文章编号:1000-5404(2013)13-1337-04

论著

二甲双胍抑制 IL-6 诱导的 LNCaP 增殖及上皮-间质转化

章国亮[1],姜 庆[1],江 军[2] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 初步探讨二甲双胍抑制前列腺癌发展的作用。**方法** 使用慢病毒感染构建 IL-6 过表达细胞株 LNCaP-IL-6(IL-6 过表达病毒转染)和 LNCaP-ctr(空病毒转染),运用激光共聚焦扫描确定转染效果,ELISA 检测 LNCaP、LNCaP-IL-6 和 LNCaP-ctr 细胞 IL-6 分泌水平,倒置显微镜观察细胞形态。实验分为 LNCaP-ctr 组、LNCaP-IL-6 组、LNCaP-ctr + 二甲双胍组和 LNCaP-IL-6 + 二甲双胍组,MTT 技术检测相对细胞数量,流式细胞技术检测二甲双胍对细胞周期的影响。实验分为 LNCaP-IL-6 和 LNCaP-IL-6 + 二甲双胍组,运用细胞迁移实验检测两组细胞迁移速度,Western blot 技术检测两组细胞 TWIST 和 E-Cadherin 表达水平。**结果** 激光共聚焦扫描和 ELISA 检测证明 IL-6 过表达细胞株 LNCaP-IL-6 构建成功,LNCaP-IL-6 细胞 IL-6 分泌水平约为 LNCaP-ctr 的 5 000 倍。MTT 实验显示第 5 天 LNCaP-IL-6 相对细胞数量约为 LNCaP-ctr 的 1.4 倍,处理组的 LNCaP-IL-6 相对细胞数量约为 LNCaP-ctr 的 1.6 倍;流式细胞仪检测显示二甲双胍阻滞 LNCaP 的细胞周期为 S 期。细胞形态学观察和 Western blot 检测证实 IL-6 诱导 LNCaP 发生上皮-间质转化,细胞迁移实验显示二甲双胍可抑制 LNCaP-IL-6 细胞的迁移,Western blot 进一步证实二甲双胍降低 LNCaP-IL-6 TWIST 表达及升高 E-Cadherin 表达。**结论** 二甲双胍能够抑制 IL-6 诱导的 LNCaP 细胞的上皮-间质转化。

[关键词] 前列腺癌;二甲双胍;上皮-间质转化;LNCaP
[中图法分类号] R392.3; R737.25; R977.15 [文献标志码] A

Metformin inhibits IL-6-induced LNCaP proliferation and epithelial-mesenchymal transition

Zhang Guoliang[1], Jiang Qing[1], Jiang Jun[2] ([1]Department of Urology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of metformin on prostate cancer development. **Methods** Lentivirus transfection was used to construct a LNCaP cell line with stable over-expression of interleukin 6 (IL-6)(LNCaP-IL-6), and LNCaP cells transfected with normal lentivirus were used as control (LNCaP-ctr). Laser scanning confocal microscopy and ELISA were used to confirm IL-6 over-expression in the LNCaP cell line. The morphology of the cells was observed under an inverted microscope. The following experiments were carried out in the four groups: LNCaP-ctr group, LNCaP-ctr with metformin group, LNCaP-IL-6 group and LNCaP-IL-6 with metformin group. MTT assay was used to detect cell relative number, flow cytometry was used to analyze cell cycle, and wound healing assay was used to detect the invasive ability of LNCaP-IL-6. Western blotting was used to detect E-Cadherin and TWIST expression levels in LNCaP-ctr cells and LNCaP-IL-6 cells. **Results** Laser scanning confocal microscopy and ELISA confirmed that the LNCaP-IL-6 cells were successfully constructed, and the secretion level of IL-6 in LNCaP-IL-6 cells was 5 000 times more than that in LNCaP-ctr cells. MTT assay indicated that the relative number of LNCaP-IL-6 cells was 1.4 times as much as that of LNCaP-ctr cells, and was 1.6 times as much as that in the LNCaP-IL-6 with metformin group after cultured for 5 d. Flow cytometry results indicated that LNCaP cell cycle was arrested at S phase. Morphology observation and Western blot analysis showed epithelia-mesenchymal transition in LNCaP-IL-6 cells. Wound

[基金项目] 国家自然科学基金(81172442);重庆市国际科技合作项目(2011GZ0047)
[通信作者] 姜 庆,E-mail:jq001002@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1612.013.html(2013-04-10)

healing assay proved that metformin inhibited LNCaP-IL-6 migration. Western blot analysis showed metformin could decrease TWIST expression and increase E-Cadherin expression. **Conclusion** Metformin reverses IL-6-induced EMT in LNCaP cells.

[**Key words**] prostate cancer; metformin; epithelial-mesenchymal transition; LNCaP

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81172442), and the International Cooperation Project of Chongqing (2011GZ0047). Corresponding author: Jiang Qing, E-mail: jq001002@sina.com

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是前列腺癌进展的重要机制之一。新近研究表明IL-6在前列腺癌的进展中起重要作用[1]。二甲双胍是治疗2型糖尿病常用的药物之一,具有潜在的抗癌作用,流行病学研究显示服用二甲双胍的糖尿病患者患癌风险低于未服药者,服用二甲双胍的癌症患者预后也好于未服用者[2]。二甲双胍被证明在体外能杀死多种癌细胞[3-4]。本研究通过构建IL-6过表达前列腺癌LNCaP细胞株(IL-6过表达病毒转染,LNCaP-IL-6),检测IL-6对LNCaP增殖的调节作用,结合细胞形态学观察和Western blot检测,证实IL-6诱导LNCaP上皮-间质转化作用。用2 mmol/L二甲双胍处理LNCaP-ctr和LNCaP-IL-6,检测二甲双胍是否逆转IL-6诱导的LNCaP的增殖优势和上皮-间质转化,探索二甲双胍抗前列腺癌的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养基、胎牛血清、胰酶、PBS均购自HyClone公司,慢病毒(pSB388 IL-6过表达慢病毒和pSB33对照病毒)购自上海生博医学生物工程科技有限公司,TWIST多抗购自Santa Cruz公司,E-Cadherin购自Epitomics公司,ELISA试剂盒(CHE0009)购自北京四正柏生物科技有限公司,凝胶配置试剂盒(KPG113)和MTT试剂盒(KGA311)购自凯基公司。

1.2 LNCaP细胞培养

LNCaP细胞株由第三军医大学西南医院中心实验室提供,用含10%(体积分数)胎牛血清的1640培养基培养,孵箱培养条件为37 ℃、5% CO_2。

1.3 IL-6过表达慢病毒感染实验

取处于对数期生长的LNCaP细胞,培养瓶中细胞饱和度>80%,胰酶消化后进行活细胞计数,调整细胞数为1×10^5/mL,以2×10^4/孔接种到24孔板。实验分为3组:IL-6过表达病毒组、对照病毒组、正常组。IL-6过表达病毒和对照病毒滴度分别为5.34×10^8、1.22×10^9 TU/mL,以MOI值为20计算,每孔加入的病毒数量为4×10^5 TU。感染8 h后,弃上清,更换为新鲜培养基,400 μL/孔,于第3天观察绿色荧光表达情况,出现绿色荧光表达后加入含2 μg/mL嘌呤霉素的RPMI1640完全培养基对阳性细胞进行纯化筛选,以1 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基维持培养。将细胞依次转移到6孔板和培养瓶进行传代扩增并冻存细胞株。

1.4 ELISA鉴定IL-6过表达LNCaP细胞株

取处于对数期生长的LNCaP-IL-6、LNCaP-ctr和LNCaP细胞,胰酶消化后进行活细胞计数,调整细胞数为1×10^5/mL,将细胞以5×10^4/孔接种于24孔板,每种细胞设3个复孔。次日更换新鲜培养基,400 μL/孔,第3天收集上清做ELISA分析。标准品的稀释和加样:加入1.0 mL稀释液至冻干标准品中,待彻底溶解后,震荡混匀;准备7个干净的EP管,第1个EP管加入750 μL的稀释液,其余加入500 μL稀释液。取溶解后的标准品250 μL加入1号EP管内,混匀后从1号取500 μL加入2号管,混匀后再从2号管取500 μL加入第3个EP管,依此方法对标准品进行梯度稀释,使EP管内标准品浓度依次为250、125、62.5、31.25、15.625、7.8、3.9 pg/mL。加样:实验组设3个复孔,另设1个空白孔,加入100 μL样品和标准品至反应孔内37 ℃,90 min;加入生物素化抗体工作液100 μL/孔,37 ℃,60 min;加入酶结合物工作液100 μL/孔,37 ℃,30 min加入显色剂100 μL/孔,37 ℃,10 min;加入终止液100 μL/孔,混匀,测D(450)值。标准品和样品的检测结果运用Excel 2003软件得出标准曲线和公式,并计算样品中IL-6的浓度。

1.5 MTT细胞增殖分析

实验分组:LNCaP-ctr组、LNCaP-IL-6组、LNCaP-ctr+2 mmol/L二甲双胍组和LNCaP-IL-6+2 mmol/L二甲双胍组。取处于对数期生长的LNCaP-IL-6和LNCaP-ctr细胞,胰酶消化后进行活细胞计数,调整细胞数为5×10^4/mL,按5 000/孔接种到4个96孔板,每组设6个复孔,用10% FBS 1640培养基进行培养,于接种后的第1、3、5天进行MTT实验。

1.6 流式细胞检测细胞周期

取处于对数期生长的LNCaP-IL-6和LNCaP-ctr细胞,胰酶消化后制成细胞悬液并进行活细胞计数,以3×10^5/孔接种于6孔板,24 h后更换新鲜完全培养基并给实验组细胞培养基中加入2 mmol/L的二甲双胍共培养48 h,PBS洗涤细胞2遍,加入胰酶消化,1 000 r/min离心3 min,弃上清,加入PBS洗涤1次,离心,弃上清,加入300 μL PBS重悬细胞,加入700 μL无水乙醇固定,4 ℃过夜,于次日进行流式细胞仪检测。

1.7 细胞划痕修复实验

取处于对数期生长的LNCaP-IL-6和LNCaP-ctr细胞,按3×10^5/孔接种于6孔板,待细胞汇合率达到90%即进行实验。用10 μL规格枪头于6孔板正中划一横线使细胞脱落,用PBS缓冲液洗去脱落细胞,加入含1%活性炭过滤的胎牛血清(CS-FBS)培养基1 mL/孔,实验组培养基中加入终浓度为2 mmol/L二甲双胍,对照组培养基中加入等体积的PBS,分别于划痕后0、24、48 h于倒置显微镜下观察细胞迁移情况并采图。

1.8 Western blot检测

取处于对数期生长的LNCaP-IL-6和LNCaP-ctr细胞,胰酶消化后制成细胞悬液并进行活细胞计数,以3×10^5/孔接种于

6 孔板,48 h 后取出用预冷的 PBS 洗 3 遍,加入细胞裂解液提取细胞总蛋白。LNCaP-IL-6 在接种 24 h 后换液并加入 2 mmol/L 二甲双胍处理 48 h,提取总蛋白。Western blot 分析 E-Cadherin、TWIST 表达水平的变化。

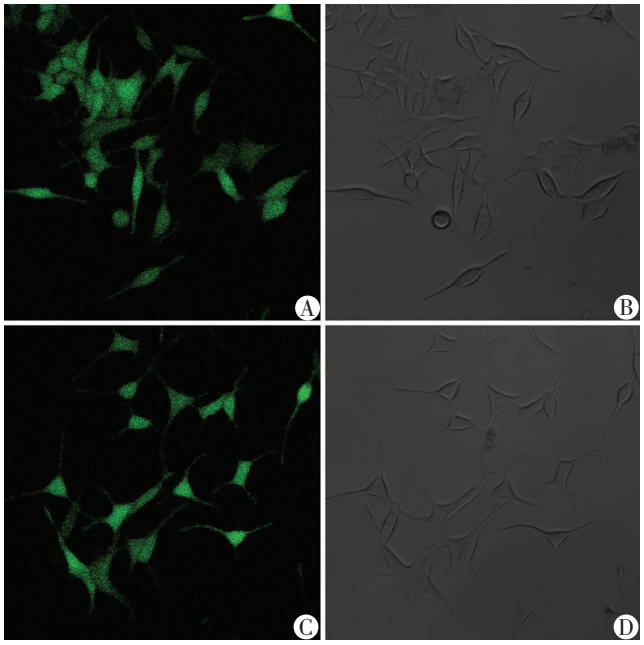
1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 LNCaP 细胞转染后 IL-6 表达的检测

慢病毒感染成功后,用 ELISA 和荧光显微镜检测目的基因的表达(图 1)。构建的慢病毒基因组中均带有绿色荧光蛋白基因,LNCaP-ctr 和 LNCaP-IL-6 均带有较强的绿色荧光,表明慢病毒基因组在宿主细胞中稳定表达。LNCaP-IL-6 组 IL-6 表达量为(5 802 ± 128.09) pg/mL,LNCaP-ctr 组为(1.14 ± 0.19) pg/mL,LNCaP 组为(1.98 ± 0.84) pg/mL。

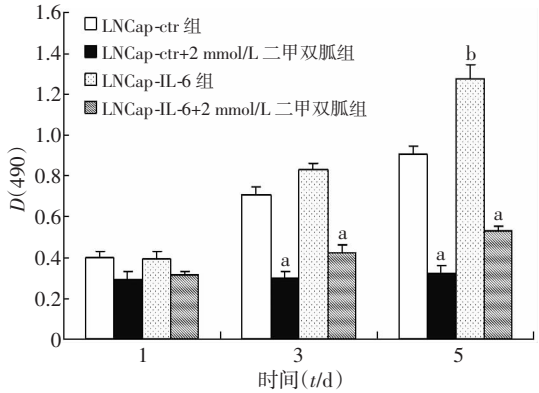


A ~ B:LNCaP-IL-6 组;C ~ D:LNCaP-ctr 组

图 1 荧光显微镜(A、C)与 ELISA(B ~ D)观察 LNCaP 细胞转染后 IL-6 的表达

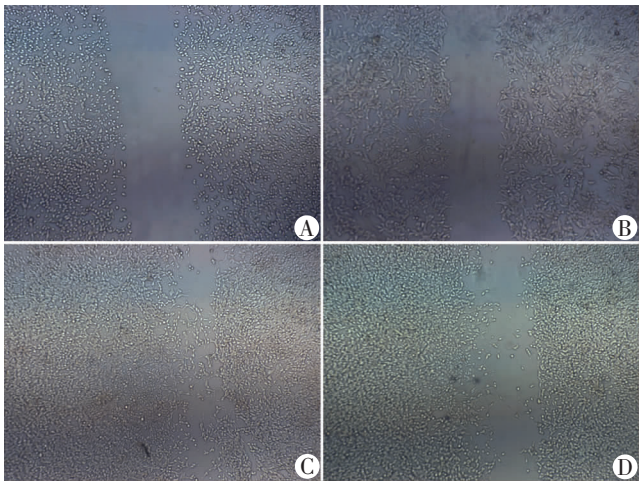
2.2 二甲双胍对 LNCaP-ctr 及 LNCaP-IL-6 细胞增殖及迁移的影响

LNCaP-ctr 细胞形态规则,排列紧密,呈鹅卵石状或星状;而 LNCaP-IL-6 细胞呈纺锤状和长梭形,细胞排列散乱,说明 IL-6 有诱导 LNCaP 细胞上皮-间质转化倾向。MTT 细胞增殖实验结果显示 LNCaP-IL-6 表现出较为明显的快于 LNCaP-ctr 细胞的生长优势;而在含有 2 mmol/L 二甲双胍的完全培养基培养条件下,LNCaP-ctr 细胞和 LNCaP-IL-6 细胞的增殖均受到一定程度的抑制,但 LNCaP-IL-6 细胞受抑制的程度小于LNCaP-ctr 细胞(图 2)。细胞划痕修复实验显示在划痕后 48 h,LNCaP-IL-6 细胞缺口已接近愈合状态,而对照划痕缺口仍比较明显(图 3)。



a: $P < 0.05$,与 LNCaP-ctr 组比较;b: $P < 0.05$,与 LNCaP-IL-6 组比较

图 2 MTT 法检测二甲双胍对 LNCaP-ctr 和 LNCaP-IL-6 增殖的变化



1: LNCaP-IL-6 对照起始; 2: LNCaP-IL-6 + 2 mmol/L 二甲双胍组起始;3:LNCaP-IL-6 对照 48 h;4:LNCaP-IL-6 + 2 mmol/L 二甲双胍组 48 h

图 3 划痕实验检测二甲双胍对 LNCaP-IL-6 细胞迁移的影响

2.3 二甲双胍对 LNCaP 细胞周期的影响

二甲双胍处理组 S 期细胞比例明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 二甲双胍对 LNCaP-ctr 和 LNCaP-IL-6 细胞周期的影响 [$n = 3$, $(\bar{x} \pm s)\%$]

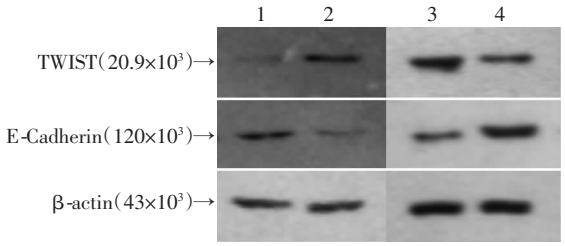
组别	G_1	S	G_2
LNCaP-ctr 组	68.23 ± 0.80	15.87 ± 0.64	15.90 ± 1.40
LNCaP-ctr + 2 mmol/L 二甲双胍组	54.16 ± 0.78	32.97 ± 1.26[a]	12.87 ± 0.97
LNCaP-IL-6 组	62.93 ± 0.59	22.33 ± 2.97	14.74 ± 2.43
LNCaP-IL-6 + 2 mmol/L 二甲双胍组	59.25 ± 1.07	31.56 ± 0.94[a]	9.19 ± 1.85[a]

a: $P < 0.05$,与 LNCaP-ctr 组和 LNCaP-IL-6 组比较

2.4 二甲双胍对 LNCaP-IL-6 TWIST 和 E-Cadherin 蛋白表达的影响

LNCaP-ctr 组 TWIST 和 E-Cadherin 蛋白相对比值分别为(0.13 ± 0.01)和(0.51 ± 0.05),LNCaP-IL-6 组分别为(0.43 ± 0.02)和(0.19 ± 0.02)。两组间 TWIST 和 E-Cadherin 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。加入二甲双胍处理的 LNCaP-IL-6 细胞 TWIST 和 E-Cadherin 相对比值分别为(0.31 ± 0.03)和(0.74 ± 0.06),未加二甲双胍处理的 LNCaP-IL-6 细胞 TWIST

和 E-Cadherin 相对比值分别为(0.67±0.04)和(0.23±0.02),二甲双胍处理组 TWIST 表达水平低于对照组,而 E-Cadherin 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,图4)。



1:LNCaP-ctr 组;2:LNCaP-IL-6 组;3:LNCaP-IL-6 组;4:LNCaP-IL-6 + 2 mmol/L 二甲双胍组

图4 Western blot 检测各组细胞 TWIST 和 E-Cadherin 蛋白的表达

3 讨论

本实验证明治疗2型糖尿病的药物二甲双胍可明显抑制前列腺癌细胞株 LNCaP 的增殖,并逆转 IL-6 诱导的 LNCaP 细胞上皮-间质转化过程。上皮-间质转化是指上皮细胞的表型向间质细胞转变,其过程伴随 EMT 转录因子的激活,E-Cadherin 表达缺失和细胞极性转换。在肿瘤细胞中发生 EMT 的细胞由于细胞间连接的缺失而更容易迁移。人类的 TWIST 是一种重要的 EMT 调节基因[5],TWIST 高表达与癌症的抗凋亡、耐药和血管生成有关[6]。TWIST 高表达引起 E-Cadherin 表达下降,使癌症患者更容易发生转移[7]。本实验通过对 LNCaP 细胞进行慢病毒感染,获得 IL-6 过表达的 LNCaP-IL-6 稳定细胞株。MTT 实验显示在细胞培养第5天,LNCaP-IL-6 的相对数量约为 LNCaP-ctr 的1.4倍,说明自分泌的 IL-6 能够明显促进 LNCaP 细胞的增殖;2 mmol/L 的二甲双胍能够显著抑制 LNCaP-ctr 和 LNCaP-IL-6 的增殖,但对二者的抑制程度不一,MTT 第3天和第5天结果显示 LNCaP-IL-6 对二甲双胍的抵抗性大于 LNCaP-ctr,其机制可能与 IL-6 的生长促进作用有关。流式细胞仪检测显示二甲双胍处理后的 LNCaP-ctr 和 LNCaP-IL-6 的 S 期细胞比例增多,表明二甲双胍阻滞 LNCaP 的细胞周期为 S 期。细胞形态观察显示以10%的 CS-FBS 维持培养 48 h 后,LNCaP-IL-6 细胞呈纺锤状和长梭形,细胞排列散乱,而 LNCaP-ctr 细胞形态规则,排列紧密,呈鹅卵石状或星状,说明 IL-6 可诱导 LNCaP 细胞向间质细胞的表型转变;Western blot 实验显示 LNCaP-IL-6 的 TWIST 水平显著高于 LNCaP-ctr,而 E-Cadherin 表达水平低于 LNCaP-ctr,表明自分泌的 IL-6 能够诱导 LNCaP 上皮-间质转化。新近研究发现 IL-6 能够提高 TWIST 蛋白的稳定性引起头颈部癌细胞的迁移能力增强[8],本实验结论与之相符。细胞迁移实验表明二甲双胍能够抑制 LNCaP-IL-6 细胞的迁移,同时 Western blot 检测显示二甲双胍处理的 LNCaP-IL-6 细胞的 TWIST 蛋白水平下降,E-Cadherin 水平上调,说明二甲双胍通过抑制 TWIST 表达而降低 E-Cadherin 表达水平,从而实现对 IL-6 过表达诱导的 LNCaP 细胞上皮-间质转化的逆转。

研究显示,二甲双胍能够激活 MAPK 而引起下游靶基因 mTOR 的抑制,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的[9-10]。本研究表明 IL-6 过表达细胞株 LNCaP-IL-6 细胞株 TWIST 表达明显高于 LNCaP-ctr,这与 IL-6 调节癌细胞的增殖、黏附、分化和抗凋亡有关[11]。二甲双胍对 TWIST 表达有显著的抑制作用,我们推测 TWIST 也可能是 MAPK 下游基因,二甲双胍经 MAPK/TWIST 途径,对前列腺癌细胞上皮-间质转化进行控制,抑制前列腺癌细胞的转移。本研究尚未进行 MAPK 相关检测,需要进一步研究证实 MAPK 对 TWIST 是否存在调控。

参考文献:

[1] Azevedo A, Cunha V, Teixeira A L, *et al*. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development[J]. World J Clin Oncol, 2011, 2(12): 384-396.

[2] Currie C J, Poole C D, Jenkins-Jones S, *et al*. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival[J]. Diabetes Care, 2012, 35(2): 299-304.

[3] Kato K, Gong J, Iwama H, *et al*. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(3): 549-560.

[4] 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.

[5] Liu A N, Zhu Z H, Chang S J, *et al*. Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 367(1/2): 195-203.

[6] Zhang L, Yang M, Gan L, *et al*. DLX4 upregulates TWIST and enhances tumor migration, invasion and metastasis[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(8): 1178-1187.

[7] Fu J, Zhang L, He T, *et al*. TWIST represses estrogen receptor-alpha expression by recruiting the NuRD protein complex in breast cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(4): 522-532.

[8] Su Y W, Xie T X, Sano D, *et al*. IL-6 stabilizes Twist and enhances tumor cell motility in head and neck cancer cells through activation of casein kinase 2[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19412.

[9] Vakana E, Platanias L C. AMPK in BCR-ABL expressing leukemias. Regulatory effects and therapeutic implications[J]. Oncotarget, 2011, 2(12): 1322-1328.

[10] Rocha G Z, Dias M M, Ropelle E R, *et al*. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(12): 3993-4005.

[11] Santer F R, Malinowska K, Culig Z, *et al*. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17(1): 241-253.

(**收稿**:2012-12-11;**修回**:2013-02-26)

(编辑 龙 亮)