

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.06.026

Napabucasin 对结直肠癌细胞增殖及迁移的影响

徐树涛, 彭锐, 邹方东

(四川大学生命科学学院, 成都 610065)

摘要: 为了探究新型小分子抑制剂 Napabucasin 对结直肠癌细胞增殖以及迁移的影响, 首先通过分子模拟对接分析了 Napabucasin 与 STAT3 蛋白的互作机制, 然后利用克隆形成实验、细胞划痕实验等方法在多种结直肠癌细胞系中证明了 Napabucasin 能够显著抑制结直肠癌细胞的集落形成能力以及迁移能力, 进而使用 Napabucasin 与 Wnt 信号通路激活剂 Wnt agonist 1 共处理结直肠癌细胞 HCT116, 结合蛋白质印迹实验发现, Wnt 信号通路介导了 Napabucasin 对结直肠癌细胞的迁移以及增殖的抑制过程。研究结果显示, Napabucasin 能够在体外抑制结直肠癌细胞的增殖能力以及迁移能力, 并且 Wnt 信号通路参与介导了这一抑制过程。

关键词: 结直肠癌; STAT3; Napabucasin; 细胞迁移

中图分类号: Q28 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)06-1193-05

Effects of Napabucasin on the proliferation and migration of colorectal cancer cells

XU Shu-Tao, PENG Rui, ZOU Fang-Dong

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: This study aims to explore the effect of the novel small molecule inhibitor Napabucasin on the proliferation and migration of colorectal cancer cells. Firstly, the interaction mechanism between Napabucasin and STAT3 was analyzed by molecular docking. Then, it was proved that Napabucasin can significantly inhibit the colony formation and migration ability of colorectal cancer cells using clone formation experiments and wound healing assay. Napabucasin and Wnt agonist 1 were then used to co-treat the HCT116 cells, combined with Western blot experiments, it was found that the Wnt signaling pathway mediates the inhibition of the migration and proliferation of colorectal cancer cells by Napabucasin. The research results show that Napabucasin can inhibit the proliferation and migration ability of colorectal cancer cells in vitro, and the Wnt signaling pathway is involved in mediating this inhibition process.

Keywords: Colorectal cancer; STAT3; Napabucasin; Cell migration

1 引言

结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)是一种严重的恶性肿瘤,严重危害身体健康^[1]。据报道,全球

每年约有 53 万患者死于该疾病^[2]。目前对于结直肠癌的治疗仍然是以手术为主,放化疗经常被用于结直肠癌患者的晚期治疗,但是仍然有约一半的患者在接受治疗后死亡^[3]。因此需要更有效的方法及

收稿日期: 2020-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(81672942)

作者简介: 徐树涛(1995-), 男, 四川广元人, 硕士研究生, 主要研究方向为细胞的分子生物学。E-mail: xushut@qq.com

通讯作者: 邹方东。E-mail: fundzou@scu.edu.cn

药物来治疗这种疾病。

结直肠癌细胞的恶性程度与信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的活性密切相关^[4]。STAT3 蛋白是一种致癌转录因子^[5], 在乳腺癌^[6]、卵巢癌、血液病^[7] 以及肝癌等多种肿瘤细胞中过度活化。作为转录因子, STAT3 是许多致癌途径的关键调节因子, 有希望成为治疗结直肠癌的潜在靶点^[8]。为了抑制结直肠癌的迁移、侵袭, 以及发生发展, 使用特异性靶向 STAT3 的抑制剂可能是一种有效的治疗结直肠癌的方法。

Napabucasin 是能够靶向于 STAT3 的小分子抑制剂, 抑制 STAT3 驱动的基因转录^[9]。Napabucasin 在胃癌^[10]、前列腺癌^[11]、非小细胞型肺癌^[12] 等癌症中发挥抑制肿瘤干细胞 (Cancer stem cells, CSCs) 自我更新的作用, 还可诱导这些癌细胞发生凋亡。正因为以 STAT3 为靶点的靶向治疗具有光明前景以及 Napabucasin 在这些肿瘤治疗中的良好效果, 我们期望通过研究 Napabucasin 对结直肠癌细胞在增殖以及迁移等方面的影响, 来初步分析靶向 STAT3 抑制剂的作用机理及其有效性, 以期实现 STAT3 抑制剂早日广泛应用于临床, 为结直肠癌患者的临床治疗提供更多的选项。

2 材料与方法

2.1 材料

人结肠癌细胞系 HCT116, DLD1 购于上海中科院细胞库, 人结肠癌细胞系 RKO 则为张林教授 (匹兹堡大学) 馈赠; 小分子抑制剂 Napabucasin 购买自 Selleck 公司 (中国上海蓝木化工有限公司), CAS 号为: 83280-65-3。Wnt agonist 1 购买自上海陶素生化科技有限公司, 其 CAS 号为 853220-52-7。

2.2 方法

2.2.1 Napabucasin 与 STAT3 蛋白的模拟对接

STAT3 蛋白结构是通过 swiss-model 网站预测而得。小分子抑制剂 Napabucasin 的 3D 结构是从 pubchem 数据库下载得到。分子对接软件选择了开源软件 Autodock4^[13]。

2.2.2 细胞克隆形成实验

用不同浓度的 Napabucasin 处理对数期生长的结直肠癌细胞, 对照组加入等量的 DMSO。每隔 3 d 更换新鲜的完全培养基并观察细胞状态。7 d 之后去除培养液, 甲醇固定并用结晶紫染色, 拍照后用 imageJ 软件进行统计分析。

2.2.3 细胞划痕实验

将对数增长期的细胞用对应浓度的 Napabucasin 处理 24 h 之后 (对照组加入等量的 DMSO), 按照划痕插件每个小室 5×10^4 个细胞铺板, 放入 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞完全贴壁之后, 拔掉划痕插件, 按时观察并拍照记录细胞迁移情况。用 ImageJ 软件测量迁移距离, 计算迁移率。

3 结果与分析

3.1 Napabucasin 抑制 STAT3 活性的机制

为了探究 Napabucasin 与 STAT3 之间的作用原理, 本研究利用 Autodock4 软件对 STAT3 进行了 Napabucasin 小分子模拟对接。如图 1A 所示, Napabucasin 小分子能够与 STAT3 蛋白中的第 710 位的苯丙氨酸之间形成氢键, 而此位点正好位于 STAT3 的 SH2 结构域之内 (图 1A), 靠近重要的磷酸化位点 Tyr705。所以我们推测 Napabucasin 可能是通过抑制 STAT3 的磷酸化从而抑制了 STAT3 蛋白的活性。在结直肠癌细胞系 HCT116 中, 用 Napabucasin 处理之后, p-STAT3 含量明显降低, 而 STAT3 总蛋白含量没有明显的变化 (图 1B), 说明 Napabucasin 处理之后, 确实降低了有活性的磷酸化形式的 STAT3 含量。



图 1 Napabucasin 与 STAT3 蛋白的 Phe710 结合并抑制 STAT3 磷酸化

A. STAT3 蛋白与小分子 Napabucasin 的对接结果。Napabucasin 小分子能够与 STAT3 蛋白中 SH2 结构域内形成氢键 (可视化软件为 UCSF Chimera^[13]); B. Napabucasin 处理 24 h 后, HCT116 细胞中 STAT3 以及 p-STAT3 蛋白含量的变化。

Fig. 1 Napabucasin binds to Phe710 of STAT3 and dephosphorylates STAT3 at Tyr705

A. Docking results of STAT3 and Napabucasin. Napabucasin small molecule can form hydrogen bonds with SH2 domain of STAT3 protein; B. changes in STAT3 and p-STAT3 content after Napabucasin treatment of HCT116 cells for 24 h.

3.2 Napabucasin 能够抑制结直肠癌细胞的集落形成能力

为了分析 STAT3 对结直肠癌细胞增殖能力的影响,我们根据不同结直肠癌细胞系的 IC₅₀ 值,选择了不同的 Napabucasin 浓度来处理相应的结直肠癌细胞.如图 2 所示,用 Napabucasin 处理之后,三种结直肠癌细胞系的克隆形成能力都明显受到的抑制($P < 0.05$).该结果说明 Napabucasin 处理之后,降低了结直肠癌细胞的单细胞集落形成能力.

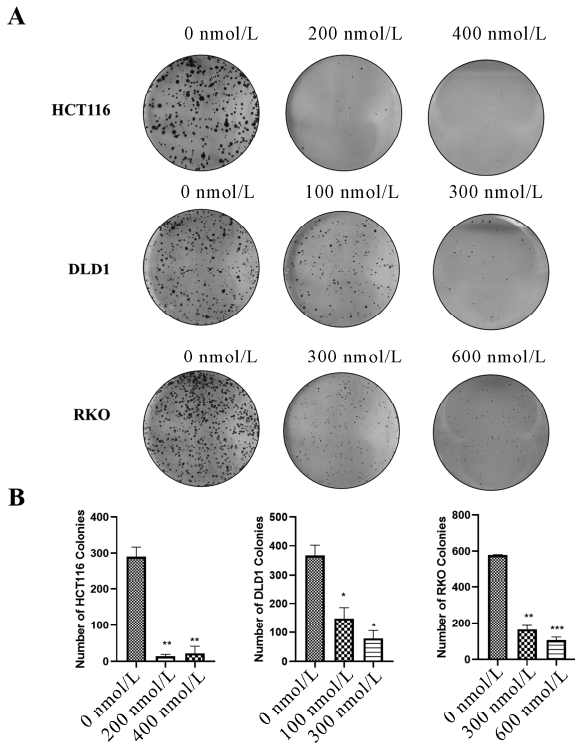


图 2 Napabucasin 对结直肠癌细胞增殖的影响

A. Napabucasin 处理之后,结直肠癌细胞的克隆形成能力受到了明显的抑制; B. 结直肠癌细胞形成的克隆数目统计.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig. 2 Napabucasin inhibits proliferation of Colorectal cancer cells

A. After Napabucasin treatment, the colony forming ability of colorectal cancer cells was significantly inhibited; B. the number of colonies formed by colorectal cancer cells.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.3 Napabucasin 能够抑制结直肠癌细胞的迁移能力

为了探究 Napabucasin 对结直肠癌细胞迁移能力的影响,通过划痕实验来分析 Napabucasin 处理后三种结直肠癌细胞迁移率的变化.结果如图 3 所示,与对照组相比,用 Napabucasin 处理后的实验组迁移率明显低于对照组,实验组迁移能力明显减弱,与对照组相比,具有显著性差异($P < 0.05$).

本结果说明结直肠癌细胞的迁移能力都受到了 Napabucasin 的明显抑制.

3.4 Wnt 信号通路介导了 Napabucasin 抑制结直肠癌细胞迁移的过程

Wnt 信号通路与 STAT3 有很多相同的下游靶基因^[14],为了研究 Wnt 信号通路是否参与了 Napabucasin 抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移与侵袭等过程.通过蛋白免疫印迹检测 HCT116 细胞在经 Napabucasin 处理之后蛋白含量的变化,发现 p-GSK3 β 以及 β -catenin 的含量出现了降低(图 4A).

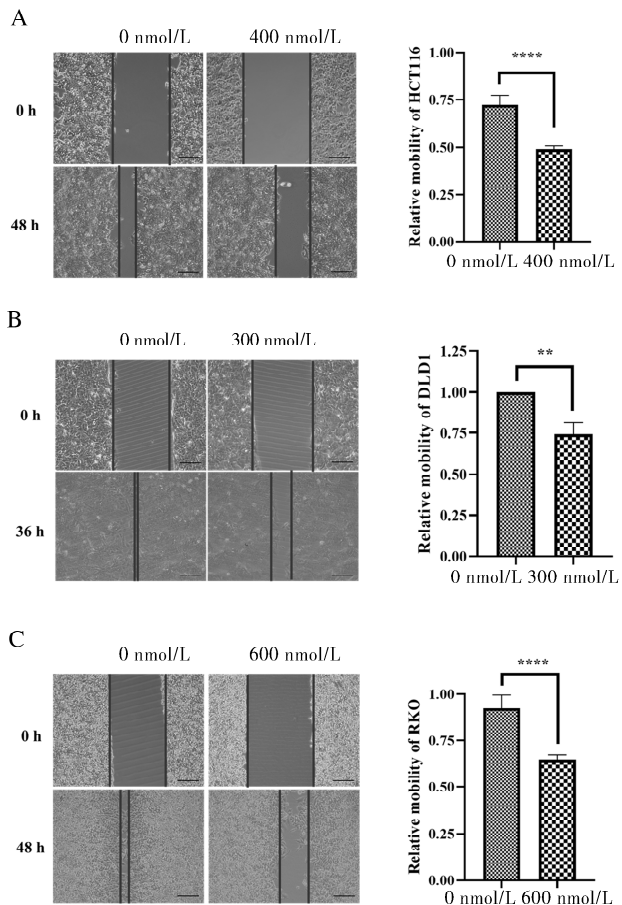


图 3 Napabucasin 能够抑制结直肠癌细胞的迁移

A. 用 Napabucasin 处理之后,HCT116 细胞迁移率下降了 23%; B. 用 Napabucasin 处理之后,DLD1 细胞迁移率下降了 26%; C. 用 Napabucasin 处理之后,RKO 细胞迁移率下降了 27%. 图中标尺的长度为 200 μ m,每个处理有三个生物学重复. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

Fig. 3 Napabucasin inhibits migration of Colorectal cancer cells

A. After treatment with Napabucasin, the migration rate of HCT116 decreased by 23%; B. after treatment with Napabucasin, the migration rate of DLD1 decreased by 26%; C. after treatment with Napabucasin, the migration rate of RKO decreased by 27%. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

为了验证 Napabucasin 处理是否影响了 Wnt 信号通路,我们用 Wnt 信号通路的激活剂 Wnt

agonist 1 与 Napabucasin 共处理 HCT116 细胞, 并观察其增殖能力. 如图 4B 所示, 当用 Napabucasin 与 Wnt agonist 1 共处理的 HCT116 细胞时, 与单独使用 Napabucasin 相比, 其克隆形成数目显著增多 ($P < 0.05$). 说明 Wnt 信号通路激活剂 Wnt agonist 1 恢复了部分由 Napabucasin 抑制的增殖能力. 图 4C 对细胞迁移能力的实验结果也与之类似. 这些实验证据表明了 Wnt 信号通路参与了 Napabucasin 抑制结直肠癌细胞迁移以及侵袭过程.

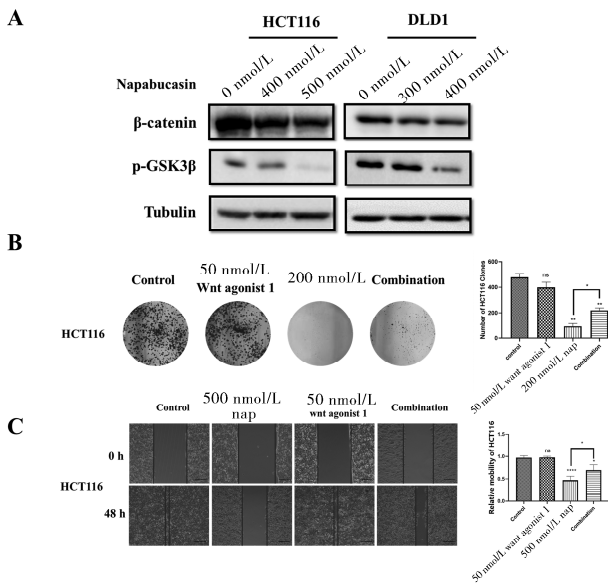


图 4 Wnt 信号通路介导了 Napabucasin 抑制结直肠癌细胞迁移及侵袭的过程

A. 用 Napabucasin 处理之后, p-GSK3 β 以及 β -catenin 的含量明显下降; B. 用 Wnt agonist 1 处理之后, HCT116 细胞的增殖能力得到了部分恢复; C. 用 Wnt agonist 1 处理之后, HCT116 细胞的迁移能力得到了部分恢复. * $P < 0.05$.

Fig. 4 Wnt signaling mediated the Napabucasin induced the inhibition of proliferation and migration of colorectal cancer cells

A. After treatment with Napabucasin, the content of p-GSK3 β and β -catenin decreased significantly; B. after treatment with Wnt agonist 1, the proliferation ability of HCT116 cells was partially restored; C. after treatment with Wnt agonist 1, the migration ability of HCT116 cells partial recovery.

* $P < 0.05$.

4 讨论

作为转录因子, STAT3 在大量实体瘤中组成型活化^[15-17]. 并且, STAT3 的活化能够增强癌细胞活性, 使许多与生存和增殖相关的基因表达上调. STAT3 可以转导很多致癌信号通路中的基因表达, 能够直接调节多种致癌基因的表达^[18]. 因

此, STAT3 成为治疗肿瘤药物的重要靶点之一. 对已有的 STAT3 小分子抑制剂进行研究, 能够进一步的了解他们的作用机理, 为临床用药提供更多的数据指导.

Napabucasin 对肿瘤细胞增殖的抑制作用已有报道, 研究人员用浓度为 300 nmol/L, 500 nmol/L 的 Napabucasin 分别处理 143B 与 MG63 两种骨肉瘤细胞系发现, Napabucasin 显著抑制了骨肉瘤细胞的增殖^[19]. 本研究中也观察到了同样的现象, 三种不同的结直肠癌细胞系 (HCT116, RKO, DLD1) 经 Napabucasin 处理之后, 无论是其克隆形成的数量还是所形成克隆的平均大小, 都明显减少, 说明 Napabucasin 能够抑制结直肠癌细胞的增殖.

STAT3 信号通路与 β -catenin 所调控的信号通路存在着很多共同的下游靶基因^[14, 20], 并且这些基因都能够在肿瘤的发生发展以及转移的过程中发挥重要的作用^[21]. 在本研究中, 通过蛋白免疫印迹实验发现 Napabucasin 在抑制了 STAT3 活性之后, Wnt 信号通路中的 β -catenin 以及 p-GSK3 β 的含量均出现了下降. 而这两种蛋白均为 Wnt 信号通路中的关键因子^[22-23]. p-GSK3 β 的含量下降, 反映了细胞内 GSK3 β 的活性升高, 造成 β -catenin 磷酸化后被泛素降解系统降解^[24]. 本研究通过 Wnt 信号通路的激活剂 Wnt agonist 1 激活 Wnt 信号通路后发现, 与单独使用 Napabucasin 相比, HCT116 细胞的增殖能力以及迁移能力都明显增强. 证明了在调控结直肠癌增殖以及迁移过程中, Wnt 信号通路与 STAT3 信号通路存在着密切联系. 而这种联系是直接联系还是间接作用, 还需要进一步的实验证明.

STAT3 抑制剂在治疗恶性肿瘤的增殖以及迁移等方面有着很好的应用潜力. 对 STAT3 抑制剂的研究, 有助于改善当前放化疗治疗效果不佳的现状. 本研究初步探究了 STAT3 抑制剂对结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移以及与 Wnt 信号通路的联系等方面的影响, 为在个体水平进一步探索控制结直肠癌肿瘤和转移提供了更多可能.

参考文献:

- [1] 陈昕涛, 姚定康. 单克隆抗体靶向治疗晚期或转移性结直肠癌研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24: 11.
- [2] Khong T L, N Thairu, H Larsen, *et al.* Identifica-

- tion of the angiogenic gene signature induced by EGF and hypoxia in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 518.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Ahmedin J. Cancer statistics 2012 [J]. *Cancer J Clin*, 2012, 62: 10.
- [4] Hua X, Jie H, Du W, *et al.* Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 5819.
- [5] 音金萍, 岳紫晨, 卓少元. STAT3:慢性炎症介导肝癌进程的关键分子[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36: 948.
- [6] Lin W, Dai Q, Xu X, *et al.* Downregulation of DPP3 promotes the proliferation and motility of breast cancer cells through activating jak2/STAT3 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514: 639.
- [7] Laudisi F, Cherubini F, Monteleone G, *et al.* STAT3 interactors as potential therapeutic targets for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1787.
- [8] Hubbard J M, Grothey A. Napabucasin: An update on the first-in-class cancer stemness inhibitor [J]. *Drugs*, 2017, 77: 1091.
- [9] Zhou Q, Peng C, Du F, *et al.* Design, synthesis and activity of BBI608 derivatives targeting on stem cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 39.
- [10] Luo J, Yan R, He X, *et al.* Constitutive activation of STAT3 and cyclinD1 overexpression contribute to proliferation, migration and invasion in gastric cancer cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9: 5671.
- [11] Zhang Y, Jin Z, Zhou H, *et al.* Suppression of prostate cancer progression by cancer cell stemness inhibitor Napabucasin [J]. *Cancer Med*, 2016, 5: 1251.
- [12] MacDonagh L, Gray S G, Breen E, *et al.* BBI608 inhibits cancer stemness and reverses cisplatin resistance in NSCLC [J]. *Cancer Lett*, 2018, 428: 117.
- [13] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30: 2785.
- [14] Mann B, Gelos M, Siedow A, *et al.* Target genes of β -catenin T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 1603.
- [15] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 1139.
- [16] Bowman T, Garcia R, Turkson J, *et al.* Stats in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 2474.
- [17] Siveen K S, Sikka S, Surana R, *et al.* Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845: 136.
- [18] Wang S, Sun Y. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (review) [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44: 1032.
- [19] Zuo D, Shogren K L, Zang J, *et al.* Inhibition of STAT3 blocks protein synthesis and tumor metastasis in osteosarcoma cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 244.
- [20] Zhang Y F, Li C S, Zhou Y, *et al.* Effects of propofol on colon cancer metastasis through STAT3/ HOTAIR axis by activating wif - 1 and suppressing Wnt pathway [J]. *Cancer Med*, 2020, 9: 1842.
- [21] 包莹, 曹培国. 结直肠癌肝转移发生的相关信号通路研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2020(2): 134.
- [22] Niehrs C. The complex world of Wnt receptor signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 767.
- [23] 顾冬梅, 覃玲艳, 干文娟, 等. 结直肠癌组织中 APC、 β -catenin 和 COX-2 的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2020(4): 452.
- [24] Voronkov A, Krauss S. Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 634.

引用本文格式:

中文: 徐树涛, 彭锐, 邹方东. Napabucasin 对结直肠癌细胞增殖及迁移的影响 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2020, 57: 1193.

英文: Xu S T, Peng R, Zou F D. Effects of Napabucasin on the proliferation and migration of colorectal cancer cells [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 1193.