



· 论 著 ·

硝呋齐特增加乳腺癌细胞对奥拉帕利敏感性的初步研究

侯 净, 程纪淦, 王 华, 魏 娜, 倪 青

贵州省人民医院乳腺外科, 贵州 贵阳 550002

[摘要] **背景与目的:** 硝呋齐特 (nifuroxazide) 是一种口服硝基呋喃类抗生素, 常用于治疗结肠炎和腹泻, 硝呋齐特可抑制STAT3磷酸化而发挥抗肿瘤作用。通过药物筛选发现硝呋齐特能影响细胞DNA同源重组 (homologous recombination, HR) 修复, 进一步对硝呋齐特与聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 抑制剂奥拉帕利 (olaparib) 联合应用的可能性进行初步探索。**方法:** 采用See-Saw系统筛选对细胞DNA HR修复影响明显的药物, 然后用HR/非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 荧光报告系统进一步验证筛选药物对HR的影响。采用免疫荧光染色技术检测药物处理后DNA损伤标记 γ H2AX焦点形成情况。最后用MTS及克隆形成实验检测药物处理后对细胞增殖的影响。**结果:** 通过筛选240个小分子抑制剂发现, STAT3抑制剂硝呋齐特可显著降低细胞HR修复水平。硝呋齐特与奥拉帕利联用可增加乳腺癌细胞DNA损伤程度并降低DNA损伤修复能力。此外, 硝呋齐特与奥拉帕利联用可进一步提高奥拉帕利对癌细胞的杀伤作用。**结论:** 硝呋齐特能增加乳腺癌细胞对奥拉帕利的敏感性, 可作为奥拉帕利潜在增敏药物, 值得进一步研究。

[关键词] 乳腺癌; 硝呋齐特; 奥拉帕尼; 同源重组修复

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.12.004

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)12-1168-06

Preliminary study on synergistic effect of nifuroxazide and olaparib on growth inhibition in breast cancer cells HOU Jing, CHENG Jigan, WANG Hua, WEI Na, NI Qing (Department of Breast Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China)

Correspondence to NI Qing E-mail: zhurenpaper@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Nifuroxazide is an oral nitrofurantoin antibiotic commonly used to treat colitis and diarrhea. Studies have also shown anti-tumor effects of nifuroxazide by inhibiting STAT3 phosphorylation. In the study, through drug screening, nifuroxazide was found to affect homologous recombination (HR) repair of cells. Therefore, the possibility of nifuroxazide combined with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor olaparib controlling breast cell growth was further explored. **Methods:** The SEE-SAW system was used to screen the drugs that had obvious effect on HR repair. Then, the effect of the drug screened on HR was further verified by HR/non-homologous end joining (NHEJ) fluorescence reporting system. DNA damage marker γ H2AX foci after drug treatment was detected by immunofluorescence staining. Finally, MTS and clone formation assay were used to detect the effect of drug on cell proliferation. **Results:** Among 240 small molecule inhibitors screened, a STAT3 inhibitor, nifuroxazide, was found to significantly reduce the level of HR repair. Meanwhile, the combination of nifuroxazide and olaparib aggravated DNA damage and attenuated the ability of DNA damage repair in breast cancer cells. In addition, the combination of nifuroxazide and olaparib further enhanced the killing effect of olaparib on cancer cells. **Conclusion:** Nifuroxazide can increase the sensitivity of olaparib to breast cancer cells, and can be used as a potential sensitization drug for further study.

[Key words] Breast cancer; Nifuroxazide; Olaparib; Homologous recombination repair

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 [2017] 1114, 黔科合基础 [2017] 1104)。

通信作者: 倪 青 E-mail: zhurenpaper@163.com;

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤，世界卫生组织国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer, IARC）发布的最新数据显示，2020年全球乳腺癌新增病例数达226万^[1]。近年来，在根据乳腺癌分子分型进行分类治疗的原则指导下，乳腺癌患者的预后得到显著改善，但某些亚型如三阴性乳腺癌因其自身恶性程度较高且缺乏靶向药物，目前治疗仍较棘手。因三阴性乳腺癌伴有较高比例的*BRCA*基因突变且存在DNA修复缺陷，因此利用联合致死策略治疗三阴性乳腺癌一直是该领域的研究热点^[2]。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 抑制剂是第一种成功利用联合致死策略获得批准在临床使用的抗癌药物。目前，PARP抑制剂被美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准用于卵巢癌、原发性腹膜癌的治疗^[3]。随着乳腺癌两个Ⅲ期临床试验结果的公布，PARP抑制剂奥拉帕利（olaparib）已经被美国FDA批准用于治疗胚系*BRCA*突变的晚期乳腺癌^[4]。另一个PARP抑制剂他拉唑帕尼（talazoparib）也被美国FDA授予优先审评资格^[5]。目前有关乳腺癌还有大量的临床试验正在进行中，新的使用方法及新的适应证不断出现，进一步为乳腺癌的治疗增加选择性。然而PARP抑制剂的应用仍存在两个问题：一是目前仅用于伴*BRCA*突变的患者，能否拓展到其他类型的乳腺癌以使更多的患者获益？二是耐药问题普遍存在。要解决这两个问题，一方面需要对PARP抑制剂的作用机制进行深入研究，另一方面就是筛选能增加PARP抑制剂敏感性的药物。本研究通过筛选能够抑制DNA同源重组（homologous recombination, HR）修复的药物找到硝呋齐特（nifuroxazide），并发现其与PARP抑制剂奥拉帕利有联合增敏效应，报道如下。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231，人骨肉瘤细胞系U2OS及HEK-293T培养在DMEM培养基中，向培养基中添加10%的胎牛血清、

1 mmol/L非必需氨基酸、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL的青霉素、100 mg/mL的链霉素，在37 °C、CO₂体积分数为5%的饱和湿度环境中培养。

1.2 See-Saw系统及药物筛选

See-Saw系统的构建：在绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）基因的3'端克隆引入两个方向相反的I-SceI靶点。I-SceI表达能诱导DNA双链断裂（double-strand break, DSB）。当DNA损伤通过非同源末端连接（non-homologous end joining, NHEJ）修复时，细胞表达GFP，若损伤通过HR修复时，细胞则表达红色荧光蛋白（red fluorescent protein, RFP）。本研究使用带有See-Saw 2.0报告系统的MCF-7细胞来分析DSB修复的效率。将See-Saw 2.0质粒转染到MCF-7细胞中，用G418筛选2周稳定，然后用表达I-SceI的慢病毒感染细胞，6 h后接种细胞于96孔板中。24 h后，用指定药物处理细胞。36 h后，收集细胞，磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline, PBS）悬浮后用4%多聚甲醛溶液室温固定20 min，然后进行流式细胞术（flow cytometry, FCM）检测。

1.3 HR与NHEJ报告系统

将HEK-293T细胞铺于24孔板中过夜，将HR报告基因（DR-GFP）或NHEJ报告基因（EJ5-GFP）以及pCBA-I-SceI和mCherry按2:2:1转染细胞。6 h后用药物处理，36 h后收集细胞，然后进行FCM检测分析。

1.4 克隆形成实验

将300~500个MCF-7、U2OS细胞接种到6孔板中。24 h后用药物处理，然后培养10~14 d。用4%多聚甲醛溶液室温固定20 min，用0.1%结晶紫室温染色20 min。计数≥50个细胞的克隆数。

1.5 MTS检测

将2 000~4 000个MCF-7、MDA-MB-231细胞接种到96孔板中。贴壁后用不同浓度药物处理，然后培养72 h。加入MTS，温育2~4 h后检测490 nm处的吸光度（D）值。

1.6 免疫荧光染色

免疫荧光染色用于检测药物处理后γH2AX

焦点的形成情况以了解DNA损伤的程度及修复能力。简要步骤如下: 在6孔板中爬片过夜, 然后用药物处理1、8 h, 用4%多聚甲醛溶液固定, 室温温育10~20 min; 用PBS洗涤3次, 每次5 min, 0.2% Triton透化处理5~10 min; 用含3%牛血清白蛋白的PBS室温封闭1 h; PBS洗涤3次, 每次5 min; 一抗4 ℃温育过夜, 然后用PBS洗涤3次, 每次5 min; 二抗室温温育1 h, PBS洗涤3次, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)核染, 封片, 在共聚焦显微镜下观察, 计数。

1.7 统计学处理

应用Graphpad Prism 8软件对数据进行分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用双侧 t 检验比较实验组之间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 硝呋齐特抑制细胞HR修复

HR修复在DNA双链断裂修复中发挥重要作用, 从而维持基因组的稳定性。然而, 癌细胞可

能通过不同机制上调HR能力并引起治疗耐受。因此, 诱导HR修复缺陷(HR deficiency, HRD)是一种可行的克服细胞对DNA损伤药物耐药的策略。为此, 本研究利用See-Saw 2.0报告基因系统筛选潜在的能抑制HR的药物。See-Saw 2.0系统是一种研究DNA双链断裂修复途径的新工具, 其中RFP阳性细胞和GFP阳性细胞分别代表HR或NHEJ对I-SceI诱导的双链损伤修复。本研究使用TargetMOL(目录编号: L8200)小分子药物库(包含240种药物)处理含有See-Saw 2.0体系的MCF-7细胞。然后检测HR和NHEJ效率。根据标准化RFP与GFP比值, 药物被分为两类。RFP与GFP比例小于1表示目标药物能抑制HR, RFP与GFP比值大于等于1的药物表示能促进HR(图1A)。在抑制HR的候选药物中, 我们发现硝呋齐特抑制作用显著, 因此选择该药物用于后续研究。为进一步验证硝呋齐特能抑制HR, 在HEK-293T细胞中采用DR-GFP报告基因检测方法进行验证。硝呋齐特处理细胞后显著抑制HR效率, 抑制程度与剂量相关, 而对NHEJ无明显影响(图1B)。

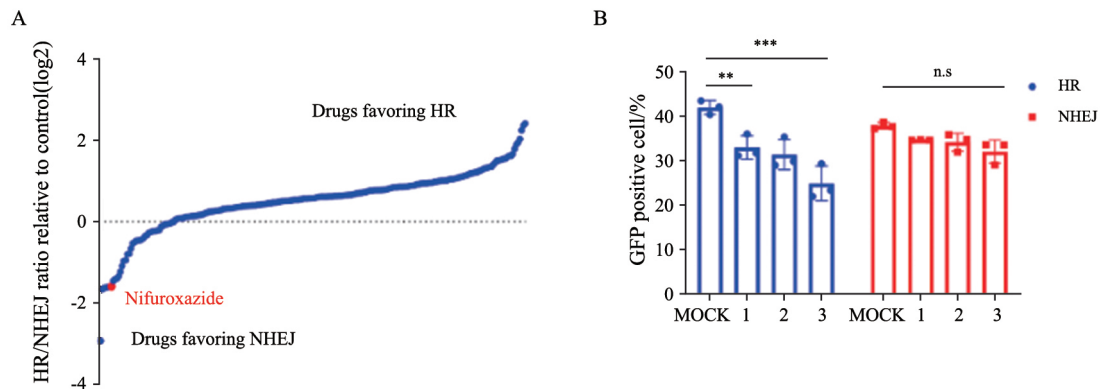


图 1 硝呋齐特抑制DNA HR修复

Fig. 1 Nifuroxazide inhibits HR repair of DNA

A: Breast cancer cell line MCF-7 was transfected with plasmids of See-Saw 2.0 system and selected with Puro, and then infected with lentivirus expressing I-SceI. The cells were collected for flow cytometry detection for homologous recombination efficiency after indicated treatments. The horizontal axis represented different drugs, and the vertical axis was the logarithm of HR/NHEJ ratio; B: HEK-293T cells were seeded on 24-well plate and incubated overnight, then HR reporter gene (DR GFP) or NHEJ reporter gene (EJ5-GFP), pCBA-I-SceI and mCherry were transfected into the cells at 2:2:1 ratio. After 6 h, the cells were treated with nifuroxazide, and then the cells were collected and analyzed by flow cytometry. MOCK: Control; Nifu: 1: Nifuroxazide 5 μmol/L; 2: Nifuroxazide 10 μmol/L; 3: Nifuroxazide 20 μmol/L; **: $P < 0.001$, compared with each other; ***: $P < 0.0001$, compared with each other

2.2 硝呋齐特增加奥拉帕利致DNA损伤程度

因为硝呋齐特能抑制HR, 我们推测其能增加PARP抑制剂所造成的DNA损伤程度。为验证这一假设, 本研究利用免疫荧光检测

硝呋齐特单用或联合PARP抑制剂奥拉帕利处理细胞后DNA损伤标志物 γ H2AX(组蛋白H2AX上的第139位丝氨酸发生磷酸化修饰)焦点形成情况, 发现单用硝呋齐特处理细胞后

无明显 γ H2AX焦点形成，提示硝呋齐特不会引起DNA双链断裂，单用奥拉帕利后有少量 γ H2AX焦点形成，8 h后基本修复。而联用后 γ H2AX焦点形成数目明显增加，且8 h后仍有较多 γ H2AX焦点（图2），表示硝呋齐特能增加奥拉帕利致DNA损伤程度并降低损伤修复能力。

2.3 硝呋齐特增加奥拉帕利治疗敏感性

基于上述结果，我们推测硝呋齐特能增加奥

拉帕利治疗敏感性，我们采用MTS方法检测奥拉帕利单用或联合硝呋齐特处理乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231后的细胞增殖情况，联用硝呋齐特可增加奥拉帕利对细胞增殖的抑制作用（图3）。此外，克隆形成实验也显示，奥拉帕利和硝呋齐特联用能显著抑制细胞的克隆形成效率（图4）。且该效应在U2OS细胞中也得到证实，表明硝呋齐特对奥拉帕利的增敏作用不限于乳腺癌细胞。

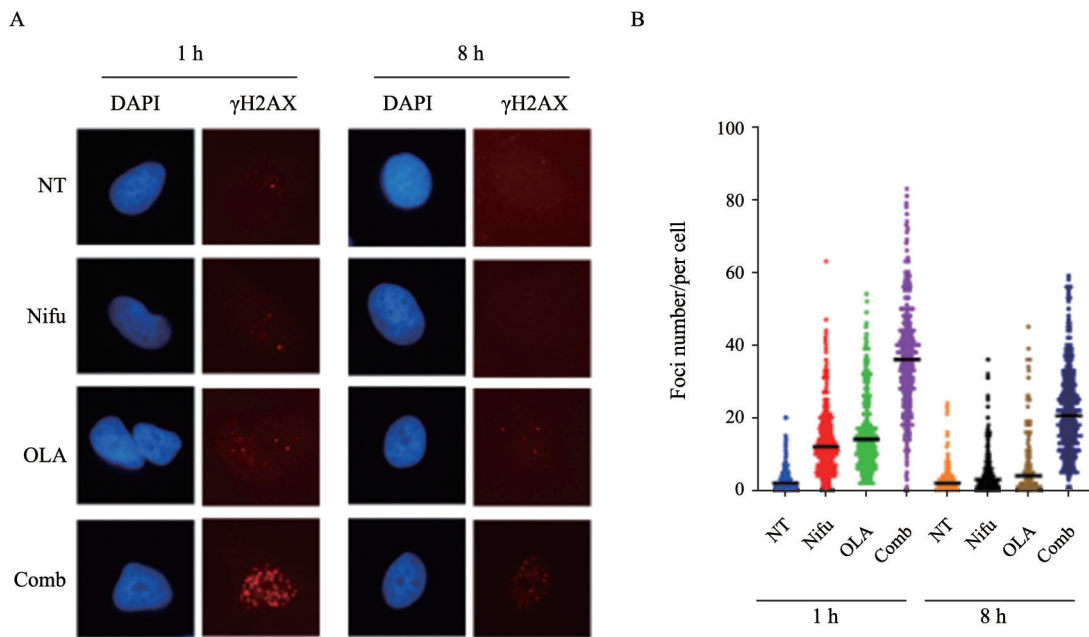


图2 硝呋齐特增加奥拉帕利致DNA损伤程度，延迟损伤修复时间

Fig. 2 Nifuroxazide increases DNA damage induced by olaparib and delays damage repair

A: MCF-7 cells were treated with nifuroxazide alone or in combination with olaparib. Immunofluorescence was used for detection of γ H2AX foci 1 and 8 h after treatment. B: The quantification of γ H2AX foci. NT: Non-treated; OLA: Olaparib; Nifu: Nifuroxazide; Comb: Combination of olaparib and nifuroxazide

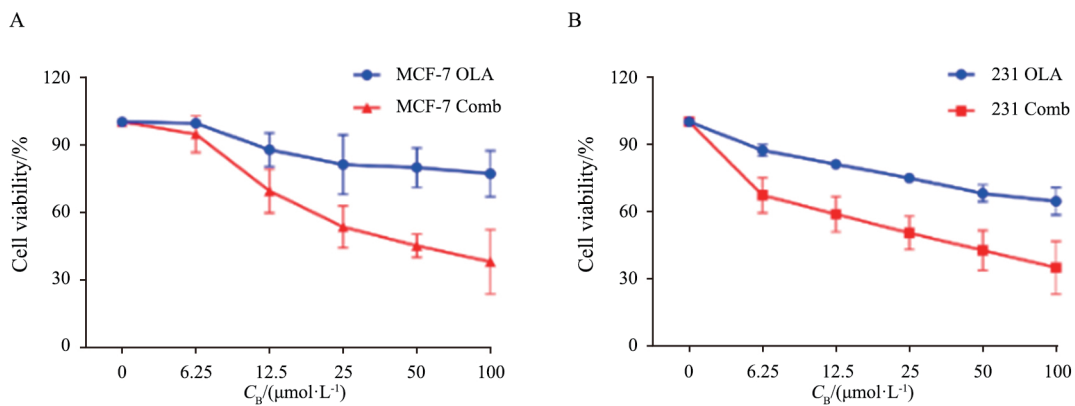


图3 硝呋齐特增加奥拉帕利对乳腺癌细胞增殖抑制作用

Fig. 3 Nifuroxazide increases the inhibitory effect of olaparib on breast cancer cells

The inhibitory effect of olaparib alone or in combination with nifuroxazide (1 $\mu\text{mol/L}$, no obvious inhibitory effect on cells) was detected by MTS. A: MCF-7 cells; B: MDA-MB-231 cells; OLA: Olaparib; Comb: Combination of olaparib and nifuroxazide

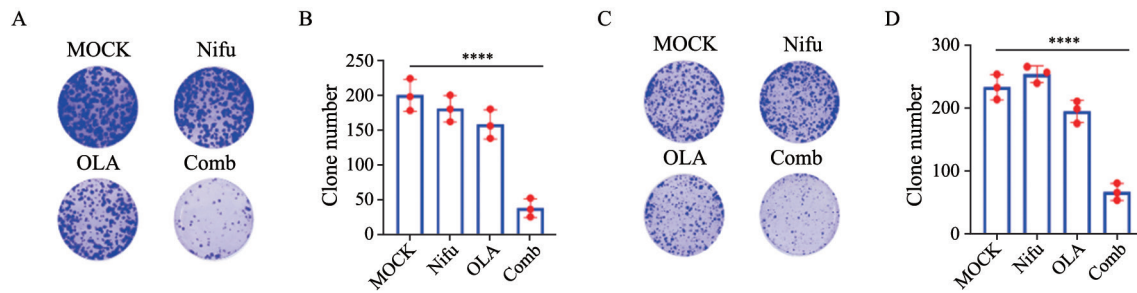


图4 硝呋齐特增加奥拉帕利克隆形成抑制作用

Fig. 4 Nifuroxazide increases the inhibitory effect of olaparib on clone formation

Cells were treated with olaparib (0.2 $\mu\text{mol/L}$) alone or in combination with nifuroxazide (0.2 $\mu\text{mol/L}$), the colony number was counted. A, B: U2OS cells; C, D: Breast cancer cell MCF-7. MOCK: Control; OLA: Olaparib; Nifu: Nifuroxazide; Comb: Combination of olaparib and nifuroxazide; ****: $P < 0.001$, compared with each other

3 讨 论

对于携带*BRC1*突变的乳腺癌患者,目前主要的治疗方式包括手术治疗和药物治疗,其中药物治疗包括铂类药物及PARP抑制剂治疗。作为一种利用合成致死效应对存在DNA HR修复缺陷的患者具有选择性毒性的靶向药物,PARP抑制剂最初被批准用于卵巢癌的治疗,但其快速发展使乳腺癌患者获益^[6]。随着PARP抑制剂奥拉帕利治疗乳腺癌的III期临床试验结果^[4]的公布,其已经被美国FDA批准用于治疗胚系*BRC1*突变的晚期乳腺癌患者;另一个PARP抑制剂talazoparib也于2018年获得美国FDA批准用于人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阴性伴有*BRC1*突变的局部晚期或转移性乳腺癌^[5]的治疗。

从药理作用上讲,PARP抑制剂主要针对的是存在DNA HR修复缺陷的肿瘤,研究^[7]发现,除*BRC1*突变造成的HR修复缺陷外,其他参与HR修复的基因如*ATM*、*ATR*、*PALB2*和*FANC*等亦可发生变异而降低HR修复能力,这一现象被称为“*BRCAness*”。存在*BRCAness*的肿瘤对PARP抑制剂也较敏感,这在理论上拓宽了PARP抑制剂的应用范围。因此,这为非*BRC1*突变的乳腺癌患者应用PARP抑制剂提供了理论依据。一种行之有效的方式为筛选能降低HR修复效率的已知药物,而后与PARP抑制剂联合使用^[8]。以此为切入点,本研究使用可诱导双链断裂继而检测DNA修复能力的See-Saw 2.0系统筛选了

240种小分子抑制剂,发现约20个药物能在一定程度上抑制乳腺癌细胞HR修复,其中效果比较显著的药物包括硝呋齐特。因硝呋齐特已被临床用于治疗结肠炎和腹泻,且有研究显示,硝呋齐特是一种STAT3抑制剂^[9-10]。此外,有研究报道^[11-12]靶向STAT3可增加奥拉帕利敏感性,因此本研究选择硝呋齐特进一步研究,结果发现,硝呋齐特能增加奥拉帕利所致的DNA损伤程度并降低DNA的修复能力,细胞增殖及克隆形成实验也显示,硝呋齐特对奥拉帕利有增敏效应。虽然本研究仅为表型上的初步探索,但仍有一定临床意义:首先,硝呋齐特确实能增加奥拉帕利的敏感性;其次,选用的MCF-7细胞及U2OS细胞为*BRC1*野生型,说明硝呋齐特的作用不受*BRC1*突变状态的影响;此外,因硝呋齐特已用于临床,这种老药新用的策略为药物开发节省了研究成本。综上,硝呋齐特作为一种奥拉帕利的潜在增敏剂,值得进一步研究探索。

[参 考 文 献]

- [1] Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. (2020-12-15) [2021-06-08]. <https://www.iarc.fr/fr/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>.
- [2] CHEN H, WU J, ZHANG Z, et al. Association between *BRC1* status and triple-negative breast cancer: a meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 909.
- [3] SACHDEV E, TABATABAI R, ROY V, et al. PARP inhibition in cancer: an update on clinical development [J]. *Target Oncol*, 2019, 14(6): 657-679.

- [4] ROBSON M, IM S A, SENKUS E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline *BRCA* mutation [J] . *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 523–533.
- [5] LITTON J K, RUGO H S, Ettl J, et al. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline *BRCA* mutation [J] . *N Engl J Med*, 2018, 379(8): 753–763.
- [6] LORD C J, ASHWORTH A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic [J] . *Science*, 2017, 355(6330): 1152–1158.
- [7] BYRUM A K, VINDIGNI A, MOSAMMAPARAST N. Defining and modulating ‘*BRCAness*’ [J] . *Trends Cell Biol*, 2019, 29(9): 740–751.
- [8] GOMEZ-CABELLO D, JIMENO S, FERNÁNDEZ-ÁVILA M J, et al. New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice [J] . *PLoS One*, 2013, 8(10): e77206.
- [9] JIA H, CUI J, JIA X, et al. Therapeutic effects of STAT3 inhibition by nifuroxazide on murine acute graft-vs-host disease: old drug, new use [J] . *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9480–9486.
- [10] YE T H, YANG F F, ZHU Y X, et al. Inhibition of Stat3 signaling pathway by nifuroxazide improves antitumor immunity and impairs colorectal carcinoma metastasis [J] . *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2534.
- [11] MCINTOSH M T, KOGANTI S, BOATWRIGHT J L, et al. STAT3 imparts *BRCAness* by impairing homologous recombination repair in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes [J] . *PLoS Pathog*, 2020, 16(10): e1008849.
- [12] KETTNER N M, VIJAYARAGHAVAN S, DURAK M G, et al. Combined inhibition of STAT3 and DNA repair in palbociclib-resistant ER-positive breast cancer [J] . *Clin Cancer Res*, 2019, 25(13): 3996–4013.

(收稿日期: 2021-06-08 修回日期: 2021-07-31)

《中国癌症杂志》被EBSCO数据库收录

2021年11月5日,《中国癌症杂志》编辑部接到美国EBSCO信息服务部通知,本刊已正式被EBSCO数据库收录。

EBSCO数据库是目前世界上最大的多学科学术期刊数据库和综合性商业资源全文数据库,已经被多个科研机构 and 高校图书馆订购使用,全球83.3%的高校图书馆均将EBSCOhost列为首选的电子文献检索。现已开发近400多个在线文献数据库,满足各类型机构的信息需求已达70余年,收录全球各种期刊逾26万种,全球11万5千多家机构选用EBSCO的产品与服务,每天在EBSCO平台上进行的检索达一亿七千五百万次。

作为中文期刊,《中国癌症杂志》提供1 000字左右英文长摘要。被EBSCO文献数据库收录,意味着本刊在论文编写格式和数据处理的标准化和规范化要求与国际文献接轨,促进了本刊已发表论文国际化传播的力度,提高论文在国内外的被引频次,提高作者、期刊、工作单位在国内外的学术地位和知名度。

特别感谢支持《中国癌症杂志》的各位专家、作者及读者,我们将不忘初心、砥砺前行!

《中国癌症杂志》编辑部