

二甲双胍通过调节组蛋白乙酰化抑制肾癌细胞 786-O 迁移和侵袭

何德娇 杨定平 刘红燕 李浩勇

430060 武汉, 武汉大学人民医院肾内科

【摘要】 目的 研究二甲双胍抑制肾癌细胞迁移和侵袭的机制。方法 采用 transwell 迁移和 matrigel 侵袭实验检测 10 mM 和 20 mM 二甲双胍对 786-O 细胞迁移和侵袭的影响; Western blot 实验检测二甲双胍对 E-cadherin、vimentin、MMP-2、MMP-9 以及组蛋白 H3K9、H4K12 和 H4K16 乙酰化水平的改变; 组蛋白乙酰转移酶抑制剂 C646 与二甲双胍联用, 通过 transwell 实验观察二甲双胍调控组蛋白乙酰化对 786-O 细胞迁移的影响。结果 10 mM 和 20 mM 二甲双胍均能显著抑制 786-O 细胞迁移和侵袭 ($P < 0.05$); 二甲双胍上调 E-cadherin, 下调 vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达 ($P < 0.05$), 同时显著增加组蛋白 H3K9、H4K12 和 H4K16 的乙酰化水平 ($P < 0.05$); C646 和二甲双胍联用能显著阻止二甲双胍引起的迁移抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 二甲双胍通过上调组蛋白乙酰化水平抑制肾癌细胞 786-O 的迁移和侵袭。

【关键词】 二甲双胍; 组蛋白乙酰化; 肾癌; 迁移和侵袭

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2390.2019.03.009

Metformin inhibits migration and invasion of renal carcinoma cell line 786-O by regulating acetylation of histone HE De-jiao, YANG Ding-ping, LIU Hong-yan, LI Hao-yong. Department of Nephrology, Wuhan University Affiliated People's Hospital, Wuhan, 430060, China
Corresponding Author: YANG Ding-ping, E-mail: shenbimeike@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of metformin inhibition of migration and invasion of renal carcinoma cell line 786-O. **Methods** Transwell migration and Matrigel invasion assays were used to examine the role of metformin at 10 mM and 20 mM on migration and invasion of the cell line 786-O. Expression of E-cadherin, vimentin, MMP-2 and MMP-9 as well as acetylation of histone H3K9, H4K12 and H4K16 were detected by western blotting after metformin treatment. When combining the histone acetyltransferase inhibitor C646 with metformin, effect of metformin regulation of histone acetylation on migration of the cell line 786-O was observed through Transwell assay. **Results** Both 10 mM and 20 mM metformin remarkably inhibited migration and invasion of 786-O cells ($P < 0.05$). The expression of E-cadherin was upregulated while expression of vimentin, MMP-2 and MMP-9 was downregulated after exposure to metformin ($P < 0.05$). What's more, the acetylation levels of histone H3K9, H4K12 and H4K16 were significantly upregulated by metformin treatment ($P < 0.05$). Combination of metformin with C646 could blocked inhibition of migration resulting from metformin treatment alone ($P < 0.05$). **Conclusions** Metformin inhibits migration and invasion of renal carcinoma cell line 786-O through upregulation of histone acetylation.

【Key words】 Metformin; Histone acetylation; Renal carcinoma; Migration and invasion

【作者简介】 何德娇, 女, 研究生在读, 主管护师, 研究方向: 肾癌, 电话: 13886115695, E-mail: 49056203@qq.com

【通信作者】 李浩勇, 男, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤, 电话: 17764060728, E-mail: haoyei5118@126.com

肾细胞癌(RCC)简称肾癌,是常见的泌尿系统恶性肿瘤,占肾脏肿瘤的 80%~90%,占成年人恶性肿瘤的 2%~3%^[1]。手术切除是治疗 RCC 的主要方法,但 1/3 的患者在确诊时已发生转移,失去了手术机会,同时 20%~30%的原发 RCC 患者在肾切除术后发生转移,预后差,5 年生存率低于 10%^[2-3]。因此,改善肾癌患者预后,延长患者的生存时间依然是临床亟待解决的问题。

肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞从原发部位,经淋巴道、血管或体腔等途径,到达其他部位继续生长的复杂过程^[4]。这个过程涉及到上皮细胞极性和黏附能力的变化,获得易于迁移和侵袭的特性,即细胞发生上皮-间充质转化(EMT),是恶性肿瘤转移的重要阶段,其中涉及多种生物标志物的改变包括细胞膜蛋白、细胞骨架、细胞外基质(ECM)和特定转录因子等^[5-6]。二甲双胍(Met)是临床上广泛使用的治疗 2 型糖尿病的双胍类药物。但是越来越多的体内和体外实验证明了二甲双胍能显著抑制肺癌、乳腺癌、前列腺癌、骨肉瘤、食管癌等肿瘤的发生、发展^[7-11]。但是,二甲双胍对肾癌细胞迁移和侵袭的影响报道较少,作用机制也并不明确。因此,积极探索二甲双胍的抗肿瘤机制将给临床上治疗 RCC 提供新的思路。

材料与方法

一、实验材料

人 RCC 细胞 786-O 购自中国科学院上海细胞库,细胞培养用胎牛血清、DMEM 培养基及双抗购自澳大利亚 Hyclone 公司。二甲双胍(metformin)和组蛋白乙酰基转移酶抑制剂 C646 购自美国 Sigma 公司。Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Matrigel 胶购自美国 BD 公司。PVDF 膜购于 millipore 公司,二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF、蛋白 marker、ECL 发光液购于 PierceBiotechnology 公司。E-cadherin、vimentin、MMP-9、H3K9、H4K12、H4K16、GAPDH、辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗等抗体购买于美国 Cell Signaling Technology 公司。上样缓冲液、结晶紫等其他常用试剂均购于索莱宝公司。

二、细胞培养

人 RCC 细胞 786-O 购自中国科学院上海细胞库,细胞常规培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,在 37℃,5%CO₂培养箱中培养。当生长状态良好的细

胞融合度达 80%~90%时进行传代和下一步实验。分别用 10 mM、20 mM 二甲双胍处理 786-O 细胞 48 h,通过迁移、侵袭及 Western 实验检测二甲双胍对 786-O 细胞迁移侵袭及组蛋白 H3、H4 乙酰化修饰水平的影响。

三、细胞迁移及侵袭

细胞迁移实验:将 10 mM、20 mM 二甲双胍处理 48 h 的 786-O 细胞进行消化,离心,并用无血清的 DMEM 培养基重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$,并以 $200 \mu\text{L} / \text{孔}$ 加入 transwell 小室(孔径: $8 \mu\text{m}$)的上室中,放入 24 孔培养板中,下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10%FBS 的 DMEM 培养基,每组设 3 个副孔。37℃,5%CO₂培养箱中常规培养 24 h 后用 4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 8 min,然后用棉签小心擦去未迁移的上层细胞,显微镜下($\times 10$)取上、下、左、右和中心 5 个视野进行拍照、计数。细胞侵袭实验:在 transwell 上室中每孔加入 50 μL 浓度为 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的 matrigel,放入 37℃成胶 6~8 h 备用。其他步骤同细胞迁移实验。

四、Western blot 实验

786-O 细胞接种于 6 孔板中,分别加入 10 mM、20 mM 二甲双胍处理 72 h 后收集细胞,并加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)冰上裂解 30 min,离心,取上清,BCA 法测定上清液的蛋白浓度。配制浓度为 10%的分离胶,取 30 $\mu\text{g} / \text{孔}$ 进行 SDS-PAGE 电泳。然后转移到 PVDF 膜上,用 TBST 配制的 5%脱脂牛奶封闭 2 h 后加入一抗(1:1000 稀释)4℃摇床孵育过夜。TBST 洗 3 次,每次 10 min,加入二抗(1:5000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗后用 AI600Images 多功能成像系统(美国 GE)进行显影,并对灰度值进行统计分析。

五、统计学处理

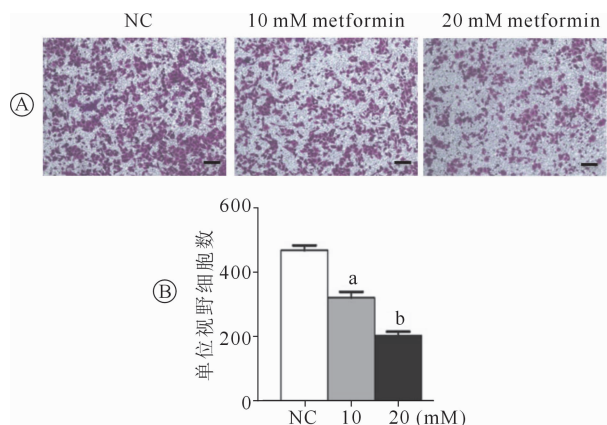
所有数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析处理,测量结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、二甲双胍抑制 786-O 细胞迁移

根据相关文献^[11-13]中二甲双胍使用浓度,我们采用 10 mM 和 20 mM 的二甲双胍处理 786-O 细胞进行迁移和侵袭实验,0 mM 二甲双胍处理组为对照组(NC)。二甲双胍 Transwell 实验结果显示:处理 786-O 细胞 24 h 后,对照组,10 mM、20 mM 二甲双胍处理组细胞穿过聚碳酸酯膜的数目分别为

(468.0 ± 27.2), (320.0 ± 32.5), (203.0 ± 21.3), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明随着二甲双胍浓度增高, 穿膜细胞数显著减少, 迁移能力显著下降。(图 1)

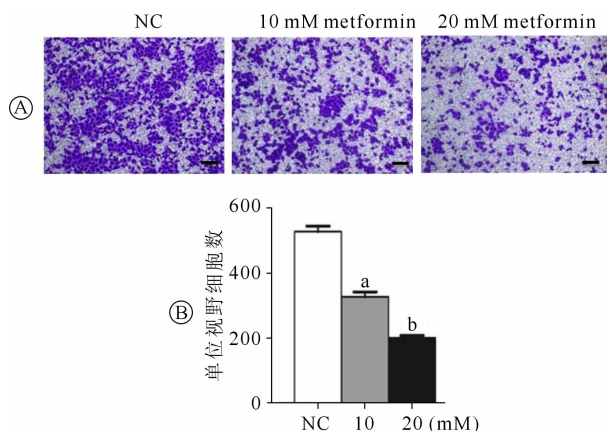


注: (A) Transwell 迁移实验检测 10 mM 和 20 mM metformin 对 786-O 细胞迁移, 比例尺: 200 μm ; (B) 穿过聚碳酸酯膜的细胞数柱状图, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 1 786-O 细胞迁移能力与二甲双胍浓度的关系

二、二甲双胍抑制 786-O 细胞侵袭

786-O 细胞在包被有 matrigel 基质中侵袭 24 h 后结果: 对照组、10 mM、20 mM 二甲双胍处理组, 细胞穿过基质层和聚碳酸酯膜的数量分别为 (528.0 ± 29.2), (328.0 ± 26.0), (202.0 ± 12.5) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明二甲双胍具有显著抑制 786-O 细胞侵袭浸润的能力。(图 2)



注: (A) matrigel 侵袭实验检测 10 mM 和 20 mM metformin 对 786-O 细胞侵袭的影响, 比例尺: 200 μm ; (B) 穿过 matrigel 和聚碳酸酯膜的细胞数柱状图, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 2 不同二甲双胍浓度对 786-O 细胞侵袭浸润能力的影响

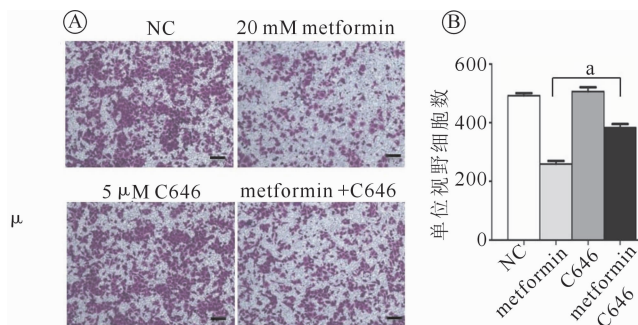
三、二甲双胍抑制 786-O 细胞 EMT 且促进组

蛋白乙酰化

EMT 的特征是上皮细胞标志物如 E-cadherin 会减少, 同时表达间充质细胞标志物如 vimentin 等。Matrix metalloproteinases (MMPs) 是以钙、锌等依赖的肽链内切酶, 降解 ECM 复合物。如图 3A 和图 3C, Western 结果显示了二甲双胍处理 786-O 细胞 48 h, E-cadherin、vimentin、MMP-2、MMP-9 及组蛋白 H3、H4 乙酰化水平的变化。图 3B 和图 3D 显示, 10 mM 和 20 mM 二甲双胍处理 786-O 细胞 48 h 后, E-cadherin 分别是 NC 组的 1.4 和 1.7 倍, vimentin 分别下降了 55%/51%, MMP-2 和 MMP-9 分别下降了 25%/44%、41%/51%。组蛋白 H3K9、H4K12 和 H4K16 乙酰化水平显著增加, 分别是 NC 的 1.3/2.1、1.5/1.9 和 1.6/1.8 倍, 均具有统计学差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

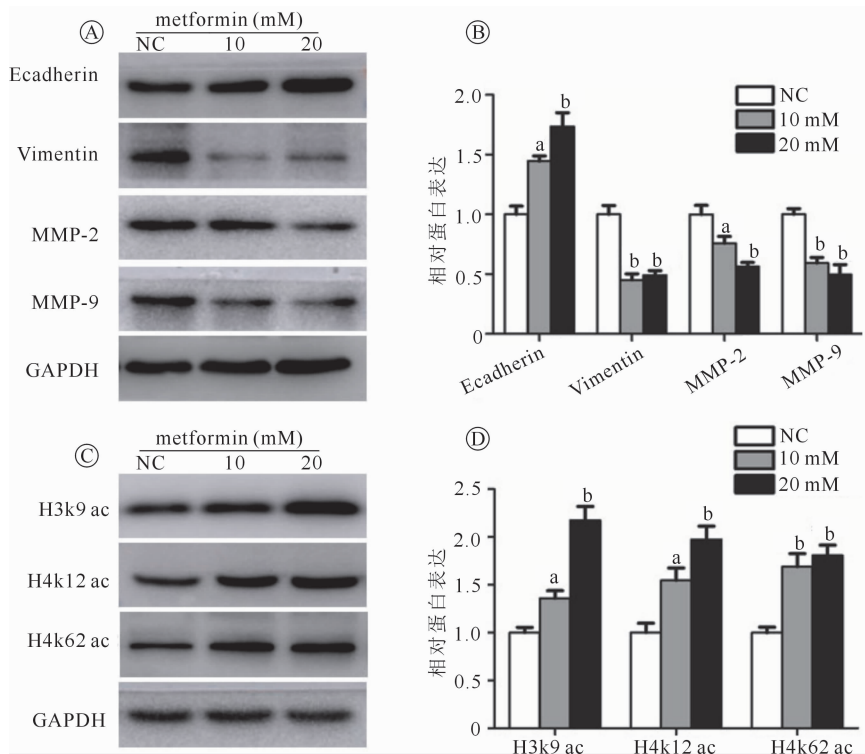
四、二甲双胍通过升高组蛋白乙酰化水平抑制 786-O 细胞迁移

为了进一步验证组蛋白 H3、H4 乙酰化水平升高是否会导致细胞迁移抑制, 我们采用乙酰转移酶 (HATs) 的抑制剂 C646 来抑制二甲双胍引起的组蛋白乙酰化水平增加, 再观察对细胞迁移的影响, 如图 4A 和图 4B 所示。二甲双胍和 C646 联合处理阻止了二甲双胍单独处理 786-O 细胞引起的迁移抑制, 单位视野穿过聚碳酸酯膜的细胞数分别为: 二甲双胍组为 (259 ± 17.6), 二甲双胍 + C646 组为 (382 ± 21.7), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明二甲双胍通过升高组蛋白乙酰化水平抑制 786-O 细胞迁移。



注: (A) Metformin 和 C646 单独或联合使用对细胞迁移的影响, 比例尺: 200 μm ; (B) 穿过聚碳酸酯膜的细胞数柱状图, ^a $P < 0.05$

图 4 不同浓度二甲双胍对细胞迁移的影响



注：(A) Western blot 检测 metformin 对 E-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达；(B) 灰度值统计分析蛋白的相对表达；(C) Metformin 对组蛋白 H3K9、H4K12 和 H4K62 乙酰化水平的影响；(D) 灰度值统计分析蛋白的相对表达。结果均以 GAPDH 为内参，将 NC 的蛋白表达水平标准化为 1，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$

图 3 二甲双胍处理细胞后各指标的变化

讨 论

二甲双胍是一种临床上常用的降血糖药物，但近年来体内外实验均证明了其对多种恶性肿瘤的生长具有抑制作用，主要表现在调节细胞周期、促进细胞凋亡、抑制细胞迁移等多个方面。比如在骨肉瘤细胞中，二甲双胍通过 AMPK/mTORC1 和 mTORC2 通路介导自噬和 G1/S 周期阻滞，发挥抗肿瘤作用^[10]；在食管癌细胞中，二甲双胍通过下调蛋白激酶 B 抑制细胞迁移和侵袭^[11]。越来越多的实验证明，二甲双胍可能成为治疗肿瘤的辅助药物，但其作用机制尚不完全清楚。本实验采用 transwell 迁移和 matrigel 侵袭实验证明了 10 mM 和 20 mM 二甲双胍显著抑制肾癌 786-O 细胞的迁移和侵袭(图 1~2)。

EMT 以细胞黏附分子(如 E-cadherin)表达减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白(Vimentin)为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞为特征，从而使上皮细胞失去细胞极性 & 粘附能力，获得较高的迁移和侵袭，降解 EMC 等间质特征^[14-15]。MMP-2 和 MMP-9 是与肾癌侵袭和转移关系最密切的基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员^[16-17]，是锌依赖性的蛋白水解酶，几乎能降解细胞外基质的所

有成分，其过度表达和活化与肿瘤的浸润、转移密切相关^[18]。本文采用 Western 检测了 EMT 和 MMPs 相关蛋白的表达。如图 3A 所示，二甲双胍处理后 E-cadherin 显著升高，Vimentin 显著下降，MMP-2 和 MMP-9 显著下降，提示二甲双胍抑制肾癌细胞迁移能力可能与下调 EMT 和 MMPs 相关蛋白有关。

随着表观遗传学研究的不断深入，其在调控肿瘤进程中的重要性也逐渐被人们认识。表观遗传调控机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑等，其中细胞内组蛋白乙酰化是通过组蛋白乙酰基转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰基转移酶(HDACs)之间的动态平衡来调控^[19]。大量的研究已经证明，保持细胞内的组蛋白乙酰基化的动态平衡在 DNA 修复，肿瘤的发生和发展过程中起着重要的作用^[20-21]。有研究表明，二甲双胍在前列腺癌和卵巢癌细胞中可激活 AMPK，从而磷酸化并抑制乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的活性，这使得乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A 减少而增加了组蛋白的乙酰化水平^[22]，而在肝癌等细胞中发现，随着组蛋白 H3、H4 乙酰化水平显著升高，细胞的迁移、侵袭能力明显降低，提示二甲双胍可能通过促进组蛋白乙

酰化来抑制肿瘤生长和转移^[23]。因此,我们检测了二甲双胍对组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化的影响,结果发现,10 mM 和 20 mM 二甲双胍均能显著促进组蛋白 H3K9、H4K12 和 H4K16 的乙酰化水平。

为了进一步证明二甲双胍增加组蛋白乙酰化对细胞迁移的影响,我们采用 HAT 的抑制剂 C646^[24]来抑制二甲双胍对组蛋白乙酰化水平的升高。图 4 结果表明,20 mM 二甲双胍单独作用能显著抑制 786-O 细胞的迁移,而与 C646 同时作用后,迁移细胞数有所增加,差异具有统计学意义,提示 C646 可能抑制了二甲双胍引起的组蛋白乙酰化增加,从而减弱二甲双胍对细胞迁移的抑制作用,也揭示了二甲双胍抑制 786-O 细胞是通过促进组蛋白乙酰化实现的。

本研究的完成不仅解释了二甲双胍抗肿瘤的可能机制,为临床治疗 RCC 患者奠定了理论基础,也为临床上进行联合药物干预提供了新的治疗策略。而组蛋白乙酰化水平变化后究竟是通过哪些基因或蛋白的改变最终影响了细胞表型的变化,目前并不明确,有待进一步深入探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(4): 615-621.
- [2] Xue YJ, Xiao RH, Long DZ, et al. Overexpression of FoxM1 is associated with tumor progression in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 200.
- [3] Escudier BC, Porta M, Schmidinger, et al. Renal cell carcinoma; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(suppl 5): v58-v68.
- [4] Cheng SK, Chuah KL. Metastatic Renal Cell Carcinoma to the Pancreas: A review[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(6): 598-602.
- [5] Qureshi R, Arora H, Rizvi MA. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt B): 321-331.
- [6] 陈晓敏, 郭俊明, 乐东海, 等. 上皮-间质转化: 肿瘤转移的重要调控机制[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2013, 35(9): 1367-1375.
- [7] Li C, Xue Y, YR Xi, et al. Progress in the application and mechanism of metformin in treating non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 2873-2880.
- [8] Davies GL, Lobanova W, Dawicki, et al. Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0187191.
- [9] Avci CB, Harman E, Dodurga Y, et al. Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin; alteration of miRNA expression in prostate cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 765-768.
- [10] 苏小桃, 何俊, 欧军, 等. 二甲双胍抑制骨肉瘤 MG63 细胞的迁移和侵袭能力[J]. *重庆医学*, 2016, 45(5): 602-605.
- [11] He Y, Tan X, Hu H, et al. Metformin inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by downregulating the protein kinase B signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 2939-2945.
- [12] Jang SY, Kim A, Kim JK, et al. Metformin inhibits tumor cell migration via down-regulation of MMP9 in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(8): 4127-4134.
- [13] Wei MS, Mao G, Lu, et al. Valproic acid sensitizes metformin-resistant human renal cell carcinoma cells by upregulating H3 acetylation and EMT reversal[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 434.
- [14] Cha YH, Yoo kJI, Kim HS, et al. Catabolic metabolism during cancer EMT[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(3): 313-320.
- [15] Davis FM, Stewart TA, Thompson EW, et al. Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(9): 479-488.
- [16] Radenkovic SG, Konjevic V, Jurisic, et al. Values of MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue of basal-like breast cancer patients [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(1): 143-152.
- [17] Chen F, Bai J, Li W, et al. RUNX3 suppresses migration, invasion and angiogenesis of human renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56241.
- [18] Lu W, Xia YH, Qu JJ, et al. P21-activated kinase 4 regulation of endometrial cancer cell migration and invasion involves the ERK1/2 pathway mediated MMP-2 secretion[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(5): 493-503.
- [19] Yu Z, Taniguchi J, Wei Y, et al. Antiproliferative and apoptotic activities of sequence-specific histone acetyltransferase inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 320-327.
- [20] Fiskus W, Sharma S, J Qi, et al. Highly active combination of BRD4 antagonist and histone deacetylase inhibitor against human acute myelogenous leukemia cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(5): 1142-1154.
- [21] Shahbaz iJ, Liu PY, Atmadibrata B, et al. The bromodomain inhibitor JQ1 and the histone deacetylase inhibitor panobinostat synergistically reduce N-Myc expression and induce anticancer effects [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(10): 2534-2544.
- [22] Vancura A, Vancurova I. Metformin induces protein acetylation in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 39939-39940.
- [23] 刘伟, 肖俊, 兰金芝, 等. 组蛋白乙酰化水平对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(12): 1365-1369.
- [24] Zhao DS, Fukuyama Y, Sakai-Tagawa, et al. C646, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of histone acetyltransferase, attenuates influenza A virus infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 60(3): 1902-1906.