

蟾毒灵抑制肿瘤相关成纤维细胞介导的转移

朱锐秋,殷佩浩

摘要 目的 探究蟾毒灵对肿瘤相关成纤维细胞(CAF)介导的肿瘤转移的作用机制。方法 从结肠癌患者组织中提取原代CAF,命名为CAF-1和CAF-2,并在共聚焦荧光显微镜下观察其形态和表面标志物表达。同时通过Western blot检测CAF表面标志物成纤维细胞激活蛋白(FAP)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(VIM)的表达来确认CAF身份。收集CAF条件培养基,通过ELISA实验检测条件培养基中的白细胞介素6(IL-6)分泌水平。选取人结肠癌细胞HCT116,分为HCT116组、HCT116加CAF条件培养基组,用Western blot检测HCT116上STAT3信号通路相关蛋白P-STAT3、STAT3表达情况,通过Western blot检测HCT116上皮间充质转化(EMT)的情况,再通过划痕实验和Transwell实验明确HCT116迁移和侵袭能力的改变。将HCT116分为对照组和蟾毒灵组,两组均用CAF条件培养基刺激,观察STAT3信号通路激活情况、EMT和侵袭能力的改变。

结果 原代细胞呈长梭形,并表达CAF表面标志物FAP、 α -SMA和VIM。ELISA实验显示CAF分泌IL-6,Western blot结果显示,CAF的条件培养基激活了HCT116的STAT3信号通路,Western blot、划痕实验和Transwell实验显示HCT116迁移和侵袭能力增加。当加入蟾毒灵后,CAF的促进转移效应得到了抑制。**结论** CAF通过释放IL-6激活了肿瘤细胞STAT3信号通路,促进了结直肠癌的转移。蟾毒灵通过抑制肿瘤细胞上STAT3信号通路的激活阻断该过程。

关键词 蟾毒灵;肿瘤相关成纤维细胞;STAT3;结直肠癌;侵袭;转移

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1240-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.012

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是新发癌症病例的第三大原因,也是癌症相关死亡的第二大常见原因。转移频率和耐药性的增加导致CRC患者的预后不良。据估计,50%~60%的CRC患者可能有转移;转移性CRC患者的5年总生存率仅为

13.3%,而局限期患者的5年总生存率为91.1%^[1-2]。其中,肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是癌症进展和转移的必要先决条件。肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)是CRC基质的主要细胞类型之一,其通过利用旁分泌因子在肿瘤的增殖、转移、血管生成和化学抗性中起重要作用^[3-4]。越来越多的证据表明,STAT3信号通路的激活是CRC细胞上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和侵袭性增加的关键因素,但关于CAF来源的白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)对于STAT3信号通路的激活的报道甚少^[5]。蟾毒灵是从蟾蜍毒液中分离的主要生物活性成分,由于其对肿瘤细胞凋亡、转移和增殖的影响,已被证实是一种有效的抗肿瘤药物。有研究^[6]表明,蟾毒灵具有靶向STAT3通路的作用。该研究旨在探索蟾毒灵对于CAF介导的肿瘤细胞侵袭和转移的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 DMEM培养基、RPIM-1640培养基、胎牛血清(FBS)、双抗、胰酶均购自美国Gibco公司;细胞培养耗材和Transwell小室购自美国Corning公司;基质胶购自美国BD公司;RIPA裂解液、上样缓冲液均购自美国Cell Signaling Technology公司;IL-6 ELISA试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司(Human, EK0428);兔源FAP抗体(英国Abcam公司, ab53066)、鼠源 α -SMA(英国Abcam公司, ab124964)、鼠源STAT3抗体(美国CST公司, 9139S)、兔源P-STAT3抗体(美国CST公司, 9145S)、兔源E-cadherin(美国CST公司, 3195S)、兔源N-cadherin(美国CST公司, 13116S)、兔源Snail(英国Abcam公司, ab180714)、鼠源VIM(美国CST公司, 5741S)和鼠源 β -actin(英国Abcam公司, ab6276);蟾毒灵购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 超低温冰箱(青岛海尔公司),全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),凝胶

2022-05-15 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81873137)

作者单位:安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

作者简介:朱锐秋,男,硕士研究生;

殷佩浩,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:yingpeihao1975@hotmail.com

电泳仪、电泳槽(美国 BIO-RAD PowerPace Basic 公司),离心机(德国 Hettich 公司),ChemiDoc MP 成像仪(美国 BIO-RAD 公司),共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

1.1.3 细胞 该课题选取结肠癌细胞 HCT116、CAF 作为实验对象,HCT116 来自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)细胞库。CRC 组织来源的 CAF,从 CRC 患者的癌组织中分离得到。细胞培养条件是 37 ℃、5% CO₂。组织标本的使用征得了患者的知情许可。

1.2 方法

1.2.1 原代 CAF 细胞提取 在培养皿中加入适量的生理盐水后将所取病人组织标本块置于其中,将多余脂肪、边缘残留组织清理掉,加入适当 10% 双抗 D-Hanks 溶液 45 ml 清洗组织至澄清。用镊子夹起组织,眼科剪剪碎至糊状。用吹管将组织碎末转移到 15 ml 离心管中,加入适量 D-Hanks 溶液完全淹没组织,配平后 1 000 r/min, 25 ℃ 离心 5 min,弃去上清液。关灯避光,加入胶原酶,封口膜封住管口,置于 37 ℃ 恒温摇床中 150 r/min 振荡 1 h。清洗胶原酶;消化后离心 5 min,倒掉胶原酶,加入含 15% 胎牛血清完全培养基 2 ml,吹打离散组织后离心 5 min,重复此步骤 3 次,待胶原酶全部去除后加入培养基,转移至小培养皿中放入培养箱中孵育。

1.2.2 细胞分组 根据实验目的将 HCT116 分成 5 组:对照组,细胞常规培养未做任何处理;CAF-1 条件培养基组,CAF-1 条件培养基加入 HCT116 中培养 24 h;CAF-2 条件培养基组,CAF-2 条件培养基加入 HCT116 中培养 24 h;蟾毒灵 + CAF-1 条件培养基组,CAF-1 条件培养基中加入蟾毒灵后加入 HCT116 作用 24 h;蟾毒灵 + CAF-2 条件培养基组,CAF-2 条件培养基中加入蟾毒灵后加入 HCT116 作用 24 h,其中蟾毒灵浓度为 35 nmol/L,作用时间为 24 h。

1.2.3 免疫荧光 CAF(2×10^4) 在显微镜上接种培养过夜。用 PBS 洗涤两次,甲醇固定 15 min,0.2% TritonX-100 渗透 5 min,5% BSA 在室温下封闭 1 h 后一抗在 4 ℃ 孵育过夜,一抗有 FAP(1 : 100,兔源)、VIM(1 : 100,鼠源),然后与二抗[山羊抗小鼠 IgG&L(AlexaFluor[®] 488)]和[山羊抗兔 IgG&L(AlexaFluor[®] 594)]孵育 2 h。用 DAPI 进行核定位评估。

1.2.4 条件培养基 当 CAF 增长到 80% 的浓度时,培养基被无血清的培养基取代。处理 48 h 后,

收集细胞悬液作为条件培养基。高速离心后收集条件培养基,通过 0.22 μm 微孔膜过滤,在 -20 ℃ 保存。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达水平 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞,置于冰上裂解 30 min 后离心提取蛋白,并使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量。用 10% 的 SDS-PAGE 分离等量的细胞裂解物,并将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,依照蛋白分子量的大小截取不同条带,将条带与一抗孵育,一抗有 FAP(1 : 1 000)、α-SMA(1 : 2 000)、VIM(1 : 1 000)、β-actin(1 : 5 000)、P-STAT3(1 : 1 000)、STAT3(1 : 1 000)、E-cadherin(1 : 1 000)、N-cadherin(1 : 1 000)、Snail(1 : 1 000)。在 4 ℃ 条件下孵育过夜,漂洗 3 次后与二抗在常温下孵育 1 h。洗膜 3 次,使用增强化学发光显色法进行显色,用 Image J 软件进行蛋白表达分析。

1.2.6 ELISA 检测 IL-6 水平 收集 CAF、HCT116 的条件培养基。使用 ELISA 试剂盒测定 IL-6 水平。将 100 μl 样品加入抗体包被的 96 孔板的每个孔中,室温下孵育 2 h。将 100 μl 的工作检测溶液加到每个孔中,在加入 100 μl 底物溶液之前,室温下再孵育 1 h。加入 50 μl 终止液终止反应。在 450 nm 波长处读取吸光度。

1.2.7 划痕实验 肿瘤细胞汇合后,用无菌移液管尖端直线划痕 HCT116。PBS 清洗细胞,清除细胞碎片,加入培养基。24 h 记录划痕照片,对不同样本的划痕实验进行调查和分析。使用 Image J 软件测量划痕面积。使用倒置显微镜获得数码照片。

1.2.8 Transwell 实验 预先用基质胶包被 Transwell 小室的底膜并放入 24 孔 Transwell 专用板中。将转染后的细胞分散在 300 μl 无血清的培养基中并加入小室内;向小室下部的孔中加入 700 μl 含 10% FBS 的培养基。孵育 48 h 后,将穿出到膜下表面的细胞用甲醇固定,结晶紫染色,并在显微镜下拍照,在光学显微镜下以 ×400 放大倍数计数细胞。

1.2.9 CCK-8 检测 HCT116 细胞活力 细胞铺板于 96 孔板中,并在 24 h 内用蟾毒灵作用。24 h 后,使用 CCK-8 检测方法评估细胞活力。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 7 和 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。这些图例说明了事件和独立实验的数量,以及与统计细节和方法相关的信息。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较, $P < 0.05$ 为差

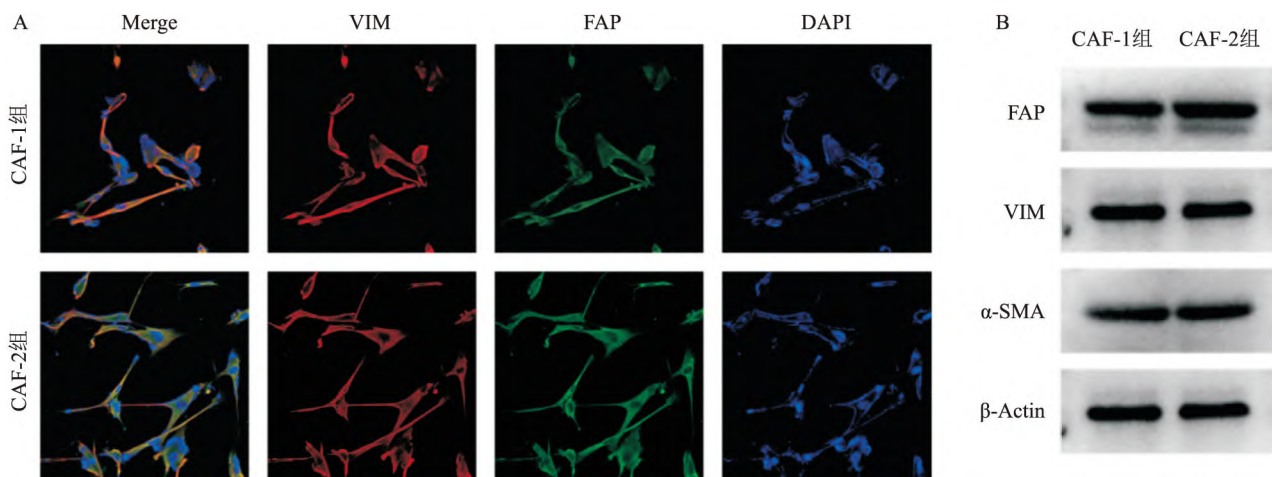


图1 原代 CAF 提取及验证

A: CAF 免疫荧光共聚焦显微镜拍摄 $\times 400$; B: 各组 FAP、 α -SMA 和 VIM 蛋白的免疫印迹图, β -Actin 为内参

异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 CAF 提取及验证 首先使用 CRC 组织标本提取原代 CAF 细胞,对细胞株命名为 CAF-1 和 CAF-2,由图 1 结果可见,镜下观察其形态呈长梭形。提取的原代细胞表达 CAF 常见表面标志物 FAP、 α -SMA 和 VIM。这一结果表明,提取的原代细胞是成纤维细胞,确保后续实验的可靠性。

2.2 CAF 中 IL-6 的分泌水平 CRC 中,CAF 通常有 IL-6 的分泌。如图 2 所示,ELISA 实验显示,CAF 的 IL-6 分泌强于 CRC 细胞。CAF 中 IL-6 分泌水平高,差异有统计学意义($F = 220.2, P < 0.05$)。

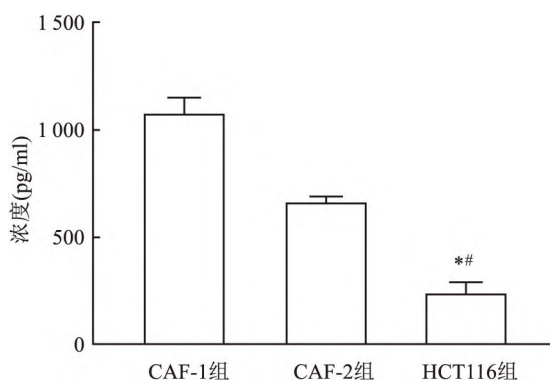


图2 各组细胞 IL-6 分泌水平

与 CAF-1 组比较: * $P < 0.05$; 与 CAF-2 组比较: # $P < 0.05$

2.3 CAF 促进结直肠细胞 STAT3 信号通路激活

为了进一步探究 CAF 促进 CRC 侵袭的机制,该研究选择对照组、CAF-1 条件培养基组和 CAF-2 条件培养基组进行 Western blot 分析。如图 3 所示,与

对照组相比,条件培养基组中人结肠癌肿瘤细胞 HCT116 的 P-STAT3 蛋白表达升高,差异有统计学意义($F = 39.32, P < 0.05$)。结果表明 CAF 可以促进 CRC 的 STAT3 信号通路激活。

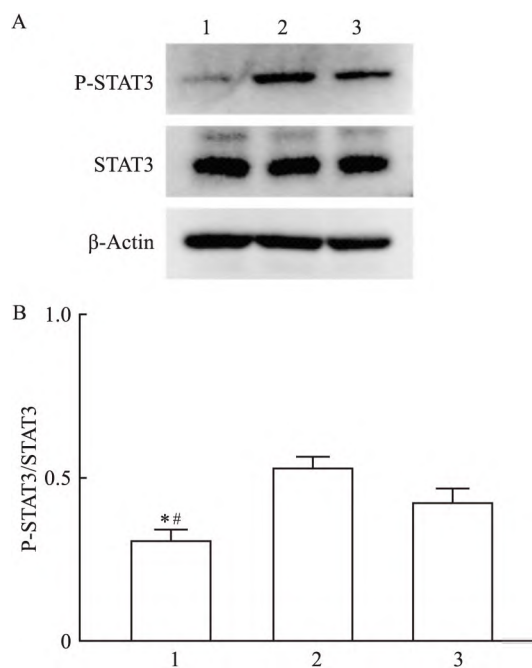


图3 各组细胞 P-STAT3、STAT3 蛋白表达量

A: 各组的 P-STAT3、STAT3 蛋白的免疫印迹图, β -Actin 为内参; B: 各组的 P-STAT3 半定量分析结果; 1: 对照组; 2: CAF-1 条件培养基组; 3: CAF-2 条件培养基组; 与 CAF-1 条件培养基组比较: * $P < 0.05$; 与 CAF-2 条件培养基组比较: # $P < 0.05$

2.4 CAF 促进 CRC 侵袭转移能力提升

为了观察 CRC 细胞侵袭能力的改变,该研究选择对照组、CAF-1 条件培养基组和 CAF-2 条件培养基组进行

Western blot、划痕实验和 Transwell 实验。如图 4 所示,与对照组相比,条件培养基组 HCT116 的 E-cadherin 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ($F = 98.27$, $P < 0.05$), N-cadherin 和 Snail 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($F_{\text{N-cadherin}} = 56.3$, $F_{\text{Snail}} = 218$, $P < 0.05$)。迁移能力和侵袭能力提升,差异有统计学意义 ($F_{\text{scratch}} = 199.1$, $F_{\text{transwell}} = 242.9$, $P < 0.05$)。这一结果表明 CAF 可以促进 CRC 的侵袭转移能力。

2.5 蟾毒灵对于 CAF 促转移效应的影响 为了研究蟾毒灵对于 CAF 促转移效应的影响,本研究选择 CAF-1 条件培养基组、CAF-2 条件培养基组、蟾毒灵 + CAF-1 条件培养基组和蟾毒灵组、蟾毒灵 + CAF-2 条件培养基组进行试验,其中蟾毒灵浓度为 35

nmol/L,作用时间为 24 h。如图 5A 所示,蟾毒灵是蟾蜍毒液中分离的主要生物活性成分。如图 5B 所示,通过 CCK-8 实验,为该研究选择出蟾毒灵的非杀伤浓度进行后续实验 ($IC_{15} = 35$ nmol/L)。如图 5C、D 所示,蛋白免疫印迹分析表明蟾毒灵可以抑制 CAF 条件培养基对于 HCT116 中 STAT3 信号通路的激活,蟾毒灵组 P-STAT3 表达降低,差异有统计学意义 ($F = 159$, $P < 0.05$)。通过蛋白免疫印迹分析、划痕实验和 Transwell 实验显示蟾毒灵组有效的抑制了 CAF 促进肿瘤 EMT、迁移和侵袭的效应,差异有统计学意义 ($F_{\text{E-cadherin}} = 109.8$, $F_{\text{N-cadherin}} = 64.53$, $F_{\text{Snail}} = 446.6$, $F_{\text{scratch}} = 59.5$, $F_{\text{transwell}} = 87.31$, $P < 0.05$)。见图 5E、F。

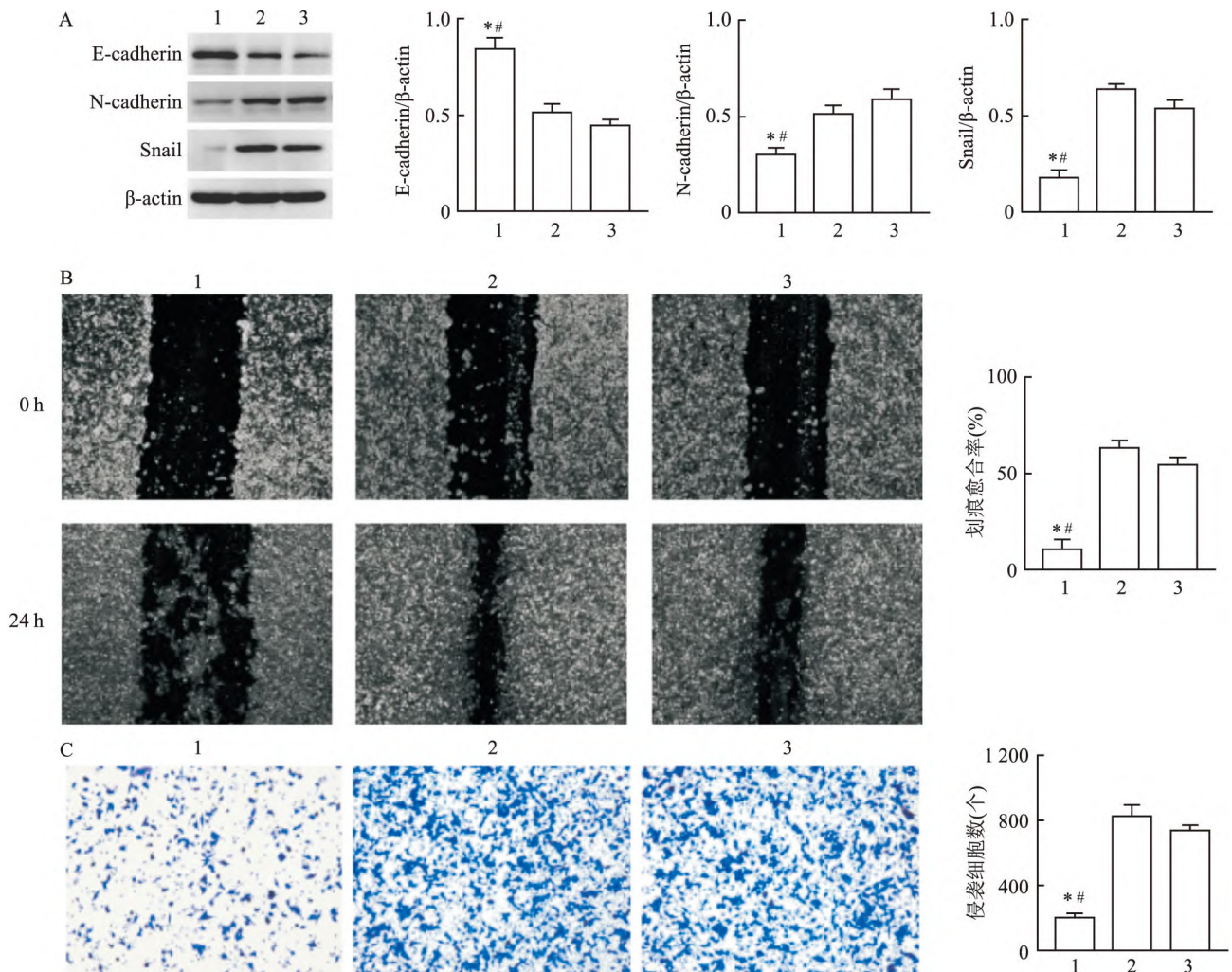


图 4 各组细胞侵袭和迁移能力情况

A: 各组的 E-cadherin、N-cadherin、Snail 蛋白的免疫印迹及半定量分析结果; B: 划痕实验 $\times 50$; C: Transwell 结晶紫染色 $\times 100$; 1: 对照组; 2: CAF-1 条件培养基组; 3: CAF-2 条件培养基组; 与 CAF-1 条件培养基组比较: * $P < 0.05$; 与 CAF-2 条件培养基组比较: # $P < 0.05$

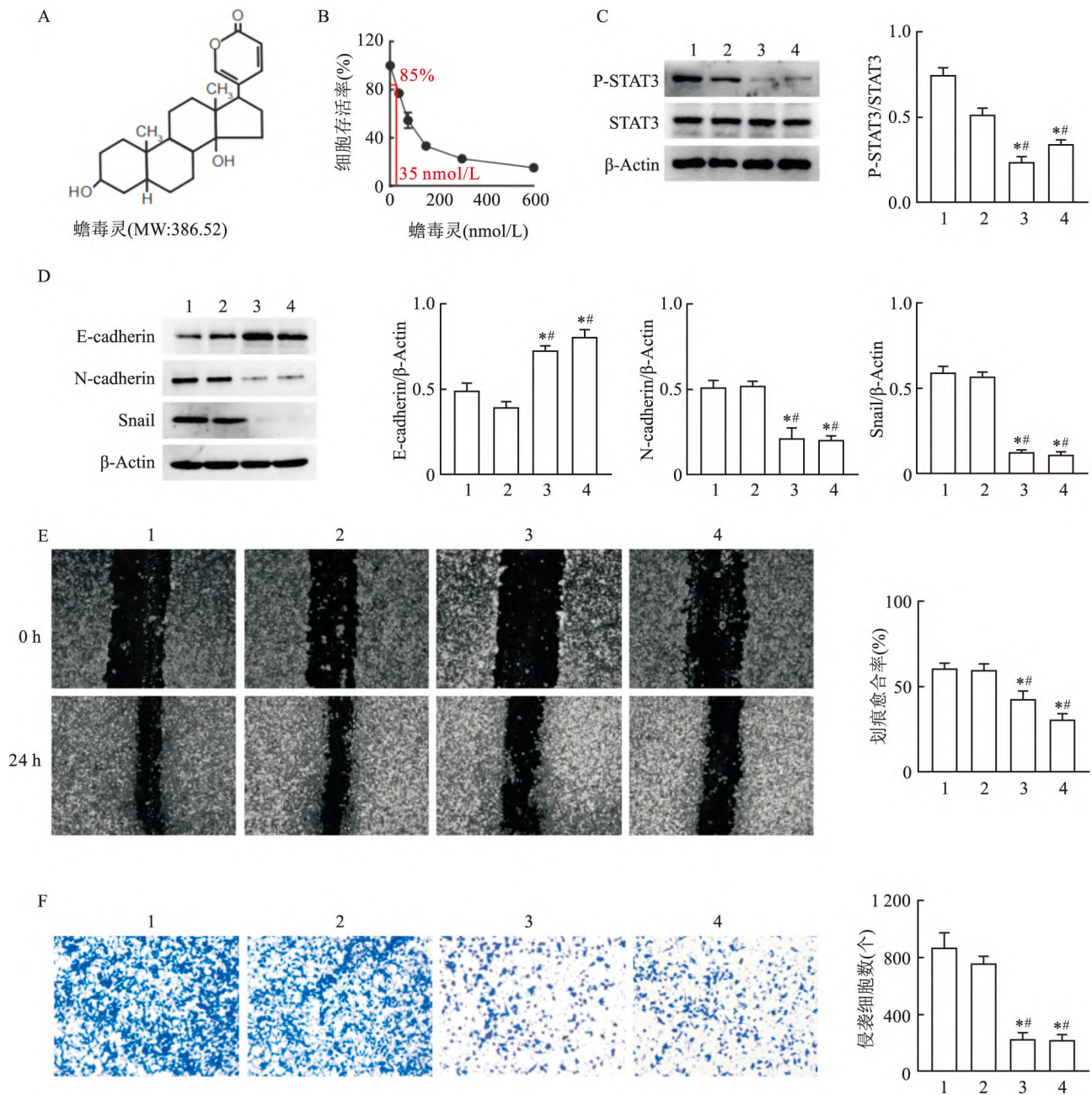


图5 咖啡酰香豆素对于 CAF 促转移效应的影响

A: 咖啡酰香豆素的分子结构; B: 用咖啡酰香豆素处理 HCT116 24 h 后 HCT116 的细胞活力; C: 各组的 P-STAT3、STAT3 蛋白的免疫印迹图及半定量分析结果, β -Actin 为内参; D: 各组的 E-cadherin、N-cadherin、Snail 蛋白的免疫印迹图及半定量分析结果, β -Actin 为内参; E: 划痕实验 $\times 50$; F: Transwell 结晶紫染色 $\times 100$; 1: CAF-1 条件培养基组; 2: CAF-2 条件培养基组; 3: 咖啡酰香豆素 + CAF-1 条件培养基组; 4: 咖啡酰香豆素 + CAF-2 条件培养基组; 与 CAF-1 条件培养基组比较: * $P < 0.05$; 与 CAF-2 条件培养基组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤转移是 CRC 晚期患者死亡的主要原因。大多数转移性 CRC 患者的中位生存期仅为 2 年, 远不能令人满意^[2]。为改善转移性 CRC 患者的生存率, 近年来越来越多的研究将重点放在对肿瘤转移的机制探讨当中, 如潘琪伟等^[7]的研究证明了氧化

固醇结合蛋白相关蛋白 8 (ORP8) 能够抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与阻断 EMT 有关。

最近的研究^[4]表明, 肿瘤转移密切依赖于肿瘤细胞与 TME 的相互作用, 这是一个动态的、不断变化的网络。CAF 被认为是肿瘤基质中的活化成纤维细胞, 有助于恶性肿瘤的发生和发展。大量实验

和临床研究^[4]支持 CAF 分泌生长因子来调节原发肿瘤中的肿瘤生长、EMT 从而促进转移。然而,CAF 促进肿瘤细胞转移的机制还有待确定。

IL-6 是一个多功能的细胞因子,能介导对损伤或感染的反应,也参与免疫疾病和癌症的过程中。最近有研究^[8]表明,在癌症中,IL-6 由癌细胞、炎症细胞和基质细胞产生,在原代 CAF 的提取后,通过 ELISA 实验观察到 IL-6 在 CAF 中大量产生。IL-6 水平升高会刺激 STAT3 信号通路的过度激活,这通常与肿瘤的 EMT 和患者预后不良有关^[9],本研究通过 Western blot 实验证明了 CAF 条件培养基会激活肿瘤细胞的 STAT3 信号通路。并且肿瘤 STAT3 信号通路的过度激活会促进 IL-6 的分泌,形成正反馈,导致整个肿瘤微环境内的 IL-6 含量进一步增加^[10]。根据划痕实验和 Transwell 实验结果表明,STAT3 信号通路激活后会导致肿瘤细胞 EMT,并且肿瘤细胞迁移和侵袭能力升高。虽然相较于对照组,CAF-1 和 CAF-2 均促进了肿瘤细胞侵袭,但是促进能力存在差异。结合文献^[4]显示,这可能源于 CAF 存在异质性,细胞因子分泌存在差异。所以靶向 STAT3 信号通路进行治疗至关重要。近几年在鉴定和开发可应用于临床的 STAT3 抑制剂方面科学家付出了相当大的努力。然而,鉴于 STAT3 作为细胞内转录因子的地位,其缺乏酶活性,通常被认为是不可成药,对 STAT3 可能的抑制剂开发一直很困难^[11]。

蟾毒灵是一种中药单体,是从中药蟾酥中分离得到的主要活性成分。在过去的十年,蟾毒灵在各种癌症中展示出杰出的抗肿瘤能力。蟾毒灵的抗癌机制可概括为抑制增殖、促进细胞凋亡、抑制血管生成和转移、逆转耐药性和诱导自噬^[12]。最近的研究表明蟾毒灵可以有效抑制 STAT3 信号通路,Dong et al^[13]的实验表明,蟾毒灵能显著降低 Mcl-1 的表达,并适度降低 Bcl-XL 的表达水平。这些抗凋亡蛋白的下调与抑制转录因子 STAT3 的激活密切相关。Wu et al^[14]在实验中发现,蟾毒灵在体内和体外均抑制了 JAK2 和 STAT3 的磷酸化,进而抑制 STAT3 信号通路的激活。本研究通过 Western blot 实验对此进行了验证。通过划痕实验和 Transwell 实验结果表明,随着 STAT3 信号通路的抑制,CAF 的促侵袭能力得到了抑制。并且根据以往研究^[15]显示,蟾毒灵还可以抑制其他促进肿瘤侵袭的信号通路,同

时指出蟾毒灵对 TME 细胞没有直接影响。值得注意的是,与之前关于蟾毒灵的其他抗肿瘤研究相比,该实验选择了较低浓度的蟾毒灵 ($IC_{15} = 35 \text{ nmol/L}$)^[6]。实验结果表明低浓度蟾毒灵影响 CAF 介导的肿瘤转移的机制,并且 STAT3 信号通路直接作用于肿瘤细胞而不是 CAF 细胞,体现了蟾毒灵低毒性高效应的特点。

综上所述,本研究通过原代 CAF 的提取探讨了 CAF 和肿瘤细胞转移之间的关系,提示 STAT3 信号通路是肿瘤细胞转移的关键因素,其中可以通过蟾毒灵阻断 STAT3 信号通路的激活来抑制 CAF 介导的肿瘤转移。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Sauer A G, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3):145-64.
- [3] Musa M, Ali A. Cancer-associated fibroblasts of colorectal cancer and their markers: updates, challenges and translational outlook[J]. Future Oncol, 2020, 16(29):2329-44.
- [4] Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(2):99-115.
- [5] 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(2):136-54.
- [6] Fang K, Zhan Y P, Zhu R Q, et al. Bufalin suppresses tumour microenvironment-mediated angiogenesis by inhibiting the STAT3 signalling pathway[J]. J Transl Med, 2021, 19(1):383.
- [7] 潘琪伟, 陈韦璵, 裴冬生, 等. ORP8 对结直肠癌 DLD-1 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(6):904-8.
- [8] Fisher D T, Appenheimer M M, Evans S S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment[J]. Semin Immunol, 2014, 26(1):38-47.
- [9] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition[J]. Cells, 2020, 9(1):217.
- [10] Rokavec M, Oner M G, Li H H, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(4):1853-67.
- [11] Thilakasiri P S, Dmello R S, Nero T L, et al. Repurposing of drugs as STAT3 inhibitors for cancer therapy[J]. Semin Cancer

- Biol, 2021, 68:31–46.
- [12] 许颖, 陈美, 金雪锋, 等. 蟾毒灵体内外抗肿瘤作用及制剂研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2829–33.
- [13] Dong Y H, Yin S T, Li J H, et al. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis *via* inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(4):394–403.
- [14] Wu X Y, Tian F, Su M H, et al. BF211, a derivative of bufalin, enhances the cytotoxic effects in multiple myeloma cells by inhibiting the IL-6/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64:24–32.
- [15] Sheng X, Sun X T, Sun K, et al. Inhibitory effect of bufalin combined with Hedgehog signaling pathway inhibitors on proliferation and invasion and metastasis of liver cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4):1513–24.

Bufalin inhibits tumor-associated fibroblast-mediated invasion and metastasis

Zhu Ruiqiu, Yin Peihao

(Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062)

Abstract Objective To explore the mechanism of bufalin on tumor metastasis mediated by cancer-associated fibroblasts (CAF). **Methods** The primary CAFs were extracted from the tissues of colon cancer patients, classified into CAF-1 and CAF-2, and their morphology and surface markers were observed under confocal microscopy. Western blot detected the expression of CAF surface markers fibroblast activated protein (FAP), α -smooth muscle actin (α -SMA), and Vimentin (VIM) to confirm the identity of CAF. The CAF conditioned medium was collected, and the interleukin-6 (IL-6) secretion level in the conditioned medium was detected by Elisa experiment. HCT116 cells were divided into 2 groups, which was HCT116 group and HCT116 with CAF conditioned medium group. The expression of P-STAT3 and STAT3, proteins related to STAT3 pathway in HCT116, was detected by Western blot. Western blot was used to detect epithelial mesenchymal transformation (EMT) of HCT116 and the changes in the migration and invasion ability of HCT116 were confirmed by scratch experiment and Transwell experiment. Two groups of HCT116 cells, including a control group and a bufalin group, were both treated with CAF-conditioned medium to observe the activation of STAT3 pathway and the changes in migration and invasion capabilities. **Results**

The extracted cells showed a long spindle shape and expressed CAF surface markers FAP, α -SMA and VIM. The Elisa experiment showed that CAF secreted IL-6; Western blot results showed that the conditioned medium of CAF activated the STAT3 signaling pathway of HCT116; Western blot, the scratch experiment and Transwell experiment also found that the migration and invasion ability of HCT116 increased. When bufalin was added, the migration promotion effect of CAF was inhibited. **Conclusion** CAF activates the STAT3 pathway of tumor cells by releasing IL-6, and promotes the invasion and metastasis of colorectal cancer. Bufalin blocks the process by inhibiting the activation of the STAT3 pathway on tumor cells.

Key words bufalin; cancer-associated fibroblast; STAT3; colorectal cancer; invasion; metastasis