

# 高表达分泌颗粒蛋白 II 增加结直肠癌细胞对奥沙利铂的耐药性

邓金海<sup>1,2</sup>, 潘腾<sup>3</sup>, 周广林<sup>4</sup>, 高悦<sup>2</sup>, 彭伟雄<sup>2</sup>, 魏玮<sup>5</sup>, 吕纯鑫<sup>5</sup>

<sup>1</sup>北京大学基础医学院免疫学系; 卫生部医学免疫学重点实验室; 北京大学人类疾病基因研究中心, 北京 100191; <sup>2</sup>湖南自兴智慧医疗科技有限公司, 湖南长沙 410221; <sup>3</sup>天津医科大学肿瘤医院国家肿瘤临床医学研究中心; 天津市"肿瘤防治"重点实验室; 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300202; <sup>4</sup>深圳市龙岗区妇幼保健院//汕头大学医学院龙岗妇幼临床学院, 广东深圳 518172; <sup>5</sup>上海市浦东新区浦南医院肿瘤科, 上海 200120

**摘要:**目的 探究分泌颗粒蛋白 II (SCG2) 在结直肠癌 (CRC) 组织中的表达特点, 并分析其对奥沙利铂化疗敏感性的影响。方法 通过对组织芯片 (包括 96 个癌组织和 84 个癌旁组织) 进行免疫组化染色检测 CRC 患者癌组织及配对癌旁组织中 SCG2 的表达量并分析 SCG2 表达量与结直肠癌患者临床特征的关系。进一步采用蛋白免疫印迹 Western blot 和实时荧光定量 PCR (qPCR) 等方法检测化疗药物奥沙利铂 (Oxa) 处理结直肠癌细胞系后的 SCG2 的表达水平。利用 CRISPR/Cas9 技术建立 SCG2 敲除 (SCG2-KO) 的 DLD1 细胞株, 采用 CCK-8 实验检测 SCG2 对药物敏感性的影响, 采用 Western blot 和 qPCR 实验检测凋亡相关蛋白的表达水平。最后, 用高浓度奥沙利铂持续处理 DLD1 细胞构建了对奥沙利铂耐药的 DLD1 细胞株, 采用 Western blot 实验检测耐药株的 SCG2 的表达水平。结果 相较于癌旁组织, 癌组织中 SCG2 表达量更高 ( $P < 0.0001$ ), 且更高的肿瘤 N 分期和临床分期患者结直肠癌组织 SCG2 阳性表达率更高。奥沙利铂处理结直肠癌细胞系可以显著增加其 SCG2 的表达量 ( $P < 0.05$ )。反过来, 敲除 SCG2 降低了 DLD1 细胞对于奥沙利铂的药物敏感性 ( $P < 0.05$ )。机制研究发现 SCG2 敲除后凋亡相关分子表达量上调。并且, 相较于亲本细胞株, SCG2 在奥沙利铂耐药的 DLD1 细胞株 (DLD1-OXAR) 中显著高表达 ( $P < 0.05$ )。结论 SCG2 是一个结直肠癌的危险性基因, 且能够降低结直肠癌患者对奥沙利铂化疗药物的敏感性。

**关键词:** 结直肠癌, 奥沙利铂, 化疗药敏感性, 分泌颗粒蛋白 II

## High expression of secretogranin II increases oxaliplatin resistance of colorectal cancer cells

DENG Jinhai<sup>1,2</sup>, PAN Teng<sup>3</sup>, ZHOU Guanglin<sup>4</sup>, GAO Yue<sup>2</sup>, PENG Weixiong<sup>2</sup>, WEI Wei<sup>5</sup>, LV Chunxin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences; NHC Key Laboratory of Medical Immunology; Center for Human Disease Genomics, Peking University, Beijing 100191, China; <sup>2</sup>Hunan Zixing Intelligent Medical Technology Co., Ltd., Changsha 410221, China; <sup>3</sup>Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300202, China; <sup>4</sup>Department of Breast Surgery, Longgang District Maternity and Child Healthcare Hospital//Longgang Maternity and Child Institute of Shantou University Medical College, Shenzhen 518172, China; <sup>5</sup>Department of Oncology, Punan Hospital of Pudong New District, Shanghai 200120, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of secretogranin II (SCG2) in colorectal cancer (CRC) tissues and its impact on oxaliplatin resistance of CRC cells. **Methods** We performed immunohistochemistry to detect the expression level of SCG2 on a tissue microarray containing 96 CRC and 84 adjacent tissues and analyzed the association of SCG2 expression with the clinical features of the CRC patients. SCG2 expression was also measured in DLD1 cells treated with oxaliplatin using immunoblotting and RT-qPCR analyses. The effects of SCG2 expression on oxaliplatin sensitivity and cell viability were evaluated in a DLD1 cell model of SCG2 knockout established using CRISPR-cas9 technique, and the expressions of apoptosis-related proteins were detected using Western blotting and RT-qPCR. We further examined SCG2 expression levels in an oxaliplatin-resistant DLD1 cell line and its parental DLD1 cells. **Results** SCG2 expression was significantly increased in CRC tissues as compared with the adjacent tissues ( $1.932 \pm 0.816$  vs 1), and the tumor tissues in advanced stages showed higher SCG2 expression levels. In DLD1 cells, treatment with oxaliplatin significantly increased SCG2 expression, and SCG2 knockout obviously increased oxaliplatin sensitivity of the cells and enhanced the expressions of apoptosis-related proteins. Compared with the parental cells, oxaliplatin-resistant DLD1 cells showed a significant increase of SCG2 expression by  $3.901 \pm 0.471$  folds. **Conclusion** SCG2 may serve as a risk gene in CRC, and its high expression increases oxaliplatin resistance of CRC cells.

**Keywords:** colorectal cancer; oxaliplatin; chemotherapy sensitivity; secretogranin II

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研项目 (201540303); 深圳市政府研究基金 (JCYJ20210324111810028); 湖南省自然科学基金 (2023JJ60491)

作者简介: 邓金海, 博士, 副研究员, E-mail: jinhai.deng@kcl.ac.uk; 潘腾, 博士, 副研究员, E-mail: teng.l.pan@kcl.ac.uk。邓金海、潘腾共同为第一作者

通信作者: 魏玮, 硕士, 主任医师, E-mail: wwei0104@163.com; 吕纯鑫, 硕士, 主治医师, E-mail: lv\_chunxin@fudan.edu.cn

结直肠癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一, 具有非常高的死亡率<sup>[1]</sup>。虽然免疫治疗和靶向治疗在结直肠癌中取得较好的疗效, 但化疗药物依旧是主要的治疗方式<sup>[2]</sup>。化疗药物已经被证实可以显著提高患者的生存率和延长生存期<sup>[3]</sup>; 但是, 大部分患者会出现对化疗药物的耐受, 严重地影响了患者的预后<sup>[4]</sup>。具体而言, 产生化疗药耐药的分子机制包括很多方面, 比如肿瘤细胞

发生细胞自噬或者衰老,肿瘤相关成纤维细胞的影响以及肿瘤免疫微环境的调控等等<sup>[5-8]</sup>。但是,目前临床上针对降低化疗药物耐药的问题尚无疗效确切的治疗选择方案<sup>[9,10]</sup>。因此,深入挖掘与结直肠癌化疗耐药性相关分子,发现新的治疗靶点仍然是目前研究的重要方向。

分泌颗粒蛋白II(SCG2)主要表达在神经和内分泌组织当中。据报道,SCG2在神经系统中具有非常重要的功能<sup>[11]</sup>,包括调控神经网络,保护神经元以及促进神经的可塑性等等<sup>[11,12]</sup>,此外,它同时被证明能够参与神经元的分化<sup>[13]</sup>。近些年来,SCG2也被证实也在肿瘤中起到重要的作用。在结直肠癌中,SCG2展现出了多重的功能,既能够促进,也能够抑制肿瘤的发生发展<sup>[14,15]</sup>。比如,SCG2能够通过促进缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )的降解,抑制血管生成,最终有效地限制肿瘤的生长和进展<sup>[15]</sup>。然而,也有研究报道SCG2具有促进血管生成的作用<sup>[16]</sup>。相关证据表明,SCG2的高表达和不良预后显著相关,并且,SCG2和M2巨噬细胞的极化显著相关<sup>[14]</sup>。因此,关于SCG2在结直肠癌中的功能需要进一步地探讨,尤其是SCG2对于化疗药敏感性的影响需要更深入的研究。

本研究发现,SCG2在结直肠癌组织中高表达,并且能够降低结直肠癌细胞系对化疗药的敏感性。当敲除SCG2时,结直肠癌细胞系对化疗药物的敏感性显著提升。相较于亲本细胞株,奥沙利铂的耐药细胞株中SCG2表达量升高。因此,研究揭示了SCG2在化疗药耐药过程中具有的重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

CRC癌组织和癌旁组织组织芯片(上海芯超生物科技),包括96个癌组织以及84个癌旁组织。这个组织芯片附带有完整的临床信息(有3名患者缺乏T分期、1名患者缺乏N分期、2名患者缺乏临床分期的相关信息)。因在免疫组化染色过程中所有组织均成功染色,故将所有组织均纳入分析。

### 1.2 主要试剂和仪器

RPMI培养基(Life Technologies Ltd),胎牛血清(Sera Laboratories International Ltd),青霉素/链霉素(Life Technologies Ltd),L-谷氨酰胺(Life Technologies Ltd),奥沙利铂(Selleck Chemicals),Deep Blue Cell Viability™ Kit (Biolegend)。抗体:兔源性人SCG2多抗(Abcam)(蛋白免疫印迹:1:1000;免疫组化:1:250);鼠源性人GAPDH单抗(Proteintech)(蛋白免疫印迹:1:5000);兔源性人p-AKT多抗(Cell Signalling Technology)(蛋白免疫印迹:1:2000);兔源性人AKT多抗(Cell Signalling Technology)(蛋白免疫印迹:1:1000);兔源性人Survivin多抗(Abcam)(蛋白免疫印迹:

1:5000);兔源性人BAX多抗(Cell Signalling Technology)(蛋白免疫印迹:1:1000);兔源性人PUMA多抗(Cell Signalling Technolog)(蛋白免疫印迹:1:1000);兔源性人Bcl-xl多抗(Cell Signalling Technology)(蛋白免疫印迹:1:1000);兔源性人Bcl-2多抗(Cell Signalling Technology)(蛋白免疫印迹:1:1000)。

### 1.3 免疫组化染色法检测SCG2表达水平

组织芯片经过烤片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化等预处理,高温抗原修复15 min,之后3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,4℃孵育一抗过夜,清洗后,二抗孵育30 min,二氨基联苯胺镜下控制显色,苏木素复染细胞核,自来水返蓝后常规中性树脂封片SCG2阳性结果显示细胞质内出现棕褐色颗粒。利用Image J(版本:1.48v)对免疫组化结果进行分析。

### 1.4 细胞培养

DLD1细胞株购自ATCC。细胞用RPMI完全培养基(RPMI培养基+1%青霉素/链霉素+10%灭活胎牛血清+1%L-谷氨酰胺)在37℃和5%CO<sub>2</sub>浓度的条件下培养。

### 1.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

细胞种植于6孔板内(4×10<sup>5</sup>/孔)。第2天更换为加药的培养基。48 h后吸除培养基,PBS缓冲液冲洗两遍后用RIPA细胞裂解液于冰上裂解细胞45~60 min。离心后用BCA试剂盒给蛋白定量后,用5X上样缓冲液配制1X工作浓度样品,储存于-20℃冰箱。蛋白通过SDS-PAGE胶分离并转至PVDF膜上。用封闭液封闭1 h后于4℃条件下孵育一抗过夜。第2天用TBST缓冲液冲洗后孵育二抗2 h。清洗后曝光。

### 1.6 实时荧光定量PCR(qPCR)

细胞种植于6孔板内(4×10<sup>5</sup>/孔)。第2天更换为加药的培养基。48 h后吸除培养基,PBS缓冲液冲洗两遍后加入QIAzol,常温静置5~10 min以裂解细胞。之后用RNeasy Mini试剂盒提取细胞RNA。之后用SuperScript™ II逆转录建立cDNA文库,用RNAase free水将样品浓度稀释到2 ng/mL。qRT-PCR实验是在10 μL的体系下,用SYBR green PCR master mix来完成。之后用QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System来进行数据分析。GAPDH作为内参来计算mRNA表达量的相对水平。SCG2引物上游ACCAGACCTCAGGTTGGAAAA,下游ACCAGACCTCAGGTTGGAAAA;GAPDH引物上游CTGGGCTACTGAGCACC3,下游AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG3;BCL2引物上游CTGGGAGAACAGGGTACGATAA,下游GGCTGGGAGGAGAAGATGC;BAX引物上游TCATCCAGGATCGAGCAGG,下游TGTCACGGC

GGCAAT; Survivin 引物上游 ACCGCATCTCTACA TTCAAG, 下游 CAAGTCTGGCTCGTTCTC。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。

### 1.7 CRISPR/Cas9 基因编辑

利用 CRISPR-cas9 技术建立 SCG2 敲除细胞株。Guide RNAs [Edit- R CRISPR (knockout) Human SCG2 crRNA, Horizon Discovery 公司]。具体实验操作步骤如下: 细胞种植于 6 孔板内, 并用 crRNA: tracrRNA 转染复合物和 Cas9 mRNA 转染细胞。48 h 后, 用 BD Aria Fusion 细胞分选仪分选出单个细胞于 96 孔板中。3~6 周之后, 用蛋白免疫印迹法检测敲除效率。

### 1.8 细胞活性实验

Deep Blue Cell Viability™ 试剂盒用于分析化疗药的细胞毒性。细胞种植于 96 孔板中 (5000/孔), 过夜贴壁后加入 10 μmol/L 的奥沙利铂。48 h 后按试剂: 培养基=1:10 的比例加入试剂, 37 °C 孵育 3 h 后检测激发光  $A_{530-570\text{nm}}$ , 发射光  $A_{590-620\text{nm}}$ , 计算细胞活性。

### 1.9 建立奥沙利铂耐药的细胞株

利用大剂量药物冲击法 (50 μmol/L) 构建 DLD1 奥沙利铂拮抗细胞株 (DLD1-OXAR)。当细胞在高浓度奥沙利铂条件下呈指数增长时, 得到 DLD1-OXAR。于无奥沙利铂的完全培养基中培养 DLD1-OXAR 2~3 周后进行后续实验分析。

### 1.10 统计学方法

本研究中所有实验独立重复至少 3 次, 应用 SPSS 20.0 及 GraphPad Prism v9.0 软件进行统计分析。计数资料以例数或百分比表示。组间比较采用  $\chi^2$  检

验。定量资料的分析采用 *t* 检验, 数据以均数±标准差表示,  $P<0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SCG2 在结直肠癌中高表达

组织芯片的免疫组化染色结果显示, SCG2 阳性染色在细胞质, 呈棕褐色, 结直肠癌组织中 SCG2 的阳性表达率是癌旁组织的  $2.107\pm 0.350$  倍 ( $t=14.59$ ), 差异有统计学意义 ( $P<0.0001$ , 图 1A、B)。进一步对 SCG2 的表达量与临床分期的相关性进行分析,  $\chi^2$  检验结果显示, 更高的肿瘤 N 分期、临床分期患者结直肠癌组织 SCG2 阳性表达率更高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ , 表 1)。

### 2.2 奥沙利铂诱导 SCG2 的表达

用奥沙利铂处理 DLD1 细胞, 蛋白免疫印迹实验结果显示 SCG2 的表达量显著上调 (10 μmol/L Oxa 组/对照组 =  $9.5345\pm 0.745$  倍,  $t=20.48$ ) (图 2A)。且相较于低浓度的奥沙利铂, 高浓度的奥沙利铂能够使 SCG2 的蛋白表达量上调更加明显 (25 μmol/L Oxa 组/10 μmol/L 组 =  $1.253\pm 0.296$  倍,  $t=14.34$ ) (图 2A)。同时, 用 qPCR 实验检测不同药物浓度处理后的 SCG2 的 mRNA 水平, 也观察到同样的表达趋势 (对照组/10 μmol/L Oxa 组 =  $1:18.239\pm 0.835$ ,  $t=30.91$ ; 10 μmol/L Oxa/25 μmol/L Oxa 组 =  $1:1.97\pm 0.191$ ,  $t=16.08$ ,  $P<0.0001$ , 图 2B)。

### 2.3 SCG2 降低奥沙利铂的敏感性

首先, 通过 CRISPR-Cas9 技术敲除 DLD1 细胞中的 SCG2, 蛋白免疫印迹实验显示成功构建了 SCG2 敲除的细胞模型 (图 3A)。接下来, 通过检测不同细胞模型中奥沙利铂的  $IC_{50}$ , 我们发现 SCG2 敲除的细胞株的

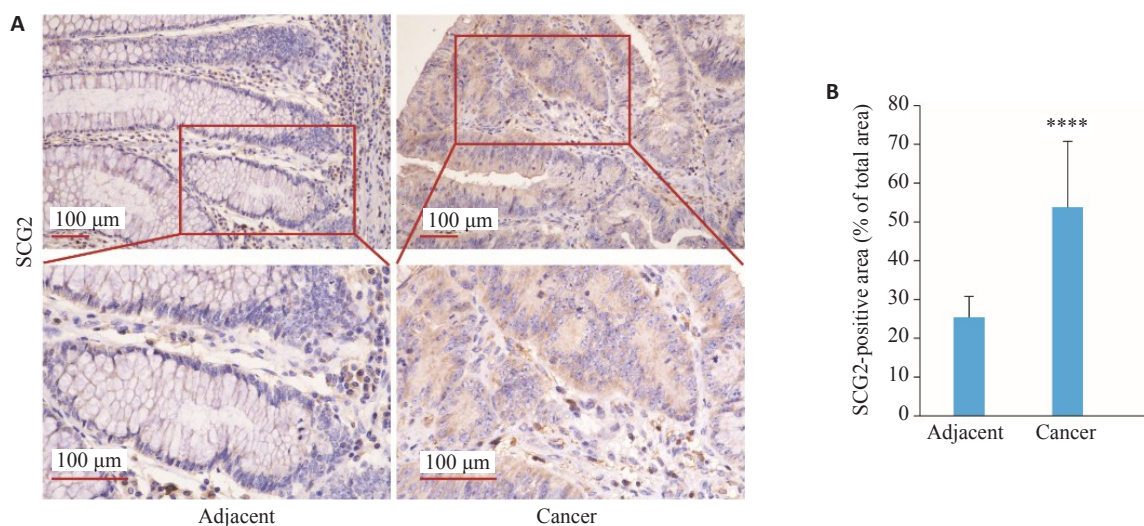


图1 在结直肠癌组织芯片中检测SCG2蛋白的表达水平

Fig.1 Assessment of SCG2 expression in CRC tumour microarray. A: Immunohistochemical staining. B: Immunohistochemical scoring. \*\*\*\* $P<0.0001$  vs adjacent tissue.

表1 SCG2表达量与结直肠癌患者临床特征的相关性

Tab.1 Association between SCG2 expression and clinicopathological features of patients with colorectal cancer

Characteristics	SCG2 expression			$\chi^2$	P
	Total (n=96)	Low (n=48)	High (n=48)		
Gender					
Male	52	23	29	1.51	0.2191
Female	44	25	19		
Age (year)					
<65	44	24	20	0.6713	0.4126
≥65	52	24	28		
T stage					
T1-T2	3	2	1	0.2813	0.5959
T3-T4	90	46	44		
N stage					
N0	55	36	19	10.07	0.0015*
N1+N2+N3	40	13	27		
M stage					
M0	93	47	46	0.3441	0.5575
M1	3	1	2		
Clinical stage					
I/II	54	37	15	26.08	<0.0001*
III/IV	40	7	33		

\*P<0.05 (Chi-square test).

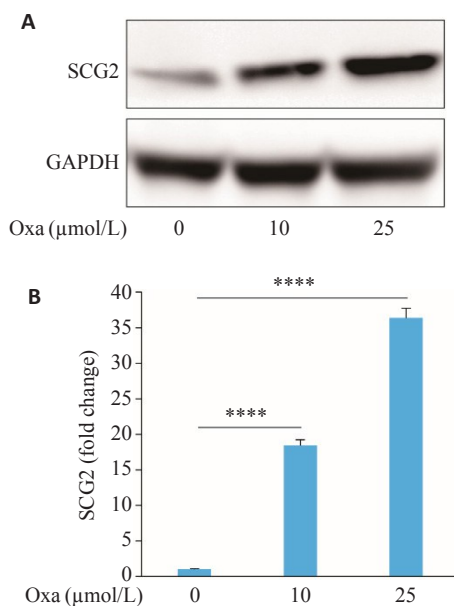


图2 检测奥沙利铂处理后的SCG2的表达量

Fig.2 Assessment of SCG2 expression in DLD1 cells treated with oxaliplatin (Oxa). A: Immunoblotting staining. B: RT-qPCR analysis. \*\*\*\*P<0.0001.

IC<sub>50</sub>显著降低(对照组/SCG2敲除组=2.647±0.371, *t*=10.96), 差异有统计学意义(*P*<0.05, 图3B)。且SCG2敲除后凋亡相关分子表达量上调, BAX上调13.348±3.615倍, Bcl2上调0.203±0.074倍, Survivin上调0.435±0.043倍mRNA表达量的变化, 差异有统计学意

义(*P*<0.05, 图3C、D)。

#### 2.4 SCG2在奥沙利铂拮抗的细胞株中高表达

通过大剂量药物冲击法, 我们成功构建了DLD1的奥沙利铂拮抗的细胞株(DLD1-OXAR)(图4A、B)。蛋白免疫印迹实验结果显示DLD1-OXAR细胞株高表达SCG2蛋白(DLD1-OXAR细胞株/DLD1细胞株=3.901±0.471, *t*=13.01), 差异有统计学意义(*P*<0.05, 图4C、D)。将耐药株中的SCG2进行敲减(图4D)。与敏感株一致, 我们发现SCG2低表达的耐药细胞株中奥沙利铂的IC<sub>50</sub>也显著降低(对照组/SCG2敲降组=2.667±0.186, *t*=24.43), 差异有统计学意义(*P*<0.05, 图4F)。

### 3 讨论

结直肠癌是全球范围内最重要的癌症相关死亡的原因之一<sup>[17]</sup>。结直肠癌的耐药、转移和复发都是导致患者预后差的重要因素<sup>[5, 18, 19]</sup>。前期研究表明, 耐药产生的机制很多, 包括肿瘤细胞内相关分子机制的调控以及肿瘤细胞与微环境的相互作用<sup>[5-8, 20]</sup>。然而, 至今为止, 临床上仍无能有效提高化疗药物敏感性的药物。针对这一问题, 本研究聚焦在细胞内产生药物抗性的具体分子机制, 期望能够为抗癌药物的研发提供有效地指导。SCG2属于粒蛋白家族, 是一种神经内分泌分泌蛋白<sup>[21]</sup>。研究证明, SCG2参与了肽类激素和神经肽进入分泌囊泡的分选和包装<sup>[22, 23]</sup>。并且, 它还能够被剪切成为有活性的分泌肽, 产生趋化作用<sup>[11, 24]</sup>。

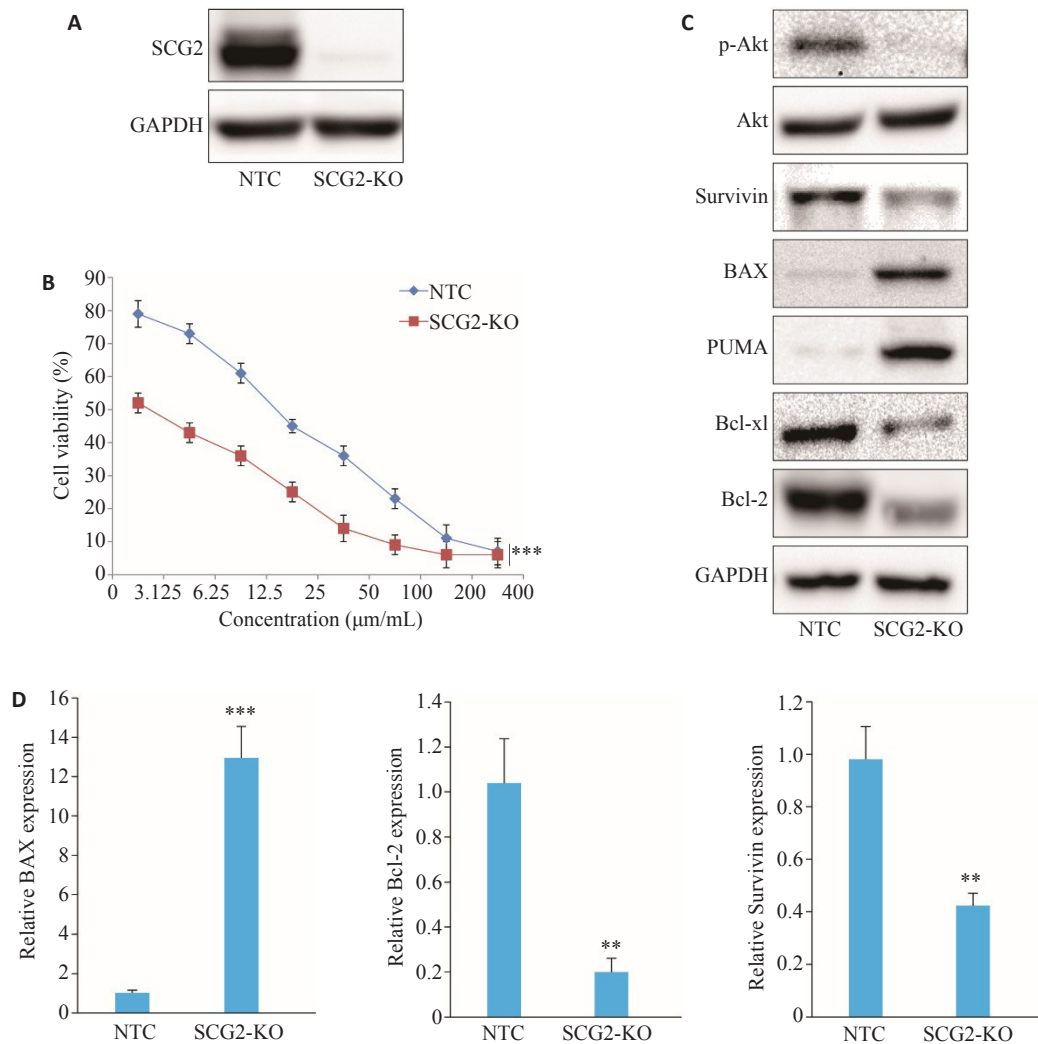


图3 敲除SCG2会降低药物的IC<sub>50</sub>浓度以及增高细胞凋亡分子的表达

Fig.3 SCG2 knockout decreases IC<sub>50</sub> of oxaliplatin and increases expressions of apoptosis markers in DLD1 cells. **A:** Verification of SCG2 knockout efficiency. **B:** Measurement of IC<sub>50</sub> of oxaliplatin in NTC and SCG2-KO cells. **C:** Immunoblotting analysis of apoptosis markers (p-AKT, Survivin, BAX, PUMA, Bcl-xl, and Bcl-2) in NTC and SCG2-KO cells. **D:** RT-qPCR analysis of apoptosis markers (BAX, Bcl-2, and survivin) in NTC and SCG2-KO cells. \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 vs NTC.

越来越多的研究表明,SCG2与肿瘤的关系非常密切<sup>[13-15, 25-30]</sup>。前期很多研究提示SCG2参与了肿瘤免疫微环境的重构<sup>[14, 26-28]</sup>。一项研究表明,SCG2促进M2巨噬细胞的极化,最终导致患者预后差<sup>[14]</sup>。另一项研究发现,SCG2表达量高的患者伴随着免疫检查点相关分子的表达量增高,包括:CD274, CD276, CTLA4, ICOS, ICOSLG, PDCD1, PDCD1LG2, TMIGD2, VTCN1, BTLA, CD27, CD40, CD70, TNFRSF9, TNFSF14, ENTPD1, HAVCR2, IDO1, LAG3, NT5E和SIGLEC15<sup>[27]</sup>,这些结果表明SCG2在结直肠癌中能够促进抑制性免疫微环境的产生,促进结直肠癌的发展。然而,也有研究发现SCG2能够抑制结直肠癌的发展<sup>[15]</sup>,其分子机制可能与SCG2能够促进HIF-1α蛋白的降解,从而抑制血管生成

有关。总而言之,这些证据都表明了SCG2在肿瘤中具有重要作用,可是,目前尚未发现SCG2对化疗敏感性的具体影响。本研究验证了SCG2对奥沙利铂敏感性的抑制作用。

我们首先验证SCG2在结直肠癌中的表达量特点。通过对含有96个癌组织结直肠癌组织芯片的分析,我们发现了SCG2在结直肠癌中表达量增高,说明SCG2是一个潜在的促肿瘤分子,提示SCG2具有促肿瘤的功能。在国际上,TNM分期系统是最为通用的肿瘤分期系统,对恶性肿瘤分期中具有重要意义。组织芯片统计分析的结果显示,虽然SCG2的表达量水平与原发肿瘤的大小和肿瘤转移无关,但是SCG2的表达量与淋巴结播散存在很强的相关性,提示高表达SCG2可能

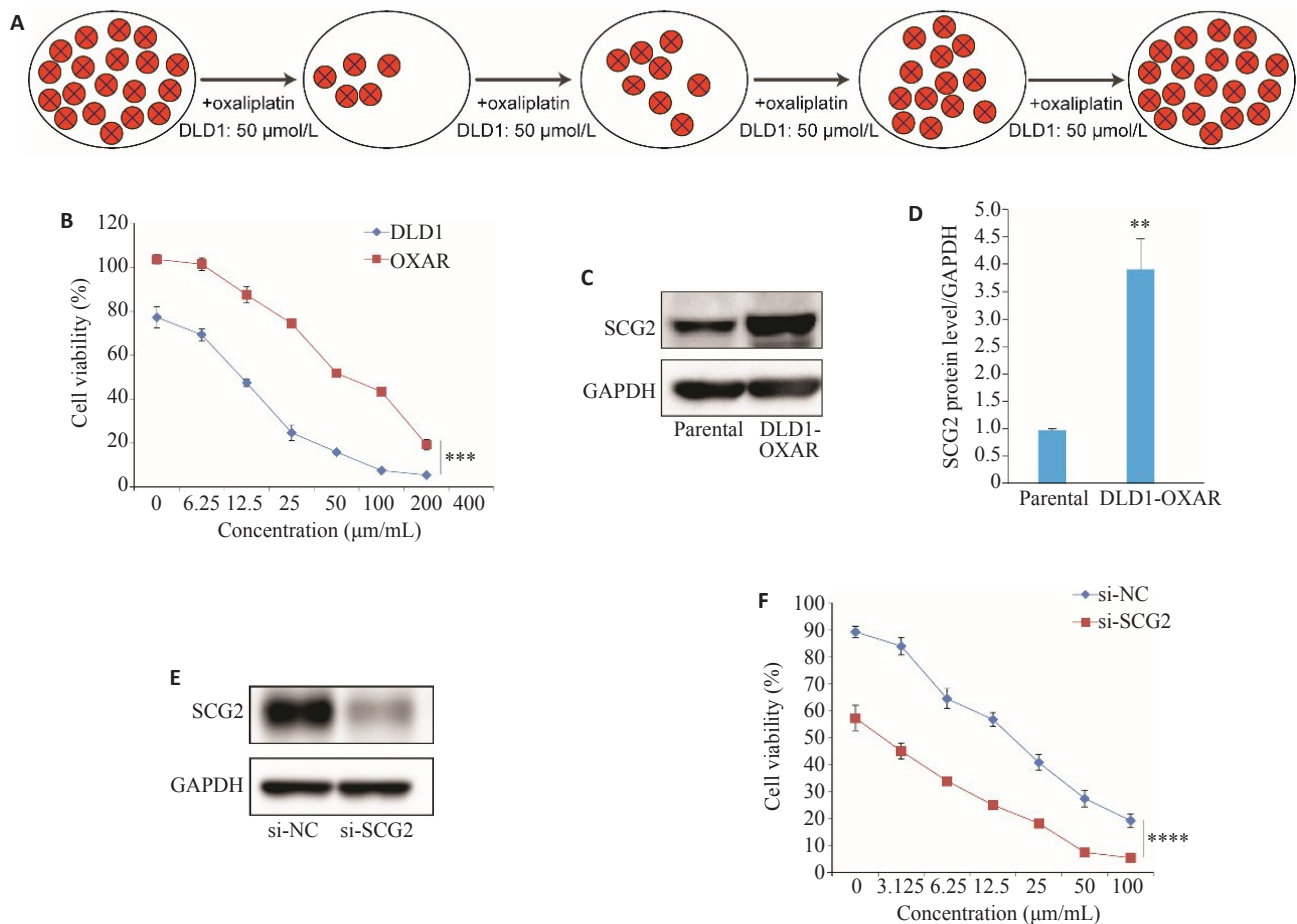


图4 SCG2在DLD1奥沙利铂耐药的细胞株中高表达

Fig.4 SCG2 expression is higher in oxaliplatin-resistant DLD1 (DLD1-OXAR) cells. **A:** Establishment of DLD1-OXAR cells. **B:** Measurement of IC<sub>50</sub> of oxaliplatin in the resistant and parental DLD1 cells. **C:** Assessment of SCG2 expression in DLD1 parental and oxaliplatin-resistant cells. **D:** SCG2 protein expression levels in parental and oxaliplatin-resistant DLD1 cells. **E:** Detection of SCG2 knockdown efficiency. **F:** Measurement of IC<sub>50</sub> of oxaliplatin in resistant and SCG2-KD resistant cells (si-NC cells vs si-SCG2 cells). \*\**P*<0.01 vs parental, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001.

与肿瘤恶性程度高相关。并且,SCG2的表达量也与临床分期密切相关(表1)。进而,我们用不同浓度的奥沙利铂处理结直肠癌细胞系,发现SCG2的表达水平可以随着药物浓度的增高而增高,提示SCG2的诱导表达呈奥沙利铂浓度依赖型。并且,这个过程是通过转录组来实现表达调控的,以上数据表明SCG2能够参与奥沙利铂引起的细胞毒性或者耐药过程。为进一步探究SCG2在结直肠癌中对药物敏感性的影响,利用CRISPR-Cas9技术建立SCG2-KO模型,实验结果发现敲除SCG2可显著降低结直肠癌细胞系对奥沙利铂的IC<sub>50</sub>,这个结果表明SCG2能够降低化疗药的敏感性。此外,SCG2在耐药细胞株中呈现高表达,也进一步表明SCG2分子在化疗药物耐药中的潜在作用。但是,以下几点值得注意:首先,前期研究发现大量的分子在不同的肿瘤类型当中具有不同的功能<sup>[31,32]</sup>,因此SCG2在其他类型的肿瘤中是否还参与耐药性的发生需要进一步

验证;其次,前期研究发现,参与肿瘤发生发展的调控分子对于不同化疗药物的敏感性具有不同的影响<sup>[33]</sup>。比如p53分子,一方面它能够增加结直肠癌患者对5-氟尿嘧啶的药物敏感性,而另外一方面,它却降低了患者对多柔比星的药物敏感性<sup>[33]</sup>。因此,SCG2是否能够增加其他结直肠癌治疗药物的耐受性还需要进一步研究。

前期报道提示SCG2参与了很多生物学过程,尤其是参与了细胞的凋亡过程<sup>[34]</sup>。例如,在成神经细胞瘤中,敲减SCG2分子能够促进一氧化氮诱导的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。另外,SCG2也被证明具有神经保护功能。具体的分子机制是SCG2能够通过调控Jak2/Stat3信号通路促进抗凋亡分子(Bcl2和Bcl-xL等分子)的表达,进一步抑制Caspase-3的激活和细胞凋亡过程。同样的,在我们的研究中,我们发现在结直肠癌细胞中敲除SCG2,可以调控凋亡相关分子表达变化,即促进促凋亡分子的表达(BAX)和抑制抗凋亡分子的表达(Bcl-2和

Survivin)。因此,我们的研究表明,SCG2可以通过调控细胞凋亡过程来影响结直肠癌对化疗药的耐受。另外,研究报道,肿瘤微环境中的因子,包括血管生成和细胞因子等,都对肿瘤药物耐受过程产生了重要的作用<sup>[35,36]</sup>。而我们的前期工作表明,SCG2参与了肿瘤微环境的调节<sup>[27]</sup>。因此,不可否认的是,SCG2也能够通过调节肿瘤微环境来影响药物敏感性。但是,在我们这个研究体系中缺乏体内实验,限制了对SCG2通过影响肿瘤微环境来调节化疗药物敏感性的研究。

综上所述,本研究明确了SCG2能够降低CRC对奥沙利铂的药物敏感性,为未来临床上联合用药提供了理论基础,促进了CRC的精准治疗。

### 参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] Miller KD, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(5): 409-36.
- [3] Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer [J]. *Ann Oncol*, 1996, 7(6): 593-600.
- [4] Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaieian H. Battling chemoresistance in cancer: root causes and strategies to uproot them [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9451.
- [5] Chen TW, Hung WZ, Chiang SF, et al. Dual inhibition of TGFβ signaling and CSF1/CSF1R reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to chemotherapy *via* suppressing PD-L1 [J]. *Cancer Lett*, 2022, 543: 215795.
- [6] Taher AT, AlRauji Noura N, Asma T, et al. High AUF1 level in stromal fibroblasts promotes carcinogenesis and chemoresistance and predicts unfavorable prognosis among locally advanced breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res*, 2022, 24(1):46.
- [7] Zhang J, He T, Yin ZN, et al. Ascitic senescent T cells are linked to chemoresistance in patients with advanced high-grade serous ovarian cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 864021.
- [8] Zhang SY, Liu XF, Abdulmomen Ali Mohammed S, et al. Adaptor SH3BGR1 drives autophagy-mediated chemoresistance through promoting PIK3C3 translation and ATG12 stability in breast cancers [J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 1822-40.
- [9] Lijuan, Bai, Xin Li, Yang Yang, et al. Bromocriptine monotherapy overcomes prostate cancer chemoresistance in preclinical models [J]. *Transl Oncol*, 2023, 34: 101707.
- [10] Mehrdad, Hashemi, Mohammad Arad Zandieh, Yasmin Talebi, et al. Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: molecular mechanisms and possible therapeutic strategies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114392.
- [11] Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, et al. Secretoneurin promotes neuroprotection and neuronal plasticity *via* the Jak2/Stat3 pathway in murine models of stroke [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(1): 133-48.
- [12] Yap EL, Pettit NL, Davis CP, et al. Bidirectional perisomatic inhibitory plasticity of a Fos neuronal network [J]. *Nature*, 2021, 590(7844): 115-21.
- [13] Li L, Hung AC, Porter AG. Secretogranin II: a key AP-1-regulated protein that mediates neuronal differentiation and protection from nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(5):879-88.
- [14] Wang H, Yin J, Hong Y, et al. SCG2 is a prognostic biomarker associated with immune infiltration and macrophage polarization in colorectal cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 795133.
- [15] Fang C, Dai L, Wang C, et al. Secretogranin II impairs tumor growth and angiogenesis by promoting degradation of hypoxia-inducible factor-1α in colorectal cancer [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(12): 3513-3526.
- [16] Yin Y, Yao SR, Hu YL, et al. The immune-microenvironment confers chemoresistance of colorectal cancer through macrophage-derived IL6 [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(23): 7375-87.
- [17] Lu Y, Kweon SS, Cai Q, et al. Identification of novel loci and new risk variant in known loci for colorectal cancer risk in east asians [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2020, 29(2): 477-86.
- [18] Zhang QM, Deng T, Zhang HD, et al. Adipocyte-derived exosomal MTPP suppresses ferroptosis and promotes chemoresistance in colorectal cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(28): e2203357.
- [19] Felicitas S, Mathias D, Hanna R, et al. Calcium-binding protein S100P is a new target gene of MACC1, drives colorectal cancer metastasis and serves as a prognostic biomarker [J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(4): 675-85.
- [20] Bellomo G, Rainer C, Quaranta V, et al. Chemotherapy-induced infiltration of neutrophils promotes pancreatic cancer metastasis via Gas6/AXL signalling axis [J]. *Gut*, 2022, 71(11): 2284-99.
- [21] Berard AR, Severini A, Coombs KM. Differential reovirus-specific and herpesvirus-specific activator protein 1 activation of secretogranin II leads to altered virus secretion [J]. *J Virol*, 2015, 89(23): 11954-64.
- [22] Hotta K, Hosaka M, Tanabe A, et al. Secretogranin II binds to secretogranin III and forms secretory granules with orexin, neuropeptide Y, and POMC [J]. *J Endocrinol*, 2009, 202(1): 111-21.
- [23] Wilfried S, Markus T, Johannes J, et al. Gene therapy with the angiogenic cytokine secretoneurin induces therapeutic angiogenesis by a nitric oxide-dependent mechanism [J]. *Circ Res*, 2009, 105(10): 994-1002.
- [24] Mitchell K, Mikwar M, Da Fonte D, et al. Secretoneurin is a secretogranin-2 derived hormonal peptide in vertebrate neuroendocrine systems [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2020, 299: 113588.
- [25] Laura Carraresi, Rosanna Martinelli, Alessandro Vannoni, et al. Establishment and characterization of murine small cell lung carcinoma cell lines derived from HPV-16 E6/E7 transgenic mice [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231(1): 65-73.
- [26] Tian CL, Wang YS, Song XR. Prognostic characteristics of immune-related genes and the related regulatory axis in patients with stage N+M0 breast cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 878219.
- [27] Weng S, Liu Z, Ren X, et al. SCG2: A Prognostic Marker That Pinpoints Chemotherapy and Immunotherapy in Colorectal Cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 873871.
- [28] Luo YW, Chen L, Zhou Q, et al. Identification of a prognostic gene signature based on an immunogenomic landscape analysis of

- bladder cancer[J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2020, 24(22): 13370-82.
- [29] Sun G, Li Y, Peng Y, et al. Identification of a five-gene signature with prognostic value in colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(4):3829-3836.
- [30] Thompson EM, Keir ST, Venkatraman T, et al. The role of angiogenesis in Group 3 medulloblastoma pathogenesis and survival [J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(9): 1217-27.
- [31] Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15): from biomarker to novel targetable immune checkpoint[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 951.
- [32] Rochette L, Meloux A, Zeller M, et al. Functional roles of GDF15 in modulating microenvironment to promote carcinogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(8): 165798.
- [33] McGill G, Fisher DE. p53 and cancer therapy: a double-edged sword [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(3): 223-5.
- [34] Zheng R, Zhang ZH, Zhao YX, et al. Transcriptomic insights into the response of the olfactory bulb to selenium treatment in a mouse model of alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2998.
- [35] Janiczek-Polewska M, Szyberg L, Malicki J, et al. Role of interleukins and new perspectives in mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1600.
- [36] Xia W, Chen WZ, Ni C, et al. Chemotherapy-induced exosomal circBACH1 promotes breast cancer resistance and stemness via miR-217/G3BP2 signaling pathway [J]. *Breast Cancer Res*, 2023, 25(1): 85.

(编辑:余诗诗)