

解毒祛瘀方对乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 的耐药逆转作用

王冬^{1*}, 石芸², 刘爽¹, 王斌¹, 钱钧强¹

(1. 天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060; 2. 天津市公安医院, 天津 300041)

[摘要] **目的:**研究解毒祛瘀方对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 耐药逆转的作用及机制。**方法:**以 MCF-7/ADM 细胞为研究对象,利用噻唑蓝(MTT)比色法检测解毒祛瘀方对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 生长的影响;应用流式细胞术检测肿瘤细胞内罗丹明 123(Rh-123)的含量;分别利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤细胞内多药耐药蛋白 1(MDR1),乳腺癌耐药相关蛋白(BCRP)mRNA 及蛋白表达变化。**结果:**与空白组比较,经 1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方作用后,阿霉素对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 的逆转倍数(RF)分别提升 1.7 倍和 3.0 倍($P < 0.05$);人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 中 Rh-123 含量分别提高了 1.8 倍和 2.5 倍($P < 0.05$),MDR1 和 BCRP 蛋白和 mRNA 表达水平明显下降($P < 0.05$),1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方 MDR1 mRNA 表达分别降低 35.5% 和 56.0% ($P < 0.05$),BCRP mRNA 表达分别降低 41.6% 和 49.5% ($P < 0.05$)。**结论:**解毒祛瘀方可提高人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 对阿霉素的敏感性,逆转该细胞对阿霉素的耐药性,其机制可能与降低 MDR1 和 BCRP 蛋白和 mRNA 的表达,抑制细胞药物外排作用相关。

[关键词] 解毒祛瘀方; 乳腺癌; 耐药逆转; 多药耐药蛋白; 乳腺癌耐药蛋白

[中图分类号] R22;R24;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0137-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030137

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1830.024.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:30

Research on Jiedu Quyu Prescription in Drug Resistance Reversal in MCF-7/ADM Human Breast Cancer Cells

WANG Dong^{1*}, SHI Yun², LIU Shuang¹, WANG Bin¹, QIAN Jun-qiang¹

(1. Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. Tianjin Police Hospital, Tianjin 300041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Jiedu Quyu prescription on drug resistance reversal for MCF-7/ADM human breast cancer cells. **Method:** The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was performed to test the effect of Jiedu Quyu prescription on proliferation of MCF-7/ADM cells. Flow cytometry was used to detect the concentration of intracellular rhodamine (Rh)-123, Real-time PCR and Western blot were used to analyze the expression of genes and proteins, including multiple drug resistant 1 (MDR1) and breast cancer resistant protein (BCRP). **Result:** After treatment with 1.25, 2.50 g·L⁻¹ Jiedu Quyu prescription, the reverse fold (RF) of MCF-7/ADM was 1.7 and 3.0 respectively ($P < 0.05$); the concentration of intracellular Rh-123 was enhance for 1.8 and 2.5 times respectively as compared with control group ($P < 0.05$). The protein and mRNA expression levels of MDR1 and BCRP were down-regulated obviously ($P < 0.05$); MDR1 mRNA expression level was decreased by 35.5% and 56.0% respectively ($P < 0.05$), while BCRP mRNA expression level was decreased by 41.6% and 49.5% respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:**

[收稿日期] 20170705(015)

[基金项目] 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题项目(2015065)

[通信作者] *王冬, 硕士, 主管药师, 从事中药药理研究, Tel:022-23340123-5104, E-mail:lvn1314@126.com

Jiedu Quyu prescription could enhance the sensitivity of human breast cancer cell line MCF-7/ADM to adriamycin, and reverse drug resistance of MCF-7/ADM. Its mechanism may be correlated with down-regulation of MDR1 and BCRP, as well as inhibition of intracellular drug efflux.

[Key words] Jiedu Quyu prescription; breast cancer; drug resistance reversal; multiple drug resistant 1 (MDR1); breast cancer resistant protein (BCRP)

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,约10%的西方女性会罹患该疾病^[1-3]。乳腺癌已成为中国女性癌症发病率中发展很快的一种癌症,其增长率仅次于肺癌^[4]。近年来各种乳腺癌辅助治疗的发展显著降低了乳腺癌患者的死亡率^[5-7],但是转移性乳腺癌的死亡率仍然高居不下。在中国,传统中草药用来预防和治疗乳腺肿瘤已经有近百年的历史,在西方有些国家近些年来也将其作为辅助治疗的备选方案^[8]。尽管有些中草药抗乳腺癌的机制尚不明确,但是其临床应用显示了很好的效果。尤其对于早期化学治疗后,产生耐药的乳腺癌患者,在应用中草药辅助治疗时提高了其化疗的敏感性^[9]。因此,本研究希望探索并阐述中草药辅助化疗、提高耐药患者化疗敏感性的理论依据。

解毒祛瘀方是天津医科大学肿瘤医院多年治疗乳腺癌的经验方,本课题组早期研究证实了该方剂可以抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖和侵袭能力,并初步阐述了其作用机制^[10-11]。但该方对于耐药肿瘤细胞的作用机制尚属空白。为此本实验利用现在分子生物学的有关研究方法考察了解毒祛瘀方逆转人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM 多药耐药的作用,并阐明该方对人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM 的耐药逆转作用的机制,为其推广应用于化疗后耐药患者奠定基础。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株 MCF-7(美国 ATCC 公司,已传至第3代)及其耐药细胞株 MCF-7/ADM(由本实验室诱导耐药培养筛选而得,已传至第3代)。

1.2 药物及试剂 解毒祛瘀方含姜黄20 g,马勃10 g,白花蛇舌草20 g(江阴天江药业有限公司,批号分别为2015100311,2015110476,2015091609),由江阴天江药业有限公司提供原料,天津市肿瘤医院制备,所有药材加以纯水500 mL,煎煮1 h后,过滤,再以纯水500 mL煎煮1 h,过滤,合并滤液,放至室温,然后加入75%乙醇,除去沉淀,将溶液蒸干,即得生药约0.5 g。trizol RNA提取试剂(Invitrogen公司,批号15596026); High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 试剂盒, SYBR green PCR Master

Mix 试剂盒(Thermo Fisher公司,批号分别为4368814,4385618);多药耐药蛋白1(MDR1);乳腺癌耐药相关蛋白(BCRP)单克隆抗体(Abcam公司,批号129450,24115);噻唑蓝(MTT, Promega公司,批号2035B358);兔抗 β -肌动蛋白(β -actin);多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物公司,批号分别为161106,160913)。

1.3 仪器 3111型CO₂恒温培养箱, Multiskan MK3型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific公司); PE-480型基因扩增仪(美国 Perkin Elmer公司); FACScaliber型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter公司); ABI7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司); 221BR46516型垂直板电泳槽,转膜电泳仪(美国 Bio-Rad公司); DC300F型倒置相差显微镜(德国 Leica公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将常规方法复苏冻存的 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞接种于含10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在饱和湿度,37℃5%CO₂培养箱中常规传代培养,按1:3传代,每48 h换液1次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT比色法检测解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞增殖 于96孔板中按 1×10^5 个/孔接种 MCF-7/ADM 细胞,每孔100 μ L,将8组预培养24 h的细胞依次分为空白组,解毒祛瘀方(0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20 $g \cdot L^{-1}$)组,每组设置5个平行孔,在饱和湿度,37℃5%CO₂再孵育48 h,吸弃培养液,然后加入新培养液和5 $g \cdot L^{-1}$ MTT 120 μ L 孵育4 h,弃去上清液,加入二甲亚砜(DMSO)200 μ L,振荡10 min,用酶标仪检测波长490 nm处的吸光度A。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{解毒祛瘀方组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.3 MTT比色法检测解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞耐药性的逆转作用 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于96孔培养板中,每孔100 μ L。培养24 h后,更换培养液,再分别加入1.25, 2.5 $g \cdot L^{-1}$ 解毒祛瘀方及0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $mg \cdot L^{-1}$ 的ADM 20 μ L,每个浓度设5个平行复孔。置于37℃5%CO₂条件下培养48 h,吸弃培养液,再加入新培养液

和 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $120 \mu\text{L}$ 孵育 4 h, 弃上清液, 加入 DMSO 200 mL , 振荡 10 min, 用酶标仪检测波长 490 nm 处 A 。计算 MCF-7/ADM 细胞在解毒祛瘀方 $1.25, 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用下的半数抑制浓度 (IC_{50})。逆转倍数 (RF) = 解毒祛瘀方 IC_{50} /空白组 IC_{50} 。

2.4 流式细胞术检测 MCF-7/ADM 细胞内 Rh-123 含量 用解毒祛瘀方 $1.25, 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用细胞 24 h, 弃去上清, 重悬于含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rh-123 的培养液中, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 温箱中培养 30 min 后, 以培养液洗涤细胞 3 次, 继续培养液孵育 10 min 后, 洗涤细胞, 然后以预冷培养液 1 mL 重悬细胞, 用流式细胞仪检测细胞的荧光强度。

2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 MCF-7/ADM 细胞 MDR1, BCRP mRNA 表达 将解毒祛瘀方 $1.25, 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用细胞 24 h 后, 细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 再加入 trizol 1 mL , 按说明书提取总 RNA, 通过 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 判断所提取总 RNA 纯度, 纯度满足要求后计算得出 RNA 浓度。首先使用逆转录试剂盒得到 cDNA, 然后进行实时定量 PCR 反应, 反应条件为 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 2 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min, 40 个循环。计算各样本待测基因 C_t 值与 GAPDH C_t 值的差, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 为该样本中待测基因相对表达量。引物由北京鼎国昌盛生物科技有限公司合成并纯化, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primer

引物	序列	长度/bp
MDR1	上游 5'-GAGCCCATCCTGTTGACTG-3'	92
	下游 5'-GCTGCCCTCACAATCTCTTC-3'	
BCRP	上游 5'-AGCAGGGACGAACAATCATC-3'	82
	下游 5'-GCCAATAAGGTGAGGCTATCA-3'	
GAPDH	上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTC-3'	95
	下游 5'-GGGTCCTTGATGGCAACA-3'	

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 MCF-7/ADM 细胞 MDR1 及 BCRP 蛋白表达 将解毒祛瘀方 $1.25, 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用细胞 24 h 后, 以 PBS 清洗细胞 3 次, 加入预冷的细胞裂解液孵育 30 min, 转移至 1.5 mL 离心管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集上清液, 以 Bradford 法定量蛋白浓度。每泳道蛋白 $40 \mu\text{g}$, 经 $10\% \text{ SDS-PAGE}$ 凝胶电泳 3 h, 完毕后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。用封闭液 ($5\% \text{ 脱脂奶粉}$) 室温孵育 60 min, 加入相应一抗 ($1:500$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$

孵育过夜。TBST 洗涤后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 ($1:5\ 000$), 室温孵育 40 min。TBST 再洗涤后用 ECL 化学发光试剂孵育 1~2 min, 显色, 曝光 X 胶片。以目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据数据处理的不同方法, 选用方差分析或 t 检验进行组间差异分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞增殖的影响 以解毒祛瘀方处理 MCF-7/ADM 细胞 48 h 后, $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 方剂抑制率为 3.6% (无毒), $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 方剂抑制率为 8.6% (低毒), 因此以这 2 种浓度进行后续的耐药逆转实验。

3.2 解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞耐药逆转的作用 MCF-7/ADM 细胞经 $1.25, 2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 解毒祛瘀方处理后 48 h 后, 阿霉素对 MCF-7/ADM 细胞的 IC_{50} 分别为 $11.2, 6.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与未经解毒祛瘀方处理的 IC_{50} $18.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较, 分别逆转了 1.7 倍和 3.0 倍 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 解毒祛瘀方对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADM 阿霉素敏感性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Jiedu Quyu formula on sensitiveness of ADM in breast cancer cells MCF-7/ADM ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	解毒祛瘀方质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	阿霉素质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	48 h 抑制率/%
空白	-	2	15.2 ± 5.21
	-	5	23.4 ± 4.83
	-	10	33.0 ± 4.20
	-	20	43.1 ± 4.89
	-	30	58.5 ± 6.16
	-	40	69.0 ± 5.60
解毒祛瘀方	1.25	2	$25.0 \pm 5.58^{1)}$
	1.25	5	$36.2 \pm 2.10^{1)}$
	1.25	10	$52.6 \pm 4.10^{1)}$
	1.25	20	$55.9 \pm 1.92^{1)}$
	1.25	30	$65.5 \pm 2.55^{1)}$
	1.25	40	$70.0 \pm 2.82^{1)}$
	2.5	0.5	$16.3 \pm 5.61^{1)}$
	2.5	1	$28.6 \pm 3.52^{1)}$
	2.5	2	$38.1 \pm 2.80^{1)}$
	2.5	5	$51.1 \pm 6.74^{1)}$
	2.5	10	$55.7 \pm 3.95^{1)}$
	2.5	20	$64.0 \pm 4.28^{1)}$

注: 与空白组比较 $^{1)} P < 0.05$ (表 3~5 同)。

3.3 解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞内 Rh-123 含量的影响 与空白组比较,经 1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方处理,MCF-7/ADM 细胞吸收 Rh-123 能力分别提高 1.8 倍和 2.5 倍($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 解毒祛瘀方对乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 吸收 Rh-123 能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Jiedu Quyu formula on absorbing of Rh-123 in breast cancer cells MCF-7/ADM($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	相对荧光强度/%
空白	0	100 ± 5.44
解毒祛瘀方	1.25	184.27 ± 5.36 ¹⁾
	2.5	249.85 ± 4.25 ¹⁾

3.4 解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞 MDR1 及 BCRP mRNA 表达的影响 与空白组相比,经 1.25,2.5 g·L⁻¹解毒祛瘀方处理 MCF-7/ADM 细胞,MDR1 mRNA 表达分别下调 35.5%,56.0% ($P < 0.05$),BCRP mRNA 表达分别下调 41.6%,49.5% ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 解毒祛瘀方对乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 中耐药相关 mRNA 相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Jiedu Quyu formula on mRNA expression of MDR1 and BCRP in breast cancer cells MCF-7/ADM($\bar{x} \pm s, n = 6$)

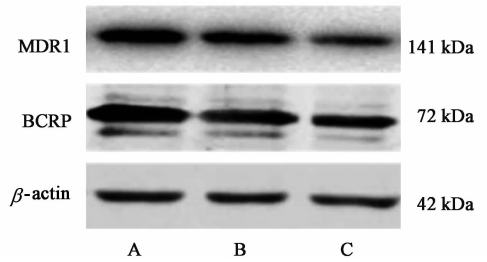
组别	质量浓度/g·L ⁻¹	MDR1	BCRP
空白	0	100 ± 6.14	100 ± 3.60
解毒祛瘀方	1.25	64.5 ± 3.30 ¹⁾	58.4 ± 6.73 ¹⁾
	2.5	44.0 ± 5.04 ¹⁾	50.5 ± 3.78 ¹⁾

3.5 解毒祛瘀方对 MCF-7/ADM 细胞 MDR1 及 BCRP 蛋白表达的影响 与空白组比较,经解毒祛瘀方 1.25,2.5 g·L⁻¹处理的 MCF-7/ADM 细胞,MDR1 蛋白表达分别下调 34.1%,62.4% ($P < 0.05$),BCRP 蛋白表达分别下调 36.9%,39.5% ($P < 0.05$)。见表 5,图 1。

表 5 解毒祛瘀方对乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 中耐药相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Jiedu Quyu formula on protein expression of MDR1 and BCRP in breast cancer cells MCF-7/ADM($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	MDR1/ β -actin	BCRP/ β -actin
空白	0	100 ± 4.31 ¹⁾	100 ± 3.20 ¹⁾
解毒祛瘀方	1.25	65.9 ± 3.96 ¹⁾	63.1 ± 6.28 ¹⁾
	2.5	37.6 ± 5.12 ¹⁾	60.5 ± 4.82 ¹⁾



A. 空白组; B, C. 解毒祛瘀方 1.25, 2.5 g·L⁻¹组

图 1 乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 中耐药相关蛋白表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of protein expression of MDR1 and BCRP in breast cancer cells MCF-7/ADM

4 讨论

癌症的转移是导致患者致死性的最主要因素。目前全球范围内,女性转移性乳腺癌也是死亡率最高的一种癌症^[12]。美国 2004—2010 年对 18 个区域的癌症统计数据表明,各种类型的恶性肿瘤的 5 年相对生存率已经有了很大程度改善,对于所有类型的转移性肿瘤其 5 年平均生存率也接近 40%,其中区域转移性肿瘤 5 年相对生存率约为 60%。就乳腺癌而言,如今原位乳腺癌的生存率接近 100%,但其远端转移的患者生存率却只有 25%,这种生存率的显著降低充分证明了远端转移性对乳腺癌患者的极大危害。在临床抗转移瘤治疗过程中,包括蒽环类化合物、紫杉烷类化合物以及曲妥珠单抗等靶向治疗药物收效甚微,因此探索发现全新的、高效的抗转移性乳腺癌药物势在必行。

药物耐受现象在乳腺癌患者中普遍存在,其具体的临床表现也是源于肿瘤细胞在受到外界刺激后发生的变化。近些年来,对于受体检测呈阳性的乳腺癌患者,受体靶向药物治疗效果明显,预计会有很好的发展潜力。也有很多研究表明,这种选择性的靶点抑制会促进肿瘤组织的进化,如 RB1 基因的突变或者缺失,导致 palbociclib 的耐药^[13], mutated in multiple advanced cancers 1 (PTEN) 的缺失,导致磷脂酰肌醇-3 激酶 (PIK3) CA 抑制剂的耐药^[14]等。当然,与靶向药物联合应用的化疗药物也会受这种耐药作用的影响,从而使治疗效果降低。因此,旨在应对不同的耐药机制,临床治疗方案也根据不同的情况而做出相应的调整。比如,早期研究中应用维拉帕米抑制药物外流泵的作用,应用雷帕霉素抑制剂解决内分泌治疗的耐受等。目前,有很多研究者为了避开药物外排而导致的耐药现象,将药物研究的重点转移到药物的传送系统上来。脂质体、胶束、磁性纳米粒等载药系统的应用越来越普遍,而且

具有很好的开发前景^[15-17]。

本研究在前期对解毒祛瘀方影响 MCF-7 人乳腺癌细胞侵袭及凋亡等方面研究的基础上,进行其对耐药乳腺癌细胞作用的研究。通过 MTT 比色法及流式细胞术实验可知解毒祛瘀方确实可以降低乳腺癌耐药细胞的药物外泵作用,提高耐药细胞对化疗药物的敏感性,进而达到逆转耐药的作用。再通过 Real-time PCR 和 Western blot 在转录及蛋白水平分别验证了该方降低耐药细胞的药物外泵作用的两个关键蛋白。由此可知,解毒祛瘀方逆转耐药的作用机制可能与其抑制乳腺癌耐药细胞多药耐药蛋白及乳腺癌耐药相关蛋白的表达及调节相关信号通路的传导相关。更确切的逆转乳腺癌细胞耐药作用机制还需结合耐药肿瘤动物实验和耐药临床原代样本研究等综合结果进行分析,并进行更加多元化、深层次的探讨。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Benson J R, Jatoi I. The global breast cancer burden [J]. Future Oncol, 2012, 8(6): 697-702.

[3] Schneider A P, Zainer C M, Kubat C K, et al. The breast cancer epidemic: 10 facts [J]. Linacre Q, 2014, 81(3): 244-277.

[4] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569.

[5] Swain S M, Baselga J, Miles D, et al. Incidence of central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: results from the randomized phase III study CLEOPATRA [J]. Ann Oncol, 2014, 25(6): 1116-1121.

[6] Brufsky A M. Current approaches and emerging directions in HER2-resistant breast cancer [J]. Breast Cancer: Auckl, 2014, 29(8): 109-118.

[7] Andre F, O'Regan R, Ozguroglu M, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial [J].

Lancet Oncol, 2014, 15(6): 580-591.

[8] KONG X N, DING X, YANG Q F. Identification of multi-target effects of Huaier aqueous extract *via* microarray profiling in triple-negative breast cancer cells [J]. Int J Oncol, 2015, 46(5): 2047-2056.

[9] SUI H, LIU X, JIN B H, et al. Zuo Jin Wan, a traditional Chinese herbal formula, reverses P-gp-mediated MDR *in vitro* and *in vivo* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi: 10.1155/2013/957078.

[10] 钱钧强, 王斌, 闫祝辰, 等. 解毒祛瘀方对 MCF-7 人乳腺癌细胞侵袭能力的影响及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 118-121.

[11] 王斌, 谢广茹, 潘战宇, 等. 解毒祛瘀方联合化疗对 MCF-7 人乳腺癌细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 236-240.

[12] Tevaarwerk A J, Gray R J, Schneider B P, et al. Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy [J]. Cancer, 2013, 119(6): 1140-1148.

[13] DeMichele A, Clark A S, Tan K S, et al. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rbt advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 995-1001.

[14] Juric D, Castel P, Griffith M, et al. Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K inhibitor [J]. Nature, 2015, 518(7538): 240-244.

[15] LEI T, Srinivasan S, TANG Y, et al. Comparing cellular uptake and cytotoxicity of targeted drug carriers in cancer cell lines with different drug resistance mechanisms [J]. Nanomedicine, 2011, 7(3): 324-332.

[16] TANG Y, LEI T, Manchanda R, et al. Simultaneous delivery of chemotherapeutic and thermal-optical agents to cancer cells by a polymeric (PLGA) nanocarrier: an *in vitro* study [J]. Pharm Res, 2010, 27(10): 2242-2253.

[17] Pattillo C B, Venegas B, Donelson F J, et al. Radiation-guided targeting of combretastatin encapsulated immunoliposomes to mammary tumors [J]. Pharm Res, 2009, 26(5): 1093-1100.

[责任编辑 张丰丰]