

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.02.0185

• 研究快报 •

## GW4064 激活法尼酯 X 受体抑制结肠癌细胞生长浸润及基质细胞衍生因子 1 的表达

张超峰<sup>1</sup>, 罗天航<sup>1</sup>, 钮宏文<sup>2</sup>, 邓琳<sup>2</sup>, 方国恩<sup>1\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院普通外科, 上海 200433

2. 上海中医药大学附属曙光医院急诊创伤外科, 上海 201203

**[摘要]** **目的** 探讨法尼酯 X 受体(FXR)特异性激动剂 GW4064 抑制结肠癌细胞生长浸润的机制。**方法** 体外培养人结肠癌细胞系 HT-29, 用浓度为 0、0.1、1、3、5、7、10  $\mu\text{mol/L}$  的 GW4064 分别处理 HT-29 细胞 72 h, 采用 MTT 法检测细胞活力; 用浓度为 0、1、5  $\mu\text{mol/L}$  的 GW4064 分别处理 HT-29 细胞 24 h, 用相差显微镜观察细胞形态; 用浓度为 0、1  $\mu\text{mol/L}$  的 GW4064 分别处理 HT-29 细胞 24 h, 采用细胞划痕实验检测细胞浸润的变化; 用浓度为 0、1、5  $\mu\text{mol/L}$  的 GW4064 分别处理 HT-29 细胞 24 h, 采用 PCR 检测 FXR mRNA 和基质细胞衍生因子 1(SDF-1) mRNA 表达的变化; 用浓度为 0、1、5、7  $\mu\text{mol/L}$  的 GW4064 分别处理 24 h, 采用 ELISA 法检测细胞培养上清液中 SDF-1 表达的变化。于裸鼠皮下接种 HT-29 细胞建立裸鼠成瘤模型, 灌胃给予 GW4064 或溶剂 DMSO, 16 d 后检测肿瘤生长情况及瘤体中 FXR 与 SDF-1 mRNA 的表达。**结果** GW4064 处理 HT-29 细胞后, 细胞生长受到抑制, 且呈剂量依赖性, 1、3、5、7、10  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组 HT-29 细胞的生长活力与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )相比差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。用相差显微镜观察可见 GW4064 处理 HT-29 细胞后, 细胞收缩变圆, 从瘦长的细胞向表皮样细胞改变。细胞划痕实验结果显示 GW4064 处理 HT-29 细胞后, 细胞迁移距离变短, 与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。PCR 检测结果显示 GW4064 处理后 FXR mRNA 表达呈剂量依赖性增加, 而 SDF-1 mRNA 表达则相反。ELISA 检测结果显示细胞培养上清液中 SDF-1 的表达量随着 GW4064 浓度的增加而逐渐下降, 1、5、7  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )相比差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。给予 GW4064 后, 荷瘤小鼠肿瘤体积变小, 与对照组(给予 DMSO)相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 并且瘤体内 FXR mRNA 表达增加、SDF-1 mRNA 表达减少。**结论** FXR 激活后抑制了结肠癌细胞生长浸润, 同时抑制了结肠癌细胞 SDF-1 的表达分泌。

**[关键词]** 结肠肿瘤; 法尼酯 X 受体; GW4064; 基质细胞衍生因子 1

**[中图分类号]** R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0185-06

### Activation of farnesoid X receptor by GW4064 inhibits invasive growth of colon cancer cells and expression of stromal cell-derived factor 1

ZHANG Chao-feng<sup>1</sup>, LUO Tian-hang<sup>1</sup>, NIU Hong-wen<sup>2</sup>, DENG Lin<sup>2</sup>, FANG Guo-en<sup>1\*</sup>

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Emergency and Traumatic Surgery, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism by which specific agonist of farnesoid X receptor (FXR) GW4064 inhibits the growth and invasion of colon cancer cells. **Methods** Human colon cancer cell lines HT-29 were *in vitro* cultured. After treatment with GW4064 of 0, 0.1, 1, 3, 5, 7 and 10  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h, cell viability was measured by MTT assay. After treatment with GW4064 of 0, 1 and 5  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h, the cell morphology was observed under phase contrast microscope, and the mRNA expression levels of FXR and stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) were detected by PCR. After treatment with GW4064 of 0 and 1  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h, the cell invasive ability was detected by cell scratch test. After treatment with GW4064 of 0, 1, 5 and 7  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h, the SDF-1 expression in the culture medium was detected by ELISA. Nude mouse

**[收稿日期]** 2018-10-31 **[接受日期]** 2019-02-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81472277). Supported by National Natural Science Foundation of China (81472277).

**[作者简介]** 张超峰, 博士生, 主治医师. E-mail: peakerzhang@163.com

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161589, E-mail: fanguoen@aliyun.com

tumorigenesis model was established by subcutaneous inoculation of HT-29 cells. After intragastric administration with GW4064 or DMSO for 16 d, the tumor growth and the mRNA expression of *FXR* and *SDF-1* in the tumors were determined.

**Results** GW4064 inhibited the growth of HT-29 cells in a dose-dependent manner, and there was significant difference in the cell viability of HT-29 cells between the GW4064 groups (1, 3, 5, 7 and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) and the control group (0  $\mu\text{mol/L}$ , all  $P < 0.05$ ). After treatment with GW4064, phase contrast microscopy showed contracted and rounded colon cancer cells and slender cells transforming into epidermoid cells. The cell scratch test showed that the invasion ability of the colon cancer cells was significantly reduced after treatment with GW4064 compared with the control group (0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ). PCR results showed that the mRNA expression level of *FXR* was increased in a dose-dependent manner after GW4064 treatment, while the expression of *SDF-1* mRNA changed in the opposite way. ELISA results showed that the SDF-1 expression in the cell culture supernatant was decreased with the increase of GW4064 concentrations, and there were significant differences between the GW4064 (1, 5 and 7  $\mu\text{mol/L}$ ) groups and the control group (0  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ). GW4064 significantly reduced tumor size compared with the control group (DMSO,  $P < 0.05$ ). In addition, the mRNA expression of *FXR* in the tumors was increased, and the mRNA expression of *SDF-1* was decreased. **Conclusion** The activation of FXR can inhibit the invasive growth of colon cancer cells and the expression of SDF-1.

**[Key words]** colonic neoplasms; farnesoid X receptor; GW4064; stromal cell-derived factor 1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 185-190]

流行病学调查显示,近年来我国结肠癌发病率和死亡率均有升高的趋势<sup>[1]</sup>。肠道代谢与微环境稳态失衡是结肠肿瘤发病的关键因素,高脂饮食可以增加肝脏胆汁分泌,使结肠中胆汁酸的浓度升高,从而导致肠道微环境改变。研究发现胆汁酸可以影响结肠癌的发病风险<sup>[2]</sup>,法尼酯 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 是胆汁酸的核受体,通过调控一系列基因的表达调节细胞内胆汁酸浓度,参与胆汁酸的肠肝循环,在糖、胆汁酸、胆固醇等物质的代谢过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。肠道上皮细胞的增殖、代谢及基因表达的平衡是细胞转化的关键因素,当细胞代谢平衡被破坏时,可能会引起炎症甚至诱发肿瘤。FXR 与结肠癌密切相关,其激活后可抑制结肠癌细胞的生长,其在结肠癌组织中的表达水平与患者预后有关<sup>[4]</sup>。目前 FXR 抑制结肠癌细胞生长浸润的相关机制尚不明确,因此我们设计以下实验进行探讨。

## 1 材料和方法

1.1 细胞、试剂与实验动物 人结肠癌细胞株 HT-29 购自上海慧颖生物科技有限公司,胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养液和磷酸盐缓冲液购自美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 购自美国 Sigma 公司,FXR 特异性激动剂 GW4064 购自英国 Tocris 公司,细胞划痕实验专用培养插件培养皿购自德国 IBIDI 公司,TRIzol 抽提试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司,PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,基质细

胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司。裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0005]。

1.2 细胞培养 HT-29 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养,当细胞融合度达到 70%~80% 时用 0.05% 胰酶消化传代。

1.3 MTT 法检测结肠癌细胞增殖情况 将 GW4064 溶解于 DMSO,制成不同浓度的 GW4064 溶液,将 HT-29 细胞悬液按  $7 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔板,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 24 h 后,将培养液换成含 1% FBS 的 DMEM 培养液 (每孔 200  $\mu\text{L}$ )。将细胞分为 7 组,分别加入不同浓度的 GW4064 (0、0.1、1、3、5、7、10  $\mu\text{mol/L}$ ),每组重复 5 孔。培养 72 h 后,各孔分别加入 20  $\mu\text{L}$  5 g/L 的 MTT,继续培养 4 h。然后弃培养液,各孔内均加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,用酶标仪检测 570 nm 波长处光密度 ( $D$ ) 值。计算细胞活力和细胞半数抑制浓度 (half maximal inhibitory,  $\text{IC}_{50}$ )。

1.4 于相差显微镜下观察细胞形态学变化 将 HT-29 细胞悬液按  $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于 12 孔板。用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 24 h 后,将培养液换成含 1% FBS 的 DMEM 培养液 (每孔 500  $\mu\text{L}$ )。将细胞分为 3 组,分别加入不同浓度的 GW4064 (0、1、5  $\mu\text{mol/L}$ ),培养 24 h 后,用相差显微镜 (Nikon Eclips TE300) 在 20 $\times$  的视野下观察细胞的形态学变化。

1.5 细胞划痕实验检测细胞浸润能力 将消化好的 HT-29 细胞按  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板, 注意不要晃动培养皿, 以防止细胞贴壁不均匀。用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 24 h 后, 撕除细胞划痕插件培养皿底部的保护胶带, 将培养液换成含 1% FBS 的 DMEM 培养液 1 mL 并将细胞分为 2 组, 分别加入不同浓度的 GW4064 (0、1  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后, 采用 IBIDI 公司的伤口愈合分析软件统计细胞的迁移距离。

1.6 PCR 检测细胞中 *FXR*、*SDF-1* mRNA 的表达 将 HT-29 细胞悬液以  $4 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板中并分为 3 组, 分别加入不同浓度的 GW4064 (0、1、5  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后, 提取 RNA, 用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。以 2  $\mu\text{g}$  cDNA 为模板, 加入引物进行 PCR。引物序列: 内参照 *GAPDH* 上游引物 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3', 下游引物 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'; *FXR* 上游引物 5'-AAC AAT CCA AGG AGG TAG AAG AC-3', 下游引物 5'-GAA GAA ATC CAG GAA ACT AAG AG-3'; *SDF-1* 上游引物 5'-GCA GCC TTT CTC TTC TTC TGT C-3', 下游引物 5'-ACT CCA AAC TGT GCC CTT CA-3'。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物与 DNA 上样缓冲液混匀后放入凝胶中电泳, 恒压 80 V, 50 min 后用紫外灯观察, 并用凝胶扫描仪进行拍照。用 BandScan 5.0 软件分析电泳条带灰度值, 以目的基因与内参基因灰度值的比值表示目的基因的相对表达量。

1.7 ELISA 法检测细胞培养上清液中 SDF-1 的表达 将 HT-29 细胞悬液按  $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于 24 孔板并分为 4 组, 分别加入不同浓度的 GW4064 (0、1、5、7  $\mu\text{mol/L}$ ), 培养 24 h 后, 取细胞培养上清液 100  $\mu\text{L}$ , 用 ELISA 试剂盒检测 SDF-1 水平。具体步骤为: 在各反应孔中加入 100  $\mu\text{L}$  一抗溶液, 置 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, 用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次; 在各反应孔中加入新鲜稀释的酶标抗体 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, 用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次; 在各反应孔中加入临用时配制的四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 底物溶液 200  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  30 min; 在各反应孔中加入硫酸 50  $\mu\text{L}$ , 用酶标仪测定 450 nm 波长处 *D* 值, 计算 SDF-1 的相对表达量。

1.8 裸鼠皮下肿瘤种植模型的建立 在无菌环境下, 用乙醇消毒接种部位, 将预先配制好的含

$1 \times 10^7$  个 HT-29 细胞的细胞悬液接种于裸鼠体侧稍靠上的部位, 2 周后随机分为对照组和 GW4064 组, 每组 10 只。GW4064 处理组给予 GW4064 灌胃, 30 mg/kg, 每 4 d 1 次; 对照组同法给予等体积 DMSO。给药 16 d 后处死小鼠, 处死前 4 h 除正常饮食外不再给药。处死后取出肿瘤组织拍照、测量体积, 用 PCR 法检测肿瘤组织中 *FXR* 及 *SDF-1* mRNA 的表达。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用两样本 *t* 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 结肠癌细胞增殖结果 0、0.1、1、3、5、7、10  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组 HT-29 细胞活力分别为 ( $101.80 \pm 2.50$ )%、( $96.64 \pm 2.33$ )%、( $76.43 \pm 3.81$ )%、( $61.70 \pm 4.31$ )%、( $47.72 \pm 5.21$ )%、( $5.34 \pm 3.57$ )%、( $2.61 \pm 2.11$ )%, 其中 1、3、5、7、10  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组细胞活力与对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$ ) 相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 72 h 细胞  $\text{IC}_{50}$  为 4.83  $\mu\text{mol/L}$ 。表明 GW4064 对 HT-29 细胞的生长产生抑制作用, 并呈现剂量依赖关系, 即随着浓度增加, GW4064 对 HT-29 细胞生长的抑制作用增强, 当 GW4064 浓度超过 5  $\mu\text{mol/L}$  时细胞活力急剧下降, 细胞毒性增加。

2.2 细胞形态学变化 0、1、5  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 处理 HT-29 细胞 24 h 后, 随着 GW4064 浓度的增加, 细胞收缩变圆, 从瘦长的细胞向表皮样细胞转变, 表明细胞生长浸润受到抑制。见图 1。

2.3 细胞划痕实验结果 0  $\mu\text{mol/L}$  (对照组) 和 1  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 分别处理 HT-29 细胞 24 h 后, 细胞迁移距离分别为 ( $150.00 \pm 6.35$ )  $\mu\text{m}$ 、( $97.00 \pm 13.21$ )  $\mu\text{m}$ , 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

2.4 细胞中 *FXR*、*SDF-1* mRNA 表达 PCR 检测结果 (图 3) 显示, 用不同浓度的 GW4064 处理 HT-29 细胞 24 h 后, 1、5  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组 *FXR*、*SDF-1* mRNA 的表达与对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$ ) 相比差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 1  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组和 5  $\mu\text{mol/L}$  GW4064 组间 *FXR* mRNA、*SDF-1* mRNA 的表达差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。表明 *FXR* mRNA 表达呈剂量依赖性增加, 而 *SDF-1* mRNA 表达却呈剂量依赖性降低。

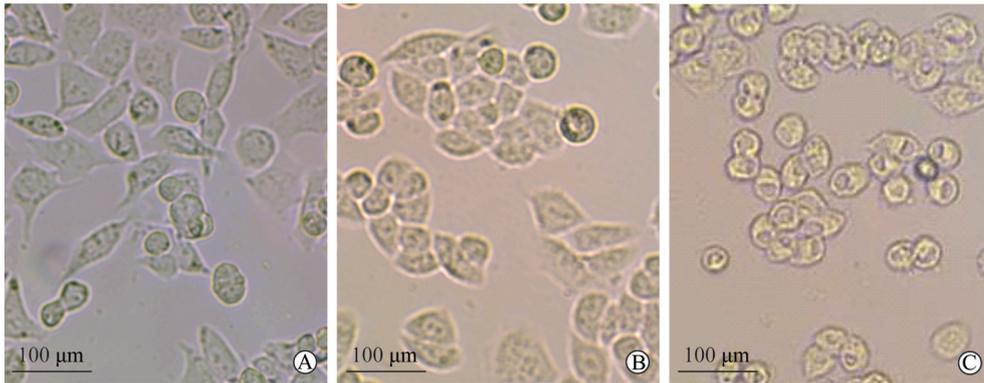


图1 GW4064处理后结肠癌细胞HT-29的形态学改变

Fig 1 Morphological changes of colon cancer cell HT-29 after GW4064 treatment

A: Control (0 μmol/L GW4064) group; B: 1 μmol/L GW4064 group; C: 5 μmol/L GW4064 group

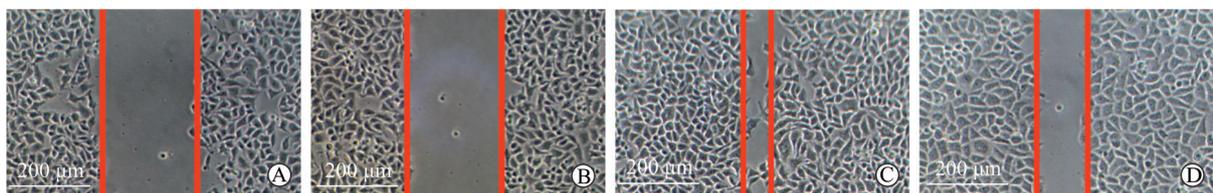


图2 细胞划痕实验结果

Fig 2 Results of cell scratch test

A, C: Control (0 μmol/L GW4064) group; B, D: 1 μmol/L GW4064 group; A, B: 0 h; C, D: 24 h

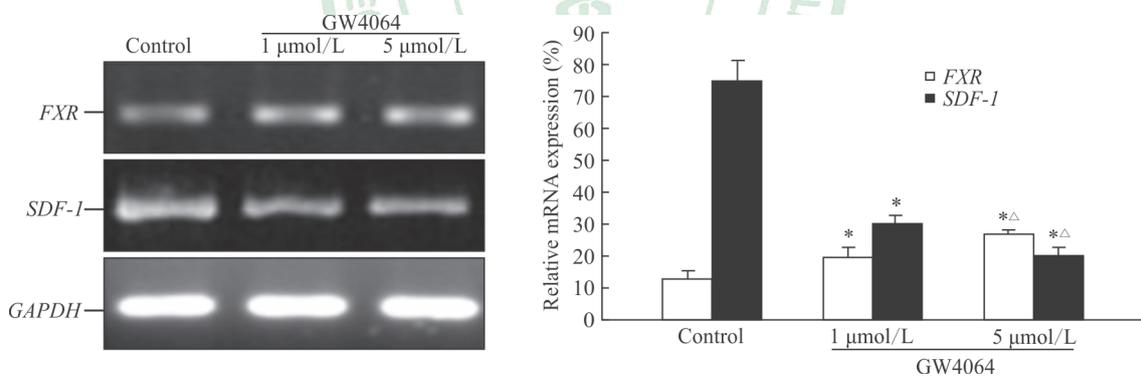


图3 PCR检测GW4064对结肠癌细胞HT-29中FXR、SDF-1 mRNA表达的影响

Fig 3 Effects of GW4064 on mRNA expression levels of FXR and SDF-1 in colon cancer cell HT-29 by PCR

FXR: Farnesoid X receptor; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

\* $P < 0.05$  vs control (0 μmol/L GW4064) group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs 1 μmol/L GW4064 group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

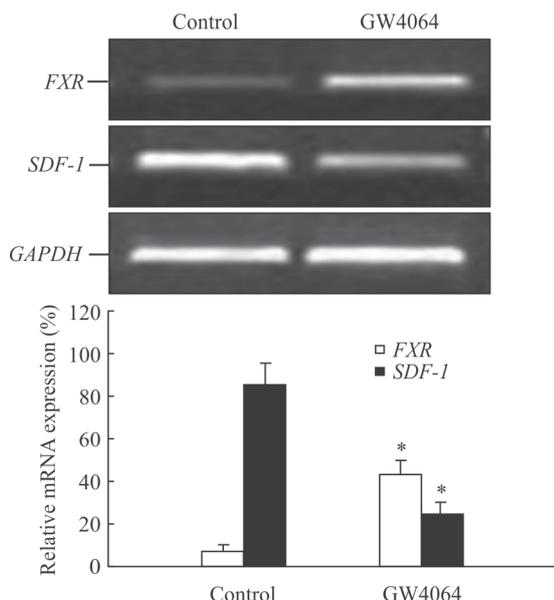
2.5 细胞培养上清液中 SDF-1 的表达 0、1、5、7 μmol/L GW4064 处理 HT-29 细胞 24 h 后, 细胞培养上清液中 SDF-1 的表达量分别为 (100.00 ± 2.41) %、(94.42 ± 7.35) %、(73.25 ± 6.11) % 和 (24.18 ± 10.33) %, 表明 SDF-1 的表达随着 GW4064 浓度的增加而下降。1、5、7 μmol/L GW4064 组与对照组 (0 μmol/L) 比较, 差异均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05)。

2.6 裸鼠肿瘤种植模型结果 见图 4。对照组 (DMSO) 及 GW4064 组肿瘤体积分别为 (840.31 ± 172.96) mm<sup>3</sup>、(266.14 ± 107.16) mm<sup>3</sup>, 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PCR 检测结果 (图 5) 显示, GW4064 组肿瘤组织中 FXR mRNA 表达升高, 而 SDF-1 mRNA 表达降低, 与对照组 (DMSO) 比较差异均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05)。



图 4 裸鼠肿瘤种植结果

Fig 4 Tumor implantation in nude mice

图 5 荷瘤小鼠肿瘤组织中 *FXR*、*SDF-1* mRNA 的表达Fig 5 mRNA expression of *FXR* and *SDF-1* in tumor tissues of tumor-bearing mice

FXR: Farnesoid X receptor; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \* $P < 0.05$  vs control (DMSO) group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

我国结直肠癌发病率由 2000 年的 16.1/10 万上升至 2013 年的 17.06/10 万<sup>[1]</sup>。目前结肠癌多采用以外科手术为主的多学科治疗, 但仍有大量患者死于结肠癌转移。即使行结肠癌根治术, 依然有 25%~40% 的患者发生异时性肝转移<sup>[5]</sup>。因此, 进一步阐明结肠癌的浸润转移机制成为当务之急。

近年来, 机体代谢及微环境与肿瘤关系的研究逐渐成为热点, 而 FXR 与肠道的代谢及微环境均相关<sup>[6]</sup>, 故 FXR 在结直肠癌中的作用也成为研究方向。在 FXR 基因敲除小鼠模型中, 小鼠发生慢性结肠炎、癌变风险明显提高; 但激活 FXR 可以降低慢性结肠炎小鼠模型肠道上皮细胞增殖及炎症<sup>[7-8]</sup>。De Gottardi 等<sup>[9]</sup>研究发现, 结肠腺瘤、结肠癌组织与正常结肠黏膜相比, FXR mRNA 的表达下降, 且 FXR 表达的高低与结肠癌的分型及分期明显相

关。Lax 等<sup>[10]</sup>研究也进一步证实, 结肠癌的分期及患者预后与 FXR 的表达呈负相关。在前期研究中, 我们对人胆管细胞癌与正常胆管组织中 FXR 的表达进行了比较, 也得到了相似的结果<sup>[11]</sup>。Smith 等<sup>[12]</sup>研究表明, 应用牛磺脱氧胆酸可以抑制小鼠肠道腺瘤的形成, 并且可促进小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, Shp)、纤维母细胞生长因子 15 (fibroblast growth factor 15, FGF15) 及肠胆汁酸结合蛋白 (ileal bile acid binding protein, IBABP) 的表达, 而这些蛋白的表达均由 FXR 调控。本研究结果也证实 FXR 的表达与结肠癌生长呈负向关系, 通过 GW4064 激活 FXR 表达, 细胞浸润生长受到抑制, 细胞活力下降, 细胞形态发生改变。

肿瘤细胞的生长、转移与周围微环境有关, 微环境的构成是由基质细胞决定。SDF-1 是重要的基质细胞衍生因子, 通过自分泌或旁分泌的环路刺激细胞增殖, 并可协同巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 促进结肠癌细胞的生长和浸润转移<sup>[13]</sup>。Margolin 等<sup>[14]</sup>在结肠癌转移小鼠模型中研究发现, 基质细胞可以促进肿瘤细胞的转移, 但敲除 *SDF-1* 基因后, 该作用被显著抑制。Wang 等<sup>[15]</sup>研究发现, SDF-1 通过激活整合素  $\alpha\beta6$  及细胞外调节蛋白激酶/E26 转录因子 1 (extracellular regulated protein kinase/E26 transformation specific 1, ERK/Ets-1) 信号通路促进结肠癌肝转移。Ma 等<sup>[16]</sup>发现沉默 *SDF-1* 基因, 可以通过丝裂原活化蛋白激酶/磷脂酰肌醇 3 激酶/激活蛋白 1 (mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3 kinase/activator protein 1, MAPK/PI3K/AP-1) 信号通路显著抑制结肠癌细胞的生长、浸润和迁移。SDF-1 还可以协同 CXC 趋化因子配体 6 (CXC chemokine ligand 6, CXCL6) 激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白 (phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR) 通路促进结肠癌细胞的迁移<sup>[17]</sup>。Stanisavljević 等<sup>[18]</sup>通过分析结肠癌患者肿瘤组织中 SDF-1 与 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 的表达发现, 预后差的患者肿瘤组织细胞核中 CXCR4 高表达、细胞质中 SDF-1 低表达, 而且 SDF-1 和 CXCR4 在结肠癌细胞的表达差异可作为结肠癌 TNM 分期 III 期患者的预后指标。由上述研究结果可见, SDF-1 在结肠癌的生长和转移中起重要作用。

本研究应用 GW4064 激活 FXR 后, 分别在 mRNA 水平与蛋白水平上检测了 SDF-1 的表达, 结果表明 SDF-1 表达受到抑制, 并呈剂量依赖

性。将 GW4064 作用于裸鼠成瘤模型,进一步验证了 FXR 与 SDF-1 表达的变化与肿瘤生长的关系。由此我们认为, GW4064 通过激活 FXR 的表达抑制结肠癌细胞的生长浸润, FXR 可能是通过降低 SDF-1 的表达起作用。Peng 等<sup>[19]</sup>研究证实 GW4064 通过 FXR 作用于结肠癌细胞,可以抑制结肠癌的形成及生长,这与本研究结果一致。高脂饮食可导致结肠癌风险增加,刺激肝脏合成分泌胆汁盐增多,使结肠内胆汁酸浓度增加,肠道内胆汁酸平衡被破坏。而 FXR 可以平衡结肠细胞胆汁酸水平,激活 FXR 可以促进胆汁酸的重吸收,胆汁酸水平增高后抑制了结肠细胞表达 FXR<sup>[20]</sup>,从而促进结肠细胞的增殖转化。

综上所述,本研究结果表明 GW4064 可以抑制结肠癌细胞的浸润生长。其可能机制为通过激活 FXR 降低了 SDF-1 的表达,从而抑制了结肠癌细胞的生长浸润。提示 GW4064 有望成为治疗结肠癌浸润、转移的重要化学药物,但其深入机制尚需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] ZHENG Z X, ZHENG R S, ZHANG S W, CHEN W Q. Colorectal cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 8455-8460.
- [2] OCVIRK S, O'KEEFE S J. Influence of bile acids on colorectal cancer risk: potential mechanisms mediated by diet-gut microbiota interactions[J]. *Curr Nutr Rep*, 2017, 6: 315-322.
- [3] DI CIAULA A, WANG D Q, MOLINA-MOLINA E, LUNARDI BACCETTO R, CALAMITA G, PALMIERI V O, et al. Bile acids and cancer: direct and environmental-dependent effects[J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16(Suppl 1:s3-105.): s87-s105.
- [4] KOUTSOUNAS I, GIAGINIS C, THEACHARIS S. Farnesoid X receptor (FXR) from normal to malignant state[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27: 835-853.
- [5] LALMAHOMED Z S, BRÖKER M E, VAN HUIZEN N A, COEBERGH VAN DEN BRAAK R R, DEKKER L J, RIZOPOULOS D, et al. Hydroxylated collagen peptide in urine as biomarker for detecting colorectal liver metastases[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 321-330.
- [6] GADALETA R M, CARIELLO M, SABBÀ C, MOSCHETTA A. Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851: 30-39.
- [7] MODICA S, MURZILLI S, SALVATORE L, SCHMIDT D R, MOSCHETTA A. Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 9589-9594.
- [8] MARAN R R, THOMAS A, ROTH M, SHENG Z, ESTERLY N, PINSON D, et al. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328: 469-477.
- [9] DE GOTTARDI A, TOURI F, MAURER C A, PEREZ A, MAURHOFER O, VENTRE G, et al. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49: 982-989.
- [10] LAX S, SCHAUER G, PREIN K, KAPITAN M, SILBERT D, BERGHOLD A, et al. Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130: 2232-2239.
- [11] 张超峰,王坚. 法尼酯 X 受体在胆管癌中的表达特点[J]. *外科理论与实践*, 2009, 14: 171-173.
- [12] SMITH D L, KESHAVAN P, AVISSAR U, AHMED K, ZUCJER S D. Sodium taurocholate inhibits intestinal adenoma formation in APC<sup>Min/+</sup> mice, potentially through activation of the farnesoid X receptor[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 1100-1109.
- [13] SHIN H N, MOON H H, KU J L. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  and macrophage migration-inhibitory factor induce metastatic behavior in CXCR4-expressing colon cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30: 1537-1543.
- [14] MARGOLIN D A, MYERS T, ZHANG X, BERTONI D M, REUTER B A, OBOKHARE I, et al. The critical roles of tumor-initiating cells and the lymph node stromal microenvironment in human colorectal cancer extranodal metastasis using a unique humanized orthotopic mouse model[J]. *FASEB J*, 2015, 29: 3571-3581.
- [15] WANG B, WANG W, NIU W, LIU E, LIU X, WANG J, et al. SDF-1/CXCR4 axis promotes directional migration of colorectal cancer cells through upregulation of integrin  $\alpha v \beta 6$ [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35: 282-291.
- [16] MA J, SU H, YU B, GUO T, GONG Z, QI J, et al. CXCL12 gene silencing down-regulates metastatic potential via blockage of MAPK/PI3K/AP-1 signaling pathway in colon cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20: 1035-1045.
- [17] MA J C, SUN X W, SU H, CHEN Q, GUO T K, LI Y, et al. Fibroblast-derived CXCL12/SDF-1 $\alpha$  promotes CXCL6 secretion and co-operatively enhances metastatic potential through the PI3K/Akt/mTOR pathway in colon cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 5167-5178.
- [18] STANISAVLJEVIĆ L, ABMUS J, STORLI K E, LEH S M, DAHL O, MYKLEBUST M P. CXCR4, CXCL12 and the relative CXCL12-CXCR4 expression as prognostic factors in colon cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 7441-7452.
- [19] PENG Z, RAUFMAN J P, XIE G. Src-mediated cross-talk between farnesoid X and epidermal growth factor receptors inhibits human intestinal cell proliferation and tumorigenesis[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e48461. doi: 10.1371/journal.pone.0048461.
- [20] MASSAFRA V, VAN MIL S W C. Farnesoid X receptor: a "homeostat" for hepatic nutrient metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864: 45-59.