

欧前胡素对乳腺癌他莫昔芬的多药耐药逆转作用及机制研究

吴凤玲¹, 李秋香¹, 李 清², 黄小英¹, 梁新丽¹, 廖正根¹, 汤喜兰³, 董 伟^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 岐黄国医书院, 江西 南昌 330025

3. 江西科技师范大学药学院, 江西 南昌 330013

摘要: 目的 研究欧前胡素对人乳腺癌 MCF-7/他莫昔芬 (tamoxifen, TAM) 的多药耐药逆转作用及相关机制。方法 分别用欧前胡素、TAM、欧前胡素联合他莫昔芬处理人乳腺癌 MCF-7 细胞和人乳腺癌他莫昔芬耐药株 MCF-7/TAM 细胞, 采用 MTT 法检测 MCF-7/TAM 细胞耐药性、细胞活力以及联合用药逆转倍数; 伤口愈合实验、Transwell 实验、集落形成实验检测 MCF-7/TAM 细胞迁移、侵袭和集落形成能力; 免疫印迹法检测细胞多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、多药耐药 1 (multidrug resistance 1, MDR1)、谷胱甘肽 S-转移酶 π (glutathione S-transferase π , GST- π) 蛋白表达情况变化; 将 MCF-7/TAM 细胞株接种于裸鼠皮下构建裸鼠乳腺癌 TAM 耐药移植瘤模型, 分别将成功构建移植瘤裸鼠随机分为对照组、TAM (4.6 mg/kg) 组、欧前胡素 (20 mg/kg) 组、TAM (4.6 mg/kg) 联合欧前胡素低剂量 (10 mg/kg) 组、TAM (4.6 mg/kg) 联合欧前胡素高剂量 (20 mg/kg) 组, ig 给药 21 d, 期间测量肿瘤体积并称重体质量; 给药结束后处死裸鼠剖取肿瘤组织称量肿瘤质量, 采用 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡情况; 采用免疫组化法检测增殖标志物 Ki-67 的蛋白表达情况及病理情况; 采用定量逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法和免疫印迹法检测多药耐药蛋白 MRP1、MDR1、GST- π 蛋白表达情况。**结果** 欧前胡素抑制 MCF-7/TAM 细胞增殖作用呈剂量相关性; 欧前胡素联合 TAM 给药组显著抑制 MCF-7/TAM 细胞迁移、侵袭和集落形成能力 ($P < 0.05$ 、 0.01)、显著下调多药耐药蛋白 MRP1、MDR1、GST- π 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 欧前胡素联合 TAM 能够逆转人乳腺癌 TAM 耐药的多药耐药性, 抑制肿瘤增殖 ($P < 0.05$)、增加肿瘤细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.01)、显著下调多药耐药蛋白 MRP1、MDR1、GST- π 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 欧前胡素可增强乳腺癌 MCF-7/TAM 细胞 TAM 的敏感性, 降低 MRP1、MDR1、GST- π 的蛋白表达, 抑制乳腺癌 TAM 的耐药性。

关键词: 欧前胡素; 乳腺癌; 他莫昔芬; 耐药性; 多药耐药蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0165-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.017

Reversal effect and mechanism of multidrug resistance of imperatorin in breast cancer tamoxifen

WU Fengling¹, LI Qiuxiang¹, LI Qing², HUANG Xiaoying¹, LIANG Xinli¹, LIAO Zhenggen¹, TANG Xilan³, DONG Wei¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine Nanchang 330004, China

2. Qihuang Chinese Medicine Academy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330025, China

3. School of Pharmacy Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China

Abstract: Objective Investigate the role of imperatorin in reversing multidrug resistance in breast cancer MCF-7/tamoxifen (TAM) cells and its related mechanism. **Methods** Breast cancer MCF-7 cells and MCF-7/TAM cells were treated with imperatorin, TAM,

收稿日期: 2024-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82060733); 江西省卫生健康委员会项目 (2023111141); 中药改良创新江西省重点实验室 (2024SSY07131); 大学生校级创新创业项目 (X202310412252); 校级研究生创新专项基金 (JZYC23S77, JZYC23S71); 江西中医药大学研究生教改项目 (jzyjg-2023-07)

作者简介: 吴凤玲, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: 13635968737@163.com

***通信作者:** 董 伟, 副教授, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: sober96@foxmail.com

and imperatorin combined with TAM *in vitro*, respectively. The drug resistance, cell viability and reversal ratio of MCF-7/TAM cells were detected by MTT assay. MCF-7/TAM cell migration, invasion and colony formation were evaluated by wound healing test, Transwell test and colony formation test, Western blotting was used to detect the changes in the protein expression of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), multidrug resistance 1 (MDR1) and glutathione S-transferase π (GST- π). The MCF-7/TAM cell line was inoculated subcutaneously in nude mice to construct a TAM resistant xenograft model of breast cancer in nude mice, and the nude mice who successfully constructed xenografts were randomly divided into control group, TAM (4.6 mg/kg) group, imperatorin (20 mg/kg) group, TAM (4.6 mg/kg) combined with imperatorin low-dose (10 mg/kg) group, and TAM (4.6 mg/kg) combined with imperatorin high-dose (20 mg/kg) group, ig administration was performed for 21 days, during which tumor volume was measured and body weight was weighed. After the end of administration, nude mice were sacrificed to dissect tumor tissues to weigh the tumor mass, and the apoptosis of tumor cells was detected by TUNEL method. Immunohistochemistry was used to detect the expression and pathology of marker of proliferation Ki-67. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR and Western blotting were used to detect the protein expressions of multidrug resistance proteins MRP1, MDR1 and GST- π . **Results** *In vitro*, imperatorin inhibited the proliferation of MCF-7/TAM cells in a dose-dependent manner, and the combination of imperatorin and TAM significantly inhibited the migration, invasion and colony formation ability of fine MCF-7/TAM cells ($P < 0.05$, 0.01), and significantly down-regulate the expression of multidrug resistant proteins MRP1, MDR1 and GST- π ($P < 0.05$, 0.01). *In vivo*, imperatorin combined with TAM could reverse the multidrug resistance of TAM-resistant human breast cancer, inhibit tumor proliferation ($P < 0.05$), increase tumor cell apoptosis ($P < 0.05$, 0.01), and significantly down-regulate the expression of multidrug resistant proteins MRP1, MDR1 and GST- π ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Imperatorin can enhance the TAM sensitivity of MCF-7/TAM cells, reduce the expression of MRP1, MDR1 and GST- π , and inhibit TAM resistance in breast cancer.

Key words: imperatorin; breast cancer; tamoxifen; drug resistance; multidrug resistance protein

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率极高，严重威胁女性健康^[1]。临床上，乳腺癌亚型包括雌激素受体阳性（estrogen receptor positive, ER⁺）乳腺癌、孕激素受体阳性（progesterone receptor positive, PR⁺）乳腺癌、人表皮生长因子受体 2 阳性（human epidermal growth factor receptor 2 positive, HER²⁺）乳腺癌和三阴（triple-negative breast cancer, TNBC）乳腺癌，而 ER⁺是最常见的乳腺癌亚型，主要通过内分泌疗法进行治疗^[2]。他莫昔芬（tamoxifen, TAM）作为乳腺癌内分泌治疗的一线药物，可通过与雌激素竞争性结合雌激素受体（estrogen receptor, ER）发挥抗癌效果，虽然患者最初对内分泌治疗反应良好，但随后出现的他莫昔芬耐药成为临床内分泌治疗的重要障碍，仍会导致患者总生存期和无进展生存期较低^[3]。研究显示，TAM 耐药与 ER 信号改变、串扰在 ER 和生长因子受体（epidermal growth factor receptor, GFR）网络之间，下调 ER，上调特异性 GFR，激活其他细胞增殖途径如磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路（包括抑癌基因失活和诱导核因子- κ B 信号转导）、肿瘤微环境改变等有关^[4-7]。

欧前胡素（imperatorin, IMP）是伞形科植物白芷的主要有效成分，属于 6,7-呋喃香豆素类化合物，

具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗抑郁、保护心血管、抗病毒、抗肿瘤等药理活性^[8-16]。近年来，呋喃香豆素类化合物无论是单独使用还是与其他药物联合使用作为潜在的抗肿瘤作用而受到关注。IMP 可拮抗 ATP 结合盒转运蛋白 G2（adenosine triphosphate binding cassette transporter G2, ABCG2）的活性，并以浓度依赖性方式逆转 ABCG2 介导的多药耐药（multidrug resistance, MDR）^[17]。前期研究显示，IMP 可增强多柔比星和紫杉醇耐药细胞的细胞毒性，下调 NOD/SCID 小鼠异种移植多柔比星耐药人白血病细胞系 K562/DOX 肿瘤中 p-糖蛋白的表达，增强了多柔比星的抗肿瘤作用^[18]。据此，本研究以人乳腺癌他莫昔芬耐药株 MCF-7/TAM 细胞为研究对象，考察 IMP 对 MCF-7/TAM 细胞他莫昔芬耐药的影响及逆转作用，为后期乳腺癌治疗提供基础。

1 材料

1.1 细胞株与动物

乳腺癌 MCF-7 细胞（批号 SCSP-531）购自上海中科院细胞库；MCF-7/TAM 细胞（批号 CQ80255）购自上海传秋生物科技有限公司。

无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级 BALB/c 雌性裸鼠，4 周龄，体质量 16~20 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号 SCHK（湘）2019-0004。动物饲养于温度 22~

25 ℃、相对湿度为 40%~60%、光照 12 h 的环境中。本研究动物实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 JZLLSC20210064)。

1.2 药品与试剂

IMP(批号 AF9061801, 质量分数>98%)购自成都埃法生物科技有限公司; TAM(批号 1010S022, 质量分数>98%); 总 RNA 提取试剂盒(批号 R1200)、胰岛素(批号 18830)、二甲基亚砷(批号 1209M032)、结晶紫染液(批号 G1065)、BCA 试剂盒(批号 PC0020)、PVDF 膜(批号 YA1701)均购自北京索莱宝生物科技有限公司; Matrigel 胶(批号 3632-001-02)购自美国 R&D Systems 公司; 胎牛血清(批号 2152050CP)、0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA(批号 2428760)购自美国 Gibco 公司; MEM 培养基(批号 MA0217)购自大连美仑生物科技有限公司; 雌激素(批号 S404601)购自美国 Selleck 公司; TUNEL 试剂盒(批号 G1501)、DAB 显色剂(批号 G1212)、苏木素染液(批号 G1004)、二甲苯(批号 10023418)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司; HE 染液套装(批号 G1003)购自国药集团化学试剂有限公司; TB Green Premix Ex Taq II(批号 AM61530A)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号 ALE1663A)购自日本 Takara 公司; PCR 引物由上海生工生物科技有限公司设计合成; 制胶试剂盒(批号 AP1001)、电泳液(批号 B2005)、转膜液(批号 B2006)均购自河南普利莱生物有限公司; 脱脂奶粉(批号 P0216)购自上海碧云天生物技术有限公司; 三色预染蛋白 Marker(批号 WJ103)购自上海雅酶生物医药科技有限公司。多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1, 批号 67228-1-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 60004-1-Ig)一抗、HRP 标记的二抗(批号 SA00001-1、SA00001-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 多药耐药 1(multidrug resistance 1, MDR1, 批号 sc-55510)一抗购自北京安诺伦生物科技有限公司; GST- π (批号 ab138491)一抗购自上海艾博抗贸易有限公司。

1.3 仪器

Bio-Rad 型 PCR、Bio-Rad 型蛋白质电泳及电转移装置(美国 Bio-Rad 公司); 3001 型酶标仪、ND2000 型核酸蛋白定量仪、ABI Veriti 型梯度 PCR、奥德赛红外荧光、Cryotome E 型冰冻切片机(美国

Thermo Fisher Scientific 公司)、ECLIPSE TS100-F 型倒置显微镜、Nikon Eclipse C1 型正置荧光显微镜、Nikon DS-U3 型成像系统(日本尼康仪器有限公司)、TDZ4A-WS 型台式低速离心机(湖南湘仪离心机有限公司)、TSY-B 型脱色摇床(武汉塞维尔生物科技有限公司)、Scientz-48L 型冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)、Donatello 型脱水机(意大利 DIAPATH 公司)、JB-P5 型包埋机(武汉俊杰电子有限公司)、RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养 MCF-7 细胞用含 10%胎牛血清、1%丙酮酸钠、0.01 mg/mL 胰岛素的 MEM 培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养; MCF-7/TAM 细胞另外加入 0.1 μ g/mL TAM 维持耐药性。当细胞生长密度达到 80%~90%, 用胰酶消化后传代。

2.1.2 MTT 法检测耐药细胞耐药性 设置空白孔, 取对数生长期的 MCF-7 细胞和 MCF-7/TAM 细胞以 1×10^4 个/孔分别接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 设置对照孔, 培养 24 h 细胞贴壁后, 分别加入 100 μ L 质量浓度为 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μ g/mL 的他莫昔芬溶液, 分别设置 5 个复孔, 药物干预 24、48、72 h 后, 每孔加入 100 μ L MTT 溶液, 培养箱孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 150 μ L DMSO, 避光摇床振摇 10 min, 多功能酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率、半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)和耐药倍数。

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

$$\text{耐药倍数} = \text{MCF-7/TAM 细胞 IC}_{50} / \text{MCF-7 细胞 IC}_{50}$$

2.1.3 MTT 法检测细胞存活率 设置空白孔, 取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 设置对照孔, 培养 24 h 细胞贴壁后, 分别加入 100 μ L 质量浓度为 3.125、6.250、12.500 μ g/mL 及 0.025、0.050、0.100、0.200 mg/mL 的 IMP 溶液, 设置 5 个复孔, 加药培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 100 μ L MTT 溶液, 培养箱孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 150 μ L DMSO, 避光摇床振摇 10 min, 多功能酶标仪测定 490 nm 处的 A 值, 计算细胞存活率及 IC₅₀。

2.1.4 MTT 法检测联合用药对 MCF-7/TAM 细胞的逆转倍数 设置对照孔, 取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L

细胞悬液, 设置对照孔, 培养 24 h 细胞贴壁后, 设置 5 个复孔, 分别加入 IMP 溶液 (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 与质量浓度为 2.5、5.0、10.0、15.0 $\mu\text{g/mL}$ TAM 溶液, 加药培养 24、48、72 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL MTT 溶液, 培养箱孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 150 μL DMSO, 避光摇床振摇 10 min, 多功能酶标仪测定 490 nm 处的 A 值, 计算联合用药后细胞存活率、 IC_{50} 及逆转倍数。

逆转倍数 = IC_{50} 单独用药 / IC_{50} 联合用药

2.1.5 细胞划痕实验 取对数生长期的 MCF-7/TAM 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 细胞贴壁后, 用 10 μL 无菌枪头在培养板底端划一字型划痕, 力度尽量保持一致, PBS 洗涤 3 次, 设置对照组、IMP (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 组、TAM (5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$) 组、联合给药 (IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 5 $\mu\text{g/mL}$ 、IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 10 $\mu\text{g/mL}$) 组, 各组加入 2 mL 含相应药物的 MEM 完全培养基, 培养 24 h 后在倒置显微镜下观察各组细胞迁移变化并拍照, 采用 Image-J 软件分析计算细胞迁移率。

细胞迁移率 = $1 - \text{划痕面积} / \text{初始划痕面积}$

2.1.6 Transwell 实验 取 100 μL Matrigel 基底胶 (与 MEM 培养基的比例为 1 : 8), 包被于上室, 培养箱孵育 3 h 后, 弃去残余液体, 加入 100 μL MEM 基础培养基基底膜水化 0.5 h 后, 弃去残余液体。取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞, 重悬, 加 200 μL 细胞混悬液 (1×10^6 个/mL) 至上室, 下室加入 600 μL 含 20% FBS 的 MEM 完全培养基, 培养 24 h, 设置对照组、IMP (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 组、TAM (5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$) 组、联合给药 (IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 5 $\mu\text{g/mL}$ 、IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 10 $\mu\text{g/mL}$) 组, 各组加入 200 μL 含相应药物的 MEM 培养基, 培养 24 h 后, PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 3 次, 结晶紫染色 15 min, 用棉签擦去上室残留细胞, 于倒置显微镜下拍照计数。

2.1.7 集落形成实验 取对数生长期 MCF-7/TAM 细胞以 1 000 个/孔的密度接种于 12 孔板, 设置对照组、IMP (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 组、TAM (5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$) 组、联合给药 (IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 5 $\mu\text{g/mL}$ 、IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 10 $\mu\text{g/mL}$) 组, 各组加入 1 mL 含相应药物的 MEM 培养基, 培养 7 d 后, PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色 15 min, PBS 洗涤并对可见菌落拍照计数。

2.1.8 免疫印迹法检测相关蛋白表达 取对数生

长期 MCF-7/TAM 细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 细胞贴壁后, 设置对照组、IMP (6.25 $\mu\text{g/mL}$) 组、TAM (5、10 $\mu\text{g/mL}$) 组、联合给药 (IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 5 $\mu\text{g/mL}$ 、IMP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ + TAM 10 $\mu\text{g/mL}$), 各组加入 2 mL 含相应药物的 MEM 完全培养基, 培养 24 h 后, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂冰上裂解 30 min, 收集细胞于 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清, BCA 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, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 加入一抗 MRP1、MDR1、GST- π 、GAPDH 抗体 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后加入对应二抗 (1 : 7 500), 室温孵育 1 h, 洗膜后使用 ECL 化学发光试剂盒在凝胶成像系统进行曝光拍照, 采用 Image-J 软件进行蛋白条带的灰度值分析, 以 GAPDH 为内参, 分析目标蛋白的表达。

2.2 动物实验

2.2.1 动物造模、分组及给药 裸鼠适应性喂养 1 周, 于接种细胞前 5 d 称量体质量, ip 长效雌激素 (1.5 mg/kg) 0.2 mL, 每 6 天 ip 1 次。将状态良好的 MCF-7/TAM 细胞胰酶消化 1 000 r/min 离心 5 min, 预冷 PBS 重悬离心 2 次后, 加入基底胶重悬, 调整细胞密度为 3×10^7 个/mL, 腋下皮下注射 0.1 mL 细胞悬液, 每天观察裸鼠饮食饮水、活动变化以及肿瘤大小。

当裸鼠肿瘤平均体积达到 50~100 mm³ 后, 随机分为模型组、TAM (4.6 mg/kg) 组、IMP (20 mg/kg) 组、TAM (4.6 mg/kg) + IMP 低剂量 (10 mg/kg) 联合组、TAM (4.6 mg/kg) + IMP 高剂量 (20 mg/kg) 联合组, 每组 6 只。各组给药剂量参考文献报道^[18-19], ig 给药 (10 mL/kg), 1 次/d, 模型组 ig 等体积生理盐水。给药后每隔 3 d 称量体质量并用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积, 21 d 后处死, 剥离肿瘤称量肿瘤质量, 计算各给药组抑瘤率。

肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$

抑瘤率 = $1 - \text{给药组平均肿瘤质量} / \text{模型组平均肿瘤质量}$

2.2.2 TUNEL 染色 冰冻切片固定, 蛋白酶 K 修复, PBS 清洗, 破膜, PBS 清洗, 加入 buffer 孵育, 加 TUNEL 反应液, PBS 清洗, 加 DAPI 染液复染, PBS 清洗, 加抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜观察拍照, 使用 Image-J 软件对各组的荧光强度进行计算。

2.2.3 Ki-67 染色^[20] 将组织石蜡切片用二甲苯

脱蜡至水,透明、浸蜡、石蜡包埋、切片 4 μm 厚度,抗原修复,PBS 清洗,加阻断内源性过氧化物酶后,PBS 清洗,加 buffer 孵育 10 min,一抗(1:1 000)孵育过夜,PBS 清洗,加入辣根过氧化物酶标记,PBS 清洗,DAB 染色,PBS 清洗,加苏木素复染 1 min,水洗,脱水,透明,封片,显微镜观察拍照,使用 Image-J 软件进行分析,计算阳性细胞百分比。

2.2.4 苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色 瘤体组织用 4%多聚甲醛固定,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片 4 μm 厚度,HE 染色,苏木素染色 5 min,水洗,伊红染色液染色 5 min,梯度乙醇脱水,二甲苯至透明、中性树胶封片,显微镜观察拍照。

2.2.5 RT-qPCR 检测相关基因表达 取肿瘤组织,按照总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,采用 RT-qPCR 扩增各目的基因,以 *GAPDH* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组 *MRP1*、*MDR1*、*GST-π* mRNA 相对表达,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'-3')
<i>GST-π</i>	F: TCGCTGATCACAACCTGCTG R: AGGTTACGTACTCAGGGGA
<i>MDR1</i>	F: GCTCCTGACTATGCCAAAGC R: TCTTCACCTCCAGGCTCAGT
<i>MRP1</i>	F: AGGACACGTCGGAACAAGTC R: TGACGATCAAAGCCTCCACC
<i>GAPDH</i>	F: GATTTGGTCGTATTGGGCGC R: TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC

2.2.6 免疫印迹法检测相关蛋白表达 取瘤体组织,液氮中研磨匀浆后,使用 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂提取组织中的总蛋白,BCA 测定蛋白浓度,电泳、转膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、显影,Image-J 软件进行蛋白条带的灰度值分析。以 *GAPDH* 为内参,分析目标蛋白的表达。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,若数据符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据通过单因素方差分析,组间比较采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 细胞实验

3.1.1 MCF-7/TAM 细胞耐药指数 如表 2 所示,

TAM 分别作用于 MCF-7 细胞和 MCF-7/TAM 细胞时,24、48、72 h 的 MCF-7 细胞的 IC_{50} 分别为 (4.35 ± 0.60) 、 (3.66 ± 0.44) 、 (3.41 ± 0.37) μg/mL,相同时间下,MCF-7/TAM 细胞的 IC_{50} 分别为 (19.40 ± 0.40) 、 (13.30 ± 0.55) 、 (9.35 ± 1.30) μg/mL,其耐药倍数分别为 4.46、3.64 和 2.74。结果表明,TAM 对 MCF-7 细胞和 MCF-7/TAM 细胞主要呈现时间相关性。

表 2 TAM 对 MCF-7/TAM 和 MCF-7 细胞的 IC_{50} 与耐药倍数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 IC_{50} value and resistance index of TAM on MCF-7/TAM and MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

给药时间/h	$IC_{50}/(\mu g \cdot mL^{-1})$		耐药倍数
	MCF-7/TAM 细胞	MCF-7 细胞	
24	19.40 ± 0.40	4.35 ± 0.60	4.46
48	13.30 ± 0.55	3.66 ± 0.44	3.64
72	9.35 ± 1.30	3.41 ± 0.37	2.74

3.1.2 IMP 对 MCF-7/TAM 细胞存活率的影响 随着 IMP 质量浓度的增加,MCF-7/TAM 细胞存活率逐渐降低,IMP 对 MCF-7/TAM 细胞存活率的影响表现出时间和浓度相关性。IMP 单独作用于 MCF-7/TAM 细胞 24、48、72 h 时, IC_{50} 分别为 (153.01 ± 24.43) 、 (34.22 ± 3.50) 、 (14.77 ± 1.63) μg/mL,表明 IMP 对 MCF-7/TAM 细胞的最大无毒浓度随着时间增加而显著降低,24、48、72 h 的无细胞毒性最大质量浓度分别为 6.25、3.13、1.56 μg/mL。

3.1.3 联合用药后 MCF-7/TAM 的逆转倍数 如表 3 所示,无毒浓度的 IMP 与 TAM 联合用药后可以显著降低 MCF-7/TAM 细胞存活率,表明 IMP 与 TAM 联合用药能够增强 MCF-7/TAM 细胞对 TAM 的敏感性。

3.1.4 联合用药后抑制 MCF-7/TAM 细胞的迁移能力 如图 1 所示,以各组 0 h 划痕面积为对照,分别给药 24 h 后,MCF-7/TAM 细胞向划痕中间迁移,除 IMP 组外,其余给药组均能显著抑制细胞迁移($P < 0.01$),与等剂量 TAM 组比较,联合给药组,迁移细胞数量显著减少($P < 0.05$),抑制迁移效果更好。

3.1.5 联合用药后抑制 MCF-7/TAM 细胞的侵袭能力 如图 2 所示,与对照组比较,除 IMP 组和 TAM 低剂量组外,给药组均能抑制细胞的侵袭,Transwell 小室中侵袭的细胞数量减少。与等剂量 TAM 组比较,联合给药组抑制能力更强、细胞侵袭数量

表 3 IMP 与 TAM 联合用药后对 MCF-7/TAM 细胞的
IC₅₀ 与逆转倍数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 IC₅₀ value and reversal ratio of MCF-7/TAM cells
treated with combined IMP and TAM

($\bar{x} \pm s, n=3$)		
给药时间/h	IC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	逆转倍数
24	8.89 $\pm$ 0.64	2.18
48	7.06 $\pm$ 0.88	1.90
72	5.20 $\pm$ 0.04	1.80

更少 ($P < 0.05$)。

3.1.6 联合用药后抑制 MCF-7/TAM 细胞的集落形成能力 如图 3 所示, 与对照组比较, 除 IMP 组外, 其余给药组均能显著抑制细胞的集落形成能力 ($P < 0.01$); 与等剂量 TAM 组比较, 联合给药组集落个数更少, 且 TAM 和 IMP 联合给药组中 TAM 浓度越高, 抑制集落形成能力更强 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

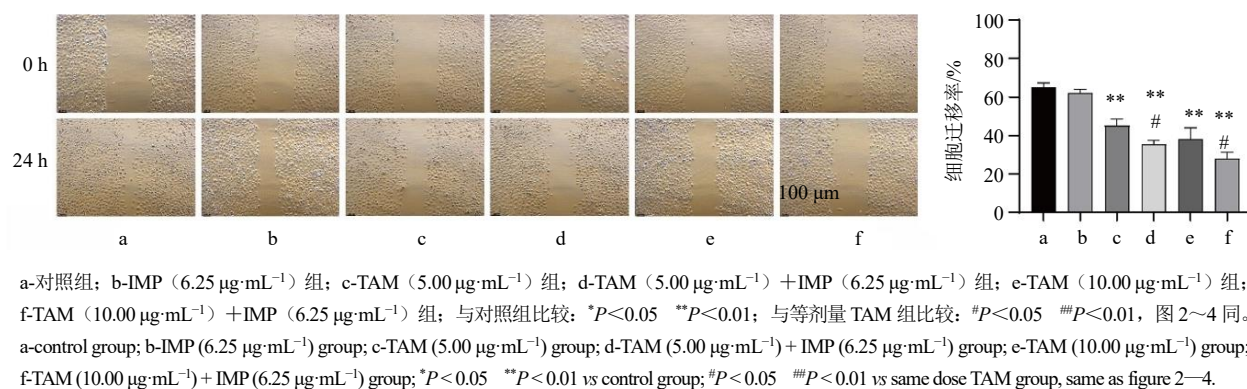


图 1 联合用药对 MCF-7/TAM 细胞迁移的影响 ($\times 10$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of combination on MCF-7/TAM cell migration ($\times 10$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

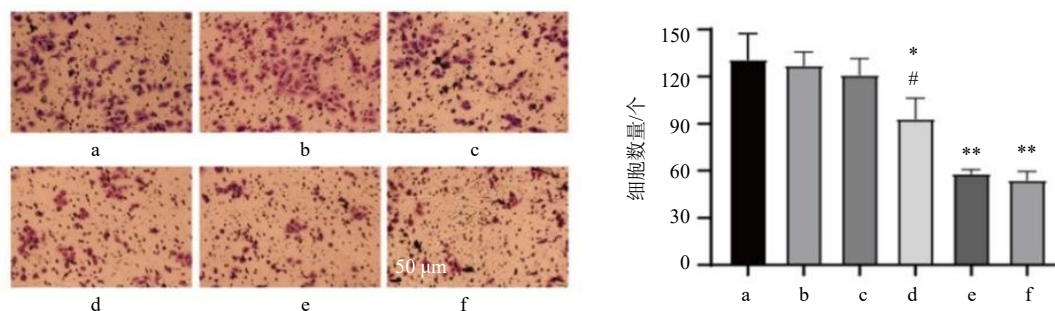


图 2 联合用药对 MCF-7/TAM 细胞侵袭的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of combination therapy on MCF-7/TAM cell invasion ($\times 100$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

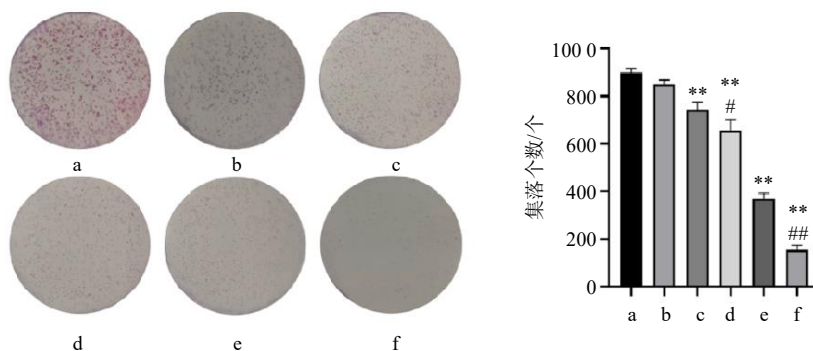


图 3 联合用药对 MCF-7/TAM 细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of combination therapy on MCF-7/TAM cell colony formation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.7 联合用药对耐药蛋白表达的影响 如图 4 所示, 与对照组比较, 各给药组均下调了 MRP1、MDR1、GST- π 蛋白的表达 ($P<0.05$ 、 0.01)。与 TAM 组比较, 联合用药高剂量组 MRP1、GST- π 蛋白表达下降趋势更明显 ($P<0.05$), 表明联合给药组逆转肿瘤耐药效果更好。

3.2 动物实验

3.2.1 对裸鼠移植瘤的生长曲线与体质量的影响 如图 5 所示, 裸鼠在接种 MCF-7/TAM 细胞 8 d 后腋下出现质地较硬的栗状结节, 随着时间的增长肿瘤体积逐渐增大。各组裸鼠精神状态良好, 活动度正常, 均未出现消瘦死亡, 体质量无明显差异。与模型

组比较, 各给药组肿瘤生长速度减慢, 表明药物均不同程度地抑制肿瘤体积的增长 ($P<0.05$)。

3.2.2 对裸鼠移植瘤抑瘤率的影响 如表 4 所示, 与模型组比较, 各给药组裸鼠肿瘤质量均显著减轻 ($P<0.05$); 与 TAM 组比较, TAM 联合 IMP 高剂量组的抑瘤率显著性降低 ($P<0.05$)。

3.2.3 TUNEL 染色 如图 6 所示, 肿瘤细胞核为蓝色, 凋亡细胞为绿色。模型组绿色荧光强度表达较低, 凋亡细胞少。与模型组相比, 联合给药组均有增强绿色荧光强度的表达趋势 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明给药组能够促进肿瘤组织细胞凋亡。与 TAM 组比较, TAM 联合 IMP 高剂量组绿色荧光强度表

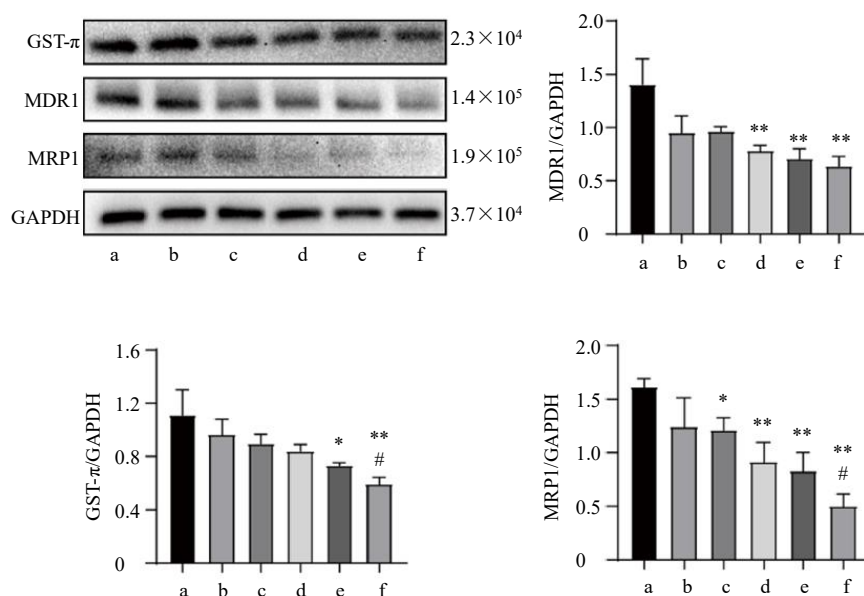
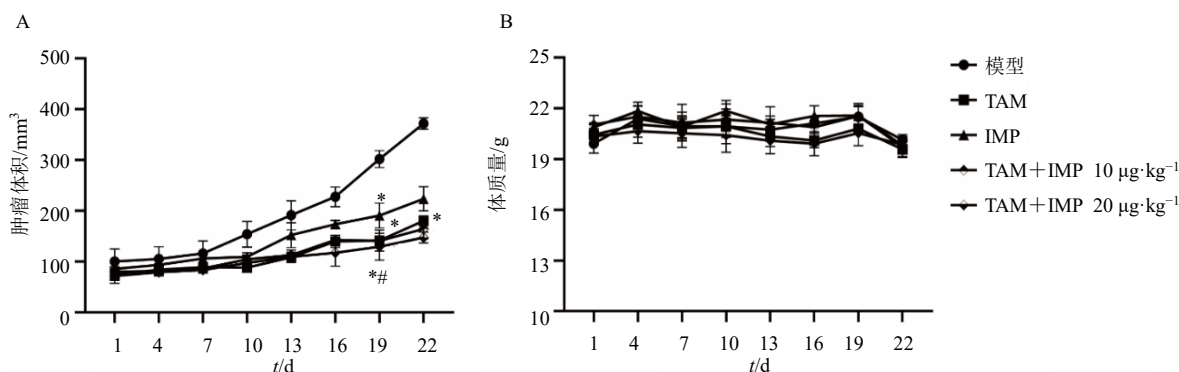


图 4 联合用药对细胞耐药蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of combination therapy on cell drug resistance protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 TAM 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 图 6、7、9、10 同。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs TAM group, same as figure 6, 7, 9, 10.

图 5 裸鼠肿瘤生长曲线 (A) 与体质量 (B)

Fig. 5 Tumor growth curves (A) and body weight (B) in nude mice

表 4 各组裸鼠肿瘤质量及抑瘤率

Table 4 Tumor weight and tumor inhibition rate of nude mice in each group

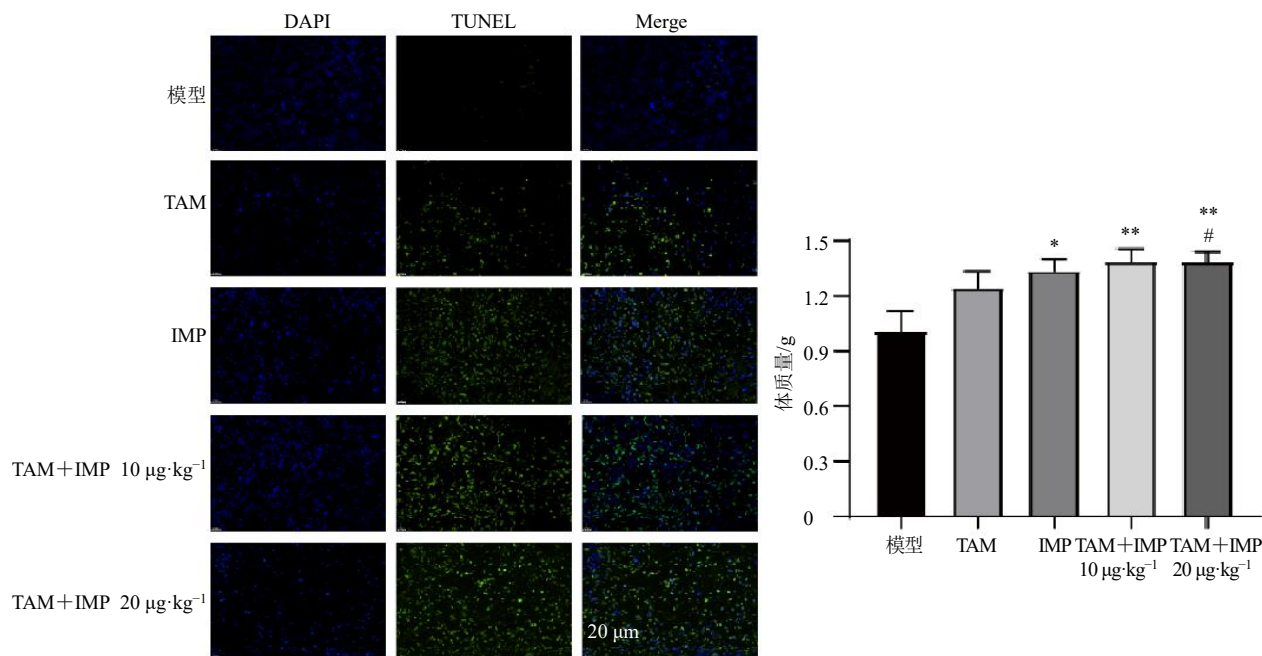
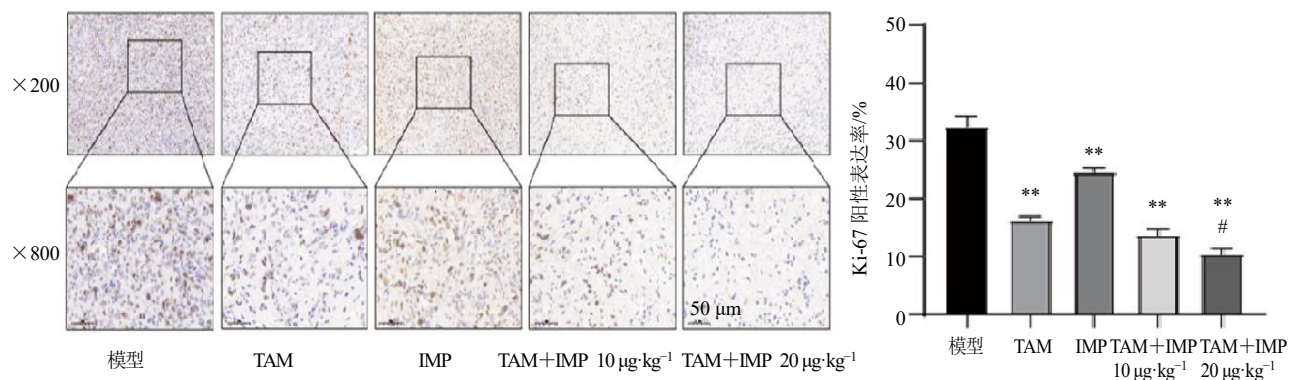
组别	剂量/ (mg·mL ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	0.29±0.06	—
TAM	4.6	0.17±0.02*	40.49
IMP	20.0	0.21±0.02*	29.18
TAM+IMP	4.6+10.0	0.14±0.01*	49.66
	4.6+20.0	0.13±0.02**	53.06 [#]

与模型组比较: * $P<0.05$; 与 TAM 组比较: [#] $P<0.05$ 。* $P<0.05$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs TAM group.

达更高 ($P<0.05$), 加快了肿瘤组织细胞的凋亡。

3.2.4 Ki-67 染色 如图 7 所示, 与模型组比较, 各给药组细胞核明显减少, 皮下瘤组织 Ki-67 表达水平显著降低 ($P<0.01$); 与 TAM 组比较, TAM 联合 IMP 高剂量组小鼠皮下瘤组织 Ki67 表达水平显著降低 ($P<0.05$), 表明联合给药抑制肿瘤细胞增殖效果更佳。

3.2.5 HE 染色 如图 8 所示, 显微镜下均能观察到大量乳腺癌肿瘤细胞, 符合乳腺癌特征。与模型组比较, 各给药组裸鼠肿瘤组织细胞生长状态较差, 细胞形态排列致密性降低, 出现“空泡化”坏

图 6 给药诱导皮下瘤组织凋亡情况 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 6 Apoptosis induced by administration in subcutaneous tumor tissues ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)图 7 联合给药对皮下瘤组织 Ki-67 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 7 Effect of combined administration on Ki-67 expression in subcutaneous tumor tissues ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

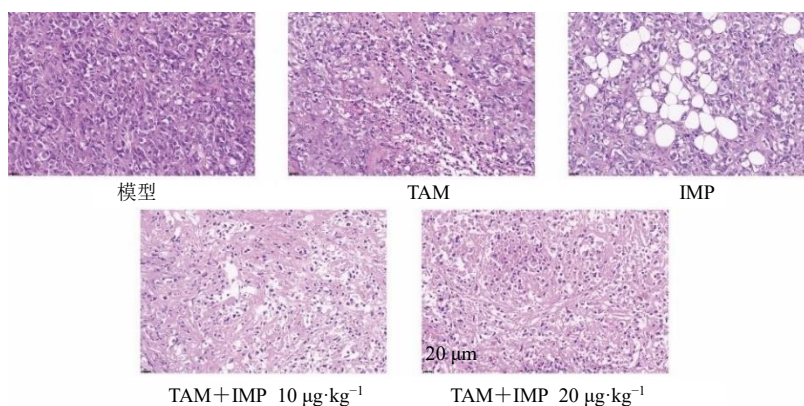


图 8 HE 染色观察给药对皮下瘤组织病理变化的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 HE staining observed effect of drug administration on histopathologic changes of subcutaneous tumors ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

死现象。与 TAM 组比较,联合给药组肿瘤细胞排列紊乱、形态不规则、数量降低,且胞核溶解比例较大、细胞核质比减小、多见核固缩,凋亡坏死现象更明显,表明肿瘤组织细胞进入快速凋亡状态。

3.2.6 联合用药对相关基因表达的影响 如图 9 所示,与模型组比较,各给药组中 *MRP1*、*MDR1*、*GST- π* mRNA 的表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);与 TAM 组比较,TAM 联合 IMP 低、高剂量组 *MDR1*、*GST- π* mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明联合给药组可能通过降低肿瘤组织中的 *MDR1*、*GST- π* 的表达逆转肿瘤耐药效果。

3.2.7 联合用药对相关蛋白表达的影响 如图 10 所示,与模型组比较,各给药组 *MRP1*、*MDR1*、*GST- π* 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);与 TAM 组比较,TAM 联合 IMP 低、高剂量组均显著下调 *MRP1*、*MDR1*、*GST- π* 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

4 讨论

乳腺癌是女性中最常见的肿瘤,也是导致癌症

相关死亡的主要原因。大约 70% 患者乳腺癌雌激素受体呈阳性,TAM 作为选择性雌激素受体调节剂可显著提高雌激素受体阳性乳腺癌患者的生存率,但接受 TAM 治疗的患者会出现耐药性^[21]。研究表明,TAM 可诱导 MCF-7 细胞多种表观遗传和多药耐药干细胞标记基因的改变^[22]。使用常规抗增殖药物进行长期治疗后,肿瘤细胞会自发地失去对治疗剂的敏感性,这种现象被称为多药耐药性。多药耐药性是肿瘤化疗的重要挑战,这已经成为临床乳腺癌治疗的主要障碍^[17,23]。肿瘤细胞的耐药可能与药物外排增强、遗传因素、生长因子、DNA 修复能力增加和外源性代谢升高等多种机制有关。利用源自植物的生物活性化合物来重建多药耐药肿瘤细胞对抗肿瘤药物对的敏感性的探索成为 1 种替代途径。

IMP 单独使用以及与其他药物联用后具有抗肿瘤作用,IMP 能促进肝癌细胞凋亡,可增强顺铂对肝癌细胞的细胞毒性^[24]。IMP 与吉西他滨联合用药可显著改善吉西他滨耐胰腺导管腺癌异种移

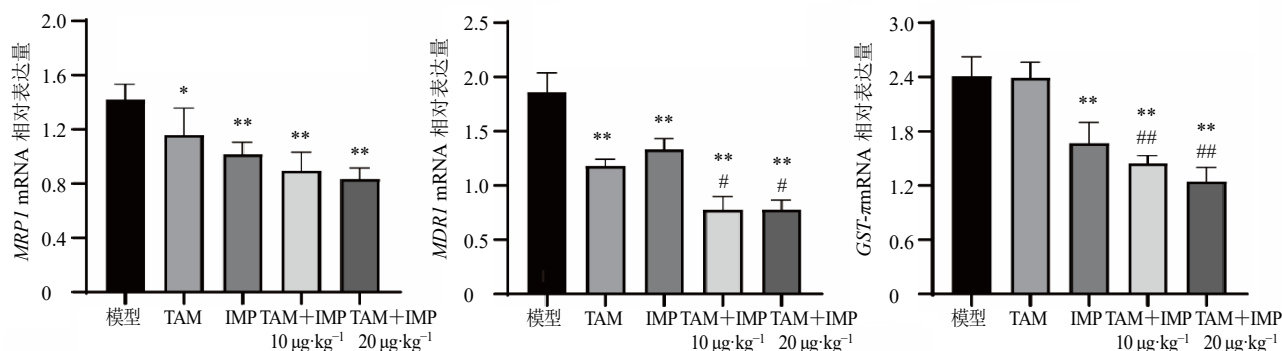
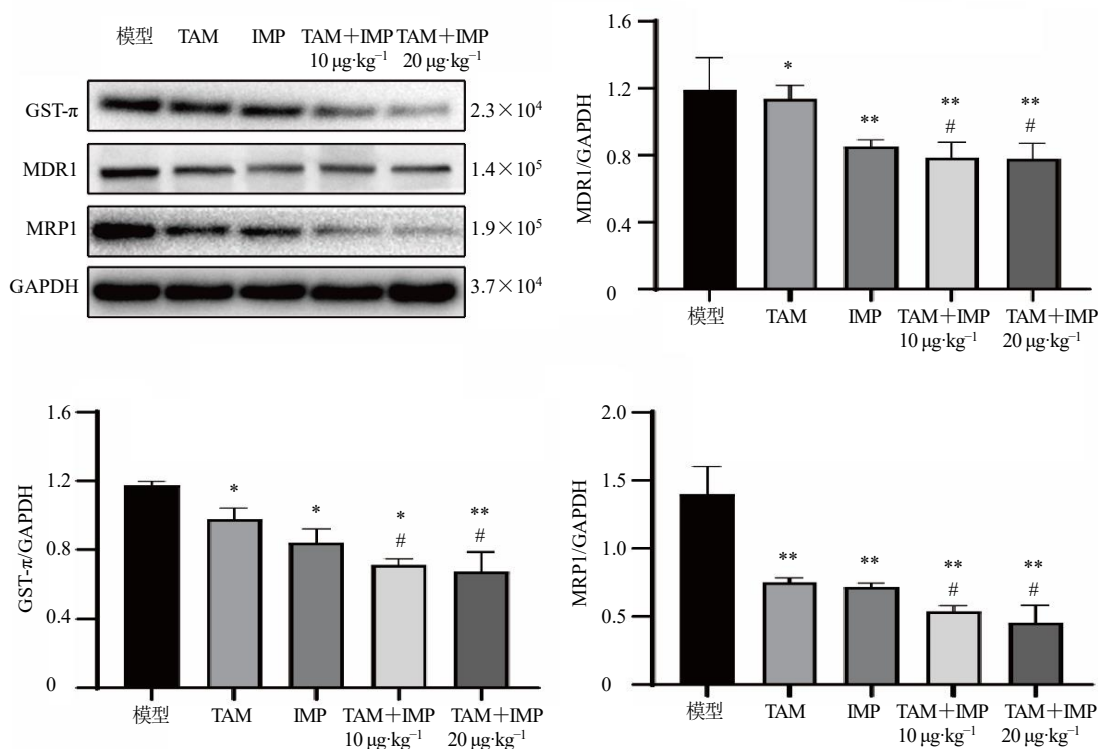


图 9 对皮下瘤组织耐药 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of drug administration on expression of drug-resistant mRNA in subcutaneous tumor tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 10 对皮下瘤组织耐药蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 10 Effect of drug administration on expression of drug-resistant protein in subcutaneous tumor tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

植瘤的肿瘤反应，表明 IMP 有抑制化疗药物耐药的潜力^[25]。甘油磷脂代谢与肿瘤耐药密切相关，脂质或脂质代谢产物通过帮助生物膜合成和胆固醇脂质的产生，促进肿瘤细胞的增殖和侵袭，游离的脂肪酸可以为肿瘤细胞的生长和侵袭提供能量^[26]。本课题组前期研究显示，在多柔比星对的乳腺癌耐药过程中，一些参与甘油磷脂代谢酶的表达发生了改变^[27]，其中，脂肪特异性磷脂酶 A2 (phospholipase A2 group XVI, PLA2G16) 是磷脂酶家族的成员之一，其催化磷脂酸生成游离脂肪酸和溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA)。溶血磷脂酸是 1 种生物活性脂质，其可激活多个促进肿瘤的信号通路，如细胞外调节蛋白激酶、抑癌基因、丝裂原活化蛋白激酶和磷脂酰肌醇信号通路。而花生四烯酸这样的游离脂肪酸可以通过环氧化酶转化为前列腺素，从而参与肿瘤的发展^[28]。另外，PLA2G16 的表达与乳腺癌的恶性程度、复发、化疗耐药和预后不良有关，临床化疗药物如多柔比星、顺铂、TAM，联合胞质磷脂酶 A2 的抑制剂吉立拉地可以消除乳腺肿瘤的发生^[29]。二酰甘油激酶 ζ (diacylglycerol kinase ζ , DGK ζ) 属于真核生物二酰基甘油激酶

(diacylglycerol kinase, DGK) 家族，参与催化二酰基甘油转化为磷脂酸的过程^[30]。DGK ζ 在三阴乳腺癌细胞中表达上调，通过多种机制促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[31]。而 DGK ζ 敲降可以诱导人类急性髓系白血病 HL-60 细胞的凋亡 DNA 合成后期或细胞分裂期停滞^[32]。

综上，IMP 与 TAM 联合用药后，增强了乳腺癌 MCF-7/TAM 细胞对 TAM 的敏感性，使 MDR1、GST- π mRNA 的表达降低，抑制 TAM 耐药，其作用机制与抑制甘油磷脂代谢途径有关。本课题后续将进一步选择相应的指标进行深入研究，从而为乳腺癌的临床治疗提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Li C Y, Wang W H, Leung C H, et al. KDM5 family as therapeutic targets in breast cancer: Pathogenesis and therapeutic opportunities and challenges [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 109.

- [3] Hanker A B, Sudhan D R, Arteaga C L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(4): 496-513.
- [4] Yao J W, Deng K, Huang J L, *et al.* Progress in the understanding of the mechanism of tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 592912.
- [5] Shen J, He Y, Li S P, *et al.* Crosstalk of methylation and tamoxifen in breast cancer (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(4): 180.
- [6] Varghese E, Samuel S M, Lišková A, *et al.* Targeting glucose metabolism to overcome resistance to anticancer chemotherapy in breast cancer [J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2252.
- [7] 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): e2204819.
- [8] Ge J W, Deng S J, Xue Z W, *et al.* Imperatorin inhibits mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa-B signaling pathways and alleviates neuroinflammation in ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(1): 116-125.
- [9] Grabarska A, Skalicka-Woźniak K, Kielbus M, *et al.* Imperatorin as a promising chemotherapeutic agent against human larynx cancer and rhabdomyosarcoma cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2046.
- [10] Kowalczyk J, Nakos-Bimpos M, Polissidis A, *et al.* Imperatorin influences depressive-like behaviors: A preclinical study on behavioral and neurochemical sex differences [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1179.
- [11] Liao X P, Zhang Z L, Ming M, *et al.* Imperatorin exerts antioxidant effects in vascular dementia via the Nrf2 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 5595.
- [12] Luo M, Luo Y. Imperatorin relieved ulcerative colitis by regulating the nrf-2/ARE/HO-1 pathway in rats [J]. *Inflammation*, 2021, 44(2): 558-569.
- [13] 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.
- [14] Wang N, Wang J, Zhang Y J, *et al.* Imperatorin ameliorates mast cell-mediated allergic airway inflammation by inhibiting MRGPRX2 and CamKII/ERK signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 184: 114401.
- [15] Xu W W, Huang Z H, Liao L, *et al.* Direct targeting of CREB1 with imperatorin inhibits TGF β 2-ERK signaling to suppress esophageal cancer metastasis [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(16): 2000925.
- [16] Lv M C, Xu Q X, Zhang B, *et al.* Imperatorin induces autophagy and G0/G1 phase arrest via PTEN-PI3K-AKT-mTOR/p21 signaling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 689.
- [17] 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]. *Pharmaceutics*, 2023, 16(11): 1595.
- [18] 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.
- [19] 钟志如, 罗序亮, 刘学艳, 等. 破壁灵芝孢子粉联合他莫昔芬对人乳腺癌 MCF-7 细胞皮下移植瘤生长增殖的影响 [J]. *江西医药*, 2020, 55(2): 127-131.
- [20] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, *et al.* Breast cancer [J]. *Lancet*, 2021, 397(10286): 1750-1769.
- [21] Mishra A, Srivastava A, Pateriya A, *et al.* Metabolic reprogramming confers tamoxifen resistance in breast cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 347: 109602.
- [22] Kalyanaraman A, Gnanasampanthapandian D, Shanmughan P, *et al.* Tamoxifen induces stem-like phenotypes and multidrug resistance by altering epigenetic regulators in ER α + breast cancer cells [J]. *Stem Cell Investig*, 2020, 7: 20.
- [23] Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3233.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Robey R B, Weisz J, Kuemmerle N B, *et al.* Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: Cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(Suppl 1): S203-S231.
- [27] 董伟, 黄小英, 谢冰斌, 等. 氧化前胡素对乳腺癌 MCF-7/DOX 细胞多柔比星耐药的抑制作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(3): 260-266.
- [28] Xia W, Bai H S, Deng Y, *et al.* PLA2G16 is a mutant

- p53/KLF5 transcriptional target and promotes glycolysis of pancreatic cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12642-12655.
- [29] Liu S Q, Sun Y, Hou Y X, *et al*. A novel lncRNA ROPM-mediated lipid metabolism governs breast cancer stem cell properties [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 178.
- [30] Takeishi Y, Goto K, Kubota I. Role of diacylglycerol kinase in cellular regulatory processes: A new regulator for cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 115(3): 352-359.
- [31] Zhao Y Y, Sun H F, Li X, *et al*. DGKZ promotes TGF β signaling pathway and metastasis in triple-negative breast cancer by suppressing lipid raft-dependent endocytosis of TGF β R2 [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 105.
- [32] Li H, Dong C H, Tian Y N, *et al*. Knockdown of diacylglycerol kinase zeta (DGKZ) induces apoptosis and G₂/M phase arrest in human acute myeloid leukemia HL-60 cells through MAPK/survivin/caspase pathway [J]. *Pharmazie*, 2019, 74(7): 418-422.

[责任编辑 罗 曦]