

补骨脂素逆转 P-gp 介导的乳腺癌耐药的作用研究

张英哲, 王晓红, 花义同, 郭庆群, 于跃, 杨振林*

滨州医学院附属医院, 滨州 256600

摘要: 观察补骨脂素处理乳腺癌耐药细胞后, P-gp 的活性、表达变化和小窝蛋白-1 的表达变化, 及二者的共定位变化, 并探讨其意义。我们通过检测补骨脂素对 MCF-7/ADR 的抑制作用, 以及补骨脂素对 P-gp 和小窝蛋白-1 表达和定位的影响。结果显示补骨脂素能够逆转乳腺癌细胞多药耐药; 补骨脂素并不影响 P-gp 的表达, 但是显著降低 P-gp 的转运活性; 同时补骨脂素显著降低了小窝蛋白-1 的表达, 并且破坏了小窝蛋白-1 和 P-gp 的共定位。以上研究结果表明, 补骨脂素通过抑制 P-gp 的外排功能来降低多药耐药性, 这对于提高化疗效率和改善旨在逆转 P-gp 介导的多药耐药性的临床方案可能是重要的。

关键词: 乳腺癌; 补骨脂素; 脂筏; P-gp; 小窝蛋白-1

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0113-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.018

The effect of psoralen on reversing P-gp-mediated breast cancer resistance by reducing caveolin-1

ZHANG Ying-zhe, WANG Xiao-hong, HUA Yi-tong, GUO Qing-qun, YU Yue, YANG Zhen-lin*

Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China

Abstract: To explore the effect of psoralen on reversing P-gp-mediated breast cancer resistance by reducing caveolin-1. We assessed cell viability by MTT assay to evaluate the cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity of psoralen. We analysed the cellular accumulation of ADR and Rh 123 by immunofluorescence. We measured P-gp ATPase activity by monitoring ATP consumption. The effect of psoralen on P-gp and caveolin-1 expression were detected by RT-PCR and Western Blot. The effect of psoralen on P-gp and caveolin-1 co-localization by immunofluorescence. The IC_{50} of MCF-7/ADR were $75.32 \pm 2.52 \mu\text{g}/\text{mL}$, and the IC_{50} of MCF-7/ADR + psoralen were $24.28 \pm 1.53 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$). The relative fluorescence intensity of ADR in MCF-7/ADR + psoralen is $60.03\% \pm 2.89\%$ and higher than the MCF-7/ADR $24.59\% \pm 1.29\%$ ($P < 0.05$). The relative fluorescence intensity of Rh123 in MCF-7/ADR + psoralen is $67.8\% \pm 3.03\%$ and significantly higher than the control group $23.69\% \pm 1.28\%$ ($P < 0.01$). Psoralen significantly decreased ATPase activity of P-gp ($P < 0.05$). Psoralen did not affect the protein expression or mRNA levels of P-gp ($P > 0.05$). The expression of caveolin-1 was down-regulated in MCF-7/ADR + psoralen cells ($P < 0.05$). Compared with cells without psoralen, the relative fluorescence intensity was decreased by 0.56-fold in cells treated with $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ psoralen ($P < 0.05$). Psoralen reduces multidrug resistance by inhibiting the efflux function of P-gp, which may be important for increasing the efficiency of chemotherapy and improving the clinical protocols aiming to reverse P-gp-mediated multidrug resistance.

Key words: breast cancer; lipid rafts; P-gp; caveolin-1; psoralen

乳腺癌被认为是影响女性生命健康的恶性肿瘤

之一, 尽管在治疗上已经取得了很大进展, 但多药耐药 (MDR) 仍然是乳腺癌患者死亡的主要原因^[1]。因此, 探索多药耐药的分子基础以此来开发临床试剂、预防肿瘤耐药的发生和治疗耐药肿瘤是至关重要的。临床上现有化疗药虽然已应用多年, 但是不良反应较多, 而且作用靶点相对单一, 所以寻找到一种药物作用相对温和、具有多个作用靶点的新型中

收稿日期: 2018-12-18 接受日期: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金 (81173601); 山东省自然科学基金 (ZR2017LH072, ZR2017MH033); 滨州市科技发展计划 (NO. 2015ZC0301); 滨州医学院科研计划与科研启动基金 (BY2014KYQD36); 山东省高等学校科技计划 (J15LL51); 滨州医学院科技计划 (BY2017KJ01)

* 通信作者 Tel: 86-153-45438602; E-mail: 15345438602@163.com

药,对当前研究是至关重要的^[2]。

补骨脂素作为补骨脂的主要提取物之一,有文献报道在经过补骨脂素干预后,能降低 MCF-7/ADR 对阿霉素的耐药性^[3,4],而且具有作用广泛、天然低毒等特点。我们之前的研究表明,补骨脂素通过 RNA-seq 分析通过 PPAR 信号通路影响脂质代谢^[5]。可见,补骨脂素在逆转乳腺癌多药耐药方面具有不容小视的意义。

P-gp 的表达或功能异常是肿瘤细胞产生 MDR 的重要机制之一^[6]。目前针对 P-gp 介导的抗药性逆转的小分子药物有川芎嗪,芹菜素,葛根素等,但疗效低、副作用大、价格高等问题限制了临床应用^[7]。因此,通过竞争性或非竞争性抑制 P-gp 功能,或直接降低 P-gp 的表达来逆转肿瘤细胞的 MDR 具有重要的临床应用意义。P-gp 是其所处的脂质环境中最重要的转运蛋白之一,其发挥功能时是定位在脂筏(lipid raft)区域的^[8]。脂筏的定位和分布是脂筏作为信号跨膜转导平台的重要结构基础之一^[9-11]。脂筏根据形状和结合蛋白的不同分为两类:浮筏和小窝,其标志蛋白分别为 flotillin 家族和 caveolin 家族^[12-14]。有一些研究报道,小窝蛋白-1 在多种多药耐药肿瘤细胞中高表达,包括 MCF-7/ADR, Htt-29/MDR, skvlb1 和 A549/T24^[15,16]。并且有研究表明 P-gp 与小窝蛋白-1(caveolin-1)存在共定位^[15,17-19]。综上所述,P-gp,小窝蛋白-1 与 MDR 密切相关,但具体机制尚不完全清楚。

因此我们推测,P-gp 的功能不仅取决于它在脂筏上的位置,而且取决于构成脂筏组分小窝蛋白-1 的表达。所以,本研究将探讨补骨脂素通过对小窝蛋白-1 的调控,进而破坏脂筏稳定性以及小窝蛋白-1 和 P-gp 的共定位,从而抑制 P-gp 的转运活性,最终达到逆转耐药的目,并为临床上逆转肿瘤多药耐药提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂

人乳腺癌细胞阿霉素耐药株 MCF-7/ADR、PRMI-1640 完全培养基、DMEM 培养液、CCK-8 试剂盒、核蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物有限公司。补骨脂素购于中国生物制品鉴定所。Maxima SYBR Green qPCR 及 ReverTra Ace qPCR RT Kit 购自 Thermo scientific 公司。P-gp、小窝蛋白-1 基因上、下游引物购于上海生工生物股份有限公司。Pgp-Glo™ Assay 购自 Promega 公司。抗体购自 Proteintech 公

司。酶标仪购自北京柏莱斯特科技发展有限公司。

1.2 细胞培养

在含 95% 空气和 5% CO₂ 以及温度 37 ℃、湿度 100% 条件下的培养箱内培养培养 MCF-7/ADR 细胞,培养基选取阿霉素浓度为 1 μg/mL 的 RPMI-1640 完全培养基,以此维持细胞的耐药性,所有试验均在细胞对数生长期进行。

1.3 MTT 比色法测定补骨脂素对 MCF-7/ADR 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)

将 MCF-7/ADR 和 MCF-7/ADR + 补骨脂素细胞在 96 孔板中以每孔 2 × 10⁴ 个细胞的细胞密度培养 48 h。将阴性对照组中的细胞与补充有 0.1% DMSO 的 RPMI-1640 培养基一起温育。将细胞与 10 μL MTT(5 mg/mL)一起温育 4 h,然后弃去培养基并加入 200 μLDMSO。在晶体完全溶解后,用酶标仪器在 490 nm 处测量分光光度吸光度。取 4 孔 A 值的均数按公式计算细胞抑制率;细胞抑制率(IR) = (1 - 试验孔 A 均值/对照孔 A 均值) × 100%。计算 IR 并求出 IC₅₀,以上实验重复 3 次。

1.4 细胞分组干预

选取 15 mL DMSO 溶液和 15 mg 补骨脂素粉配制成浓度为 1 g/L 的补骨脂素溶液,过滤分装后 4 ℃冰箱避光保存。

本实验室前期研究测得 MCF-7/ADR 10% 抑制率(IC₁₀) = 8 mg/L,20% 抑制率(IC₂₀) = 20 mg/L,IC₁₀ 和 IC₂₀ 被认为是无毒浓度或者是低毒浓度,因而实验选择 0、8、12、16 mg/L 的补骨脂素进行干预。前期实验得知补骨脂素处理 24 和 48 h 细胞变化差异无显著性意义,所以该药物作用没有时间依赖性^[20],因而实验选择 48 h 作为干预时间。

1.5 Western Blot 检测补骨脂素对 P-gp 蛋白表达的影响

取 MCF-7/ADR 和用 8 μg/mL 浓度补骨脂素处理 48 h 后的 MCF-7/ADR 细胞,倒掉培养液,并将瓶倒扣在吸水纸吸干培养液;每瓶细胞加 3 mL 冷 PBS,平均轻轻摇动 1 min 洗涤细胞,然后弃去洗液,重复以上步骤 2 次;每瓶细胞加 100 μL 的裂解液,用干净的刮棒将细胞刮于培养瓶的一侧,与冰上裂解 30 min,为使细胞充分裂解,培养瓶要经常来回摇动;裂解完成后用枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL EP 管中;4°离心机,12 000 rpm 15 min,取上清液体,测蛋白浓度,按 4:1 的浓度加 5 × loading buffer,煮沸 15 min。再进行凝胶电泳分离,然后转移至

PVDF 膜上,用稀释浓度为 1:2 000 的 P-gp 一抗和 1:4 000 的二抗进行免疫酶联反应曝光。

1.6 RT-PCR 技术检测补骨脂素对 P-gp 基因表达的影响

细胞总 RNA 的提取:取补骨脂素处理 48 h 后的细胞,每孔加入 1 mL Trizol 裂解细胞,将裂解液转入 1.5 mL EP 管中,室温静置 5 min;每管加入 0.2 mL 氯仿,涡旋仪上剧烈振荡 15 s,室温静置 2 min,4 ℃,12 000 rpm 离心 15 min,取上层水相移至新的 EP 管中,加入 0.5 mL 预冷的异丙醇,颠倒数次,室温静置 10 min,4 ℃,12 000 rpm 离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 体积分数为 75% 的乙醇(DEPC 水配制)洗涤 RNA 沉淀;4 ℃,10 000 rpm 离心 5 min;弃去上清,将 EP 管倒置,室温干燥 10 min;每管加入体积分数为 0.1% 的 DEPC 水 20 μ L 溶解 RNA 沉淀。酶标仪测定所提 RNA 的浓度和纯度,含量为 1.5 ~ 2.0 μ g/ μ L;OD260/OD280 在 1.8 ~ 2.0 之间。以总 RNA 为模板,以 Oligo-dTPrimer 为引物按照 ReverTra Ace qPCR RT Kit 说明书进行操作逆转录合成第一链 cDNA。按照 SYBR R Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 反应,反应引物序列为:P-gp (forward: 5'-GATTGCT-CACCGCCTGTCCAC-3', reverse: 5'-CGTGCCAT-GCTCCTTG ACTCTG-3'); β -actin (forward: 5'-TGT-CACCAACTGGGACGATA-3',reverse:5'-GGGCTGTT-GAAGGTCTCAAA-3')。反应体系为:cDNA 模板 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,SYBRgreen PCR Mix 12.5 μ L,DEPC H₂O 补足总体积至 25 μ L。反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,共 40 个循环,每次扩增设置 β -actin 为内参对照。制作标准曲线,根据标准曲线扩增效率的一致性,选用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 P-gp 基因 mRNA 的相对表达量。

1.7 P-gp 活性检测

我们通过 Pgp-Glo™ 试剂盒 (Promega, 美国) 评估了 P-gp ATP 酶的活性。钒酸钠 (Na_3VO_4) 用作 P-gp ATP 酶抑制剂。维拉帕米 (Ver) 在此作为药物刺激 P-gp ATP 酶活性的阳性对照。用补骨脂素处理后测量 P-gp ATP 酶的活性。样品的发光与 P-gp ATP 酶活性负相关。

1.8 免疫荧光检测补骨脂素对 ADR 和 Rh 123 外排的影响

ADR 和 Rh 123 在细胞内的积累,能够反应 P-

gp 的功能活性,因此我们参与免疫荧光检测了 MCF-7/ADR 和用 8 μ g/mL 浓度补骨脂素处理 48 h 后的 MCF-7/ADR 细胞中二者的残留。将 MCF-7/ADR 和 MCF-7/ADR + 补骨脂素细胞接种在盖板上的 6 孔板中 48 h,然后用 PBS 洗涤细胞三次,并在室温下用 4% 多聚甲醛固定 15 min。将细胞在 PBS 中洗涤三次,然后直接在山羊血清封闭溶液中孵育。然后将它们与抗体一起在 4 ℃ 下与 ADR 和 Rh 123 一起孵育过夜。检测到第二抗体的一抗结合,用 DAPI 染色细胞核。捞取细胞爬片,用防荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察并用自带软件进行叠加。处理后图像通过 Image J 软件进行数据的相对定量处理。

1.9 Western Blot 和 RT-PCR 技术检测补骨脂素对小窝-1 表达的影响

具体操作步骤参考上文,其中小窝蛋白-1 的反应引物序列为:(forward: 5'-GGCCAGCTTCACCAC-CTTCAC-3', reverse: 5'-ACACGGCTGATGCACTGAA TCTC-3')。

1.10 免疫荧光检测补骨脂素对 P-gp 和小窝蛋白-1 共定位的影响

具体步骤参考上文。

1.11 统计学方法

数据采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,两样本间均数比较采用 *t* 检验。所有数据均用 SPSS17.0 统计软件处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补骨脂素能够逆转乳腺癌细胞多药耐药。

通过比较 IC₅₀ 值测量 MDR 细胞 MCF-7/ADR 对

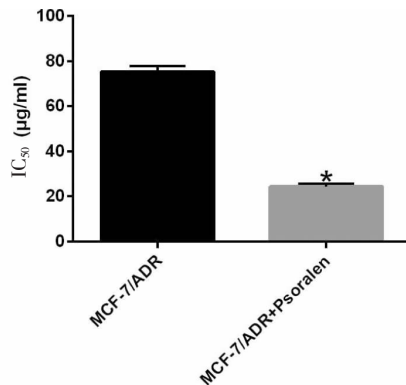


图1 补骨脂素显著逆转 MDR 并增加 ADR 对 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性 (* $P < 0.05$)

Fig. 1 Psoralen significantly reversed MDR and increased the cytotoxicity of ADR to MCF-7/ADR cells (* $P < 0.05$)

化疗药物的化学敏感性。逆转倍数 = MCF-7/ADR + 补骨脂素的 IC_{50} /MCF-7/ADR 的 IC_{50} 。结果显示, MCF-7/ADR + 补骨脂素和 MCF-7/ADR 的 IC_{50} 分别为 24.28 ± 1.53 和 $75.32 \pm 2.52 \mu\text{g}/\text{mL}$, 逆转倍数值为 3.1 倍, 表明补骨脂素显著逆转 MDR 并增加 ADR 对 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性 ($*P < 0.05$) (如图 1 所示)。

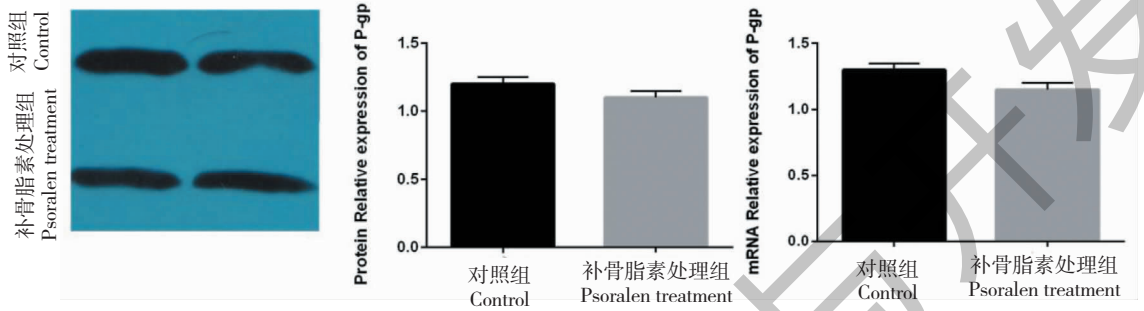


图 2 补骨脂素对 mRNA 和蛋白质水平的 P-gp 表达影响 ($P > 0.05$)

Fig. 2 Psoralen affects p-gp expression of mRNA and protein levels ($P > 0.05$)

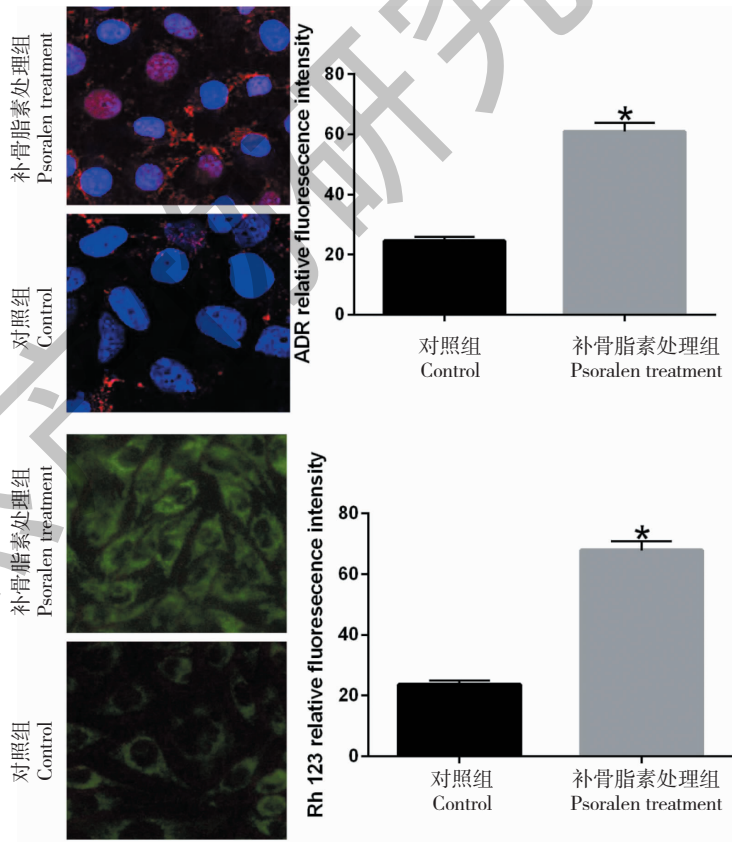


图 3 MCF-7/ADR + 补骨脂素中 Rh 123 的相对荧光强度

Fig. 3 Relative fluorescence intensity of Rh 123 in MCF-7/ADR + psoralen

2.3 补骨脂素抑制 P-gp 的功能活性

免疫荧光结果显示 MCF-7/ADR + 补骨脂素中

2.2 补骨脂素对 P-gp 蛋白和基因的表达均没有显著差异

我们假设补骨脂素通过降低 P-gp 的表达来抑制 MCF-7/ADR 细胞的药物外排, 最终逆转药物耐药性。但是, RT-PCR 和 Western Blot 检测结果表明补骨脂素对 mRNA 和蛋白质水平的 P-gp 表达的没有影响 ($P > 0.05$) (如图 2 所示)。

ADR 的相对荧光强度为 $60.03\% \pm 2.89\%$, 显著高于 MCF-7/ADR 组 $24.59\% \pm 1.29\%$ 。二者相比, 补

骨脂素处理后细胞中 ADR 的荧光强度增加了 1.4 倍 ($P < 0.05$)。MCF-7/ADR + 补骨脂素中 Rh 123 的相对荧光强度为 $67.8\% \pm 3.03\%$, 显著高于 MCF-7/ADR 组 $23.69\% \pm 1.28\%$, 二者相比, 补骨脂素使 Rh 123 的荧光强度增加 1.8 倍 ($P < 0.05$) (如图 3 所示)。以上结果表明, 补骨脂素增加了 MCF-7/ADR 细胞中 ADR 和 Rh123 抗癌药物的积累。

P-gp 与目标药物结合, 借 ATP 释放出的能量, 直接或间接将药物泵出细胞, 或依靠其蛋白本身, 作为运输通道, 将药物从细胞内泵出细胞外, 最终导致降低细胞内药物浓度, 降低或丧失目标药物的药效。因此我们检测了 P-gp ATP 酶活性, 发现 $\Delta\text{RLU}_{\text{TC}(\text{pso})} = 1.98 \pm 0.69 \times 10^4$, $\Delta\text{RLU}_{\text{TC}(\text{ver})} = 3.01 \pm 0.43 \times 10^4$, $\Delta\text{RLU}_{\text{TC}(\text{pso} + \text{ver})} = 5.45 \pm 0.13 \times 10^4$ 和 $\Delta\text{RLU}_{\text{basal}} = 2.39 \pm 0.23 \times 10^4$, 表明补骨脂素显著降低 P-gp 的 ATP 酶活性 ($*P < 0.05$), 但增强维拉帕米刺激的 ATP 酶活性 ($*P < 0.05$), 这表明可能存在协同作用补骨脂素和维拉帕米对 P-gp ATP 酶活性的影

响 (如图 4 所示)。

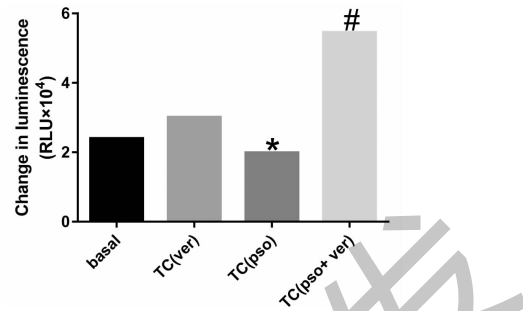


图 4 补骨脂素存在下 P-gp ATP 酶活性的消耗

Fig. 4 Consumption of p-gp atpase activity in the presence of psoralen

2.4 补骨脂素抑制 MCF-7/ADR 中小窝-1 的表达

小窝蛋白-1 的表达可能影响 P-gp 的功能, 因此我们进一步检测了补骨脂素是否对小窝蛋白-1 的表达有影响。Western Blot 和 RT-PCR 检测结果表明, 当用 0、8、12、16 mg/L 补骨脂素处理 MCF-7/ADR 细胞后, 小窝蛋白-1 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$) (如图 5 所示)。

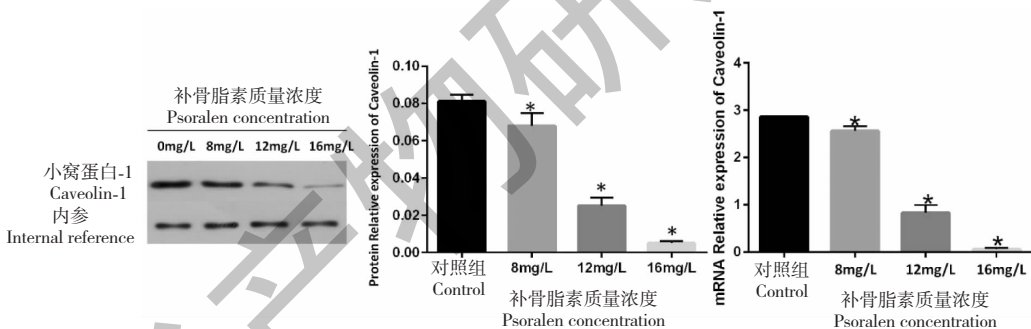


图 5 补骨脂素处理后, 小窝蛋白-1 的表达水平 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Expression level of fossa protein-1 after psoralen treatment ($P < 0.05$)

2.5 补骨脂素破坏了 P-gp 和小窝蛋白-1 共定位

免疫荧光检测结果显示, 在 MCF-7/ADR 组中红色荧光小窝蛋白-1 和绿色荧光 P-gp 叠加后, 细胞膜区域出现黄色荧光, 证明 P-gp 与小窝蛋白-1 存在共定位关系。但在补骨脂素处理后的 MCF-7/ADR 组中, 小窝蛋白-1 的分布变得分散。并且在红色荧光小窝蛋白-1 和绿色荧光 P-gp 叠加后, 细胞膜区域的黄色荧光明显降低。MCF-7/ADR + 补骨脂素的相对荧光强度为 $28.49\% \pm 1.03\%$, 显著低于 MCF-7/ADR 组 $51.09\% \pm 1.31\%$ 。二者相比, 补骨脂素处理后细胞的相对荧光强度降低了 0.56 倍 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 补骨脂素破坏小窝蛋白-1

和 P-gp 的共定位关系 (如图 6 所示)。

3 讨论

近年来, 许多研究发现补骨脂素可以通过改善肿瘤细胞的多药效应来提高化疗药物的敏感性^[5,21]。我们之前的研究表明, 补骨脂素通过 PPAR 信号途径影响脂质代谢^[5]。P-gp 可以增加药物流出并最终导致化疗药物的功效降低, 即 P-gp 过表达是 MDR 的主要机制之一^[22]。抑制 P-gp 介导的药物外排可以增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 从而提高化疗对多药耐药肿瘤的疗效^[6,23]。但是, 具体机制尚未得到明确研究。

为了验证补骨脂素是否通过下调 P-gp 降低

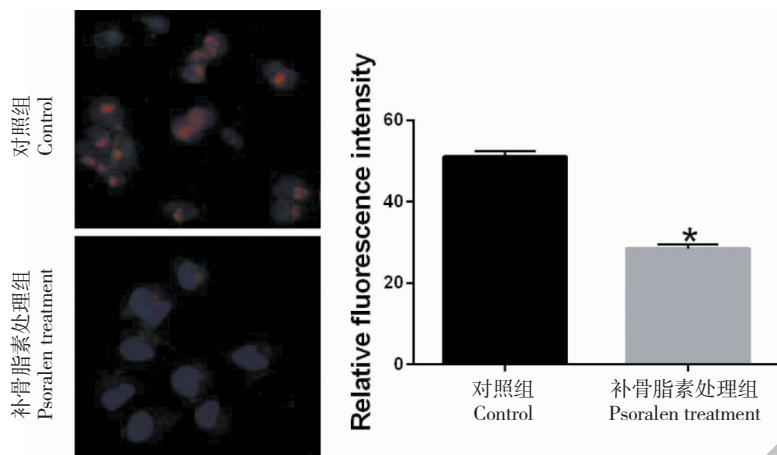


图6 补骨脂素处理后细胞的相对荧光强度

Fig. 6 The relative fluorescence intensity of psoralen treated cells

MCF-7/ADR 细胞的多药耐药性,通过 Western 印迹和 RT-PCR 检测 P-gp 的表达变化。然而,本实验的结果表明补骨脂素在 mRNA 或蛋白质水平上没有改变 P-gp 表达,表明补骨脂素不会通过抑制 P-gp 表达来降低 MDR。同时,P-gp 通过跨膜和核苷酸结合结构域增加药物流出,所以 P-gp 的活性反映了其转运功能。因此,我们使用免疫荧光检测 ADR 和 Rh 123 的细胞内积累来分析 P-gp 转运功能。这些结果表明,补骨脂素改变 P-gp 转运功能,增加药物的细胞内积累,而不是降低 P-gp 的表达。

研究表明,位于脂筏上的 P-gp 是具有重要功能的转运蛋白。一些磷脂本身可用作 P-gp 的底物,以调节 P-gp 在膜上的转运活性,糖脂也可通过调节 P-gp 的磷酸化来改变其外排^[24]。Dr. Ghetie 的研究结果表明 P-gp 无法定位到脂筏中会导致其功能的缺失^[25]。而且 Dr. Reungpatthanaphong 的研究证实,用甲基 β 环糊精去除胆固醇会导致 P-gp 的功能缺失,并从脂筏区移动到非脂筏区。这可能是甲基 β 环糊精使磷脂重新分布、增加了细胞膜的流动性,影响了 P-gp 的定位和功能^[26]。小窝蛋白-1 是脂筏的重要组成蛋白,在多药耐药肿瘤细胞中表达上调^[27,28],具体机制可能与小窝蛋白-1 的表达和 P-gp 的共定位有关^[29]。在我们的实验中,补骨脂素不仅降低了小窝蛋白-1 的表达,还破坏了小窝蛋白-1 和 P-gp 的共定位。可见,P-gp 的功能不仅仅依赖于它在脂筏中的定位,还和构成脂筏成分的变化有关。

总之,这些结果进一步表明补骨脂素可以通过抑制小窝蛋白-1 的表达并破坏小窝蛋白-1 和 P-gp 的共定位来逆转 P-gp 介导的肿瘤多药耐药。可见,

补骨脂素不仅具有药物作用温和、多作用靶点的优点,同时也是中药里面为数不多的逆转剂和增敏剂,从而可能成为毒副作用小的中药耐药逆转剂,无疑对肿瘤患者的治疗带来了新的希望。但是,目前本研究仍处于体外研究阶段,其具体机制需要进一步体内试验来证实。这需要本实验室成员和更多科研工作者的进一步努力,为乳腺癌患者带来新的福音。

参考文献

- Xu GF, Zhang WJ, Zhou ZH, et al. Cancer stem cells and multidrug resistance [J]. J Int Onco (国际肿瘤学杂志), 2012, 39:902-904.
- Wu YQ, Xu WH. Research progress in the reversion of traditional Chinese medicine on multidrug resistance of leukemia cells [J]. Gansu Med J (甘肃医药), 2016, 35:267-269.
- Cai TG, Tang FD, Cai Y. Reversal effect of multidrug resistance on MCF-7/ADR cells by psoralen [J]. Chin J Practical Chin Modern Med (中华实用中西医杂志), 2003 (11).
- Cai Y. Reversal of multidrug resistance in human breast cancer by psoralen [J]. Tumor (肿瘤), 2004, 24:240-241.
- Wang X, Xu C, Hua Y, et al. Exosomes play an important role in the process of psoralen reverse multidrug resistance of breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35:186.
- Georgantzopoulou A, Skoczynska E, Van den Berg J H, et al. P-gp efflux pump inhibition potential of common environmental contaminants determined in vitro [J]. Environ Toxicol Chem, 2014, 33:804-813.
- Xing HJ, Cui HY, Zhao JH. Effect and mechanism of apigenin on reversing the multidrug resistance of colon cancer resistant cells HCT-8/5FU by down-regulating MDR-1/P-gp expression [J]. Chin J Gerontol, 2014, 13:3709-3712.

- 8 Chae SW, Lee J, Park JH, et al. Intestinal P-glycoprotein inhibitors, benzoxanthone analogues [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70:234-241.
- 9 Acevedo KM, Hayne DJ, Mcinnes LE, et al. Effect of structural modifications to glyoxal-bis (thiosemicarbazonato) copper(II) complexes on cellular copper uptake, copper-mediated ATP7A trafficking, and P-glycoprotein mediated efflux [J]. *J Med Chem*, 2018, 61:711-723.
- 10 Auzmendi J, Buchholz B, Salguero J, et al. Pilocarpine-induced status epilepticus is associated with P-glycoprotein induction in cardiomyocytes, electrocardiographic changes, and sudden death [J]. *Pharmaceuticals*, 2018, 11(1):UNSP 21.
- 11 Willi L, Labarthe NV, D'Escoffier LN, et al. Can P-glycoprotein and β -tubulin polymorphisms be used as genetic markers of resistance in *Dirofilaria immitis* from Rio de Janeiro, Brazil? [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11:152.
- 12 Pezeshkian W, Chevrot G, Khandelia H. The role of caveolin-1 in lipid droplets and their biogenesis [J]. *Chem Phys Lipids*, 2018, 211(SI):93-99.
- 13 Sun J, Zhang X, Wang C, et al. Curcumin decreases hyperphosphorylation of tau by down-regulating caveolin-1/GSK-3 β in N2a/APP695swe cells and APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45:1667-1682.
- 14 Li HY, Qu C, Zhang YJ, et al. Caveolin-1 is involved in DNA damage and repair signaling in X-irradiated Chang liver cells [J]. *Acta Physiol Sin (生理学报)*, 2017, 69:759-766.
- 15 Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273:32380-32383.
- 16 Yang CP, Galbiati F, Volonte D, et al. Upregulation of caveolin-1 and caveolae organelles in Taxol-resistant A549 cells [J]. *Febs Lett*, 1998, 439:368-372.
- 17 Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1 and cancer multidrug resistance: coordinate regulation of pro-survival proteins? [J]. *Leuk Res*, 2004, 28:907-908.
- 18 Luker GD, Pica CM, Kumar AS, et al. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains [J]. *Biochemistry*, 2000, 39:7551-7561.
- 19 Demeule M, Jodoin J, Gingras D, et al. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries [J]. *Febs Lett*, 2000, 466:219-224.
- 20 Zhao WZ, Cheng K, Wang XH, et al. Effects of psoralen on cell cycle and apoptosis of human breast cancer multidrug resistance cell [J]. *Chin J Clinicians (Electron) (中华临床医师杂志(电子版))*, 2016, 10:2111-2115.
- 21 Jiang J, Wang X, Cheng K, et al. Psoralen reverses the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human breast cancer MCF-7/ADR cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13:4745-4750.
- 22 Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, et al. Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12:570-594.
- 23 Kim JH, Choi AR, Kim YK, et al. Co-treatment with the anti-malarial drugs mefloquine and primaquine highly sensitizes drug-resistant cancer cells by increasing P-gp inhibition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441:655-660.
- 24 Wang X, Xu C, Hua Y, et al. Psoralen induced cell cycle arrest by modulating Wnt/ β -catenin pathway in breast cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8:14001.
- 25 Ghetie MA, Marches R, Kufert S, et al. An anti-CD19 antibody inhibits the interaction between P-glycoprotein (P-gp) and CD19, causes P-gp to translocate out of lipid rafts, and chemosensitizes a multidrug-resistant (MDR) lymphoma cell line [J]. *Blood*, 2004, 104:178-183.
- 26 Reungpatthanaphong P, Marbeuf-Gueye C, Le Moyec L, et al. Decrease of P-glycoprotein activity in K562/ADR cells by M β CD and filipin and lack of effect induced by cholesterol oxidase indicate that this transporter is not located in rafts [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36:533-543.
- 27 Karam JA, Lotan Y, Roehrborn CG, et al. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence [J]. *Prostate*, 2007, 67:614-622.
- 28 Cordes N, Frick S, Brunner T B, et al. Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1 [J]. *Oncogene*, 2007, 26:6851-6862.
- 29 Orłowski S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63:1038-1059.