

HIF-1 α 调控 4-羟基他莫昔芬对乳腺癌 MCF-7 细胞敏感性的研究

陈宗跃^{1,2}, 张璟钰¹, 张敏琴¹, 樊双琴¹, 沈祥春¹, 陈妍¹, 张玥¹

摘要 目的 该研究通过建立人乳腺癌 4-羟基他莫昔芬(4-OHT)耐药细胞系(MCF-7/TR),探究低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)对乳腺癌 MCF-7 细胞 4-OHT 耐药的影响。方法 采用他莫昔芬的体内活性形式 4-OHT 建立乳腺癌耐药细胞 MCF-7/TR。MTT 实验检测 4-OHT 对乳腺癌细胞 MCF-7、MCF-7/TR 细胞活力的影响,并测定耐药指数(RI);Western blot 检测 MCF-7、MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达水平;采用 MTT 法和流式细胞术 AV/PI 双染法检测, HIF-1 α 抑制剂(LW6)或 siRNA HIF-1 α 干预作用后 4-OHT 对 MCF-

7/TR 细胞的影响以及 HIF-1 α 稳定剂(FG-4592)处理后 4-OHT 对 MCF-7 细胞的影响。结果 结果显示, MCF-7/TR 耐药细胞株成功构建,其 RI 为(5.56 $\pm$ 0.80);与 MCF-7 细胞相比, MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 高表达,且 4-OHT 作用后 MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 的表达水平上调;给予 LW6 或沉默 HIF-1 α 的表达后, HIF-1 α 的表达下调增强了 4-OHT 对 MCF-7/TR 细胞的抑制作用;给予 FG-4592 后, HIF-1 α 的表达上调可降低 4-OHT 对 MCF-7 细胞的抑制作用。结论 HIF-1 α 在乳腺癌 MCF-7 细胞 4-OHT 耐药中发挥重要作用,靶向 HIF-1 α 可能是增加乳腺癌细胞对他莫昔芬敏感性的有效途径。

关键词 乳腺癌;耐药;4-羟基他莫昔芬;低氧诱导因子 1 α
中图分类号 R 323.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0938-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.017

2022-03-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860648);贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2021]169);贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(编号:黔教合 KY 字[2018]048);贵州省高层次创新型人才计划(编号:71000305);贵州医科大学药学国际科技合作基地(编号:黔科合平台人才[2017]5802);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]一般 527)

作者单位:¹ 贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室,贵阳 550025

² 贵阳康养职业大学,贵阳 550081

作者简介:陈宗跃,男,硕士;

陈妍,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: s0710189@sina.com;

张玥,女,副教授,责任作者, E-mail: 254212060@qq.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,75% 的恶性乳腺肿瘤患者呈现雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ER α) 阳性^[1]。他莫昔芬(tamoxifen, TAM)是原发性 ER α 阳性乳腺癌的核心治疗药物,临床数据显示约 50% 的反应性乳腺肿瘤因长期使用 TAM 而产生抗性并导致治疗失败^[2]。低氧诱导因子 1 α (hypoxia induced factor 1 α , HIF-1 α) 是细胞在低氧状态下稳定表达的核转录因子^[3],其可调控多种耐药靶

kit was used to detect cell activity, TUNEL staining was used to detect neuron apoptosis, JC-1 kit was used to detect mitochondrial membrane potential, Calcein AM was used to detect MPTP opening degree, and Western blot was used to detect proteins expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic compact protein (PSD-95), Synaptophysin, Synapsin-1, and Cyclophilin D (CypD). **Results** Compared with Con group, the cell viability of Sevo group was significantly reduced ($P < 0.05$), the apoptosis rate of neurons increased ($P < 0.01$), the expression of synapse proteins decreased ($P < 0.05$), the mitochondrial membrane potential decreased ($P < 0.01$), the opening degree of MPTP increased ($P < 0.01$), and the expression of CypD protein increased ($P < 0.01$). Cyclosporin A, a specific inhibitor of MPTP opening, could reduce hippocampal neuron apoptosis and synaptic damage caused by sevoflurane exposure, maintain mitochondrial membrane potential, and inhibit MPTP opening and CypD protein expression. **Conclusion** Prolonged exposure to sevoflurane can cause damage to hippocampal neurons in SD rats. The mechanism is related to the promotion of CypD-mediated MPTP opening.

Key words sevoflurane; hippocampal neurons; cyclosporin A; cyclophilin D; mitochondrial permeability transition pore

基因的表达从而致使肿瘤细胞的化疗耐药。目前已有研究^[4]表明 HIF-1 α 水平升高与多种恶性肿瘤耐药有关,但其与乳腺癌 TAM 耐药的关系目前尚不明确。因此,该研究采用 TAM 的活性代谢物 4-羟基他莫昔芬(4-hydroxy tamoxifen, 4-OHT) 构建乳腺癌 TAM 耐药细胞模型,探讨 HIF-1 α 与乳腺癌 TAM 耐药的关系,为攻克乳腺癌耐药问题寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院昆明细胞库;4-OHT 购自美国 Abcam 公司;FG-4592 及 LW6 均购自上海 MedChem Express 公司;MTT 购自北京索莱宝公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;si-HIF-1 α 和阴性对照 si-NC 序列均购自上海吉玛公司,Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;抗 HIF-1 α 购自美国 Sigma 公司; β -actin 单克隆抗体购自美国 Bioworld 公司;二抗羊抗兔/羊抗鼠购自上海斯信生物科技有限公司;一抗稀释液/二抗稀释液均购自上海碧云天生物有限公司。

1.2 主要仪器 LDZX 型立式高压蒸汽灭菌锅购自上海申安医疗器械厂;SW-CJ-1 型超净工作台购自苏州净化设备有限公司;Heal force 型细胞培养箱购自上海力申科学仪器有限公司;CFX 型凝胶成像系统购自美国 Bio-rad 公司;3020-426 型多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司;NovoCyte 3008 型流式细胞仪购自美国艾森生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 构建耐药细胞 将 MCF-7 细胞培养于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中,细胞传代贴壁后加处理因素。MCF-7/TR 通过浓度梯度法诱导获得,将 4-OHT 浓度从 1 $\mu\text{mol/L}$ 逐渐提高到 5 $\mu\text{mol/L}$,筛选 6 个月,待细胞生长稳定后,通过给予 MCF-7 和 MCF-7/TR 细胞不同浓度 4-OHT(0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 后,用 MTT 法检测细胞的耐药性。后配制含 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 4-OHT 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基常规培养耐药细胞以继续维持其耐药性。耐药指数(resistance index, RI) = $\text{IC}_{50}(\text{MCF-7/TR})/\text{IC}_{50}(\text{MCF-7})$ 。

1.3.2 MTT 法检测细胞存活率 将乳腺癌 MCF-7 亲本细胞或 MCF-7/TR 细胞分别接种于不同 96 孔板内(1×10^4 个/孔),培养 24 h 后,分别给予不同组 MCF-7/TR 细胞 4-OHT(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 联合

LW6(15 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h、FG-4592(25 $\mu\text{mol/L}$) 联合不同浓度 4-OHT(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 以及给予沉默 HIF-1 α 蛋白 MCF-7/TR 细胞不同浓度 4-OHT(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 后,加入 20 μl /孔的 MTT 孵育 4 h,于酶标仪波长 490 nm 处测吸光度值,计算各浓度药物下的抑制率(inhibition rate, IR),并绘制细胞生长抑制曲线,实验重复 3 次,每组设置 5 个复孔。 $\text{IR} = [(\text{对照组 OD 值} - \text{给药组 OD 值})/\text{对照组 OD 值}] \times 100\%$ 。

1.3.3 Western blot 法检测蛋白表达 将药物处理 24 h 后的 MCF-7/TR 或 MCF-7 细胞用 RIPA 裂解液加蛋白酶抑制剂裂解细胞 20 min 后收集上清液,采用 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定各组蛋白浓度并按照 40 μg 共 20 μl 上样各组蛋白进行电泳、转膜、封闭。封闭完成后按照抗体说明书稀释一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,恢复至室温后加入 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入二抗室温孵育 90 min 后再次洗膜,曝光,采用自动凝胶成像系统(Bio-Rad)进行成像,所得数据使用 Image Lab 分析软件进行 One-way ANOVA 分析。

1.3.4 siRNA 实验探讨 HIF-1 α 蛋白对 MCF-7/TR 细胞耐药的影响 将对数生长期的 MCF-7/TR 细胞接种于 6 孔板中,培养至融合率达到 50% ~ 60%,根据转染说明书,使用 Lipofectamine 2000 试剂进行转染,si-HIF-1 α 和 si-NC 的转染浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞转染 6 h 后,采用含有 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基换液,继续培养 48 h,提取总蛋白进行敲除效果验证。细胞抑制率实验在转染 48 h 后给予不同浓度 4-OHT(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 后进行细胞存活率检测。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 用不含 EDTA 的胰酶消化各给药组细胞,收集细胞悬液,2 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液,用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次,再以 2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书加入 500 μl Binding Buffer 悬浮细胞,先加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μl PI 溶液,在室温条件下避光反应 15 min 后上流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 实验重复 3 次,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 处理和分析数据,两样本之间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析进行显著性检验,并计算 F 值, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建乳腺癌 TAM 耐药细胞系 MCF-7/TR

给予 MCF-7 和 MCF-7/TR 细胞不同浓度 4-OHT (0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h 后, MTT 法检测 4-OHT 对 MCF-7/TR 细胞和 MCF-7 亲本细胞的生长抑制作用。结果显示, 与 MCF-7 细胞相比, MCF-7/TR 细胞对 4-OHT 的抵抗性增强 ($P < 0.05$), 其 RI 值为 (5.56 ± 0.80) (图 1)。

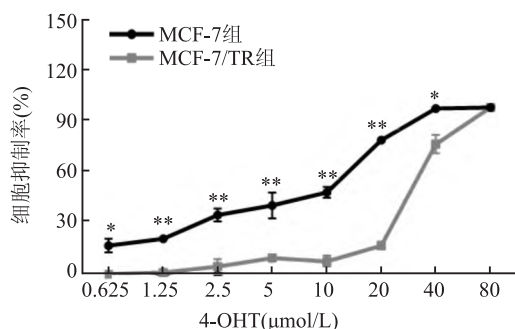


图1 4-OHT 对 MCF-7 和 MCF-7/TR 细胞的生长抑制影响
与 MCF-7/TR 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 HIF-1 α 表达与乳腺癌细胞 MCF-7 他莫昔芬耐药之间的关系 按照实验分组 (MCF-7, MCF-7 + 4-OHT, MCF-7/TR, MCF-7/TR + 4-OHT) 分别给予 MCF-7 和 MCF-7/TR 细胞 4-OHT (1 $\mu\text{mol/L}$) 作用 24 h。Western blot 结果显示, 与未给药处理的亲本细胞 MCF-7 相比, MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达上调 ($F = 13.46$, $P < 0.05$); 与未处理组 MCF-7/TR 细胞比较, 低剂量的 4-OHT 可上调 MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达 ($F = 12.54$, $P < 0.05$) (图 2), 提示乳腺癌 TAM 耐药可能与 HIF-1 α 表达上调有关。

2.3 HIF-1 α 抑制剂 LW6 对 MCF-7/TR 耐药细胞的影响 Western blot 结果显示, 与空白对照组 (Control 组) 比较, 给予 MCF-7/TR 细胞 LW6 (15 $\mu\text{mol/L}$) 作用后, HIF-1 α 蛋白表达减少 ($F = 20.76$, $P < 0.05$) (图 3A); MTT 结果显示, 在给予 MCF-7/TR 细胞不同浓度 4-OHT (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 联合 LW6 (15 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, LW6 可提高 4-OHT 对 MCF-7/TR 的抑制率, LW6 + 5 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 12.51$, $P < 0.05$)、LW6 + 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 48.07$, $P < 0.01$)、LW6 + 20 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 31.71$, $P < 0.01$) (图 3B); 流式细胞术检测结果显示, 与单用 4-OHT (5 $\mu\text{mol/L}$) 组相比, LW6 (15 $\mu\text{mol/L}$)

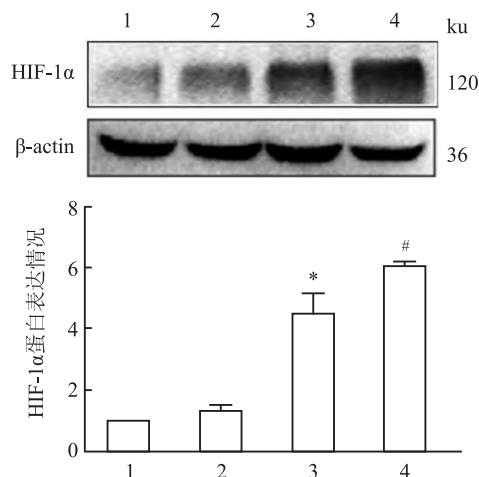


图2 MCF-7 和 MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 的表达情况

1: MCF-7; 2: MCF-7 + 4-OHT; 3: MCF-7/TR; 4: MCF-7/TR + 4-OHT; 与 MCF-7 组比较: * $P < 0.05$; 与 MCF-7/TR 组比较: # $P < 0.05$

联合 4-OHT (5 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞凋亡率增加 ($F = 15.49$, $P < 0.05$) (图 3C), 结果提示抑制 HIF-1 α 可增加乳腺癌 TAM 耐药细胞 MCF-7/TR 的化疗敏感性。

2.4 沉默 HIF-1 α 蛋白对 MCF-7/TR 细胞对 4-OHT 的敏感性的影响 Western blot 实验结果显示, 与 si-NC 组比较, si-HIF-1 α 能有效敲除 MCF-7/TR 细胞中 HIF-1 α 蛋白 ($F = 56.04$, $P < 0.01$) (图 4A); MTT 结果显示, 与空白对照组比较 (si-NC), 沉默 HIF-1 α 可增强不同浓度 4-OHT (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 对 MCF-7/TR 细胞的生长抑制作用, si-HIF-1 α + 5 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 45.86$, $P < 0.01$)、si-HIF-1 α + 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 37.86$, $P < 0.01$)、si-HIF-1 α + 20 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 36.61$, $P < 0.01$) (图 4B); 流式细胞术检测结果显示, 与 si-NC + 4-OHT (5 $\mu\text{mol/L}$) 相比, si-HIF-1 α 可增强 4-OHT 对 MCF-7/TR 细胞的抑制作用, 细胞凋亡率增加 ($F = 12.99$, $P < 0.05$) (图 4C), 结果表明 HIF-1 α 是促进乳腺癌 TAM 细胞 MCF-7/TR 耐药的重要途径。

2.5 HIF-1 α 稳定剂 FG-4592 对 4-OHT 抑制 MCF-7 细胞生长的影响 Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, FG-4592 (25 $\mu\text{mol/L}$) 可上调 MCF-7 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达 ($F = 16.76$, $P < 0.05$) (图 5A); MTT 结果显示, 与单独使用 4-OHT 相比, FG-4592 (25 $\mu\text{mol/L}$) 联合不同浓度 4-OHT (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 可降低 4-OHT 对 MCF-7 细胞的抑制率, FG-4592 + 5 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 10.49$, $P < 0.05$)、FG-4592 + 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 41.59$, $P < 0.05$)、FG-4592 + 20 $\mu\text{mol/L}$ 4-OHT ($F = 41.59$, $P < 0.05$)。

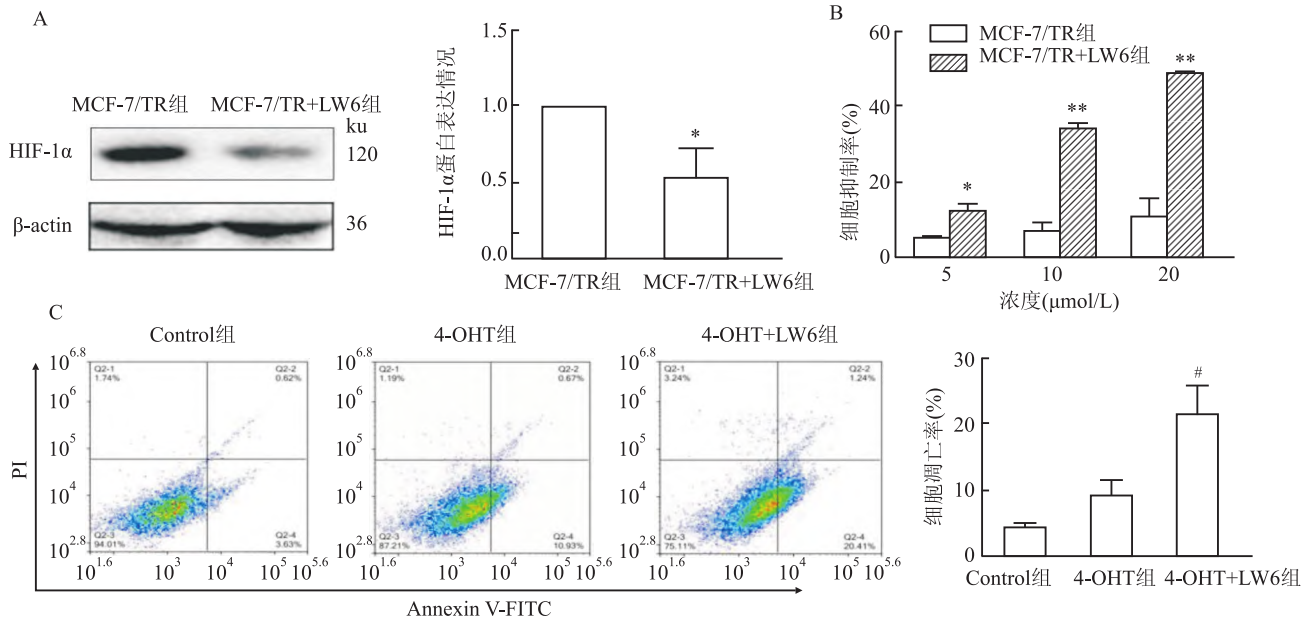


图3 HIF-1α抑制剂LW6对MCF-7/TR细胞的影响

A: Western blot 实验检测 LW6 对 MCF-7/TR 细胞 HIF-1α 蛋白表达的影响; B: MTT 实验检测 LW6 对 MCF-7/TR 细胞生长的影响; C: 流式细胞术检测 LW6 对 MCF-7/TR 细胞凋亡的影响; 与 MCF-7/TR 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 4-OHT 组比较: # $P < 0.05$

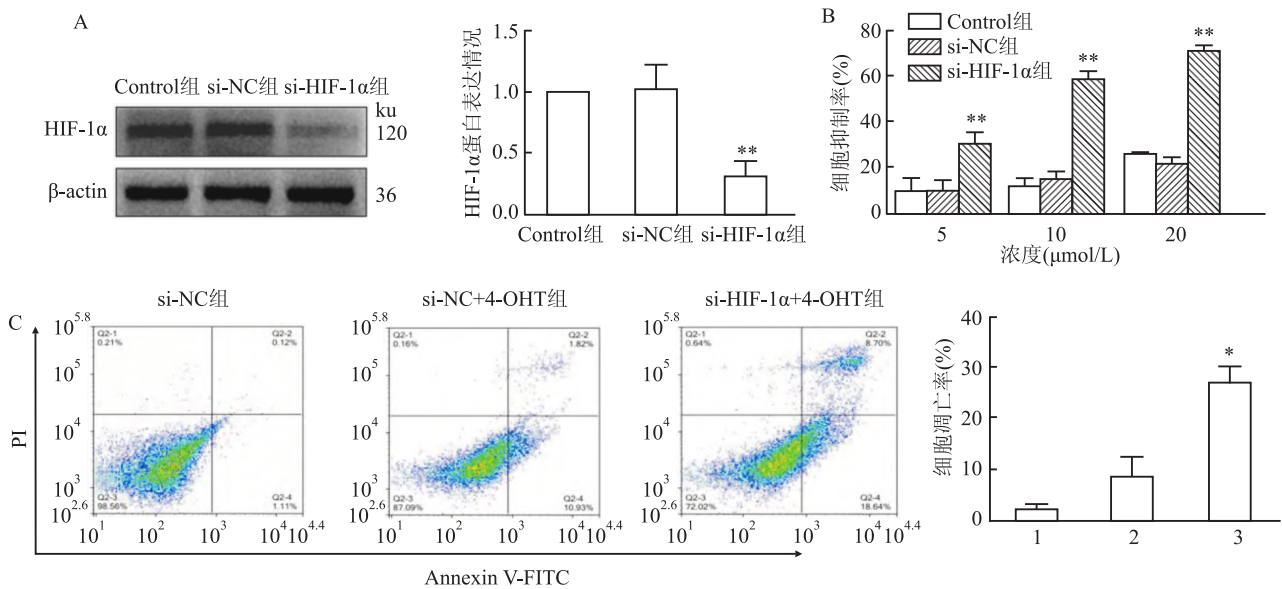


图4 沉默HIF-1α对MCF-7/TR细胞的影响

A: Western blot 实验检测 MCF-7/TR 细胞的 HIF-1 α 的蛋白表达; B: MTT 实验检测特异性敲除 HIF-1α 后 4-OHT 抑制 MCF-7/TR 细胞生长的影响; C: 流式细胞术检测沉默 HIF-1α 对 MCF-7/TR 细胞凋亡的影响; 1: si-NC 组; 2: si-NC + 4-OHT 组; 3: si-HIF-1α + 4-OHT 组; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

0.01)、FG-4592 + 20 μmol/L 4-OHT ($F = 105.80$, $P < 0.05$) (图 5B); 流式细胞术检测结果显示, 与单用 4-OHT (5 μmol/L) 组相比, 4-OHT (5 μmol/L) + FG-4592 (15 μmol/L) 组细胞凋亡率降低 ($F = 16.35$, $P < 0.05$) (图 5C)。

3 讨论

乳腺癌为激素依赖性肿瘤, 研究显示雌激素可刺激乳腺癌细胞的生长和增殖, 在乳腺癌的发生、发展及侵袭、转移中发挥重要作用^[5]。目前, 临床主

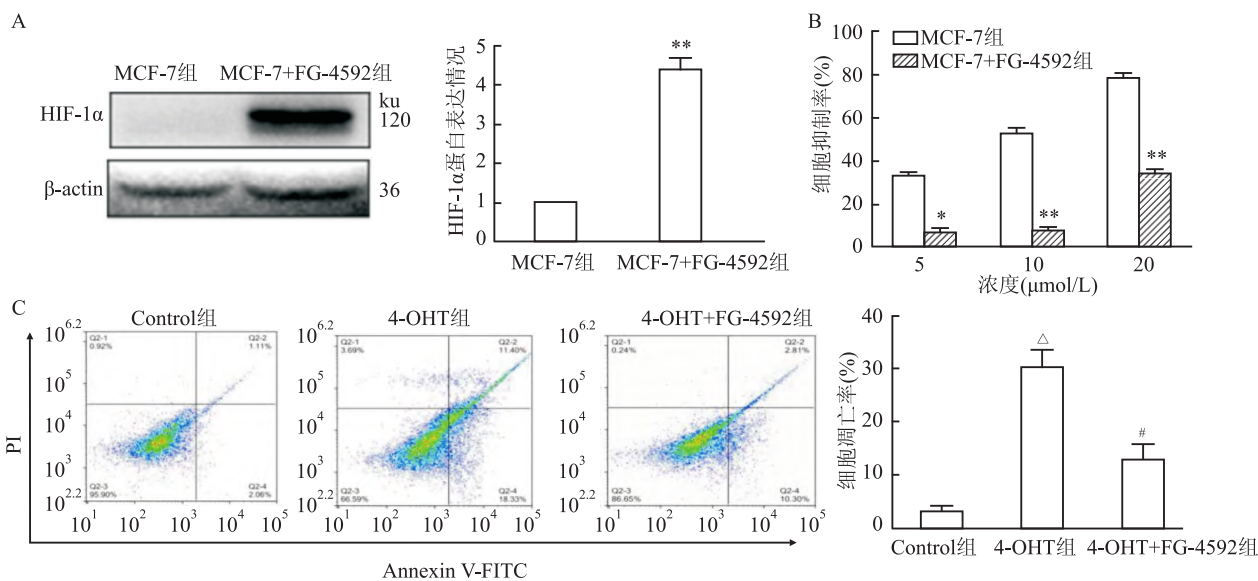


图5 HIF-1α稳定剂FG-4592对MCF-7细胞的影响

A: Western blot 实验检测 FG-4592 对 MCF-7 细胞 HIF-1α 蛋白表达的影响; B: MTT 实验检测 FG-4592 对 4-OHT 抑制 MCF-7 细胞生长的影响; C: 流式细胞术检测 FG-4592 对 MCF-7 细胞凋亡的影响; 与 MCF-7 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 4-OHT 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 Control 组比较: [△] $P < 0.05$

要应用手术、放射治疗、全身治疗和辅助内分泌治疗等方式对乳腺癌患者进行治疗,其中,内分泌治疗是 ER 阳性乳腺癌的重要治疗方式,临床应用中显示其具有低毒、预后效果和耐受性好等特点。但在内分泌治疗过程中,其疗效因耐药性而受到了限制。研究^[6]显示,最初对 TAM 治疗有反应的 ER 阳性乳腺癌在长期治疗期间敏感性逐渐降低,甚至出现复发和转移,形成继发性耐药,由于 TAM 耐药性的出现,治疗效果的降低,临床上乳腺癌病死率逐年递增。因此,探讨乳腺癌 TAM 耐药机制具有重要的研究意义。

TAM 耐药的发生与乳腺癌细胞异常代谢激活、ER 功能和表达的丧失以及基因表达谱的改变密切相关^[7]。近年来研究^[8-9]显示 TAM 的活性形式 4-OHT 可诱导 HK-2 蛋白高表达促进 MCF-7 细胞对 4-OHT 抵抗,同时研究显示脯氨酰羧肽酶(PRCP)活性的增加也介导了 4-OHT 的耐药过程,但是其确切的耐药机制仍需探索。既往研究^[10]表明, HIF-1α 在肿瘤细胞中的水平升高与病死率、癌症进展和抵抗治疗有关,且其表达与 ERα 阳性乳腺癌患者内分泌治疗耐药呈正相关^[11]。HIF-1α 在常氧条件下会被脯氨酸羟化酶(PHD)羟基化,再被 VHL 肿瘤抑制蛋白复合物识别后通过泛素蛋白酶途径降解^[12]。而在乳腺癌耐药细胞中,即使是常氧条件, HIF-1α 也呈现高表达^[13],而 HIF-1α 是否影响耐药细胞对

4-OHT 敏感性仍不清楚。为了探讨 HIF-1α 与乳腺癌 MCF-7 细胞 4-OHT 耐药之间是否存在联系,该研究采用免疫印迹分析 MCF-7/TR 细胞及其亲本细胞中 HIF-1α 的表达水平,研究表明 HIF-1α 在 MCF-7/TR 细胞中高表达,而在亲本细胞中几乎不表达。在给予低剂量的 4-OHT 作用后, MCF-7/TR 细胞中 HIF-1α 水平进一步增加,这提示 HIF-1α 可能参与乳腺癌细胞对 4-OHT 的耐药过程中。目前已有研究^[14]表明抑制 HIF-1α 表达可体外抑制乳腺癌耐药蛋白并增加肿瘤细胞的化学敏感性。为了验证这一结论,该研究向 MCF-7/TR 细胞中加入 HIF-1α 抑制剂、MCF-7 细胞中加入 HIF-1α 稳定剂,同时采用小分子 siRNA 干扰技术和流式细胞术探讨 4-OHT 对 MCF-7/TR 细胞影响。结果显示,在敲除 HIF-1α 蛋白或者加入 HIF-1α 抑制剂后, 4-OHT 对 MCF-7/TR 生长抑制作用增强,细胞凋亡率增加;而在 MCF-7 细胞中加入稳定剂 FG-4592 后, 4-OHT 对 MCF-7 生长抑制作用减弱,细胞凋亡率降低。

综上所述,该研究表明 HIF-1α 在 4-OHT 耐药乳腺癌 MCF-7/TR 细胞中具有重要作用,抑制 HIF-1α 表达可增加 MCF-7/TR 细胞对 4-OHT 的敏感性,因此, HIF-1α 有望成为乳腺癌 TAM 耐药治疗的新靶点。但是,该研究对于 HIF-1α 调控乳腺癌 4-OHT 耐药的详细机制尚未阐明,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 荆 凤,邢唯杰,裴佳佳,等. 乳腺癌患者内分泌治疗相关症状的调查研究[J]. 中华护理杂志, 2021, 56(5): 737-43.
- [2] 李涌涛,齐新海,巴合提·哈立亚,等. 激素受体阳性乳腺癌患者 CYP2D6 基因多态性及拷贝数变异与他莫昔芬治疗预后的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(10): 1614-8.
- [3] Dewangan J, Srivastava S, Mishra S, et al. Salinomycin inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 α /VEGF mediated tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 164: 326-35.
- [4] Tsubaki M, Takeda T, Tomonari Y, et al. Overexpression of HIF-1 α contribute to melphalan resistance in multiple myeloma cells by activation of ERK1/2, Akt, and NF- κ B [J]. Lab Invest, 2019, 99(1): 72-84.
- [5] Wang J, Hong D Y, Chen L, et al. Effects of GPER inhibitors on the growth and colony formation of MCF-12A mammary epithelial cells induced by estrogen for a long time [J]. Chin J Hosp Pharm, 2017, 37(3): 235-8.
- [6] 张璟钰,陈宗跃,刘婷婷,等. 3-溴丙酮酸增加 MCF-7/TR 耐药细胞对他莫昔芬的敏感性[J]. 药学报, 2020, 55(10): 2392-7.
- [7] 陈卓婷,陈小东. 乳腺癌他莫昔芬耐药机制的研究进展[J]. 海南医学, 2019, 30(6): 808-11.
- [8] Liu X, Miao W, Huang M, et al. Elevated hexokinase II expression confers acquired resistance to 4-hydroxytamoxifen in breast cancer cells [J]. Mol Cell Proteomics, 2019, 18(11): 2273-84.
- [9] Duan L, Motchoulski N, Danzer B, et al. Prolylcarboxypeptidase regulates proliferation, autophagy, and resistance to 4-hydroxytamoxifen-induced cytotoxicity in estrogen receptor-positive breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2011, 286(4): 2864-76.
- [10] Li S, Li J, Dai W, et al. Genistein suppresses aerobic glycolysis and induces hepatocellular carcinoma cell death [J]. Br J Cancer, 2017, 117(10): 1518-28.
- [11] Jia X, Hong Q, Lei L, et al. Basal and therapy-driven hypoxia-inducible factor-1 α confers resistance to endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(11): 8648-62.
- [12] 程 诚. 延迟低氧条件下 E3 泛素连接酶 p53RFP 介导 HIF-1 α 降解机制的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [13] Li X, Wu Y, Liu A, et al. Long non-coding RNA UCA1 enhances tamoxifen resistance in breast cancer cells through a miR-18a-HIF1 α feedback regulatory loop [J]. Tumor Biol, 2016, 37(11): 14733-43.
- [14] Song J G, Lee Y S, Park J A, et al. Discovery of LW6 as a new potent inhibitor of breast cancer resistance protein [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(4): 735-44.

Study on HIF-1 α regulating the sensitivity of 4-hydroxytamoxifen to breast cancer MCF-7 cells

Chen Zongyue^{1,2}, Zhang Jingyu¹, Zhang Minqin¹, Fan Shuangqin¹, Shen Xiangchun¹, Chen Yan¹, Zhang Yue¹

(¹Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; ²Guiyang Healthcare Vocational University, Guiyang 550081)

Abstract Objective To explore the effect of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) on tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7, and to establish a human breast cancer cell line (MCF-7/TR) with 4-hydroxy tamoxifen (4-OHT) resistance. **Methods** 4-OHT was an active form of tamoxifen *in vivo*, resistant breast cancer cells MCF-7/TR were established *in vitro* using 4-OHT. MTT assay was used to detect the effect of 4-OHT on the MCF-7 and MCF-7/TR cells, and the drug resistance multiple was detected. Western blot was used to detect the expression level of HIF-1 α protein in MCF-7 and MCF-7/TR cells. The effects of HIF-1 α inhibitor (LW6) or siRNA HIF-1 α on MCF-7/TR cells and 4-OHT on MCF-7 cells treated with HIF-1 α stabilizer (FG-4592) were detected by MTT and flow cytometry AV/PI staining. **Results** The results showed that the MCF-7/TR was successfully constructed, and the drug resistance ratio was (5.56 $\pm$ 0.80). Compared with MCF-7 cells, MCF-7/TR cells had higher expression of HIF-1 α protein and it was up-regulated after tamoxifen treatment. After giving LW6 or silencing the expression of HIF-1 α , the down-regulation of HIF-1 α expression enhanced the inhibitory effect of 4-OHT on MCF-7/TR cells. After treatment of FG-4592, the expression level of HIF-1 α in breast cancer cells MCF-7 was up-regulated, and hindered the inhibition effect of tamoxifen on MCF-7 cells. **Conclusion** The above results indicate that HIF-1 α plays an important role in 4-OHT resistant breast cancer, and targeting HIF-1 α may be an effective way to increase the sensitivity of MCF-7/TR cells to tamoxifen.

Key words breast cancer; resistance; 4-hydroxy tamoxifen; hypoxia induced factor 1 α