

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.003>

基于基因表达谱筛选乳腺癌他莫昔芬耐药的生物标志物与治疗药物

张晶晶^{1,2}, 赵拯², 刘赞心², 朱余兵², 樊宏伟^{1,2}

[1. 南京医科大学第三临床医学院, 南京 210029; 2. 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)药学部, 南京 210006]

[摘要] **目的:** 利用基因表达谱和关联性图谱数据库筛选乳腺癌他莫昔芬耐药的潜在生物标志物和治疗药物。**方法:** 在GEO(Gene Expression Omnibus)数据库中筛选得到他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞基因表达谱数据集GSE67916和GSE26459, 利用R语言和Bioconductor包筛选差异表达基因。Metascape对差异表达基因进行功能注释, Cytoscape构建差异表达基因编码蛋白互相作用网络图并确定核心基因。利用数据集GSE9893验证核心基因在他莫昔芬耐药患者中的表达及与临床预后的关系。最后将差异表达基因导入关联性图谱数据库筛选他莫昔芬耐药的候选治疗药物并进行细胞实验验证。**结果:** 共获得差异表达基因462个, 这些基因显著富集于雄激素响应、糖酵解和胆固醇平衡等通路。ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)为乳腺癌他莫昔芬耐药的核心基因, ACLY在耐药患者中的表达水平显著高于敏感患者($P < 0.05$), ACLY低表达患者无复发生存率显著高于高表达患者($P < 0.05$)。最终筛选得到匹莫齐特、LY-294002等10种候选治疗药物, 经证实LY-294002可有效抑制耐他莫昔芬乳腺癌细胞的增殖。**结论:** ACLY可作为他莫昔芬耐药的生物标志物。利用基于关联性图谱数据库可快速筛选出他莫昔芬耐药的潜在治疗药物。

[关键词] 基因表达谱; 乳腺癌; 他莫昔芬耐药; 生物标志物; 治疗药物

Screening biomarkers and therapeutic agents for tamoxifen-resistant breast cancer based on gene expression profile

ZHANG Jingjing^{1,2}, ZHAO Zheng², LIU Yunxin², ZHU Yubing², FAN Hongwei^{1,2}

(1. Third Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; 2. Department of Pharmacy, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

Abstract **Objective:** To screen potential biomarkers and therapeutic agents for tamoxifen-resistant breast cancer based on gene expression profile and connectivity map. **Methods:** GSE67916 and GSE26459 which contain gene expression profiles of tamoxifen-resistant breast cancer cell were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using the Bioconductor packages in the R

收稿日期 (Date of reception): 2018-04-20

通信作者 (Corresponding author): 樊宏伟, Email: fanhongwei178@sina.com

基金项目 (Foundation item): 南京市医学科技发展资金资助项目 (YKK15091)。This work was supported by the Medical Science and Technology Development Foundation of Nanjing, China (YKK15091).

language. Metascape was used to perform functional annotation for DEGs. Cytoscape was used to construct the protein-protein interaction network map of DEGs-coding proteins and then to identify the hub gene. GSE9893 was downloaded to validate the expression difference of hub gene between tamoxifen-sensitive patients and resistant patients and then to investigate the correlation between hub gene expression and relapse-free survival. Finally, potential therapeutic agents were screened by mapping the DEGs to connectivity map database and validated by cell proliferation assay. **Results:** A total of 462 genes were filtered as DEGs and they were mainly involved in androgen response, glycolysis, cholesterol homeostasis and so on. ATP-citrate lyase (ACLY) was identified as the hub gene related to tamoxifen resistance. The expression level of ACLY in tamoxifen-resistant patients was significantly higher than that in tamoxifen-sensitive patients ($P < 0.05$). The relapse-free survival in patients with low expression levels of ACLY was significantly better than that in patients with high expression levels ($P < 0.05$). Ten candidate therapeutic agents were screened for tamoxifen resistance, such as pimoziide, LY-294002 and so on. LY-294002 was confirmed to inhibit the proliferation of tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Conclusion:** ACLY may be used as a biomarker for tamoxifen resistant breast cancer. Connectivity map can be used to rapidly discover potential therapeutic agents and lay the foundation for further studies.

Keywords gene expression profile; breast cancer; tamoxifen resistance; biomarkers; therapeutic agents

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤, 约70%的乳腺癌患者是雌激素受体阳性(ER⁺)乳腺癌^[1]。中美指南^[2-3]指出, ER⁺乳腺癌患者辅助内分泌治疗首选他莫昔芬(tamoxifen, TAM)。然而, 接受他莫昔芬治疗的15年内, 33%的患者会出现耐药, 病情复发, 最终导致26%的患者死亡^[4]。因此, 探索他莫昔芬耐药的潜在生物标志物和治疗药物, 将有利于筛选高危人群, 实现个体化合理用药, 提高乳腺癌的治疗效果。

基因芯片是伴随着人类基因组计划发展而来的一项生物技术, 其中基因表达谱芯片技术最为成熟, 应用也最为广泛, 该技术可检测整个基因组范围内上万个基因在mRNA表达水平上的变化, 有助于揭示疾病发生发展的内在机制, 在疾病诊断、精准治疗和预后评估等领域具有重要价值^[5]。基于基因表达谱技术, 来自哈佛和麻省理工的研究团队共同创建了用于揭示基因、疾病和药物之间相互联系的关联性图谱数据库(Connectivity map, cMap), 该数据库可帮助药物研发人员利用基因表达谱数据快速比对出与疾病高度关联的药物或小分子化合物, 有助于疾病导向的新药研发, 该成果已相继发表在国际科学期刊Science^[6]和Cell^[7]。近年来的研究趋势也显示出cMap数据库在药物开发和机制研究领域, 可提供越来越精准的方向^[8-9]。本研究旨在利用基因表达谱和cMap数据库筛选出他莫昔芬耐药的潜在生物标志物和治疗药物, 为乳腺癌辅助内分泌治疗提供合理指导, 改善患者预后。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

LY-294002购自日本Sigma公司; 无酚红DMEM培养基购自美国Gibco公司; 活性炭处理的胎牛血清(charcoal stripped serum, CSS)购自美国Equitech-Bio公司; MTT细胞增殖检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 耐他莫昔芬乳腺癌细胞MCF-7/TAM由南京医科大学附属南京医院临床药理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 获取基因表达谱数据集

在GEO(Gene Expression Omnibus)数据库中筛选得到他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞基因表达谱数据集GSE67916和GSE26459, 两个数据集均采用GPL570芯片平台。其中GSE67916包括10例他莫昔芬敏感的乳腺癌细胞MCF-7和8例他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞MCF-7/TAM; GSE26459包括MCF-7和MCF-7/TAM各3例。

1.2.2 筛选差异表达基因

采用R语言和Bioconductor包分别对两个数据集的芯片原始数据进行质量控制, 剔除不合格的样品, 留下的样品采用多阵列对数健壮算法进行预处理。对探针进行基因名注释, 去除没有对应基因名或有多个对应基因名的探针, 合并对应相同基因名的多个探针并取平均值。采用limma包筛选差异表达基因, 筛选标准为改变倍数大于

1.2倍且错误发现率(false discovery rate, FDR)小于0.05。最后对两个数据集筛选出的上调及下调基因分别绘制韦恩图取交集以获得共有的差异表达基因。

1.2.3 差异表达基因功能注释

采用Metascape基因注释与分析在线工具(<http://metascape.org/>)对差异表达基因进行功能注释, 数据库选用基因集富集分析中的特征基因集合, 设定 $P < 0.001$ 为可信的基因集合。

1.2.4 构建蛋白互相作用网络图确定核心基因

采用STRING在线工具(<https://string-db.org/>)分析差异表达基因所编码的蛋白质之间的互相作用, 得到蛋白互相作用关系对(protein-protein interaction, PPI), 将其中结合分数值(combined score)大于0.6的蛋白互相作用对导出为文本并输入到Cytoscape软件中, 构建PPI网络图, 剔除其中孤立的蛋白互相作用对, 利用插件CentiScape计算网络图各个节点的拓扑学指标Degree unDir, Degree unDir值最大的基因处于PPI网络调控的中心, 即为核心基因。

1.2.5 核心基因在他莫昔芬耐药患者中的表达及与预后的关系

在GEO中筛选得到含他莫昔芬耐药患者基因表达谱和生存资料的数据集GSE9893, 该数据集采用GPL5049平台, 共包括155例患者, 其中147例为ER⁺患者, 6例为ER⁻PR⁺患者, 2例为ER⁻PR⁻患者。所有患者术前未接受新辅助治疗, 术后使用他莫昔芬治疗5年, 服药期间有103例患者未出现复发, 52例患者出现复发, 其中48例为远处转移, 4例为局部复发。对芯片数据进行预处理和log₂转化, 获得每个基因在每个患者中的表达值, 绘制箱线图, 分析核心基因在复发患者与未复发患者中的表达差异。根据核心基因的表达值是否高于中位数, 将患者划分为高表达组和低表达组, 绘制生存曲线, 分析核心基因表达水平与无复发生存率的关系。

1.2.6 筛选他莫昔芬耐药的候选治疗药物

将筛选出的上调及下调差异表达基因转换为Affymetrix HG-U133A平台对应的探针名, 另存为grp格式文件, 登录cMap关联性图谱数据库(<https://portals.broadinstitute.org/cmap/>), 在query界面下的quick query选项里分别载入上调和下调的探针, 进行在线药物筛选, 筛选标准为平均关联分数 < 0 、实例个数 ≥ 3 、 $P < 0.05$ 且药物名称明确。将平均关联分数升序排列, 选取排名前10的药物进行文献检索分析。

1.2.7 MTT法验证候选药物对耐药细胞增殖的抑制作用

MCF-7/TAM细胞在37 °C, 5%CO₂的培养箱中培养, 在含5% CCS的phenol-free DMEM培养基中生长, 当生长融合度达80%时, 消化并接种于96孔板中。细胞分为5组, 即溶剂对照组和不同浓度LY-294002组(0.3, 1, 3, 5, 10 μmol/L), 每组5个复孔, 药物处理5 d后, 按MTT试剂盒操作说明测定各孔吸光度值, 计算各浓度下的细胞存活率。

1.3 统计学处理

采用R 3.2.5统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用独立样本t检验, 生存分析采用Kaplan-Meier法, 组间比较采用Log-Rank检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 基因差异表达分析采用芯片数据线性模型法, 多重校验采用Benjamin-Hochberg法, $FDR < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选差异表达基因

对数据集GSE67916和GSE26459筛选出的上调及下调基因分别绘制韦恩图取交集, 获得共同差异表达的基因462个, 其中上调基因257个, 下调基因205个(图1)。

2.2 差异表达基因功能注释

对462个共同差异表达基因进行功能注释, 结果显示这些基因显著富集于以下通路: 激素响应、mTORC1信号通路、低氧、肌细胞生成、糖酵解、脂肪酸代谢、细胞凋亡、凝血反应、胆固醇平衡和脂肪生成(图2)。

2.3 差异表达基因编码蛋白互相作用网络分析

构建差异表达基因编码蛋白互相作用网络图并进行拓扑结构分析, 结果表明: 在所有节点蛋白中, ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)的Degree unDir值最高, 处于网络图的中心, 即为乳腺癌他莫昔芬耐药的核心基因(图3)。

2.4 ACLY在他莫昔芬敏感患者与耐药患者中的表达

数据集GSE9893共包括155例服用他莫昔芬

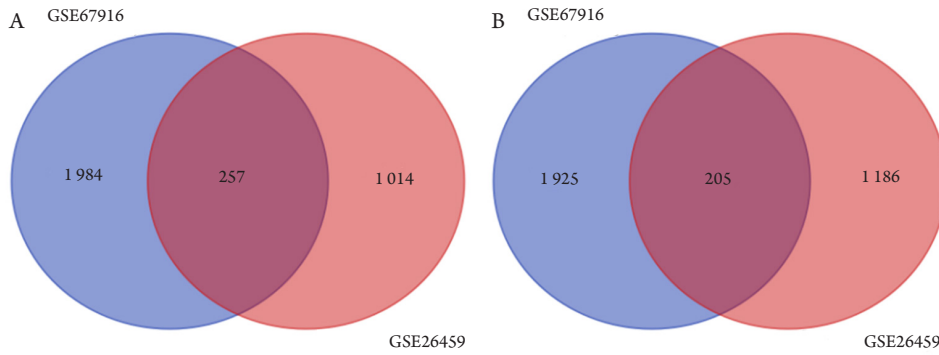


图1 GSE67916和GS26459共有的差异表达基因

Figure 1 Common differentially expressed genes between GSE67916 and GSE26459

(A)上调基因; (B)下调基因。

(A) Up-regulated genes; (B) Down-regulated genes.

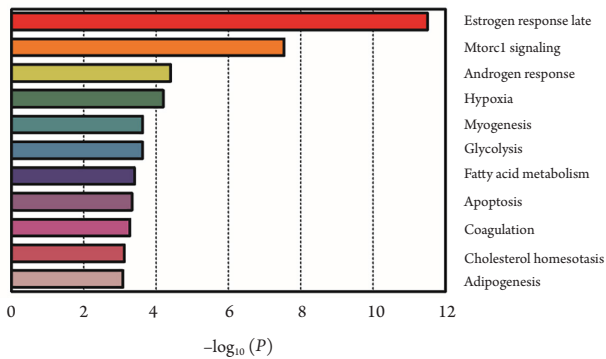


图2 差异表达基因功能注释

Figure 2 Functional annotation for differentially expressed genes

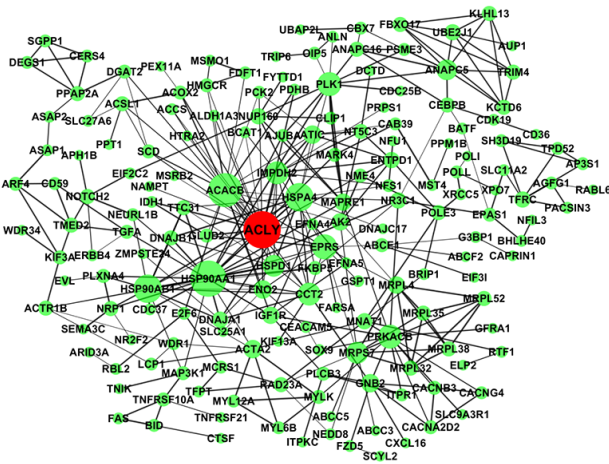


图3 差异表达基因编码蛋白的互相作用网络图

Figure 3 Interaction network map of differentially expressed genes-coding proteins

治疗的乳腺癌患者, 治疗期间有103例未出现复发, 定义为他莫昔芬敏感患者(TAM-sensitive); 52例出现复发, 定义为他莫昔芬耐药患者(TAM-resistant)。芯片处理结果表明ACLY在耐药患者中的表达水平显著高于敏感患者($P < 0.05$, 图4)。

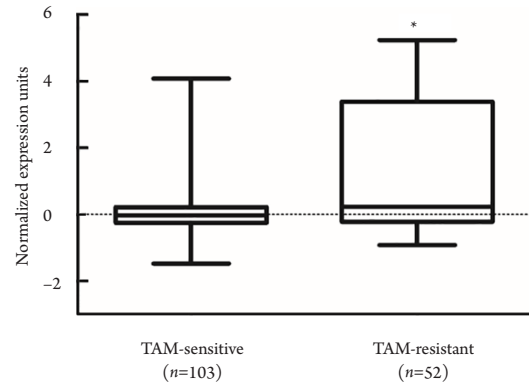


图4 ACLY在他莫昔芬敏感患者与耐药患者中的表达

Figure 4 Expression levels of ACLY between tamoxifen-sensitive patients and resistant patients

与他莫昔芬敏感患者相比, $*P < 0.05$ 。

Compared with TAM-sensitive patients, $*P < 0.05$.

2.5 ACLY 表达水平与患者无复发生存率的关系

根据ACLY的表达值是否高于中位数, 将155例服用他莫昔芬治疗的乳腺癌患者分为高表达组和低表达组, 绘制生存曲线, 结果表明: ACLY低表达患者服用他莫昔芬, 无复发生存率显著高于高表达患者($P < 0.05$, 图5)。

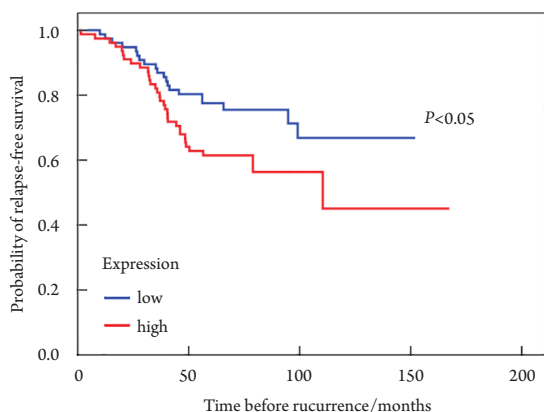


图5 ACLY表达水平与患者无复发生存率的关系

Figure 5 Correlation between ACLY expression levels and relapse-free survival

表1 经cMap筛选出的乳腺癌他莫昔芬耐药候选治疗药物

Table 1 Candidate therapeutic agents screened by cMap for tamoxifen resistant breast cancer

序号	药物名称	n	平均关联分数	富集分数	P	临床主治
1	匹莫齐特	4	-0.488	-0.906	0.00014	二苯丁哌啶类抗精神病药
2	萘丁美酮	4	-0.484	-0.878	0.00052	非甾体类抗炎药
3	依米丁	4	-0.405	-0.829	0.00163	治疗阿米巴病
4	吐根碱	5	-0.403	-0.570	0.04446	治疗阿米巴病
5	去甲替林	4	-0.362	-0.644	0.03847	三环类抗抑郁药
6	渥曼青霉素	18	-0.341	-0.443	0.00121	PI3K抑制药
7	LY-294002	61	-0.332	-0.553	<0.001	PI3K抑制药
8	普罗帕酮	4	-0.329	-0.788	0.00408	治疗心律不齐
9	咖啡酸	3	-0.28	-0.820	0.0117	5-脂肪氧化酶抑制药
10	羟苄丝肼	5	-0.266	-0.624	0.01951	治疗帕金森病

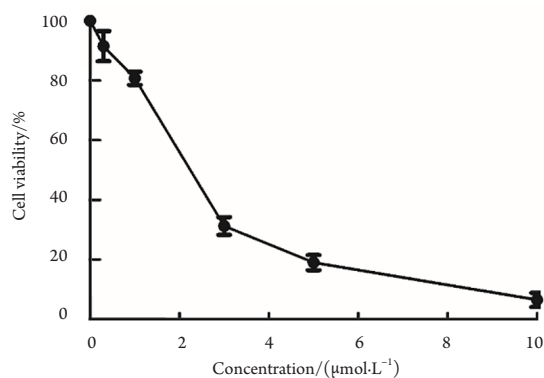


图6 LY-294002对MCF-7/TAM细胞增殖的影响

Figure 6 Effect of LY-294002 on cell proliferation of MCF-7/TAM

2.6 乳腺癌他莫昔芬耐药的候选治疗药物

将差异表达基因输入到cMap关联性图谱数据库进行在线药物筛选, 最终得到匹莫齐特、萘丁美酮、依米丁、吐根碱、去甲替林、渥曼青霉素、LY-294002、普罗帕酮、咖啡酸和羟苄丝肼等10种候选药物(表1)。

2.7 LY-294002 抑制耐他莫昔芬乳腺癌细胞的增殖

在筛选得到的候选药物中, LY-294002的检出次数最多且P值最小。结果显示: LY-294002可有效抑制MCF-7/TAM的增殖, 且抑制作用随剂量升高逐渐增强, 具有一定的剂量依赖性(图6)。

3 讨论

本研究首先考察他莫昔芬敏感的乳腺癌细胞与耐药细胞之间基因的差异表达, 揭示耐药发生发展过程中出现的异常生物学事件, 结果表明: 差异表达基因显著富集于雄激素响应、低氧、胆固醇平衡、糖酵解、脂肪酸代谢等通路。研究^[10]发现: 他莫昔芬耐药的乳腺癌患者高表达雄激素受体, 耐药的发生很可能是因肿瘤增殖由雌激素依赖型转变为雄激素依赖型。在临床上, 肿瘤组织内的低氧状态与肿瘤转移、耐药、预后不良密切相关^[11]。Alam等^[12]发现低氧可促进乳腺癌细胞表达低氧诱导因子-2 α 从而介导他莫昔芬耐药。近

年来, 胆固醇代谢与他莫昔芬耐药之间的关系也逐渐被认识^[13]。研究^[14]表明: 他莫昔芬可增加胆固醇前体物质积聚, 诱导细胞保护性自噬, 促进细胞存活进而发生耐药。依赖糖酵解获取能量是肿瘤细胞代谢的显著特征。且他莫昔芬耐药的乳腺癌细胞糖酵解水平显著高于敏感细胞, 糖酵解的异常活跃为乳腺癌细胞增殖和转移提供能量, 抑制糖酵解可提高他莫昔芬敏感性^[15-16]。他莫昔芬诱发脂肪肝在临床上多有报道, 这与他莫昔芬促进脂肪酸合成、诱导脂肪蓄积有关^[17], 然而脂质代谢异常如何影响他莫昔芬耐药尚未见报道, 有待后续研究。

本研究对差异表达基因编码的蛋白构建相互作用网络图谱, 拓扑学结构分析表明ACLY处于网络图谱的中心位置, 为他莫昔芬耐药的核心基因。ACLY是连接糖酵解和脂肪酸合成的关键酶, 可催化柠檬酸生成乙酰辅酶A, 后者是脂肪酸和胆固醇合成的关键物质^[18]。进一步验证结果表明: ACLY在他莫昔芬耐药患者中的表达水平显著高于敏感患者($P < 0.05$), 且ACLY低表达患者的无复发生存率显著高于高表达患者($P < 0.05$)。因此, ACLY高表达的乳腺癌患者可能是他莫昔芬耐药的高危人群, 对初诊患者可考虑选用其他内分泌治疗药物以避免耐药, 而对已经发生耐药的患者, 寻求药物提高治疗效果至关重要。

新药研发是一个耗时漫长、耗资巨大的过程, 而开发老药新用途可极大降低药物研发时间和成本, 加速药物开发进程, 是当前药物研发的热点^[19]。cMap是一个基于基因表达谱的药物筛选平台, 在研究老药新用途方面具有重要价值。本研究利用cMap数据库共筛选得到10种他莫昔芬耐药的候选治疗药物, 这些药物富集分数较高, 可较好地逆转他莫昔芬耐药发生过程中基因的正常表达。经文献检索, 药物均具有抗肿瘤活性, 其中关联分数和富集分数最高的匹莫齐特已被证实可抑制耐他莫昔芬乳腺癌细胞的增殖^[20], 这也印证了基于关联性图谱数据库筛选药物的可靠性。研究^[21]发现: LY-294002可降低糖酵解水平抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 耐他莫昔芬的乳腺癌细胞糖酵解水平显著增高, 因此LY-294002很可能对他莫昔芬耐药细胞具有抑制作用。本研究也证实LY-294002能有效抑制MCF-7/TAM的增殖, 且具有一定的剂量依赖性。

综上所述, ACLY高表达的乳腺癌患者临床预后较差, 更容易发生耐药, 可作为他莫昔芬耐药的潜在生物标志物, 后续大样本量的验证试验还

有待进行, 以明确其作为预后标志物的可靠性。此外, 本研究建立的基于关联性图谱数据库筛选药物的模式是可行的, 发现的多种候选药物可能对治疗他莫昔芬耐药具有重要价值, 后续将在体内外展开深入研究, 以期为临床他莫昔芬耐药提供有效的防治策略。

参考文献

1. Amanatullah DF, Tamareis JS, Chu P, et al. Local estrogen axis in the human bone microenvironment regulates estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 121.
2. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline focused update[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(21): 2255-2269.
3. 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2017年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(9): 695-760. Chinese Anti-Cancer Association, Committee of Breast Cancer Society. Breast cancer diagnosis and treatment guidelines and specifications (2017 version) [J]. *China Oncology*, 2017, 27(9): 695-760.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials[J]. *Lancet*, 2005, 365(9472): 1687-1717.
5. Powell JR, Bennett M, Waters R, et al. Functional genome-wide analysis: a technical review, its developments and its relevance to cancer research[J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2013, 7(2): 157-166.
6. Lamb J, Crawford ED, Peck D, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease[J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1929-1935.
7. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1 000 000 profiles[J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1437-1452. e17.
8. Hicks DF, Goossens N, Blas-García A, et al. Transcriptome-based repurposing of apigenin as a potential anti-fibrotic agent targeting hepatic stellate cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42563.
9. Lv C, Zeng HW, Wang JX, et al. The antitumor natural product tanshinone IIA inhibits protein kinase C and acts synergistically with 17-AAG[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 165.
10. Rondón-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, et al. Tamoxifen resistance: emerging molecular targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8).
11. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis[J]. *Science*, 2016, 352(6282): 175-180.
12. Alam MW, Persson CU, Reinbothe S, et al. HIF2 α contributes to

- antiestrogen resistance via positive bilateral crosstalk with EGFR in breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11238-11250.
13. Poirrot M, Silvente-Poirrot S, Weichselbaum RR, et al. Cholesterol metabolism and resistance to tamoxifen[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(6): 683-689.
 14. Leignadier J, Dalenc F, Poirrot M, et al. Improving the efficacy of hormone therapy in breast cancer: the role of cholesterol metabolism in SERM-mediated autophagy, cell differentiation and death[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 144: 18-28.
 15. Radde BN, Ivanova MM, Mai HX, et al. Nuclear respiratory factor-1 and bioenergetics in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 347(1): 222-231.
 16. Woo YM, Shin Y, Lee EJ, et al. Inhibition of aerobic glycolysis represses Akt/mTOR/HIF-1 α axis and restores tamoxifen sensitivity in antiestrogen-resistant breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132285.
 17. 王娜娜, 周桂琴. 他莫昔芬致脂肪肝机制研究进展[J]. *药物不良反应杂志*, 2016, 18(4): 290-292.
 - WANG Nana, ZHOU Guiqin. Research process in mechanisms of tamoxifen-induced fatty liver[J]. *Adverse Drug Reactions Journal*, 2016, 18(4): 290-292.
 18. Wang D, Yin L, Wei J, et al. ATP citrate lyase is increased in human breast cancer, depletion of which promotes apoptosis[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(4): 1010428317698338.
 19. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks?[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 314-316.
 20. Strobl JS, Peterson VA. Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992, 263(1): 186-193.
 21. 袁济钢, 陈敏, 李旭, 等. LY294002对人胃腺癌细胞株BGC-823糖酵解水平的影响及其机制探讨[J]. *胃肠病学*, 2013, 18(5): 260-265.
 - YUAN Jigang, CHEN Min, LI Xu, et al. Effect of LY294002 on glycolysis in human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 and its possible mechanism[J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*, 2013, 18(5): 260-265.

本文引用: 张晶晶, 赵拯, 刘赟心, 朱余兵, 樊宏伟. 基于基因表达谱筛选乳腺癌他莫昔芬耐药的生物标志物与治疗药物[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1392-1398. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.003

Cite this article as: ZHANG Jingjing, ZHAO Zheng, LIU Yunxin, ZHU Yubing, FAN Hongwei. Screening biomarkers and therapeutic agents for tamoxifen-resistant breast cancer based on gene expression profile[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1392-1398. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.003