

的疾病特征之一^[4]。

本研究模型组雌鼠自孕期第 2 天给予尾静脉注射 NOS 抑制剂 L-NAME, 直至新生鼠出生后第 21 天。本研究关注了 NGF 下游的两个受体——TrkA 与 p75NTR, 并发现两者表达在 CHPS 幽门组织中显著下降, 提示存在一种可致幽门部肠神经系统发育异常的致病机制, NGF 及其受体下调可能起到关键作用。需要注意的是, 幽门肌细胞的来源并不完全清楚^[5], 可能主要来源于间充质细胞, 其与肌细胞交叉分布, 发挥过程中受到多种因素的影响。离体研究也发现, 肌间神经节细胞能够调节促进细胞轴突生长, 神经控制异常会导致肌肉无法松弛, 再通过过多的生长因子, 导致肌细胞增殖、肥大。其与 CHPS 的因果关系也不明确。有研究认为婴儿使用红霉素、妊娠期间母亲使用红霉素都可能增加 CHPS 发生风险, 但缺乏足够的循证证据。最后, CHPS 有明显的家族遗传倾向, 越来越多的证据显示, 遗传基因多态性可能与 CHPS 发病有关, 且不仅仅存在一个致病基因^[6], 这些基因是否参与 NGF 及其受体表达调节有待商榷。

本研究显示, CHPS 幽门组织的 NGF 及其受体表达异常, TrkA 与 p75NTR 的降低及 NGF 表达减少, 这种改变可能与 CHPS 的发病有关。关于 CHPS 发生机制主要为幽门肌改变、卡哈尔间质细胞发育异常、染色体及基因异常等^[7]。常见的病理表现为幽门环形肌增生肥厚, 可合并多种畸形, 提示 CHPS 可能是一种多因性病变, 如其他畸形病因存在共性, 也存在特异性。幽门肌中多种生长因子及其受体表达明显增加, 肌肉中的神经末梢、肽能神经纤维等显著减少。神经胶质细胞有神经营养因

子作用, 而 NGF 及其受体在消化道的生理及病理过程中起到促进作用。无法发挥作用从而导致相关肌肉中的神经系统、肽能神经纤维发育不良, 平滑肌细胞增殖增生, 最终导致 CHPS 发生。

本研究为动物实验, 样本量有限, 影响一些评价指标, 将来拟扩大样本再进一步分析; 后续计划开展 CHPS 患儿的病理、分子生物学研究, 以进一步分析 NGF 与 CHPS 的关系。

综上所述, NGF 与 CHPS 具有因果关系, 而二者的结合点是 CHPS 引发的 NGF 受体表达降低, 具体表现为 TrkA 与 p75NTR 的表达降低, 这为深化 CHPS 机制研究提供了实验证据。

参考文献

- [1] 蔡本龙, 张又祥. 先天性肥厚性幽门狭窄手术方式研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2016, 43 (3): 201-203.
- [2] 李万福, 马柱, 李朝旺, 等. 腹腔镜幽门环肌切开术与开腹手术治疗先天性肥厚性幽门狭窄有效性和安全性 Meta 分析 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28 (18): 1433-1436.
- [3] 曲颜, 刘远梅. 胶质细胞源性神经营养因子在肠神经系统中的作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29 (5): 384-386.
- [4] 高颜, 王春晖, 林燕, 等. 红霉素对胃食管反流兔模型胃肠道动力作用的影响 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31 (07): 491-495.
- [5] Gezer H Ö, Oguzkurt P, Temiz A, et al. Hypertrophic pyloric stenosis in twins; genetic or environmental factors [J]. Clin Genet, 2015, 87 (4): 388-391.
- [6] Boybeyi O, Soyer T, A tasoy P, et al. Investigation of the effects of charm Horm ones Oil the pyloric muscle in newborn rats [J]. J Pediatr Surg, 2015, 50 (3): 408-412.
- [7] 魏颖, 张又祥, 张榕培, 等. 肝细胞生长因子在先天性肥厚性幽门狭窄大鼠幽门中的表达 [J]. 广东医学, 2015, 36 (12): 1855-1858.

• 基础研究 •

肿瘤相关成纤维细胞经 FGF19/FGFR4 信号轴调控结肠癌细胞生长的实验研究

福建医科大学省立临床学院 福建省立金山医院普外科 (福州 350007) 杨国华 郑圣斌 林彩锋 黄若磊

【摘要】 目的 探讨肿瘤相关成纤维细胞 (CAF) 通过 FGFR4/FGF19 信号轴调控结肠癌生长可能机制。方法 将研究对象分为 3 组, 分别是细胞组、细胞+NF 组、细胞+CAF 组。绘制各组癌细胞生长曲线, 采用 ELISA 法检测细胞外 FGF19 因子浓度变化。结果 癌细胞与 CAF 共培养后, 癌细胞生长率明显提高, 与其他组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞外 FGF19 因子浓度明显提高, 与其他组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 CAF 通过促进结肠癌细胞自分泌 FGF19 因子, 促进癌细胞分裂生长。

【关键词】肿瘤相关成纤维细胞; FGF19; FGFR4; 结肠癌; 生长

【中图分类号】R735.3 【文献标识码】B 【文章编号】1002-2600(2020)04-0136-04

Experimental study on CAF regulating the growth of colorectal cancer through the signal axis of fibroblast growth factor 4/fibroblast growth factor 19

YANG Guohua, ZHENG Shengbin, LIN Caifeng, HUANG Ruolei.

Department of General Surgery, Provincial Jinshan Hospital, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism of cancer associated fibroblast (CAF) regulating the growth of colorectal cancer through the signal axis of fibroblast growth factor 4/fibroblast growth factor 19. **Methods** The experiment was divided into three groups, including cancer cell group, cancer cell+NF group, cancer cell+CAF group. The growth curve of each group was drawn. The changes of extracellular fibroblast growth factor 19 were detected by ELISA. **Results** After co-culture of cancer cells with CAF, the growth rate of cancer cells was significantly increased, compared with other groups ($P < 0.05$); the concentration of extracellular fibroblast growth factor 19 was significantly increased, compared with other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** CAF can promote the autocrine of fibroblast growth factor 19 and promote the growth of cancer cells.

【Key words】 CAF; FGF19; FGFR4; colorectal cancer; growth

结直肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一, 结直肠癌发生、发展与其肿瘤微环境有关, 即癌细胞本身、肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAF)、免疫细胞、血管内皮细胞以及细胞外基质等共同构成的内环境, 很多体外和体内研究表明 CAF 以及肿瘤基质对于癌症进展非常重要。近年来研究发现, 成纤维细胞生长因子受体 4 (fibroblast growth factor receptor 5, FGFR4) 表达于乳腺癌、胃癌、胰腺癌、肝细胞癌和结直肠癌等肿瘤组织中, 它与胃癌、肺癌、乳腺癌和横纹肌肉瘤的生存率低有关^[1-2]。FGFR 对促进结直肠癌的发生、侵袭和存活具有重要作用, 但其机制目前尚不明确, FGFR4 是纤维生长因子 19 (fibroblast growth factor, FGF19) 特异受体, 本研究拟通过结直肠癌细胞系体外实验研究, 探讨 CAF 经 FGF19/FGFR4 信号轴调控结直肠癌生长的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 实验细胞: 人结肠癌 SW480、HCT116 和 LoVo 细胞株 (购自上海生命科学院细胞生物学研究所细胞库)。2) FGF19 ELISA 检测试剂盒 (购自美国 BD 生物公司), vimentin、 α -smoothmuscle actin (α -SMA) 抗体 (购自 Sigma 公司), 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒 (购自 Invitrogen 公司), HBSS 消化液、Eagle's 培养基及 DMEM 培养基 (GIBCO 公司), 抗 pSTAT3、pERK、STAT3、ERK (购自 Invitrogen 公司), RNA easy Mini 试剂盒 (购自德国 QIAGEN 公司), FGF19 siRNA (购自 Sigma 公司), Jetprime 转染试剂 (购自 Sigma 公司)。

1.2 方法:

1.2.1 CAF 及正常成纤维细胞 (natuer fibroblasts, NF) 分离与培养: 从新鲜的组织标本中分离 CAF 细胞及 NF, 分别来自结肠癌和癌旁正常组织, 后者距离肿瘤病灶边缘至少 2 cm 并且在组织学上证实不含腺癌细胞。过程如下: 组织块用 PBS 缓冲液反复冲洗后分成小块 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 组织块, 组织块置入含有 1 mg/L 胶原酶, 2.5 mg/L 胰蛋白酶, 30 μ g/mL DNase I 酶的汉克斯缓冲盐溶液 (Hank's buffered saline solution, HBSS) 溶解消化, 37 $^{\circ}$ C 水浴中振荡溶解 30 min, 反复 3 次。加入 Vimentin 及 α -SMA 抗体进行细胞免疫组化分选 CAF 或 NF, 收集的细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液中培养, 在细胞融合 70%~80% 时, 使用 0.1% (wt/vol) 胰蛋白酶及 0.2% (wt/vol) EDTA 消化细胞 1:3 进行传代分流。到第 3 代时, 细胞在形态上形成均一的单层细胞。

1.2.2 细胞培养及实验分组: SW480、HCT116 和 LoVo 细胞接种于含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液中。置入 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 3 个细胞株分别与 CAF/NF 共培养 14 d。每周以 1:3 消化传代分流。实验分为细胞组、CAF+细胞组、NF+细胞组。

1.2.3 MTT 法分析细胞生长: 用含 10% 胎小牛血清 DMEM/F12 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 10⁵ 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 200 μ L, 培养 5 d 后, 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/mL 用 PBS 配) 20 μ L 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内

培养上清液，每孔加 150 μ L DMSO，振荡 10 min，使结晶物充分融解。选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值，记录结果，以时间为横坐标，吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 ELISA 法检测 FGF19 因子浓度：采用 ELISA 法检测各组 FGF19 蛋白表达，按照试剂盒产家说明书进行操作，绘制标准曲线，每组设置 3 次重复，于酶标仪上分别读取各组细胞培养液上清液在 450 nm 处的吸光值，根据公式计算 FGF19 的浓度值。

1.3 统计学分析：采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示，采用 EXCELL 软件进行绘图，组间比较采用 Student's 进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAF 表达标识物情况：从结肠癌组织及癌旁组织中可分离出 CAF 细胞及 NF 细胞，两者细胞表面均表达 vimentin 蛋白及 α -SMA 蛋白，与 NF 细胞比较，CAF 表达 α -SMA 蛋白更粗大。见图 1。

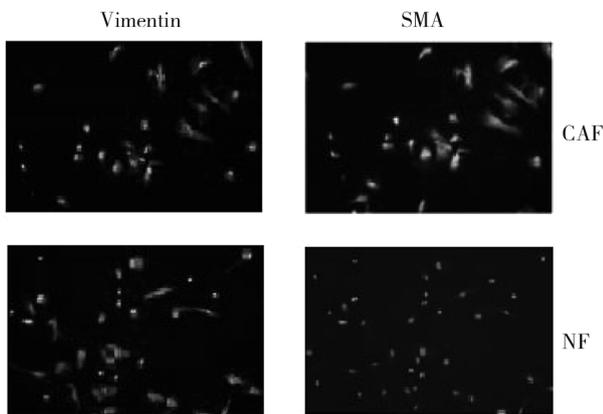


图 1 CAF 及 NF 细胞免疫组化图

2.2 3 组细胞生长情况：SW480 细胞、HCT116 细胞、LoVo 细胞与 CAF 共培养，其生长速度明显高于对照组及 NF 组，且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，但 3 个细胞系与 NF 共培养，其生长速度无明显变化，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.3 细胞培养中 FGF19 蛋白量：SW480 细胞、HCT116 细胞、LoVo 细胞与 CAF 共培养后，癌细胞分泌 FGF19 因子明显增多，明显高于 NF 细胞组及细胞组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；NF 细胞组与单纯细胞组之间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；NF 细胞组与对照组比较，差异无统

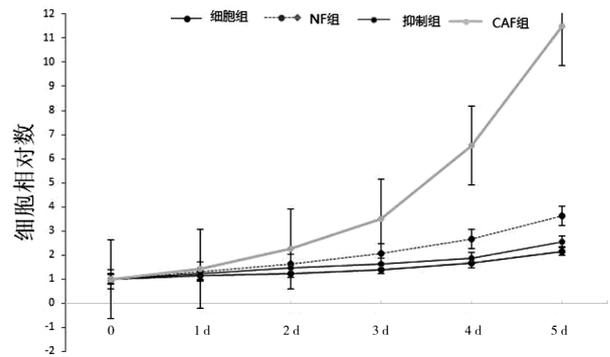


图 2 结肠癌细胞生长曲线图

统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

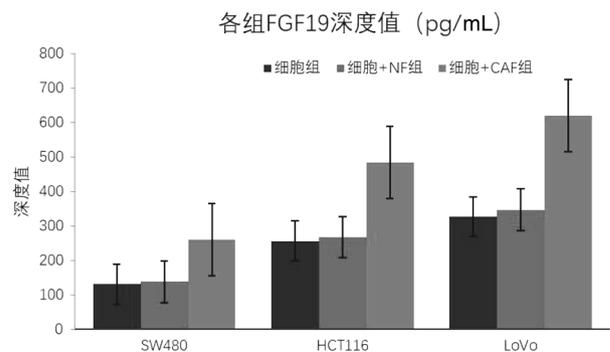


图 3 结肠癌细胞与 CAF 及 NF 细胞共培养后分泌 FGF19 因子柱状图

3 讨论

复发及转移是结直肠癌患者死亡主要原因，近年来研究发现肿瘤复发及转移是肿瘤微环境中肿瘤细胞和细胞外基质相互作用产物，CAF 作为肿瘤微环境的关键因素，它可分泌多种因子，如细胞因子、趋化因子（如 IL-6、CXCL12）、生长因子（如 HGF、转化因子）、生长因子 β 、纤维蛋白最后生长因子）和受体（例如血小板衍生生长因子受体），这些生长因子通过激活有丝分裂原激活蛋白激酶（MAPK）和磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）/AKT 途径发挥作用，这些途径介导细胞增殖和细胞存活（抗凋亡信号）、蛋白质合成、细胞骨架重排和侵袭，它们是维持肿瘤增殖信号传导并支持癌细胞逃避死亡和生长抑制的重要机制，促进肿瘤生长及侵袭转移^[3]。研究发现 FGFR4 受体在癌细胞侵袭与转移具有重要作用^[4]，FGFR4 是 FGF19 唯一受体，具有促进肿瘤侵袭及转移作用。研究发现，含有 FGF19 的染色体 11q. 13 基因，在所有肝癌的中被扩增 5%~10%，提示 FGF19 是肝癌致病因素。有研究发现 FGF19 通过 FGFR4 激活的连环蛋白信

号级联反应, 调节 GSK3/ β -catenin 促进肝细胞癌细胞上皮-间质转化, 促进肝癌转移^[5]。有研究表明高水平 FGF19 与 HCC 肿瘤大小、病理分期呈正相关, 是 HCC 预后不良因素, FGF19 水平与前列腺癌、乳腺癌和儿童肝母细胞瘤预后不良有关^[6-7]。

结合本文, 结肠癌细胞与 CAF 共培养, 其结肠癌细胞分泌 FGF19 蛋白水平明显升高, 且癌细胞生长速度明显高于对照组, 提示 CAF 可促进结肠癌细胞自分泌 FGF19 因子, 并与细胞表面 FGFR4 受体结合, 促进癌细胞生长。因此, CAF 通过肿瘤微环境促进结肠癌细胞自分泌 FGF19 因子, 激活癌细胞表面 FGFR4 受体, 促进肿瘤细胞生长。

参考文献

[1] Joshi J J, Coffey H, Corcoran E, et al. H3B-6527 is a potent and selective inhibitor of FGFR4 in FGF19-driven hepatocellular [J]. Carcinoma Cancer Res, 2017, 77 (24): 6999-7013.

[2] Raja A, Park I, Haq F, et al. FGF19-FGFR4 signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Cells, 2019, 8 (6): 536-552.

[3] Sandberg T P, Stuart MPME, Osting J, et al. Increased expression of cancer-associated fibroblast markers at the invasive front and its association with tumor-stroma ratio in colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19 (1): 284-314.

[4] Deying W, Feng G, Shumei L, et al. CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells [J]. Biosci Rep, 2017, 37 (2): 1-12.

[5] Zhao H K. FGF19 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by modulating the GSK3/ β -catenin signaling cascade via FGFR4 activation [J]. Oncotarget, 2016, 7 (12), 13575-13586.

[6] Kan Z, Zheng H, Liu X, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma [J]. Genome Res, 2013, 23 (9): 1422-1433.

[7] Zhao H, Lv F, Liang G, et al. FGF19 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by modulating the GSK3/ β -catenin signaling cascade via FGFR4 activation [J]. Oncotarget, 2016 (7): 13575-13586.

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对撰写医药学论文主体部分的一些要求

1 前言

概述研究背景、目的、思路、理论依据、方法、预期结果和意义等。可提供与主题相关的参考文献, 切忌写成文献综述。不涉及本研究数据或结论。一般以 200~300 个汉字为宜。

2 方法

描述研究对象 (人或实验动物, 包括对照组) 的选择及其基本情况, 以及研究所采用的方法 (包括分组方法)。实验研究的论文常写成“材料与方法”, 临床研究论文常写成“资料与方法”。临床试验研究还应说明试验程序是否经所在单位或地区伦理学相关机构的批准, 研究对象是否知情同意并签署知情同意书。

2.1 观察对象: 观察对象为患者, 需注明病例和对照者来源、选择标准、一般情况、观察指标和疗效判断标准等。研究对象为实验动物, 需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体质量、饲养条件和健康状况及许可证号、合格证号等。

2.2 研究方法: 详述新创的方法及改良方法的改进之处, 以备他人重复。采用他人方法, 应引用文献, 无需详细描述。

2.3 药品与试剂: 药品及化学试剂使用通用名称, 并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位、生产时间及给药途径。

2.4 仪器、设备: 应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围。无需描述工作原理。

2.5 统计学分析: 描述统计学方法及其选择依据, 并说明所使用的统计学软件。

3 结果

“结果”是指实验所得数据、观察记录, 经过综合分析和统计学处理的结果。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述。结果叙述应求实、简明、准确、清楚、严谨, 不与讨论内容混淆。一般应对所得数据作统计学分析, 如 P 值前应给出具体检验值, 如 t 值、 χ^2 值、 q 值等。

4 讨论

“讨论”是对结果的科学解释与评价, 是研究所形成的科学理论。着重讨论研究结果的创新之处及从中得出的结论, 包括理论意义、实际应用价值、局限性, 及其对进一步研究工作的启示。若不能得出结论, 也可提出建议、设想、改进意见或待解决的问题等。应将研究结果与其他有关的研究相比较, 并将结论与目的联系起来讨论, 并列相关参考文献。不必重述已在前言和结果部分详述过的数据或资料。