

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research二甲双胍对结直肠癌的影响及 COX-2/PGE2
通路机制研究Research on effects of metformin in colorectal cancer and the COX-2/PGE2
pathway mechanism余婉萱¹, 王 蓉², 许斌斌³

(1. 温州市中心医院; 2. 福建中医药大学附属人民医院; 3. 联勤保障部队第九〇〇医院, 浙江 温州 353200)

YU Wan-xuan¹, WANG Rong²,
XU Bin-bin³

(1. Wenzhou Central Hospital; 2. Fujian Provincial People's Hospital; 3. The 900 Hospital of the Joint Service Support Force of the People's Liberation Army of China, Wenzhou 353200, Zhejiang Province, China)

作者简介: 余婉萱(1996-), 女, 医师, 硕士研究生, 主要从事结直肠癌方面的临床工作和研究

通信作者: 王蓉, 主任医师, 硕士生导师

MP: 18060580811

E-mail: ronglittle2003@163.com

摘要:目的 探讨二甲双胍不同剂量对结直肠癌(CRC)的抑制作用及其通过调节胆汁酸代谢和环氧合酶-2(COX-2)/前列腺素表皮生长因子受体(PGE2)通路的机制。方法 60只BALB/c小鼠分为对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组和高剂量实验组,通过氧化偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导CRC模型。用游标卡尺测量肿瘤数量和直径;用液相色谱-质谱联用(LC-MS)法检测粪便中胆汁酸水平;用免疫组化法检测结肠组织中COX-2和PGE2蛋白表达。结果 对照组、模型组和低、中、高剂量实验组的肿瘤数量分别为0、(11.58±7.13)、(7.83±3.38)、(3.33±2.06)和(2.83±1.40)个;肿瘤直径分别为0、(2.91±0.32)、(2.43±0.31)、(2.11±0.37)和(1.98±0.38)mm;总胆汁酸浓度分别为(20 989.00±306.69)、(43 256.50±187.08)、(32 265.26±325.08)、(23 035.72±136.33)和(22 351.51±145.36)ng·g⁻¹;脱氧胆酸(DCA)浓度分别为(3 160.14±113.31)、(16 684.58±4.39)、(11 544.47±7.86)、(5 472.60±25.03)和(5 201.36±79.95)ng·g⁻¹;石胆酸(LCA)浓度分别为(2 140.43±76.23)、(14 452.60±47.82)、(9 085.87±11.14)、(3 145.09±54.20)和(2 955.51±38.02)ng·g⁻¹;胆酸(CA)浓度分别为(6 917.71±51.12)、(2 051.41±88.47)、(3 181.64±23.79)、(5 564.01±35.45)和(5 866.10±63.80)ng·g⁻¹;鹅脱氧胆酸(CDCA)浓度分别为(5 720.33±53.07)、(1 135.43±48.38)、(1 530.56±37.57)、(4 060.14±37.09)和(4 542.83±27.39)ng·g⁻¹;牛磺胆酸(TCA)浓度分别为(497.24±59.29)、(1 560.15±26.03)、(958.13±28.00)、(705.21±3.66)、(669.24±33.00)ng·g⁻¹;牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)浓度分别为(1 027.96±84.28)、(2 918.60±122.90)、(2 518.23±70.50)、(1 411.36±49.15)和(1 389.87±5.8)ng·g⁻¹;COX-2表达评分分别为未检测到表达、(5.75±0.97)、(4.50±1.78)、(2.75±1.66)和(2.67±0.89)分;PGE2表达评分分别为未检测到表达、(5.75±0.97)、(4.50±1.93)、(2.67±1.67)和(2.50±0.90)分,模型组的上述指标与对照组比较;低、中、高剂量实验组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均P<0.05)。中、高剂量实验组在降低肿瘤数量、直径及调节胆汁酸代谢方面效果均显著优于低剂量组(均P<0.05)。COX-2/PGE2表达抑制程度与二甲双胍剂量呈负相关。结论 二甲双胍通过剂量依赖性调节胆汁酸代谢(降低DCA、LCA、TCA、TCDCA,恢复CA、CDCA水平)及抑制COX-2/PGE2信号通路,发挥抗结直肠癌作用,中、高剂量实验组(250~500 mg·kg⁻¹·d⁻¹)效果更显著。

关键词:二甲双胍;结直肠癌;胆汁酸代谢;环氧合酶-2/前列腺素表皮生长因子受体通路;剂量依赖性

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.016

中图分类号:R979.1

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)21-3096-07

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of different doses of metformin on colorectal cancer (CRC) and its mechanism involving the regulation of bile acid metabolism and the cyclooxygenase - 2 (COX - 2)/prostaglandin E2 (PGE2) pathway. **Methods** A total of 60 BALB/c mice were divided into control, model, low - dose metformin, medium - dose metformin and high - dose metformin groups. A CRC model was induced using azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS). Tumor number and diameter were measured with a caliper; fecal bile acid levels were detected by liquid chromatography - mass spectrometry (LC - MS); and protein expression of COX - 2 and PGE2 in colon tissue was determined by immunohistochemistry. **Results** Tumor numbers in the control, model, low -, medium - and high - dose groups were 0, 11.58 ± 7.13 , 7.83 ± 3.38 , 3.33 ± 2.06 and 2.83 ± 1.40 , respectively; tumor diameters were 0, (2.91 ± 0.32) , (2.43 ± 0.31) , (2.11 ± 0.37) and (1.98 ± 0.38) mm, respectively; total bile acid concentrations were $(20\ 989.00 \pm 306.69)$, $(43\ 256.50 \pm 187.08)$, $(32\ 265.26 \pm 325.08)$, $(23\ 035.72 \pm 136.33)$ and $(22\ 351.51 \pm 145.36)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; deoxycholic acid (DCA) concentrations were $(3\ 160.14 \pm 113.31)$, $(16\ 684.58 \pm 4.39)$, $(11\ 544.47 \pm 7.86)$, $(5\ 472.60 \pm 25.03)$ and $(5\ 201.36 \pm 79.95)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; lithocholic acid (LCA) concentrations were $(2\ 140.43 \pm 76.23)$, $(14\ 452.6 \pm 47.82)$, $(9\ 085.87 \pm 11.14)$, $(3\ 145.09 \pm 54.20)$ and $(2\ 955.51 \pm 38.02)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; cholic acid (CA) concentrations were $(6\ 917.71 \pm 51.12)$, $(2\ 051.41 \pm 88.47)$, $(3\ 181.64 \pm 23.79)$, $(5\ 564.01 \pm 35.45)$ and $(5\ 866.10 \pm 63.80)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; chenodeoxycholic acid (CDCA) concentrations were $(5\ 720.33 \pm 53.07)$, $(1\ 135.43 \pm 48.38)$, $(1\ 530.56 \pm 37.57)$, $(4\ 060.14 \pm 37.09)$ and $(4\ 542.83 \pm 27.39)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; taurocholic acid (TCA) concentrations were (497.24 ± 59.29) , $(1\ 560.15 \pm 26.03)$, (958.13 ± 28.00) , (705.21 ± 3.66) and (669.24 ± 33.00) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) concentrations were $(1\ 027.96 \pm 84.28)$, $(2\ 918.60 \pm 122.90)$, $(2\ 518.23 \pm 70.50)$, $(1\ 411.36 \pm 49.15)$ and $(1\ 389.87 \pm 5.80)$ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively; COX - 2 staining scores in the model, low -, medium - and high - dose groups were (5.75 ± 0.97) , (4.50 ± 1.78) , (2.75 ± 1.66) and (2.67 ± 0.89) points, respectively; PGE2 staining scores were (5.75 ± 0.97) , (4.50 ± 1.93) , (2.67 ± 1.67) and (2.50 ± 0.90) points, respectively; compared with the control group, the aforementioned indicators in the model group showed statistically significant differences; compared with the model group, the indicators in the low -, medium - and high - dose groups showed statistically significant differences (all $P < 0.05$). The medium - and high - dose groups were significantly more effective than the low - dose group in reducing tumor number and diameter and regulating bile acid metabolism ($P < 0.05$). The inhibition of COX - 2/PGE2 expression was negatively correlated with the dose of metformin. **Conclusion** Metformin exerts anti - CRC effects through dose - dependent regulation of bile acid metabolism (reducing DCA, LCA, TCA, TCDCA and restoring CA and CDCA levels) and inhibition of the COX - 2/PGE2 signaling pathway. The medium - and high - dose groups ($250 - 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) show more significant effects.

Key words: metformin; colorectal cancer; bile acid metabolism; cyclooxygenase - 2/prostaglandin E2 pathway; dose - dependent

胆汁酸由肝合成并在肠道内经微生物代谢生成次级胆汁酸,其中脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)和石胆酸(lithocholic acid, LCA)被认为是结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的致癌因素^[1]。高水平次级胆汁酸可通过诱导DNA氧化损伤、促炎及促增殖作用推动CRC发生^[2]。环氧合酶-2(cyclooxygenase - 2, COX - 2)/前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)信号通路在此过程中起关键作用^[3],次级胆汁酸可激活该通路进而加速肿瘤进展。此外,结合型胆汁酸亦

与肠道炎症及肿瘤发生密切相关^[4]。鉴于CRC早期症状隐匿且发病呈年轻化趋势,其预防尤为重要。二甲双胍作为常用降糖药,近年被发现可降低糖尿病患者CRC发生风险^[5],其作用可能与改善胆汁酸代谢有关^[6]。前期研究提示,二甲双胍可能通过影响胆汁酸代谢并发挥抗肿瘤作用的假设^[7],但剂量效应与胆汁酸代谢 - COX - 2/PGE2通路的关联性仍需进一步研究。本研究旨在探索中、高剂量二甲双胍通过双重机制抑制CRC的潜力,为结直肠癌的临床预防和治

疗提供新的思路。

材料与方法

1 材料

实验动物 本研究使用 60 只 6 周龄清洁级 BALB/c 雌性小鼠,体质量 19 ~ 20g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(沪)2021-0002,使用许可证号:SYXK(闽)2021-0031,饲养在实验动物中心。本实验经联勤保障部队第九〇〇医院动物伦理委员会批准(伦理批号:2021-26)。小鼠适应环境 1 周,环境条件(温度、湿度、光照)严格控制。鼠笼、鼠盒、水瓶等均经过高压蒸汽灭菌和消毒。

试剂 氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM),纯度:95%,批号:YA0805、葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS),分子量:36 000 ~ 50 000,批号:G11243,均由美国 Mpbio 公司生产;磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS),纯度:0.01 mol · L⁻¹, PH 7.2,批号:21773143,广州和为医药科技有限公司生产;重组 COX-2 抗体、重组 PGE2 抗体,均由美国 Abcam 公司生产;胆汁酸标准品,由上海甄准生物科技有限公司提供;液相色谱-质谱相关试剂(甲醇、乙腈、甲酸),均由美国 Thermo-Fisher 公司生产。

仪器 HistoStar 组织包埋机,江苏维林科生物技术有限公司产品;Excelsior AS 组织脱水机,江苏维林科生物技术有限公司产品;HistoCore BIOCUT 组织轮转切片机,北京昊诺斯科技有限公司产品;HS-1145 摊片烤片机,北京莱博瑞杰科技有限公司产品;N-SIM 显微镜,日本 Nikon 公司产品;ZY-680 全自动生化分析仪,上海博奥思生物技术有限公司产品;CFX96TM Real-Time System,美国 Bio-Rad 公司产品;QTRAP 6500 + 质谱仪、SciexExionLCTMAD 液相色谱系统,美国 AB Sciex 公司产品。

2 实验方法

2.1 主要溶液的配制

氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)溶液 将 AOM 溶解于灭菌水中,制备浓度为 10 mg · mL⁻¹ 的储存溶液,储存于 -20 ℃,使用时现用生理盐水稀释至所需浓度。

2% 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)溶液 将 DSS 10 g 溶解于无菌水 500 mL 中,储存于 4 ℃,每 2 天更换 1 次。

二甲双胍溶液^[8] 用 PBS 溶解盐酸二甲双胍,根

据小鼠体重配制 125、250、500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 的溶液,现配现用。

2.2 模型建立、动物分组及处理方式^[6-7]

根据前期研究,将 60 只小鼠随机分为 5 组:对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组和高剂量实验组,每组 12 只。对照组和模型组小鼠每日灌胃生理盐水 0.4 mL,低、中、高剂量实验组小鼠每日灌胃不同剂量二甲双胍(125、250、500 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)。实验进行期间,每周对小鼠进行 1 次称质量,同时每日监测其饮食、饮水、及整体状态。第 1 天,模型组和低、中、高剂量实验组小鼠腹腔注射 AOM (10 mg · kg⁻¹),1 周后开始给 2% DSS 溶液代替正常饮用水,再过 1 周换回正常饮用水(确保无 DSS 残留),连续 2 周自由饮用,如此“DSS-正常-DSS-正常”重复 3 个周期,第 10 周诱导结束,全部小鼠改为正常饮水至第 14 周实验结束。在腹腔注射 AOM 的同时开始药物灌胃干预。对照组小鼠腹腔注射等量的生理盐水并全程饮用正常饮用水。

2.3 动物组织与粪便标本的留取

在第 14 周末,收集所有小鼠粪便样本并保存在 -80 ℃ 冰箱。实验终止前 12 h 禁食。解剖时,使用颈椎脱臼法处死小鼠,取出结肠并用 PBS 冲洗,肠腔纵向切开以观察肿瘤形成,肿瘤组织保存在 10% 福尔马林溶液中,石蜡包埋。

2.4 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色法进行病理学观察

将结肠组织依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片处理。切片厚度为 5 μm,烘烤 4 h 完成。进行脱蜡、水化、染色(苏木素、伊红)和封片,最后用中性树脂封片。由病理科医生阅片评估结果。

2.5 免疫组化法检测 COX-2 与 PGE2 蛋白的表达

切片脱蜡、水化后,进行抗原修复、内源性酶封闭、血清封闭,并使用 COX-2 和 PGE2 抗体进行免疫组化染色。用 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)显色,并进行复染、透明、脱水、封片。COX-2 和 PGE2 的阳性表达判断标准:当细胞膜及(或)细胞质内出现棕黄色颗粒沉积时视为阳性细胞。根据阳性细胞比例及染色深度给予综合评分:阳性细胞比例 < 5% 记 0 分,5% ~ 24% 记 1 分,25% ~ 49% 记 2 分,50% ~ 74% 记 3 分,≥ 75% 记 4 分;颜色无明显着色记 0 分,淡黄色记 1 分,黄色记 2 分,棕黄色记 3 分。2 项评分相加反映指标的表达水平。

2.6 液相色谱-质谱联用技术检测小鼠粪便胆汁酸代谢水平

小鼠粪便样本于-80℃保存,24 h内干冰转运至北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行检测。实验参照文献[9]进行:小鼠粪便样本经研磨后,加入含内标的甲醇溶液进行蛋白沉淀与代谢物提取,离心后取上清液进样。色谱分离,用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100.0 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱。质谱检测用 AB Sciex QTRAP 6500+ 系统,电喷雾电离(electrospray Ionization,ESI)负离子模式,离子源温度 550℃,离子喷雾电压-4 500 V,气帘气 241.32 kPa,用多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)扫描。对标准液进行液相色谱-串联质谱联用技术(liquid chromatography-tandem mass spectrometry,LC-MS/MS)检测,各胆汁酸在相应浓度范围内线性良好($R^2>0.99$),精密度、准确度及稳定性均符合生物样本分析要求。

3 统计学处理

用 R v. 3.5.2 软件分析液相色谱-质谱联用技术的检测结果并可视化。用 SPSS 26.0 软件处理实验数据,用 GraphPad-Prism 9.0 软件作图。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布数据用 ANOVA 单因素方差分析,多组比较用 LSD *t* 检验,Kruskal-Wallis *H* 检验用于非正态分布数据,用线性回归分析相关性。

结 果

1 各组小鼠结肠肿瘤数量与大小的比较

对照组未见肿瘤形成,而模型组及低、中、高剂量实验组小鼠均有肿瘤形成。低、中、高剂量实验组肿瘤数量均显著少于模型组(均 $P<0.05$),中、高剂量实验组肿瘤数量较低剂量实验组显著减少($P<0.05$),中、高剂量实验组组间比较,在统计学上差异无统计学意义($P>0.05$)。低、中、高剂量实验组的肿瘤直径较模型组均显著减小(均 $P<0.05$),且中、高剂量实验组的肿瘤直径较低剂量实验组均显著减小(均 $P<0.05$),中剂量实验组与高剂量实验组比较,在统计学上差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步进行线性回归分析,随着二甲双胍剂量的增加,实验组肿瘤平均直径及肿瘤数量均显著减少(均 $P<0.01$)。结果见表 1。

2 小鼠结肠组织病理学特征

各组小鼠结肠组织经过 HE 染色后显示,除对照组外,模型组和低、中、高剂量实验组的小鼠皆出现肿

瘤,病理类型涵盖腺瘤伴低级别上皮内瘤变、腺瘤伴高级别上皮内瘤变或癌,见图 1。

3 粪便胆汁酸组成的变化

用液相色谱-质谱联用技术检测了 8 种胆汁酸的浓度。对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组和高剂量实验组总胆汁酸浓度分别为(20 989.00±306.69)、(43 256.50±187.08)、(32 265.26±325.08)、(23 035.72±136.33)和(22 351.51±145.36)ng·g⁻¹。与对照组相比,模型组的总胆汁酸浓度显著升高($P<0.05$)。经过二甲双胍干预后,低、中、高剂量实验组的总胆汁酸浓度较模型组均显著降低(均 $P<0.05$),其中,中、高剂量实验组的总胆汁酸浓度均低于低剂量实验组(均 $P<0.05$)。

表 1 各组小鼠肠道平均肿瘤数量和平均直径($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Average number and diameter of intestinal tumors in mice in each group($\bar{x}\pm s$)

Group	Number of tumor-bearing mice (n)	Average tumor number	Average tumor diameter (mm)
Control	0	0	0
Model	12	11.58±7.13	2.91±0.32
Low-dose	12	7.83±3.38*	2.43±0.31*
Medium-dose	12	3.33±2.06**	2.11±0.37**
High-dose	12	2.83±1.40**	1.98±0.38**

Compared with model group, * $P<0.05$; Compared with low-dose group; ** $P<0.05$; Control group: Mice were administered 0.4 mL of physiological saline daily by gavage; Model group: Mice were administered 0.4 mL of physiological saline daily by gavage; Low-dose group: Mice were administered metformin at a dose of 125 mg·kg⁻¹·d⁻¹ daily by gavage; Medium-dose group: Mice were administered metformin at a dose of 250 mg·kg⁻¹·d⁻¹ daily by gavage; High-dose group: Mice were administered metformin at a dose of 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹ daily by gavage.

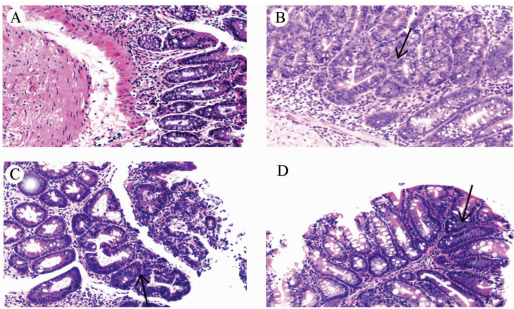


图 1 苏木精伊红(HE)染色法检测小鼠结肠病变组织(×100倍)

Figure 1 Mouse colonic lesions detected by hematoxylin and eosin staining(HE)staining (×100 magnification)

A: Normal colorectal tissue; B: Colorectal adenocarcinoma; C: Colorectal adenoma with high-grade intraepithelial neoplasia; D: Colorectal adenoma with low-grade intraepithelial neoplasia.

进一步定量分析显示,对照组、模型组、低剂量实验组、中剂量实验组和高剂量实验组的脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)浓度分别为($3\ 160.14 \pm 113.31$)、($16\ 684.58 \pm 4.39$)、($11\ 544.47 \pm 7.86$)、($5\ 472.60 \pm 25.03$)和($5\ 201.36 \pm 79.95$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 石胆酸(lithocholic acid, LCA)浓度分别为($2\ 140.43 \pm 76.23$)、($14\ 452.60 \pm 47.82$)、($9\ 085.87 \pm 11.14$)、($3\ 145.09 \pm 54.2$)和($2\ 955.51 \pm 38.02$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)浓度分别为($5\ 720.33 \pm 53.07$)、($1\ 135.43 \pm 48.38$)、($1\ 530.56 \pm 37.57$)、($4\ 060.14 \pm 37.09$)和($4\ 542.82 \pm 27.39$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 胆酸(cholic acid, CA)浓度分别为($6\ 917.71 \pm 51.12$)、($2\ 051.41 \pm 88.47$)、($3\ 181.64 \pm 23.79$)、($5\ 564.01 \pm 35.45$)和($5\ 866.10 \pm 63.80$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)浓度分别为(497.24 ± 59.29)、($1\ 560.15 \pm 26.03$)、(958.13 ± 28.00)、(705.21 ± 3.66)和(669.24 ± 33.00) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 牛磺鹅脱氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)浓度分别为($1\ 027.96 \pm 84.28$)、($2\ 918.60 \pm 122.90$)、($2\ 518.23 \pm 70.50$)、($1\ 411.36 \pm 49.15$)和($1\ 389.87 \pm 5.80$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; α -鼠胆酸(α -muricholic acid, α -MCA)浓度分别为($1\ 027.96 \pm 84.28$)、($2\ 918.60 \pm 122.90$)、($2\ 443.23 \pm 182.97$)、($1\ 817.11 \pm 109.02$)和($1\ 147.37 \pm 38.39$) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; β -鼠胆酸(β -muricholic acid, β -MCA)浓度分别为(497.24 ± 59.29)、($1\ 535.15 \pm 131.60$)、($1\ 003.13 \pm 50.00$)、(860.21 ± 22.21)和(579.25 ± 25.03) $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因此,模型组 DCA 和 LCA 浓度均显著高于对照组(均 $P < 0.05$)。同时,模型组 TCDCA 和 TCA 的浓度均显著上升(均 $P < 0.05$),而 CA 和 CDCA 浓度均显著下降(均 $P < 0.05$)。二甲双胍干预后,与模型组相比,低、中、高剂量实验组的 DCA、LCA、TCA 和 TCDCA 浓度均显著降低(均 $P < 0.05$),且中、高剂量实验组的上述胆汁酸浓度均显著低于低剂量实验组(均 $P < 0.05$)。另一方面,与对照组相比,模型组中的 CA 和 CDCA 浓度均显著下降,而在中、高剂量实验组中,CA 和 CDCA 的浓度均显著升高,且中、高剂量实验组的浓度均显著高于低剂量实验组(均 $P < 0.05$),接近对照组水平。上述结果表明,二甲双胍干预可以有效逆转 CRC 小鼠胆汁酸的分子变化,并使其接近正常组水平,其中中高剂量实验组的干预效果更为

显著。

4 COX2 与 PGE2 表达情况

通过免疫组化的方法检测各组小鼠结肠组织 COX-2 与 PGE2 的表达情况,并使用染色综合评分的方法进行统计学分析,结果如下:COX2 在模型组和低、中、高剂量实验组染色评分分别为(5.75 ± 0.97)、(4.5 ± 1.78)、(2.75 ± 1.66)和(2.67 ± 0.89)分; PGE2 在模型组、低、中和高剂量实验组染色评分分别为(5.75 ± 0.97)、(4.5 ± 1.93)、(2.67 ± 1.67)和(2.50 ± 0.90)分。在正常组织中,COX2 和 PGE2 几乎不表达。在模型组中,COX-2 和 PGE2 表达明显增多。经过二甲双胍干预后,与模型组相比,低、中、高剂量实验组 COX2 和 PGE2 蛋白表达均明显下降(均 $P < 0.05$),其中中、高剂量实验组比低剂量实验组均更明显(均 $P < 0.05$),而中、高剂量实验组之间在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

CRC 是全球范围内发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤之一,其发生发展遵循正常上皮→腺瘤→癌变的多阶段模式。在这一漫长过程中,早期筛查与干预尤为关键。近年来,二甲双胍作为一种常用于治疗 2 型糖尿病的药物^[10],被发现在结直肠癌的防治中显示出潜在价值。临床研究表明,其可显著降低 2 型糖尿病患者结直肠癌的发病风险并改善预后^[11]。此外,改善胆汁酸代谢被认为是其在结直肠癌中发挥重要作用的重要潜在机制之一。这些发现促使二甲双胍以“老药新用”的方式走进了研究的视野,从而引起对其转化研究的关注。

在本研究中,本研究通过构建 AOM/DSS 诱导的小鼠结直肠癌模型进一步验证了二甲双胍的抗肿瘤作用。实验表明,二甲双胍能够以剂量依赖的方式显著抑制结肠肿瘤的形成,具体表现为肿瘤数量和直径的减少,且中、高剂量实验组($250 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)效果更为显著。组织病理学评估(HE 染色)显示,二甲双胍干预组的肿瘤多维持在腺瘤伴低级别上皮内瘤变阶段,提示其可能延缓了肿瘤的恶性进展。尽管中、高剂量实验组之间未显示出统计学显著性差异,但整体趋势提示二甲双胍的抗肿瘤作用具有一定的剂量相关性,在后续研究中需要扩大样本量进行进一步验证。

胆汁酸作为胆固醇在肝中的代谢产物,不仅能够促进膳食脂肪及脂溶性维生素的消化与吸收,还

在调节肝脂质代谢过程中扮演关键角色^[12]。研究表明,胆汁酸代谢紊乱与结肠直肠癌(CRC)的发生发展密切相关^[13]。其中,DCA和LCA等次级胆汁酸水平升高通过DNA氧化损伤、诱导炎症和促进细胞增殖,推动CRC的发生^[14]。结肠直肠癌患者粪便中DCA和LCA等次级胆汁酸浓度显著高于正常人群^[15]。此外,结合型胆汁酸过多可能引发炎症反应,促进有害菌的繁殖,从而对肠道健康产生不利影响^[4]。本研究发现,在AOM/DSS诱导的结肠直肠癌模型小鼠中,次级胆汁酸(如DCA和LCA)及部分结合型胆汁酸(如TCA和TCDCA)水平显著升高,而初级胆汁酸(CA和CDCA)水平降低。经二甲双胍干预后,上述具有肠道毒性的胆汁酸水平均被显著逆转,表明二甲双胍可直接改善结肠癌发展过程中的胆汁酸代谢紊乱。

本研究进一步证实,胆汁酸代谢异常与关键致癌信号通路COX-2/PGE2的激活密切相关。环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)作为一种诱导型酶,在结肠直肠癌等肿瘤组织中常显著高表达,并通过生成前列腺素类物质(如PGE2)促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡及诱导新生血管形成^[16]。研究显示,次级胆汁酸如脱氧胆酸(DCA)可通过激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)信号转导,进而上调转录激活蛋白(activator protein 1, AP-1)等核因子,诱导COX-2基因表达及PGE2合成增加。异常升高的PGE2不仅可以抑制p53介导的细胞凋亡,还能通过激活cAMP信号通路进一步促进结肠直肠癌的发生发展^[17]。动物及细胞实验均显示,DCA处理可以显著提升结肠癌细胞中COX-2 mRNA转录水平及蛋白表达,并伴随培养液内PGE2含量升高,而使用COX-2抑制剂(如尼美舒利)则可有效阻断DCA促癌作用^[18-19]。本研究中发现,模型组小鼠结肠组织中COX-2与PGE2表达均显著上调,而二甲双胍干预后二者表达均受到抑制,且中、高剂量组效果更为明显。这表明,二甲双胍在降低次级胆汁酸水平的同时,能够显著抑制COX-2/PGE2通路的活化,其作用机制可能与二甲双胍调节胆汁酸代谢,减少DCA等可激活COX-2/PGE2通路的次级胆汁酸有关。

以上结果表明,二甲双胍可能通过纠正胆汁酸代谢紊乱,间接抑制COX-2/PGE2信号通路的活化。未来仍需更多细胞实验直接验证特定次级胆汁酸对此通路的激活作用,并深入探索二甲双胍调控此过程的具体分子机制。

本研究提示:二甲双胍在一定剂量范围内具有显著的结肠直肠癌抑制作用,其抗肿瘤机制主要通过调节胆汁酸代谢的稳态及抑制COX-2/PGE2信号通路实现。鉴于胆汁酸代谢在CRC防治中的关键作用,二甲双胍调节这一机制的潜力为CRC的预防和治疗提供了新的研究思路。因此,未来的研究应扩大样本量,并在临床中进一步验证二甲双胍在预防结肠癌中的应用潜力。

参考文献:

- [1] LIU Y, ZHANG S, ZHOU W, *et al.* Secondary bile acids and tumorigenesis in colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12(11):738—745.
- [2] CALICETI C, PUNZO A, SILLA A, *et al.* New insights into bile acids related signaling pathways in the onset of colorectal cancer [J]. *Nutrients*, 2022, 14(14):29—34.
- [3] MIZUNO R, KAWADA K, SAKAI Y. Prostaglandin E2/EP signaling in the tumor microenvironment of colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24):54—62.
- [4] JIA W, XIE G, JIA W. Bile acid - microbiota cross - talk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2):111—128.
- [5] WU H, ESTEVE E, TREMAROLI V, *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment - naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug [J]. *Nat Med*, 2017, 23(7):850—858.
- [6] PAVLO PETAKH, KAMYSHNA I, KAMYSHNYI A. Effects of metformin on the gut microbiota: A systematic review [J]. *Mol Metab*, 2023, 77(7):101—105.
- [7] 侯雅萍. 不同剂量二甲双胍对小鼠结肠直肠癌的预防作用及对肠道菌群的影响[D]. 福建 厦门:厦门大学,2022.
- [8] CHOI S B, LEW L C, YEO S K, *et al.* Probiotics and the BSH - related cholesterol lowering mechanism: A jekyll and hyde scenario [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2015, 35(3):392—401.
- [9] KEANE J M, WALSH C J, CRONIN P, *et al.* Investigation of the gut microbiome, bile acid composition and host immunoinflammatory response in a model of azoxymethane - induced colon cancer at discrete timepoints [J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(4):528—536.
- [10] 杨毅,季秀娟,杨金奎,等. 盐酸二甲双胍缓释片治疗2型糖尿病的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(3):174—176.
- [11] SEHDEV A, SHIH Y C T, VEKHTER B, *et al.* Metformin for primary colorectal cancer prevention in diabetic patients: A case - control study in a US population [J]. *Cancer*, 2015, 121(7):1071—1078.
- [12] TICHIO A L, MALHOTRA P, DUDEJA P K, *et al.* Intestinal absorption of bile acids in health and disease [J]. *Compr Physiol*, 2019, 10(1):21—56.
- [13] RIMAL B, COLLINS S L, TANES C E, *et al.* Bile salt hydrolase catalyses formation of amine - conjugated bile acids [J]. *Nature*, 2024, 626(8000):859—863.
- [14] ZENG H, UMAR S, RUST B, *et al.* Secondary bile acids and short

- chain fatty acids in the colon: A focus on colonic microbiome, cell proliferation, inflammation, and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5):1214.
- [15] OCVRK S, WILSON A S, APPOLONIA C N, *et al.* Fiber, fat, and colorectal cancer: New insight into modifiable dietary risk factors [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2019, 21(11):62—68.
- [16] KHAN N, FAROOQ A D, SADEK B. Investigation of cyclooxygenase and signaling pathways involved in human platelet aggregation mediated by synergistic interaction of various agonists [J/OL]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9:3497—3506. 2015-07-06 [2025-08-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26185418/>.
- [17] ZHEN Y, ZHANG W, LIU C, *et al.* Exogenous hydrogen sulfide promotes C6 glioma cell growth through activation of the p38 MAPK/ERK1/2-COX-2 pathways [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5):2413—2422.
- [18] WEI J, ZHANG J, WANG D, *et al.* The COX-2-PGE2 pathway promotes tumor evasion in colorectal adenomas [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2022, 15(5):285—296.
- [19] CEN B, LANG J D, DU Y, *et al.* Prostaglandin E2 induces miR675-5p to promote colorectal tumor metastasis via modulation of p53 expression [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(4):971—984. (收稿日期 2025-05-23)

· 科学文摘 ·

一项 C3 肾小球病患者口服伊普可泮治疗的随机、双盲、平行、多中心、安慰剂对照的 3 期研究

引自:KAVANAGH D, BOMBACK A S, VIVARELLI M, *et al.* Oral iptacopan therapy in patients with C3 glomerulopathy: A randomised, double-blind, parallel group, multicentre, placebo-controlled, phase 3 study [J]. *Lancet*, 2025, 406(10512):1587—1598.

本研究是一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的 3 期临床研究,比较了伊普可泮(LNP023)与安慰剂的疗效和安全性。从 18 个国家的 35 家医院或医疗中心招募了经活检确诊的 C3 肾小球病成年参与者(18~60 岁)。纳入标准包括筛查时血清 C3 浓度降低(即 $<77 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$),随机化前第 -75 天和第 -15 天的尿蛋白肌酐比值(UPCR)为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 或更高,筛查和第 -15 天估计肾小球滤过率(eGFR)为每 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{ m}^{-1}$ 或更高。以及接种脑膜炎奈瑟菌和肺炎链球菌疫苗。所有符合条件的参与者以 1:1 随机分配到伊普可泮组或安慰剂组,根据皮质类固醇、霉酚酸或 2 者的治疗进行分层。在 6 个月的双盲期内,参与者口服 200 mg 伊普可泮或安慰剂,每日 2 次;随后是 6 个月的开放标签期,所有参与者服用 200 mg 伊普可泮,每天 2 次。主要终点是 6 个月时蛋白尿的相对减少。2021 年 7 月 28 日至 2023 年 2 月 15 日,共筛选 132 例参与者,其中 58 例未通过筛选,最终,共 74 例(64% 为男性;69% 为白人)被 1:1 随机分配接受伊普可泮($n=38$)或安慰剂($n=36$)进行治疗。安慰剂组的 1 例参与者在开放标签期间停止了治疗。在 6 个月时,与基线相比,伊普可泮组的 24 h UPCR 百分比变化为 -30.2% [95% 置信区间(CI) $-42.8 \sim -14.8$],安慰剂组为 7.6% (95% CI $-11.9 \sim 31.3$)。在伊普可泮组中,24 h UPCR 的几何平均值在基线时为 $3.33 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (95% CI $2.79 \sim 3.97$),在 6 个月时为 $2.17 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (95% CI $1.62 \sim 2.91$);在安慰剂组中,基线时为 $2.58 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (95% CI $2.18 \sim 3.05$),6 个月时为 $2.80 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (95% CI $2.37 \sim 3.30$)。与安慰剂相比,伊普可泮在 6 个月时的 24 h UPCR 降低了 35.1% (95% CI $13.8 \sim 51.1$; $P=0.0014$)。在 6 个月时,伊普可泮表现出有统计学意义的且有临床意义的蛋白尿减少。伊普可泮在 C3 肾小球病患者中具有良好的耐受性和可接受的安全性。