

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.005

pEGFP-C1-STAT3 真核表达载体的构建及其在 SGC7901 细胞株中对 Snail 表达的影响

李 旭,袁济钢,邹晓平

Construction of pEGFP-C1-STAT3 Recombinant Eukaryotic Expression Vector and Its Effect on Expression of Snail in SGC7901 Cell Line

LI Xu, YUAN Jigang, ZOU Xiaoping

Department of Gastroenterology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Corresponding Author: ZOU Xiaoping, E-mail: 13770771661@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect on the expression of zinc finger transcript factor Snail1 (Snail) and excision repair cross complementation group 1 (ERCC1) after transfected with the signal transducer and activator of transcription factor (STAT3) in SGC7901 cell line. **Methods** We used recombinant DNA technology to construct the pEGFP-C1-STAT3 recombinant eukaryotic expression vector and transfected by liposome 2000 in SGC7901. The expression of EGFP was observed in transfection group by fluorescent microscopy. We detected the expression of STAT3, pSTAT3, Snail, ERCC1 and the apoptosis rate using Western blot and flow cytometry after cisplatin (DDP) treated. **Results** The recombinant plasmid was confirmed by double restriction enzyme digestion and the sequence was consensus with STAT3 gene sequencing. SGC7901 cells were transfected with recombinant plasmid pEGFP-C1-STAT3 and the product of recombinant plasmid was obtained. Western blot detection of the pSTAT3, Snail and ERCC1 expression showed significantly increased protein levels. Flow cytometry analysis revealed obviously decreasing of cell early apoptosis after the DDP treatment in pEGFP-C1-STAT3 transfection group. **Conclusion** We constructed the pEGFP-C1-STAT3 recombinant eukaryotic expression vector successfully and enhanced the expression of Snail and ERCC1 after transfection in SGC7901 cell line, which decreased its sensitivity to cisplatin.

Key words: Signal transducer and activator of transcription factor (STAT3); Zinc finger transcript factor Snail; Excision repair cross complementation group 1 (ERCC1); Gastric cancer; Vector construction

摘要:目的 研究信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 基因转染人胃癌细胞株 SGC7901 后,对锌指转录因子 Snail1 (Snail) 及切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross complementation group 1, ERCC1) 表达的影响。**方法** 利用基因重组技术构建重组 pEGFP-C1-STAT3 真核表达载体;脂质体介导转染技术转染胃癌细胞株 SGC7901,荧光显微镜、Western blot 检测转染后 SGC7901 细胞株中 STAT3、pSTAT3、Snail 及 ERCC1 的表达,流式细胞仪检测转染后顺铂处理下细胞凋亡率。**结果** 重组质粒经 Hind III、Sac II 双酶切测序与 STAT3 基因序列一致;利用脂质体介导将 pEGFP-C1-STAT3 重组质粒转染 SGC7901 细胞株,获得了 STAT3 基因表达,Western blot 检测 pSTAT3、Snail、ERCC1 表达增高,具有统计学意义,流式细胞术分析显示转染重组质粒 pEGFP-C1-STAT3 后,细胞在顺铂作用下的早期凋亡率减低。**结论** 成功构建 STAT3 重组质粒并转入中分化胃腺癌细胞株 SGC7901 后,细胞 Snail 及 ERCC1 显著增高,细胞对顺铂敏感度下降。

关键词: 信号转导与转录激活因子 3; 锌指转录因子; 切除修复交叉互补基因 1; 胃癌; 载体构建

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

收稿日期:2012-10-23;修回日期:2012-12-20

基金项目:江苏省消化系统疾病临床医学中心基金资助项目 (BL2012001)

作者单位:210008 南京,南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科

通信作者:邹晓平, E-mail: 13770771661@163.com

作者简介:李旭 (1986-),女,硕士在读,主要从事消化系统肿瘤的研究

0 引言

信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription factor, STAT3) 于 1994 年作为白细胞介素-6 (IL-6) 信号传递中的急性反应因子 (acute-phase response factor, APRF) 的研

究中被发现并纯化^[1],随着对其研究的不断深化,STAT3 及其下游靶基因的表达对人类各类肿瘤包括消化系统肿瘤细胞的生长、转移、血管生成及耐药等方面起着重要的作用。锌指转录因子 Snail 是 EMT 的主要调控因子之一,在细胞的转移、侵袭中起着重要的作用,此外,近年来已有研究发现 Snail 与化疗耐药也密切相关。由于胃癌细胞中 STAT3 与 Snail 及耐药机制的研究鲜见报道,本实验构建了 pEGFP-C1-STAT3 重组质粒,并转入胃癌细胞株 SGC7901 中,初步探讨胃癌细胞株中 STAT3 对于 Snail 及 ERCC1 表达的影响,为日后胃癌化疗耐药及侵袭转移等的控制及进一步的研究提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SGC7901 细胞株为本实验室传代培养;空白质粒 pEGFP-C1 由鼓楼医院生殖中心惠供;大肠杆菌 Trans1-T1 Phage Resistant、Trans2K Plus II DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* II、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 为大连 Takara 公司产品;琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品;质粒 DNA 提取试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品;RPMI1640 及胎牛血清为南京维森特生物技术有限公司产品;胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品;Liposome2000 为美国 Invitrogen 公司产品;蛋白 Marker 为加拿大 Fermentas 公司产品;STAT3、pSTAT3 购自美国 Cell Signaling 公司;Snail、ERCC1 购自美国 Abcam 公司;Tublin 购自南京 Bioworld 公司;羊抗鼠及羊抗兔 Ig-G 二抗购自杭州联科公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 STAT3 基因的扩增

根据 GenBank 中 STAT3 的 mRNA 序列设计引物,引物序列为上游:5'-GTTGTCAAGCTTG-GATGGCCCAATGGAATCA-3',下游引物:5'-TCCCCGCGGGGTCACATGGGGGAGGTAGC-3'。其中,在上游引物 5'端加入 *Hind* III 酶切位点,下游引物中加入 *Sac* II 酶切位点。从 SGC7901 胃癌细胞株中抽提总 mRNA,再以 RT-PCR 方法大量扩增 STAT3 片段。PCR 循环条件:98.0℃ 10 s,56.0℃、58.0℃、60.9℃、64.5℃、67.5℃、69.2℃、70.0℃ 15 s,72℃ 2 min,共 35 个循环,72℃ 延伸

10 min。1%琼脂糖凝胶电泳分离目的基因,按照 DNA 抽提试剂盒说明回收 DNA。本实验在 7 种退火温度下全亮,因此切胶回收全部退火温度下亮带。

1.2.2 pEGFP-C1-STAT3 重组质粒的构建

取适量回收的 DNA 产物与载体 pEGFP-C1 进行双酶切,切胶回收 2.3 kB 及 4.7 kB 片段进行纯化,将纯化后的目的基因与载体片段按浓度比 9:1 混合,16℃ 连接 4 h,连接产物转化感受态细胞 (Trans1-T1 Phage Resistant 大肠杆菌),挑取单克隆菌落置入含卡那霉素 30 μg/ml 的 LB 培养液 (Luria Bertani medium) 中 37℃,250 r/min 摇菌过夜(不超过 12 h),第二天进行质粒抽提。将重组好的 pEGFP-C1-STAT3 用 *Hind* III、*Sac* II 进行双酶切鉴定,并将鉴定正确的质粒菌液送华大基因公司测序。

1.2.3 质粒的转染及 EGFP 荧光表达检测

采用脂质体转染法。将状态良好、处于对数生长期的胃癌细胞系 SGC7901 用含 0.25% EDTA 的胰酶消化,用完全培养液重悬后计数,按 5×10^5 /孔接种于六孔板中,待细胞融合度达到 80% 时换无血清培养液饥饿培养 2 h 后转染,分别将空载体 pEGFP-C1 及重组质粒 pEGFP-C1-STAT3 与 Liposome2000 按照 5 μg:8 μl 比例进行混合,转入六孔板细胞株中,每孔加入 2 ml 无血清无双抗 RPMI 1640 培养液。4 h 后将无血清无双抗培养液换成有血清无双抗培养液,转染 24 h 后,于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白荧光信号表达情况。

1.2.4 Western blot 法检测 STAT3、pSTAT3 及 Snail 的表达水平

SGC7901 细胞株在转染空载体 pEGFP-C1 及重组质粒 pEGFP-C1-STAT3 48 h 后用含裂解液的上样缓冲液裂解对数生长期的上述六孔板中提取细胞蛋白,用 TCA 法测定蛋白浓度,100℃ 煮沸 10 min,离心 15 min 后上样,10% SDS-PAGE 电泳分离、转膜、含 3% BSA 的 TBST 封闭 1 h,再与 STAT3、pSTAT3、Snail 及 Tublin 抗体孵育过夜。第二天经 TBST 洗涤后,用 HRP 偶联的羊抗鼠及羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜后,用 ECL 化学发光法显影成像。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

在六孔板中按 5×10^5 /孔接种 SGC7901 细胞,按上述方法转染重组质粒 pEGFP-C1-STAT3 及空载体 pEGFP-C1,转染 24 h 后换无血清无双抗培养液饥饿 2 h,再向每孔中加入含顺铂的无双抗 RPMI 1640 完全培养液,使顺铂作用浓度达到 10 μg/ml,避光作用 24 h,吸出上清液,用 PBS 洗一遍,向每孔

中加入不含 EDTA 的胰酶(500 μl)消化后收集细胞,用 PBS 洗涤细胞二次(2 000 r/min 离心 5 min),收集(1~5) × 10⁵ 细胞,加入 500 μl 的结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μl Annexin V FITC 混匀后,加入 5 μl 碘化丙啶,混匀,室温避光反应 5~15 min,在流式细胞仪下检测细胞凋亡率。实验重复三次。

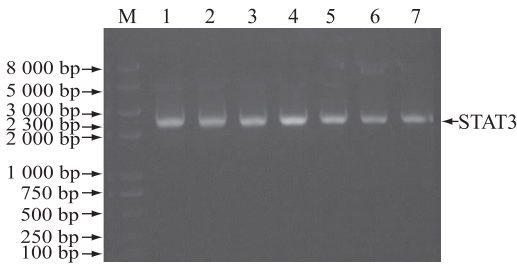
1.3 统计学方法

应用 Quantity one、SPSS17.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组均数的比较用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STAT3 基因 cDNA PCR 扩增结果

STAT3 经 PCR 扩增后电泳在 2.3 kB 处出现一条目的条带,与预期结果一致,见图 1。



M: DNA marker; 1-7: Represent different annealing temperature. 1; 56.0°C; 2; 58.0°C; 3; 60.9°C; 4; 64.5°C; 5; 67.5°C; 6; 69.2°C; 7; 70.0°C

图 1 STAT3 基因 PCR 扩增

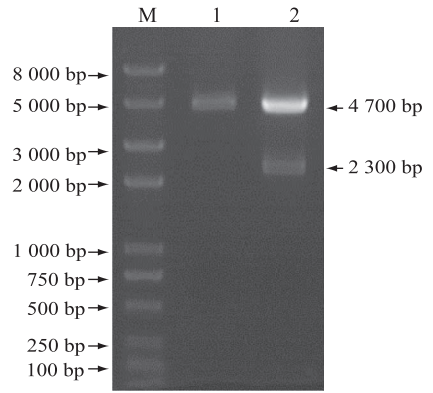
Figure 1 PCR amplification of STAT3 gene

2.2 STAT3 基因重组质粒的双酶切及测序鉴定

pEGFP-C1 载体相对分子质量为 4.7 kB, PCR 扩增产物约 2.3 kB。提取的 pEGFP-C1-STAT3 重组质粒经 *Hind* III、*Sac* II 双酶切后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。重组质粒菌液送华大基因公司测序,插入片段与 Genbank 中的 STAT3 (NM_139276) 进行比较,证实无移码改变,提示重组质粒构建成功。

2.3 STAT3 转染细胞株 SGC7901 绿色荧光蛋白表达的观察

重组 pEGFP-C1-STAT3 表达质粒与空载体 pEGFP-C1 转染 SGC7901 细胞株 24 h 后,荧光显微镜观察显示两组转染细胞中均有绿色荧光蛋白表达,说明二者均已成功转染入 SGC7901 细胞。pEGFP-C1-STAT3 成功转染细胞 24 h 后表达为 EGFP 与 STAT3 的融合蛋白,分布于整个细胞,见图 3A; pEGFP-C1 成功转染细胞 24 h 后的绿色荧光则为单纯 EGFP 表达,主要分布于细胞核中,见图 3B。



M: DNA marker; 1; vector pEGFP-C1 digested with *Hind* III and *Sac* II; 2; recombinant plasmid pEGFP-C1-STAT3 digested with *Hind* III and *Sac* II

图 2 重组质粒双酶切鉴定

Figure 2 Identification of the recombinant plasmid pEGFP-C1-STAT3 by *Hind* III and *Sac* II digestion

2.4 SGC7901 转染后细胞 STAT3、pSTAT3、Snail、ERCC1 的表达

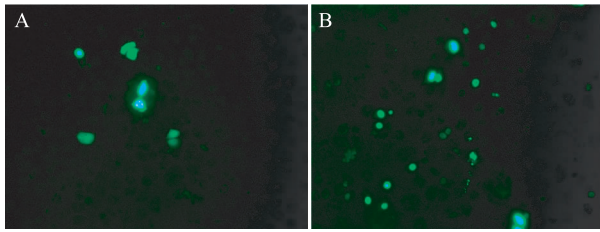
重组质粒转染细胞后,用 Western blot 检测 STAT3、pSTAT3、Snail 蛋白的表达情况。pEGFP-C1-STAT3 转染细胞 48 h 后,STAT3、pSTAT3、Snail 及 ERCC1 处于高水平表达,与转染 pEGFP-C1 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见图 4。

2.5 pEGFP-C1-STAT3 转染 SGC7901 细胞后对顺铂(DDP)诱导的早期凋亡的影响

用流式细胞仪检测胃癌细胞株转染 pEGFP-C1-STAT3 及转染空载体 pEGFP-C1 24 h 后,在终浓度为 10 μg/ml 的 DDP 诱导 24 h 下细胞早期凋亡率,以未经任何处理的 SGC7901 细胞株作为对照。转染 pEGFP-C1-STAT3 组细胞的早期凋亡率为 (33.47 ± 1.087)%,而转染空载体 pEGFP-C1 组细胞在 DDP(10 μg/ml, 24 h) 诱导下的早期凋亡率为 (42.33 ± 1.089)%,两者差异有统计学意义 (*P* < 0.05),见图 5。

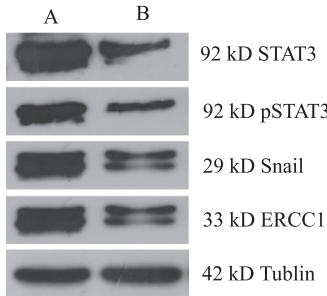
3 讨论

人类 stat3 基因有三种形式的突变体,其中突变体 1 (NM_139276) 编码了最完整的 STAT3 蛋白,生理状态下的 STAT3 在细胞的增殖及分化中起着重要的作用。随着人们对 STAT3 研究的逐渐深入,STAT3 在肿瘤细胞的生长及转移中所起的作用也逐渐为大家所重视。如在泌尿系统肿瘤中,STAT3 激活的小鼠模型可以使膀胱原位癌直接进展为浸润癌^[2];在胰腺癌中,磷酸化的 STAT3 (pSTAT3) 通过在蛋白和基因水平上调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,



A: expression of EGFP in SGC7901 cells at 24 h after transfection with plasmid pEGFP-C1-STAT3, detected by immunostaining; B: expression of EGFP in SGC7901 cells at 24 h after transfection with vector pEGFP-C1, detected by immunostaining

图 3 SGC7901 细胞绿色荧光蛋白信号的观察结果 (×200)
Figure 3 Green fluorescent protein signal of SGC7901 (×200)

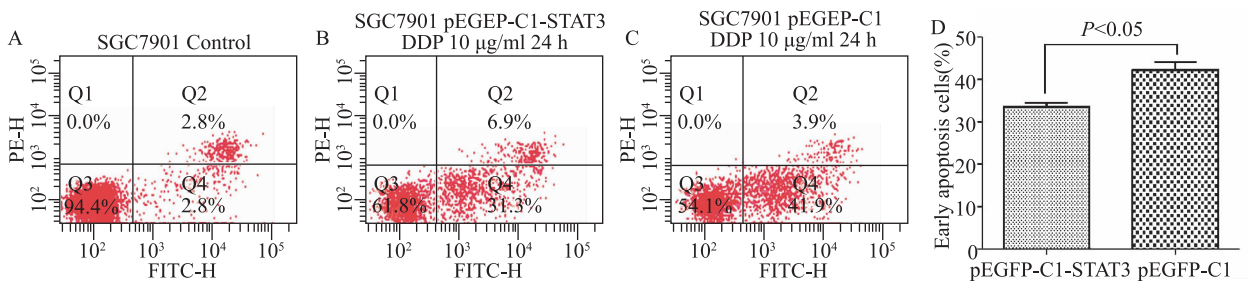


A: pEGFP-C1-STAT3 transfected group; B: pEGFP-C1 transfected group

图 4 Western blot 检测转染质粒后 SGC7901 细胞中 STAT3、pSTAT3、Snail、ERCC1 及 Tublin 蛋白的表达
Figure 4 The protein expression of STAT3, pSTAT3, Snail, ERCC1 and Tublin in SGC7901 cells after transfection, detected by Western blot

VEGF), 促进肿瘤血管生成, 并通过 VEGF-C, 提高早期胰腺癌在淋巴结的转移^[3]; 肝细胞癌中 siRNA 介导的 STAT3 表达下调可以抑制上皮间质转化 (epithelial - mesenchymal transition, EMT) 的发生, 进而增强肝癌细胞对化疗药物 (阿霉素) 的敏感

度^[4]。在胃肠道肿瘤中, STAT3 的致瘤作用亦逐渐为人们所重视。最近 Xiong 等^[5]用芯片堆叠、小干扰 RNA 及免疫组织化学染色等技术证实 STAT3 调控了胃癌细胞株 AGS 中控制细胞生长和周期进程的相关基因, 如 Bcl-2、p16(ink4a) 和 p21(waf1/cip1) 等的表达, 且 pSTAT3 (Tyr705) 的表达与 TNM 分期、分化和生存相关, 提示 STAT3 可能是胃癌靶向治疗的潜在因子并且 pSTAT3(Tyr705) 的表达可以预示胃癌的预后。抑制 STAT3 的活化则可逆转胃癌细胞株对化疗药物的敏感度^[6]。Snail 是上皮间质转化的重要调控因子, 其编码的锌指转录蛋白可与细胞黏附因子 E-cadherin 的启动子区 E-box 结合, 在转录水平上抑制 E-cadherin 的表达^[7], 从而降低细胞间的黏附力, 或通过上调基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 的表达来促进细胞基底膜的水解^[8], 从而增加了肿瘤细胞的侵袭力。肿瘤细胞中 Snail 的表达除了对其转移侵袭具有一定的影响外, 对肿瘤的耐药也有一定的作用。Hsu 等^[9]在研究头颈部鳞癌对顺铂的耐药时指出 Snail 直接调节了化疗耐药基因切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross complementation group 1, ERCC1) 的转录。Snail 可以通过竞争性结合 ERCC1 启动子部位的 E-box 连接序列, 促进 ERCC1 基因的表达, 从而通过增强肿瘤 DNA 修复能力实现顺铂耐药。在人膀胱癌组织标本中 Snail 与 ERCC1 的表达呈正相关, 且二者联合表达的膀胱癌患者无病生存期显著下降^[10]。STAT3 是 Snail 的上游调节因子, Yamashita 等^[11]在 2004 年就指出激活状态的 STAT3 在斑马鱼原肠胚及哺乳动物细胞中与其下游的 LIV-1、Snail 之间具有着密切的分子关联, 继而 STAT3 在胰腺、乳腺、头颈部肿瘤及前列腺等肿瘤中对 Snail 的调控也被越来越



A: SGC7901 control, without treatment; B: SGC7901 transfected with pEGFP-C1-STAT3 and treated by DDP for 24 h followed by the Annexin V-FITC; C: SGC7901 transfected with pEGFP-C1 and treated by DDP for 24 h followed by the Annexin V-FITC. A-C: one of FACS graphs was picked out standing for each group. D: Statistical data from indicated experiments run in three times. Columns, mean of three independent experiments; bars, SD

图 5 SGC7901 细胞株转染重组质粒 pEGFP-C1-STAT3 及空载体 pEGFP-C1 后顺铂对细胞早期凋亡的影响
Figure 5 Effect of DDP treatment on early apoptosis after SGC7901 cells transfected with pEGFP-C1-STAT3 and pEGFP-C1

多的报道出来^[12-15]。STAT3 与胃癌的发生发展近年来也逐渐开始为人们所关注,然而 STAT3 与 Snail 在胃癌中的关系却鲜见报道。因而,构建 STAT3 重组质粒,研究其与 Snail 蛋白表达的相关性,对胃癌的耐药及侵袭转移研究具有重要的理论指导意义。

荧光蛋白标记技术是一种新型的细胞示踪技术,常用标记物为绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP),在紫外光或蓝光激发时,GFP 可以发射可见绿色荧光,标记基因在细胞内的表达情况。本实验中使用的是 GFP 突变体 EGFP,其荧光强度显著提高,光漂白抗性增强^[16],更有利于观察和拍摄图片。

本实验利用基因重组技术,将 STAT 3 基因克隆到 EGFP 真核表达载体 pEGFP-C1 上,成功构建 STAT 3 重组质粒 pEGFP-C1-STAT 3,用脂质体转染入胃 SGC7901 细胞株中,实现了 SGC7901 细胞中 STAT 3 高表达的目的,利用 EGFP 的示踪功能,在荧光显微镜下观察转染后细胞株中绿色荧光蛋白的表达,并利用 Western blot 技术检测了转染后 STAT 3、pSTAT 3、Snail 及 ERCC1 等蛋白表达的情况。结果显示 STAT 3 表达增高后,pSTAT 3、Snail 及 ERCC1 的表达也随之增高,与转染空载体质粒组比较差异有统计学意义。这提示 STAT 3 转入 SGC7901 细胞中后被激活,增加了下游的 Snail 蛋白的表达,继而促进铂类耐药基因 ERCC1 表达增高,经流式细胞术对转染后顺铂处理下 SGC7901 细胞的凋亡情况检测,证实转入 pEGFP-C1-STAT 3 重组质粒的细胞早期凋亡率下降,对顺铂敏感度降低,支持 Western blot 结果。本实验结果说明在胃癌 SGC7901 细胞株中,STAT 3 可能通过自身磷酸化激活促进 Snail 及 ERCC1 的表达,继而降低了胃癌细胞株对顺铂化疗的敏感度。

本研究旨在根据胃癌细胞株中 STAT3、Snail 的研究,从分子水平探讨胃癌化疗敏感度下降的机制,这对于提高胃癌患者的生存率和生活质量具有重要的意义,两者关系的研究将对胃癌肿瘤基因治疗的临床应用提供新的思路。

参考文献:

[1] Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, *et al.* Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130[J]. *Science*, 1994, 263(5143): 89-92.

[2] Ho PL, Lay EJ, Jian W, *et al.* Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3135-42.

[3] Huang C, Huang R, Chang W, *et al.* The expression and clinical significance of pSTAT3, VEGF and VEGF-C in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Neoplasma*, 2012, 59(1): 52-61.

[4] Hu QD, Chen W, Yan TL, *et al.* NSC 74859 enhances doxorubicin cytotoxicity via inhibition of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(2): 207-13.

[5] Xiong H, Du W, Wang JL, *et al.* Constitutive activation of STAT3 is predictive of poor prognosis in human gastric cancer [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(9): 1037-46.

[6] Huang S, Chen M, Shen Y, *et al.* Inhibition of activated Stat3 reverses drug resistance to chemotherapeutic agents in gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 315(2): 198-205.

[7] Rodrigo I, Cato AC, Cano A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 248(2): 358-71.

[8] Lee J, Kim JC, Lee SE, *et al.* STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) suppresses adenoma to carcinoma transition in Apcmin/+ mice via regulation of SNAI (Snail-1) stability[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 18182-9.

[9] Hsu DS, Lan HY, Huang CH, *et al.* Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(18): 4561-71.

[10] Kawashima A, Takayama H, Kawamura N, *et al.* Co-expression of ERCC1 and Snail is a prognostic but not predictive factor of cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(1): 15-21.

[11] Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, *et al.* Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer[J]. *Nature*. 2004, 429(6989): 298-302.

[12] Huang C, Yang G, Jiang T, *et al.* The effects and mechanisms of blockage of STAT3 signaling pathway on IL-6 inducing EMT in human pancreatic cancer cells in vitro[J]. *Neoplasma*, 2011, 58(5): 396-405.

[13] Lee KH, Hsu EC, Guh JH, *et al.* Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(45): 39247-58.

[14] Yadav A, Kumar B, Datta J, *et al.* IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(12): 1658-67.

[15] Zhou HE, Otero-Marah V, Lue HW, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(6): 601-10.

[16] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148): 802-5.