

CXCL12/CXCR4 大肠癌细胞放射敏感度的影响的实验研究

孟祥宇 汪大伟 赵明 朱兴业

摘要 目的 研究 CXCL12/CXCR4 对大肠癌细胞放射敏感度的影响。方法 HCT116 细胞系进行培养和分组,对其进行外源性 CXCL12、AMD3100 及 CXCL12 + siSurvivin 处理在放射治疗下对其细胞存活分数、LDH、caspase - 3、caspase - 9 进行检测。结果 外源性 CXCL12 处理减弱了放射诱导的细胞存活分数下降和细胞死亡的增加,抑制 CXCR4 促使大肠癌细胞对放射更敏感。CXCL12/CXCR4 对细胞存活起关键作用,通过外源性 CXCL12 处理可逆转放射促使的 Bax 的表达和 caspase - 3 和 caspase - 9 的活性。在放射条件下抑制 CXCR4 可使细胞凋亡增强。此外,外源性 CXCL12 处理增加 Survivin 的表达,CXCL12 对放射诱导的细胞凋亡的抑制作用是由 Survivin 的表达而实现。结论 CXCL12/CXCR4 通过 Survivin 的表达在放射中保护结肠癌细胞,这意味着一个放射在大肠癌治疗应用的重要潜在机制。

关键词 CXCL12 凋亡 大肠癌 抗辐射 Survivin

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.017

Experimental Study of the Effect of CXCL12/CXCR4 on the Radiation Sensitivity of Colorectal Cancer Cells. Meng Xiangyu, Wang Dawei, Zhao Ming, et al. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective To test the hypothesis that CXCL12/CXCR4 axis is closely related to the sensitivity to radiotherapy in colorectal cancer cells. **Methods** CT116 cell lines were cultured and treated with exogenous CXCL12, AMD3100 and CXCL12 + siSurvivin. The cell Survival fractions, LDH, Caspase3 and Caspase9 were detected under the radiation therapy. **Results** We found that decreased cell Survival fractions and the increase of cell death induced by radiotherapy were attenuated by CXCL12 treatment, and inhibition of CXCR4 promoted colorectal cancers cell more sensitive to radiotherapy. We also examined the critical roles of CXCL12/CXCR4 in cell survival and found that radiotherapy facilitated the expression of Bax and activation of caspase - 3 and caspase - 9, which was reversed by CXCL12 treatment. Cell apoptosis was enhanced by inhibition of CXCR4 under conditions of radiotherapy. Furthermore, treatment with CXCL12 resulted in the increased expression of survivin and the inhibitory effects of CXCL12 on radiotherapy - induced apoptosis were mitigated by survivin knockdown. **Conclusion** These results indicate that CXCL12/CXCR4 protects colorectal cancer cells against radiotherapy via survivin, implying an important underlying mechanism of resistance to radiotherapy in the treatment of colorectal cancer.

Key words CXCL12; Apoptosis; Colorectal cancer; Radioresistance; Survivin

大肠癌患者根治性切除术后的 5 年生存率约 65%,是胃肠道最常见的恶性肿瘤之一^[1]。目前,晚期大肠癌的主要治疗方法是手术切除联合放射治疗和化疗^[2,3]。然而,在放射过程中,大肠癌细胞对放射治疗耐受性明显影响和削弱了治疗效果,使癌细胞逃避杀伤。因此,研究调节大肠癌细胞放射治疗敏感度的关键因素从而提高临床治疗效果至关重要。

基质细胞衍生因子 1 (CXCL12,也称为 SDF - 1)

是一种诱导趋化因子属于人趋化因子超家族^[4]。在多种类型的细胞中 CXCR4 是 CXCL12 最常见的趋化因子受体,CXCL12 在细胞生长分化和血管生成中的生物学作用是通过结合其受体 (CXCR4) 完成的^[5,6]。以前的研究已经表明,在肾和宫颈癌趋化因子受体 CXCR4 的高表达与中位生存期显著减少密切相关^[7,8]。在大肠癌患者中 CXCR4 的表达往往上调^[9,10]。此外,最近的研究表明,CXCL12/CXCR4 与一些肿瘤的发生和发展密切相关,抑制 CXCL12/CXCR4 被认为是抗癌治疗的一个新靶点^[11-13]。然而,CXCL12/CXCR4 对大肠癌细胞放射敏感度的影响以及相应的分子机制至今仍不明确。

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2012M520769)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科

通讯作者:赵明,电子信箱:labixiaoxinmy@163.com

细胞凋亡是细胞死亡的主要途径,抑制细胞凋亡可提高肿瘤细胞存活分数。肿瘤细胞抗凋亡分子的过度表达是肿瘤抗放射及其复发的重要原因。Survivin 属于凋亡抑制蛋白(IAP)家族,是一种广泛表达的抗凋亡蛋白,参与调节多种肿瘤的发生和发展,能提高细胞生存能力,调节细胞周期进程,增强肿瘤的恶性行为^[14,15]。研究表明,Survivin 表达增加与多种癌症的癌进展和辐射耐受性密切相关,阻止 Survivin 可作为肿瘤分子治疗的候选靶点^[16,17]。

本研究中笔者发现,增加 CXCL12 可使放射治疗抑制细胞生长的作用削弱,而抑制 CXCR4 可增大肠癌细胞对放射的敏感度。此外, CXCL12/CXCR4 的激活会导致大肠癌细胞通过上调 Survivin 的表达来增加其对辐射的耐受力。这个发现为提高大肠癌放射治疗的疗效提供了新的策略和潜在的靶点。

材料与方法

1. 材料:抗 Bax 抗体、Survivin 和 β -肌动蛋白购自美国圣克鲁斯生物技术有限公司。caspase-3 和 caspase-9 活性试剂盒和 LDH 检测试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司。CXCL12 购自派普泰克公司。

2. 细胞系的制备与培养:HCT116,从美国典型培养物保藏获得人结肠癌细胞系。笔者常规在 37℃ 用 DMEM 培养液加 10% 胎牛血清、青霉素(100U/ml)和链霉素(100U/ml)在一个孵化器 95% 的空气和 5% 的 CO₂ 中培养细胞。

3. 放射线处理:放射线是使用⁶⁰Co 源辐照器进行(Co-V,放射治疗机 780;美国 MDS Nordion 公司)在 1Gy/min 剂量率。

4. siRNA 的构建和转染:HCT116 细胞转染 Survivin 基因小干扰 RNA(siSurvivin),非对照 siRNA 作为阴性对照,由上海吉玛制药有限公司设计和合成。HCT116 细胞培养至 30%~50%,然后 2 μ g siRNA 和 10 μ l 基因转染试剂分别稀释血清 opti-mem-1 介质,然后轻轻地混合在一起。在室温下孵育 20min,然后将混合物直接添加到细胞上。

5. 克隆形成试验:将经过不同处理的各组细胞,分别消化并吹打成单个细胞,并把细胞悬浮在 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中备用。将每组细胞悬液分别接种以每皿 500 个细胞的含 10ml 37℃ 预温培养液的皿中。置 37℃ 5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养 2 周。固定然后加适量 Giemsa 应用染色液

染 20min。用肉眼直接计数克隆,计数 >50 个细胞的克隆数。最后计算细胞存活分数。实验完成 3 份,重复 3 次。

6. LDH 检测:细胞凋亡或坏死而造成的细胞膜结构的破坏导致细胞质内的酶释放到培养液里,其中包括酶活性较为稳定的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)。通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性,就可以实现对细胞毒性的定量分析。LDH 释放被看做细胞膜完整性的重要指标,并被广泛用于细胞毒性检测。根据制造商的指示进行实验。

7. caspase-3 活性的测定:caspase-3 又称 CPP32、Yama、apopain 属于 CED-3 亚家族,是细胞凋亡过程中的一个关键酶。caspase-3 可以剪切 procaspase 2、6、7 和 9,可直接特异性剪切许多 caspase 底物(如 PARP、ICAD 等),并在细胞核凋亡过程中起到重要作用。利用 caspase-3 催化底物 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide(Ac-DEVD-pNA)产生黄色的游离硝基苯胺 pNA(p-nitroaniline),通过测定分光光度比色法测定 pNA 在 405nm 处吸光度值,通过制造商的使用说明进行相关步骤,从而间接获得 caspase-3 的活性。

8. caspase-9 活性的测定:caspase-9 又称 ICE-LAP6、Mch6 可以与细胞色素 C 和 Apafl 形成复合物并被激活,进一步激活下游的 caspase-3,从而促进后续的细胞凋亡信号。caspase-9 活性检测利用 caspase-9 催化特异性底物(Ac-LEHD-pNA)产生黄色的游离硝基苯胺 pNA(p-nitroaniline),通过分光光度比色法测定 pNA 在 400~410nm 处吸光度值,从而间接获得 caspase-9 的活性。

9. Western blot 法检测分析:1 $\times 10^6$ 细胞经超声处理,通过离心在 4℃ 12000r/min 10min 去除碎片。然后,含 50 μ g 蛋白样品经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜。通过 3% BSA 阻滞,孵育初级抗体,然后用碱性磷酸酶标记二抗,与 5-溴-4-磷酸/硝基四氮唑蓝(中国天根生化科技有限公司)印迹染色。

10. 统计学方法:应用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验或单因素方差分析和 Dunnett' t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 通过外源性 CXCL12 处理使大肠癌细胞抗放

射性增强:抗放射性是癌症治疗中的重要问题。要确定 CXCL12/CXCR4 与大肠癌细胞抗放射性是否相关,首先在放射条件下用外源性 CXCL12 处理 HCT116。克隆形成实验结果显示细胞存活分数呈剂量依赖性降低,HCT116 细胞在 8Gy 放射处理下细胞存活分数显著降低。然而,放射处理后细胞存活分数的下降因外源性 CXCL12 处理而逆转(图 1A)。乳酸脱氢酶法检测细胞死亡发现,8Gy 放射处理 LDH 释放量明显增多,而外源性 CXCL12 处理减轻 LDH 的释放(图 1B)。

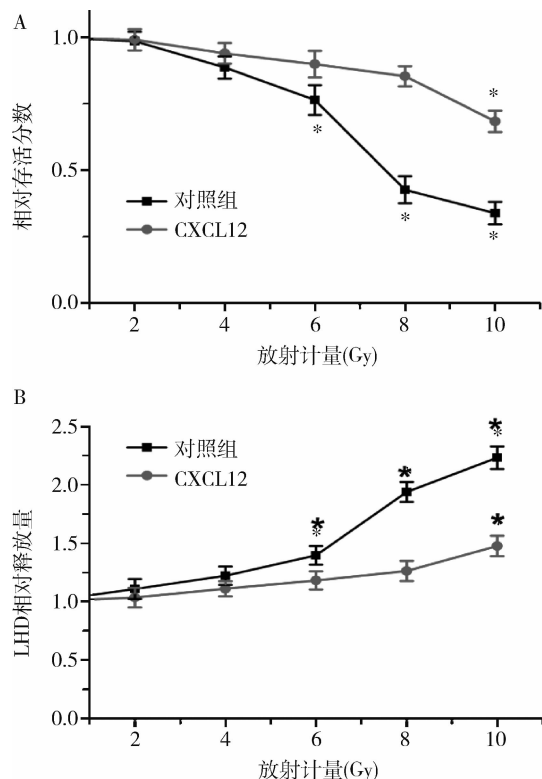


图 1 在放射条件下,通过外源性 CXCL12 处理提高细胞存活

A. 克隆形成实验表明,大肠癌肿瘤细胞在 8Gy 放射条件下细胞存活显著减少,通过外源性 CXCL12 处理可缓解下降趋势; B. 8Gy 放射下促使 LDH 释放增加,通过外源性 CXCL12 处理减轻了放射对 LDH 释放的影响;与 0Gy 比较, * $P < 0.05$

2. 通过 AMD3100 抑制 CXCR4 使大肠癌细胞对放射更敏感: CXCR4 是 CXCL12 最主要的受体。利用 CXCR4 抑制剂 (AMD3100) 观察 CXCR4 在放射处理中的作用。8Gy 放射导致 HCT116 细胞细胞存活分数明显减少, LDH 释放增加。然而通过 AMD3100 处理在 4Gy 放射下就能达到相同效果, 较未经 AMD3100 处理组相比更多的细胞被放射杀死(图 2)。

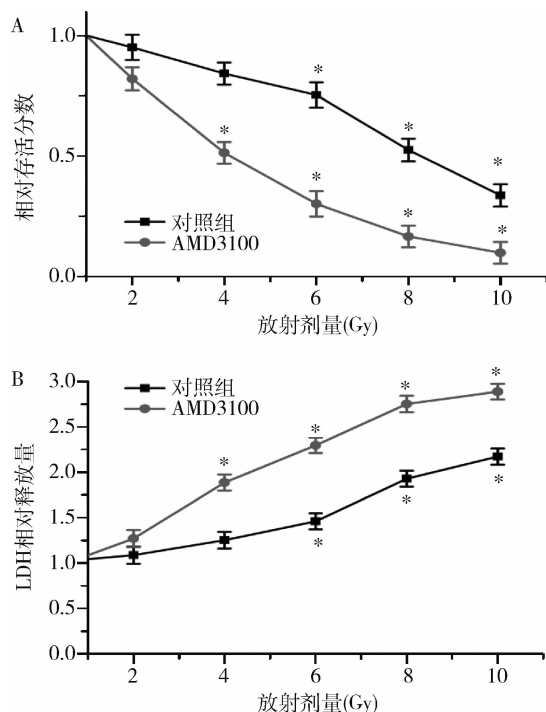


图 2 抑制 CXCR4 使大肠癌细胞对放射更敏感

A. 8Gy 放射处理使细胞存活分数明显减少, 而通过 AMD3100 处理在 4Gy 放射下细胞存活分数明显减少; B. 抑制 CXCR4 使大肠癌细胞对放射更敏感使放射杀死更多细胞, 与 0Gy 比较, * $P < 0.05$

3. 放射诱导的大肠癌细胞凋亡被外源性 CXCL12 的处理而抑制: 众所周知, 放射处理诱导细胞凋亡可使肿瘤生长抑制和细胞死亡。为观察放射条件下 CXCL12/CXCR4 是否参与细胞凋亡调节。细胞暴露于 8Gy 放射导致 caspase - 3 活性增加, 而外源性 CXCL12 处理抑制放射诱导的 caspase - 3 活化(图 3A)。此外, 放射导致 caspase - 9 活性增加, Bax 蛋白的高表达, 这些由外源性 CXCL12 处理而减弱(图 3 中 B 和 C)。

4. CXCR4 抑制剂促使放射诱导的大肠癌细胞凋亡增强: 利用 AMD3100 阻断 CXCL12/CXCR4 的功能, 放射下的凋亡变化包括 caspase - 3 及 caspase - 9 活性, Bax 蛋白表达被 CXCR4 抑制剂增强, 放射诱导的细胞凋亡和死亡通过抑制 CXCL12/CXCR4 后增强放射诱导的大肠癌细胞凋亡(图 4)。

5. CXCL12/CXCR4 的激活使大肠癌细胞通过上调 Survivin 的表达产生辐射抗性: Survivin 在绝大多数癌组织中过度表达, 作为一种细胞凋亡抑制剂可以调节肿瘤的发生和发展, Survivin 表达增加使 caspase 介导的细胞凋亡的显著抑制。笔者已经证明了 CX-

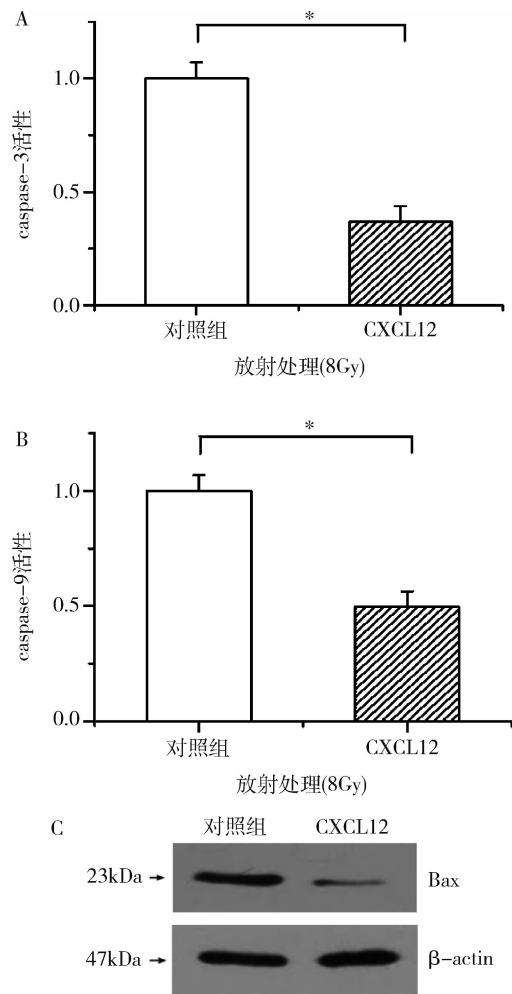


图 3 放射诱导的大肠癌细胞凋亡被外源性 CXCL12 的处理而抑制

A. 外源性 CXCL12 处理抑制放射诱导的 caspase - 3 活化; B. 放射导致 caspase - 9 活性增加, 由外源性 CXCL12 处理而减弱; C. Bax 蛋白的高表达, 由外源性 CXCL12 处理而减弱; * $P < 0.05$

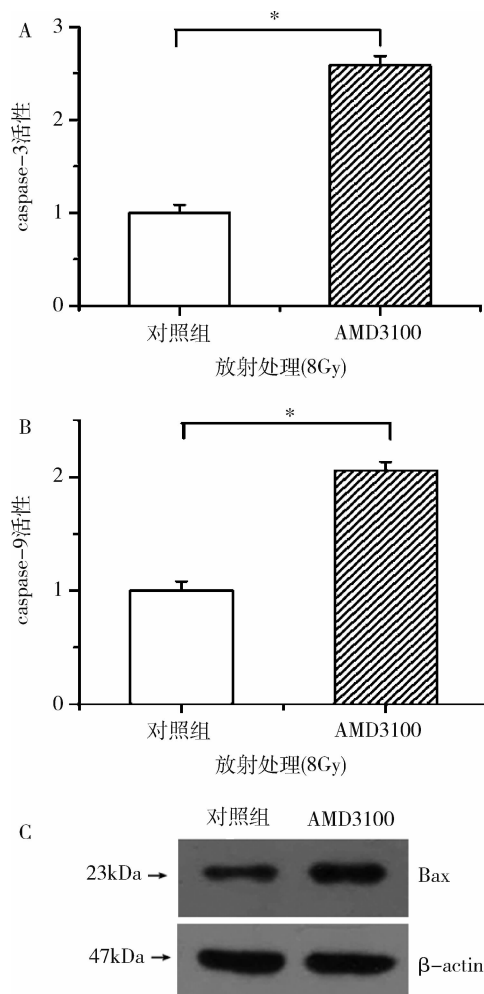


图 4 抑制 CXCR4 增强放射诱导的大肠癌细胞凋亡

A、B. 抑制 CXCL12/CXCR4 显著提高放射诱导的 caspase - 3 及 caspase - 9 活性; C. 在放射处理 (8Gy) 下 AMD3100 抑制 CXCR4 使 Bax 蛋白表达增强; * $P < 0.05$

CL12/CXCR4 使大肠癌细胞通过抑制细胞凋亡抵抗放射, 然后检查 CXCL12/CXCR4 和 Survivin 蛋白之间联系, 外源性 CXCL12 处理使 Survivin 表达上调, 而抑制 CXCR4 使 HCT116 细胞中 Survivin 的表达减少 (图 5A、B)。Survivin siRNA 用于降低 Survivin 的表达 (图 5C)。实验显示, 放射条件下 Survivin siRNA 减弱 CXCL12 对细胞存活的促进作用 (图 5D)。检测细胞凋亡时, 获得类似的结果。实验表明 CXCL12 减弱放射诱导 caspase - 3 及 caspase - 9 的活性的作用, 被 siSurvivin 所减轻 (图 5 中 E、F)。

讨 论

大肠癌是胃肠道最常见的恶性肿瘤之一。目前手术联合放射治疗是大肠癌治疗最重要的途径, 大肠

癌细胞对放射治疗的耐受性严重影响治疗效果及预后。然而大肠癌的抗放射性的机制尚不明确。因此有必要探索与大肠癌细胞放射治疗敏感度密切相关的关键性分子和信号转导通路。目前的研究表明, CXCL12/CXCR4 的激活, 通过上调 Survivin 的表达使大肠癌细胞对放射不敏感。以前的研究已经表明, CXCL12 与 CXCR4 不仅在正常组织起重要作用, 同样存在在肿瘤细胞^[18,19]。在大肠癌中, CXCR4 在大肠癌组织中的表达上调。此外, CXCR4 的高表达与中位生存期显著减少相关^[20,21]。

越来越多的证据表明, CXCL12/CXCR4 参与调控大肠癌的发生、发展。然而, 放射条件下 CXCL12 和 CXCR4 对大肠癌细胞存活的作用是不确定的。在笔者的研究中, 外源性 CXCL12 处理减弱放射引起细

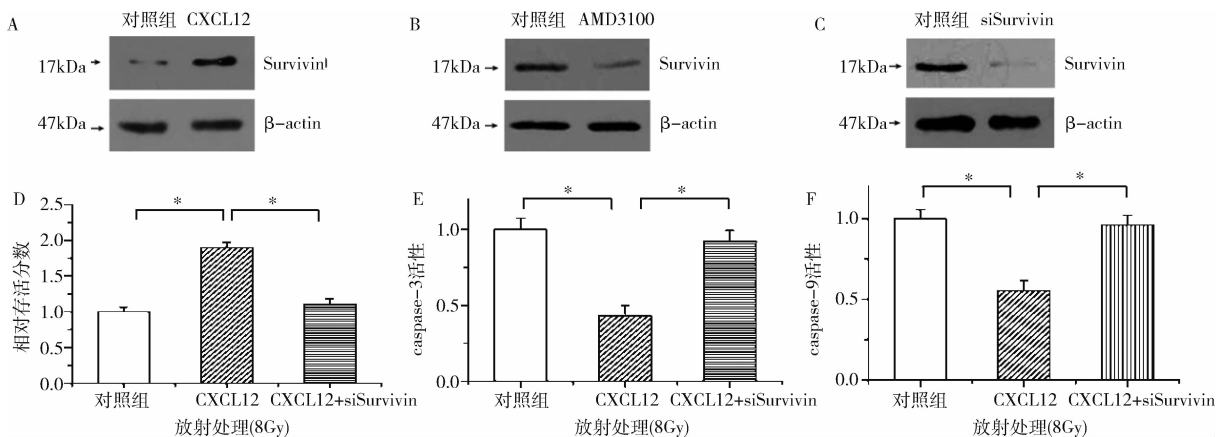


图5 CXCL12/CXCR4的激活使大肠癌细胞通过上调 Survivin 的表达产生辐射抗性

A、B. 外源性 CXCL12 处理使 Survivin 表达上调,而抑制 CXCR4 使大肠癌细胞中 Survivin 的表达减少;C. 免疫印迹法测量 Survivin siRNA 的活性;D. 放射条件下 Survivin siRNA 减弱 CXCL12 对细胞存活的促进作用;E、F. CXCL12 减弱放射诱导 caspase-3 及 caspase-9 的活性的作用,被 siSurvivin 所减轻; * $P < 0.05$

胞存活分数的下降和细胞死亡增加。相反,通过 AMD3100 (竞争性抑制 CXCR4) 抑制 CXCL12/CXCR4,放射处理会杀死更多的细胞。这些结果表明, CXCL12/CXCR4 激活使大肠癌细胞对放射不敏感,抑制 CXCL12/CXCR4 可促进大肠癌细胞对放射更敏感,提高大肠癌放射的治疗效果。细胞凋亡在调节细胞生长过程中起着关键的作用,放射治疗通过促进细胞凋亡诱导细胞死亡,抑制细胞生长。

CXCL12/CXCR4 对大肠癌细胞抗放射性起重要作用,研究 CXCL12/CXCR4 在放射诱导大肠癌细胞凋亡过程中是否具有调节作用。线粒体依赖性细胞凋亡是细胞凋亡的一种重要类型,它是由线粒体膜电位的降低而引发的。Bax 蛋白,定位于线粒体外膜,参与调节线粒体膜电位的变化^[22]。Bax 的表达增加与线粒体膜电位下降有关,caspase-9 是其下游效应分子。激活 caspase-9 随后增加 caspase-3 活性(细胞凋亡的执行者)。在研究中,笔者发现放射促进 Bax 蛋白的表达,导致 caspase-9 和 caspase-3 活性的增加,而放射诱导的凋亡变化由外源性 CXCL12 处理而减弱。此外,CXCR4 抑制剂增强放射治疗条件下的细胞凋亡。这些结果表明,CXCL12/CXCR4 的激活抑制在放射处理下的细胞凋亡而使更多的细胞存活。Survivin 作为一种重要的抗凋亡蛋白,属于凋亡抑制蛋白(IAP)家族。

以前的研究已经证明, Survivin 表达的增加能显著减少 p53、caspase 介导的凋亡。考虑到 CXCL12/CXCR4 对放射诱导的细胞凋亡的抑制效应,笔者决定探索 CXCL12/CXCR4 和 Survivin 之间的是否存在

联系。笔者发现激活 CXCL12/CXCR4 导致 Survivin 水平的增加,抑制这一途径有相反的作用。此外,下调 Survivin 减轻 CXCL12 细胞凋亡的抑制作用。这些结果表明,在大肠癌细胞中 CXCL12/CXCR4 的激活触发的抗辐射,至少部分是由 Survivin 蛋白介导的。

综上所述,笔者的研究结果表明,放射条件下通过上调 Survivin 蛋白的表达,CXCL12/CXCR4 的激活抑制细胞凋亡和促进细胞存活,阻断 CXCL12/CXCR4 信号通路使大肠癌细胞对放射更敏感。这一发现为大肠癌细胞在放射治疗的敏感度研究提供一个重要的基础机制,为提高大肠癌放射治疗效率提供了一种新的策略。

参考文献

- 1 Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117
- 2 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer [J]. New Eng J Med, 2004, 351(17):1731-1740
- 3 Sauer R, Liersch T, Merkel S, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(16):1926-1933
- 4 Chu CY, Cha ST, Lin WC, et al. Stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α/CXCL12)-enhanced angiogenesis of human basal cell carcinoma cells involves ERK1/2-NF-κB/interleukin-6 pathway [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(2):205-213
- 5 Noda M, Omatsu Y, Sugiyama T, et al. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice [J]. Blood, 2011, 117(2):451-458
- 6 Dillenburgilla P, Patel V, Mikelis CM, et al. SDF-1/CXCL12 in-

- duces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/G α i/mTORC1 axis [J]. *FASEB J*, 2015, 29(3):1056 – 1068
- 7 D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, *et al.* Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(7):772 – 781
- 8 Schrevel M, Karim R, ter Haar NT, *et al.* CXCR7 expression is associated with disease – free and disease – specific survival in cervical cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(9):1520 – 1525
- 9 Kim J, Takeuchi H, Lam S T, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(12):2744 – 2753
- 10 Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, *et al.* Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5):1743 – 1750
- 11 Katsumoto K, Kume S. The role of CXCL12 – CXCR4 signaling pathway in pancreatic development [J]. *Theranostics*, 2013, 3(1):11 – 17
- 12 Gomez – Casal R, Epperly MW, Wang H, *et al.* Radioresistant human lung adenocarcinoma cells that survived multiple fractions of ionizing radiotherapy are sensitive to HSP90 inhibition [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42):44306 – 44322
- 13 Feys L, Descamps B, Vanhove C, *et al.* Radiotherapy – induced lung damage promotes breast cancer lung – metastasis through CXCR4 signaling [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):26615 – 26632
- 14 Sah NK, Khan Z, Khan GJ, *et al.* Structural, functional and therapeutic biology of survivin [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(2):164 – 171
- 15 Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(17):2708 – 2710
- 16 Khan Z, Tiwari RP, Khan N, *et al.* Induction of apoptosis and sensitization of head and neck squamous carcinoma cells to cisplatin by targeting survivin gene expression [J]. *Curr Gene Ther*, 2012, 12(6):444 – 453
- 17 Salz W, Eisenberg D, Plescia J, *et al.* A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior [J]. *Urol Oncol Seminars Origin Invest*, 2005, 65(9):3531 – 3534
- 18 Kucia M, Reza R, Miekus K, *et al.* Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF – 1 – CXCR4 axis [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(7):879 – 894
- 19 Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers [J]. *Leukemia J*, 2008, 23(1):43 – 52
- 20 Zeelenberg IS, Stalle RV, Roos E. The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(13):3833 – 3839
- 21 Kim J, Takeuchi H, Lam ST, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival [J]. *Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2005, 23(12):2744 – 2753
- 22 Zeng L, Li T, Xu DC, *et al.* Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria – dependent pathway by interacting with Bax protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(34):29125 – 29133

(收稿日期:2017 – 02 – 08)

(修回日期:2017 – 03 – 10)

(上接第 6 页)

- 13 Liang X, Bushman FD, FitzGerald GA. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33):10479 – 10484
- 14 Saini C, Suter DM, Liani A, *et al.* The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011, 76:39 – 47
- 15 Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(3):145 – 151
- 16 Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2013(217):3 – 27
- 17 Leone V, Gibbons SM, Martinez K, *et al.* Effects of diurnal variation of gut microbes and high – fat feeding on host circadian clock function and metabolism [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(5):681 – 689
- 18 Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. The role of the immune system in governing host – microbe interactions in the intestine [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(7):660 – 667
- 19 Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, *et al.* Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17996
- 20 Mukherji A, Kobiita A, Ye T, *et al.* Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs [J]. *Cell*, 2013, 153(4):812 – 827
- 21 Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, *et al.* Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5):e97500
- 22 Sheaffer KL, Kaestner KH. Transcriptional networks in liver and intestinal development [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9):a008284
- 23 Minemura M, Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(6):1691 – 1702
- 24 Montagner A, Korecka A, Polizzi A, *et al.* Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome – derived signals [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:20127

(收稿日期:2017 – 03 – 15)

(修回日期:2017 – 03 – 23)