

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2019.01.017

二甲双胍通过调控 STAT3 的表达抑制 头颈部肿瘤转移机制的研究

吴丹丹,裴丽丽,李冰艳,吴 瑕

(南京医科大学康达学院基础医学部,江苏 连云港 222000)

[摘要] 探讨二甲双胍是否通过调控 STAT3 的表达抑制头颈部肿瘤的 EMT 和迁移。在头颈部肿瘤 686LN 细胞株上给予二甲双胍处理,Western blot 检测上皮-间叶样转化(EMT)相关蛋白的表达;通过 Transwell 实验检测二甲双胍对头颈部肿瘤细胞迁移能力的影响;在高转移特性的头颈部肿瘤细胞株和配对的低转移特性的细胞株上,检测 STAT3 蛋白表达;用脂质体转染 STAT3 的小干扰 RNA,检测头颈部肿瘤 EMT 相关蛋白的表达;在 686LN 上给予 IL-6 处理或者给予二甲双胍处理或者同时给予 IL-6 和二甲双胍处理,检测 STAT3 蛋白和 EMT 相关蛋白表达;以及通过 Transwell 实验检测二甲双胍对 IL-6 诱导的细胞迁移的影响。结果显示,给予二甲双胍处理,抑制头颈部肿瘤的 EMT,并且细胞迁移能力减弱。STAT3 磷酸化和总蛋白在高转移特性的头颈部肿瘤细胞株高表达。转染 STAT3 siRNA 抑制 STAT3 的表达可抑制头颈部肿瘤的 EMT。二甲双胍抑制 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平升高,抑制 IL-6 诱导的 EMT,同时二甲双胍抑制 IL-6 诱导的细胞迁移。结论说明,二甲双胍抑制头颈部肿瘤 EMT 和细胞迁移,并且能抑制 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平升高,其抑制头颈部肿瘤迁移作用机制可能与下调 STAT3 的磷酸化水平有关。

[关键词] 二甲双胍,STAT3,头颈部肿瘤,IL-6

[中图分类号] 739.91 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2019)01-0107-06

Metformin Inhibits the Metastasis of Head and Neck Cancer by Regulating the Expression of STAT3

Wu Dandan, Pei Lili, Li Bingyan, Wu Xia

(Kangda College of Nanjing Medical University, Department of Basic Medicine, Lianyungang 222000, China)

Abstract: To study whether metformin can inhibit the epithelial-mesenchymal transition and migration of head and neck cancer by regulating the expression of STAT3. Metformin was given on the head and neck cancer 686LN cell line and Western blot was used to detect related protein of epithelial-mesenchymal transition (EMT). The effect of metformin on head and neck cancer cell migration was determined by transwell assay. Western blot analysis was used to detect the expression of STAT3 in a highly metastatic head and neck cancer cell line and a paired low metastatic cell line. STAT3 siRNA transfected in head and neck cancer to detect the effect of STAT3 on EMT. Western blot analysis was used to detect the expression of STAT3 and EMT related protein in 686LN cells treated with IL-6 or metformin. The effect of metformin on cell migration induced by IL-6 by transwell assay. The EMT and the cell migration ability were inhibited in 686LN cells treated with metformin. The expression of STAT3 phosphorylation and total protein in high level in the highly metastatic head and neck cancer cell line. Transfection of STAT3 siRNA inhibited the expression of STAT3 could inhibit the EMT of head and neck cancer. Metformin inhibited IL-6 mediated STAT3 phosphorylation and inhibits IL-6 induced EMT, while metformin inhibited IL-6 induced cell migration. The results showed that, metformin inhibited EMT and cell migration, and can inhibit IL-6 mediated STAT3 phosphorylation in head and neck cancer, which inhibited the metastasis of head and neck cancer may be related to the downregulation of the phosphorylation level of STAT3.

Key words: metformin, STAT3, head and neck cancer, IL-6

收稿日期:2018-10-16.

基金项目:国家自然科学基金(30873099)、南京医科大学康达学院科研发展基金(KD2016KYJJZD005).

通讯联系人:吴丹丹,硕士,讲师,研究方向:肿瘤药理. E-mail:wutongchuan@163.com

二甲双胍是一类双胍类抗糖尿病药物,主要通过减少葡萄糖在肠道的吸收,降低肝脏葡萄糖的产生,增加葡萄糖在骨骼肌和脂肪组织的摄取和利用发挥作用.近年来临床研究和流行病学资料显示,二甲双胍可能作为一种新型的多方位的药物来预防和治疗肿瘤^[1].国外研究发现,二甲双胍能抑制 Her-2 阳性乳腺癌细胞转移^[2].国内也有相关报道,二甲双胍能够抑制人结肠癌细胞株 SW480 转移^[3];薛知新等^[4]也证实二甲双胍可以抑制 AGS 胃癌细胞增殖、迁移等.上述研究提示,二甲双胍能够抑制肿瘤细胞的转移.

信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)蛋白家族是可以被白细胞介素类、生长因子类及某些癌蛋白等多种细胞因子受体激活的一组蛋白.其中,STAT3 是人类恶性肿瘤中最常见被激活的 STAT 家族成员,因为它参与了多种肿瘤的致癌信号通路和胞内信号转导通路,并可以被多个促炎因子和生长因子活化^[5].STAT3 的异常活化改变受这一转录因子调控的各种基因表达,包括凋亡调控基因,如 Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xl、存活素(survivin)^[6]、Fas^[7]和凋亡蛋白 X 染色体相关抑制剂(XIAP)^[8];还有些细胞生存基因,如细胞周期蛋白 D1、D2 和 B1^[9]、myc^[10]、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21^[9].持续激活 STAT3 也上调 MMPs 的表达^[8],介导肿瘤侵袭转移^[11].因此,深入研究 STAT3 在肿瘤转移过程中的作用机制,针对 STAT3 进行靶向干预可能成为肿瘤治疗的一个有效途径.

多种转录因子如 Snail/Slug 家族、Twist、相互作用蛋白(SIPI)、TGF- β 、Wnt/ β -连锁蛋白(β -catenin)及 Notch 等信号通路单独或相互作用,参与促进肿瘤细胞 EMT 的发生^[12].研究发现,二甲双胍可以通过抑制 IL-6 介导的 STAT3 酪氨酸磷酸化,进而抑制肺腺癌细胞 EMT 过程^[13].但是,二甲双胍通过调控 STAT3 抑制头颈部肿瘤转移尚未有明确报道.

本文首先研究了二甲双胍对头颈部肿瘤 EMT 和细胞迁移影响,接着对比了高转移特性的头颈部肿瘤细胞株和配对的低转移特性的细胞株上 STAT3 磷酸化及总蛋白水平的表达,并研究了二甲双胍是否通过调控 STAT3 影响头颈部肿瘤的转移.探讨侵袭转移的可能机制,为肿瘤的靶向治疗提供依据.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

DMEM/F12 培养基购自 HyClone 公司;0.25%胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Transwell 细胞培养小室(8 μ m 孔径)和 PVDF 膜(Polyvinylidene Fluoride)购自美国 Millipore 公司;Lipofectamine TM 2000 购自美国 Invitrogen 公司;Stat3 siRNA 试剂购自上海吉玛制药技术有限公司;二甲双胍购自 Beyotime Biotechnology;人重组白介素-6(rHuIL-6)购自美国 Bioworld 公司;E-cadherin(R868)pAb, N-cadherin(W745)pAb, β -actin mAb 和 GAPDH pAb 抗体均购自美国 Bioworld 公司;Vimentin 兔多克隆抗体和 SNAI1 兔多克隆抗体购自美国 Proteintech Group 公司;p-STAT3(Tyr705)和 STAT3 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的二抗均购于美国 R&D 公司;PageRulerTM Prestained Protein Ladder 购自美国 Thermo Scientific 公司.

其余未详细说明试剂皆为分析纯级别.

1.1.2 试剂配制

30%丙烯酰胺凝胶液:丙烯酰胺 29 g,双丙烯酰胺 1 g,加纯水溶解定容至 100 mL,4 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.5 mol/L Tris(pH 8.8):45.43 g Tris-base,200 mL 纯水溶解,用 HCl 调 pH 值至 8.8,最后定容至 250 mL.

0.5 mol/L Tris(pH 6.8):15.14 g Tris-base,200 mL 纯水溶解,用 HCl 调 pH 值至 6.8,最后定容至 250 mL.

10% SDS:10 g SDS 加纯水定容至 100 mL,室温储存.

10% APS:0.05 g APS,加入 500 μ L 双蒸水溶解,4 $^{\circ}$ C 避光储存 1 周.

6 \times 电泳上样缓冲液:30 mL 1 mol/L Tris(pH 6.8),6 mL β -巯基乙醇,12 g SDS,0.025 g 溴酚蓝,加入甘油 60 mL 溶解后分装,-20 $^{\circ}$ C 保存.

考马斯亮蓝溶液:考马斯亮蓝 G-250 0.1 g,95%乙醇 50 mL,85%磷酸 100 mL,去离子水定容至 1 000 mL,滤纸过滤.

1 \times PBST:PBS 1000 mL,加 500 μ L Tween-20,混匀.

5%脱脂奶:2 g 脱脂奶粉,加入 40 mL PBST 混匀.

1.2 实验方法

1.2.1 686LN 和 686LN-M4e 细胞的培养

686LN,686LN-M4e 细胞在 37 °C、5%(v/v) CO₂、饱和湿度的条件下,在含 10%的胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中培养. 常规细胞培养,待细胞生长融合度达 80%~90%时,用 0.25%胰酶消化传代,每 3 d 传一代.

1.2.2 肿瘤细胞迁移实验

按 Transwell 小室说明书操作,细胞消化重悬于无血清 DMEM/F12 培养基,并以 5×10^4 密度接种于 24 孔板 Transwell 上室(体积为 0.4 mL),下室中加入 0.6 mL 培养过 3T3 细胞的条件诱导培养基(3T3 细胞融合度达到 80%~90%时,PBS 清洗 2 次,加入条件培养基并在培养箱内孵育过夜). 继续培养 24 h 后,取出小室,PBS 洗 3 次,用棉签擦去小室上侧的细胞,用甲醇固定 30 min,晾干后 0.1%结晶紫染色 30 min,在光镜下观察并统计穿过滤膜位于膜下侧的(发生迁移的细胞)细胞数.

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达

细胞提取总蛋白,考马斯亮蓝法测蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,恒定电压 150 V,转膜(PVDF 膜)3 h,5%脱脂牛奶封闭 1.5 h,一抗 37 °C 孵育 2 h,再 4 °C 平摇过夜,次日,待一抗孵育结束后把膜用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,后孵育二抗,室温孵育 2 h. 二抗孵育结束后,PVDF 膜用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min. ECL 发光和显影. 具体方法见文献^[14].

1.2.4 细胞 siRNA 瞬时转染实验

转染前一天,观察细胞状态,选取生长状态良好的细胞,胰酶消化,以 5×10^5 接种至六孔板中(使用不含抗生素的完全培养基),24 h 内待细胞融合度达 80%~90%时按 Lipofectamine TM 2000 说明书进行转染. 6 h 后吸去培养液,换成含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养. 转染 48 h 后提取细胞内总蛋白,采用 Western blot 的方法检测蛋白水平变化.

1.2.5 统计学分析

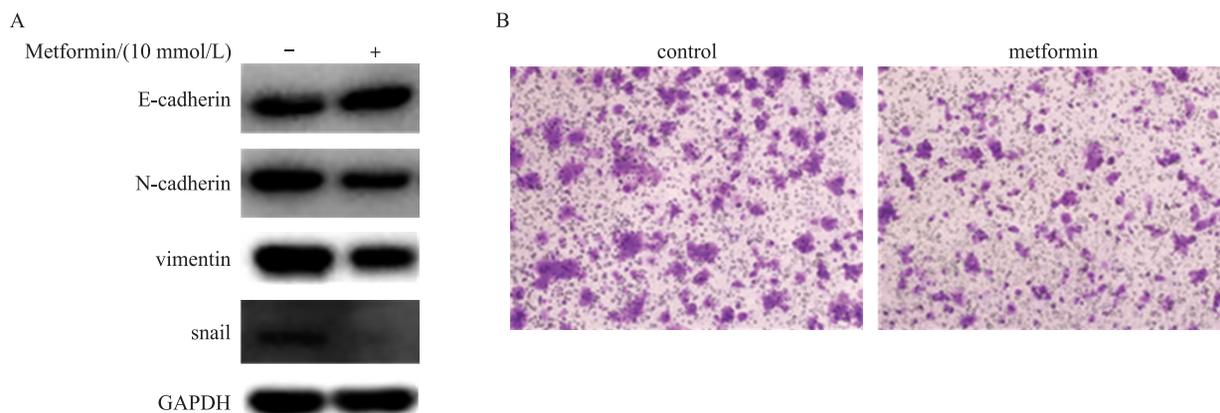
所有结果均采用 GraphPad InStat5 统计软件进行统计. *P* 值小于 0.05 定义为有统计学意义.

2 结果

2.1 二甲双胍抑制 EMT 和细胞迁移

首先,在 686LN 细胞株上给予二甲双胍处理 48 h,Western blot 检测 EMT 相关指标,结果显示,与对照组相比,E-cadherin 表达增多,而 N-cadherin、vimentin 及调控 E-cadherin 表达的转录因子 snail 表达减少(图 1A),结果提示二甲双胍抑制 EMT.

接着按前述方法进行 Transwell 实验,将 686LN 细胞种于小室的上室内,在小室外侧加入条件诱导培养基或加了二甲双胍的条件诱导培养基,24 h 后固定、染色,显微镜观察穿入下室中的细胞数目. 结果显



A.686LN 细胞给予 10 mmol/L 的二甲双胍处理 48 h,Western blot 法检测 EMT 相关蛋白表达. B.细胞重悬于无血清培养基,并以 5×10^4 密度接种于 24 孔板 Transwell 上室(体积为 0.4 mL),外侧加入条件诱导培养基或加了二甲双胍的条件诱导培养基,24 h 后固定、染色,显微镜观察穿入下室中的细胞数目.

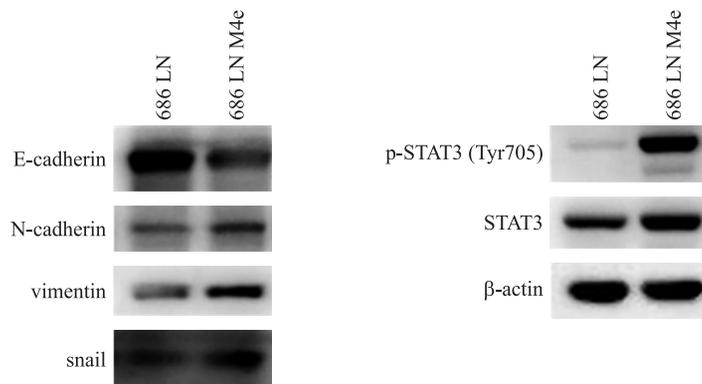
图 1 二甲双胍抑制上皮-间叶样转化(EMT)和细胞迁移

Fig. 1 Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition(EMT) and cell migration

示,加了二甲双胍组下室中的细胞数比对照组明显减少(图 1B),提示二甲双胍抑制细胞迁移。

2.2 STAT3 在高转移特性的头颈部肿瘤细胞株中的表达高于低转移特性的细胞株

以往研究表明 STAT3 与多种肿瘤的侵袭转移相关,为了明确 STAT3 在头颈部肿瘤侵袭转移中的作用,本研究在高转移特性的 686LN-M4e 和配对的低转移特性细胞株 686LN 中对比了 STAT3 的蛋白表达情况。Western blot 结果显示,STAT3 在高转移特性的 686LN-M4e 中的表达量显著高于低转移特性细胞株 686LN(图 2)。



686LN 细胞和 686LN 细胞种于 10 cm 培养皿 24 h,用 Western blot 检测蛋白相关表达。

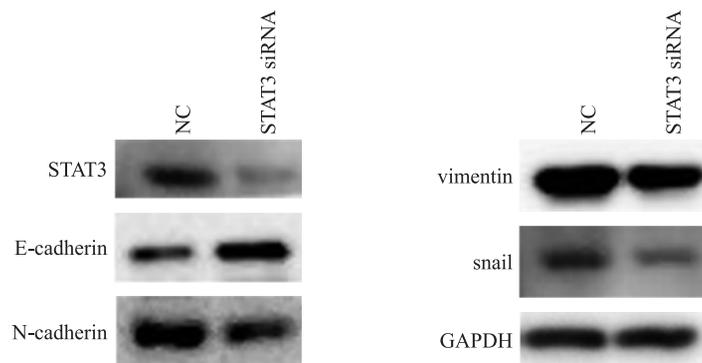
图 2 STAT3 在高转移特性的头颈部肿瘤细胞株中的表达高于低转移特性的细胞株

Fig. 2 Expression of STAT3 in head and neck cancer with high metastatic characteristics was higher than that low metastatic characteristics cells

同时在高转移特性细胞株 686LN-M4e(STAT3 高表达)和低转移特性细胞株 686LN(STAT3 低表达)中检测 EMT 相关指标。结果显示,高转移特性细胞株 686LN-M4e(STAT3 高表达)E-cadherin 低表达,N-cadherin、vimentin 及 snail 高表达,而在低转移特性细胞株 686LN(STAT3 低表达)中则 E-cadherin 高表达,而 N-cadherin、vimentin、snail 低表达(图 2)。这些结果在蛋白水平验证了 EMT 可能参与促进了头颈部肿瘤的侵袭转移。这与之前的研究一致^[15]。

2.3 阻抑 STAT3 的表达抑制头颈部肿瘤的 EMT

为了进一步研究 STAT3 是否促进 EMT,本实验阻抑 STAT3 的表达检测对 EMT 的影响。首先在 686LN 细胞瞬时转染 STAT3 的 siRNA,Western blot 结果显示,STAT3 的表达降低了约 90%,E-cadherin 表达增多,而 N-cadherin、vimentin 及 snail 表达减少(图 3)。上述结果提示阻抑 STAT3 的表达能抑制头颈部肿瘤的 EMT。



686LN 细胞转染 STAT3 siRNA 和 NC siRNA 后,再正常培养 48 h,Western blot 检测相关蛋白表达。

图 3 阻抑 STAT3 的表达抑制头颈部肿瘤的 EMT

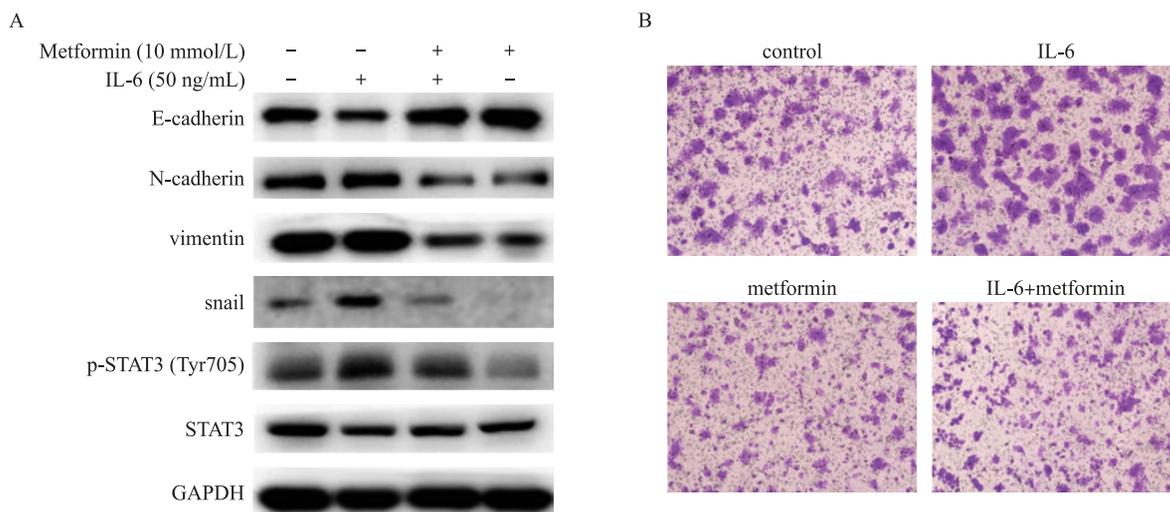
Fig. 3 Transfection of STAT3 siRNA inhibited the expression of STAT3 could inhibit the EMT of head and neck cancer

2.4 二甲双胍抑制 STAT3 的磷酸化和 IL-6 介导 EMT 和细胞迁移

STAT3 是白介素 6(Interleukin-6,IL-6)主要的下游信号分子,在 686LN 细胞株上给予 IL-6 和二甲双胍处理 48 h,Western blot 检测相关蛋白,结果显示,与对照组相比,IL-6 组 p-STAT3(Tyr705)表达增高,二甲双胍

组表达减少,IL-6+二甲双胍组表达未有明显增加(图 4A)。结果提示,二甲双胍抑制 STAT3 的磷酸化和 IL-6 介导的 STAT3 的磷酸化。同时检测 EMT 等相关指标,与对照组相比,IL-6 组 E-cadherin 表达减少,二甲双胍组表达增加,IL-6+二甲双胍组表达未见明显变化;IL-6 组 N-cadherin、vimentin 表达增高,二甲双胍组表达都减少,IL-6+二甲双胍组表达减少;IL-6 组 snail 表达增高,二甲双胍组表达减少,IL-6+二甲双胍组表达未有明显变化(图 4A)。以上结果提示,二甲双胍通过调控 STAT3 抑制头颈部肿瘤的 EMT。

最后,按前述方法进行 Transwell 实验,将 686LN 细胞分别种于小室的上室内,外侧加入条件诱导培养基或加了二甲双胍或加了 IL-6 的条件诱导培养基,24 h 后固定、染色,显微镜观察穿入下室中的细胞数目,结果显示,与对照组相比,IL-6 组细胞数目增加,二甲双胍组细胞数目减少,IL-6+二甲双胍组细胞数目减少(图 4B)。结果提示,二甲双胍抑制 IL-6 介导的细胞迁移。



A.686LN 细胞给予 50 ng/L 的 IL-6 和二甲双胍处理 48 h,Western blot 检测相关蛋白水平. B.细胞重悬于无血清培养基,并以 5×10^4 密度接种于 24 孔板上室(体积为 0.4 mL),外侧加入条件诱导培养基或加了二甲双胍或加了 IL-6 的条件诱导培养基,24 h 后固定、染色,显微镜观察穿入下室中的细胞数目.

图 4 二甲双胍抑制 STAT3 的磷酸化和 IL-6 介导 EMT 和细胞迁移

Fig. 4 Metformin inhibited EMT and cell migration, and can inhibit IL-6 mediated STAT3 phosphorylation in head and neck cancer

3 讨论

近年来研究发现,EMT 可以通过多种机制和途径参与肿瘤的发生和发展,促进肿瘤细胞的迁移、侵袭^[16]。头颈部肿瘤是常见恶性肿瘤,其中 95% 以上为鳞状细胞癌。多数患者确诊此病时已是晚期并伴随转移,因此需要研究在头颈部肿瘤转移中起关键作用的信号分子及其作用机制,为诊断和治疗提供有效的依据。

二甲双胍是一种临床上广泛使用的双胍类降糖药物,具有毒性小,可长期应用的特点,主要用于 2 型糖尿病的治疗^[17]。最新的研究进展提示,二甲双胍能抑制多种恶性肿瘤的 EMT 进程,从而影响肿瘤进展及预后^[18]。因此,研究阐明二甲双胍的抑制肿瘤转移的作用和机制可为肿瘤的治疗提供新的方向,具有重要的理论意义和临床应用价值。本研究首先证明了二甲双胍能抑制头颈部肿瘤的 EMT 和细胞迁移。

STAT3 信号通路的激活促成了肿瘤炎性微环境的形成,参与肿瘤血管生成、上皮间质转化和细胞外基质降解等多个环节,在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用。研究发现,STAT3 在高转移特性的 686LN-M4e 中的表达量显著高于低转移特性细胞株 686LN,并且发现阻抑 STAT3 的表达抑制了头颈部肿瘤的 EMT。STAT3 是 IL-6 主要的下游信号分子,研究发现,二甲双胍抑制 STAT3 的磷酸化和 IL-6 介导的 EMT 和细胞迁移。因此推测二甲双胍通过抑制 IL-6 下调 STAT3 的表达,从而抑制了头颈部肿瘤的转移。然而二甲双胍抑制 IL-6 的机制尚不明确,需要进一步研究。

[参考文献]

[1] BAUR D M, KLOTSCHKE J, HAMNVIK O P, et al. Type 2 diabetes mellitus and medications for type 2 diabetes mellitus are

- associated with risk for and mortality from cancer in a German primary care cohort[J]. *Metabolism: clinical and experimental*, 2011, 60(10): 1363–1371.
- [2] CHEN T W, LIANG Y N, FENG D, et al. Metformin inhibits proliferation and promotes apoptosis of HER2 positive breast cancer cells by downregulating HSP90[J]. *Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 2013, 18(1): 51–56.
- [3] 朱智峰, 梁琳琅. 二甲双胍对结肠癌细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(2): 51–56.
- [4] 薛知新, 钟捷, 赵丹瑜, 等. 二甲双胍对 AGS 胃癌细胞生长侵袭的抑制作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(19): 1974–1978.
- [5] SIVEEN K S, SIKKA S, SURANA R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, 1845(2): 136–154.
- [6] ZHANG X, ZHANG J, WEI H, et al. STAT3-decoy oligodeoxynucleotide inhibits the growth of human lung cancer via down-regulating its target genes[J]. *Oncology reports*, 2007, 17(6): 1377–1382.
- [7] DARNELL J E. STATs and gene regulation[J]. *Science*, 1997, 277(5332): 1630–1635.
- [8] WANG X H, LIU B R, QU B, et al. Silencing STAT3 may inhibit cell growth through regulating signaling pathway, telomerase, cell cycle, apoptosis and angiogenesis in hepatocellular carcinoma: potential uses for gene therapy[J]. *Neoplasma*, 2011, 58(2): 158–171.
- [9] BOLLRATH J, PHESSÉ T J, VON BURSTIN V A, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis[J]. *Cancer cell*, 2009, 15(2): 91–102.
- [10] KIUCHI N, NAKAJIMA K, ICHIBA M, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene[J]. *Journal of experimental medicine*, 1999, 189(1): 63–73.
- [11] ASGEIRSSON K S, OLAFSDOTTIR K, JONASSON J G, et al. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer[J]. *Cytokine*, 1998, 10(9): 720–728.
- [12] 杨佳华, 刘颖斌, 董平. 上皮间质细胞转化与肿瘤细胞侵袭转移的关系[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(8): 572–574.
- [13] ZHAO Z, CHENG X, WANG Y, et al. Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis[J]. *PloS one*, 2014, 9(4): e95884.
- [14] KASTRITIS E, CHARIDIMOU A, VARKARIS A, et al. Targeted therapies in multiple myeloma[J]. *Targeted oncology*, 2009, 4(1): 23–36.
- [15] WU D, CHENG J, SUN G, et al. p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 36539–36550.
- [16] IWATSUKI M, MIMORI K, YOKOBORI T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance[J]. *Cancer science*, 2010, 101(2): 293–299.
- [17] BAILEY C J, TURNER R C. Metformin[J]. *The New England journal of medicine*, 1996, 334(9): 574–579.
- [18] SIKKA A, KAUR M, AGARWAL C, et al. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation[J]. *Cell cycle*, 2012, 11(7): 1374–1382.

[责任编辑:黄敏]