

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.008

· 基础研究 ·

## DUOX2对结直肠癌细胞氟尿嘧啶敏感性的影响

张雪<sup>1a</sup>, 刘妍<sup>1a</sup>, 周欣亮<sup>1a</sup>, 范志松<sup>1a</sup>, 韩晶<sup>1a</sup>, 冯莉<sup>1a</sup>, 左静<sup>1a</sup>, 王贵英<sup>1b,2</sup> (1. 河北医科大学 第四医院 a. 肿瘤内科; b. 外二科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学 第三医院 胃肠外科, 河北 石家庄 050051)

**[摘要]** **目的:** 探讨双氧化酶 2 (dual oxidase 2, DUOX2) 对结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 细胞 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 药物敏感性的影响。 **方法:** 选用 CRC 细胞系 DLD-1、SW480、HCT116、SW620 与正常肠上皮细胞株 NCM460, 用 qPCR 法检测细胞中 DUOX2 的表达水平。利用慢病毒感染技术, 稳定敲降 HT-29 与 HCT116 细胞中 DUOX2 表达, qPCR 法和 WB 法检测敲降效率。用不同浓度 (0、5、10、20、40、80、120  $\mu\text{g/ml}$ ) 5-FU 处理 sh-Control 组与 sh-DUOX2 组细胞, 用 CCK-8 法、流式细胞术分别检测 5-FU 对细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期的影响。构建裸鼠 HT29 细胞移植瘤模型, 观察 DUOX2 基因对 5-FU 疗效的影响。 **结果:** DUOX2 mRNA 在 CRC 细胞中的表达水平显著高于 NCM460 细胞 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。敲降 DUOX2 基因后, 与 sh-Control 组相比, sh-DUOX2 组 HT29 和 HCT116 细胞中 DUOX2 mRNA 和蛋白表达水平明显下降 (均  $P < 0.01$ ); 细胞对 5-FU 的敏感性增强, 细胞凋亡率明显升高 (均  $P < 0.01$ ), G0/G1 期比例显著升高、G2 期与 S 期比例显著下降 (均  $P < 0.01$ )。未经 5-FU 治疗的 sh-Control 组与 sh-DUOX2 组裸鼠移植瘤体积及质量比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ), 经 5-FU 治疗的 sh-DUOX2+5-FU 组移植瘤体积及质量明显低于 sh-Control+5-FU 组 (均  $P < 0.01$ )。 **结论:** 敲降 DUOX2 基因可显著增强 CRC 细胞对 5-FU 的敏感性。

**[关键词]** 双氧化酶 2; 5-氟尿嘧啶; 结直肠癌; HT29 细胞; HCT116 细胞; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R735.3; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)12-1365-07

## Effect of DUOX2 on sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil

ZHANG Xue<sup>1a</sup>, LIU Yan<sup>1a</sup>, ZHOU Xinliang<sup>1a</sup>, FAN Zhisong<sup>1a</sup>, HAN Jing<sup>1a</sup>, FENG Li<sup>1a</sup>, ZUO Jing<sup>1a</sup>, WANG Guiying<sup>1b,2</sup> (1a. Department of Medical Oncology, 1b. The Second Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of double oxidase 2 (DUOX2) on the sensitivity of colorectal cancer (CRC) cells to 5-fluorouracil (5-FU). **Methods:** CRC cell lines DLD-1, SW480, HCT116, SW620 and normal intestinal epithelial cell line NCM460 were selected, and the expression of DUOX2 in these cell lines were detected by qPCR. DUOX2 expression in HT-29 and HCT116 cells was stably knocked down by lentivirus infection technique. The knockdown efficiency was detected by qPCR and WB. Cells in sh-Control and sh-DUOX2 groups were treated with 5-FU at different concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80, 120  $\mu\text{g/ml}$ ). The effects of 5-FU on cell proliferation, apoptosis and cell cycle were detected by CCK-8 method and flow cytometry. HT29 cell transplanted xenograft model in nude mice was constructed to observe the effect of DUOX2 gene on the treatment efficacy of 5-FU. **Results:** the expression level of DUOX2 mRNA in CRC cells was significantly higher than that in NCM460 cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with sh-Control group, the mRNA and protein expressions of DUOX2 in sh-DUOX2 group were significantly decreased (all  $P < 0.01$ ); the sensitivity of cells to 5-FU was enhanced, the apoptosis rate and the ratio of cells at G0/G1 phase were significantly increased (all  $P < 0.01$ ), and the ratio of cells at G2 and S phase was significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). There was no significant difference in tumor volume and mass between sh-Control group and sh-DUOX2 group without 5-FU treatment (all  $P > 0.05$ ), but the volume and mass of transplanted tumor in sh-DUOX2+5-FU group after 5-FU treatment was significantly lower than that in sh-Control+5-FU group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The sensitivity of CRC cells to 5-FU can be significantly enhanced by knocking down DUOX2 gene.

**[基金项目]** 国家癌症中心肿瘤科研专项课题 (No. NCC2017A23)。Project supported by the Cancer Research Program of National Cancer Center (No. NCC2017A23)

**[作者简介]** 张雪 (1986-), 女, 博士生, 主治医师, 主要从事结直肠癌的临床研究, E-mail: zhangxuetgy2019@126.com

**[通信作者]** 王贵英 (WANG Guiying, corresponding author), 博士, 主任医师、教授、博士生导师, 主要从事结直肠癌的临床与基础研究, E-mail: wangguiyingtgy@163.com

**[Key words]** double oxidase 2 (DUOX2); 5-fluorouracil (5-FU); colorectal cancer (CRC); HT29 cell; HCT116 cell; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1365-1371. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.008]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,在中国,CRC病死率在男性肿瘤中占第三位,在女性肿瘤中占第四位<sup>[1]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)用于治疗多种恶性肿瘤,是CRC治疗中的基础药物,广泛应用于CRC患者治疗的不同阶段。对5-FU药物的敏感性是影响治疗效果的关键因素,如何提高5-FU疗效成为CRC研究的热点。双氧化酶2(dual oxidase 2, DUOX2)属于NADPH氧化酶家族成员,位于人类15号染色体上,最初发现于甲状腺组织<sup>[2]</sup>,与甲状腺功能障碍和遗传性短暂性先天性甲状腺功能减退有关<sup>[3-4]</sup>。DUOX2在多种肿瘤的发生发展过程中发挥不同的作用,该基因在肝癌<sup>[5]</sup>、胰腺癌<sup>[6]</sup>、前列腺癌<sup>[7]</sup>中高表达,在肺癌中低表达<sup>[8]</sup>。既往研究显示,DUOX2在肠癌组织中高表达<sup>[9-10]</sup>,此外其产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以促进5-FU诱导的上皮-间质转化<sup>[11]</sup>。但DUOX2对CRC细胞5-FU药物敏感性的影响及相关机制鲜有研究。本研究通过敲降CRC细胞中DUOX2的表达,探索其对5-FU化疗敏感性的影响,旨在为提高CRC患者的5-FU治疗效果寻找新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

人CRC细胞系DLD-1、SW480、HCT116、HT-29、SW620和正常肠上皮细胞株NCM460均购自中科院上海细胞库。

5周龄、雌性BALB/c裸鼠购自维通利华(实验动物合格证号:No.1103241911014956),动物实验严格按照河北医科大学第四附属医院实验动物伦理委员会的指导方针进行。

DMEM培养基、PRMI 1640培养基和0.25% EDTA胰酶购自Thermo公司,PBS和胎牛血清购自BI公司,逆转录试剂盒购自Promega公司,DUOX2引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,DUOX2一抗购自美国OriGene Technologies公司,GAPDH一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,山羊抗兔荧光二抗购自美国Rockland公司,sh-DUOX2与阴性对照sh-Control慢病毒由上海吉凯基因科技有限公司合成,PE偶联Annexin-V凋亡检测试剂盒购自美国BD公司,细胞周期检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司。

### 1.2 细胞培养与慢病毒感染

将不同细胞株复活后,HT-29细胞培养于10%胎牛血清的DMEM培养基中,DLD-1、SW480、HCT116、SW620和NCM460细胞在10%胎牛血清的PRMI 1640培养基中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。视细胞生长情况,每2~4 d进行1:2~1:3传代。

取对数生长期HT-29或HCT116细胞,接种于6孔板,当细胞贴壁生长汇合度约50%时,按照慢病毒感染使用说明书的方法进行慢病毒感染。DUOX2基因的干扰序列为:5'-GGAGGACAACAUGUGGUUTTA-ACCACUAUGUUGUCCUCCTT-3'。在本研究中将稳定敲降DUOX2的细胞定义为sh-DUOX2,同时设计sh-Control为阴性对照。慢病毒带有GFP标签,转染72 h,荧光表达丰度较高时,在荧光显微镜下观察转染效率(转染效率=绿色荧光细胞数/总细胞数×100%)。

### 1.3 qPCR法检测CRC细胞中DUOX2 mRNA表达

收集待检测的细胞,用TRIzol提取细胞中总RNA,经检测RNA的纯度和浓度后,用逆转录试剂盒合成cDNA。参照下列反应体系,以cDNA做模板,配制qPCR反应体系:cDNA 4.6 μl、引物0.4 μl、qPCR mix 5.0 μl,总体积10 μl。引物序列:DUOX2 F为5'-GCTTGGACCCATCATTAC-3', R为5'-GCCGCAACCTCATAACCT-3'。GAPDH作为内参。反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共40个循环完成扩增,之后95℃ 1 min,55℃ 30 s,95℃ 30 s绘制熔解曲线。 $\Delta CT = [CT(DUOX2) - CT(GAPDH)]$ , DUOX2 相对表达量 =  $sh-DUOX2 (2^{-\Delta CT}) / sh-Control (2^{-\Delta CT})$ 。

### 1.4 WB法检测CRC细胞中DUOX2蛋白的表达

用RIPA裂解液处理sh-Control和sh-DUOX2组细胞提取总蛋白,BCA试剂盒测定各组蛋白浓度,按照50 μg/孔上样后,进行SDS-PAGE、转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h,分别加入DUOX2(1:500)与GAPDH(1:2 000)一抗4℃孵育过夜。次日,TBST洗膜3次后,加入羊抗兔荧光二抗(1:8 000)继续孵育2 h,清洗后,置于Odyssey双色红外荧光扫描系统,分析蛋白条带的灰度值,以GAPDH为内参,计算DUOX2蛋白的表达量。

### 1.5 CCK-8法检测5-FU对CRC细胞增殖的抑制作用

将感染后细胞铺于96孔培养板中(5×10<sup>3</sup>个细胞孔),每组设置6个复孔,同时设计阴性对照及空白对照。细胞贴壁后,分别在每组中加入不同浓度(0、5、10、20、40、80、120 μg/ml)的5-FU。培养箱中培养72 h

后,每孔中加入 20  $\mu\text{l}$  的 CCK-8 溶液,2 h 后在酶标仪上测定波长在 450 nm 处各孔的光密度( $D$ )值,以反映各组细胞的增殖活力,并计算 5-FU 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

### 1.6 流式细胞术检测 CRC 细胞的凋亡率及细胞周期分布

(1)细胞凋亡率检测:用 5-FU 干预 sh-Control 和 sh-DUOX2 两组细胞 72 h,标记为 sh-Control+5-FU 和 sh-DUOX2+5-FU,未经干预的 sh-Control 作为对照。取 Falcon 试管,做好标记。用冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,用 1 $\times$ 结合缓冲液制成密度为  $1\times 10^6$  个细胞/ml 的悬液。各组分别加入 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液、5  $\mu\text{l}$  Annexin-V 和 5  $\mu\text{l}$  核酸染料,轻轻混匀后室温避光放置 15 min,后分别加入 1 $\times$ 结合缓冲液 400  $\mu\text{l}$ ,1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。细胞凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

(2)细胞周期分布检测:分别收集密度为  $2\times 10^5\sim 1\times 10^6$  个的各组细胞,离心弃上清。用 PBS 洗涤 1 次,离心弃上清。加入 1 ml DNA 染色液和 10  $\mu\text{l}$  破膜剂混匀,室温避光孵育 30 min 后,于流式细胞仪上检测细胞周期的分布。

### 1.7 裸鼠 HT29 细胞移植瘤模型的构建及观察

将 BALB/c 裸鼠随机分为 2 组(10 只/组),将 sh-Control、sh-DUOX2 两组 HT29 细胞( $1\times 10^6$  个细胞/只)分别注射在裸鼠腋窝中后部皮下。出现肉眼可见的皮下结节后,随机在两组裸鼠中各取 5 只进行 5-FU (5 mg/kg)腹腔注射治疗,1 次/3 d。每周观察、记录移植瘤大小,计算肿瘤体积= $1/2\times$ 长径 $\times$ 短径 $^2$ 。4 周后处死裸鼠,取移植瘤进行拍照并称质量。

### 1.8 统计学处理

qPCR 法、WB 法、CCK-8 法、流式细胞术等实验均重复 3 次。采用 SPSS21.0 与 GraphPad Prism5.0 软件进行实验数据的统计分析与绘图。正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间计量资料比较采用  $t$  检验,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DUOX2 在 CRC 细胞系中均表达上调

qPCR 检测结果(图1)显示,与 NCM460 细胞相比,DUOX2 mRNA 在 DLD-1、SW480、HCT116、HT-29、SW620 细胞中的表达水平均明显上调( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),以 SW620 细胞中表达水平最高。

### 2.2 成功建立 DUOX2 敲除的 CRC 细胞株

选取 DUOX2 表达水平较高的 HT-29 和 HCT116 两个细胞株进行慢病毒转染,72 h 后用荧光显微镜下观察,两种细胞的转染效率均  $>85\%$ (图 2A)。qPCR 和 WB 实

验结果显示,与 sh-Control 组相比,sh-DUOX2 组 DUOX2 mRNA 表达水平显著下调(均  $P<0.01$ ,图 2B),DUOX2 蛋白的表达水平显著降低(均  $P<0.01$ ,图 2C)。

### 2.3 敲降 DUOX2 后增强 5-FU 对 CRC 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 法检测结果(图3)显示,用不同浓度的 5-FU 处理后,sh-DUOX2 组 HT29 和 HCT116 细胞  $\text{IC}_{50}$  值均明显低于 sh-Control 组[HT29:( $31.43\pm 3.92$ )vs( $48.42\pm 6.23$ ) $\mu\text{g/ml}$ ,  $P<0.01$ ; HCT116:( $15.5\pm 4.42$ )vs( $29.3\pm 7.56$ ) $\mu\text{g/ml}$ ,  $P<0.01$ ]。敲降 DUOX2 基因可明显降低 5-FU 药物的  $\text{IC}_{50}$  值。

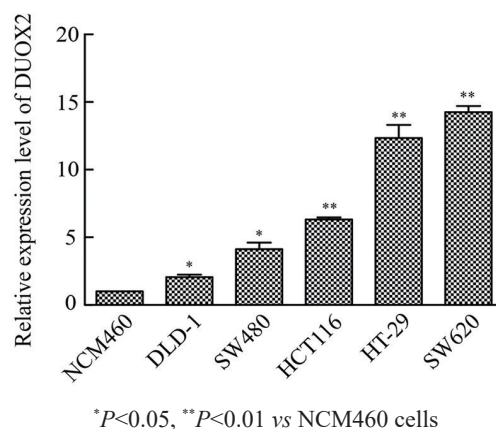


图1 DUOX2 基因在不同细胞系中的表达水平

Fig.1 The expression level of DUOX2 in CRC cell lines

### 2.4 敲降 DUOX2 对 5-FU 诱导的细胞凋亡率与细胞周期的影响

流式细胞术检测结果(图4)显示,敲降 DUOX2 再用 5-FU (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 干预后,sh-DUOX2+5-FU 组 HT29 和 HCT116 细胞的凋亡率均明显高于 sh-Control+5-FU 组和 sh-Control 组 [HT29:( $24.73\pm 0.84$ )% vs ( $12.09\pm 0.30$ )%、( $7.25\pm 0.29$ )%, 均  $P<0.01$ ; HCT116:( $16.63\pm 1.36$ )% vs ( $5.60\pm 0.62$ )%、( $2.37\pm 0.45$ )%, 均  $P<0.01$ ]。细胞周期检测结果(图5)显示,sh-Control 与 sh-DUOX2 组 HT29 和 HCT116 细胞的细胞周期分布比较差异无统计学意义(均  $P>0.05$ );用 5-FU (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 干预后,与 sh-Control+5-FU 相比,sh-DUOX2+5-FU 组细胞的 G0/G1 期比例显著上调( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),G2 期比例显著下降(均  $P<0.01$ ),S 期比例亦显著下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。实验结果表明,5-FU 对 sh-DUOX2 组细胞周期的阻滞作用显著优于 sh-Control 组。

### 2.5 敲降 DUOX2 增强裸鼠 HT29 细胞移植瘤对 5-FU 的敏感性

成功建立裸鼠皮下 HT29 细胞移植瘤模型。1 周后随机腹腔注射 5-FU 进行治疗,记录不同时期各组裸鼠移植瘤的生长情况(图 6A)。4 周后处死裸鼠,剥除移植

瘤并称质量,结果显示(图6A,B),未经5-FU治疗的sh-Control组与sh-DUOX2组移植瘤的体积及质量比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$ );经5-FU治疗的sh-DUOX2+5-FU组和sh-DUOX2+5-FU组移植瘤的体

积及质量均明显低于未治疗sh-DUOX2组(均 $P<0.01$ ),经5-FU治疗的sh-DUOX2+5-FU组移植瘤体积及质量明显低于sh-Control+5-FU组(均 $P<0.01$ )。实验结果表明,敲降DUOX2后明显提高5-FU的治疗效果。

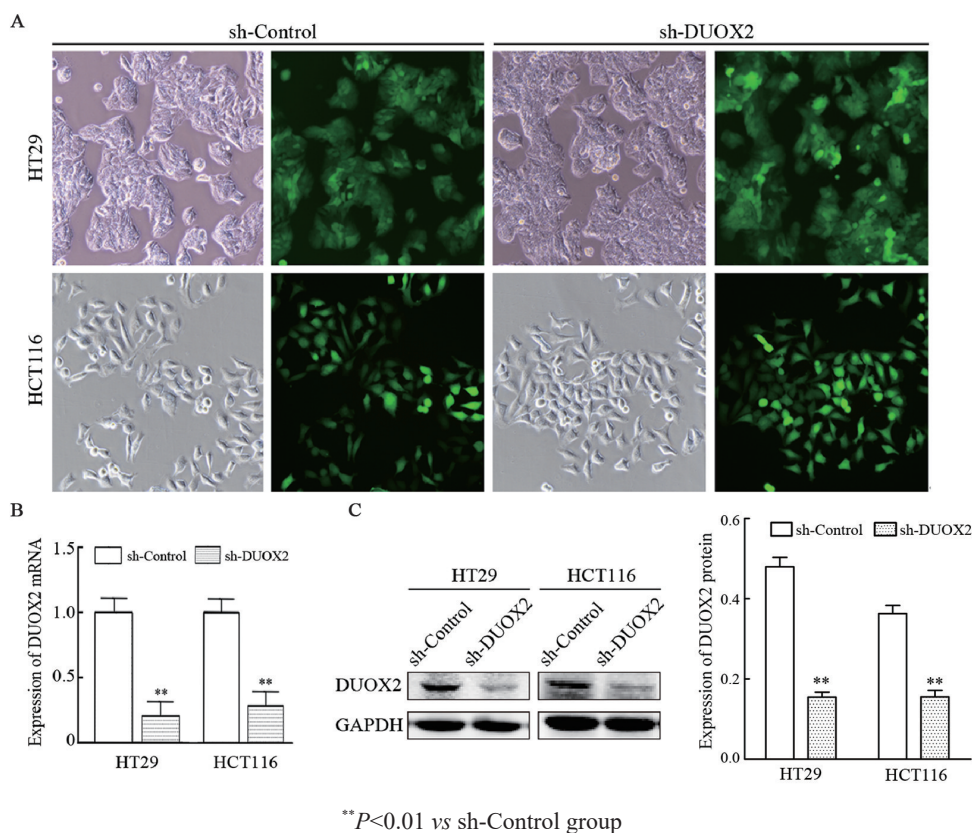


图2 慢病毒感染后荧光显微镜图像(A,  $\times 400$ )和CRC细胞中DUOX2表达(B, C)

Fig.2 Fluorescence microscopical images after lentivirus infection (A,  $\times 400$ ) and expression of DUOX2 in CRC cells (B, C)

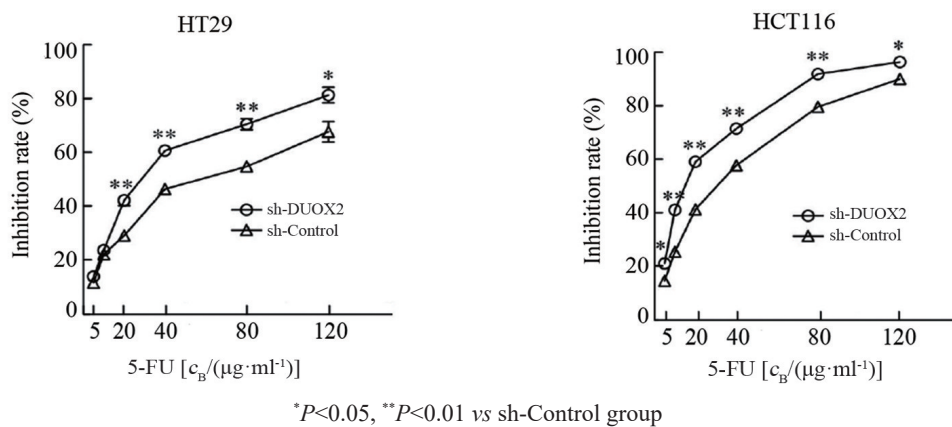


图3 5-FU对CRC细胞增殖抑制率的影响

Fig.3 Effect of 5-FU on proliferation inhibition rate of CRC cells

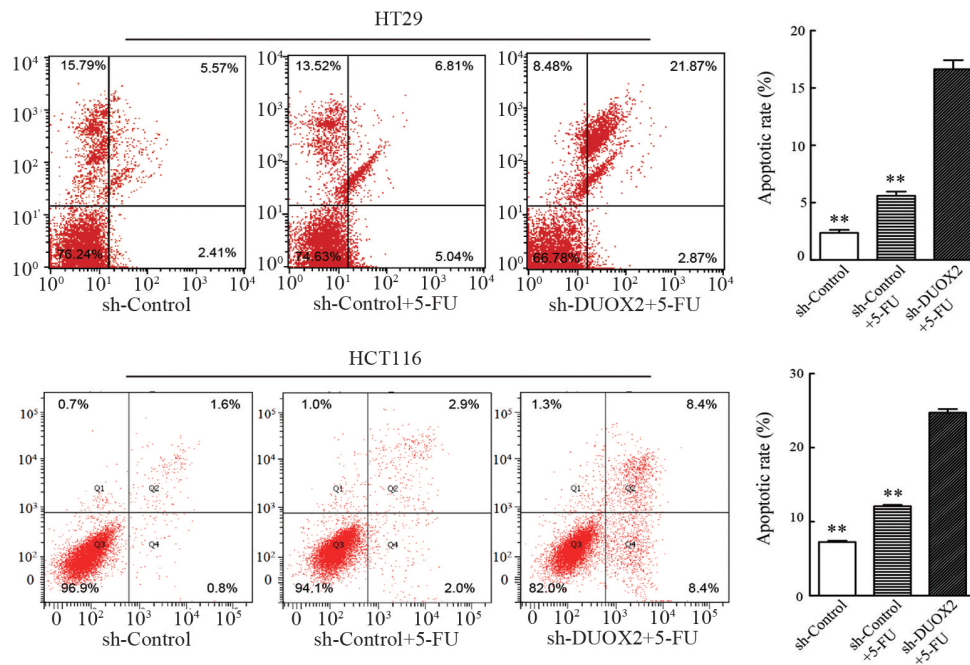
### 3 讨论

近年来,随着肿瘤化疗敏感性相关研究的不断深入,相应的基因检测可能为患者提供有效的药物指导与预后评估<sup>[12]</sup>。5-FU是抗代谢类化疗药,在体

内可以抑制胸苷酸合成酶的活性,阻断脱氧嘧啶核苷酸酶向胸腺嘧啶核苷酸的转化,干扰DNA及RNA的合成,可以转化成多种活性物质如5-FU核苷,干扰蛋白质合成,对肿瘤细胞各期均有作用,近年来对其药物敏感性的研究成为热点<sup>[13]</sup>。作为CRC化疗的基

础用药,5-FU在新辅助及辅助化疗、一二线等多个阶段的内科治疗中占有举足轻重的地位,提高肿瘤细胞对5-FU的敏感性是改善CRC患者生存的关键。然而受到机体、器官、微环境、细胞等多种因素的影

响,不同CRC患者对5-FU为基础的标准化疗的敏感性存在很大差异<sup>[14]</sup>,研究人员试图通过筛选对化疗敏感基因的可以进一步改善治疗效果,有助于开展个体化的药物治疗。



\*\* $P < 0.01$  vs sh-DUOX2+5-FU

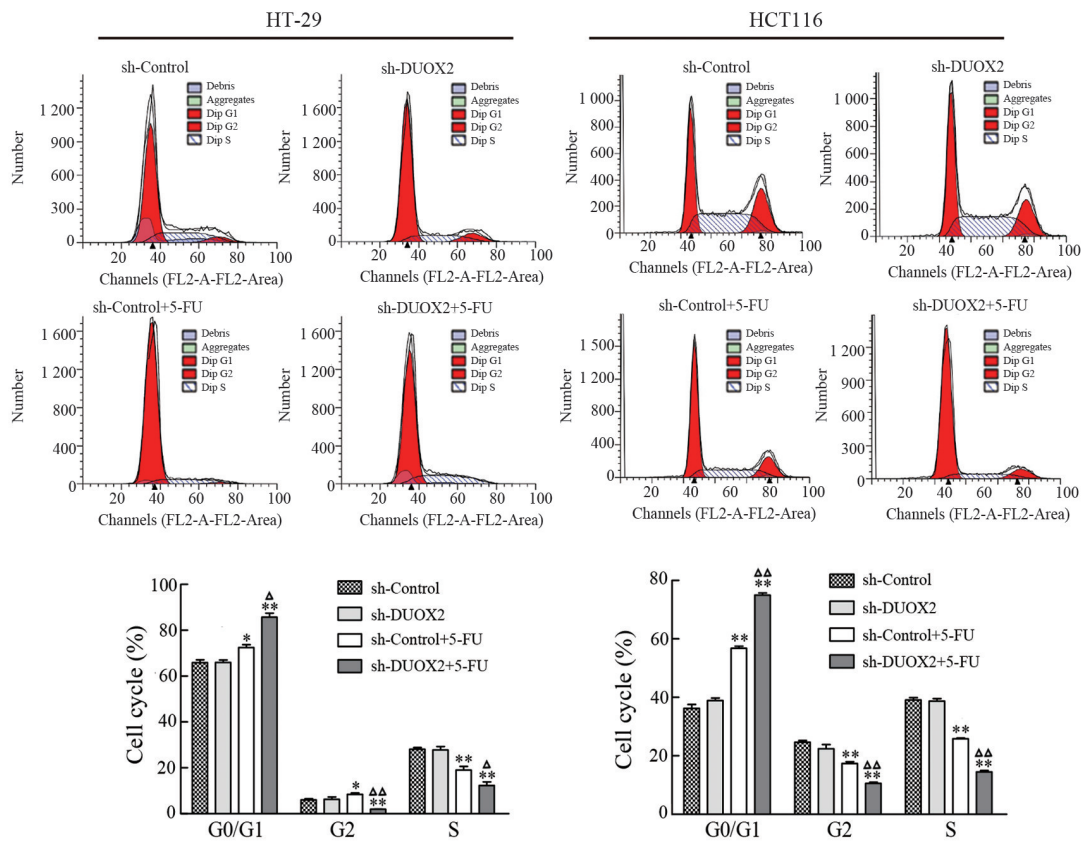
图4 5-FU对两组细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of 5-FU on cell apoptosis in the two groups

众所周知,肿瘤微环境在肿瘤的发生发展中起重要的作用<sup>[15]</sup>。在肿瘤微环境的影响因素中,ROS占有举足轻重的地位,它可显著影响肿瘤的发生发展与药物敏感性。最初认为,ROS仅仅是线粒体呼吸和其他代谢途径的副产物,随着研究的深入,逐渐发现ROS的产生受多种内源性调节,肿瘤细胞中往往存在过高的ROS水平,导致异常的细胞信号转导。既往研究认为,在化疗基础上联合抗氧化剂治疗,如维生素C、维生素E、乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽等<sup>[16-19]</sup>可提高化疗的有效率。此外,ROS主要来自于NADPH氧化酶家族(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases, NOXs)<sup>[20]</sup>,对该家族成员的干预可能有助于提高化疗疗效。NOXs成员包括NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1和DUOX2,各成员在不同类型的细胞中发挥的功能存在差异。虽然目前认为DUOX1和DUOX2是高度同源的,二者均依赖于 $Ca^{2+}$ 信号转导,但二者在功能上也存在差异,在非刺激条件下,DUOX2具有基础活性,并不太严格依赖于 $Ca^{2+}$ 。研究<sup>[21]</sup>表明,沉默DUOX1可以导致肺癌H292细胞对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的抗性增加。而DUOX2在药

物作用的机制与信号通路等方面鲜有研究报道。本研究结果提示,沉默DUOX2使CRC细胞对5-FU敏感性增强,与DUOX1的功能存在明显差异,可能与不同成员潜在的独特功能相关。

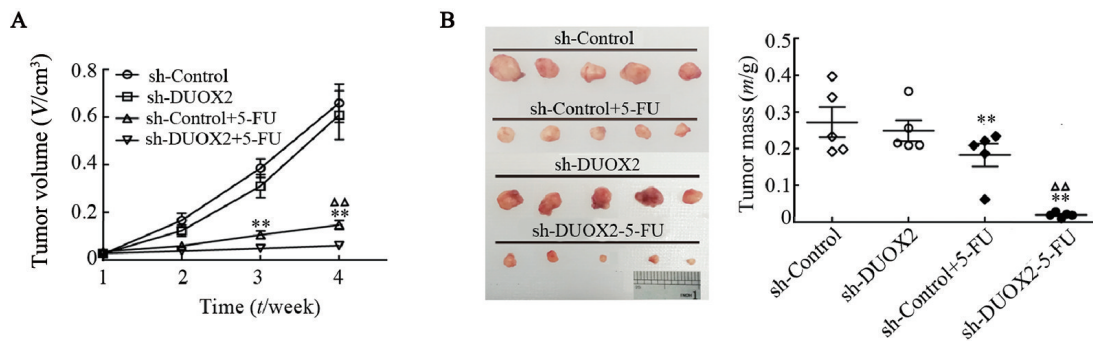
在所有NOXs家族成员中,DUOX2功能相对单一,只产生 $H_2O_2$ <sup>[22]</sup>,而 $H_2O_2$ 是一种重要的ROS,它能够调控细胞的增殖、迁移和分化等信号通路<sup>[23]</sup>。大量的ROS可导致肿瘤细胞氧化应激的发生,是参与肿瘤微环境调控的重要因子。鉴于DUOX2独特的生物学功能,笔者推测DUOX2可能参与化疗药物的敏感性。有研究表明,DUOX2通常在CRC<sup>[9-10]</sup>、胰腺癌<sup>[6,24]</sup>、Barrett食管和胃癌<sup>[9]</sup>中高表达,而在肺癌中低表达<sup>[8]</sup>,DUOX2在CRC中表达上调与预后不良有关<sup>[25]</sup>。本研究发现,DUOX2在CRC细胞中的表达明显高于正常肠上皮细胞,与既往研究一致。提示在CRC中,DUOX2可能作为癌基因发挥生物学功能。为进一步明确CRC患者癌组织中DUOX2水平是否与患者5-FU药物敏感性相关,本课题组后期将收集CRC患者肿瘤组织与正常组织标本,进行DUOX2检测,并对其治疗及预后进行随访。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs sh-Control or sh-DUOX2 group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs sh-Control+5-FU group

图5 不同分组的细胞周期情况

Fig.5 Cell cycle in different groups



\*\* $P < 0.01$  vs sh-Control or sh-DUOX2 group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs sh-Control+5-FU group

图6 裸鼠CRC移植瘤的生长曲线(A)和质量(B)

Fig.6 Growth curve (A) and mass (B) of CRC transplanted tumor in nude mice

本研究中选取DUOX2表达水平较高的HCT116和HT29细胞,采用慢病毒感染技术敲低DUOX2的表达后,qPCR与WB实验结果均显示CRC细胞中DUOX2的表达受到抑制;通过CCK-8法检测发现,敲降DUOX2后,CRC细胞对5-FU的敏感性明显提高,流式细胞结果显示敲低DUOX2后,5-FU导致的细胞凋亡率升高、细胞周期阻滞明显增加。敲降DUOX2基因可显著增强CRC细胞的5-FU敏感性,提示DUOX2可能是提高CRC患者5-FU敏感性的潜在干预靶点。既往KANG等<sup>[11]</sup>发现,5-FU耐药的

SNUC5细胞中DUOX2 mRNA水平显著升高,提示DUOX2高表达可能与5-FU耐药相关,与本研究结论一致。本研究推测,DUOX2可能通过影响肿瘤细胞的ROS水平,导致异常的细胞信号转导,进而影响药物的疗效。未来需更深入的研究来揭示其参与药物敏感性调控的机制。

综上所述,DUOX2与CRC细胞5-FU的药物敏感性密切相关,靶向抑制DUOX2的表达可以提高肿瘤细胞对5-FU化疗敏感性,为寻找新的途径改善CRC患者5-FU化疗效果提供了新的思路和理论依据。

## [参 考 文 献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] LANDRY W D, COTTER T G. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(4): 934-938. DOI: 10.1042/BST20140060.
- [3] KIZYS M M L, LOUZADA R A, MITNE-NETO M, et al. DUOX2 mutations are associated with congenital hypothyroidism with ectopic thyroid gland[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 102(11): 4060-4071. DOI:10.1210/jc.2017-00832.
- [4] MATSUO K, TANAHASHI Y, MUKAI T, et al. High prevalence of DUOX2 mutations in Japanese patients with permanent congenital hypothyroidism or transient hypothyroidism[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016, 29(7): 807-812. DOI:10.1515/jpem-2015-0400.
- [5] WANG J J, SHAO M M, LIU M, et al. PKC $\alpha$  promotes generation of reactive oxygen species via DUOX2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 839-845. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.021.
- [6] WU Y Z, MEITZLER J L, ANTONY S, et al. Dual oxidase 2 and pancreatic adenocarcinoma: IFN- $\gamma$ -mediated dual oxidase 2 overexpression results in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced, ERK-associated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(42): 68412-68433[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340089/>. DOI:10.18632/oncotarget.12032.
- [7] PETTIGREW C A, CLERKIN J S, COTTER T G. DUOX enzyme activity promotes AKT signalling in prostate cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(12): 5175-5181.
- [8] LUXEN S, BELINSKY S A, KNAUS U G. Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 1037-1045. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5782.
- [9] QI R, ZHOU Y F, LI X Z, et al. DUOX2 expression is increased in barrett esophagus and cancerous tissues of stomach and colon[J/OL]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016: 1835684[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4709674/>. DOI: 10.1155/2016/1835684.
- [10] WANG R, DASHWOOD W M, NIAN H, et al. NADPH oxidase overexpression in human colon cancers and rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine (PhIP)[J/OL]. *Int J Cancer*, 2011, 128(11): 2581-2590[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3262595/>. DOI:10.1002/ijc.25610.
- [11] KANG K A, RYU Y S, PIAO M J, et al. DUOX2-mediated production of reactive oxygen species induces epithelial mesenchymal transition in 5-fluorouracil resistant human colon cancer cells[J/OL]. *Redox Biol*, 2018, 17: 224-235[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6006906/>. DOI: 10.1016/j.redox.2018.04.020.
- [12] GIRÁLDEZ M D, LOZANO J J, CUATRECASAS M, et al. Gene-expression signature of tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer treated with 5'fluorouracil-based adjuvant chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5): 1090-1097. DOI: 10.1002/ijc.27747.
- [13] 陈少坚, 林拥华, 吴友谊, 等. Lin28 对肝癌 HepG2 细胞 5-Fu 敏感性的影响及其分子机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(3): 261-266. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.008.
- [14] 韩勇, 寿成超. 影响 5-FU 疗效的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(21): 1255-1259. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.21.014.
- [15] MASSAGUÉ J, OBENAU F A C. Metastatic colonization by circulating tumour cells[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 298-306. DOI: 10.1038/nature17038.
- [16] AL-TONBARY Y, AL-HAGGAR M, EL-ASHRY R, et al. Vitamin E and N-acetylcysteine as antioxidant adjuvant therapy in children with acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Adv Hematol*, 2009, 2009: 689639[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2778172/>. DOI:10.1155/2009/689639.
- [17] PATHAK A K, BHUTANI M, GULERIA R, et al. Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer[J]. *J Am Coll Nutr*, 2005, 24(1): 16-21. DOI:10.1080/07315724.2005.10719438.
- [18] YOO J, HAMILTON S J, ANGEL D, et al. Cisplatin ototoxicity protection using transtympanic L-N-acetylcysteine: a pilot randomized study in head and neck cancer patients[J/OL]. *Laryngoscope*, 2014, 124(3): E87-E94[2020-06-08]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/lary.24360>. DOI:10.1002/lary.24360.
- [19] SMYTH J F, BOWMAN A, PERREN T, et al. Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: Results of a double-blind, randomised trial[J]. *Ann Oncol*, 1997, 8(6): 569-573. DOI:10.1023/a:1008211226339.
- [20] YU T, WAN P, ZHU X D, et al. Inhibition of NADPH oxidase activities ameliorates DSS-induced colitis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 158: 126-133. DOI:10.1016/j.bcp.2018.10.010.
- [21] LITTLE A C, SHAM D, HRISTOVA M, et al. DUOX1 silencing in lung cancer promotes EMT, cancer stem cell characteristics and invasive properties[J/OL]. *Oncogenesis*, 2016, 5(10): e261[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5117847/>. DOI:10.1038/oncsis.2016.61.
- [22] MEITZLER J L, KONATÉ M M, DOROSHOW J H. Hydrogen peroxide-producing NADPH oxidases and the promotion of migratory phenotypes in cancer[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 675: 108076. DOI:10.1016/j.abb.2019.108076.
- [23] ROY K, WU Y, MEITZLER J L, et al. NADPH oxidases and cancer [J]. *Clin Sci*, 2015, 128(12): 863-875. DOI: 10.1042/CS20140542.
- [24] WU Y Z, LU J M, ANTONY S, et al. Activation of TLR4 is required for the synergistic induction of dual oxidase 2 and dual oxidase A2 by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide in human pancreatic cancer cell lines[J/OL]. *J Immunol*, 2013, 190(4): 1859-1872[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3563939/>. DOI:10.4049/jimmunol.1201725.
- [25] ABDUL AZIZ N A, MOKHTAR N M, HARUN R, et al. A 19-Gene expression signature as a predictor of survival in colorectal cancer[J/OL]. *BMC Med Genomics*, 2016, 9(1): 58[2020-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5016995/>. DOI: 10.1186/s12920-016-0218-1.

[收稿日期] 2020-06-10

[修回日期] 2020-11-13

[本文编辑] 党瑞山