基于 Hippo/YAP 信号通路探究粉防己碱抗乳腺癌耐药机制

辛国松[1,2]，王毛毛[1]，侯妍秀[1]，杨 燚[1]，于 淼[1,2]，季宇彬[1,2]，李文兰[1,2]，李海茹[3*]

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心，黑龙江 哈尔滨 150076
2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心，黑龙江 哈尔滨 150076
3. 哈尔滨医科大学附属第二医院，黑龙江 哈尔滨 150086

摘 要：目的 研究粉防己碱通过调控 Hippo/Yes-相关蛋白同源癌蛋白（homologous oncoproteins Yes-associated protein，YAP）信号通路抗乳腺癌多重耐药的分子机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测粉防己碱对乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响；采用倒置显微镜、荧光显微镜观察细胞形态；采用流式细胞仪检测细胞凋亡率；采用细胞集落实验检测细胞克隆形成能力；采用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力；采用 Western blotting 检测细胞耐药外排蛋白[P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）、乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP）、多药耐药相关蛋白（multidrug resistance associated protein，MRP）]，Hippo 通路关键节点蛋白[YAP1、大肿瘤抑制激酶 1（large tumor suppressor kinase 1，LATS1）、哺乳动物不育系 20 样激酶 1（mammalian Sterile 20-like kinase 1，MST1）、转录共活化因子（transcriptional co-activator with PDZ-binding motif，TAZ）]和凋亡关键蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）、细胞色素 C（cytochrome-C，Cyt-C）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）]表达。**结果** 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞具有增殖抑制作用，半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）值为 14.20 μmol/L；粉防己碱能够改变细胞形态，部分细胞出现凋亡迹象；粉防己碱显著诱导 MCF-7/ADR 细胞发生凋亡（P＜0.01），抑制细胞的增殖分化和侵袭能力，显著下调 P-gp、BCRP、MRP1、YAP1、TAZ 和 Bcl-2 蛋白表达（P＜0.01），显著上调 MST1、LATS1、Caspase-3、Cyt-C 和 Bax 蛋白表达（P＜0.01）。**结论** 粉防己碱能够通过下调 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 MRP1 蛋白表达，抑制外排蛋白活性，增加细胞内粉防己碱含量蓄积；并通过激活 Hippo 信号通路，上调 MST1 蛋白表达，激活 LATS1，进而调控下游靶点 YAP1 和 TAZ 表达，进一步上调 Caspase-3、Cyt-C 和 Bax 蛋白表达，下调 Bcl-2 蛋白表达，启动细胞凋亡程序，发挥抗肿瘤作用。

关键词：粉防己碱；乳腺癌；阿霉素；耐药性；Hippo/YAP 信号通路

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2023)18 - 5960 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.014

Mechanism of tetrandrine against drug resistance in breast cancer based on Hippo/YAP signaling pathway

XIN Guo-song[1,2], WANG Mao-mao[1], HOU Yan-xiu[1], YANG Yi[1], YU Miao[1,2], JI Yu-bin[1,2], LI Wen-lan[1,2], LI Hai-ru[3]

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. National Ministry of Education Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Harbin 150076, China
3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of tetrandrine against multidrug resistance in breast cancer by regulating Hippo/homologous oncoproteins Yes-associated protein (YAP) signaling pathway. **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of tetrandrine on proliferation of MCF-7/ADR cells; Inverted microscopy and fluorescence microscopy were used to observe cell morphology; Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate; Cell colony assay was used to detect cell clone formation

收稿日期：2023-04-18

基金项目：中国博士后面上项目（2021MD703828）；黑龙江省自然科学基金优秀青年项目（YQ2022H002）；黑龙江省博士后资助项目（LBH-Z20172）；哈尔滨商业大学产业化项目支持计划（XL0086）

作者简介：辛国松（1984—），男，副研究员，博士（博士后），硕士生导师，研究方向为抗肿瘤中药药理学。E-mail: 13766801150@163.com

***通信作者：**李海茹（1988—），女，副教授，博士（博士后），硕士生导师，研究方向为中药药理学。

ability; Transwell experiment was used to detect cell invasion ability; Western blotting was used to detect expressions of resistance efflux proteins [P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance associated protein (MRP)], Hippo pathway key node proteins [YAP1, large tumor suppressor kinase 1 (LATS1), mammalian Sterile 20-like kinase 1 (MST1), transcriptional co activator with PDZ binding motif (TAZ)], and apoptosis key proteins [cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), cytochrome C (Cyt-C), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax)]. **Results** Tetrandrine had a proliferative inhibitory effect on MCF-7/ADR cells, with a half inhibitory concentration (IC_{50}) value of 14.20 μmol/L; Tetrandrine could change cell morphology and some cells showed signs of apoptosis; Tetrandrine significantly induced apoptosis in MCF-7/ADR cells (P < 0.01), inhibited cell proliferation, differentiation and invasion ability, significantly down-regulated the expressions of P-gp, BCRP, MRP1, YAP1, TAZ and Bcl-2 proteins (P < 0.01), and significantly up-regulated the expressions of MST1, LATS1, Caspase-3, Cyt-C and Bax proteins (P < 0.01). **Conclusion** Tetrandrine can inhibit efflux protein activity and increase intracellular accumulation of tetrandrine by down-regulating the expressions of P-gp, BCRP and MRP1 proteins in MCF-7/ADR cells. And tetrandrine exerts anti-tumor effects by activating Hippo signaling pathway, upregulation of MST1 protein expression, activation of LATS1, and regulation of downstream target YAP1 and TAZ expressions, further upregulation of Caspase-3, Cyt-C, and Bax protein expressions, down-regulation of Bcl-2 protein expression, initiation of cell apoptosis program.

Key words: tetrandrine; breast cancer; adriamycin; drug resistance; Hippo/YAP pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，其发病率逐年上升。据统计，2020 年女性乳腺癌已经超越肺癌成为全球癌症发病率最高的癌种。2020 年全球新增乳腺癌患者达到 226 万例，死亡 68 万例，分别占全球新发癌症病例和死亡病例的 11.7%和 6.8%，乳腺癌成为女性因癌症死亡的主要原因[1-2]。我国乳腺癌发病率在近 30 年中每年增长 2%～3%，成为威胁女性健康的“头号癌症杀手”，卫生部已将乳腺癌列为我国肿瘤防治的重点之一[3-4]。

防己 *Stephaniae Tetrandrae Radix* 又称粉防己、汉防己，是一种常用的中药，其主要成分为粉防己碱，在中医中广泛用于治疗哮喘、痢疾发烧等疾病。主要具有抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病、抗高血压、抗菌、镇痛、抗氧化、抗疟疾虫、抗血小板等药理作用，近年来粉防己碱的抗肿瘤作用受到众多研究者的关注。临床发现乳腺癌细胞具有极强的增殖分化、侵袭和转移的能力，阿霉素是临床上治疗乳腺癌的常用药物，但阿霉素治疗乳腺癌过程中易产生耐药性，难以达到良好的临床治疗效果。因此目前急需寻找能够抑制乳腺癌细胞对阿霉素耐药性的方法和途径，进一步提高阿霉素的临床疗效[5-7]。导致乳腺癌多重耐药的机制为药物外排蛋白在三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）供能的条件下将进入细胞的药物排出胞外，减少药物在癌细胞内的富集，降低药效，引起癌细胞中的多重耐药性。乳腺癌多重耐药产生的主要耐药蛋白为 P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）、多药耐药相关蛋白（multidrug resistance associated protein，MRP）、乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP），是评价和衡量乳腺癌细胞多重耐药特性强弱的指数[8-11]。中药具有整体观念、高效低毒、多靶点作用调控的特点，相关研究表明多种中药活性成分都能够通过调控药物外排蛋白表达、促进肿瘤细胞凋亡逆转乳腺癌多重耐药，表现出对乳腺癌多重耐药的抑制作用[12-13]。而且相关研究还发现粉防己碱能够通过调控 Yes-相关蛋白同源癌蛋白 1（homologous oncoproteins Yes-assoc iated protein 1，YAP1）表达从而介导 Hippo 信号通路诱导肿瘤细胞发生凋亡，推测粉防己碱可以通过介导乳腺癌多重耐药外排蛋白，增加乳腺癌细胞内粉防己碱和阿霉素的蓄积，进而降低 YAP 表达，激活 Hippo 信号途径诱导乳腺癌细胞发生凋亡，从而发挥抗肿瘤作用，实现临床应用价值[14-18]。

1 材料

1.1 细胞株

乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞由北京北纳创联生物技术研究员质控中心提供。

1.2 药品与试剂

胎牛血清（批号 0201021）购自浙江杭天生物科技公司；粉防己碱（质量分数为 98%，批号 L1607039）购自阿拉丁试剂有限公司；CCK-8 试剂盒（批号 C0043）、PMSF（批号 ST505）、HRP 标记山羊抗大鼠 IgG 二抗（批号 A0192）、Western blotting 及 IP 细胞裂解液（批号 072318180723）、30% Acr-Bis（批号 093018181017）购自碧云天生物技术有限公司；RPMI 1640 培养基（批号 AD123707271）购

自美国 HyClone 公司；二甲基亚砜（批号 20200901）购自天津中和盛泰化工有限公司；碘化丙啶（PI）染液（批号 R20285）美国 Sigma 公司；聚山梨酯-20（批号 20190207）购自美国 Biotopped 公司；Tris（批号 181127）购自美国 Amresco 公司；SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（批号 P0015）、兔抗 YAP1 抗体（批号 bs-52418R）、兔抗大肿瘤抑制激酶 1（large tumor suppressor kinase 1，LATS1）抗体（批号 bs-2904R）、兔抗哺乳动物不育系 20 样激酶 1（mammalian Sterile 20-like kinase 1，MST1）抗体（批号 bs-3504R）、兔抗转录共活化因子（transcriptional co-activator with PDZ-binding motif，TAZ）抗体（批号 bs-12367R）购自北京博奥森生物技术有限公司；兔抗 P-gp 抗体（批号 WL01338）、兔抗 BCRP 抗体（批号 WL03192）、兔抗 MRP1 抗体（批号 WL01027）、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（批号 WL01114）、兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）抗体（批号 WL02512）、兔抗细胞色素 C（cytochrome-C，Cyt-C）抗体（批号 WL04963）、兔抗 B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（批号 WL01506）、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 WL02385）购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.3　仪器

ECO-170P-230 型细胞培养箱（美国 NBS 公司）；Adventurer 万分之一电子天平（美国 OHAUS 公司）；Model 680 型酶标仪（美国 NBS 公司）；EPICS-XL 型流式细胞仪、Allegra^{TM} 64R 型低温高速离心机（美国 Beckman-Coulter 公司）；荧光显微镜（德国 Leica 公司）；680 型全自动酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；微量移液器（芬兰百得公司）；标准型 PB-10 型 pH 计（德国 Sartorius 公司）；GIS-2019 型 Tannon 凝胶成像系统（天能科技有限公司）；DYY-7C 型电泳仪、M344039 型垂直电泳转印槽（北京六一仪器厂）。

2　方法

2.1　细胞复苏及传代培养

将 MCF-7/ADR 细胞从−80 ℃冰箱取出，水浴加热融化，加入 2 mL 含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基，1500 r/min 离心 5 min，弃去上清，重悬细胞，平均分到 2 个培养瓶中，加入 5 mL 细胞培养液，在 5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养。细胞长势良好时进行传代，弃去培养液，用 PBS 清洗 3 次，再加入胰蛋白酶溶液消化，反复吹打得细胞悬液，分装到 2 个细胞培养瓶中，加入 5 mL 细胞培养液，于细胞培养箱中培养。

2.2　CCK-8 法检测粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

MCF-7/ADR 细胞以 2×10^4/mL 接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，于培养箱中培养 24 h。分别加入 1、2、4、8、16、32 μmol/L 粉防己碱 100 μL，对照组加入 100 μL 培养基，每组设置 6 个平行孔。将 96 孔板放入培养箱培养 48 h，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，继续培养 4 h，用酶标仪检测吸光度（*A*）值。

2.3　倒置显微镜和荧光显微镜观察粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞形态的影响

MCF-7/ADR 细胞以 3×10^4/mL 接种于 6 孔板，于培养箱中培养 24 h。设置对照组和粉防己碱（7、14、28 μmol/L）组，各给药组加入 1 mL 粉防己碱，对照组加入 1 mL 培养基。培养 48 h 后，用倒置显微镜观察并拍照；每孔中加入 1 mL 多聚甲醛固定 1 h，弃去上清液，冲洗后加入 200 μL Hoechst 33258 染色液，水浴加热 30 min 后，用荧光显微镜观察并拍照。

2.4　流式细胞仪检测粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

按“2.3”项下方法进行分组和给药，培养 48 h 后，吸取上清液，加入胰蛋白酶消化后离心，弃去上清液，加入 70%冰乙醇，固定 24 h 后离心。加入 Annexin V 和 PI 染液 800 μL，用尼龙网将染色后的细胞过滤。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5　集落实验检测粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞克隆能力的影响

取对数生长期、生长状态良好的 MCF-7/ADR 细胞，PBS 洗涤后加入胰蛋白酶消化，离心后弃去上清液，重悬细胞，用台盼兰染色后以 1×10^3/孔接种于 96 孔板，培养 12～18 h。PBS 清洗后，按“2.3”项下方法进行分组和给药，连续培养 7 d 后弃去培养基，PBS 洗涤后用甲醇固定 10 min。洗涤后用吉姆萨染液染色，洗涤干燥后置于倒置显微镜下观察细胞集落形成率并拍照。

2.6　Transwell 实验检测粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力的影响

MCF-7/ADR 细胞以 1×10^5/mL 接种于 6 孔板，每孔 1 mL，培养 24 h。按“2.3”项下方法进行分组和给药，培养 48 h 后，弃去培养液，用 PBS 洗涤 1

次，每孔加入 0.1 mL 10%甲醇溶液，固定细胞 30 s。吸去甲醇溶液，每孔加入 0.1 mL 结晶紫染液，室温孵育 20 min。弃去染色液，用蒸馏水洗涤各孔，将培养板倒置于吸水纸上吸干水分。自然干燥或 37 ℃烘干后在显微镜下观察并拍照。

2.7 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞耐药蛋白、Hippo 通路和凋亡相关蛋白表达的影响

按“2.3”项下方法进行分组和给药，培养 48 h 后，收集细胞，加入含 PMSF 的细胞裂解液，裂解 30 min 后离心 15 min，取上清液，煮沸使蛋白变性，采用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭 2 h 后加入一抗，4 ℃孵育过夜；洗膜后加入二抗，室温孵化 2 h，洗膜后加入化学发光试剂，显影并用显色仪拍照。

2.8 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析。

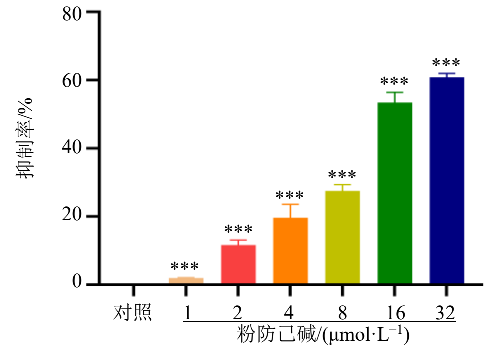
3 结果

3.1 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

如图 1 所示，粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞具有增殖抑制作用，其半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）为 14.20 μmol/L，并参考 IC_{50} 值设定后续粉防己碱给药剂量为 7、14、28 μmol/L。

3.2 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞形态的影响

采用倒置显微镜、荧光显微镜观察粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞形态的影响，如图 2 所示，与对照组比较，粉防己碱使肿瘤细胞形态有一定改变，随着给药浓度的增加，细胞大部分变圆漂浮于培养基中，并且出现凋亡小体，且细胞膜破碎明显，细胞排列稀疏，细胞核的荧光强度最强。



与对照组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$，下图同

$^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ *vs* control group, same as below figures

图 1 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

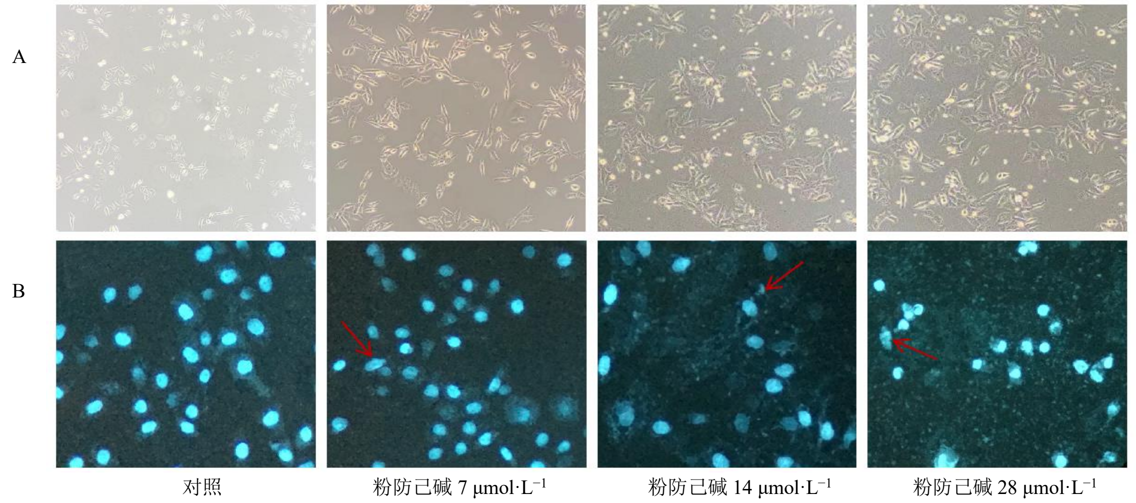
Fig. 1 Effect of tetrandrine on proliferation of MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.3 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

如图 3 所示，与对照组比较，各剂量粉防己碱组 MCF-7/ADR 细胞凋亡率均显著升高（$P<0.01$），呈剂量相关性。

3.4 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞克隆能力的影响

单个 MCF-7/ADR 细胞在体外持续增殖 6 代以上，其后代形成 1 个细胞集落，且每个克隆均包含 50 个细胞以上，大小为 0.3～1.0 mm。如图 4 所示，



A-倒置显微镜下细胞形态（×100） B-荧光显微镜下细胞形态（×200）

A-cell morphology in inverted microscope (× 100) B-cell morphology in fluorescence microscope (× 200)

图 2 粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of tetrandrine on morphology of MCF-7/ADR cells

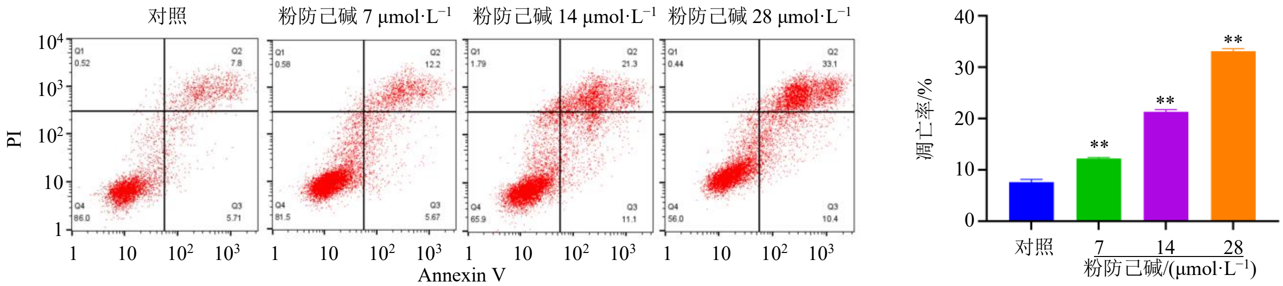


图 3　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$, $n = 3$）

Fig. 3　Effect of tetrandrine on apoptosis of MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

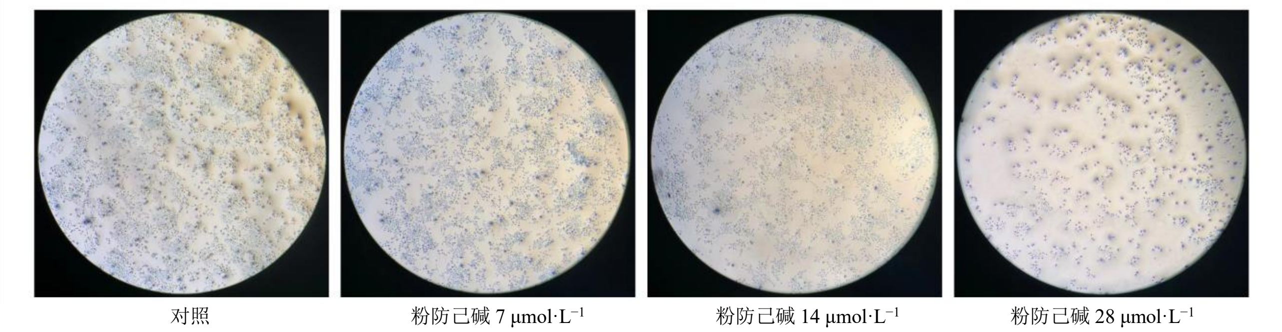


图 4　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞克隆能力的影响（×40）

Fig. 4　Effect of tetrandrine on cloning ability of MCF-7/ADR cells (× 40)

对照组肿瘤细胞的集落数量较多，粉防己碱给药组集落数量较少，且呈剂量相关性。表明粉防己碱可以抑制 MCF-7/ADR 细胞的克隆形成能力。

3.5　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力的影响

如图 5 所示，与对照组比较，粉防己碱给药组紫色区域呈剂量相关性地减少，且颜色明显变浅。表明粉防己碱能够显著抑制 MCF-7/ADR 细胞的侵袭能力。

3.6　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞耐药蛋白、Hippo 通路和凋亡相关蛋白表达的影响

3.6.1　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞耐药蛋白表达的影响　如图 6 所示，粉防己碱各剂量组能够有效降低 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 MRP1 蛋白表达水平（P<0.01），且呈剂量相关性。

3.6.2　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞 Hippo 通路关键调控蛋白表达的影响　如图 7 所示，与对照组比较，粉防己碱各剂量组 MCF-7/ADR 细胞中 MST1 和 LATS1 蛋白表达水平均显著升高（P<0.01），YAP1 和 TAZ 蛋白表达水平均显著降低（P<0.01），且呈剂量相关性。

3.6.3　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞凋亡相关蛋白表达的影响　如图 8 所示，与对照组比较，粉防己碱各剂量组 MCF-7/ADR 细胞中 Caspase-3、Cyt-C 和 Bax 蛋白表达水平均显著升高（P<0.01），Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低（P<0.01），且呈剂量相关性。

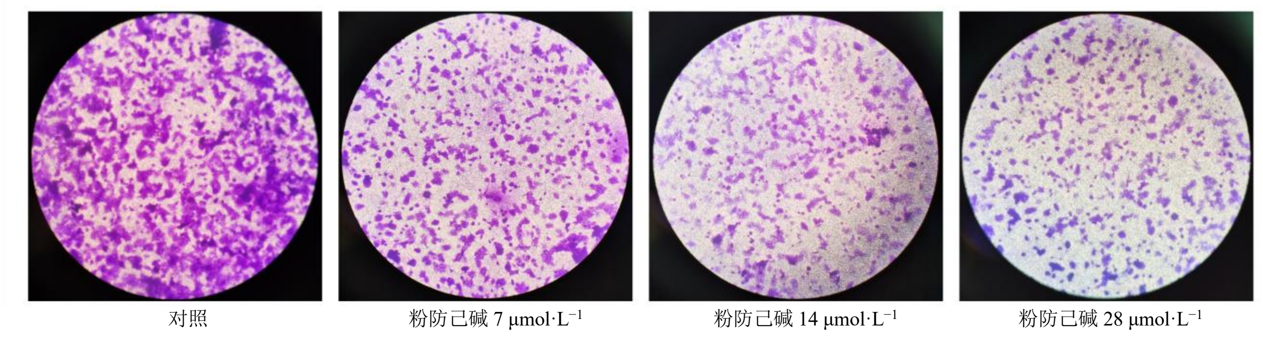


图 5　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力的影响（×100）

Fig. 5　Effect of tetrandrine on invasive ability of MCF-7/ADR cells (× 100)

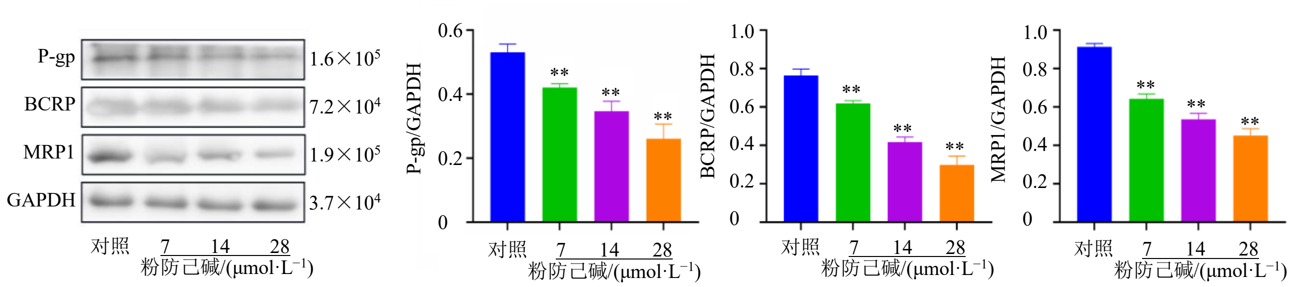


图 6　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 MRP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6　Effect of tetrandrine on P-gp, BCRP and MRP1 protein expressions in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

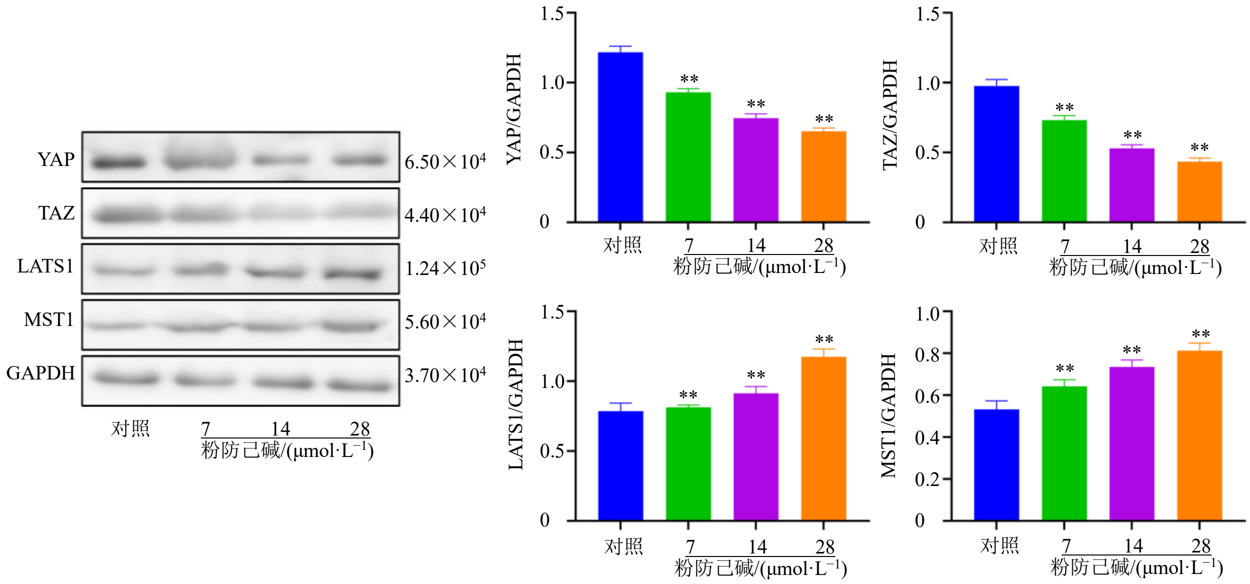


图 7　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞 YAP1、TAZ、LATS1 和 MST1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7　Effect of tetrandrine on YAP1, TAZ, LATS1 and MST1 protein expressions in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

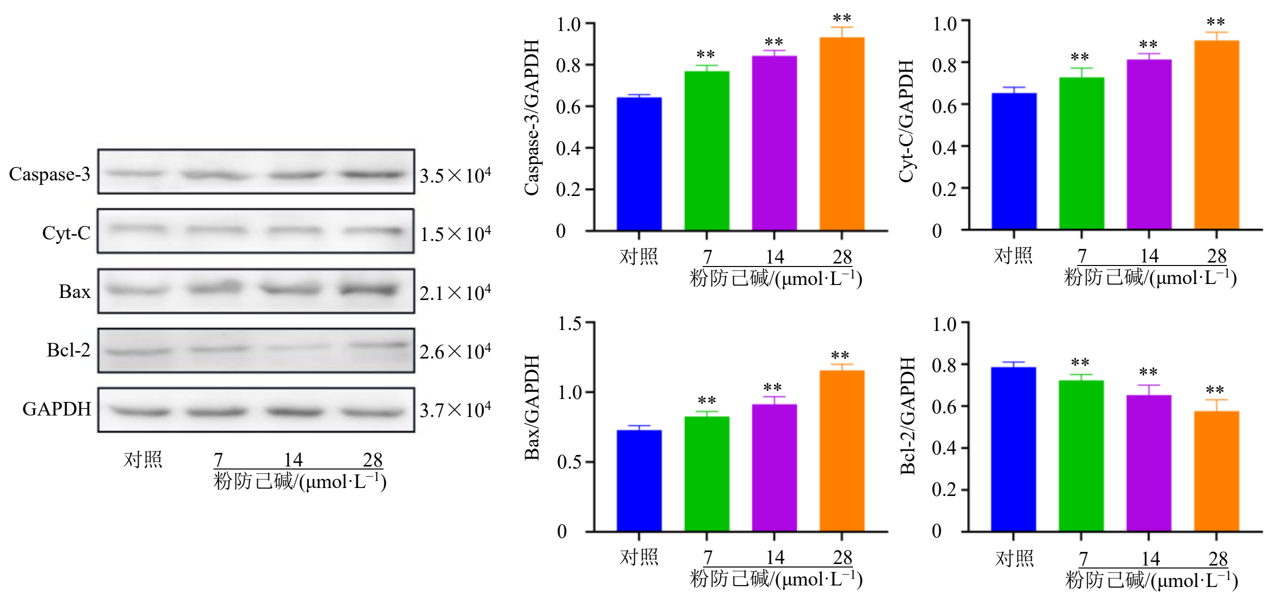


图 8　粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞 Caspase-3、Cyt-C、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8　Effect of tetrandrine on Caspase-3, Cyt-C, Bax and Bcl-2 protein expressions in MCF-7/ADR cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

乳腺癌是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤，其增殖、分化、侵袭、转移等特性使其在临床上难以得到有效治疗。阿霉素是目前临床上广泛使用的一种抗肿瘤药物，但由于其在抗肿瘤作用下容易发生耐药性，导致疗效不佳。如何克服乳腺癌的耐药性是目前亟待解决的问题。根据有关文献报道，乳腺癌产生多重耐药的机制为在 ATP 供能的情况下，药物外排蛋白会将进入细胞的药物排出胞外，减少了药物在肿瘤细胞中的富集，进而降低了药效，产生了肿瘤细胞的耐药性，P-gp、MRP 及 BCRP 是评估乳腺癌多重耐药特征的重要指标[19-21]。中药具有高效、低毒、多靶点、多通路调控的作用特点，其多个有效成分能够调控外排蛋白的表达，从而抑制肿瘤细胞凋亡，进而逆转多药耐药，因此筛选一种中药活性组分逆转乳腺癌多重耐药机制潜力巨大。相关研究表明，粉防己碱可以有效地逆转肿瘤对卡铂、顺铂、紫杉醇等的耐药性，因此，推测粉防己碱可能是通过调节乳腺癌多药耐药外排蛋白的活性，提高药物在胞内的蓄积，并诱导肿瘤细胞凋亡，从而起到抗肿瘤作用[22-24]。

本研究采用 CCK-8 法检测粉防己碱的 IC_{50} 值，利用倒置显微镜、荧光显微镜等观察粉防己碱对肿瘤细胞形态的影响，并通过流式细胞仪测定了其对肿瘤细胞凋亡的影响，结果表明粉防己碱对肿瘤细胞的生长有显著影响，并具有一定的剂量相关性。表明粉防己碱能够有效抑制乳腺癌对阿霉素的耐药性。为探究粉防己碱对肿瘤细胞增殖分化和侵袭能力的影响，进行细胞集落实验和 Transwell 实验。结果显示，粉防己碱能够抑制乳腺癌细胞克隆形成能力，有效降低肿瘤细胞增殖分化和侵袭能力。为进一步探究粉防己碱在 MCF-7/ADR 细胞中逆转多药耐药的机制，利用 Western blotting 对耐药蛋白 P-gp、BCRP、MRP1 的表达进行检测。结果表明，粉防己碱可以通过下调 P-gp、BCRP 和 MRP1 蛋白表达水平，减少肿瘤细胞膜蛋白的外排，提高阿霉素在肿瘤细胞内的蓄积，从而提高药物的疗效，并通过阻断 P-gp 蛋白所介导的多重耐药通路，达到逆转乳腺癌细胞对阿霉素耐药的目的。

以 Hippo 信号通路为切入点，深入探究粉防己碱对 MCF-7/ADR 细胞的影响及其分子作用机制。采用 Western blotting 对 Hippo 通路中的关键节点蛋白 MST1、YAP1、LATS1、TAZ 进行分析，发现粉防己碱能够激活 Hippo 通路上的 MST1 蛋白，从而提高 MST1 的表达水平，激活 LATS1，活化的 LATS1 对下游靶基因 YAP1 和 TAZ 进行调控，将其磷酸化，降低其含量，从而抑制乳腺癌细胞的增殖和分化[25-26]。Caspase-3、Cyt-C、Bax、Bcl-2 是调节凋亡的重要蛋白，Bax 和 Bcl-2 二者通过形成同源和异源二聚体来调节细胞凋亡。Caspase-3 可以通过抑制凋亡抑制物，破坏细胞结构使蛋白丧失功能，Cyt-C 可以介导细胞凋亡[27-31]。采用 Western blotting 检测凋亡蛋白 Caspase-3、Cyt-C、Bax、Bcl-2 表达的变化。结果显示，粉防己碱能够通过上调 Caspase-3、Cyt-C 和 Bax 蛋白表达，下调 Bcl-2 蛋白表达，诱导细胞发生凋亡，表明粉防己碱能够诱导 MCF-7/ADR 细胞发生凋亡，启动细胞凋亡程序。

综上，粉防己碱可能通过降低 P-gp、BCRP、MRP1 蛋白在肿瘤细胞内的表达，抑制肿瘤外排蛋白表达活性，增加粉防己碱与阿霉素在乳腺癌细胞中的含量蓄积；并进一步激活 Hippo 信号通路，上调 MST1 蛋白表达，活化 LATS1，调节 YAP1，并促进 YAP1 的磷酸化，通过下调 YAP1 和 TAZ 的表达，抑制乳腺癌细胞增殖分化，促进乳腺癌细胞凋亡，从而达到抗肿瘤的目的。本研究为解决临床乳腺癌对阿霉素的耐药性提供新的研究思路和方法参考，也为粉防己碱的进一步研究与开发奠定基础和提供数据支持。

利益冲突 *所有作者均声明不存在利益冲突*

参考文献

[1] DeSantis C, Siegel R, Bandi P, *et al*. Breast cancer statistics, 2011 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2011, 61(6): 408-418.

[2] WHO. Global health estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019 [EB/OL]. [2021-02-20]. https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death.

[3] Fan L, Goss P E, Strasser-Weippl K. Current status and future projections of breast cancer in Asia [J]. *Breast Care*, 2015, 10(6): 372-378.

[4] 杜建姝. 中国乳腺癌现状 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(46): 371-372.

[5] Cao J, Zhang M D, Wang B, *et al*. Chemoresistance and metastasis in breast cancer molecular mechanisms and novel clinical strategies [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 658552.

[6] Shi R Z, He Y F, Wen J, *et al*. Epithelial cell adhesion molecule promotes breast cancer resistance protein-

mediated multidrug resistance in breast cancer by inducing partial epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(8): 1644-1653.
[7] 林慧, 吉丽银, 符策岗. 乳腺癌化疗耐药的分子机制 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2022, 31(2): 194-201.
[8] Pan Y, Chen Q, Li N, *et al*. CTAB reversed drug-resistance mediated by AMPK-HIF-1 alpha-P-gp pathway in breast cancer [J]. *Pancreas*, 2020, 49(2): 154-155.
[9] Li W J, Chen X H, Zeng J C, *et al*. Theoretical insight into the multiple interactions of quinazoline inhibitors with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 38(14): 4336-4343.
[10] Raman D, Cimpean A M, De Miglio M R. Editorial: Drug resistance in breast cancer-mechanisms and approaches to overcome chemoresistance [J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1080684.
[11] 罗锦琳, 欧阳慧婷, 邹联洪, 等. 乳腺癌内分泌耐药机制的研究进展 [J]. 实用预防医学, 2022, 29(4): 510-512.
[12] Tarapcsák S, Szalóki G, Telbisz Á, *et al*. Interactions of retinoids with the ABC transporters P-glycoprotein and breast cancer resistance protein [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41376.
[13] Khan A, Ali L, Wei D Q. Editorial: Breast cancer resistance, biomarkers and therapeutics development in the era of artificial intelligence [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1034990.
[14] Watanabe A, Momo, Tanaka K, *et al*. Drug-drug interaction between apalutamide and atorvastatin through breast cancer resistance protein in an outpatient [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2022, 60(8): 367-369.
[15] Yan C, Yang H J, Su P, *et al*. OTUB1 suppresses Hippo signaling via modulating YAP protein in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(48): 5186-5198.
[16] 王明珠, 周阳, 何凯桐, 等. Hippo 通路在肿瘤发生发展中作用机制的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(16): 3061-3064.
[17] 于文静. 粉防己碱通过 Hippo 通路抗肝癌作用机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
[18] Liu X F, Han Q, Rong X Z, *et al*. ANKHD1 promotes proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer cells via regulating YAP oncoprotein expression and inactivating the Hippo pathway [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(5): 1175-1185.
[19] Zattoni I F, Delabio L C, Dutra J P, *et al*. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 237: 114346.
[20] Wang J, Gan C P, Retmana I A, *et al*. P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) limit brain accumulation of the FLT3 inhibitor quizartinib in mice [J]. *Int J Pharm*, 2019, 556: 172-180.
[21] Lu J, Wang Y C, Shi Z J, *et al*. 3-Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid decreases the malignancy of taxol resistant human ovarian cancer by inhibiting multidrug resistance (MDR) proteins function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 108992.
[22] N Bhagya. Network pharmacology based investigation on the mechanism of tetrandrine against breast cancer [J]. *Phytomedicine Plus*, 2023, 3(1): 100381.
[23] Samsuzzaman M, Jang B C. Growth-suppressive and apoptosis-inducing effects of tetrandrine in SW872 human malignant liposarcoma cells via activation of Caspase-9, down-regulation of XIAP and STAT-3, and ER stress [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 843.
[24] 杨燚, 王毛毛, 于淼, 等. 基于网络药理学、分子对接和体外实验探讨防己生物碱类活性成分逆转乳腺癌耐药的作用机制 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2841-2851.
[25] 任宇亮, 吴慧, 左春妹, 等. Hippo 信号通路在乳腺癌发生、转移和治疗中的作用 [J]. 湖北医药学院学报, 2022, 41(6): 646-651.
[26] 祝景伟, 佟经伟, 许培权. Hippo 信号通路中 TAZ、YAP 在三阴性乳腺癌中的表达及意义 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(8): 940-943.
[27] 张娜娜. Caspase-3 和 Bcl-2 表达与乳腺癌细胞凋亡及其临床病理特征的相关性分析 [J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(10): 1609-1613.
[28] 刘斌, 游金辉. 乳腺癌与 Bcl-2、Caspase-3 的相关性研究与应用 [J]. 川北医学院学报, 2017, 32(4): 638-642.
[29] 裴岩岩, 李雅, 闫春生, 等. 黄芪甲苷通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1077-1082.
[30] Jiang X F, Liu Y S, Zhang G J, *et al*. *Aloe*-emodin induces breast tumor cell apoptosis through upregulation of miR-15a/miR-16-1 that suppresses BCL2 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5108298.
[31] Li Y N, Ning Ni, Song Lei, *et al*. Derivatives of deoxypodophyllotoxin induce apoptosis through Bcl-2/Bax proteins expression [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21(5): 611-620.

［责任编辑　李亚楠］