

# PDK1过表达降低人乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性

甘德露 蒋玉林 岳姝君 钱胡孙 周婷 张典 石霁 方文丽 姚梦俐 陈婷梅\*

(重庆医科大学, 检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文探讨了丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase 1, PDK1)与乳腺癌细胞他莫昔芬耐药性产生的关系和作用机制。采用Western blot法检测他莫昔芬敏感性乳腺癌细胞MCF-7和T47D以及他莫昔芬耐药性细胞MCF-7R和T47DR中p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、PDK1的表达水平;采用脂质体转染法、哌立福辛和二氯乙酸处理改变各细胞中PDK1表达后,采用Western blot法检测C-myc、Cyclin D1、Bcl-2和Bcl-x1蛋白的表达水平;用CCK-8法检测细胞增殖;用流式细胞术检测各细胞的凋亡率。结果显示,他莫昔芬耐药性人乳腺癌细胞株中PDK1蛋白表达量高于敏感细胞,干扰耐药细胞中PDK1蛋白表达后细胞耐药性降低,增殖能力下降;耐药细胞中PI3K/AKT/mTOR通路进一步被激活,上调PDK1蛋白表达水平;干扰PDK1表达以及哌立福辛和二氯乙酸联用可以抑制耐药细胞增殖,促进细胞凋亡,为他莫昔芬耐药性乳腺癌的临床治疗提供新的思路。

**关键词** 丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1); 乳腺癌; 耐药性; 他莫昔芬

## PDK1 Overexpression Attenuates Drug Sensitivity of Tamoxifen Resistant Breast Cancer Cells

GAN Delu, JIANG Yulin, YUE Shujun, QIAN Husun, ZHOU Ting, ZHANG Dian, SHI He,

FANG Wenli, YAO Mengli, CHEN Tingmei\*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This article explored the correlation and mechanism of PDK1 and tamoxifen resistance in breast cancer cells. The levels of PDK1, p-AKT, AKT, p-mTOR, and mTOR in breast cancer MCF-7 and T47D cells as well as tamoxifen-resistant MCF-7R and T47DR cells were detected by Western blot. The levels of PDK1 in cells were changed by transfection, perifosine and dichloroacetic acid treatments, and then the changes of C-myc, Cyclin D1, Bcl-2 and Bcl-x1 levels were detected by Western blot. The cell proliferation was detected by CCK-8, and the cell apoptosis was detected by FCM. The results showed that, as compared with MCF-7 or T47D cells, the protein levels of PDK1 significantly increased in MCF-7R and T47DR cells. After the transfection of PDK1-siRNA into MCF-7R and T47DR cells, the  $IC_{50}$  of OHT and proliferations of drug-resistant cells significantly reduced. The PI3K/AKT/mTOR pathway was activated, which up-regulated the expression of PDK1 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. Interfering with the expression of PDK1, and combinatory treatment with perifosine and di-chloroacetic acid inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of tamoxifen-resistant cells. This study provides a

收稿日期: 2019-12-27 接受日期: 2020-03-06

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81772844)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18875273673, E-mail: tingmeichen@cqmu.edu.cn

Received: December 27, 2019 Accepted: March 6, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81772844)

\*Corresponding author. Tel: +86-18875273673, E-mail: tingmeichen@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5242>

new idea for the clinical treatment of tamoxifen-resistant breast cancer.

**Keywords** pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1); breast cancer; drug resistance; tamoxifen

乳腺癌是全球女性发病率居第一位、致死率居第二位的恶性肿瘤。在美国,乳腺癌的发病率已高达女性肿瘤总发病率的30%,而中国女性乳腺癌的发病率也已达女性肿瘤总发病率的15%<sup>[1-2]</sup>。

乳腺癌属于内分泌相关的肿瘤,大约75%的乳腺癌为雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性,适用于辅助内分泌治疗<sup>[3]</sup>。目前,临床上应用最多的三种辅助内分泌治疗药物分别为:选择性雌激素受体调节剂、芳香化酶抑制剂和选择性雌激素受体下调剂(selective estrogen receptor down-regulators, SERDs)<sup>[4]</sup>。他莫昔芬属于SERDs中的一种,是ER阳性乳腺癌患者最有效且最常用的辅助治疗方法之一<sup>[5]</sup>。有报道指出,使用他莫昔芬辅助治疗5年,可将乳腺癌复发和死亡的风险分别降低约40%和20%<sup>[6]</sup>。然而,研究也发现,在接受他莫昔芬治疗5年的妇女中有三分之一于15年内复发<sup>[7]</sup>。因此,他莫昔芬的内在和获得性耐药成为临床治疗面临的主要难题。研究者们通过对内分泌治疗耐药性的分子机制的深入研究和了解,比如内质网突变、内质网共激活因子的扩增、致癌基因的过表达或致癌信号通路的激活等,为临床提供了新的治疗策略<sup>[8-12]</sup>。因此阐明潜在的发病机制、发掘新的治疗靶点、降低药物耐受率、提高病人生存质量已成为临床乳腺癌治疗过程中亟待解决的任务。

丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)是调节线粒体丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)活性状态的四种PDK同工酶(PDK1、PDK2、PDK3、PDK4)之一。在多种类型肿瘤中均可见PDK1异常高表达,例如黑色素瘤、结肠癌、非小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤、肾细胞癌、鼻咽癌<sup>[13-16]</sup>等。使用特异性的小分子抑制剂如二氯乙酸(dichloroacetic acid, DCA)靶向抑制PDK1可将癌细胞代谢从糖酵解转变为氧化磷酸化,逆转肿瘤细胞中的Warburg效应,抑制肿瘤生长<sup>[17-18]</sup>。

在前期的研究结果中我们发现,与人乳腺癌亲本敏感细胞MCF-7、T47D相比,他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR中PDK1蛋白的表达水平明显增加。本研究以他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR为研究对象,探讨PDK1对耐药性的影响,并探究其相关调节机制,为临床治疗他莫昔芬耐药性乳腺癌

提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

胎牛血清和DMEM培养基购自Gibco公司; PCR引物由Invitrogen公司合成; 总RNA抽提试剂Trizol、反转录试剂盒和实时荧光定量PCR检测用SYBR<sup>®</sup> Green mix荧光染料均购自TaKaRa公司; 脂质体转染试剂LipoFiter<sup>™</sup>购自汉恒生物科技(上海)有限公司; 细胞总蛋白提取试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究; 蛋白质印迹法检测用相关试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司; CCK-8试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司; 兔抗人PDK1抗体、兔抗人C-myc抗体、兔抗人细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)抗体、兔抗人p-mTOR抗体、兔抗人mTOR抗体购自Abcam公司; 鼠抗人Bcl-2抗体、兔抗人Bcl-x1抗体、兔抗人p-AKT抗体、兔抗人AKT抗体购自Cell Signaling Technology公司; 兔抗β肌动蛋白(β-actin)mAb购自Proteintech公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 哌立福新、二氯乙酸、4-羟基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen, OHT)购自美国Sigma公司; Annexin V-APC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株MCF-7和T47D以及他莫昔芬耐药性人乳腺癌细胞株MCF-7R和T47DR由重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学重点实验室保存。MCF-7、T47D、MCF-7R、T47DR分别接种于含10%胎牛血清和1%青链霉素混合液的DMEM(高糖)培养液中,在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>无菌恒温培养箱中进行培养; 耐药细胞需在培养基中加入终浓度为5 μmol/L的他莫昔芬维持培养。

1.2.2 实时荧光定量PCR法检测MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR细胞中PDK1 mRNA的表达水平 分别收集MCF-7、MCF-7R、T47D和T47DR细胞,用TRIzol法提取总RNA,逆转录成cDNA后, qRT-PCR检测PDK1表达水平。PDK1基因的上游引物序列为5'-CTG TGA TAC GGA TCA GAA ACC G-3', 下游引

物序列为5'-TCC ACC AAA CAA TAA AGA GTG CT-3'; 内参*ACTB*的上游引物序列为5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG -3', 下游引物序列为5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。各组均设3个复孔, *ACTB*作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算PDK1的相对表达量。

**1.2.3 PDK1过表达质粒和siRNA转染** 将对数生长期的MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR接种于6孔板中, 按LipoFiter™说明书, 将PDK1-siRNA和对照siRNA、PDK1过表达质粒和阴性对照空载体质粒转染至MCF-7和T47D细胞中, 分别命名为MCF-7R-siPDK1、MCF-7R-siNC、T47DR-siPDK1、T47DR-siNC、MCF-7-NC、MCF7-PDK1、T47D-NC、T47D-PDK1细胞。

**1.2.4 Western blot法检测MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR细胞中PDK1、CyclinD1、C-myc、Bcl-2、Bcl-xl、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR蛋白水平** 将对数生长期的MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR接种于6孔板中, 对细胞进行处理后提取细胞总蛋白, BCA法测定总蛋白浓度。各细胞蛋白以40 μg/孔的量上样, 进行10% SDS-PAGE以分离目的蛋白(80 V 30 min, 120 V 1.5 h); 将分离后的蛋白以恒电流转移(0.21 A, 1~2 h)至孔径为0.45 μm的PVDF膜上; 洗膜后, 放入含5%脱脂奶粉封闭1 h; 分别加入相应一抗(体积稀释比例均为1:1 000) 4 °C孵育过夜; 洗膜后加入二抗(体积稀释比例均为1:2 000)室温孵育1 h, TBST洗膜后显影。应用ImageJ软件分析目的条带的灰度值, 以目的蛋白条带与内参β-actin条带灰度值之比表示目的蛋白的相对表达水平。

**1.2.5 CCK8法检测MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR细胞增殖** 将对数生长期MCF-7、MCF-7R、T47D接种于96孔板中, 培养24 h后, 更换为含有OHT的新鲜培养液, 其中OHT终浓度分别为5、10、15、20和25 μmol/L; 同时设OHT未处理对照组和无细胞空白调零孔。将细胞继续培养48 h, 用酶联免疫检测仪在450 nm波长处测定各孔的 $D$ 值, 并计算细胞相对存活率和 $IC_{50}$ 。另外, 将MCF-7R和T47DR接种于96孔板中, 每种细胞分别设5个复孔。培养6 h后, 每孔加入10 mmol/L二氯乙酸和5 μmol/L派立福新继续培养6 h后, 更换相同体积的新鲜无血清培养液, 每孔加入10 μL CCK-8, 继续培养1 h。然后检测450 nm波长处各孔的 $D$ 值, 以此反映各细胞的增殖活性。

**1.2.6 流式检测MCF-7R、T47DR细胞凋亡** 将对数生长期的MCF-7R和T47DR接种于6孔板中。培

养6 h后, 每孔加入10 mmol/L二氯乙酸和5 μmol/L派立福新继续培养6 h。获得细胞悬液后加入Annexin V-APC染液, 混匀后于4 °C避光反应15 min; 随后加入PI混匀, 4 °C避光反应5 min; 最后置于流式细胞仪(型号: Becton Dickinson)上检测细胞凋亡率。

**1.2.7 统计学分析** 采用SPSS 20.0软件对各实验结果数据进行统计分析。各实验均独立重复3次, 计量资料 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间数据的比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中PDK1表达上调

为探究人乳腺癌亲本敏感细胞与他莫昔芬耐药细胞中PDK1蛋白表达水平差异, 分别提取MCF-7、T47D和MCF-7R、T47DR细胞的总RNA和总蛋白, qRT-PCR和Western blot检测结果显示, 耐药细胞MCF-7R和T47DR中PDK1的mRNA水平和蛋白表达水平均明显高于敏感细胞(图1)。

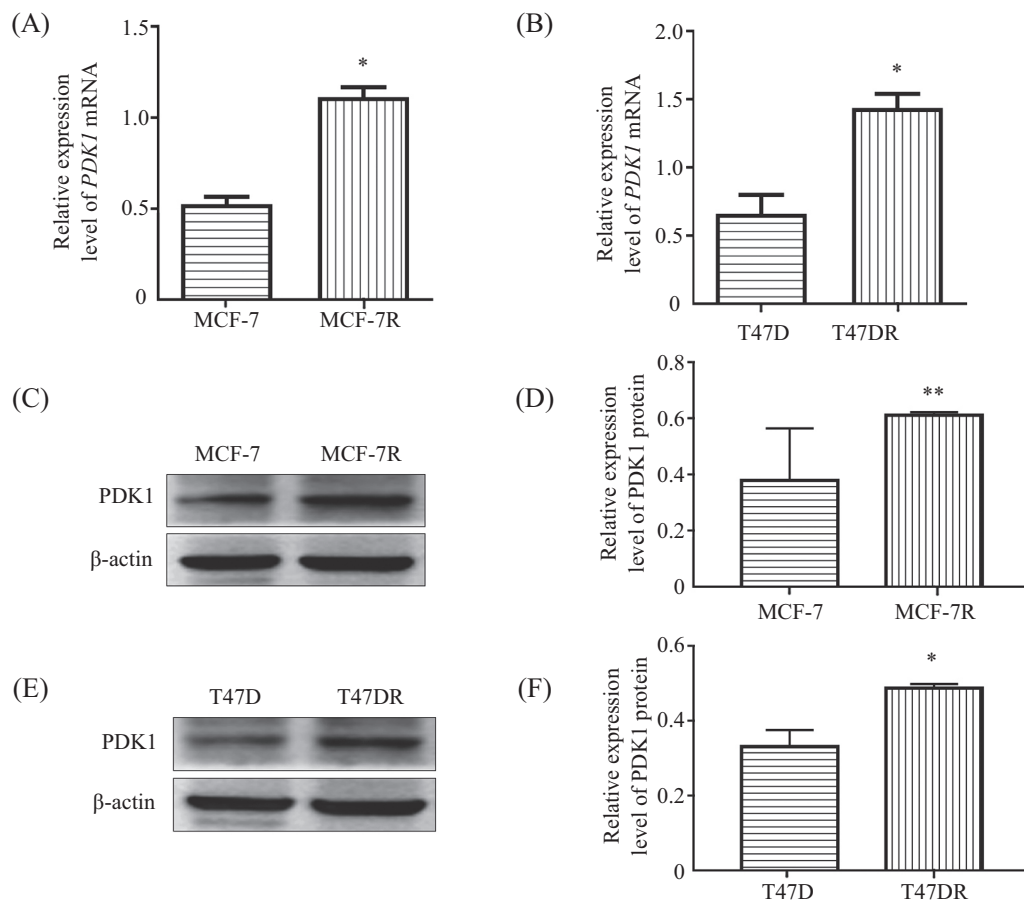
### 2.2 干扰乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中PDK1表达及在敏感细胞中过表达PDK1

采用脂质体转染法分别在敏感细胞MCF-7和T47D中过表达PDK1, 在耐药细胞MCF-7R和T47DR中敲低PDK1, Western blot检测结果显示, MCF-7和T47D细胞中PDK1蛋白表达水平上调(图2A), MCF-7R和T47DR中PDK1蛋白表达被明显干扰(图2B), 且PDK1-si63干扰效果最好(图2C), 之后实验所用siRNA均选用si63。

### 2.3 干扰PDK1表达可增强乳腺癌耐药细胞对他莫昔芬的敏感性

为了探究PDK1对乳腺癌细胞耐药性的影响, 我们分别在低表达PDK1的敏感细胞MCF-7、T47D中过表达PDK1, 以及在高表达PDK1的耐药细胞MCF-7R、T47DR中干扰PDK1表达。用不同浓度(5、10、15、20、25 μmol/L)他莫昔芬处理细胞, CCK-8检测结果(图3A和图3B)显示, 在敏感细胞MCF-7、T47D中过表达PDK1后, 与对照组相比细胞活力增加,  $IC_{50}$ 值增高; 在耐药细胞MCF-7R、T47DR中干扰PDK1表达后, 与对照相比细胞活力降低,  $IC_{50}$ 值减少。Western blot检测结果(图3C和图3D)显示, 在敏感细胞MCF-7、T47D中过表达PDK1后, 增殖相关蛋白CyclinD1、C-myc和抗凋亡相关蛋白Bcl-xl表达量增高; 在耐药细胞MCF-





A: qRT-PCR实验检测MCF-7和MCF-7R细胞中PDK1 mRNA表达水平; \* $P < 0.05$ , 与MCF-7组比较; B: qRT-PCR实验检测T47D和T47DR细胞中PDK1 mRNA表达水平; \* $P < 0.05$ , 与T47D组比较; C: Western blot实验检测MCF-7和MCF-7R细胞中PDK1蛋白表达水平; D: 统计学分析PDK1在MCF-7R细胞的表达比例; \*\* $P < 0.01$ , 与MCF-7组比较; E: Western blot实验检测T47D和T47DR细胞中PDK1蛋白表达水平; F: 统计学分析PDK1在T47DR细胞的表达比例; \* $P < 0.05$ , 与T47D组比较。

A: the expression of PDK1 in MCF-7 and MCF-7R cells detected by qRT-PCR. \* $P < 0.05$  compared with MCF-7. B: the expression of PDK1 in T47D and T47DR cells detected by qRT-PCR. \* $P < 0.05$  compared with T47D. C: the expression of PDK1 in MCF-7 and MCF-7R cells detected by Western blot. D: the expression rate of PDK1 in MCF-7R cells analysed by statistics. \*\* $P < 0.01$  compared with MCF-7. E: the expression of PDK1 in T47D and T47DR cells detected by Western blot. F: the expression rate of PDK1 in T47DR cells analysed by statistics. \*\* $P < 0.01$  compared with T47D.

图1 乳腺癌他莫昔芬耐药细胞与敏感细胞中PDK1表达量的差异

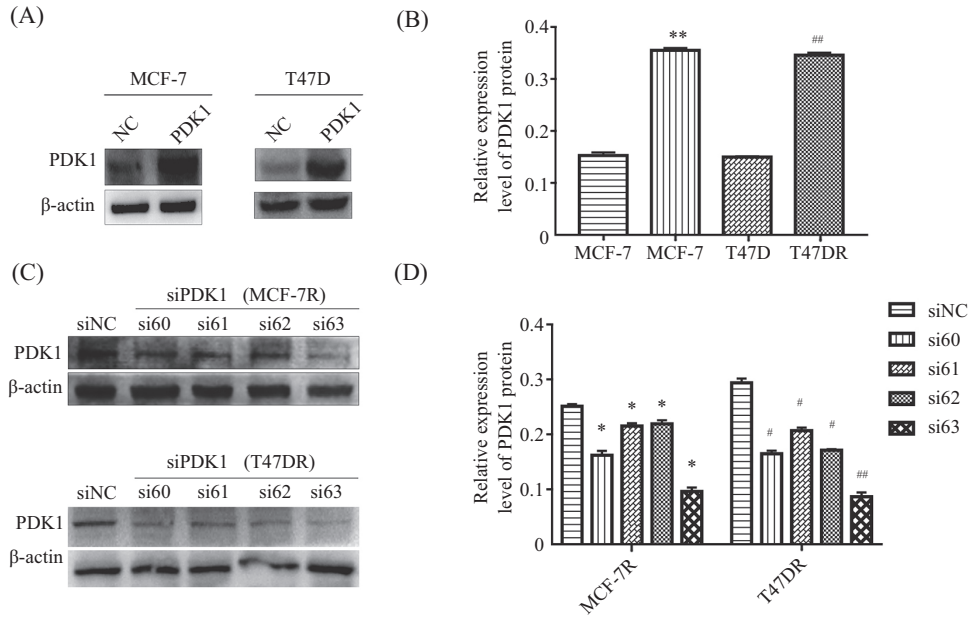
Fig.1 Differences in the expression levels of PDK1 between tamoxifen-resistant and sensitive breast cancer cells

7R、T47DR中干扰PDK1表达后, CyclinD1、C-myc、Bcl-x1蛋白表达量下降。以上结果提示, 干扰耐药细胞MCF-7R、T47DR中PDK1蛋白表达可显著抑制耐药细胞的增殖能力和抗凋亡能力。

#### 2.4 乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中PI3K/AKT/mTOR通路激活上调PDK1蛋白表达

为了探究乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中调控PDK1蛋白表达的信号通路, 我们查阅文献和生物信息学网站(<https://www.kegg.jp/>)发现, 在多种肿瘤细胞中, PI3K/AKT/mTOR信号通路异常激活导致其下游分子PDK1转录增加, 蛋白表达上调。我们检测乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中PI3K/AKT/mTOR信号

通路激活情况, Western blot检测结果显示, 与敏感细胞MCF-7和T47D相比, 他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR中p-AKT、p-mTOR蛋白表达增加(图4A), 统计结果分析显示, 他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR中p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR比率显著提高(图4B和图4C)。以上结果表明在耐药细胞中, PI3K/AKT/mTOR信号通路被进一步激活。使用5  $\mu\text{mol/L}$  AKT抑制剂哌立福辛处理他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR 6 h后, Western blot检测结果显示, 处理组细胞中p-AKT、AKT、p-mTOR、PDK1蛋白表达明显减少(图4D和图4E)。以上结果提示, 在他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR中PI3K/AKT/mTOR信

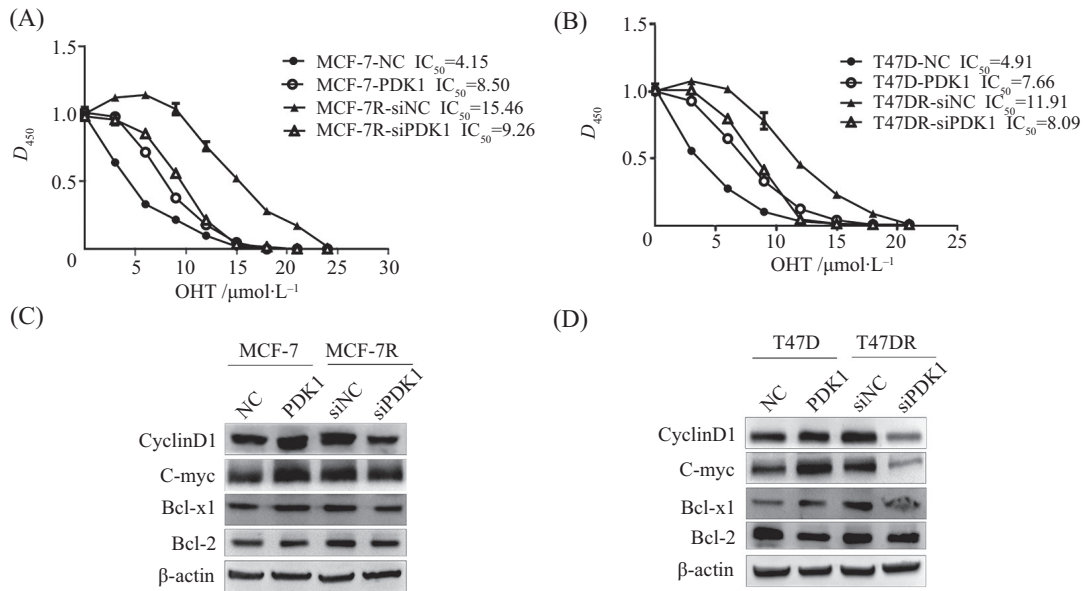


A: Western blot实验检测过表达PDK1效率; B: 统计学分析PDK1在MCF-7和T47D细胞的表达比例; \*\* $P < 0.01$ , 与MCF-7-NC组比较; ## $P < 0.01$ , 与T47D-NC组比较; C: Western blot实验检测敲低PDK1效率; D: 统计学分析PDK1在MCF-7R和T47DR细胞的表达比例; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与siNC组比较。

A: the overexpression of PDK1 detected by Western blot. B: the expression rate of PDK1 in MCF-7 and T47D cells analysed by statistics. \*\* $P < 0.01$  compared with MCF-7-NC. ## $P < 0.01$  compared with T47D-NC. C: the knockdown of PDK1 detected by Western blot. D: the expression rate of PDK1 in MCF-7R and T47DR cells analysed by statistics. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with siNC.

图2 干扰和过表达PDK1效果验证

Fig.2 Verify the effects of interference and overexpression of PDK1

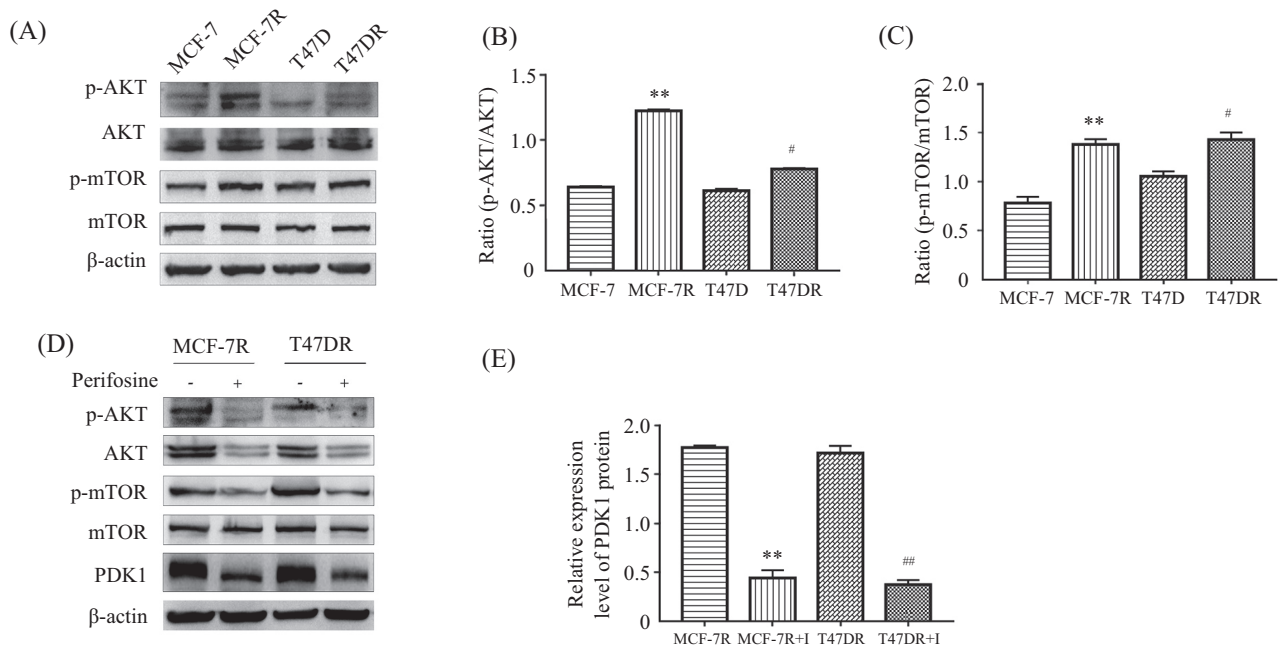


A: CCK8实验检测不同浓度他莫昔芬处理后, MCF-7-NC、MCF7-PDK1、MCF-7R-siPDK1、MCF-7R-siNC细胞 $D_{450}$ ; B: CCK8实验检测不同浓度他莫昔芬处理的T47D-NC、T47D-PDK1、T47DR-siPDK1、T47DR-siNC细胞 $D_{450}$ ; C: Western blot实验检测MCF-7-NC、MCF7-PDK1、MCF-7R-siPDK1、MCF-7R-siNC细胞中CyclinD1、C-myc、Bcl-x1、Bcl-2蛋白表达水平; D: Western blot实验检测T47D-NC、T47D-PDK1、T47DR-siPDK1、T47DR-siNC细胞中CyclinD1、C-myc、Bcl-x1、Bcl-2蛋白表达水平。

A: the  $D_{450}$  of MCF-7-NC, MCF7-PDK1, MCF-7R-siPDK1 and MCF-7R-siNC cells treated with OHT detected by CCK8; B: the  $D_{450}$  of T47D-NC, T47D-PDK1, T47DR-siPDK1, T47DR-siNC cells treated with OHT detected by CCK8; C: the expression of CyclinD1、C-myc、Bcl-x1、Bcl-2 in MCF-7-NC, MCF7-PDK1, MCF-7R-siPDK1 and MCF-7R-siNC cells detected by Western blot; D: the expression of CyclinD1、C-myc、Bcl-x1、Bcl-2 in T47D-NC, T47D-PDK1, T47DR-siPDK1, T47DR-siNC cells detected by Western blot.

图3 PDK1对乳腺癌细胞他莫昔芬耐药性的影响

Fig.3 Effects of PDK1 on tamoxifen resistance in breast cancer cells



A: Western blot实验检测MCF-7、MCF-7R、T47D、T47DR细胞中p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR蛋白表达水平; B、C: 统计学分析p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR在MCF-7R和T47DR细胞的表达比例。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与MCF-7组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与T47DR组比较; D: 使用5  $\mu\text{mol/L}$  哌立福辛处理MCF-7R和T47DR 6 h后, Western blot实验检测MCF-7R和T47DR细胞中p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、PDK1蛋白表达水平; E: 统计学分析PDK1在MCF-7R和T47DR细胞的表达比例; \*\* $P < 0.01$ , 与MCF-7R组比较; ## $P < 0.01$ , 与T47DR组比较。

A: the expression of p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR in MCF-7, MCF-7R, T47D and T47DR cells detected by Western blot. B,C: the expression rate of p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR in MCF-7R and T47DR cells analysed by statistics. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with MCF-7; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  compared with T47D. D: MCF-7R and T47DR treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  perifosine for 6 hours, the expression of p-AKT, AKT, p-mTOR, mTOR, PDK1 in MCF-7R and T47DR cells detected by Western blot. E: the expression rate of PDK1 in MCF-7R and T47DR cells analysed by statistics. \*\* $P < 0.01$  compared with MCF-7; ## $P < 0.01$  compared with T47D.

#### 图4 PI3K/AKT/mTOR信号通路调控他莫昔芬耐药细胞中PDK1表达

Fig.4 PI3K/AKT/mTOR signaling pathway regulates PDK1 expression in tamoxifen-resistant cells

号通路调控下游PDK1蛋白表达, 抑制此信号通路可显著减少PDK1蛋白表达量。

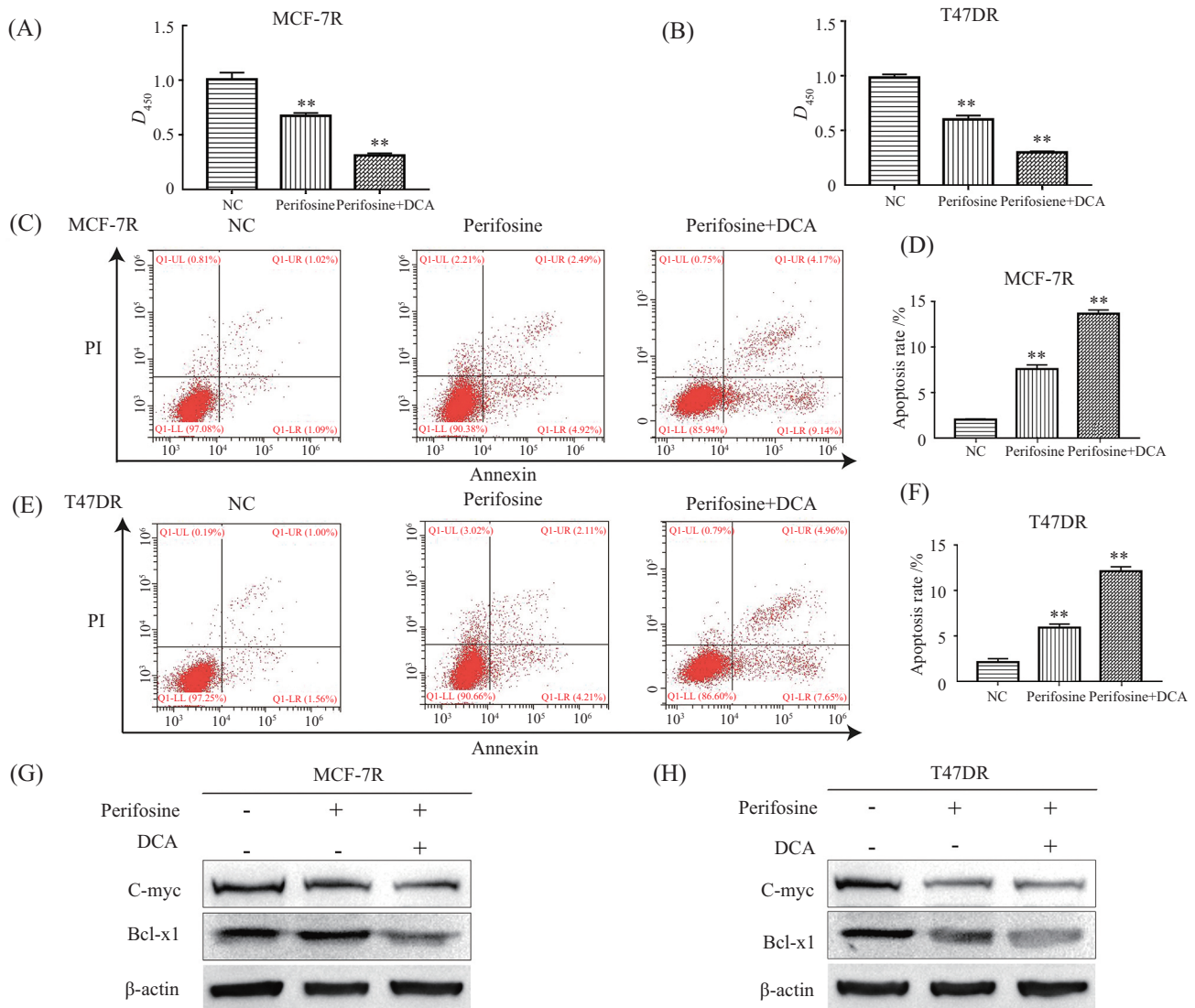
### 2.5 哌立福辛和二氯乙酸联用可进一步诱导乳腺癌耐药细胞凋亡并抑制其增殖

为了探究哌立福辛和二氯乙酸处理对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响, 我们分别单独使用5  $\mu\text{mol/L}$  哌立福辛以及联合使用10 mmol/L二氯乙酸和5  $\mu\text{mol/L}$  哌立福辛处理MCF-7R和T47DR细胞6 h。与单独使用哌立福辛相比, 联合使用二氯乙酸和哌立福辛处理耐药细胞后, CCK-8检测结果显示, MCF-7R和T47DR的增殖能力进一步降低(图5A和图5B); FCM检测结果显示, MCF-7R和T47DR的凋亡细胞数明显增多(图5C~图5F); 同时Western blot检测结果(图5G和图5H)也显示联合用药后, MCF-7R和T47DR中增殖相关蛋白C-myc和抗凋亡相关蛋白Bcl-x1表达量明显减少。以上结果提示, 联合应用二氯乙酸和哌立福辛能够

更好地诱导耐药细胞凋亡, 抑制其增殖。

### 3 讨论

目前对于PDK1影响肿瘤细胞耐药性的研究多集中于PDK其余三种同工酶PDK2、PDK3、PDK4。比如PDK2的过表达和高糖酵解与头颈癌的顺铂耐药性有关<sup>[19]</sup>; PDK4高表达影响卵巢癌化疗耐药<sup>[20]</sup>, 有关PDK1与肿瘤耐药的研究较少, 且没有研究报道PDK1对乳腺癌他莫昔芬耐药的影响。本研究在细胞水平模拟临床上产生的他莫昔芬耐药性抵抗, 发现在耐药细胞MCF-7R和T47DR中PDK1的表达水平明显高于敏感细胞MCF-7和T47D, 干扰PDK1表达后可抑制耐药细胞的增殖并促进其凋亡, 一定程度上恢复耐药细胞对他莫昔芬的敏感性。初步探究了PDK1表达对ER阳性乳腺癌细胞他莫昔芬耐药的作用, 具有一定的新意。



A: CCK8实验检测MCF-7R细胞增殖能力; \*\* $P < 0.01$ , 与NC组比较; B: CCK8实验检测T47DR细胞增殖能力; \*\* $P < 0.01$ , 与NC组比较; C、E: 流式细胞术检测MCF-7R和T47DR细胞凋亡; D、F: 统计学分析MCF-7R和T47DR细胞凋亡比例; \*\* $P < 0.01$ , 与NC组比较; G: Western blot实验检测MCF-7R细胞中C-myc和Bcl-x1蛋白表达水平; H: Western blot实验检测T47DR细胞中C-myc和Bcl-x1蛋白表达水平。

A: the proliferation of MCF-7R cells detected by CCK8. \*\* $P < 0.01$  compared with NC. B: the proliferation of T47DR cells detected by CCK8. \*\* $P < 0.01$  compared with NC. C,E: the apoptosis of MCF-7R and T47DR cells detected by FCM. D,F: the apoptosis rate of PDK1 in MCF-7R and T47DR cells analysed by statistics. \*\* $P < 0.01$  compared with NC. G: the expression of C-myc, Bcl-x1 in MCF-7R cells detected by Western blot. H: the expression of C-myc, Bcl-x1 in T47DR cells detected by Western blot.

图5 哌立福辛和二氯乙酸对他莫昔芬耐药细胞增殖和凋亡的影响

Fig.5 Effects of perifoxin and DCA on the proliferation and apoptosis of tamoxifen-resistant cells

PI3K/AKT/mTOR是一条在多种肿瘤发生发展过程中被激活的经典信号通路,调控着PDK1的表达<sup>[21-23]</sup>。本研究分析了敏感细胞和乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中此条信号通路的激活情况,发现在耐药细胞中PI3K/AKT/mTOR通路被进一步激活;当使用哌立福辛抑制此条通路激活后,耐药细胞中PDK1的表达量也被明显抑制,说明在乳腺癌他莫昔芬耐药细胞中PDK1的表达也同时受到PI3K/AKT/mTOR调控。

DCA能够抑制PDK1的表达和活性,在临床上主要应用于治疗先天性乳酸性酸中毒、疟疾、家族性高胆固醇血症等疾病<sup>[24]</sup>。现有的一些临床试验结果表明,DCA具有潜在的抗癌作用<sup>[25]</sup>。临床癌症研究人员报告说,DCA与不同药物联用可通过逆转对化疗的耐药性并促进细胞凋亡来发挥协同作用<sup>[17,26]</sup>,比如DCA处理使PDK2过表达的耐药性头颈癌细胞对顺铂敏感<sup>[19]</sup>;DCA还可通过诱导耐紫杉醇的肺腺



癌细胞内柠檬酸盐的积累克服耐药性<sup>[27]</sup>。综上所述, DCA作为佐剂与其他药物在癌症治疗中联合应用能够达到协同治疗效果, 最大程度降低或延迟诱导耐药性。哌立福辛是一种AKT抑制剂, 在多种人类肿瘤模型中均显示出显著的抗增殖促凋亡活性, 因其具有良好的代谢稳定性和胃肠道耐受性被广泛应用于临床治疗。单独使用的哌立福辛仅在肉瘤和巨球蛋白血症中有效。目前越来越多的研究聚焦于将哌立福辛与其他药物联合应用于癌症治疗, 比如与索拉非尼、舒尼替尼、紫杉醇、吉西他滨等药物联用<sup>[28]</sup>。本研究使用DCA和哌立福辛联合处理乳腺癌他莫昔芬耐药细胞MCF-7R和T47DR。结果显示, 与单独使用哌立福辛相比, 联合用药更能显著抑制耐药细胞增殖, 促进其凋亡。

综上所述, 本研究发现, ER阳性乳腺癌细胞在他莫昔芬产生耐药性后, 胞内PI3K/AKT/mTOR信号通路被进一步激活, 导致下游PDK1蛋白表达水平升高; 干扰PDK1表达后, 能在一定程度上恢复耐药细胞对他莫昔芬的敏感性; 而联合应用哌立福辛和DCA能进一步抑制耐药细胞增殖, 促进其凋亡。后续本课题组将深入探讨PI3K/AKT/mTOR信号通路调控PDK1表达和PDK1影响他莫昔芬耐药产生的具体分子机制, 设计动物实验进一步证明联合用药的疗效, 以期为临床上治疗对他莫昔芬抵抗的乳腺癌患者提供潜在新治疗方案。

### 参考文献 (References)

- [1] MILLER K D, GODING SAUER A, ORTIZ A P, et al. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 425-45.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [3] HE H, SINHA I, FAN R, et al. c-Jun/AP-1 overexpression reprograms ERalpha signaling related to tamoxifen response in ERalpha-positive breast cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(19): 2586-600.
- [4] IGNATIADIS M, SOTIRIOU C. Luminal breast cancer: from biology to treatment [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(9): 494-506.
- [5] CLARKE R, LEONESSA F, WELCH J N, et al. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(1): 25-71.
- [6] MIGLIACCIO I, MALORNI L, HART C D, et al. Endocrine therapy considerations in postmenopausal patients with hormone receptor positive, human epidermal growth factor receptor type 2 negative advanced breast cancers [J]. *BMC Med*, 2015, 13(1): 46.
- [7] EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials [J]. *Lancet*, 2005, 365(9472): 1687-717.
- [8] TOY W, SHEN Y, WON H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1439-45.
- [9] MILLS J N, RUTKOVSKY A C, GIORDANO A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 41: 59-65.
- [10] TRYFONIDIS K, ZARDAVAS D, KATZENELLENBOGEN B S, et al. Endocrine treatment in breast cancer: cure, resistance and beyond [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 50: 68-81.
- [11] JOHNSTON S R. Enhancing endocrine therapy for hormone receptor-positive advanced breast cancer: cotargeting signaling pathways [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(10): djv212.
- [12] SANTEN R J, FAN P, ZHANG Z, et al. Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells [J]. *Steroids*, 2009, 74(7): 586-94.
- [13] PATE K T, STRINGARI C, SPROWL-TANIO S, et al. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer [J]. *EMBO J*, 2014, 33(13): 1454-73.
- [14] LIU T, YIN H. PDK1 promotes tumor cell proliferation and migration by enhancing the Warburg effect in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 193-200.
- [15] SRADHANJALI S, TRIPATHY D, RATH S, et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 in retinoblastoma: A potential therapeutic opportunity for targeting vitreous seeds and hypoxic regions [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177744.
- [16] XIANG G, LI X, CAO L, et al. Frequent overexpression of PDK1 in primary nasopharyngeal carcinoma is associated with poor prognosis [J]. *Pathol Res Pract*, 2016, 212(12): 1102-7.
- [17] KANKOTIA S, STACPOOLE P W. Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug [J]? *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2): 617-29.
- [18] CHU Q S, SANGHA R, SPRATLIN J, et al. A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors [J]. *Invest New Drugs*, 2015, 33(3): 603-10.
- [19] ROH J L, PARK J Y, KIM E H, et al. Activation of mitochondrial oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer [J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(1): 20-9.
- [20] WANG J, QIAN Y, GAO M. Overexpression of PDK4 is associated with cell proliferation, drug resistance and poor prognosis in ovarian cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 251-62.
- [21] XIAO Y, PENG H, HONG C, et al. PDGF Promotes the Warburg effect in pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1alpha signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1603-13.
- [22] KIM J W, TCHERNYSHYOV I, SEMENZA G L, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia [J]. *Cell Metab*, 2006, 3(3): 177-85.
- [23] LI B, ZHU Y, SUN Q, et al. Reversal of the Warburg effect with DCA in PDGF treated human PASMC is potentiated by pyruvate



- dehydrogenase kinase1 inhibition mediated through blocking Akt/GSK3beta signalling [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1391-400.
- [24] STOCKKLAUSNER C, LAMPERT A, HOFFMANN G F, et al. Novel treatments for rare cancers: the U.S. orphan drug act is delivering-a cross-sectional analysis [J]. *Oncologist*, 2016, 21(4): 487-93.
- [25] STACPOOLE P W. Therapeutic targeting of the pyruvate dehydrogenase complex/pyruvate dehydrogenase kinase (PDC/PDK) axis in cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(11): 107-9.
- [26] GUPTA S, DWARAKANATH B. Modulation of immuno-biome during radio-sensitization of tumors by glycolytic inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2018, doi: 10.2174/0929867325666180601101145.
- [27] ZHOU X, CHEN R, YU Z, et al. Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 63.
- [28] MEUILLET E J. Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(18): 2727-42.