

·论著·

# 壬基酚对人结肠癌 SW480 细胞活性及跨膜 G 蛋白偶联雌激素膜受体 30 表达的影响

杨清旭 刘秀 张桃 宁伟伟 张杰 谢铭

遵义医科大学附属医院消化病医院 遵义医科大学附属医院普外科, 遵义 563000

通信作者: 谢铭, Email: 2581303091@qq.com

**【摘要】 目的** 分析壬基酚对人结肠癌 SW480 细胞活性及跨膜 G 蛋白偶联雌激素膜受体 30(GPR30) 表达的影响。**方法** 采用实验研究方法。通过体外培养人结肠癌 SW480 细胞, 采用细胞增殖、周期及凋亡检测以及基因和蛋白检测实验, 分析壬基酚影响人结肠癌 SW480 细胞增殖、细胞周期、凋亡以及 GPR30 表达的情况。细胞分组: SW480 细胞加入培养基设为对照组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 雌二醇设为雌二醇组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 壬基酚设为壬基酚组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 壬基酚+ $1 \times 10^{-7}$  mol/L GPR30 特异性拮抗剂 G15 设为壬基酚+G15 组。观察指标: (1) 4 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数。(2) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的周期占比。(3) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数。(4) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 信使 RNA(mRNA) 表达情况。(5) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白表达情况。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差异法检验。**结果** (1) 4 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数。细胞增殖实验结果显示: 对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的增殖指数分别为  $100.00 \pm 0.00$ 、 $89.19 \pm 4.86$ 、 $148.96 \pm 6.04$ 、 $120.40 \pm 3.39$ , 4 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=21.45, P<0.05$ ); 壬基酚组与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 雌二醇组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。(2) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的周期占比。细胞周期实验结果显示: 对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的 S 期细胞占比分别为  $39.96\% \pm 2.02\%$ 、 $36.67\% \pm 0.62\%$ 、 $43.85\% \pm 1.02\%$ 、 $38.29\% \pm 1.42\%$ , 4 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=10.08, P<0.05$ ); 雌二醇组、壬基酚组分别与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 壬基酚+G15 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。(3) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数。细胞凋亡实验结果显示: 对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数分别为  $1.67 \pm 0.18$ 、 $4.80 \pm 0.31$ 、 $0.75 \pm 0.11$ 、 $2.20 \pm 0.19$ , 4 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=136.79, P<0.05$ ); 雌二醇组、壬基酚组分别与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 壬基酚+G15 组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。(4) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 表达情况。实时荧光定量聚合酶链式反应检测结果显示: 对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 相对表达率分别为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $0.86 \pm 0.05$ 、 $1.89 \pm 0.27$ 、 $0.64 \pm 0.12$ , 4 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=26.61, P<0.05$ ); 壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 雌二醇组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。(5) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白表达情况。Western blot 检测结果显示: 对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白相对表达率分别为  $1.83 \pm 0.16$ 、 $1.68 \pm 0.15$ 、 $3.10 \pm 0.30$ 、 $1.26 \pm 0.11$ , 4 组比较, 差异有统计学意义 ( $F=34.05, P<0.05$ ); 壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 雌二醇组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。**结论** 低剂量壬基酚可增加人结肠癌 SW480 细胞增殖指数与 S 期细胞占比, 降低细胞

DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220516-00278

收稿日期 2022-05-16

引用本文: 杨清旭, 刘秀, 张桃, 等. 壬基酚对人结肠癌 SW480 细胞活性及跨膜 G 蛋白偶联雌激素膜受体 30 表达的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2022, 21(6): 802-808. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220516-00278.



凋亡指数,并促进 GPR30 mRNA 和蛋白表达。

【关键词】 结肠肿瘤; 雌激素; 壬基酚; 受体; 跨膜 G 蛋白偶联雌激素受体 30; 增殖; 细胞周期; 凋亡

基金项目:贵州省科学技术基金计划(黔科合基础[2017]1228)

### Influence of nonylphenol on cytoactive and the expression of G protein-coupled estrogen receptor in human colon cancer SW480 cells

Yang Qingxu, Liu Xiu, Zhang Tao, Ning Weiwei, Zhang Jie, Xie Ming

Hospital of Digestive Diseases, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Xie Ming, Email: 2581303091@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the influence of nonylphenol (NP) on cytoactive and the expression of G protein-coupled estrogen receptor 30 (GPR30) in human colon cancer SW480 cells. **Methods** The experimental study was conducted. The human colon cancer SW480 cells were cultured in vitro. The influence of NP on proliferation, cell cycle, apoptosis and the expression of GPR30 in human colon cancer SW480 cells were analyzed by cell proliferation, cell cycle detection, cell apoptosis and gene expression and protein expression experiments. Cell grouping: SW480 cells cultured with medium were set as the control group, cultured with medium+ $1\times 10^{-8}$  mol/L estradiol were set as the estradiol group, cultured with medium+ $1\times 10^{-8}$  mol/L NP were set as the NP group, cultured with medium+ $1\times 10^{-8}$  mol/L NP+ $1\times 10^{-7}$  mol/L GPR30 specific antagonist G15 were set as the NP+G15 group, respectively. Observation indicators: (1) proliferation index of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups; (2) cycle proportion of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups; (3) apoptosis index of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups; (4) GPR30 messenger RNA(mRNA) expression of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups; (5) GPR30 protein expression of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Measurement data with normal distribution were represented as  $\text{Mean}\pm\text{SD}$  and one way ANOVA was used for comparison between groups. The least significant difference method was used to test the pairwise comparison. **Results** (1) Proliferation index of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Results of the cell proliferation experiments showed that the proliferation indexes of human colon cancer SW480 cells in the control group, the estradiol group, the NP group and the NP+G15 group were  $100.00\pm 0.00$ ,  $89.19\pm 4.86$ ,  $148.96\pm 6.04$  and  $120.40\pm 3.39$ , respectively, showing a significant difference among the 4 groups ( $F=21.45$ ,  $P<0.05$ ). There was a significant difference between the control group and the NP group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the control group and the estradiol group, between the control group and the NP+G15 group ( $P>0.05$ ). (2) Cycle proportion of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Results of the cell cycle detection experiments showed that the proportions of human colon cancer SW480 cells in the S phase of the cell cycles in the control group, the estradiol group, the NP group and the NP+G15 group were  $39.96\%\pm 2.02\%$ ,  $36.67\%\pm 0.62\%$ ,  $43.85\%\pm 1.02\%$  and  $38.29\%\pm 1.42\%$ , respectively, showing a significant difference among the 4 groups ( $F=10.08$ ,  $P<0.05$ ). There were significant differences between the control group and the estradiol group, between the control group and the NP group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the control group and the NP+G15 group ( $P>0.05$ ). (3) Apoptosis index of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Results of the cell apoptosis experiments showed that the apoptosis indexes of human colon cancer SW480 cells in the control group, the estradiol group, the NP group and the NP+G15 group were  $1.67\pm 0.18$ ,  $4.80\pm 0.31$ ,  $0.75\pm 0.11$  and  $2.20\pm 0.19$ , respectively, showing a significant difference among the 4 groups ( $F=136.79$ ,  $P<0.05$ ). There were significant differences between the control group and the estradiol group, between the control group and the NP group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the control group and the NP+G15 group ( $P>0.05$ ). (4) GPR30 mRNA expression of human colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Results of quantitative real-time polymerase chain reaction detection showed that the relative expression rates of GPR30 mRNA in human colon cancer SW480 cells of the control group, the estradiol group, the NP group and the NP+G15 group were  $1.00\pm 0.00$ ,  $0.86\pm 0.05$ ,  $1.89\pm 0.27$  and  $0.64\pm 0.12$ , respectively, showing a significant difference among the 4 groups ( $F=26.61$ ,  $P<0.05$ ). There were significant differences between the control group and the NP group, between the control group and the NP+G15 group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the control group and the estradiol group ( $P>0.05$ ). (5) GPR30 protein expression human

colon cancer SW480 cells in the 4 groups. Results of Western blot detection showed that the relative expression rates of GPR30 protein in human colon cancer SW480 cells of the control group, the estradiol group, the NP group and the NP+G15 group were  $1.83 \pm 0.16$ ,  $1.68 \pm 0.15$ ,  $3.10 \pm 0.30$  and  $1.26 \pm 0.11$ , respectively, showing a significant difference among the 4 groups ( $F=34.05$ ,  $P<0.05$ ). There were significant differences between the control group and the NP group, between the control group and the NP+G15 group ( $P<0.05$ ), and there was no significant difference between the control group and the estradiol group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Low dose of NP can increase the proliferation index and the proportion of cells in the S phase of the cell cycles, decrease the apoptosis index, and promote the mRNA and protein expression of GPR30 in human colon cancer SW480 cells.

**【Key words】** Colon neoplasms; Estrogen; Nonylphenol; Receptors; G protein-coupled estrogen receptor 30; Proliferation; Cell cycle; Apoptosis

**Fund program:** Science and Technology Foundation of Guizhou Province ([2017]1228)

结直肠癌是我国常见恶性肿瘤,2018 年中国癌症统计报告显示:我国结直肠癌发病率、病死率在全恶性肿瘤中分别位居第3位、第5位,其中新发病例 37.6 万,死亡病例 19.1 万,男性发病率明显高于女性<sup>[1-3]</sup>。雌激素主要通过其受体发挥作用,已有研究结果显示:雌二醇与雌激素受体- $\beta$ (estrogen receptor- $\beta$ , ER- $\beta$ )是防御结直肠黏膜恶变的保护性因素<sup>[4-7]</sup>。跨膜 G 蛋白偶联雌激素膜受体 30(G protein-coupled estrogen receptor 30, GPR30)广泛表达于各种组织及细胞,可参与雌二醇介导的细胞增殖、迁移及凋亡调控<sup>[8-11]</sup>。壬基酚是环境雌激素典型代表,可结合雌激素受体促进肿瘤细胞增殖、分化<sup>[12-16]</sup>。本研究通过体外培养人结肠癌 SW480 细胞,采用细胞增殖、凋亡及周期检测以及基因和蛋白检测实验,分析壬基酚对人结肠癌 SW480 细胞活性及 GPR30 表达的影响。

## 材料与方法

### 一、实验材料与方法

采用实验研究方法。

#### (一)实验材料

1. 人结肠癌 SW480 细胞(货号 ZQ0063)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

2. 壬基酚和雌二醇(货号分别为 HX23543、HX5110)购自成都化夏化学试剂有限公司。

3. GPR30 特异性拮抗剂 G15(货号 HY-103449)购自美国 MedChemexpress 公司。

4. 胎牛血清(货号 10099141C)购自美国 Gibco 公司。

5. L-15 培养基(货号 SH30525.01)购自美国 HyClone 公司。

6. 细胞增殖毒性检测试剂盒(cell counting kit-8,

CCK-8)、细胞总 RNA 提取试剂盒、细胞总蛋白提取试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(货号分别为 CA1210、R1200、BC3710、PC0030)购自北京索莱宝科技有限公司。

7. 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(货号分别为 FXP018、FXP0311)购自北京四正柏生物科技有限公司。

8. 人 GPR30 基因、GAPDH 基因引物,序列分别为 GPR30 基因上游引物: CACCAGCAGTACGTGATCGG, 下游引物: CATCTTCTCGCGAAGCTGAT; GAPDH 基因上游引物: CGGAGTCAACGGATTTCGTCGTAT, 下游引物: AGCCTTCTCCATGGTGGTG-AAGAC, 由上海生工生物工程有限公司合成。

9. Prime script RT 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq RT-PCR 试剂盒(货号分别为 RR037A、RR420L)购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

10. 兔抗人 GPR30 单克隆抗体(货号为 ab260033)购自美国 Abcam 公司。

11. 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(货号分别为 10494-1-AP、B900210)购自美国 Proteintech 公司。

12. 增强型化学发光(efficient chemiluminescence, ECL)试剂盒(货号 WBKLS0100)购自美国 Millipore 公司。

#### (二)实验方法

1. 细胞培养及分组: 人结肠癌 SW480 细胞采用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养基, 添加 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/L 链霉素, 置于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养。细胞分组: SW480 细胞加入培养基设为对照组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 雌二醇设为雌二醇组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 壬基酚设为壬基酚组, 加入培养基+ $1 \times 10^{-8}$  mol/L 壬基酚+ $1 \times 10^{-7}$  mol/L G15 设为壬基酚+G15 组。前期预实验结果显示:



$1 \times 10^{-8}$  mol/L 壬基酚对人结肠癌 SW480 细胞增殖具有促进作用。

2. 细胞增殖实验:取对数生长期人结肠癌 SW480 细胞,以  $6 \times 10^3$  个细胞/孔均匀接种于 96 孔培养板,待细胞完全贴壁后以含 2% 胎牛血清的 L-15 培养基培养 24 h;每孔细胞加入不同实验药物,每种药物对应 5 孔细胞,继续培养 24 h 后按照 CCK-8 说明书检测细胞增殖指数。

3. 细胞凋亡实验:取对数生长期人结肠癌 SW480 细胞,以  $1 \times 10^6$  个细胞/瓶均匀接种于 T25 细胞培养瓶,待细胞完全贴壁后以含 2% 胎牛血清的 L-15 培养基培养 24 h;每瓶细胞加入不同实验药物,每种药物对应 3 瓶细胞,继续培养 24 h 后按照细胞凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡指数。

4. 细胞周期实验:取对数生长期人结肠癌 SW480 细胞,以  $1 \times 10^6$  个细胞/瓶均匀接种于 T25 细胞培养瓶,待细胞完全贴壁后以含 2% 胎牛血清的 L-15 培养基培养 24 h;每瓶细胞加入不同实验药物,每种药物对应 3 瓶细胞,继续培养 24 h 后按照细胞周期检测试剂盒说明书检测细胞周期。

5. 细胞总 RNA 提取、逆转录及实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测:各组实验细胞按照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,按照 Prime script RT 试剂盒说明书进行 RNA 逆转录,并按照 SYBR Premix Ex Taq RT-PCR 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环;95 °C 延伸 10 min。以 GAPDH 基因为内参照,分析 GPR30 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 表达。

6. 细胞总蛋白提取、定量及 Western blot 检测:各组实验细胞按照细胞总蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,按照 BCA 试剂盒说明书进行蛋白定量,并按照 ECL 试剂盒说明书进行 Western blot 检测。GPR30 抗体按 1:1 000 稀释,GAPDH 抗体按 1:5 000 稀释,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 按 1:10 000 稀释。以 GAPDH 为内参照,分析 GPR30 蛋白表达。

## 二、观察指标

(1) 4 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数。(2) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的周期占比:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基

酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 S 期细胞占比。(3) 4 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞凋亡指数。(4) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 表达情况:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 基因表达情况。(5) 4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白表达情况:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白表达情况。

## 三、统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差异法检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、4 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数

细胞增殖实验结果显示:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的增殖指数分别为  $100.00 \pm 0.00$ 、 $89.19 \pm 4.86$ 、 $148.96 \pm 6.04$ 、 $120.40 \pm 3.39$ , 4 组比较,差异有统计学意义 ( $F = 21.45$ ,  $P < 0.001$ );壬基酚组与对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ );雌二醇组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较,差异均无统计学意义 ( $P = 0.193$ ,  $0.069$ );壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与雌二醇组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ );壬基酚组与壬基酚+G15 组比较,差异有统计学意义 ( $P = 0.002$ )。

### 二、4 组人结肠癌 SW480 细胞的周期占比

细胞周期实验结果显示:对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的 S 期细胞占比分别为  $39.96\% \pm 2.02\%$ 、 $36.67\% \pm 0.62\%$ 、 $43.85\% \pm 1.02\%$ 、 $38.29\% \pm 1.42\%$ , 4 组比较,差异有统计学意义 ( $F = 10.08$ ,  $P = 0.004$ );雌二醇组、壬基酚组分别与对照组比较,差异均有统计学意义 ( $P = 0.043$ ,  $0.022$ );壬基酚+G15 组与对照组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.260$ );壬基酚组与雌二醇组比较,差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ );壬基酚+G15 组与雌二醇组比较,差异无统计学意义 ( $P = 0.270$ );壬基酚组与壬基酚+G15 组比较,差异有统计学意义 ( $P = 0.004$ )。

### 三、4 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数

细胞凋亡实验结果显示:对照组、雌二醇组、壬

基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞的凋亡指数分别为  $1.67 \pm 0.18$ 、 $4.80 \pm 0.31$ 、 $0.75 \pm 0.11$ 、 $2.20 \pm 0.19$ ，4 组间比较，差异有统计学意义 ( $F=136.79$ ,  $P<0.001$ )；雌二醇组、壬基酚组分别与对照组比较，差异均有统计学意义 ( $P<0.001$ ,  $P=0.002$ )；壬基酚+G15 组与对照组人比较，差异无统计学意义 ( $P=0.057$ )；壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与雌二醇组比较，差异均有统计学意义 ( $P<0.001$ )；壬基酚组与壬基酚+G15 组比较，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。

四、4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 表达情况

qRT-PCR 检测结果显示：对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 相对表达率分别为  $1.00 \pm 0.00$ 、 $0.86 \pm 0.05$ 、 $1.89 \pm 0.27$ 、 $0.64 \pm 0.12$ ，4 组比较，差异有统计学意义 ( $F=26.61$ ,  $P<0.001$ )；壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较，差异均有统计学意义 ( $P<0.001$ ,  $P=0.046$ )；雌二醇组与对照组比较，差异无统计学意义 ( $P=0.375$ )；壬基酚组与雌二醇组比较，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )；壬基酚+G15 组与雌二醇组比较，差异无统计学意义 ( $P=0.193$ )；壬基酚组与壬基酚+G15 组比较，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。

五、4 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白表达情况

Western blot 检测结果显示：对照组、雌二醇组、壬基酚组、壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 蛋白相对表达率分别为  $1.83 \pm 0.16$ 、 $1.68 \pm 0.15$ 、 $3.10 \pm 0.30$ 、 $1.26 \pm 0.11$ ，4 组比较，差异有统计学意义 ( $F=34.05$ ,  $P<0.001$ )；壬基酚组、壬基酚+G15 组分别与对照组比较，差异均有统计学意义 ( $P<0.001$ ,  $P=0.017$ )；雌二醇组与对照组比较，差异无统计学意义 ( $P=0.440$ )；壬基酚组与雌二醇组比较，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )；壬基酚+G15 组与雌二醇组比较，差异无统计学意义 ( $P=0.061$ )；壬基酚组与壬基酚+G15 组比较，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )。

## 讨 论

### 一、环境雌激素对肿瘤发生发展的影响

已有的研究结果显示：环境雌激素，包括雌二醇、双酚 A 等可通过在机体中累积，产生拮抗或类似雌激素效应，干扰内源性雌激素正常生理功能，表现出神经系统、生殖系统细胞毒性及内分泌干扰等促肿瘤效应<sup>[17-21]</sup>。本研究以不同剂量壬基酚刺

激人结肠癌 SW480 细胞，结果显示：与对照组比较，壬基酚浓度为  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 时可促进人结肠癌 SW480 细胞增殖。这与 Liu 等<sup>[22]</sup>和 Rowlands 等<sup>[23]</sup>的研究结果相似。此外，与对照组比较，壬基酚组人结肠癌 SW480 细胞 S 期细胞占比升高，细胞凋亡指数降低，这提示低剂量壬基酚对结肠癌 SW480 细胞活性有促进作用。

二、雌激素及其受体在结肠癌发生发展中的作用

雌二醇与 ER- $\beta$  结合可发挥阻碍结直肠黏膜恶变作用，从而阻止结直肠癌发生、发展<sup>[6-7]</sup>。Bustos 等<sup>[24]</sup>的研究结果显示：在正常氧气浓度下，雌二醇可通过与 GPR30 结合，发挥抑制结直肠癌细胞增殖与迁移作用。本研究选择不表达雌激素受体- $\alpha$ 、低表达 ER- $\beta$  的人结肠癌 SW480 细胞开展实验，结果显示：与对照组人结肠癌 SW480 细胞比较，雌二醇组人结肠癌 SW480 细胞 S 期细胞占比降低，细胞凋亡指数增加<sup>[25]</sup>。这提示雌二醇可抑制人结肠癌 SW480 细胞活性，与 Bustos 等<sup>[24]</sup>的研究结果相似。

GPR30 广泛分布于人体组织，可参与恶性肿瘤发生发展过程<sup>[26-27]</sup>。已有的研究结果显示：低剂量双酚 A ( $1 \times 10^{-10} \sim 10^{-8}$  mol/L) 可通过 GPR30 促进鼠精原细胞系增殖效应<sup>[28-29]</sup>。此外，GPR30 的异常表达还与乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肺癌、甲状腺癌等恶性肿瘤的不良预后密切相关<sup>[30-41]</sup>。本研究结果显示：与对照组比较，壬基酚组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 和蛋白表达均升高，而壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 和蛋白表达均降低。此外，与对照组比较，壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数、S 期细胞占比、凋亡指数比较，差异均无统计学意义；但与壬基酚组比较，壬基酚+G15 组人结肠癌 SW480 细胞增殖指数、S 期细胞占比、凋亡指数比较，差异均有统计学意义。上述结果提示：低剂量壬基酚可促进人结肠癌 SW480 细胞 GPR30 mRNA 和蛋白表达，而通过 GPR30 特异性拮抗剂 G15 可阻断低剂量壬基酚对结肠癌 SW480 细胞活性的促进作用。这与 Chevalier 等<sup>[21]</sup>的研究结果相似，提示 GPR30 可作为结肠癌潜在治疗靶点开展更深入的研究。

### 三、本研究的不足

本研究仅纳入 1 株人结肠癌细胞开展实验，且未验证壬基酚与 GPR30 的内在联系。笔者团队下一步将纳入更多人结肠癌临床标本和细胞，构建相应的低表达细胞株，并建立实验动物模型以进一步

验证本研究结果。

综上,低剂量壬基酚可增加人结肠癌 SW480 细胞增殖指数与 S 期细胞占比,降低细胞凋亡指数,并促进 GPR30 mRNA 和蛋白表达。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 杨清旭、刘秀、张桃:实验设计与实施,数据收集与统计分析,论文撰写;宁伟伟、张杰:数据收集及统计分析;谢铭:研究指导,论文修改,经费支持

## 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020 版)[J]. 中华消化外科杂志,2020,19(6):563-588. DOI:10.3760/cma.j.cn115610-20200504-00348.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] Hendifar A, Yang D, Lenz F, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival[J]. Clin Cancer Res, 2009,15(20):6391-6397. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-0877.
- [4] McDonnell DP, Norris JD. Connections and regulation of the human estrogen receptor[J]. Science,2002,296(5573): 1642-1644. DOI:10.1126/science.1071884.
- [5] Ho KJ, Liao JK. Nonnuclear actions of estrogen[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002,22(12):1952-1961. DOI:10.1161/ 01.atv.00000041200.85946.4a.
- [6] Ferreira AM, Westers H, Albergaria A, et al. Estrogens, MSI and Lynch syndrome-associated tumors[J]. Biochim Biophys Acta,2009,1796(2):194-200. DOI:10.1016/j.bbcan.2009.06.004.
- [7] Xu AG, Yu ZJ, Jiang B, et al. Colorectal cancer in Guangdong Province of China: a demographic and anatomic survey[J]. World J Gastroenterol,2010,16(8):960-965. DOI:10.3748/ wjg.v16.i8.960.
- [8] Hazell GG, Yao ST, Roper JA, et al. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues[J]. J Endocrinol,2009,202(2):223-236. DOI:10.1677/JOE-09-0066.
- [9] Wang C, Prossnitz ER, Roy SK. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones[J]. Endocrinology,2007,148(10):4853-4864. DOI:10.1210/en. 2007-0727.
- [10] Chevalier N, Vega A, Bouskine A, et al. GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation[J]. PLoS One,2012,7(4):e34672. DOI:10.1371/journal.pone.0034672.
- [11] Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH, et al. Regulation of HRG- $\beta$  1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression[J]. Mol Med Rep,2012,6(1):131-138. DOI:10.3892/mmr.2012.874.
- [12] Jothiramajayam M, Sinha S, Ghosh M, et al. Sodium fluoride promotes apoptosis by generation of reactive oxygen species in human lymphocytes[J]. J Toxicol Environ Health A,2014,77(21):1269-1280. DOI:10.1080/15287394.2014. 928658.
- [13] Hwang KA, Kang NH, Yi BR, et al. Genistein, a soy phytoestrogen, prevents the growth of BG-1 ovarian cancer cells induced by 17 $\beta$ -estradiol or bisphenol A via the inhibition of cell cycle progression[J]. Int J Oncol,2013,42(2):733-740. DOI:10.3892/ijo.2012.1719.
- [14] Jie Y, Xuefeng Y, Mengxue Y, et al. Mechanism of nonyl-phenol-induced neurotoxicity in F1 rats during sexual maturity [J]. Wiener klinische Wochenschrift,2016,128(11/12):426-434. DOI:10.1007/s00508-016-0960-6.
- [15] Duan P, Hu C, Quan C, et al. 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways[J]. Toxicology,2016,341(343):28-40. DOI:10.1016/j.tox.2016. 01.004.
- [16] Kang NH, Hwang KA, Kim TH, et al. Induced growth of BG-1 ovarian cancer cells by 17 $\beta$ -estradiol or various endocrine disrupting chemicals was reversed by resveratrol via down-regulation of cell cycle progression[J]. Mol Med Rep,2012, 6(1):151-156. DOI:10.3892/mmr.2012.887.
- [17] Masuo Y, Ishido M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev,2011,14 (5-7):346-369. DOI:10.1080/10937404.2011.578557.
- [18] Wayne A, Trudeau VL. Neuroendocrine disruption: more than hormones are upset[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev,2011,14(5-7): 270-291. DOI:10.1080/10937404. 2011.578273.
- [19] Chung BY, Kyung M, Lim SK, et al. Uterotrophic and herberger assays for endocrine disruption properties of plastic food contact materials polypropylene (PP) and polyethylene terephthalate (PET) [J]. J Toxicol Environ Health A,2013,76(10):624-634. DOI:10.1080/15287394.2013.80 1767.
- [20] He YY, Du GQ, Cai B, et al. Estrogenic transmembrane receptor of GPR30 mediates invasion and carcinogenesis by endometrial cancer cell line RL95-2[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2012,138(5):775-783. DOI:10.1007/s00432-011- 1133-7.
- [21] Chevalier N, Bouskine A, Fenichel P. Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/ GPR30[J]. Int J Cancer,2012,130(1):241-242. DOI:10.1002/ ijc.25972.
- [22] Liu H, Du J, Hu C, et al. Delayed activation of extracellular-signal-regulated kinase 1/2 is involved in genistein- and equol-induced cell proliferation and estrogen-receptor-alpha-mediated transcription in MCF-7 breast cancer cells [J]. J Nutr Biochem,2010,21(5):390-396. DOI:10.1016/j. jnutbio.2009.01.016.
- [23] Rowlands DJ, Chapple S, Siow RC, et al. Equol stimulated mitochondrial reactive oxygen species activate endothelial nitric oxide synthase and redox signaling in endothelial cells roles for F-actin and GPR30[J]. Hypertension,2011, 57(4):833-840. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110. 162198.
- [24] Bustos V, Nolan ÁM, Nijhuis A, et al. GPER mediates differential effects of estrogen on colon cancer cell proliferation and migration under normoxic and hypoxic conditions[J]. Oncotarget,2017,8(48):84258-84275. DOI:10.18 632/oncotarget.20653.
- [25] Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, et al. Tumor repres-



- sive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6100-6106. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0506.
- [26] Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(12): 715-726. DOI: 10.1038/nrendo.2011.122.
- [27] Barton M. Not lost in translation: emerging clinical importance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER[J]. *Steroids*, 2016, 111: 37-45. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.02.016.
- [28] Sheng ZG, Zhu BZ. Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- $\alpha$ [J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(12): 1775-1780. DOI: 10.1289/ehp.1103781.
- [29] Sheng ZG, Huang W, Liu YX, et al. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 267(1): 88-94. DOI: 10.1016/j.taap.2012.12.014.
- [30] Molina L, Bustamante FA, Bhoola KD, et al. Possible role of phytoestrogens in breast cancer via GPER-1/GPR30 signaling[J]. *Clin Sci Lond*, 2018, 132(24): 2583-2598. DOI: 10.1042/CS20180885.
- [31] Girgert R, Emons G, Gründker C. 17 $\beta$ -estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1212-1218. DOI: 10.3892/or.2016.5306.
- [32] Lappano R, Maggiolini M. GPER is involved in the functional liaison between breast tumor cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 176: 49-56. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.019.
- [33] Zhuang Y, Xiang J, Bao W, et al. MDH2 stimulated estrogen-GPR30 pathway down-regulated PTEN expression promoting the proliferation and invasion of cells in endometrial cancer[J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(2): 203-210. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.01.009.
- [34] Chen C, Wang Y, Wang S, et al. LSD1 sustains estrogen-driven endometrial carcinoma cell proliferation through the PI3K/AKT pathway via di-demethylating H3K9 of cyclin D1[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(3): 942-952. DOI: 10.3892/ijo.2017.3849.
- [35] Lv QY, Xie BY, Yang BY, et al. Increased TET1 expression in inflammatory microenvironment of hyperinsulinemia enhances the response of endometrial cancer to estrogen by epigenetic modulation of GPER[J]. *J Cancer*, 2017, 8(5): 894-902. DOI: 10.7150/jca.17064.
- [36] Yan Y, Jiang X, Zhao Y, et al. Role of GPER on proliferation, migration and invasion in ligand-independent manner in human ovarian cancer cell line SKOV3[J]. *Cell Biochem Funct*, 2015, 33(8): 552-559. DOI: 10.1002/cbf.3154.
- [37] Albanito L, Lappano R, Madeo A, et al. Comment on "Effects of atrazine on estrogen receptor  $\alpha$ - and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts" [J]. *Environ Health Perspect*, 2015, 123(5): 493-499. DOI: 10.1289/ehp.1510927.
- [38] Liu C, Liao Y, Fan S, et al. G-Protein-coupled estrogen receptor antagonist G15 decreases estrogen-induced development of non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(3): 283-292. DOI: 10.3727/096504017X15035795904677.
- [39] Zhu P, Liao LY, Zhao TT, et al. GPER/ERK&AKT/NF- $\kappa$ B pathway is involved in cadmium-induced proliferation, invasion and migration of GPER-positive thyroid cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 442: 68-80. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.007.
- [40] 何煦, 陈杰, 叶尚勉, 等. 雌激素受体核酸适配体抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖 [J]. *肿瘤*, 2019, 39(2): 83-90. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2019.11.520.
- [41] 刘俊江, 袁丹, 周正平, 等. 雌激素受体拮抗剂对子宫内腺样癌 Ishikawa 细胞增殖的影响及可能的作用机制 [J]. *肿瘤*, 2018, 38(7): 652-661. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2018.11.170.

## 本刊加入中国临床试验注册与发表协作网申明

2004 年 10 月, 世界卫生组织领导建立全球临床试验注册制度, 并启用国际临床试验注册平台, 倡导所有涉及人体的试验均需在世界卫生组织一级注册机构登记注册, 应公开研究者、研究实施单位、研究目的、干预措施等试验信息。这是提高医学试验公信力、提高临床试验质量的有效措施。

中国 48 家医学期刊与中国临床试验注册中心、中国循证医学中心于 2006 年组织成立中国临床试验注册与发表协作网, 提出各成员期刊优先发表经注册的临床试验成果, 逐渐过渡至只发表经注册的临床试验成果, 旨在推动我国临床试验注册制度和临床试验透明化, 提高医学研究整体水平和社会公信力。

为履行期刊引领学术和规范研究责任, 促进临床试验信息透明化, 助力我国医学事业发展, 经《中华消化外科杂志》编辑委员会讨论决定, 本刊自 2021 年 1 月 1 日起正式加入中国临床试验注册与发表协作网。本刊提倡凡涉及人体试验均应在中国临床试验注册中心 ([www.chictr.org.cn](http://www.chictr.org.cn)) 申请注册。已注册的临床试验报告投稿时请注明注册编号, 本刊将优先录用发表。