

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.01.006

G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭的实验研究 *

冯晨晨¹ 贺琪¹ 陆文全³ 赵婧⁴ 李丹¹ 张剑² 时永全^{1,2Δ}

(1 西安医学院 陕西 西安 710021; 2 空军军医大学西京医院消化内科 肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

3 郑州大学第一附属医院消化内科 河南 郑州 450000; 4 西安交通大学第二附属医院消化内科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探讨 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1(G-protein coupled bile acid receptor 1, GPBAR1/TGR5)对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:**免疫组织化学染色方法(Immunohistochemistry, IHC)检测胃癌及癌旁组织芯片中 TGR5 表达情况;qRT-PCR 及 Western blot 检测胃癌细胞系中 TGR5 表达水平;小干扰 RNA 处理 AGS、MKN-45 胃癌细胞后构建 TGR5 敲减细胞系,慢病毒载体转染胃癌 SGC-7901 细胞构建 TGR5 过表达细胞系;CCK-8 实验、平板克隆形成实验、裸鼠皮下移植瘤实验检测 TGR5 对细胞增殖的影响;流式细胞仪检测 TGR5 对细胞周期及凋亡的影响;Transwell 实验检测 TGR5 对胃癌细胞迁移及侵袭的影响;Western blot 检测上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关分子 β -连环蛋白(β -catenin)、锌指蛋白转录因子(Snail)、E 盒结合锌指蛋白(Zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1)在 AGS、MKN-45 及 SGC-7901 胃癌细胞中的表达。**结果:**TGR5 在胃癌及癌旁组织中均有表达,胃癌组织 TGR5 高表达率(41.0%)显著高于癌旁组织(9.5%),伴肠化生癌旁组织 TGR5 高表达率(50%)显著高于不伴肠化生的癌旁组织(0%),胃癌组织 TGR5 表达与肿瘤大小相关。TGR5 在正常人胃上皮永生细胞株 GES-1 及各胃癌细胞系中均有表达。TGR5 表达敲低的 AGS 和 MKN-45 细胞增殖能力减弱、凋亡率显著升高、侵袭和迁移能力显著降低。过表达 TGR5 的 SGC-7901 细胞增殖能力增强、克隆形成能力提高、凋亡率明显减低、侵袭和迁移能力显著升高。此外,TGR5 过表达显著上调了间质细胞标志物 β -catenin、Snail、ZEB1 的表达水平。**结论:**TGR5 能够增强胃癌细胞增殖及迁移能力,并抑制细胞凋亡。TGR5 可能通过 EMT 途径介导胃癌细胞转移。

关键词:胃癌;胆汁酸;TGR5;增殖;迁移;侵袭;凋亡

中图分类号:R-73;R735;R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)01-32-11

The Study of G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 in Promoting the Proliferation, Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells*

FENG Chen-chen¹, HE Qi¹, LU Wen-quan³, ZHAO Jing⁴, LI Dan¹, ZHANG Jian², SHI Yong-quan^{1,2Δ}

(1 Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710021, China; 2 State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Gastroenterology,

Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 Department of Gastroenterology,

the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450000, China;

4 Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To explore the influence of G-protein coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1/TGR5) on malignant phenotypes of gastric cancer cells. **Methods:** The expression of TGR5 in gastric tissue microarray was analyzed with immunohistochemistry. qRT-PCR and Western blot was used to detect TGR5 expression in gastric cancer cell lines. MKN-45 and AGS gastric cancer cells were transfected with TGR5 siRNA to knockdown TGR5 expression. Ectopic expression of TGR5 in SGC-7901 cells was achieved by infection with recombinant lentivirus. CCK-8 assay, colony-forming assay and subcutaneous tumor model were used to evaluate cell proliferation. Flow cytometry was exploited to observe cell cycle and apoptosis. Transwell assay was used to test cell migration and invasion. The protein levels of β -catenin, Snail and ZEB1 were examined by Western blot. **Results:** TGR5 expression was presented in both gastric cancer and adjacent tissues, and strong expression of TGR5 was displayed in 41.0 % of gastric cancer tissues as well as 9.5 % of adjacent tissues. In addition, strong expression of TGR5 was found in 50 % of adjacent tissues with intestinal metaplasia as well as 0 % of adjacent tissues without intestinal metaplasia. The expression level of TGR5 in gastric cancer tissues was correlated to tumor size. Western blot and qRT-PCR revealed that TGR5 was expressed in both GES-1 and gastric cancer cell lines. Knock-down of TGR5 in AGS and MKN-45 cells resulted in decreased proliferation, increased apoptosis and suppressed migration and invasion. In the contrary, over-expression of TGR5 in SGC-7901 cells promoted proliferation, colony-forming ability, migration and invasion but inhibited apoptosis. Furthermore, increased expression of β -catenin, Snail and ZEB1 was exhibited in SGC-7901 cells with ectopic TGR5 expression. **Conclusions:** TGR5 could enhance the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells as well as inhibit cell

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81873554);陕西省创新人才推进计划-科技创新团队项目(2018TD-003)

作者简介:冯晨晨(1993-),女,硕士研究生,主要研究方向:胃癌发生机制与防治,电话:15592544713, E-mail: 451620705@qq.com

Δ 通讯作者:时永全,男,博士生导师,教授,主要研究方向:胃癌发生机制与防治, E-mail: shiyquan@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2021-05-28 接受日期:2021-06-24)

apoptosis. TGR5 may take a part in metastasis of gastric cancer cells through regulation of EMT pathway.

Key words: Gastric cancer; Bile acid; TGR5; Proliferation; Migration; Invasion; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-73; R735; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)01-32-11

前言

胃癌的发生涉及多种危险因素,其中包括胆汁反流等^[1]。胆汁酸是以胆固醇为原料在肝脏中合成的化合物,是胆汁反流的主要成分。胆汁酸在体内不仅参与脂质、葡萄糖、能量代谢的稳态调节,还通过胆汁酸受体介导发挥信号分子作用^[2]。G蛋白偶联受体胆汁酸受体-1 (G-protein coupled bile acid receptor 1, GPBAR1/TGR5)是一种定位于细胞膜的胆汁酸受体,属于G蛋白偶联受体家族成员^[3]。TGR5在多种肿瘤中表达异常,可能参与恶性肿瘤的发生发展。TGR5在胃癌及慢性胃炎组织中均有表达,胃癌中的表达水平明显高于慢性胃炎组织,并且TGR5表达与晚期胃癌(III-IV期)相关^[4]。此外,TGR5还参与胆汁酸诱导的细胞增殖、转移等过程^[5]。本课题组前期研究证实,TGR5在胃粘膜肠化生组织中高表达,并通过上调肝细胞核因子4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α)促进尾型同源盒2(Caudal type homebox 2, CDX2)、粘蛋白2(Mucin 2, MUC2)等多种肠型标志分子在胃上皮细胞的表达。在此基础上,本研究将检测TGR5在胃癌组织中的表达水平,并探索TGR5对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭等生物学行为的影响,为深入理解胃癌发生发展机制提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及组织芯片

人胃粘膜上皮永生化细胞GES-1及胃癌细胞系(AGS, SGC-7901, MKN-45, BGC-823, AZ-521)由本实验室保存。胃癌微阵列组织芯片购自芯超生物,两张芯片共包含105对胃癌及癌旁组织,其中含预后信息胃癌组织77例。

1.2 试剂及仪器

胎牛血清购自BIOIND公司;青霉素-链霉素-胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国Gibco公司;RPMI 1640、DMEM培养基购自美国Gibco公司;TGR5多克隆抗体及Snail、ZEB1单克隆抗体购自Abcam公司; β -catenin单克隆抗体购自CST公司;CCK-8溶液购自日本同仁;Transwell小室购自康宁公司;RNA提取及反转录试剂盒购自TAKARA公司;TGR5引物购自擎科生物;10%丙烯酰胺预混凝胶购自BIO-RAD公司;DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CFX 96实时荧光定量聚合酶链反应系统、酶标分析仪、二氧化碳培养箱为美国Thermo Forma公司产品;倒置显微镜为日本Olympus公司产品。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 GES-1及胃癌AGS细胞培养于含10%血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中。胃癌SGC-7901、MKN-45、BGC-823、AZ-521细胞培养于含有10%血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基中。在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养并传代。

1.3.2 实时荧光定量PCR 用RNA试剂盒提取细胞总RNA,

依据反转录试剂盒说明书中的操作步骤制备cDNA。反转录后的cDNA与各引物及TB green按比例混匀后进行PCR扩增。选用GAPDH作为内部对照,GAPDH上游序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3'。TGR5上游序列:5'-TACTGGTCCTGCCTCCTGTCTA-3',下游序列:5'-CCAGCAAGAGGTTGGCAAGCA-3'。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s;59℃ 30 s,共40个循环。

1.3.3 免疫组织化学染色 将石蜡包埋组织芯片放入烤片机中65℃烤片过夜。取出后依次浸泡于二甲苯及梯度乙醇溶液中脱蜡和水化。组织芯片用柠檬酸钠修复液进行修复并灭活内源性过氧化物酶。室温下血清封闭30 min后向芯片组织中滴入TGR5抗体或PBS(阴性对照),置入湿盒中4℃冰箱过夜。第二天取出湿盒,复温40 min,室温下孵育通用型二抗40 min。DAB显色后进行苏木素复染,在梯度浓度乙醇、二甲苯溶液中脱水及透明并用中性树脂封片。人正常结肠组织作为阳性对照。采用半定量方法判定组织染色情况,染色强度评分:无着色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,深褐色3分;阳性细胞百分比评分:0-5% 0分,6-25% 1分,26-50% 2分,51-75% 3分,76-100% 4分。依据两者乘积进行判定:0-5为低表达,6-12为高表达。

1.3.4 Western blot 收集处于对数生长期的细胞置于细胞裂解液中裂解并回收蛋白质。每孔按照20 μ g体系进行上样,在恒压120 v下电泳70 min。恒压2.5 v进行转膜。5%脱脂牛奶室温下封闭2 h后,将滤膜放入一抗(TGR5、 β -actin、 β -catenin、Snail、ZEB1)中并于4℃冰箱中过夜孵育。第二天取出滤膜,用TBST清洗3遍,每遍5 min。室温下孵育二抗1 h。取出条带用TBST清洗后在显影器中进行显影。

1.3.5 小干扰RNA转染及慢病毒载体感染胃癌细胞 将AGS和MKN-45胃癌细胞接种到6孔板中培养,当细胞密度达到70-80%时进行转染。将各组小干扰RNA及Lipofectamine 2000分别用Opti-EME无血清培养基按一定比例稀释后混匀并转染6 h,采用Western blot验证敲除效率(小干扰RNA序列见表1)。将SGC-7901胃癌细胞接种至6孔板中,并用TGR5重组慢病毒进行转染,嘌呤霉素筛选出稳定过表达的细胞用于后续实验。

1.3.6 CCK-8细胞增殖实验 将胃癌细胞按照1000个细胞/孔的密度接种到96孔板中。细胞培养1-5天,每天在特定时间段取出一个平板,每孔添加10 μ L CCK-8,在37℃条件下孵育2 h。在酶标仪上测量450 nm的吸光度。

1.3.7 平板克隆形成实验 待细胞生长至对数生长期时收获细胞,将胃癌细胞按照500个细胞/孔的密度接种到6孔板中,37℃条件下培养14天后取出6孔板,用PBS缓冲液清洗2遍,加入4%多聚甲醛固定20 min,然后用结晶紫染色15 min,计数细胞克隆数目。

1.3.8 构建裸鼠皮下移植瘤模型 选取4-6周雄性免疫缺陷裸鼠,随机分成两组,NC组4只,LV-TGR5组5只,在右侧腋

表 1 TGR5 小干扰 RNA 序列

Table 1 TGR5 small interfering RNA sequences

	5'-3'	3'-5'
siRNA-507	UCGUCUACUUGGCUCCCAATT	UUGGGAGCCAAGUAGACGATT
siRNA-742	CCUGUACCUCGAAGUCUAUTT	AUAGACUUCGAGGUACAGGTT
siRNA-1220	GUCGACCUGGACUUGAACUTT	AGUUCAAGUCCAGGUCGACTT
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

下处皮下注射 200 μ L 含有 3×10^6 个胃癌细胞的单细胞悬液。随后观察肿瘤生长情况,当肉眼可见皮下肿瘤时用游标卡尺测量肿瘤大小,按照体积=(长轴 $\times$ 短轴 $\times$ 2)/2 公式计算肿瘤体积,24 天后处死并取皮下肿瘤进行免疫组织化学染色。

1.3.9 流式细胞术检测细胞周期及凋亡 取对数生长期细胞,用 0.25 %胰蛋白酶常规消化并收集细胞悬液,将细胞悬液 1000 r/min 离心 5 min,弃上清,预冷 PBS 洗涤 2 遍。75 %乙醇重悬细胞并放置 4 %冰箱固定过夜。检测时,1000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤 2 遍,弃 PBS 并加入 300 μ L PI/RNase 染色试剂,室温避光 60 min,加入样本管中,用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下测定细胞各周期 DNA 含量。检测细胞凋亡时收取培养皿中细胞培养液及胰酶消化后的细胞悬液,500 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,预冷 PBS 洗涤 2 遍,并调整细胞密度为 10^6 /mL,加入 400 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后室温避光孵育 15 min,最后加入 10 μ L PI 染色液混匀后冰浴避光 5 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,其中 Q1 代表坏死细胞,Q2 代表晚期凋亡细胞,Q3 代表早期凋亡细胞,Q4 代表活细胞。

1.3.10 细胞侵袭及迁移实验 使用 Transwell 室(24-孔板)进行迁移和侵袭实验,不同之处在于后者需要包被基质胶。用无血清培养基洗涤细胞,重悬并计数。随后,将 200 μ L (5×10^4) 细胞添加到上室中,并将 600 μ L 含 20 %血清的 RPMI 1640 或 DMEM 培养基添加到下室中。24-48 h 后移去小室,PBS 清洗后用 4 %多聚甲醛固定 20 min,然后用结晶紫染色 15 min。用棉签擦拭小室内未侵袭/迁移的胃癌细胞。在倒置显微镜下随机选取 5 个视野拍照并计数。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 版统计分析软件,使用 Student's-t 检验和方差分析比较两组之间的校准差异。采用 SPSS 19.0 软件对组织芯片中 TGR5 表达水平进行分析。Pearson χ^2 检验分析 TGR5 在各组织中的表达差异及与胃癌患者临床病理参数间的相关性。Kaplan-Meier 用于分析 TGR5 与患者生存期间的关系,并绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

表 2 TGR5 在胃癌及癌旁组织中的表达

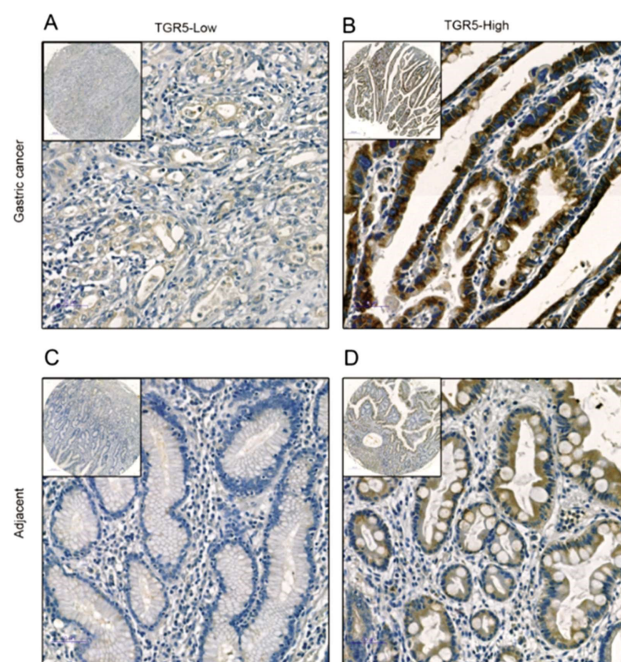
Table 2 TGR5 expression levels in GC and adjacent tissues

Tissue	No. of patients	TGR5		P
		Low(%)	High(%)	
Gastric cancer	105	62(59.0)	43(41.0)	<0.008
Adjacent	105	95(90.5)	10(9.5)	

2.1 TGR5 在胃癌组织和癌旁组织中的表达情况

2.1.1 TGR5 在胃癌组织中高表达 免疫组织化学染色结果显示:TGR5 主要定位于胃癌细胞及癌旁细胞的细胞质和细胞膜(图 1)。胃癌组织中 TGR5 高表达率为 41.0%,癌旁组织中 TGR5 高表达率为 9.5%,两组差异具有统计学意义($P < 0.008$)(表 2)。

2.1.2 TGR5 在肠化生组织中高表达 我们前期发现 TGR5 在胃粘膜肠化生组织的表达水平高于慢性胃炎组织^[4]。因此,我们进一步按照伴或不伴肠化生将癌旁组织分为两组。结果发现,伴有肠化生的癌旁组织中 TGR5 高表达率(50%)显著高于不伴肠化生的癌旁组织(0%),两组差异具有统计学意义($P < 0.001$)(表 3)。

图 1 TGR5 在胃癌及癌旁组织中的表达情况(50 $\times$ /200 $\times$)Fig.1 The expression of TGR5 in GC and adjacent tissues (50 $\times$ /200 $\times$)

Note: (A) low expression of TGR5 in GC; (B) high expression of TGR5 in GC; (C) low expression of TGR5 in adjacent; (D) high expression of TGR5 in adjacent. GC: Gastric Cancer.

表 3 TGR5 在伴和不伴肠化生癌旁组织中的表达

Table 3 TGR5 expression levels in adjacent tissues with and without IM

Tissue	No. of patients	TGR5		P
		Low(%)	High(%)	
With IM	20	10(50.0)	10(50.0)	<0.001
Without IM	85	85(100)	0(0)	

Note: IM, Intestinal Metaplasia.

2.2 TGR5 的表达与胃癌临床病理参数的关系

TGR5 在胃癌组织中的表达与肿瘤大小显著正相关。当肿瘤组织尺寸在 5 cm 以下时, TGR5 高表达率仅仅 26.8%; 肿瘤组织尺寸超过 5 cm 后, TGR5 高表达率可达 50.0%。而 TGR5 在胃癌组织中的表达与年龄、性别、病理分期、TNM 分期、AJCC 分期以及远处转移等均无关(表 4)。

表 4 TGR5 表达与胃癌患者临床病理参数的相关性

Table 4 The relationship between TGR5 expression and GC patients' clinical pathological features

Variables	No. of patients	TGR5		P
		Low(%)	High(%)	
Age(year)				0.362
<63	52	33(63.5)	19(36.5)	
≥ 63	53	29(54.7)	24(45.3)	
Gender				0.215
Male	71	39(54.9)	32(45.1)	
Female	34	23(67.6)	11(32.4)	
Pathological Stage				0.305
I - II	24	12(50.0)	12(50.0)	
III-IV	81	50(61.7)	31(38.3)	
Tumor size				0.018
<5 cm	41	30(73.2)	11(26.8)	
≥ 5 cm	64	32(50.0)	32(50.0)	
T stage				0.461
T1	2	1(50.0)	1(50.0)	
T2	12	8(66.7)	4(33.3)	
T3	56	36(64.3)	20(35.7)	
T4	35	17(48.6)	18(51.4)	
N stage				0.156
N0	20	9(45.0)	11(55.0)	
N1/N2/N3	85	53(62.4)	32(37.6)	
M stage				0.346
M0	76	47(61.8)	29(38.2)	
M1	29	15(51.7)	14(48.3)	
TNM stage				0.297
I - II	25	17(68.0)	8(32.0)	
III-IV	80	45(56.3)	35(43.8)	
AJCC stage				0.979
1-2	27	16(59.3)	11(40.7)	
3-4	78	46(59.0)	32(41.0)	

2.3 TGR5 表达与胃癌患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析表明(图2),TGR5 高表达组胃癌患者平均生存时间为 50.6 个月,低表达组胃癌患者平均生存时间为 45.6 个月,两组间无统计学差异($P=0.283$)。

2.4 TGR5 在胃癌细胞中的表达

TGR5 在 GES-1 细胞和胃癌细胞系 AGS、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、AZ-521 中均有表达(图3)。在 mRNA 水平,GES-1 表达量最高,低分化胃癌细胞系 BGC-823、MKN-45 中 TGR5 表达水平相对较高,中分化胃癌细胞系 SGC7901 表达水平较低。然而,GES-1 细胞中 TGR5 在蛋白及 mRNA 水平中存在差异,可能与转录后修饰有关。结合以上结果,选用 AGS 及 MKN-45 胃癌细胞进行小干扰 RNA 敲减试验,选用 SGC-7901 构建过表达 TGR5 细胞系。如图4所示,小干扰 RNA 序列 507 能够显著降低 AGS 细胞和 MKN-45 细胞中的 TGR5 表达水平,而小干扰 RNA 序列 742 仅降低 AGS 细胞中的 TGR5。因此,后续的实验均采用小干扰 RNA 序列 507 进行。图4还显示,慢病毒载体介导 TGR5 在 SGC-7901 细胞的过表达,为后续实验奠定了基础。

2.5 TGR5 在体内及体外促进胃癌细胞增殖

细胞增殖实验表明,TGR5 敲低后抑制 AGS 和 MKN45 细胞的增殖活性(图5A,5B),过表达 TGR5 显著增强 SGC-7901

细胞的增殖活性(图5C)。平板克隆形成实验显示,TGR5 过表达后促进 SGC-7901 细胞克隆形成(图5D)。为验证 TGR5 在体内是否调节细胞增殖,本研究构建了裸鼠皮下移植瘤模型(图6A),结果表明:TGR5 过表达组的肿瘤重量、体积、Ki-67 染色强度均明显高于对照组($P<0.05$)(图6B,6C,6D)。

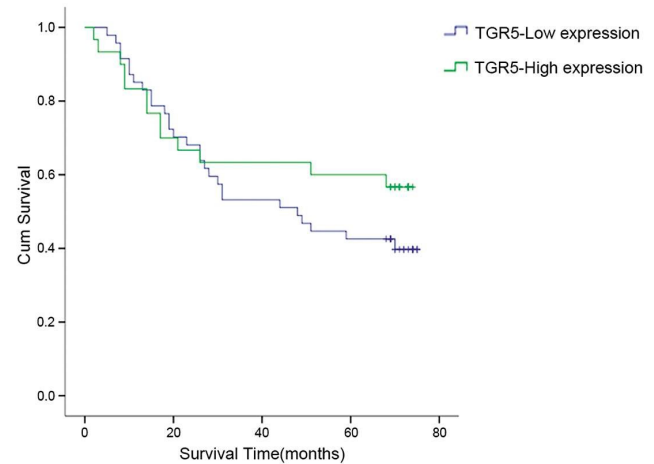


图2 胃癌患者的生存曲线

Fig.2 GC patients' survival curve

Note: Low, low expression of TGR5 in GC; High, high expression of TGR5 in GC

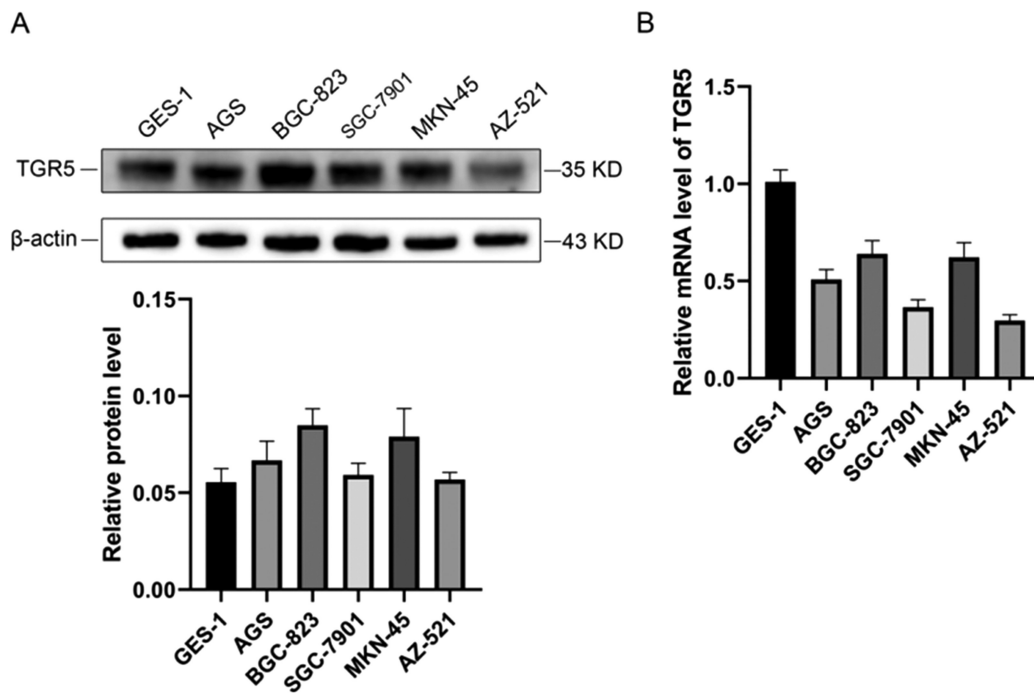


图3 Western blot(A)和 RT-PCR(B)检测 TGR5 在 GES 和胃癌细胞系中的表达

Fig.3 The protein and RNA expression levels of TGR5 was observed by Western blot and RT-PCR

2.6 TGR5 抑制胃癌细胞凋亡但不影响细胞周期分布

2.6.1 TGR5 与胃癌细胞周期分布无关 流式细胞术显示: AGS 及 MKN45 细胞中敲低 TGR5 表达后,G0/G1 期、G2 期细胞数量较对照组增多,S 期细胞数量较对照组降低,但差异没有统计学意义($P>0.05$)(图7A,7B)。在 SGC7901 细胞中过表达 TGR5 后,G0/G1、G2 期细胞数量较对照组减少,S 期细胞数量较对照组增多,差异没有统计学意义($P>0.05$)(图7C)。

2.6.2 TGR5 抑制胃癌细胞自发性凋亡 流式细胞术显示:在 AGS 及 MKN45 细胞中,敲低 TGR5 表达后细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)(图8A,7B),而 SGC7901 细胞中过表达 TGR5 则显著抑制细胞凋亡($P<0.05$)(图8C)。

2.7 TGR5 促进胃癌细胞迁移及侵袭

借助 Transwell 小室检测胃癌细胞侵袭及迁移,结果表明,TGR5 敲低后从 Transwell 小室穿出的 AGS 及 MKN-45 胃癌

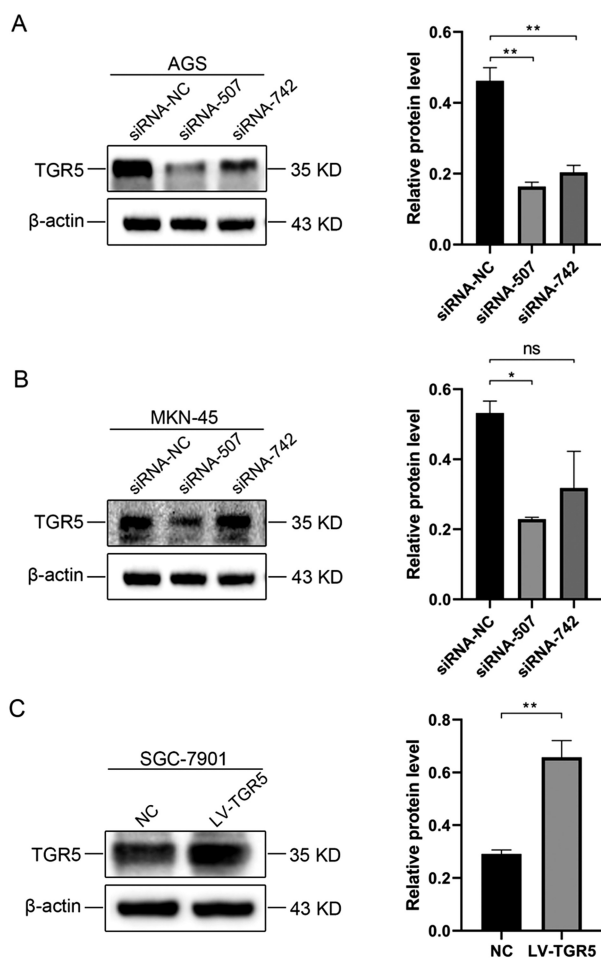


图4 Western blot 检测 TGR5 在转染 siRNA 或感染慢病毒胃癌细胞中的表达

Fig.4 TGR5 knock-down and overexpression efficiency was detected by Western blot

Note: *compared with siRNA-NC or NC, $P < 0.05$,

** compared with siRNA-NC or NC $P < 0.01$; ns, not significant.

细胞较对照组减少($P < 0.05$)(图 9A, 9B)。相反, TGR5 过表达后从 Transwell 小室穿出的 SGC-7901 细胞明显增多($P < 0.05$)(图 9C)。进一步检测 EMT 相关分子在胃癌细胞中的表达, 结果显示, TGR5 过表达促进 β -catenin、Snail、ZEB1 蛋白表达 (图 10A); 敲低 TGR5 表达抑制 β -catenin、Snail、ZEB1 的蛋白表达 (图 10B)。

3 讨论

许多研究已证实胆汁酸在消化系统肿瘤中发挥重要作用, 但其内在调控机制仍不清楚。Correa 模型表明肠上皮化生是胃癌最重要的癌前病变阶段^[5]。肠上皮化生的危险因素主要有幽门螺杆菌感染、高盐膳食、吸烟以及慢性胆汁反流等^[6]。本课题组关注胆汁酸反流与肠上皮化生间的联系, 并假设胆汁酸可能通过促进肠上皮化生进而调控胃癌的发生发展。前期研究发现, 胆汁酸可以通过其核受体 FXR 激活 SHP/NF- κ B 及 miR-92a/FoxD1/NF- κ B 信号通路促进胃上皮细胞过表达肠上皮化生标志物 CDX2^[7,8]。除核受体 FXR 外, 膜受体 TGR5 也参与胆汁酸信号传递, 从而调控胆汁酸诱导的细胞增殖、凋亡及肿瘤转移。Liu 等人在非小细胞肺癌中发现 TGR5 促进细胞增殖, 增殖活性与细胞周期相关, 上调或下调 TGR5 表达后细胞周期蛋白如细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、细胞周期蛋白 E (cyclin E1) 及磷酸化 Rb 蛋白 (p-Rb)、细胞周期素依赖性蛋白激酶 4 (CDK4)、细胞周期素依赖性蛋白激酶 6 (CDK6) 和 c-Myc 蛋白表达相应发生变化^[9]。Hong 等人发现 TDCA 能够增强人 Barrett's 细胞系和食管腺癌细胞的增殖能力, 促进甲基 [3H] 胸腺嘧啶摄取、NADPH 氧化酶 (NOX) NOX5-S 表达、 H_2O_2 生成。他们还发现, TDCA 诱导的 NOX5-S 表达增加可能是通过激活 TGR5 受体和 $G\alpha_q$ 蛋白而介导^[10]。在胆管癌动物模型和分离的胆管上皮细胞中, TGR5 参与胆汁酸诱导的胆管细胞增殖, TGR5 激活后通过促进 CD95 死亡受体的丝氨酸磷酸化而增强细胞的抗凋亡作用^[11]。

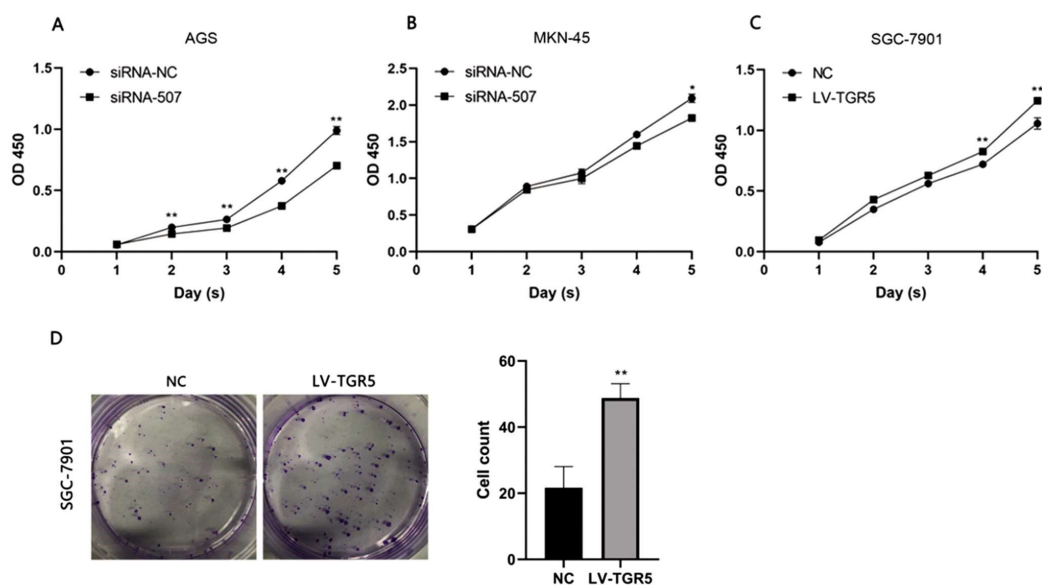


图5 CCK-8 实验(A,B,C)和细胞克隆形成实验(D)检测 TGR5 对胃癌细胞增殖能力的影响

Fig.5 CCK-8 assay and colony-forming assay displays the function of TGR5 on cells proliferation

Note: *compared with siRNA-NC or NC, $P < 0.05$, ** compared with siRNA-NC or NC $P < 0.01$.

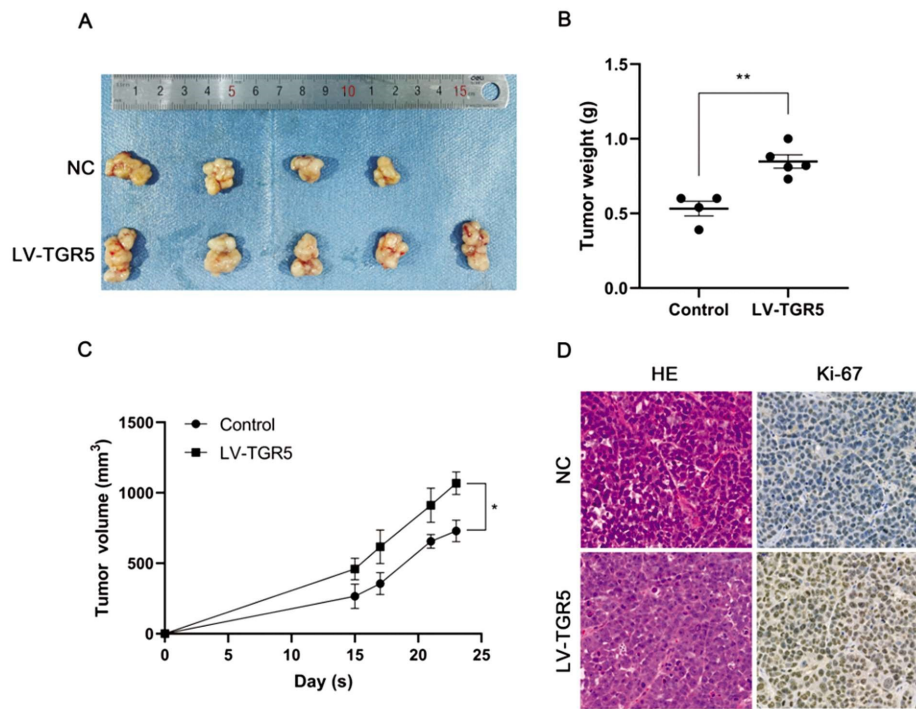


图 6 裸鼠皮下成瘤实验检测 TGR5 在体内对 SGC-7901 胃癌细胞增殖能力的影响(200×)

Fig.6 TGR5 promotes the proliferation of SGC-7901 GC cells in nude mice(200×)

Note: ** compared with siRNA-NC or NC $P < 0.01$.

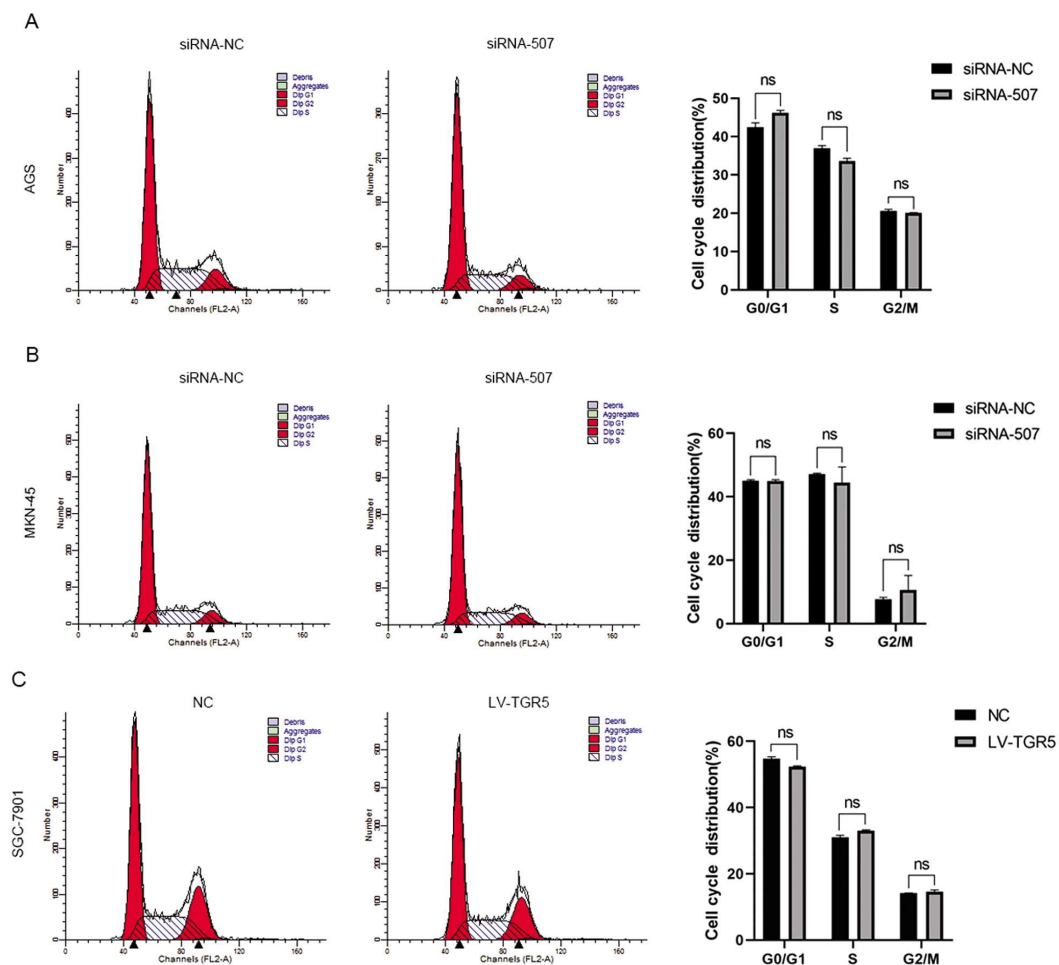


图 7 流式细胞术检测 TGR5 对胃癌 AGS、MKN-45 和 SGC-7901 细胞周期分布的影响

Fig.7 The effect of TGR5 on cell cycle distribution of AGS, MKN-45 and SGC-7901 cells in Flow cytometry

Note: ns, not significant.

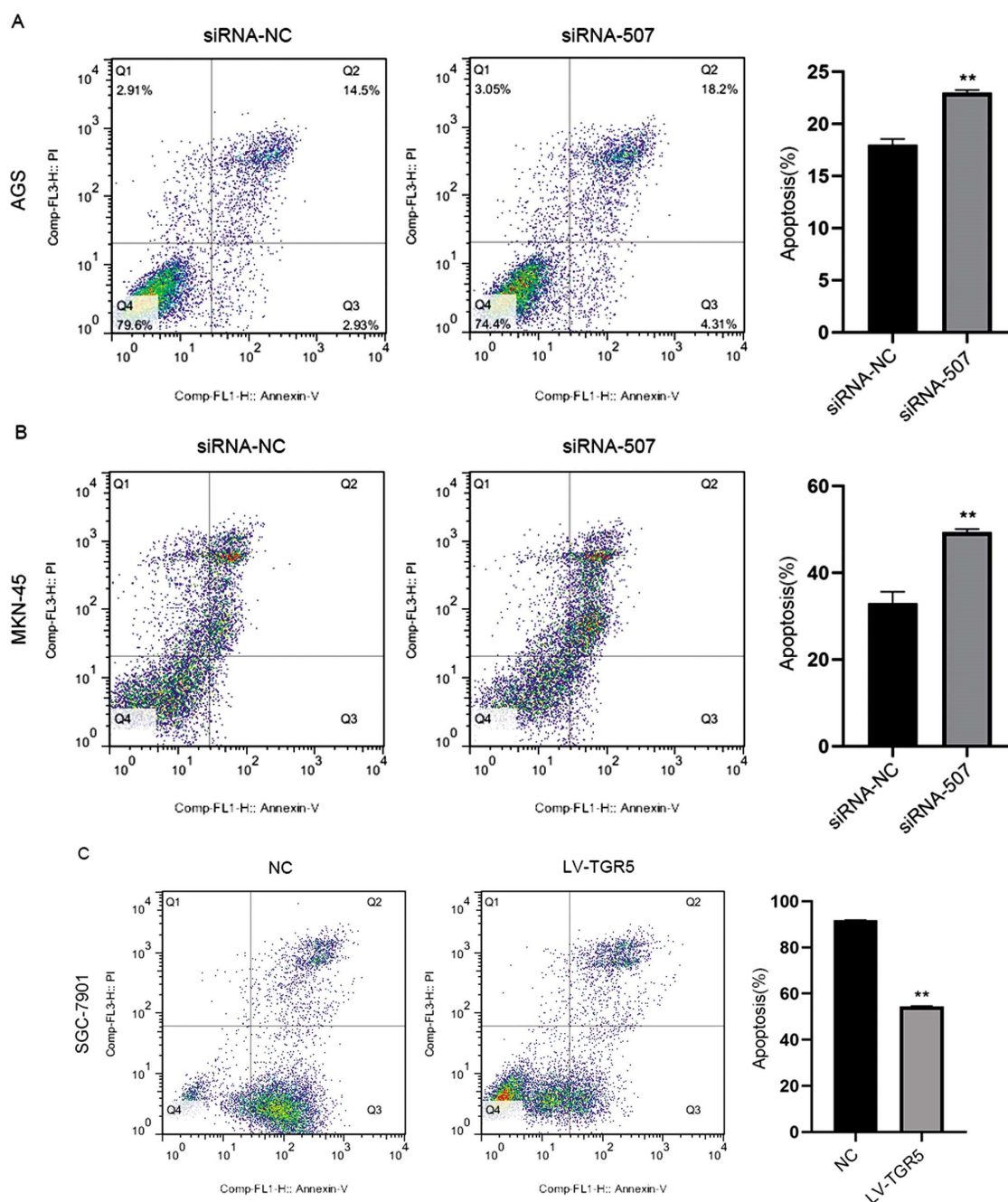


图8 流式细胞术检测 TGR5 对胃癌 AGS、MKN-45 和 SGC-7901 细胞凋亡的影响

Fig.8 The effect of TGR5 on cell apoptosis of AGS, MKN-45 and SGC-7901 cells in Flow cytometry

Note: ** compared with siRNA-NC or NC $P < 0.01$.

本研究发现胃癌组织中 TGR5 高表达率显著高于癌旁组织, TGR5 高表达率与肿瘤大小相关, 与性别、年龄、病理分级、TNM 分期、远处转移等均无关。此外, TGR5 表达与胃癌患者平均生存时间无关, 这可能都与研究纳入样本量不足, 无法真正代表整体情况, 也可能与肿瘤病理类型相关, 已有研究报道肠型胃癌 TGR5 染色强度高于弥漫型胃癌^[12]。由于本实验采用的胃癌组织芯片中包含一种或多种病理类型, 可能存在 TNM 分期高但 TGR5 低表达的情况。体外细胞实验发现胃癌细胞系中 TGR5 蛋白水平高于 GES-1, 这与 TGR5 在胃癌组织中高表达的情况相一致。

本研究还发现 TGR5 促进胃癌细胞增殖, 在裸鼠体内同样发现 TGR5 过表达后裸鼠移植瘤的大小、体积及 Ki-67 染色强

度都明显升高。此外, TGR5 能够抑制细胞自发性凋亡, 但对细胞周期分布无明显影响。TGR5 促进胃癌细胞增殖的研究在其他文献中也有报道, Cao 等人发现敲低或增强 TGR5 表达后引起 TDCA 诱导的细胞增殖能力相应改变, 其中 TGR5 同 Gq α 和 G α i-3 共价结合参与介导胆汁酸依赖性细胞增殖作用^[12]。

TGR5 促进胃癌细胞迁移、侵袭, 其促转移活性可能与其调控 EMT 相关。在 EMT 过程中, 上皮表型标志物如上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin) 等表达水平下降, 而间质表型相关蛋白如神经型钙黏蛋白 (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin)、 β -catenin 等表达升高^[13]。TGR5 与 EMT 的关系在其他文献中也有报道。在非小细胞肺癌中, TGR5 过表达后基质金属蛋白酶 -2 (MMP2)、基质金属蛋白酶 -9 (MMP9)、Rho 亚家族蛋白 A/Rho

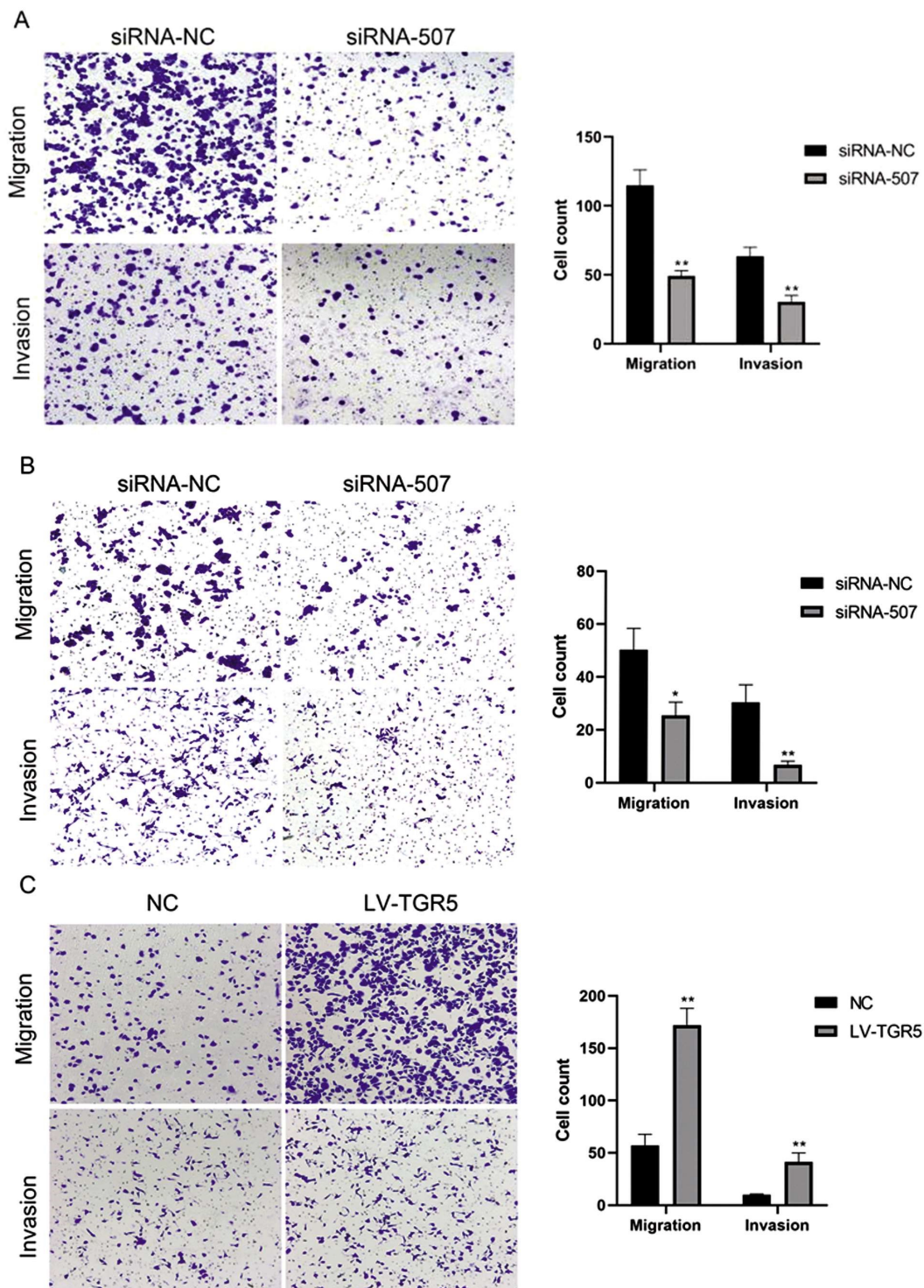


图9 Transwell 试验检测 TGR5 对胃癌 AGS(A)、MKN-45(B)和 SGC-7901(C)迁移和侵袭的影响

Fig.9 The function of TGR5 on cell invasion and migration of AGS, MKN-45 and SGC-7901 cells in Transwell assay

Note: *compared with siRNA-NC or NC, $P < 0.05$, ** compared with siRNA-NC or NC $P < 0.01$.

相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(RhoA/ROCK1)表达升高^[9]。在胃癌中,用 TGR5 配体、TLCA、齐墩果酸或 6-ECDCA 处理 MKN-45 胃癌细胞后,EMT 相关基因如 MMP10 和 MMP13 的表达水平增加^[3]。TGR5 在胃癌细胞中的作用仍存在争议。Guo 等人发现,TGR5 配体 23S-mCDCA、GPBARA 能够抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡,并且这种效应与转录活化因子 3(STAT3)信号通路相关^[14]。这一结论与本研究及既往的另两项报道^[14]不同。我们推测,这可能与不同的实验

条件比如采用不同的 TGR5 激动剂有关。

TGR5 发挥调控癌变的作用可能与胆汁酸暴露相关。长期暴露于胆汁酸下可能引起氧化/亚硝基应激反应,增加活性氧和活性氮的释放并诱导 DNA 损伤,导致癌基因的激活或抑癌基因的失活以及表观遗传学的改变^[15]。TGR5 可能被暴露的胆汁酸活化。如在 Barrett's 食管及食管腺癌粘膜中 TGR5 mRNA 和蛋白表达水平明显高于正常食管粘膜^[10]。在结肠癌和胰腺导管腺癌中,敲低 TGR5 表达能够显著抑制 DCA 诱导的 cyclinD

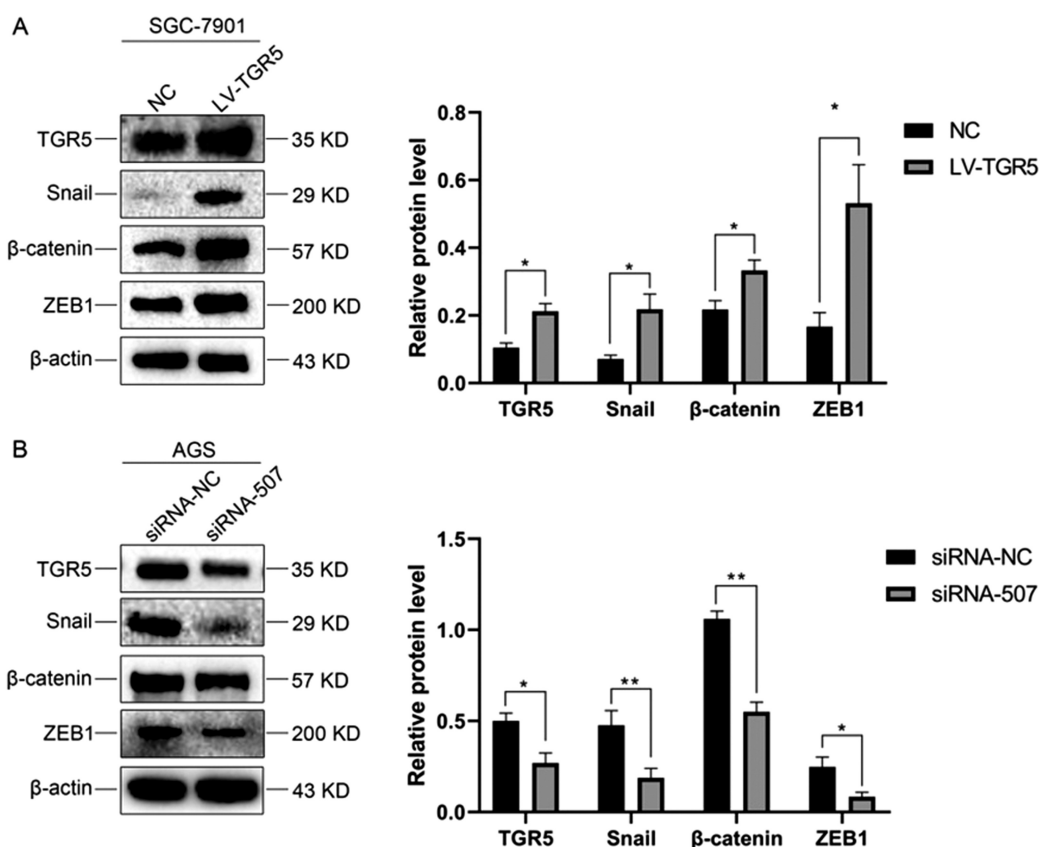


图 10 EMT 相关分子在胃癌细胞中的表达

Fig.10 Expression of EMT-related molecules in GC cells

Note: *compared with siRNA-NC or NC, $P<0.05$, ** compared with siRNA-NC or NC $P<0.01$.

1 和 STAT3 活化及细胞侵袭和增殖^[6]。Chen 等人发现,在二乙基亚硝胺的诱导下,TGR5^{-/-}小鼠比野生型小鼠更易发生急性肝损伤和肝癌,其机制可能与 TGR5 拮抗 STAT3 信号通路相关^[7]。

TGR5 对肿瘤细胞的调节作用与胆汁酸的效应并不完全相同,因为胆汁酸可以同时激活包括 TGR5 在内的多个受体^[18]。本课题组前期研究发现,胃癌组织中 TGR5 及 FXR 均有表达,TGR5 及 FXR 高表达率均显著高于慢性胃炎组织。TGR5 高表达与胃癌患者预后相关,而 FXR 高表达与胃癌分化程度相关^[4]。在 Barrett's 食管粘膜及食管腺癌组织中也可检测出 TGR5 或维生素 D 受体(Vitamin D Receptor, VDR)蛋白及 mRNA 表达,TGR5 和 VDR 高表达之间存在显著正相关^[19]。

TGR5 在不同类型肿瘤中发挥的作用还可能与 TGR5 表达水平及定位相关。胆汁酸是由肝细胞合成后通过胆道系统运输到胆囊中浓缩储存,胆管上皮细胞在正常状态下就处于胆汁酸负载状态,TGR5 在胆管细胞中表达水平较高,胆汁酸激活胆管细胞中 TGR5 受体可能是一种保护机制^[20]。在人体中胃黏膜屏障保护胃黏膜免受酸性胃液的腐蚀,发生慢性胆汁反流时可能削弱胃黏膜屏障的保护作用,使胃黏膜暴露于胃酸中造成黏膜损伤。在胆汁反流大鼠模型中也证实了慢性胆汁反流可引起胃腺体增生和扩张、鳞状上皮增生和角化^[21]。TGR5 在肠化生的癌旁组织和胃癌组织均呈高表达状态,提示 TGR5 参与了胃黏膜病变的持续演进和恶变。

本实验未采用胆汁酸或其他配体激活或抑制 TGR5,旨在观察在缺乏胆汁酸的条件下 TGR5 分子自身对胃癌细胞产生

的效应。结果初步证实,在无胆汁酸刺激下 TGR5 依然发挥调节胃癌细胞的作用。本研究不足之处在于未探讨 TGR5 促进胃癌细胞增殖及转移的下游机制,也未能完善体内转移的相关实验。总之,本实验发现,TGR5 在胃癌组织中表达上调,TGR5 能够促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭等恶性表型,提示 TGR5 分子参与了胃癌的发生发展。这为更好地理解胆汁酸促进胃癌发生的机理提供了一定的实验基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2014, 23(5): 700-713
- [2] Martinot E, Sèdes L, Baptissart M, et al. Bile acids and their receptors [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2017, 56: 2-9
- [3] Graziosi L, Marino E, Carino A, et al. The bile acid receptor GPBAR1 (TGR5) is expressed in human gastric cancers and promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell lines [J]. European Journal of Surgical Oncology, 2018, 44(4): 549
- [4] 石森,刘彩芳,孙妮娜,等. TGR5 和 CDX2 在胃黏膜肠化生及胃癌中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(12): 2334-2339
- [5] Correa P. A Human Model of Gastric Carcinogenesis [J]. Cancer research, 1988, 48(13): 3554
- [6] Joo Y, Park H, Myung D, et al. Prevalence and Risk Factors of Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia: A Nationwide Multicenter Prospective Study in Korea[J]. Gut and Liver, 2013, 7(3):

- 303-310
- [7] Zhou H, Ni Z, Li T, et al. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP-dependent upregulation of the expression of CDX2[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7617-7624
- [8] Li T, Guo H, Li H, et al. MicroRNA-92a-1-5p increases CDX2 by targeting FOXD1 in bile acids-induced gastric intestinal metaplasia [J]. *Gut*, 2019, 68(10): 1751-1763
- [9] Liu X, Chen B, You W, et al. The membrane bile acid receptor TGR5 drives cell growth and migration via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Letters*, 2018, 412: 194-207
- [10] Hong J, Behar J, Wands J, et al. Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2010, 59(2): 170-180
- [11] Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, et al. TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro [J]. *Gut*, 2016, 65(3): 487-501
- [12] Cao W, Tian W, Hong J, et al. Expression of bile acid receptor TGR5 in gastric adenocarcinoma [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 304(4): G322-G327
- [13] Aiello N M, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(5): 1016-1026
- [14] Guo C, Su J, Li Z, et al. The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through antagonizing STAT3 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34402-34413
- [15] BERNSTEIN H, BERNSTEIN C, PAYNE C, et al. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers [J]. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2005, 589(1): 47-65
- [16] Nagathihalli N S, Beesetty Y, Lee W, et al. Novel Mechanistic Insights into Ectodomain Shedding of EGFR Ligands Amphiregulin and TGF- α : Impact on Gastrointestinal Cancers Driven by Secondary Bile Acids[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(7): 2062-2072
- [17] Chen W D, Yu D, Forman B M, et al. Deficiency of G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) enhances chemically induced liver carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 656-666
- [18] Hylemon P B, Zhou H, Pandak W M, et al. Bile acids as regulatory molecules[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(8): 1509-1520
- [19] Pang C, Lalonde A, Godfrey T E, et al. Bile salt receptor TGR5 is highly expressed in esophageal adenocarcinoma and precancerous lesions with significantly worse overall survival and gender differences[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2017, 10: 29-37
- [20] Keitel V, Häussinger D. TGR5 in cholangiocytes[J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2013, 29(3): 299-304
- [21] Wang X, Tang J, CAO Q. The effects of chronic bile reflux on the gastric mucosa of rats [J]. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2013, 24(3): 251-259

(上接第 15 页)

- [26] Desideri E, Vegliante R, Cardaci S, et al. MAPK14/p38alpha-dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation[J]. *Autophagy*, 2014, 10(9): 1652-65
- [27] Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T, et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas [J]. *International Journal of Oncology*, 2000, 17: 107-119
- [28] Malafa M, Margenthaler J, Webb B, et al. MnSOD Expression Is Increased in Metastatic Gastric Cancer [J]. *Journal of Surgical Research*, 2000, 88(2): 130-134
- [29] Zou X, Santa-Maria CA, O'Brien J, et al. Manganese Superoxide Dismutase Acetylation and Dysregulation, Due to Loss of SIRT3 Activity, Promote a Luminal B-Like Breast Carcinogenic-Permissive Phenotype[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(6): 326-36
- [30] Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(6): 893-904
- [31] Jin C, Qin L, Shi Y, et al. CDK4-mediated MnSOD activation and mitochondrial homeostasis in radioadaptive protection[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 81: 77-87