



岩藻糖基转移酶8抑制剂2FF在多柔比星治疗肿瘤中的协同增效作用与机制*

谢志东^{1,2)} 章晓联^{1,2)**}⁽¹⁾ 武汉大学泰康医学院(基础医学院)免疫学系, 过敏及免疫相关疾病湖北省重点实验室, 武汉 430071;⁽²⁾ 武汉大学中南医院过敏科, 武汉 430071)

摘要 **目的** 化疗是当前癌症治疗的重要手段之一, 但化疗过程中多药耐药性的产生及副反应的发生严重限制了其应用, 因此化疗常与其他药物或疗法联合应用。在已经鉴定的13个人类岩藻糖基转移酶(fucosyltransferases, FUTs)中, FUT8(α -(1,6)-fucosyltransferase)是唯一负责核心岩藻糖基化的酶。核心岩藻糖基化在癌症的发生、转移及化疗耐药中有着重要作用, 抑制FUT8是一种潜在逆转多药耐药的方法。本研究旨在探究FUT8的小分子抑制剂2FF(2-deoxy-2-fluoro-L-fucose)联合化疗药物多柔比星(doxorubicin, DOX)治疗恶性肿瘤的可行性。**方法** 凝集素印迹实验检测2FF、DOX或二者联合对肿瘤细胞核心岩藻糖基化水平的影响。通过CCK-8法、Transwell侵袭实验探究2FF与DOX联合作用对人肝癌细胞HepG2及小鼠结肠癌细胞CT26细胞活性或侵袭的影响; 通过流式细胞术检测2FF、DOX或二者联合对HepG2细胞表面程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)表达的影响; 构建BALB/c小鼠结肠癌细胞皮下荷瘤模型以探究2FF与DOX联合作用对肿瘤生长的抑制作用。**结果** 在本研究中, 证实FUT8的抑制剂2FF能有效抑制HepG2及CT26细胞核心岩藻糖基化水平, 而DOX可增强HepG2细胞核心岩藻糖基化水平, 并且2FF可抑制这一作用。2FF能够有效增强HepG2及CT26细胞对DOX的敏感性。此外, 2FF联合DOX可协同抑制HepG2细胞的侵袭能力。在体内水平, 2FF联合DOX可增强对BALB/c小鼠CT26皮下荷瘤模型的疗效, 但二者联合造成小鼠体重的下降。此外, DOX可引起HepG2细胞PD-L1表达上调, 而2FF可削弱这一作用。**结论** FUT8抑制剂2FF可抑制DOX对肿瘤细胞的核心岩藻糖修饰和PD-L1表达的促进作用, 并增强DOX的抗癌作用。

关键词 核心岩藻糖基化, FUT8抑制剂, 化疗, 多柔比星, 多药耐药

中图分类号 R730.53

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0280

CSTR: 32369.14.pibb.20240280

恶性肿瘤已经成为危害人类生命健康、制约社会经济发展的一大类疾病, 是全世界人口死亡的重要因素之一。根据中国国家癌症中心2022年发布的统计数据^[1], 2022年中国恶性肿瘤新发病例估计为482.47万, 平均每分钟就有7人确诊, 且近十几年来恶性肿瘤的发病死亡率均呈持续上升趋势, 每年由于恶性肿瘤所产生的医疗消费超过2 200亿, 防控形势严峻。

化疗仍是目前治疗癌症的主要方法之一。多柔比星(doxorubicin, DOX)是许多化疗方案的重要组成部分, 在临床上广泛应用于乳腺癌、肝癌、肺癌及神经母细胞瘤等多种恶性肿瘤的治疗^[2]。然而, 化疗的严重不良反应和耐药性的出现极大限制了其应用及疗效。因此, 迫切需要开发新的治疗策略以提高癌症患者的生存率。

异常糖基化是肿瘤细胞的普遍特征, 参与肿瘤的进展、转移和免疫逃逸等过程^[3-4]。肿瘤糖基化中的一个关键变化是岩藻糖基化的增加。岩藻糖基化可分为末端岩藻糖基化和核心岩藻糖基化。岩藻糖基化由一系列岩藻糖基转移酶(fucosyltransferases, FUTs)催化, 在已经鉴定的13个FUTs中, FUT8(α -(1,6)-fucosyltransferase)是唯一负责核心岩藻糖基化的酶, 它催化 α -1,6-岩藻糖转移到N-聚糖最内层的乙酰氨基葡萄糖残基, 核心岩藻糖基化水平可受其底物岩藻糖二磷酸鸟苷(guanosine

* 国家自然科学基金(82230078, 22077097)和国家重点研发计划(2022YFA1303500)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 027-68781587, E-mail: zhangxiaolian@whu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-30, 接受日期: 2024-09-03

diphosphate focus, GDP-Fuc) 水平的影响^[4]。

目前多项研究表明, FUT8的过度激活与多药耐药的产生存在紧密联系。丙肝病毒可诱导Huh7.5.1细胞的FUT8表达上调, 并通过MEK1/2/NF- κ B信号通路上调P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp), 导致其对5-氟尿嘧啶耐药^[5]; FUT8可上调PI3K/AKT信号通路及P-糖蛋白的表达, 导致人肝细胞癌多药耐药的产生^[6]。此外, 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的核心岩藻糖基化水平升高能够增强其与EGF结合的能力^[7], 而EGFR及其下游信号通路的激活(包括JAK-STAT、PI3K-AKT和MAPK等信号通路)也可促进多药耐药的产生^[8]。因此, FUT8抑制剂可能逆转多药耐药的产生并增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。目前一些FUT8抑制剂已经被开发并应用, 其中2FF(2-deoxy-2-fluoro-L-fucose)是一种小分子抑制剂, 可经被动运输进入细胞, 在细胞中经过一系列反应后转变为GDP-Fuc的类似物, 从而抑制GDP-Fuc的合成并竞争性抑制FUT8, 有效降低细胞膜蛋白N-糖链的岩藻糖基化水平^[9]。

本研究旨在探究FUT8抑制剂联合化疗药物DOX治疗恶性肿瘤的可行性, 并探索一种新的治疗策略, 以逆转肿瘤耐药性并提高恶性肿瘤患者的治疗效果。这种联合治疗策略有望提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 增强治疗效果, 并可能降低肿瘤复发和转移的风险。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HepG2(人肝癌细胞)、CT26(鼠结肠癌细胞)购买于中国典藏培养物保藏中心; 野生型(wild-type, WT)BALB/c小鼠购买于湖北省疾病预防控制中心; DOX购买于陶束生物; 2FF购买于MedChemExpress公司; Transwell购买于Servicebio公司; CCK-8试剂购买于Servicebio公司。

1.2 细胞培养

CT26及HepG2细胞系用含10%的胎牛血清的DMEM完全培养基在37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养。

1.3 检测2FF联合DOX对HepG2及CT26细胞活性的影响

2FF对细胞活性的影响: CT26或HepG2细胞铺96孔板, 5 000细胞/孔, 贴壁后, 每组用不同浓度2FF处理细胞, 48 h后, 每孔加入10%体积的

CCK-8溶液, 37℃培养箱中孵育1~4 h后, 酶标仪检测A₄₅₀。每组重复5次。

2FF联合DOX对细胞活性的影响: 用50 μmol/L 2FF预处理72 h的CT26或HepG2细胞铺96孔板, 5 000细胞/孔, 贴壁后, 分别用不同浓度DOX处理细胞, 24 h后, CCK-8法检测细胞活性, 具体方法同上。细胞活力(cell viability) = (实验组A值 - 空白组A值) / (对照组A值 - 空白组A值) × 100%。

1.4 凝集素印迹(Lectin blot)检测细胞核心岩藻糖基化水平

将HepG2细胞预先接种于6孔板中, 50 μmol/L 2FF处理72 h后, 用预冷PBS洗涤3次后, 加入200 μl/孔细胞裂解液RIPA(预先加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂), 冰上裂解20 min, 直至不可见明显细胞团块; 12 000g离心5 min, 收集上清, Bradford法测定蛋白质浓度; 加入等体积2×SDS上样缓冲液混匀后, 95℃煮沸变性5 min。样品冷却后, 经SDS-PAGE胶电泳后, 将蛋白质转移至PVDF膜(转膜条件为恒流200 mA, 2 h 30 min)。用5% BSA溶液室温封闭1 h后加入凝集素Bio-AOL(1:2 000)、抗体β-actin或GAPDH(1:1 000), 4℃过夜; 用TBST置于摇床上洗涤5 min, 共3次; Bio-AOL处理的膜加入链霉亲和素-HRP(1:10 000), 室温孵育45 min, β-actin或GAPDH处理的膜加入HRP标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗(1:10 000)室温孵育1 h; TBST洗涤5 min/次, 共5次后, ECL显色化学发光检测。

1.5 Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力

将Matrix-Gel™基质胶(标准型)置于冰中并在4℃融化, 将基质胶用无血清培养液按照1:8的比例进行稀释。取60 μl上述混合溶液垂直加入Transwell迁移小室中, 使其均匀平铺在底部。置于37℃孵育3 h后吸出未结合的基质胶。加入100 μl不含血清培养液, 将培养板置于37℃培养箱孵育30 min, 进行水化。将HepG2细胞(1×10⁵)重悬于含有0.1%血清的200 μl培养基中, 然后添加到Transwell迁移小室。底部腔室添加600 μl含10%胎牛血清细胞培养基。共培养72 h后, 细胞用4%多聚甲醛固定, 用0.1%结晶紫染色。

1.6 BALB/c小鼠CT26皮下荷瘤模型的构建

所有动物实验已经过武汉大学A3动物实验中心批准, 实验动物福利和伦理批件号: WP20240336。6~8周大小约20~25 g的SPF级雌性

BALB/c 共 24 只, 在小鼠右腋下皮下注射 1×10^6 个 CT26 小鼠结肠癌细胞。肿瘤平均体积达 100 mm^3 (第 7 天) 后, 随机分为 4 组, 6 只/组。Mock 组: 注射与实验组同剂量的生理盐水; DOX 组: 腹腔注射 DOX 2 mg/kg , 每 2 天 1 次; 2FF 组: 尾静脉注射 2FF 5 mg/kg , 每 2 天 1 次; 2FF 联合 DOX (DOX+2FF) 组: 腹腔注射 DOX 2 mg/kg 及尾静脉注射 2FF 5 mg/kg , 每 2 天 1 次。每日观察, 隔日用游标卡尺测量并记录每组小鼠肿瘤大小, 肿瘤测量时进行盲测, 肿瘤大小计算公式为: $V/\text{mm}^3 = (\text{长径}/\text{mm}) \times (\text{短径}/\text{mm})^2 / 2$ 。

1.7 流式细胞术检测HepG2细胞PD-L1表达水平

HepG2 细胞经 $50 \mu\text{mol/L}$ 2FF 处理 72 h 后, 再加 $200 \mu\text{g/L}$ DOX 处理 48 h。PBS 洗 2 次后加入胰酶在 37°C 消化 1 min, 将细胞吹打下来后再次用 PBS 洗 2 次, 加入 PC7 anti-PD-L1 抗体于 4°C 环境下放置 30 min。加入适量 PBS 洗涤细胞后上机检测。使用 FlowJo 流式分析软件分析结果。

1.8 统计学分析

本研究所有数据均呈现为均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), 并采用 GraphPad Prism 9.0 进行分析。两样本均数之间差异比较采用 Student's *t* 检验。多样本之间比较采用方差分析, 然后以 Neuman-Keuls 检验分析多组内两组之间差异。本研究中, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$,

“NS” 代表无统计学意义。

2 结 果

2.1 2FF可抑制DOX诱导的肿瘤细胞膜N-糖链岩藻糖修饰水平增加

为探究 2FF 是否能够有效抑制肿瘤细胞的核心岩藻糖基化水平, 用 $50 \mu\text{mol/L}$ 2FF 处理 HepG2 或 CT26 细胞 72 h 后, 提取细胞总蛋白质, 利用米曲霉凝集素 (*Aspergillus oryzae* lectin, AOL) 进行 Lectin blot 实验, 其中 AOL 是一种特殊的凝集素, 能特异性识别并结合核心岩藻糖。结果表明, $50 \mu\text{mol/L}$ 2FF 可显著降低 CT26 及 HepG2 细胞核心岩藻糖基化水平 (图 1a, b)。

DOX 为蒽环类抗癌药物, 能破坏肿瘤细胞的 DNA 结构, 而 HepG2 细胞的 *P53* 基因为野生型, 因此 DOX 作用于 HepG2 细胞可引起 *P53* 的表达上调。据文献报道, *p53* 可作为 *FUT8* 基因的特异性转录因子^[10], 因此 DOX 可能促进 HepG2 细胞 *FUT8* 的表达。经 200、400、800 $\mu\text{g/L}$ DOX 处理 48 h 后, HepG2 细胞核心岩藻糖基化水平升高, 其中 200 $\mu\text{g/L}$ DOX 增强 HepG2 的核心岩藻糖基化水平最强, 而 $50 \mu\text{mol/L}$ 2FF 与上述不同浓度 DOX 共同作用时, HepG2 细胞核心岩藻糖基化水平显著降低 (图 1b)。

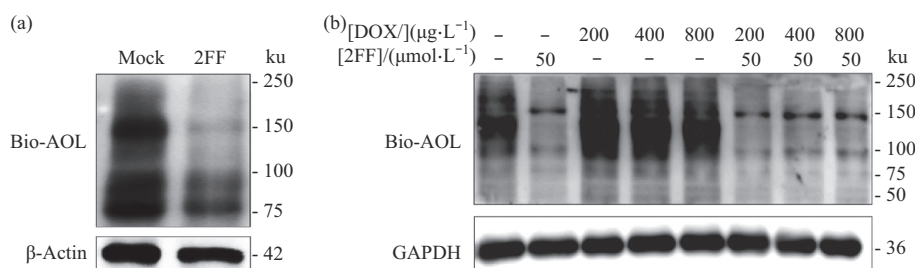


Fig. 1 The effect of 2FF and DOX on the core fucosylation of tumor cells

2FF significantly decreases the fucosylation level of CT26 (a) and HepG2 cells (b), while DOX can enhance the fucosylation level of HepG2 cells (b).

2.2 2FF可增强HepG2及CT26细胞对DOX的敏感性

化疗药物可通过多种机制杀伤肿瘤细胞, 但由于化疗药物多难以靶向肿瘤细胞, 在杀伤肿瘤细胞时也对体内正常细胞造成损伤, 并带来严重的不良反应, 因此在临床应用中需要严格控制化疗药物的使用剂量^[11]。而 *FUT8* 介导的核心岩藻糖基化及 *FUT* 家族的其他成员介导的非核心岩藻糖基化在肿瘤耐药的产生中有重要作用。因此, 本文探究通

过 2FF 抑制肿瘤细胞岩藻糖基化后是否能够增强 HepG2 或 CT26 细胞对 DOX 的敏感性。

用 $50 \mu\text{mol/L}$ 2FF 处理 HepG2 或 CT26 细胞 72 h 后, 移除含 2FF 的培养基, 更换为含不同浓度 DOX 的培养基, 检测 24 h 后细胞活性的变化。研究发现, 经 2FF 预处理后, DOX 对 HepG2 或 CT26 细胞活性的抑制作用显著增强, 其对 HepG2 细胞的 IC_{50} 从 $897.2 \mu\text{g/L}$ 降低至 $377.8 \mu\text{g/L}$, 其对 CT26 细胞的 IC_{50} 由 $726.8 \mu\text{g/L}$ 降至 $403.3 \mu\text{g/L}$ (图 2)。

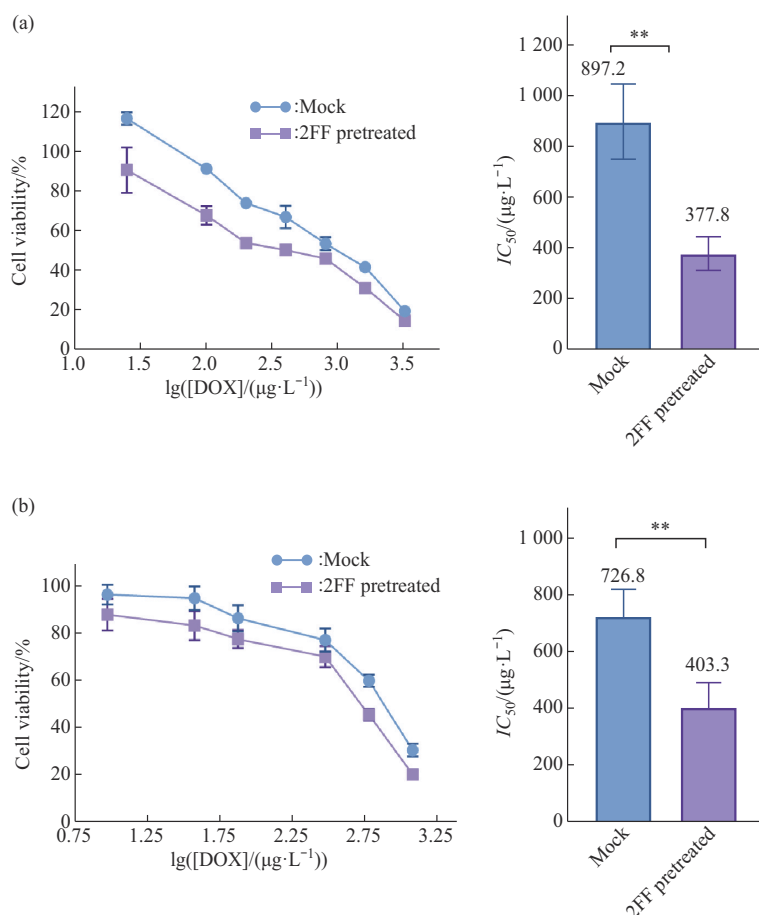


Fig. 2 2FF enhances the sensitivity of HepG2 and CT26 cells to DOX

(a) HepG2; (b) CT26 cells. The data are representative of five independent experiments, ** $P < 0.01$.

2.3 2FF联合DOX可显著抑制HepG2细胞的侵袭能力

通过Transwell细胞侵袭实验表明, 相较于未经药物处理的Mock组, 50 $\mu mol/L$ 2FF使72 h后发

生侵袭的HepG2细胞数量显著降低。此外, 200 $\mu g/L$ DOX和50 $\mu mol/L$ 2FF联合进一步使发生侵袭的HepG2细胞数量降低(图3)。

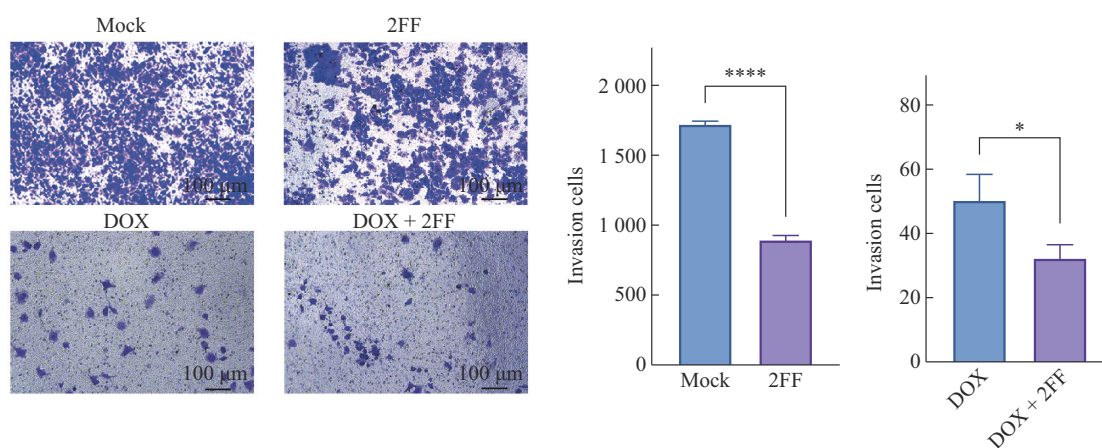


Fig. 3 2FF in combination with DOX can significantly inhibit the invasive ability of HepG2 cells

* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

2.4 2FF可增强DOX对BALB/c小鼠CT26皮下荷瘤模型的疗效

由前所述, 2FF在体外可增强DOX的抗癌作用。因此构建BALB/c小鼠CT26皮下荷瘤模型, 以探究在体内水平, 2FF能否增强DOX的抗癌作用。研究发现, 2FF及DOX均抑制了肿瘤在小鼠

体内的生长, 且两者联合的抑制效果更加显著, 但2FF与DOX联合治疗使小鼠体重明显下降(图4), 这可能与2FF增强了DOX对体内正常细胞的毒性作用有关, 因此为降低二者联合所引起的毒副作用, 应当采取相应方法以增强DOX对肿瘤的靶向性。

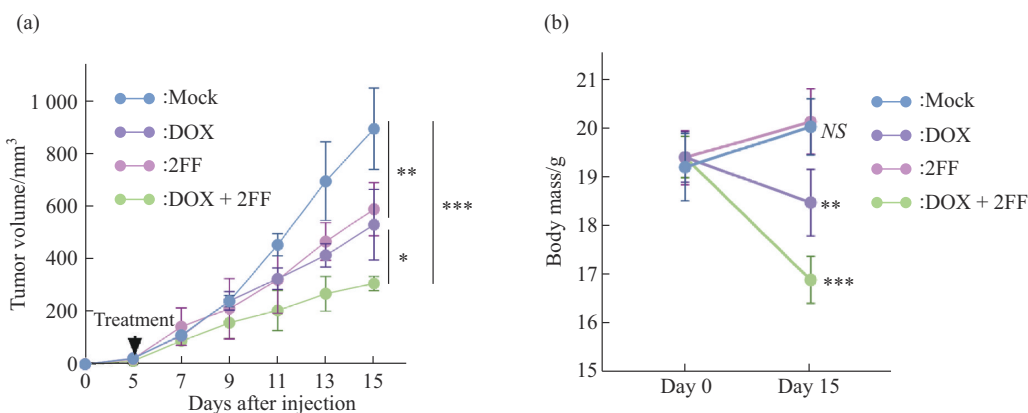


Fig. 4 2FF can enhance the anti-tumor efficacy of COX in BALB/c mice bearing CT26 tumor cells

(a) Tumor volume; (b) Mouse body mass. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, NS, non-significant.

2.5 2FF可削弱DOX诱导的HepG2细胞PD-L1表达上调

由于核心岩藻糖基化在促进肿瘤细胞免疫逃逸中也发挥重要作用。肿瘤细胞表面的程序性死亡受体配体1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 是与T细胞程序性死亡受体1 (programmed death-1, PD-1) 结合的免疫检查点或免疫抑制分子, PD-L1/PD-1轴在抑制T细胞杀伤活性中发挥重要作用。

因此, 本研究通过流式细胞术检测HepG2细胞PD-L1蛋白表达。结果表明, 经200 $\mu\text{g/L}$ DOX处理24 h后, HepG2细胞膜表面PD-L1显著升高, 而经50 $\mu\text{mol/L}$ 2FF预处理72 h后再用200 $\mu\text{g/L}$ DOX处理24 h, DOX引起的HepG2细胞膜表面PD-L1表达增加的效应被削弱(图5)。这些结果表明, 2FF可以抑制DOX诱导的HepG2细胞PD-L1表达上调, 从而可能在体内发挥活化T细胞的作用。

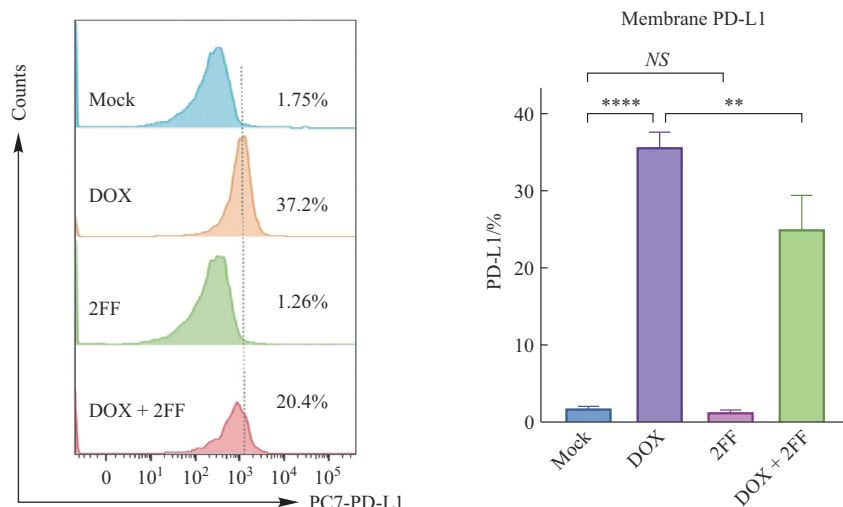


Fig. 5 2FF attenuates the PD-L1 expression induced by DOX in HepG2 cells

** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, NS, non-significant.

3 讨 论

本研究探究了FUT8抑制剂2FF与化疗药物DOX在体内或体外是否存在联合效应。结果显示, 在细胞水平, 2FF能有效抑制肿瘤细胞膜N-糖链的核心岩藻糖基化水平, 而DOX可增强HepG2细胞核心岩藻糖基化水平。此外, 2FF能够显著增强HepG2及CT26细胞对DOX的敏感性, 并且2FF与DOX联合能够显著抑制HepG2细胞侵袭。在BALB/c小鼠CT26皮下荷瘤模型中, 2FF及DOX均抑制了肿瘤在小鼠体内的生长, 且2FF与DOX联合的抑制效果更加显著。但与此同时, 2FF与DOX联合治疗使小鼠体重明显下降, 这可能与2FF增强了DOX对体内正常细胞的毒性作用有关, 因此为降低二者联合所引起的毒副作用, 应当采取相应方法增强DOX对肿瘤的靶向性。此外, DOX可引起HepG2细胞PD-L1表达上调, 而2FF可削弱这一作用。这些结果表明, 2FF与DOX联合不仅能够显著抑制HepG2及CT26细胞侵袭和肿瘤细胞的生长, 还可能发挥活化T细胞的杀伤作用。

化疗是目前治疗恶性肿瘤的重要手段, 但化疗过程中产生的多药耐药及化疗药物带来的全身副作用严重限制了其疗效及应用。因此, 开发新的化疗策略以逆转化疗过程中肿瘤耐药性的产生并降低化疗所带来的严重不良反应具有重要的临床应用价值。许多研究尝试将化疗与其他药物或疗法联合治疗恶性肿瘤。由前所述, FUT8的过度激活与多药耐药产生的存在紧密联系。因此, 化疗与FUT8抑制剂联合可能能够逆转多药耐药的产生。

此外, 化疗与FUT8抑制剂的联合治疗是一种潜在的化疗联合免疫治疗策略。尽管长期以来人们认为化疗仅具有免疫抑制作用, 但新的研究表明, 化疗也能促进免疫功能^[12]。化疗主要通过阻滞细胞周期、抑制DNA复制、干扰细胞代谢、抑制微管组装等途径抑制肿瘤生长。此外, 细胞毒性化疗药物可以诱导免疫原性细胞死亡, 激发抗肿瘤免疫反应^[13-14]。免疫原性细胞死亡导致损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)的上调, 如I型干扰素(interferon-I, IFN-I)的分泌、钙网蛋白的暴露、ATP的泄漏和高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)的释放。这些释放的DAMPs增强了树突状细胞(dendritic cell, DC)的抗原捕获及呈递, 从而增强特异性免疫应答。此外, DOX等化疗药物可直接

杀死免疫抑制细胞, 增强效应细胞功能, 尤其是低于最大耐受剂量的化疗剂量^[14]。例如, 低剂量环磷酰胺可清除循环和肿瘤浸润中的调节性T细胞(Tregs)^[15], DOX、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和多西他赛等化疗药物在小鼠模型中减少了髓源性抑制细胞^[16]。PD-1是一种重要的免疫抑制分子, 通过抑制T细胞炎症活动来调节免疫系统并促进自身耐受。PD-1包含两个主要的N-糖基化位点, 它们高度核心岩藻糖基化, 这些翻译后修饰是PD-1表达的重要调节因子, 抑制FUT8可降低T细胞表面PD-1的表达, 并增强T细胞活化^[17]。此外, 肿瘤组织中耗竭的T细胞也含有高度核心岩藻糖基化的结构^[3]。这些发现表明, 靶向核心岩藻糖基化可以减弱PD-1与PD-L1相互作用, 抑制肿瘤的免疫逃逸, 增强T细胞活化。此外, PD-L1也被高度糖基化修饰, 并且PD-L1的功能与稳定性与其糖基化修饰密切相关。PD-L1的N192、N200及N219位点的糖基化修饰可抑制PD-L1与糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3, GSK3 β)相互作用, 而GSK3 β 可将PD-L1磷酸化并促进其通过蛋白酶体途径降解^[18]; PD-L1的N-糖基化修饰可阻碍抗PD-L1抗体对其的识别^[19]; PD-L1的S195位点的磷酸化可导致PD-L1糖基化修饰异常, 并导致其通过内质网相关蛋白降解(ER-associated protein degradation, ERAD)途径降解^[20]。但目前尚未报道过核心岩藻糖基化修饰对PD-L1功能及稳定性的影响。本研究发现, 2FF可削弱DOX诱导的HepG2细胞PD-L1表达上调, 2FF可能通过抑制PD-L1的核心岩藻糖基化修饰而在蛋白质水平降低PD-L1, 也可能通过其他途径调节PD-L1基因的表达水平, 其分子机制还需进一步研究, 如可能与EGFR及TGF- β 信号通路相关。EGFR信号通路可抑制GSK3 β 的活化, 从而抑制GSK3 β 导致的PD-L1降解等^[18], 因此EGFR信号通路的激活可增强PD-L1的稳定性。在胰腺导管腺癌中, non-SMAD-TGF- β 信号通路可增加肿瘤细胞PD-L1的表达^[21]。抑制FUT8能有效抑制EGFR及TGF- β 信号通路^[7, 22], 进而抑制肿瘤细胞PD-L1的表达。因此, 当化疗与FUT8抑制剂联合治疗肿瘤时, FUT8抑制剂在增强肿瘤细胞对DOX等化疗药物的敏感性的同时, 也可能通过抑制PD-L1/PD-1轴增强体内免疫系统对肿瘤的清除, 从而在体内水平表现出更强的联合效应。

综上, FUT8抑制剂与化疗两者间存在可能的

协同机制以增强对癌细胞杀伤能力。本研究发现, FUT8 抑制剂在降低 DOX 对肿瘤细胞膜 N-糖链的岩藻糖修饰水平的增加, 同时也增强肿瘤细胞对 DOX 等化疗药物的敏感性, 可能会抑制 FUT8 从而逆转化疗过程中多药耐药的产生, 并且与化疗药物协同作用增强体内免疫反应杀伤肿瘤细胞。但需采取相应方法增强 DOX 对肿瘤的靶向性以避免二者联合所带来的毒副作用。

4 结 论

本研究探究了 FUT8 抑制剂 2FF 与化疗药物 DOX 在体内或体外是否存在联合效应。结果显示, 在细胞水平, 2FF 能有效抑制肿瘤细胞膜 N-糖链的核心岩藻糖基化水平, 而 DOX 可增强 HepG2 细胞核心岩藻糖基化水平。此外, 2FF 能够显著增强 HepG2 及 CT26 细胞对 DOX 的敏感性, 并且 2FF 与 DOX 联合能够显著抑制 HepG2 细胞侵袭。在 BALB/c 小鼠 CT26 皮下荷瘤模型中, 2FF 及 DOX 均抑制了肿瘤在小鼠体内的生长, 且 2FF 与 DOX 联合的抑制效果更加显著。但与此同时, 2FF 与 DOX 联合治疗使小鼠体重明显下降, 这可能与 2FF 增强了 DOX 对体内正常细胞的毒性作用有关, 因此为降低二者联合所引起的毒副作用, 应当采取相应方法增强 DOX 对肿瘤的靶向性。此外, DOX 可引起 HepG2 细胞 PD-L1 表达上调, 而 2FF 可削弱这一作用, 说明其还可能通过抑制 PD-L1/PD-1 轴增强 T 细胞的杀伤功能。这些结果表明, 2FF 与 DOX 联合不仅能够显著抑制 HepG2 及 CT26 细胞侵袭和肿瘤细胞的生长, 还可能发挥活化 T 细胞的杀伤作用。

参 考 文 献

- [1] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析. 中华肿瘤杂志, 2024, **46**(3): 221-231
Zheng R S, Chen R, Han B F, *et al.* Chin J Oncol, 2024, **46**(3): 221-231
- [2] Hellmann M D, Li B T, Chaft J E, *et al.* Chemotherapy remains an essential element of personalized care for persons with lung cancers. Ann Oncol, 2016, **27**(10): 1829-1835
- [3] Rodrigues J G, Duarte H O, Reis C A, *et al.* Aberrant protein glycosylation in cancer: implications in targeted therapy. Biochem Soc Trans, 2021, **49**(2): 843-854
- [4] Pijnenborg J F A, Visser E A, Noga M, *et al.* Cellular fucosylation inhibitors based on fluorinated fucose-1-phosphates. Chemistry, 2021, **27**(12): 4022-4027
- [5] Li S, Liu X Y, Pan Q, *et al.* Hepatitis C virus-induced FUT8 causes 5-FU drug resistance in human hepatoma Huh7.5.1 cells. Viruses, 2019, **11**(4): 378
- [6] Cheng L, Luo S, Jin C, *et al.* FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. Cell Death Dis, 2013, **4**(11): e923
- [7] Wang X, Gu J, Ihara H, *et al.* Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. J Biol Chem, 2006, **281**(5): 2572-2577
- [8] Jiang L, Wang P, Sun Y J, *et al.* Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway. J Exp Clin Cancer Res, 2019, **38**(1): 265
- [9] Bastian K, Scott E, Elliott D J, *et al.* FUT8 Alpha- (1, 6) - fucosyltransferase in cancer. Int J Mol Sci, 2021, **22**(1): 455
- [10] Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, *et al.* Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells. PLoS One, 2016, **11**(12): e0168355
- [11] Weingart S N, Zhang L, Sweeney M, *et al.* Chemotherapy medication errors. Lancet Oncol, 2018, **19**(4): e191-e199
- [12] Mathew M, Enzler T, Shu C A, *et al.* Combining chemotherapy with PD-1 blockade in NSCLC. Pharmacol Ther, 2018, **186**: 130-137
- [13] Zhu H, Shan Y, Ge K, *et al.* Oxaliplatin induces immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma cells and synergizes with immune checkpoint blockade therapy. Cell Oncol (Dordr), 2020, **43**(6): 1203-1214
- [14] Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, *et al.* Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. Nat Rev Cancer, 2017, **17**(5): 286-301
- [15] Barbon C M, Yang M, Wands G D, *et al.* Consecutive low doses of cyclophosphamide preferentially target Tregs and potentiate T cell responses induced by DNA PLG microparticle immunization. Cell Immunol, 2010, **262**(2): 150-161
- [16] Yi M, Zheng X, Niu M, *et al.* Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. Mol Cancer, 2022, **21**(1): 28
- [17] Dai X, Gao Y, Wei W. Post-translational regulations of PD-L1 and PD-1: mechanisms and opportunities for combined immunotherapy. Semin Cancer Biol, 2022, **85**: 246-252
- [18] Li C W, Lim S O, Xia W, *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. Nat Commun, 2016, **7**: 12632
- [19] Lee H H, Wang Y N, Xia W, *et al.* Removal of N-linked glycosylation enhances PD-L1 detection and predicts anti-PD-1/PD-L1 therapeutic efficacy. Cancer Cell, 2019, **36**(2): 168-178.e4
- [20] Cha J H, Yang W H, Xia W, *et al.* Metformin promotes antitumor immunity via endoplasmic-reticulum-associated degradation of PD-L1. Mol Cell, 2018, **71**(4): 606-620.e7
- [21] Hussain S M, Kansal R G, Alvarez M A, *et al.* Role of TGF- β in pancreatic ductal adenocarcinoma progression and PD-L1 expression. Cell Oncol (Dordr), 2021, **44**(3): 673-687
- [22] Tu C F, Wu M Y, Lin Y C, *et al.* FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. Breast Cancer Res, 2017, **19**(1): 111

Synergistic Effect and Mechanism of FUT8 Inhibitor 2FF With DOX for Cancer Treatment*

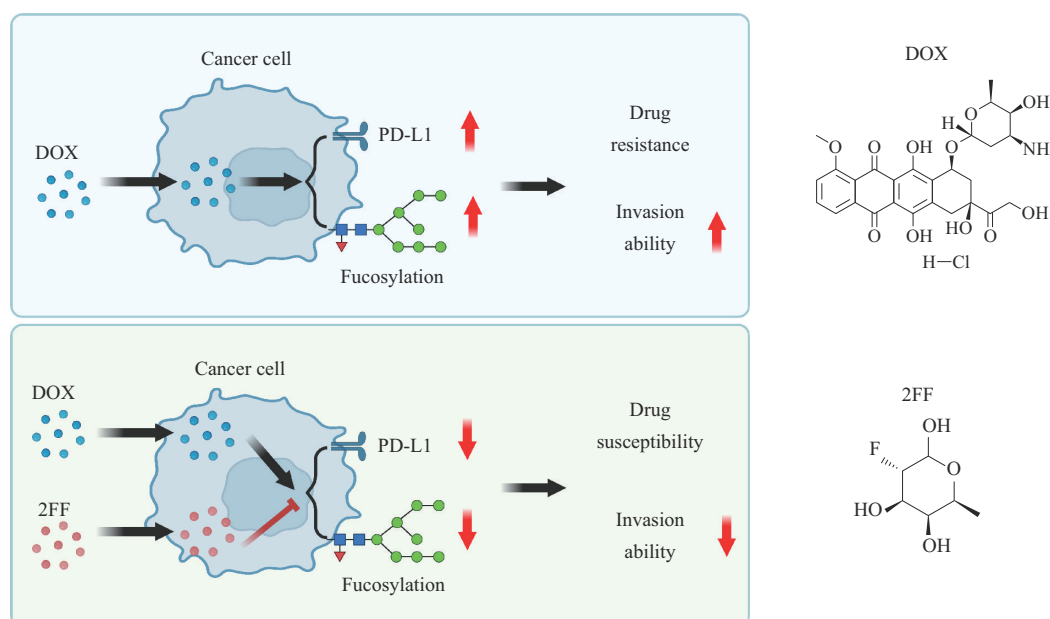
XIE Zhi-Dong^{1,2)}, ZHANG Xiao-Lian^{1,2)**}

(¹⁾Hubei Key Laboratory of Allergy and Immune-related Diseases, Department of Immunology, Wuhan University Taikang Medical School

(School of Basic Medical Sciences), Wuhan 430071, China;

²⁾Department of Allergy, Zhongnan Hospital Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Chemotherapy is one of the important therapeutic approaches for cancer treatment. However, the emergence of multidrug resistance and side effects significantly limit its application. To address these challenges, chemotherapy is often combined with other drugs or therapies. Among the 13 human fucosyltransferases (FUTs) identified, FUT8 (alpha-(1,6)-fucosyltransferase) is the only enzyme responsible for core fucosylation. Core fucosylation plays an important role in cancer occurrence, metastasis and chemotherapy resistance, making the suppression of FUT8 a potential strategy for reversing multidrug resistance. This study aims to evaluate the feasibility of combining the small molecule FUT8 inhibitor 2FF (2-deoxy-2-fluoro-L-fucose) with the clinical chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX) for treating malignant tumors. **Methods** The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and mouse colon cancer cell line CT26 cells were treated with 2FF,

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82230078, 22077097) and National Key R&D Program of China (2022YFA1303500).

** Corresponding author.

Tel: 86-27-68781587, E-mail: zhangxiaolian@whu.edu.cn

Received: June 30, 2024 Accepted: September 3, 2024

DOX or their combination and core fucosylation levels were assessed using Lectin blot. HepG2 and CT26 cells were exposed to 50 $\mu\text{mol/L}$ 2FF for 72 h, followed by treatment with a gradient concentration of DOX for 24 h. Cell viability and IC_{50} values were determined *via* the CCK-8 assay. Transwell invasion assays were conducted to evaluate the combined effect of 2FF and DOX on the invasion ability of HepG2 cells. Flow cytometry was performed to analyze the impact of 2FF, DOX and their combination on membrane PD-L1 expression of HepG2 cells. To assess the *in vivo* effect, 6- to 8-week-old female BALB/c mice (20–25 g), were subcutaneously injected with 1×10^6 CT26 cells into the right axilla (four groups, six mice in each group). After the average tumor volume reached 100 mm^3 , mice were treated with DOX, 2FF, their combination, or saline (mock group) every other day. DOX was administrated intraperitoneally (2 mg/kg), 2FF intravenously (5 mg/kg), and the combination group, received the both treatment. Tumor size was measured every other day using a vernier caliper. **Results** This study demonstrated that DOX upregulates the core fucosylation levels in HepG2 and CT26 cells, while 2FF effectively inhibits this DOX-induced effect. Furthermore, 2FF enhanced the sensitivity of HepG2 and CT26 cells to DOX. The combination of 2FF and DOX synergistically inhibited the invasion ability of HepG2 cells, and enhanced the anti-tumor efficacy of CT26 subcutaneous tumor model in BALB/c mice. However the combination treatment led to weight loss in mice. In addition, DOX increased the cell surface PD-L1 expression in HepG2 cells, which was effectively suppressed by 2FF. **Conclusion** The FUT8 inhibitor 2FF effectively suppresses DOX-induced upregulation of core fucosylation and PD-L1 levels in tumor cells, and 2FF synergistically enhances the anticancer efficacy of DOX.

Key words core fucosylation, FUT8 inhibitor, chemotherapy, doxorubicin, multidrug resistance

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0280

CSTR: 32369.14.pibb.20240280