

亚硒酸钠对乳腺癌阿霉素耐药MCF-7/ADR细胞生物学行为的影响

郑瑶¹, 付明霞², 王蔚琛¹, 陈微微³, 韩宇晨¹, 白玉¹, 安佳佳¹

(1. 滨州医学院附属医院检验科, 山东 滨州 256603; 2. 山东省滨州市人民医院病理科, 山东 滨州 256603; 3. 滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东 滨州 256603)

[摘要] **目的:** 探讨亚硒酸钠(SS)对乳腺癌阿霉素耐药细胞MCF-7/ADR增殖、迁移、凋亡和肿瘤干性的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 乳腺癌阿霉素耐药MCF-7/ADR细胞经不同浓度(0、5、10、20、40和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) SS处理48 h后, 采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)法检测各组细胞增殖活性, 确定后续实验的用药浓度。将MCF-7/ADR细胞分为对照组(0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS)、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组, 培养24、48和72 h后, 采用CCK-8法检测各组细胞增殖活性, 克隆形成实验检测各组细胞克隆形成数, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 细胞划痕实验和Transwell小室实验检测各组细胞划痕愈合率及细胞迁移数, 干细胞成球实验检测各组细胞的球体形成数, Western blotting法检测各组细胞中ATP结合盒转运蛋白B亚家族成员1(ABCB1)、微管相关蛋白轻链3-II(LC3-II)和p62蛋白表达水平。**结果:** 与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组比较, 培养48和72 h时, 5、10、20及40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞增殖活性均明显降低($P<0.01$)。与0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组比较, 10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞克隆形成数均明显减少($P<0.01$)。与对照组比较, 5、10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞凋亡率无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞划痕愈合率均明显降低($P<0.01$), 5、10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组迁移细胞数均明显降低($P<0.01$)。培养14 d后, 与对照组比较, 5、10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞中球体形成数均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组比较, 5、10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞中ABCB1及p62蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS组细胞中LC3-II蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论:** SS可抑制MCF-7/ADR细胞增殖、迁移和成球能力, 诱导细胞自噬, 下调ABCB1蛋白表达水平。

[关键词] 亚硒酸钠; 耐药性; 乳腺肿瘤; 自噬; 阿霉素; 细胞增殖

[中图分类号] R73-3; R737.9 **[文献标志码]** A

Effect of sodium selenite on biological behaviors of breast cancer doxorubicin-resistant MCF-7/ADR cells

ZHENG Yao¹, FU Mingxia², WANG Weichen¹, CHEN Weiwei³, HAN Yuchen¹, BAI Yu¹, AN Jiajia¹

(1. Department of Laboratory, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China;

[收稿日期] 2025-04-20

[录用日期] 2025-06-12

[基金项目] 山东省科技厅自然科学基金资助项目(ZR2022QH192); 山东省卫健委医药卫生科技发展计划项目(202403020449, 2019WS0321, 202302080488); 山东省滨州市卫健委临床重点专科建设资助项目(BZSLCZDZK-08)

[作者简介] 郑瑶(2000—), 女, 陕西省榆林市人, 在读硕士研究生, 主要从事亚硒酸钠抗肿瘤方面的研究。

[通信作者] 白玉, 副主任技师(E-mail: xue_yubai@126.com);

安佳佳, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: jiajiabest_007@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

2. Department of Pathology, People's Hospital, Binzhou City, Shandong Province, Binzhou 256603, China;

3. Medical Research Center, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of sodium selenite (SS) on the proliferation, migration, apoptosis, and tumor stemness of breast cancer doxorubicin-resistant MCF-7/ADR cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** After the breast cancer doxorubicin-resistant MCF-7/ADR cells were treated with various concentrations (0, 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of sodium selenite (SS) for 48 h, cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups and the drug concentration for the subsequent experiments was determined. The MCF-7/ADR cells were divided into control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS), 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group. After cultured for 24, 48, and 72 h, CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; colony formation assay was used to detect the numbers of colony formation of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; wound healing assay and Transwell chamber assay were used to detect the wound healing rates and the numbers of migration cells in various groups; sphere formation assay was used to detect the numbers of sphere formation in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of ATP-binding cassette transporter B subfamily member 1 (ABCB1), microtubule-associated protein 1 light chain 3- II (LC3- II), and p62 proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group, after cultured for 48 and 72 h, the proliferation activities of the MCF-7/ADR cells in 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group, the numbers of clone formation cells in 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with control group, the apoptotic rates of the cells in 5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups showed no significant difference ($P>0.05$). Compared with control group, the wound healing rates of the cells in 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.01$), and the numbers of migration cells in 5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.01$). After 14 d of culture, compared with control group, the numbers of spheroid formation in the cells in 5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with control group, the expression levels of ABCB1 and p62 proteins in the cells in 5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the expression levels of LC3- II protein in the cells in 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS groups were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** SS can inhibit the proliferation, migration, and sphere formation ability of the MCF-7/ADR cells, induce cell autophagy, and down-regulate the expression level of ABCB1 protein.

KEYWORDS Sodium selenite; Drug resistance; Breast neoplasm; Autophagy; Doxorubicin; Cell proliferation

2022 年统计数据^[1]显示: 全球癌症新发病例约 2 000 万例, 其中女性乳腺癌新发病例约 230.89 万例, 占比 11.6%, 位居第 2 名。阿霉素是治疗乳腺癌的常用标准化疗药物之一, 然而长期化疗往往导致肿瘤产生多药耐药 (multidrug resistance, MDR), 致使药效降低和疾病复发。研究^[2]显示超过 90% 的化疗相关死亡与 MDR 有关联。因此, 逆转乳腺癌阿霉素耐药成为提高乳腺癌患者生存率的关键, 阐明其分子机制具有重要临床意义。

硒是人体必需的微量元素, 亚硒酸钠 (sodium selenite, SS) 作为常见的无机硒营养补充剂, 在适宜剂量下具有预防癌症、保护心血管和增强免疫功能等作用。研究^[3-8]表明: SS 具有明显抗肿瘤活性, 可激活多种信号通路诱导肺癌、肾细胞癌、胰腺癌和乳腺癌等多种肿瘤细胞凋亡。此外, SS 还被证实可增强肺癌、卵巢癌和白血病等耐药细胞对化疗药物的敏感性^[3, 9-10]。然而 SS 在改善乳腺癌耐药方面的作用机制尚不明确。因此, 本研究探讨 SS 对乳腺癌耐药细胞化疗敏感性的影响及其

分子机制, 以期SS作为乳腺癌的潜在治疗药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 乳腺癌阿霉素耐药MCF-7/ADR细胞购自浙江美森细胞科技有限公司。SS购自美国Sigma公司, 阿霉素购自美国TargetMol Chemicals Inc公司, MCF-7细胞专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂购自美国MedChemExpress公司, 兔抗人三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合盒转运蛋白B亚家族成员1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCB1) 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 微管相关蛋白轻链3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II) 和p62抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。多功能酶标仪 (型号: Biotek Synergy H1) 购自美国BioTek公司, 凝胶成像系统 (型号: ChemiDocXRS+) 购自美国Bio-Rad Laboratories公司。

1.2 细胞培养和传代 将MCF-7/ADR细胞培养于专用培养基中, 置于5% CO₂、37℃培养, 显微镜下观察生长情况, 当细胞生长达到80%~90%时, 加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗, 0.25%胰酶消化, 按照1:3比例进行传代。

1.3 CCK-8法检测各组细胞增殖活性 将消化后的MCF-7/ADR细胞接种至含100 μL培养基的96孔细胞培养板中, 细胞密度为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 37℃培养过夜。每组设3个复孔, 分别加入0、5、10、20和40 μmol·L⁻¹ SS培养48 h后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液孵育2 h。采用酶标仪于450 nm波长处测定每孔吸光度 (A) 值, 以0 μmol·L⁻¹ SS为对照组, 计算各组细胞增殖活性。细胞增殖活性 = (实验组A值 - 空白孔A值) / (对照组A值 - 空白孔A值)。确定后续实验SS浓度为0、5、10和20 μmol·L⁻¹, 将MCF-7/ADR细胞分为对照组 (0 μmol·L⁻¹ SS)、5 μmol·L⁻¹ SS组、10 μmol·L⁻¹ SS组和20 μmol·L⁻¹ SS组。

1.4 克隆形成实验检测各组细胞克隆形成数 收集完全消化后的各组细胞, 1 000 r·min⁻¹ 离心

5 min, 弃上清, 取20 μL细胞悬液, 与1×台盼蓝1:1混合后, 移液枪反复吹打混匀, 采用细胞计数仪进行计数, 将细胞稀释至 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 加入12孔细胞培养板, 每孔700个细胞, 每组设置3个复孔。将12孔细胞培养板放入培养箱中培养2周, PBS缓冲液清洗后, 加入4%甲醛固定15 min, 结晶紫染色30 min。回收结晶紫染液, 自来水缓慢冲洗至本底干净, 自然晾干。于显微镜下拍照记录, 计数各组细胞克隆形成数, 以每个细胞集落含50个或大于50个细胞为1个克隆。

1.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 收集消化后的各组细胞, 1 000 r·min⁻¹离心5 min, 弃上清。加入预冷PBS缓冲液冲洗2次。加入1×结合缓冲液重悬细胞, 细胞密度调整为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。于100 μL细胞悬浮液中加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染液。室温静置15 min, 加入400 μL 1×结合缓冲液至总体积500 μL。染色完成后1 h内采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.6 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率 将细胞按照 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于12孔细胞培养板中, 培养箱中过夜。200 μL枪头垂直于孔板作划痕, PBS缓冲液冲洗后, 于显微镜下拍照, 并记录拍照位置; 按0、5、10和20 μmol·L⁻¹浓度梯度加入SS, 每组重复3次。分别于24和48 h后, 加入空白培养基, 在0 h时记录位置拍照, 显微镜下拍照记录划痕宽度。细胞迁移率 = (0 h划痕宽度 - 特定时间点划痕宽度) / 0 h划痕宽度 × 100%。

1.7 Transwell小室实验检测各组MCF-7/ADR细胞迁移细胞数 消化各组细胞并计数, 于Transwell小室的下室中加入700 μL含10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培养基, 用无血清培养基重悬细胞, 于Transwell小室的上室加入100 μL细胞悬液, 37℃孵育48 h。加入4%多聚甲醛固定10 min, 0.1%结晶紫孵育30 min, PBS缓冲液洗涤3次, 于倒置显微镜下观察并拍照。各组随机选取6个视野, 采用Image J软件进行统计分析, 计数各组细胞中迁移细胞数, 结果取平均值。

1.8 干细胞成球实验检测各组MCF-7/ADR细胞中球体形成数 收集消化后的各组细胞, 离心去除含血清的培养基, PBS缓冲液冲洗。使用干细胞培养基重悬细胞, 并进行计数。将细胞以每孔5 000个的密度接种于超低附着6孔细胞培养板中, 每孔

补加 3 mL 培养基。将培养板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 5 d 更换一半培养基。培养 14 d 后, 于显微镜下观察细胞球体的形态, 采用 Image J 软件测定各组干细胞球体直径, 以直径 > 50 μm 的球体作为成功形成球体, 计数各组细胞球体形成数。

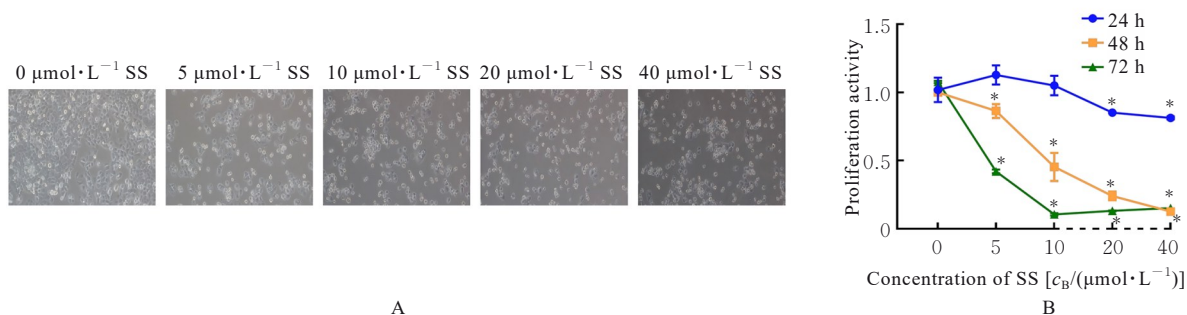
1.9 Western blotting 法检测各组 MCF-7/ADR 细胞中 ABCB1、LC3-Ⅱ 和 p62 蛋白表达水平 采用 0、5、10 和 20 μmol·L⁻¹ SS 处理细胞 48 h 后, PBS 缓冲液冲洗细胞, 按每 1 mL 裂解液加入 10 μL 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的比例配制裂解工作液, 振荡涡旋后静置 30 min。于 4 ℃、12 700 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清。采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒测定蛋白浓度, 取适量蛋白样品按 1:4 比例混合 5× loading buffer 试剂, 95 ℃ 加热 10 min。根据目标蛋白相对分子质量配制相应浓度的分离胶, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳 (恒定电压 120 V, 时间 1 h)。采用湿式转印法 (恒定电流 400 mA, 时间 1 h) 将凝胶中的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入一抗 GAPDH (1:1 000 稀释)、p62 (1:10 000)、

LC3-Ⅱ (1:1 000) 和 ABCB1 (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜。加入含吐温的 Tris 缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline with Tween, TBST) 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min。加入相应二抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次。加入发光液曝光显影, 使用 Image 软件分析各蛋白条带灰度值, 计算各组细胞中目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

1.10 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性、克隆形成数、凋亡率、划痕愈合率、迁移细胞数、球体形成数和细胞中 ABCB1、LC3-Ⅱ 及 p62 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MCF-7/ADR 细胞增殖活性 与 0 μmol·L⁻¹ SS 组比较, 培养 24 h 后, 20 和 40 μmol·L⁻¹ SS 组 MCF-7/ADR 细胞增殖活性均明显降低 ($P < 0.01$); 培养 48 和 72 h 后, 5、10、20 和 40 μmol·L⁻¹ SS 组 MCF-7/ADR 细胞增殖活性均明显降低 ($P < 0.01$), 且增殖活性变化呈时间浓度依赖性。见图 1。



A: ×100. * $P < 0.01$ compared with 0 μmol·L⁻¹ SS group.

图1 不同浓度 SS 作用后各组细胞增殖情况(A)和增殖活性(B)

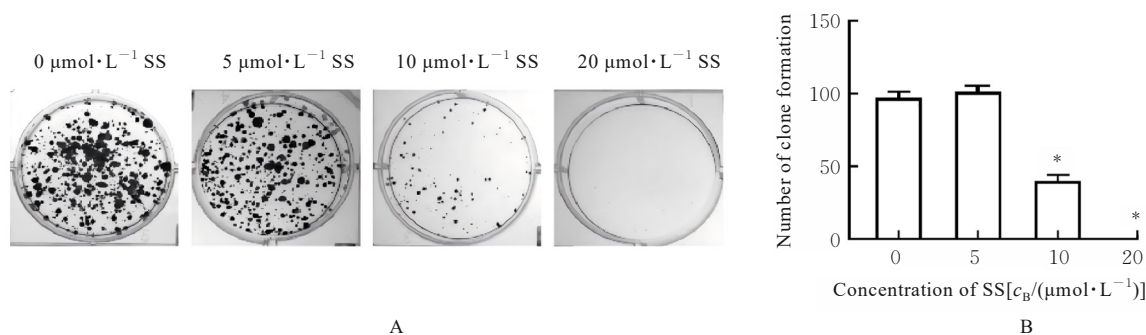
Fig. 1 Proliferation (A) and proliferation activities (B) of cells in various groups after treated with different concentrations of SS

2.2 各组 MCF-7/ADR 细胞克隆形成数 与 0 μmol·L⁻¹ SS 组比较, 5 μmol·L⁻¹ SS 组 MCF-7/ADR 细胞克隆形成数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 10 和 20 μmol·L⁻¹ SS 组 MCF-7/ADR 细胞克隆形成数均明显减少 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组 MCF-7/ADR 细胞凋亡率 与对照组 (2.74% ± 1.34%) 比较, 5 μmol·L⁻¹ SS 组

(3.59% ± 1.00%)、10 μmol·L⁻¹ SS 组 (2.52% ± 0.97%) 和 20 μmol·L⁻¹ SS 组细胞凋亡率 (1.61% ± 0.82%) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

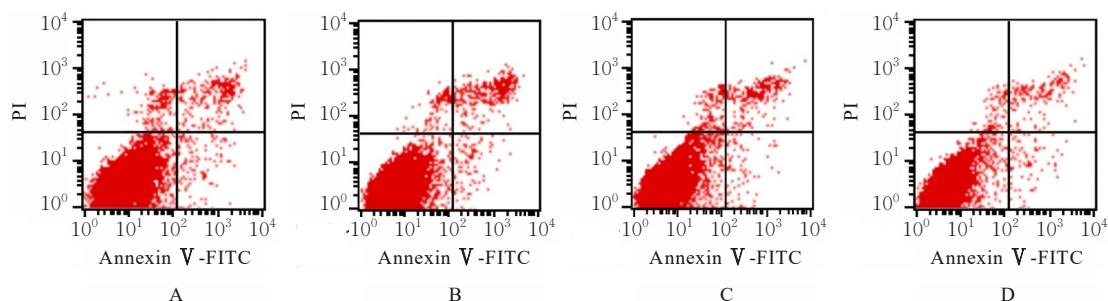
2.4 各组 MCF-7/ADR 细胞划痕愈合率 干预 24 h 后, 与对照组比较, 5 μmol·L⁻¹ SS 组细胞划痕愈合率呈下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);



A: Crystal violet; B: Histogram (* $P < 0.01$ compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group).

图2 各组细胞克隆形成情况(A)和克隆形成数(B)

Fig. 2 Clone formation status(A) and clone formation numbers(B) of cells in various groups concentrations of SS



A: Control group; B: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group; C: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group; D: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group.

图3 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

Fig. 3 Apoptosis of cells in various groups detected by flow cytometry

10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.01$)。干预 48 h 后, 与对照组比较, 5 、 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组细胞划痕愈合率均明显降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见图 4。

2.5 各组 MCF-7/ADR 细胞迁移细胞数 与对照组比较, 5 、 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组 MCF-7/ADR 细胞迁移细胞数均明显降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见图 5。

2.6 各组 MCF-7/ADR 细胞中球体形成数 培养 14 d 后, 与对照组比较, 5 、 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组细胞中球体形成数均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见图 6。

2.7 各组细胞中 ABCB1、LC3-II 和 p62 蛋白表达水平 Western blotting 法检测结果显示: 与对照组比较, 5 、 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组细胞中 ABCB1 及 p62 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS 组细胞中 LC3-II 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。见图 7。

3 讨论

乳腺癌是全球女性癌症中发病率最高的恶性肿

瘤, 死亡率仅次于肺癌。目前, 化疗仍是乳腺癌最主要的治疗方式, 其中以阿霉素为代表的蒽环类药物应用广泛, 但耐药性的出现严重限制了其临床疗效。因此, 探讨逆转乳腺癌阿霉素耐药的策略对改善乳腺癌患者预后具有重要意义。

SS 通过抑制肿瘤细胞生长、侵袭转移及调控免疫微环境等多种机制, 展现出潜在的抗肿瘤价值。XU 等^[11] 研究显示: SS 通过抑制核因子 κB (nuclear factor kappa B, NF- κB) 信号通路的激活、下调丙酮酸脱氢酶激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 和激活线粒体凋亡途径来促进肺癌细胞凋亡。LV 等^[12] 研究显示: SS 可通过线粒体活性氧激活 AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) /叉头框蛋白 O 3a (forkhead box O3a, FoxO3a) 信号轴抑制宫颈癌细胞增殖, 诱导其凋亡, 促进自噬。李艳梅等^[13] 研究表明: SS 可通过下调活性氧 (reactive oxygen species, ROS) /磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol

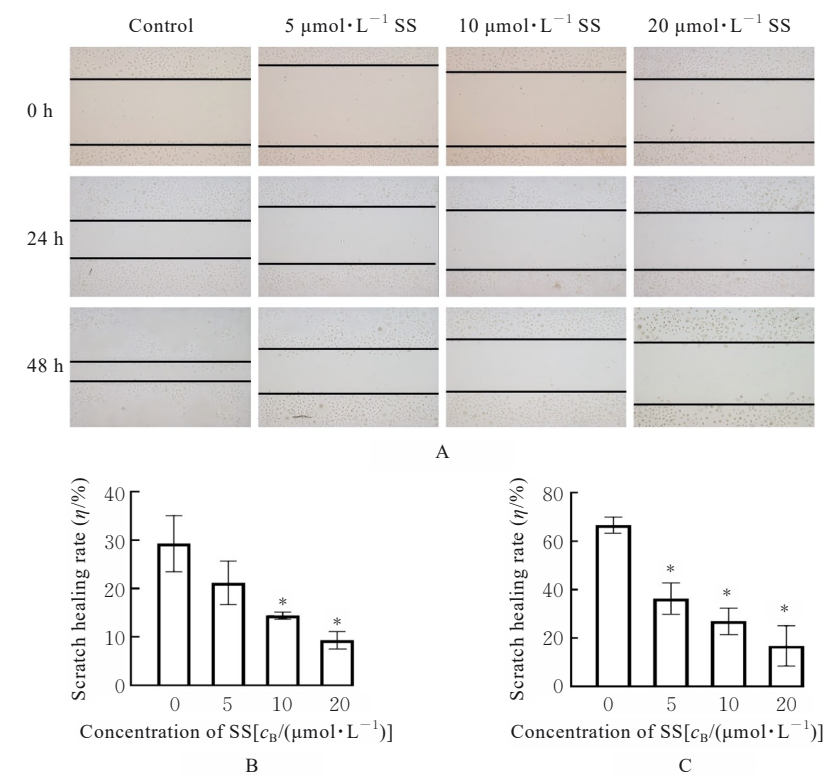


图 4 各组细胞划痕愈合情况(A)和划痕愈合率(B,C)
Fig. 4 Scratch healing(A) and scratch healing rates(B,C) of cells in various groups

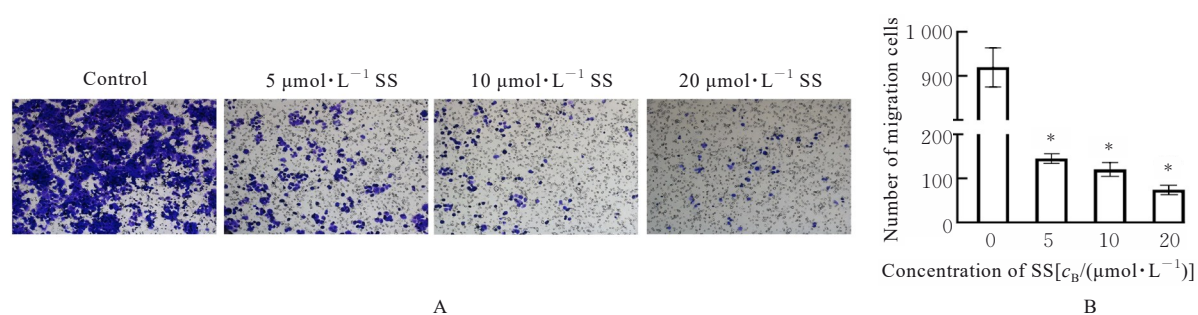
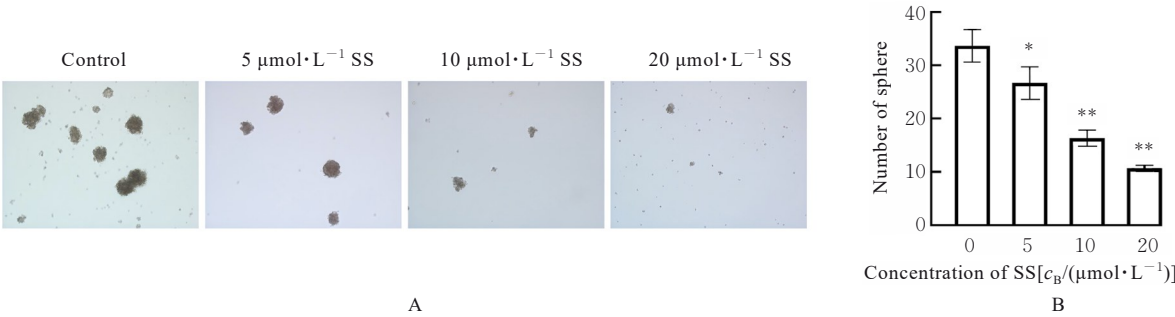


图 5 Transwell 小室实验检测各组细胞迁移情况(A)和迁移细胞数(B)
Fig. 5 Cell migration(A) and numbers of migration cells(B) in various groups detected by Transwell chamber assay

3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路逆转肺癌细胞对吉非替尼的耐药性。本研究结果显示:与对照组比较,不同浓度 SS 组 MCF-7/ADR 细胞增殖活性、克隆形成数、迁移细胞数、划痕愈合率及球体形成数均明显降低,与上述文献报道结果相似。

ABCB1 转运蛋白(亦称 P-gp)具有 ATP 依赖性外排泵功能,导致耐药肿瘤细胞内化疗药物蓄积明显减少,化疗药物疗效降低,是肿瘤复发的重要驱动因素^[14-15]。在阿霉素、顺铂和紫杉醇等化疗药

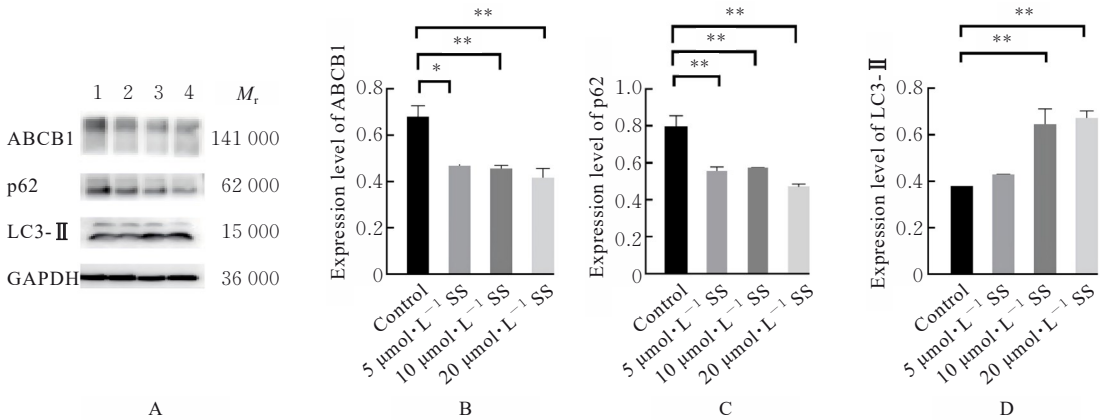
物作用下,ABCB1 在多种药物敏感和耐药的癌细胞系中均呈现剂量依赖性上调^[16-19]。研究^[20]显示:肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)通过表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)-信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)-ABCB1 信号轴介导仑伐替尼耐药。本研究结果显示:与对照组比较,不同浓度 SS 组细胞中 ABCB1 蛋白表达水平明显降低,提示 SS 可能通过抑制 ABCB1 蛋白表达,增强对肿瘤细胞的敏感性。



A: Morphology and size of cell spheres($\times 100$); B: Number of spheres(* $P<0.05$,** $P<0.01$ compared with control group).

图6 各组细胞中球体细胞形成情况

Fig. 6 Sphere formation of cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group; Lane 3: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group; Lane 4: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SS group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图7 各组MCF-7/ADR细胞中ABCB1、LC3-II和p62蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 7 Electrophoregram(A) and histograms(B-D) of expressions of ABCB1, LC3-II, and p62 proteins in MCF-7/ADR cells in various groups

自噬是被称为自噬体的双膜结构与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解和循环吞噬的细胞成分。LC3-II作为自噬体膜特异性结合蛋白,是评估自噬活性的关键分子标志^[21-23],p62可作为自噬底物降解的标志。在肿瘤的化疗治疗过程中,细胞自噬发挥双重功能:一方面,化疗诱导自噬可使肿瘤细胞逃避各种治疗效果,促进化疗耐药和肿瘤存活;另一方面,一些化疗药物可以通过诱导自噬从而达到治疗肿瘤的目的^[24-26]。本研究结果显示:与对照组比较,不同浓度SS组细胞中LC3-II蛋白表达水平明显升高,p62蛋白表达水平明显降低,提示SS通过诱导自噬促进乳腺癌对阿霉素耐药的敏感性。

综上所述,SS可抑制MCF-7/ADR细胞增殖和迁移能力及肿瘤干细胞的成球能力,并且诱导其自噬,下调ABCB1蛋白表达水平。

利益冲突声明:
所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:
郑瑶参与实验操作和论文撰写,付明霞、王蔚琛和陈微微参与实验技术指导,韩宇晨参与实验操作,白玉和安佳佳参与研究设计、论文审阅及修改。

[参考文献]

[1] FILHO A M, LAVERSANNE M, FERLAY J, et al. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide[J]. Int J Cancer, 2025, 156(7): 1336-1346.

[2] BUKOWSKI K, KCIUK M, KONTEK R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3233.

[3] CHAN L S, LIU J, LI M S C, et al. Selenite as a dual apoptotic and ferroptotic agent synergizes with EGFR

- and KRAS inhibitors with epigenetic interference [J]. Clin Epigenetics, 2023, 15(1): 36.
- [4] CHEN W W, AN J J, GUO J W, et al. Sodium selenite attenuates lung adenocarcinoma progression by repressing SOX2-mediated stemness [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 81(5): 885-895.
- [5] MORO C F, SELVAM A K, GHADERI M, et al. Drug-induced tumor-specific cytotoxicity in a whole tissue *ex vivo* model of human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Front Oncol, 2022, 12: 965182.
- [6] 韩宇晨, 陈微微, 白玉, 等. 亚硒酸钠对肺癌细胞迁移和血管生成的影响及其机制探究[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(9): 1598-1605.
- [7] 刘 啸. 亚硒酸钠对肾细胞癌生物学行为影响及其作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [8] 徐梦辰. 亚硒酸钠诱导人源三阴性乳腺癌细胞铁死亡的机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [9] CAFFREY P B, FRENKEL G D. Selenite enhances and prolongs the efficacy of cisplatin treatment of human ovarian tumor xenografts[J]. In Vivo, 2012, 26(4): 549-552.
- [10] WANG J, KOBAYASHI M, SAKURADA K, et al. Possible roles of an adult T-cell leukemia (ATL)-derived factor/thioredoxin in the drug resistance of ATL to adriamycin[J]. Blood, 1997, 89(7): 2480-2487.
- [11] XU X, HOU Y Q, LIN S M, et al. Sodium selenite inhibits proliferation of lung cancer cells by inhibiting NF- κ B nuclear translocation and down-regulating PDK1 expression which is a key enzyme in energy metabolism expression[J]. J Trace Elem Med Biol, 2023, 78: 127147.
- [12] LV C Q, ZENG Q Y, QI L, et al. Sodium selenite induces autophagy and apoptosis in cervical cancer cells *via* mitochondrial ROS-activated AMPK/mTOR/FOXO3a pathway[J]. Antioxidants, 2024, 13(8): 1004.
- [13] 李艳梅, 马琳, 刘单, 等. 亚硒酸钠通过增加ROS抑制PI3K/AKT通路改善肺癌PC-9/GR细胞对吉非替尼的耐药性[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(4): 636-641.
- [14] SKINNER K T, PALKAR A M, HONG A L. Genetics of ABCB1 in cancer[J]. Cancers, 2023, 15(17): 4236.
- [15] CHENG G R, PI Z F, ZHUANG X Y, et al. The effects and mechanisms of aloe-emodin on reversing adriamycin-induced resistance of MCF-7/ADR cells[J]. Phytother Res, 2021, 35(7): 3886-3897.
- [16] CHEN H K, CHEN Y L, WANG C Y, et al. ABCB1 regulates immune genes in breast cancer [J]. Breast Cancer, 2023, 15: 801-811.
- [17] IBRAHIM S M, KARIM S, ABUSAMRA H, et al. Genomic amplification of chromosome 7 in the Doxorubicin resistant K562 cell line[J]. Bioinformation, 2018, 14(9): 587-593.
- [18] REED K, HEMBRUFF S L, LABERGE M L, et al. Hypermethylation of the ABCB1 downstream gene promoter accompanies ABCB1 gene amplification and increased expression in docetaxel-resistant MCF-7 breast tumor cells[J]. Epigenetics, 2008, 3(5): 270-280.
- [19] WANG Y C, JURIC D, FRANCISCO B, et al. Regional activation of chromosomal arm 7q with and without gene amplification in taxane-selected human ovarian cancer cell lines[J]. Genes Chromosom Cancer, 2006, 45(4): 365-374.
- [20] HU B Y, ZOU T T, QIN W, et al. Inhibition of EGFR overcomes acquired lenvatinib resistance driven by STAT3-ABCB1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2022, 82(20): 3845-3857.
- [21] HAN X W, MO J G, YANG Y M, et al. Crucial roles of LncRNAs-mediated autophagy in breast cancer [J]. Int J Med Sci, 2022, 19(6): 1082-1092.
- [22] IBRAGIMOVA M, TSYGANOV M, LITVIAKOV N. Tumour stem cells in breast cancer [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5058.
- [23] LIAO M M, WANG C W, YANG B W, et al. Corrigendum: autophagy blockade by Ai Du Qing formula promotes chemosensitivity of breast cancer stem cells *via* GRP78/ β -catenin/ABCG2 axis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 809565.
- [24] QIAN M Q, MA X D, PAN G W. Curcumin improving drug resistance of MDA-MB-231/DDP tumor treatment by enhancing autophagy [J]. International J Pharmacology, 2022, 18(4): 806-816.
- [25] SHAHVERDI M, HAJIASGHARZADEH K, SORKHABI A D, et al. The regulatory role of autophagy-related miRNAs in lung cancer drug resistance [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 148: 112735.
- [26] YUN C W, JEON J, GO G, et al. The dual role of autophagy in cancer development and a therapeutic strategy for cancer by targeting autophagy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 179.