

分类号: R737.9

单位代码: 10159

密 级: 公开

学 号: 2021121242



中国医科大学

# 硕士学位论文

(临床医学硕士学术学位)

中文题目: COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用  
机制研究

英文题目: Study on the Mechanism of COMMD3 in Docetaxel Resistance in  
TNBC

论文作者: 闫春燕

指导教师: 赵羲和 副教授

学科专业: 肿瘤学

完成时间: 2024年2月

中国医科大学硕士学位论文

COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制研究  
Study on the Mechanism of COMMD3 in Docetaxel Resistance in  
TNBC

论文作者 闫春燕                      指导教师 赵羲和 副教授  
申请学位 医学硕士                      培养单位 第二临床学院  
一级学科 临床医学                      二级学科 肿瘤学  
研究方向 肿瘤的化疗耐药  
论文起止时间 2022年5月 — 2024年2月  
论文完成时间 2024年2月

中国医科大学(辽宁)  
2024 年 2 月

## 摘要

**目的：**三阴性乳腺癌具有高度增殖、侵袭和快速进展的特性，预后差，是临床治疗的难点。多西紫杉醇（又称多西他赛）广泛用于三阴性乳腺癌的各治疗阶段，多西紫杉醇耐药是导致治疗失败的重要原因。本项目拟通过体外实验研究，结合临床资料分析，明确COMMD3与三阴性乳腺癌预后的关系及其在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制，探讨COMMD3成为解决三阴性乳腺癌化疗治疗耐药新靶点的可能性。

**研究方法：**1. 自TCGA数据库提取三阴性乳腺癌的RNAseq数据和相应的临床信息，通过生物信息学分析获得与生存相关基因。自GEO数据库提取三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药株与非耐药株的基因表达谱，通过生物信息学分析获得差异表达基因。将筛选出的差异表达基因与生存预后相关基因取交集，基于Lasso回归算法进行降维并构建包含交集基因的预后模型。对交集基因在三阴性乳腺癌中进行单基因差异基因分析，发现COMMD3可能为导致三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的关键基因。2. 构建对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系，通过TMT（Tandem Mass Tags for Relative and Absolute Quantitation）检测BT-549和BT-549/Doc细胞的差异蛋白。3. 通过qPCR、Western Blot检测COMMD3在对多西紫杉醇耐药与不耐药三阴性乳腺癌细胞株中表达水平差异。收集对多西紫杉醇耐药与不耐药三阴性乳腺癌患者病理切片和治疗信息，通过免疫组化检测COMMD3在对多西紫杉醇耐药与不耐药三阴性乳腺癌患者肿瘤组织中表达水平差异。4. 在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系中敲减COMMD3，通过CCK8、流式细胞术检测COMMD3表达下降对三阴性乳腺癌IC50、细胞周期及细胞凋亡影响。5. 在对多西紫杉醇敏感的三阴性乳腺癌细胞系中过表达COMMD3，通过CCK8、流式细胞术检测COMMD3表达升高对三阴性乳腺癌细胞IC50、细胞周期及细胞凋亡影响。6. 利用免疫共沉淀-质谱分析寻找COMMD3的相互作用蛋白，结合生物信息学手段进一步探索COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制。

**结果：**1. 在TCGA数据库中鉴定出184个三阴性乳腺癌生存相关基因，GEO数据库中鉴定出与多西紫杉醇耐药相关基因3563个。取交集并筛选方向后得到10个待选基因，基于Lasso进行降维并构建预后模型。交集基因在三阴性乳腺癌中的单基因差异基因分析结果提示COMMD3在三阴性乳腺癌中差异基因富集在PI3K/AKT等

信号通路与细胞周期、凋亡、代谢相关生物学过程，提示COMMD3可能为三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药关键基因。2. 本研究构建的多西紫杉醇耐药株与非耐药株相比，TMT检测到223个差异蛋白，其中上调蛋白98个，下调蛋白125个。对差异蛋白进行功能富集后发现差异蛋白主要富集在于代谢过程、细胞周期、坏死性凋亡等生物学过程。3. qPCR、Western Blot显示多西紫杉醇耐药细胞与非耐药细胞相比，COMMD3明显上调，免疫组化实验结果显示COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌患者肿瘤组织中表达明显升高。4. 在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系中敲减COMMD3，耐药细胞IC<sub>50</sub>下降到非耐药细胞水平，多西紫杉醇处理诱导细胞G2/M期阻滞，凋亡增加。5. 在对多西紫杉醇敏感的三阴性乳腺癌细胞系中过表达COMMD3，细胞IC<sub>50</sub>升高，多西紫杉醇处理不能诱导细胞G2/M期阻滞，凋亡增加。6. 免疫共沉淀-质谱分析结果显示COMMD3可能通过代谢重编程、细胞骨架蛋白、细胞应激及蛋白质合成的调控等途径调节三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。

**结论：**COMMD3高表达与三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药和不良预后密切相关，靶向抑制COMMD3可逆转对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌的耐药性，使其对多西紫杉醇重新敏感。过表达COMMD3可增强三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药性。COMMD3可能通过代谢重编程、细胞骨架蛋白、细胞应激及蛋白质合成的调控等途径调节三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。

**关键词：**COMMD3；三阴性乳腺癌；多西紫杉醇；化疗耐药；生物信息学

## Abstract

**Objective:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by high proliferative, invasive, and rapid progression properties, leading to a poor prognosis and making it a challenging clinical treatment dilemma. Docetaxel, also known as Taxotere, is extensively used across various treatment stages of TNBC. Resistance to docetaxel is a significant cause of treatment failure. This study is dedicated to elucidating the correlation between COMMD3 expression and the prognosis of TNBC, particularly focusing on its mechanistic role in docetaxel resistance. By integrating in vitro experimental research with clinical data analysis, this investigation seeks to evaluate the feasibility of targeting COMMD3 as a novel strategic approach in counteracting chemotherapy resistance in TNBC treatment.

**Methods:** 1. RNAseq data and corresponding clinical information of TNBC were extracted from the TCGA database, and genes related to survival were identified through bioinformatics analysis. Gene expression profiles of docetaxel-resistant and non-resistant strains of TNBC were extracted from the GEO database, and differentially expressed genes were obtained through bioinformatics analysis. The intersection of differentially expressed genes and genes related to survival prognosis was taken, and a prognostic model including intersecting genes was constructed based on the lasso regression algorithm. Single-gene differential gene analysis was conducted on intersecting genes in TNBC, COMMD3 was identified as a potential key gene causing docetaxel resistance in TNBC. 2. TNBC cell lines resistant to docetaxel were established, and differential proteins in BT-549 and BT-549/Doc cells were detected using TMT for Relative and Absolute Quantitation. 3. The expression levels of COMMD3 in docetaxel-resistant and non-resistant TNBC cell lines were detected by qPCR and Western Blot. Pathological sections and treatment information of docetaxel-resistant and non-resistant TNBC patients were collected, and the expression levels of COMMD3 in tumor tissues of patients with and without docetaxel resistance were detected by immunohistochemistry. 4. COMMD3 was knocked down in TNBC cell lines resistant to docetaxel, and the effects of decreased COMMD3 expression on the IC<sub>50</sub> of TNBC, cell cycle, and apoptosis were

detected by CCK8 assay and flow cytometry. 5. COMMD3 was overexpressed in docetaxel-sensitive TNBC cell lines, and the effects of increased COMMD3 expression on the IC<sub>50</sub> of TNBC, cell cycle, and apoptosis were detected by CCK8 assay and flow cytometry. 6. Utilizing Co-Immunoprecipitation-Mass Spectrometry (COIP-MS) analysis to identify COMMD3 interacting proteins, and integrating bioinformatics approaches to further investigate the mechanism of COMMD3 in mediating docetaxel resistance in TNBC.

**Results:** 1. In the TCGA database, 184 survival-related genes for TNBC were identified, and 3563 genes associated with docetaxel resistance were identified in the GEO database. An intersection and subsequent filtering yielded 10 candidate genes, and a prognostic model was constructed based on dimension reduction via Lasso regression. Single-gene differential gene analysis of COMMD3 in TNBC indicated that the differential genes were mainly related to pathways such as PI3K/AKT signaling pathway, cell cycle and metabolic processes. This indicates that COMMD3 could be a key gene for docetaxel resistance in TNBC. 2. Compared to non-resistant TNBC cell line, 223 differential proteins were detected in docetaxel-resistant TNBC cell line by TMT, including 98 upregulated proteins and 125 downregulated proteins. Functional enrichment analysis of these differential proteins revealed a concentration in pathways related to metabolism, cell cycle, and necroptosis, among others. 3. qPCR and Western Blot analyses showed that COMMD3 was significantly upregulated in docetaxel-resistant strains compared to non-resistant strains, and immunohistochemistry results indicated that the expression of COMMD3 is significantly increased in the tumor tissues of TNBC patients who are resistant to docetaxel. 4. In the docetaxel-resistant TNBC cell lines, knockdown of COMMD3 reduced the IC<sub>50</sub> to levels comparable to non-resistant cells, and docetaxel treatment induced G2/M phase arrest and an increase in apoptosis. 5. In docetaxel-sensitive TNBC cell lines, overexpression of COMMD3 elevated the IC<sub>50</sub>, and docetaxel treatment failed to induce G2/M phase arrest and increase apoptosis. 6. The results of COIP-MS analysis suggest that COMMD3 may regulate the resistance of TNBC to docetaxel through pathways involving metabolic reprogramming, cytoskeletal proteins, cellular stress, and protein synthesis regulation.

**Conclusion:** High expression of COMMD3 is intricately linked with both docetaxel

resistance and adverse prognostic outcomes in TNBC. Targeted suppression of COMMD3 has been shown to effectively counteract docetaxel resistance in TNBC, whereas its overexpression significantly augments this resistance. COMMD3 may regulate the resistance of TNBC to docetaxel through pathways involving metabolic reprogramming, cytoskeletal proteins, cellular stress, and protein synthesis regulation.

**Key words:** COMMD3; Triple-Negative Breast Cancer; Docetaxel; Chemotherapy Resistance; Bioinformatic analysis

## 英文缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
ACTB	Actin Beta	$\beta$ -肌动蛋白
ACTN4	Actinin Alpha 4	$\alpha$ -肌动蛋白4
ALB	Albumin	白蛋白
ALDOA	Fructose-Bisphosphate Aldolase A	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶A
ANXA2	Annexin A2	膜联蛋白 A2
BCA	Bicinchoninic Acid	二喹啉甲酸
CCK8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒8
cDNA	Complementary DNA	互补DNA
CI	Confidence Interval	置信区间
COIP-MS	Co-Immunoprecipitation-Mass Spectrometry	免疫共沉淀-质谱
COMMD3	COMM domain-containing 3	含COMM域3
CRL	Cullin-RING E3 ubiquitin ligases	E3泛素连接酶
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	3,3'-二氨基联苯胺
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate	二乙基焦碳酸酯
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
ECL	Enhanced Chemiluminescence	增强型化学发光
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EEF1A1	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1	真核生物翻译延伸因子1 $\alpha$ 1
EEF2	Eukaryotic Translation Elongation Factor 2	真核生物翻译延伸因子 2
ENaC	Epithelial Sodium Channel	阿米洛利敏感钠通道
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
GEO	Gene Expression Omnibus	基因表达数据库
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis	基因集富集分析
GO	Gene ontology	基因本体论



英文缩写	英文全称	中文全称
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	人表皮生长因子受体2
HIST1H2A	Histone H2A Type 1-A	组蛋白H2A型1-A
HIST1H4H	Histone H4 Type 1-H	组蛋白 H4 型 1-H
HR	Hazard Ratio	危险比
HNRNPU	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U	异质核核糖核蛋白U
HNRPA3	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A 3	异质核核糖核蛋白A3
HNRNPK	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K	异质核核糖核蛋白K
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1	热休克蛋白90 $\alpha$ 家族B成员1
HSPD1	Heat Shock Protein 60 kDa Mitochondrial	热休克蛋白60 kDa线粒体
IC50	Half Maximal Inhibitory Concentration	半抑制浓度
IGL@	Immunoglobulin Lambda Constant 1	免疫球蛋白 $\lambda$ 恒定区1
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
KRT1	Keratin 1	角蛋白1
KRT10	Keratin 10	角蛋白10
KRT14	Keratin 14	角蛋白 14
KRT16	Keratin 16	角蛋白16
KRT19	Keratin 19	角蛋白19
KRT5	Keratin 5	角蛋白5
KRT78	Keratin 78	角蛋白78
KRT8	Keratin 8	角蛋白8
KRT9	Keratin 9	角蛋白9
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱氢酶
MDR	Multi-Drug Resistance gene	多药耐药基因
MOI	Multiplicity of Infection	感染复数
mRNA	messenger RNA	信使RNA
MYH9	Myosin Heavy Chain 9	肌球蛋白重链9

英文缩写	英文全称	中文全称
NPM1	Nucleophosmin 1	核磷蛋白1
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲盐水
PKM	Pyruvate Kinase M2	丙酮酸激酶M2型
PHGDH	Phosphogluconate Dehydrogenase	磷酸葡萄糖酸脱氢酶
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride	苯甲基磺酰氟
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction	定量聚合酶链式反应
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	放射免疫沉淀法
RI	Resistance Index	耐药指数
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RNA-seq	RNA Sequencing	RNA序列测定
RPL3	Ribosomal Protein L3	核糖体蛋白L3
RPL5	Ribosomal Protein L5	核糖体蛋白L5
RPL7	Ribosomal Protein L7	核糖体蛋白L7
RPL8	Ribosomal Protein L8	核糖体蛋白L8
RPL14	Ribosomal Protein L14	核糖体蛋白L14
RPL18	Ribosomal Protein L18	核糖体蛋白L18
RPL19	Ribosomal Protein L19	核糖体蛋白L19
RPS14	Ribosomal Protein S14	核糖体蛋白S14
RPS18	Ribosomal Protein S18	核糖体蛋白S18
RPS4X	Ribosomal Protein S4 X-linked	核糖体蛋白S4 X连锁
RPS6	Ribosomal Protein S6	核糖体蛋白S6
RPS8	Ribosomal Protein S8	核糖体蛋白S8
RPS9	Ribosomal Protein S9	核糖体蛋白 S6
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SERPINH1	Serpin Family H Member 1	丝氨酸蛋白酶抑制剂家族H成员1
TCP1	T-Complex Protein 1	T复合体蛋白1

英文缩写	英文全称	中文全称
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	Tris缓冲盐溶液加Tween-20
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer	三阴性乳腺癌
TMT	Tandem Mass Tags for Relative and Absolute Quantitation	串联质谱标签相对和绝对定量技术
YWHAG	YWHA Family Member A	YWHA家族成员A
YWHAZ	YWHA Family Member Z	YWHA家族成员Z

## 目 录

1 前言.....	1
2 材料和方法.....	4
2.1 实验材料.....	4
2.1.1 三阴性乳腺癌临床标本.....	4
2.1.2 细胞系来源.....	4
2.1.3 主要仪器.....	5
2.1.4 主要试剂与耗材.....	6
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 表达量与生存相关基因的筛选.....	8
2.2.2 耐药相关基因的识别.....	9
2.2.3 预后模型建立.....	9
2.2.4 单基因差异表达基因分析与功能富集 .....	10
2.2.5 COMMD3 的预后分析 .....	10
2.2.6 细胞培养.....	11
2.2.7 耐药株构建.....	12
2.2.8 细胞耐药性测定.....	13
2.2.9 串联质谱标签相对和绝对定量技术.....	14
2.2.10 细胞总蛋白提取.....	15
2.2.11 Western Blot 实验 .....	16
2.2.12 细胞总 RNA 提取 .....	17
2.2.13 RNA 逆转录实验 .....	18
2.2.14 实时定量 PCR 实验(RT-qPCR).....	18
2.2.15 免疫组织化学染色实验.....	19
2.2.16 质粒转染.....	20
2.2.17 慢病毒转染.....	20
2.2.18 稳转株细胞的构建.....	21
2.2.19 细胞周期检测实验.....	21
2.2.20 细胞凋亡检测实验.....	22
2.2.21 联合免疫沉淀质谱分析.....	22
2.2.22 蛋白的功能富集与 PPI 分析.....	24
2.2.23 统计分析.....	24
3 结果.....	25
3.1 COMMD3 是导致三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的关键基因...25	
3.1.1 表达量与生存相关基因和耐药相关基因 .....	25

3.1.2 与多西紫杉醇耐药相关的 TNBC 预后模型 .....	27
3.1.3 单基因差异表达基因分析揭示 COMMD3 可能是 TNBC 多 西紫杉醇耐药的关键基因 .....	29
3.1.4 COMMD3 是三阴性乳腺癌预后危险因素 .....	30
3.2 多西紫杉醇耐药对三阴性乳腺癌细胞的影响 .....	31
3.3 COMMD3 在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中高表达 .....	36
3.4 COMMD3 表达水平下降导致耐药三阴性乳腺癌对多西紫杉醇 重新敏感 .....	38
3.5 COMMD3 表达水平升高可启动三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐 药 .....	42
3.6 COMMD3 在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制初步 探索 .....	44
4 讨论 .....	48
5 结论 .....	53
本研究创新性的自我评价 .....	54
参考文献 .....	55
综述 乳腺癌化疗耐药机制研究：现状与挑战 .....	59
参考文献 .....	63

# COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制研究

## 1 前言

三阴性乳腺癌是乳腺癌亚型中的一种，特征是乳腺肿瘤细胞中雌激素受体（Estrogen Receptor, ER）、孕激素受体（Progesterone receptor, PR）和人表皮生长因子受体2（Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2）的表达均为阴性。这种亚型占有浸润性乳腺肿瘤的大约10%至20%<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌的临床表现通常更为侵袭性，具有较高的肿瘤扩散和转移潜力，病程发展也相对更快<sup>[2]</sup>。遗憾的是，与其他亚型乳腺癌相比，三阴性乳腺癌因缺乏ER、PR和HER2表达，无法使用内分泌治疗或针对HER2的靶向治疗。因此，化疗成为三阴性乳腺癌患者的主要治疗选择。然而，化疗对三阴性乳腺癌患者的效果通常受限，研究表明相较于其他乳腺癌亚型，三阴性乳腺癌患者接受化疗后的五年无病生存率明显降低<sup>[3]</sup>。迄今为止，现有的非选择性化疗方案通常伴随较高的复发率和不可忽视的毒性副作用<sup>[4]</sup>。例如，蒽环类紫杉醇类等常用化疗药物，虽然在一些患者中可见初期反应，但在长期追踪研究中，约有20% - 30%的患者在治疗后5年内出现复发<sup>[5]</sup>。这些毒性副作用包括但不限于心脏毒性、神经系统毒性及骨髓抑制等，显著影响了患者的生活质量<sup>[6]</sup>。探究理解三阴性乳腺癌患者对多西紫杉醇化疗发生耐药的机制对三阴性乳腺癌治疗策略的制定与优化，潜在治疗方法的探索至关重要。

铜代谢MURR1结构域（Copper Metabolism MURR1 Domain, COMMD）蛋白家族由10个家族成员构成，它们共享一个高度结构保守的C端COMMD基序<sup>[7]</sup>。COMMD蛋白在许多细胞过程中起关键作用，包括NF- $\kappa$ B信号途径的调控、细胞周期的控制以及铜离子的代谢等。在恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中，COMMD家族成员表现出重要的调节功能<sup>[8]</sup>。COMMD3（COMM domain-containing 3）作为该家族的一个成员，其功能渐受关注。在对Cullin-RING E3泛素连接酶（Cullin-RING E3 ubiquitin ligases, CRL）复合物活性的调节中，COMMD3所扮演的角色通过参与泛素依赖性蛋白质降解过程影响蛋白稳态和信号转导<sup>[9]</sup>。此

外, COMMD3参与下调NF-kappa-B的激活, 在细胞应答过程中发挥调节作用<sup>[10]</sup>。COMMD3还通过调节上皮细胞顶端膜上阿米洛利敏感钠通道 (Epithelial Sodium Channel, ENaC) 亚基的表达, 影响钠离子转运从而控制细胞体积以及维持体液平衡<sup>[11]</sup>。COMMD3在肿瘤学领域也日益受到重视, 研究揭示, COMMD3在各类肿瘤中的表达水平与其病理特性及患者预后紧密相关, 这种关联在前列腺癌的表现尤为显著: 在前列腺癌中, COMMD3的高表达与肿瘤细胞的增强迁移和侵袭能力、高复发率以及低生存率有直接关联<sup>[12]</sup>。COMMD3的缺失被发现能够通过改变铜离子运输蛋白的表达, 加速浸润性乳腺癌的生长<sup>[13]</sup>。此外, COMMD3在卵巢癌中可以通过抑制HER2的内质网运输抑制肿瘤发展, 展现出作为治疗靶点的潜在价值<sup>[14]</sup>。在肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 研究中, COMMD3表达水平的增加与病情恶化和不良预后密切相关<sup>[15]</sup>。尤其引人注目的是, COMMD3的mRNA (messenger RNA) 表达在HCC的免疫细胞相关性研究中得到验证, 这为未来的免疫治疗策略提供了新的视角<sup>[16]</sup>。

本研究通过分析TCGA数据库来识别表达量与三阴性乳腺癌患者生存预后相关的基因, 分析GSE数据集GSE28784以识别对多西紫杉醇耐药和非耐药的三阴性乳腺癌细胞系的差异基因。将筛选出的差异表达基因与预后相关基因取交集, 筛选方向后基于lasso回归算法进行降维并构建包含交集基因的预后模型, 并在三阴性乳腺癌中对交集基因分别进行单基因差异基因分析。我们通过药物浓度递增法构建对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞株, 通过TMT探索耐药株与非耐药株之间的差异蛋白, 并结合单基因差异基因分析结果, 根据进一步文献调研, 发现COMMD3可能为三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药关键基因。

我们通过qPCR、Western Blot检测COMMD3在对多西紫杉醇耐药与非耐药三阴性乳腺癌细胞系中表达水平差异。收集对多西紫杉醇耐药与敏感的三阴性乳腺癌患者病理切片和治疗信息, 通过免疫组化检测COMMD3在三阴性乳腺癌患者肿瘤组织中的表达水平差异。在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系中敲减COMMD3, 通过CCK8、流式细胞术检测COMMD3表达下降对三阴性乳腺癌IC50、细胞周期及细胞凋亡影响。在对多西紫杉醇敏感的三阴性乳腺癌细胞系中过表达COMMD3, 通过CCK8、流式细胞术检测COMMD3表达上调是否能导致普通三阴性乳腺癌细胞紫杉耐药。在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系中提取蛋白, 通过免疫共沉淀-质谱分析寻找COMMD3的相互作用蛋白, 通过生物信息学手段进一步探索COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制。

本研究聚焦于揭示COMMD3在三阴性乳腺癌对多西紫杉醇化疗耐药性中发挥的作用。通过深入分析，我们旨在阐明COMMD3在耐药性发展中的具体作用，进而探讨其在调控化疗耐药性的信号通路和影响的下游靶基因方面的潜在机制。此外，本研究还致力于评估COMMD3作为一种潜在的应对三阴性乳腺癌的多西紫杉醇耐药性的治疗靶点的潜力。这一研究不仅有望提供对抗三阴性乳腺癌化疗耐药性的新策略，也可能为肿瘤治疗提供新的视角。



## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 三阴性乳腺癌临床标本

本研究中涉及的所有临床病理切片均来自盛京医院。在本研究中，我们筛选了2017年至2022年在盛京医院接受手术或穿刺病理诊断的原发性乳腺癌患者病例。筛选出30例多西紫杉醇（或紫杉醇）耐药与30例多西紫杉醇（或紫杉醇）敏感的三阴性乳腺癌患者，从病理科申请调取病理切片用于免疫组化染色。纳入标准：1. 组织学确诊为原发性乳腺癌；2. 术后病理报告详尽，包括完整的免疫组化结果；3. 病理报告确认为三阴性乳腺癌；4. 拥有完整的临床病例资料。排除标准包括：1. 临床病例及资料不完整的患者；2. 病理样本未在本院留存的患者。多西紫杉醇（或紫杉醇）耐药定义为患者在接受多西紫杉醇（或紫杉醇）治疗期间肿瘤持续进展（无论是否有初始缓解）或在完成多西紫杉醇（或紫杉醇）治疗后6个月内发生复发。多西紫杉醇（或紫杉醇）敏感定义为未接受多西紫杉醇（或紫杉醇）治疗的患者或在接受多西紫杉醇（或紫杉醇）治疗期间肿瘤未发生持续进展或在完成多西紫杉醇（或紫杉醇）治疗后6个月内未发生复发。

本研究的所有实验程序均遵循赫尔辛基宣言的伦理准则，并得到了盛京医院研究伦理委员会的审核和批准，伦理编号为：2023PS1210K。本项研究使用的资料为临床常规病例中现有的资料信息，对患者常规诊疗没有任何影响，使用的病理切片为患者诊断治疗过程中产生的临床剩余或废弃样本，患者不因参加研究进行额外的检查，对患者没有任何伤害，伦理委员会批准免除知情同意。

#### 2.1.2 细胞系来源

本研究中所涉及到的细胞系为人三阴性乳腺癌细胞株，主要包括：BT-549，BT-549/Doc，MDA-MB-231，MDA-MA-231/Doc。其中BT-549细胞株与MDA-MB-231细胞株来源于本实验室保存的细胞株，BT-549/Doc细胞株与MDA-MA-231/Doc细胞株通过多西紫杉醇药物浓度递增法构建而成，其化疗耐药性经过多西紫杉醇耐药性实验检测。上述所有细胞株均在37℃含有5% CO<sub>2</sub>浓度的恒温细胞培养箱中进行培养，且所有操作均在无菌操作台中进行，以防止细胞污染。

## 2.1.3 主要仪器

表2-1 主要仪器及品牌

仪器名称	公司名称
CO <sub>2</sub> 恒温细胞培养箱	美国Thermo Fisher公司
倒置光学显微镜	日本Olympus公司
共聚焦荧光显微镜	日本Nikon公司
电子显微摄像系统	日本Nikon公司
台式高速冷冻离心机	美国Thermo Fisher公司
-80℃超低温冰箱	美国Thermo Fisher公司
恒温水浴锅	上海森信实验仪器有限公司
水平摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
脱色摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
梯度PCR仪	美国BIO-RAD公司
7500实时荧光定量PCR仪	美国Thermo Fisher公司
Western-blot垂直电泳仪	美国BIO-RAD公司
Western-blot转印仪	美国BIO-RAD公司
化学发光成像分系统	Amersham Imager 680 美国通用公司
多功能酶标仪	美国BioTek公司
掌中宝离心机	中国北京天根生物科技公司
磁力搅拌	中国上海龙跃仪器设备有限公司
-20℃低温冰箱	美国西门子公司
低温高速离心机	美国Thermo Fisher公司
Thermo Fisher移液器	美国Thermo Fisher公司
制冰机	美国GRANT公司
流式细胞仪	美国Beckman公司
扫描仪	美国 LI-COR Biosciences 公司
超显微紫外分光光度计	NanoPhotometer 50德国implen公司
涡旋混匀器	HYQ-2121A 苏州捷美电子有限公司
纯水机	中国优普公司
雪花制冰机	FM210 北京长流科学仪器有限公司

## 2.1.4 主要试剂与耗材

表2-2 主要试剂及品牌

试剂名称	公司名称
胎牛血清	南京生航生物技术有限公司
DMEM培养基	美国Corning公司
重组人胰岛素溶液（10 mg/mL）	上海中乔新舟生物科技有限公司
1640培养基	美国Corning公司
多西紫杉醇	上阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	美国Corning公司
青链霉素混合液（100×）	白鲨生物科技有限公司
无血清细胞冻存液	白鲨生物科技有限公司
PMSF（100 mM）	上海碧云天生物技术有限公司
BCA蛋白浓度测定试剂盒（增强型）	上海碧云天生物技术有限公司
Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液	上海雅酶生物医药科技有限公司
PAGE凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
双色预染蛋白Marker	上海雅酶生物医药科技有限公司
十二烷基硫酸钠	白鲨生物科技有限公司
三羟甲基氨基甲烷	白鲨生物科技有限公司
甘氨酸	白鲨生物科技有限公司
甲醛	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
PVDF膜（0.45 μm）	德国达姆施塔特市默克集团
脱脂奶粉	白鲨生物科技有限公司
TBS缓冲液（即用型干粉）	白鲨生物科技有限公司
PBS磷酸盐缓冲液干粉	北京索莱宝科技有限公司
Trizol Invitrogen	北京索莱宝科技有限公司
氯仿	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
DEPC水	北京索莱宝科技有限公司
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	诺唯赞生物科技有限公司

表2-2 主要试剂及品牌（续）

试剂名称	公司名称
HiScript III RT SuperMix for qPCR	诺唯赞生物科技有限公司
$\beta$ -actin引物	上海生工生物工程股份有限公司
COMMD3引物	上海生工生物工程股份有限公司
液体DAB酶底物显色试剂盒	福州迈新生物技术开发有限公司
COMMD3 Polyclonal antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
P glycoprotein Polyclonal antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Beta Actin Recombinant antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Multi-rAb Goat Anti-rabbit recombinant secondary antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Starvio质粒DNA转染试剂盒	上海星启百代生物科技有限公司
过表达质粒	金拓思(武汉)生物科技有限公司
敲减慢病毒	沈阳同达生物技术有限公司
Polybrene	上海碧云天生物技术有限公司
嘌呤霉素	北京索莱宝科技有限公司
DNA 含量检测试剂盒（细胞周期）	北京索莱宝科技有限公司
细胞凋亡检测试剂盒	日本同仁化学研究所
IP裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
蛋白A/G-beads	上海碧云天生物技术有限公司
50*cocktail	上海碧云天生物技术有限公司
磷酸化蛋白酶抑制剂	上海碧云天生物技术有限公司
PVDF膜 0.22 um	美国Sigma公司
TWEEN 20	上海生工生物技术有限公司
His	武汉三鹰生物科技有限公司
荧光标记山羊抗兔二抗	美国 LI-COR Biosciences 公司
转移缓冲液	鼎国生物科技有限公司
COMMD3 Rabbit monoclonal Antibody	Cell Signaling Technology
尿素	美国Thermo Fisher公司
考马斯亮蓝染料G250	美国Amesco公司
丙烯酰胺	Sigma-Aldrich实验室

表2-2 主要试剂及品牌（续）

耗材名称	公司名称
过硫酸胺	美国Amesco公司
C18液相色谱柱	美国Phenomenex公司
乙腈	美国Thermo Fisher公司
TMT10plex™ Isobaric Label Reagent Set	美国Thermo Fisher公司

表2-3 主要耗材及品牌

耗材名称	公司名称
各规格枪头	无锡耐思生命科技股份有限公司
各规格培养皿	无锡耐思生命科技股份有限公司
各规格孔板	无锡耐思生命科技股份有限公司
各规格离心管	无锡耐思生命科技股份有限公司
流式细胞管流式管	美国FALCON公司
冻存管	美国Corning公司
PCR反应管（平盖，无酶）	武汉塞维尔生物科技有限公司
PCR 8联管	武汉塞维尔生物科技有限公司
WB抗体孵育盒	武汉塞维尔生物科技有限公司
湿盒	白鲨生物科技有限公司
塑料载玻片染色缸+架	白鲨生物科技有限公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 表达量与生存相关基因的筛选

本研究用于筛选三阴性乳腺癌中表达量与生存相关基因的数据源自癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas, TCGA）项目，通过其官方数据门户网站（<https://portal.gdc.com>）获取，利用GDC Data Transfer Tool（版本v1.6.0）下载数据，选取三阴性乳腺癌病例的RNA测序（RNAseq）数据（Level 3）及其对应的临床信息。对RNAseq数据进行质量控制，包括去除低质量读段、校正测序错误等步骤，质量控制通过FastQC（版本v0.11.9）进行，确保数据质量满足后续分析要求。对清洗后的数据进行标准化处理，以消除实验批次效应和其他非生物学变异。数据标准化主要通过R包edgeR（版本3.32.1）完成。首先，利用该软件包中的

TMM (Trimmed Mean of M values) 方法进行数据标准化, 以确保数据之间的可比性。随后, 使用edgeR中的removeBatchEffect函数对数据进行批次效应校正, 以减少由于实验条件、时间、技术平台等因素造成的干扰。将处理后的RNAseq数据与相应的临床信息进行关联, 确保每个样本的遗传数据和临床数据的一致性, 此步骤使用了R包ComplexHeatmap (版本2.6.2) 进行数据整合和可视化。最终得到140个符合要求的三阴性乳腺癌RNAseq数据。

使用limma包 (版本3.46.0) 对标准化后的RNAseq表达数据进行差异表达分析。差异表达基因的选择标准基于校正后的 $P$ 值 (使用Benjamini-Hochberg方法进行FDR校正), Adjusted  $P < 0.05$ 且 $|\log_2(FC)| > 1$ 被认为差异具有生物学和统计学的显著性。通过R包survival (版本3.2-10) 和survminer (版本0.4.9) 进行Kaplan-Meier生存曲线分析, 以评估不同基因表达水平与患者生存期的关系。生存率的差异通过logrank检验进行评估, 以确定不同基因表达组之间的生存差异是否具有统计学意义。使用单变量Cox回归模型来估计与生存相关的基因的危险比 (Hazard Ratio, HR), 并计算95%置信区间 (Confidence Intervals, CI),  $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

### 2.2.2 耐药相关基因的识别

本研究用于识别三阴性乳腺癌耐药相关基因的数据源自GEO数据库, 从GEO数据库获取微阵列表达谱GSE28784, 该数据集包含三种不同类型的MDA-MB-231细胞系: 敏感型、多西紫杉醇耐药型和紫杉醇耐药型细胞的基因表达数据。使用Affymetrix Expression Console软件 (版本 1.4.1) 对数据进行预处理, 使用RMA (Robust Multi-array Average) 算法进行数据归一化, 该算法在Affymetrix Expression Console软件中实现。此外, 使用该软件的质量控制工具来评估芯片数据的整体质量, 确保后续分析的准确性。

应用limma软件包 (版本: 3.42.2) 中的经验贝叶斯法鉴定敏感型与多西紫杉醇耐药型细胞系之间的差异基因, 选择DEGs的标准如下:  $|\log_2(FC)| > 1$ , 校正后 $P < 0.05$ 。

### 2.2.3 预后模型建立

对表达量与生存相关基因和耐药相关基因取交集, 利用“韦恩图”展现交集基因。对多西紫杉醇的耐药为预后危险因素, 基于此标准对交集基因进行方向筛选, 纳入方向筛选后的基因进行预后模型建立。

从TCGA数据库 (<https://portal.gdc.com>) 下载三阴性乳腺癌的STAR-counts数据和临床信息，从中提取TPM格式的数据，之后进行归一化处理 $\log_2(\text{TPM}+1)$ ，最终保留具有RNAseq数据和临床信息的样本用于后续分析。该处理过程通过使用R语言（版本 3.6.1）中的preprocessCore包（版本 1.50.0）进行。在特征选择阶段，我们采用了最小绝对收缩和选择算子（LASSO）回归算法，该算法通过R软件的glmnet包（版本 2.0-18）实现。我们利用10倍交叉验证来确定最优罚项，从而有效减少模型的复杂度并提高预测准确性。Log rank用于检验Kaplan-Meier生存分析，比较上述两组或多组之间的生存差异，进行了timeROC分析判别预测模型的准确性。

#### 2.2.4 单基因差异表达基因分析与功能富集

对10个交集基因分别进行单基因差异表达基因分析和功能富集。根据目的基因表达水平的中位数将前文中从TCGA数据库中获取并经过质控和标准化的三阴性乳腺癌RNAseq数据分为两组，分别为高表达组与低表达组。应用limma软件包（版本：3.42.2）中的经验贝叶斯法鉴定高表达组与COMMD3低表达组之间的差异基因，选择DEGs的标准如下： $|\log_2(\text{FC})| > 1$ ，校正后 $P < 0.05$ 。

功能富集分析通过ClusterProfiler包（版本 3.14.3）在R中实施，包括GO分析和KEGG途径分析。GSEA（Gene Set Enrichment Analysis）富集分析通过GSEA软件（版本 4.0.3）实现。通过ggplot2包对富集结果进行可视化。

#### 2.2.5 COMMD3的预后分析

利用前文中预后模型建立时从TCGA数据库下载整理的三阴性乳腺癌的STAR-counts数据和临床信息进行生存分析。根据COMMD3表达水平的中位数将所有数据分为COMMD3高表达组与COMMD3低表达组，对两组进行Kaplan-Meier生存分析，通过logrank检验和单变量Cox回归获得生存差异的 $P$ 值、95%置信区间（CI）的危险比（HR）。为了评估COMMD3对三阴性乳腺癌患者预后的预测准确性，我们进行了timeROC分析，该分析利用R软件中专门设计的生存ROC曲线来评估基因表达在不同时间点上的敏感性和特异性。以上所有分析 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

从TCGA数据库分别下载Luminal A型，Luminal B型，HER2阳性型乳腺癌的STAR-counts数据和临床信息，从中提取TPM格式的数据，之后进行归一化处理 $\log_2(\text{TPM}+1)$ ，最终保留具有RNAseq数据和临床信息的样本用于后续分析。该

处理过程通过使用R语言（版本 3.6.1）中的preprocessCore包（版本 1.50.0）进行。根据COMMD3表达水平的中位数将各分型乳腺癌数据分别分为COMMD3高表达组与COMMD3低表达组，对两组进行Kaplan-Meier生存分析，通过logrank检验和单变量Cox回归获得生存差异的P值、95%置信区间（CI）的危险比（HR）。以上所有分析 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2.2.6 细胞培养

细胞复苏：将实验所需的物品（6 cm培养皿、经高压消毒的枪头、15 mL离心管、移液枪）放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟。在15 mL离心管中加入1 mL完全培养基。戴好手套，从-80℃冰箱中取出冻存细胞，立刻放入37℃水浴锅中进行融化。冻存管内冰晶完全融化后使用1000  $\mu$ L规格的移液枪将冻存管内液体转移至提前加入完全培养基的15 mL离心管中，做好标记，1000 rpm离心5分钟。离心期间在6 cm培养皿中加入3 mL完全培养基，同时做好标记（细胞名称、复苏日期、实验人姓名缩写）。离心完毕，弃上清，保存离心管底部细胞沉淀，用1 mL完全培养基对细胞沉淀进行重悬，将重悬后的细胞转移到培养皿中，以米字型轨迹轻轻晃动培养皿，使细胞充分混匀，随后放入细胞培养箱以37℃，5% CO<sub>2</sub>的环境培养，24小时后观察细胞状态并更换新鲜完全培养基。

细胞传代：细胞状态良好、无污染且细胞融合度80% - 90%时适合传代。将实验所需的物品（6 cm培养皿、经高压消毒的枪头、15 mL离心管、移液枪）放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟。消毒完毕后从细胞培养箱中取出培养皿，弃上清，吸取1 mL无菌PBS（phosphate buffered saline）溶液轻柔加入培养皿中，轻晃细胞培养皿以清洗细胞，随后弃PBS溶液，该操作重复两次。使用移液枪吸取1 mL含EDTA（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid）的胰蛋白酶溶液轻柔加入培养皿，在显微镜下观察细胞消化进度。当大部分细胞变圆变亮后加入1 mL完全培养基终止消化。轻晃培养皿使胰酶与培养基混合均匀，使用移液枪轻轻吹打以使细胞充分从培养皿上脱落，注意吹打过程避免气泡产生。将细胞混合液转移至15 mL离心管中，做好标记，1000 rpm离心5分钟。离心期间在新的6 cm培养皿中加入3 mL完全培养基（培养皿数量根据传代比例确定），同时做好标记（细胞名称、复苏日期、实验人姓名缩写）。离心完毕，弃上清，保存离心管底部细胞沉淀，用1 mL完全培养基对细胞沉淀进行重悬，将重悬后细胞转移到培养皿中，以米字型轨迹轻轻晃动培养皿，使细胞充分混匀，随后放入细胞培养箱以37℃，5%CO<sub>2</sub>的环



境培养, 24小时后观察细胞状态并更换新鲜完全培养基。

细胞冻存: 细胞状态良好、无污染且细胞融合度80% - 90%时适合冻存。将实验所需的物品(6 cm培养皿、经高压消毒的枪头、15 mL离心管、移液枪)放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟。消毒完毕后从细胞培养箱中取出培养皿, 弃上清, 吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中, 轻晃细胞培养皿以清洗细胞, 随后弃PBS溶液, 该操作重复两次。使用移液枪吸取1 mL含EDTA的胰蛋白酶溶液轻柔加入培养皿, 在显微镜下观察细胞消化进度。当大部分细胞变圆变亮后加入1 mL完全培养基终止消化。轻晃培养皿使胰酶与培养基混合均匀, 使用移液枪轻轻吹打以使细胞充分从培养皿上脱落, 注意吹打过程避免气泡产生。将细胞混合液转移至15 mL离心管中, 做好标记, 1000 rpm离心5分钟。离心完毕, 弃上清, 保存离心管底部细胞沉淀, 用1 mL无血清细胞冻存液对细胞沉淀进行重悬, 将重悬后的细胞转移到冻存管中, 做好标记(细胞名称、冻存日期、实验人姓名缩写)。将冻存管放入-80℃冰箱保存。

其他注意事项: BT-549细胞和MDA-MB-231细胞培养方式相同, 不同之处在于二者的完全培养基配方。BT-549细胞完全培养基配方为: 1640培养基+10%胎牛血清+10  $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素+1%青链霉素双抗溶液。MDA-MB-231细胞完全培养基配方为: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素双抗溶液。二者生长速度不同, 所以传代比例也有所差异。BT-549细胞生长速度较快, 传代比例根据实验目的一般为1:5, MDA-MB-231细胞生长速度一般, 传代比例一般为1:2。

### 2.2.7 耐药株构建

对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞株是通过药物浓度递增法进行构建。按照查阅文献建议, 我们选取0.5 nmmol/L作为初始加药浓度。新复苏的细胞经过三次传代后状态良好, 无污染, 细胞融合度达到70%即给予药物处理, 每次药物处理24小时后更换新鲜完全培养基, 待细胞生长融合度达到80%时传代。传代后细胞生长状态良好, 无污染, 细胞融合度达到70%即给予药物处理, 药物处理24小时后更换新鲜完全培养基。若细胞更换完全培养基后生长融合不均匀, 融合度最大处达到80%也可进行传代, 后续正常进行操作。药物浓度梯度为0.5 nmmol/L递增, 根据细胞生长状态决定给药浓度, 若细胞生长状态一般则可重复上一次给药浓度, 若细胞生长状态较好, 则可梯度增加药物浓度。

最终MDA-MB-231细胞加药终浓度为10 nmmol/L, 将耐药株命名为MDA-MB-231/Doc。BT-549细胞加药终浓度为25 nmmol/L, 将耐药株命名为BT-549/Doc。

## 2.2.8 细胞耐药性测定

使用CCK8法对MDA-MB-231细胞和MDA-MB-231/Doc细胞、BT-549细胞和BT-549/Doc细胞的耐药指数进行测定。

用无水乙醇冲洗血球计数板3次, 待乙醇蒸发后将盖玻片置于计数板上方。取对数期生长状况良好的MDA-MB-231细胞、MDA-MB-231/Doc细胞、BT-549细胞、BT-549/Doc细胞, 弃上清, 吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中, 轻晃细胞培养皿以清洗细胞, 随后弃PBS溶液。该操作共重复两次。使用移液枪吸取1 mL含EDTA的胰蛋白酶溶液轻柔加入培养皿, 在显微镜下观察细胞消化进度。当大部分细胞变圆变亮后加入1 mL完全培养基终止消化。轻晃培养皿使胰酶与培养基混合均匀, 使用移液枪轻轻吹打以使细胞充分从培养皿上脱落, 注意吹打过程避免气泡产生。将细胞混合液转移至15 mL离心管中, 做好标记, 1000 rpm离心5分钟。离心完毕, 弃上清保存离心管底部细胞沉淀, 用1 mL完全培养基对细胞沉淀进行重悬, 注意重悬时避免产生气泡。用移液枪吸取10  $\mu$ L细胞重悬液沿着计数板边缘缓慢加入, 注意避免出现气泡且不能让细胞液流到计数室旁边的凹槽中。静置1分钟后在倒置显微镜下进行计数。

根据计数结果稀释细胞悬液, 将细胞悬液接种于96孔板中, 按每孔5000个的数量接种。96孔板最外围的一圈细胞培养孔使用PBS填充, 避免细胞液蒸发。24小时后显微镜下观察细胞, 若细胞生长状态良好, 则可进行加药诱导刺激。使用不完全培养基配成含有不同浓度药物的培养液, 每个药物浓度设置三个复孔, 同时设置三个不含细胞只含培养液的调零组。

BT-549细胞及其衍生细胞系测试药物浓度梯度设置为: 0, 25, 50, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 10000, 20000 nmmol/L。MDA-MB-231细胞及其衍生细胞测试药物浓度梯度设置为: 0, 5, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 nmmol/L。药物刺激24小时后, 小心吸弃原有培养液, 注意不要吸走细胞, 用不完全培养基配制CCK8溶液浓度为10%的培养液, 按照每孔100  $\mu$ L的体积轻柔加入96孔板中, 注意不要冲击贴壁的细胞。将96孔板放回细胞培养箱37 $^{\circ}$ C孵育2小时后使用酶标仪检测各孔细胞的吸光值(450 nm处)。

使用Excel处理测试结果:

存活率 (%) = 1 - (实验组-调零组) / (空白组-调零组)

致死率 (%) = 1 - 存活率

实验组: 含有细胞并且给予药物处理

空白组: 含有细胞,但是未给予药物处理

调零组: 不含细胞,未给予药,只含有CCK8溶液浓度为10%的培养液。

将Excel处理过的数据输入GraphPad Prism 9软件进行分析,并绘制抑制率曲线,求IC<sub>50</sub> (Half Maximal Inhibitory Concentration) 值。

RI (Resistance Index) = IC<sub>50</sub><sub>耐药株</sub> / IC<sub>50</sub><sub>非耐药株</sub>。

## 2.2.9 串联质谱标签相对和绝对定量技术

蛋白质提取: 在冰上混合8 M尿素、30 mM HEPES、1 mM PMSF、2 mM EDTA和10 mM二硫苏糖醇,制成细胞裂解液并冷藏保存。取出培养细胞,去除培养基,用预冷的PBS洗涤细胞两次,去除PBS。向培养皿中加入1 mL细胞裂解液,确保细胞完全接触裂解液。轻轻吹打细胞,促进裂解,避免产生气泡。将裂解液转移到标记好的离心管中,进行冰浴超声处理5分钟(脉冲2秒,间隔3秒,功率180 W)。经过超声处理后,以20000 g离心30分钟,收集上清液。向其中加入二硫苏糖醇至终浓度10 mM,然后在56°C水浴中孵育1小时。之后,迅速加入碘乙酰胺至终浓度55 mM,在暗室中静置1小时。再次以20000 g, 4°C离心30分钟,收集上清液。使用Bradford法对蛋白质进行定量。

蛋白质的酶解: 取30 µg蛋白质样品,加入10K超滤管中,以14000 g, 4°C离心40分钟,去除废液。重复此步骤两次,以清洗蛋白质。加入1 µg/µL的胰蛋白酶,按照每100 µg蛋白质底物加入3.3 µg的酶的比例,37°C水浴中酶解24小时。酶解后,冻干消化液,使用200 mM三乙基碳酸氢铵复溶肽段。

肽段的标记: 将标记试剂平衡至室温。向每管标记试剂中加入41 µL乙腈,涡旋1分钟,离心至管底。将标记试剂与肽段混合,使用不同同位素标记不同样品。混匀后,室温静置1小时。加入8 µL 5%羟胺,室温静置15分钟。将样品混合后,真空抽干。

RP预分离: 使用常规液相进行预分离。将标记后抽干的样品用1 mL A液溶解,以15000 g离心10分钟,取上清液。流动相设置为A液(95% H<sub>2</sub>O, 5% ACN, 氨水调pH至9.8)和B液(95% ACN, 5% H<sub>2</sub>O, 氨水调pH至9.8)。设置分离方法,上样后按照预设梯度运行,得到预分离色谱图。从峰出现1分钟后开始收集,

每30秒收集一管。

质谱检测：将8个预分离组分别进行质谱检测。使用Q-Exactive质谱仪检测肽段信号，得到质谱原始文件。将质谱原始文件输入PD（Proteome Discoverer 2.2，Thermo）软件进行筛选。使用Mascot软件进行搜索，根据搜索结果和筛选后的谱图进行定量分析。使用ANOVA方差分析评估差异显著性，选择 $P < 0.05$ ， $\text{Ratio} \geq 1.2$  或  $\text{Ratio} \leq 0.83$ 的蛋白作为差异蛋白。对原始质谱数据进行数据库搜索，以 $\text{FDR} < 1\%$ 的标准过滤结果，得到肽段和蛋白鉴定结果。

本实验样品由本课题组准备，后续实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成。

## 2.2.10 细胞总蛋白提取

提前配置好细胞裂解液，PMSF与RIPA（Radio Immunoprecipitation Assay）裂解液比例1:100，冰上保存。细胞汇合度达到90%时适合提取蛋白，从细胞培养箱中取出细胞，去除培养基，用提前预冷的PBS轻轻洗涤细胞两次，弃去PBS，向六孔板中加入150  $\mu\text{L}$ 细胞裂解液，确保细胞被完全覆盖。使用移液枪轻轻吹打，使细胞与裂解液充分接触，裂解细胞，注意避免产生气泡。将六孔板放置在冰上，保持低温裂解10分钟。裂解完成后，使用移液器将裂解液转移到预先标记好的1.5 mL离心管中。将1.5 mL离心管放入提前预冷至4℃的高速离心机，以14,000 g离心15分钟。离心后，收集上清液，这即为细胞裂解液，包含了细胞的总蛋白。

通过BCA（Bicinchoninic Acid）法测定蛋白浓度：取1.2 mL蛋白标准配制液加入到一管标准蛋白（30 mg BSA）中，充分溶解后配制成25 mg/mL的蛋白标准溶液，蛋白标准溶液在-20℃条件下保存，使用时提前取出冰上融化。取适量25 mg/mL蛋白标准溶液，用PBS稀释至终浓度为0.5 mg/mL。根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B（50:1）的比例配制适量BCA工作液，充分混匀。BCA工作液现用现配，室温保存。将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu\text{L}$ 加到96孔板的标准品孔中，加PBS补足到20  $\mu\text{L}$ ，相当于标准品浓度分别为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL。蛋白样品稀释10倍后加入到96孔板的样品孔中，每孔20  $\mu\text{L}$ 。每孔加入200  $\mu\text{L}$ 的BCA工作液，37℃放置30分钟。用酶标仪测定A562的吸光度。根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

按4体积蛋白样品配1体积蛋白上样缓冲液的比例向蛋白样品中加入5×蛋白上

样缓冲液，轻轻吹打混匀，金属浴100℃加热10分钟，加热结束后蛋白样品在-80℃条件冷冻保存。注意实验全程冰上进行，避免蛋白降解。

#### 2.2.11 Western Blot实验

**配置SDS-PAGE**（Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis）  
凝胶：清洗制胶玻璃板，晾干后组装并固定在配胶架上，以双蒸水验漏，确认制胶玻璃板组装不漏后开始配胶。首先制备下层胶：取等体积下层胶溶液和下层胶缓冲液各2.7 mL，混匀；向混合溶液中加入60 μL的改良型促凝剂，再次混匀。将混合溶液注入制胶玻璃板中，注意液面与短玻璃板上沿之间的距离比梳齿长0.5 cm。可留少许溶液在配胶杯中，以判断胶凝固状况。加入适量的无水乙醇覆盖于下层胶之上。下层胶凝固后开始制备上层胶：取0.75 mL的上层胶溶液和相同体积的彩色上层胶缓冲液，混合均匀。注意在混合前摇匀上层胶溶液以确保染料分布均匀。向混合溶液中加入15 μL的改良型促凝剂，再次混匀。倒去无水乙醇，将混合溶液注入已凝固的下层胶之上，插入齿梳。等待上层胶凝固后拔去齿梳即可开始电泳。

**蛋白样品上样和电泳**：首先配置电泳液：按照甘氨酸 14.40 g，Tris 3.03 g，SDS 1 g，双蒸水定容至1 L的配方配置电泳液。在电泳槽内安装制胶玻璃板，倒入电泳液，电泳液没过上样孔后缓慢拔去齿梳，按照每孔20 μg的上样量加入蛋白样品，样品最左端加入5 μL预染蛋白Marker作为指示。加样完毕后即可开始电泳，电泳条件为恒压120 V，80分钟。当蛋白上样缓冲液的颜色移动到底部时即可终止电泳。

**转膜**：电泳时提前按照甘氨酸 14.40 g，Tris 3.03 g，甲醇200 mL，双蒸水定容至1 L的配方配置转膜液，4℃冷藏预冷。将PVDF（Polyvinylidene Difluoride）膜提前用甲醇预湿（激活膜），然后在转移缓冲液中浸泡。电泳结束后取出凝胶，切除上层胶和底部蛋白上样缓冲液蓝色部分及以下的下层胶后在倒有转膜液的托盘中按顺序制作“三明治”：（黑-）海绵1张→滤纸3张→凝胶→PVDF膜→滤纸3张→海绵1张（白+）。各层之间用滚棒去除气泡。将“三明治”夹紧后放进电转内槽（“三明治”夹子的黑面对着内槽的黑面，夹子的白面对着内槽的红面），再将内槽放入电转外槽中，外槽放入冰盒后加满预冷的转膜液，将整个电转外槽置于装满冰的泡沫箱中，以恒流200 mA，90分钟的条件转膜。

**封闭**：转膜结束后将膜取出，用5%脱脂奶粉室温封闭2小时。

孵育一抗：封闭结束后，以TBST（Tris Buffered Saline with Tween 20）溶液室温水平摇床洗膜3次，每次5分钟。根据蛋白Maker的分子量标记裁剪出目的蛋白的条带，做好标记后放置在抗体孵育盒中，加入相应的抗体稀释液（COMMD3稀释比例为1:2000；P-gp稀释比例为1:2500），4℃水平摇床孵育过夜，无目的蛋白的条带浸泡在TBST溶液中保存。

二抗孵育：一抗孵育结束后，回收抗体稀释液，以TBST溶液室温水平摇床洗膜3次，每次5分钟。清洗结束后根据一抗种属选择相应的二抗稀释液（稀释比例1:20000），室温水平摇床孵育1小时。

发光：二抗孵育结束后，以TBST溶液室温水平摇床洗膜3次，每次10分钟。将ECL（Enhanced Chemiluminescence）发光液试剂盒中A、B液以1:1的比例配置反应液，反应液在棕色离心管中避光保存备用，每次发光前现用现配。清洗完毕后借助化学发光成像仪显影，注意除目的蛋白条带显影外需将整膜拼接后显影保存记录。

## 2.2.12 细胞总RNA提取

RNA（Ribonucleic Acid）极容易降解，提取过程必须一直在无菌无酶环境下进行，并保持低温。使用的移液枪头、离心管必须无菌无酶，实验人员佩戴口罩手套。细胞汇合度达到90%时适合提取蛋白，从细胞培养箱中取出细胞，去除培养基，用提前预冷的PBS轻轻洗涤细胞两次，弃去PBS，向六孔板中加入1 mL Trizol试剂，轻轻吹打，使Trizol与细胞充分接触，裂解细胞。室温放置5分钟，使细胞裂解充分。将裂解液转移到1.5 mL离心管中，加入200  $\mu$ L氯仿，振荡器上剧烈震荡30秒直至液体充分混合，室温静置5分钟。静置后的离心管放入提前预冷至4℃的高速离心机，以12,000 rpm离心15分钟，离心结束后取出离心管，可观察到离心管内液体分为三层，上层透明液体即为RNA。小心地吸取上层RNA溶液至新的离心管中，注意不要吸取到中间的蛋白层。向RNA溶液中加入0.5 mL异丙醇，上下颠倒离心管混匀液体，4℃下孵育10分钟后放入预冷好的高速离心机，以12,000 rpm离心15分钟，离心结束后可在离心管底部发现少量白色沉淀。弃上清，加入1 mL用DEPC（Diethyl Pyrocarbonate）水新配置的75%乙醇，上下颠倒洗涤，洗涤结束后放入提前预冷至4℃的高速离心机，以12,000 rpm离心5分钟，弃去液体，将离心管开盖倒置于吸水纸上，室温条件下晾干，晾干后加入20  $\mu$ L DEPC水溶解离心管底部白色沉淀，溶液即为RNA溶液，-80℃冻存保存。冻存前取1  $\mu$ L RNA溶液稀释

10倍后用紫外分光光度计检测RNA浓度和纯度。

### 2.2.13 RNA逆转录实验

RNA极易降解，反转录实验过程必须一直在无菌无酶环境下进行，保持低温。使用的移液枪头、离心管必须无菌无酶，实验人员佩戴口罩手套。在离心管中，将1  $\mu\text{g}$  RNA与RNase-free ddH<sub>2</sub>O混合，总体积为16  $\mu\text{L}$ 。加入4  $\mu\text{L}$ 的4 $\times$ gDNA wiper Mix。轻轻吹打混匀，然后在42 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2分钟。在上述基因组DNA（Deoxyribonucleic Acid）去除反应管中，直接加入5 $\times$ HiScript III qRT SuperMix，总体积为20  $\mu\text{L}$ 。轻轻吹打混匀后进行逆转录反应，反应条件为37 $^{\circ}\text{C}$ ，15分钟；85 $^{\circ}\text{C}$ ，5秒。逆转录产物即cDNA（Complementary DNA），可立即用于qPCR反应，或于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存保存。

### 2.2.14 实时定量PCR实验（RT-qPCR）

使用SYBR Green I嵌合荧光法进行定量实时聚合酶链反应。确保所有实验操作均在无菌条件下进行，避免污染。确保所有试剂和样品在操作前充分混匀，避免产生气泡。确保实验操作在避光条件下进行，以防止荧光染料降解。

在qPCR管中，按照以下比例配制反应体系：

ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix：10  $\mu\text{L}$

Primer 1（10  $\mu\text{M}$ ）：0.4  $\mu\text{L}$

Primer 2（10  $\mu\text{M}$ ）：0.4  $\mu\text{L}$

cDNA：2  $\mu\text{L}$

ddH<sub>2</sub>O：补足至20  $\mu\text{L}$

qPCR反应条件设置：

预变性：95 $^{\circ}\text{C}$ ，30秒（标准程序）或3秒（快速程序）。

循环反应：95 $^{\circ}\text{C}$ ，3 - 10秒；60 $^{\circ}\text{C}$ ，10 - 30秒；72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 - 30秒。

循环次数：40次（Rep: 1, Reps: 40）。

熔解曲线：使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

将配制好的反应体系放入PCR仪，启动qPCR程序。结束后分析数据，以 $\beta$ -actin为内参，每个样本CT值为三个复孔的CT值取平均数，计算公式如下：

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{目的基因}) - \text{CT}(\beta\text{-actin}), \text{ 相对表达量} = 2^{-\Delta\text{CT}}$$

表2-4 主要引物及序列

基因名称	序列(5'→3')
$\beta$ -actin Forward	CTCCATCCTGGCTGT
$\beta$ -actin Reverse	GCTGTCCTTACCGTTCC
COMMD3 Forward	ACTCCAACGCCTTCACGCTTC
COMMD3 Reverse	GGATGATCTAACACGGCCTCGTC

## 2.2.15 免疫组织化学染色实验

将石蜡切片放入预热至60℃的恒温箱中烘烤30分钟。烤制结束后将烤制过的石蜡切片按照1号二甲苯10分钟、2号二甲苯8分钟、3号二甲苯8分钟、无水乙醇5分钟、90%乙醇3分钟、80%乙醇3分钟、70%乙醇3分钟的顺序室温脱蜡，最后用双蒸水清洗3次，每次3分钟以完成水化。

水化后的切片浸泡在PBS中保存。按说明书配置柠檬酸钠抗原修复液（一包柠檬酸钠抗原修复液粉剂用双蒸水定容至1 L），微波炉加热煮沸，然后将切片放入修复液中，微波炉加热8分钟，加热结束后从微波炉中取出容器，自然冷却至室温后PBS清洗切片3次，每次5分钟。

清洗结束后取出切片，甩干水分，用免疫组化笔画圈，圈住组织，将切片放入提前加入少量蒸馏水的湿盒中。滴加内源性过氧化物酶阻断剂，室温孵育30分钟，PBS清洗切片3次，每次5分钟。清洗结束后取出切片，甩干水分，将切片放入湿盒中，滴加非特异性染色阻剂或阻断剂，室温孵育30分钟，封闭结束后甩去。将切片放入湿盒中，滴加适量的一抗稀释液，4℃孵育过夜。

次日将切片取出，PBS清洗切片3次，每次5分钟。清洗结束后取出切片，甩干水分，将切片放入湿盒中，滴加生物素标记的羊抗小鼠/兔、小鼠、兔IgG聚合物或兔抗羊IgG聚合物，室温孵育30分钟，PBS清洗切片3次，每次5分钟。清洗结束后取出切片，甩干水分，将切片放入湿盒中，滴加链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶，室温孵育30分钟。PBS清洗切片3次，每次5分钟。

配置新鲜DAB（3,3'-Diaminobenzidine）染色剂，在离心管中加0.85 mL蒸馏水，按顺序加A、B、C试剂各50  $\mu$ L混匀，即成1 mL的DAB显色液。配制好的溶液避光存放，30分钟内有效。切片清洗结束后取出切片，甩干水分，滴加新鲜配制的DAB显色液，观察到特异性组织着色较强时取出切片，流水终止显色。

苏木素复染1到2分钟，细胞核变蓝色时终止，自来水冲洗反蓝。按照70%酒精1分



钟、80%酒精1分钟、95%酒精2分钟、无水乙醇4分钟、1号二甲苯3分钟、2号二甲苯3分钟,的顺序脱水。脱水结束后滴加适量中性树胶封片,注意避免气泡产生,晾干后显微镜下拍照记录。

每个切片使用倒置显微镜在100倍下随机选择3个视野拍照保留,使用Image J软件的IHC Profiler插件根据阳性细胞的平均灰度值(染色强度)和阳性面积百分比(染色面积)对染色强度进行评估并赋分,结果分为四类:阴性(0分),弱阳性(1分),中等阳性(2分),强阳性(3分)。评估主要基于胞浆内染色。

## 2.2.16 质粒转染

在转染前一天,使用不含抗生素的完全培养基将细胞铺板于24孔板中,每孔接种 $1.0 - 2.0 \times 10^5$ 个细胞。确保次日细胞状态良好、无污染且细胞融合度80%,此时适合进行质粒转染。将实验所需的物品(经高压消毒的枪头、离心管、移液枪)放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟,消毒完毕后进行Starvio/DNA复合物包装:在1.5 mL无菌离心管中加入50  $\mu$ L Trans buffer,并添加0.8  $\mu$ g的质粒,轻轻吹打混匀,立即向DNA稀释液中添加1.2  $\mu$ L Starvio,轻轻混匀。将Starvio/DNA复合物室温静置15分钟。静置结束后从细胞培养箱中取出24孔板,弃上清,吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入细胞培养孔中,轻晃24孔板以清洗细胞,随后弃PBS溶液。该操作重复两次。向细胞培养孔中加入1 mL新鲜的不含抗生素的含血清培养基,轻柔地将制备的Starvio/DNA复合物滴加入细胞培养孔中,轻轻晃动24孔板,使复合物均匀分布。将24孔板放入培养箱中,孵育24小时后根据细胞生长情况更换新鲜完全培养基或进行传代,48小时后收集细胞进行后续实验。

## 2.2.17 慢病毒转染

在转染前一天,使用完全培养基将细胞铺板于24孔板中,每孔接种细胞数根据细胞生长速度确定,确保次日细胞状态良好、无污染且细胞融合度50%,此时适合进行慢病毒转染。将实验所需的物品(经高压消毒的枪头、离心管、移液枪)放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟,从-80℃冰箱取出慢病毒冰上融化,消毒完毕后进行慢病毒-培养基-Polybrene混合液制备:根据MOI(Multiplicity of Infection)值用新鲜完全培养基将病毒稀释成所需浓度(MDA-MB-231/Doc细胞MOI值为10,BT-549/Doc细胞MOI值为50),加入适量Polybrene,使Polybrene浓度为5  $\mu$ g/mL,轻轻吹打混匀。从培养箱中取出24孔板,弃上清,吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中,轻晃细胞培养皿以清洗细胞,随后弃PBS溶液。该操

作共重复两次。将慢病毒-培养基-Polybrene混合液加入培养孔中，轻轻摇匀。将培养板放入培养箱中，孵育24小时后根据细胞生长情况更换新鲜完全培养基或进行传代，48小时后开始稳转株筛选构建。

ShCOMMD3序列（5'→3'）：GCATATTTGGTGACCTTAAGT

ShCon序列（5'→3'）：UUCUCCGAACGUGUCGUT

## 2.2.18 稳转株细胞的构建

确定筛选药物浓度：第一天将细胞接种于24孔板中，每孔接种细胞数根据细胞生长速度确定，确保次日细胞状态良好、无污染且细胞融合度80%。将实验所需的物品（经高压消毒的枪头、离心管、移液枪）放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟，消毒完毕后从培养箱中取出24孔板，弃上清，吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中，轻晃细胞培养皿以清洗细胞，随后弃PBS溶液。该操作重复两次，加入新鲜完全培养基。按照0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$ 的浓度梯度加入嘌呤霉素。每天更换含嘌呤霉素的新鲜完全培养基，48小时后细胞完全死亡的最低浓度则为嘌呤霉素工作浓度。

稳转株的筛选：细胞慢病毒转染48小时后开始稳转株筛选，确定细胞融合度70%，在培养基中加入上述实验中确定的工作浓度的嘌呤霉素，同时设置未转染细胞作为空白对照组。每天更换含嘌呤霉素的新鲜完全培养基，当空白对照组细胞完全死亡时，更换培养基为不含嘌呤霉素的新鲜完全培养基，此时实验组剩下的基本可以认为是阳性细胞。对筛选后的阳性细胞隔代加药维持阳性细胞率，维持浓度一般为工作浓度的一半，根据空白细胞生长速度及细胞状态调整，并对细胞进行保种与复检。

## 2.2.19 细胞周期检测实验

将实验所需的物品放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟。消毒完毕后从细胞培养箱中取出培养皿，弃上清，吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中，轻晃细胞培养皿以清洗细胞，随后弃PBS溶液。该操作重复两次。吸取1 mL含EDTA的胰蛋白酶溶液轻柔加入培养皿，在显微镜下观察细胞消化进度。当大部分细胞变圆变亮后加入1 mL完全培养基终止消化。轻晃培养皿使胰酶与培养基混合均匀，使用移液枪轻轻吹打以使细胞充分从培养皿上脱落，注意吹打过程避免气泡产生。将细胞混合液转移至15 mL离心管中，做好标记，1000 rpm离心5分钟。离心结束后弃上清，保留细胞沉淀，加入1 mL预冷的PBS重悬细胞，1000 rpm离心5

分钟收集细胞，该操作重复两次。在细胞沉淀中加入1 mL预冷的70%乙醇，4℃过夜固定。次日从4℃冰箱取出细胞，1000 rpm离心5分钟。离心结束后弃上清，保留细胞沉淀，加入1 mL预冷的PBS重悬细胞，1000 rpm离心5分钟收集细胞，该操作重复两次。向细胞沉淀中加100  $\mu$ L RNase A溶液，37℃孵育30分钟。孵育结束后加入400  $\mu$ L PI染色液，4℃避光孵育30分钟。孵育结束后将细胞悬液转移入流式管中，上机检测，记录激发波长488 nm处红色荧光。

## 2.2.20 细胞凋亡检测实验

将实验所需的物品放入超净工作台中紫外线消毒至少20分钟。消毒完毕后从细胞培养箱中取出培养皿，吸取上清液转移至15 mL离心管中。吸取1 mL无菌PBS溶液轻柔加入培养皿中，轻晃细胞培养皿以清洗细胞，吸取PBS溶液转移至15 mL离心管中，该操作共重复两次。吸取1 mL不含EDTA的胰蛋白酶溶液轻柔加入培养皿，在显微镜下观察细胞消化进度。当大部分细胞变圆变亮后加入1 mL完全培养基终止消化。轻晃培养皿使胰酶与培养基混合均匀，轻轻吹打以使细胞充分从培养皿上脱落，注意吹打过程避免气泡产生。将细胞混合液转移至15 mL离心管中，做好标记，1000 rpm离心5分钟。离心结束后弃上清，保留细胞沉淀，加入1 mL预冷的PBS重悬细胞，1000 rpm离心5分钟收集细胞，该操作重复两次。加入预先配置好的1 $\times$ Annexin V Binding Solution 500  $\mu$ L，重悬细胞。取100  $\mu$ L细胞悬液，加入新的离心管中，向细胞悬液中加入5  $\mu$ L Annexin V, FITC结合物，再加入5  $\mu$ L的PI Solution。室温下避光孵育15分钟，孵育结束后加入400  $\mu$ L 1 $\times$ Annexin V Binding Solution，混匀后将细胞悬液转移入流式管中，上机检测。设置对照：未染色细胞、Annexin V，FITC染色细胞（没有PI）、PI染色细胞（没有Annexin V-FITC）。

## 2.2.21 联合免疫沉淀质谱分析

细胞总蛋白提取：使用10 cm细胞培养皿培养细胞，细胞状态良好、无污染且细胞融合度90%时适合提取蛋白。提前以PMSF:IP裂解液 = 1:100，蛋白酶抑制剂:IP裂解液 = 1:50的比例配置好细胞裂解液，冰上保存。从细胞培养箱中取出细胞，去除培养基，用提前预冷的PBS轻轻洗涤细胞两次，弃去PBS，向培养皿中加入1 mL细胞裂解液，确保细胞完全覆盖。轻轻吹打，使细胞与裂解液充分接触，裂解细胞，注意避免产生气泡。将培养皿放置在冰上，保持低温裂解10分钟。裂解完成后，将裂解液转移到预先标记好的离心管中。将离心管放入提前预冷至4℃

的高速离心机，以14,000 g离心15分钟。离心后，收集上清液，这即为细胞裂解液，包含了细胞的总蛋白。向细胞裂解液上清中加入1.0  $\mu\text{g}$  His抗体和30  $\mu\text{L}$  A/G-珠子（使用前充分混匀），4 $^{\circ}\text{C}$ 摇转孵育30分钟；以14,000 g离心5分钟，将上清转入一个新的离心管中，冰上操作，然后采用BCA法测定蛋白浓度（取少量细胞裂解液上清变性后用于input实验）。

**免疫沉淀：**取1 mL至1.5 mL细胞裂解液，加入1.0  $\mu\text{g}$ 抗体用于沉淀目标蛋白（同时加入等量的对照IGG作为阴性对照），在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。加入30  $\mu\text{L}$  A/G-珠子（使用前需充分混匀），轻轻弹匀后，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下摇转孵育过夜。在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以1000 g离心5分钟，小心吸去上清，避免吸到底部的珠子，收集免疫沉淀复合物。使用1 mL冰冷的IP裂解液（不加抑制剂）洗涤免疫沉淀复合物4次，每次在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以1000 g离心5分钟，小心弃去上清。最后一次洗涤后，加入40  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SDS含巯基乙醇的上样缓冲液，沸水煮10分钟，然后4 $^{\circ}\text{C}$ 下以1000 g离心5分钟取上清。取15  $\mu\text{L}$ 上清样品用于Western Blot检测。（选择不同种属的抗体分别进行免疫沉淀实验和Western Blot实验，这样再选择一个种属交叉反应比较弱或者无种属交叉反应的二抗进行Western Blot实验，可以大大减弱抗体分子的重链和轻链分子的Western Blot信号）或者考马斯亮蓝染色后切胶回收蛋白，最后质谱检测鉴定。

**Western Blot实验：**实验步骤按前文叙述进行。增加凝胶图像分析步骤，将胶片进行扫描存档，Photo Shop整理去色，软件处理系统分析目标带的光密度值。

**考马斯亮蓝染色：**SDS-PAGE电泳实验步骤同上；SDS-PAGE电泳后，将胶放入玻璃平皿中，加入考马斯亮染色液，在70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5分钟，然后置于摇床上染色30分钟。回收染色液，用清水洗净胶，加入考马斯亮脱色液，置于脱色摇床上过夜。去除脱色液，用清水洗净胶，对目的条带进行切胶回收。

**蛋白质胶内酶解：**将切下的胶粒放入1.5 mL离心管中，加入双蒸水清洗，重复两次。再加入考染脱色液清洗，重复两次，然后使用乙腈脱水至胶粒变白，真空抽干乙腈。加入10 mM二硫苏糖醇，孵育1小时。移除多余液体，加入55 mM碘乙酰胺，暗室孵育45分钟。移除多余液体，加入25 mM碳酸氢铵清洗，重复两次。再次使用乙腈脱水，真空抽干。加入1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 酶储液稀释后的溶液，让胶粒吸收。加入25 mM碳酸氢铵覆盖胶粒，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中消化过夜。消化后，加入0.1%三氟乙酸终止消化。取10  $\mu\text{L}$ 样品进行质谱检测。

**LC-MS/MS 分析：**使用0.1%甲酸溶液复溶干燥后的肽段，通过预柱和分析柱进行分离。流动相A为0.1%甲酸水溶液，流动相B为0.1%甲酸乙腈溶液。梯度洗脱

条件如上所述。使用Q Exactive质谱仪进行数据非依赖采集模式检测，离子源电压为1.8 kV，正离子模式，一级质谱扫描范围为350-2000 m/z，分辨率为70000；二级质谱分辨率为17500，碎裂模式为高能碰撞解离，碰撞能量设置为28%。

数据库搜索：使用 Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 软件将原始数据RAW文件转换成MGF格式，再用Mascot (Version 2.3.01, Matrix Science, UK) 搜索Uniprot human (Number of sequences: 172097) 数据库对蛋白进行鉴定，并采用假阳性率FDR < 1%作为结果过滤条件。添加固定修饰Carbamidomethyl (C)，可变修饰Oxidation (M)，Gln→Pyro-Glu (N-term Q)。设定一级质量偏差为15 ppm，二级质量偏差为0.02 Da。允许最大漏切数为1。

本实验样品由本课题组准备，后续实验由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成。

## 2.2.22 蛋白的功能富集与PPI分析

功能富集分析通过ClusterProfiler包(版本 3.14.3)在R中实施，包括GO分析和KEGG途径分析。通过STRING生物数据库(版本: 12.0; <http://string-db.org/>)构建原始PPI (Protein-Protein Interactions) 网络，利用Cytoscape 3.9.1来生成和可视化PPI网络。

## 2.2.23 统计分析

使用GraphPad Prism 9进行统计分析，采用t检验和单因素方差分析来比较各组之间差异。使用Kaplan-Meier法进行生存分析，并通过Log-rank检验确定生存曲线统计学意义。每个实验至少重复三次，得到了相似的结果。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ， $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 COMMD3是导致三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的关键基因

##### 3.1.1 表达量与生存相关基因和耐药相关基因

对来自TCGA数据库的三阴性乳腺癌RNAseq数据及其对应临床数据分析, 获得在三阴性乳腺癌中表达量高低与患者预后相关的基因集, 总共获取基因数为184个 ( $HR < 1$  或  $HR > 1$ ,  $P < 0.05$ )。按 $P$ 值显著性排序, 部分结果 (top20) 如图1所示。

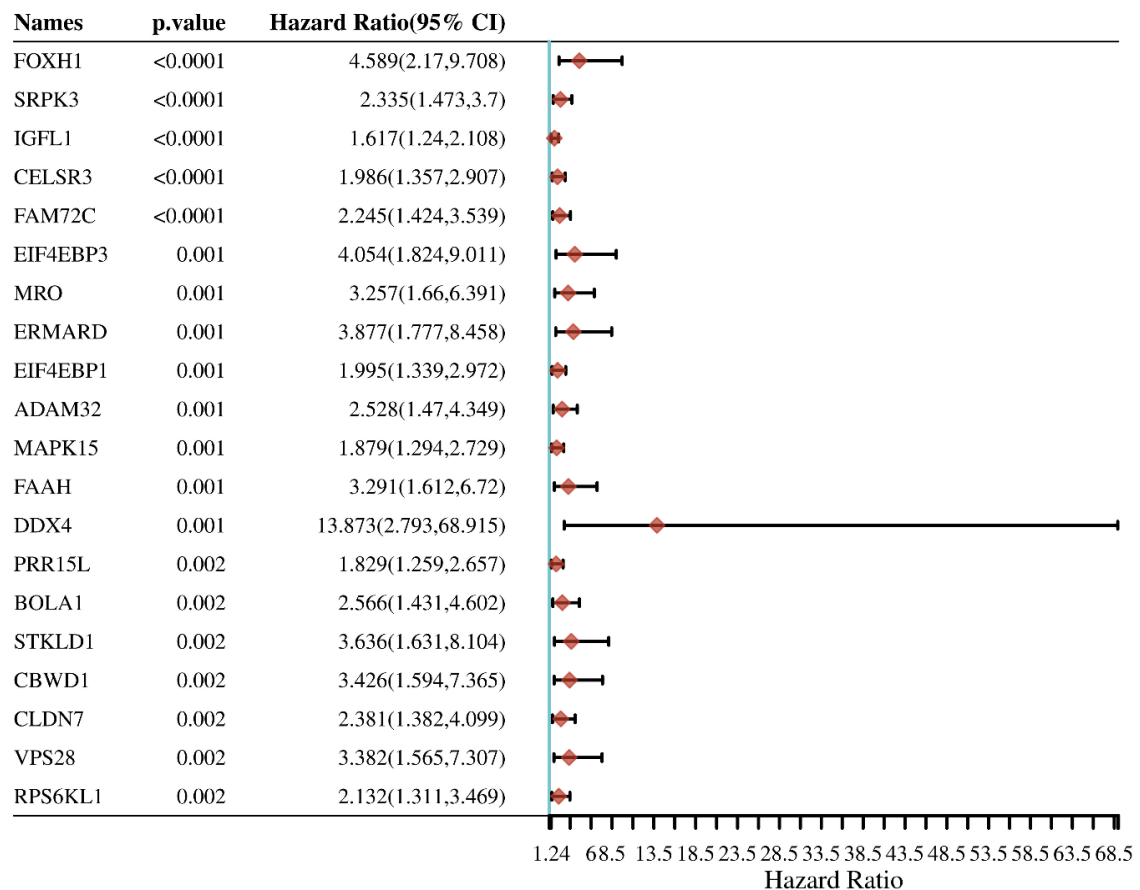


图1 TNBC中表达量与生存相关基因部分结果

对来自GEO数据库的GSE28784数据集中敏感型与多西紫杉醇耐药型细胞系数据进行分析, 从而获得对多西紫杉醇敏感和对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系的差异表达基因, 即与三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药相关基因。该数据集的DEGs的火山图如图2A所示, 热图如图2B所示 (根据LogFC值排列前1%)。

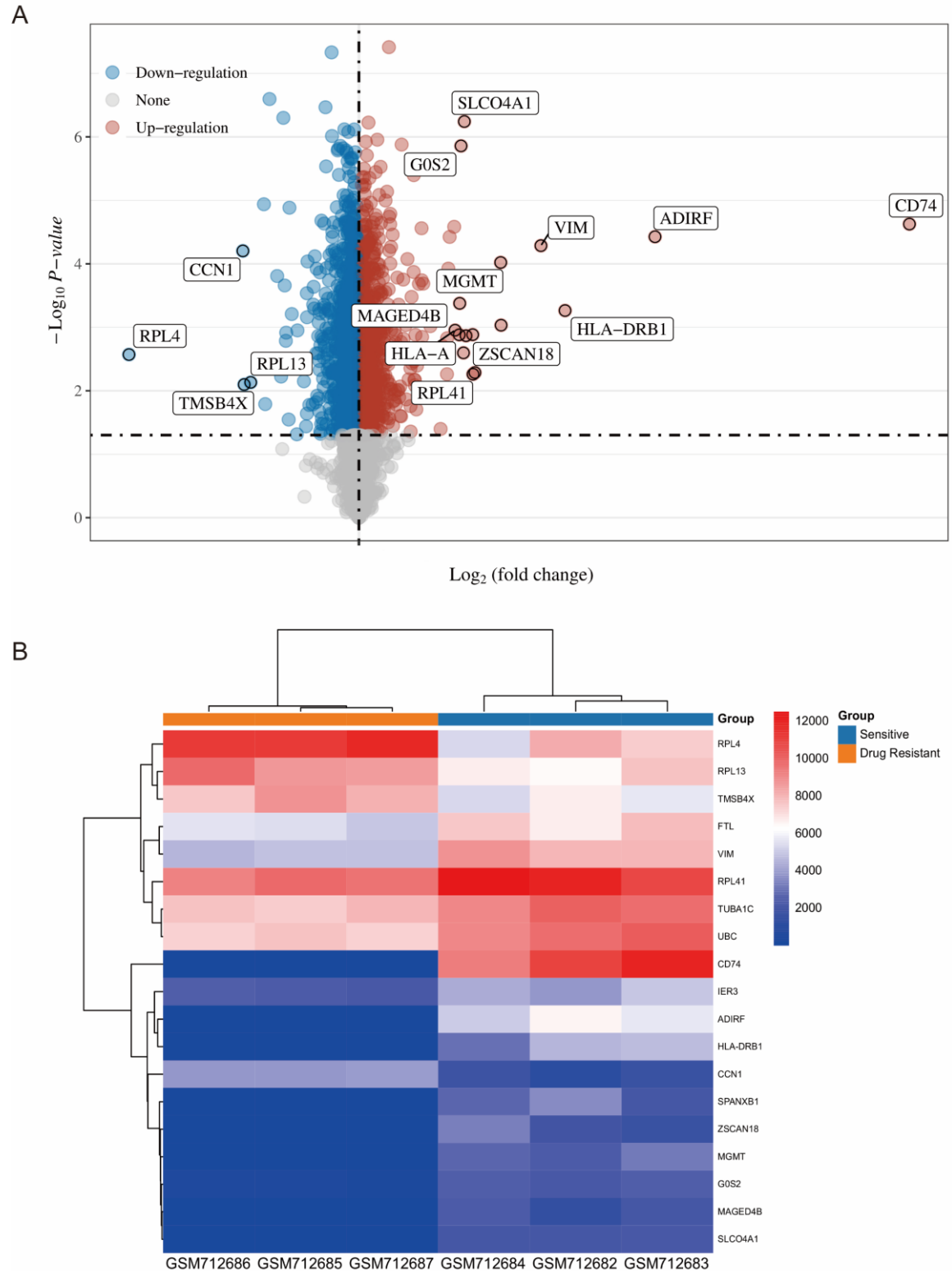


图2 TNBC的多西紫杉醇耐药相关基因集

**A:** GSE28784的差异表达分析的火山图。**B:** GSE28784的差异表达分析差异基因的热图（根据LogFC值排列前1%）。蓝色和红色分别表示对应矩形里的表达水平较低与较高，而白

色表示基因表达差异不显著。

三阴性乳腺癌中表达量高低与预后相关的基因和三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药相关基因的重叠基因如韦恩图所示（图3）。

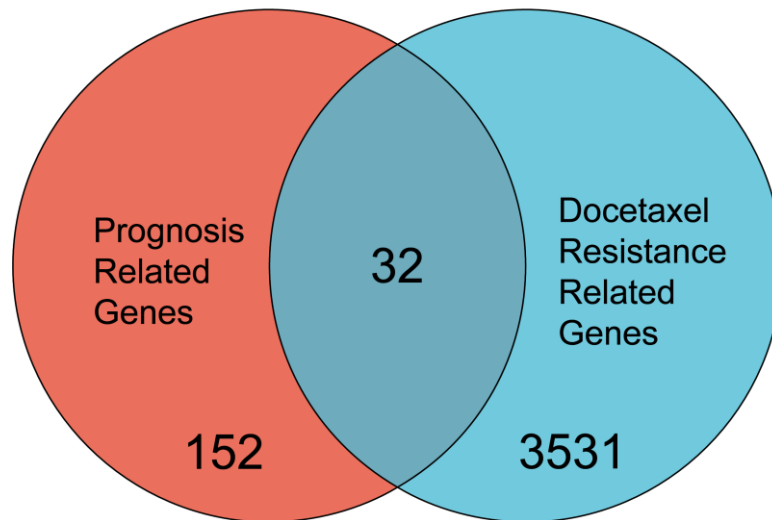


图3 TNBC中表达量高低与预后相关的基因和耐药相关基因的重叠基因。

### 3.1.2 与多西紫杉醇耐药相关的TNBC预后模型

对生存相关基因和耐药相关基因取交集。对多西紫杉醇的耐药为预后危险因素，基于此标准结合预后分析对交集基因进行方向筛选，总共有10个基因方向一致，这十个基因分别是：BOLA1, CAMK1D, CLDN7, COMMD3, EIF4EBP1, HOOK2, IKBKB, SLC12A8, VPS28, NR3C2。纳入上述十个基因在三阴性乳腺癌中进行预后模型建立。

模型是一个包含多个基因的RiskScore公式，各基因有权重，负数代表该基因为保护基因，正数代表该基因为危险基因： $\lambda_{\min}=0.0295$ ； $\text{RiskScore} = (0.3598) * \text{BOLA1} + (0.0557) * \text{CAMK1D} + (0.3045) * \text{CLDN7} + (0.3362) * \text{COMMD3} + (0.4329) * \text{EIF4EBP1} + (0.3354) * \text{HOOK2} + (0.0878) * \text{IKBKB} + (0.2885) * \text{SLC12A8} + (0.0989) * \text{VPS28} + (-0.0086) * \text{NR3C2}$ （图4A-C）。



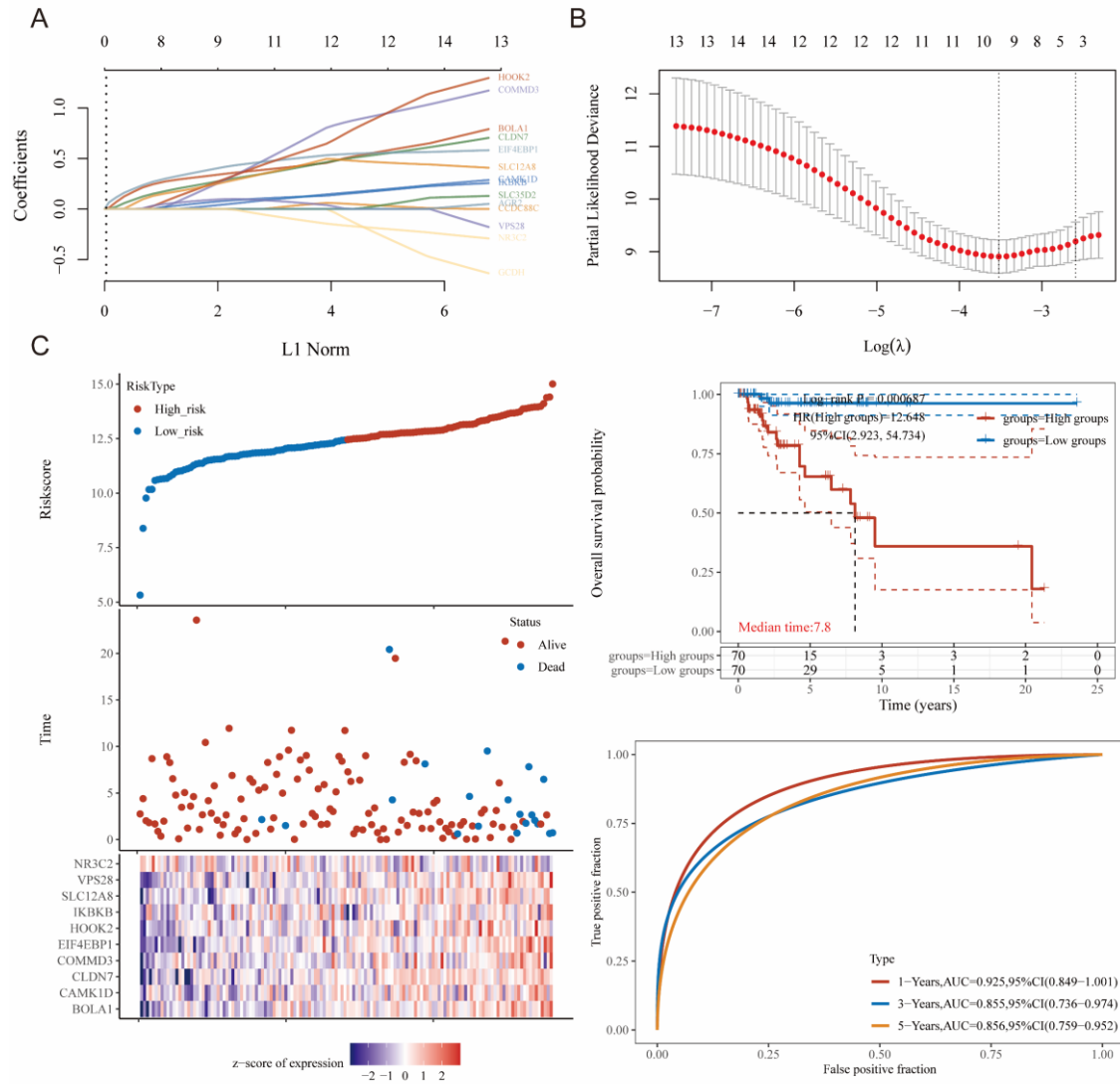


图4 交集基因在三阴性乳腺癌中预后模型建立

**A:** 交集基因在三阴性乳腺癌中预后模型建立的Lasso cox回归。选定特征的系数由lambda参数显示，横坐标代表自变量 lambda 的值，纵坐标表示自变量的系数；使用Lasso cox回归模型绘制了部分似然偏差与 $\log(\lambda)$ 的关系。**B:** Lasso和多因素cox。所选数据集中Risk score和生存时间、存活状态情况，其中最上面代表该Risk score从低到高散点图，不同颜色代表不同风险组；中间代表不同样本Risk score对应的生存时间和生存状态散点图分布；最下面图代表该signature中包含基因的表达热图。**C:** 该风险模型在数据集中的KM生存曲线分布及该风险模型不同时间的ROC曲线与AUC。

ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲线和AUC (Area Under the Curve) 值显示一年预后预测AUC = 0.925, 95%CI (0.849–1.001)，三年预后预测AUC = 0.855, 95%CI (0.736–0.974)，五年预测AUC = 0.856, 95%CI (0.759–0.952)。

AUC值均大于0.7，说明此预后分析预测能力较强。

### 3.1.3 单基因差异表达基因分析揭示COMMD3可能是TNBC多西紫杉醇耐药的关键基因

我们对10个交集基因分别进行单基因差异基因分析，将从TCGA数据库中获取的三阴性乳腺癌RNAseq数据根据各基因表达水平的中位数分为两组，分别为高表达组与低表达组，鉴定高低表达组之间的差异基因。并对差异基因进行GSEA功能富集，GO与KEGG功能富集分析。

其中COMMD3的单基因差异基因分析总共获取478个差异基因，其中191个上调基因，287个下调基因，差异基因的火山图如图5A所示。GSEA功能富集结果显示差异基因富集在PI3K-Akt信号传导途径、MET激活PTK2信号传导、受体酪氨酸激酶信号传导、RUNX1的转录调控、WNT信号传导、DNA双链断裂应激反应等生物学过程和信号传导通路（图5B）。GO功能富集分析发现上调基因主要在代谢过程，细胞结构，酶活性，金属离子结合等生物学过程富集（图5C）。下调基因主要富集在突触发育和结构，生物发育和形态学，生物化学和细胞生物学，离子通道和转运体等生物学过程中（图5D）。KEGG功能富集分析发现上调基因富集在氮代谢通路（图5C）。下调基因富集在胞外基质-受体相互作用与细胞黏附分子通路（图5D）。

这些生物学过程与肿瘤的发生发展及化疗耐药息息相关。提示COMMD3可能是导致三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的关键基因。

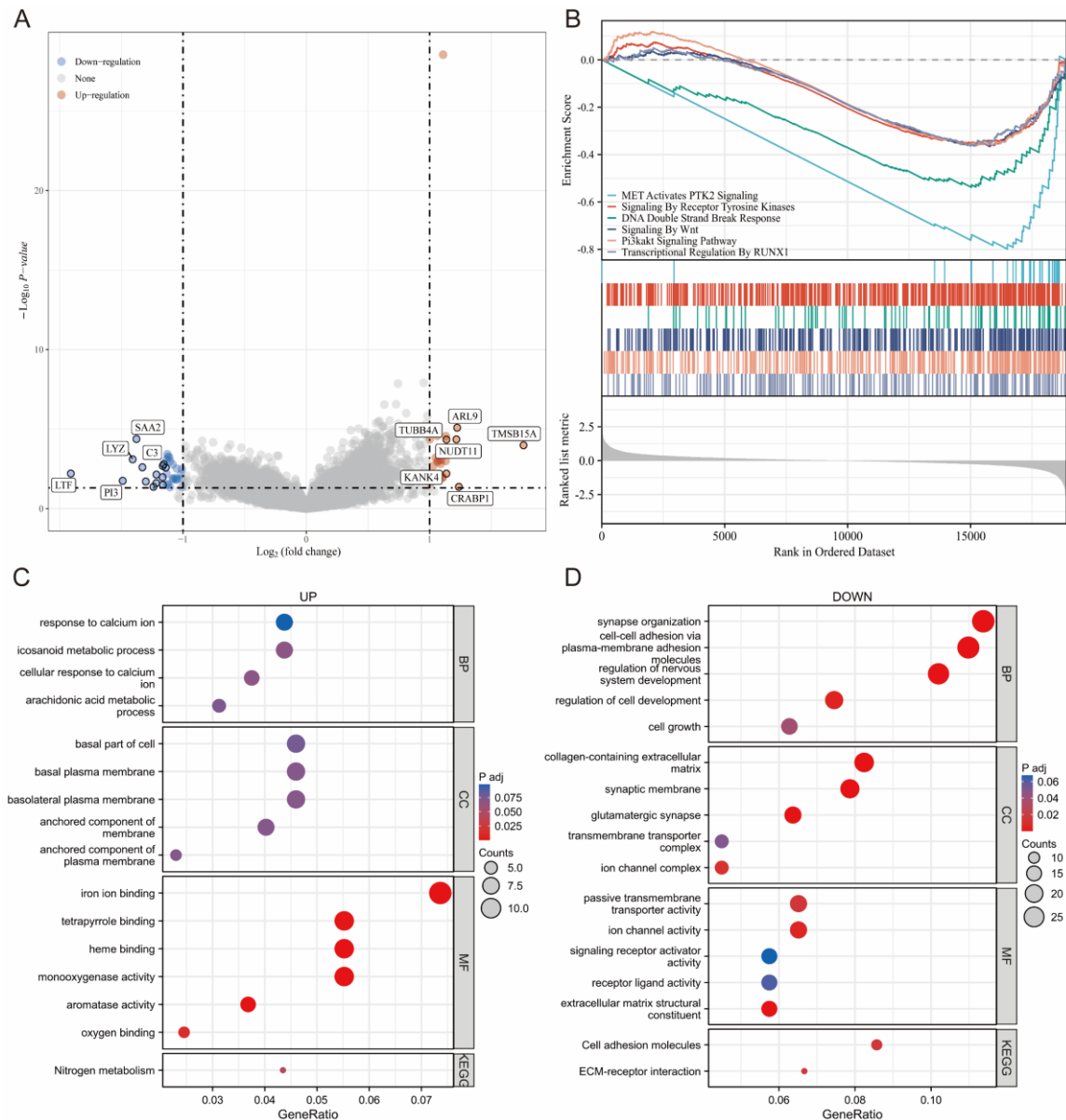


图5 TNBC中的COMMD3单基因差异基因分析

A: COMMD3差异基因的火山图。B: COMMD3差异基因的GSEA功能富集。C: 上调基因的GO和KEGG富集分析点图。D: 下调基因的GO和KEGG富集分析点图。

### 3.1.4 COMMD3是三阴性乳腺癌预后危险因素

利用前文中预后模型建立时从TCGA数据库下载整理的三阴性乳腺癌的STAR-counts数据和临床信息，根据COMMD3基因表达水平的中位数将所有数据分为COMMD3高表达组与COMMD3低表达组，对两组患者进行Kaplan-Meier生存分析。

生存分析结果显示，COMMD3在三阴性乳腺癌中为预后危险因素（HR, 3.882;

95% CI, 1.295 to 11.638  $P = 0.0155$ ) (图6A), 该结论与预后模型结论一致。ROC曲线和AUC值显示一年预后预测AUC = 0.843, 95%CI (0.734–0.952), 三年预后预测AUC = 0.748, 95%CI (0.644–0.851), 五年预测AUC = 0.668, 95%CI (0.537–0.799) (图6B), 其中一年预后预测与三年预后预测AUC值均大于0.7, 五年预测AUC虽然小于0.7但大于0.5且接近0.7, 说明此预后分析预测能力较强。

此外, 我们在其他分型的乳腺癌中对COMMD3进行生存预后分析, 结果显示COMMD3的表达水平对Luminal A型、Luminal B型、HER-2阳性型乳腺癌患者的生存预后的影响无统计学意义 (图6C-E)。

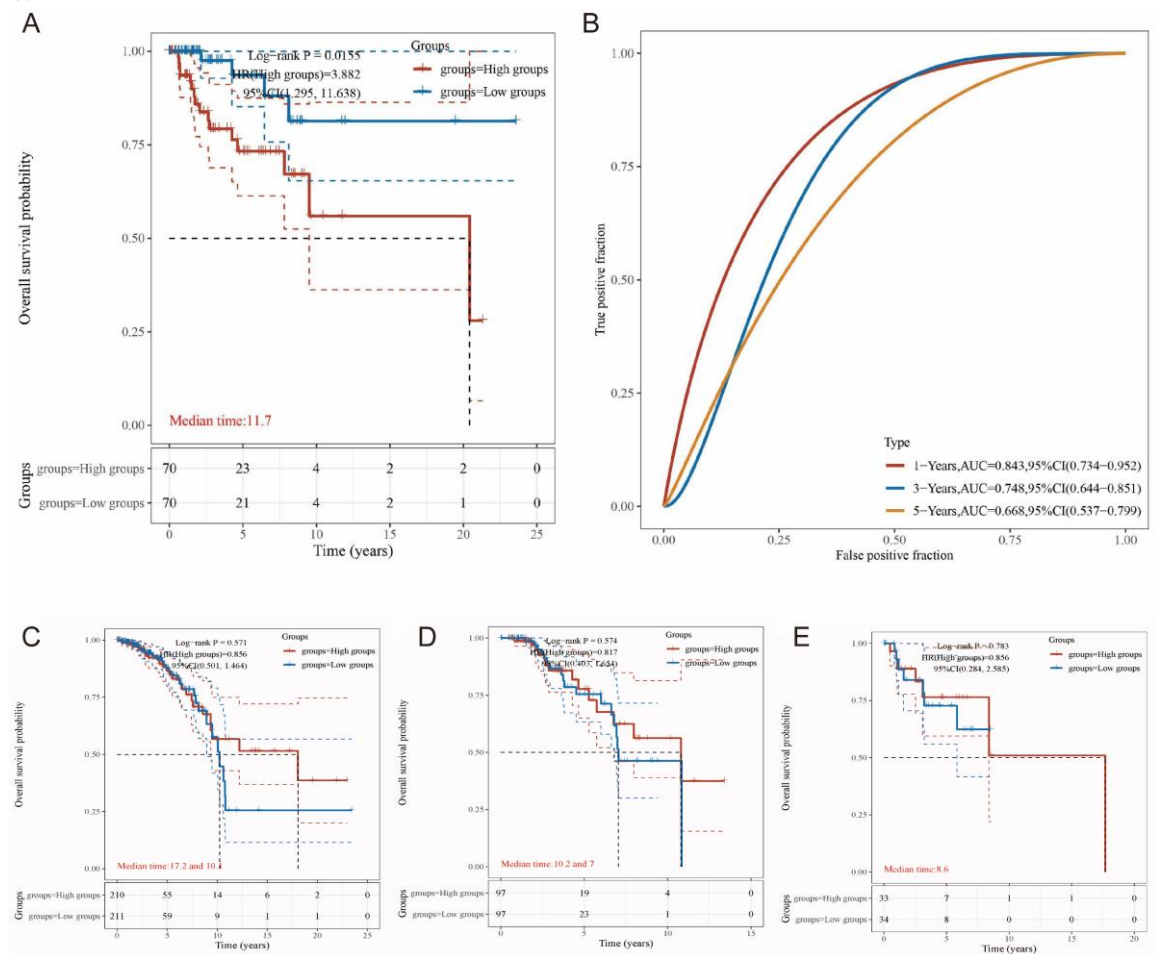


图6 COMMD3在乳腺癌中生存预后分析

A: COMMD3在三阴性乳腺癌中的KM生存曲线。B: COMMD3在三阴性乳腺癌中不同时间的ROC曲线和AUC值。C: COMMD3在Luminal A型乳腺癌中的KM生存曲线。D: COMMD3在Luminal B型乳腺癌中的KM生存曲线。E: COMMD3在HER2阳性型乳腺癌中的KM生存曲线。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

### 3.2 多西紫杉醇耐药对三阴性乳腺癌细胞的影响

在本研究中，我们通过药物浓度递增法成功构建了MDA-MB-231和BT-549两种三阴性乳腺癌细胞系的多西紫杉醇耐药亚型（图7A），分别命名为MDA-MB-231/Doc和BT-549/Doc。初步通过CCK8实验评估了这四种细胞对多西紫杉醇的敏感性，以IC<sub>50</sub>值作为衡量指标验证MDA-MB-231/Doc和BT-549/Doc细胞株的耐药性。研究结果揭示，MDA-MB-231/Doc细胞对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>值为7363 nmmol/L，MDA-MB-231细胞的IC<sub>50</sub>值为650.9 nmmol/L，RI  $\approx$  10.47。而BT-549/Doc细胞对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>值为17414 nmmol/L，BT-549细胞的IC<sub>50</sub>值为1331 nmmol/L，RI  $\approx$  13.08（图7B）。

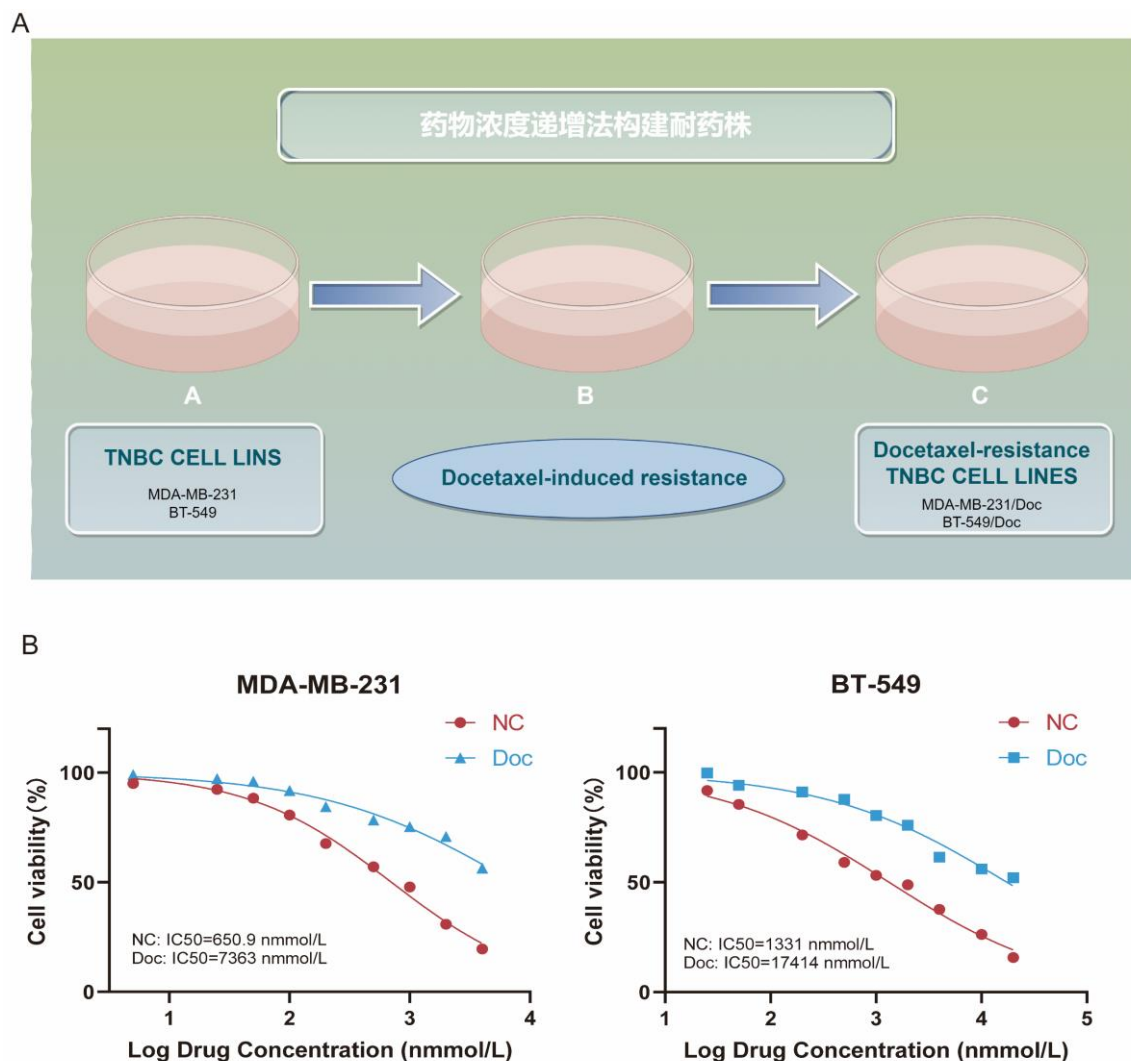


图7 对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞模型建立

A：通过药物浓度递增法构建对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系模型。B：MDA-MB-231及其耐药株MDA-MB-231/Doc，BT-549及其耐药株BT-549/Doc的IC<sub>50</sub>。

相较非耐药株，耐药株的形态发生变化。耐药细胞形状更加多样，出现拉



长、扁平等形状，核仁变得更加不规则与明显，细胞质中应激颗粒增多，细胞之间的联系也更加紧密。尤其是BT-549/Doc细胞，呈现出细胞集群的生长模式倾向（图8）。

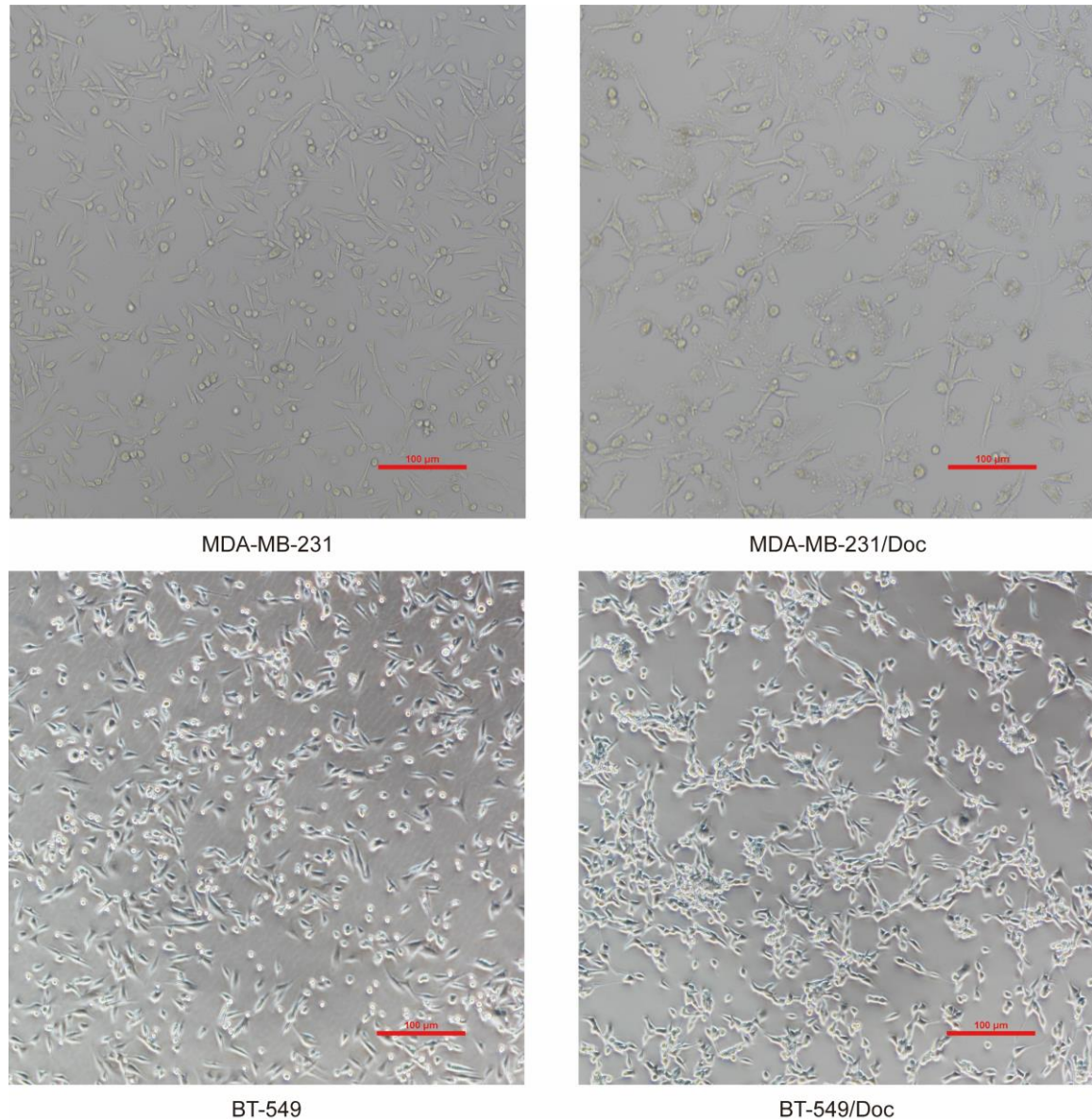


图8 对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞形态发生改变

相较非耐药株，耐药细胞形状更加多样，出现拉长、扁平等形状，核仁变得更加不规则与明显，细胞质中应激颗粒增多，细胞之间的联系也更加紧密。比例尺为100  $\mu\text{m}$ 。

P-糖蛋白（P-glycoprotein, P-gp）是由MDR（Multi-Drug Resistance gene）基因所编码的一种膜型糖蛋白，有ATP依赖性跨膜转运活性，可将药物转运至细胞外。在肿瘤化疗中，P-gp的过度表达是导致化疗药物耐药的关键因素之一<sup>[17]</sup>。我们通过Western Blot实验检测了P-gp在普通三阴性乳腺癌细胞和对多西紫杉醇耐药

的三阴性乳腺癌细胞中的表达水平，结果显示P-gp在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞中较普通三阴性乳腺癌细胞中表达水平明显升高（图9）。

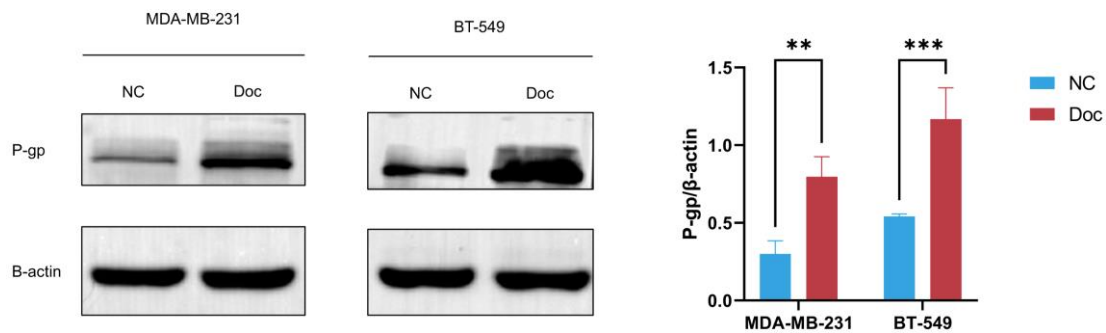


图9 对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞中P-gp表达明显升高

Western Blot结果显示P-gp在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达显著升高。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

为了进一步探索对多西紫杉醇耐药对三阴性乳腺癌细胞的影响，我们使用TMT技术检测BT-549和BT-549/Doc细胞之间的差异蛋白。TMT样本的质量控制分析显示肽段电荷状态分布良好，双电荷和三电荷的肽段最多，适合质谱分析（图10-A）。大部分蛋白质的序列覆盖率在10%-20%，表明大多数蛋白质的识别结果可靠（图10-B）。蛋白匹配的肽段数目分布统计如图10-C所示，蛋白质质量的分布情况如图10-D所示。根据标签离子的峰强度进行样本间定量比较总共得到223个差异蛋白，其中上调蛋白98个，下调蛋白125个。火山图如图10-E所示，热图如图10-F所示（根据LogFC值排列前2%）。

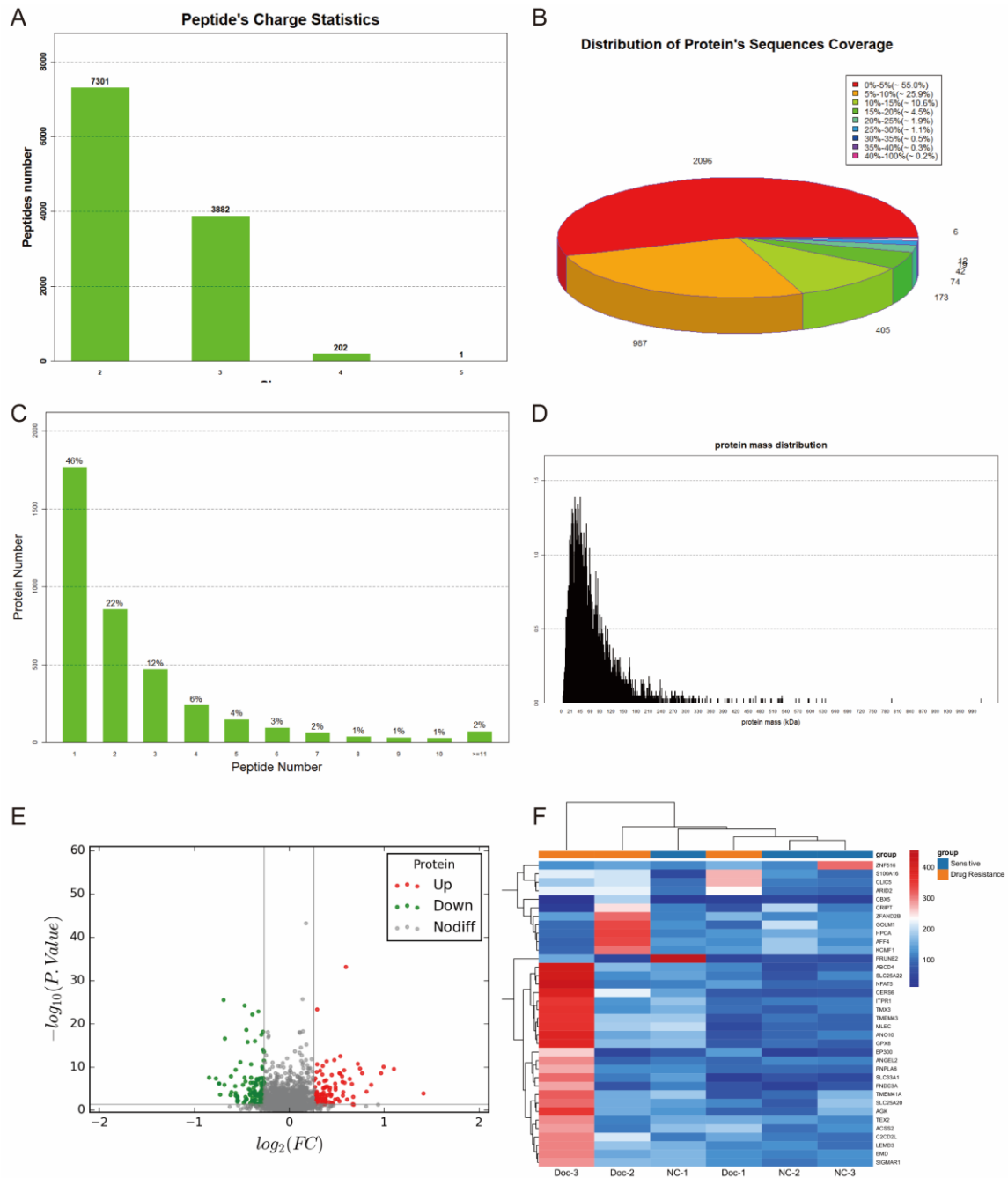


图10 TMT质量控制分析及差异蛋白结果展示

**A:** 肽段电荷分布: 横坐标为电荷数, 纵坐标为肽段数量。柱形图顶端的数字代表该电荷状态的肽段数目。**B:** 蛋白鉴定覆盖率统计: 不同颜色代表不同的蛋白覆盖率, 图上的数字代表该覆盖率蛋白的个数。**C:** 蛋白匹配肽段数目分布: 横坐标为匹配上的肽段数目, 纵坐标为蛋白个数比。**D:** 鉴定蛋白质的分子量分布: 横坐标为蛋白理论分子量, 纵坐标为该分子量的蛋白占比。**E:** TMT差异蛋白火山图。**F:** TMT差异蛋白热图(根据LogFC值排列前2%)。蓝色和红色分别表示对应矩形里的表达水平较低与较高, 而白色表示基因表达差异不显著。

对差异蛋白进行GSEA功能富集, GO与KEGG功能富集分析。GSEA功能富集



结果显示差异蛋白富集在细胞外基质的组织和构建与氨基酸及其衍生物的代谢过程两条通路上（图11A-B）。GO和KEGG功能富集结果显示上调蛋白主要富集在能量代谢，细胞凋亡与自噬，细胞结构与组织等生物学过程（图11C），下调蛋白主要富集在蛋白质合成与代谢，细胞外基质与细胞间相互作用，能量转换与信号传递等生物学过程（图11D）。

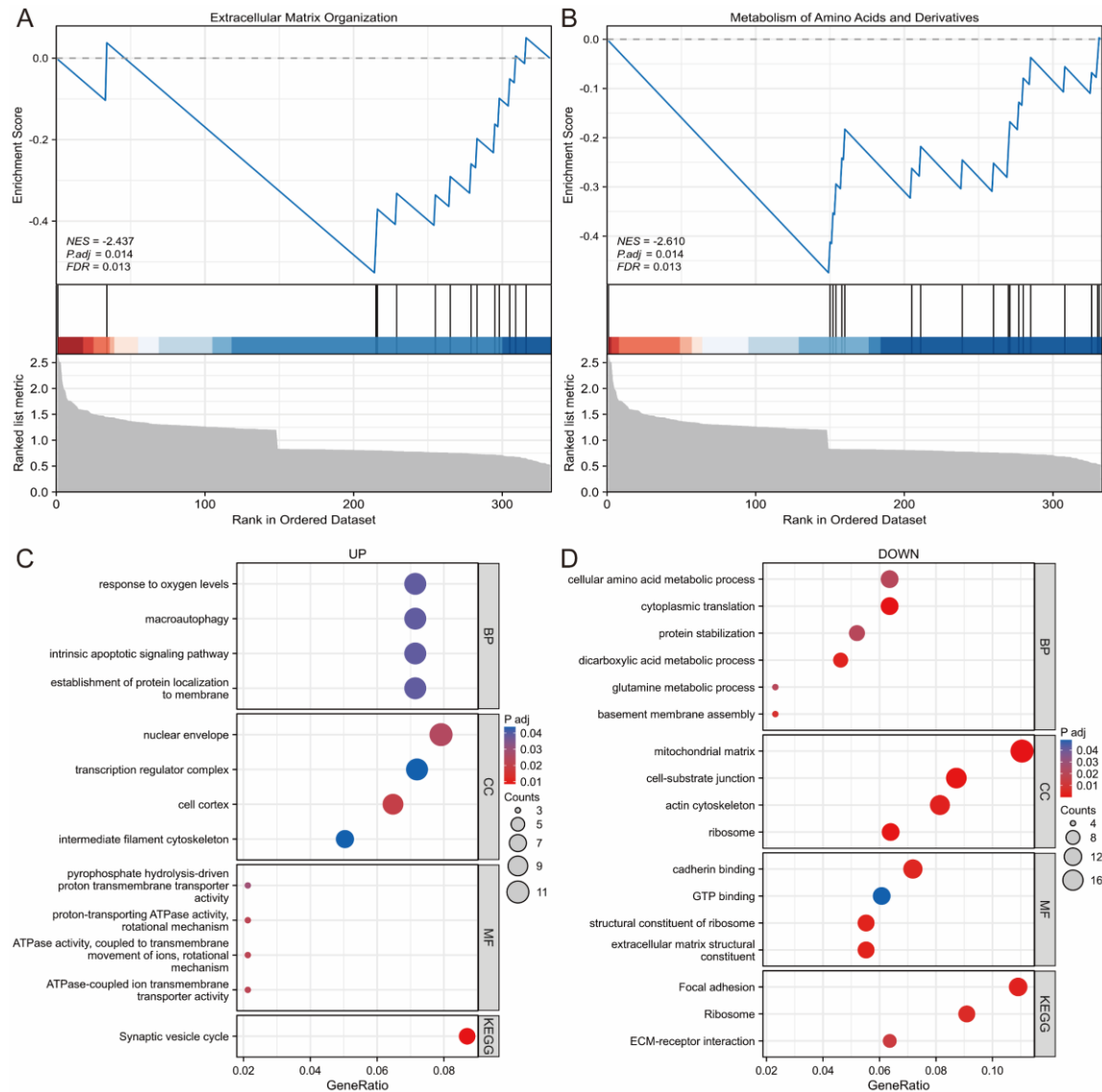


图11 TMT检测耐药细胞与不耐药细胞差异蛋白的功能富集

A-B: 差异蛋白GSEA功能富集分析。C: 上调蛋白的GO和KEGG功能富集分析。D: 下调蛋白的GO和KEGG功能富集分析。

### 3.3 COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中高表达

我们通过实时定量PCR和Western Blot实验检测了COMMD3在耐药与非耐药细

胞株中的表达差异。结果表明,无论是在mRNA还是蛋白质水平上,COMMD3在MDA-MB-231/Doc和BT-549/Doc细胞中的表达均显著高于相应的非耐药细胞株(图12A-B)。

扩大研究范围,我们还从盛京医院病理科获得了接受多西紫杉醇或紫杉醇治疗后发展出耐药性的三阴性乳腺癌患者的肿瘤组织样本,以及对多西紫杉醇敏感的患者样本。通过免疫组化染色技术检测了这些样本中COMMD3的表达情况。结果显示,耐药患者肿瘤组织中COMMD3的表达显著高于药敏患者肿瘤组织(图12C)。结合患者临床病理信息与COMMD3表达水平进行统计分析,结果显示COMMD3高表达与患者的多西紫杉醇耐药密切相关,而COMMD3表达与患者年龄、肿瘤直径、是否发生淋巴结转移的相关性无统计学意义(表3-1)。

表3-1 三阴性乳腺癌中COMMD3表达与临床病理学参数的关系

变量	病例数	COMMD3表达		P值
		高表达	低表达	
年龄				0.459
< 50岁	14	10	4	
≥ 50岁	46	18	28	
肿瘤直径				0.647
≤ 3cm	17	5	12	
> 3cm	43	23	20	
淋巴结转移				0.539
转移	27	13	14	
未转移	33	15	18	
治疗线数				0.14
一线治疗	14	5	9	
二线治疗	28	12	16	
三线及以上	18	11	7	
紫杉醇耐药				<0.0001
耐药	30	27	3	
非耐药	30	1	29	

总之，我们在三阴性乳腺癌细胞系和三阴性乳腺癌患者的肿瘤组织中证明了COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达升高。

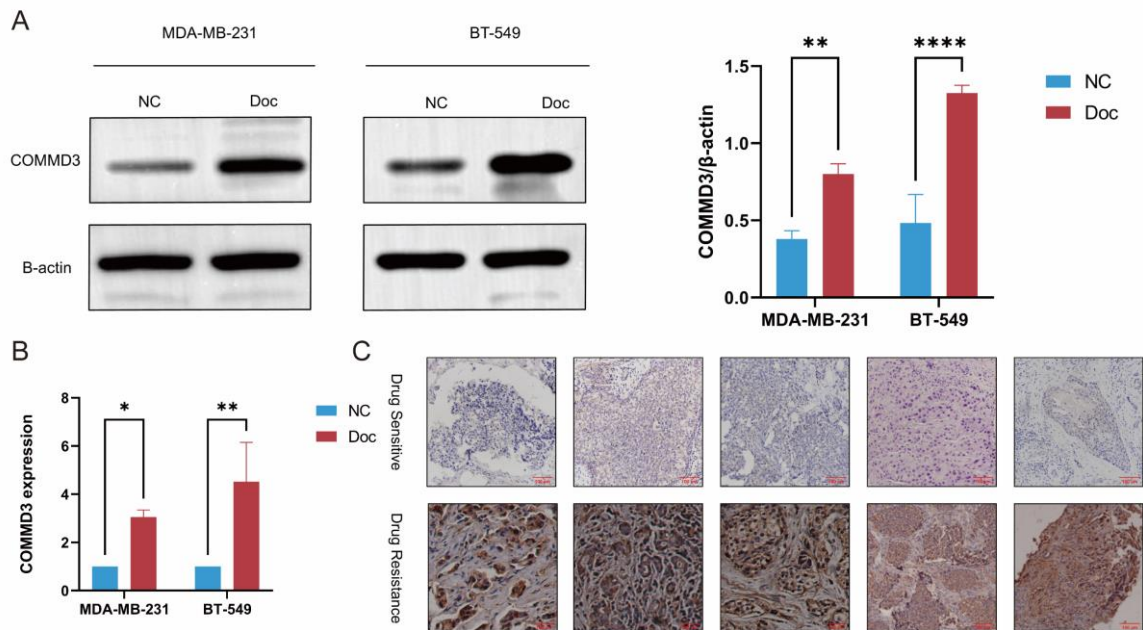


图12 COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达升高

**A:** Western Blot结果显示COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达显著升高。**B:** qPCR结果显示COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达显著升高。**C:** 免疫组化染色显示COMMD3在对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌中表达显著升高，比例尺为100 μm。P < 0.05被认为差异具有统计学意义。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

### 3.4 COMMD3表达水平下降导致耐药三阴性乳腺癌对多西紫杉醇重新敏感

通过慢病毒介导的方式，我们在多西紫杉醇耐药的MDA-MB-231/Doc和BT-549/Doc细胞系中敲减COMMD3基因。转染72小时后，采用Western Blot方法检测COMMD3蛋白的表达。结果表明，与未转染对照组（NC）及空载体对照组（ShCon）相比，敲减COMMD3（ShCOMMD3）的细胞组中COMMD3蛋白表达显著降低（图13A）。

为探索COMMD3在三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇耐药性中的作用，我们采用CCK-8实验评估了敲减COMMD3基因后的三阴性乳腺癌耐药细胞系对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>。实验结果表明，相较于未转染对照组和空载体对照组，敲减COMMD3的细胞系对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>值降低到了接近非耐药细胞的水准（图13B）。这一

结果明确指示了COMMD3在三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇耐药性中发挥重要作用。

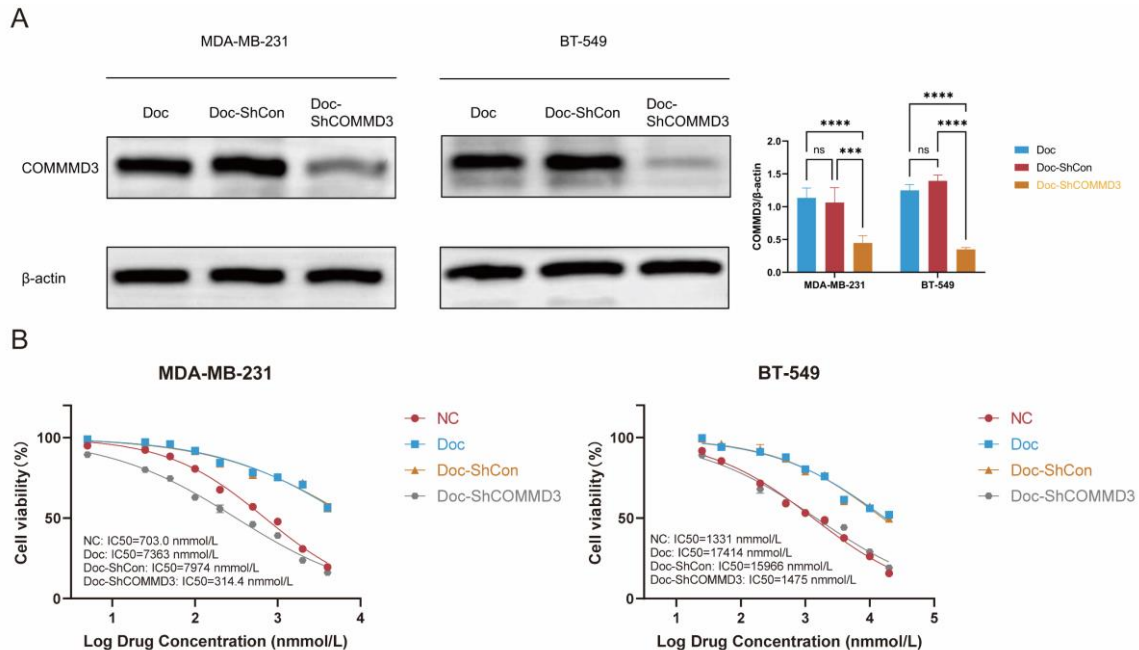


图13 COMMD3表达水平降低使对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌重新敏感

**A:** Western Blot结果显示, 与未转染对照组 (NC) 及空载体对照组 (ShCon) 相比, 敲减COMMD3 (ShCOMMD3) 的细胞中COMMD3蛋白表达显著降低。**B:** CCK-8实验结果显示敲减COMMD3的耐药细胞系对多西紫杉醇的IC50值降低到了接近药敏细胞的水准。 $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

多西紫杉醇是一种M期特异性的化疗药物, 其主要作用机制是通过促进微管的聚合并防止其解聚, 从而阻断肿瘤细胞的有丝分裂, 导致癌细胞不能正常分裂生长, 最终诱导细胞死亡。鉴于COMMD3敲减后细胞对多西紫杉醇敏感性的增加, 为进一步探索COMMD3对三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的影响, 我们对肿瘤细胞的细胞周期和凋亡进行了研究。

在本研究中, 我们采用流式细胞术深入探究了多西紫杉醇对三阴性乳腺癌细胞系的影响, 特别是非耐药三阴性乳腺癌细胞系、对多西紫杉醇耐药的三阴性乳腺癌细胞系, 以及COMMD3敲减后的耐药三阴性乳腺癌细胞系。我们关注的焦点是在多西紫杉醇处理后, 这些不同细胞系的细胞周期分布和凋亡率变化, 其中未经药物处理的细胞作为实验的对照组。

实验结果揭示了有趣的现象。在对多西紫杉醇敏感的普通三阴性乳腺癌细胞

中,经多西紫杉醇处理,与对照组相比,观察到细胞周期在G2/M期的累积显著增加(图14),同时凋亡率也有显著提升(图15),这表明多西紫杉醇能有效阻断这些细胞的有丝分裂过程,诱导细胞凋亡。然而,对于展现出对多西紫杉醇耐药性的细胞系,这种变化并不明显(图14-16),表明耐药机制可能影响了药物的作用效果。更为重要的是,当我们对耐药三阴性乳腺癌细胞系进行COMMD3基因的敲减后,这些细胞在接受多西紫杉醇处理时,不仅在细胞周期的G2/M期比例上升(图14),而且凋亡率也显著增加(图15),与对多西紫杉醇敏感的细胞系相似。这一发现表明,COMMD3基因的敲减能够逆转耐药三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇的抵抗性,恢复药物的敏感性,从而揭示了COMMD3在调控三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇耐药性中可能扮演的关键角色。

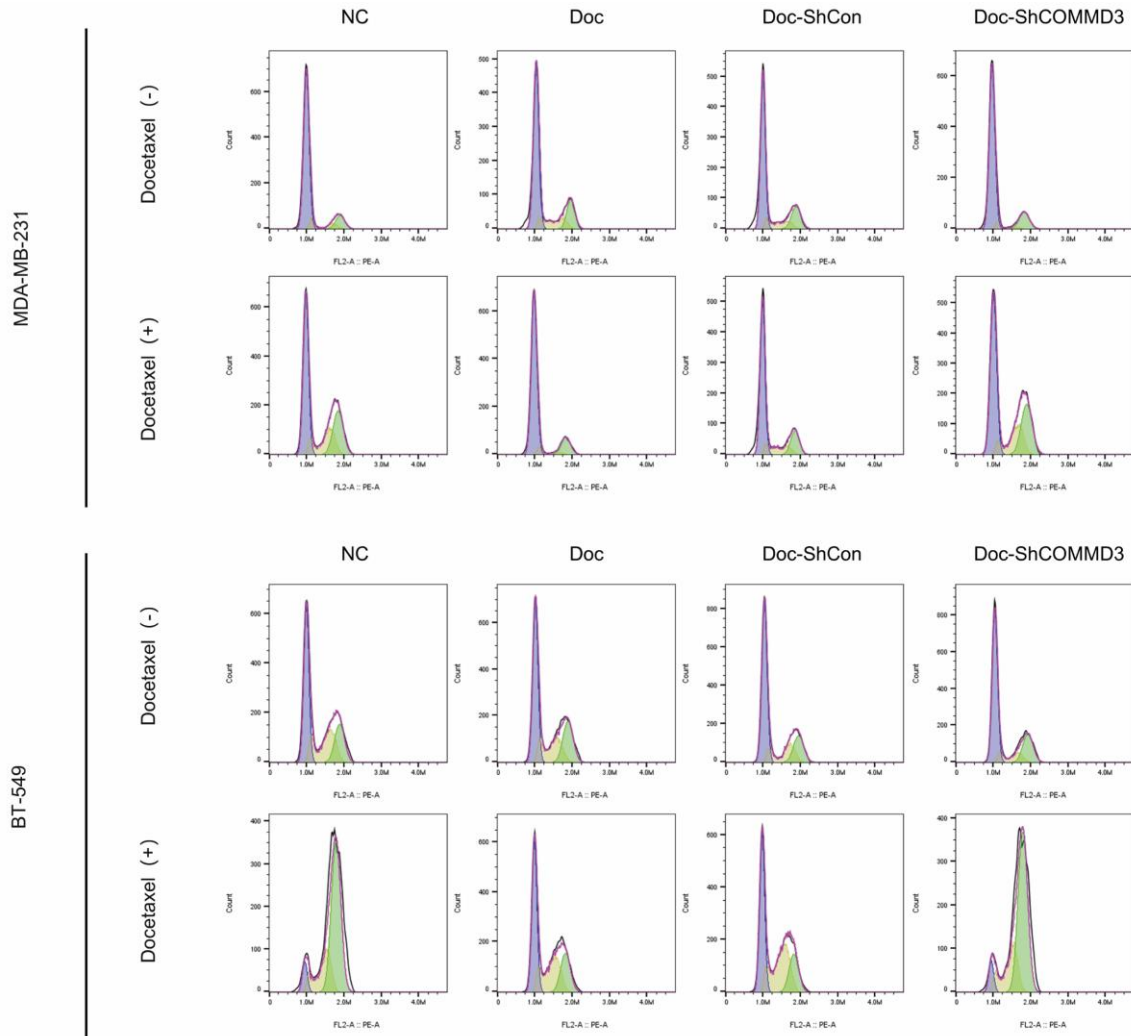


图14 在耐药三阴性乳腺癌细胞系中敲减COMMD3后给予多西紫杉醇处理能明显诱导细胞G2/M期阻滞



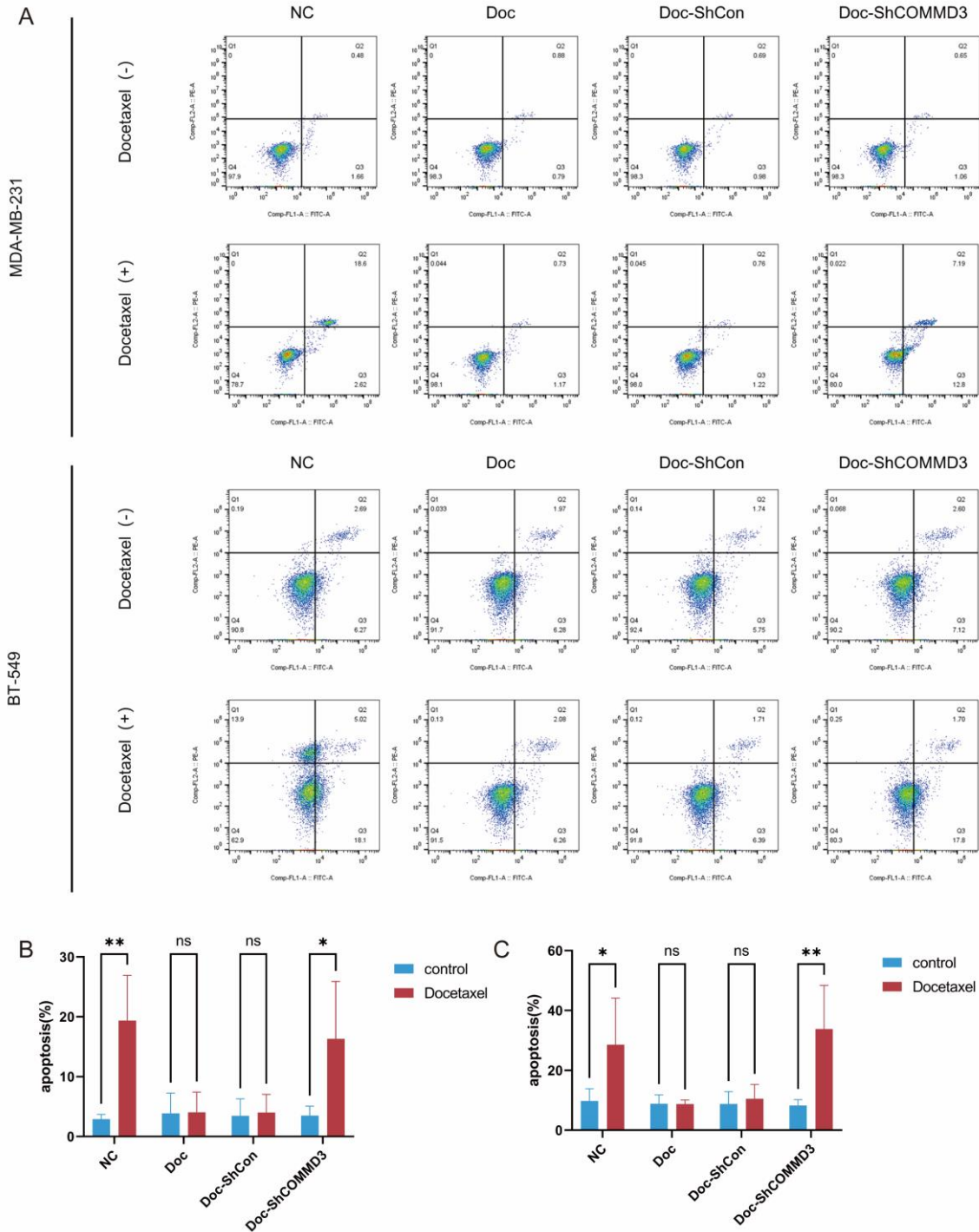


图15 在耐药三阴性乳腺癌细胞系中敲减COMMD3后给予多西紫杉醇处理能明显诱导细胞凋亡

A: 流式细胞术结果显示, 对耐药三阴性乳腺癌细胞系进行COMMD3基因的敲减后给予多西紫杉醇处理能明显诱导细胞凋亡。B: MDA-MB-231细胞的凋亡率统计分析结果。C: BT-549细胞的凋亡率统计分析结果。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

### 3.5 COMMD3表达水平升高可启动三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药

为了进一步探索COMMD3表达水平对三阴性乳腺癌细胞耐药性的影响，本研究选用了BT-549细胞系作为实验模型。通过质粒介导的转染方法，我们构建了过表达COMMD3的细胞模型（OVCOMMD3组）。转染48小时后，利用Western Blot技术检测细胞中COMMD3蛋白的表达水平。实验结果显示，在OVCOMMD3组中COMMD3蛋白的表达量显著高于未转染对照组（NC组）和空载体对照组（OVCon组）（图16A）。

为了评估COMMD3过表达对BT-549细胞对多西紫杉醇敏感性的影响，我们进行了CCK-8实验来测定IC<sub>50</sub>。结果揭示，尽管COMMD3过表达的细胞系（OVCOMMD3）对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>值较耐药细胞系BT-549/Doc略低，但与未转染对照组和空载体对照组相比，其IC<sub>50</sub>值显著上升（图16B）。这一发现表明COMMD3的过表达至少在一定程度上促进了三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇的耐药性。

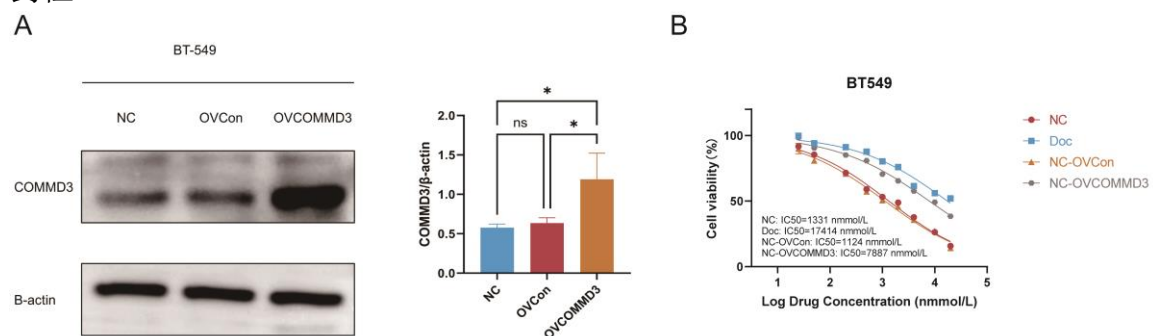


图16 过表达COMMD3使非耐药TNBC细胞IC<sub>50</sub>升高

**A:** Western Blot结果显示，与未转染对照组（NC）及空载体对照组（OVCon）相比，过表达COMMD3（OVCOMMD3）的细胞中COMMD3蛋白表达显著升高。**B:** CCK-8实验结果显示过表达COMMD3的耐药细胞系对多西紫杉醇的IC<sub>50</sub>值升高。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

进一步地，我们通过流式细胞仪分析了不同处理条件下细胞的周期分布和凋亡率。在未经药物处理的细胞作为实验对照的情况下，经多西紫杉醇处理的非耐药BT-549细胞在G<sub>2</sub>/M期的累积以及凋亡率均有显著上升（图17A-B），这说明多西紫杉醇能有效阻滞这些细胞周期的进程，并促使细胞凋亡。相反，BT-549/Doc细胞显示出对多西紫杉醇的耐药性，这些耐药细胞在药物处理后，无论是细胞周

期分布还是凋亡率，均未观察到与敏感细胞相似的变化。值得注意的是，当在非耐药BT-549细胞中过表达COMMD3后，多西紫杉醇处理不再诱导G2/M期阻滞和细胞凋亡率的提升，这与耐药细胞的表现相似。这一结果进一步证明了COMMD3过表达能够有效地诱导对多西紫杉醇敏感的三阴性乳腺癌细胞产生耐药性。

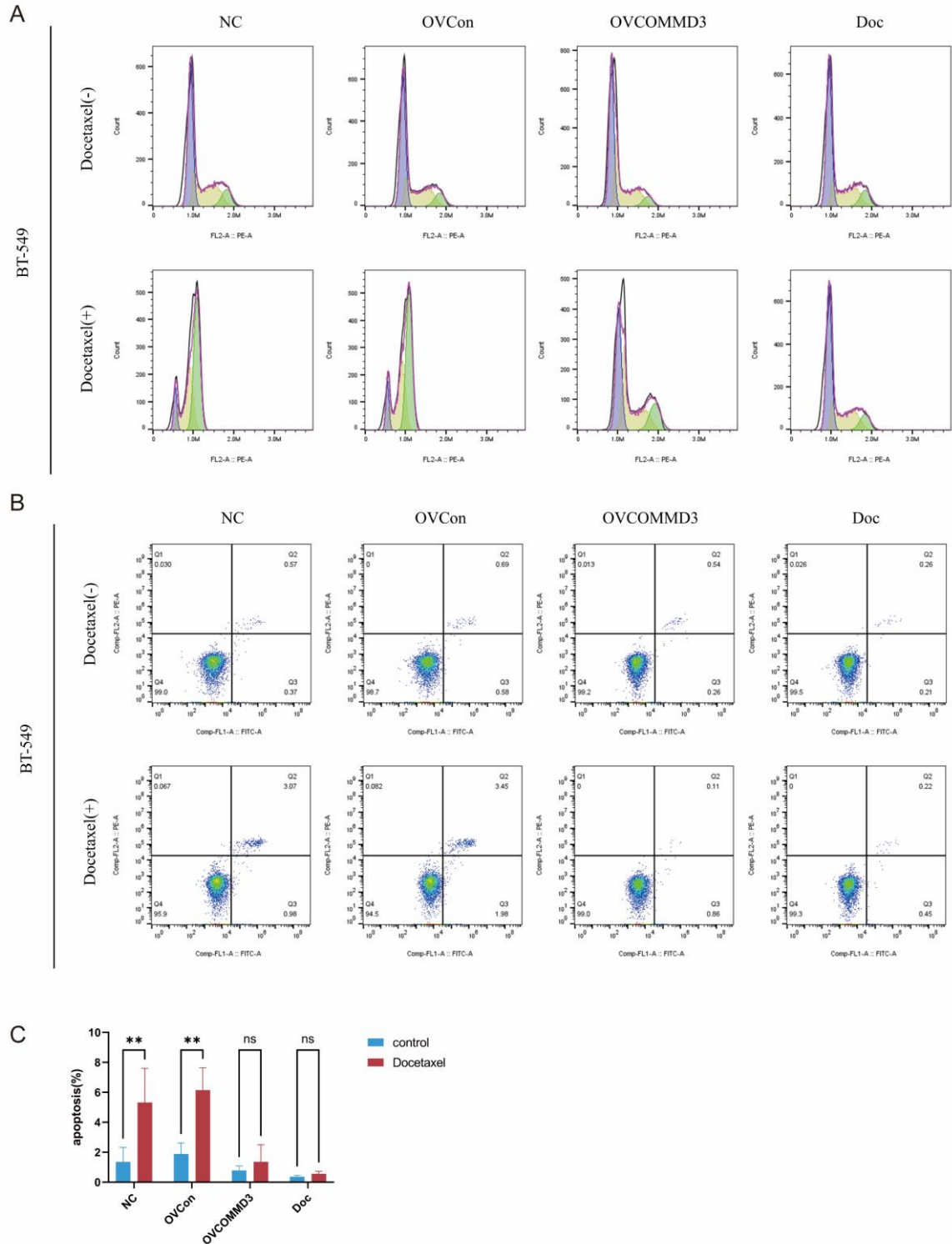


图17 过表达COMMD3可部分启动三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性



**A:** 在三阴性乳腺癌细胞系中过表达COMMD3后给予多西紫杉醇处理, 无明显细胞G2/M期阻滞出现, 与对多西紫杉醇耐药的细胞系相似。**B:** 在三阴性乳腺癌细胞系中过表达COMMD3后给予多西紫杉醇处理, 细胞凋亡无明显变化。**C:** BT-549细胞的凋亡率统计分析结果。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

结合先前在耐药细胞系中敲除COMMD3的实验结果, 我们得出结论: COMMD3的表达水平是影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇敏感性的重要因素。

### 3.6 COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药中的作用机制初步探索

为了深入理解COMMD3如何调控三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性, 本研究采用Western Blot技术评估了COMMD3对P-gp表达的影响。实验结果显示, 敲减COMMD3的多西紫杉醇耐药三阴性乳腺癌细胞中, P-gp的表达水平明显低于未转染和转染空载体的对照组(图18A)。相应地, 过表达COMMD3的三阴性乳腺癌细胞中P-gp的表达水平显著高于对照组(图18B)。这一发现与癌细胞在化疗压力下通过上调P-gp表达以适应性抵抗化疗药物的机制相吻合<sup>[18]</sup>。因此, COMMD3对P-gp表达的调控可能是其影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药性的关键途径之一。

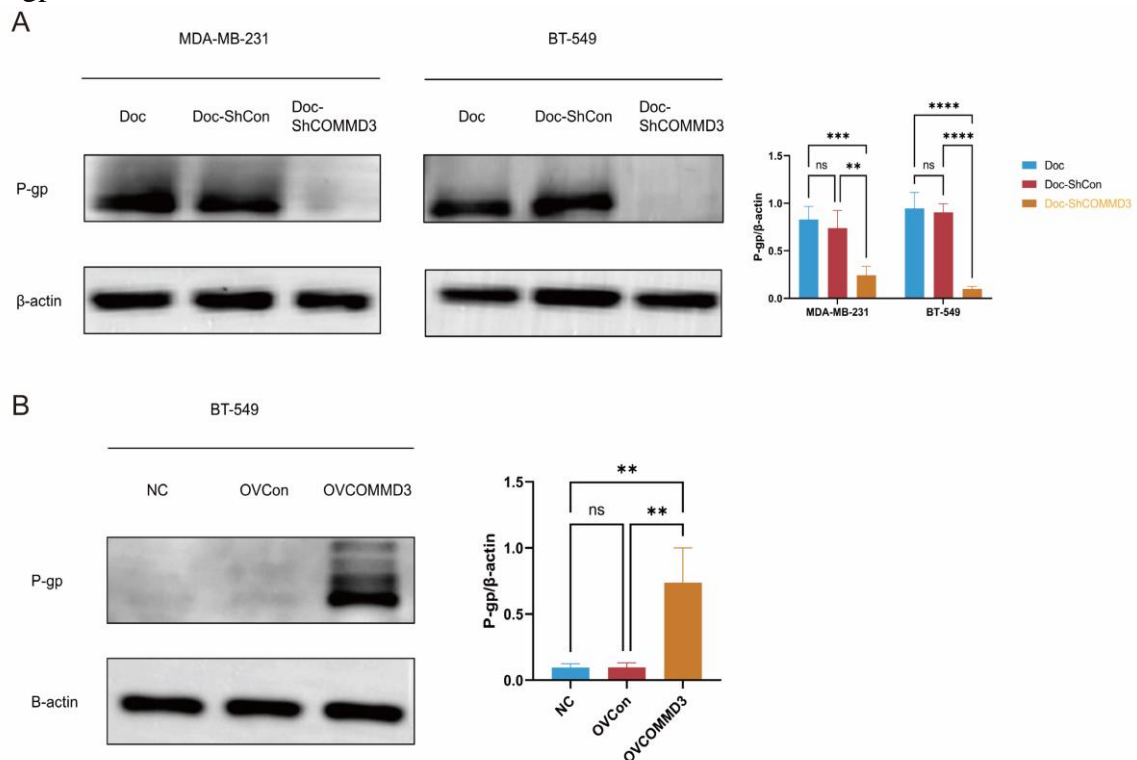


图18 COMMD3通过调节P-gp的表达水平影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药性

A: Western Blot结果显示, 敲减COMMD3导致P-gp表达水平降低。B: 过表达COMMD3导致P-gp表达水平升高。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。NS为结果无明显统计学意义。N = 3。

进一步地, 我们通过COIP-MS技术筛选并鉴定了与COMMD3相互作用的蛋白, 旨在探索COMMD3在三阴性乳腺癌耐药性中的作用机制。基于COIP-MS结果中不同蛋白的蛋白质丰度、重复性、特异性及蛋白质数据库UniProt的对比计算出Score作为衡量标准, 以score = 50作为阈值, 认为score  $\geq 50$ 的蛋白为COMMD3的有效互作蛋白。

我们对score  $\geq 50$ 的蛋白按照功能做简单分类, 主要可分为7类, 分别为: 细胞骨架蛋白、应激反应蛋白、代谢酶、转录和翻译调节器、信号分子、DNA修复和细胞周期控制、免疫反应调节剂, 结果如表3-1所示。

表 3-2 COMMD3互作蛋白的功能分类

生物学功能	蛋白名称
细胞骨架蛋白	KRT1, KRT2、KRT5、KRT8、KRT9、 KRT10、KRT14、KRT16、KRT19、KRT78、 ACTB、ACTN4
应激反应蛋白	HSP90AB1、HSPD1、SERPINH1
代谢酶	ALB、ALDOA、PKM、ENO3、PHGDH LDH
转录和翻译调节器	HIST1H2A、HIST1H4H、HNRNPU、 HNRPA3、HNRNPK、RPS6、RPS8、RPS9、 RPS14、RPS18、RPL3、RPL5、RPL7、 RPL8、RPL14、RPL18、RPL19、RPL35、 RPS4X
信号分子	ANXA2、MYH9、YWHAG、YWHAZ
DNA修复和细胞周期控制	NPM1、TCP1
免疫反应调节剂	IGL@

为了进一步探索COMMD3可能的作用机制, 我们对score  $\geq 50$ 的蛋白进行了KEGG和GO功能富集分析。KEGG功能富集显示COMMD3在BT-549/Doc细胞中互作蛋白主要集中在核糖体、氨基酸生物合成、碳代谢、雌激素信号通路、糖酵解/糖异生等关键生物学路径; GO功能富集揭示了这些蛋白在翻译与蛋白质合成、

RNA代谢与处理、代谢调控与稳态、蛋白质互作与稳定性调控、细胞骨架与细胞结构、细胞内囊泡与颗粒等等方面的集中分布（图19A）。

随后，我们对 $\text{score} \geq 50$ 的蛋白进行了PPI互作网络分析，该互作网络有88个节点，1155条边。按照连接节点数从高到低排列，GAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）、ACTB（Actin, beta）、HSP90AB1（Heat shock protein 90 alpha family class B member 1）、EEF2（Eukaryotic translation elongation factor 2）、EEF1A1（Eukaryotic translation initiation factor 1 alpha）为连接节点数最多的五个蛋白（图19B）。

GAPDH是细胞内参与糖酵解途径的关键酶<sup>[19]</sup>。ACTB是细胞骨架的核心组成部分，在维护细胞形态、运动以及细胞内物质运输等多个生物学过程中发挥着关键作用<sup>[20]</sup>。HSP90AB1是热休克蛋白家族的一员，参与多种蛋白质的折叠、稳定和功能调节与细胞应激调节<sup>[21]</sup>。EEF2和EEF1A1是真核翻译延伸因子，是在翻译的延伸步骤中起核心作用，对蛋白质合成的调控至关重要。这些蛋白分别代表着代谢重编程、细胞骨架蛋白、细胞应激及蛋白质合成的调控等途径，结合功能富集和分类，COMMD3很可能通过这些途径调控三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药。

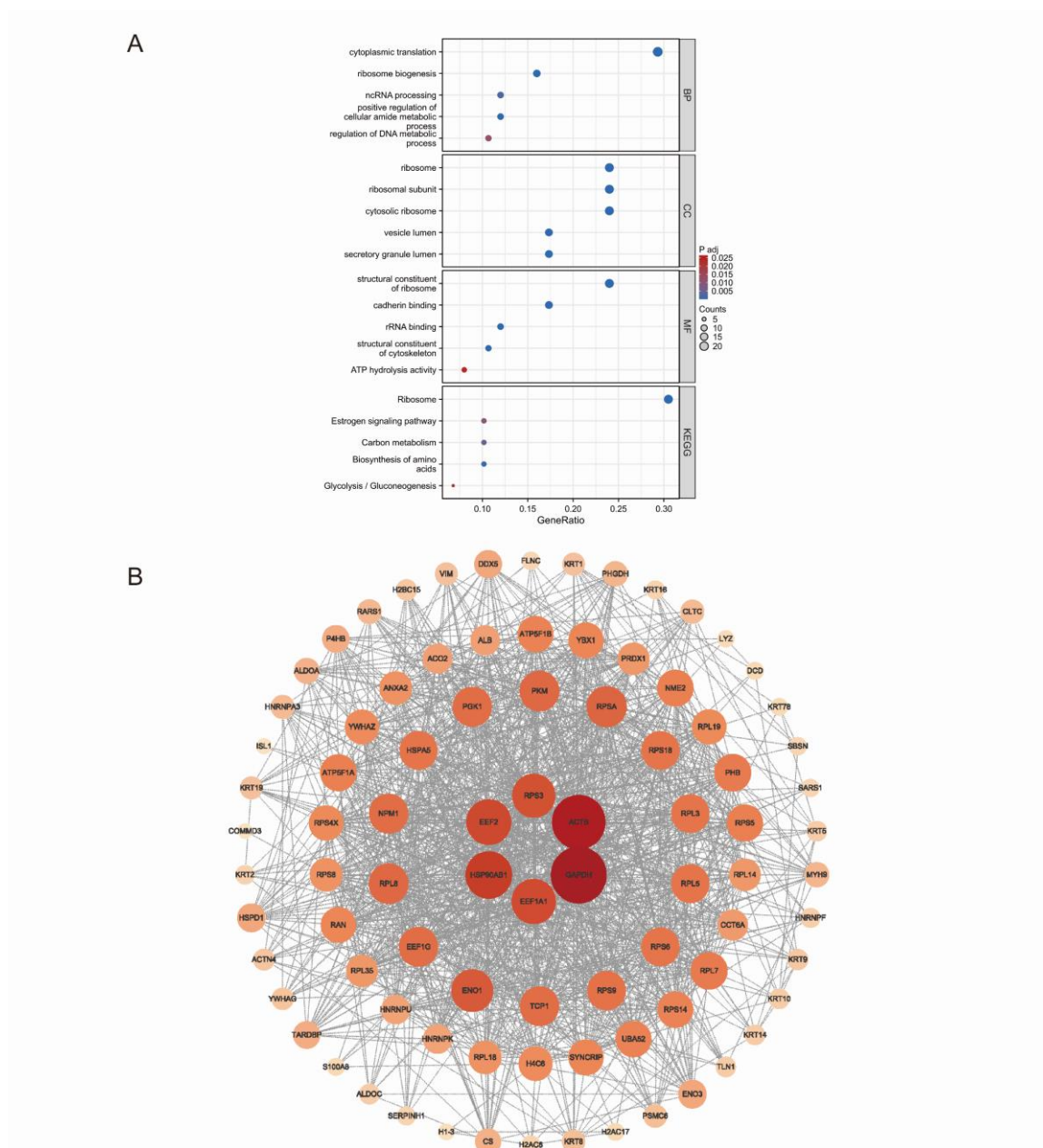


图19 COMMD3在BT-549/Doc细胞中互作蛋白的富集与PPI分析

A: COMMD3互作蛋白的GO和KEGG功能富集。B: COMMD3互作蛋白的PPI互作网络。

## 4 讨论

三阴性乳腺癌相较于其他类型乳腺癌展现出更强的侵袭性和更快的病程进展速度。由于缺乏有效的治疗靶点，仍以化学治疗作为主要治疗方案，其中多西紫杉醇药是化疗治疗常用药。然而患者常常出现原发或获得性的化疗耐药，在长期追踪研究中，约有20%-30%的患者在治疗后5年内出现复发，显著影响患者生活质量与预后<sup>[3]</sup>。因此探究理解乳腺癌患者对多西紫杉醇药化疗发生耐药的机制对乳腺癌治疗策略的制定与优化，潜在治疗方法的探索至关重要。

本研究利用生物信息学技术，从TCGA和GEO数据库中筛选出10个与三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药相关的关键基因，并建立了预后模型评估这些基因对患者预后的影响。通过对10个交集基因分别在三阴性乳腺癌中进行单基因差异基因分析，我们发现COMMD3的单基因差异基因GSEA功能富集结果显示差异基因富集在PI3K-Akt信号传导途径、MET激活PTK2信号传导、受体酪氨酸激酶信号传导、RUNX1的转录调控、WNT信号传导、DNA双链断裂应激反应等生物学过程和信号传导通路上。PI3K/AKT信号通路参与调节细胞生长、存活、代谢和细胞周期等多个关键过程，其异常激活与多种癌症的治疗耐药性密切相关<sup>[22]</sup>。MET信号通路的异常激活被认为是肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗的一种旁路机制。例如，MET扩增可通过激活非EGFR依赖性的ErbB3磷酸化，进而诱导PI3K/AKT信号通路的激活。这一过程导致EGFR-TKI（表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂）的耐药性产生。这种旁路激活为肿瘤细胞提供了一种绕过EGFR-TKI效应的耐药机制<sup>[23]</sup>。受体酪氨酸激酶是一类细胞表面受体，它们在细胞生长、分化、迁移和存活等过程中起着关键作用，其异常激活或过度表达均可导致肿瘤细胞对化疗药物的抵抗<sup>[24]</sup>。RUNX1与肿瘤化疗耐药性的直接关联已在结直肠癌中被证实：有研究揭示RUNX1通过激活Hedgehog信号通路和促进ABCG2的表达，从而促进结直肠癌的增殖和对5-氟尿嘧啶的抗性<sup>[25]</sup>。WNT信号转导在肿瘤化疗耐药中扮演重要角色，通过维持肿瘤干细胞的自我更新和多能性，调节肿瘤微环境等途径促进肿瘤的耐药，靶向抑制WNT/ $\beta$ -catenin信号通路已被证明能够增强化疗药物的敏感性<sup>[26]</sup>。DNA双链断裂是细胞中最为严重的DNA损伤类型，细胞通过非同源末端连接和同源重组来修复这种损伤，许多化疗药物通过诱导肿瘤细胞产生DNA双链断裂并阻止修复来发挥作用，肿瘤的化疗耐药与DNA双链断裂密切相关<sup>[27]</sup>。GO和KEGG功能富集结果

揭示,上调基因主要在代谢过程,细胞结构,酶活性,金属离子结合等生物学过程富集,下调基因富集在胞外基质-受体相互作用与细胞黏附分子通路,这些生物学过程与肿瘤的发生发展及化疗耐药息息相关。如代谢重编程是肿瘤化疗耐药的重要标志之一,而细胞结构的变化对肿瘤细胞的迁移和侵袭至关重要,其中细胞骨架的重组可能通过改变药物分布导致肿瘤细胞的耐药。胞外基质-受体相互作用和细胞黏附分子通路与肿瘤细胞逃避免疫监视和促进肿瘤微环境中细胞间相互作用息息相关,这些都可直接或间接的导致肿瘤细胞耐药。结合进一步文献查阅,我们认为COMMD3可能为导致三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的关键基因。

我们对COMMD3在乳腺癌各分型中进行了生存预后分析,结果显示COMMD3是三阴性乳腺癌预后不良因素,而在Luminal A型, Luminal B型, HER2阳性型乳腺癌中, COMMD3对患者的生存预后影响无统计学意义。COMMD3仅在三阴性乳腺癌中起到影响患者预后生存的作用。

在生物信息学研究结果的基础上,我们通过细胞实验进一步探索验证。首先采用药物浓度递增法构建了MDA-MB-231和BT-549细胞的多西紫杉醇耐药细胞株(分别命名为MDA-MB-231/Doc和BT-549/Doc)。耐药株相对非耐药株形态和生物学功能均发生改变。显微镜下可见耐药细胞形状更加多样,出现拉长、扁平等形状,核仁变得更加不规则与明显,细胞质中应激颗粒增多,细胞之间的联系也更加紧密。尤其是BT-549/Doc细胞,呈现出细胞集群的生长模式倾向。这些形态变化可能是对长期多西紫杉醇药物暴露的适应性反应,在耐药性的发生发展过程中,细胞会改变它们的细胞骨架,细胞黏附特征及生长行为,从而在药物暴露环境中生存下来。

通过TMT获取耐药株与非耐药株之间差异蛋白,对差异蛋白进行GSEA功能富集, GO与KEGG功能富集分析。GSEA功能富集结果显示差异蛋白富集在细胞外基质的组织和构建与氨基酸及其衍生物的代谢过程两条通路上。GO和KEGG功能富集结果显示上调蛋白主要富集在能量代谢,细胞凋亡与自噬,细胞结构与组织等生物学过程,下调蛋白主要富集在蛋白质合成与代谢,细胞外基质与细胞间相互作用,能量转换与信号传递等生物学过程。

利用实时定量PCR实验和Western Blot实验,我们比较了耐药细胞株与非耐药细胞株中COMMD3的表达水平差异。结果表明,耐药细胞株中COMMD3的表达显著高于非耐药细胞株。进一步通过免疫组织化学染色的方法检测COMMD3在对多西紫杉醇耐药和不耐药的三阴性乳腺癌患者肿瘤组织中表达情况,结果显示

COMMD3在对多西紫杉醇耐药的肿瘤组织中表达水平较不耐药患者明显升高。

在以上结果的基础上，我们对耐药细胞系进行了COMMD3基因的敲减实验，并在非耐药细胞系中过表达COMMD3基因，以进一步探讨COMMD3对多西紫杉醇耐药性的影响。实验结果显示，COMMD3的敲减能有效逆转耐药细胞对多西紫杉醇的耐药性，而在非耐药细胞中过表达COMMD3则能部分诱导非耐药细胞对多西紫杉醇的耐药性。这些实验结果明确指出，COMMD3是调控三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药性的关键因子。

P-gp的过度表达与多种类型肿瘤的化疗耐药性密切相关。紫杉醇和多西紫杉醇都是P-gp的底物，这意味着当肿瘤细胞中P-gp表达水平升高时，这些药物能够被有效地从细胞内泵出，导致药物浓度降低，从而减弱其抗肿瘤效果，最终导致化疗失败。本研究通过Western Blot实验对比了耐药细胞株与非耐药细胞株，以及敲减COMMD3基因的耐药细胞株与过表达COMMD3的非耐药细胞株中P-gp的表达水平。实验结果显示，与非耐药细胞株相比，耐药细胞株中P-gp的表达显著提高。在敲减COMMD3的耐药细胞株中，P-gp的表达水平显著下降；而在过表达COMMD3的非耐药细胞株中，P-gp的表达则明显增加。这些发现提示COMMD3可能通过调节P-gp的表达，进而影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。

为了进一步探索COMMD3调控三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性的机制，本研究通过COIP-MS技术筛选并鉴定了三阴性乳腺癌耐药细胞中与COMMD3相互作用的蛋白，并对互作蛋白进行了功能分类、功能富集与PPI互作网络分析，结合文献调研对COMMD3在三阴性乳腺癌耐药性中的作用机制进行深入分析。PPI互作网络有88个节点，1155条边，其中按照连接点数从高到底排列，排名最高的5个蛋白分别是GAPDH、ACTB、HSP90AB1、EEF2、EEF1A1。

PPI互作网络中连接点数最多的蛋白GAPDH是细胞内参与糖酵解途径的关键酶，它在细胞的能量代谢中起着重要作用。在功能富集分析及蛋白功能分类中，与代谢相关的途径及蛋白也占据了显著地位。代谢重编程，尤其是糖酵解的调整，是肿瘤耐药性形成的关键机制之一。19世纪，德国生理学家奥托·瓦博格首次揭示了肿瘤细胞的代谢特性——即使在充足氧气环境下，肿瘤细胞也偏好通过糖酵解而非线粒体氧化磷酸化来产生能量，这一现象被称为瓦博格效应<sup>[28]</sup>。随后的研究进一步深入，揭示了糖代谢重编程在肿瘤耐药中的重要作用：肿瘤细胞通过增强糖酵解能力降低对化疗药物的依赖，即使化疗药物抑制了氧化磷酸化过程，

仍能维持生存和增殖<sup>[29]</sup>。糖代谢的产物，如乳酸，可改变肿瘤微环境，促使肿瘤细胞抵御药物引起的应激，从而增强耐药性<sup>[30]</sup>。此外，糖代谢中的中间产物参与抗凋亡机制，帮助肿瘤细胞逃避化疗引发的细胞死亡<sup>[31]</sup>。针对糖代谢途径的干预已经成为克服肿瘤耐药性的新策略，例如通过抑制葡萄糖转运蛋白或糖酵解关键酶活性，降低肿瘤细胞的糖代谢水平，增强化疗药物效果<sup>[32]</sup>。同时，针对糖代谢途径的药物与传统化疗药物联用，展现出提升治疗效果的潜力<sup>[33]</sup>。基于以上观点，COMMD3可能通过与GAPDH等糖酵解路径关键酶的相互作用，参与调控三阴性乳腺癌的代谢重编程，进而影响其对多西紫杉醇的耐药性。

在PPI互作网络分析中，连接节点数量排名第二的蛋白是ACTB。作为细胞骨架的核心组成部分，ACTB在维护细胞形态、运动以及细胞内物质运输等多个生物学过程中发挥着关键作用<sup>[20]</sup>。我们的研究发现细胞骨架蛋白在COMMD3的互作蛋白中占据了重要的比例，这一点在GO功能富集分析中得到了进一步的支持，其中涉及大量与细胞骨架及细胞结构相关的功能通路。有趣的是，多西紫杉醇的靶向作用对象即为组成细胞骨架的微管，其机制在于阻断微管蛋白的聚合和解聚过程，进而抑制肿瘤细胞的有丝分裂活动。因此，细胞骨架蛋白含量的变化可直接影响微管稳定性，进一步调整细胞对药物的敏感性<sup>[34]</sup>。细胞骨架参与的信号传导通路，如Rho GTPases家族（包括Rho、Rac和Cdc42）调控的肌动蛋白丝重组过程，与肿瘤的化疗耐药性密切相关<sup>[35]</sup>。基于这些观察，COMMD3可能通过与ACTB等细胞骨架蛋白的相互作用及调控其表达，抑制微管蛋白解聚，从而影响三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇的耐药性。

PPI互作网络中连接节点数第三的HSP90AB1是热休克蛋白家族的一员，这个家族的蛋白质在细胞应对各种应激条件下起着重要作用，包括热休克、氧化应激、辐射和化学药物等<sup>[21]</sup>。互作蛋白的功能分类及功能富集分析也表明，COMMD3在BT-549/Doc细胞中的互作蛋白部分与细胞的应激反应相关。HSP90AB1是一种分子伴侣蛋白，参与多种蛋白质的折叠、稳定和功能调节<sup>[21]</sup>。在肿瘤细胞中，HSP90AB1可能帮助维持耐药相关蛋白（如多药耐药蛋白P-gp和拓扑异构酶）的活性和稳定性，从而促进耐药性的形成<sup>[36]</sup>。此外，HSP90AB1还涉及多条信号传导通路的调节，如PI3K/Akt、Ras/Raf/MEK/ERK和NF- $\kappa$ B等，这些通路在调控肿瘤细胞的生存、增殖及耐药性方面发挥核心作用<sup>[37-39]</sup>。HSP90AB1本身也被视为潜在的药物靶点，针对其的抑制剂，例如17-AAG（17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin）和Geldanamycin，已在研究中显示出克服肿瘤化疗耐药性



的潜力<sup>[40,41]</sup>。综合考虑COMMD3对三阴性乳腺癌细胞中P-gp表达调控的影响，COMMD3可能通过与HSP90AB1的相互作用，进而调节P-gp的活性与稳定性，影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。

PPI互作网络连接节点数第四和第五的蛋白是EEF2和EEF1A1，这两个蛋白是真核翻译延伸因子，是在翻译的延伸步骤中起核心作用的编码基因<sup>[42]</sup>。EEF2是翻译延伸过程中的主要驱动力，它通过结合GTP（鸟苷三磷酸）来驱动mRNA上肽链的延伸。EEF2的功能受到其磷酸化状态严格调控，EEF2激酶可磷酸化EEF2，磷酸化的EEF2（p-EEF2）活性降低，导致蛋白质合成速率减缓或暂停<sup>[43]</sup>。这种调控机制允许细胞根据当前的生理和环境条件灵活调整蛋白质合成速率，是细胞对应激反应、能量状态变化及细胞周期变化的重要方式<sup>[44]</sup>。EEF2激酶和自噬在维持耐药三阴性乳腺癌的侵袭性肿瘤行为和化疗耐药性中发挥着关键作用。沉默EEF2激酶可能是治疗三阴性乳腺癌的一种新策略<sup>[45]</sup>。EEF1A1是翻译延伸因子1（EF1）复合物的一部分，它与GTP结合并携带氨基酸到正在合成的多肽链上，其活性对于维持蛋白质合成速率和细胞蛋白质合成的平衡至关重要。EEF1A1与肿瘤发展、进展以及化疗耐药性之间存在密切关系。有研究表明，EEF1A1的过表达与肝细胞癌进展相关，并可能预示着不良的临床结果<sup>[46]</sup>。此外，EEF1A1是p53和p73促凋亡功能的负调节因子，能通过此路径抑制化疗诱导的肿瘤细胞凋亡，在肿瘤的化疗耐药中起到关键作用<sup>[47]</sup>。COMMD3可能通过与EEF2和EEF1A1等翻译延伸因子的相互作用，参与调节三阴性乳腺癌细胞对多西紫杉醇的耐药性。COMMD3与这些蛋白的互作不仅影响蛋白质合成的调控，也可能涉及到肿瘤细胞对化疗药物的反应能力，进而影响三阴性乳腺癌的治疗效果。

本研究通过生物信息学技术和细胞实验结合，证实了COMMD3在三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药中发挥关键作用，并对其作用机制进行初步探索。但本研究仍存在局限性，对COMMD3作用机制的探索较为浅显，未能通过实验对COIP-MS的结果进行进一步验证探索，也未能结合动物模型进行体内实验验证。后续我们将通过实验进一步验证COIP-MS的实验结果，并在裸鼠体内进行实验，验证COMMD3对三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药的作用及机制，进一步完善拓展课题。

## 5 结论

1. COMMD3高表达与三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药和不良预后密切相关。
2. 靶向抑制COMMD3可逆转对多西紫杉醇耐药三阴性乳腺癌的耐药性，过表达COMMD3可部分启动三阴性乳腺癌对多西紫杉醇耐药性。
3. COMMD3通过调节P-gp的表达，进而影响三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。
4. COMMD3可能通过代谢重编程、细胞骨架蛋白、细胞应激及蛋白质合成的调控等途径调节三阴性乳腺癌对多西紫杉醇的耐药性。

## 本研究创新性的自我评价

本研究首次揭示了COMMD3在三阴性乳腺癌多西紫杉醇耐药性及不良预后中的关键作用，标志着对该疾病治疗机制理解的重要进展。

通过系统的实验验证，我们发现COMMD3的高表达不仅与三阴性乳腺癌的多西紫杉醇耐药性和不良预后紧密相关，而且靶向抑制COMMD3可以有效逆转耐药性，揭示了COMMD3作为治疗靶点的潜在价值。

此外，本研究首次阐明了COMMD3通过调节P-gp的表达，进而影响药物耐药性的机制，为理解耐药性发展提供了新的视角。更重要的是，COMMD3可能通过代谢重编程、细胞骨架蛋白调控、细胞应激反应及蛋白质合成等多条途径，综合调控三阴性乳腺癌的多西紫杉醇耐药性。

这些发现不仅丰富了我们对于三阴性乳腺癌耐药机制的认识，也为开发新的治疗策略提供了理论依据和实验基础，具有重要的创新意义和临床应用前景。

## 参考文献

- [1] Bauer KR, Brown M, Cress RD, *et al.* Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry[J]. *Cancer*, 2007, 109(9): 1721-1728.
- [2] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(20): 1938-1948.
- [3] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [4] Carey LA, Dees EC, Sawyer L, *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes[J]. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2007, 13(8): 2329-2334.
- [5] Ovcarićek T, Frković SG, Matos E, *et al.* Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival[J]. *Radiology and Oncology*, 2011, 45(1): 46-52.
- [6] Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer[J]. *The Oncologist*, 2016, 21(9): 1050-1062.
- [7] Healy MD, Hospenthal MK, Hall RJ, *et al.* Structural insights into the architecture and membrane interactions of the conserved COMMD proteins[J]. *eLife*, 2018, 7: e35898.
- [8] You G, Zhou C, Wang L, *et al.* COMMD proteins function and their regulating roles in tumors [J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1067234.
- [9] Mao X, Gluck N, Chen B, *et al.* COMMD1 (copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1) regulates Cullin RING ligases by preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated protein 1) binding[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(37): 32355-32365.
- [10] Burstain E, Hoberg JE, Wilkinson AS, *et al.* COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(23): 22222-22232.
- [11] Liu YF, Swart M, Ke Y, *et al.* Functional interaction of COMMD3 and COMMD9 with the epithelial sodium channel[J]. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2013, 305(1): F80

- 89.
- [12] Umbreen S, Banday MM, Jamroze A, *et al.* COMMD3:BMI1 Fusion and COMMD3 Protein Regulate C-MYC Transcription: Novel Therapeutic Target for Metastatic Prostate Cancer[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2019, 18(11): 2111-2123.
- [13] Hancock JL, Kalimutho M, Straube J, *et al.* COMMD3 loss drives invasive breast cancer growth by modulating copper homeostasis[J]. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 2023, 42(1): 90.
- [14] Wang S, Liu Y, Li S, *et al.* COMMD3-Mediated Endosomal Trafficking of HER2 Inhibits the Progression of Ovarian Carcinoma[J]. *Molecular cancer research: MCR*, 2023, 21(3): 199-213.
- [15] Cheng W, Cheng Z, Zhang C, *et al.* Investigating the Association between COMMD3 Expression and the Prognosis of Hepatocellular Carcinoma[J]. *Journal of Cancer*, 2022, 13(6): 1871-1881.
- [16] Wang X, He S, Zheng X, *et al.* Transcriptional analysis of the expression, prognostic value and immune infiltration activities of the COMMD protein family in hepatocellular carcinoma[J]. *BMJ C cancer*, 2021, 21(1): 1001.
- [17] Tian Y, Lei Y, Wang Y, *et al.* Mechanism of multidrug resistance to chemotherapy mediated by P-glycoprotein (Review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2023, 63(5): 119.
- [18] Waghray D, Zhang Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(12): 5108-5121.
- [19] Du D, Liu C, Qin M, *et al.* Metabolic dysregulation and emerging therapeutic targets for hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 2022, 12(2): 558-580.
- [20] Dugina VB, Shagieva GS, Shakhov AS, *et al.* The Cytoplasmic Actins in the Regulation of Endothelial Cell Function[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 7836.
- [21] Haase M, Fitze G. HSP90AB1: Helping the good and the bad[J]. *Gene*, 2016, 575(2 Pt 1): 171-186.
- [22] Shan KS, Bonano-Rios A, Theik NWY, 等. Molecular Targeting of the Phosphoinositide-3-Protein Kinase (PI3K) Pathway across Various Cancers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(4): 1973.
- [23] Spitaleri G, Trillo Aliaga P, Attili I, 等. MET in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Cross “a Long and Winding Road” Looking for a Target[J]. *Cancers*, 2023, 15(19): 4779.
- [24] 张义朋, 黄华艳, 仰映婕, 等. 受体酪氨酸激酶AXL在肿瘤耐药中的作用研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(7): 819-824.

- [25] Li Q, Lai Q, He C, *et al.* RUNX1 regulates the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer through the Hedgehog signaling pathway[J]. *Journal of Cancer*, 2021, 12(21): 6363-6371.
- [26] Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer[J]. *Nature Reviews. Cancer*, 2021, 21(1): 5-21.
- [27] Andrade D, Mehta M, Griffith J, *et al.* YAP1 inhibition radiosensitizes triple negative breast cancer cells by targeting the DNA damage response and cell survival pathways.[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(58): 98495-98508.
- [28] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science (New York, N.Y.)*, 1956, 123(3191): 309-314.
- [29] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [30] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism[J]. *Cancer Letters*, 2015, 356(2 Pt A): 156-164.
- [31] Ganapathy-Kanniappan S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer: current insights into the classic metabolic phenotype[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 53(6): 667-682.
- [32] Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, *et al.* A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25677-25695.
- [33] 陈思禹, 王钰琦. 糖代谢与肿瘤化疗靶向药物耐药关系研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2018, 29(2): 295-298.
- [34] Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton [J]. *Trends in Cell Biology*, 2018, 28(10): 776-792.
- [35] Barreno A, Orgaz JL. Cytoskeletal Remodelling as an Achilles' Heel for Therapy Resistance in Melanoma[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 518.
- [36] Kumar P, Devaki B, Jonnala UK, *et al.* Hsp90 facilitates acquired drug resistance of tumor cells through cholesterol modulation however independent of tumor progression[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2020, 1867(8): 118728.
- [37] Giulino-Roth L, van Besien HJ, Dalton T, *et al.* Inhibition of Hsp90 Suppresses PI3K/AKT/mTOR Signaling and Has Antitumor Activity in Burkitt Lymphoma[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2017, 16(9): 1779-1790.
- [38] Dou F, Yuan LD, Zhu JJ. Heat shock protein 90 indirectly regulates ERK activity by affecting R

- af protein metabolism[J]. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2005, 37(7): 501-505.
- [39] Bai L, Xu S, Chen W, *et al.* Blocking NF- $\kappa$ B and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death[J]. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 2011, 16(1): 45-54.
- [40] Talaei S, Mellatyar H, Asadi A, *et al.* Spotlight on 17-AAG as an Hsp90 inhibitor for molecular targeted cancer treatment[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2019, 93(5): 760-786.
- [41] Gooljarsingh LT, Fernandes C, Yan K, *et al.* A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: Slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(20): 7625-7630.
- [42] Cristiano L. The pseudogenes of eukaryotic translation elongation factors (EEFs): Role in cancer and other human diseases[J]. *Genes & Diseases*, 2022, 9(4): 941-958.
- [43] Hizli AA, Chi Y, Swanger J, *et al.* Phosphorylation of Eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF2) by Cyclin A–Cyclin-Dependent Kinase 2 Regulates Its Inhibition by eEF2 Kinase[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, 33(3): 596-604.
- [44] Kaul G, Pattan G, Rafeequi T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2011, 29(3): 227-234.
- [45] Wang RX, Xu XE, Huang L, *et al.* eEF2 kinase mediated autophagy as a potential therapeutic target for paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2019, 7(23): 783.
- [46] Chen SL, Lu SX, Liu LL, *et al.* eEF1A1 Overexpression Enhances Tumor Progression and Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Translational Oncology*, 2017, 11(1): 125-131.
- [47] Blanch A, Robinson F, Watson IR, *et al.* Eukaryotic translation elongation factor 1- $\alpha$  1 inhibits p53 and p73 dependent apoptosis and chemotherapy sensitivity[J]. *PloS One*, 2013, 8(6): e66436.

## 综述

### 乳腺癌化疗耐药机制研究：现状与挑战

乳腺癌是全球女性癌症相关死亡的主要原因，化疗是乳腺癌的重要治疗手段之一。尽管如今其在乳腺癌的治疗中已趋于成熟，取得重大进展，但耐药的出现仍然是乳腺癌患者预后不良的主要原因之一。探究理解乳腺癌患者对化疗发生耐药的机制对乳腺癌治疗策略的制定与优化，潜在治疗方法的探索至关重要。我们总结了对乳腺癌化疗耐药机制研究的最新进展，并讨论了它们对改善乳腺癌患者预后的治疗潜力，旨在改善乳腺癌患者在治疗中出现的耐药，提高治疗效果。

#### 1. 背景

乳腺癌作为一种源自乳房上皮细胞的恶性肿瘤，其发病率呈逐年上升的趋势，成为女性最为常见的癌症之一<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织统计数据显示，乳腺癌已成为全球女性恶性肿瘤的首要致死因素之一<sup>[2]</sup>。

化疗作为乳腺癌治疗的主要手段之一，其药物介入机制旨在扰乱癌细胞的生物学活性，抑制其生长与增殖。化疗药物通过干预癌细胞的DNA合成与修复过程，导致DNA的异常积累，最终促使癌细胞凋亡<sup>[3]</sup>。化疗药物还涉及细胞周期的调控：使癌细胞周期阻滞于特定阶段，以抑制其不受控制的增殖<sup>[4]</sup>。除此之外，化疗亦可通过接入癌细胞信号传导途径，干扰其生存和增殖信号转导，实现对癌细胞的有效抑制。

尽管化疗在乳腺癌治疗中取得了显著成就，但乳腺癌对化疗产生的耐药逐渐成为制约治疗效果的主要因素之一。探究理解乳腺癌患者发生耐药的机制对乳腺癌治疗策略的制定与优化，潜在治疗方法的探索至关重要。本综述总结了对乳腺癌化疗耐药机制研究的最新进展，并讨论了它们对改善乳腺癌患者预后的治疗潜力。

#### 2. 乳腺癌化疗耐药机制

##### 2.1 基因突变与耐药

基因突变是导致乳腺癌化疗耐药性的重要因素之一。一些基因突变会使乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性发生变化，这些关键基因的突变会导致药物靶点的结构或功能异常，从而减弱相应化疗药物的作用效果。例如，人体内最重要的抑癌



基因之一*TP53*，其编码的蛋白p53是细胞周期调控的关键基因，并在诱导细胞凋亡和细胞代谢等过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。*TP53*基因突变可以导致乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性降低<sup>[6]</sup>。而*BRCA1*和*BRCA2*基因突变是乳腺癌中常见的遗传突变，这些突变会影响到DNA修复机制，使得癌细胞在接受化疗药物时表现出更高的敏感性<sup>[7]</sup>。

此外，一些耐药相关基因的研究也为我们理解乳腺癌化疗耐药性提供了重要线索。研究表明，某些基因的异常表达会导致癌细胞对化疗药物产生耐药性<sup>[8]</sup>。*ABCB1*基因编码P-糖蛋白，P-糖蛋白是一种ATP结合盒转运蛋白，通过泵出化疗药物并减少其细胞内浓度，促进多药耐药的发生。迄今为止，在包括乳腺癌在内的各种类型的化疗耐药癌症中都检测到了P-糖蛋白的过表达<sup>[9]</sup>。由*ATP7A*和*ATP7B*编码的铜外排转运蛋白在铂类耐药中起着重要作用。在多种癌症中观察到*ATP7A*和*ATP7B*的过表达。此外，它们的表达与铂类化疗的癌症预后和治疗结果有关<sup>[10]</sup>。*ERCC1*基因编码的蛋白是参与核苷酸切除修复途径的重要蛋白。核苷酸切除修复是一种多功能的DNA修复系统，针对广泛的螺旋扭曲DNA损伤。*ERCC1*的过表达能够加快DNA的修复速度，肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性<sup>[11]</sup>。

近年来，随着基因组学和生物信息学技术的迅速发展，越来越多的乳腺癌耐药相关基因被鉴定出来，为乳腺癌治疗的个体化提供了强有力的支持。通过针对特定基因的治疗策略，可以在一定程度上提高化疗药物对乳腺癌的疗效，为患者提供更加精准有效的治疗方案。

## 2.2 肿瘤干细胞与耐药

肿瘤干细胞是指在肿瘤中存在的一小部分细胞，具有干细胞的特性，包括自我更新和分化的能力<sup>[12]</sup>。一些标准的化疗药物通常有效于杀死大多数快速分裂的癌细胞，然而肿瘤干细胞往往处于静止状态或慢速增长，这使得它们能够对化疗药物抵抗<sup>[13]</sup>。并且，研究还发现CSCs具有更强的DNA修复能力，以及更高的抗凋亡能力，这也可能导致它们对化疗药物产生耐药<sup>[14]</sup>。此外，肿瘤干细胞与肿瘤微环境的组成部分（如血管和免疫细胞）以及各种细胞因子相互作用，并受到多种信号通路的调节，从而促进各种癌症的耐药性<sup>[15]</sup>。

有研究表明，传统放化疗可有效减小乳腺癌的肿瘤体积，但转移能力强的CSCs却能存活<sup>[16]</sup>。骨髓间充质干细胞可减弱顺铂对三阴性乳腺癌的治疗效果<sup>[17]</sup>。miR-1275的降低可通过靶向midkine/AKT轴提高肿瘤干细胞的特性，从而促进乳腺癌化疗耐药<sup>[18]</sup>。据报道，在三阴性乳腺癌中，细胞髓母细胞瘤原癌基因*c-Myc*和髓细胞

白血病-1 *MCL-1*协同维持肿瘤干细胞耐药，增加线粒体氧化磷酸化和活性氧的产生，从而促进缺氧诱导因子1 *HIF1*的积累，增加肿瘤干细胞的数量<sup>[19]</sup>。

各种信号通路促进了CSCs的自我更新、增殖和分化，导致远处转移和药物耐药性<sup>[20]</sup>。RNA的失调处理可以促进药物耐药基因的恶性转化，包括RNA结合蛋白、甲基化和失控的剪接<sup>[21]</sup>。核心组蛋白大H2A.1的敲除被报道能触发获得类似CSCs的特征，促使药物耐药性，提高对缺氧的反应，并通过核因子 $\kappa$ B p65的Ser536磷酸化来增加糖酵解<sup>[22]</sup>。

## 2.3 肿瘤微环境与耐药

近年来，越来越多的研究显示，肿瘤微环境在乳腺癌化疗耐药中扮演着重要的角色。肿瘤微环境是由癌细胞、细胞外基质、血管、免疫细胞以及各种细胞分泌的各种生物活性因子构成的。这个“生态系统”通过细胞、细胞因子、药物等之间的相互作用，参与了癌症的发生、发展以及对治疗的反应<sup>[23]</sup>。

首先，肿瘤微环境对化疗药物的输送和代谢起到了重要作用。血管生成是肿瘤生长和扩散的关键过程，而新生血管的异常结构会导致药物在肿瘤内的分布不均匀，从而影响其疗效。有报道表明通过阻断肿瘤微循环中的TGF- $\beta$ 信号可以改变肿瘤血管，从而提高化疗药物的有效性<sup>[24]</sup>。此外，肿瘤微环境中的一些细胞，如肿瘤相关巨噬细胞和成纤维细胞，具有特定的药物代谢能力，它们可能通过代谢或分解化疗药物而影响其浓度和活性<sup>[25]</sup>。其次，肿瘤微环境对肿瘤细胞的免疫应答和耐药性也起到了重要影响。肿瘤免疫耐受是指肿瘤细胞能够逃避免疫系统的攻击，其中肿瘤微环境中的免疫抑制因子扮演了重要角色<sup>[26]</sup>。此外，肿瘤微环境中的炎症因子和细胞因子也可以影响免疫细胞的活性，从而影响对化疗的应答<sup>[27]</sup>。例如，有研究发现巨噬细胞和蛋白酶可以降低乳腺癌对化疗的反应<sup>[28]</sup>。此外，肿瘤微环境还可以通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭能力来影响化疗敏感性。一些细胞因子和生长因子可以通过激活特定的信号通路来促进肿瘤细胞的增殖，从而减弱了化疗药物的作用。例如，有研究揭示雌激素受体阳性乳腺癌细胞已被证明会分泌血小板源性生长因子（PDGF-CC），它与成纤维细胞活化因子（CAFs）中的血小板源性生长因子受体（PDGFR）结合，导致肝细胞生长因子（HGF）、胰岛素样生长因子结合蛋白3（IGFBP3）和甲状腺钙化蛋白1（STC1）的表达增加，这些因子对肿瘤细胞的内分泌治疗耐药性负有责任。而靶向抑制PDGF-CC可以恢复肿瘤细胞对内分泌治疗的敏感性<sup>[29]</sup>。同时，肿瘤微环境中的基质成分也可以提供支持，使得肿瘤细胞更具侵袭性<sup>[30]</sup>。

## 2.4 DNA 修复机制与耐药

DNA修复是细胞内部的一个重要过程，它保证了DNA分子的完整性和稳定性<sup>[31]</sup>。在乳腺癌治疗中，化疗药物通过干预癌细胞的DNA合成与修复过程，导致DNA的异常积累，最终促使癌细胞凋亡。然而，许多癌细胞会通过活化DNA修复机制来抵御化疗药物的作用，从而产生耐药性。

核苷酸修复是一种常见的DNA修复机制，它包括碱基切除修复和核苷酸交换修复等<sup>[32]</sup>。许多乳腺癌细胞会通过增强这些修复通路的活性，迅速修复化疗药物引起的DNA损伤，从而减少了药物的疗效。研究发现一些蛋白质如PARP1（聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1）在碱基切除修复过程中发挥了重要作用。PARP1在DNA修复中起到辅助的作用，其高表达会使得细胞对化疗药物具有更强的耐药性<sup>[33]</sup>。在一些乳腺癌研究中发现，核苷酸交换修复系统中的一些关键蛋白如XPD的异常表达或突变会导致乳腺癌细胞对化疗药物的抵抗性增强<sup>[34]</sup>。同源重组修复是另一个重要的DNA修复机制，它在DNA双链断裂修复中发挥关键作用，其异常活化或过度活化会使得细胞对化疗药物如顺铂等产生耐药性<sup>[35]</sup>。BRCA1和BRCA2是同源重组修复过程中的关键蛋白，它们的突变或缺失与乳腺癌的发生密切相关，并且会导致细胞对化疗药物的耐药<sup>[36]</sup>。非同源末端连接是另一种参与DNA修复的机制。在非同源末端连接通路中，DNA双链断裂会被直接连接起来，而不需要同源模板。有研究显示通过增强非同源末端连接（NHEJ）通路的活性，相邻的正常肺成纤维细胞有效地修复了被微束定向照射的肺癌细胞的DNA损伤，从而降低了化疗药物的疗效<sup>[37]</sup>。此外，还有其他一些DNA修复机制，如错配修复等，也可能参与了乳腺癌的化疗耐药过程。

## 3. 分子靶向治疗与化疗耐药

化疗是乳腺癌主要治疗手段之一，但随着治疗的进行，一些乳腺癌患者会出现对化疗药物的耐药，这成为临床治疗中的一个严重问题。分子靶向治疗作为近年来发展迅速的一种治疗策略，对于克服乳腺癌化疗耐药有着重要意义。

分子靶向治疗通过干预特定的信号通路或靶点，针对乳腺癌细胞的特异性变异或异常表达，以达到抑制癌细胞生长和扩散的目的<sup>[38]</sup>。例如，HER2受体是一种酪氨酸激酶受体，在某些乳腺癌患者中出现异常扩增或过表达，从而促进了癌细胞的增殖。通过使用HER2抑制剂如曲妥珠单抗等，可以显著抑制HER2阳性乳腺癌的生长，提高治疗效果<sup>[39]</sup>。分子靶向治疗还可以干扰乳腺癌细胞内部的信号传导网络，从而影响细胞的生存和增殖能力。例如，CDK4/6抑制剂如帕博利珠可以

抑制细胞周期的进程，从而抑制乳腺癌细胞的增殖<sup>[40]</sup>。此外，PARP抑制剂如奥拉帕尼布可以干扰DNA修复机制，针对乳腺癌中BRCA等基因的缺陷，使得癌细胞无法有效修复DNA损伤，从而导致细胞凋亡<sup>[40]</sup>。

然而，尽管分子靶向治疗在一定程度上提高了乳腺癌的治疗效果，但化疗耐药问题依然存在。一些研究表明，乳腺癌细胞可能会通过多种途径来逐渐产生对分子靶向药物的耐药性，包括信号通路的变异、分子靶点的突变等<sup>[41]</sup>。因此，研究人员正在努力寻找新的分子靶向治疗策略，以应对化疗耐药的挑战。

#### 4. 展望与前景

乳腺癌的化疗耐药问题在临床治疗中一直备受关注。然而，随着分子生物学、细胞生物学等领域的不断深入研究，对于乳腺癌化疗耐药机制的认识也取得了显著进展。基于乳腺癌分子亚型的精准治疗将成为未来的研究重点，通过针对特定的分子靶点，提高治疗的精准性，从而有效避免或延缓耐药的产生。基因编辑技术的广泛应用也将为克服乳腺癌化疗耐药提供新的策略。通过精确地编辑与耐药相关的基因，干预相关的信号通路，可以有效地削弱癌细胞对化疗药物的耐药性，提高治疗效果。此外，免疫治疗作为近年来备受关注的治疗策略，也在乳腺癌化疗耐药研究中展现出了积极的前景。通过激活免疫系统，提升患者自身的抗癌能力，可以显著提高对化疗药物的敏感性，为克服耐药问题提供新的可能性。

尽管如此，目前针对乳腺癌化疗耐药的研究主要集中在细胞水平和动物模型层面，缺乏足够的临床病例验证，研究成果的转化应用仍需进一步探索，在临床应用方面仍面临巨大挑战。未来应将加强基础研究与临床实践的结合，推动乳腺癌治疗策略的不断优化，为患者提供更加有效的治疗方案，提高其生存质量。

#### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A cancer journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. International Journal of Cancer, 2019, 144(8): 1941–1953.
- [3] Kandalai S, Li H, Zhang N, *et al.* The human microbiome and cancer: a diagnostic and therapeutic

- tic perspective[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2023, 24(1): 2240084.
- [4] Maleki EH, Bahrami AR, Matin MM. Cancer cell cycle heterogeneity as a critical determinant of therapeutic resistance[J]. *Genes & Diseases*, 2024, 11(1): 189–204.
- [5] 周建林. 癌症中p53失活的分子机制和靶向p53的抗癌药物研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(3): 189–196.
- [6] Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, *et al.* p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy[J]. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 2013, 22 Suppl 2: S27-29.
- [7] Zattarin E, Taglialatela I, Lobefaro R, *et al.* Breast cancers arising in subjects with germline BRCA1 or BRCA2 mutations: Different biological and clinical entities with potentially diverse therapeutic opportunities[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2023, 190: 104109.
- [8] 吴佩阳, 李力. 卵巢上皮性癌多药耐药相关信号通路及靶向药物治疗的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(7): 551–555.
- [9] Tian Y, Lei Y, Wang Y, *et al.* Mechanism of multidrug resistance to chemotherapy mediated by P-glycoprotein (Review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2023, 63(5): 119.
- [10] Arnesano F, Natile G. Interference between copper transport systems and platinum drugs[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2021, 76: 173–188.
- [11] Duan M, Ulibarri J, Liu KJ, *et al.* Role of Nucleotide Excision Repair in Cisplatin Resistance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9248.
- [12] 李星霓. 肿瘤干细胞的研究进展及靶向治疗[J]. *内蒙古医学杂志*, 2022, 54(6): 707–709.
- [13] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, *et al.* Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 780–783.
- [14] Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine[J]. *Nanomedicine (London, England)*, 2012, 7(4): 597–615.
- [15] Gao Q, Zhan Y, Sun L, *et al.* Cancer Stem Cells and the Tumor Microenvironment in Tumor Drug Resistance[J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2023, 19(7): 2141–2154.
- [16] Boodram JN, McGregor IJ, Bruno PM, *et al.* Breast Cancer Stem Cell Potent Copper(II)-Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Complexes[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2016, 55(8): 2845–2850.
- [17] Sarnella A, Ferrara Y, Albanese S, *et al.* Inhibition of Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell-Induced Carbonic Anhydrase IX Potentiates Chemotherapy Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer Cells[J]. *Cells*, 2023, 12(2): 298.

- [18] Han X, Li M, Xu J, *et al.* miR-1275 targets MDK/AKT signaling to inhibit breast cancer chemo resistance by lessening the properties of cancer stem cells[J]. International Journal of Biological Sciences, 2023, 19(1): 89–103.
- [19] Lee K-M, Giltane JM, Balko JM, *et al.* MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation[J]. Cell Metabolism, 2017, 26(4): 633–647.e7.
- [20] Pützer BM, Solanki M, Herchenröder O. Advances in cancer stem cell targeting: How to strike the evil at its root[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017, 120: 89–107.
- [21] Jiang Q, Crews LA, Holm F, *et al.* RNA editing-dependent epitranscriptome diversity in cancer stem cells[J]. Nature Reviews. Cancer, 2017, 17(6): 381–392.
- [22] Lo Re O, Fusilli C, Rappa F, *et al.* Induction of cancer cell stemness by depletion of macrohistone H2A1 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology (Baltimore, Md.), 2018, 67(2): 636–650.
- [23] M B, Ew R, K K, *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. Nature Medicine, 2018, 24(5).
- [24] Liu J, Liao S, Diop-Frimpong B, *et al.* TGF- $\beta$  blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(41): 16618–16623.
- [25] Housman G, Byler S, Heerboth S, *et al.* Drug resistance in cancer: an overview[J]. Cancers, 2014, 6(3): 1769–1792.
- [26] 刘鑫男, 李丹, 李斌. 免疫微环境介导的肿瘤耐受机制及其靶向治疗[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(S1): 2281–2290.
- [27] Yuan J, Yang L, Li Z, *et al.* The role of the tumor microenvironment in endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer[J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 14: 1261283.
- [28] Shree T, Olson OC, Elie BT, *et al.* Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer[J]. Genes & Development, 2011, 25(23): 2465–2479.
- [29] Roswall P, Bocci M, Bartoschek M, *et al.* Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling[J]. Nature Medicine, 2018, 24(4): 463–473.
- [30] Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, *et al.* Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways[J]. Cell, 2014, 159(3): 499–513.

- [31] 王菲尔, 杨绎煊, 莫日根. RNA聚合酶监视的DNA修复机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(11): 1260–1272.
- [32] 王重娟, 梁月琴, 金醒昉. DNA损伤修复、TP53、ABCB1基因单核苷酸多态性与NSCLC铂类药物疗效关系的研究进展[J]. 山东医药, 2021, 61(3): 85–90.
- [33] Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic[J]. Science (New York, N.Y.), 2017, 355(6330): 1152–1158.
- [34] Jiang Z, Li C, Xu Y, *et al.* Associations between XPD polymorphisms and risk of breast cancer: a meta-analysis[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2010, 123(1): 203–212.
- [35] O’Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics [J]. Nature Reviews. Genetics, 2006, 7(1): 45–54.
- [36] D’Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance[J]. DNA Repair, 2018, 71: 172–176.
- [37] Kobayashi A, Tengku Ahmad TAF, Autsavapromporn N, *et al.* Enhanced DNA double-strand break repair of microbeam targeted A549 lung carcinoma cells by adjacent WI38 normal lung fibroblast cells via bi-directional signaling[J]. Mutation Research, 2017, 803–805: 1–8.
- [38] 李彬, 张桂芳. 晚期三阴性乳腺癌诊疗进展及未来治疗方向[J]. 河南医学研究, 2023, 32(19): 3636–3644.
- [39] Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3[J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(7): 463–475.
- [40] Robson M, Im S-A, Senkus E, *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation[J]. The New England Journal of Medicine, 2017, 377(6): 523–533.
- [41] Fu X, Li P, Zhou Q, *et al.* Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies[J]. Genes & Diseases, 2024, 11(1): 306–320.