

甘氨酸脱氧胆酸通过法尼醇 X 受体/上皮-间质转化信号轴抑制肝细胞癌进展

李智超,柯立鑫,林俊龙,高凯,华贇鹏*

中山大学附属第一医院 肝胆胰外科中心,广东 广州 510080

【摘要】 目的 探讨甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA)对肝癌细胞增殖、侵袭和转移的影响及其可能的分子机制。方法 构建裸鼠肝细胞癌皮下种植瘤模型和肺转移模型,观察GDCA治疗[200 mg/(kg·d)]对肝细胞癌生长、转移的影响,并通过免疫组织化学染色分析种植瘤中法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)的表达。利用Swiss Target Prediction数据库预测GDCA潜在的作用靶点,应用AutoDockTools进行分子对接和结合能计算。使用Kaplan-Meier plotter数据库分析FXR表达对肝细胞癌患者总生存期和无进展生存期的影响。蛋白质印迹法检测经GDCA(0.5 mmol/L)处理后肝癌细胞系(SNU-449、HUH-7、LM3、97H)中FXR的表达。通过shRNA技术建立敲低FXR的LM3肝癌细胞株,采用克隆集落形成实验、CCK-8细胞增殖实验、Transwell细胞迁移实验、细胞划痕实验检测肝癌细胞的增殖、转移能力,并用蛋白质印迹法检测敲低FXR后LM3细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关标志物的表达情况。结果 GDCA能有效抑制肝细胞癌皮下种植瘤和肺转移灶的生长。Swiss Target Prediction数据库预测GDCA最可能的结合靶点为FXR,分子对接显示两者具有高结合活性(结合能为-8.2 kcal/mol)。Kaplan-Meier plotter数据库中FXR高表达的肝细胞癌患者较低表达患者的总生存期($HR=0.52, 95\%CI\ 0.33\sim0.82, P=0.004\ 5$)和无进展生存期($HR=0.63, 95\%CI\ 0.47\sim0.85, P=0.002\ 2$)更长。在GDCA给药治疗后的裸鼠皮下瘤组织中,以及经GDCA处理的肝癌细胞系中FXR表达均上调。此外,在FXR敲低后,LM3细胞的增殖、转移能力增强,FXR的敲低逆转了GDCA对肝癌细胞增殖和转移的抑制作用,且呈现较高的间质细胞标志物波形蛋白表达。结论 GDCA通过FXR减缓EMT的进程,从而抑制肝细胞癌的进展,GDCA治疗有望成为肝细胞癌的一种辅助治疗方法。

【关键词】 肝细胞癌; 胆汁酸; 法尼醇 X 受体; 上皮-间质转化

Glycodeoxycholic acid inhibits the progression of hepatocellular carcinoma via the farnesoid X receptor/epithelial-mesenchymal transition signaling axis

Li Zhichao, Ke Lixin, Lin Junlong, Gao Kai, Hua Yunpeng*

Center of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

*Corresponding author: Hua Yunpeng, E-mail: hyp0427@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the antitumor effects of glycodeoxycholic acid (GDCA) on hepatocellular carcinoma (HCC) and to delineate the underlying molecular mechanism. **Method** Subcutaneous xenograft and experimental lung metastasis models of HCC were established in nude mice to evaluate the in vivo efficacy of GDCA [200 mg/(kg·d)]. Tumor burden and metastatic spread were monitored longitudinally, and the farnesoid X receptor (FXR) expression in resected tumors was quantified by immunohistochemistry. Putative GDCA targets were predicted using the Swiss Target Prediction platform, and

基金项目: 广东省自然科学基金(2022A1515010537, 2023A1515012531); 广州市科技项目(2024B03J1256)

*通信作者: 华贇鹏, E-mail: hyp0427@163.com

binding affinity to FXR was computed by molecular docking (AutoDockTools). Prognostic significance of FXR transcriptional levels was analyzed in the Kaplan–Meier Plotter HCC cohort. In vitro, FXR protein expression was determined by western blotting in four human HCC cell lines (SNU–449, HUH–7, LM3, 97H) after GDCA (0.5 mmol/L) exposure. Stable FXR knockdown LM3 cells were generated via shRNA transduction; clonogenic, CCK–8, Transwell and wound–healing assays were employed to assess proliferative and invasive capacities. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) status was evaluated by western blotting for E–cadherin, N–cadherin and vimentin. **Result** GDCA administration markedly suppressed both subcutaneous tumor growth and pulmonary metastatic colonization. In silico analysis using the Swiss Target Prediction database identified FXR as the top–ranking high–confidence target of GDCA, exhibiting robust binding energy ($\Delta G = -8.2$ kcal/mol). High intra–tumoral FXR mRNA levels were associated with prolonged overall survival ($HR = 0.52$, 95% CI 0.33–0.82, $P = 0.0045$) and progression–free survival ($HR = 0.63$, 95% CI 0.47–0.85, $P = 0.0022$) in patients with HCC. GDCA treatment up–regulated FXR expression in xenograft tissues and in all tested HCC cell lines. Genetic ablation of FXR reversed GDCA–mediated suppression of proliferation and motility, concomitant with acquisition of a mesenchymal phenotype highlighted by increased vimentin expression. **Conclusion** GDCA impedes HCC progression by activating FXR–dependent signaling, thereby retarding the EMT process. These findings provide a mechanistic rationale for repositioning GDCA as an adjunctive therapeutic agent in HCC.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Bile acid; Farnesoid X receptor; Epithelial–mesenchymal transition

肝细胞癌(简称肝癌)是我国第二大肿瘤致死原因,其治疗方式单一、预后极差^[1-2]。我国肝癌患者5年总体生存率不足15%^[2]。肝癌的致病机制复杂,除乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等病毒性肝炎外,非酒精性脂肪性肝病、黄曲霉毒素暴露、酒精性肝病及代谢综合征等均被证实为肝癌的独立危险因素^[3]。探索肝癌发生发展机制,寻求高效、安全的治疗方法,迫在眉睫。肠–肝轴作为肠道及其微生物群与肝脏双向关联的通路,与人体健康以及疾病发生尤其是肝脏疾病密切相关,是目前肝硬化研究的热点方向^[4]。笔者课题组的前期研究以及预实验均发现肠道菌群失调与肝癌的发生发展密切相关^[5]。在肠–肝轴的交流机制中,胆汁酸作为源于胆固醇、由肝脏合成分泌、肠道内细菌参与处理的代谢产物,被认为是肠肝交流的主要“语言”,其紊乱已被证实会导致肝脏疾病的发生发展^[6]。课题组的前期研究发现,亲水的结合型脱氧胆酸——一种结合型次级胆酸,包括甘氨酸脱氧胆酸(glycodeoxycholic acid, GDCA, 人体为主)和牛磺酸脱氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA, 小鼠为主)——在人和小鼠肝癌状态下占总胆汁酸的比例减少, GDCA可以抑制肝癌细胞的增殖、迁移,补充GDCA可抑制裸鼠皮下肝癌种植瘤的增长。既往文献同样发现在肝癌患者中GDCA比例下调的现象,而且GDCA在体外实验可诱导

SMMC–7721人肝癌细胞系的凋亡和细胞周期阻滞^[7]。然而,关于GDCA抑制肝癌增殖、转移的机制尚不清楚,值得深入研究,从而为肝癌的防治提供新的安全手段。本研究在课题组前期研究的基础上,构建了裸鼠肝癌皮下种植瘤模型和肺转移模型,并进行生物信息学分析和体外实验,以探讨GDCA抑制肝癌增殖、转移的可能机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂和细胞

研究所用主要实验试剂和细胞见表1。

1.1.2 实验器材和用品

研究的主要实验器材和用品见表2。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型

本研究的动物实验方案经过中山大学实验动物管理与使用委员会的动物实验伦理审查批准,批准文号为SYSU–IACUC–2021–000749。所有动物实验均在中山大学实验动物中心进行。实验用鼠均购自广东药康生物科技有限公司[许可证号:SCXK(粤)2020–0054]。

1.2.1.1 裸鼠皮下种植瘤模型

订购8周龄的BALB/c裸鼠,雄性,共10只,通过中山大学中山医学院何母楼实验动物中心的

检疫,用于后续实验。所有裸鼠在无特定病原体级屏障系统中饲养并进行实验。饲养室相对湿度为(55±10)%,温度为(22±2)℃,光照12h明暗交

替,裸鼠饲养用的饲料为钴-60辐射源灭菌过的大小鼠专用颗粒饲料。消化SNU-449细胞并用PBS洗涤3次后采用计数仪计数,用PBS调整细

表1 主要实验试剂和细胞

试剂名称	厂家	货号
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	碧云天生物技术有限公司	P1045
苯甲基磺酰氟	碧云天生物技术有限公司	ST507-10 ml
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司	P0013B
Immobilon™ Western 化学发光辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)底物	美国 Sigma-Aldrich Millipore 公司	P90720
Evo M-MLV 反转录试剂预混液	湖南艾科瑞生物工程有限公司	AG11706
SYBR 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒	湖南艾科瑞生物工程有限公司	AG11701
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司	PG112, PG113
电泳液粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司	G2018
转膜液粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司	G2017
Tris 缓冲盐溶液(tris buffered saline, TBS)粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司	G0001
磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司	G0002
双色预染蛋白 marker	上海雅酶生物医药科技有限公司	WJ101
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司	8121263
1640 培养基	美国 Gibco 公司	8121757
CCK-8 细胞计数试剂盒	日本同仁化学有限公司	CK04
甘氨酸脱氧胆酸钠	美国 Sigma-Aldrich 公司	G9910-1G
Lipofectamine 2000 转染试剂	美国 Invitrogen 公司	11668019
结晶紫染色液	碧云天生物技术有限公司	C0121
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液套装	武汉赛维尔生物科技有限公司	G1003
分化液	武汉赛维尔生物科技有限公司	G1005-3
返蓝液	武汉赛维尔生物科技有限公司	G1005-4
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司	10004160
GeneJET RNA 纯化试剂盒	赛默飞世尔科技公司	K0731
BCA 检测试剂盒	凯基生物科技有限公司	KGP902
电泳缓冲液(干粉)	武汉赛维尔生物科技有限公司	G2018-1L
转膜缓冲液(干粉)	武汉赛维尔生物科技有限公司	G2017-1L
TBS(干粉)	武汉赛维尔生物科技有限公司	G0001-2L
EDTA(pH 9.0)抗原修复液	谷歌生物科技有限公司	G1203
柠檬酸(pH 6.0)抗原修复液	谷歌生物科技有限公司	G1202
PBS	谷歌生物科技有限公司	G0002
牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)	谷歌生物科技有限公司	G5001
3%双氧水	武汉赛维尔生物科技有限公司	G0115
组化试剂盒 DAB 显色剂	武汉赛维尔生物科技有限公司	G1211
LM3(HCCLM3)人高转移性肝癌细胞	赛百慷(上海)生物技术股份有限公司	
SNU-449 人肝癌细胞	赛百慷(上海)生物技术股份有限公司	
HUH-7 人肝癌细胞	广州欣源生物科技有限公司	
97H(MHCC-97H)人高转移性肝癌细胞	广州欣源生物科技有限公司	

表2 主要实验器材和用品

名称	厂家	型号
正置光学显微镜	日本尼康公司	Nikon Eclipse E100
成像系统	日本尼康公司	Nikon DS-U3
凝胶/化学图像分析系统	上海天能科技有限公司	Tanan-5200
核酸分析仪	北京凯奥科技发展有限公司	K2800
StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 系统	赛默飞世尔科技公司	4480846
PCR 扩增仪	北京大龙兴创实验仪器股份公司	TC1000-G
涡旋混合器	谷歌生物科技有限公司	MX-F
掌上离心机	谷歌生物科技有限公司	D1008E
移液枪	Dragon 公司	KE0003087/KA0056573
组化笔	Gene Tech 公司	GT1001

注:PCR,聚合酶链反应。

胞悬液的浓度为 5.0×10^6 个/ml, 在裸鼠腋下进行皮下注射约 150 μ l 细胞悬液。在皮下注射约 1 周后, 可见裸鼠腋下有皮下瘤形成, 实验组裸鼠 ($n=5$) 灌胃 GDCA 溶液 [200 mg/(kg·d)], 对照组裸鼠 ($n=5$) 灌胃等量的 PBS, 定期观察肿瘤生长情况, 并用游标卡尺测量和记录皮下瘤的长短径。接种 5 周后, 处死裸鼠, 取皮下瘤, 拍照记录, 测量肿瘤长短径并称重, 使用以下公式计算肿瘤体积 (V): $V = (L \times W^2) / 2$ 。将部分标本用多聚甲醛溶液固定后进行包埋、切片、HE 染色、免疫组织化学染色, 其余冻存于液氮中。

1.2.1.2 肺转移模型

裸鼠的周龄、性别、来源、饲养条件等均同上, 共 20 只。消化 LM3 细胞并用 PBS 洗涤 3 次后采用计数仪计数, 用 PBS 调整细胞悬液的浓度为 1.0×10^7 个/ml, 从裸鼠的尾静脉注射细胞悬液, 每只 100 μ l, 之后实验组裸鼠 ($n=10$) 灌胃 GDCA 溶液 [200 mg/(kg·d)], 对照组裸鼠 ($n=10$) 灌胃等量的 PBS, 4 周后经活体成像确认裸鼠肺部出现特异性荧光信号, 实验组的信号强度高于对照组 ($P < 0.01$), 提示肺转移模型构建成功, 此时处死裸鼠, 解剖并取肺标本, 用 4% 多聚甲醛固定后进行包埋、切片、HE 染色、拍照。统计肺转移灶的数目和直径。

1.2.2 苏木精-伊红染色

(1) 将石蜡切片脱蜡水化: 切片置 65 $^{\circ}$ C 烘箱 1~2 h 后, 依次过缸二甲苯 I 15 min、二甲苯 II 15 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、90% 乙醇 2 min、80% 乙醇 2 min、70% 乙醇 2 min, 然后将切片放入自来水中。

(2) 苏木精染色: 切片置入苏木精染液染色 3~5 min, 自来水洗, 之后滴加分化液分化 30 s, 自来水浸泡 15 min, 返蓝。

(3) 伊红染色: 切片置伊红染液十几秒至 2 min, 自来水浸泡 2~5 min。

(4) 脱水、透明、封片: 切片依次过 70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I、二甲苯 II, 每个 5 min。使用中性和树脂封片。

1.2.3 免疫组织化学染色

(1) 将石蜡切片脱蜡水化: 方法同上。

(2) 修复抗原: 将切片放于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 的修复盒于微波炉中修复 (高火 5 min, 停火 3 min, 中火 5 min)。冷却后用 PBS 摇晃洗涤玻片 3 次, 每次 5 min。

(3) 灭活内源性过氧化物酶: 避光, 3% 过氧化氢孵育切片 25 min。PBS 摇晃洗涤玻片 3 次, 每次 5 min。

(4) 血清封闭: 3% BSA 在组化圈内覆盖组织室温孵育 30 min。

(5) 一抗: 在组织上滴加稀释一定比例后的一抗 (抗体信息见表 3), 切片于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(6) 二抗: PBS 摇晃洗涤玻片 3 次, 每次 5 min。应用一抗相应种属的二抗, 室温孵育切片 50 min。

(7) DAB 显色: PBS 摇晃洗涤玻片 3 次, 每次 5 min。DAB 显色, 镜下控制显色时间, 置入自来水中停止显色。

(8) 细胞核复染: 切片置入苏木精染液染色 3~5 min, 自来水洗, 之后滴加分化液分化数秒, 自来水浸泡 15 min, 返蓝。

(9) 脱水、透明、封片: 切片依次过 70% 乙醇、

80%乙醇、90%乙醇、无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I、二甲苯 II,每个 5 min。使用中性和树脂封片。

(10)显微镜拍照、分析:根据免疫组织化学染色细胞的强度和比例评分计算免疫组织化学染色总评分,计算得分的定义如下:在光学显微镜下对组织切片按染色强度(阴性上色为 0 分、淡黄色为 1 分、浅褐色为 2 分、深褐色为 3 分)、阳性比例进行评分(0~25%为 1 分、>25%~50%为 2 分、>50%~75%为 3 分、>75%~100%为 4 分)。总评分为两项评分的乘积。

表 3 免疫组织化学抗体信息

抗体	稀释比例	厂家和货号
Ki-67	1:400	美国 Cell Signaling Technology 公司,#12202
法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)	1:200	武汉三鹰生物技术有限公司,25055-1-AP
HRP 标记的山羊抗兔	1:500	武汉赛维尔生物科技有限公司,GB23303

注:HRP,辣根过氧化物酶。

1.2.4 细胞功能学实验

1.2.4.1 CCK-8 增殖实验

采用 CCK-8 细胞计数试剂盒检测肝癌细胞的增殖活力,实验组加入 GDCA 至最佳浓度(0.5 mmol/L,根据前期研究所确定的最佳浓度),对照组加入等量的 PBS。实验操作严格遵循试剂盒说明书:将细胞按 2000 个/孔的密度接种于 96 孔板,分别培养 24、48、72、96、120 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂及 100 μ l DMEM 培养基,继续孵育 2 h,最后使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值,根据吸光度值作图即为细胞的生长曲线。

1.2.4.2 克隆集落形成实验

消化、离心、吹匀肝癌细胞悬液并计数,调整浓度为 1000 个/100 μ l,6 孔板每孔接种 1000 个细胞,实验组加入 GDCA 至最佳浓度,对照组加入等量的 PBS,每组设置 3 个重复,37 $^{\circ}$ C 恒温培养,每 3 天更新 1 次培养基。定时观察细胞克隆集落,约 2 周,弃去 6 孔板的培养基,PBS 清洗后每孔加入 1 ml 4%多聚甲醛固定细胞,30 min 后回收多聚甲醛,加入 1 ml 结晶紫染液,30 min 后回收结晶紫染液,清洗多余的染液使背景干净,晾干,拍照。计算克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) \times 100%。

1.2.4.3 Transwell 细胞迁移实验

准备 24 孔板,在下层加入 600 μ l 15%胎牛血

清的培养基,上层放入 8 μ m 小孔的 Transwell 小室。消化、离心肝癌细胞,用无血清培养基重悬、计数,调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml,取 200 μ l 细胞悬液加入上层的 Transwell 小室中,实验组加入 GDCA 至最佳浓度,对照组加入等量的 PBS,每组设置 3 个重复,37 $^{\circ}$ C 恒温培养。1 d 后,将小室取出,弃去培养基,PBS 清洗后用棉签轻擦内面的细胞,留下外层的细胞,4%多聚甲醛用于固定小室上的细胞,30 min 后回收多聚甲醛,将小室浸入结晶紫染液,30 min 后回收结晶紫染液,清洗多余的染液使背景干净,晾干,显微镜下拍照、计数。

1.2.4.4 细胞划痕实验

将肝癌细胞接种在 6 cm 培养皿中,待细胞培养至密度差不多 100%时,实验组加入 GDCA 至最佳浓度,对照组加入等量的 PBS,每组设置 3 个重复,用 200 μ l 的无菌移液管尖端刮擦细胞表层形成划痕,分别于 0、8、16、24 h 在显微镜下拍照,Image J 软件计算细胞迁移率=100% \times (初始划痕面积-拍摄时划痕面积)/初始划痕面积。

1.2.5 shRNA 转染

shRNA 由广州艾基生物科技有限公司设计合成,序列见表 4,转染试剂为 Lipofectamine 2000。转染前,在无血清无抗生素的培养基中接种肝癌细胞,待细胞融合度为 50%时,按照试剂说明书配置、混匀、静置转染复合物,将其加入到细胞中,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 8 h 后更换新鲜培养基,2 d 后提取 RNA,通过实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)进行敲低效率的验证。转染成功后提取蛋白、RNA,并进行细胞功能学实验。转染 FXR shRNA 的肝癌细胞系为 shFXR 组,转染对照质粒的肝癌细胞系为 shControl 组。后续用 GDCA(最佳浓度)处理,再分为 shFXR+GDCA 组和 shControl+GDCA 组。

表 4 shRNA 序列

寡核苷酸名称	序列(5'-3')
shFXR	
正义链	GUGGAACCAUACUCGCAAUdTdT
反义链	AUUGCGAGUAUGGUUCCACdTdT
shControl	
正义链	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT
反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT

注:FXR,法尼醇 X 受体。

1.2.6 RT-qPCR 测定肝癌细胞 mRNA 表达水平

(1) 用上海生工生物工程技术有限公司官网 (<https://www.sangon.com>) 设计 FXR 的 RT-qPCR 引物(表 5)。

表 5 实时荧光定量聚合酶链反应引物序列

引物名称	序列(5'-3')
FXR 正向引物	TACCAAAAACGCTGTGTACAAG
FXR 反向引物	TTCCTTAGTCGACACTCTTGAC
人源 β -actin	TCCCTGAGAAGAGCTACGA

(2) 提取 RNA: 按照 GeneJET RNA 纯化试剂盒说明书提取各组肝癌细胞中的 RNA。

(3) 使用提取的 500 ng 总 RNA 和 Evo M-MLV 反转录试剂预混液在 PCR 扩增仪上进行反转录反应, 反应体系见表 6。

表 6 反转录反应体系

组分名称	用量(10 μ l 反应体系)
5 \times Evo M-MLV 反转录试剂预混液	2 μ l
总 RNA	500 ng
无 RNA 酶水	加至 10 μ l

(4) RT-qPCR: 使用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒在 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 系统上进行 RT-qPCR 程序, 反应体系和程序分别见表 7 和表 8。每个样品设置 3 个复孔, 每个实验重复 3 次。然后, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法评估相对 mRNA 水平, 内参选用 β -actin。

1.2.7 蛋白质印迹法测定肝癌细胞蛋白表达水平

(1) 肝癌细胞总蛋白提取和浓度测定: 用 RIPA 缓冲液裂解细胞、离心、提取蛋白, 根据 BCA 检测试剂盒的说明书测定蛋白浓度。

(2) 配胶、上样: 按照 PAGE 凝胶快速制备试剂盒说明书配置上层胶和下层胶。待测蛋白样本中加入 5 \times 上样缓冲液, 混匀, 95 $^{\circ}$ C 金属浴 15 min, 离心震荡混匀。将电泳液加入电泳槽中, 待胶板固定后取下梳子, 每孔加入相同质量(30 μ g)的蛋白样品, 两侧的孔加入双色预染蛋白 marker 5 μ l, 用 1 \times 上样缓冲液补齐各孔上样体积。

(3) 电泳、转膜、封闭: 电泳按 80 V、0.5 h(上层胶)和 110 V、1.5 h(下层胶)的条件进行, 结束后进行转膜, 在 110 V、1.5 h 的条件下将蛋白从凝胶中转移至 PVDF 膜上。结束后裁剪 PVDF 膜, 置于 5%脱脂牛奶中, 室温摇床封闭 1~2 h。

表 7 实时荧光定量聚合酶链反应的反应体系

组分名称	用量(20 μ l 反应体系)
2 \times SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒	10 μ l
cRNA(反转录反应液)	\leq 2 μ l
正向引物(10 μ mol/L)	0.4 μ l
反向引物(10 μ mol/L)	0.4 μ l
ROX 参比染料(20 μ mol/L)	0.4 μ l
无 RNA 酶水	加至 20 μ l

表 8 实时荧光定量聚合酶链反应的反应程序

温度($^{\circ}$ C)	时间	循环数(次)
95	30 s	1
95	5 s	40
60	30 s	40
4	保持	1

(4) 抗体孵育: 用 1 \times TBST 进行 3 次洗膜, 每次 5 min, 然后将膜置于一抗溶液(3% BSA 稀释)中, 低速摇床 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。回收一抗, 用 1 \times TBST 洗膜 3 次。之后将条带放入二抗溶液中, 室温孵育 2 h。一抗抗体及具体稀释比例见表 9。

(5) 显影: 用 1 \times TBST 进行 3 次洗膜, 配置显影液, 将其滴于蛋白条带上, 使用凝胶图像分析系统采集图像, 之后进行结果分析和图像处理。

1.2.8 生物信息学分析

1.2.8.1 靶点蛋白预测

Swiss Target Prediction (<http://www.swisstarget-prediction.ch/>) 基于所提交的小分子化合物结构, 从 2D 和 3D 结构相似性的角度, 间接预测提交小分子化合物的作用靶点。将从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载的 GDCA 的 3D 结构 sdf 格式文件, 输入 Swiss Target Prediction 网站进行靶点对接, 获得 GDCA 潜在的靶点基因, 即为活性成分作用靶点。

1.2.8.2 分子对接

从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中获得 GDCA 和 FXR 的化学及三维结构, 蛋白质分子去水、去磷酸根等操作由 Pymol 2.3.2 软件实施, 运行 Auto Dock 1.5.6 软件将 GDCA 与 FXR 的 pdb 格式转为 pdbqt 格式并寻找活性口袋, 然后应用 AutoDockTools 进行分子对接并计算分子结合能。文献报道, 分子对接的结合能 <-4.25 kcal/mol 表示配体小分子与受体蛋白之间有一定的结合活

表9 蛋白质印迹法抗体信息

抗体	稀释比例	厂家和货号
GAPDH	1:5000	武汉三鹰生物技术有限公司, 60004-1-Ig
FXR	1:1000	武汉三鹰生物技术有限公司, 25055-1-AP
脂质运载蛋白 2(lipocalin-2, LCN2)	1:500	武汉三鹰生物技术有限公司, 26991-1-AP
Snail	1:500	武汉三鹰生物技术有限公司, 26183-1-AP
E-钙黏蛋白	1:5000	武汉三鹰生物技术有限公司, 20874-1-AP
N-钙黏蛋白	1:500	美国 Abcam 公司, ab98952
波形蛋白	1:2000	武汉三鹰生物技术有限公司, 10366-1-AP
β -catenin	1:5000	美国 Abcam 公司, ab32572
HRP 标记的山羊抗兔 IgG	1:5000	武汉赛维尔生物科技有限公司, GB23303
HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG	1:5000	武汉赛维尔生物科技有限公司, GB23301

注:FXR,法尼醇 X 受体;HRP,辣根过氧化物酶。

性,结合能 <-5.0 kcal/mol 表明二者之间有良好的结合活性,而结合能 <-7.0 kcal/mol 表明配体与受体之间具有极强的结合活性^[8]。

1.2.8.3 Kaplan-Meier plotter 数据库临床数据分析

基于 Kaplan-Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com>),以肝癌患者肿瘤组织中的 FXR 表达量中位数为界,将肝癌患者分为 FXR 高、低表达两组,分析两组患者的总生存(overall survival, OS)期和无进展生存(progression-free survival, PFS)期差异。

1.2.8.4 基因表达综合 (gene expression omnibus, GEO)数据库数据分析

使用的数据集为来自 GEO 数据库中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 的 GSE151524 数据集,下载数据格式为 MINiML。使用 R 软件的 limma 软件包 (3.40.2 版本) 研究 mRNA 的差异表达。在 GEO 数据库中分析了调整后的 P 值 (Q 值)以纠正假阳性结果。“ $Q < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ ”被定义为阈值 mRNA 差异表达的筛选条件。

1.2.9 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析和作图,正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用独立样本 t 检验进行比较。生存分析采用 Kaplan-Meier 法以及 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GDCA 抑制肝癌细胞的体内增殖和转移

采用 SNU-449 细胞构建的裸鼠皮下种植瘤

模型实验结果显示,与对照组相比,GDCA 给药的实验组的瘤体重量 [(0.179 \pm 0.069) g 比 (0.618 \pm 0.063) g, $P=0.002$] 和体积 [(241.70 \pm 53.63) mm³ 比 (582 \pm 71.91) mm³, $P=0.005$] 均降低(图 1A)。对种植瘤体切片进行增殖标志物 Ki-67 染色,结果显示实验组肿瘤组织中 Ki-67 阳性比例降低(图 1B),提示 GDCA 可抑制 SNU-449 细胞在体内的增殖。采用 LM3 细胞建立的裸鼠肝癌肺转移模型的肺组织 HE 染色结果表明,GDCA 给药的实验组肺上转移灶数目 [(6.200 \pm 1.643) 个比 (10.000 \pm 2.449) 个, $P=0.021$] 和直径 [(1.255 \pm 0.197) mm 比 (1.875 \pm 0.171) mm, $P < 0.001$] 均较对照组减少(图 1C、1D)。

2.2 GDCA 可能通过结合 FXR 发挥抑癌作用

基于 GDCA 的小分子化合物结构(图 2A),通过 Swiss Target Prediction 网站进行 GDCA 的靶点对接,获得前 10 位潜在的活性成分作用靶点基因(表 10),结果显示 GDCA 与 FXR(*NR1H4*)作用的可能性最大(probability=0.682 406)。因此,本研究选择 GDCA 在肝癌细胞上的特异性受体 FXR 进行后续研究。

利用 AutoDockTools 对 GDCA 和 FXR 进行分子对接并计算结合能,结果显示 GDCA 与 FXR 的结合能为 -8.2 kcal/mol,表明 GDCA 与 FXR 之间具有强烈的结合活性。采用 Pymol 2.3.2 软件进行分子对接的可视化呈现(图 2B),可见 GDCA 以氢键形式与 FXR 活性位点附近的 5 个氨基酸结合,分别为 MET-269、MET-332、ARG-335、SER-336、TYR-373。

Kaplan-Meier plotter 数据库的分析结果显示,

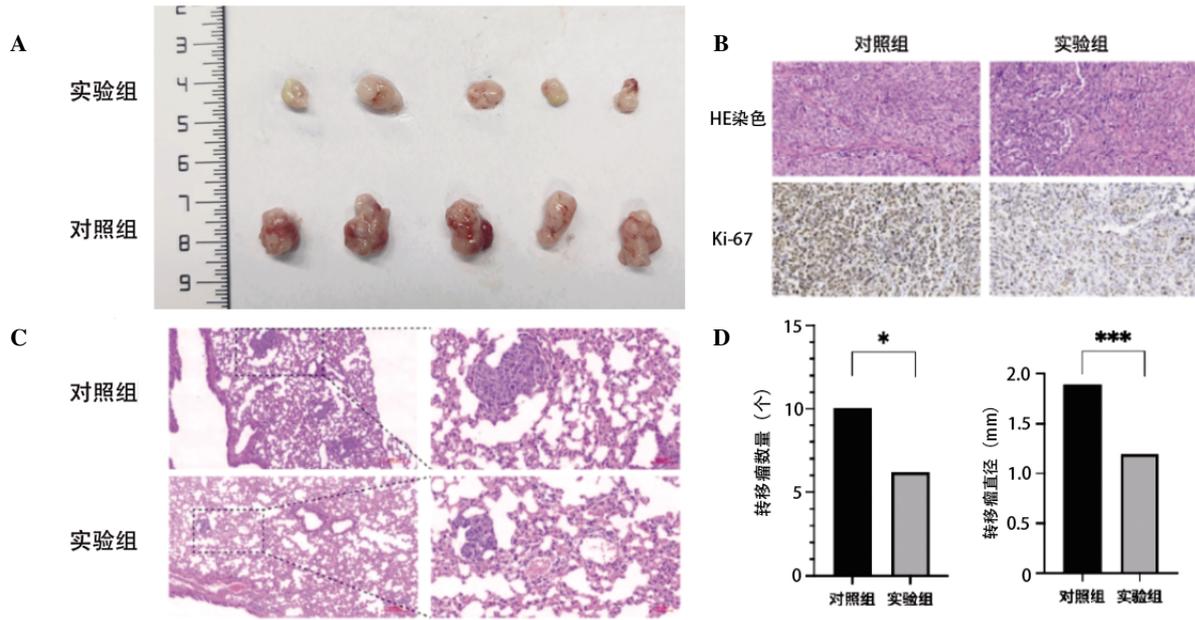


图1 GDCA 体内抑制肝癌细胞的生长和转移

注:A,裸鼠皮下瘤标本;B,皮下瘤组织的HE染色和Ki-67免疫组织化学染色($\times 10$);C,裸鼠肝癌肺转移模型肺标本HE染色(左图 $\times 10$ 、右图 $\times 40$);D,裸鼠肝癌肺转移瘤数目及大小。HE,苏木精-伊红。 $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ 。

FXR 低表达患者中位 OS 期为 47.4 个月,高表达患者则为 104.2 个月($HR=0.52$, $95\%CI 0.33\sim 0.82$, $P=0.0045$,图 3A);FXR 低表达患者中位 PFS 期为 14.33 个月,高表达患者则为 30.10 个月($HR=0.63$, $95\%CI 0.47\sim 0.85$, $P=0.0022$,图 3B)。

2.3 FXR 及上皮-间质转化相关标志物的表达量验证

通过蛋白质印迹法检测 SNU-449、HUH-7、LM3、97H 这 4 种肝癌细胞系中 FXR 和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关标志物的蛋白表达,结果发现经 GDCA 处理后,

FXR 和上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白表达量升高,而间质细胞标志物波形蛋白、 β -catenin、Snail 的表达量降低(图 4A),提示 GDCA 可能介导 FXR 增加从而抑制肝癌细胞的 EMT 过程。此外,裸鼠皮下瘤标本的 FXR 免疫组织化学染色总评分在 GDCA 给药的实验组中也较对照组高 [(2.280 ± 0.438) 分比 (5.520 ± 0.716) 分, $P < 0.001$,图 4B]。

2.4 敲低 FXR 能逆转 GDCA 的抑癌与抑制 EMT 过程的作用

鉴于前期筛选发现 LM3 细胞具有较高的转移潜能,对 GDCA 敏感且其 FXR 表达量较高,故

表 10 GDCA 的前 10 位靶点基因预测

靶点	通用基因名	Uniprot ID	ChEMBL ID	probability
胆汁酸受体 FXR	NR1H4	Q96R11	CHEMBL2047	0.682 406
磷脂酶 A2 V 组	PLA2G5	P39877	CHEMBL4323	0.114 839
雌二醇 17 β -脱氢酶 3	HSD17B3	P37058	CHEMBL4234	0.114 839
氨基肽酶 B	RNPEP	Q9H4A4	CHEMBL2432	0.106 543
蛋白激酶 C α	PRKCA	P17252	CHEMBL299	0.106 543
整合素 α II b/ β 3	ITGA2B ITGB3	P08514 P05106	CHEMBL2093869	0.106 543
雄激素受体	AR	P10275	CHEMBL1871	0.106 543
亮氨酸氨基肽酶	LAP3	P28838	CHEMBL3965	0.106 543
血管紧张素转换酶	ACE	P12821	CHEMBL1808	0.106 543
磷脂酶 A2 II A 组	PLA2G2A	P14555	CHEMBL3474	0.106 543

注:FXR,法尼醇 X 受体。

选取 LM3 细胞进行 FXR 敲低实验, 结果可见 shFXR 组的 FXR mRNA 表达较 shControl 组下降 ($P<0.001$, 图 5A)。接着, 观察敲低 FXR 后细胞的

表型变化, 可见 FXR 敲低后细胞克隆形成率增加 [(28.970±1.850)% 比 (20.900±1.852)% , $P<0.001$, 图 5B], 增殖能力增强 ($P=0.002$, 图 5C), 穿过小室

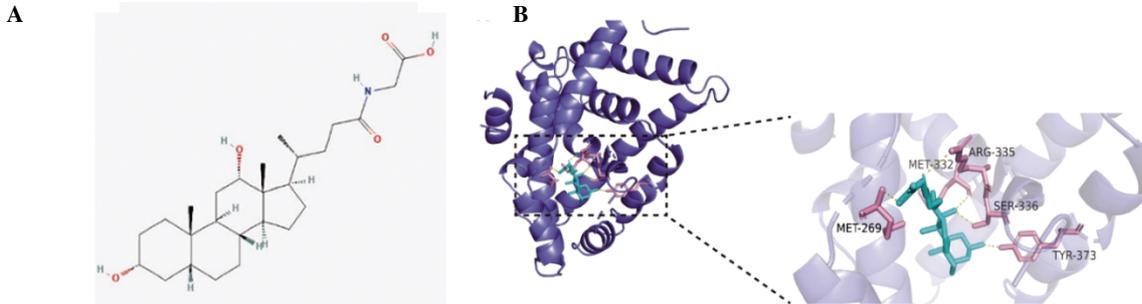


图 2 Swiss Target Prediction 联合分子对接鉴定 FXR 为 GDCA 的高亲和力作用靶点注: A, GDCA 的化学结构; B, GDCA 与 FXR 分子对接的模式图。GDCA, 甘氨脱氧胆酸。

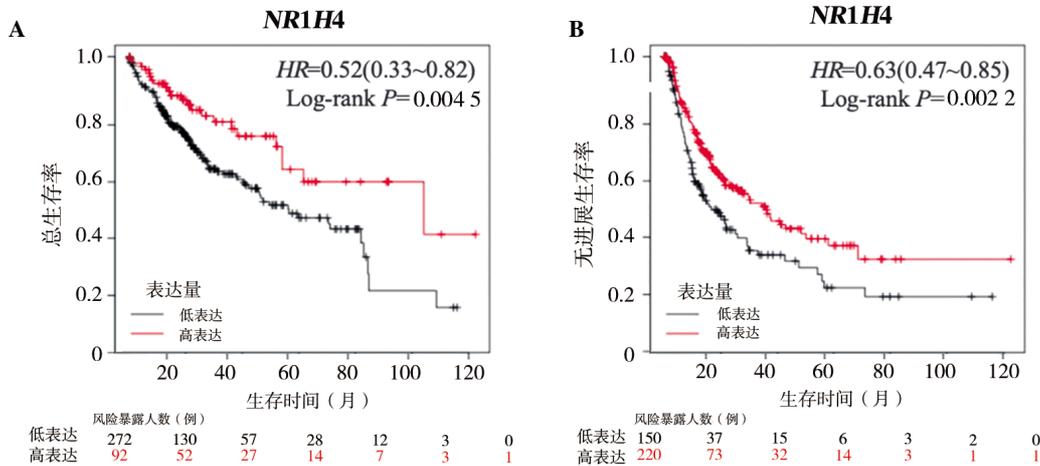


图 3 Kaplan-Meier plotter 数据库中 FXR 高表达与低表达肝癌患者的生存曲线注: A, 总生存曲线; B, 无进展生存曲线。

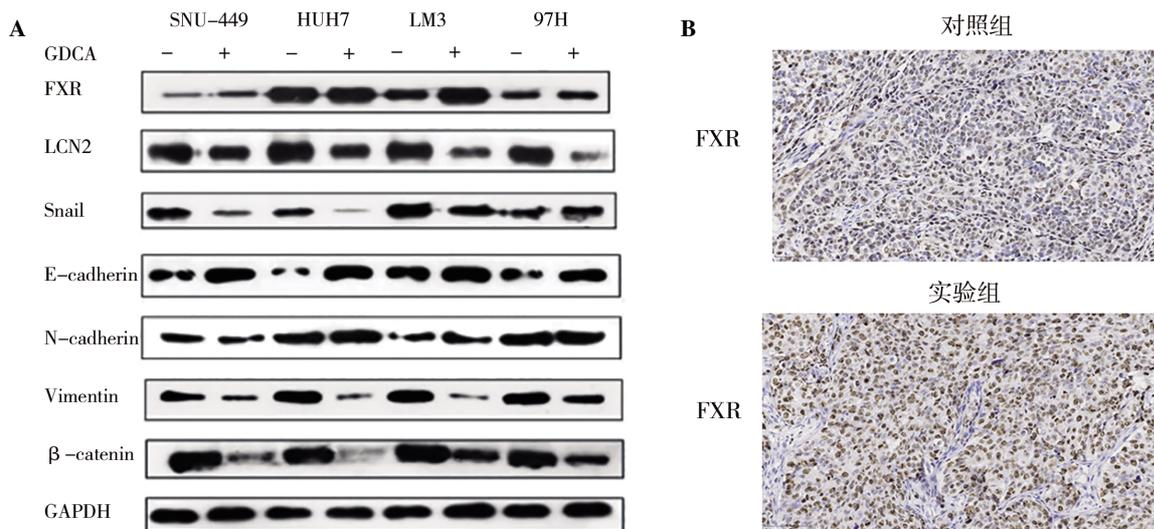


图 4 GDCA 上调 FXR 并抑制肝癌细胞上皮-间质转化表型的体内外验证

注: A, 蛋白质印迹法检测 GDCA 处理肝癌细胞系后的 FXR 以及上皮-间质转化相关标志物的表达; B, 裸鼠皮下瘤标本中的 FXR 免疫组织化学染色($\times 40$)。GDCA, 甘氨脱氧胆酸; FXR, 法尼醇 X 受体; LCN2, 脂质运载蛋白 2; E-cadherin, E-钙黏蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; Vimentin, 波形蛋白。

的肝癌细胞数量增多[(274±40)个比(153±11)个, $P<0.001$,图 5D]。此外,FXR 的敲低抑制了 GDCA 的治疗效果,shFXR+GDCA 组的细胞增殖、侵袭能力强于 shControl+GDCA 组:克隆形成率增加[(24.77±0.839)%比(14.10±1.054)%, $P<0.001$,图 5B]、细胞增殖能力增强($P=0.006$,图 5C)、穿过小室的细胞数量增多[(180±13)个比(35±10)个, $P<0.001$,图 5D]、划痕实验细胞迁移率上升[(52.390±3.101)%比(31.250±1.735)%, $P=0.005$,图 5E]。

此外,shFXR 组与 shControl 组相比,N-钙黏蛋白、波形蛋白等的表达量增加,而 E-钙黏蛋白表达量减少。shFXR+GDCA 组也较 shControl+GDCA 组的波形蛋白表达量增加,而 E-钙黏蛋白表达量减少(图 6)。

通过检索 GEO 数据集,发现 FXR 敲除的小鼠能自发形成肝癌(GSE151524)。对该数据集中肝组织的差异表达基因进行分析后发现,促进 EMT 相关的基因(*S100A8*^[9]、*LGALS1*^[10]、*SPP1*^[11]等)表达升高,而抑制 EMT 相关的基因(*GLS2*^[12]、*NDRG2*^[13]等)表达降低(表 11)。

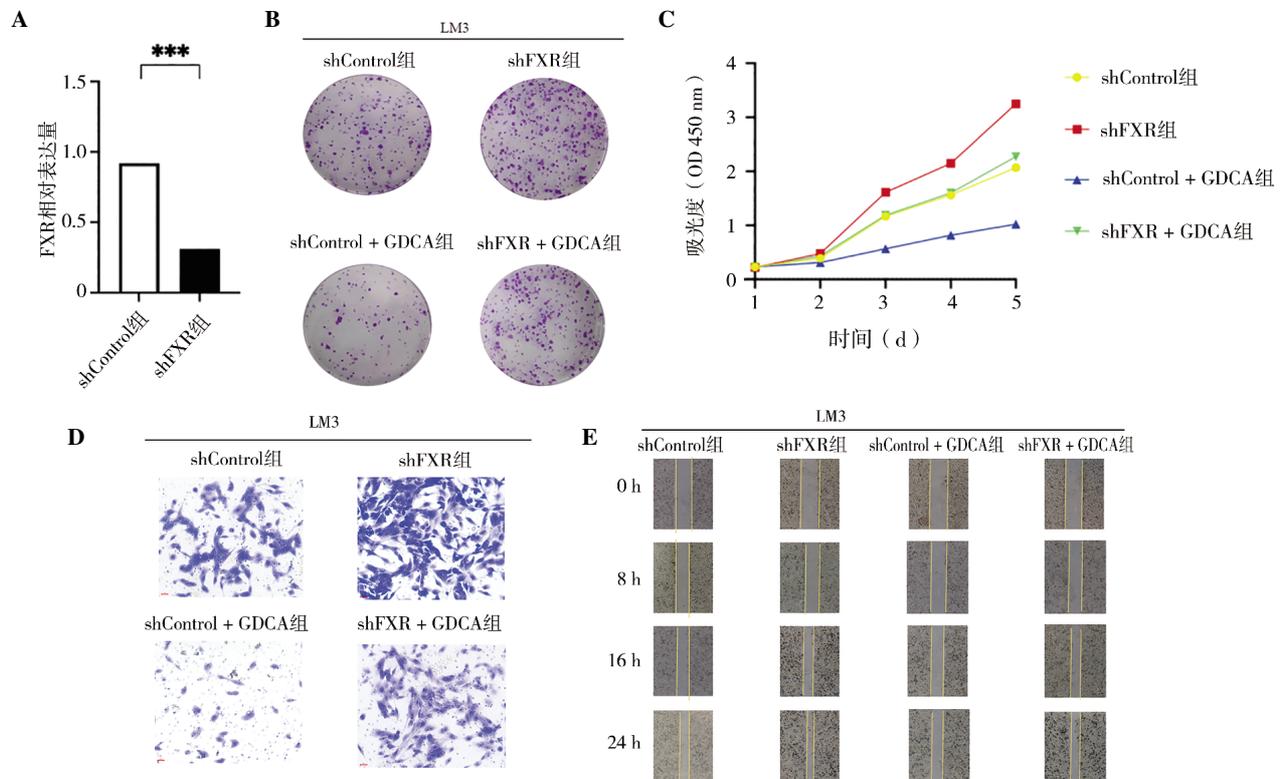


图 5 敲低 FXR 削弱 GDCA 对肝癌细胞增殖、迁移的抑制效应

注:A,实时荧光定量聚合酶链反应验证 FXR 敲低的效率;B,克隆集落形成实验(结晶紫染色,×40);C,CCK-8 细胞增殖实验;D,Transwell 细胞迁移实验(结晶紫染色,×10);E,细胞划痕实验。GDCA,甘氨脱氧胆酸;FXR,法尼醇 X 受体。*** $P<0.001$ 。

LM3

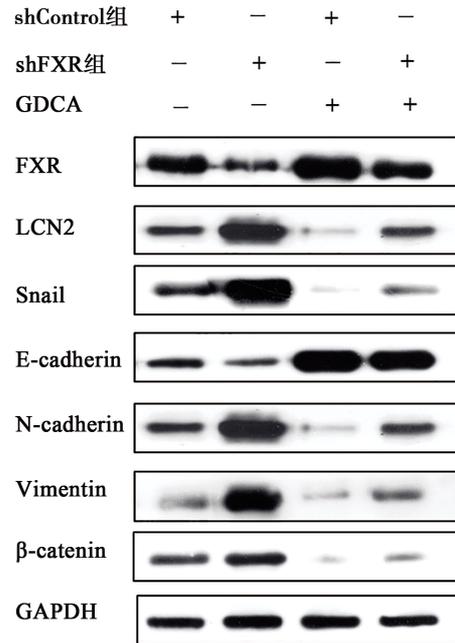


图 6 蛋白质印迹法检测 FXR 敲低后 LM3 肝癌细胞的 FXR 和上皮-间质转化相关标志物的表达情况

注:GDCA,甘氨脱氧胆酸;FXR,法尼醇 X 受体;LCN2,脂质运载蛋白 2;E-cadherin,E-钙黏蛋白;N-cadherin,N-钙黏蛋白;Vimentin,波形蛋白。

表 11 FXR 基因敲除小鼠上皮-间质转化相关基因的表达情况

基因	log2FC	Q 值
LCN2	3.150	1.63E-07
S100A8	2.814	<0.001
LGALS1	1.852	6.71E-07
SPP1	1.725	3.21E-09
NTRK2	1.540	<0.001
GDF15	1.494	<0.001
ANXA2	1.354	<0.001
TGM2	1.172	7.10E-10
MMP2	1.080	1.47E-06
TIMP1	1.029	2.85E-05
KLF6	1.025	6.35E-06
EGR1	1.023	0.007
GLS2	-1.320	2.01E-05
NDRG2	-1.663	3.95E-11

3 讨论

研究表明,胆汁酸对细胞的影响往往取决于胆汁酸的亚型、生化特性和浓度,以及细胞类型及其表达的受体^[14]。关于胆汁酸与肝癌的关系,相关研究指出疏水性的胆汁酸可促进肝癌的发展^[15-16],而亲水性的胆汁酸,如熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)则可抑制肝癌细胞增殖、诱导凋亡^[17]。然而,不同研究间尚存在矛盾的结果,具体作用机制仍不明确。围绕这一问题,笔者课题组的前期研究通过胆汁酸测序揭示了肝癌患者和肝癌小鼠血中亲水性的结合型脱氧胆酸显著减少的现象,且该减少现象与肠道菌群中分泌胆盐水解酶的细菌减少相关^[5]。课题组也发现GDCA治疗可以明显抑制人肝癌细胞株的体内外增殖、转移能力。文献同样指出在肝癌患者中GDCA比例下调的现象^[18-19],而且GDCA在体外实验可诱导SMMC-7721人肝癌细胞系的凋亡、细胞周期阻滞^[20-21],因此,有必要对GDCA抑制肝癌的作用进行确认,并对其具体机制深入探究。

本研究在前期研究结果的基础上,首先通过体内种植瘤明确GDCA治疗抑制了种植瘤内肿瘤细胞的Ki67表达。通过转移瘤模型实验,验证了GDCA可在体内显著抑制肝癌的肺转移。

鉴于在体内外实验中明确了GDCA具有抑制肝癌的作用,课题组期望分析、筛选出GDCA起作用的相应靶点。Swiss Target Prediction网站由瑞士

生物信息学研究所开发,可以基于提交的小分子化合物结构,预测该化合物的作用靶点,目前已被广泛应用于计算机辅助的药物设计。本研究利用Swiss Target Prediction工具进行预测,得到GDCA最佳靶点为FXR。然后,通过AutoDockTools进行分子对接,发现GDCA与FXR间的结合能达到-8.2 kcal/mol,具有极强的结合活性,并确定了它们之间可能结合的5个氨基酸:MET-269、MET-332、ARG-335、SER-336、TYR-373。

FXR是一种重要的胆汁酸受体,其主要在肝脏、小肠、胆管、肾脏中表达,参与胆汁酸和胆固醇稳态的维持^[22];调节脂质代谢及生长因子、炎症因子和氧化应激酶的表达^[23];参与葡萄糖代谢和胰岛素敏感性的调节^[24];维持肠道黏膜免疫系统平衡以保护肠道上皮屏障功能等^[25]。同时,目前研究也发现FXR与肝癌的发生发展密切相关^[22, 26]。在炎症过程中,FXR表达减少将导致肝脏转运蛋白功能下降,致使肝脏胆汁酸淤积和持续炎症,促进肝癌的发展^[27-28],而FXR的过表达可以通过调控肿瘤抑制因子NDRG2降低肝癌生长和转移的潜力,并增加FXR激动剂的抗肿瘤功效^[29];FXR还可以通过抑制信号转导和转录激活因子3或核因子κB等炎性通路以及活性氧的产生进而抑制肝脏炎症和肝癌的发生^[30-31]。FXR缺陷的小鼠将自发形成肝癌^[32],而肠道FXR的特异性激活则能预防FXR缺陷小鼠自发性肝癌的发生^[33]。为探究FXR表达与临床肝癌患者预后的关系,课题组利用Kaplan-Meier plotter数据库进行分析,验证了FXR高表达肝癌患者的OS期和PFS期更长。体内外实验也发现,GDCA处理后肝癌细胞以及种植瘤上FXR的表达上调。结合相关结果,课题组推测GDCA抑制肝癌的作用可能通过与FXR结合实现。

EMT过程,是指上皮细胞逐渐失去其细胞黏附、紧密连接等上皮分化特征,获得具有迁移性、侵袭性等间质表型的过程^[34-35],可促使肿瘤获得迁移、侵袭等恶性进展的潜能,对于肿瘤的发生、发展有重要意义^[36]。目前认为,上皮和间质细胞存在各自特异性表达的分子标志物,如上皮细胞主要表达E-钙黏蛋白、紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1),间质细胞主要表达波形蛋白、N-钙黏蛋白。文献报道,E-钙黏蛋白在肝癌中低表达,与组织学低分化、侵袭性、转移呈负相关,

而波形蛋白在肝癌中高表达,与组织学低分化、侵袭性、转移呈正相关^[37-39]。本研究采用蛋白质印迹法检测 GDCA 处理肝癌细胞后 EMT 相关蛋白表达量的变化,结果证实,GDCA 处理导致上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白的上调,而促进 EMT 过程的相关标志物波形蛋白则下调。

Wolfe 等^[40]发现 FXR 基因敲除小鼠可以自发形成肝癌,并可见 EMT 相关蛋白 Snail 表达增加。为证明 FXR 是否抑制了 EMT 过程,本研究建立了敲低 FXR 的 LM3 肝癌细胞株,结果表明敲低 FXR 后,肝癌细胞增殖、侵袭、转移能力加强,同时也发现 FXR 敲低后,E-钙黏蛋白表达的减少以及波形蛋白表达的增加,证实 FXR/EMT 信号轴的存在。另外,FXR 的敲低减弱了 GDCA 抑制肝癌细胞增殖、侵袭和转移的能力,抑制了 GDCA 下调促 EMT 相关标志物的效果。由此推测,作为一种 FXR 的天然激动剂^[41],GDCA 通过与 FXR 有效结合,抑制肝癌 EMT 过程,而 FXR 的敲低则逆转了 GDCA 的抑癌作用。本研究不仅为探索肝癌的机制提供了新的思路,也为日后寻找肝癌有效的预测指标和新的治疗策略提供了研究基础。

本研究尚存在一些不足之处。第一,本研究仅使用肝癌患者显著降低的 GDCA 开展研究,而对于小鼠常见的 TDCA 是否能在小鼠肝癌上起作用,以及其他结合型次级胆酸(如 UDCA 和牛磺熊去氧胆酸)能否抑制肝癌及其作用机制,尚需未来深入研究。第二,GDCA 与 FXR 相互作用的方式仍有待探索,如运用表面等离子共振和等温滴定量热等技术开展实验以明确 GDCA 调控 FXR 的具体机制。第三,本研究仅验证了 GDCA 通过调控 FXR/EMT 信号通路起作用,但 FXR 具体调节 EMT 信号通路的机制也尚待探究。

综上,本研究通过体内外实验,验证在肝癌患者中显著减少的 GDCA 可以抑制肝癌的增殖、侵袭和转移,生物信息学分析和分子生物学实验表明 GDCA 可能通过 FXR 信号轴调控 EMT 过程,从而抑制肝癌发展。本研究对 GDCA 在肝癌中的功能和相关分子机制的探索,验证了胆汁酸 GDCA/FXR/EMT/肝癌侵袭转移相关的信号调控轴,为肝癌的诊断和治疗提供了潜在的生物标志物和靶标。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李智超,负责实验设计、实验操作、数据收集和初步分析,并撰写论文的大部分内容;柯立鑫,参与实验设计和数据分析,并撰写论文的部分章节;林俊龙,负责数据的最终分析和论文的校对工作;高凯,负责数据的最终分析和论文的校对工作;华赞鹏,负责对论文草稿进行批判性审阅、评论、修订和润色,包括增加重要的学术内容,负责研究项目的日常管理、进度协调和监督,为整个研究项目提供学术指导、监督

人工智能使用声明 本文未使用任何人工智能相关工具对文字及图表进行处理

参考文献

- [1] LLOVET JM, KELLEY RK, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 6.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] LIN H, JEON AJ, CHEN K, et al. The epigenetic basis of hepatocellular carcinoma—mechanisms and potential directions for biomarkers and therapeutics [J]. Br J Cancer, 2025, 132(10): 869-887.
- [4] KUANG J, WANG J, LI Y, et al. Hyodeoxycholic acid alleviates non-alcoholic fatty liver disease through modulating the gut-liver axis [J]. Cell Metab, 2023, 35(10): 1752-1766.e8.
- [5] SHEN R, KE L, LI Q, et al. Abnormal bile acid-microbiota crosstalk promotes the development of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Int, 2022, 16(2): 396-411.
- [6] FUCHS CD, SIMBRUNNER B, BAUMGARTNER M, et al. Bile acid metabolism and signalling in liver disease [J]. J Hepatol, 2025, 82(1): 134-153.
- [7] CHEN T, ZHOU K, SUN T, et al. Altered bile acid glycine: taurine ratio in the progression of chronic liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2022, 37(1): 208-215.
- [8] PINZI L, RASTELLI G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4331.
- [9] CORMIER K, HARQUAIL J, OUELLETTE R, et al. Intracellular expression of inflammatory proteins S100A8 and S100A9 leads to epithelial-mesenchymal transition and attenuated aggressivity of breast cancer cells [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(1): 35-45.
- [10] BACIGALUPO ML, MANZI M, ESPELT MV, et al.

- Galectin -1 triggers epithelial -MESENCHYMAL transition in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(6): 1298-1309.
- [11] DONG Q, ZHU X, DAI C, et al. Osteopontin promotes epithelial -mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma through regulating vimentin [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12997-13012.
- [12] KUO T, CHEN C, HUA K, et al. Glutaminase 2 stabilizes Dicer to repress Snail and metastasis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2): 282-294.
- [13] KIM MJ, LIM J, YANG Y, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) suppresses the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells via STAT3/Snail signaling [J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(1): 33-42.
- [14] SHAPIRO H, KOLODZIEJCZYK AA, HALSTUCH D, et al. Bile acids in glucose metabolism in health and disease[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(2): 383-396.
- [15] NGUYEN PT, KANNO K, PHAM QT, et al. Senescent hepatic stellate cells caused by deoxycholic acid modulates malignant behavior of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146 (12): 3255-3268.
- [16] YOSHIMOTO S, LOO TM, ATARASHI K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome [J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 97-101.
- [17] OYAMA K. Reduction of hepatocarcinogenesis by ursodeoxycholic acid in rats [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(5): 885-892.
- [18] RESSOM HW, XIAO J, TULI L, et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 743: 90-100.
- [19] XIAO J, VARGHESE RS, ZHOU B, et al. LC-MS based serum metabolomics for identification of hepatocellular carcinoma biomarkers in Egyptian cohort [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(12): 5914-5923.
- [20] 陈江, 黄文芳, 郭谕, 等. 甘氨酸脱氧胆酸钠对人肝癌细胞周期及 P21mRNA 表达的影响 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007(5): 871-872.
- [21] 陈江, 黄文芳, 逯兴敏, 等. 甘氨酸脱氧胆酸诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡中对 P53 表达的影响 [J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(3): 167-169.
- [22] JIA W, XIE G, JIA W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2): 111-128.
- [23] JIANG T, WANG X, SCHERZER P, et al. Farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism, fibrosis, and diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2007, 56 (10): 2485-2493.
- [24] ZHANG Y, LEE FY, BARRERA G, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(4): 1006-1011.
- [25] GADALETA RM, VAN ERPECUM KJ, OLDENBURG B, et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2011, 60(4): 463-472.
- [26] KUIPERS F, BLOKS VW, GROEN AK. Beyond intestinal soap--bile acids in metabolic control [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(8): 488-498.
- [27] CUPERUS FJC, CLAUDEL T, GAUTHEROT J, et al. The role of canalicular ABC transporters in cholestasis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(4): 546-560.
- [28] HALILBASIC E, CLAUDEL T, TRAUNER M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(1): 155-168.
- [29] DEUSCHLE U, SCHÜLER J, SCHULZ A, et al. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e43044.
- [30] GUO F, XU Z, ZHANG Y, et al. FXR induces SOCS3 and suppresses hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34606-34616.
- [31] WANG Y, CHEN W, WANG M, et al. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response [J]. *Hepatology*, 2008, 48 (5): 1632-1643.
- [32] YANG F, HUANG X, YI T, et al. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 863-867.
- [33] DEGIROLAMO C, MODICA S, VACCA M, et al. Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor -null mice by intestinal -specific farnesoid X receptor reactivation [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 161-170.
- [34] COOPMAN P, DJIANE A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(18): 3535-3553.
- [35] FOUNOUNOU N, LOYER N, LE BORGNE R. Septins

- regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells[J]. *Dev Cell*, 2013, 24(3): 242–255.
- [36] KRIZANAC M, MASS SANCHEZ PB, WEISKIRCHEN R, et al. A Scoping Review on Lipocalin-2 and Its Role in Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2865.
- [37] BOLÓS V, PEINADO H, PÉREZ-MORENO MA, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(3): 499–511.
- [38] YANG J, MANI SA, DONAHER JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927–939.
- [39] BATLLE E, SANCHO E, FRANCÍ C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 84–89.
- [40] WOLFE A, THOMAS A, EDWARDS G, et al. Increased activation of the Wnt/ β -catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 338(1): 12–21.
- [41] PARKS DJ, BLANCHARD SG, BLEDSOE RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1365–1368.

收稿日期: 2025-09-16