

胆汁酸及受体 TGR5/FXR 参与肝细胞癌和胆管细胞癌的发生与发展

林跃军 张楠 聂萌 王林

摘要 **目的** 探讨胆汁酸与胆汁酸受体 TGR5/FXR 在肝细胞癌和胆管癌发生、发展中的作用和可能的机制。**方法** 通过免疫组化检测胆汁酸受体 FXR 与 TGR5 在癌旁组织、肝细胞癌组织和胆管细胞癌组织中的表达水平;采用 MTS 实验检测不同胆汁酸(石胆酸、鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸钠、熊去氧胆酸及胆酸)对人胆管癌细胞系 HCCC-9810 以及人肝癌细胞系 HepG2 的增殖凋亡影响;采用流式细胞检测石胆酸和鹅脱氧胆酸对人胆管癌细胞系 HCCC-9810 和人肝癌细胞系 HepG2 凋亡的影响。**结果** TGR5 在肝细胞肝癌和胆管细胞癌组织中呈高表达,与之相反,FXR 在肝细胞肝癌和胆管细胞癌中呈现低表达水平;胆汁酸能够促进癌细胞的凋亡,而不同种类的胆汁酸其抑制细胞增殖的效力不同。**结论** 胆汁酸受体 FXR 和 TGR5 参与肝细胞癌和胆管细胞癌的发生、发展;胆汁酸能够抑制 HepG2 和 HCCC-9810 增殖与促进 HepG2 和 HCCC-9810 凋亡,为研究胆汁酸抗肿瘤作用机制奠定了基础。

关键词 胆汁酸 TGR5 受体 FXR 受体 肝细胞癌 胆管细胞癌

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.006

Role of Bile Acid and Its Receptors TGR5 and FXR in the Development of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. Lin Yuejun, Zhang Nan, Nie Meng, et al. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Science/Peking Union Medical School, Chinese Academy Medical School, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To explore the roles of bile acids (BAs), its nuclear and membrane G-protein-coupled receptors, FXR and TGR5, in the progression of the hepatocellular carcinoma (HCC) and cholangiocarcinoma. **Methods** We examined the expression of TGR5 and FXR in human hepatocellular carcinoma (HCC), cholangiocarcinoma and the adjacent noncancerous tissues. We investigated the effects of lithocholic acid (LCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), taurocholic acid (TLC), ursodesoxycholic acid (UDCA) and cholic acid (CA) on proliferation and apoptosis of cultured HepG2 and HCCC-9810 cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) and Annexin V/Propidium Iodide assays. **Results** Compared with the adjacent noncancerous tissues, the TGR5 levels were higher in the HCC, while the FXR levels were lower in cholangiocarcinoma. Multiple BAs inhibited the proliferation of HepG2 and HCCC-9810 cells and induced apoptosis with different efficacies and in a dose-dependent manner. **Conclusion** Our findings demonstrate that BAs inhibit proliferation and promote apoptosis of HCC and cholangiocarcinoma cells. Thus, TGR5 and FXR may regulate the initiation and progression of HCC and cholangiocarcinoma similarly as in other cancers. BAs may be developed as potential anti-cancer drugs in future therapy.

Key words Bile acids; TGR5 receptor; FXR receptor; Hepatocellular carcinoma; Cholangiocarcinoma

胆汁酸是胆固醇的代谢产物,是胆汁的重要组成部分,能促进脂肪和脂溶性维生素的吸收^[1]。近年来的研究发现,胆汁酸还具有信号分子的特性,能通过核受体法尼醇受体(farnesol-X-receptor, FXR, NR1H4)和G蛋白偶联受体TGR5(G-protein-coupled bile acid receptor, GPBAR1)发挥生物调节功

能^[2]。有研究显示胆汁酸和人工合成的胆汁酸衍生物在生理浓度下在体外能够抑制肿瘤细胞如前列腺癌细胞、胃癌细胞和结肠癌细胞的生长^[3-5]。分子水平研究发现胆汁酸受体FXR和TGR5在癌症的发生、发展中发挥着重要作用^[2]。

胆汁酸作为胆固醇在肝脏细胞经一系列精细调节而合成的胆固醇代谢物,维持体内胆固醇浓度的稳定;胆汁酸的肠肝循环过程,一方面增添了胆汁酸组成成分的多样性,另一方面也维持了机体循环胆汁酸池的稳定^[6]。为了探究这个问题,笔者检测了肝细

作者单位:100005 北京,中国医学科学院基础医学研究所生理学系

通讯作者:王林,电子信箱:lin.wang@ibms.pumc.edu.cn;聂萌,电子信箱:doublea8@126.com

胞癌和胆管细胞癌病理组织切片中胆汁酸受体 TGR5 和 FXR 的表达水平,并用不同类型不同浓度的胆汁酸干预肿瘤细胞系 HepG2 和 HCCC-9810,检测其增殖与凋亡情况,为进一步研究胆汁酸与肿瘤之间的关系奠定了基础。

材料与方法

1. 实验材料:DMEM 培养基(美国 Corning 公司),胎牛血清(美国 Invitrogen 公司),Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司),MTS 试剂(美国 Promega 公司),青霉素-链霉素(美国 Life Technologies 公司),FXR 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),TGR5 抗体(英国 Abcam 公司),HepG2 与 HCCC-9810 购于中国医学科学院细胞中心,肝细胞癌和胆管细胞癌病理切片及其相应的癌旁组织由协和医院病理科提供。

2. 免疫组织化学检测蛋白原位表达:将制备好的石蜡切片浸泡在二甲苯中进行脱蜡 2 次,每次 3min。此后按浓度梯度的乙醇逐步水化石蜡切片:100%乙醇 2 次,95%乙醇 1 次,85%乙醇 1 次,75%乙醇 1 次,每次 5min。随后将切片放入 PBS 中,清洗 2 次,每次 3min。在石蜡切片上滴加 50 μ l 3% 过氧化氢,在湿盒中放置 20min。随后用 PBS 清洗 2 次。每次 3min。在 98℃ 的抗原修复液中浸浴 15min,取出冷却至室温。然后用 PBS 清洗 3 次,每次 5min。在石蜡切片上滴加约 100 μ l 稀释后的一抗,放入湿盒,4℃ 过夜。随后用 PBS 清洗 3 次,每次 3min。使用免疫组化试剂盒中的辅助剂封闭切片,滴加 100 μ l 辅助剂,放置湿盒,室温温育 30min。使用 PBS 清洗 2 次,每次 2min。加入免疫组化试剂盒中的二抗,室温温育 30min。使用 PBS 清洗 2 次,每次 2min。然后将事先配制好的 DAB 化学试剂(A 液:B 液为 1:50),滴加在切片上,根据抗原的表达丰度显色,一般不超过 5min。用自来水冲洗终止反应。苏木精负染细胞核 15s 左右,用自来水冲洗后,在 1% 盐酸乙醇中分色 15s,然后将切片置于 PBS 中。按 75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇的顺序脱水,每次 5min。最后将染色后的切片在二甲苯中浸泡 2 次,每次 3min,再用中性树脂封片,室温晾干过夜后,切片盒中室温干燥长期保存。

3. MTS 法细胞增殖实验:当处于对数生长期的细胞达到 90% 汇合度时,消化细胞并用 2 倍体积的完全培养基终止消化,转移至 15ml 离心管中,800r/min 室温离心 5min 后得到细胞沉淀。用 5ml 完全培养基

重悬后计数,制备成浓度为 3×10^4 细胞/毫升的细胞悬液。将制好的细胞悬液每孔 100 μ l 加入到 96 孔细胞培养板中,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜。待 96 孔板中每孔细胞数达到 5000 个左右时(一般细胞贴壁后培养过夜即可),加入不同浓度不同种类的胆汁酸,每种处理设 4 个复孔,以 DMSO 为实验对照组(DMSO 占细胞上清的比例不超过 0.5%)。分别于 0、12、24 及 48h 后,在 96 孔细胞培养板中每孔加入 20 μ l MTS 试剂,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 2h。检测前摇晃培养板 10s,将 MTS 试剂与细胞培养基混匀。在酶联免疫检测仪上读取波长为 490nm 处的吸光度值(A)。实验至少重复 3 次,结果取平均值。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡:用 LCA 胆汁酸不同浓度(0、500、1000 μ mol/L)处理不同的肿瘤细胞系 48h 后,收集培养基上清(含有死细胞)于 15ml 离心管中,用 1 $\times$ PBS 洗一次贴壁细胞,在 37℃ 细胞培养箱中胰蛋白酶消化细胞,用含有 10% FBS 的完全培养基终止消化后,并将消化好的细胞转移至对应的离心管,离心弃去上清。调整细胞浓度为 1×10^6 细胞/毫升。1000r/min 离心 5min。弃上清,用 1ml 1 $\times$ PBS 轻柔吹洗细胞,,1000r/min,5min 离心 2 次。每孔细胞用 100 μ l 1 $\times$ Binding Buffer 重悬,依次加入 5 μ l FITC 标记的 Annexin V 和 5 μ l PI,充分混匀。室温避光反应 15min,每隔 5min 轻轻混匀 1 次,使得抗体与细胞充分结合,1000r/min 离心 5min,弃上清。用 1ml 1 $\times$ PBS 轻柔吹洗细胞 3 遍,每次 1000r/min 离心 5min。最后每孔用 100 μ l 稀释好的 1 $\times$ Binding Buffer 重悬后,用流式细胞仪检测不同标记的细胞比例。

5. 统计学方法:用 GraphPad Prism5 做图,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 胆汁酸受体 FXR 与 TGR5 在肝细胞癌和胆管细胞癌组织中的差异性表达:分别用 TGR5 和 FXR 抗体对癌组织和癌旁组织进行组化染色,与癌旁组织相比,TGR5 在肝细胞癌和胆管细胞癌中表达水平较高(图 1 中 A、B)。相反的,FXR 在肝细胞癌和胆管细胞癌中表达水平较低(图 1 中 C、D)。

2. MTS 细胞增殖实验:将不同种类的胆汁酸 LCA、CDCA、TLC、UDCA 和 CA 分别配置成浓度为 0、125、250、500、1000 μ mol/L 的工作液,加入到已经铺好 HepG2 的 96 孔板中,每个浓度 4 个复孔,在 0、12、

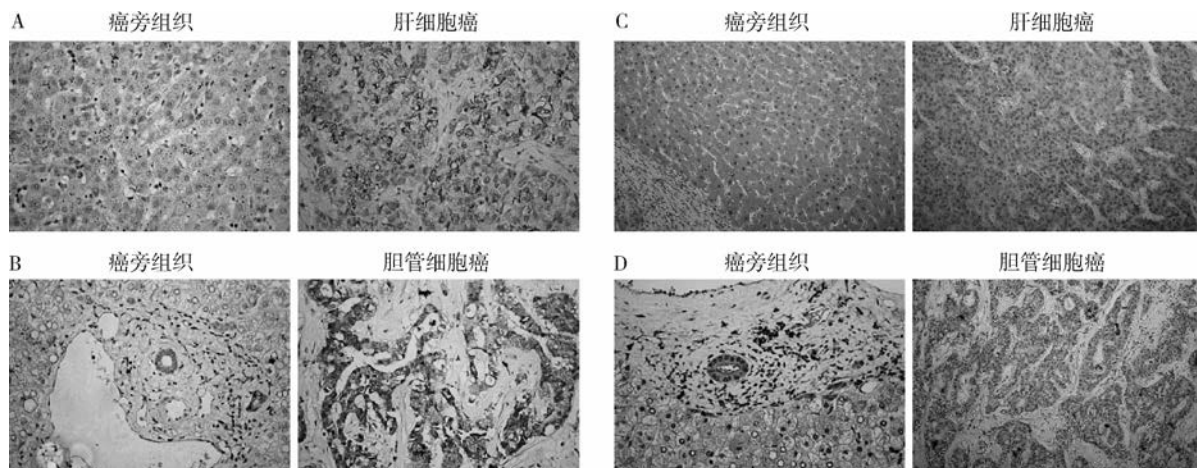


图1 TGR5与FXR在癌旁组织与癌组织中的表达情况

A、B. 癌旁组织与肝细胞癌及癌旁组织与胆管细胞癌中 TGR5 的表达; C、D. 癌旁组织与肝细胞癌及癌旁组织与胆管细胞癌中 FXR 的表达

24、48h 分别检测细胞活性, MTS 实验显示高浓度的 UDCA, 尤其是 FXR 受体天然激动剂 CDCA 对 HepG2

的增殖抑制现象最为明显, 且浓度越高抑制增殖现象越明显(图2)。

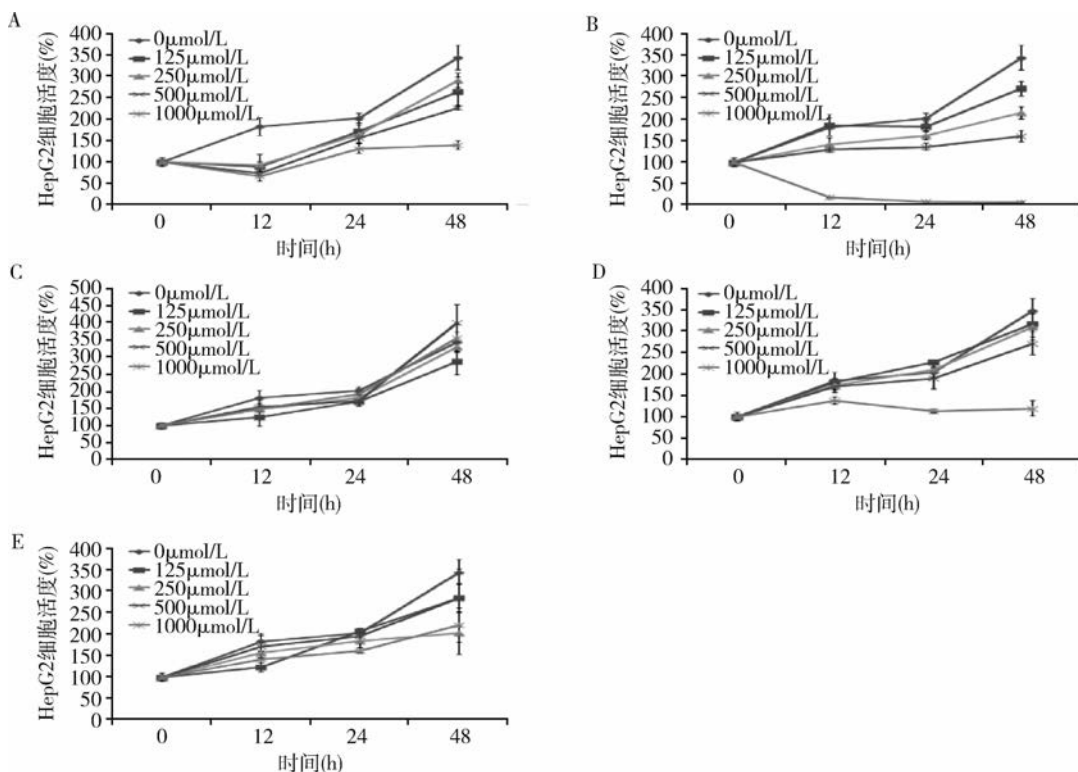


图2 不同种类不同浓度的胆汁酸对 HepG2 的增殖影响

A. LCA; B. CDCA; C. TCA; D. UDCA; E. CA

3. 流式细胞仪检测 TGR5 受体天然激动剂 LCA 对 HepG2 和 HCCC-9810 的凋亡作用: 一方面随着 LCA 浓度的增加其促凋亡作用越强, 另一方相同浓度下 LCA 对 HCCC-9810 的促凋亡效果比 HepG2 强, 且呈浓度依赖性, 即浓度越高, 促凋亡效应越强

(图3)。

讨 论

目前关于胆汁酸对肿瘤发生、发展的影响, 其研究结论并不一致。用超过生理浓度的胆汁酸处理动物模型和体外细胞实验显示, 胆汁酸是胃肠癌的致病

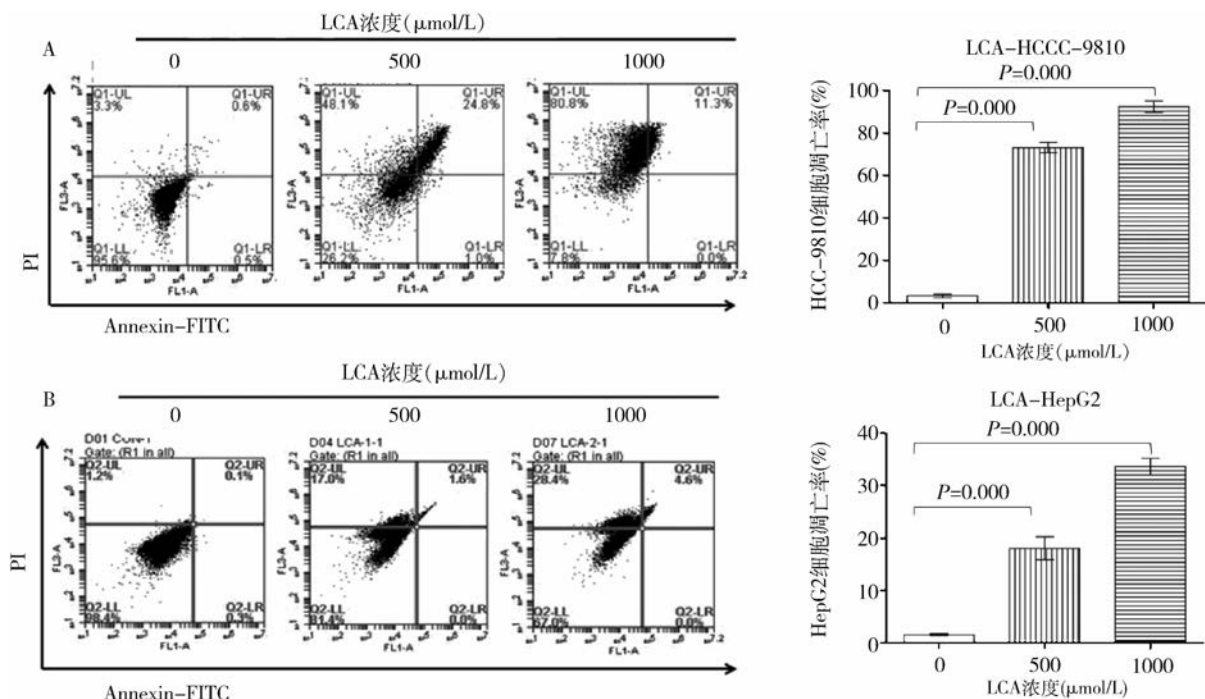


图3 TGR5天然激动剂LCA对HCCC-9810和HepG2的凋亡作用

A. LCA对HCCC-9810细胞系的凋亡作用; B. LCA对HepG2细胞系的凋亡作用

因素,若胃、结肠、食管等器官长时间暴露于胆汁酸中会引起相应部位的非典型性增生,最终演变为肿瘤^[7]。

随着对胆汁酸作为信号的研究逐渐深入,人们对胆汁酸受体的认识也逐渐清楚。FXR在多个层面上发挥着保肝作用,降低了胆汁酸在肝脏中的蓄积,另外FXR能抑制肝形状细胞聚集,促进细胞外基质的降解,具有抗炎、抗纤维化作用^[8,9],抑制细胞凋亡和肿瘤发生,从而在保肝作用和抑制肝癌发生中发挥重要作用^[10]。胆汁酸膜受体TGR5一方面通过改善机体代谢综合征,从而维持肝脏功能稳态,另一方面TGR5也能降低NF-κB的转录活性,预防慢性肝炎,通过改善肝脏本身疾病的发生、发展,从而抑制肝癌的发生^[11,12]。

Wang等发现在酸性条件下胆汁酸(DCA和CDCA)能够诱导胃腺癌细胞系c-myc和人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的表达,通过端粒酶的激活影响细胞老化,促进肿瘤发生^[13]。另外有研究显示阻断胆汁酸的肠肝循环,会延迟术后肝脏组织的再生,BAs对肝细胞增殖起到促进作用^[14]。Phelan等^[7]在研究中发现胆汁酸(CDCA和DCA)能够破坏HIF-1α(hypoxic-inducible factor-1α)抑制转移性前列腺癌细胞系DU-145黏附、侵袭与迁移,从而发挥抗肿瘤作用。

以上研究所得到的相互矛盾结果可能与所用的实验动物模型、细胞模型、胆汁酸种类、胆汁酸浓度、作用时间等密切相关,这也提示着胆汁酸及其相关受体在肿瘤发生、发展过程中具有复杂的生理病理功能。胆汁酸的稳态和肠肝循环在物质代谢过程发挥着重要作用,如协助吸收饮食中脂类物质,协助清除机体潜在毒性分子,能够调节脂类代谢、葡萄糖代谢和机体的能量平衡。若胆汁酸的转运和合成过程出现障碍,机体胆汁酸稳态遭到破坏,则会产生肝脏、肠道,甚至全身系统的相关疾病^[15]。通过调节循环胆汁酸池体积和组成,针对胆汁酸受体及其下游效应器研发新的分子药物为治疗代谢性疾病、炎症和肿瘤提供了新的思路和可能。

本实验通过免疫组化染色发现了胆汁酸受体TRG5、FXR在肝细胞癌组织,胆管细胞癌组织与癌旁组织中的差异表达;体外实验显示不同种类不同浓度的胆汁酸对HepG2, HCCC-9810的增殖和凋亡的作用强度不同,为接下来研究胆汁酸与胆汁酸受体TGR5/FXR在肝细胞癌和胆管细胞癌发生、发展中的作用奠定了基础。

参考文献

- Poupon R, Chignard N, Rosmorduc O, et al. Biliary function and its regulation [J]. Med Sci, 2004, 20(12): 1096-1099

(下转第95页)

象维生素 D 均缺乏。因此,鉴别正常血钙范围内低 25(OH)D 水平的 PHPT 与 SPHP 至关重要。

在临床中大部分医师认为静脉钙负荷试验存在一定风险,使用时较为慎重,比如心脏疾病、高钙危象及操作的复杂性,且相关临床研究较少。本研究对 37 例高 PTH 血症患者进行静脉钙负荷试验,试验前全部常规检查心电图,心脏彩超,排除既往心脏病史或服用洋地黄制剂及心电图异常者,血钙 < 2.75mmol/L,试验中严格进行心电监护。试验中 37 例患者均无不良反应,心电图未见异常变化,血钙最高者达 3.36mmol/L,经随访后亦无不适表现,所以在临床中严格掌握适应证及禁忌证的情况下,使用静脉钙负荷试验是安全的。

综上所述,静脉钙负荷试验鉴别 PHPT 及 SHPT 有一定的敏感度和特异性,在掌握适应证及禁忌证的情况下,应用合理的方法,对甲状旁腺功能亢进的病因诊断有一定的帮助,且临床应用无不良反应,是一种行之有效的功能试验。

参考文献

- Fraser WD. Hyperparathyroidism [J]. Lancet, 2009, 374 (9684) : 145 - 158
- Taniguchi ED. Hyperparathyroidism [J]. Am Fam Physician, 2004, 69 (2) : 333 - 339
- 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会,等.原发性甲状旁腺功能亢进症诊疗指南 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014, 7(3) : 187 - 198
- 廖二元.原发性甲状旁腺功能亢进症 [M]. 北京:科学出版社,

2003:660 - 700

- 周建平,田雨霖.中国人原发性甲状旁腺功能亢进 10 年文献回顾 (1995 ~ 2004) [J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(1) : 78 - 80
- Rao DS, Wilson RJ, Kleerekoper M, *et al.* Lack of biochemical progression or continuation of accelerated bone loss in mild asymptomatic primary hyperparathyroidism: evidence for biphasic disease course [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 67(6) : 1294 - 1298
- Aloia JF, Talwar SA, Pollack S, *et al.* Optimal vitamin D status and serum parathyroid hormone concentrations in African American women [J]. Am J Clin Nutr, 2006, 84(3) : 602 - 609
- Malberti F, Farina M, Imbasciati E. The PTH - calcium curve and the set point of calcium in primary and secondary hyperparathyroidism [J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(10) : 2398 - 2406
- Khosla S, Ebeling PR, Firek AF, *et al.* Calcium infusion suggests a "set - point" abnormality of parathyroid gland function in familial benign hypercalcemia and more complex disturbances in primary hyperparathyroidism [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76(3) : 715 - 720
- Potts JT. Parathyroid hormone: past and present [J]. J Endocrinol, 2005, 187(3) : 311 - 325
- Titon I, Cailleux - Bounacer A, *et al.* Evaluation of a standardized short - time calcium suppression test in healthy subjects: interest for the diagnosis of primary hyperparathyroidism [J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(3) : 351 - 357
- Zhao L, Zhang MJ, Lin JM, *et al.* PTH inhibition rate is useful in the detection of early - stage primary hyperparathyroidism [J]. Clin Biochem, 2011, 44(10 - 11) : 844 - 848
- Reginster JY, Deroisy R, Pirenne H, *et al.* High prevalence of low femoral bone density in elderly women living in nursing homes or community dwelling: a plausible role of increased parathyroid hormone secretion [J]. Osteoporos Int, 1999, 9(2) : 121 - 128
- 郭艳英, 努劳古丽 · 买买提, 马福等, 等. 乌鲁木齐城区健康成年人维生素 D 营养状况调查分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(10) : 989 - 993 (收稿日期: 2016 - 12 - 08) (修回日期: 2016 - 12 - 22)

(上接第 21 页)

- Baptissart M, Vega A, Maqdas S, *et al.* Bile acids: from digestion to cancers [J]. Biochimie, 2013, 95(3) : 504 - 517
- Choi YH, Im EO, Suh H, *et al.* Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells [J]. Cancer Lett, 2003, 199(2) : 157 - 167
- Pyo JS, Ko YS, Kang G, *et al.* Bile acid induces MUC2 expression and inhibits tumor invasion in gastric carcinomas [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(7) : 1181 - 1188
- Zeng H, Botnen JH, Briske - Anderson M. Deoxycholic acid and selenium metabolite methylselenolol exert common and distinct effects on cell cycle, apoptosis, and MAP kinase pathway in HCT116 human colon cancer cells [J]. Nutr Cancer, 2010, 62(1) : 85 - 92
- Jones ML, Tomaro - Duchesneau C, Prakash S. The gut microbiome, probiotics, bile acids axis, and human health [J]. Trends Microbiol, 2014, 22(6) : 306 - 308
- Phelan JP, Reen FJ, Dunphy N, *et al.* Bile acids destabilise HIF - 1 α and promote anti - tumour phenotypes in cancer cell models [J]. BMC Cancer, 2016, 16(7) : 476
- Thomas WA, Jaseja GE, Guo GL, *et al.* Increased activation of the Wnt/beta - catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in Farnesoid X receptor knockout mice [J]. Pharmacol. Exp Ther, 2011, 338(1) : 12 - 21

- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, *et al.* Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88 - dependent IL - 6 production [J]. Science, 2007, 317(5834) : 121 - 124
- Wang YD, Yang F, Chen WD, *et al.* Farnesoid X receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo [J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(7) : 1622 - 1632
- Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G. Bile - acid - activated receptors: targeting TGR5 and Farnesoid - X - receptor in lipid and glucose disorders [J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(11) : 570 - 580
- Wang YD, Chen WD, Yu D, *et al.* The G - Protein - coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light - chain enhancer of activated B cells (NF - kappaB) in mice [J]. Hepatology, 2011, 54(4) : 1421 - 1432
- Wang X, Zhou PH, Sun XJ, *et al.* Acidified bile acids increase hTERT expression via c - myc activation in human gastric cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(6) : 3038 - 3044
- Ueda J, Chijiwa K, Nakano K, *et al.* Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin E - associated kinase activity [J]. Surgery, 2002, 131(5) : 564 - 573
- Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond [J]. Hepatol, 2013, 58(1) : 155 - 168 (收稿日期: 2017 - 03 - 13) (修回日期: 2017 - 03 - 22)