DOI:10.16016/j.1000-5404.202009227

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 在结肠癌细胞 5-氟尿嘧啶耐药中的作用

周洪旭,董 严,李建军 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院肿瘤科

[摘要] **目的** 通过建立结肠癌 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)耐药细胞株,探讨硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(stearoyl CoA desaturase 1,SCD1)在结肠癌细胞 5-FU 耐药中的作用。**方法** 采用 5-FU 浓度间歇性递增与高浓度反复诱导筛选的方法建立对 5-FU 耐药的结肠癌细胞株 HCT116(HCT116/5FU)。CCK-8 实验检测 HCT116、HCT116/5FU、HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 各组细胞在 5-FU 作用下的存活率以及半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC_{50})。制作结肠癌组织和癌旁组织芯片并以免疫组化方法检测 SCD1 的表达。定量 PCR 及 Western blot 检测各组细胞 SCD1 的表达;CCK-8 实验、平板克隆形成及结晶紫染色实验检测各组细胞存活状况。Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率。HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 裸鼠皮下成瘤实验观察 SCD1 对肿瘤生长的影响,Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达。**结果** HCT116 的 5-FU IC_{50} 为(0.90±0.06) μg/mL,HCT116/5FU 的 5-FU IC_{50} 为(15.02±0.81) μg/mL,耐药倍数约为 16.7 倍。SCD1 在耐药结肠癌组织内的表达高于普通结肠癌组织和对应的结肠癌癌旁组织。HCT116/5FU 中 SCD1 的表达显著高于 HCT116($P<0.01$)。过表达 SCD1 能降低结肠癌细胞的凋亡率。裸鼠皮下成瘤实验显示过表达 SCD1 能增加结肠癌细胞对 5-FU 的抵抗。在 5-FU 处理 48 h 后,HCT116-OE-SCD1 组细胞凋亡相关蛋白 bcl-2、caspase3 的表达低于 HCT116-Control 组($P<0.01$)。**结论** 成功建立了 5-FU 获得性耐药的结肠癌细胞模型,SCD1 促进结肠癌细胞对 5-FU 的抵抗。

[关键词] 耐药;5-氟尿嘧啶;结肠癌;SCD1
[中图法分类号] R345; R735.35; R915 [文献标志码] A

Role of stearoyl CoA desaturase 1 in resistance of colon cancer cells to 5-fluorouracil

ZHOU Hongxu, DONG Yan, LI Jianjun Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a 5-fluorouracil (5-FU)-resistant colon cancer cell line, and to investigate the role of stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) in the resistance of colon cancer cells to 5-FU. **Methods** Drug resistance to 5-FU was induced in colon cancer cell line HCT116 by increasing the concentration intermittently and repeated inducing and screening with high concentration to produce drug-resistant cell line HCT116/5FU. The survival rates and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were measured by CCK-8 assay in HCT116, HCT116/5FU, HCT116-Control and HCT116-OE-SCD1 cells after the treatment of 5-FU. Immunohistochemical assay was employed to measure the expression of SCD1 after the fabrication of colon cancer and paracancerous tissue chips. Quantitative PCR and Western blotting were applied to detect the expression of SCD1. CCK-8 assay, plate clone formation and crystal violet staining were used to detect cell survival status. The apoptotic rates were detected by AnnexinV-FITC/PI double staining. HCT116-Control and HCT116-OE-SCD1 subcutaneous xenograft models in nude mice were established to observe the effect of SCD1 on tumor growth. Western blotting was carried out to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** The IC_{50} value of 5-FU was 0.90±0.06 μg/mL in HCT116 cells, and 15.02±0.81 μg/mL in HCT116/5FU cells, with a multiple of resistance about 16.7 times. The expression of

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81803028)
[通信作者] 李建军,E-mail:leejjun2007@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

SCD1 was higher in drug resistant colon cancer tissues than in common colon cancer tissues and corresponding paracancerous tissues. And its expression level was also higher in HCT116/5FU cells than HCT116 cells. Overexpression of SCD1 reduced the apoptotic rate of colon cancer cells ($P<0.01$). Xenograft nude mouse model indicated that SCD1 overexpression enhanced the resistance of colon cancer cells to 5-FU. After 48 h of 5-FU treatment, the expression of bcl-2 and caspase3 were lower in HCT116-OE-SCD1 group than HCT116-Control group ($P<0.01$). **Conclusion** The 5-FU-resistant model of colon cancer HCT116/5FU cells is successfully established. SCD1 promotes the resistance to 5-FU in colon cancer cells.

[**Key words**] drug resistance; 5-fluorouracil; colon cancer; stearoyl CoA desaturase 1

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81803028). Corresponding author: LI Jianjun, E-mail: leejjun2007@163.com

结直肠癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤[1-2]。虽然新型药物的应用提高了结直肠癌患者的生存率,但对晚期结直肠癌患者而言,以5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)为基础的治疗手段,其5年生存率仍低于10%[3-4]。阻碍生存率提高的关键因素是癌细胞能够对化疗药物的细胞毒性作用产生耐药性[5]。对5-FU耐药性的产生依然是结肠癌化疗失败的主要原因。提高化疗敏感性一直是癌症治疗的目标[6]。因此,研究结肠癌5-FU化疗耐药的机制,为提高临床治疗有效率和为临床预测提供新的思路和方向,成为当前急需解决的问题。

已有研究表明,硬脂酰辅酶A去饱和酶1(stearoyl CoA desaturase1,SCD1)是脂肪酰基Δ9-去饱酶,在体内能将饱和脂肪酸通过代谢途径转换为单不饱和脂肪酸,可能与癌症的发病机制、发病率和死亡风险有关[7-11]。既往研究主要聚焦于SCD1在肿瘤分化、转化中的作用[12-13]。本研究初步实验发现SCD1与结肠癌化疗敏感性有关,因此,通过5-FU浓度间歇性递增与高浓度反复诱导筛选的方法建立对5-FU耐药的HCT116细胞株(HCT116/5FU),并采用慢病毒转染方法构建SCD1过表达HCT116细胞株(HCT116-OE-SCD1),研究SCD1在结肠癌5-FU耐药中的作用,期望为临床提高结肠癌对5-FU化疗的敏感性提供新的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

HCT116细胞株、SCD1过表达(OE-SCD1)和对照(Control)的结肠癌HCT116细胞株及5-FU耐药细胞株(HCT116/5FU)均由本科实验室构建和冻存,McCoy's 5A培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液均购自HyClone公司;胎牛血清购自Gibco公司;Polymer双染检测试剂盒和中性树胶购自中杉金桥公司;结晶紫染液、RIPA细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、一抗稀释液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE配胶试剂盒均购自碧云天公司;ECL发光液、PVDF膜购自美国Millipore公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)购自Sigma公司;CCK-8试剂购自Biosharp公司;兔抗人SCD1、bcl-2及caspase3抗体购自英国Abcam公司;羊抗兔二抗及Tubulin抗体购自Affinity公司;细胞增殖试剂盒购自美国GeneCopoeia公司;PCR引物、RNA提取试剂TRIzol、逆转录试剂盒、RT-PCRSYBRGreen购自日本TaKaRa公司;AnnexinV-FITC/PI(propidiumiodide,碘化丙啶)凋亡检测试剂盒购自贝博公司;SCD1过表达及对照慢病毒购自吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 人结肠癌HCT116细胞株复苏于本科实验室,用含100 mL/L的FBS和10 mL/L的青-链霉素双抗的McCoy's 5A完全培养基,置于37 ℃、5%CO_2的细胞培养箱中常规培养,0.25%胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜下观察细胞形态。取对数生长期的HCT116细胞按1×10^5/孔接种于24孔板内,并加入0.5 mL McCoy's 5A完全培养基培养24 h后按说明书加入慢病毒稀释液,同时建立对照,继续培养48 h后消化传代用含5-FU的完全培养基培养,提取RNA、蛋白及细胞,进行q-PCR、Western blot、CCK-8等后续实验。

1.2.2 耐药细胞模型的建立及鉴定 前期以McCoy's 5A完全培养基培养HCT116细胞,待细胞贴壁生长状态良好后,加入5-FU药物,作用48 h后更换为不含5-FU的培养基培养,待细胞生长融合度约为80%时进行传代处理,再次待细胞贴壁生长状态良好后重复加药过程。初始5-FU浓度为0.2 μg/mL,每隔1周增加0.2 μg/mL(共3个间隔),直到5-FU浓度达到0.8 μg/mL。随着5-FU浓度的增加,细胞增殖率降低。后期以含高浓度5-FU的McCoy's 5A完全培养基反复诱导筛选,5-FU作用浓度依次为1.6、2.4、3.2、4.0、4.8、5.6、6.4、7.2、8.0、8.8、9.6 μg/mL。历时约6个月,HCT116细胞基本可以在含药物浓度为9.6 μg/mL 5-FU的McCoy's 5A完全培养基中稳定生长和传代,即耐药模型建立成功,将此耐药细胞株命名为HCT116/5FU。

用 CCK-8 实验检测 HCT116/5FU 细胞(以 HCT116 细胞为对照)对 5-FU 的敏感性。分别取处于对数生长期的 HCT116、HCT116/5FU 两细胞株按 5×10^3/孔接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μL 完全培养基,每个浓度设置 3 个复孔,于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,按倍比稀释依次加入不同浓度的 5-FU。加药期间观察细胞形态,48 h 后行 CCK-8 检测。然后每孔依次加入 10 μL CCK-8 试剂于细胞培养箱中继续培养 2 h,然后在酶标仪上测定在 450 nm 波长处的光密度值[D(450)],采用 GraphPad Prism 7.0 软件计算存活率,并得出半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC_{50})。

1.2.3 临床标本和免疫组化染色

1.2.3.1 组织芯片制作 收集本院 2019 年手术切除的 5-FU 治疗欠佳和疗效尚可的结肠癌样本各 20 例及各自对应的癌旁组织样本 40 例。取少量标本经常规脱水后用 4%多聚甲醛固定。石蜡包埋制成 3 μm 切片后进行 HE 染色。由 2 名病理学医师进行病理诊断和评分。在切片上做好标记后将相应供体蜡块对应部位确定为取材位点。在空白受体蜡块 20 mm×16 mm 范围内设计 10×8 点组织阵列,在对应位置用微阵列仪打孔(深度 0.2~0.3 cm,直径约 0.1 cm,间距约 0.1 cm),将组织蜡芯放在受体蜡块对应的小孔上,每例标本在癌细胞或结肠黏膜腺体丰富区各取 2~4 个区。将构建好的芯片蜡块放入 55 ℃温箱中约 20 min,在蜡将要完全溶解前,取出室温下冷却,然后将其嵌入至另一蜡块,待蜡块与组织芯片融合之后,重复上述步骤。耐药结肠癌样本和普通结肠癌样本及各自对应的癌旁组织样本共制作了 3 个蜡块,待蜡块变硬后切片,共制作了 3 个组织芯片。

1.2.3.2 免疫组化染色 组织芯片置于 60 ℃烤箱烘干、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、蒸馏水和 PBS 溶液清洗后过氧化氢封闭、EDTA 进行抗原修复、血清封闭。根据免疫组化试剂盒说明书染色,稀释 SCD1 至终浓度为 4 μg/mL。苏木精显色完成返蓝后风干,中性树胶封片。

1.2.3.3 结果判定 参照免疫组化相关评判标准对免疫组化染色结果进行评判,细胞出现棕黄色颗粒为阳性结果。采用半定量法对染色结果进行判定。染色强度计分方法:无阳性染色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别计 0、1、2、3 分;阳性染色细胞构成比计分方法:阳性染色细胞数百分比 0%、>0%~10%、>10%~50%、>50%~75%、>75%分别计分 0、1、2、3、4 分。最后将染色强度分数与阳性细胞百分比分数相乘,低于 7 分则判定为蛋白低表达,7 分及以上则判定为蛋白高表达。

1.2.4 定量 PCR 分析 采用 TRIzol 试剂盒分别提取对数生长期的 HCT116、HCT116/5FU、HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 各组细胞的总 RNA,超微量分光光度计测定总 RNA 浓度,再逆转录获得总 cDNA。上机测定并比较各组细胞 SCD1 表达水平的差异。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞存活率及 IC_{50} 分别取处于对数生长期的 HCT116、HCT116/5FU、HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 各组细胞,铺板方法同上,每种细胞均设置 3 个复孔。待细胞贴壁后,将完全培养基更换为含 5-FU 的完全培养基。加药期间观察细胞形态,48 h 后行 CCK-8 检测。每孔依次加入 10 μL CCK-8 试剂,放入 37 ℃,5%CO_2 细胞培养箱中 2 h 后使用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔光密度值[D(450)],实验重复 3 次,采用 GraphPad Prism 7.0 软件计算各组细胞的存活率。

1.2.6 平板克隆形成及结晶紫染色 分别将处于对数生长期的 HCT116、HCT116/5FU、HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 各 5 000 个接种于 6 孔板内。待细胞贴壁后,分别加入含终浓度为 1.5 μg/mL 5-FU 的完全培养基。每隔 3 d 换液 1 次,并维持药物浓度。于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 14 d 后,显微镜下观察,吸弃培养孔中的液体,PBS 洗 2 遍,加入 4%多聚甲醛溶液常温固定 15 min。PBS 洗 2 遍,结晶紫溶液常温染色 25 min,PBS 洗 3 遍,拍照,40×显微镜下计数细胞数>50 个的集落数目,Image J 软件计算集落平均面积。

1.2.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 取 HCT116、HCT116/5FU、HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 各组对数生长期细胞接种于 6 孔板内,每组细胞分别设置 2 个复孔,用普通完全培养基培养,待细胞贴壁后融合度达 70%~80%时,再分别用含 1.0 μg/mL 5-FU 的 McCoy's 5A 完全培养基继续培养 48 h。分别收集各组细胞制成悬液,离心后弃上清,冷 PBS 清洗 2 次,用 Annexin V 1×结合液制成 1×10^6/mL 的细胞悬液,各组分别取其 300 μL 加入 Annexin V-FITC/PI 染液,4 ℃避光孵育 15 min,上机检测各组细胞凋亡率。

1.2.8 裸鼠成瘤 裸鼠(8 周龄,质量 17 g 左右)购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。将 HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 两种细胞系(3×10^6)分别混于 200 μL 磷酸盐缓冲液中,皮下注射到裸鼠的右侧臀部,并监测裸鼠的体质量和肿瘤的生长。测量肿瘤的两个垂直直径并使用公式估计肿瘤体积[V=长度(mm)×宽度(mm)^2/2][14]。当肿瘤体积达到 20 mm^3 时,腹腔注射 5-FU(50 mg/kg)和亚叶酸钙(80 mg/kg)[15],每周 1 次,为期 3 周。对裸鼠进行监测,直到肿瘤总体积达到 500 mm^3,此时处死裸鼠。瘤体解剖拍照称量。

1.2.9 Western blot 检测蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液分别提取处于对数生长期的 HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 细胞总蛋白,按 BCA 试剂盒说明测定总蛋白浓度。30 μg 蛋白上样,经 80 V、30 min 然后 120 V、70 min 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。250 mA 恒流 2 h 转移到 PVDF 膜上,5% BSA(牛血清白蛋白)室温摇床封闭 2 h 后,4 ℃摇床先后分别孵育 SCD1、bcl-2 及 caspase3(均 1∶1 000)兔抗人特异性一抗过夜。次日 PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗膜 2 次,每次 5 min,加入羊抗兔二抗(1∶10 000)室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,滴加显影液后 ECL Bio-Rad 成像系统显影。换入 Tubulin 抗体(1∶10 000)4 ℃摇床孵育过夜,次日 PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗膜 3 次,每次 5 min,滴加显影液后 ECL Bio-Rad 成像系统显影。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用配对 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-FU 耐药结肠癌细胞株模型的建立和鉴定

通过对结肠癌 HCT116 细胞进行 5-FU 浓度间歇性递增与高浓度反复诱导筛选的方法,建立了较稳定的结肠癌 5-FU 耐药细胞株模型(图 1A),命名为 HCT116/5FU 细胞。CCK-8 检测结果显示,随着培养基内 5-FU 浓度的升高,细胞存活的比例均逐渐降低;与 HCT116 相比,HCT116/5FU 细胞下降的速度较慢,对 5-FU 的敏感性降低($P<0.01$,图 1B)。经 GraphPad Prism 7.0 计算,HCT116 的 5-FU IC_{50} 为(0.90±0.06) μg/mL,HCT116/FU 的 5-FU IC_{50} 为(15.02±0.81) μg/mL,耐药倍数约为 16.7 倍($P<0.01$)。

2.2 结肠癌组织内 SCD1 的表达

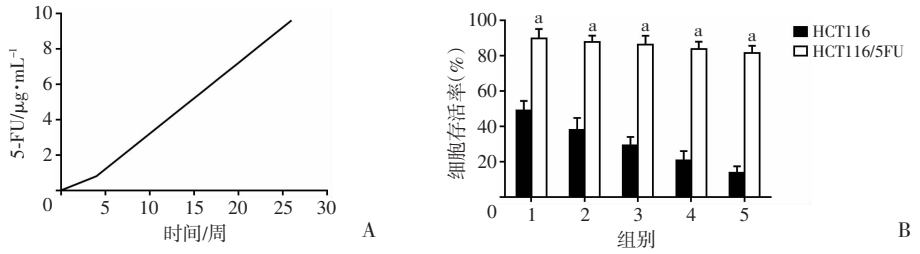
通过对结肠癌组织及对应的癌旁组织进行免疫组化实验发现,耐药结肠癌组织内 SCD1 的表达明显高于普通结肠癌组织和对应的结肠癌癌旁组织(图 2)。提示 SCD1 的表达水平与结肠癌组织对 5-FU 的敏感性有关。

2.3 SCD1 在结肠癌细胞耐药过程中的作用

q-PCR 结果显示,在含浓度为 1.5 μg/mL 5-FU 的完全培养基培养细胞后,SCD1 的表达水平在 HCT116/5FU 中显著高于 HCT116($P<0.01$,图 3A),提示 SCD1 可能促进结肠癌细胞耐药。为了进一步探究 SCD1 是否影响结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性,在 HCT116 细胞中过表达 SCD1,q-PCR 与 Western blot 检测其过表达效率,与 HCT116-Control 组(对照)相比,HCT116-OE-SCD1 组 SCD1 表达显著升高($P<0.01$,图 3A、4C)。在浓度为 1.5 μg/mL 的 5-FU 处理后,CCK-8 结果显示,HCT116/5FU 组与 HCT116-OE-SCD1 组的细胞存活率显著高于 HCT116 组与 HCT116-Control 组($P<0.01$,图 3B)。平板克隆形成及结晶紫染色实验结果显示,在 1.5 μg/mL 浓度的 5-FU 处理 14 d 后,HCT116/5FU 组和 HCT116-OE-SCD1 组存活的细胞数明显高于 HCT116 组与 HCT116-Control 组($P<0.01$,图 3C~E)。以上结果说明 SCD1 对结肠癌细胞的耐药过程发挥重要作用,其表达水平的升高能促进结肠癌细胞对 5-FU 的抵抗。

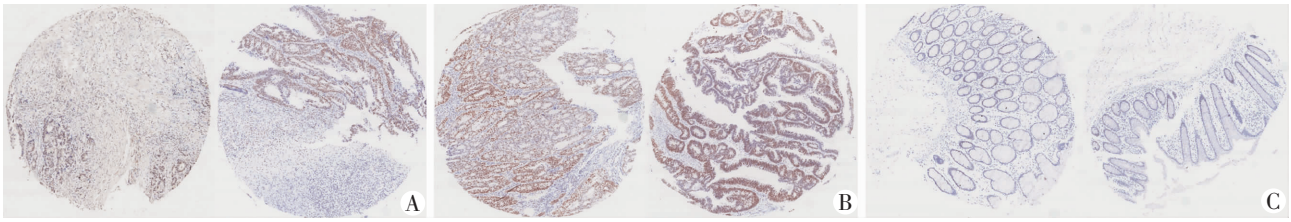
2.4 SCD1 对结肠癌细胞凋亡的影响

为了进一步证实 SCD1 参与结肠癌细胞对 5-FU 的抵抗,在相同浓度的 5-FU 处理后,用 Annexin V-FITC/PI 染色检测各组细胞的凋亡率。凋亡率检测结果(图 4A)显示,在含浓度为 1.0 μg/mL 的 5-FU 的完全培养基培养 48 h 后,HCT116 组和 HCT116-Control 组细胞凋亡率均高于 HCT116/5FU 组和 HCT116-OE-SCD1 组($P<0.01$,图 4B)。Western blot 结果显示,HCT116-Control、HCT116-OE-SCD1 两组细胞分别在浓度为 1.5 μg/mL 的 5-FU 处理 48 h 后,HCT116-OE-SCD1 组凋亡相关蛋白 bcl-2、caspase3 的表达均低于 HCT116-Control 组($P<0.01$,图 4C、D)。结果表明,过表达 SCD1 减少了结肠癌细胞在 5-FU 作用下的凋亡。



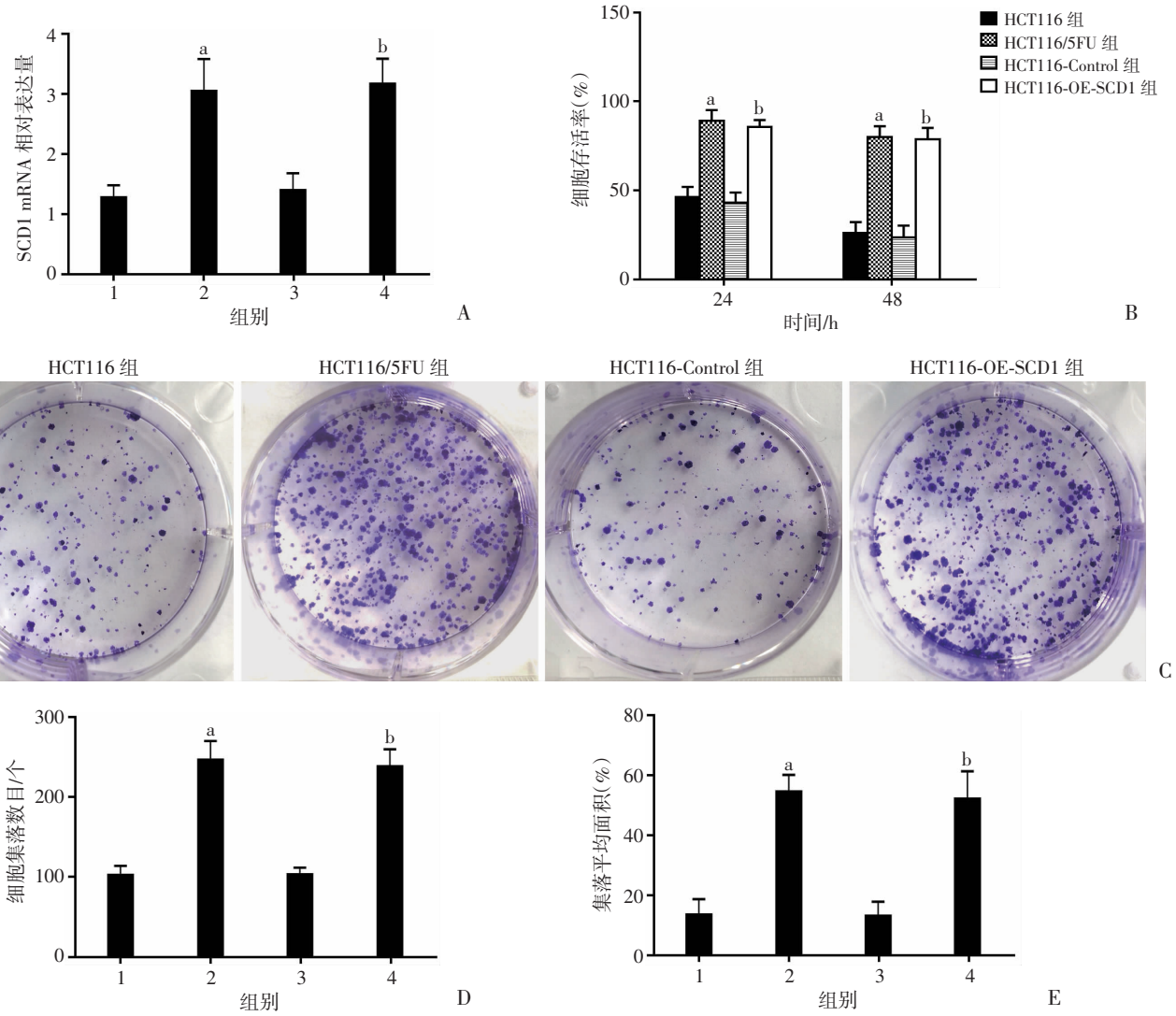
A:以 5-FU 浓度递增与高浓度反复诱导筛选的方法建立结肠癌 5-FU 耐药细胞株模型;B:不同浓度 5-FU 处理 HCT116 和 HCT116/5FU 细胞 48 h 后存活率 1~5:分别为 1.00、1.15、1.30、1.45、1.60 μg/mL 5-FU 处理组;a:$P<0.01$,与 HCT116 细胞比较

图 1 结肠癌细胞株 HCT116/5FU 的建立和鉴定



A:普通结肠癌组织;B:耐药结肠癌组织;C:结肠癌癌旁组织　　左右分别为相应组织的不同切面

图 2　免疫组化实验观察不同结肠组织中 SCD1 的表达　(×100)



1:HCT116 组;2:HCT116/5FU 组;3:HCT116-Control 组;4:HCT116-OE-SCD1 组;a:$P<0.01$,与 HCT116 组比较;b:$P<0.01$,与 HCT116-Control 组比较

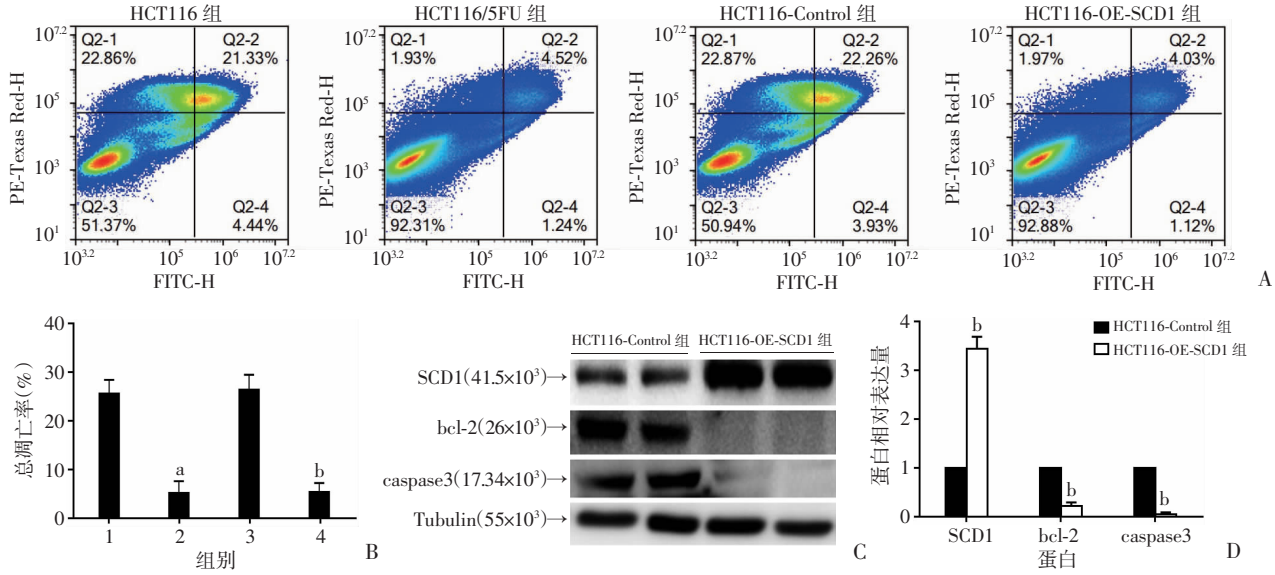
A:各组细胞中 SCD1 的表达;B:各组细胞在相同 5-FU 浓度下的细胞存活率;C:平板克隆形成及结晶紫染色实验检测相同浓度 5-FU 处理各组细胞 14 d 后的存活情况;D、E:细胞集落数目及集落平均面积分析

图 3　SCD1 参与结肠癌细胞耐药

2.5　过表达 SCD1 增加裸鼠皮下结肠癌对 5-FU 的抵抗

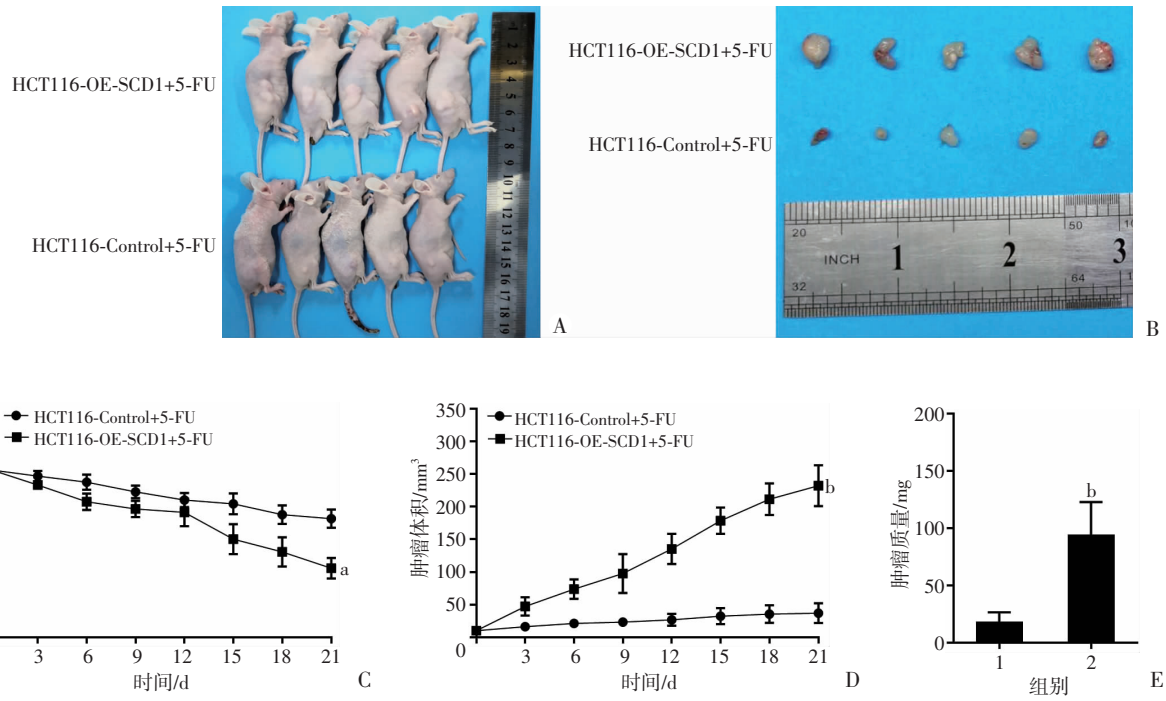
为了明确 HCT116 细胞中 SCD1 的过表达是否能增强结肠癌细胞的化疗耐药能力。将 HCT116-Control 和 HCT116-OE-SCD1 两种细胞(3×10^6)分别皮下注射到 8 周龄无胸腺裸鼠的右侧臀部,然后在 5-FU 治疗下监测肿瘤的形成以及裸鼠质量的变化。结果发现,成瘤后在 5-FU 治疗的同时,HCT116-Control 组裸鼠生长的肿瘤体积比 HCT116-OE-SCD1 组小(图 5A、B)。裸

鼠质量变化曲线表明,HCT116 内过表达 SCD1 降低了 5-FU 的疗效($P<0.05$,图 5C)。肿瘤生长曲线和最终肿瘤质量表明,HCT116-OE-SCD1 细胞注射裸鼠后成瘤的最终体积和增加的速率显著高于接种 HCT116-Control 细胞的裸鼠($P<0.01$,图 5D、E)。说明过表达 SCD1 增加了裸鼠皮下结肠癌对 5-FU 的抵抗,增加了结肠癌细胞的体内致瘤性。



A:流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况;B:各组细胞凋亡率分析　1:HCT116 组;2:HCT116/5-FU 组;3:HCT116-Control 组;4:HCT116-OE-SCD1 组;C、D:Western blot 检测各组细胞中蛋白的表达及半定量分析　a:$P<0.01$,与 HCT116 组比较;b:$P<0.01$,与 HCT116-Control 组比较

图 4　SCD1 对结肠癌细胞凋亡的影响



A:裸鼠成瘤;B:成瘤裸鼠上分离的肿瘤;C、D:分别注射 HCT116-Control+5-FU 和 HCT116-OE-SCD1+5-FU 后裸鼠体质量及肿瘤体积变化　1:HCT116-Control+5-FU;2:HCT116-OE-SCD1+5-FU;E:成瘤裸鼠上分离的肿瘤质量　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HCT116-Control+5-FU 比较

图 5　过表达 SCD1 增加裸鼠皮下结肠癌对 5-FU 的抵抗

3 讨论

经过30多年的临床研究,抗代谢药物5-FU仍被推荐为治疗结直肠癌的首选。5-FU使用与尿嘧啶相同的运输系统进入细胞。它在细胞内转化为3种活性代谢物:氟脱氧尿苷单磷酸(FdUMP)、氟脱氧尿苷三磷酸(FdUTP)和氟尿苷三磷酸(FUTP)[3]。FdUTP在DNA中错误结合,从而抑制核苷酸的生物合成,导致DNA损伤,进而影响细胞的增殖和存活。5-FU在细胞处于G_0或G_1期时没有活性,被认为是纯粹的S期活性化疗药物,抑制胸苷酸合酶,导致dTTP的耗竭[16-17]。虽然基于5-FU的化疗有利于结肠癌患者,但其中很大一部分复发[18-19]。结直肠癌5-FU耐药的主要机制有:①药物失活或缺乏对药物的激活;②药物反应和耐药性可能受到药物靶点改变的影响,如靶点基因突变或表达水平的变化;③肿瘤细胞激活生存途径,比如HER信号通路的激活;④抗凋亡蛋白表达增加,比如FLIP、MCL1等[20]。化疗耐药和癌细胞转移仍然是癌症治疗的主要问题[21-22]。因此,寻找逆转结肠癌5-FU耐药的策略对改善患者的预后至关重要。

研究发现,SCD1通过抑制AMPK信号通路负性调控自噬诱导的肝癌细胞死亡[23]。通过干扰SCD1介导的单不饱和脂肪酸的合成,可以有效杀伤白血病和淋巴瘤细胞[24]。在不同类型的卵巢癌中,均有SCD1表达水平的升高。SCD1抑制AMPK,增强Akt,并通过减少脂肪酸氧化从而调节脂质代谢,促进脂肪生成,从而促进癌细胞生长。药物抑制SCD1后体外和体内均能诱导卵巢癌细胞凋亡和铁死亡[25]。Myc-过表达的肿瘤细胞需要IRE1α/XBP1信号来维持在体外体内的生长和存活,这个过程依赖于SCD1活性的升高[26]。SCD1是一种跨膜蛋白,主要位于内质网细胞器,催化饱和脂肪酸转化为Δ-9单不饱和脂肪酸,例如将棕榈酸(C16:0FA)转化为棕榈油酸(C16:1FA)或将硬脂酸(C18:0FA)转化为油酸(C18:1FA)。在有丝分裂的细胞周期过程中,作为脂肪酸去饱和的关键转化酶,SCD1刺激脂质生物合成,为细胞膜的生成提供新磷脂,进而促进肿瘤细胞的快速增殖的必要条件[8]。

本研究采用5-FU浓度梯度间歇性递增与高浓度反复诱导筛选的方法构建了5-FU耐药的结肠癌细胞株HCT116/5FU,CCK-8实验显示在高浓度的5-FU作用下,HCT116/5FU对5-FU的敏感性明显降低,证明HCT116/5FU耐药细胞株构建成功。通过对临床样本进行免疫组化实验发现,在耐药结肠癌组织样本中SCD1的表达明显高于普通结肠癌组织和对应的结肠癌癌旁组织。为了了解在结肠癌细胞中SCD1是否作用于5-FU处理下的耐药与凋亡,通过q-PCR结果表明,在含5-FU的培养基培养细胞之后,HCT116/5FU中SCD1的表达明显高于HCT116。接着研究显示,在HCT116中过表达SCD1后,可以明显降低结肠癌细胞对5-FU的敏感性,并显著降低在5-FU作用下的凋亡率,凋亡相关蛋白的表达量也明显低于HCT116-Control组细胞。

细胞凋亡是化疗药物引起细胞死亡的主要机制之一[27]。抗凋亡细胞被认为对抗癌治疗具有耐药性[28]。因此Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率实验结果表明过表达SCD1促进结肠癌细胞对5-FU的抵抗。通过裸鼠皮下成瘤实验,提示HCT116细胞内过表达SCD1能促进增加皮下结肠癌的化疗耐药。因此SCD1表达水平的升高体内体外均能增加结肠癌细胞对5-FU的抵抗。

综上所述,SCD1在促进结肠癌对5-FU化疗耐药中发挥着重要作用。因此,SCD1有望成为逆转结肠癌5-FU化疗耐药的有效靶点。本研究为预测和增强5-FU疗效,提高结肠癌患者生存质量提供了新的方向和思路,但SCD1的具体作用机制还需进一步探索。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING SAUER A, *et al*. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA A Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164. DOI:10.3322/caac.21601.

[2] WANQING C, KEXIN S, RONGSHOU Z, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1-12.

[3] KOZOVSKA Z, GABRISOVA V, KUCEROVA L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment[J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(8): 911-916. DOI:10.1016/j.biopha.2014.10.019.

[4] SU P, YANG Y, WANG G, *et al*. Curcumin attenuates resistance to irinotecan *via* induction of apoptosis of cancer stem cells in chemoresistant colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1343-1353. DOI:10.3892/ijo.2018.4461.

[5] LIN G L, TING H J, TSENG T C, *et al*. Modulation of the mRNA-binding protein HuR as a novel reversal mechanism of epirubicin-triggered multidrug resistance in colorectal cancer cells[J]. PLoS ONE, 2017, 12(10): e0185625. DOI:10.1371/journal.pone.0185625.

[6] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer[J]. Nature, 2019, 575(7782): 299-309. DOI:10.1038/s41586-019-1730-1.

[7] PRESLER M, WOJTCZYK-MIASKOWSKA A, SCHLICHTHOLZ B, *et al*. Increased expression of the gene encoding stearoyl-CoA desaturase 1 in human bladder cancer[J]. Mol

Cell Biochem, 2018, 447(1/2): 217-224. DOI:10.1007/s11010-018-3306-z.

[8] ANGELUCCI C, D'ALESSIO A, IACOPINO F, *et al*. Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5 [J]. Oncotarget, 2018, 9(36): 24364-24380. DOI:10.18632/oncotarget.25273.

[9] RAN H, ZHU Y, DENG R, *et al*. Stearoyl-CoA desaturase-1 promotes colorectal cancer metastasis in response to glucose by suppressing PTEN[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 54. DOI:10.1186/s13046-018-0711-9.

[10] COLACINO J A, MCDERMOTT S P, SARTOR M A, *et al*. Transcriptomic profiling of curcumin-treated human breast stem cells identifies a role for stearoyl-coa desaturase in breast cancer prevention [J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 158(1): 29-41. DOI:10.1007/s10549-016-3854-4.

[11] NOTO A, DE VITIS C, PISANU M E, *et al*. Stearoyl-CoA-desaturase 1 regulates lung cancer stemness *via* stabilization and nuclear localization of YAP/TAZ[J]. Oncogene, 2017, 36(32): 4573-4584. DOI:10.1038/onc.2017.75.

[12] IGAL R A. Stearoyl CoA desaturase-1: New insights into a central regulator of cancer metabolism[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(12 pt a): 1865-1880. DOI:10.1016/j.bbalip.2016.09.009.

[13] CHEN L, REN J, YANG L, *et al*. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediated cell apoptosis in colorectal cancer by promoting ceramide synthesis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19665. DOI:10.1038/srep19665.

[14] WANG L, ZHANG L, LI L, *et al*. Small-molecule inhibitor targeting the Hsp90-Cdc37 protein-protein interaction in colorectal cancer[J]. Sci Adv, 2019, 5(9): eaax2277. DOI:10.1126/sciadv.aax2277.

[15] OU J J, PENG Y, YANG W W, *et al*. ABHD5 blunts the sensitivity of colorectal cancer to fluorouracil *via* promoting autophagic uracil yield[J]. Nat Commun, 2019, 10: 1078. DOI:10.1038/s41467-019-08902-x.

[16] WEBBER E M, KAUFFMAN T L, O'CONNOR E, *et al*. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 156. DOI:10.1186/s12885-015-1093-4.

[17] DE ANGELIS P M, SVENDSRUD D H, KRAVIK K L, *et al*. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery[J]. Mol Cancer, 2006, 5(1): 1-25. DOI:10.1186/1476-4598-5-20.

[18] CHE J, PAN L, YANG X, *et al*. Thymidine phosphorylase expression and prognosis in colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy: a meta-analysis[J]. Mol Clin Oncol, 2017, 7(6): 943-952. DOI:10.3892/mco.2017.1436.

[19] KUGIMIYA N, NISHIMOTO A, HOSOYAMA T, *et al*. JAB1-STAT3 activation loop is associated with recurrence following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in human colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 6203-6209. DOI:10.3892/ol.2017.6994.

[20] HOLOHAN C, VAN SCHAEYBROECK S, LONGLEY D B, *et al*. Cancer drug resistance: an evolving paradigm[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(10): 714-726. DOI:10.1038/nrc3599.

[21] GUO C, MA J L, DENG G L, *et al*. ZEB1 promotes oxaliplatin resistance through the induction of epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells[J]. J Cancer, 2017, 8(17): 3555-3566. DOI:10.7150/jca.20952.

[22] GARG M. Epithelial plasticity and cancer stem cells: Major mechanisms of cancer pathogenesis and therapy resistance [J]. World J Stem Cells, 2017, 9(8): 118-126. DOI:10.4252/wjsc.v9.i8.118.

[23] HUANG G M, JIANG Q H, CAI C, *et al*. SCD1 negatively regulates autophagy-induced cell death in human hepatocellular carcinoma through inactivation of the AMPK signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 180-190. DOI:10.1016/j.canlet.2014.12.036.

[24] SOUTHAM A D, KHANIM F L, HAYDEN R E, *et al*. Drug redeployment to kill leukemia and lymphoma cells by disrupting SCD1-mediated synthesis of monounsaturated fatty acids[J]. Cancer Res, 2015, 75(12): 2530-2540. DOI:10.1158/0008-5472.can-15-0202.

[25] CARBONE M, MELINO G. Stearoyl CoA desaturase regulates ferroptosis in ovarian cancer offering new therapeutic perspectives[J]. Cancer Res, 2019, 79(20): 5149-5150. DOI:10.1158/0008-5472.can-19-2453.

[26] XIE H, TANG C H, SONG J H, *et al*. IRE1α RNase-dependent lipid homeostasis promotes survival in Myc-transformed cancers[J]. J Clin Invest, 2018, 128(4): 1300-1316. DOI:10.1172/jci95864.

[27] DANIAL N N, KORSMEYER S J. Cell death: critical control points[J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219. DOI:10.1016/s0092-8674(04)00046-7.

[28] DENISENKO T V, SOROKINA I V, GOGVADZE V, *et al*. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: a link that must to be broken[J]. Drug Resist Updat, 2016, 24: 1-12. DOI:10.1016/j.drup.2015.11.002.

(**收稿**:2020-09-26;**修回**:2020-11-16)

(编辑 汪勤俭)