



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.06.012  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2018.06.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(6):732-739.

· 基础研究 ·

## 紫杉醇诱导三阴性乳腺癌细胞自噬相关蛋白 LC3 的表达及其作用

吴至佛, 姚晓艺, 汪灵, 邓增艳, 石静, 黄俊辉

(中南大学湘雅医院 肿瘤科, 湖南 长沙 410008)

### 摘要

**目的:** 探讨紫杉醇对三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞自噬相关蛋白 LC3 表达的影响及意义。

**方法:** 用 CCK-8 法测定紫杉醇对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 增殖的抑制作用及 25% 抑制浓度 ( $IC_{25}$ ) ; 用  $IC_{25}$  浓度的紫杉醇作用 MDA-MB-231 细胞后, 分别用免疫荧光化学法、Western blot、流式细胞术检测细胞 LC3 与凋亡相关蛋白的表达及细胞的凋亡率。

**结果:** 紫杉醇呈浓度依赖性抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 其  $IC_{25}$  为  $3.11 \mu\text{g/mL}$ 。  $IC_{25}$  浓度的紫杉醇处理后, MDA-MB-231 细胞后 LC3 的表达量以及 LC3B/LC3A 比例明显升高、凋亡蛋白 Bax 与 caspase-3 蛋白表达量明显降低、总凋亡率与早期凋亡率均降低 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 紫杉醇可诱导 TNBC 细胞自噬相关蛋白 LC3 表达升高, 该作用可能降低细胞凋亡, 从而导致 TNBC 细胞产生紫杉醇耐药。

### 关键词

三阴性乳腺癌; 抗药性, 肿瘤; 自噬; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9

## Paclitaxel induced expression of autophagy-associated protein LC3 in triple negative breast cancer cells and its action

WU Zhifo, YAO Xiaoyi, WANG Ling, DENG Zengyan, SHI Jing, HUANG Junhui

(Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the influence of paclitaxel on expression of autophagy-associated protein LC3 in triple negative breast cancer (TNBC) cells and the significance.

**Methods:** The inhibitory effect of paclitaxel on proliferation of TNBC MDA-MB-231 cells was determined by CCK-8 assay and then the 25% inhibition concentration ( $IC_{25}$ ) value was calculated. In MDA-MB-231 cells after treatment with  $IC_{25}$  concentration of paclitaxel, the expressions of LC3 protein and apoptosis-associated proteins as well as the cell apoptosis rates were determined by immunofluorescence histochemistry, Western blot analysis and flow cytometry, respectively.

**Results:** The proliferation effect of TNBC-MDA-MB-231 cells was significantly inhibited by paclitaxel in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ), with an  $IC_{25}$  value of  $3.11 \mu\text{g/mL}$ . In MDA-MB-231 cells after

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (11jj3122); 中南大学研究生自主探索创新基金资助项目 (2016zzts531)。

收稿日期: 2018-03-13; 修订日期: 2018-05-19。

作者简介: 吴至佛, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事肿瘤基础与临床治疗方面的研究。

通信作者: 黄俊辉, Email: 808003@csu.edu.com

treatment with 3.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  paclitaxel, the expression level of LC3 protein as well as LC3B/LC3A ratio were significantly increased, the expression levels of the apoptosis-related protein Bax and caspase-3 were significantly decreased, and the total and early apoptosis rates were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Paclitaxel can induce the increased expression of the autophagy-related protein LC3, and this action may probably reduce the cell apoptosis and thereby cause paclitaxel resistance in TNBC cells.

**Key words**

Triple Negative Breast Neoplasms; Drug Resistance, Neoplasm; Autophagy; Apoptosis

**CLC number:** R737.9

随着分子生物学技术的发展,乳腺癌分子学检测已被临床广泛应用。根据雌激素受体(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, Her-2)表达情况以及乳腺癌肿瘤细胞增殖指数(Ki-67)的不同,临床将乳腺癌分为Luminal A型、Luminal B型、Her-2型和三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)4个亚型<sup>[1]</sup>。其中, TNBC是一类特殊生物学行为的乳腺癌,约占乳腺癌的15%~20%<sup>[2]</sup>。综述文献发现, TNBC多发生于绝经前的年轻女性、黑色人种发病率高于白人、病理组织学分级高、侵袭性强、易早期复发和转移、临床预后较差<sup>[3-6]</sup>,对ER及PR为受体的内分泌治疗无效<sup>[7]</sup>, Her-2为靶点的靶向药物治疗不敏感<sup>[8]</sup>。因此,除手术、放疗之外,化疗在TNBC的治疗中显得尤为重要。无论是TNBC还是非TNBC的化疗,紫杉醇是重要的化疗药物之一<sup>[9]</sup>,但临床经常出现紫杉醇耐药的现象<sup>[10]</sup>。肿瘤耐药既是一种常见现象,又是一个复杂而尚未解决的难题,虽然有各种理论和推测解释化疗药物耐药的机制,但目前仍无根本性进展。据报道<sup>[11]</sup>,肿瘤细胞的自噬(autophagy)与化疗耐药有关。目前,自噬与肿瘤发生及其耐药研究越来越受到学者们的重视,已成为肿瘤耐药机制研究的热点之一<sup>[12]</sup>。自噬相关基因8(autophagy-related gene 8, Atg8)在哺乳动物被称为微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein1 light chain3, MAP1-LC3, 简称LC3)<sup>[13]</sup>,对自噬泡的形成必不可少,是LC3是自噬的重要标记物。有文献<sup>[14-15]</sup>报道肺癌A549细胞、人胶质瘤U87细胞、卵巢癌顺铂耐药细胞SK-OV/DDP和乳腺癌MCF-7细胞的紫杉醇耐药与自噬相关基因相关,但机制不清楚。为探讨LC3在TNBC中与紫杉醇敏感性的关系,本研究以人

TNBC细胞MDA-MB-231为研究对象,研究不同浓度紫杉醇与LC3表达的关系,以及对肿瘤细胞凋亡的影响,为今后进一步寻找紫杉醇耐药靶点提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人TNBC细胞MDA-MB-231系由中南大学肿瘤研究所馈赠, LC3阳性细胞MCF-7为本实验建株,紫杉醇购自浙江海正制药公司,荧光标记Anti-LC3 A/B兔单克隆抗体、荧光标记山羊抗兔IgG-HRP购自南京赛泓瑞公司, Bax兔单克隆抗体、山羊抗鼠IgG-HRP、 $\beta$ -actin、山羊抗兔IgG-HRP购自SANTA公司, caspase-3兔单克隆抗体购自Abcam公司, LC3 A/B兔单克隆抗体购自CST公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** MDA-MB-231细胞培养于含10%胎牛血清、1 mL/100 mL青链霉素的二抗混合液的高糖DMEM培养液,青链霉素混合液双抗用于预防细胞培养的细菌污染。产品经过滤除菌处理,可以直接添加到细胞培养液内。青霉素的含量为10 kU/mL,链霉素的含量为10 mg/mL。在细胞培养液中推荐的青霉素的工作浓度为100 U/mL,链霉素的工作浓度为0.1 mg/mL。37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养,每2~3天更换培养液,观察细胞的生长状态并进行细胞传代备用。

**1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖抑制** 取对数生长期MDA-MB-231细胞,接种于96孔板内,每孔约100  $\mu\text{L}$ 。分为实验组(MDA-MB-231细胞+紫杉醇)和对照组(仅有MDA-MB-231细胞),根据紫杉醇浓度不同又将实验组分为0.5、1、2、5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  6个亚组。每组设置3个平行孔,置37  $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h,每孔加入约10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶

液, 孵育 1 h。将 96 孔板置于摇床充分混匀 1 min, 酶标仪检测 450 nm 波长下每孔的 OD 值, 代入以下公式计算细胞生长抑制率: 肿瘤细胞增值抑制率 (%) = (实验组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。绘制生长曲线, 计算出紫杉醇对 MDA-MB-231 细胞增殖的 25% 抑制浓度 (IC<sub>25</sub>), 用于后续实验。

**1.2.3 免疫荧光法检测 LC3 表达** 为观察紫杉醇对 MDA-MB-231 细胞 LC3 表达的影响, 设置实验组 (MDA-MB-231+IC<sub>25</sub> 浓度紫杉醇) 和对照组 (MDA-MB-231+ 高糖 DMEM 稀释成工作浓度)。用胰蛋白酶-EDTA 溶液将实验组和对照组细胞消化, 离心, 收集下层细胞沉淀。将收集的细胞用完全培养液重悬、计数、调整好细胞密度。将调整好密度的细胞悬液分别加入每个玻片培养小室, 每个约 1 mL, 孵育 24 h 后在各组细胞中按设计方案加入紫杉醇, 再次孵育 72 h 后, 弃去培养液, PBS 洗涤 2 min。3% 多聚甲酸 4 °C 下固定 30 min。PBS 洗涤。加入一抗及荧光素标记的相关二抗, 室温避光 1 h, PBS 洗涤。每小室加入 To-Pro3 (1:1 000), 室温下避光 5 min, PBS 洗涤。甘油封片, 荧光显微镜观察并拍照。Motic Fluo 1.0 软件测定各组积分光密度值 (integrated optical density, IOD) 值。

**1.2.4 Western blot 检测 LC3 表达** 一抗 LC3 工作浓度为 1:800, 内参 β-actin 为 1:1 000, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体。按 1.2.3 方法设置实验组与对照组。取对数生长期细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度约 1 × 10<sup>7</sup> 个 /mL; 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心后收集到 1.5 mL EP 管中; 加入细胞裂解液, 超声破碎仪进一步破碎, 12 000 r/min 转速离心 10~20 min, 取上清液转移至另一离心管中, 震荡混匀。按 0、1、2、4、6、8、10 μL 含量将其加到 96 孔板标准品孔中, 每孔均用灭菌双蒸水补足到 10 μL, 每个样本设置 3 个平行孔; 每孔加入 BCA 工作液 200 μL 孵育 30 min; 多功能酶标仪测量 OD<sub>562 nm</sub> 波长时的吸光度, 制作标准曲线, 计算各组蛋白浓度。以 4:1 的比例将剩余蛋白加入 SDS 上样缓冲液, 在 100 °C 高温放置 5 min 变性, SDS-PAGE 凝胶电泳, 电转移至 PVDF 膜。将转好的膜放入含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭。先后加入一抗、二抗孵育, 室温下 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5~10 min; 取 ECL 化学发光试

剂显影。通过化学发光凝胶成像分析系统进行扫描图像上的信号条带, 并用 Image J 图像分析软件对条带灰度进行数字量化, 计算光密度值 (optical density, OD)。上述实验重复 3 次。

**1.2.5 凋亡相关蛋白与细胞凋亡检测** 将待检细胞分为实验组 (MDA-MB-231+IC<sub>25</sub> 浓度紫杉醇)、阳性对照组 (LC3 阳性 MCF-7+IC<sub>25</sub> 浓度紫杉醇) 和阴性对照组 (仅有 MDA-MB-231)。参照 1.2.4 方法应用 Western blot 检测各组细胞凋亡相关因子 Bax、capase-3 蛋白的表达。流式细胞术检测细胞早期凋亡率和总凋亡率。IC<sub>25</sub> 浓度为紫杉醇工作浓度, Bax 为 1:300、capase-3 为 1:5 000, 内参 β-actin 为 1:1 000。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 计量资料两组比较采用 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, 检验水准为 α = 0.05, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。免疫荧光法图像采用 Motic Fluo 1.0 软件处理测定各组 IOD 值、Western blot 图像灰度值采用 Image J 软件分析、所有图片通过 GraphPad Prism 5 软件完成。

## 2 结果

### 2.1 紫杉醇对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

用不同浓度紫杉醇 (0.5~20 μg/mL) 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后, CCK-8 法检测细胞活性, 绘制生长抑制曲线 (表 1) (图 1), 结果显示, 随着紫杉醇浓度增高, MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率逐渐增加, 呈浓度依赖性 (*P* < 0.05), 经计算, 紫杉醇 IC<sub>25</sub> 为 3.11 μg/mL, 选择 IC<sub>25</sub> 作为后续实验浓度。

表 1 不同浓度紫杉醇作用后的 OD 值与细胞生长抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 OD values and cell growth inhibition rates after treatment of different concentrations of paclitaxel ( $\bar{x} \pm s$ )

紫杉醇浓度 (μg/mL)	OD 值	抑制率 (%)
0	0.624 ± 0.007	—
0.5	0.595 ± 0.009	4.738 ± 1.254
1	0.543 ± 0.009	13.278 ± 2.349
2	0.496 ± 0.010	21.157 ± 1.669
5	0.471 ± 0.004	25.234 ± 1.309
10	0.314 ± 0.013	51.184 ± 2.171
20	0.214 ± 0.013	67.713 ± 1.889

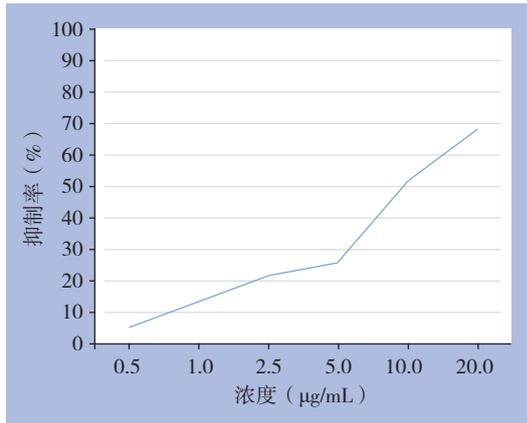


图1 不同浓度紫杉醇下MDA-MB-231细胞生长曲线  
Figure 1 Survival curve of MDA-MB-231 cells under different concentrations of paclitaxel

## 2.2 紫杉醇对MDA-MB-231细胞LC3表达的影响

应用免疫荧光化学法和Western blot分别从定性与定量两方面检测紫杉醇对MDA-MB-231细胞LC3表达的影响,在荧光显微镜下观察(图2),与对照组比较,实验组细胞中代表LC3的红色荧光亮度增多增强,主要分布于细胞核周围的细胞质中。统计分析结果显示,实验组IOD值较对照组明显增高( $P=0.0018$ )。

LC3分为LC3A和LC3B两种亚型,自噬时主要以LC3B形式存在。Western blot结果显示,对照组LC3B/LC3A相对含量为 $0.9657 \pm 0.0685$ ,实验组为 $1.6394 \pm 0.0282$ ,与对照组比较,实验组LC3B/LC3A比例明显提高( $P=0.0009$ )(图3)。

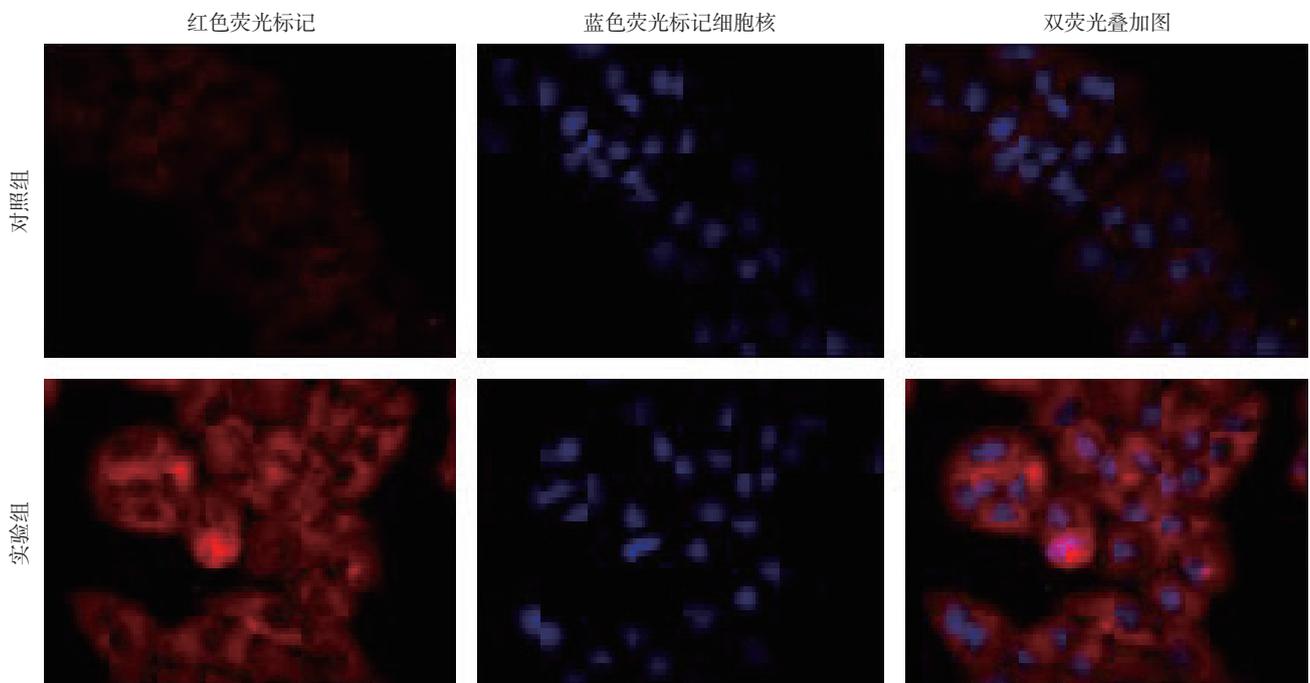


图2 免疫荧光法检测LC3表达  
Figure 2 Immunofluorescence staining for LC3 expression

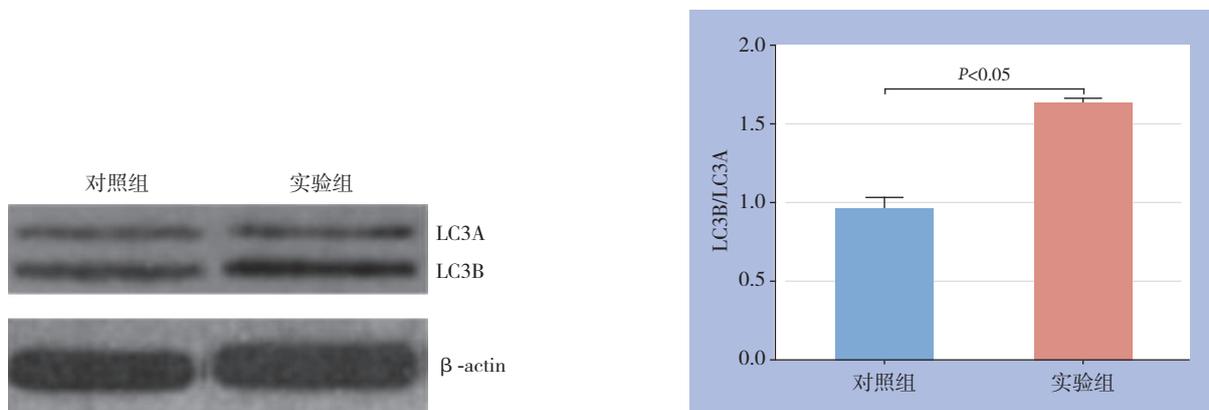


图3 Western blot检测LC3蛋白表达  
Figure 3 Western blot analysis for LC3 protein expression

### 2.3 凋亡相关蛋白及细胞凋亡情况检测

Western blot结果显示, 实验组和阳性对照组Bax蛋白表达较阴性对照组明显降低 ( $P=0.005$ 、 $0.0004$ ), 而实验组与阳性对照组之间无统计学

差异 ( $P=0.2847$ ); 实验组与阳性对照组caspase-3蛋白的表达也较阴性对照组低 ( $P=0.0034$ 、 $0.0032$ ), 而实验组与阳性对照组之间无统计学差异 ( $P=0.9599$ ) (图4)。

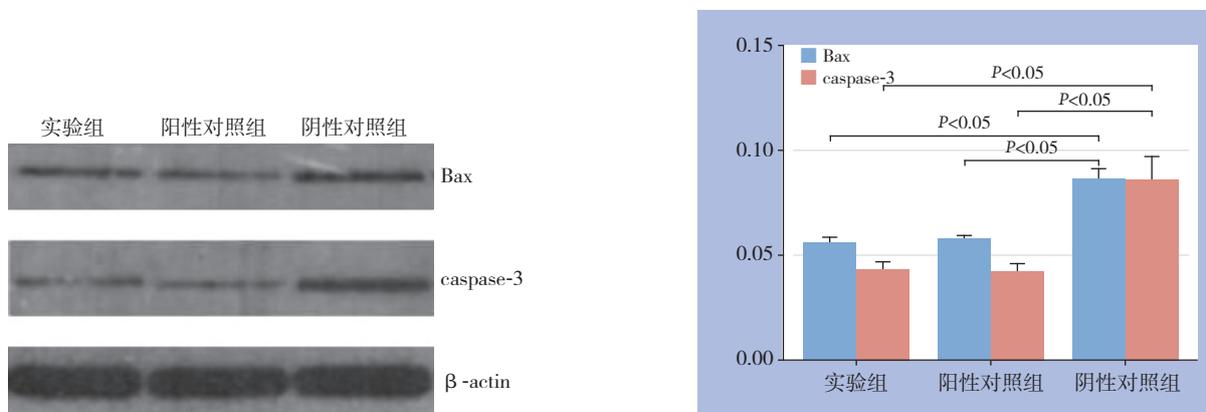


图4 Western blot 检测 Bax、caspase-3 蛋白表达

Figure 4 Western blot analysis for Bax and caspase-3 protein expressions

流式细胞术检测结果显示, 实验组细胞总凋亡率为 ( $10.21 \pm 0.03$ )%、阳性对照组为 ( $11.99 \pm 0.15$ )%、阴性对照组为 ( $25.06 \pm 0.03$ )%, 实验组和阳性对照组的细胞总凋亡率均低于阴性对照组 ( $P=0.0056$ 、 $0.0067$ ); 实验组细胞早期凋亡率为 ( $6.53 \pm 0.06$ )%、阳

性对照组为 ( $6.28 \pm 0.06$ )%、阴性对照组为 ( $12.74 \pm 0.07$ )%, 实验组和阳性对照组的早期凋亡率均低于阴性对照组 ( $P=0.0035$ 、 $0.0039$ )。实验组与阳性对照组细胞总凋亡率、早期凋亡率均无统计学差异 ( $P=0.6744$ 、 $0.4506$ ) (图5)。

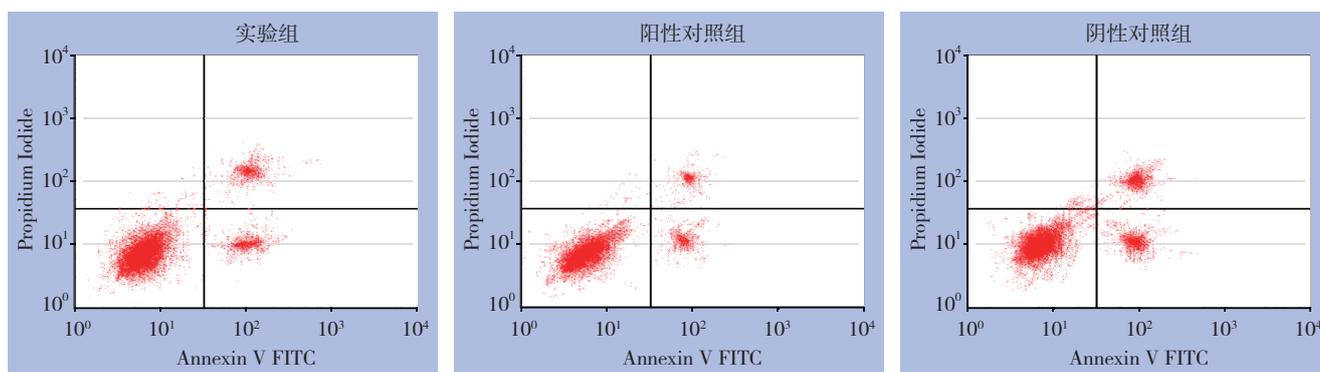


图5 流式细胞术检测细胞凋亡

Figure 5 Apoptosis analysis by flow cytometry

## 3 讨论

乳腺癌已成为女性第一位的恶性肿瘤, 严重威胁妇女的生命健康。其中TNBC约占所有乳腺癌的15%~20%, 具有发病年龄较小、分化差、侵袭性强、容易复发和转移、临床预后较差的特点。因缺乏ER、PR和Her-2表达, 对以ER、PR为靶

点的内分泌治疗和以Her-2为靶点的靶向药物治疗不敏感, 成为临床预后较差的乳腺肿瘤。TNBC除手术、放疗外, 化疗是其主要治疗手段之一。多个大型临床研究和诊疗指南均推荐含紫杉类和(或)蒽环类的化疗方案作为TNBC化疗的首选方案<sup>[16-18]</sup>。本研究应用CCK-8检测人MDA-MB-231细胞对紫杉醇的抗肿瘤作用, 结果显示随着紫杉醇

浓度的提高,MDA-MB-231细胞的增值抑制率逐渐增加,呈浓度依赖性,提示紫杉醇在体外细胞中能抑制MDA-MB-231细胞的增殖而发挥抗肿瘤作用。当紫杉醇浓度为3.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,肿瘤细胞增殖抑制率达到25% ( $\text{IC}_{25}$ ),与笔者前期实验相符<sup>[19]</sup>。文献<sup>[11]</sup>报道和笔者的前期研究均证实,紫杉醇在用药一段时间后出现药物敏感性下降,产生耐药性<sup>[20-22]</sup>,在一定程度上限制了紫杉醇在临床中的应用。

肿瘤耐药是一个复杂的过程,虽然有多种学说解释肿瘤细胞耐药产生的机制,但均未能完全解决问题。在已报道的众多耐药机制研究中,包括了肿瘤细胞的自噬。自噬是细胞维持自身稳定性的生理过程,是溶酶体降解途径,通过细胞的自噬作用而降解或清除不需要的代谢产物或(和)损伤的细胞器,或重新利用降解后的生物大分子和能量,以维持细胞的稳定状态<sup>[23]</sup>。根据自噬底物运送至溶酶体腔方式的不同,自噬可分为大自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)3种。自噬过程由自噬相关基因(autophagy associated gene, Atg)介导,多种上下游调控信号途径传导,主要有依赖mTOR(mammalian target of rapamycin, mTOR)和非依赖mTOR途径,如Class III PI3K、P53、RAS-MAPK等<sup>[24]</sup>。Atg最初是在酵母菌中被发现,迄今为止已鉴定出30余种直接参与自噬形成以及调控的相关基因。LC3分为LC3I(或LC3A)和LC3II(或LC3B)2种形式,Atg7在Atg4的参与下活化形成LC3A,并在Atg3的协同下与磷脂酰乙醇胺结合,形成LC3B。LC3B具有融合特性,定位于自噬体膜上,可促进自噬泡的延伸<sup>[14]</sup>,因此LC3是自噬的重要标记物<sup>[25]</sup>。

近年来研究发现自噬参与多种生理病理过程,如组织发育、分化、抗衰老、免疫调节、清除微生物,以及肿瘤的发生与发展等<sup>[26-27]</sup>。正常情况下细胞的自噬作用主要是维持细胞的稳定状态,但在某些情况下,如饥饿、低氧、药物等因素可以改变细胞自噬水平,使其提高或降低自噬能力。自噬与肿瘤的发展及耐药密切相关,化疗、放疗和内分泌治疗均可诱导肿瘤细胞发生自噬<sup>[28]</sup>。文献<sup>[14-15]</sup>报道显示,在肺癌A549细胞、

人胶质瘤U87细胞、卵巢癌顺铂耐药细胞SK-OV/DDP、乳腺癌MCF-7细胞的研究中,均发现紫杉醇能诱导肿瘤细胞发生自噬。本实验中应用免疫荧光法及Western blot检测均证实,紫杉醇作用于MDA-MB-231细胞后,与对照组相比,自噬相关蛋白LC3 B/A的分布增多,含量增高,证实紫杉醇可诱导MDA-MB-231发生自噬。

为进一步证实紫杉醇诱导MDA-MB-231细胞上调LC3(LC3B/LC3A)的情况下,紫杉醇对MDA-MB-231细胞凋亡的影响,本实验进一步检测了不同情况下的MDA-MB-231细胞的凋亡相关因子caspase-3及Bax蛋白水平表达和肿瘤细胞凋亡率。与未发生LC3蛋白表达变化的细胞组相比,实验组与LC3阳性细胞组的相关凋亡蛋白Bax和caspase-3降低,流式细胞术检测早期凋亡率和总凋亡率下降,提示LC3的存在降低了紫杉醇对MDA-MB-231细胞的敏感性。文献<sup>[29-30]</sup>报道,自噬相关蛋白LC3是一种微管结合蛋白,在自噬过程中LC3被转化形成溶于细胞质的LC3A并被Atg5募集向自噬体膜,最后被转化形成LC3B,定位于自噬体膜上募集脂质分子,保证自噬体膜的进一步扩展并封闭。紫杉醇作用靶点是微管,诱导自噬相关蛋白LC3表达变化可能与此有关。

结合本研究 and 文献报道资料,笔者认为紫杉醇作为化疗药物,一方面对MDA-MB-231细胞有抑制作用,同时又能诱导MDA-MB-231细胞引起自噬相关蛋白LC3表达变化,并在此基础上可降低紫杉醇对MDA-MB-231细胞的促凋亡效应。提示LC3可能通过调节肿瘤细胞的自噬而影响紫杉醇的耐药性,可能作为未来研究TNBC紫杉醇耐药,提高药物敏感性的新靶点。

#### 参考文献

- [1] 高国璇, 辛灵, 刘倩, 等. St Gallen国际乳腺癌会议专家共识10年历程回顾[J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(1):70-72.  
Gao GX, Xin L, Liu Q, et al. Review for the St Gallen international expert consensus from 2003 to 2013[J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2014, 34(1):70-72.
- [2] Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy[J]. Cancer, 2015, 121(1):8-16. doi: 10.1002/cncr.28914.
- [3] Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer

- subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study[J]. *JAMA*, 2006, 295(21):2492–2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
- [4] Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer[J]. *Clin Breast Cancer*, 2009, 9(Suppl 2):S73–81. doi: 10.3816/CBC.2009.s.008.
- [5] Rody A, Karn T, Solbach C, et al. The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial[J]. *Breast*, 2007, 16(3):235–240. doi: 10.1016/j.breast.2007.02.006.
- [6] Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20):1938–1948. doi: 10.1056/NEJMra1001389.
- [7] Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2016, 293(2):247–269. doi: 10.1007/s00404-015-3859-y.
- [8] Sharma P. Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer[J]. *Oncologist*, 2016, 21(9):1050–1062. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0067.
- [9] Mustacchi G, De Laurentiis M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:4303–4318. doi: 10.2147/DDDT.S86105.
- [10] Murray S, Briasoulis E, Linardou H, et al. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(7):890–903. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.02.011.
- [11] Kumar P, Zhang DM, Degenhardt K, et al. Autophagy and transporter-based multi-drug resistance[J]. *Cells*, 2012, 1(3):558–575. doi: 10.3390/cells1030558.
- [12] Panzarini E, Dini L. Nanomaterial-induced autophagy: a new reversal MDR tool in cancer therapy?[J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(8):2527–2538. doi: 10.1021/mp500066v.
- [13] Noda NN, Inagaki F. Mechanisms of Autophagy[J]. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44:101–122. doi: 10.1146/annurev-biophys-060414-034248.
- [14] Zhang Q, Si S, Schoen S, et al. Suppression of autophagy enhances preferential toxicity of paclitaxel to folliculin-deficient renal cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32:99. doi: 10.1186/1756-9966-32-99.
- [15] Xi G, Hu X, Wu B, et al. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2011, 307(2):141–148. doi: 10.1016/j.canlet.2011.03.026.
- [16] Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need[J]. *Oncologist*, 2011, 16(Suppl 1):1–11. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-01.
- [17] Ghersi D, Willson ML, Chan MM, et al. Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, (6):CD003366. doi: 10.1002/14651858.CD003366.
- [18] Rapoport BL, Nayler S, Demetriou GS, et al. Triple-negative breast cancer pathologic diagnosis and current chemotherapy treatment options[J]. *Oncol Hematol Rev*, 2014, 10(1):25–32. doi: http://doi.org/10.17925/OHR.2014.10.1.25.
- [19] 刘利, 杨农, 邱霞, 等. 叶酸及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与乳腺癌细胞多药耐药的相关性分析[J]. *现代肿瘤学*, 2015, 23(3):306–310.
- Liu L, Yang N, Qiu X, et al. Correlation of folate and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and multidrug resistant breast cancer cells[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2015, 23(3):306–310.
- [20] 吴至佛, 汪灵, 黄俊辉. 三阴性乳腺癌的生物标记物研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(11):1472–1477. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.016.
- Wu ZF, Wang L, Huang JH. Research progress on biomarkers of triple-negative breast cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(11):1472–1477. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.016.
- [21] 黄俊辉, 张铁, 黄玉婷, 等. MIF对耐ADM人乳腺癌细胞MCF-7/ADM体内外耐药逆转作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(6):576–583.
- Huang JH, Zhang T, Huang YT, et al. Reversal effect of mifepristone on adriamycin resistance in human breast cancer cell line MCF-7/ADM in vitro and in vivo[J]. *Journal of Central South University: Medical Sciences*, 2010, 35(6):576–583.
- [22] 邱霞, 杨国荣, 刘利, 等. Wnt5a基因在乳腺癌细胞株MCF-7中的表达及其与E-钙黏蛋白、波形蛋白基因的关系[J]. *肿瘤研究与临床*, 2016, 28(10):649–653. doi:10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2016.10.001.
- Qiu X, Yang GR, Liu L, et al. Expression of Wnt5a gene in breast cancer cell line MCF-7 and its relationship with E-cadherin or vimentin[J]. *Cancer Research and Clinic*, 2016, 28(10):649–653. doi:10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2016.10.001.
- [23] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4):728–741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- [24] Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4):664–673. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.014.
- [25] Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, et al. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization[J]. *Genes Cells*, 2007,

- 12(2):209–218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x.
- [26] Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases[J]. Cell Res, 2014, 24(1):69–79. doi: 10.1038/cr.2013.161.
- [27] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(6):401–410. doi: 10.1038/nrc3262.
- [28] Janku F, McConkey DJ, Hong DS, et al. Autophagy as a target for anticancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(9):528–539. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.71.
- [29] Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy[J]. BMB Rep, 2016, 49(8):424–430.
- [30] Alonso S, Pethe K, Russell DG, et al. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(14):6031–6036. doi: 10.1073/pnas.0700036104.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 吴至佛, 姚晓艺, 汪灵, 等. 紫杉醇诱导三阴性乳腺癌细胞自噬相关蛋白LC3的表达及其作用[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(6):732–739. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.06.012  
 Cite this article as: Wu ZF, Yao XY, Wang L, et al. Paclitaxel induced expression of autophagy-associated protein LC3 in triple negative breast cancer cells and its action[J]. Chin J Gen Surg, 2018, 27(6):732–739. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.06.012

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料, 用  $M(QR)$  表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等), 统计量的具体值(如  $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$  等)应可能给出具体的  $P$  值(如  $P=0.0238$ ); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部