

靶向碱基切除修复途径以克服结直肠癌细胞中的阿霉素耐药性

王源源, 印学晨, 董云菲, 刘洁, 郭志刚, 何凌峰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子与医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 结直肠癌(CRC)具有非常高的发病率和死亡率,成为全球第三大最常见的恶性肿瘤和第二大最致命的癌症。阿霉素作为化学治疗药物,多年来一直广泛应用于癌症临床治疗,但由于其耐药性和副作用,治疗效果较为有限。已有研究证明,在癌细胞中 DNA 修复能力会大大增强,这在很大程度上会使得癌细胞在化学治疗药物引起的 DNA 损伤中存活下来。Flap 核酸内切酶 1(FEN1)在各种类型的癌细胞中表达较高,并在 DNA 损伤修复中起着关键作用。研究表明,FEN1 抑制剂 SC13 显著增强了阿霉素的治疗效果,这种联合治疗可以通过激活 cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 通路进而抑制结直肠癌的细胞增殖,故靶向 FEN1 可为阿霉素在临床使用中提供一种新的策略。

[关键词] DNA 修复, FEN1, 阿霉素, 结直肠癌, 肿瘤治疗

[中图分类号] R73-36+1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2023)02-0061-09

Targeting Base Excision Repair Pathway to Overcome Doxorubicin Resistance in Colorectal Cancer Cells

Wang Yuanyuan, Yin Xuechen, Dong Yunfei, Liu Jie, Guo Zhigang, He Lingfeng

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Colorectal cancer (CRC) has very high morbidity and mortality, becoming the third most common malignancy and the second most deadly cancer worldwide. As a chemotherapeutic drug, doxorubicin has been widely used in clinical treatment for many years but the therapeutic efficacy is limited due to drug resistance and side effects. Studies have shown that DNA repair capacity is greatly enhanced in cancer cells, which to a large extent enables cancer cells to survive DNA damage induced by chemotherapeutic drugs. Flap endonuclease 1 (FEN1) expression gets elevated in various types of cancer cells and plays a critical role in DNA damage repair. The study revealed that FEN1 inhibitor SC13 significantly enhanced the therapeutic effect of doxorubicin. The combinative treatment suppressed colorectal cancer cells proliferation via the activation of cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb pathway. It suggested that targeting FEN1 could be a potent strategy for tumor-targeting therapy.

Key words: DNA repair, FEN1, Doxorubicin, colorectal cancer cells, tumor therapy

结直肠癌(CRC)历来是许多西方国家最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率都很高,而上消化道癌症则在东方国家占主导地位。然而,在过去的几十年中,许多亚洲国家的结直肠癌发病率也出现了迅速上升的趋势^[1]。手术切除仍然是结直肠癌最有效的手段之一,化疗是治疗过程中最优选的辅助疗法之一。考虑到目前化疗疗效有限,加用靶向药物已付诸实践^[2]。

多柔比星,也称为阿霉素,自发现以来已普遍用于治疗多种形式的癌症^[3-5]。它属于蒽环类抗生素的化疗药物,通过诱导 DNA 损伤来介导肿瘤细胞的死亡^[6]。阿霉素的确切作用机制很复杂,目前尚不清楚,但普遍认为阿霉素在临床相关浓度下的抗肿瘤作用主要是通过抑制拓扑异构酶 II 的进程,进而导致双链 DNA 断裂(DSB)^[6-7]。阿霉素因其广谱抗肿瘤作用被广泛用于癌症治疗,在临床治疗中使用了多年,但阿

收稿日期:2022-09-29.

基金项目:国家自然科学基金项目(81872284)。

通讯作者:何凌峰,博士,副教授,研究方向:DNA 损伤修复。E-mail:lfhe22@139.com

霉素的治疗效果却非常有限,这主要是由于癌细胞的耐药性和机体严重的不良反应^[8-10]。此外,阿霉素的用途受到毒性的极大限制,特别是对心肌的损害和危及生命的心脏损害,这是累积且不可逆的,阿霉素诱导的毒性和耐药性已被认为是化疗方法的主要障碍。研究表明,毒性和耐药机制分别与活性氧的诱导和线粒体损伤有关^[11]。因此,迫切需要探索克服耐药性和毒性的方法。

细胞周期主要由细胞周期蛋白(cyclin)及其相关的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)复合物和抑制蛋白驱动^[12]。研究表明,cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 通路在控制细胞生长方面发挥着关键作用,该通路失调会导致不受控制的增殖,这在各种癌细胞中可以观察到。INK4 家族成员可阻断由 CDK4/6 和 cyclinD 产生的细胞周期进程。大量研究揭示了 INK4 蛋白在细胞衰老、细胞凋亡和 DNA 修复中的重要作用^[13]。INK4/P16 蛋白是 INK4 细胞周期抑制剂家族的成员,是一种肿瘤抑制剂,可抑制 cyclinD-CDK4/6 的活性,并通过直接与 CDK4 结合抑制其催化活性来促进 G1 期阻滞。CDK4/6 抑制剂 palbociclib、ribociclib、abemaciclib 等相继获批。尽管有良好的临床效果,但对于 CDK4/6 抑制剂的内在或获得性耐药经常报道,故制定各种策略来克服阻力非常重要^[14]。

越来越多的报道证明,DNA 修复途径会使癌细胞在化疗药物诱导的 DNA 损伤中存活下来^[15]。故在癌症治疗中,特定 DNA 修复途径的抑制剂与诱导 DNA 损伤的药物联合使用可能会行之有效^[16]。PARP 抑制剂在 HR 缺陷型癌症中的成功应用凸显了 DNA 损伤修复(DDR)抑制剂的潜力^[17]。据报道,DNA 核酸内切酶 1(FEN1)是碱基切除修复(BER)和各种 DNA 修复途径中的关键成分。FEN1 通过参与 DNA 复制和修复^[18-19]在维持基因组稳定性和完整性方面发挥重要作用,并且在许多癌细胞中高表达^[20-21]。总之越来越多的研究已经表明抑制 BER 蛋白对癌症的治疗非常重要^[16]。团队还成功开发了一种名为 SC13^[22]的高效 FEN1 抑制剂。

基于上述这些报道,猜测 FEN1 抑制剂 SC13 可以使结直肠癌细胞对低剂量阿霉素治疗敏感。研究使用 SW480 细胞系作为研究模型,并在体外和体内测试了这一想法。结果表明,SC13 和阿霉素的共同治疗有效地抑制了结直肠癌细胞的生长和促进了癌细胞的凋亡,并且联合治疗显著激活了 cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 通路。总之,研究表明,靶向 FEN1 可能是阿霉素治疗结肠癌的潜在策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基购自江苏凯基生物技术股份有限公司,胎牛血清购自南京森贝伽生物科技有限公司,胰蛋白酶(Trypsin)购自索莱宝生物科技公司,阿霉素购自 Selleck Chemical(S1208)。FEN1 抑制剂(SC13)是在自己的实验室中合成,如先前报道^[22]。本文使用的抗体:anti-FEN1 antibody(14768-1-AP, Proteintech),anti-Ki67 antibody(SC-15402, Santa Cruz),anti-p16 INK4A antibody(ABclonal, A11651),Cell Cycle Regulation Antibody Sampler Kit(9932, Cell Signaling Technology),Apoptosis Antibody Sampler Kit(9915, Cell Signaling Technology),anti- γ -H2AX antibody(ab2893, Abcam),anti-53BP1 antibody(SC-22760, Santa Cruz),Alexa Fluor® 488 Goat-Anti-Rabbit(A11008, Life Technologies),Alexa Fluor® 594 Donkey-Anti-Rabbit(R37119, Life Technologies),anti-vinculin antibody(MAB3574, Millipore)。CCK8(Cell™ Counting Kit-8)购自南京恩晶生物科技有限公司,BCA(BCA Protein Quantification Kit)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,极超敏 ECL 化学发光试剂盒(BeyoECL Moon)购自碧云天生物试剂公司,细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit)购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养

本研究中所用的细胞株 NCM460、SW480 和 HCT-8 均为本实验室保存。细胞培养使用 DMEM 完全培养基,并放置于 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,并于 1 d~2 d 传代一次。

1.2.2 药物敏感性实验

取 3 000 个/孔 SW480 和 NCM460 细胞,与不同浓度的阿霉素孵育或联合 20 μ mol/L 的 SC13 共孵育,DMSO 处理的细胞作为对照。加药 48 h 后弃掉旧培养基,将 10 μ L 的 CCK8 和 90 μ L 的新鲜培养基混合添加到每个孔中,并于 37℃ 进一步孵育 1 h~2 h,在 450 nm 处测量吸光度,根据吸光度计算细胞相对数量。

1.2.3 蛋白印迹分析

收集细胞,用1×PBS轻轻洗涤3次,用含有蛋白酶抑制剂的SDS裂解液充分裂解细胞,经过细胞破碎仪和煮沸后,使用BCA测定试剂盒对蛋白浓度进行定量.取30 μg总蛋白样品进行SDS-PAGE垂直电泳,电泳结束后,将蛋白转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉将膜封闭,与一抗过夜孵育,第二天孵育二抗,使用ECL蛋白印迹检测试剂进行化学发光检测和拍照.

1.2.4 克隆形成实验

将500个/孔SW480细胞接种在6孔板中,待贴壁后加相应的药物或抑制剂处理,于37℃孵育约2周.然后将细胞用PBS洗涤2次并用0.05%结晶紫溶液染色,直至看到紫色清晰的克隆细胞团,然后对六孔板进行拍照保存.

1.2.5 核型分析实验

加药处理之后的SW480细胞用秋水仙碱处理以将细胞停滞在中期,然后于室温下细胞用低渗溶液孵育20 min,用现配好的固定液(甲醇:醋酸=3:1)固定,用吉姆萨溶液染色并在显微镜下扫描有丝分裂细胞.使用Image Pro 7.0(Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA)检测图像,并对每个中期细胞中的染色体进行计数和分析.

1.2.6 免疫荧光

将加药处理过后的SW480细胞,按照 3×10^4 个/孔接种到12孔板中,待爬片之后,PBS洗涤2次,用4%甲醛固定30 min,加入Triton X-100以通透细胞.载玻片用3% BSA封闭,然后与一抗过夜孵育,第二天孵育荧光二抗,然后用DAPI染色,在荧光显微镜下观察.

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

将 1×10^5 个/孔SW480细胞接种在6孔板中,待药物或抑制剂处理时间结束后,收获所有细胞,并根据制造商的方案使用凋亡检测试剂盒.简而言之,用预冷的PBS洗涤细胞,重悬于结合缓冲液中.然后细胞用Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)染色,室温避光孵育15 min,流式细胞仪分析.PI阳性和Annexin V阴性染色的细胞计为坏死细胞.仅具有Annexin V阳性染色或同时具有Annexin V和PI阳性染色的细胞被认为分别经历了早期或晚期细胞凋亡.具有PI和Annexin V阴性染色的细胞被鉴定为正常.

1.2.8 动物实验

BALB/c裸鼠购自百奥赛图公司,实验动物均饲养于南京师范大学实验动物中心(SPF级).所有活体动物实验都得到了南京师范大学动物实验伦理委员会的批准(IRB#2020-0047).

4周龄BALB/c裸鼠右侧背部皮下注射 2×10^6 个SW480细胞.每3 d用卡尺测量肿瘤大小,并根据二维测量计算肿瘤大小,在肿瘤体积达到 $50 \text{ mm}^3 \sim 70 \text{ mm}^3$ 时,将小鼠随机分组,阿霉素(2 mg/kg小鼠体重)和SC13(5 mg/kg小鼠体重)腹腔内给药.肿瘤体积(mm^3)计算为长度 \times 宽度 $^2/2$.在实验结束时,处死小鼠,分离并拍照肿瘤,将皮下肿瘤组织用多聚甲醛固定一周后制成石蜡切片.

1.2.9 免疫组化实验

肿瘤组织离体后尽快放入4%多聚甲醛中固定,经梯度脱水后进行石蜡包埋和切片,切片依次进行烘片,二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、通透及封闭内源性过氧化物酶、微波高温抗原修复、血清封闭、一抗孵育、二抗孵育、苏木素复染、梯度酒精脱水、中性树脂封片,倒置荧光显微镜观察并拍照.

1.2.10 统计分析

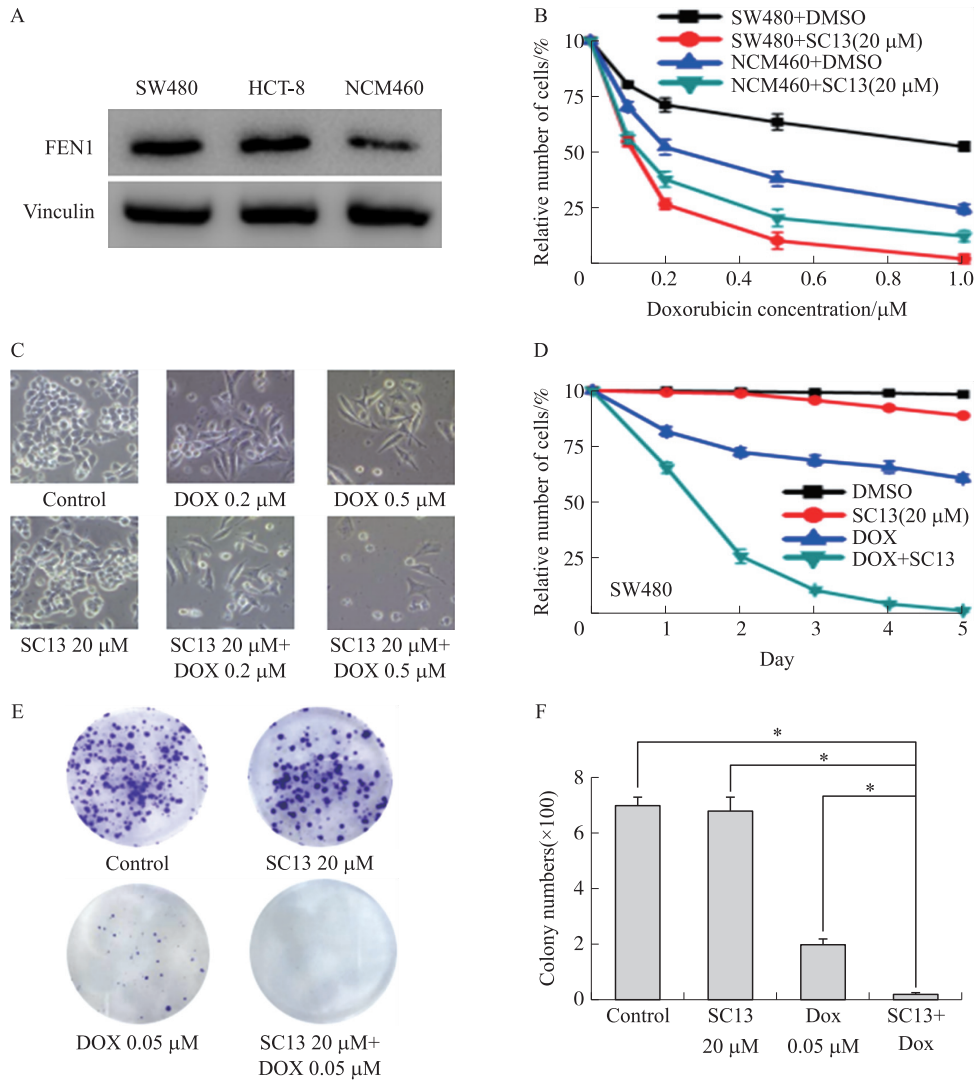
所有试验均执行至少3次独立重复试验,以获取具有统计学意义的实验数据.实验数据分析及作图使用Graphpad Prism软件分析,以($\text{Mean} \pm \text{SD}$)表示,采用 t 检验的方法分析两组数据之间的差异,多组间比较采用one way ANOVA方法进行统计分析.图片数据使用Photoshop软件和Image J软件进行处理分析,并用GraphPad Prism软件对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 代表组别之间有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 SC13使结直肠癌细胞对阿霉素敏感

研究表明,DNA修复通路中的蛋白可以作为癌症治疗的靶点^[15],所以猜测FEN1抑制剂SC13可以通过诱导DNA损伤使结肠癌细胞对化疗药物敏感.为了验证这一想法,检测了FEN1在结直肠癌细胞

SW480 和 HCT-8 中的表达,研究表明,与正常人结肠上皮细胞 NCM460 相比,FEN1 在癌细胞中的表达较高(图 1A). 接下来检测 SC13 和阿霉素联合抑制肿瘤细胞的能力,结果显示,阿霉素(图 S1A)与 SC13(图 S1B)对 SW480 结直肠癌细胞的抑制显示出协同作用(图 1B). 相反,由于 FEN1 在正常细胞中低表达,所以正常上皮细胞 NCM460 对联合治疗的敏感性大大减弱(图 1B). 此外,阿霉素和 SC13 的协同作用通过等效线图法得到证实,如图 S2 所示. 另一种结直肠癌细胞 HCT-8 的结果表明,联合效应不是细胞特异性表型(图 S3). SC13 和阿霉素单独处理或其组合处理 SW480 细胞,其典型细胞形态和数量如图 1C 所示. 此外,联合处理 SW480 癌细胞,其抑制效果呈时间依赖性,如图 1D 所示. 为了确认上述数据,还进行了克隆形成实验检测. 如图 1E-1F 所示,相较于阿霉素和 SC13 单独处理,两者联合对 SW480 细胞的抑制更加明显.



A: Western blot 检测结直肠癌细胞中 FEN1 表达情况;B:SW480 和 NCM460 细胞的药物敏感性测定;C:药物或抑制剂处理 48 h 后 SW480 的细胞形态和数量分析;D:药物或抑制剂对 SW480 细胞抑制的时间依赖性分析;E-F:药物或抑制剂对 SW480 细胞的克隆形成影响分析. * $P<0.05$.

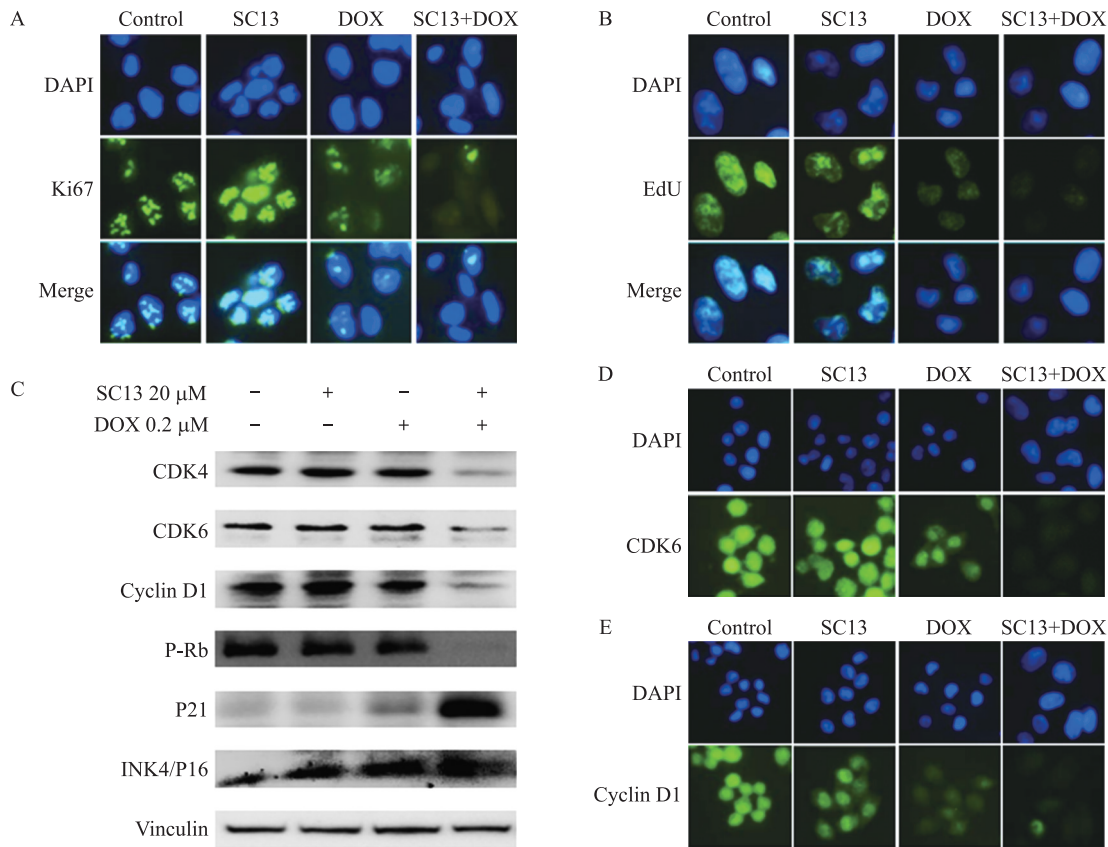
图 1 SC13 和阿霉素单独处理或其联合处理对结直肠癌细胞的抗增殖作用

Fig. 1 Anti-proliferative effects of SC3 or doxorubicin alone and in combination on colorectal cancer cells

2.2 SC13 和阿霉素联合治疗,通过激活 cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 通路诱导细胞周期停滞

为了探索可能的机制,本研究分析了 SC13 和阿霉素单独处理或其组合处理 SW480 细胞后细胞周期的变化. Ki67 是一种成熟的细胞增殖标记物,通过免疫荧光检测(图 2A),表明在 SC13 和阿霉素联合处理 SW480 细胞后,细胞增殖受到显著抑制. 同时使用 EdU 细胞增殖检测试剂盒检测细胞的增殖能力,与上述结果保持一致(图 2B). 为了确认联合治疗是否诱导细胞周期停滞,检测了细胞周期蛋白(cyclin)及相关

的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的表达,结果表明,CDK4、CDK6 和 cyclinD1 的表达在阿霉素或 SC13 单独作用下略有降低,但在 SC13 和阿霉素联合治疗后显著降低(图 2C-2E). 此外,为了揭示可能的具体分子机制,分析了 INK4/P16 的基因表达,它是 CDK4/6 和视网膜母细胞瘤(Rb)通路的关键调节因子. 在大多数癌症类型中,INK4/P16 被下调以加速癌细胞生长. CDK 抑制蛋白 INK4/P16 和 P21 的表达升高和 Rb 的磷酸化降低也证实了细胞周期受到了抑制(图 2C). 表明联合治疗是通过激活 cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 诱导癌细胞中的细胞周期停滞,进而抑制癌细胞的增殖.



A:免疫荧光检测 Ki67 的表达;B:免疫荧光检测 EdU 的表达;C:Western blot 检测细胞周期相关蛋白的表达;D:免疫荧光检测 CDK6 的表达;E:免疫荧光检测 cyclinD1 的表达

图 2 SC13 和阿霉素单独处理或其组合处理后的细胞周期变化

Fig. 2 Cell cycle change following treatment with SC13 or doxorubicin alone and in combination

2.3 SC13 和阿霉素联合治疗导致癌细胞中 DNA 损伤增加

研究分析了用 SC13 和阿霉素单独处理或其组合处理后,SW480 细胞中的 DNA 损伤. 蛋白质印迹和免疫荧光的结果显示,用 SC13 和阿霉素一起处理的 SW480 细胞中, γ H2AX 表达显著升高,表明共同处理导致未修复的 DNA 双链断裂(DSB)的积累(图 3A-3C). 为支持上述数据,同时检测了 53BP1 蛋白的表达,结果与上述数据一致(图 3D-3E). 为了评估共同治疗对染色体完整性和稳定性的影响,分析了中期细胞核的染色体畸变. 联合治疗组表现出显著增加的染色体片段和断裂水平(图 3F-3G). 上述数据表明,SC13 和阿霉素联合会导致癌细胞中未修复的 DSB 的积累和染色体断裂.

2.4 SC13 和阿霉素联合治疗促进癌细胞凋亡

为了确定 SC13 和阿霉素联合治疗是否促进了细胞凋亡,用 Annexin V-FITC 和 PI 进行双重染色. 如图 4A 和 4B 所示,单药治疗组仅诱导轻微的细胞凋亡,但联合治疗导致细胞凋亡率增多. 为了解联合治疗诱导细胞凋亡的机制,检测了 SW480 细胞中促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的表达. 如图 4C 所示,SC13 和阿霉素联合处理下调了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,同时上调了促凋亡蛋白 Bax 的表达.

2.5 SC13 可以增强阿霉素在小鼠体内的抗肿瘤效应

为了评估 SC13 和阿霉素联合治疗在体内的抗肿瘤效果,使用了 SW480 异种移植模型. 将 SW480 细

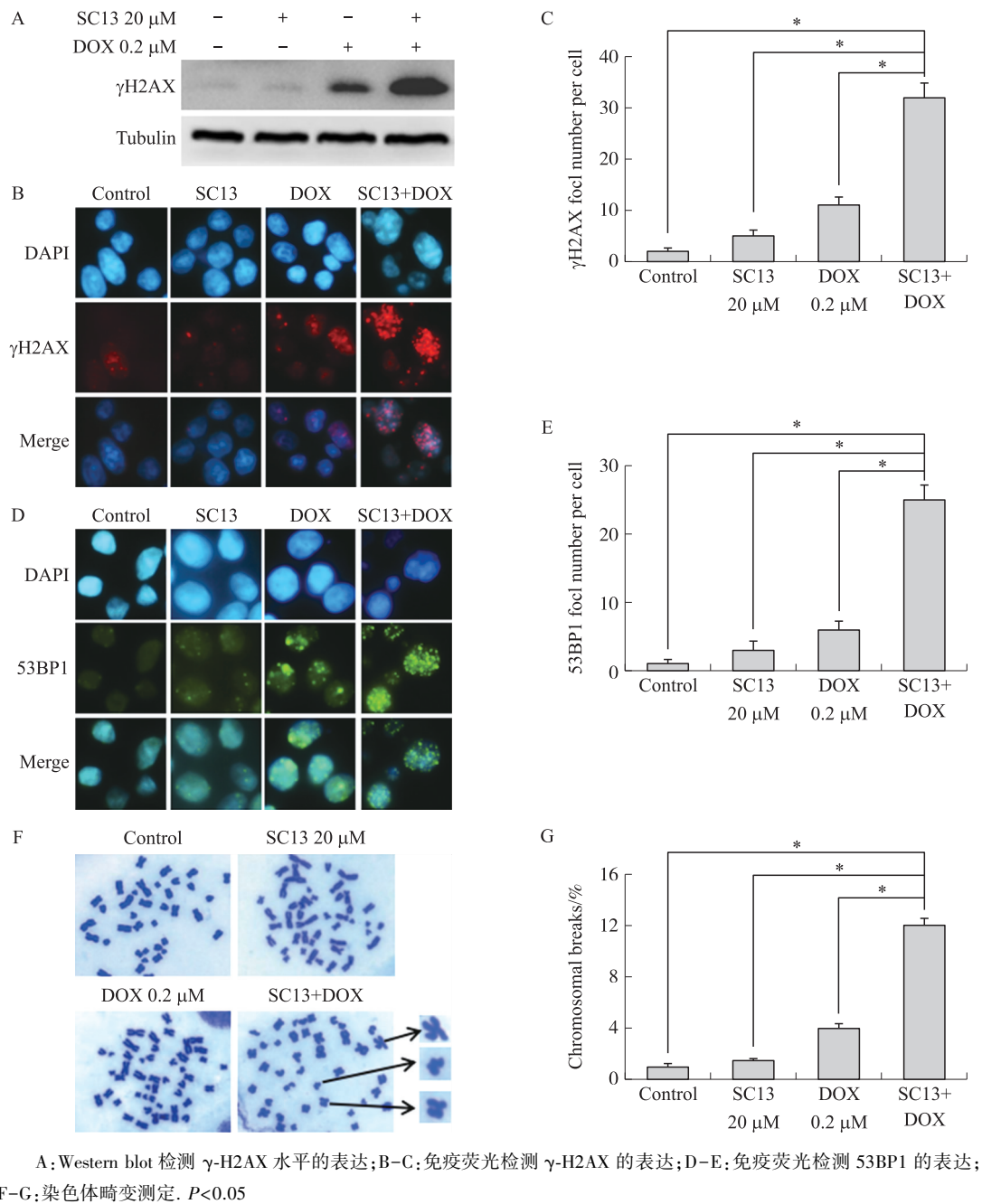
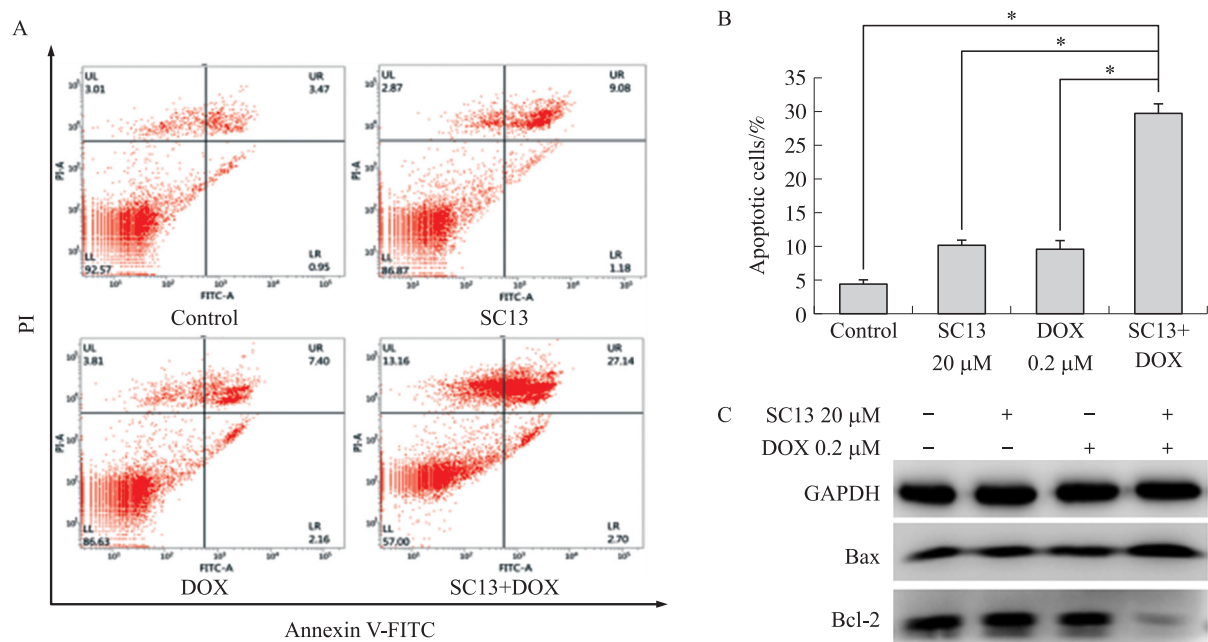


图 3 SC13 和阿霉素单独处理或其组合处理后对 SW480 细胞诱导的 DNA 损伤

Fig. 3 DNA damage induced by SC13 or doxorubicin alone and in combination on SW480 cells

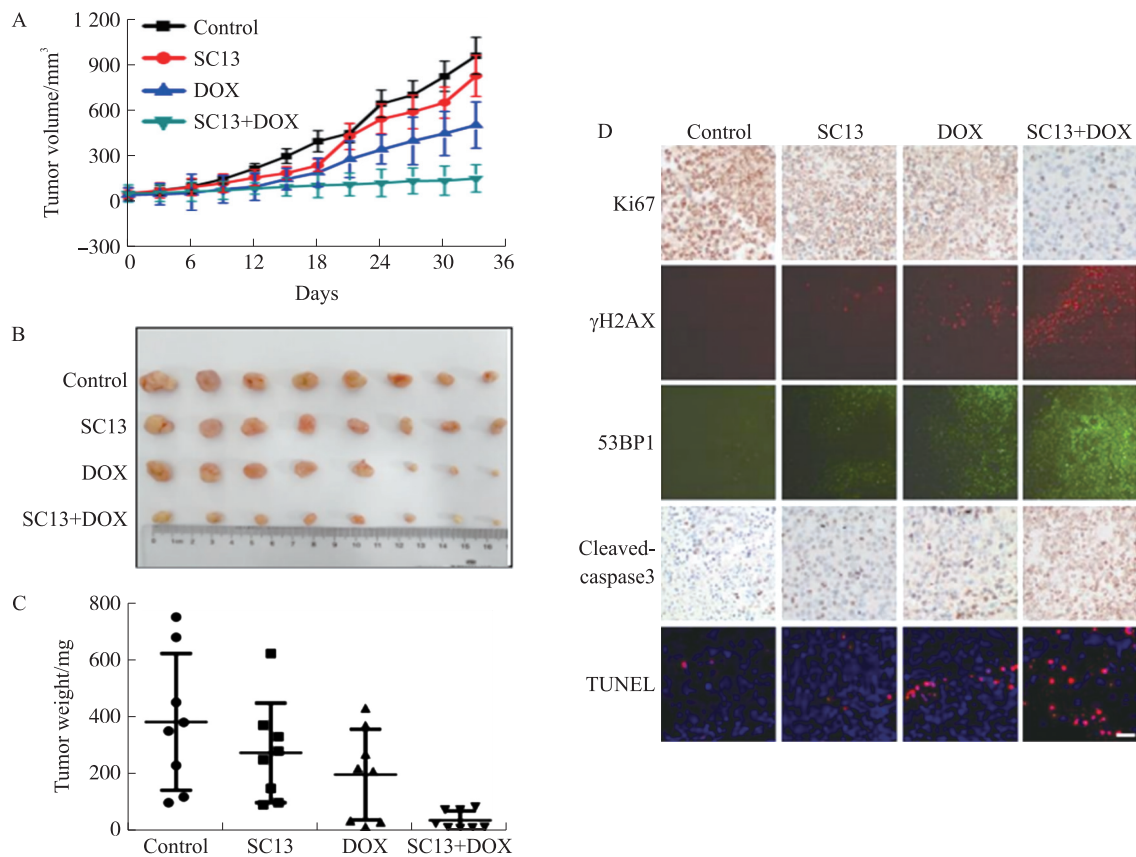
胞皮下注射到裸鼠的右侧. 当肿瘤体积达到 50 mm^3 时, 将小鼠随机分为 4 组. 两周后, 每两天对荷瘤小鼠腹腔注射溶剂、阿霉素 (2 mg/kg)、SC13 (5 mg/kg) 或联合治疗 (2 mg/kg 阿霉素+5 mg/kg SC13), 持续 5 次, 监测肿瘤体积 33 d. 如图 5A 所示, 在对照组中观察到肿瘤体积随着时间增加, 单独使用 SC13 或阿霉素导致肿瘤生长有所缓慢, 而 SC13 和阿霉素联合治疗显著抑制了肿瘤的生长, 此外小鼠的肿瘤大小和重量记录也与上述结果一致 (图 5B-5C). 为了阐明体内联合治疗的抗肿瘤作用机制, 进行了免疫组织化学和组织免疫荧光分析, 结果表明联合治疗组 Ki67 显著降低, 说明 SC13 和阿霉素的联合治疗显著抑制了肿瘤的生长. 此外, 联合组中 γ H2AX 和 53BP1 的阳性染色率显著高于其他组, 说明 SC13 和阿霉素的联合治疗显著促进了肿瘤的 DNA 损伤. 同时 cleaved-caspase3、TUNEL 也显著高于单一治疗组, 说明联合治疗后, 肿瘤细胞发生了显著的细胞凋亡 (图 5D). 所有这些数据表明, 联合治疗在体内和体外条件下增强了抗肿瘤作用. 总而言之, 目前的数据为克服癌细胞耐药性提供了另一种策略, 如图 6 所示.



A: 代表性流式细胞仪点图显示 SW480 细胞的凋亡水平; B: SW480 细胞在不同处理下发生凋亡的百分比; C: Western blot 检测不同处理后凋亡相关蛋白的表达水平。* $P < 0.05$ 。

图 4 细胞凋亡检测

Fig. 4 Cell apoptosis detection



A: 治疗过程中小鼠肿瘤生长变化情况; B: 肿瘤体积大小; C: 肿瘤的平均重量; D: 肿瘤样本的免疫组化和免疫荧光的代表性显微照片。

图 5 阿霉素联合 SC13 对肿瘤异种移植物的抗肿瘤作用

Fig. 5 Antitumor effects of doxorubicin combined with SC13 on tumor xenografts

2.6 讨论

结直肠癌(CRC)是最具侵袭性的癌症之一,大约一半的结直肠癌患者发生局部复发或远处转移,甚至脑转移,化疗仍然是癌症治疗最有力的方法之一^[23]. 在过去十年中,人们一直研究克服化疗耐受性和耐药性的方法. 据报道,为了降低阿霉素的毒性,研究者们开发出了基于脂质体的各种药物递送系统^[24]. 为了克服阿霉素的耐药性,研究者们尝试将阿霉素与其他抗肿瘤化合物联合使用,例如得知替莫唑胺可以通过抑制癌细胞中的 P-糖蛋白表达来逆转阿霉素耐药性^[25]. 同时研究表明, MicroRNA-522 可以通过靶向 ABCB5 来逆转阿霉素诱导的结肠癌细胞 HT29 的耐药性^[26].

阿霉素发挥其促凋亡作用的机制归因于其干扰 DNA 功能和诱导 DNA 损伤的能力. 据报道,FEN1 在不同的癌症类型中过度表达,降低 FEN1 表达可能会影响癌细胞的 DNA 修复能力. 而癌细胞发生化疗耐药性,一定程度上是因为其强大的 DNA 修复能力和增殖能力.

3 结论

本研究证明了 FEN1 在结直肠癌中过表达,这暗示 FEN1 抑制剂 SC13 可能会增加结肠癌细胞对阿霉素的敏感性. 研究结果表明,SC13 与低剂量阿霉素联合会导致未修复的 DSB 积累,同时上调 P16/INK4 和 CDK 抑制蛋白 p21,最终导致 CDK4/6 和 cyclinD1 表达下降,进而阻滞细胞周期进程. 综上,SC13 和阿霉素的共同治疗可以激活 cyclinD-CDK4-6/INK4/Rb 信号通路,并有效诱导癌细胞凋亡,这可能是结肠癌治疗的潜在策略.

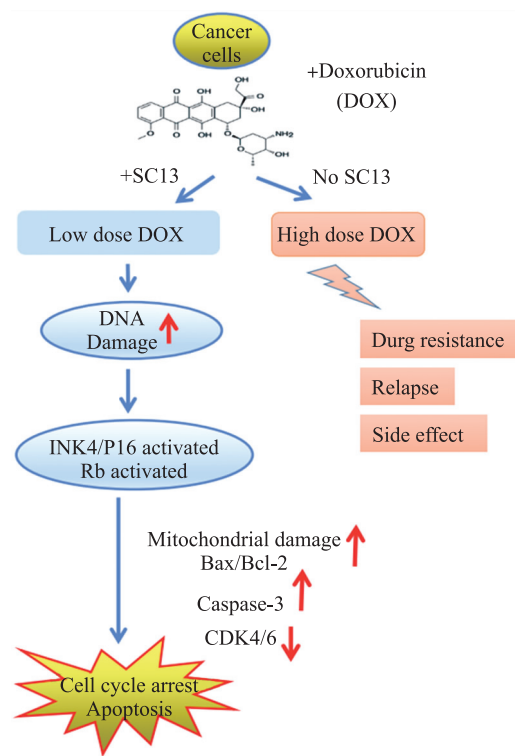


图 6 结肠癌治疗新策略的示意图
Fig. 6 A schematic representation of a novel strategy for colon cancer therapy

[参考文献]

[1] SUNG J J Y, LAU J Y, GOH K L, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia; implications for screening[J]. Lancet oncology, 2005, 6(11): 871-876.

[2] WANG J, LUO L, WANG D, et al. Combination adjuvant chemotherapy with targeted drugs for treatment of colorectal cancer: A network meta-analysis[J]. Journal of cellular biochemistry, 2018, 119(2): 1521-1537.

[3] KWAK M S, YU S J, YOON J H, et al. Synergistic anti-tumor efficacy of doxorubicin and flavopiridol in an *in vivo* hepatocellular carcinoma model[J]. Journal of cancer research and clinical oncology, 2015, 141(11): 2037-2045.

[4] LEI H, WANG X, WU C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations[J]. Journal of molecular graphics & modelling, 2012, 38: 279-289.

[5] XUE J P, WANG G, ZHAO Z B, et al. Synergistic cytotoxic effect of genistein and doxorubicin on drug-resistant human breast cancer MCF-7/Adr cells[J]. Oncology reports, 2014, 32(4): 1647-1653.

[6] FORREST R A, SWIFT L P, REPHAELI A, et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation[J]. Biochemical pharmacology, 2012, 83(12): 1602-1612.

[7] MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, et al. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity[J]. Pharmacological reviews, 2004, 56(2): 185-229.

[8] KOZOVSKA Z, GABRISOVA V, KUCEROVA L. Colon cancer; Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2014, 68(8): 911-916.

[9] LUEPERTZ R, WAETJEN W, KAHL R, et al. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells[J]. Toxicology, 2010, 271(3): 115-121.

[10] QU J, ZHAO L, ZHANG P, et al. MicroRNA-195 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug doxorubicin

- by targeting the first binding site of BCL2L2 mRNA[J]. *Journal of cellular physiology*,2015,230(3):535–545.
- [11] MOHAJERI M, SAHEBKAR A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance; A review[J]. *Critical reviews in oncology hematology*,2018,122:30–51.
- [12] SHERR C J, BEACH D, SHAPIRO G I. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy[J]. *Cancer discovery*,2016,6(4):353–367.
- [13] CANEPA E T, SCASSA M E, CERUTI J M, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions[J]. *Iubmb life*,2007,59(7):419–426.
- [14] PANDEY K, AN H J, KIM S K, et al. Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review[J]. *International journal of cancer*,2019,145(5):1179–1188.
- [15] HELLEDAY T, PETERMANN E, LUNDIN C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy[J]. *Nature reviews cancer*,2008,8(3):193–204.
- [16] VISNES T, GRUBE M, HANNA B M F, et al. Targeting BER enzymes in cancer therapy[J]. *DNA repair*,2018,71:118–126.
- [17] CLEARY J M, AGUIRRE A J, SHAPIRO G I, et al. Biomarker-guided development of DNA repair inhibitors[J]. *Molecular cell*,2020,78(6):1070–1085.
- [18] ZHENG L, DAI H, ZHOU M, et al. Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers[J]. *Nature medicine*,2007,13(7):812–819.
- [19] ZHENG L, JIA J, FINGER L D, et al. Functional regulation of FEN1 nuclease and its link to cancer[J]. *Nucleic acids research*,2011,39(3):781–794.
- [20] LAM J S, SELIGSON D B, YU H, et al. Flap endonuclease 1 is overexpressed in prostate cancer and is associated with a high Gleason score[J]. *Bju international*,2006,98(2):445–451.
- [21] NIKOLOVA T, CHRISTMANN M, KAINA B. FEN1 is overexpressed in testis, lung and brain tumors[J]. *Anti-cancer research*,2009,29(7):2453–2459.
- [22] HE L, ZHANG Y, SUN H, et al. Targeting DNA flap endonuclease 1 to impede breast cancer progression[J]. *Ebiomedicine*,2016,14:32–43.
- [23] BROWER V. Modified gastric cancer chemotherapy: more effective, less toxic[J]. *Lancet oncology*,2015,16(16):E590–E596.
- [24] TAHOVER E, PATIL Y P, GABIZON A A. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: focus on liposomes[J]. *Anti-cancer drugs*,2015,26(3):241–258.
- [25] ZHANG R, SAITO R, SHIBAHARA I, et al. Temozolomide reverses doxorubicin resistance by inhibiting P-glycoprotein in malignant glioma cells[J]. *Journal of neuro-oncology*,2016,126(2):235–242.
- [26] YANG G, JIANG O, LING D, et al. MicroRNA-522 reverses drug resistance of doxorubicin-induced HT29 colon cancer cell by targeting ABCB5[J]. *Molecular medicine reports*,2015,12(3):3930–3936.

[责任编辑:黄 敏]