

学校代码: 10285

学 号: 20184233025

苏州大学
SOOCHOW UNIVERSITY

硕士学位论文

(学术学位)



SREBP1/FASN/胆固醇轴促进结直肠癌
的放疗抵抗

SREBP1/FASN/cholesterol axis facilitates
radioresistance in colorectal cancer

研究生姓名 金煜晓

指导教师姓名 杨晓东

专业名称 普 外

研究方向 胃肠道肿瘤

所在院部 苏州大学附属第二医院

论文提交日期 2021 年 5 月

苏州大学学位论文独创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得苏州大学或其它教育机构的学位证书而使用过的材料。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人承担本声明的法律责任。

论文作者签名： 金煜晓 日期： 2021.5.26

SREBP1/FASN/胆固醇轴促进结直肠癌的放疗抵抗

中文摘要

目的

研究胆固醇代谢促进结直肠癌（CRC）细胞放疗抵抗的机制，为 CRC 放疗增敏提供新的方向。

方法

1.采用 CCK-8、克隆形成实验、EdU 增殖检测实验及裸鼠成瘤实验等实验观察胆固醇对受照后细胞增殖、凋亡及活力的影响。2.评估受照后细胞内胆固醇含量的变化，然后用 PCR 和 western blot 观察受照后 CRC 细胞中胆固醇合成相关基因 SREBPs 家族及其下游 FASN 和 HMGCR 基因的表达情况。3.通过转染抑制 SREBP1 的表达，并用 PCR 和 western blot 验证干扰效率，在此基础之上，检测沉默 SREBP1 后受照细胞中胆固醇含量及其放疗敏感性的变化。4.给予 CRC 细胞 FASN 抑制剂 TVB-2640，随后体内外实验探究 CRC 细胞放疗敏感性的变化情况，以及受照细胞中胆固醇含量。

结果

1.CCK-8、克隆形成实验显示外源胆固醇促进 CRC 细胞照射后的增殖；EdU 增殖检测实验显示外源胆固醇促进 CRC 细胞照射后的 DNA 复制；裸鼠成瘤实验显示胆固醇使照射后小鼠瘤子体积的增大、重量增加，用 TVB-2640 抑制 FASN 促进照射后小鼠瘤子体积的减小、重量的减轻。2.CRC 细胞照射后胆固醇含量增加，实时 PCR 和 western blot 显示 CRC 细胞照射后 SREBP1/FASN 上调、SREBP2/HMGCR 下调。3.抑制 SREBP1 或 FASN 后胆固醇含量下降，CCK-8、克隆形成实验显示抑制 SREBP1 或 FASN 后 CRC 细胞照射后增殖减少；流式细胞术和 Western 实验显示抑制 SREBP1 或 FASN 促进 CRC 细胞照射后的凋亡。

结论

通过研究，我们发现外源性胆固醇和 CRC 细胞照射后细胞内胆固醇合成在体外和体内促进 CRC 细胞放疗抵抗。靶向 SREBP1 和 FASN 抑制 CRC 细胞照射后细胞内胆固醇合成，提高 CRC 细胞的放疗敏感性。

关键词

SREBP1, FASN, 结直肠癌细胞, 放疗抵抗, 胆固醇

作者: 金煜晓

指导教师: 杨晓东

SREBP1/FASN/cholesterol axis facilitates radioresistance in colorectal cancer

Abstract

Objective

To interrogate the mechanism of cholesterol metabolism prompting radioresistance in CRC cells and provide a new direction for radiosensitization in CRC.

Methods

1. The effects of cholesterol on the proliferation, apoptosis and viability of irradiated cells were assessed by CCK-8, colony formation, EDU incorporation and nude mouse tumorigenicity assays. 2. The cellular cholesterol level post-irradiation was assessed, and then PCR and Western blot assays were used to observe the expression of cholesterol synthesis related genes SREBPs family and its downstream genes FASN and HMGCR in CRC cells post-irradiation. 3. Cell transfection assay was used for the knockdown of the expression of SREBP1 and the interference efficiency was verified by qRT-PCR and Western blot assays. Then, the cholesterol level in irradiated cells after silencing SREBP1 and the radiosensitivity in CRC cells were assessed. 4. The CRC cells were treated with TVB-2640, an inhibitor of FASN. Then, the radiosensitivity in CRC cells and cholesterol level in irradiated cells were assessed in *vivo* and *vitro* assays.

Results

1. CCK-8, colony formation assays showed that exogenous cholesterol addition promoted the proliferation of CRC cells after irradiation; EdU incorporation assay showed that cholesterol promoted DNA replication in CRC cells after irradiation. Nude mouse tumorigenicity assay showed that cholesterol increased the volume and weight of tumors in mice after irradiation. TVB-2640, an inhibitor of FASN, promoted the reduction of volume and weight of tumors in mice after irradiation. 2. Cholesterol level increased in CRC cells after irradiation, and real-time quantitative PCR and Western blot assays showed SREBP1/FASN were up-regulated, SREBP2/HMGCR were down-regulated post-irradiation in CRC cells. 3. Cholesterol level decreased after the inhibition of SREBP1 or FASN; CCK-

8 and colony formation assays showed that the inhibition of SREBP1 or FASN inhibited the proliferation of CRC cells after irradiation; Flow cytometry and Western blot assays showed that the inhibition of SREBP1 or FASN accelerated the apoptosis of CRC cells after irradiation.

Conclusions

In this study, we found that exogenous cholesterol addition or radiation-induced intracellular cholesterol synthesis prompt the radioresistance in CRC cells in *vitro* and in *vivo* assays. The inhibition of SREBP1 and FASN inhibit intracellular cholesterol synthesis after irradiation in CRC cells and enhance the radiosensitivity in CRC cells.

Keywords

SREBP1; FASN; colorectal cancer cell; radioresistance; cholesterol;

Written by: Yu-xiao Jin

Supervised by: Xiao-dong Yang

目 录

引 言	1
第一部分 外源胆固醇摄入对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究	3
材料与方法	3
实验结果	9
小 结	12
讨 论	12
第二部分 放疗对 CRC 细胞中胆固醇含量影响的研究.....	13
材料与方法	13
实验结果	17
小 结	21
讨 论	21
第三部分 SREBP1 对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究.....	23
材料与方法	23
实验结果	25
小 结	27
讨 论	27
第四部分 FASN 对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究	28
材料与方法	28
实验结果	30
小 结	32
讨 论	32
全文总结	34
参考文献	35

综 述	39
参考文献	46
附 录	55
1.缩写词表:	55
2.原始数据:	56
攻读学位期间发表的论文	59
致 谢	60

引言

在本世纪,肿瘤对人类健康和国家财政及社会安定的威胁是全球所面临的一个重大公共问题。全球癌症统计报告显示在所有癌症中,CRC 的总体发病率位居第三(10%),病死率位居第二(9.4%),与此同时,CRC 的发病也越来越年轻化[1,2]。放射治疗在癌症中的应用是一个里程碑式的发展,它被单独或与其他治疗方法联合用于良性或者是恶性肿瘤的治疗,无论是基于治愈或者是姑息性治疗的目的[3]。全球每年接受放疗的恶性肿瘤病人超过 50%,而对于 CRC 尤其是直肠癌,术前放疗是一种革命性的联合治疗方式—术前放疗的年局部复发风险比单独手术的患者大约低 50%[4]。然而由于 CRC 中特定基因谱的表达,大量的 CRC 病人表现出了对放射治疗的低反应性,而更高剂量放疗需求以及潜在更大的放疗副反应的风险,导致了 CRC 病人放疗的中断,大大降低了 CRC 病人的生活质量[5]。因此,阐明 CRC 放疗抵抗的潜在机制,并开发出一种安全有效的放射增敏剂仍是目前临床上的一个尚未得到解决的医学难题。

众所周知,人体内的糖代谢、脂代谢等与人体的生理病理状态密切相关,这些代谢的动态平衡维持着人体的健康。许多肿瘤细胞携带着异常的脂质代谢谱,而这些异常的代谢谱有利于适合肿瘤快速生长的肿瘤微环境的形成[6]。胆固醇作为脂类的一员,它的异常增多会促进多种肿瘤的发生发展[7-10]。此外,高胆固醇的摄入不仅能抑制癌细胞的凋亡,还能促进癌细胞的转移[11,12]。更值得注意的是,胆固醇的合成与乳腺癌的内分泌治疗抵抗、肝癌和卵巢癌的化疗抵抗密切相关[13-15]。迄今为止,固醇反应元件结合蛋白(SREBPs)家族是公认的控制着胆固醇的合成和摄入基因[16],而 SREBPs 家族表达的失衡在多种癌症中被观察到并被证明与癌症的发生发展相关[17]。

放疗抵抗目前可被分为先天性的和获得性的放疗抵抗[18]。就 CRC 而言,只有不到 30%的 CRC 患者表现出对于放疗良好的反应,而导致这种现象的因素是多样的,并最终会导致先天性的和获得性的放疗抵抗[19]。CRC 所拥有的特定的放疗抵抗的基因谱维持 CRC 先天性的放疗抵抗。然而胆固醇与 CRC 放疗敏感性的关系目前尚不清楚,而在此过程中 SREBPs 家族的影响更需阐明。

综上所述,我们提出以下疑问:外源性胆固醇是否会导致 CRC 获得性放疗抵抗? SREBPs 家族是否会促进内源胆固醇合成导致 CRC 先天性放疗抵抗? 以上疑问的解决将会为 CRC 放疗提供新的思路,并对于接受放疗的 CRC 病人是否该低胆固醇饮食提供参考。

第一部分 外源胆固醇摄入对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究

在本世纪,肿瘤对人类健康和国家财政及社会安定的威胁是全球所面临的一个重大公共问题。据全球癌症统计报告显示,在所有癌症中,CRC的总体发病率位居第三(10%),病死率位居第二(9.4%),与此同时,CRC的发病也越来越年轻化[1,2]。放射治疗在癌症中的应用是一个里程碑式的发展,它被单独或与其他治疗方法联合用于良性或者是恶性肿瘤的治疗,无论是基于治愈或者是姑息性治疗的目的[3]。全球每年接受放疗的恶性肿瘤病人超过50%,而对CRC尤其是直肠癌,术前放疗是一种革命性的联合治疗方式—术前放疗的年局部复发风险比单独手术的患者大约低50%[4]。然而由于CRC中特定基因谱的表达,大量的CRC病人表现出对放射治疗的低反应性,而更高剂量放疗需求以及潜在更大的放疗副反应的风险,导致了CRC病人放疗的中断,大大降低CRC病人的生活质量[5]。因此,阐明CRC放疗抵抗的潜在机制,并开发出一种安全有效的放射增敏剂仍是目前临床上的一个尚未得到解决的医学难题。

众所周知,人体内的糖代谢、脂代谢等与人体的生理病理状态密切相关,这些代谢的动态平衡维持着人体的健康。许多肿瘤细胞携带着异常的脂质代谢谱,而这些异常的代谢谱有利于塑造适合肿瘤快速生长的肿瘤微环境[6]。胆固醇作为脂类的一员,它的异常增多会促进多种肿瘤的发生发展,例如肝癌、前列腺癌、乳腺癌和CRC等 [7-10]。此外,高胆固醇的摄入不仅能抑制癌细胞的凋亡,还能促进癌细胞的转移[11,12]。更值得注意的是,胆固醇的合成与乳腺癌的内分泌治疗抵抗、肝癌和卵巢癌的化疗抵抗密切相关[13-15]。但是迄今为止,胆固醇与CRC的放疗敏感性之间的关系尚未明确。

本部分研究主要是明确外源胆固醇摄入对CRC细胞放疗敏感性的影响,并分别从体内和体外两个实验模型来证明胆固醇的作用。

材料与方法

一、材料

1. 细胞系: 人CRC细胞系HCT-8和HT-29购自ATCC,经STR鉴定细胞无交叉污染和无支原体感染。HT-29和HCT-8细胞株分别在添加10%胎牛血清和1%青霉素/链霉

素的RPMI-1640和McCoy's 5A培养基中, 5% CO₂和37℃条件下培养。

2. **动物:** 雄性BALB/c无胸腺的裸鼠(Charles River), 18-20g, 4-6周龄, 5只小鼠/笼。所有的老鼠在实验前会被饲养在一个SPF级别的动物实验中心, 适应环境与正常节律 (12/12h光暗循环)至少3天, 自由饮食。

3. 试剂与仪器

试剂/仪器	品牌/厂家
RPMI-1640培养基	Gibco公司
McCoy's 5A培养基	Gibco公司
胎牛血清	Gibco公司
青链霉素混合液(100×)	北京索莱宝公司
胰蛋白酶-EDTA消化液	北京索莱宝公司
胰蛋白酶消化液(0.25%) 不含EDTA和酚红	北京索莱宝公司
Countstar自动细胞计数分析仪	广州吉源生物科技有限公司
胆固醇	北京索莱宝公司
CCK-8试剂盒	北京索莱宝公司
Click Edu-AF594细胞增殖分析试剂盒 (成像法)	南京恩晶生物公司
兔来源Ki-67单克隆抗体	Proteintech Group公司
小鼠来源p27单克隆抗体	Santa Cruz公司
无水乙醇	天津江天化技术有限公司
丙酮	天津江天化技术有限公司
无水甲醇	天津江天化技术有限公司
异丙醇	天津江天化技术有限公司
二甲苯	天津江天化技术有限公司
过氧化氢溶液	天津江天化技术有限公司
甲醛	天津江天化技术有限公司
4%组织细胞固定液	北京索莱宝公司
环保透明脱蜡液	北京索莱宝公司
牛血清白蛋白 (BSA-V)	北京索莱宝公司
无菌无酶PBS是磷酸缓冲盐溶液	HyClone公司
PBS缓冲液干粉	北京索莱宝公司
Triton X-100	北京索莱宝公司

试剂/仪器	品牌/厂家
柠檬酸钠抗原修复液 (50X)	北京普利莱公司
通用SP试剂盒	北京中杉金桥公司
DAB显色试剂盒	北京中杉金桥公司
苏木精染色液	北京索莱宝公司
切片石蜡 56-58℃	北京索莱宝公司
¹³⁷ Cs γ 射线照射源	加拿大原子能公司
-80℃冰箱	赛默飞公司
4℃、-20℃冰箱	青岛海尔公司
精密称量天平	Sartorius公司
光学显微镜	Olympus公司
组织自动脱水机	上海精密仪器厂
细胞培养箱	赛默飞公司
生物安全柜	赛默飞公司
超净工作台	赛默飞公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技有限公司
轮转式石蜡切片机	深圳市达科为医疗科技有限公司
移液器	Eppendorf公司
1.5/15/50ml离心管	AXYGEN公司
超速离心机	赛默飞公司
10/200/1000ul枪头	AXYGEN公司
冻存管	AXYGEN公司
一次性针头过滤器 0.22um Millipore.	北京索莱宝公司
6/12/24/96孔板	Corning公司
培养瓶/皿	Corning公司
液氮罐	乐山市东亚机电工贸有限公司
抗荧光衰减封片剂	北京索莱宝公司
中性树脂	北京索莱宝公司
载玻片/盖玻片	北京中科瑞泰生物科技有限公司
荧光显微镜	MW-LIGHT公司
24孔板配套用细胞爬片	上海晶安生物科技有限公司
DTX 880 多功能酶标仪	Beckman公司

二、实验方法

1. 细胞培养、传代

- 1) 处理细胞前用75%酒精消毒生物安全柜台面，然后用紫外照射至少30min。
- 2) 每天换液，换液前需预热培养基并留一半的条件培养基。
- 3) 当细胞汇聚80%左右时，弃去培养基，然后用无菌无酶PBS洗涤两次，然后、胰酶（含0.25%EDTA）消化细胞，在显微镜下观察细胞状态直到细胞变圆。
- 4) 随后用相应的培养基重悬，然后培养。

2. 细胞冻存、复苏

- 1) 冻存前，保证细胞生长汇合达到80%以上。
- 2) 弃去培养基，然后用无菌无酶PBS洗涤两次，加胰酶，在观察细胞状态直到细胞变圆。
- 3) 随后用相应的培养基重悬、离心弃上清，随后用细胞冻存液（无菌血清/DMSO为9/1）重悬至冻存管中，标明冻存细胞类型及冻存日期。
- 4) 冻存细胞时梯度降温，细胞每隔一年复苏一次调整状态后重新冻存。
- 5) 复苏细胞时需37℃速融，冻存液融化后，离心弃去上清，用相对应的培养基重悬，接种于培养皿中，然后放到细胞培养箱中。四小时后观察细胞状态，次日更换新鲜培养基。

3. CCK-8增殖检测实验

- 1) 细胞处于指数增长期时，用胰酶消化计数后在96孔板中每个孔接种3000个细胞，后在细胞培养箱中过夜。
- 2) 第二天给予细胞6Gy射线照射。随后细胞换液，每个孔更换新鲜培养基，处理组同时给予2uM已过滤除菌的胆固醇&丙酮溶液。随后Day0天的每孔立即避光给予CCK-8试剂5ul。细胞避光孵育2h后用酶标仪检测，确保基础细胞数量相近。然后分别在24h、48h和72h给予CCK-8检测细胞生长情况。每次加入CCK-8试剂之前更换新鲜培养基以排除胆固醇本身对本实验的干扰。

- 3) 检测波长为450nm。

4. 克隆形成实验

- 1) 细胞处于指数增长期时，用胰酶消化计数后在6孔板中每个孔接种500个细胞，

后在细胞培养箱中过夜。

2) 第二天给予细胞6Gy射线照射。随后细胞换液,每个孔更换新鲜培养基,处理组同时给予2uM已过滤除菌的胆固醇&丙酮溶液。

3) 6孔板放于细胞培养箱中培养14天,每三天更换一半培养基为新鲜的培养基同时给予相应的胆固醇&丙酮溶液。每次更换培养基前观察细胞状态。

4) 在第14天,弃去6孔板中的培养基,紧贴侧壁每孔缓慢加入PBS,清洗两次并弃去。

5) 紧贴侧壁缓慢加入甲醇每孔1ml,放于4℃摇床上30min。

6) 弃去甲醇,紧贴侧壁每孔缓慢加入姬姆萨染色液1ml,室温摇床上染色30min。

7) 弃去染液并用自来水缓慢冲洗,避免冲到细胞克隆团。晾干后照相,然后用Photoshop计数并统计。

5. Edu增殖检测实验

1) 细胞接种于放有玻片的24孔板中。次日更换新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。

2) 当细胞汇合达到40%时给予细胞6Gy射线照射,随后更换为新鲜培养基并处理组加入2uM已过滤除菌的胆固醇&丙酮溶液。然后在细胞培养箱中继续培养。

3) 24h后用根据试剂厂商说明进行实验。

注:上述实验都使用了HCT-8和HT-29两种细胞系。

6. 裸鼠成瘤实验

1) 每只小鼠给予含有 4×10^6 个HTC-8细胞100ul生理盐水悬液皮下注射到小鼠的腋窝。

2) 待瘤体到 100mm^3 ,将小鼠随机分组。然后次日开始给予每只小鼠局部3Gy射线照射,一天一次,累计剂量为12Gy。

3) 照射第一天处理组开始通过灌胃的方式,每天给予含有4%胆固醇的生理盐水悬浊液200ul/只小鼠。

4) 每天称量小鼠体重,观察小鼠健康状态,待小鼠瘤体积达到一定大小时,给予小鼠安乐死。

7. 免疫组织化学实验

1) 小鼠安乐死后收集的瘤子放入4%多聚甲醛中过夜固定。

2) 次日瘤子放入自动脱水机脱水,程序如下:75%乙醇4h、85%乙醇30min、85%乙醇2h、95%乙醇2h、100%乙醇2h、二甲苯1.5h、二甲苯1.5h、二甲苯45min、石蜡30min、石蜡1h。

3) 随后组织样本进行石蜡包埋并切片。

4) 为保证切片顺利,切下的组织片完整,将经刀片修整过的蜡块放入冰水混合物中浸泡大约10/min。组织片的厚度为5 μ m。

5) 切下的组织片放于预热至45℃的热水中,注意动态观察,保证组织片不损坏的情况下充分延展。随后用载玻片捞起组织片,注意不能使组织片皱褶以防止出现组织重叠。所有样本做好标记。

6) 随后将载玻片放在40℃烘干,然后再放到60℃烘箱中,烘30min。随后放到盒中保存准备之后的实验。

7) 60℃烤片1h

8) 脱蜡,步骤依次为:脱蜡液15min、脱蜡液15min、无水乙醇15min、无水乙醇15min、85%乙醇10min、70%乙醇10min、50%乙醇5min、自来水5次、蒸馏水5min、3% H_2O_2 静置10min、PBS浸泡2min(总计三次)。期间注意轻拿轻放,防止脱片,同时每次换到新的液体中前都在吸水纸上沾一下。

9) 随后进行抗原修复,将放有载玻片的架子放到含有1 \times 柠檬酸钠抗原修复液盒子中,随后放到已经加热至95℃的热水中,浸泡15min。随后将盒子拿出到室温中缓慢冷却,然后放到预冷的PBS中浸泡5min(总计三次),随后用滤纸吸干载玻片上的水分,注意不能碰到组织。

10) 随后将载玻片放到湿盒中,向组织上滴上山羊血清封闭液,随后放到37℃中1h。

11) 拿出湿盒,随后尽量去除载玻片上的封闭液,向组织上滴上一抗,然后放到4℃中过夜。

12) 次日,用PBS浸泡载玻片5min(总计三次),滤纸吸干水分,然后向组织上滴上对应的二抗,随后放到37℃中1h。然后用PBS浸泡载玻片5min(总计三次)。

13) 滤纸吸干水分,然后向组织上滴上辣根过氧化物酶工作液,室温孵育15min。然后用PBS浸泡载玻片5min(总计三次)。

14) 用DAB显色,显微镜下随时观察显色深度,及时用PBS终止显色。然后剩余

的片子显色同样的时间。

15) 用苏木精复染,显微镜下随时观察显色深度,及时用自来水终止显色。然后用蒸馏水浸泡5min。

16) 若染色过深可以用PBS浸泡5min返蓝,随后用自来水浸泡。

17) 镜下观察染色适宜的后脱水,步骤依次为:80%乙醇10s、95%乙醇10s、无水乙醇5min、无水乙醇5min、脱蜡剂5min、脱蜡剂5min。

18) 风干。

19) 在载玻片上滴上中性树胶,盖上盖玻片封片。注意盖上后不要挪动防止损伤组织。

8. 统计分析

免疫组化阳性表达区域用IPP软件分析。数据分析采用学生t检验,以平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$ 。

实验结果

1. 外源胆固醇的摄入对 CRC 细胞在放疗后增殖和存活能力的影响。

在体外实验中,为了研究胆固醇对CRC细胞放疗敏感性的影响,我们首先通过CCK-8实验探寻胆固醇对照射后CRC细胞HCT-8和HT-29短期的增殖和存活能力的影响。CCK-8的结果显示,外源胆固醇加入会导致CRC细胞HCT-8和HT-29在照射后短期的增殖和存活能力增强(图 1-1 A-B)。随后为了探寻胆固醇对照射后CRC细胞HCT-8和HT-29长期的增殖和存活能力的影响,我们将照射后CRC细胞HCT-8和HT-29平均接种500个左右的细胞到6孔板的每个孔,从而进行长达14天的克隆形成实验。克隆形成实验的结果显示,外源添加胆固醇后,CRC细胞癌HCT-8和HT-29的存活和增殖能力明显增强(图 1-1 C-D)。

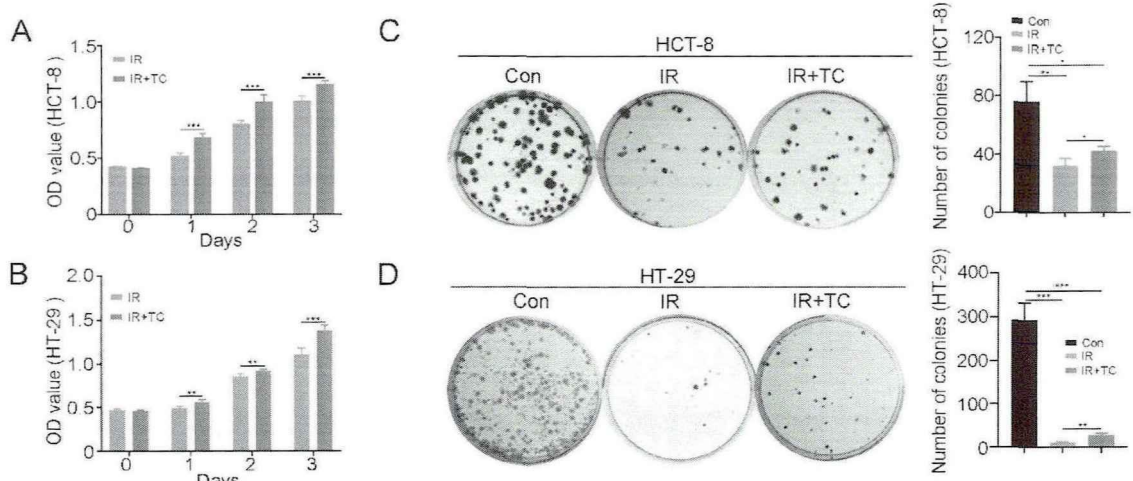


图 1-1 外源胆固醇的摄入对CRC细胞在放疗后增殖和存活能力的影响

(A-B)CCK-8实验评估在体外胆固醇摄入对受辐照的CRC细胞HCT-8和HT-29短期的增殖能力的影响。(C-D)克隆形成实验评估在体外胆固醇摄入对受辐照的CRC细胞HCT-8和HT-29长期的增殖和存活能力的影响。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值±标准差，P<0.05为有统计学意义。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

2.外源胆固醇的摄入对照射后 CRC 细胞 DNA 复制的影响。

我们通过EdU增殖检测实验评估CRC细胞HCT-8和HT-29中处于DNA复制活跃的细胞数量。实验结果显示，照射后HCT-8和HT-29处于DNA复制活跃的细胞数量明显减少，而给予胆固醇后，促进了辐照后CRC细胞的DNA复制。

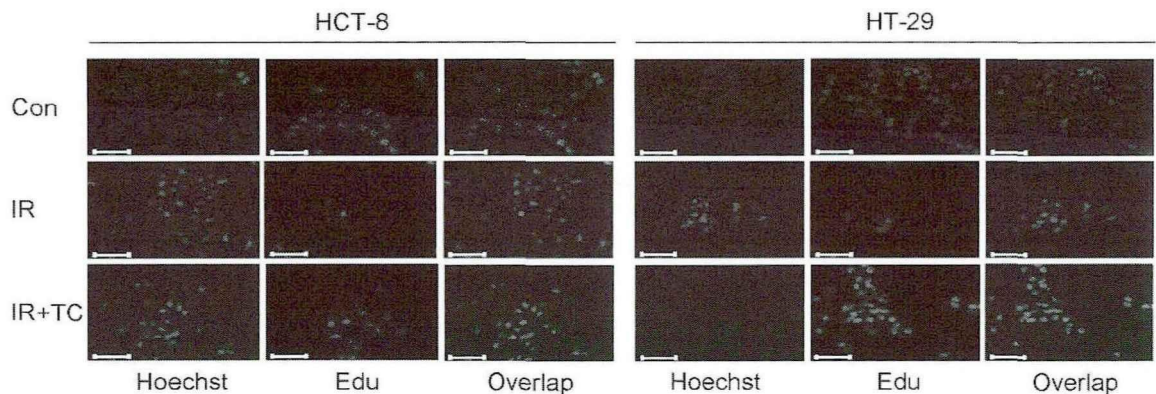


图 1-2 外源胆固醇的摄入对照射后CRC细胞DNA复制的影响

EdU增殖检测评估CRC细胞DNA复制活跃的细胞数量，标尺为125 μm。

3.体内实验研究胆固醇摄入对CRC细胞放疗敏感性的影响。

我们前两个结果显示，在体外胆固醇摄入会导致CRC细胞的放疗敏感性降低。为验证胆固醇在体内对CRC细胞放疗敏感性的影响，我们进行了裸鼠皮下成瘤实验。实验结果显示，给予胆固醇灌胃的小鼠，瘤子的重量明显大于单纯照射组，同时瘤子的照片也显示出胆固醇灌胃组小鼠有着更大的瘤体（图1-3 A-B）。随后我们对瘤组织进行了免疫组织化学实验，分析Ki-67和p27的表达情况。结果显示，照射小鼠在给予胆固醇灌胃后，瘤组织中Ki-67的表达明显增高，而p27的表达明显降低（图1-3 C）。

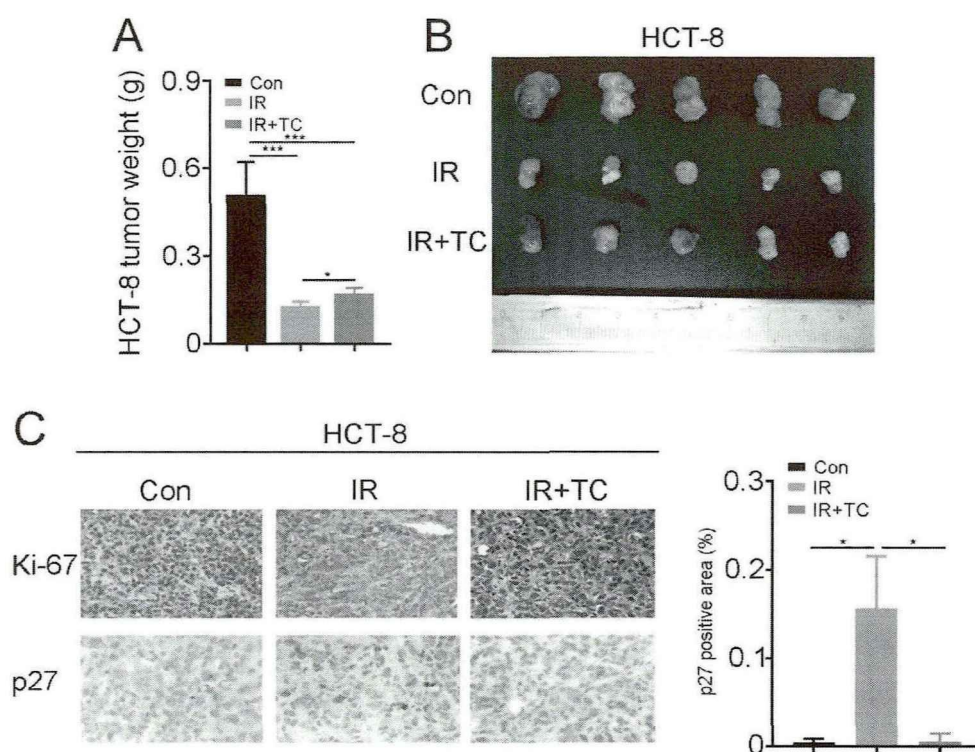


图 1-3 体内实验研究胆固醇摄入对CRC细胞放疗敏感性的影响

(A) 12Gy γ 射线照射后，裸鼠的HCT-8瘤子重量。(B) 12Gy γ 射线照射后，裸鼠的HCT-8瘤子照片。(C) 免疫组织化学实验评估HCT-8瘤子中Ki-67和p27的表达量。IPP软件分析p27阳性区域。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值 \pm 标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ 。

小 结

- 1.胆固醇摄入会促进受照的 CRC 细胞 DNA 复制、增殖和存活能力增加。
- 2.胆固醇摄入会导致裸鼠 HCT-8 细胞的放疗敏感性降低。

讨 论

肥胖、不良饮食和过量饮酒是CRC的危险因素[20-22]。迄今为止，已经有许多研究证明肥胖、不良饮食和过量饮酒等因素与人体内脂代谢的异常有一定关联[23]。胆固醇维持和营养细胞膜，并有利于细胞膜的稳定；此外，胆固醇是多种物质的前体，这些物质对人体内稳态的调节至关重要[24]。另一方面，胆固醇与如糖尿病、冠心病、认知功能下降、不孕症等有关[25-28]；另外也会导致多种癌症的发生发展[29]；甚至还会导致许多疾病的治疗失败如糖尿病的胰岛素抵抗、乳腺癌的内分泌治疗抵抗、卵巢癌的化疗抵抗等[15, 30, 31]。然而迄今为止尚未有文章报道胆固醇对CRC放疗敏感性的影响。

在这一部分研究中，我们发现在体外实验中，胆固醇的摄入会促进CRC细胞在放疗后的存活与增殖，同时会促进CRC细胞在放疗后DNA复制更加活跃。这与先前研究发现胆固醇会促进正常结直肠癌细胞的DNA复制及细胞增殖相一致[12]。众所周知的是，放疗抵抗的表现之一是细胞的DNA复制更加活跃，细胞的增殖能力和生存能力更强。因此，我们的研究显示出在体外实验中，外源性的胆固醇使结直肠癌细胞的放疗敏感性下降。而在体内实验中，我们发现在放疗后胆固醇摄入的小鼠有比单纯照射组小鼠更大的瘤体、更高的瘤重。在我们这一部分研究中，由于小鼠灌胃胆固醇时间较短，小鼠瘤体积及瘤重没有大幅度上升，但是肿瘤增殖标志物水平差异明显。而已经有研究证明小鼠需胆固醇进行后4周循环胆固醇水平显著上升，因此在这部分研究中瘤重和瘤体没有大幅度上升很可能由于单纯灌胃胆固醇对于小鼠循环胆固醇含量影响较小。

总之，我们发现外源性胆固醇促进CRC细胞获得性放疗抵抗。所有的证据都支持胆固醇降低放疗的疗效，并成为CRC患者放疗的潜在隐患。也就是说，CRC患者在放疗期间应避免摄入过多的胆固醇。

第二部分 放疗对 CRC 细胞中胆固醇含量影响的研究

迄今为止,在临床上许多癌症的放疗失败大部分由于放疗的副反应过大或者放疗反应差,而放疗的低反应会使患者需更高的放疗剂量,从而大大增加了放疗副反应的风险。因此,癌症患者对放疗的低反应对临床上放疗中断有很大的影响。

放疗抵抗分为先天性的放疗抵抗和获得性的放疗抵抗[18]。在第一部分中,我们发现外源性胆固醇的摄入会导致CRC细胞获得性的放疗抵抗。研究显示部分CRC细胞的基因谱会导致其先天性的放疗抵抗[5]。固醇反应元件结合蛋白(SREBPs)家族是公认的控制胆固醇的合成和摄入基因[16],而SREBPs家族的失调在多种癌症中观察到并被证明与癌症的发生发展相关[17]。为明确胆固醇与CRC先天性放疗抵抗的关系,在本部分研究中将会评估CRC细胞放疗后细胞内胆固醇含量的变化以及调控胆固醇合成相关基因的表达变化。

材料与方法

一、材料

试剂与仪器

试剂/仪器	品牌/厂家
组织细胞总胆固醇(TC)酶法测定试剂盒	北京普利莱基因技术有限公司
组织细胞甘油三酯(TG)酶法测定试剂盒	北京普利莱基因技术有限公司
引物	GENEWIZ公司
TRIzol (总RNA提取试剂)	北京普利莱基因技术有限公司
氯仿	天津江天化技术有限公司
反转录试剂盒	宝日医生物技术有限公司
PCR扩增仪	Bio Rad公司
荧光定量聚合酶链反应监测仪	Bio Rad公司
恒温金属浴	日本亚斯旺株式会社
SYBR Green Master (Rox)	Roche 公司
小鼠来源GAPDH单克隆抗体	Proteintech公司
小鼠来源SREBP1单克隆抗体	Abcam公司
小鼠来源FASN单克隆抗体	Santa Cruz公司

试剂/仪器	品牌/厂家
SDS-PAGE凝胶制备试剂盒	北京索莱宝公司
RIPA裂解液	碧云天
5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液	北京索莱宝公司
10×电泳转移缓冲液	北京索莱宝公司
10×TBST缓冲液	北京索莱宝公司
5×蛋白上样缓冲液(含DTT)	北京索莱宝公司
蛋白Marker	赛默飞公司
电泳仪	Bio Rad公司
电泳槽	Bio Rad公司
转膜仪	Bio Rad公司
凝胶成像系统	Bio Rad公司
PVDF膜(0.45um)	Millipore公司
ECL化学发光底物(特超敏)	Biosharp公司

二、实验方法

1. 细胞内总胆固醇或甘油三酯测定

- 1) 用胰酶消化后吹打形成单细胞悬液，均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。
- 2) 在细胞汇聚到50%-70%给予细胞6Gy射线照射，随后更换为新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。
- 3) 在24h后用胰酶消化细胞，随时观察细胞状态。
- 4) 细胞趋近于变圆时用相对应的培养基中和，然后1000rpm离心5min后弃去培养基，收集到1.5mL离心管中并用PBS清洗两次。
- 5) PBS最后一遍重悬后，一部分用于细胞计数，剩余一部分离心收集后弃去PBS，然后加入组织细胞总胆固醇(TC)/甘油三酯(TG)酶法测定试剂盒中的细胞裂解液。
- 6) 冰上超声裂解细胞，后静置10min。
- 7) 吸取上清到新的1.5mL离心管，70℃加热10分钟。
- 8) 离心，然后取上清。
- 9) 根据每组间细胞数量的比例，计算出相对的胆固醇或甘油三酯含量。

2. 实时定量PCR实验

- 1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。
- 2) 在细胞汇聚到50%-70%更换新鲜培养基，随后给予细胞6Gy γ 射线照射，然后放入细胞培养箱中继续培养。
- 3) 在照射0h、0.5h、2h、4h、6h、24h时细胞用遇冷PBS清洗两次，然后弃去PBS。
- 4) 往6孔板中加入200ul的Trizol(总RNA提取试剂),4 $^{\circ}$ C裂解15min。
- 5) 反复吹打至细胞充分裂解，裂解后将裂解液收集到1.5ml离心管中。
- 6) 加入100ul (-20 $^{\circ}$ C预冷)的氯仿，剧烈振荡30s，然后室温静置15min。
- 7) 4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心15min，收集上层清液至新的1.5ml离心管中。
- 8) 异丙醇沉淀。
- 9) 4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心15min，弃去上层清液。
- 10) 加入700ul的75%乙醇，然后轻轻弹起RNA。
- 11) 4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心15min，弃去上层清液，然后待离心管中的酒精完全挥发。
- 12) 加入20ul无菌无酶水溶解RNA，RNA于-80 $^{\circ}$ C保存。
- 13) 反转RNA成cDNA,反转程序如下：37 $^{\circ}$ C 30s，85 $^{\circ}$ C 5s。cDNA于-20 $^{\circ}$ C保存；反转体系（试剂于反转试剂盒中）如下：PrimeScript Buffer 2ul，PrimeScript RT Enzyme 0.5ul，Oligo dT Primer 0.5ul，Random 6 mers 0.5ul，RNA 6.5ul。
- 14) 获得的cDNA用于实时定量PCR实验检测基因表达。程序如下：50 $^{\circ}$ C 2min，95 $^{\circ}$ C 10min，95 $^{\circ}$ C 15s，60 $^{\circ}$ C 1min（于此步骤读取荧光），至第三步重复40个循环；反转体系如下：10ul SYBR,上游引物0.5ul，下游引物0.5ul，双蒸水7.5ul，cDNA 1.5ul。
- 15) 引物序列如下：

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	forward	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	reverse	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
<i>AMPK</i>	forward	TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT
	reverse	GGTGAGCCACAACCTTGTCTT
<i>SREBP2</i>	forward	TGGCTCATCTTTGACCTTTGC
	reverse	GCGCCAGGAGAACATGGT

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>HMGCR</i>	forward	GGACCCCTTTGCTTAGAT
	reverse	CCACCAAGACCTATTGCT
<i>SREBP1</i>	forward	ACAGTGACTTCCCTGGCCTAT
	reverse	GCATGGACGGGTACATCTTCAA
<i>FASN</i>	forward	GGACCTGTCTAGGTTTGATGC
	reverse	TGGCTTCATAGGTGACTTCCA

3. 蛋白免疫印迹实验

- 1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。
- 2) 在细胞汇聚到50%-70%更换新鲜培养基，随后给予细胞6Gy射线照射，然后放入细胞培养箱中继续培养。
- 3) 在照射0h、0.5h、2h、4h、6h、24h时细胞用遇冷PBS清洗两次，然后弃去PBS。
- 4) 配置裂解液为RIPA细胞组织裂解液：PMSF蛋白酶抑制剂（100：1）。往六孔板中加入裂解液，冰上裂解细胞提取蛋白。
- 5) 在冰上裂解20分钟后，收集裂解液至1.5ml离心管中。
- 6) 4℃下12000rpm离心20min，收集上清液。
- 7) 按上清液：5×蛋白上样缓冲液为4：1配置蛋白样品。
- 8) 将配置好的蛋白样品在100℃下煮沸15min使蛋白变性，蛋白样品保存至-80℃。
- 9) 配置分离胶和浓缩胶，分离胶的选择为：FASN蛋白为8%浓度，SREBP1、GAPDH为10%浓度。
- 10) 上样时根据目的蛋白分子量选择相应的蛋白marker，注意上样时若无marker的一侧同样上一个样以使获得的目的条带整齐处于同一水平上。
- 11) 电泳时间：浓缩胶为80V(30min),分离胶为120V（90min）。电泳过程中动态观察电泳状况。
- 12) 在电泳结束后，根据marker收集目的蛋白分子量所在分离胶，然后放于湿转电泳夹上，随后裁取相应大小的PVDF膜（甲醇激活10s）后覆盖于分离胶上。注意观察胶与膜之间是否有气泡，必须在无气泡后合上湿转夹。从黑色那面起为海绵—三层

滤纸—PVDF膜凝胶—三层滤纸—海绵。转膜夹黑面对应槽的黑面，夹的白面对应槽的红面。

13) 转膜过程需在冰上进行，确保转膜中转膜液温度不过高。湿转时间为200毫安90min。动态观察确保转膜过程顺利进行。

14) 转膜完成后取出PVDF膜，然后用5%BSA在37℃下摇床上封闭1h。

15) PVDF膜在4℃下用配置好的一抗在摇床上孵育过夜。

16) 用1×TBST洗膜3次，每次15min。

17) PVDF膜在37℃下用配置好的一抗在摇床上孵育1h。

18) 用1×TBST洗膜3次，每次15min。

19) 用配置好的显影液A:B为1:1在成像系统下显影。

4. CCLE及KM-plotter数据库分析

1) 从CCLE数据库中搜索关键词为SREBF1、SREBF2、FASN、HMGCR在各个细胞系中的基础表达量。下载后筛出HCT-8、HT-29中基因的表达量，用Prism软件做成热图。

2) 从KM-plotter中搜索关键词为SREBF1及Rectum adenocarcinoma的生存曲线图，观察SREBF1的表达对直肠癌中病人生存的影响。

实验结果

1. 放疗对CRC细胞内胆固醇的合成影响

在第一部分中，我们发现外源性的胆固醇摄入会导致CRC细胞的获得性的放疗抵抗。为了研究胆固醇是否与CRC先天性的放疗抵抗的关系，我们通过试剂盒评估了照射后CRC细胞中的总胆固醇水平。实验结果显示，照射后24h胆固醇的含量明显上升（图2-1）。

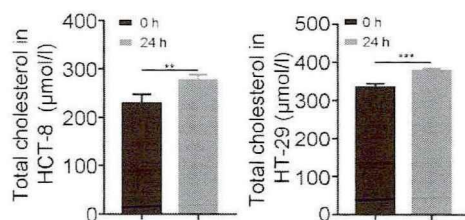


图 2-1 放疗对CRC细胞内胆固醇的合成的影响

总胆固醇检测试剂盒评估照射后24h在HCT-8和HT-29中的总胆固醇含量。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值±标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义 ** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.放疗对 HCT-8CRC 细胞内胆固醇合成相关基因表达的影响

我们证明照射后胆固醇的含量在CRC细胞中升高。基于此，我们从转录水平检测了与胆固醇合成相关的基因的表达情况。实验结果显示在HCT-8中，照射后AMPK(SREBPs家族的负调节因子，抑制胆固醇合成)快速下降(图2-2 A),与上述结果相统一。因此，我们检测了SREBPs家族的表达情况。结果显示SREBP1及其下游基因FASN在照射后6h内有一个快速响应的过程且表现出上升的趋势，相反的是，SREBP2及其下游基因HMGCR则快速下降(图2-2 B-D)。为了明确SREBP1及其下游基因FASN的反应，我们在照射后24h检测了它们的表达情况。结果显示SREBP1及其下游基因FASN在照射后24h保持了升高的情况(图2-2 F-G)。随后我们通过蛋白免疫印迹实验检测验证分别验证了SREBP1及FASN在6h内蛋白水平的变化(图2-2 H)和SREBP1在24h蛋白水平的变化(图2-2 I)。

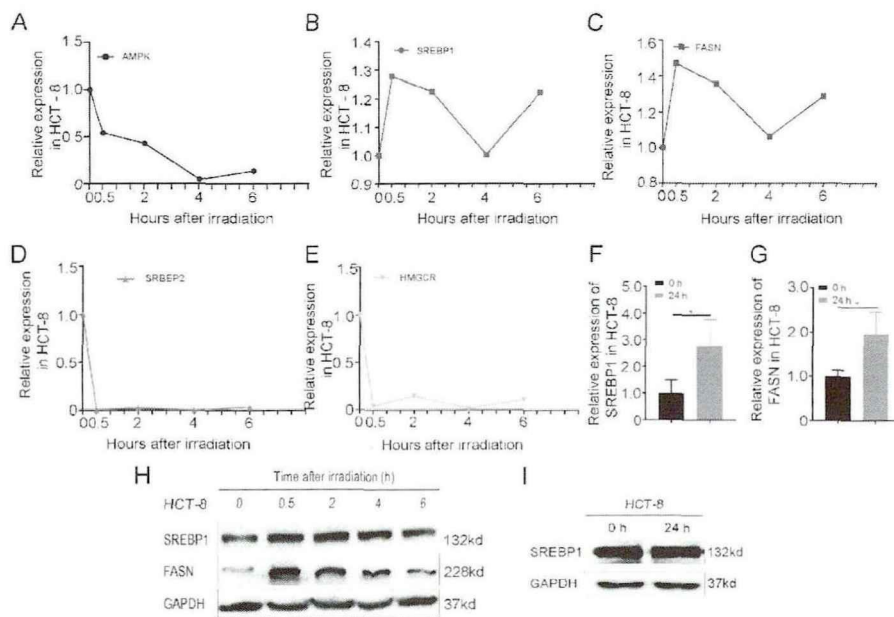


图 2-2 放疗对HCT-8CRC细胞内胆固醇合成相关基因表达的影响

(A-E) 6Gy γ 射线照射后，通过实时定量PCR检测HCT-8细胞中AMPK、SREBP1、FASN、SREBP2、HMGCR在0、0.5、2、4、6h的表达情况。(F-G) 6Gy γ 射线照射

后, 通过实时定量PCR检测HCT-8细胞中SREBP1及FASN在24h的表达情况。(H) 6Gy γ 射线照射后, 通过蛋白免疫印迹实验检测HCT-8细胞中SREBP1及FASN在0、0.5、2、4、6h的表达情况。(I) 6Gy γ 射线照射后, 通过蛋白免疫印迹实验检测HCT-8细胞中SREBP1在24h的表达情况。实验统计学方法为学生t检验, 数据显示为平均值 \pm 标准差, $P < 0.05$ 为有统计学意义。* $P < 0.05$ 。

3.放疗对 HT-29CRC 细胞内胆固醇合成相关基因表达的影响

我们在HCT-8中检测了胆固醇合成相关基因的表达, 为明确HCT-8中的检测结果, 我们在HT-29中检测了AMPK、SREBP1和FASN的表达情况。实验结果显示在HT-29中, 照射后AMPK快速下降(图2-3 A)而SREBP1及其下游基因FASN在照射后6h内有一个快速响应的过程且表现出上升的趋势(图2-3 B-C)。并SREBP1及其下游基因FASN在照射后24h保持了升高的情况(图2-3 D-F)。

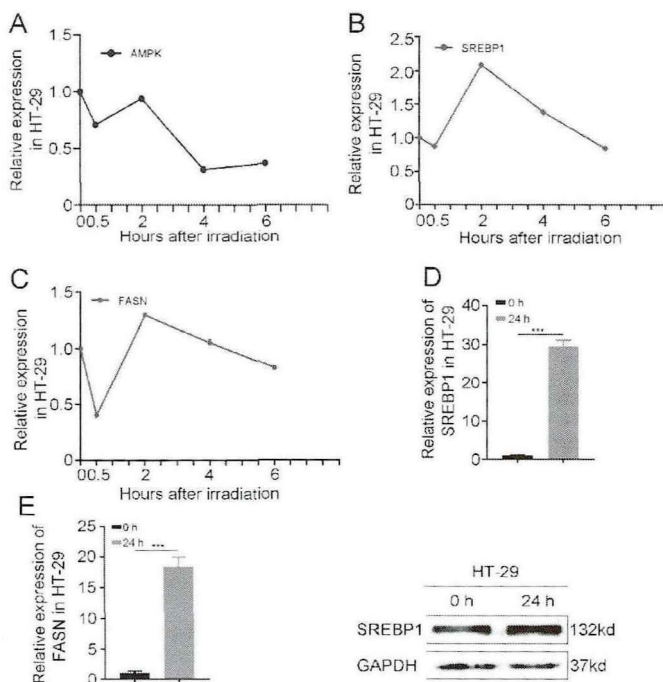


图 2-3 放疗对HT-29CRC细胞内胆固醇合成相关基因表达的影响

(A-B) 6Gy γ 射线照射后, 通过实时定量PCR检测HT-29细胞中AMPK、SREBP1、FASN在0、0.5、2、4、6h的表达情况。(D-E) 6Gy γ 射线照射后, 通过实时定量PCR检测HT-29细胞中SREBP1及FASN在24h的表达情况。(F) 6Gy γ 射线照射后, 通过蛋白免疫印迹实验检测HT-29细胞中SREBP1在24h的表达情况。实验统计学方法为学生

t检验，数据显示为平均值±标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。*** $P < 0.001$ 。

4. 放疗对 CRC 细胞中甘油三酯的影响。

由于SREBP1及其下游基因FASN主要控制脂肪酸的合成，因此我们在照射后24h检测了HCT-8和HT-29中甘油三酯的含量。结果显示，照射后24h甘油三酯的含量明显下降（图2-4）。结果提示在照射后甘油三酯合成并没有被激活。

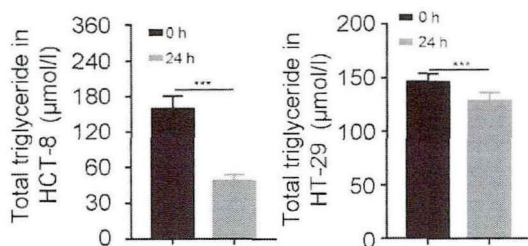


图 2-4 放疗对CRC细胞内甘油三酯的合成的影响

甘油三酯检测试剂盒评估照射后24h在HCT-8和HT-29中的甘油三酯含量。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值±标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。*** $P < 0.001$ 。

5. CCLE 中正常 CRC 细胞中 SREBP1、SREBP2、FASN、HMGCR 的表达情况及 SREBP1 的表达与直肠癌病人生存期的关系。

上述结果发现在照射情况下SREBP1和FASN的表达和胆固醇的合成正相关。由于胆固醇的合成主要由SREBP2和其下游基因HMGCR调控，因此我们通过CCLE数据库查询正常CRC细胞中SREBP1、SREBP2、FASN、HMGCR的表达情况。实验结果显示虽然SREBP2/HMGCR和SREBP1在HCT-8和HT-29中高表达，但FASN在两株细胞系中明显低表达，暗示SREBP1/FASN信号正常的CRC细胞中处于非激活状态（图2-5 A）。临床上，CRC病人中接受放疗的病人以直肠癌病人为主，因此我们通过KM-plotter分析了SREBP1的表达与临床上直肠癌病人总体生存的关系。分析结果显示，SREBP1高表达的直肠癌病人总体生存期更短（图2-5 B）。

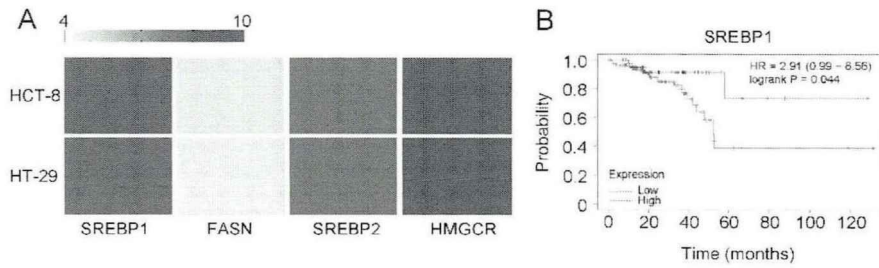


图 2-5 CCLE中CRC细胞中SREBP1、SREBP2、FASN、HMGCR的表达情况及SREBP1的表达与直肠癌病人生存期的关系。

(A) 通过 CCLE (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) 分析 SREBP1/FASN 和 SREBP2/HMGCR在HCT-8和HT-29细胞系中的基础表达情况。颜色深度表示表达的程度。(B) 直肠癌患者总生存期的Kaplan-Meier分析(<http://kmplot.com/analysis/>)。

小 结

1.放疗后 CRC 细胞中胆固醇合成增加。

2.SREBP1/FASN 信号在照射后激活，并与胆固醇合成也增加。

讨 论

最近的一项研究报道，低剂量空间辐射可能会诱发癌变，而在肺中，这种低剂量辐射会导致胆固醇合成增加[32]。与此同时，我们的研究结果显示，照射24小时后，CRC细胞HCT-8和HT-29的内源性胆固醇升高。我们在第一部分证明外源性胆固醇的摄入会导致CRC细胞的获得性放疗抵抗。上述结果暗示照射后早期内源性胆固醇积累可能是CRC细胞的先天性放疗抵抗的原因。

研究显示，基因在6h内快速应答的很有可能是调控该通路的关键相应基因[33]。传统观点认为，SREBP2/HMGCR信号是胆固醇合成的主要调节因子，而SREBP1/FASN信号在各种癌症中调节脂肪酸合成[16]。最近，越来越多的研究报道SREBP1/FASN信号在特定条件下也参与胆固醇的合成[34, 35]。因此，我们在本研究中评估了SREBP2/HMGCR和SREBP1/FASN信号通路在结肠细胞HCT-8和HT-29中的表达。有趣的是，在照射刺激后6小时内，CRC细胞中SREBP1/FASN信号被激活，而不是SREBP2/HMGCR信号，这表明SREBP1/FASN通路对照射具有快速、直接的应答作用。由于结果显示SREBP1/FASN在照射激活后6h内的短时间内未一直上升，因

此为了进一步明确SREBP1/FASN在照射后的长时间表达情况，我们在24h检测SREBP1/FASN的表达情况。我们发现SREBP1/FASN在24h后依旧保持高表达。CCLE分析显示在未受刺激时SREBP1和SREBP2在HCT-8和HT-29细胞系中均有高基础表达；但它们的下游基因FASN和HMGCR表现出不同的基础表达水平。SREBPs家族作为转录因子，在激活后以核定位依赖的方式发挥其功能[36]，这部分表现在其下游基因在转录水平上的上调。因此，CCLE的结果提示SREBP1可能位于HCT-8和HT-29细胞株的细胞质中，导致SREBP1/FASN信号通路正常CRC细胞中未激活。

综上所述，我们发现放疗会促进CRC细胞内源性胆固醇合成增多，这可能与部分CRC先天性放疗抵抗有关。同时SREBP1/FASN信号会在放疗后被激活，并与胆固醇的合成增加有关。

第三部分 SREBP1 对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究

在第二部分研究中我们发现SREBP1对放疗会快速响应并其表达与CRC细胞内胆固醇的水平成正相关。为了明确在照射情况下SREBP1与胆固醇合成的关系，以及它们与CRC先天性放疗抵抗的关系。因此，我们通过沉默SREBP1来探究SREBP1是否通过影响胆固醇的合成来影响CRC细胞的先天性放疗抵抗。

材料与方法

一、材料

试剂与仪器

试剂/仪器	品牌/厂家
RFect siRNA/miRNA 转染试剂	常州百代生物科技股份有限公司
小干扰RNA	广州锐博生物技术有限公司
小鼠来源 β -actin单克隆抗体	Proteintech公司
流式细胞仪	BD公司
Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒	BD公司

二、实验方法

注：以下实验都选用CRC细胞HCT-8进行实验

1. 细胞转染

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到30%-50%准备转染，小干扰RNA序列：5'-AAGACAGCAGAUUUAUUCAGCUUUG-3'。

3) 首先在一个1.5ml离心管中加入250ul的无血清无双抗的1640培养基和10ul的转染试剂，混匀后室温孵育5min；同时在另一个1.5ml离心管中加入250ul的无血清无双抗的1640培养基和6.5ul的小干扰RNA，混匀后室温孵育5min。随后将含有转染试剂的培养基全部加入到含有小干扰RNA的培养基中，轻轻混匀后室温孵育20min。

4) 将6孔板中的培养基弃去更换新鲜的含有血清的无双抗的1640培养基2.5ml，

随后将上述混匀后的培养基按每孔500ul加入到6孔板中。

5) 15-24h后通过实时定量PCR和蛋白免疫印迹实验检测转染效率。

2. 细胞内总胆固醇测定

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到30%-50%时进行转染实验。

3) 15-24h后给予细胞6Gyy射线照射，随后更换为新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。

4) 24h后按照第二部分研究方法检测细胞内总胆固醇含量。

3. CCK-8增殖检测实验和克隆形成实验

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到30%-50%时进行转染实验。

3) 15-24h后给予细胞6Gyy射线照射，随后更换为新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。

4) 24h后按照第一部分研究方法进行CCK-8实验和克隆形成实验检测沉默SREBP1后对CRC细胞放疗敏感性影响的研究。

4. 流式细胞术实验

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到30%-50%时进行转染实验。

3) 15-24h后给予细胞6Gyy射线照射，随后更换为新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。

4) 在24h后用无EDTA的胰酶消化细胞，随时观察细胞状态。

5) 细胞趋近于变圆时用相对应的培养基中和，然后2000g离心5min后弃去培养基，收集到1.5mL离心管中并用预冷PBS清洗两次。

6) 用300ul的Binding buffer重悬细胞。

7) 加入5ul的AnnexinV-FITC后混匀，室温避光孵育15min。

8) 在上机前5min加入5ul的PI，同时在上机前加入200ul的Binding buffer。

9) 注意在实验过程中设置空白对照和AnnexinV-FITC及PI单染组。

5. Caspase-6表达检测

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到30%-50%时进行转染实验。

3) 15-24h后给予细胞6Gy射线照射，随后更换为新鲜培养基然后在细胞培养箱中继续培养。

4) 24h后通过蛋白免疫印迹实验检测Caspase-6的表达情况。

实验结果

1.SREBP1 对 CRC 细胞放疗后胆固醇合成的影响。

我们检测了沉默SREBP1的CRC细胞在放疗后细胞内的胆固醇水平。实验结果显示，转染小干扰RNA后SREBP1及其下游FASN的表达明显下降（图3-1 A-C）。随后我们通过试剂盒检测细胞内总胆固醇含量，发现沉默SREBP1抑制了CRC细胞照射后胆固醇的合成（图3-1 D）。

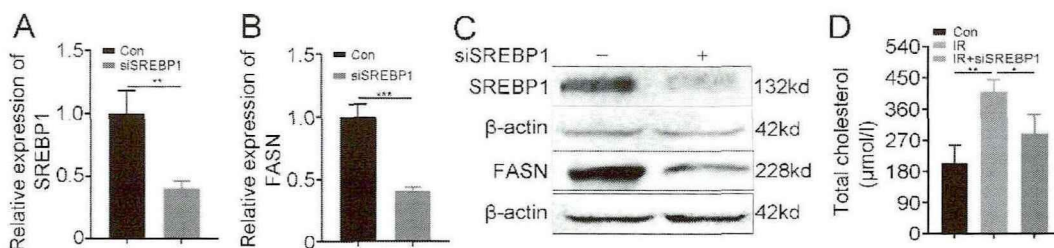


图 3-1 SREBP1对CRC细胞放疗后胆固醇合成的影响

(A-B) 用实时定量PCR实验检测转染靶向SREBP1的5nM小干扰RNA后SREBP1和FASN的表达情况。(C) 用蛋白免疫印迹实验检测转染靶向SREBP1的5nM小干扰RNA后SREBP1和FASN的表达情况。(D) 沉默SREBP1的CRC细胞在照射后24h细胞内的总胆固醇水平。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值±标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.SREBP1 对 CRC 细胞放疗后增殖的影响。

我们通过CCK-8和克隆形成实验评估照射后CRC细胞的增殖能力。实验结果显示，

沉默SREBP1使CRC细胞在照射后的增殖能力明显降低（图3-2 A-B）。

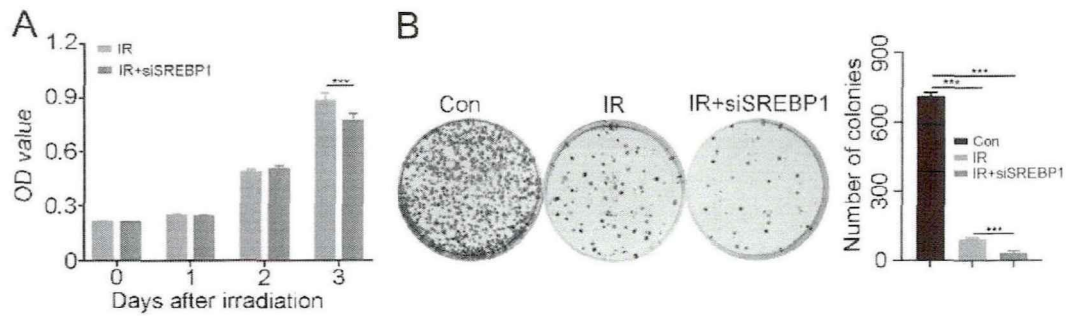


图 3-2 SREBP1对CRC细胞放疗后增殖的影响

(A-B) 通过CCK-8 (A)和克隆形成(B)实验，评估在有或没有siSREBP1干扰的情况下照射后的HCT-8细胞的增殖能力。实验统计学方法为学生t检验，数据显示为平均值±标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。*** $P < 0.001$ 。

3.SREBP1 对 CRC 细胞放疗后凋亡的影响。

我们进行流式细胞术检测凋亡细胞和蛋白免疫印迹实验检测凋亡执行蛋白Caspase-6。实验结果显示，实验结果显示，沉默SREBP1使CRC细胞在照射后凋亡的细胞明显增多（图3-3 A）。同时，沉默SREBP1使CRC细胞中Caspase-6的表达在照射后明显升高（图3-3 B）。总之，沉默SREBP1会促进CRC细胞放疗后的凋亡。

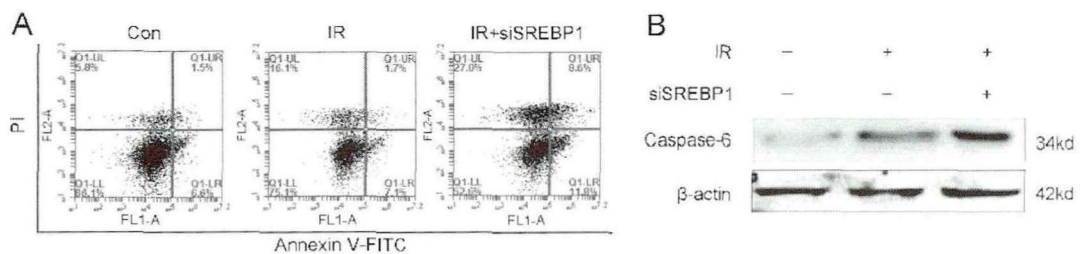


图 3-3 SREBP1对CRC细胞放疗后凋亡的影响

(A)流式细胞术评估在有或无siSREBP1干扰的情况下照射后的HCT-8细胞凋亡的数量。(B)蛋白免疫印迹实验检测在有或无siSREBP1干扰的情况下照射后的HCT-8细胞中凋亡执行蛋白Caspase-6表达量。

小 结

- 1.沉默 SREBP1 抑制放疗后 CRC 细胞胆固醇合成。
- 2.沉默 SREBP1 提高了 CRC 细胞的放疗敏感性。

讨 论

详细内容见第四部分。

第四部分 FASN 对 CRC 细胞放疗敏感性影响的研究

在第三部分研究中，我们证明了SREBP1/胆固醇促进了CRC细胞的先天性放疗抵抗。为了明确SREBP1是如何影响胆固醇的合成从而影响CRC细胞的先天性放疗抵抗，在本部分我们将探寻FASN对放疗后胆固醇合成导致的CRC细胞先天性放疗抵抗影响。

材料与amp;方法

一、材料

试剂与amp;仪器

试剂/amp;仪器	品牌/amp;厂家
TVB-2640	上海兴默amp;技术有限公司
组织细胞破碎仪	Gering 公司
超微量分光光度计	IMPLEN公司

二、实验方法

注：以下实验都选用CRC细胞HCT-8进行实验

1. CCK-8增殖检测实验

- 1) 用胰酶消化计数后在96孔板中每个孔接种3000个细胞，后在细胞培养箱中过夜。
- 2) 给予CRC细胞浓度为3.75ug/ml、7.5ug/ml TVB-2640的量。
- 3) 随后按照第一部分研究方法，在第0h、24h、48h、72h检测细胞数量，观察TVB-2640是否对CRC细胞有细胞杀伤毒性。
- 4) 随后重新按照第一步接种于96孔板，然后在细胞培养箱中过夜。
- 5) 24h后给予细胞6Gyy射线照射，同时更换新鲜培养基并给予细胞7.5ug/ml的TVB-2640，然后在细胞培养箱中继续培养。
- 6) 在给予TVB-2640后第0h、24h、48h、72h检测细胞数量，观察TVB-2640对受照细胞增殖的影响。

2. 克隆形成实验

- 1) 用胰酶消化计数后在6孔板中每个孔接种1000个细胞，后在细胞培养箱中过

夜。

2) 第二天给予细胞6Gy射线照射。随后更换新鲜培养基，处理组同时给予7.5ug/ml的TVB-2640。

3) 6孔板放于细胞培养箱中培养14天，每三天更换一半培养基为新鲜的培养基同时给予相应的TVB-2640。每次更换培养基前观察细胞状态。

4) 随后按照第一部分的研究方法进行克隆形成实验。

3. 流式细胞术实验

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到50%-70%时给予细胞6Gy射线照射，同时更换新鲜培养基并给于细胞7.5ug/ml的TVB-2640，然后在细胞培养箱中继续培养。

3) 24h后按照第三部分的研究方法进行流式细胞术实验。

4. Caspase-6表达检测

1) 用胰酶消化吹成单细胞悬液后均匀地接种于6孔板中，后在细胞培养箱中过夜。

2) 在细胞汇聚到50%-70%时给予细胞6Gy射线照射，同时更换新鲜培养基并给于细胞7.5ug/ml的TVB-2640，然后在细胞培养箱中继续培养。

3) 24h后按照第三部分的研究方法检测Caspase-6表达。

5. 裸鼠成瘤实验

1) HCT-8细胞处于指数增长期时用于动物实验。每只小鼠给予含有 4×10^6 个细胞100ul生理盐水悬液皮下注射到小鼠的腋窝。

2) 待瘤体到 100mm^3 ，将小鼠随机分组。然后次日开始给予每只小鼠局部3Gy射线照射，一天一次，累计剂量为12Gy。

3) 每次照射前处理组通过灌胃给予含有7.5ug的TVB-2640的生理盐水悬浊液200ul/只小鼠。

4) 每天称量小鼠体重，观察小鼠健康状态，待小鼠瘤体积达到一定大小时，给予小鼠安乐死。

6. 免疫组织化学实验

按照第一部分的研究方法进行免疫组织化学实验。

7. 组织内总胆固醇测定

- 1) 取出在冻存前已经称重完的瘤组织，按照每1mg组织加入10ul裂解液。
- 2) 用组织细胞破碎仪研磨组织。而后静置10分钟。
- 3) 将上清液收集到两个1.5ml离心管中，其中一个用超微量分光光度计测量蛋白浓度。
- 4) 另一个管的上清液根据第二部分研究方法检测总胆固醇浓度。
- 5) 最后通过蛋白浓度比例计算出相对的总胆固醇浓度。

实验结果

1. TVB-2640 对 CRC 细胞毒性的研究。

在本部分研究中，我们使用了FASN抑制剂TVB-2640来研究FASN对CRC细胞先天性放疗抵抗影响。首先通过CCK-8实验观察TVB-2640对CRC细胞的毒性。实验结果显示TVB-2640对未受其他刺激的CRC细胞增殖没有影响（图4-1）。

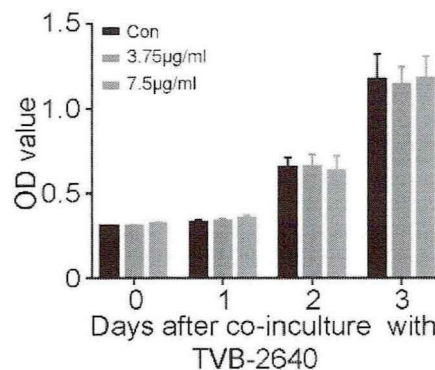


图 4-1 TVB-2640对CRC细胞毒性的研究

CCK-8实验评估TVB-2640对HCT-8细胞活性的影响。

2. TVB-2640 对 CRC 细胞放疗后增殖的影响。

为了探寻FASN对放疗后CRC细胞胆固醇合成导致的CRC细胞先天性放疗抵抗影响。我们通过CCK-8和克隆形成实验评估照射后CRC细胞的增殖存活能力。实验结果显示，TVB-2640使CRC细胞在照射后的增殖存活能力明显降低（图4-2 A-B）。

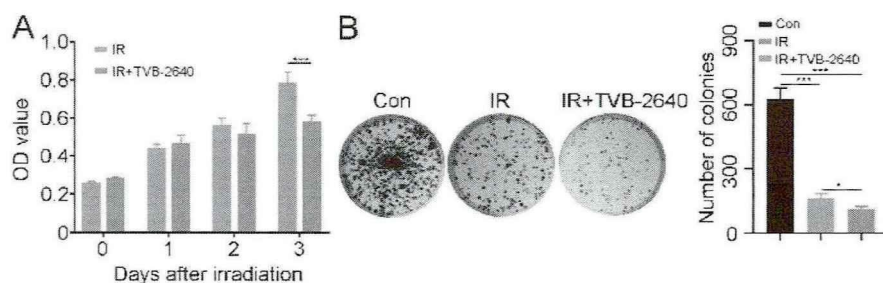


图 4-2 TVB-2640对CRC细胞放疗后增殖的影响

(A-B) 通过CCK-8(A)和克隆形成(B)实验, 评估TVB-2640对照射后的HCT-8细胞的增殖存活能力的影响。实验统计学方法为学生t检验, 数据显示为平均值±标准差, $P < 0.05$ 为有统计学意义。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

3. TVB-2640 对 CRC 细胞放疗后凋亡的影响。

我们已经证明了TVB-2640抑制CRC细胞放疗后增殖。为了明确TVB-2640对CRC细胞放疗敏感性的影响, 我们进行流式细胞术检测凋亡细胞和蛋白免疫印迹实验检测凋亡执行蛋白Caspase-6。实验结果显示, 实验结果显示, TVB-2640使CRC细胞在照射后凋亡的细胞明显增多(图4-3 A)。同时, TVB-2640使CRC细胞在照射后凋亡的Caspase-6明显升高(图4-3 B)。总之, TVB-2640会促进CRC放疗后的细胞凋亡。

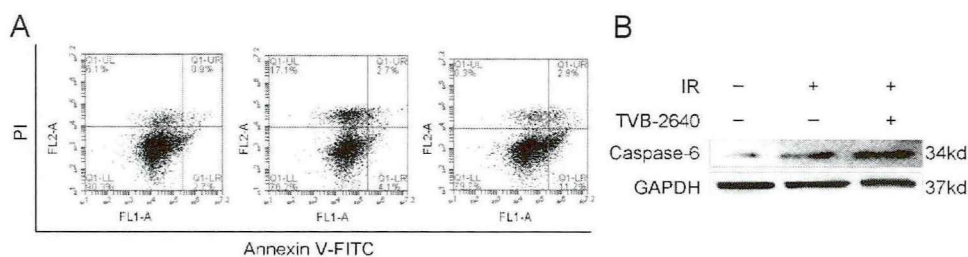


图 4-3 TVB-2640对CRC细胞放疗后凋亡的影响

(A)流式细胞术评估TVB-2640对照射后的HCT-8细胞凋亡数量的影响。(B)蛋白免疫印迹实验检测TVB-2640对照射后的HCT-8细胞中凋亡执行蛋白Caspase-6表达的影响。实验统计学方法为学生t检验, 数据显示为平均值±标准差, $P < 0.05$ 为有统计学意义。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

4. 体内实验研究 TVB-2640 对 CRC 细胞放疗敏感性的影响。

我们前两个结果显示, 在体外TVB-2640会提高CRC的放疗敏感性。为了验证

TVB-2640在体内对CRC放疗敏感性的影响，我们进行了裸鼠皮下成瘤实验。实验结果显示给予TVB-2640的小鼠照射导致体重的下降明显改善（图4-4 A）、瘤子的体积比单纯照射组更小（图4-4 B-C）、瘤子的重量明显小于单纯照射组（图4-4 D）。随后我们对瘤组织进行了免疫组织化学实验，分析Ki-67、p27和Caspase-6的表达情况。结果显示，照射小鼠在给予TVB-2640后，瘤组织中Ki-67的表达明显降低，而p27和Caspase-6的表达明显增高（图4-4 E）。最后，为了明确TVB-2640对放疗后胆固醇合成的影响，我们检测了瘤组织内的胆固醇含量。结果显示TVB-2640抑制了放疗后胆固醇合成（图4-4 F）。

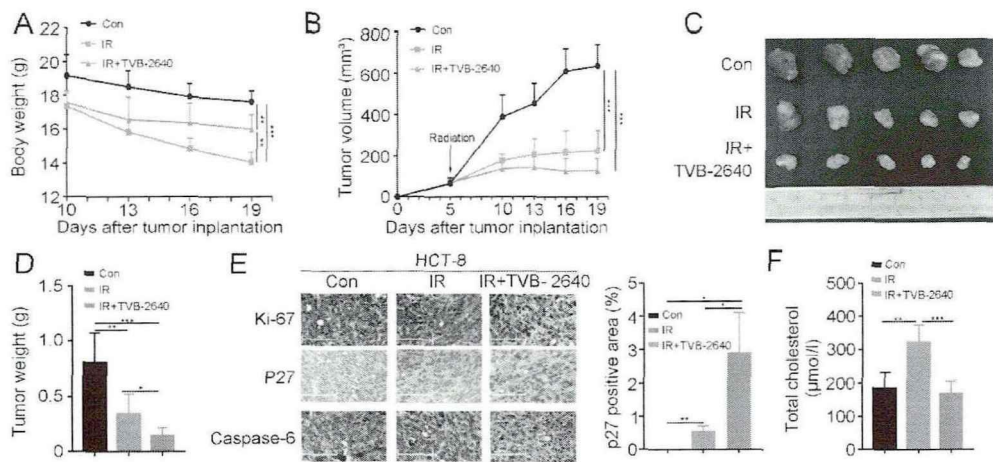


图 4-4 体内实验研究TVB-2640对CRC细胞放疗敏感性的影响

(A) 裸鼠体重。(B-D)裸鼠HCT-8肿瘤的生长曲线、照片、重量。(E)免疫组织化学实验评估裸鼠HCT-8瘤组织Ki-67、p27和Caspase-6的表达。标尺为125 μm 。p27阳性表达区域使用IPP软件分析。(F)裸鼠HCT-8瘤组织中的总胆固醇水平。数据显示为平均值 \pm 标准差， $P < 0.05$ 为有统计学意义。*表示 $P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ ；***表示 $P < 0.001$ 。

小 结

1. TVB-2640 抑制放疗后 CRC 细胞胆固醇合成。
2. TVB-2640 提高 CRC 细胞的放疗敏感性。

讨 论

在前两部分研究中，我们发现外源性胆固醇摄入会促进CRC细胞的获得性放疗抵

抗，而照射后CRC细胞中胆固醇升高并与SREBP1/FASN的表达成正相关。然而CRC细胞的先天性放疗抵抗是否与SREBP1/FASN和胆固醇的升高有关有待研究。

在第三、第四部分研究中我们发现，放疗后内源性SREBP1上调，激活细胞内胆固醇合成促进CRC细胞先天性放疗抵抗，抑制SREBP1/FASN信号通路可降低CRC细胞放疗后的胆固醇合成，并抑制增殖和促进凋亡。具体而言，放疗激活SREBP1/FASN信号通路可以长期提高胆固醇合成，促进CRC细胞增殖和抑制凋亡。所有证据显示，放疗刺激下SREBP1/FASN/胆固醇轴被激活，导致CRC细胞先天性放疗抵抗。临床上，增加放疗累积剂量以提高放疗疗效可能会加重不良反应，甚至加重肿瘤的侵袭[37]。目前已经有研究说明SREBP1和FASN促进CRC细胞的侵袭和转移[38, 39]。

根据我们的发现，SREBP1/FASN是影响CRC细胞治疗的关键通路。阻断该通路可提高CRC细胞放疗的疗效和预后。TVB-2640是目前唯一进入临床的FASN抑制剂[40]。I期临床试验证实了FASN抑制剂TVB-2640抑制肝内从头合成，是非酒精性脂肪性肝病的一种新的治疗途径。此外，研究表明TVB-2640联合紫杉醇治疗非小细胞肺癌和乳腺癌患者可改善预后。

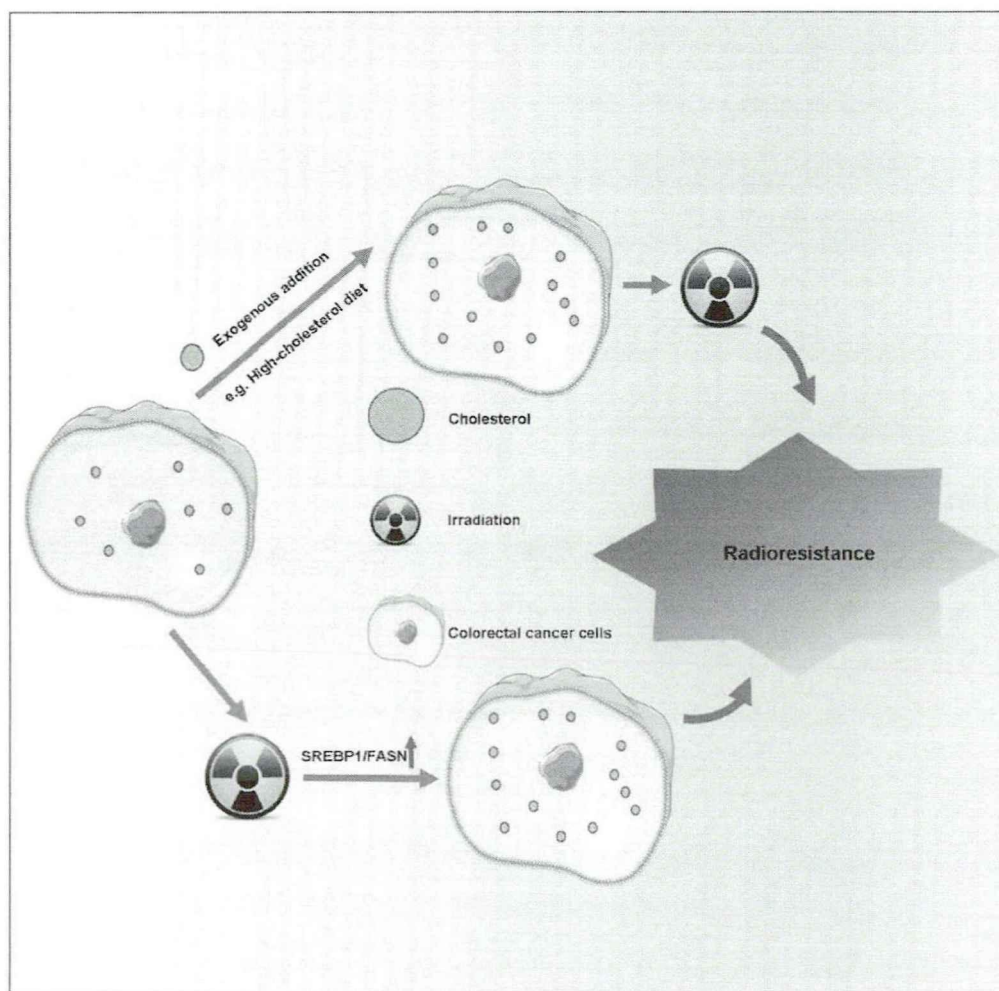
因此，我们评估TVB-2640在CRC细胞放疗中的协同效应。正如预期的那样，TVB-2640提高了CRC细胞的放疗敏感性。重要的是，口服TVB-2640能有效减轻放疗小鼠的体重损失，暗示TVB-2640可作为一种安全有效的放疗增敏剂用于CRC的治疗，值得研究。

此外，多项研究表明胆固醇的促癌作用与其下游的代谢产物如27-羟基胆固醇、胆汁酸等密切相关，因此需要更深入的研究来明确胆固醇促进结直肠癌放疗抵抗的机制。同时，本研究尚需临床样本验证，是否在放疗前可以检测病人体内胆固醇含量，作为临床上放疗剂量选择的参考。

全文总结

创新性：我们目前的研究结果表明，外源性添加胆固醇可促进CRC细胞的获得性放疗抗性。放疗激活SREBP1/FASN信号通路，导致CRC细胞内长久的胆固醇增加。相应地，升高的胆固醇水平会促进CRC细胞放疗抵抗能力。因此，靶向SREBP1和FASN的治疗结合低胆固醇饮食可能有潜力改善CRC患者对放疗的反应。

不足：我们研究采取的是给予小鼠灌胃胆固醇，不符合正常饮食方式。另外多项研究表明循环胆固醇的升高需要长期高胆固醇饮食，但是由于长期高胆固醇饮食会导致小鼠诱发如肝炎等疾病导致混杂因素更多，因此本研究未采用该研究方法。此外HCT-8细胞在照射后虽然凋亡执行蛋白Caspase-6上升，但是细胞凋亡未大幅度上升。总之，虽然我们发现胆固醇与结直肠癌放疗抵抗相关，但是更多的研究是有必要的。



参考文献

- [1] Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021.
- [2] Mauri G., Sartore-Bianchi A., Russo A.G., Marsoni S., Bardelli A., Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Molecular oncology.* 2019; 13: 109-131.
- [3] Yan K. Recent Developments in Radiotherapy. *N Engl J Med.* 2017; 377: 2200.
- [4] Uehara K., Nagino M. Neoadjuvant treatment for locally advanced rectal cancer: a systematic review. *Surgery today.* 2016; 46: 161-168.
- [5] Park S.Y., Lee C.J., Choi J.H., Kim J.H., Kim J.W., Kim J.Y., Nam J.S. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.* 2019; 38: 399.
- [6] DeBerardinis R.J., Chandel N.S. Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances.* 2016; 2: e1600200.
- [7] Zhang X., Coker O.O., Chu E.S., Fu K., Lau H.C.H., Wang Y.X., Chan A.W.H., Wei H., Yang X., Sung J.J.Y., Yu J. Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut.* 2020.
- [8] Du Q., Wang Q., Fan H., Wang J., Liu X., Wang H., Wang Y., Hu R. Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. *Biochemical pharmacology.* 2016; 105: 42-54.
- [9] Jiang S., Wang X., Song D., Liu X., Gu Y., Xu Z., Wang X., Zhang X., Ye Q., Tong Z., Yan B., Yu J., Chen Y., Sun M., Wang Y., Gao S. Cholesterol Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells by Suppressing Degradation of EGFR through APMAP. *Cancer research.* 2019; 79: 3063-3075.
- [10] Munir M.T., Ponce C., Powell C.A., Tarafdar K., Yanagita T., Choudhury M., Gollahon L.S., Rahman S.M. The contribution of cholesterol and epigenetic changes to the pathophysiology of breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2018; 183: 1-9.
- [11] Baek A.E., Yu Y.A., He S., Wardell S.E., Chang C.Y., Kwon S., Pillai R.V., McDowell H.B., Thompson J.W., Dubois L.G., Sullivan P.M., Kemper J.K., Gunn M.D.,

- McDonnell D.P., Nelson E.R. The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nature communications*. 2017; 8: 864.
- [12] Wang Y., Liu C., Hu L. Cholesterol regulates cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer by modulating miR-33a-PIM3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; 511: 685-692.
- [13] Gu L., Saha S.T., Thomas J., Kaur M. Targeting cellular cholesterol for anticancer therapy. *FEBS J*. 2019; 286: 4192-4208.
- [14] Montero J., Morales A., Llacuna L., Lluís J.M., Terrones O., Basañez G., Antonsson B., Prieto J., García-Ruiz C., Colell A., Fernández-Checa J.C. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 2008; 68: 5246-5256.
- [15] Zheng L., Li L., Lu Y., Jiang F., Yang X.A. SREBP2 contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*. 2018; 243: 655-662.
- [16] Riscal R., Skuli N., Simon M.C. Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! *Molecular cell*. 2019; 76: 220-231.
- [17] Cheng C., Geng F., Cheng X., Guo D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer communications (London, England)*. 2018; 38: 27.
- [18] Seshacharyulu P., Baine M.J., Soucek J.J., Menning M., Kaur S., Yan Y., Ouellette M.M., Jain M., Lin C., Batra S.K. Biological determinants of radioresistance and their remediation in pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*. 2017; 1868: 69-92.
- [19] Buckley A.M., Lynam-Lennon N., O'Neill H., O'Sullivan J. Targeting hallmarks of cancer to enhance radiosensitivity in gastrointestinal cancers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17: 298-313.
- [20] Avgerinos K.I., Spyrou N., Mantzoros C.S., Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism: clinical and experimental*. 2019; 92: 121-135.
- [21] Baena R., Salinas P. Diet and colorectal cancer. *Maturitas*. 2015; 80: 258-264.
- [22] Zheng K., Yu J., Chen Z., Zhou R., Lin C., Zhang Y., Huang Z., Yu L., Zhao L., Wang Q. Ethanol promotes alcohol-related colorectal cancer metastasis via the TGF-

- β /RUNX3/Snail axis by inducing TGF- β 1 upregulation and RUNX3 cytoplasmic mislocalization. *EBioMedicine*. 2019; 50: 224-237.
- [23] McDonnell D.P., Park S., Goulet M.T., Jasper J., Wardell S.E., Chang C.Y., Norris J.D., Guyton J.R., Nelson E.R. Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer research*. 2014; 74: 4976-4982.
- [24] Luo J., Yang H., Song B.L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2020; 21: 225-245.
- [25] Brunham L.R., Kruit J.K., Verchere C.B., Hayden M.R. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 403-408.
- [26] Peters S.A., Singhatheh Y., Mackay D., Huxley R.R., Woodward M. Total cholesterol as a risk factor for coronary heart disease and stroke in women compared with men: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2016; 248: 123-131.
- [27] McNamara D.J. Dietary cholesterol, heart disease risk and cognitive dissonance. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2014; 73: 161-166.
- [28] Papadopoulos V. Cholesterol homeostasis and infertility: the liver X receptor connection. *Endocrinology*. 2005; 146: 2517-2518.
- [29] Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biological chemistry*. 2015; 396: 1-11.
- [30] Grice B.A., Barton K.J., Covert J.D., Kreilach A.M., Tackett L., Brozinick J.T., Elmendorf J.S. Excess membrane cholesterol is an early contributing reversible aspect of skeletal muscle insulin resistance in C57BL/6NJ mice fed a Western-style high-fat diet. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2019; 317: E362-e373.
- [31] Brindisi M., Fiorillo M., Frattaruolo L., Sotgia F., Lisanti M.P., Cappello A.R. Cholesterol and Mevalonate: Two Metabolites Involved in Breast Cancer Progression and Drug Resistance through the ERR α Pathway. *Cells*. 2020; 9.
- [32] Werner E., Alter A., Deng Q., Dammer E.B., Wang Y., Yu D.S., Duong D.M., Seyfried N.T., Doetsch P.W. Ionizing Radiation induction of cholesterol biosynthesis in Lung tissue. *Sci Rep*. 2019; 9: 12546.
- [33] Festuccia N., Osorno R., Halbritter F., Karwacki-Neisius V., Navarro P., Colby D., Wong F., Yates A., Tomlinson S.R., Chambers I. Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell stem cell*. 2012; 11: 477-

- 490.
- [34] Eid W., Dauner K., Courtney K.C., Gagnon A., Parks R.J., Sorisky A., Zha X. mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114: 7999-8004.
- [35] Carroll R.G., Zastona Z., Galván-Peña S., Koppe E.L., Sévin D.C., Angiari S., Triantafilou M., Triantafilou K., Modis L.K., O'Neill L.A. An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation. *The Journal of biological chemistry.* 2018; 293: 5509-5521.
- [36] Komeili A., O'Shea E.K. Nuclear transport and transcription. *Current opinion in cell biology.* 2000; 12: 355-360.
- [37] Park C.M., Park M.J., Kwak H.J., Lee H.C., Kim M.S., Lee S.H., Park I.C., Rhee C.H., Hong S.I. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer research.* 2006; 66: 8511-8519.
- [38] Gao Y., Nan X., Shi X., Mu X., Liu B., Zhu H., Yao B., Liu X., Yang T., Hu Y., Liu S. SREBP1 promotes the invasion of colorectal cancer accompanied upregulation of MMP7 expression and NF- κ B pathway activation. *BMC cancer.* 2019; 19: 685.
- [39] Jafari N., Drury J., Morris A.J., Onono F.O., Stevens P.D., Gao T., Liu J., Wang C., Lee E.Y., Weiss H.L., Evers B.M., Zaytseva Y.Y. De Novo Fatty Acid Synthesis-Driven Sphingolipid Metabolism Promotes Metastatic Potential of Colorectal Cancer. *Molecular cancer research : MCR.* 2019; 17: 140-152.
- [40] Jones S.F., Infante J.R. Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2015; 21: 5434-5438.

综述

胆固醇在肿瘤中作用的研究进展

金煜晓 综述 杨晓东 校审

摘要: 在本世纪,肿瘤对人类健康和国家财政及社会安定的威胁是全球所面临的一个重大的公共问题。十多年前,世界卫生组织将肿瘤定义为慢性疾病—以长期隐秘的发病机制和反复发作为特征。研究显示,2020年中国的肿瘤发病人数和死亡人数位居全球第一。尽管随着医疗科研的发展中大量诊疗技术被应用至临床,肿瘤的诊断和治疗还是个悬而未决的社会难题。众所周知,长期的遗传突变、表观遗传异常和异常的肿瘤微环境等多种因素是肿瘤发生的潜在引发因素,这些因素都与机体内的脂代谢相关。目前,越来越多的研究表明脂代谢的紊乱与肿瘤发生发展有关,而体内胆固醇水平的异常也会影响肿瘤发生发展及预后。在本综述中,我们将详细介绍胆固醇的生理功能、稳态调节及其与肿瘤发生发展及预后的关系。我们期望对胆固醇的研究能为肿瘤的诊断及治疗提供新的靶点和思路。

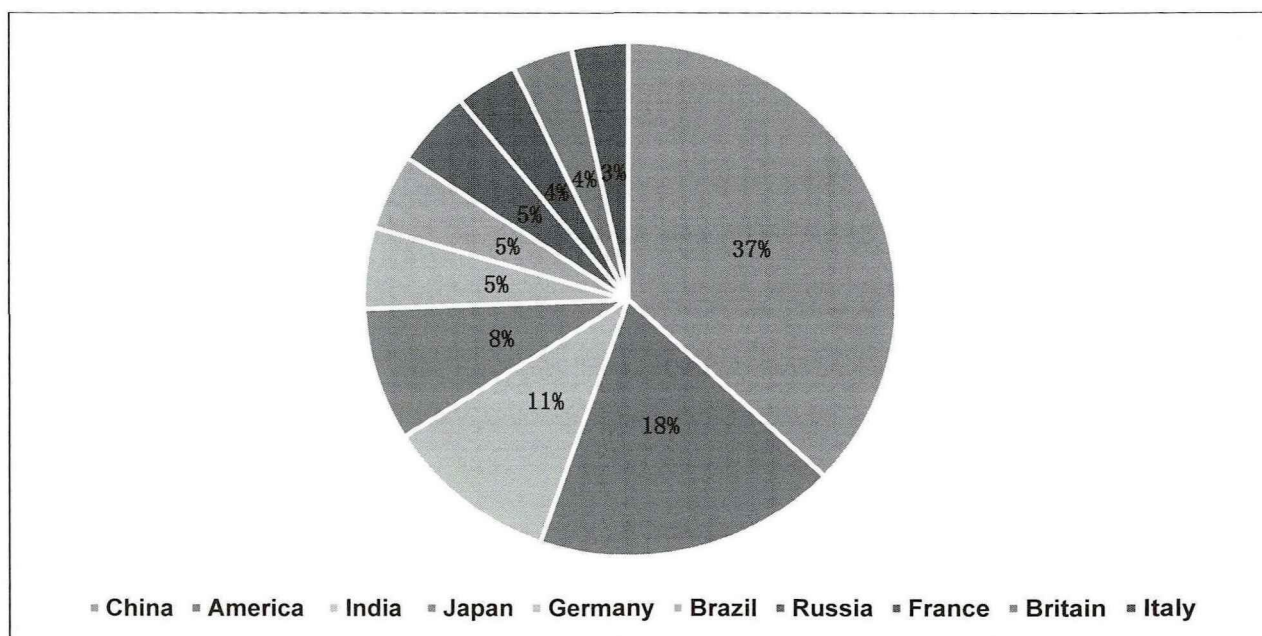


图 1 2020年癌症新发人数前十的国家

关键词: 胆固醇、肿瘤

一、胆固醇的生理功能

胆固醇相对于其他生物分子具有独特的功能：从繁殖到养分的运输再到细胞过程的激活，胆固醇在这些过程中都扮演者重要角色[1]。作为是环戊烷多氢菲的衍生物，它结构具有3个主要区域：亲水性近端，疏水性远端和中心4环结构，这使其具有极高的刚性。由于这种结构，它为许多对细胞功能至关重要的功能提供了支撑：如胆固醇嵌入在脂质之间，调节细胞膜流动性和渗透性，使细胞膜更致密、更稳定，同时细胞可以对其表面的胆固醇进行重组，使其不受外源性病原体的影响；另外，胆固醇可作为许多细胞受体和转运蛋白的协调者，这些受体和转运蛋白通常在整个细胞膜中随机漂移。此外，它可以形成“筏”组织信号分子、膜蛋白的运输以及调节神经的传递；另一方面，胆固醇本身不仅是调节分子，还可以被用来合成类固醇激素来平衡宿主的生理。此外，体内胆固醇的修饰功能还可以促进胚胎的正常发育[2]。总之，胆固醇是维系人体健康的重要分子。

二、体内胆固醇稳态的调节

体内胆固醇的水平主要受外界饮食摄入和机体内部胆固醇调节网络的影响。随着西方化饮食（牛奶，鸡蛋，肉等）的越来越普及，机体摄入的胆固醇也越来越多。研究表明体内胆固醇的来源其中30%受到饮食的影响而70%受到胆固醇体内的合成（如肝脏和肠黏膜合成）影响[3]。但是令人惊讶的是，尽管从食物中摄入的胆固醇水平不高，但饮食中的胆固醇对循环胆固醇具有显著影响。在临床研究中心主持下进行的早期研究表明，饮食中的胆固醇对循环胆固醇水平的具有重大的影响[4]。

与此同时，内部胆固醇稳态是由一个复杂的网络协调的，远远超过外部摄入和内部合成。从头合成而言，所有有核细胞均可通过甲羟戊酸途径合成胆固醇，该途径受HMG-CoA还原酶(HMGCR)和角鲨烯单加氧酶(SQLE)的限速酶调控；研究发现，从转录角度看，HMGCR和SQLE受到固醇调控元件结合蛋白2(SREBP2)的调控。此外，SREBP1和FASN还可以通过提高乙酰基辅酶A促进胆固醇合成，并在特定条件下它们也调控胆固醇的合成[5, 6]。此外胆固醇的转运也维持胆固醇稳态。例如，作为核受体的肝脏X受体 α 和 β (LXR)参与将胆固醇从细胞内转运到细胞外。除了合成和转运，胆固醇的酯化作用也影响胆固醇的内稳态如ACAT1和ACAT2调节胆固醇和胆固醇酯之间的转换[7]。

上述无论饮食还是胆固醇内部调节的失调都会导致体内胆固醇稳态的失衡。

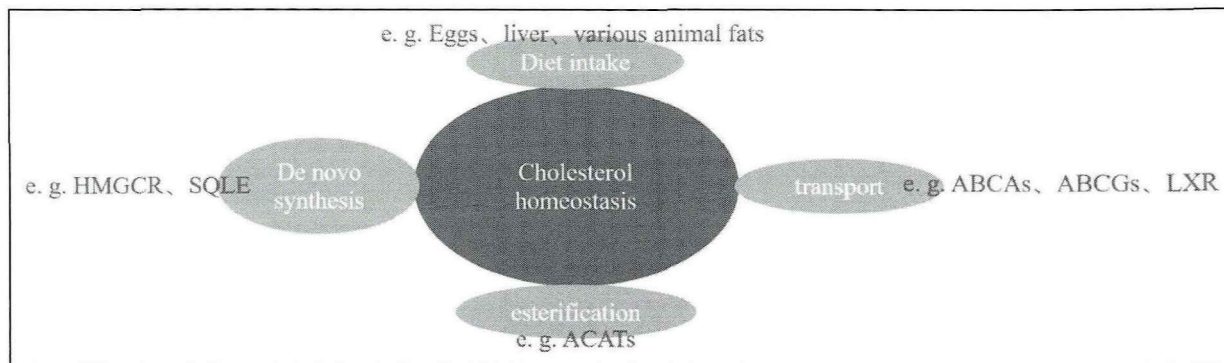


图 2 影响体内胆固醇稳态的部分因素

三、胆固醇的稳态与肿瘤发生发展的关系

近些年,越来越多的研究显示无论是体内胆固醇水平的异常还是调节胆固醇的网络紊乱都与肿瘤的发生发展及预后相关。

1.乳腺癌

研究显示,总胆固醇水平升高的女性乳腺癌复发率增加,血清中较高浓度的低密度脂蛋白(LDL)胆固醇与无病生存期降低有关;相应的是,降低胆固醇的他汀类药物可降低乳腺癌的复发率和死亡率[8-10]。而临床前研究显示高胆固醇饮食可显著减少乳腺癌肿瘤潜伏期并增加肿瘤生长、肿瘤内部血管生成以及肺转移,并肿瘤中细胞周期蛋白D1(肿瘤形成的标志物)、SR-BI(高密度脂蛋白胆固醇受体清除剂受体B1受体高表达与乳腺癌的侵袭性及预后不良有关)和LDL受体(与乳腺癌发生发展有关如促进Akt和ERK过度表达、减少粘附分子、促进细胞迁移)的表达增加与血浆中胆固醇水平有关[11-15]。

此外,胆固醇摄入后在体内主要代谢为27-羟基胆固醇,它是体内雌激素受体调节剂之一,被发现与雌激素受体阳性的乳腺发生发展有关[16]。当胆固醇激活雌激素受体 α 后,PGC-1 α 、ERbB2、HER2、TPD52和NOTCH2蛋白显著增加,从而使乳腺癌对于他莫昔芬和阿霉素耐药甚至使乳腺癌更有侵袭能力[17]。

基因上述背景,研究者发现靶向甲羟戊酸途径可以显著克服HER2阳性乳腺癌的化疗耐药[18]。

2.前列腺癌

研究显示,循环中胆固醇的升高与前列腺癌发生和发展呈正相关[19,20]。一旦患有前列腺癌,癌细胞自身会从头合成大量的脂肪酸和胆固醇[21],因而形成一种恶性

循环。众所周知，雄激素与前列腺癌的发生发展密不可分，而胆固醇作为类固醇激素的前体在前列腺癌中会大量合成雄激素，从而促进前列腺癌的发生发展。此外高胆固醇改变了细胞膜组成比例并改变膜筏的含量，影响某些类型的蛋白质募集及调节，包括对癌细胞存活和侵袭性至关重要的各种细胞信号传导蛋白质：如诱导APMAP与EPS15R的结合可抑制EGFR内化并激活ERK1/2以促进EMT从而促进前列腺癌转移[22, 23]。前列腺癌去势治疗目的是为了降低雄激素的产生，但是研究发现在不依赖于雄激素的前列腺癌中，ABCA1的表达明显下调从而降低胆固醇的外排[24]。

基于上述背景，研究者发现抑制胆固醇合成如用辛伐他汀抑制HMGCR可以逆转前列腺癌对于雄激素靶向疗法的耐药性[25, 26]。

3. 黑色素瘤

研究显示，长期使用降低胆固醇的他汀类药物的使用与黑色素瘤患病风险降低相关[27]。此外，有研究显示60%的黑色素瘤至少有一个胆固醇合成基因表达增加或染色体拷贝数增加，且胆固醇合成相关途径活性的增加与患者生存期降低相关[28]。研究显示，在黑色素瘤细胞中V-ATPase与富含胆固醇的细胞膜微区之间的相互作用与黑色素瘤迁移和侵袭等恶性表型相关[29]。此外，研究显示在黑色素瘤中，合成胆固醇相关基因SREBP的激活稳定了脂质筏从而维持肿瘤细胞的生长并合成胆固醇相关基因表达与黑色素瘤的干性和侵袭性密切相关[30, 31]，而胆固醇的主要代谢产物27-羟基胆固醇也能维持AKT/MAPK信号通路来促进黑色素瘤细胞增殖[32]。

基于上述背景，研究者发现靶向循环肿瘤细胞中胆固醇的转运可以抑制AKT的磷酸化从而促进癌症细胞的凋亡、抑制癌症的转移[33]。但是有文章显示调节胆固醇的含量可增强或者减弱黑色素瘤中的免疫疗法[34]，因此深入明确胆固醇是如何调节黑色素瘤的抗肿瘤免疫是必要的。

4. 肝癌

目前研究关于胆固醇对于肝癌的影响充满争议，多项研究发现循环中高胆固醇水平与肝癌的发生发展成负相关[35, 36]。但这些研究需将某些因素如他汀类药物服用史包括进去，分析胆固醇与肝癌的关系。肝癌最常见的原因是肝炎，研究需将肝炎这一因素纳入同时需考虑肝硬化患者合成胆固醇能力下降这种干扰因素。另外研究显示，高胆固醇饮食促进肝癌的发生发展，而与循环胆固醇含量无关[37]。

部分临床前研究显示胆固醇饮食会抑制肝癌的发展而他汀类药物的使用会反而

促进肝癌的发生和转移[38]，而临床数据显示他汀类药物的长期使用与较低的肝癌风险有关，并更适合有肝病和糖尿病病史的患者[39-41]。体外实验显示胆固醇促进肝癌细胞的增殖[42]。虽然有部分小鼠实验发现4周高胆固醇饮食引起的循环高水平胆固醇与药物诱导的肝癌的发展或转移呈负相关[43, 44]，但是小鼠循环胆固醇含量可能相对于人体更易被膳食的胆固醇所影响[45]，并于君等人发现12个月高脂高胆固醇饮食而非单纯高脂饮食会促进肝癌的形成从而促进肝癌的发生发展[46]。因此，上述部分小鼠体内实验需通过进行长期饮食诱导的肝炎来明确高胆固醇饮食对于肝癌的影响[47]。

目前对于胆固醇与肝癌发生发展的研究存在争议，但是多项动物实验发现靶向胆固醇合成可以抑制肝癌的发生并提高肝癌对于化疗的敏感性[48-50]。

总而言之，胆固醇和肝癌之间的关系需明确。

5. 结直肠癌

在CRC的发生发展过程中，环境因素起着至关重要的作用[51]。研究发现血清胆固醇水平高与CRC风险增加有关[52, 53]。虽然有队列研究显示长期使用他汀类药物与CRC患癌风险显著降低、CRC病人更长地生存期呈正相关[54]，但是有研究指出在排除选择偏倚和不死时间偏倚影响后，癌症诊断后的6个月内开始使用他汀类药物治疗似乎并未改善3年内癌症特异性或总体生存期[55]。研究指出，CRC存在多种分子亚型，需的大规模研究明确他汀类药物与CRC之间的关系，尤其是与甲羟戊酸途径相关的CRC[56]。

尽管使用他汀类药物是否可以降低患肠癌的风险具有争议，但胆固醇会增加这种风险已被广泛认可。临床前研究指出，高胆固醇饮食喂食会促进正常小鼠的肠道干细胞增殖，当小鼠磷脂重塑酶Lpcat3缺乏时SREBP-2会过度激活促进胆固醇合成促进肠道干细胞增殖，并向CRC的转化[57]。此外胆固醇会抑制角鲨烯环氧酶，随后激活 β -catenin及使p53失活，促进肠道干细胞发生上皮-间质转化进而促进CRC侵袭转移[58]。而在诱导CRC模型的小鼠种胆固醇抑制巨噬细胞中AMPK α 的活性，导致线粒体ROS大量产生随后激活NLRP3炎症小体，促进CRC的发生发展[59]，而在此过程中巨噬细胞浸润导致癌细胞的免疫逃逸也在CRC的发生发展中起重要作用[60]。此外，体外细胞实验显示胆固醇会抑制miR-33a、上调PIM3，使C-Myc, p21, p27和Bad蛋白磷酸化，抑制CRC细胞凋亡[61]。胆固醇的主要代谢产物27-羟基胆固醇也会促进CRC的发生发

展[62]。最近,于君等人发现致癌菌厌氧消化链球菌也会通过促进胆固醇合成来促进CRC的发生发展[63]。

研究指出不仅外源胆固醇促进了CRC的发生发展,调控胆固醇网络的失调也与CRC的发生发展密切相关:ABCA1的下调促进了CRC细胞的增殖与存活[64]、SREBP1促进与p65磷酸化有关的MMP7的表达来促进CRC细胞的侵袭和转移[65]。

基于上述背景,研究者发现靶向胆固醇可以提高癌症如CRC的免疫疗法疗效[66]。APOA-1与AIBP联合促进胆固醇外排抑制CRC发展[67]。TASIN-1清除胆固醇后诱导CRC细胞凋亡[68]。

6. 膀胱癌

研究显示膳食胆固醇与膀胱癌的风险呈正相关[69]。临床前研究显示胆固醇的代谢产物25-羟基胆固醇在膀胱癌组织中增加,并促膀胱癌细胞的增殖、上皮间充质转化及对阿霉素的耐药性,同时25-羟基胆固醇在膀胱癌中的高水平与不良预后相关[70]。此外,研究指出Archazolid B与他汀类药物的结合可通过影响胆固醇的生物合成来增强Archazolid B对于膀胱癌的抑制作用[71]。但是也有报道指出抑制胆固醇代谢是mTOR抑制剂与氯喹在膀胱癌细胞中起协同作用的基础[72]。总之,目前关于胆固醇在膀胱癌中的作用需的研究来明确。

7. 肺癌

目前关于胆固醇与肺癌的之间关系的尚未有大量研究报道且存在争议。部分的研究显示循环内胆固醇含量与肺癌之间的关系呈负相关[73-75]。而有研究指出无论是循环总胆固醇的升高还是促进胆固醇吸收和转运的基因APOB表达的升高,都与肺癌的发生发展正相关[76]。

目前尚未有临床前研究明确指出外源性胆固醇摄入与肺癌之间的关系。但给予胆固醇生物合成抑制剂25-羟基胆固醇会减少BIX01294诱导的肺癌细胞死亡[77],值得注意的是25-羟基胆固醇是胆固醇的代谢产物之一,可能本身会负反馈抑制胆固醇的合成,同时25-羟基胆固醇本身具有促癌作用[70]。此外,无论是临床研究还是临床前研究都指出他汀类药物会抑制肺癌的发展[78-80],且多项研究指出胆固醇的升高与肺癌分子靶向疗法的耐药有关[81,82]。最近,有研究发现番茄红素通过抑制胆固醇的积累和促进胆固醇的逆向转运抑制了烟草致癌物等诱导的肺癌[83]。

总而言之,目前对于胆固醇与肺癌关系的研究目前文章报道较少,需的研究来明

确两者间的关系。

8.其他癌症

目前虽然有部分研究指出胆固醇与如胆囊癌、子宫内膜癌、甲状腺癌等癌症相关，但尚需更多的证据来支撑。

四、结论和展望

体内胆固醇的稳态对于机体健康必不可少。越来越多的证据表明胆固醇稳态的失衡与多种癌症发生发展及癌症治疗失败相关。随着对于胆固醇研究的深入，胆固醇在癌症中如何发挥作用的机制也更加明确，为将来癌症中基于胆固醇的靶向疗法提供依据。

参考文献

- [1] David, W., Drugs R.J.C., Therapy. Cholesterol biosynthesis and metabolism. 1992.
- [2] Schade D.S., Shey L., Eaton R.P. Cholesterol Review: A Metabolically Important Molecule. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2020; 26: 1514-1523.
- [3] Grundy S.M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annual review of nutrition*. 1983; 3: 71-96.
- [4] Connor W.E., Hodges R.E., Bleiler R.E. The serum lipids in men receiving high cholesterol and cholesterol-free diets. *The Journal of clinical investigation*. 1961; 40: 894-901.
- [5] Carroll R.G., Zaslona Z., Galván-Peña S., Koppe E.L., Sévin D.C., Angiari S., Triantafilou M., Triantafilou K., Modis L.K., O'Neill L.A. An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation. *The Journal of biological chemistry*. 2018; 293: 5509-5521.
- [6] Eid W., Dauner K., Courtney K.C., Gagnon A., Parks R.J., Sorisky A., Zha X. mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114: 7999-8004.
- [7] Luo J., Yang H., Song B.L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2020; 21: 225-245.
- [8] Bahl M., Ennis M., Tannock I.F., Hux J.E., Pritchard K.I., Koo J., Goodwin P.J. Serum lipids and outcome of early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *Breast cancer research and treatment*. 2005; 94: 135-144.
- [9] Rodrigues Dos Santos C., Fonseca I., Dias S., Mendes de Almeida J.C. Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression. *BMC cancer*. 2014; 14: 132.
- [10] Mansourian M., Haghjooy-Javanmard S., Eshraghi A., Vaseghi G., Hayatshahi A., Thomas J. Statins Use and Risk of Breast Cancer Recurrence and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2016; 19: 72-81.
- [11] Llaverias G., Danilo C., Mercier I., Dauner K., Capozza F., Williams T.M., Sotgia F.,

- Lisanti M.P., Frank P.G. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *The American journal of pathology*. 2011; 178: 402-412.
- [12] Yuan B., Wu C., Wang X., Wang D., Liu H., Guo L., Li X.A., Han J., Feng H. High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37: 3581-3588.
- [13] Antalis C.J., Uchida A., Buhman K.K., Siddiqui R.A. Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clinical & experimental metastasis*. 2011; 28: 733-741.
- [14] Alikhani N., Ferguson R.D., Novosyadlyy R., Gallagher E.J., Scheinman E.J., Yakar S., LeRoith D. Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene*. 2013; 32: 961-967.
- [15] Gallagher E.J., Zelenko Z., Neel B.A., Antoniou I.M., Rajan L., Kase N., LeRoith D. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene*. 2017; 36: 6462-6471.
- [16] Nelson E.R. The significance of cholesterol and its metabolite, 27-hydroxycholesterol in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2018; 466: 73-80.
- [17] Brindisi M., Fiorillo M., Frattaruolo L., Sotgia F., Lisanti M.P., Cappello A.R. Cholesterol and Mevalonate: Two Metabolites Involved in Breast Cancer Progression and Drug Resistance through the ERR α Pathway. *Cells*. 2020; 9.
- [18] Sethunath V., Hu H., De Angelis C., Veeraraghavan J., Qin L., Wang N., Simon L.M., Wang T., Fu X., Nardone A., Pereira R., Nanda S., Griffith O.L., Tsimelzon A., Shaw C., Chamness G.C., Reis-Filho J.S., Weigelt B., Heiser L.M., Hilsenbeck S.G., Huang S., Rimawi M.F., Gray J.W., Osborne C.K., Schiff R. Targeting the Mevalonate Pathway to Overcome Acquired Anti-HER2 Treatment Resistance in Breast Cancer. *Molecular cancer research : MCR*. 2019; 17: 2318-2330.
- [19] Magura L., Blanchard R., Hope B., Beal J.R., Schwartz G.G., Sahnoun A.E. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer causes & control : CCC*. 2008; 19: 1259-1266.
- [20] Mondul A.M., Clipp S.L., Helzlsouer K.J., Platz E.A. Association between plasma total cholesterol concentration and incident prostate cancer in the CLUE II cohort. *Cancer causes & control : CCC*. 2010; 21: 61-68.
- [21] Flavin R., Zadra G., Loda M. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate

- cancer. *The Journal of pathology*. 2011; 223: 283-294.
- [22] Hryniewicz-Jankowska A., Augoff K., Sikorski A.F. The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.). 2019; 244: 1053-1061.
- [23] Jiang S., Wang X., Song D., Liu X., Gu Y., Xu Z., Wang X., Zhang X., Ye Q., Tong Z., Yan B., Yu J., Chen Y., Sun M., Wang Y., Gao S. Cholesterol Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells by Suppressing Degradation of EGFR through APMAP. *Cancer research*. 2019; 79: 3063-3075.
- [24] Fukuchi J., Hiipakka R.A., Kokontis J.M., Hsu S., Ko A.L., Fitzgerald M.L., Liao S. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2004; 64: 7682-7685.
- [25] Kong Y., Cheng L., Mao F., Zhang Z., Zhang Y., Farah E., Bosler J., Bai Y., Ahmad N., Kuang S., Li L., Liu X. Inhibition of cholesterol biosynthesis overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *The Journal of biological chemistry*. 2018; 293: 14328-14341.
- [26] Neuwirt H., Bouchal J., Kharraishvili G., Ploner C., Jöhrer K., Pitterl F., Weber A., Klocker H., Eder I.E. Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. *Cell communication and signaling : CCS*. 2020; 18: 11.
- [27] Jacobs E.J., Newton C.C., Thun M.J., Gapstur S.M. Long-term use of cholesterol-lowering drugs and cancer incidence in a large United States cohort. *Cancer research*. 2011; 71: 1763-1771.
- [28] Kuzu O.F., Noory M.A., Robertson G.P. The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer research*. 2016; 76: 2063-2070.
- [29] Costa G.A., de Souza S.B., da Silva Teixeira L.R., Okorokov L.A., Arnholdt A.C.V., Okorokova-Façanha A.L., Façanha A.R. Tumor cell cholesterol depletion and V-ATPase inhibition as an inhibitory mechanism to prevent cell migration and invasiveness in melanoma. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2018; 1862: 684-691.
- [30] Yamauchi Y., Furukawa K., Hamamura K., Furukawa K. Positive feedback loop between PI3K-Akt-mTORC1 signaling and the lipogenic pathway boosts Akt signaling: induction of the lipogenic pathway by a melanoma antigen. *Cancer research*. 2011; 71:

4989-4997.

- [31] Restivo G., Diener J., Cheng P.F., Kiowski G., Bonalli M., Biedermann T., Reichmann E., Levesque M.P., Dummer R., Sommer L. low neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. *Nature communications*. 2017; 8: 1988.
- [32] Tian W., Pang W., Ge Y., He X., Wang D., Li X., Hou H., Zhou D., Feng S., Chen Z., Yang Y. Hepatocyte-generated 27-hydroxycholesterol promotes the growth of melanoma by activation of estrogen receptor alpha. *Journal of cellular biochemistry*. 2018; 119: 2929-2938.
- [33] Chen Y.C., Gowda R., Newswanger R.K., Leibich P., Fell B., Rosenberg G., Robertson G.P. Targeting cholesterol transport in circulating melanoma cells to inhibit metastasis. *Pigment cell & melanoma research*. 2017; 30: 541-552.
- [34] Ma X., Bi E., Huang C., Lu Y., Xue G., Guo X., Wang A., Yang M., Qian J., Dong C., Yi Q. Cholesterol negatively regulates IL-9-producing CD8(+) T cell differentiation and antitumor activity. *J Exp Med*. 2018; 215: 1555-1569.
- [35] Strohmaier S., Edlinger M., Manjer J., Stocks T., Bjørge T., Borena W., Häggström C., Engeland A., Nagel G., Almquist M., Selmer R., Tretli S., Concin H., Hallmans G., Jonsson H., Stattin P., Ulmer H. Total serum cholesterol and cancer incidence in the Metabolic syndrome and Cancer Project (Me-Can). *PloS one*. 2013; 8: e54242.
- [36] Nderitu P., Bosco C., Garmo H., Holmberg L., Malmström H., Hammar N., Walldius G., Jungner I., Ross P., Van Hemelrijck M. The association between individual metabolic syndrome components, primary liver cancer and cirrhosis: A study in the Swedish AMORIS cohort. *International journal of cancer*. 2017; 141: 1148-1160.
- [37] Ioannou G.N., Morrow O.B., Conole M.L., Lee S.P. Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the United States population. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2009; 50: 175-184.
- [38] Zhao Z., Zhong L., He K., Qiu C., Li Z., Zhao L., Gong J. Cholesterol attenuated the progression of DEN-induced hepatocellular carcinoma via inhibiting SCAP mediated fatty acid de novo synthesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; 509: 855-861.
- [39] McGlynn K.A., Hagberg K., Chen J., Graubard B.I., London W.T., Jick S., Sahasrabudhe V.V. Statin use and risk of primary liver cancer in the Clinical Practice Research Datalink. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107.

- [40] Bosch J., Gracia-Sancho J., Abraldes J.G. Cirrhosis as new indication for statins. *Gut*. 2020; 69: 953-962.
- [41] Tran K.T., McMenamin Ú C., Coleman H.G., Cardwell C.R., Murchie P., Iversen L., Lee A.J., Thrift A.P. Statin use and risk of liver cancer: Evidence from two population-based studies. *International journal of cancer*. 2020; 146: 1250-1260.
- [42] Cui M., Xiao Z., Wang Y., Zheng M., Song T., Cai X., Sun B., Ye L., Zhang X. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway. *Cancer research*. 2015; 75: 846-857.
- [43] Yang Z., Qin W., Chen Y., Yuan B., Song X., Wang B., Shen F., Fu J., Wang H. Cholesterol inhibits hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by promoting CD44 localization in lipid rafts. *Cancer letters*. 2018; 429: 66-77.
- [44] Qin W.H., Yang Z.S., Li M., Chen Y., Zhao X.F., Qin Y.Y., Song J.Q., Wang B.B., Yuan B., Cui X.L., Shen F., He J., Bi Y.F., Ning G., Fu J., Wang H.Y. High Serum Levels of Cholesterol Increase Antitumor Functions of Nature Killer Cells and Reduce Growth of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2020; 158: 1713-1727.
- [45] Hegsted D.M. Serum-cholesterol response to dietary cholesterol: a re-evaluation. *The American journal of clinical nutrition*. 1986; 44: 299-305.
- [46] Liang J.Q., Teoh N., Xu L., Pok S., Li X., Chu E.S.H., Chiu J., Dong L., Arfianti E., Haigh W.G., Yeh M.M., Ioannou G.N., Sung J.J.Y., Farrell G., Yu J. Dietary cholesterol promotes steatohepatitis related hepatocellular carcinoma through dysregulated metabolism and calcium signaling. *Nature communications*. 2018; 9: 4490.
- [47] Zhang H., Léveillé M., Courty E., Gunes A., B N.N., Estall J.L. Differences in metabolic and liver pathobiology induced by two dietary mouse models of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2020; 319: E863-e876.
- [48] Kim Y.S., Lee Y.M., Oh T.I., Shin D.H., Kim G.H., Kan S.Y., Kang H., Kim J.H., Kim B.M., Yim W.J., Lim J.H. Emodin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to the Anti-Cancer Effect of Sorafenib through Suppression of Cholesterol Metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19.
- [49] Kim G.H., Kan S.Y., Kang H., Lee S., Ko H.M., Kim J.H., Lim J.H. Ursolic Acid

- Suppresses Cholesterol Biosynthesis and Exerts Anti-Cancer Effects in Hepatocellular Carcinoma Cells. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20.
- [50] Montero J., Morales A., Llacuna L., Lluís J.M., Terrones O., Basañez G., Antonsson B., Prieto J., García-Ruiz C., Colell A., Fernández-Checa J.C. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 2008; 68: 5246-5256.
- [51] Vogelstein B., Kinzler K.W. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG*. 1993; 9: 138-141.
- [52] Muka T., Kraja B., Ruiters R., de Keyser C.E., Hofman A., Stricker B.H., Kieft-de Jong J.C., Franco O.H. Dietary polyunsaturated fatty acids intake modifies the positive association between serum total cholesterol and colorectal cancer risk: the Rotterdam Study. *Journal of epidemiology and community health*. 2016; 70: 881-887.
- [53] Dashti S.G., Li W.Y., Buchanan D.D., Clendenning M., Rosty C., Winship I.M., Macrae F.A., Giles G.G., Hardikar S., Hua X., Thibodeau S.N., Figueiredo J.C., Casey G., Haile R.W., Gallinger S., Le Marchand L., Newcomb P.A., Potter J.D., Lindor N.M., Hopper J.L., Jenkins M.A., Win A.K. Type 2 diabetes mellitus, blood cholesterol, triglyceride and colorectal cancer risk in Lynch syndrome. *Br J Cancer*. 2019; 121: 869-876.
- [54] Cardwell C.R., Hicks B.M., Hughes C., Murray L.J. Statin use after colorectal cancer diagnosis and survival: a population-based cohort study. *J Clin Oncol*. 2014; 32: 3177-3183.
- [55] Emilsson L., García-Albéniz X., Logan R.W., Caniglia E.C., Kalager M., Hernán M.A. Examining Bias in Studies of Statin Treatment and Survival in Patients With Cancer. *JAMA Oncol*. 2018; 4: 63-70.
- [56] Gray R.T., Loughrey M.B., Bankhead P., Cardwell C.R., McQuaid S., O'Neill R.F., Arthur K., Bingham V., McGready C., Gavin A.T., James J.A., Hamilton P.W., Salto-Tellez M., Murray L.J., Coleman H.G. Statin use, candidate mevalonate pathway biomarkers, and colon cancer survival in a population-based cohort study. *Br J Cancer*. 2017; 116: 1652-1659.
- [57] Wang B., Rong X., Palladino E.N.D., Wang J., Fogelman A.M., Martín M.G., Alrefai W.A., Ford D.A., Tontonoz P. Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis. *Cell stem cell*. 2018; 22: 206-220.e204.

- [58] Jun S.Y., Brown A.J., Chua N.K., Yoon J.Y., Lee J.J., Yang J.O., Jang I., Jeon S.J., Choi T.I., Kim C.H., Kim N.S. Reduction of Squalene Epoxidase by Cholesterol Accumulation Accelerates Colorectal Cancer Progression and Metastasis. *Gastroenterology*. 2020.
- [59] Du Q., Wang Q., Fan H., Wang J., Liu X., Wang H., Wang Y., Hu R. Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. *Biochemical pharmacology*. 2016; 105: 42-54.
- [60] Liu C., Yao Z., Wang J., Zhang W., Yang Y., Zhang Y., Qu X., Zhu Y., Zou J., Peng S., Zhao Y., Zhao S., He B., Mi Q., Liu X., Zhang X., Du Q. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/STAT3-CSN5-PD-L1 pathway. *Cell death and differentiation*. 2020; 27: 1765-1781.
- [61] Wang Y., Liu C., Hu L. Cholesterol regulates cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer by modulating miR-33a-PIM3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019; 511: 685-692.
- [62] Rossin D., Dias I.H.K., Solej M., Milic I., Pitt A.R., Iaia N., Scoppapietra L., Devitt A., Nano M., Degiuli M., Volante M., Caccia C., Leoni V., Griffiths H.R., Spickett C.M., Poli G., Biasi F. Increased production of 27-hydroxycholesterol in human colorectal cancer advanced stage: Possible contribution to cancer cell survival and infiltration. *Free Radic Biol Med*. 2019; 136: 35-44.
- [63] Tsoi H., Chu E.S.H., Zhang X., Sheng J., Nakatsu G., Ng S.C., Chan A.W.H., Chan F.K.L., Sung J.J.Y., Yu J. *Peptostreptococcus anaerobius* Induces Intracellular Cholesterol Biosynthesis in Colon Cells to Induce Proliferation and Causes Dysplasia in Mice. *Gastroenterology*. 2017; 152: 1419-1433.e1415.
- [64] Smith B., Land H. Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Rep*. 2012; 2: 580-590.
- [65] Gao Y., Nan X., Shi X., Mu X., Liu B., Zhu H., Yao B., Liu X., Yang T., Hu Y., Liu S. SREBP1 promotes the invasion of colorectal cancer accompanied upregulation of MMP7 expression and NF- κ B pathway activation. *BMC cancer*. 2019; 19: 685.
- [66] Ma X., Bi E., Lu Y., Su P., Huang C., Liu L., Wang Q., Yang M., Kalady M.F., Qian J., Zhang A., Gupte A.A., Hamilton D.J., Zheng C., Yi Q. Cholesterol Induces CD8(+) T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*. 2019; 30: 143-156.e145.

- [67] Zhang T., Wang Q., Wang Y., Wang J., Su Y., Wang F., Wang G. AIBP and APOA-I synergistically inhibit intestinal tumor growth and metastasis by promoting cholesterol efflux. *Journal of translational medicine*. 2019; 17: 161.
- [68] Zhang L., Kim S.B., Luitel K., Shay J.W. Cholesterol Depletion by TASIN-1 Induces Apoptotic Cell Death through the ER Stress/ROS/JNK Signaling in Colon Cancer Cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2018; 17: 943-951.
- [69] Hu J., La Vecchia C., de Groh M., Negri E., Morrison H., Mery L. Dietary cholesterol intake and cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012; 23: 491-500.
- [70] Wang C., He H., Fang W. Oncogenic roles of the cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol in bladder cancer. *Oncology letters*. 2020; 19: 3671-3676.
- [71] Hamm R., Chen Y.R., Seo E.J., Zeino M., Wu C.F., Müller R., Yang N.S., Efferth T. Induction of cholesterol biosynthesis by archazolid B in T24 bladder cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2014; 91: 18-30.
- [72] King M.A., Ganley I.G., Flemington V. Inhibition of cholesterol metabolism underlies synergy between mTOR pathway inhibition and chloroquine in bladder cancer cells. *Oncogene*. 2016; 35: 4518-4528.
- [73] Lin X., Lu L., Liu L., Wei S., He Y., Chang J., Lian X. Blood lipids profile and lung cancer risk in a meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of clinical lipidology*. 2017; 11: 1073-1081.
- [74] Lyu Z., Li N., Wang G., Feng X., Chen S., Su K., Li F., Wei L., Li X., Xie S., Guo L., Chen Y., Tan F., Yin J., Cui H., Chen H., Li J., Ren J., Shi J., Wu S., Dai M., He J. Independent and joint associations of blood lipids and lipoproteins with lung cancer risk in Chinese males: A prospective cohort study. *International journal of cancer*. 2019; 144: 2972-2984.
- [75] Siemianowicz K., Gminski J., Stajszczyk M., Wojakowski W., Goss M., Machalski M., Telega A., Brulinski K., Magiera-Molendowska H. Serum total cholesterol and triglycerides levels in patients with lung cancer. *International journal of molecular medicine*. 2000; 5: 201-205.
- [76] Deng W., Liu H., Luo S., Clarke J., Glass C., Su L., Lin L., Christiani D.C., Wei Q. APOB Genotypes and CDH13 Haplotypes in the Cholesterol-Related Pathway Genes Predict Non-Small Cell Lung Cancer Survival. *Cancer epidemiology, biomarkers &*

- prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2020; 29: 1204-1213.
- [77] Kim H., Choi S.Y., Lim J., Lindroth A.M., Park Y.J. EHMT2 Inhibition Induces Cell Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer by Altering the Cholesterol Biosynthesis Pathway. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21.
- [78] Hu T., Shen H., Huang H., Yang Z., Zhou Y., Zhao G. Cholesterol-lowering drug pitavastatin targets lung cancer and angiogenesis via suppressing prenylation-dependent Ras/Raf/MEK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Anti-cancer drugs*. 2020; 31: 377-384.
- [79] Cardwell C.R., Mc Menamin Ú., Hughes C.M., Murray L.J. Statin use and survival from lung cancer: a population-based cohort study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015; 24: 833-841.
- [80] Chen Y., Li X., Zhang R., Xia Y., Shao Z., Mei Z. Effects of statin exposure and lung cancer survival: A meta-analysis of observational studies. *Pharmacological research*. 2019; 141: 357-365.
- [81] Ali A., Levantini E., Fhu C.W., Teo J.T., Clohessy J.G., Goggi J.L., Wu C.S., Chen L., Chin T.M., Tenen D.G. CAV1 - GLUT3 signaling is important for cellular energy and can be targeted by Atorvastatin in Non-Small Cell Lung Cancer. *Theranostics*. 2019; 9: 6157-6174.
- [82] Chen Q., Pan Z., Zhao M., Wang Q., Qiao C., Miao L., Ding X. High cholesterol in lipid rafts reduces the sensitivity to EGFR-TKI therapy in non-small cell lung cancer. *Journal of cellular physiology*. 2018; 233: 6722-6732.
- [83] Mustra Rakic J., Liu C., Veeramachaneni S., Wu D., Paul L., Chen C.O., Ausman L.M., Wang X.D. Lycopene Inhibits Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Carcinogenesis by Modulating Reverse Cholesterol Transport in Ferrets. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 2019; 12: 421-432.

附录

1. 缩写词表:

SREBPs	Sterol-regulatory element binding proteins
FASN	Fatty Acid Synthase
HMGCR	HMG-CoA Reductase
TC	total cholesterol
TG	triglyceride
IPP	Image Pro Plus
SQLE	Squalene monooxygenase
LXR	Liver X Receptor
ACAT	Acetyl Coenzyme A Acetyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α
TPD52	tumor protein D52
ERbB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
HER2	hairy-related 2
AMPK	protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1
ERK	extracellular regulated MAP kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NOTCH2	notch receptor 2
EMT	epithelial to mesenchymal transition
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPS15R	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1

Lpcat3	Lysophosphatidylcholine Acyltransferase
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
MMP7	matrix metalloproteinase 7
APOA-1	apolipoprotein A-I
AIBP	NAD(P)HX epimerase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
CRC	Colorectal cancer
APOB	apolipoprotein B

2.原始数据:

图4-1 数据

X		Group A									
A:Y1		con									
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	A:Y7	A:Y8	A:Y9	A:Y10	
0	0.3158	0.3035	0.3086	0.3006	0.3148	0.3051	0.3089	0.2979	0.3055	0.3074	
24	0.3583	0.3399	0.3065	0.3505	0.3279	0.3150	0.3162	0.3214	0.3217		
48	0.5463	0.6006	0.6396	0.7359	0.6918	0.6719	0.6892	0.7191	0.6111	0.6002	
72	1.0259	1.0424	1.1600	1.0171	1.2392	1.2717	0.9657	1.3372	1.3726	1.2951	

Group B		抑制剂7 5ug/2ml									
B:Y1		B:Y2									
B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	B:Y7	B:Y8	B:Y9	B:Y10		
0.3063	0.3080	0.3006	0.2949	0.3127	0.3120	0.3020	0.3119	0.3081	0.3113		
0.3435	0.3490	0.3204	0.3288	0.3580	0.3138	0.3414					
0.7066	0.5139	0.7368	0.6578	0.6086	0.7422	0.6251	0.6533				
1.0556	0.9969	1.0743	1.0916	1.2514	1.2887	1.2463	1.1144				

Group C		抑制剂15ug/2ml									
C:Y1		C:Y2									
C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4	C:Y5	C:Y6	C:Y7	C:Y8	C:Y9	C:Y10		
0.3336	0.3174	0.3226	0.3260	0.3245	0.3209	0.3128	0.3197	0.3332	0.3129		
0.3330	0.3383	0.3324	0.3745	0.3528	0.3643	0.3396	0.3853				
0.7307	0.6921	0.5118	0.5414	0.6164	0.7683	0.6680	0.6057	0.6631	0.5204		
1.2244	1.0642	1.1551	1.2739	1.2318	1.2106	1.3362	0.9192				

图2-4数据

Group A HCT-8 0h							Group B HCT-8 24h						
A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	A:Y7	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	B:Y7
117.6755	120.4490	120.4490	103.8080	95.4875	112.1285	95.4875	59.43200	48.33800	45.56450	48.33800	45.56450	45.56450	

Group A HT-29 0h					Group B HT-29 24h																	
A:1	A:2	A:3	A:4	A:5	B:1	B:2	B:3	B:4	B:5	B:6	B:7	B:8	B:9									
153.3345	145.0140	136.6935	145.0140	145.0140	136.6935	161.6550	145.0140							128.373	136.694	136.694	111.732	120.053	136.694	128.373	128.373	128.373

图3-1 A-B数据

Table format Grouped	Group A CON			Group B si		
	A:1	A:2	A:3	B:1	B:2	B:3
1 SREBP1	1.128279	1.079466	0.792217	0.454016	0.422551	0.344560
2 FASN	0.882924	1.045300	1.071776	0.397981	0.446269	0.392789

图3-2 D数据

Group A CON			Group B IR			Group C SI+IR		
A:1	A:2	A:3	B:1	B:2	B:3	C:1	C:2	C:3
153.7045001	208.777738	253.8377249	438.9680570	421.9867008	371.0426323	272.7749204	246.4198556	351.8401147

图3-2 A数据

Table format Grouped	Group A IR						Group B SI+IR					
	A:1	A:2	A:3	A:4	A:5	A:6	B:1	B:2	B:3	B:4	B:5	B:6
1 0	0.2172	0.2126	0.2039	0.2051	0.2093	0.2048	0.2052	0.2120	0.2011	0.2049	0.2030	0.1957
2 1	0.2312	0.2519	0.2428	0.2456	0.2527	0.2484	0.2308	0.2448	0.2454	0.2496	0.2423	0.2337
3 2	0.5168	0.4852	0.4645	0.4904	0.4671	0.4860	0.5152	0.4930	0.5138	0.4689	0.5028	0.5335
4 3	0.8725	0.8245	0.9154	0.9042	0.9461	0.8353	0.7711	0.7137	0.7429	0.7753	0.8383	0.7963

图2-1 数据

Group A HCT-8 CON							Group B HCT-8 24							
A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	A:Y7	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	B:Y7	B:Y8
237.6667	244.3333	247.6667	204.3333	231.0000	234.3333	197.6667	284.3333	257.6667	264.3333	291.0000	287.6667	281.0000	274.3333	267.6667

Group C HT29 CON							Group D HT29 24							
C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4	C:Y5	C:Y6	C:Y7	D:Y1	D:Y2	D:Y3	D:Y4	D:Y5	D:Y6	D:Y7	D:Y8
317.6667	327.6667	327.6667	337.6667	341	347.6667		379.8984	368.1852	375.9940	387.7072	375.9940	379.8984		

图2-2 2-3数据

X	Group A HCT-8SREBP1		Group B HCT-8FASN		Group C HCT-8SREBP2		Group D HCT-8HMGR		Group E HT29SREBP1		Group F HT29FASN		X	Group A HCT-8 AMPK	
K	A:Y1	A:Y2	B:Y1	B:Y2	C:Y1	C:Y2	D:Y1	D:Y2	E:Y1	E:Y2	F:Y1	F:Y2	X	A:Y1	A:Y2
0.0	1.000000		1.000000		1.000000		1.000000		1.00000		1.00000		0.0	1.000000000	
0.5	1.276761		1.471438		0.006763		0.041737		0.86948		0.40171		0.5	0.541590240	0.546900252
2.0	1.225099		1.359117		0.023012		0.147167		2.09493		1.29683		2.0	0.427595987	0.505617168
4.0	1.001725		1.064790		0.002422		0.015768		1.38365		1.05330		4.0	0.047301953	0.054308820
6.0	1.223710		1.289462		0.034423		0.107871		0.84527		0.83123		6.0	0.135484847	0.158190415

Group A HCT-8 0h SREBP1				Group B HCT-8 24h SREBP1				Group A HCT-8 0h FASN				Group B HCT-8 24h FASN			
A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	A:1	A:2	A:3	A:4	B:1	B:2	B:3	B:4
0.436773	0.744717	1.407058	1.411533	1.66849	3.15538	3.53230		0.870576	0.995300	1.134222	1.625552	1.704516	2.542267		

Group A HT-29 0h SREBP1			Group B HT-29 24h SREBP1			Group A HT-29 0h FASN			Group B HT-29 24h FASN		
A:1	A:2	A:3	B:1	B:2	B:3	A:1	A:2	A:3	B:1	B:2	B:3
0.955329	0.996269	1.039368	28.44262	30.69120		0.675728	0.808957	1.515333	17.36132	19.53075	

X	Group A HT-29 AMPK	
K	A:Y1	A:Y2
0.0	1.000000000	
0.5	0.709422231	0.711280968
2.0	0.940874798	0.940937181
4.0	0.314735000	
6.0	0.368828428	0.369476450

图1-1 A数据

Table format Grouped		Group A IR						Group B IR+TC							
	X	A:1	A:2	A:3	A:4	A:5	A:6	A:7	B:1	B:2	B:3	B:4	B:5	B:6	B:7
1	0	0.4179	0.4298	0.4126	0.3991	0.4247	0.4054		0.4124	0.4076	0.4138	0.4121	0.4068	0.3829	0.3930
2	1	0.5335	0.4764	0.5402	0.4822	0.5497	0.5162		0.6779	0.6504	0.7089	0.7374	0.6722	0.6167	
3	2	0.7540	0.8260	0.7385	0.8022	0.8262	0.8280		0.9065	1.0527	1.0735	0.9390	0.9254	1.0355	
4	3	1.0342	0.9175	1.0518	1.0075	0.9700			1.0954	1.1506	1.1904	1.1684	1.1360		

图1-1 B数据

Table format Grouped		Group A IR						Group B IR+TC					
	X	A:1	A:2	A:3	A:4	A:5	A:6	B:1	B:2	B:3	B:4	B:5	B:6
1	0	0.4945	0.4819	0.4796	0.4676	0.4598	0.4532	0.4755	0.4706	0.4626	0.4619	0.4587	0.4552
2	24	0.5253	0.5157	0.5041	0.4823	0.4804	0.4703	0.6043	0.5890	0.5610	0.5436	0.5380	0.5274
3	48	0.9049	0.8763	0.8494	0.8460	0.8094	0.8048	0.9649	0.9200	0.9159	0.9149	0.9078	0.9076
4	72	1.1452	1.1802	1.0617	1.0288	1.0625	1.1909	1.4717	1.4474	1.3573	1.3525	1.3303	1.3276

图1-3 A数据

Table format Grouped		Group A CON					Group B IR					Group C IR+TC				
	X	A:1	A:2	A:3	A:4	A:5	B:1	B:2	B:3	B:4	B:5	C:1	C:2	C:3	C:4	C:5
1	0	0.7018	0.5201	0.4303	0.4559	0.3989	0.1076	0.1246	0.1060	0.1514		0.1881	0.1514	0.1359	0.1819	

图4-2 A数据

X		Group A IR										Group B R+TVB-2640									
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	A:Y7	A:Y8	A:Y9	A:Y10	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	B:Y7	B:Y8	B:Y9	B:Y10
0	0	0.2391	0.2456	0.2422	0.2367	0.2710	0.2555	0.2824	0.2520	0.2520	0.2714	0.2883	0.2896	0.2760	0.2505	0.2795	0.2872	0.2715	0.2815	0.2713	0.2928
24	0.4709	0.4148	0.3927	0.4210	0.4814	0.4311	0.4291	0.4422	0.4886	0.4588	0.5097	0.4794	0.5252	0.4800	0.4368	0.4187	0.3720	0.4901	0.4286		
48	0.5859	0.6933	0.5253	0.5291	0.5104	0.5542	0.6324	0.5730			0.5346	0.4963	0.5394	0.4871	0.5832	0.4293	0.4700	0.4992	0.5082		
72	0.7596	0.6781	0.7881	0.7588	0.8187	0.8929	0.7796				0.5489	0.5208	0.6038	0.5401	0.5900	0.5803	0.6070	0.6381			

图4-4 A数据

X		Group A con						Group B IR						Group C IR+TVB-2640					
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4	C:Y5	C:Y6
10	18.8	18.6	17.6	20.3	18.6	20.6	17.0	17.0	17.6	16.5	17.2	18.9	18.7	17.4	16.7	17.2	18.1	17.4	
13	19.8	18.8	18.4	18.5	17.1		16.9	16.4	15.0	16.2	15.4	15.0	15.1	15.9	16.5	16.8	17.1	18.9	
16	18.2	17.5	17.4	17.8	17.4		14.4	14.5	14.3	15.4	15.7	15.0	15.9	16.0	16.9	16.1	15.1		
19	17.5	18.6	17.0	17.1	17.6		13.9	13.9	13.5	15.1	14.0		15.8	17.1	15.8	14.8	16.5		

图4-4 B数据

X		Group A CON						Group B RT						Group C TVB2640					
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4	C:Y5	C:Y6
0	0.000000							0.000000						0.000000					
5	83.788840	24.012800	91.929740	45.156250	66.960000	90.865820	53.902350	47.717150	78.000000	114.907700	89.015380	45.529780	95.1698200	55.5874600	82.5979500	52.2990300	68.6940500	94.0334600	
10	381.389100	318.791600	335.176700	269.461800	555.000000	470.696300	234.896800	147.378800	186.964600	178.425400	161.405900	164.304000	113.6253000	106.5024000	127.3234000	190.4099000	123.4698000	96.0757900	
13	528.852416	441.787392	293.773696	488.298302	514.928815		216.076113	118.002314	332.187642	213.257952	149.221538	216.295487	74.6494965	294.4136120	122.8658735	129.5279840	104.5048980	155.9539665	
16	776.051600	538.110600	604.419700	491.503200	643.316900		146.174100	181.652900	231.282200	165.548400	172.592200	419.746300	145.3125000	88.2183300	42.1523200	109.8737000	161.2584000	218.2737000	
19	734.241500	625.552500	560.077100	748.000000	514.382000		176.569600	239.154000	412.551800	296.406700	161.333200	167.427400	42.1523200	153.3446000	165.5252000	89.9654300	110.4619000	216.7630000	

图4-4 D数据

		Group A con						Group B IR						Group C R+TVB-2640					
		A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	A:Y6	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5	B:Y6	C:Y1	C:Y2	C:Y3	C:Y4	C:Y5	C:Y6
		0.7593	1.1045	0.9196	0.8730	0.3827		0.2892	0.1886	0.4315	0.8751	0.2960	0.2359	0.0655	0.0650	0.1622	0.2388	0.1120	0.2145

攻读学位期间发表的论文

一、发表的论文

1. **Jin Y.**, Chen Z., Dong J., Wang B., Fan S., Yang X., Cui M. SREBP1/FASN/cholesterol axis facilitates radioresistance in colorectal cancer. *FEBS open bio.* 2021. 11:1343-1352.
2. Wang B., Dong J., Xiao H., Li Y., **Jin Y.**, Cui M., Zhang S.Q., Fan S.J. Metformin fights against radiation-induced early developmental toxicity. *The Science of the total environment.* 2020; 732: 139274.
3. Zhang S., Wang B., Xiao H., Dong J., Li Y., Zhu C., **Jin Y.**, Li H., Cui M., Fan S. LncRNA HOTAIR enhances breast cancer radioresistance through facilitating HSPA1A expression via sequestering miR-449b-5p. *Thoracic cancer.* 2020; 11: 1801-1816.

二、荣誉奖励

1. 2018-2019学业奖学金三等奖
2. 2019-2020学业奖学金三等奖
3. 2019-2021学业奖学金三等奖
4. 2020年参与苏州大学附属第二医院举办的“2020年核技术医学应用学术交流会”时获得优秀论文二等奖

致 谢

时光荏苒，转眼间三年已过去。三年的时间里有不少遗憾，但过得很充实。

这三年里，感谢我的老师杨晓东教授。感谢您给了我读研究生的机会。回想第一次见到您的时候，您就很仔细的帮我分析以后做科研的路该怎么走。三年时间中的我两年半时间在天津放射医学研究所学习，其实能见到您的机会并不多。但是在这几年中，您时常从网上给我分享重要的文献，在科研上给予我灵感及指导。更让我感动的是，您多次在我科研中遇到困难时，从苏州来到了1000多里外的天津，与这边老师探讨我接下去的工作该如何展开。在这三年中，无论是科研上、还是生活上，您都给予我很大的帮助。

我还要感谢樊赛军教授给予我机会来放射所学习，为我提供了一个良好的平台。在刚来到研究所的时候，您就和我详细的聊了我在实验室需学会的技术。您的和蔼可亲深深触动了我。在天津的这几年，您时常找我聊我目前的科研工作，也时常关心我是否适应天津的生活。您作为国内知名的教授，是我的榜样。未来我也会朝这个方向而努力！

我另外感谢的是崔明老师，您和我老师一样给我很大的帮助。是您在我科研不顺利时，替我分析问题，指导我应该如何调整实验方法。您和我老师在我这三年的科研生活中无论是生活上还是工作上都给予我很大帮助。您和我老师让我知道，只有不断提升自我，才真正有资格做一个救死扶伤的医生。

然后感谢我以前的大学同学，是你们使我在升学与工作之间坚定了自己的信念。

在天津的这几年里，碰到了许多的困难。在这里，我感谢我的好朋友王滨。刚到所里的时候我一个人都不认识，由于与这边师兄师姐们不熟悉、以及自己的在做事方面的粗心大意，感觉自己很难融入到这个集体中！你对于我这两年的改变是至关重要的，感谢你将从师兄师姐以及老师们获得的很多实验技术和经验分享给我。对于我难以融入到这个集体中，感谢你常常提醒我要在自己查阅文献和相关知识后，带着自己的想法去向老师和师兄师姐们请教。你对我来说亦师亦友！

我还要感谢张书琴老师。我刚来天津的时候，感到迷茫和不知所措，是您和王滨帮助我融入救治室的这个大家庭。当我工作上有压力的时候，是您和王滨倾听我的烦

恼，让我能坚定走下去。

另外我要感谢董佳丽师姐、肖惠文师姐、陈志远师兄、李源师姐。虽然研究工作很辛苦、我感觉压力很大和很枯燥，同时也碰到了很多的困难。但是因为你们的帮助，我顺利渡过难关。感谢你们在工作上对我的帮助和指导、感谢你们在生活中对我的热情和帮助。

最后，我要感谢我的父母。感谢你们这些年来的养育与支持。感谢你们对我的任性的包容。从医之路漫长而艰辛，感谢你们的默默奉献。望身体安康！

2021年3月4号

于天津

学位论文答辩委员会决议

- 包括：1、对论文的评价，包括选题的理论价值和实践意义，论文理论、方法上的开拓与创新，论据的可靠充分与结论的正确性；论文所反映的作者学术视野（对本学科及相关领域研究动态的把握）、基础理论、专业知识、写作能力等；
- 2、对答辩的评价；
- 3、是否同意通过论文答辩，是否建议授予学位或是否建议在规定时间内修改论文后重新答辩一次的结论。

论文《SREBP1/FASN/胆固醇合成途径抑制剂对结直肠癌细胞增殖的影响》通过体内外实验，研究胆固醇与结直肠癌细胞增殖敏感性的关系，结果显示：1、外源性胆固醇促进CRC细胞增殖，抑制FASN/胆固醇合成途径抑制剂对CRC细胞增殖的促进作用。2、CRC细胞增殖与胆固醇合成途径抑制剂对CRC细胞增殖的促进作用呈负相关。3、抑制SREBP1/FASN后胆固醇合成量下降，抑制SREBP1或FASN后胆固醇合成量下降，抑制SREBP1或FASN后胆固醇合成量下降，抑制SREBP1或FASN后胆固醇合成量下降。

表明：1、外源性胆固醇和CRC细胞增殖细胞内胆固醇合成途径抑制剂对CRC细胞增殖的促进作用。2、靶向SREBP1和FASN抑制CRC细胞增殖和细胞内胆固醇合成，提高CRC细胞的增殖敏感性。

论文设计合理，立意新颖，研究方法正确，数据准确，结果可靠，答辩思路清晰，回答问题合理、恰当。该论文达到苏州大学硕士学位论文的要求，答辩委员会通过无记名投票（3/3票），一致通过论文答辩，建议苏州大学学位评定委员会授予学术型硕士学位。

答辩委员会主席（签名）： 王亚东 秘书（签名）： 浦玉伟

委员（签名）： 吴俊、 刘通

2021年5月26日

答辩委员会表决结果

答辩委员会	3 人	出席委员	3 人
同意论文答辩通过	3 人	不同意论文答辩通过	0 人
建议授予硕士学位	3 人	不建议授予硕士学位	0 人
建议在规定时间内修改论文后重新答辩一次	0 人	不建议在规定时间内修改论文后重新答辩一次	0 人

注：表决票由院系存档，保留三年。