

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.004

PARP1通过调控N-糖基转移酶FUT8影响胃癌AGS细胞的增殖与5-FU耐药

王晶¹, 王宏浩², 向田³, 任文镇⁴, 刘杲²(1. 武汉市汉口医院 检验科, 湖北 武汉 430015; 2. 湖北民族大学医学部 恩施临床学院暨恩施土家族苗族自治州中心医院 胃肠外科 湖北 恩施 445000; 3. 恩施土家族苗族自治州中心医院 临床检验中心, 湖北 恩施 445000; 4. 湖北医药学院恩施培养基地 胃肠外科, 湖北 恩施 445000)

[摘要] **目的:**探讨聚二磷酸腺苷核糖聚合酶1(PARP1)对胃癌AGS细胞的增殖和5-FU耐药性的影响及其可能的机制。**方法:**收集2018年5月至2019年12月于恩施土家族苗族自治州中心医院就诊的72例胃癌患者的肿瘤组织和癌旁组织,采用qPCR和免疫组化法检测胃癌和癌旁组织中PARP1的表达状况。CCK-8法、流式细胞术和集落形成实验分别检测PARP1抑制剂AG14361对胃癌AGS细胞增殖、凋亡和集落形成的影响,MTT法检测AG14361对胃癌细胞5-FU敏感性的影响。mRNA测序分析AG14361处理AGS细胞后差异基因整体分布情况,KEGG富集分析相关信号通路。向AGS细胞转染siFUT8以敲减FUT8基因的表达,qPCR和WB法检测AGS细胞内 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)的表达状况和敲减FUT8效果,CCK-8法、流式细胞术和集落形成实验分别检测AG14361处理对敲减FUT8表达的AGS细胞增殖、凋亡和集落形成的影响。**结果:**与癌旁组织相比,胃癌组织中PARP1呈高表达($P<0.001$)。AG14361处理可显著抑制AGS细胞的增殖和细胞集落形成,促进AGS细胞凋亡(均 $P<0.01$)。AG14361处理可降低5-FU杀伤胃癌细胞的 IC_{50} ,且在AGS细胞中尤为明显, IC_{50} 下降超过60%。mRNA测序结果显示,N-糖基化修饰中FUT8是AG14361抑制AGS细胞增殖的关键糖基转移酶($P<0.05$)。与siNC组相比, IC_{50} 浓度的AG14361可显著逆转干扰FUT8对AGS细胞增殖的增加,促进细胞凋亡和BAX蛋白表达、抑制Bcl2蛋白表达,抑制FUT8干扰所致AGS细胞集落的增加(均 $P<0.01$)。**结论:**PARP1可通过调控N-糖基转移酶FUT8促进胃癌细胞恶性转化,其抑制剂AG14361可增强胃癌细胞对5-FU的敏感性,PARP1可能成为胃癌治疗的一个潜在靶标。

[关键词] 胃癌;AGS细胞;多ADP核糖聚合酶1; α -1,6-岩藻糖基转移酶8;增殖;5-FU;耐药

[中图分类号] R735.2;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0410-09

PARP1 promotes proliferation and 5-FU resistance of gastric cancer AGS cells by regulating N-glycosyltransferase FUT8

WANG Jing¹, WANG Honghao², XIANG Tian³, REN Wenzhen⁴, LIU Gao²(1. Department of Laboratory Medicine, Wuhan Hankou Hospital, Wuhan 430015, Hubei, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture & Enshi Clinical College, Medical School of Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China 3. Department of Laboratory Medicine, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, Hubei, China 4. Department of Gastrointestinal Surgery, Enshi Training Base, Hubei University of Medicine, Enshi 445000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of polyadenosine diphosphate ribose polymerase 1 (PARP1) on the proliferation and 5-FU resistance of gastric cancer cells and its potential mechanism. **Methods:** The tumor tissues and corresponding paracancerous tissues of 72 patients with gastric cancer who were treated in Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture from May 2018 to December 2019 were collected. AGS cells were transfected with siFUT8 to knock down FUT8 gene expression. qPCR and immunohistochemistry were used to detect the expression of PARP1 in gastric cancer and adjacent tissues. CCK-8, flow cytometry, and colony formation assay were employed to detect the effects of AG14361 on the proliferation, apoptosis and colony formation of AGS cells. MTT assay was used to detect the effect of AG14361 on the 5-FU sensitivity of gastric cancer cells. The overall distribution of differential genes in AGS cells treated with AG14361 was analyzed by mRNA sequencing, and related signaling pathways were analyzed by KEGG enrichment. qPCR and WB were used to detect the expression of α -1,6-fucosyltransferase (FUT8) in AGS cells and the interference effect of FUT8. CCK-8, flow cytometry, and colony formation assay were employed to detect the effects of AG14361 on the proliferation, apoptosis, and colony formation of AGS cells disturbed by siFUT8. **Results:** Compared with paracancer tissues,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81760540)

[作者简介] 王晶(1982—),女,本科,主管检验师,主要从事感染与肿瘤相关的研究,E-mail:24073051@qq.com

[通信作者] 刘杲,E-mail:lgkinki@whu.edu.cn

PARP1 expression was significantly increased in gastric cancer tissues ($P < 0.001$). AG14361 can significantly inhibit the proliferation and colony formation of AGS cells, thus promoting the apoptosis of AGS cells (all $P < 0.01$). AG14361 treatment reduced the IC_{50} of 5-FU against gastric cancer cells, especially against AGS cells, with IC_{50} decreased by more than 60%. mRNA sequencing results showed that FUT8 was a key glycosyltransferase of AG14361 in inhibiting the proliferation of AGS cells ($P < 0.05$). Compared with the siNC group, treatment of AG14361 with IC_{50} significantly reversed the promotion of AGS cells proliferation caused by interference with FUT8, promoted apoptosis and BAX protein expression, decreased Bcl2 protein expression and inhibited the increase in AGS cell colony formation caused by interference with FUT8 (all $P < 0.01$). **Conclusion:** PARP1 can promote malignant transformation of gastric cancer cells by regulating N-glycosyltransferase FUT8. AG14361 can enhance the chemotherapy sensitivity of 5-FU, and PARP1 may become a potential target for gastric cancer treatment.

[Key words] gastric cancer; AGS cell; poly-ADP ribose polymerase 1 (PARP1); α -1,6-fucosyltransferase 8 (FUT8); proliferation; 5-FU; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(5): 410-418. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.004]

胃癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,2021年流行病学统计结果^[1]显示,在世界范围内,其发病率在所有肿瘤中位于第四位,但病死率高居第三。尽管目前胃癌的诊治技术有了较大的进步,但由于其早期缺乏特异症状、肿瘤侵袭和转移能力较强,多数患者就诊时已是中晚期。术后化疗作为进展期胃癌患者的主要治疗手段的,部分患者易出现多种不良反应难以耐受,且治疗过程中易出现对化疗药物的耐药^[2],故患者5年生存率仍相对较低^[3]。多聚ADP核糖聚合酶1(poly-ADP ribose polymerase 1, PARP1)为一种广泛存在于多数真核细胞内的蛋白核酶,其介导的N-糖基化修饰与肿瘤细胞的恶性生物学行为密切相关, α -1,6-岩藻糖基转移酶8(α -1,6-fucosyltransferase 8, FUT8)是其中的关键酶。ADP-核糖基化的最新进展为人类肿瘤治疗提供了新的方向^[4-5]。外源性给予PARP1抑制剂能够显著抑制肺腺癌细胞的DNA损伤修复,增加肺癌细胞对药物的敏感性,诱导细胞发生凋亡^[6-7]。在卵巢癌^[8]、乳腺癌^[9]及宫颈癌^[10]等多种肿瘤的研究中也发现,沉默PARP1基因可显著增强放疗敏感性,促进细胞凋亡,但其在胃癌中作用的研究尚少。本研究通过对胃癌患者组织和细胞中PARP1的研究,并结合生物信息学方法探究其对胃癌AGS细胞增殖和耐药性的影响及潜在机制,这对发现新的治疗靶点、改善患者预后等都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人胃癌细胞AGS和SGC-7901购自中国科学院细胞库,均采用含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素双抗的DMEM完全培养基于37℃,5%CO₂培养箱中培养。DMEM培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自美国Hyclone公司,PARP1抑制剂AG14361购自美国Sigma-Aldrich公司(用5μL 4.74%的DMSO溶解后用于细胞实验),DNA Ligation Kit试剂盒购自日本TOYOBO公司,TRIzol和Lipofectamine 2000转染试剂盒均购自美国Invitrogen公司,反转录试剂盒和实时定

量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,RIPA裂解液,BCA蛋白定量试剂盒,MTT、CCK-8试剂盒和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天公司,一抗[兔抗PARP1(ab191217)、FUT8(ab191571)、 β -actin(ab179467)单克隆抗体]和HRP标记的羊抗兔IgG二抗(ab6721)均购自英国Abcam公司,ECL显色液和PVDF膜购自美国Millipore公司。IX83倒置相差显微镜购自日本Olympus公司,细胞CO₂培养箱购自美国Thermo Scientific公司,Agilent 2100 Bioanalyzer生物芯片分析系统购自美国Agilent Technologies公司,ABI7500型qPCR仪购自美国ABI公司,FACSCanto II流式细胞仪购自美国BD公司,RT-6100全自动酶标分析仪购自深圳雷杜公司,GelDoc XR+凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 临床样本

收集2018年5月至2019年12月间经恩施土家族苗族自治州中心医院病理科医生明确诊断为胃癌的石蜡组织切片72例(其中伴有淋巴结转移的胃癌原发灶组织37例,无淋巴结转移的胃癌原发灶组织35例),同时收集相应距肿瘤边缘5cm以上的癌旁组织标本切片。入选患者包括男性43例、女性29例,中位年龄52(38~80)岁。纳入标准:标本采集前患者未接受过术前的放疗或化疗治疗,无其他肿瘤病史。排除标准:合并其他胃部疾病的患者,不同意样本采集的患者,信息不全的患者。所有患者术前均告知研究过程并签署知情同意书,研究方案得到所在医院医学伦理委员会的批准。

1.3 免疫组织化学法检测PARP1在胃癌组织中的表达

术后立即将组织标本放入4%多聚甲醛中固定,经全自动免疫组织化学染色仪脱水、石蜡包埋、制成切片等步骤后,加入10μg/mL的PARP1抗体,然后依次采用生物素化抗小鼠IgG二抗,随后用碱性磷酸酶链霉亲和素和显色原进行染色。经苏木精复染、脱水、透明后用中性树脂封片,采用倒置显微镜观察,在高倍镜下观察样本,每个视野计数100个肿瘤细

胞,每张切片观察5个视野。结果判读:PARP1阳性信号定位于细胞核,细胞核内出现棕黄色颗粒即为阳性,无棕黄染色者为阴性;染色呈黄色计为1分,染色呈棕黄色计为2分,染色呈棕色计为3分。同时按每高倍镜视野阳性细胞百分比计分,阳性细胞数<5%计为0分,5%~<26%计为1分,26%~<50%计为2分,50%~<75%计为3分,≥75%计为4分。两种计分的乘积即为阳性强度:<3分为阴性表达,≥3分为阳性表达(最高分为12分)。

1.4 MTT法检测AG14361杀伤AGS细胞的IC₅₀

将AGS细胞培养至对数生长期,经0.25%胰酶消化、洗涤、计数,重悬于10%FBS的DMDM培养液,调整细胞密度为1×10⁴个/mL,按100 μL/孔接种至96孔培养板,37℃、5%CO₂培养箱过夜培养,分别加入不同浓度的AG14361,AG14361的终浓度分别为100、50、25、12.5、6.25、3和1.5 μmol/L,同时设阴性对照(加入等体积的DMSO),各组设3个复孔。37℃、5%CO₂培养箱培养24 h,培养结束前4 h加入MTT(5 mg/mL),10 μL/孔,待培养结束,用全自动酶标仪检测各孔光密度(D)值,波长为490 nm。根据检测结果计算AG14361对AGS细胞的IC₅₀(50%细胞生长抑制所需的药物浓度),抑制率=(对照组D值-实验组D值)/对照组D值×100%。

1.5 qPCR法检测AG14361对AGS细胞中PARP1和FUT8表达的影响

收集处于对数生长期细胞,采用TRIzol法提取细胞RNA,然后逆转录为cDNA。使用10 μL体系,包括1 μL cDNA、5 μL 2×SYBGREEN Mix、1 μL上下游引物混合液(引物混合物浓度为2 μmol/L)、3 μL无RNA酶的水,设置3个复孔。引物由武汉擎科生物合成,引物序列见表1。PCR反应条件为95℃ 10 min;95℃ 15 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min,共40个循环。β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对表达量。

表1 qPCR引物序列

基因		引物序列(5'-3')
PARP1	上游	AATCTATCAGGGAACGGCGG
	下游	CATCAAACATGGGCGACTGC
FUT8	上游	GACAGAACTGGTTCAGCGGAGA
	下游	GCAGTAGACCACATGATGGAGC
β-actin	上游	TGGTGGGCATGGGTTCAGAAAGGAT
	下游	CCAGAGGCGTACAGGGATAGCAC

1.6 WB法检测细胞中相关蛋白的表达

采用RIPA裂解液将收集的细胞在冰上进行裂解,BCA蛋白定量法测定蛋白质浓度,随后加入1 mL

5×SDS上样缓冲液混匀,100℃干浴5 min。每样本取15 μg蛋白质行SDS-PAGE,经转膜、5%脱脂奶粉封闭后,加入一抗4℃过夜,1×TBS/T轻洗3遍,加入二抗,室温处理1 h,1×TBS/T轻洗3遍,加入ECL发光剂进行显色及凝胶成像仪显影,采用Image J2x软件分析蛋白条带的灰度值,以GAPDH为内参,计算靶蛋白的相对表达。

1.7 CCK-8法检测AG14361对胃癌细胞增殖的影响

收集对数生长期细胞,按1×10³个/孔均匀接种于96孔板,加入AG14361使药物浓度达IC₅₀,每孔总体积为100 μL,37℃、5%CO₂培养箱23 h,然后每孔加入10 μL CCK-8培养,在细胞培养箱中继续培养1 h,酶标仪检测450 nm处D值,D值反映细胞增殖状况。

1.8 流式细胞术检测AG14361对胃癌细胞凋亡的影响

取对数生长期的细胞,按1×10⁵个/孔均匀接种于6孔板中,然后加入AG14361使药物浓度为IC₅₀,每孔总体积为4 mL,细胞培养24 h后,弃上清,1×PBS轻洗3遍,胰酶消化,800×g离心5 min,弃上清,加入195 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞;随后依次加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL碘化丙啶染色液混匀后室温避光放置20 min,随后置于冰浴中。采用FACS Canto II流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.9 细胞集落形成实验检测AG14361对胃癌细胞克隆形成的影响

取对数生长期的AGS细胞,进行胰酶消化,制成1×10³个/mL的细胞悬液。取1 mL接种于12孔板,轻轻晃动培养皿,使细胞分散均匀,37℃、5% CO₂中培养2周,当培养皿中出现肉眼可见克隆时,终止培养,PBS轻洗3次,空气干燥。4%多聚甲醛/甲醇固定15 min,弃甲醇后空气干燥。用0.5%结晶紫溶液染色20 min,PBS洗3次,晾干。在显微镜下以肉眼可见的细胞团作为计数细胞集落的标准,拍照并使用Image J2x软件进行计数。

1.10 AGS细胞基因测序及差异基因富集分析

AGS细胞分别使用DMSO和IC₅₀浓度的AG14361处理24 h后提取总RNA,送北京奥维森科技进行mRNA测序,每组3个生物学重复。样品总RNA经定量、完整性检测后进行测序分析。FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)是目前最为常用的基因表达水平估算方法,以FPKM>1界定基因表达,用火山图可以展示差异基因的整体分布情况。鉴定差异基因后对差异基因进行功能富集分析。用H-cluster方法对差异基因的相对表达水平值log₂(FPKM)进行聚类,做层次聚类分析。差异表达基因KEGG富集分析结果通过散点图进行图形化展示。Rich factor、

$-\log_{10}(P \text{ value})$ 和富集到此通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度。Rich factor 指 pathway 中富集到的差异表达基因数量与注释基因数量的比值。

1.11 向 AGS 细胞转染 FUT8 siRNA 以干扰 FUT8 mRNA 的表达

siFUT8 和 siNC RNA 由上海英俊公司合成, 序列如下: siFUT8, 5'-GGACUGCACAAUCGAUACATT-3'; siNC: 5'-GGTTCAACGTTCTTCAGTCAGATCT-3'。siFUT8 的转染完全按照转染试剂说明书进行。AGS 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种 6 孔板, 37°C 培养过夜, 更换新鲜的 DMEM 完全培养基。将 2.2 pmol 的 siFUT8 RNA 溶于无血清培养基中, 颠倒混匀后, 加入 $8 \mu\text{L}$ 的转染试剂转染细胞, 同时转染无干扰作用的 siNC 作为阴性对照。 37°C 下培养 72 h 后检测 FUT8 mRNA 水平, 评估转染 AGS 细胞干扰 FUT8 表达效果。

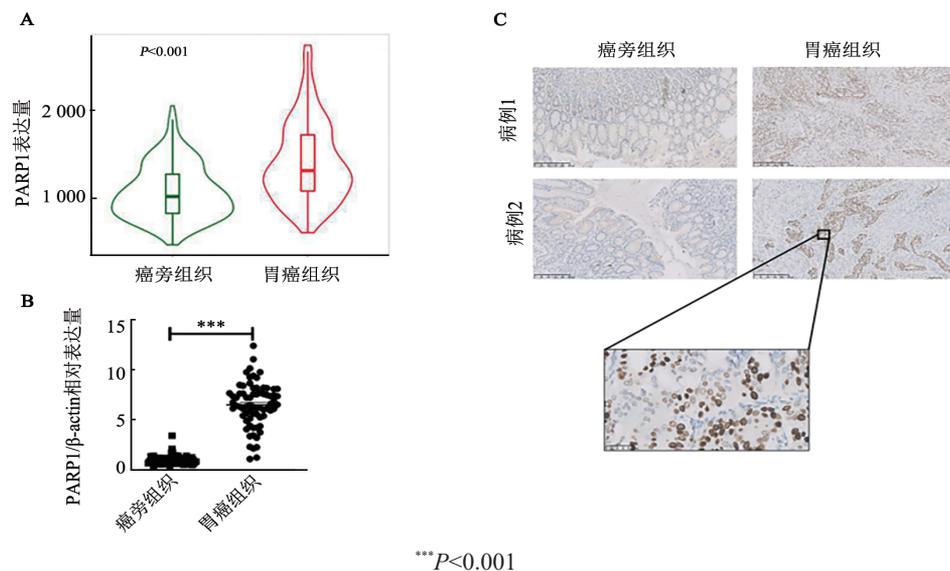
1.12 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 t 检验, 两组以上数据比较采用单因素方差分析; 两组间率的比较采用 χ^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 胃癌组织和癌旁组织中 PARP1 表达水平

Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 PARP1 在胃癌及正常胃组织中表达差异, 结果(图 1A)显示, 胃癌组织中 PARP1 基因表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.001$)。对 72 对胃癌组织和癌旁组织中 PARP1 基因和蛋白表达进行检测, qPCR 检测结果(图 1B)显示, 癌组织标本中 PARP1 基因表达水平显著高于癌旁组织 ($t = 20.91, P < 0.001$); 免疫组化检测结果(图 1C)显示, 胃癌组织中 PARP1 阳性表达率显著高于相应癌旁组织 ($P = < 0.001$, 表 2)。



A: Kaplan-Meier Plotter 数据库中 PARP1 在胃癌及正常组织中表达差异; B: qPCR 检测 PARP1 在胃癌和癌旁组织中的表达; C: PARP1 在 2 例胃癌患者胃癌组织和癌旁组织中的表达(标尺为 $250 \mu\text{m}$)

图 1 胃癌组织和癌旁组织中 PARP1 表达水平比较

表 2 PARP1 在胃癌及癌旁组织中表达阳性率状况

组织类型	PARP1		阳性率/%
	阴性表达	阳性表达	
胃癌组织	13	59	81.94
癌旁组织	48	24	33.33
χ^2			34.841
P			<0.001

2.2 AG14361 可抑制胃癌细胞增殖而促进细胞凋亡

MTT 法检测结果(图 2A)显示, 作为 PAPP1 抑制剂, AG14361 杀伤 AGS 细胞的 IC_{50} 为 $17.31 \mu\text{mol/L}$ 。

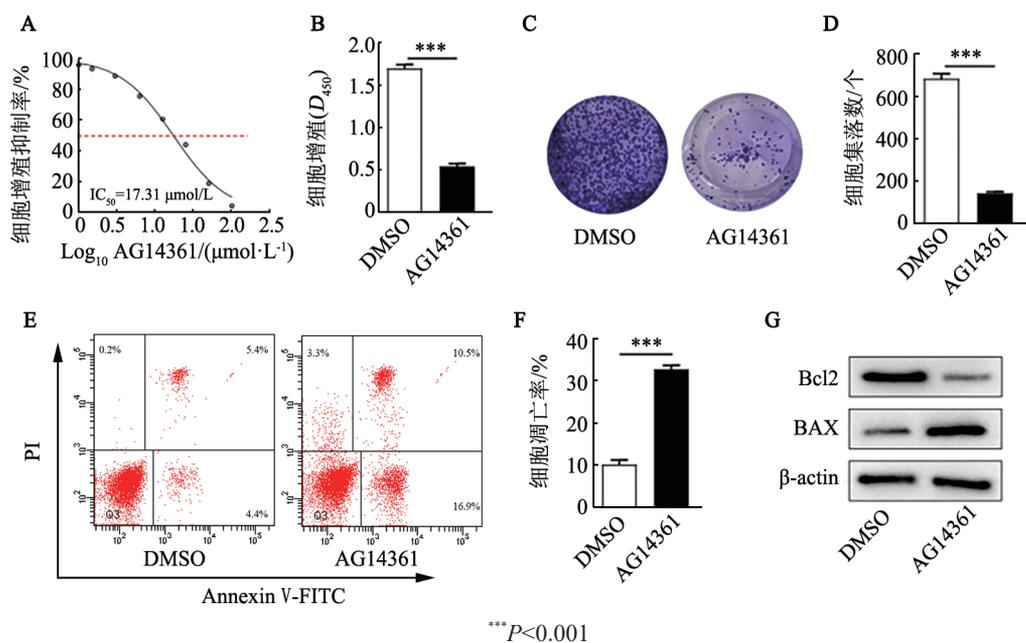
使用 IC_{50} 的 AG14361 处理 AGS 细胞发现, 与空白对照相比, 细胞增殖水平显著减低 ($P < 0.001$, 图 2B), 平板集落形成试验也显示 AG14361 可显著抑制细胞集落的形成 ($P < 0.001$, 图 2C、D), 细胞凋亡水平显著增加 ($P < 0.001$, 图 2E、F), 凋亡蛋白 BAX 表达显著增加、抗凋亡蛋白 Bcl2 表达显著降低(图 2G)。

2.3 AG14361 可增强胃癌细胞对 5-FU 的化疗敏感性

MTT 法检测结果显示, 5-FU 杀伤 AGS 和 SGC-7901 细胞的 IC_{50} 分别为 $5.124 \mu\text{g/mL}$ 和 $1.070 \mu\text{g/mL}$ (图 3A、B)。在用 $17.31 \mu\text{mol/L}$ 的 AG14361 处理细胞后再以 5-FU 杀伤 AGS 和 SGC-7901 细胞, IC_{50} 分别降

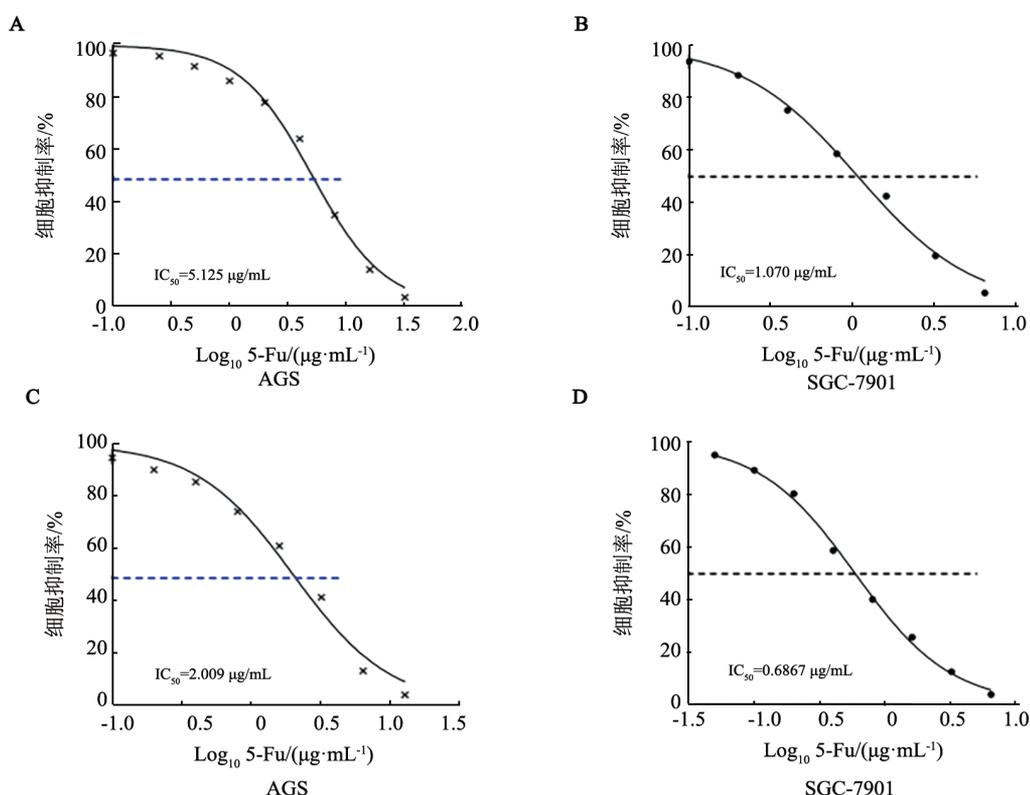
为 2.009 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.586 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3C、D)。与单独 5-FU 处理相比较, 在经 AG14361 处理后 5-FU 再处理, 其杀伤 AGS 细胞的 IC_{50} 下降了 60.79%、杀伤

SGC-7901 细胞的 IC_{50} 下降了 41.74%, 说明 AG14361 可增强胃癌细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性。



A: MTT 法检测 AG14361 对 AGS 细胞的 IC_{50} ; B: CCK-8 法检测细胞增殖; C: 集落形成试验检测细胞集落形成数 ($\times 20$); D: 细胞集落数比较; E: 流式细胞法检测细胞凋亡; F: 细胞凋亡率比较; G: WB 法检测凋亡相关蛋白 Bcl2 和 BAX 的表达状况

图 2 PARP1 抑制剂 AG14361 对 AGS 细胞增殖、细胞集落形成和凋亡的影响



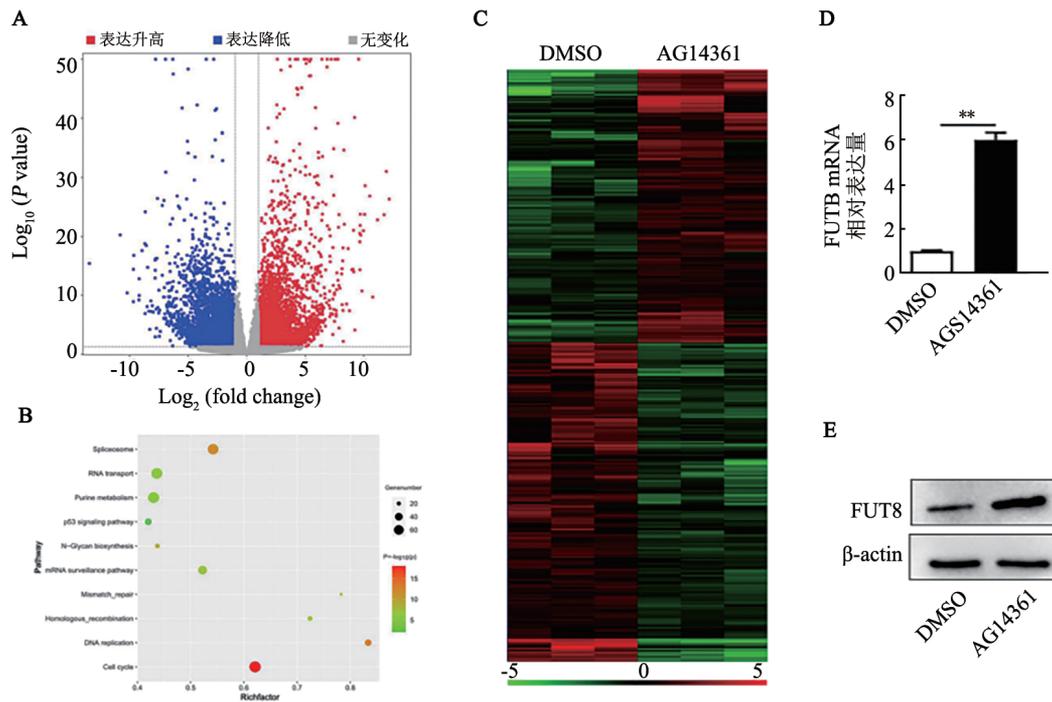
A: MTT 法检测 5-FU 杀伤 AGS 细胞的 IC_{50} ; B: MTT 法检测 5-FU 杀伤 SGC-7901 细胞的 IC_{50} ; C: MTT 法检测预先 IC_{50} 的 AG14361 处理 AGS 细胞后 5-FU 再处理的 IC_{50} ; D: MTT 法检测预先 IC_{50} 的 AG14361 处理 SGC-7901 细胞后 5-FU 再处理的 IC_{50}

图 3 PARP1 抑制剂 AG14361 增强胃癌 AGS 和 SGC-7901 细胞对 5-FU 的敏感性

2.4 AG14361 促进 AGS 细胞 N-糖基转移酶 FUT8 的表达

AG14361 处理 AGS 细胞 24 h 后提取总 RNA, 进行 mRNA 测序。以 FPKM>1 界定基因表达, 共计检测到 40 305 个基因。将差异基因筛选阈值界定为 $|\text{Log}_2(\text{FoldChang})| > 1$ 且 $q \text{ value} < 0.005$, 共筛选到 5 496 个基因, 其中上调基因 2 972 个、下调基因 2 524 个(图 4A)。差异表达基因 KEGG 富集分析发现, 共有 10 条肿瘤及胃功能相关信号轴被富集且表达水平具有显著差异, 这些信号轴涉及细胞周期、DNA 修

复、基因同源重组、P53 信号轴和核酸剪接修复等, 尤其是在 N-糖基化修饰方面也显示出重要作用(图 4B)。采用 KEGG 基因聚类进一步分析, 热图结果(图 4C)显示, AG14361 可显著促进 N-糖基转移酶 FUT8 等基因的表达。为验证 AG14361 对 FUT8 的调控作用, 分别使用 qPCR 和 WB 检测 AGS 细胞经 AG14361 处理后细胞中 FUT8 的表达量, 结果显示, AG14361 处理 AGS 细胞后, 细胞中 FUT8 基因 ($P < 0.05$, 图 4D) 和蛋白(图 4E)的表达水平都有所升高。



** $P < 0.01$

A: mRNA 测序差异基因表达图; B: 差异表达基因 KEGG 富集分析相关信号通路图;
C: KEGG 基因聚类分析热图; D: qPCR 检测 AG14361 处理后 AGS 细胞中 FUT8 mRNA 水平变化;
E: WB 检测 AG14361 处理后 AGS 细胞中 FUT8 蛋白水平变化

图 4 AG14361 可促进 FUT8 表达的生存分析结果经 qPCR 和 WB 法得验证

2.5 PARP1 通过调控 N-糖基转移酶 FUT8 促进 AGS 细胞增殖

为进一步探究 FUT8 对胃癌细胞的影响, 对 AGS 细胞进行 siFUT8 干扰处理(见图 5A、B), 同时使用 17.31 $\mu\text{mol/L}$ 的 AG14361 分别处理 siNC 和 siFUT8 组的 AGS 细胞, CCK-8 法检测结果(图 5C)显示, 与 siNC 组相比, siFUT8 组 AGS 细胞的增殖水平显著升高 ($P < 0.01$), 而 AG14361 处理可显著逆转该影响 ($P < 0.001$); 平板集落形成实验结果(图 5D、E)显示, siFUT8 组 AGS 细胞集落的形成能力较 siNC 组显著增强 ($P < 0.001$), 而 AG14361 处理可显著抑制该影响 ($P < 0.01$); 流式细胞术检测结果(图 5F、G)也显示,

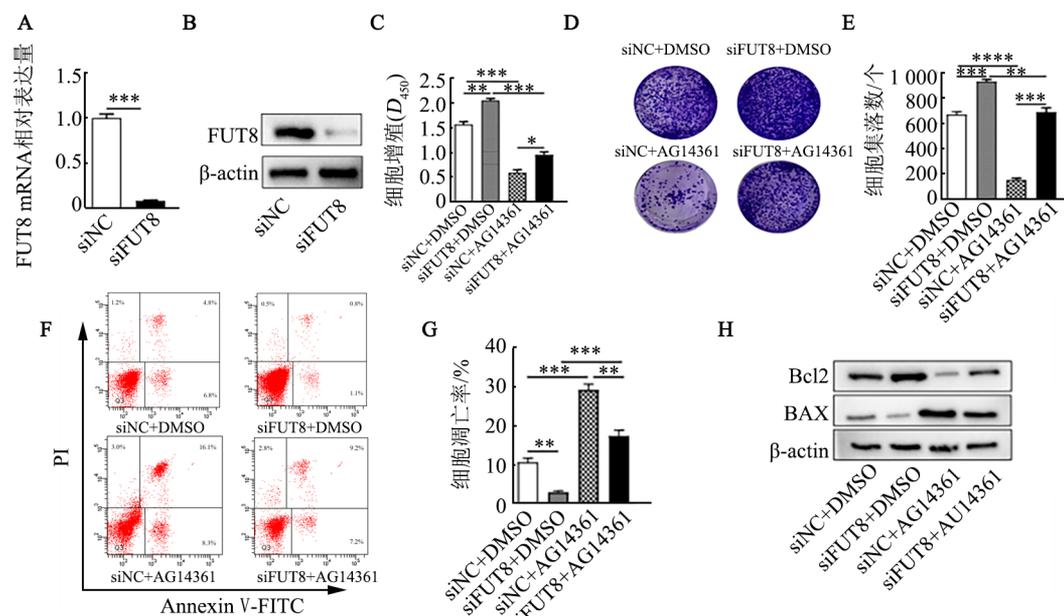
AG14361 可显著逆转 siFUT8 所致 AGS 细胞增殖的增加, 而促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 同时促进凋亡蛋白 BAX 表达、抑制抗凋亡蛋白 Bcl2 表达(图 5H)。

3 讨论

由于绝大多数胃癌患者在确诊时已进入进展期或晚期, 因此术后药物治疗便成为胃癌治疗的主要手段^[11]。其中化疗药物如氟尿嘧啶类、紫杉醇类、表柔比星类及铂类药物在胃癌的药物治疗中使用最为广泛, 它们多是通过损伤肿瘤细胞核酸功能而发挥抗癌作用的^[12]。但随着患者用药时间的延长, 肿瘤细胞 DNA 的损伤可以通过激活机体 DNA 损伤应答机

制得以修复,使肿瘤细胞产生耐药,而肿瘤细胞耐药的
出现便成为影响患者生存时间和生存质量中最亟
待解决的问题^[13]。因此,在DNA损伤修复、调节细胞

凋亡等方面发挥重要作用的PARP1便成为肿瘤治疗
及耐药研究的焦点分子而备受关注。



*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

A: qPCR检测FUT8 mRNA水平变化; B: WB检测FUT8蛋白水平变化; C: CCK-8检测细胞增殖状况; D: 集落形成试验检测细胞集落形成数; E: 细胞集落数; F: 流式细胞术检测细胞凋亡状况; G: 细胞凋亡率; H: WB检测Bcl2和BAX的表达状况

图5 PARP1通过调控N-糖基转移酶FUT8影响AGS细胞增殖、抑制细胞凋亡

PARP1在多种肿瘤细胞中呈高表达,通过siRNA
技术干扰PARP1基因的表达能够有效抑制肿瘤细胞
复制过程中的DNA损伤修复,导致肿瘤细胞DNA损
伤的积聚和自我凋亡的启动,进而到达抑制肿瘤细胞
增殖的效果^[14-15]。本研究首先通过Kaplan-Meier
Plotter数据库分析比较胃癌组织与正常组织中
PARP1的表达,结果发现PARP1在胃癌组织中表达
显著升高。对收集的胃癌患者组织与癌旁组织进行
qPCR和免疫组化分析,同样发现PARP1在胃癌组织
中呈高表达。王睿等^[16]通过ELISA法检测胃癌患者
血清中PARP1含量时发现,患者血清中PARP1表达
显著升高;同时也有研究^[17]显示PARP1可作为胃癌
独立预后和疾病诊断和进展的重要生物学标志。这
都说明胃癌患者PARP1可能在胃癌的发生发展中具
有重要作用。

抑制PARP1的表达可抑制肿瘤细胞DNA修复
过程,临床前及临床研究^[6-9]均已证明,在多种肿瘤中
抑制PARP1的表达均具有增强化疗、放疗等治疗效
果的潜力,因此PARP1抑制剂在临床抑制肿瘤耐药
中也日益受到关注,被认为是一种很有前景的抗癌
策略。奥拉帕利、卢卡帕利、尼拉帕利和他拉唑帕利
等4种PARP1抑制剂已获得美国FDA批准,其在

治疗与人类乳腺癌易感基因1和2(breast cancer
susceptibility gene1/2, BRCA1/2)突变所致的卵巢癌、
转移性乳腺癌、晚期前列腺癌和胰腺癌等肿瘤的治
疗中均取得了较好的疗效^[18]。同时一些PARP1抑制
剂(如BMN673、AG14361、NMS-P118和BYK204165
等)正逐步进入临床评估^[19-20]。AG14361是一种有效
的PARP1抑制剂,它可通过诱导caspase 3/7的活化
而调控细胞周期异常,并抑制NF-κB信号激活^[21]。
WANG等^[22]使用AG14361处理胃癌细胞时发现,
AG14361可增强顺铂耐药的胃癌细胞的化疗敏感
性。而5-FU作为胃癌化疗过程中最常见的化疗
药物之一,AG14361对其化疗敏感性影响的研究尚
少。因此,本研究首先通过对胃癌AGS细胞使用
AG14361抑制剂处理,观察其对细胞生物学行为的
影响,结果发现,AGS细胞细胞增殖、集落形成能
力显著降低,细胞凋亡显著增加。于是使用AG14361
联合5-FU分别处理AGS和SGC-7901胃癌细胞系,
观察其对5-FU化疗敏感性的影响,结果显示其可显
著降低化疗药物5-FU的IC₅₀,这说明AG14361也可
显著增强化疗药物5-FU对胃癌细胞的敏感性,这也
为PARP1抑制剂AG14361联合放化疗药物治疗胃癌
奠定了一定的实验基础。

为探究AG14361抑制胃癌细胞增殖,增强5-FU敏感性的机制,通过AG14361处理AGS细胞后进行mRNA测序,进一步分析差异基因的变化,并通过信号通路的富集分析发现,N-糖基化修饰在PARP1介导的胃癌细胞增殖中起着重要作用,提示AG14361可通过促进胃癌细胞糖基化修饰进而提高胃癌细胞对5-FU的敏感性。糖基化修饰是蛋白翻译后修饰中最重要的加工环节之一,尤其是N-糖基化修饰,占到生物体总糖基化修饰的一半以上,其异常修饰常与细胞癌变、转移、抗原提呈、免疫逃逸等肿瘤生物学行为密切相关^[23]。FUT8属于岩藻糖基转移酶家族,是参与N-聚糖核心岩藻糖基化的关键酶^[24]。研究结果^[25]显示,FUT8在多种肿瘤细胞中表达增高,而胃癌症表达则显著降低;临床研究结果^[26-27]也显示,胃癌患者FUT8的表达与胃癌患者生存、淋巴结转移和预后等多种病理临床特征密切相关,即FUT8表达越高,患者总体生存率越好,但具体机制尚不清楚。本研究使用AG14361处理AGS细胞,通过生物信息学方法进行mRNA测序和KEGG基因聚类分析,发现AG14361处理后N-糖基转移酶FUT8等基因的表达显著升高,并且抑制PARP1表达后AGS细胞内FUT8显著升高。

为进一步证实PARP1通过调控胃癌细胞中FUT8的表达介导胃癌细胞的恶性进展,对AGS细胞进行FUT8干扰处理,同时使用AG14361处理,观察胃癌AGS细胞的增殖、集落形成和凋亡状况,结果发现AG14361可以显著逆转AGS细胞FUT8干扰带来的胃癌细胞生物学行为的改变,这进一步说明了PARP1可能通过下调胃癌细胞中FUT8的表达促进胃癌细胞的恶性进展。当然,本研究仅从生物学行为上初步证实抑制PARP1的表达可以通过增加FUT8的表达,抑制胃癌细胞的恶性改变,从而达到抑制胃癌细胞增殖的效果,而其中的具体机制有待进一步深入研究。

综上所述,本研究通过以胃癌组织和胃癌细胞的为研究对象,初步证实了PARP1可通过促进N-糖基转移酶FUT8的表达介导胃癌细胞凋亡和影响化疗药物敏感性,这为AG14361等PARP1抑制剂转化至临床治疗胃癌等肿瘤提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] CHEN Z, LI Y, TAN B, *et al.* Progress and current status of molecule-targeted therapy and drug resistance in gastric cancer[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2020, 56(7): 469-482. DOI: 10.1358/dot.2020.56.7.3112071.
- [3] 吴珍珍, 刘志宏, 孙丽. PTEN 诱导激酶 1 在预测胃癌患者预后及化疗疗效中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(10): 1272-1278. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2021.10.008.
- [4] PALAZZO L, SUSKIEWICZ M J, AHEL I. Serine ADP-ribosylation in DNA-damage response regulation[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2021, 71: 106-113. DOI:10.1016/j.gde.2021.07.005.
- [5] CURTIN N J, SZABO C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(10): 711-736. DOI:10.1038/s41573-020-0076-6.
- [6] ALMAHLI H, HADCHITY E, JABALLAH M Y, *et al.* Development of novel synthesized phthalazinone-based PARP-1 inhibitors with apoptosis inducing mechanism in lung cancer[J]. *Bioorg Chem*, 2018, 77: 443-456. DOI:10.1016/j.bioorg.2018.01.034.
- [7] GONZALEZ RAJAL A, MARZEC K A, MCCLOY R A, *et al.* A non-genetic, cell cycle-dependent mechanism of platinum resistance in lung adenocarcinoma[J/OL]. *eLife*, 2021, 10: e65234 [2022-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33983115/>. DOI: 10.7554/eLife.65234.
- [8] BI Y, VERGINADIS I I, DEY S, *et al.* Radiosensitization by the PARP inhibitor olaparib in BRCA1-proficient and deficient high-grade serous ovarian carcinomas[J]. *Gynecol Oncol*, 2018, 150(3): 534-544. DOI:10.1016/j.ygyno.2018.07.002.
- [9] LOAP P, LOIRAT D, BERGER F, *et al.* Combination of Olaparib with radiotherapy for triple-negative breast cancers: one-year toxicity report of the RADIOPARP Phase I trial[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(10): 1828-1832. DOI:10.1002/ijc.33737.
- [10] TIAN S Z, LOU L L, TIAN M Y, *et al.* MAPK4 deletion enhances radiation effects and triggers synergistic lethality with simultaneous PARP1 inhibition in cervical cancer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 143 [2022-03-15]. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01644-5>. DOI:10.1186/s13046-020-01644-5.
- [11] 张子博, 刘羽, 李勇, 等. 阿帕替尼联合其他药物治疗进展期及晚期胃癌的研究进展[J]. *河北医药*, 2021, 43(7): 1082-1086. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2021.07.029.
- [12] RUSSI S, VERMA H K, LAURINO S, *et al.* Adapting and surviving: intra and extra-cellular remodeling in drug-resistant gastric cancer cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3736 [2022-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31370155/>. DOI: 10.3390/ijms20153736.
- [13] MARIN J J G, AL-ABDULLA R, LOZANO E, *et al.* Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16(3): 318-334. DOI: 10.2174/1871520615666150803125121.
- [14] LUO H, LIANG H R, CHEN Y T, *et al.* miR-7-5p overexpression suppresses cell proliferation and promotes apoptosis through inhibiting the ability of DNA damage repair of PARP-1 and BRCA1 in TK6 cells exposed to hydroquinone[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 283: 84-90. DOI:10.1016/j.cbi.2018.01.019.
- [15] WANG Y J, LUO W B, WANG Y F. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response[J/OL]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 81: 102651 [2022-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31302005/>. DOI:10.1016/j.dnarep.2019.102651.
- [16] 王睿, 王岚, 黎明新, 等. 血清 PARP-1 蛋白高表达在胃癌中的临

- 床意义[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(12): 972-977. DOI:10.3969/j.issn.1007-3969.2015.12.009.
- [17] AFZAL H, YOUSAF S, RAHMAN F, *et al.* PARP1: a potential biomarker for gastric cancer[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(8): 152472 [2022-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31174925/>. DOI:10.1016/j.prp.2019.152472.
- [18] 黄佳炎, 尹香花. PARP抑制剂在肿瘤中的治疗现状及展望[J]. *肿瘤药理学*, 2021, 11(3): 300-304, 314. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2021.03.09.
- [19] DE BONO J, RAMANATHAN R K, MINA L D, *et al.* Phase I, dose-escalation, two-part trial of the PARP inhibitor talazoparib in patients with advanced germline BRCA1/2 mutations and selected sporadic cancers[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(6): 620-629. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-16-1250.
- [20] PIETANZA M C, WAQAR S N, KRUG L M, *et al.* Randomized, double-blind, phase II study of temozolomide in combination with either veliparib or placebo in patients with relapsed-sensitive or refractory small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(23): 2386-2394. DOI:10.1200/JCO.2018.77.7672.
- [21] VAZQUEZ-ORTIZ G, CHISHOLM C, XU X L, *et al.* Drug repurposing screen identifies lestaurotinib amplifies the ability of the poly (ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor AG14361 to kill breast cancer associated gene-1 mutant and wild type breast cancer cells [J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3): R67 [2022-03-15]. <https://doi.org/10.1186/bcr3682>. DOI:10.1186/bcr3682.
- [22] WANG Q, XIONG J P, QIU D P, *et al.* Inhibition of PARP1 activity enhances chemotherapeutic efficiency in cisplatin-resistant gastric cancer cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 92: 164-172. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.08.001.
- [23] PINHO S S, REIS C A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(9): 540-555. DOI:10.1038/nrc3982.
- [24] BASTIAN K, SCOTT E, ELLIOTT D J, *et al.* FUT8 alpha-(1, 6)-fucosyltransferase in cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 455 [2022-03-15]. <https://doi.org/10.3390/ijms22010455>. DOI: 10.3390/ijms22010455.
- [25] LIAO C C, AN J X, YI S Q, *et al.* FUT8 and protein core fucosylation in tumours: from diagnosis to treatment[J]. *J Cancer*, 2021, 12(13): 4109-4120. DOI:10.7150/jca.58268.
- [26] ZHAO Y P, XU X Y, FANG M, *et al.* Decreased core-fucosylation contributes to malignancy in gastric cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94536 [2022-03-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732908/>. DOI:10.1371/journal.pone.0094536.
- [27] MA M X, HAN G X, WANG Y, *et al.* Role of FUT8 expression in clinicopathology and patient survival for various malignant tumor types: a systematic review and meta-analysis[J]. *Aging*, 2020, 13(2): 2212-2230. DOI:10.18632/aging.202239.

[收稿日期] 2022-03-25

[修回日期] 2022-04-15

[本文编辑] 黄静怡