

木犀草素通过调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路促进铜死亡增强乳腺癌细胞顺铂敏感性的机制研究

毕超 史晓光 胡俊生 赖瑞 张娟 霍巧玲 刘曼*

(北京中医药大学东直门医院普外三区, 北京 101100)

摘要 该文旨在探究木犀草素对乳腺癌(BC)细胞顺铂(DDP)敏感性的影响及其通过调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路促进铜死亡的机制。采用低浓度加量持续诱导法建立乳腺癌的顺铂耐药细胞株MDA-MB-231/DDP-R。MTT法检测不同浓度顺铂和木犀草素对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R抑制率的影响。将MDA-MB-231/DDP-R分为5组: 对照组、顺铂组、木犀草素组、顺铂+木犀草素组和740Y-P组。采用Transwell实验检测细胞侵袭能力, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力, 流式细胞术检测细胞凋亡水平。用比色法试剂盒检测细胞内Cu²⁺水平, 采用蛋白免疫印迹技术分别检测铜死亡相关蛋白的表达水平, 以及PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白的表达水平。构建裸鼠移植瘤模型, 检测瘤体体积和质量。结果显示: 随着顺铂浓度增加, 其对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R细胞的抑制率显著上升($P<0.05$); 与MDA-MB-231细胞相比, 顺铂和木犀草素对MDA-MB-231/DDP-R细胞的抑制率显著降低($P<0.05$)。与顺铂组相比, 顺铂+木犀草素组的细胞抑制率显著增加($P<0.05$)。与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组及顺铂+木犀草素组的侵袭细胞数, 细胞迁移率, ATP7A蛋白表达水平, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β 值, 以及裸鼠瘤体体积和质量均显著降低($P<0.05$); 细胞凋亡率、Cu²⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平则显著升高($P<0.05$)。与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的侵袭细胞数, 细胞迁移率, ATP7A蛋白表达水平, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β 值, 以及裸鼠瘤体体积和质量均显著降低($P<0.05$); 细胞凋亡率、Cu²⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的侵袭细胞数, 细胞迁移率, ATP7A蛋白表达水平, p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β 值, 以及裸鼠瘤体体积和质量均显著增加($P<0.05$); 细胞凋亡率、Cu²⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。因此, 木犀草素可通过调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路诱导铜死亡, 从而增强乳腺癌细胞对顺铂的敏感性。

关键词 木犀草素; 乳腺癌; 顺铂; 铜死亡; PI3K/AKT/GSK-3 β

The Mechanism of Luteolin Promoting Cuprotoxicity and Enhancing Cisplatin Sensitivity of Breast Cancer Cells by Regulating PI3K/AKT/GSK-3 β Signaling Pathway

BI Chao, SHI Xiaoguang, HU Junsheng, LAI Rui, ZHANG Juan, HUO Qiaoling, LIU Man*

(Department of General Surgery, East Zhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 101100, China)

收稿日期: 2025-09-15

接受日期: 2025-11-26

湖北陈孝平科技发展基金会专项基金(批准号: CXPJJH12000002-2020010)资助的课题

*通信作者。Tel: 17371879464, E-mail: liumanlucky@163.com

Received: September 15, 2025

Accepted: November 26, 2025

This work was supported by the Hubei Chen Xiaoping Science and Technology Development Foundation Special Fund (Grant No.CXPJJH12000002-2020010)

*Corresponding author. Tel: +86-17371879464, E-mail: liumanlucky@163.com

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of luteolin on the sensitivity of BC (breast cancer) cells to DDP (cisplatin) and its mechanism of promoting copper death by regulating PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway. The cisplatin-resistant breast cancer cell line MDA-MB-231/DDP-R was established by continuous induction with low concentration. MTT assay was used to detect the effects of different concentrations of cisplatin and breast cancer on the inhibition rate of MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP-R. MDA-MB-231/DDP-R cells were divided into five groups: control group, cisplatin group, luteolin group, cisplatin+luteolin group and 740Y-P group. The cell invasion, migration and apoptosis levels were detected by Transwell assay, wound healing assay and flow cytometry, respectively. The intracellular Cu²⁺ level was measured, and the expression levels of proteins related to cuproptosis and the PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway were detected by Western blot. Nude mice xenografts were constructed to detect tumor volume and weight. The results showed that the inhibitory rates of cisplatin on both MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP-R cells increased significantly with rising cisplatin concentrations ($P<0.05$). Compared with MDA-MB-231 cells, the inhibitory effects of cisplatin and luteolin on MDA-MB-231/DDP-R cells were significantly lower ($P<0.05$). The cisplatin+luteolin group exhibited a significantly higher cell inhibitory rate compared to the cisplatin group alone ($P<0.05$). Compared with the Control group, the cisplatin, luteolin, and cisplatin+luteolin groups showed significant reductions ($P<0.05$) in the number of invasive cells, cell migration rate, ATP7A protein expression, the ratios of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β , as well as in nude mouse tumor volume and weight. Conversely, the cell apoptosis rate, intracellular Cu⁺ concentration, and the expression levels of DLAT and FDX1 proteins were significantly increased ($P<0.05$). Compared to either the cisplatin group or the luteolin group alone, the cisplatin+luteolin group demonstrated significantly lower values ($P<0.05$) for the number of invasive cells, cell migration rate, ATP7A protein expression, the p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β ratios, and tumor volume and weight. In contrast, the cell apoptosis rate, Cu⁺ concentration, and DLAT and FDX1 protein expression levels were significantly higher ($P<0.05$). Compared with the cisplatin+luteolin group, the 740Y-P group exhibited significant increases ($P<0.05$) in the number of invasive cells, cell migration rate, ATP7A protein expression, the p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-GSK-3 β Ser9/GSK-3 β ratios, and tumor volume and weight. Meanwhile, the cell apoptosis rate, Cu⁺ concentration, and DLAT and FDX1 protein expression levels were significantly decreased ($P<0.05$). luteolin can induce cuproptosis by regulating the PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway, thereby enhancing the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin.

Keywords luteolin; breast cancer; cisplatin; copper died; PI3K/AKT/GSK-3 β

乳腺癌(breast cancer, BC)仍是全球面临的重重大公共卫生挑战,也是女性发病的主要原因之一^[1]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)属于高度侵袭性的乳腺癌亚型,约45%的患者会出现远处转移,这致使患者生存期显著缩短^[2]。目前,辅助化疗是乳腺癌手术治疗的有效补充手段。顺铂(cisplatin, DDP)是一种常用于实体肿瘤治疗的有效药物,作为DNA损伤剂,它通过形成加合物诱导细胞死亡。然而,顺铂的疗效常因耐药性的产生而受限^[3]。因此,需要进一步研究顺铂敏感性的精确分子机制,以满足当前临床的需要。铜是人体必需的金属元素,作为多种酶的辅助因子,参与众多关键生化过程。研究发现,细胞内铜稳态失衡会引发代谢

紊乱,导致铜死亡,这在肿瘤发生及化疗耐药中发挥重要作用^[4-5]。基于此,诱导肿瘤细胞发生铜死亡或可成为一种对抗顺铂耐药的新型乳腺癌治疗策略。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)信号通路在细胞生长、增殖、凋亡和代谢等过程中发挥关键作用,其异常激活与包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生、发展及化疗耐药密切相关^[6-7]。在结直肠癌等模型中,PI3K/AKT通路已被证实可调控包括铜死亡在内的多种程序性细胞死亡方式^[8],但其在乳腺癌铜死亡中的作用机制尚不明确。

天然化合物联合治疗可作为提高常规化疗药

物疗效、减少副作用的新策略。木犀草素(luteolin)是一种天然黄酮类化合物,广泛存在于多种植物中,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性^[9]。近年来研究表明,木犀草素在抗癌方面具有独特优势,可通过PI3K/AKT通路抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡^[10],还可通过靶向癌症干细胞提高乳腺癌化疗敏感性^[11]。然而,木犀草素能否增强乳腺癌细胞对顺铂的敏感性及其具体作用机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨木犀草素对乳腺癌细胞顺铂敏感性的影响,以及其通过调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路促进铜死亡的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物与主要试剂

MDA-MB-231购自美国ATCC;木犀草素(纯度:99.51%)、顺铂(纯度: $\geq 99.0\%$)和PI3K通路激活剂740Y-P(纯度:99.96%)购自美国MedChem Express公司;杜氏改良伊格尔培养基和胎牛血清购自美国Hyclone公司;噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]细胞增殖试剂盒和Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Cu²⁺测试盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;铜转运ATP酶 α 肽(ATPase, Cu²⁺ transporting, alpha polypeptide, ATP7A)抗体、二氢硫辛酰胺转乙酰基酶(dihydrolipoyl transacetylase, DLAT)抗体、AKT抗体、p-AKT抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自美国CST公司;铁氧还蛋白1(ferredoxin 1, FDX1)抗体、PI3K抗体、磷酸化(phosphorylation, p)-PI3K抗体、GSK-3 β 抗体、p-GSK-3 β Ser9抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)购自英国Abcam公司。

1.2 顺铂耐药乳腺癌细胞系的建立

采用逐步递增药物浓度的持续诱导策略开展实验。在含10%胎牛血清和0.01 mg/mL胰岛素的DMEM培养基中,将MDA-MB-231细胞按 1×10^4 /mL密度接种于37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱内开展初始培养。待细胞生长至对数生长期,且融合度达70%~80%时,启动顺铂耐药诱导流程。首先,给予起始浓度为3.75 μ mol/L的顺铂处理细胞,将顺铂加入培养基后放回培养箱继续培养,密切观察细胞

形态变化、增殖活性等。待6孔板内细胞生长至近70%~80%融合度时,使用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)于37 °C消化细胞2 min并传代,接种数目与加药方式同前。细胞在加压条件下传代培养约7个月,药物浓度逐渐递增,具体剂量依次为3.75、7.5、15、30及60 μ mol/L,成功获得具有稳定耐药特性的乳腺癌细胞系MDA-MB-231/DDP-R,显微镜下观察MDA-MB-231/DDP和MDA-MB-231/DDP-R形态学变化。

1.3 MTT检测

选取处于对数生长期的MDA-MB-231细胞与MDA-MB-231/DDP-R细胞,以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板。待细胞融合度达80%左右时,分别加入不同浓度的顺铂(DDP, 浓度梯度为0、3.75、7.5、15、30及60 μ mol/L)及木犀草素(浓度梯度为0、1、2、4、8 μ mol/L),继续培养24 h。之后,每孔加入50 μ L MTT溶液,置于37 °C、5% CO₂饱和湿度的培养箱中避光孵育4 h后弃去上清液,再加入DMSO,于37 °C孵育30 min,测定490 nm波长处的吸光度(D)值。以对照组(0 μ mol/L木犀草素)的细胞存活率为100%,计算各组细胞抑制率,公式为:细胞抑制率=[1-(实验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)] $\times 100\%$ 。利用SPSS软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值,并据此计算耐药指数(resistance index, RI)和逆转倍数(reversal factor, RF)。其中,耐药指数(RI)=MDA-MB-231/DDP-R细胞IC₅₀/MDA-MB-231细胞IC₅₀;逆转倍数(RF)=单独DDP组IC₅₀/(DDP+木犀草素组IC₅₀)。金氏公式^[12]计算木犀草素与顺铂的协同,作用公式为: $q=E(A+B)/(EA+EB-EA \times EB)$ 。其中,E(A+B)表示两种药物联合作用时对细胞的抑制率,EA和EB分别表示木犀草素与顺铂单独使用时对细胞的抑制率。判断标准如下: $q>1.15$ 表示具有协同作用, $0.85 \leq q \leq 1.15$ 表示具有相加作用, $q<0.85$ 表示具有拮抗作用。实验设置三个平行组。

1.4 细胞分组

将MDA-MB-231/DDP-R细胞接种于杜氏改良伊格尔培养基中,置于37 °C、5% CO₂培养箱内培养,待细胞融合度接近90%时进行传代。将细胞分为以下5组:对照组(MDA-MB-231/DDP-R细胞经体积分数为1% DMSO处理)、顺铂组(MDA-MB-231/DDP-R细胞用15 μ mol/L顺铂处理24 h)、木犀草素组(MDA-MB-231/DDP-R细胞用2 μ mol/L木犀草素处理24 h)、顺铂+木犀草素组(MDA-MB-231/DDP-R细

胞先用2 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素处理24 h, 移除木犀草素后收集细胞沉淀, 再用15 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理24 h)和740Y-P组(MDA-MB-231/DDP-R细胞先用2 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素和20 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P^[13])处理24 h, 移除药物后收集细胞沉淀, 再用15 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理24 h, 每组设置三个复孔。

1.5 Transwell实验

Transwell实验采用24孔板的Transwell小室系统, 小室底部为孔径8.0 μm 的聚对苯二甲酸乙二醇酯过滤膜, 膜表面预先包被Matrigel基质胶(预先稀释到1 mg/mL的工作浓度)。将细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度悬浮于200 μL 无血清培养基中。下室加入含10%胎牛血清的完全培养基作为趋化因子。培养24 h后, 用湿润棉签轻柔擦除上室未侵袭的细胞, 下室膜表面浸润的细胞用4%甲醛在室温下固定10 min, 再用0.1%结晶紫染色15 min。最后通过光学显微镜随机选取5个视野计数侵袭细胞数量, 并拍照记录。

1.6 细胞划痕实验

将细胞接种于6孔板, 培养至细胞融合度达70%~80%。随后, 用不含胎牛血清的培养基处理细胞24 h, 之后用200 μL 无菌针尖在单层细胞中心划出直线创口。用培养基冲洗去除未贴壁细胞后, 分别于0 h和24 h在显微镜下拍摄伤口间隙图像。使用ImageJ软件定量分析伤口面积, 迁移率(%)=[(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度] $\times 100\%$ 。

1.7 流式细胞术

收集MDA-MB-231/DDP-R细胞, 以磷酸盐缓冲液洗涤2次后, 将细胞重悬于100 μL 结合缓冲液中, 调整细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。先加入5 μL Annexin V-FITC, 室温避光孵育5 min; 随后补充5 μL 碘化丙啶(PI)和400 μL 结合缓冲液, 继续室温避光孵育20 min。按照流式细胞仪配套试剂盒说明书进行操作, 使用流式细胞仪检测染色细胞, 并用FlowJo软件进行数据分析。

1.8 细胞内 Cu^+ 水平的检测

将收集的细胞转移至玻璃匀浆器中, 添加预冷的磷酸盐缓冲液, 随后置于冰浴条件下充分研磨。将匀浆液在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以12 000 $\times g$ 离心15 min, 收集所得上清液。按照试剂盒操作说明, 使用酶标仪测定上清液在580 nm波长处的吸光度值, 并根据标准曲线计算各组细胞 Cu^+ 的含量。

1.9 蛋白免疫印迹

采用RIPA缓冲液裂解细胞和肿瘤组织总蛋白, 采用BCA试剂盒定量。然后用10% SDS-PAGE分离

20 μg 总蛋白, 然后将其转移到PVDF膜上。将膜与5%脱脂牛奶在室温下预孵育30 min, 然后与一抗包括ATP7A、DLAT、FDX1、PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT、GSK-3 β 、p-GSK-3 β Ser9和GAPDH(稀释倍数1:1 000)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第2天, 3次洗涤后, 用相应的二抗(稀释倍数1:5 000)孵育膜, 室温下孵育30 min。使用PierceTMECL Western检测目标蛋白, 并使用化学发光成像分析系统拍照。相对灰度值由ImageJ量化, 采用GAPDH作为内参。

1.10 裸鼠移植瘤

25只Balb/c裸鼠[由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京) 2021-0009]适应性饲养1周, 正常饮食。将MDA-MB-231/DDP-R细胞复苏后培养传代, 收集对数生长期细胞, 以生理盐水调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 以每只0.2 mL接种于裸鼠背部皮下。待移植瘤长至0.5 cm^3 大小时, 将裸鼠随机分组: 对照组、顺铂组(腹腔注射4 mg/kg顺铂^[14])、木犀草素组(腹腔注射20 mg/kg木犀草素^[15])、顺铂+木犀草素组(腹腔注射4 mg/kg顺铂和20 mg/kg木犀草素)和740Y-P组(腹腔注射4 mg/kg顺铂和20 mg/kg木犀草素, 尾静脉注射2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 740 Y-P^[16])。对照组保持常规饮食模式, 给药组则每日给予1次药物干预, 持续给药28天。在给药周期内, 每日密切监测裸鼠的精神状态、活动能力、摄食量及排泄情况等一般生命体征, 同时每7天使用游标卡尺测量肿瘤的直径变化, 并每日观察注射部位是否存在皮肤破溃或红肿等异常反应。于停药次日采用颈椎脱臼法处死全部裸鼠。本研究经北京中医药大学东直门医院伦理委员会审查批准(伦理审批号: 2020DZMEC-099-01)。

1.11 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行数据分析。先使用Shapiro-Wilk检验评估数据的正态性, 确认所有定量数据均符合正态分布且方差齐性后, 以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 若结果有显著差异, 进一步用SNK- q 检验确定差异组别。两组数据比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂耐药乳腺癌细胞系的鉴定

显微镜下观察到, MDA-MB-231呈现圆形形态, 细胞间连接较少, 相比之下, MDA-MB-231/DDP-R

表现出更细长的梭状形状, 细胞之间的连接数量增加, 以假足突起为特征, 见图1。MTT结果显示, 随着浓度的增加, 顺铂对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R的抑制率显著增加 ($P<0.05$); 与MDA-MB-231相比, 顺铂对MDA-MB-231/DDP-R抑制率显著降低 ($P<0.05$)。MDA-MB-231的 IC_{50} 为 $(12.81\pm1.05)\text{ }\mu\text{mol/L}$, MDA-MB-231/DDP-R的 IC_{50} 为 $(87.56\pm3.59)\text{ }\mu\text{mol/L}$, $RI=6.83\pm0.25$, 见表1。选择 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 顺铂作为后续实验浓度。

2.2 木犀草素对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R细胞的抑制作用

随着木犀草素浓度的增加, 木犀草素对MDA-

MB-231和MDA-MB-231/DDP-R的抑制率显著增加 ($P<0.05$); 与MDA-MB-231相比, 木犀草素对MDA-MB-231/DDP-R的 IC_{50} 显著增加 ($P<0.05$), 见表2。选择 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作为后续实验浓度。

2.3 木犀草素对MDA-MB-231/DDP-R细胞的化疗敏感性的影响

与顺铂组相比, 顺铂对顺铂+木犀草素组的抑制率显著增加 ($P<0.05$), 并且不同浓度的顺铂作用24 h后, 顺铂组的 IC_{50} 为 $(85.62\pm3.35)\text{ }\mu\text{mol/L}$, 顺铂+木犀草素组的 IC_{50} 为 $(24.83\pm1.08)\text{ }\mu\text{mol/L}$, 见表3。此外, 依据金氏公式计算, $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 顺铂与 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 木犀草素联用的 q 值为3.23, 提示在该浓度下两药联用具有协

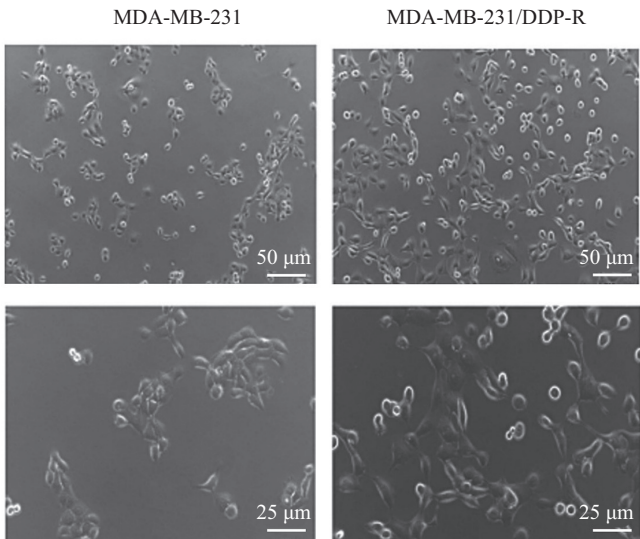


图1 MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R形态的变化
Fig.1 Morphological changes of MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP-R

表1 顺铂对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R的抑制率
Table 1 Inhibition rate of cisplatin on MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP-R

组别 Group	抑制率/% Inhibition rate /%						F	P	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
	DDP 0 $\mu\text{mol/L}$	DDP 3.75 $\mu\text{mol/L}$	DDP 7.5 $\mu\text{mol/L}$	DDP 15 $\mu\text{mol/L}$	DDP 30 $\mu\text{mol/L}$	DDP 60 $\mu\text{mol/L}$			
MDA-MB-231	0.00±0.00	15.26±0.99*	30.16±4.04*	59.49±3.94*	77.04±6.45*	98.49±5.45*	249.238	<0.001	12.81±1.05
MDA-MB-231/ DDP-R	0.00±0.00	5.49±0.84*&	12.64±1.47*&	21.05±2.67*&	29.97±2.73*&	40.85±5.34*&	92.676	<0.001	87.56±3.59*
t	-	13.034	7.059	13.989	11.640	13.084	-	-	34.614
P	-	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	-	-	<0.001

* $P<0.05$, 与紧邻的较低浓度比较; & $P<0.05$, 与MDA-MB-231比较; “-”表示统计检验不适用。 $\bar{x}\pm s, n=3$ 。
* $P<0.05$ compared with the adjacent lower concentration; & $P<0.05$ compared with MDA-MB-231; “-” means that the statistical test is not applicable. $\bar{x}\pm s, n=3$.

表2 木犀草素对MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R的抑制率
Table 2 Inhibition rate of luteolin on MDA-MB-231 and MDA-MB-231/DDP-R

组别 Group	抑制率/% Inhibition rate /%					<i>F</i>	<i>P</i>	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
	Luteolin 0 μmol/L	Luteolin 1 μmol/L	Luteolin 2 μmol/L	Luteolin 4 μmol/L	Luteolin 8 μmol/L			
MDA-MB-231	0.00±0.00	10.28±4.01*	27.92±3.67*	38.94±4.31*	58.02±3.09*	137.469	<0.001	5.79±0.34
MDA-MB-231/ DDP-R	0.00±0.00	9.16±2.16* ^{&}	23.94±2.93* ^{&}	35.19±3.94* ^{&}	53.14±4.20* ^{&}	143.020	<0.001	6.92±0.45*
<i>t</i>	-	0.426	1.468	1.112	1.468	-	-	3.470
<i>P</i>	-	0.692	0.216	0.328	0.216	-	-	0.026

**P*<0.05, 与紧邻的较低浓度比较; [&]*P*<0.05, 与MDA-MB-231比较; “-”表示统计检验不适用。 $\bar{x}\pm s$, *n*=3。

**P*<0.05 compared with the adjacent lower concentration; [&]*P*<0.05 compared with MDA-MB-231; “-” means that the statistical test is not applicable.
 $\bar{x}\pm s$, *n*=3.

表3 木犀草素对MDA-MB-231/DDP-R细胞的化疗敏感性的影响
Table 3 Effect of luteolin on chemosensitivity of MDA-MB-231/DDP-R cells

组别 Group	抑制率/% Inhibition rate /%						<i>F</i>	<i>P</i>	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
	DDP 0 μmol/L	DDP 3.75 μmol/L	DDP 7.5 μmol/L	DDP 15 μmol/L	DDP 30 μmol/L	DDP 60 μmol/L			
Luteolin group	0.00±0.00	5.66±0.79*	11.94±0.98*	22.10±2.31*	28.49±2.61*	41.99±3.98*	147.853	<0.001	85.62±5.35
Luteolin+ DDP group	0.00±0.00	9.97±0.61* ^{&}	18.21±1.84* ^{&}	35.94±2.25* ^{&}	53.47±4.12* ^{&}	75.94±5.06* ^{&}	287.611	<0.001	24.83±1.08*
<i>t</i>	-	7.479	5.209	7.434	8.871	9.134	-	-	19.291
<i>P</i>	-	0.002	0.006	0.002	0.001	<0.001	-	-	<0.001

**P*<0.05, 与紧邻的较低浓度比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; “-”表示统计检验不适用。 $\bar{x}\pm s$, *n*=3。

**P*<0.05 compared with the adjacent lower concentration; [&]*P*<0.05 compared with luteolin group; “-” means that the statistical test is not applicable.
 $\bar{x}\pm s$, *n*=3.

同作用。

2.4 木犀草素联合顺铂对MDA-MB-231/DDP-R细胞增殖、迁移和凋亡的影响

与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木犀草素组的侵袭细胞数和细胞迁移率显著降低, 细胞凋亡率显著增加 (*P*<0.05); 与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的侵袭细胞数和细胞迁移率显著降低, 细胞凋亡率显著增加 (*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的侵袭细胞数和细胞迁移率显著增加, 细胞凋亡率显著降低 (*P*<0.05), 见表4和图2。

2.5 木犀草素联合顺铂对MDA-MB-231/DDP-R细胞铜死亡的影响

与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木犀草素组的Cu⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平显著升高, ATP7A蛋白表达水平显著降低 (*P*<0.05);

与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的Cu⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平显著增加, ATP7A蛋白表达水平显著降低 (*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的Cu⁺浓度、DLAT和FDX1蛋白表达水平显著降低, ATP7A蛋白表达水平显著升高 (*P*<0.05), 见表5和图3。

2.6 木犀草素联合顺铂对MDA-MB-231/DDP-R细胞PI3K/AKT/GSK-3β信号通路的影响

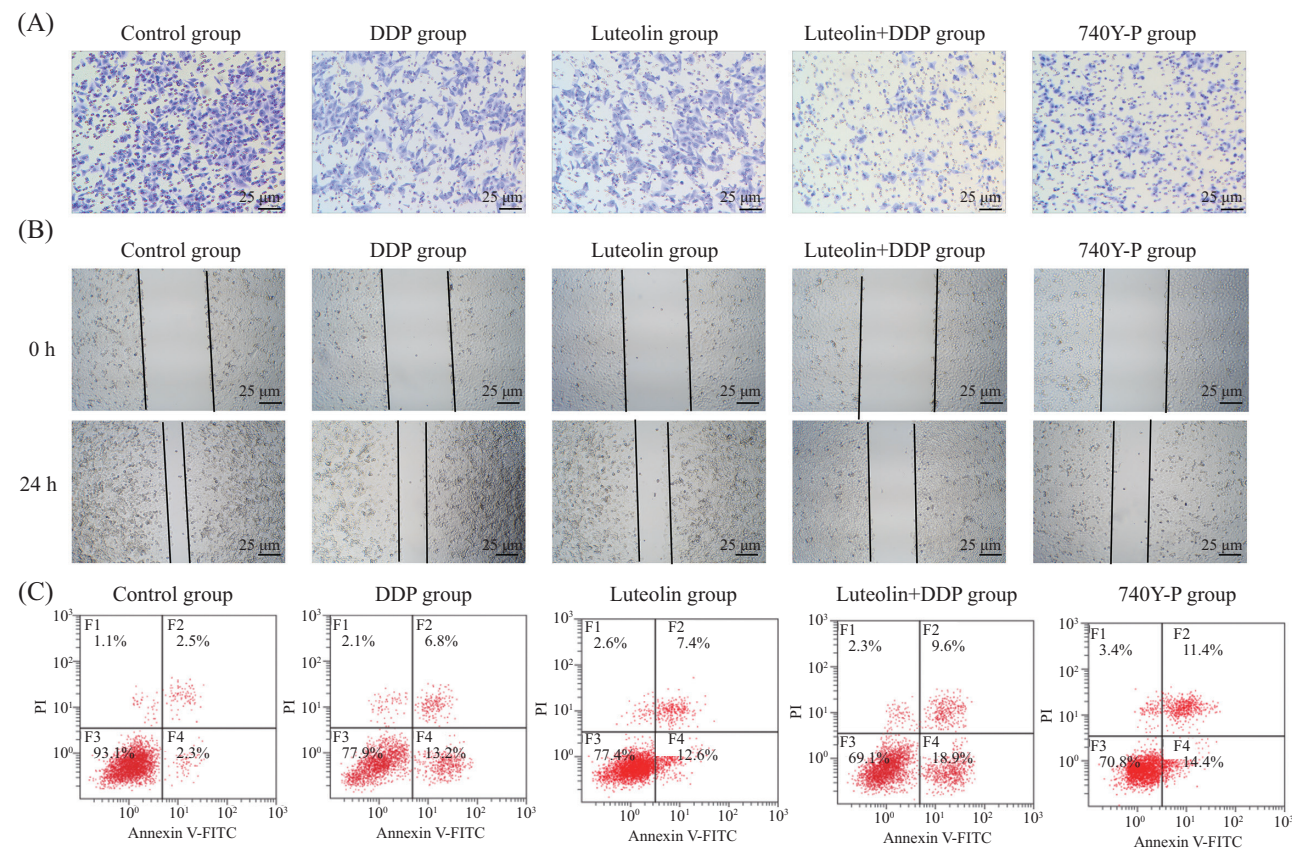
与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木犀草素组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水平显著降低 (*P*<0.05); 与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水平显著降低 (*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水

表4 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞增殖、迁移和凋亡的比较

Table 4 Comparison of proliferation, migration and apoptosis of MDA-MB-231/DDP-R cells in each group

组别 Group	穿膜细胞数 Number of invasive cells	细胞迁移率/% Cell migration rate /%	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control group	295.74±16.97	49.37±2.41	2.26±0.12
DDP group	212.05±13.48*	37.18±1.39*	13.10±0.89*
Luteolin group	203.49±14.25*	35.82±1.42*	12.68±0.53*
Luteolin+DDP group	59.65±4.84* ^{&#}	17.69±1.28* ^{&#}	19.27±0.94* ^{&#}
740Y-P group	99.53±6.11 [△]	28.46±1.33 [△]	14.32±0.68 [△]
<i>F</i>	182.818	155.519	237.698
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 $\bar{x}\pm s$, *n*=3。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. $\bar{x}\pm s$, *n*=3.



A: Transwell实验检测细胞侵袭能力; B: 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; C: 流式细胞术检测细胞凋亡水平。
A: Transwell assay was used to detect cell invasion ability; B: cell scratch test was used to detect cell migration ability; C: Flow cytometry was used to detect the level of apoptosis.

图2 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞增殖、迁移和凋亡的比较

Fig.2 Comparison of proliferation, migration and apoptosis of MDA-MB-231/DDP-R cells in each group

平显著增加(*P*<0.05), 见表6和图4。

2.7 木犀草素联合顺铂对裸鼠移植瘤的影响

与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木犀草素组的裸鼠瘤体体积减小和质量显著降低(*P*<0.05); 与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草

素组的裸鼠瘤体体积减少和质量显著降低(*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的裸鼠瘤体体积减小和质量显著增加(*P*<0.05), 见表7和图5。

2.8 木犀草素联合顺铂对裸鼠铜死亡的影响

与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木

表5 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞Cu⁺水平和铜死亡相关蛋白表达水平的比较

Table 5 Comparison of Cu⁺ levels and copper death-related protein expression levels in MDA-MB-231/DDP-R cells of each group

组别 Group	Cu ⁺ /μmol·L ⁻¹	ATP7A	DLAT	FDX1
Control group	3.57±0.21	0.87±0.05	0.30±0.02	0.28±0.01
DDP group	6.54±0.26*	0.72±0.04*	0.75±0.06*	0.70±0.04*
Luteolin group	6.79±0.21*	0.70±0.05*	0.84±0.05*	0.71±0.05*
Luteolin+DDP group	14.19±1.09* ^{&#}	0.15±0.01* ^{&#}	1.06±0.07* ^{&#}	0.99±0.06* ^{&#}
740Y-P group	8.05±0.39 [△]	0.39±0.02 [△]	0.76±0.05 [△]	0.73±0.05 [△]
<i>F</i>	153.889	178.585	82.683	94.617
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 $\bar{x}\pm s$, *n*=3。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. $\bar{x}\pm s$, *n*=3.

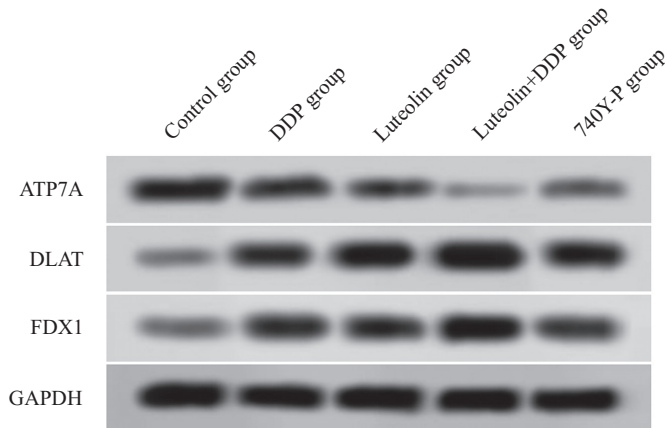


图3 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞铜死亡相关蛋白表达水平的比较

Fig.3 Comparison of the expression levels of cuproptosis-related proteins in MDA-MB-231/DDP-R cells among different groups

表6 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞PI3K/AKT/GSK-3β通路相关蛋白表达水平的比较

Table 6 Comparison of the expression levels of PI3K/AKT/GSK-3β pathway-related proteins in MDA-MB-231/DDP-R cells in each group

组别 Group	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-GSK-3β Ser9/GSK-3β
Control group	1.18±0.07	0.97±0.06	1.13±0.06
DDP group	0.96±0.05*	0.76±0.04*	0.97±0.06*
Luteolin group	0.92±0.06*	0.73±0.04*	0.94±0.05*
Luteolin+DDP group	0.37±0.02* ^{&#}	0.25±0.01* ^{&#}	0.29±0.02* ^{&#}
740Y-P group	0.57±0.03 [△]	0.53±0.04 [△]	0.56±0.03 [△]
<i>F</i>	128.720	130.271	161.141
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 $\bar{x}\pm s$, *n*=3。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. $\bar{x}\pm s$, *n*=3.

犀草素组的DLAT和FDX1蛋白表达水平显著升高, ATP7A蛋白表达水平显著降低(*P*<0.05); 与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的DLAT和FDX1

蛋白表达水平显著升高, ATP7A蛋白表达水平显著降低(*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的DLAT和FDX1蛋白表达水平显著降低, ATP7A蛋白

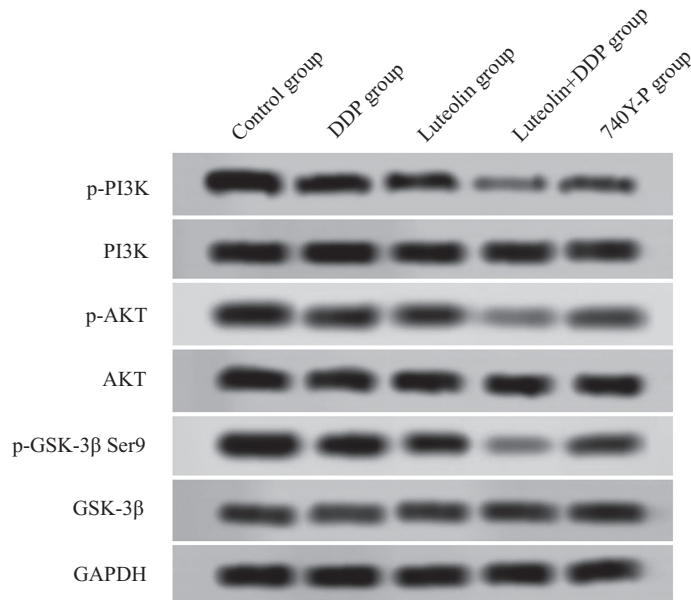


图4 各组MDA-MB-231/DDP-R细胞PI3K/AKT/GSK-3β通路相关蛋白表达水平的比较
Fig.4 Comparison of the expression levels of PI3K/AKT/GSK-3β pathway-related proteins in MDA-MB-231/DDP-R cells in each group

表7 各组裸鼠瘤体体积和质量的比较

Table 7 Comparison of tumor volume and weight of nude mice in each group

组别 Group	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume /mm ³				肿瘤质量/mg Tumor mass /mg
	7 d	14 d	21 d	28 d	
Control group	156.91±13.49	359.43±26.49	473.39±27.63	604.54±34.44	631.05±38.16
DDP group	126.87±9.67*	276.05±19.26*	382.41±23.47*	509.27±30.18*	516.42±32.41*
Luteolin group	120.01±10.33*	267.15±18.02*	365.54±22.62*	493.49±27.65*	505.67±28.03*
Luteolin+DDP group	90.37±8.16* ^{&#}	157.48±13.67* ^{&#}	222.56±18.21* ^{&#}	326.05±16.08* ^{&#}	340.18±23.64* ^{&#}
740Y-P group	116.49±9.41 [△]	234.19±15.21 [△]	306.47±24.67 [△]	413.96±25.07 [△]	421.29±33.84 [△]
<i>F</i>	26.486	112.254	78.297	73.455	59.739
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 *n*=5, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. *n*=5, $\bar{x}\pm s$.

表达水平显著增加(*P*<0.05), 见表8和图6。

2.9 木犀草素联合顺铂对裸鼠PI3K/AKT/GSK-3β信号通路的影响

与对照组相比, 顺铂组、木犀草素组和顺铂+木犀草素组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水平显著降低(*P*<0.05); 与顺铂组和木犀草素组相比, 顺铂+木犀草素组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水平显著降低(*P*<0.05); 与顺铂+木犀草素组相比, 740Y-P组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-GSK-3β Ser9/GSK-3β水平显著升高(*P*<0.05), 见表9和图7。

3 讨论

由于TNBC具有侵袭性的生物学行为且难以治愈, 目前尚无有效的靶向治疗方法。尽管传统细胞毒性药物顺铂在TNBC治疗中效果良好, 但其耐药性成为临床应用的主要障碍^[17]。近期, 联合治疗作为一种化学预防策略取得新突破, 即利用天然化合物增强和支持化疗药物的活性。临床前研究表明, 化学-草药联合治疗已通过多种机制(如诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、干扰多种癌细胞系的关键基因表达和蛋白质信号通路)被证实可提高治疗效果^[18]。因此, 本研究旨在探索一种新型联合

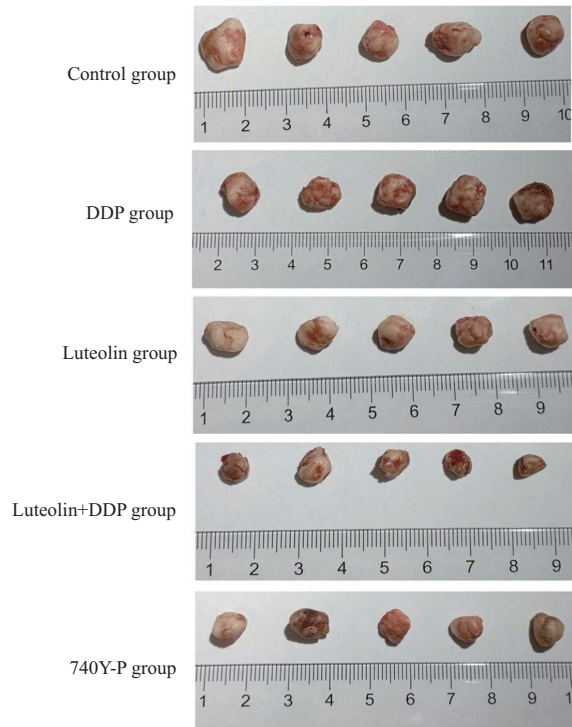


图5 各组裸鼠瘤体图

Fig.5 Tumor maps of nude mice in each group

表8 各组裸鼠铜死亡相关蛋白表达水平的比较

Table 8 Comparison of copper death-related protein expression levels in nude mice of each group

组别 Group	ATP7A	DLAT	FDX1
Control group	0.85±0.05	0.32±0.01	0.35±0.01
DDP group	0.70±0.06*	0.41±0.02*	0.40±0.02*
Luteolin group	0.72±0.05*	0.40±0.03*	0.43±0.05*
Luteolin+DDP group	0.29±0.02* ^{&#}	0.82±0.06* ^{&#}	0.80±0.05* ^{&#}
740Y-P group	0.40±0.03 [△]	0.55±0.04 [△]	0.58±0.03 [△]
<i>F</i>	140.581	147.159	129.961
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 *n*=5, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. *n*=5, $\bar{x}\pm s$.

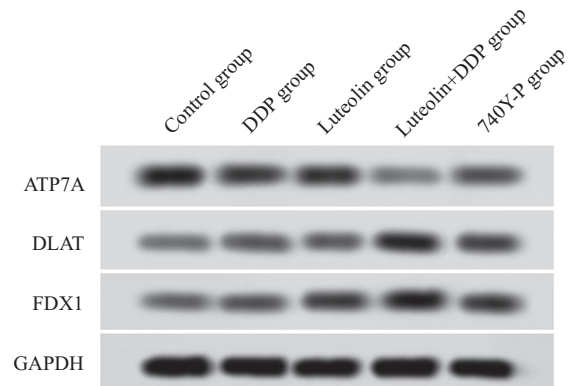


图6 各组裸鼠铜死亡相关蛋白表达水平的比较

Fig.6 Comparison of copper death-related protein expression levels in nude mice of each group

表9 各组裸鼠PI3K/AKT/GSK-3β通路相关蛋白表达水平的比较

Table 9 Comparison of the expression levels of PI3K/AKT/GSK-3β pathway-related proteins in nude mice of each group

组别 Group	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-GSK-3β Ser9/GSK-3β
Control group	1.28±0.08	1.25±0.07	1.22±0.08
DDP group	1.09±0.07*	1.11±0.05*	1.06±0.07*
Luteolin group	1.10±0.05*	1.07±0.05*	1.07±0.08*
Luteolin+DDP group	0.34±0.02* ^{&#}	0.32±0.03* ^{&#}	0.31±0.02* ^{&#}
740Y-P group	0.52±0.03 [△]	0.59±0.03 [△]	0.54±0.04 [△]
<i>F</i>	278.444	332.735	195.622
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与对照组比较; [&]*P*<0.05, 与顺铂组比较; [#]*P*<0.05, 与木犀草素组比较; [△]*P*<0.05, 与顺铂+木犀草素组比较。 *n*=5, $\bar{x}\pm s$ 。
**P*<0.05 compared with the control group; [&]*P*<0.05 compared with the DDP group; [#]*P*<0.05 compared with the luteolin group; [△]*P*<0.05 compared with the luteolin+DDP group. *n*=5, $\bar{x}\pm s$.

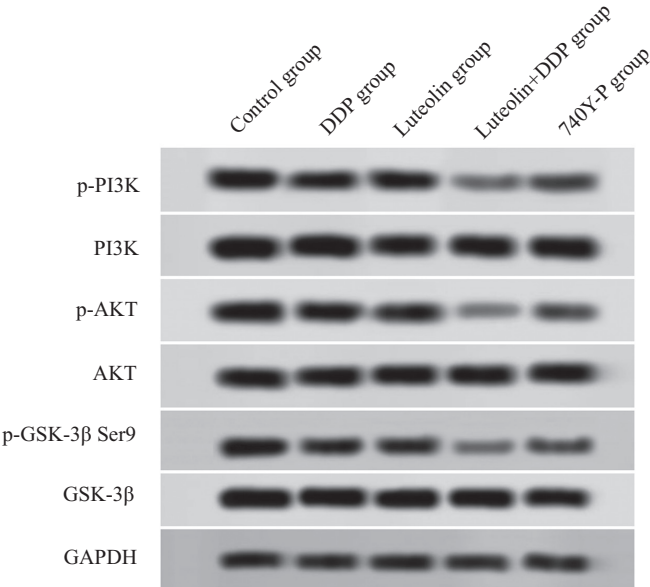


图7 各组裸鼠PI3K/AKT/GSK-3β通路相关蛋白表达水平的比较

Fig.7 Comparison of PI3K/AKT/GSK-3β pathway-related protein expression levels in nude mice of each group

治疗策略,以克服顺铂耐药,提升TNBC的治疗效果。在众多天然化合物中,木犀草素因其独特的化学结构和多样的生物活性备受关注。木犀草素是一种广泛存在于自然界的黄酮类化合物,具有抗癌活性,在结直肠癌、胶质母细胞瘤和胰腺癌等多种癌症类型中均得到证实^[19]。在TNBC领域,木犀草素也被认为是癌细胞生长和转移的抑制剂^[20],能显著降低顺铂诱导的乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[21]。然而,木犀草素提高乳腺癌细胞顺铂敏感性的具体机制尚不明确。为此,本研究构建顺铂耐药的MDA-MB-231/DDP-R细胞模型,并采用木犀草素进行干预。结果显示,木犀草素可显著抑制MDA-MB-231和MDA-MB-231/DDP-R细胞的增殖活性,且抑制作用呈浓

度依赖性。浓度为2 μmol/L的木犀草素能显著逆转MDA-MB-231/DDP-R细胞对顺铂的耐药性,逆转指数达3.45±0.29。进一步将顺铂与木犀草素联合应用于MDA-MB-231/DDP-R细胞,发现联合用药可显著抑制细胞侵袭、迁移,并促进细胞凋亡,其效果明显优于顺铂单药组和木犀草素单药组。在裸鼠移植瘤中我们也观察到了同样的趋势。这提示木犀草素与顺铂联合应用或许是提高TNBC顺铂敏感性、克服耐药性的有效策略。

铜死亡是一种新兴的程序性细胞死亡形式,由铜依赖性线粒体功能障碍所引发,其关键触发因素为细胞内铜离子的蓄积。铜离子可直接与三羧酸循环中的脂酰化组分结合,促使脂酰化线粒体蛋白聚

集,诱导蛋白质毒性应激,最终导致细胞死亡^[22]。这种由离子直接诱导的细胞死亡方式具有良好的可控性与精确性,在肿瘤治疗领域具有潜在应用价值^[23]。目前,铜螯合剂、铜离子载体以及铜基纳米材料等均已被报道可用于癌症治疗^[24]。ATP7A是经典的铜转运蛋白,可将多余的铜离子泵至细胞外腔室。此外,ATP7A还能调节赖氨酸氧化酶的活性,进而参与肿瘤的侵袭与转移过程。因此,抑制ATP7A的表达是扰乱铜转运机制、破坏铜稳态的有效手段,最终会使细胞内铜离子浓度升高,从而抑制肿瘤发展^[25]。DLAT是丙酮酸脱氢酶复合物的一个亚基,其可通过结合铜的能力介导铜的还原,引发线粒体蛋白毒性应激和铜相关形态改变。近期研究证实,DLAT依赖性铜沉积在克服乳腺癌顺铂耐药方面发挥关键作用^[26]。FDX1也是促进铜死亡的关键基因。FDX1缺失会破坏DLAT的脂酰化过程,进而影响铜死亡进程,最终抑制癌症的恶性进展^[27]。本研究发现,木犀草素可提升细胞内Cu⁺浓度,显著抑制ATP7A表达,上调DLAT和FDX1蛋白表达水平。这提示木犀草素可能通过可增强MDA-MB-231/DDP-R细胞对铜死亡的敏感性,进而抑制其恶性进展。

PI3K/AKT信号通路是细胞代谢与生长的关键调控因子,也是人类癌症中最常发生改变的信号通路之一,对肿瘤细胞的凋亡抑制、增殖及转移等关键过程影响重大^[28]。GSK-3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在乳腺癌等多种癌症中呈过度表达状态,参与DNA修复、细胞凋亡以及癌症化疗和放疗耐药等过程^[29]。GSK-3 β 的活性受不同磷酸化模式调控,其中Ser9位点磷酸化会抑制其激酶活性。据报道,AKT可使GSK-3 β 在Ser9位点磷酸化,进而促进乳腺癌的生长和转移^[30]。研究显示,AKT信号通路激活后,可通过消除FDX1诱导的铜代谢和有氧呼吸,增强三阴性乳腺癌对铜死亡的抗性^[31]。另一项研究报道,抑制PI3K/AKT通路可促进结肠癌细胞对铜死亡的敏感性^[8]。此外,在铜诱导的神经毒性研究中,槲皮素通过激活PI3K/AKT通路、抑制GSK-3 β 活性,减轻了铜诱导的氧化损伤和减少了细胞死亡^[32],这提示GSK-3 β 可能参与铜死亡相关信号调控。既往研究表明,木犀草素可通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路,促使他莫昔芬耐药乳腺癌细胞凋亡^[33];在紫杉醇耐药食管鳞状细胞癌中,木犀草素通过下调FAK/PI3K/AKT通路,增强药物化疗敏感性^[34]。本研究证实,木犀草素能显著抑制PI3K、AKT

和GSK-3 β 的磷酸化。进一步采用PI3K/AKT通路激活剂740Y-P进行验证,明确了该通路在顺铂耐药乳腺癌细胞铜死亡中的作用:740Y-P可显著削弱木犀草素与顺铂联合使用对MDA-MB-231/DDP-R细胞迁移和侵袭的抑制作用,同时抑制癌细胞凋亡和细胞内Cu⁺浓度升高,并逆转铜死亡相关蛋白的表达变化。这提示,木犀草素通过抑制PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路,可增强顺铂耐药乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。

综上所述,木犀草素可通过调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路诱导铜死亡,从而增强乳腺癌细胞对顺铂的敏感性。当前研究虽揭示了木犀草素通过铜死亡增敏顺铂的潜力,但仍存在局限性:未设置铜死亡特异性抑制剂对照,难以直接验证铜死亡机制;实验模型以细胞系和裸鼠为主,缺乏临床样本验证及免疫微环境考量;对PI3K/AKT/GSK-3 β 通路与铜死亡蛋白的调控关系探究不足。后续研究应增设抑制剂对照明确铜死亡作用,采用人源化PDX模型和C57BL/6小鼠同源移植模型评估疗效与安全性,并通过蛋白互作分析和基因编辑技术深化机制验证,为临床转化提供更可靠依据。

参考文献 (References)

- [1] GIAQUINTO A N, SUNG H, NEWMAN L A, et al. Breast cancer statistics 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(6): 477-95.
- [2] FENG L, WU T Z, GUO X R, et al. Discovery of natural resorcylic acid lactones as novel potent copper ionophores covalently targeting PRDX1 to induce cuproptosis for triple-negative breast cancer therapy [J]. ACS Cent Sci, 2025, 11(2): 357-70.
- [3] YU Z, CAO W, REN Y, et al. ATPase copper transporter A, negatively regulated by miR-148a-3p, contributes to cisplatin resistance in breast cancer cells [J]. Clin Transl Med, 2020, 10(1): 57-73.
- [4] GUO D, HUANG Z, WANG Q, et al. IAPP blocks anti-breast cancer function of CD8⁺T cells via targeting cuproptosis [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1481129.
- [5] QI X, WANG J, CHE X, et al. The potential value of cuproptosis (copper-induced cell death) in the therapy of clear cell renal cell carcinoma [J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(8): 3947-66.
- [6] ZHAO R, XUE Y, CAO Y, et al. Blocking or knockdown of P2X7 receptor inhibits invasion and migration of mouse breast cancer cells via PI3K/Akt/GSK-3 β pathways and EMT [J]. Med Oncol, 2025, 42(8): 340.
- [7] SHAO H, CHEN J, LI A, et al. Salvigenin suppresses hepatocellular carcinoma glycolysis and chemoresistance through inactivating the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2023, 195(8): 5217-37.
- [8] HUANG T, ZHANG Y, WU Y, et al. CEBPB dampens the cuproptosis sensitivity of colorectal cancer cells by facilitating the

- PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2024, 30(6): 381-8.
- [9] ZHU M, SUN Y, SU Y, et al. Luteolin: a promising multifunctional natural flavonoid for human diseases [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(7): 3417-43.
- [10] SINGH D, SHUKLA G. The multifaceted anticancer potential of luteolin: involvement of NF- κ B, AMPK/mTOR, PI3K/Akt, MAPK, and Wnt/ β -catenin pathways [J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(2): 505-25.
- [11] TSAI K J, TSAI H Y, TSAI C C, et al. luteolin inhibits breast cancer stemness and enhances chemosensitivity through the Nrf2-mediated pathway [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6452.
- [12] 阮涛, 吴莉, 刘岐焕, 等. 吉西他滨联合卡铂诱导NK/T细胞淋巴瘤细胞株凋亡的研究[J]. *临床医药实践*(RUAN T, WU L, LIU Q H, et al. Study on the apoptosis of NK/T cell lymphoma cell line induced by gemcitabine combined with carboplatin [J]. *Proceeding of Clinical Medicine*), 2021, 30(4): 243-9.
- [13] SHEN W J, ZHANG Y. RPN1 promotes the proliferation and invasion of breast cancer cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 25.
- [14] 刘晓蕾, 马立东, 张朵朵. 青蒿琥酯通过TLR4/NF- κ B信号通路抑制人胃癌裸鼠移植瘤生长及对PCNA和ZNF139表达的影响[J]. *中国医院用药评价与分析*(LIU X L, MA L D, ZHANG D D. Inhibition of artesunate on growth of transplanted human gastric cancer through TLR4/NF- κ B signaling pathway and its effects on expression of PCNA and ZNF139 [J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*), 2022, 22(10): 1201-5.
- [15] 杨杰, 嵇学武, 王鑫, 等. 木犀草素对口腔鳞状细胞癌迁移、侵袭、增殖和凋亡的影响[J]. *药物评价研究*(YANG J, ZHUO X W, WANG X, et al. Effects of luteolin on migration, invasion, proliferation, and apoptosis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Drug Evaluation Research*), 2025, 48(6): 1497-506.
- [16] WANG Y, WANG B L, ZHOU L Q, et al. NRP1 overexpression potentially enhances osimertinib resistance in NSCLC via activation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2024, 14(12): 5680-96.
- [17] DENG L, LIAO L, ZHANG Y L, et al. SF3A2 promotes progression and cisplatin resistance in triple-negative breast cancer via alternative splicing of MKRN1 [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(14): ead4009.
- [18] OKEM A, HENSTRA C, LAMBERT M, et al. A review of the pharmacodynamic effect of chemo-herbal drug combinations therapy for cancer treatment [J]. *Med Drug Discov*, 2023, 17: 100147.
- [19] ROCCHETTI M T, BELLANTI F, ZADOROZHNA M, et al. Multi-faceted role of luteolin in cancer metastasis: EMT, angiogenesis, ECM degradation and apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8824.
- [20] WU H T, LIN J, LIU Y E, et al. luteolin suppresses androgen receptor-positive triple-negative breast cancer cell proliferation and metastasis by epigenetic regulation of MMP9 expression via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 81: 153437.
- [21] 张晓兰, 莫殿军, 刘艳茹, 等. 木犀草素对顺铂诱导乳腺癌细胞凋亡的增敏作用[J]. *中国临床药理学杂志*(ZHANG X L, MO D J, LIU Y R, et al. Sensitizing effect of luteolin on cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells [J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*), 2022, 38(14): 1603-6.
- [22] CHI H, PENG G, WANG R, et al. Cuprotoxis programmed-cell-death-related lncrna signature predicts prognosis and immune landscape inPAAD patients [J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3436.
- [23] GUAN M, CHENG K, XIE X T, et al. Regulating copper homeostasis of tumor cells to promote cuproptosis for enhancing breast cancer immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 10060.
- [24] XU Y, LIU S Y, ZENG L, et al. An enzyme-engineered nonporous copper(i) coordination polymer nanoplatfor for cuproptosis-based synergistic cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(43): e2204733.
- [25] GAO W, HUANG Z, DUAN J, et al. Elesclomol induces copper-dependent ferroptosis in colorectal cancer cells via degradation of ATP7A [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(12): 3527-44.
- [26] TANG J, ZHAO L, QIU X, et al. Copper ionophore enhanced cisplatin efficiency through DLAT-cuproptosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2025, 503: 117496.
- [27] CHEN G, ZHANG J, TENG W, et al. FDX1 inhibits thyroid cancer malignant progression by inducing cuproptosis [J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e18655.
- [28] MENG Q, LI Z, HE X, et al. Anti-TNBC effects of Lappaol F by targeting epithelial-mesenchymal transition via regulation of GSK-3 β /YAP/ β -catenin and PI3K/AKT pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1496511.
- [29] LIN J, SONG T, LI C, et al. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118659.
- [30] YUAN Y, FAN Y, GAO Z, et al. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating Cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, 17(3): 707-25.
- [31] SUN Z, XU H, LU G, et al. AKT1 phosphorylates FDX1 to promote cuproptosis resistance in triple-negative breast cancer [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(17): e2408106.
- [32] ZUBČIĆ K, RADOVANOVIĆ V, VLAINIĆ J, et al. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling are involved in quercetin-mediated neuroprotection against copper-induced injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9834742.
- [33] WU H T, LIU Y E, HSU K W, et al. MLL3 induced by luteolin causes apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer cells through h3k4 monomethylation and suppression of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(5): 1221-41.
- [34] YANG Z, LIU H, SONG Y, et al. luteolin enhances drug chemosensitivity by downregulating the FAK/PI3K/AKT pathway in paclitaxel-resistant esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(3): 77.