100623.
- [11] 俞萍萍, 邵锦晖. 青藤碱逆转人乳腺癌 MCF-7 细胞他莫昔芬耐药及机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(24): 2972-2978.
- [12] Yu P P, Shao J H. Mechanism of sinomenine reversing drug resistance of human breast cancer MCF-7 cells to tamoxifen [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(24): 2972-2978.
- [13] Shi X P, Miao S, Wu Y, et al. Resveratrol sensitizes tamoxifen in antiestrogen-resistant breast cancer cells with epithelial-mesenchymal transition features [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 15655-15668.
- [14] Javankiani S, Bolandi S, Soleimani A, et al. MAPK signaling mediates tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480(9): 4973-4989.
- [15] Tian Y, Chen Z H, Wu P, et al. MIR497HG-Derived miR-195 and miR-497 mediate tamoxifen resistance via PI3K/AKT signaling in breast cancer [J]. Adv Sci, 2023, 10(12): 2204819.
- [16] Brockmueller A, Sajeev A, Koklesova L, et al. Resveratrol as sensitizer in colorectal cancer plasticity [J]. Cancer

- Metastasis Rev, 2024, 43(1): 55-85.
- [14] Wang X Q, Li Y, Xiao Y Y, et al. The phospholipid flippase ATP9A enhances macropinocytosis to promote nutrient starvation tolerance in hepatocellular carcinoma [J]. J Pathol, 2023, 260(1): 17-31.
- [15] Bottardi S, Layne T, Ramòn A C, et al. MNDA, a PYHIN factor involved in transcriptional regulation and apoptosis control in leukocytes [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1395035.
- [16] Kretov D A, Folkes L, Mora-Martin A, et al. The miR-144/Hmgn2 regulatory axis orchestrates chromatin organization during erythropoiesis [J]. Nat Commun, 2024, 15: 3821.
- [17] Yang T N, Peng X Y, Huang X, et al. COL6A1 inhibits the malignant development of bladder cancer by regulating FBN1 [J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83(2): 1631-1643.
- [18] IJspeert H, Dalm V A S H, van Zelm M C, et al. Hyperactivation of the PI3K pathway in inborn errors of immunity: Current understanding and therapeutic perspectives [J]. Immunother Advanc, 2024, 4(1): ltae009.

[责任编辑 兰新新]