

• 药理与临床 •

通关藤注射液逆转乳腺癌多柔比星耐药的作用机制

张小帅^{1,2}, 杨柳青^{1,3*}, 王晓艳^{1,2,3,4}, 汪彬^{1,2}, 孟高全^{1,2}, 孟伟亭^{1,2}, 李伟霞^{1,2,3,4}, 陈小菲^{1,3}, 张明亮^{1,3}, 张辉^{1,3}, 吴娅丽^{1,3}, 唐进法^{1,2,3,4*}

1. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450003

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

3. 河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心, 河南省中药临床药理学中医药重点实验室, 河南省中药安全评价与风险防控工程研究中心, 河南 郑州 450003

4. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要:目的 探究通关藤注射液(Tongguanteng Injection, TGT)对乳腺癌多柔比星(doxorubicin, DOX)耐药的逆转作用及潜在作用机制。方法 分别用 DOX、TGT、DOX+TGT 干预人乳腺癌 DOX 耐药 MCF-7/DOX 细胞株, 采用 CCK-8 法、克隆形成实验检测细胞增殖; Combenefit 软件定量分析药物联合作用指数; Transwell 实验观察细胞迁移能力; TUNEL 染色检测细胞凋亡率; 利用罗丹明外排实验检测 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞外排功能的影响; 采用生物信息学手段预测 TGT 逆转乳腺癌 DOX 耐药的作用机制, 并采用 Western blotting 实验检测 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞中耐药相关蛋白表达的调控作用。结果 TGT 可逆转 MCF-7/DOX 细胞的耐药性, 且能够协同 DOX 抑制 MCF-7/DOX 细胞的增殖、迁移, 促进细胞凋亡; 此外, TGT 增加细胞内 Rho-123 的蓄积($P<0.001$)。TGT 成分靶标的基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析结果表明其主要参与调控磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、凋亡等信号通路。GEO 数据库筛选得到 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞差异表达基因 823 个, KEGG 富集分析表明乳腺癌 DOX 耐药主要与 PI3K/Akt、Ras 相关蛋白 1(Ras-proximate-1, Rap1)、凋亡等信号通路相关。TGT 联合 DOX 显著下调 MCF-7/DOX 细胞中 p-PI3K、p-Akt、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、三磷酸腺苷结合转运蛋白 B1(adenosine triphosphate-binding cassette transporter B1, ABCB1)、ABCG2 蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01), 且上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)表达($P<0.05$)。结论 基于生物信息学结合细胞实验验证 TGT 联合 DOX 可通过抑制 PI3K/Akt 介导的凋亡相关信号通路, 同时下调 ABCB1、ABCG2 蛋白表达逆转乳腺癌 DOX 耐药。为临床 TGT 与 DOX 联合用药提供了实验依据, 为乳腺癌耐药的治疗提供新的思路。

关键词: 通关藤注射液; 多柔比星; 乳腺癌; 耐药性; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5112-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.011

Mechanism of Tongguanteng Injection on reversing doxorubicin resistance in breast cancer

ZHANG Xiaoshuai^{1, 2}, YANG Liuqing^{1, 3}, WANG Xiaoyan^{1, 2, 3, 4}, WANG Bin^{1, 2}, MENG Gaoquan^{1, 2}, MENG Weiting^{1, 2}, LI Weixia^{1, 2, 3, 4}, CHEN Xiaofei^{1, 3}, ZHANG Mingliang^{1, 3}, ZHANG Hui^{1, 3}, WU Yali^{1, 3}, TANG Jinfa^{1, 2, 3, 4}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

收稿日期: 2024-03-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(82204838); 河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2022JDZX103); 河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ202302100); 河南省高校科技创新团队(23IRTSTHN026); 河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY3012); 河南省国家中医药传承创新中心科研专项(2023ZXZX1166)

作者简介: 张小帅, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价与合理用药。E-mail: 15938638241@163.com

***通信作者:** 杨柳青, 博士, 从事中药质量评价与合理用药。E-mail: yangliuqing@163.com

唐进法, 主任药师, 博士生导师, 从事中药质量评价与合理用药。E-mail: a0519@163.com

2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
3. Henan Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Henan Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Henan Engineering Research Center of Safety Evaluation and Risk Management of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China
4. Provincial and Ministerial Coconstruction Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases with Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To explore the reversal effect and potential mechanism of Tongguanteng Injection (通关藤注射液, TGT) on doxorubicin (DOX) resistance in breast cancer. **Methods** MCF-7/DOX cells were treated with DOX, TGT and DOX + TGT, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay and clonal formation assay; Combenefit software was used to analyze the drug combination index quantitatively; Cell migration ability was examined by Transwell assay; Cell apoptosis was detected by TUNEL staining; The effect of TGT on efflux function of MCF-7/DOX cells was detected by rhodamine efflux assay; The mechanism of TGT on reversing DOX resistance in breast cancer was predicted by bioinformatics, and the regulation of TGT on expressions of drug resistance-related proteins in MCF-7/DOX cells was studied by Western blotting. **Results** TGT could reverse the drug resistance of MCF-7/DOX cells. Meanwhile, TGT combined with DOX could synergistically inhibit the proliferation and migration of MCF-7/DOX cells and promote apoptosis. In addition, TGT increased intracellular accumulation of Rho-123 ($P < 0.001$). The results of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of TGT component targets showed that they were mainly involved in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK), apoptosis and other signaling pathways. A total of 823 differentially expressed genes in MCF-7 and MCF-7/DOX cells were screened by GEO database. KEGG enrichment analysis showed that DOX resistance in breast cancer was mainly related to PI3K/Akt, Ras-proximate-1 (Rap1), apoptosis and other signaling pathways. TGT combined with DOX significantly down-regulated the protein expressions of p-PI3K, p-Akt, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), adenosine triphosphate-binding cassette transporter B1 (ABCB1) and ABCG2 in MCF-7/DOX cells ($P < 0.05, 0.01$), and up-regulated Bcl-2 associated X protein (Bax) protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Based on bioinformatics and cell experiments, it was verified that TGT combined with DOX could reverse DOX resistance in breast cancer by inhibiting PI3K/Akt-mediated apoptosis-related signaling pathway and down-regulating the expressions of ABCB1 and ABCG2 proteins. This study provides an experimental basis for the combination of TGT and DOX in clinic and new ideas for the treatment of breast cancer resistance.

Key words: Tongguanteng Injection; doxorubicin; breast cancer; drug resistance; PI3K/Akt signaling pathway

世界卫生组织国际癌症研究机构数据显示, 2020 年全球乳腺癌新发病例 226 万例, 占新发癌症病例的 11.7%, 已成为目前世界上年新增病例最多的癌症, 同时乳腺癌的死亡率位居女性第 1, 对其治疗迫在眉睫^[1]。化疗是乳腺癌临床治疗并防止其术后复发的主要策略之一, 多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是化疗的一线用药^[2]。但在治疗过程中, 随着化疗周期的延长和用药剂量的增加, 乳腺癌细胞对 DOX 产生耐药性导致化疗失败, 大大缩短了患者生存期, 已成为临床治疗的瓶颈问题, 限制其进一步应用^[3]。目前已有化疗耐药逆转剂如维拉帕米、抗血管生成药物等, 但由于不良反应较大限制其在临床应用^[4]。同时乳腺癌 DOX 耐药涉及多种机制, 单一抑制某一靶点或某一通路往往会导致其他信号通路的代偿性激活^[5]。中医药具有多成分、多靶点、多通路优势, 与化疗联用可达到增效减毒、缓解耐药作用, 延长患者生存期^[6]。因此, 寻找能够增敏

DOX、缓解耐药的中药并探讨其作用机制对解决乳腺癌 DOX 耐药难题至关重要。

通关藤又名通光散、乌骨藤等, 为萝藦科植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎, 最初记载于《滇南本草》, 具有清热解毒、散结止痛等功效^[7]。通关藤注射液 (Tongguanteng Injection, TGT) 是以通关藤提取物为药效成分的中药抗肿瘤药物制剂, 用于胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤的治疗, 且可用于放疗、化疗的辅助用药^[8]。研究报道, TGT 可通过降低乳腺癌组织中雌激素受体- $\alpha 36$ (estrogen receptor- $\alpha 36$, ER- $\alpha 36$) 的表达, 抑制乳腺癌细胞的增殖及侵袭转移能力^[9]; TGT 能通过抑制抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 B 细胞淋巴瘤-xL (B-cell lymphoma-xL, Bcl-xL) 的表达来促进乳腺癌细胞凋亡^[10]; TGT 与紫杉醇联用时可上调转录激活因子 3 (activating transcription factor 3, ATF3) 及相关细胞

因子的表达水平,促进乳腺癌细胞凋亡,增强紫杉醇抗乳腺癌的作用^[11]。此外,TGT 具有潜在的逆转耐药的作用,其可通过调控转化生长因子 β 活化激酶结合蛋白 1(transforming growth factor β activated kinase binding protein 1, TAB1)逆转乳腺癌紫杉醇耐药^[11]。临床报道 TGT 联合表柔比星新辅助化疗可抑制乳腺癌生长与转移^[12]。可见,TGT 对乳腺癌治疗以及辅助化疗具有重要意义,但 TGT 能否缓解转乳腺癌细胞 DOX 耐药及潜在作用机制尚不清楚。本研究采用人乳腺癌 DOX 耐药 MCF-7/DOX 细胞株作为研究对象,采用生物信息学方法结合体外实验,探究 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞耐药逆转作用及作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自江苏凯基生物技术股份有限公司,MCF-7/DOX 细胞株购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

TGT(20 mL/支,每毫升含通关藤 1 g,国药准字 Z20025868,批号 202206211)购自南京圣和药业股份有限公司;盐酸多柔比星(200 mg/支,批号 T1020)、维拉帕米(100 mg/支,批号 T20656)购自上海陶术生物科技有限公司;胎牛血清(批号 FSP500)购自 ExCell Bio 公司;RPMI 1640 培养基(批号 KGL1501-500)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;胰蛋白酶(批号 T1300)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL 试剂盒(批号 E-CK-A320)购自 Elabscience 公司;ECL 化学发光试剂盒(批号 CW0049M)购自北京康为世纪生物科技有限公司;三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合转运蛋白 B1(ATP-binding cassette transporter B1, ABCB1)抗体(批号 GR3219236-20)、Bcl-2 抗体(批号 GR3325129-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 GR3368232-18)、 β -actin 抗体(批号 GR208162-4)购自英国 Abcam 公司;ABCG2 抗体(批号 87396)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体(批号 10017175)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)抗体(批号 00103575)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 20000730)、HRP 标记的山羊抗兔小鼠 IgG 二抗(批号 20000768)购自美国

Proteintech 公司;p-PI3K 抗体(批号 44399)、p-Akt 抗体(批号 44546)购自 GeneTex 公司;Transwell 小室(批号 14312)购自 LABSELECT 公司。

1.3 仪器

3111 型水套式 CO₂ 培养箱、Multiskan FC 型全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);PowerPac HV 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Ti2-U 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7 细胞用含 1%双抗、10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。

MCF-7/DOX 细胞用含 250 ng/mL DOX 的 RPMI 1640 完全培养基,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养以维持其耐药性,实验前至少 7 d 更换为不含药的培养基以进行后续实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中,给予梯度浓度(0~100 μ mol/mL)的 DOX 分别作用于 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞 48 h,评估 MCF-7/DOX 细胞的耐药系数;给予梯度浓度(0~500 mg/mL)的 TGT 作用于 MCF-7/DOX 细胞 48 h,评估 TGT 对细胞毒性的影响;给予 TGT(15.63、31.25 mg/mL)分别联合梯度浓度的(0~100 μ mol/mL)DOX 作用于 MCF-7/DOX 细胞 48 h,评价 TGT 联合 DOX 逆转耐药倍数。另设置不接种细胞不含药物的空白孔,待药物作用 48 h 后,每孔加入 10% CCK-8 溶液 100 μ L,继续培养 1 h,使用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率,采用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制细胞生存曲线图,并计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$$\text{耐药系数} = \text{IC}_{50}(\text{MCF-7/DOX 细胞}) / \text{IC}_{50}(\text{MCF-7 细胞})$$

$$\text{耐药逆转倍数} = \text{IC}_{50}(\text{DOX}) / \text{IC}_{50}(\text{TGT+DOX})$$

2.3 TGT 与 DOX 联合用药协同/拮抗作用分析

采用 Combenefit 软件定量评估 TGT 与 DOX 联合的协同/拮抗效应。根据已测得的 TGT 和 DOX 分别作用于 MCF-7/DOX 细胞的 IC₅₀ 值选定联合用药的梯度药物浓度,TGT、DOX 单独用药及联合用药分别作用于 MCF-7/DOX 细胞 48 h,CCK-8 法测定细胞存活率,将所得数据导入 Combenefit 软件,并使用 LOewe 模型进行协同/拮抗分析^[13]。

2.4 细胞克隆形成检测

取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞,以 5 000 个/孔接种于 12 孔板,细胞贴壁过夜。设置对照组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组、TGT (31.25 mg/mL) 组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) + TGT (31.25 mg/mL) 组,每 3 天更换 1 次培养基,连续培养 9 d, PBS 洗涤后用甲醇固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min。洗涤干燥后置于显微镜下观察细胞集落形成率并拍照,采用 Image J 软件对其进行定量分析。

2.5 细胞迁移能力检测

取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞,以 4×10^5 个/mL 重悬于 200 μL 无血清培养基,接种于 Transwell 小室的上室,下室分别加入 700 μL 完全培养基、含 DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 的完全培养基、含 TGT (31.25 mg/mL) 的完全培养基、含 DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) + TGT (31.25 mg/mL) 的完全培养基。孵育 48 h,除去上室细胞后,用 4% 多聚甲醛进行固定, PBS 洗涤,随后用 0.1% 结晶紫染色,在显微镜下拍摄细胞迁移图像,利用 Image J 软件对下室染色细胞进行定量分析。

2.6 TUNEL 染色观察细胞凋亡情况

取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞,以 5×10^4 个/孔接种于激光共聚焦皿,设置对照组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组、TGT (31.25 mg/mL) 组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) + TGT (31.25 mg/mL) 组,药物作用 48 h 后用 PBS 洗涤 1 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,加入 0.2% Triton X-100 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书进行 TUNEL 染色,荧光显微镜拍照,观察每组细胞的凋亡情况,利用 Image J 软件对凋亡细胞进行定量分析。

2.7 Rho-123 外排实验

取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞,设置对照组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组、阳性对照药物维拉帕米 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组。药物作用 48 h 后,弃去培养基,加入终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rho-123,继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,弃上清, PBS 洗涤 3 次后,胰酶消化制备细胞悬液,重悬于 0.5 mL PBS 中,立即采用流式细胞仪检测,使用 CytExpert 2.4 软件分析 Rho-123 的平均荧光强度。

2.8 生物信息学分析

基于文献整合 TGT 活性成分,并利用 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 平台,以 “homo sapiens” 为选择物种,按照成

分通过作用于该靶标产生活性的概率 “probability > 0” 为筛选条件预测潜在活性成分的作用靶标^[14]。通过 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html>),对潜在作用靶标进行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,并设置 $P < 0.01$,选取其 Top 10 展示。将 PI3K/Akt 信号通路 (Top 1) 富集靶标导入 STRING 平台 (<http://cn.string-db.org/>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建,并使用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析,筛选核心靶标。

以 “breast cancer doxorubicin resistance” 为关键词,在 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov-s.dres.hactcm.edu.cn/geo/>) 中检索并下载 GSE125187 基因表达谱,利用 Sangerbox 3.0 (sangerbox.com/login.html) 分析 MCF-7 细胞株与 MCF-7/DOX 细胞株差异表达基因 (differential expression genes, DEGs),以 $|\log_2\text{FC}| > 0.585$ 和 $P < 0.05$ 为筛选条件,并将筛选出的 DEGs 作为乳腺癌 DOX 耐药靶标,基于 Metascape 对 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析,设置 $P < 0.01$,选取结果 Top 10 展示。利用 STRING 平台对 PI3K/Akt 信号通路 (Top 1) 富集靶标构建 PPI 网络图,并进行可视化分析。

2.9 Western blotting 实验

取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞,以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板中,设置对照组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组、TGT (31.25 mg/mL) 组、DOX (0.5 $\mu\text{mol/L}$) + TGT (31.25 mg/mL) 组。待细胞贴壁后,加入相应药物作用 48 h,收集细胞,加入 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min,每 10 分钟涡旋 1 次,充分裂解后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。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,于 5% 脱脂牛奶中封闭, TBST 洗膜 10 min,洗涤 3 次,分别加入 p-PI3K、p-Akt、PI3K、Akt、Bcl-2、Bax、ABCB1、ABCG2、 β -actin 抗体 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗膜,加入相应二抗 (1 : 5 000),室温孵育 2 h,洗膜后使用 ECL 发光法显影,利用 Image J 软件对图像进行分析。

2.10 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行分析并作图,两样本均数比较采用 t 检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析。

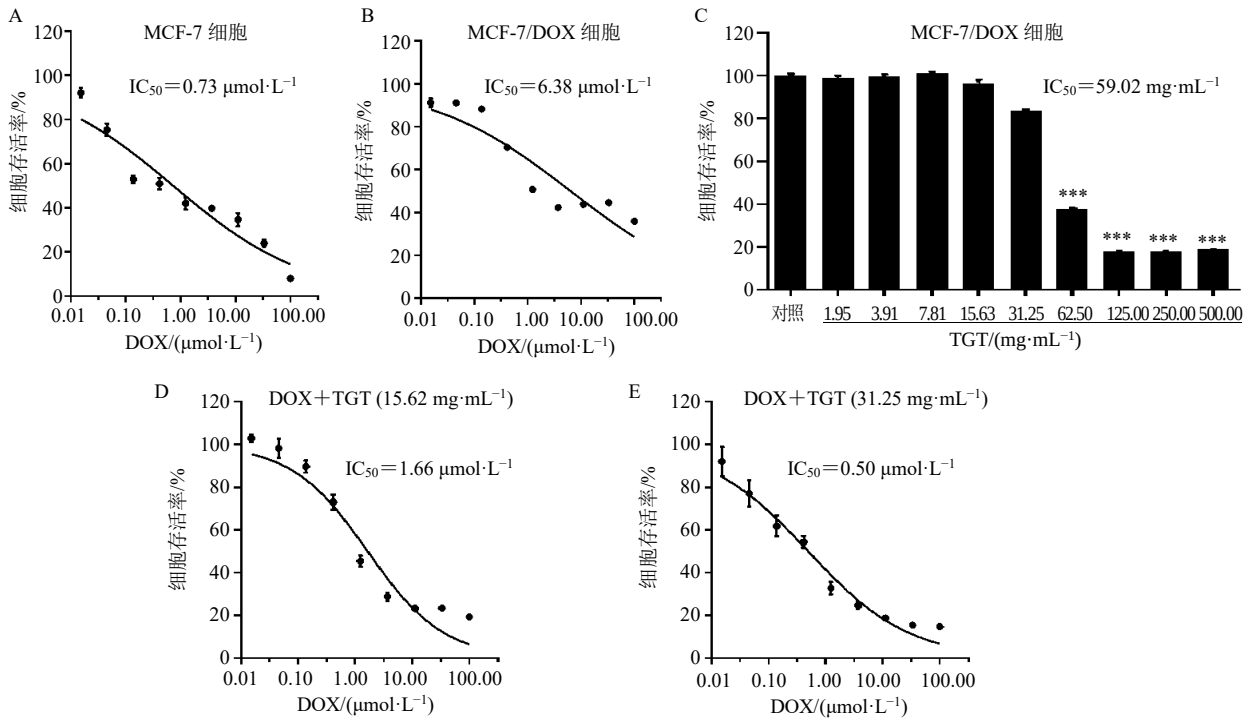
3 结果

3.1 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞的耐药逆转作用

CCK-8 结果显示,梯度浓度 DOX 作用于 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞 48 h 后, IC₅₀ 值分别为 0.73、6.38 μmol/L (图 1-A、B), 计算所得 MCF-7/DOX 细胞的耐药系数为 8.74, 表明 MCF-7/DOX 细胞对 DOX 具有较强的耐药性。

进一步检测 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞毒性, 如图 1-C 所示, TGT 对 MCF-7/DOX 细胞增殖具有抑

制作用, 其 IC₅₀ 值为 59.02 mg/mL; 当 TGT 质量浓度为 62.50 mg/mL 时, MCF-7/DOX 细胞存活率为 37.91%, TGT 有明显的毒性 ($P<0.001$); 当 TGT 质量浓度为 31.25 mg/mL 时, 有超过 80% 以上细胞均可存活, 表明 TGT 在 31.25 mg/mL 质量浓度下对细胞无明显杀伤作用。因此, 选择 31.25 mg/mL 作为 TGT 的最大无显著杀伤剂量进行后续实验, 并且选用 15.63 mg/mL 来验证 TGT 活性是否具有剂量相关性。



A-不同浓度 DOX 对 MCF-7 细胞活力的影响; B-不同浓度 DOX 对 MCF-7/DOX 细胞活力的影响; C-不同质量浓度 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞活力的影响; D-TGT (15.63 mg·mL⁻¹) 联合不同浓度 DOX 对 MCF-7/DOX 细胞活力的影响; E-TGT (31.25 mg·mL⁻¹) 联合不同浓度 DOX 对 MCF-7/DOX 细胞活力的影响; 与对照组比较: *** $P<0.001$ 。

A-effect of different concentrations of DOX on cell viability of MCF-7 cells; B-effect of different concentrations of DOX on cell viability of MCF-7/DOX cells; C-effect of different concentrations of TGT on cell viability of MCF-7/DOX cells; D-effect of TGT (15.63 mg·mL⁻¹) combined with different concentrations of DOX on cell viability of MCF-7/DOX cells; E-effect of TGT (31.25 mg·mL⁻¹) combined with different concentrations of DOX on cell viability of MCF-7/DOX cells; *** $P<0.001$ vs control group.

图 1 TGT 联合 DOX 逆转 MCF-7/DOX 细胞的耐药性 ($n=6$)
Fig. 1 TGT combined with DOX reversed drug resistance of MCF-7/DOX cells ($n=6$)

CCK-8 检测 TGT 联合 DOX 后对 MCF-7/DOX 细胞增殖抑制作用, 结果显示, TGT (15.63、31.25 mg/mL) 分别联合梯度浓度 DOX 作用于 MCF-7/DOX 细胞后, IC₅₀ 值分别为 1.66、0.5 μmol/L (图 1-D、E), 相较于 DOX 单独作用于 MCF-7/DOX 细胞的 IC₅₀ 值 (6.38 μmol/L) 显著降低, 说明 TGT 对 MCF-7/DOX 耐药株 DOX 耐药性具有显著逆转作用, 耐药逆转倍数分别为 3.84、12.6 倍 (表 1)。

表 1 TGT 联合 DOX 逆转 MCF-7/DOX 细胞耐药
Table 1 TGT combined with DOX reversed MCF-7/DOX cells resistance

细胞	药物	IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)	逆转倍数
MCF-7	DOX	0.73	—
MCF-7/DOX	DOX	6.38	—
MCF-7/DOX	DOX+TGT (15.63 mg·mL ⁻¹)	1.66	3.84
MCF-7/DOX	DOX+TGT (31.25 mg·mL ⁻¹)	0.50	12.76

3.2 TGT 协同 DOX 抑制 MCF-7/DOX 细胞增殖和迁移

通过 Combenefit 软件,使用 Loewe 模型定量分析 TGT 与 DOX 联用的药物相互作用。结果显示,当 TGT (31.25 mg/mL) 与 DOX (0.5 μ mol/L) 联合使用时,药物协同作用得分较高,说明该浓度下 TGT 与 DOX 具较好的协同作用(图 2-A),因此后续选择该浓度进行药效和机制验证。为了进一步明确 TGT 联合 DOX 对 MCF-7/DOX 细胞生长的协同抑制作用,通过 CCK-8 实验和细胞克隆集落形成实验进行验证。结果显示,TGT 联合 DOX 用药组与 TGT、DOX 单独用药组相比细胞活力受到显著抑制($P<0.01$,图 2-B),同时,联合用药组细胞克隆形成数量较单独用药组相比也显著降低($P<0.001$,图 2-C)。

通过 Transwell 实验检测联合用药对 MCF-7/DOX 细胞迁移的调控作用,与 DOX、TGT 单独

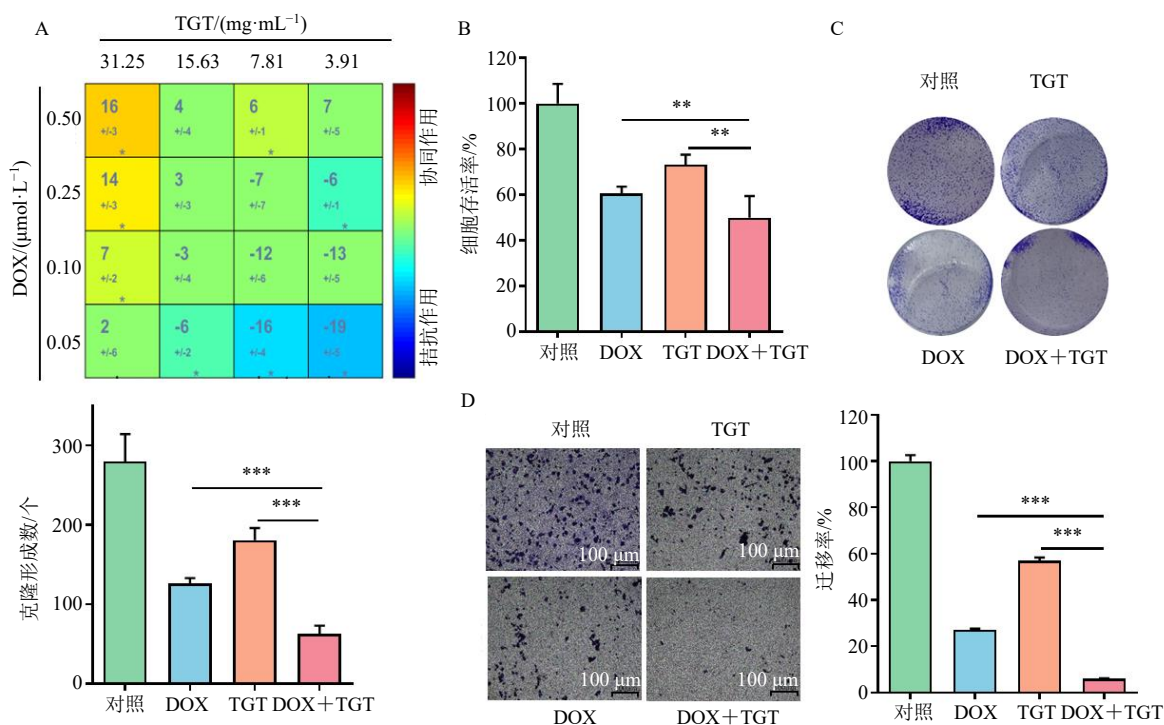
用药组相比,TGT 联合 DOX 组显著抑制了 MCF7/DOX 细胞的迁移能力($P<0.001$,图 2-D)。

3.3 TGT 协同 DOX 促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡

采用 TUNEL 染色法检测 TGT 协同 DOX 对 MCF-7/DOX 细胞凋亡的影响,凋亡细胞被染成绿色即为阳性表达,如图 3 所示,DOX、TGT 单独处理组细胞的凋亡率分别为 32.00%和 24.66%;TGT 联合 DOX 组细胞的凋亡率为 49.73%,凋亡率较 DOX、TGT 单独用药组显著升高($P<0.01$),表明 TGT 联合 DOX 给药能够协同促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡。

3.4 TGT 抑制 MCF-7/DOX 细胞外排功能

ABCB1 蛋白是 ABC 转运蛋白家族成员,在乳腺癌细胞中高表达能够促进化疗药物外排,DOX 为 ABCB1 转运蛋白底物^[15]。Western blotting 结果(图 4-A)显示,与 MCF-7 敏感株细胞相比,MCF-7/DOX 耐药细胞中 ABCB1 蛋白呈现高表达($P<0.001$),

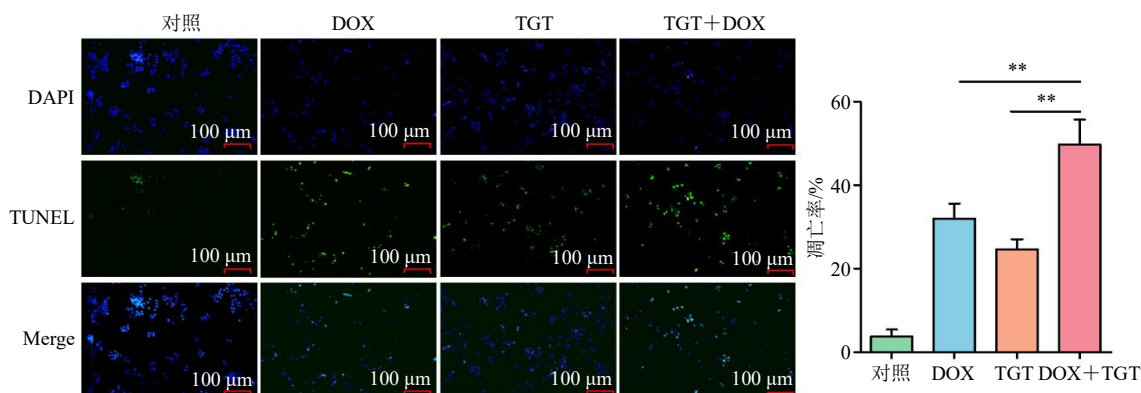
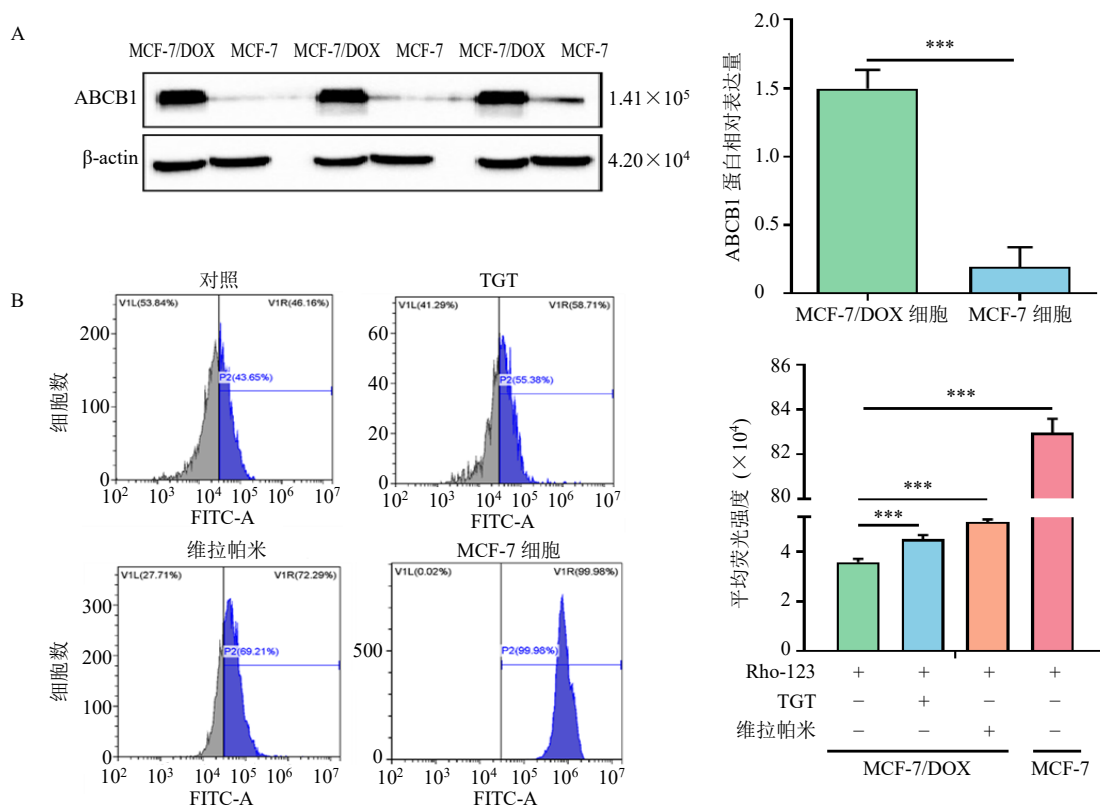


A-TGT 联合 DOX 作用于 MCF-7/DOX 细胞的协同/拮抗得分 ($n=3$); B-TGT、DOX 单独及两者联合对 MCF-7/DOX 细胞活力的抑制作用 ($n=6$); C-TGT、DOX 单独及联合作用于 MCF-7/DOX 细胞的克隆形成分析 ($n=3$); D-Transwell 小室法检测 TGT、DOX 及其联合作用对 MCF-7/DOX 细胞迁移能力的影响 ($n=3$, $\times 100$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下图同。

A-synergistic/antagonistic score of TGT combined with DOX on MCF-7/DOX cells ($n=3$); B-inhibitory effects of TGT and DOX alone or in combination on viability of MCF-7/DOX cells ($n=6$); C-clone formation analysis of MCF-7/DOX cells treated with TGT and DOX alone and in combination ($n=3$); D-effects of TGT and DOX alone or in combination on migration ability of MCF-7/DOX cells detected by Transwell assay ($n=3$, $\times 100$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ same as below figures.

图 2 TGT 联合 DOX 抑制 MCF-7/DOX 细胞的增殖和迁移

Fig. 2 TGT combined with DOX inhibited proliferation and migration of MCF-7/DOX cells

图 3 TGT 联合 DOX 协同促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 3 TGT combined with DOX synergistically promotes apoptosis in MCF-7/DOX cells ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A-MCF-7/DOX 和 MCF-7 细胞中 ABCB1 蛋白表达; B-TGT 对 MCF-7/DOX 细胞内 Rho-123 蓄积的影响。

A-ABCB1 protein expression in MCF-7/DOX and MCF-7 cells; B-effect of TGT on intracellular accumulation of Rho-123 in MCF-7/DOX cells.

图 4 TGT 抑制 MCF-7/DOX 细胞的外排功能 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 4 TGT inhibited efflux function of MCF-7/DOX cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表明耐药细胞株具有较强的药物外排能力。Rho-123 外排实验可用来评估细胞外排功能,进一步采用流式细胞术检测 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞 Rho-123 外排的影响,以评估 TGT 对 MCF-7/DOX 细胞外排功能调控作用。如图 4-B 所示,乳腺癌敏感株 MCF-7 细胞内 Rho-123 蓄积量最高(FITC 右移最为显著);

MCF-7/DOX 细胞内 Rho-123 蓄积水平显著低于 MCF-7 细胞 ($P < 0.001$),说明 MCF-7/DOX 细胞明显存在 Rho-123 外排现象;维拉帕米组 Rho-123 蓄积水平较对照组显著升高 ($P < 0.001$),TGT 给药后也显著提高 MCF-7/DOX 细胞内 Rho-123 蓄积 ($P < 0.001$),说明 TGT 具有潜在的抑制药物外排功能。

3.5 基于生物信息学探索 TGT 逆转乳腺癌 DOX 耐药的作用机制

首先,探究 TGT 中活性成分所能调控的关键靶标及信号通路。根据文献检索收集 TGT 主要活性成分 30 个(表 2),经 SwissTargetPrediction 平台预测 TGT 中潜在活性成分的作用靶标 326 个。利用 Metascape 数据库对潜在活性成分靶标进行 KEGG

通路富集分析,结果显示 TGT 主要参与调控 PI3K/Akt 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、凋亡信号通路等,其中 PI3K/Akt 信号通路位居首位(图 5-A)。进一步将 PI3K/Akt 信号通路对应的靶标构建 PPI 网络,连接度较高的核心靶标为 PIK3CA(度值=37)、PIK3CB(度值=30)、BCL2L1(度值=29)、PIK3CD

表 2 TGT 的活性成分

Table 2 Active components of TGT

编号	化合物	分子式	PubChem CID	编号	化合物	分子式	PubChem CID
TGT01 ^[7]	通关藤皂苷 H	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	75412560	TGT16 ^[7]	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	370
TGT02 ^[7]	通关藤苷元乙	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	12137734	TGT17 ^[18]	对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	637542
TGT03 ^[7]	通光散苷 A	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₂	91885077	TGT18 ^[18]	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1794427
TGT04 ^[16]	通关藤苷 F	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₂	91895269	TGT19 ^[16]	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	9798666
TGT05 ^[16]	通关藤苷元甲	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	101377895	TGT20 ^[17]	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5280633
TGT06 ^[17]	通关藤苷 G	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₄	44561398	TGT21 ^[16]	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	445858
TGT07 ^[16]	通关藤苷 I	C ₄₄ H ₆₂ O ₁₄	91973812	TGT22 ^[7]	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	8468
TGT08 ^[8]	通关藤苦苷 H	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	101743841	TGT23 ^[18]	右旋奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	6508
TGT09 ^[18]	通关藤苦苷 K	C ₅₀ H ₇₂ O ₁₉	101377894	TGT24 ^[18]	莽草酸	C ₇ H ₁₀ O ₅	8742
TGT10 ^[17]	通关藤苦苷 I	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₂	101377892	TGT25 ^[17]	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	10742
TGT11 ^[7]	通关藤苦苷 A	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₄	11228220	TGT26 ^[18]	2,3-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄	19
TGT12 ^[7]	通关藤苦苷 C	C ₄₇ H ₆₈ O ₁₄	11320433	TGT27 ^[18]	异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	5281780
TGT13 ^[18]	通关藤苦苷 G	C ₄₀ H ₆₂ O ₁₃	11274200	TGT28 ^[18]	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	6474310
TGT14 ^[8]	2,6-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄	9338	TGT29 ^[7]	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	689043
TGT15 ^[8]	1,3-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	6474640	TGT30 ^[18]	异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	6474309

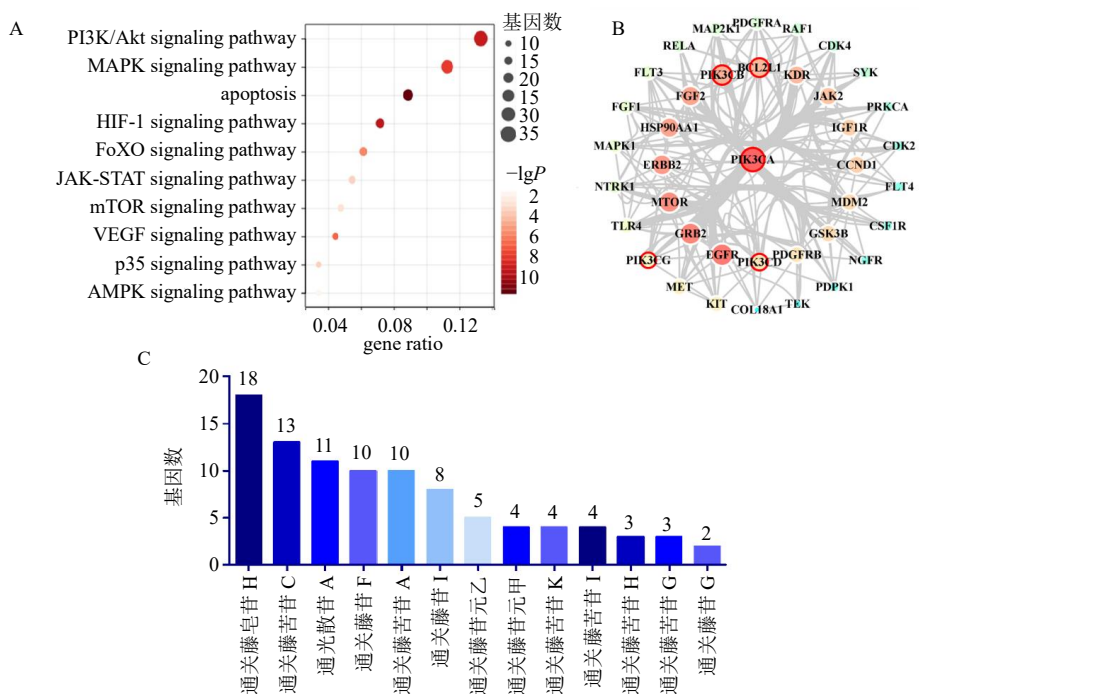


图 5 TGT 潜在活性成分筛选及关键通路富集分析

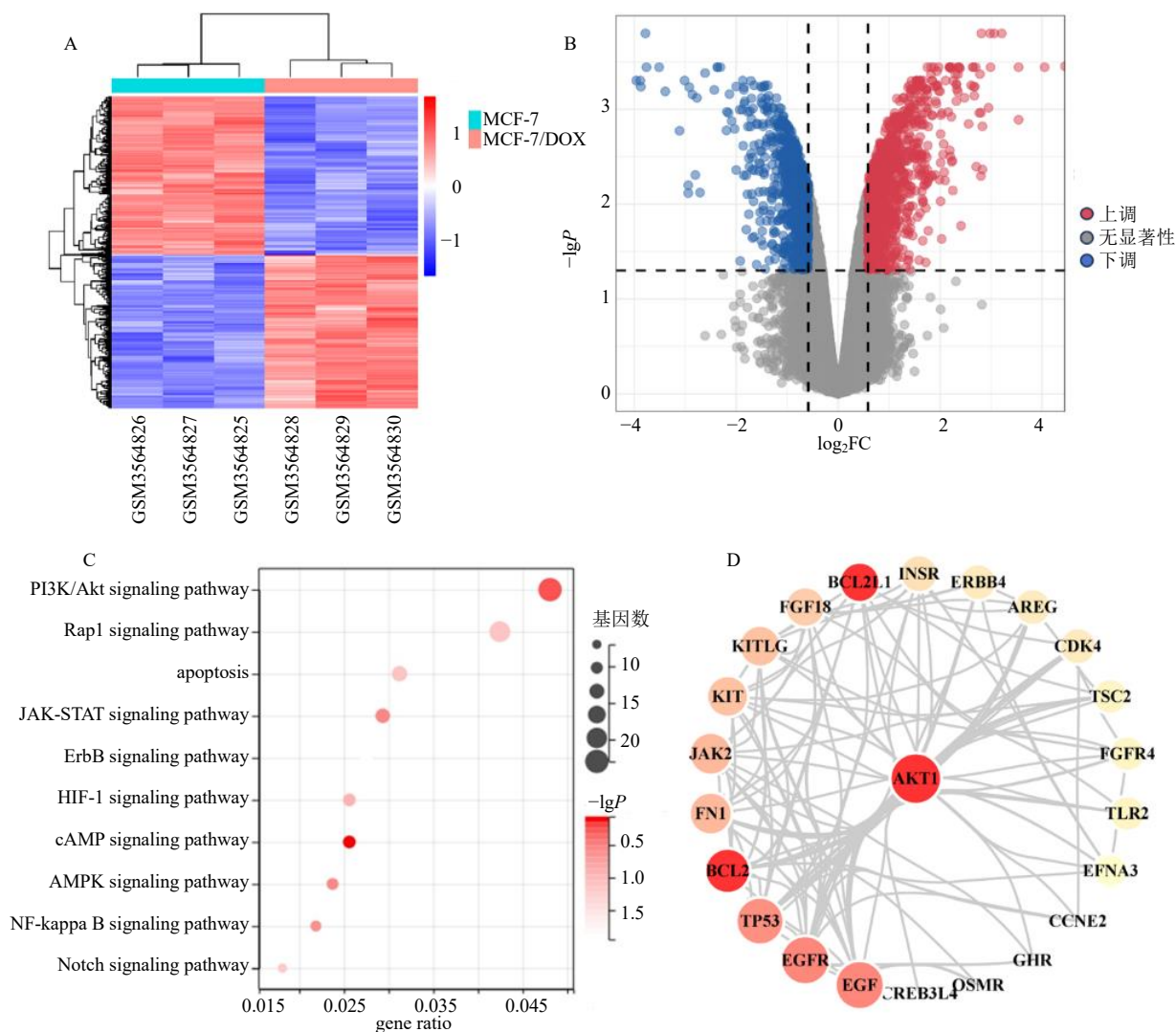
Fig. 5 Screening of potential active components of TGT and enrichment analysis of key pathways

(度值=25)、PIK3CG(度值=23)等(图 5-B)。统计 TGT 潜在活性成分靶标在 PI3K/Akt 信号通路的贡献值,结果显示通关藤苷 H、通关藤苦苷 C、通关散苷 A 等成分起主要调控作用(图 5-C)。

基于 GEO 数据库探究乳腺癌 DOX 耐药的关键靶标及信号通路。GSE125187 基因表达谱的芯片平台为 GPL16686,进一步对 MCF-7 组和 MCF-7/DOX 组筛选 DEGs,分析得到 DEGs 823 个,其中上调基因 438 个、下调基因 385 个(图 6-A、B)。基于 Metascape 数据库对 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析,结果显示乳腺癌 DOX 耐药与 PI3K/Akt 信号通

路、Ras 相关蛋白 1(Ras-proximate-1, Rap1)信号通路、凋亡信号通路等密切相关,其中 PI3K/Akt 信号通路相关性最强(图 6-C)。进一步对 PI3K/Akt 信号通路中的靶标构建 PPI 网络,结果发现 AKT1(度值=37)、BCL2(度值=19)、BCL2L1(度值=12)等为该通路中的核心靶标(图 6-D)。

上述分析结果显示,乳腺癌 DOX 耐药与 PI3K/Akt 信号通路相关性最强,同时 TGT 也主要参与调控 PI3K/Akt 信号通路,提示 TGT 可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路逆转乳腺癌 MCF-7/DOX 细胞耐药。



A-MCF-7 组和 MCF-7/DOX 组 DEGs 的分层聚类热图; B-GSE125187 的火山图; C-DEGs 的 KEGG 通路富集分析; D-PI3K/Akt 通路靶标的 PPI 网络构建(红色代表 PI3K/Akt 信号通路的关键靶标)。

A-hierarchical clustering heat map of DEGs in MCF-7 group and MCF-7/DOX group; B-volcano plot of GSE125187; C-KEGG pathway enrichment analysis of DEGs; D-PPI network construction of PI3K-Akt pathway targets (red represents key target of PI3K/AKT signaling pathway).

图 6 乳腺癌 DOX 耐药的 GEO 分析结果

Fig. 6 GEO analysis results of DOX resistance in breast cancer

3.6 TGT 协同 DOX 抑制 PI3K/Akt 信号通路

基于生物信息学分析结果,进一步采用 Western blotting 实验对富集的 PI3K/Akt 信号通路进行验证。如图 7-A、B 所示, TGT 和 DOX 联用组与 DOX、TGT 单独用药组相比, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 值均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明 TGT 联合 DOX 能够抑制 PI3K/Akt 信号通路。药效学结果显示, TGT 联合 DOX 可协同促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡 (图 3)。PI3K 活化可激活 Akt, 磷酸化后的 Akt 可调节 Bax、Bcl-2 等细胞因子, 进而调节细胞凋亡, 使得肿瘤细胞产生凋亡抵抗^[16]。因此, 进一步通过 Western blotting 实验对 PI3K/Akt 信号通路下游 Bax、Bcl-2 蛋白表达进行检测。如图 7-C、D 所示,

TGT 和 DOX 联用组与 DOX、TGT 单独用药组相比, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低 ($P<0.01$), 促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001)。以上研究结果表明, TGT 协同 DOX 可通过抑制 PI3K/Akt 介导的凋亡相关信号通路进而缓解 MCF-7/DOX 细胞耐药, 与生物信息学预测结果相符。

3.7 TGT 抑制 ABCB1、ABCG2 蛋白表达

药效学结果显示 TGT 可显著抑制 MCF-7/DOX 细胞的外排功能, ABCB1 和 ABCG2 为药物外排蛋白, 通过 Western blotting 实验检测 TGT 对药物外排相关蛋白 ABCB1、ABCG2 表达的调控作用。如图 8 所示, 与对照组比较, TGT 显著降低 ABCB1、

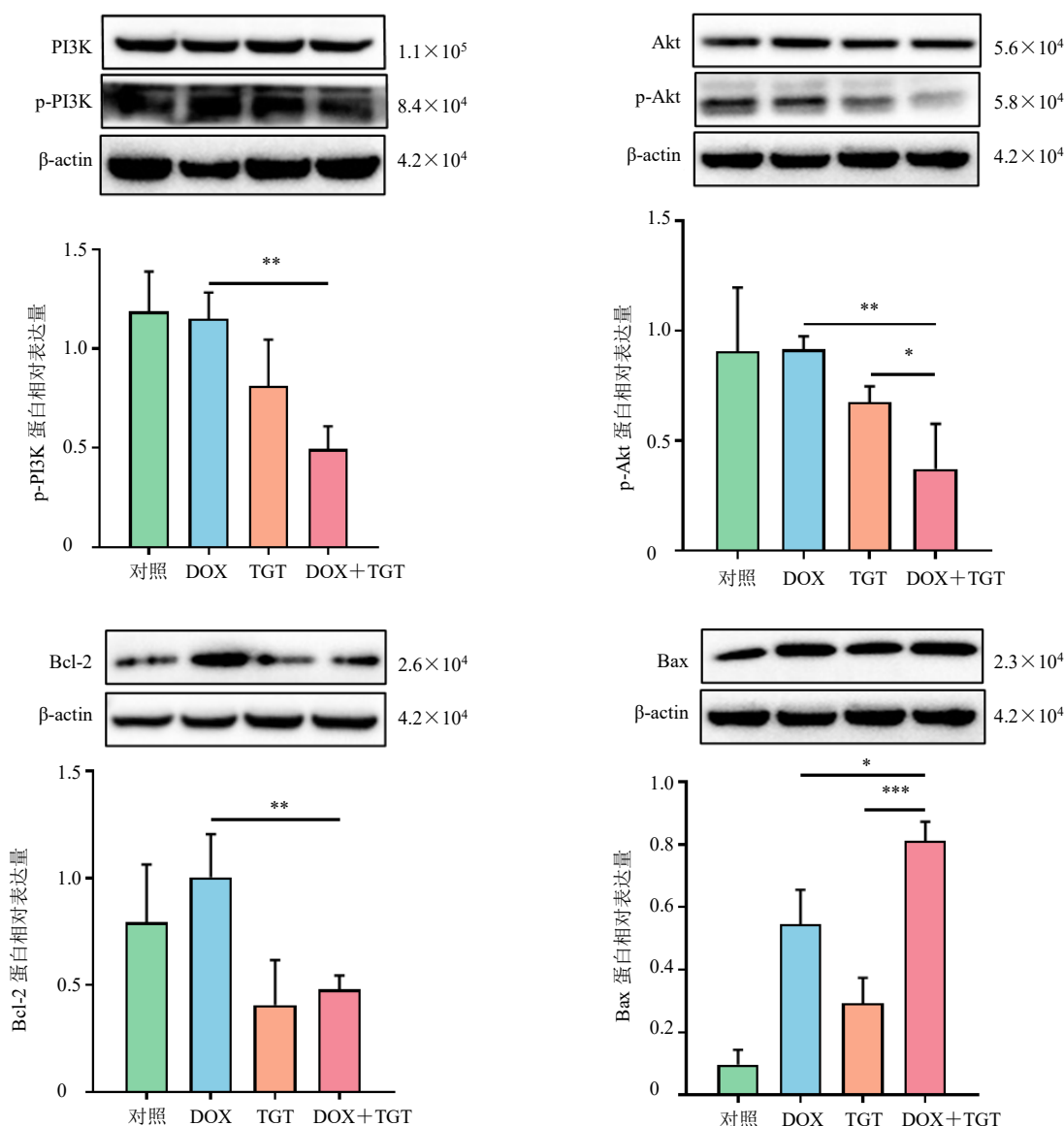


图 7 TGT 联合 DOX 抑制 PI3K/Akt-凋亡信号通路 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 TGT combined with DOX inhibits PI3K/Akt-apoptosis signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

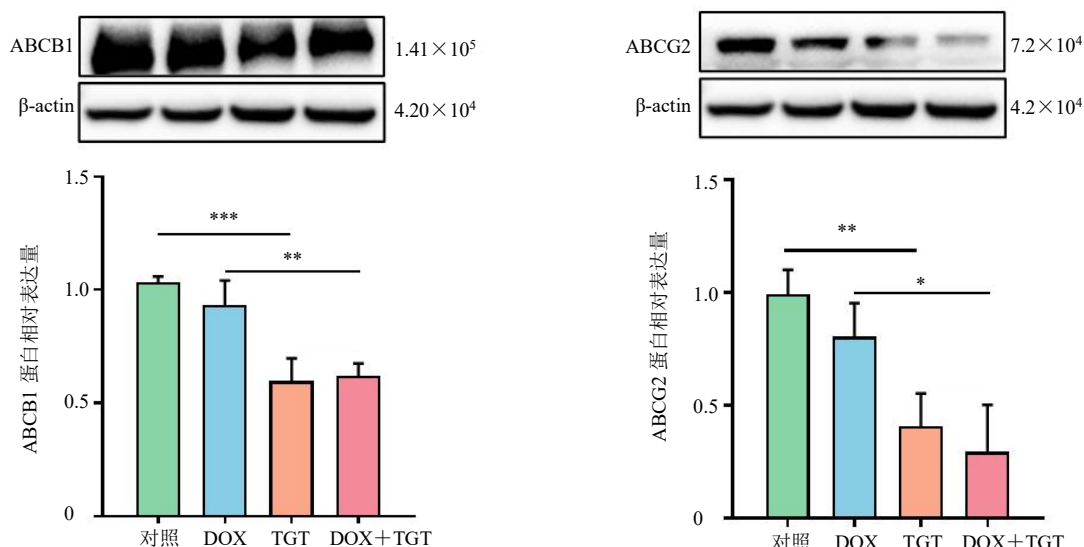


图 8 TGT、DOX 单独及联合作用于 MCF-7/DOX 细胞后 ABCB1、ABCG2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 ABCB1, ABCG2 protein expressions in MCF-7/DOX cells after treatment of TGT, DOX alone or in combination ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ABCB1 蛋白表达水平 ($P<0.01$ 、 0.001)，且 TGT 联合 DOX 给药组较 DOX 单独用药组相比，ABCB1、ABCG2 表达水平也显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。以上结果说明 TGT 通过降低 ABCB1 和 ABCG2 蛋白的表达，抑制 MCF-7/DOX 细胞的外排功能。

4 讨论

DOX 为乳腺癌化疗一线用药，但耐药性的产生严重限制其临床应用，寻找能够缓解 DOX 耐药的药物并研究其逆转机制对于乳腺癌治疗和提高患者生存率具有重要意义。先前研究表明，TGT 可通过激活 TAB1/转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor β activated kinase 1, TAK1) /p38 MAPK 信号通路逆转卵巢癌紫杉醇耐药^[17]，通关藤提取物可通过抑制 ABCG2 活性提高非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性^[8]，表明其具有缓解耐药的潜力，但 TGT 在乳腺癌细胞 DOX 耐药中的调控作用及作用机制鲜有报道。本研究发现 TGT (31.25、15.63 mg/mL) 可逆转 MCF-7/DOX 细胞的耐药性，其耐药逆转倍数分别为 12.6、3.8 倍。细胞克隆形成实验、Transwell 实验进一步明确 TGT 联合 DOX 能够显著抑制 MCF-7/DOX 细胞的克隆形成能力和迁移能力。提示 TGT 是乳腺癌细胞 DOX 化疗耐药的逆转剂，TGT 与 DOX 联合治疗方案是乳腺癌治疗合理且高效的策略。

基于中药“多成分、多靶点、多通路”的协同

作用特点，采用生物信息学方法探索 TGT 缓解乳腺癌 DOX 耐药的潜在作用机制。结果显示，TGT 潜在活性成分主要参与 PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、凋亡信号通路等调控作用，同时乳腺癌 DOX 耐药主要与 PI3K/Akt 信号通路、Rap1 信号通路、凋亡信号通路相关，提示 TGT 可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路逆转乳腺癌 DOX 耐药。

PI3K/Akt 信号通路在介导肿瘤多药耐药导致化疗和放疗抵抗方面发挥着重要作用^[18]。文献报道 TGT 可通过调控 PI3K/Akt 通路提高吉非替尼对耐药非小细胞肺癌 H460 和 H1975 裸鼠移植瘤的疗效^[19]；研究发现乳腺癌耐药性与 PI3K/Akt 通路密切相关^[20]。PI3K/Akt 信号通路对细胞凋亡发挥着重要调控的作用^[16]。细胞凋亡属于一种称程序性细胞死亡，是细胞最主要的死亡形式之一，有研究表明凋亡抵抗与乳腺癌中 DOX 耐药密切相关^[21]。此外，Bax 和 Bcl-2 在凋亡家族中为促进凋亡和抑制凋亡的代表蛋白，被认为是介导细胞凋亡内源性途径的重要调控因子^[16]。在肿瘤耐药进程中，PI3K 活化可以促使 Akt 发生磷酸化而激活，此时被激活的 Akt 通过磷酸化作用可调节 Bax、Bcl-2 等细胞因子，进而调节细胞凋亡，使得肿瘤细胞产生凋亡抵抗^[22]。体外细胞实验对 MCF-7/DOX 细胞进行 TUNEL 染色，结果显示 TGT 联合 DOX 可协同促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡。因此，进一步对 PI3K/Akt 信号通路下游 Bax、BCL-2 蛋白进行 Western blotting 检测，

结果显示与 DOX 单独组相比, TGT 联合 DOX 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, Bax 蛋白表达水平显著升高。综上所述, 表明 TGT 联合 DOX 后能够有效抑制 PI3K/Akt 介导的凋亡级联信号通路, 发挥逆转耐药的作用。

ABC 转运蛋白是负责药物外排的跨膜蛋白, 其蛋白家族中的 ABCB1 和 ABCG2 的主要功能是利用 ATP 水解产生的能量来增加外源性物质的外排, 可降低细胞内抗癌药物的浓度^[23]。多种化疗药物包括 DOX、顺铂、紫杉醇和氟尿嘧啶等都是 ABCB1 和 ABCG2 的反应底物^[23]。Hu 等^[24]研究发现 PI3K/Akt 通路能够调控 ABC 转运蛋白在人乳腺癌、肺癌和肝癌等多种肿瘤细胞中参与肿瘤细胞多药耐药。Sui 等^[25]研究发现在人结肠癌多药耐药中可通过抑制 PI3K/Akt 通路磷酸化, 降低 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的表达, 对其耐药的发生具有一定的逆转作用。Zhang 等^[26]研究发现当 PI3K 活性被抑制时可降低 ABC 蛋白家族中 P-gp、ABCG2 表达, 从而提高耐药细胞对药物敏感性。本实验通过 Rho-123 外排实验检测发现 TGT 能够增加 MCF-7/DOX 细胞中 Rho-123 含量, 通过 Western blotting 检测发现 TGT 能够显著降低 MCF-7/DOX 细胞中 ABCB1 和 ABCG2 蛋白的表达水平, 说明 TGT 能够抑制 ABC 转运蛋白表达, 增加化疗药物在细胞中的蓄积, 进而缓解 MCF-7/DOX 细胞耐药。

综上, 本研究结果证实 TGT 可有效缓解乳腺癌 MCF-7/DOX 细胞 DOX 耐药性, 并能够协同 DOX 抑制 MCF-7/DOX 细胞增殖、迁移, 促进 MCF-7/DOX 细胞凋亡, 而这其中 PI3K/Akt 介导的内源性凋亡信号通路及药物转运相关蛋白 ABCB1、ABCG2 发挥关键调控作用, 但是 TGT 相关体内研究及其相关信号通路调控作用还有待进一步验证。本研究揭示了 TGT 缓解乳腺癌 DOX 耐药细胞耐药性的作用机理, 为 TGT 在乳腺癌临床治疗中增敏 DOX, 缓解 DOX 耐药提供了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kashyap D, Pal D, Sharma R, *et al.* Global increase in breast cancer incidence: Risk factors and preventive measures [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 9605439.
- [2] Ongnok B, Chattipakorn N, Chattipakorn S C. Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions [J]. *Exp*

- Neurol*, 2020, 324: 113118.
- [3] Wijdeven R H, Pang B X, van der Zanden S Y, *et al.* Genome-wide identification and characterization of novel factors conferring resistance to topoisomerase II poisons in cancer [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(19): 4176-4187.
- [4] Lakshmikanthcharan S, Hisham M, Chaitanya Juluri S K, *et al.* Verapamil as an adjuvant treatment for drug-resistant epilepsy [J]. *Indian J Crit Care Med*, 2018, 22(9): 680-682.
- [5] Robey R W, Pluchino K M, Hall M D, *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 452-464.
- [6] Xu W C, Li B L, Xu M C, *et al.* Traditional Chinese medicine for precancerous lesions of gastric cancer: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112542.
- [7] 李双凤, 黄家彦, 韩笑, 等. 通关藤抗肿瘤主要成分及作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(1): 187-197.
- [8] Zhao C, Hao H F, Zhao H Y, *et al.* *Marsdenia tenacissima* extract promotes gefitinib accumulation in tumor tissues of lung cancer xenograft mice via inhibiting ABCG2 activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 255: 112770.
- [9] 阮立为, 邓甬川. 消癌平对乳腺癌新辅助化疗疗效的增强作用及其机制探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(4): 749-752.
- [10] 徐庆. 通关藤注射液对三阴乳腺癌细胞凋亡及 SBEM 基因表达影响的研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2023.
- [11] 张葳, 陈君君, 杨姣, 等. 通关藤注射液通过调控 ATF3 表达对紫杉醇抗乳腺癌细胞的增效作用 [J]. *中成药*, 2022, 44(6): 1774-1782.
- [12] 杨晓钟, 王荧, 党楠, 等. 消癌平注射液联合表柔比星新辅助化疗治疗三阴性乳腺癌的临床疗效 [J]. *肿瘤药*, 2019, 9(1): 130-132.
- [13] Preuer K, Lewis R P I, Hochreiter S, *et al.* DeepSynergy: Predicting anti-cancer drug synergy with Deep Learning [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(9): 1538-1546.
- [14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [15] Gottesman M M, Lavi O, Hall M D, *et al.* Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 85-102.
- [16] Pan Y D, Wang N, Xia P P, *et al.* Inhibition of Rac1 ameliorates neuronal oxidative stress damage via reducing Bcl-2/Rac1 complex formation in mitochondria through PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Exp Neurol*, 2018, 300: 149-166.

- [17] Kong Q W, Yang J, Li D, *et al.* Tongguanteng injection reverses paclitaxel resistance via upregulation of TAB1 expression in ovarian cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115728.
- [18] 汤庆丰, 孙健, 于卉, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路的中药抗肿瘤多药耐药作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(6): 78-82.
- [19] 韩淑燕, 郑文献, 何曦冉, 等. 消癌平注射液联合吉非替尼对耐药非小细胞肺癌 H460 和 H1975 裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 44-52.
- [20] Guerrero-Zotano A, Mayer I A, Arteaga C L. PI3K/AKT/mTOR: Role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(4): 515-524.
- [21] Christowitz C, Davis T, Isaacs A, *et al.* Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 757.
- [22] Liu J, Wu P, Xu Z H, *et al.* Ginkgolide B inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis and attenuates cytotoxicity via activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in H9c2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 310-316.
- [23] Qiao Y X, Jie-Chen Z, Liu J T, *et al.* Genome-wide identification of *Oryza sativa*: A new insight for advanced analysis of ABC transporter genes associated with the degradation of four pesticides [J]. *Gene*, 2022, 834: 146613.
- [24] Hu Y, Guo R, Wei J, *et al.* Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(12): e2020.
- [25] Sui H, Pan S F, Feng Y, *et al.* Zuo Jin Wan reverses P-gp-mediated drug-resistance by inhibiting activation of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 279.
- [26] Zhang L, Li Y, Wang Q, *et al.* The PI3K subunits, P110 α and P110 β are potential targets for overcoming P-gp and BCRP-mediated MDR in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 10.

[责任编辑 李亚楠]