

二甲双胍通过调控TMEM16A影响结直肠癌细胞转移

韩雨 李思媛 谭瑶 丁恺志 长孙东亭 罗素兰* 朱晓鹏*

(广西特色生物医药重点实验室, 广西大学医学院, 南宁 530004)

摘要 该研究旨在探讨二甲双胍(metformin)通过调控跨膜蛋白16A(transmembrane protein 16A, TMEM16A)抑制转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的结直肠癌细胞迁移及其潜在分子机制。CCK-8法检测HCT116细胞的增殖情况; DCFH₂-DA荧光探针评估各组细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平变化; 划痕实验与Transwell迁移实验分别检测细胞迁移和侵袭能力; 平板克隆实验评估细胞增殖潜能; 实时荧光定量逆转录PCR检测上皮-间充质转化(epithelial-interstitial transformation, EMT)相关基因的表达情况: 包括钙黏蛋白1(cadherin 1, *CDH1*)、钙黏蛋白2(cadherin 2, *CDH2*)、蜗牛家族转录抑制因子1(snail family transcriptional repressor 1, *SNAIL*)、蜗牛家族转录抑制因子2(snail family transcriptional repressor 2, *SLUG*)、波形蛋白(Vimentin, *VIM*); 免疫荧光技术检测E-cadherin和Vimentin蛋白的表达分布; Western blot检测E-cadherin、Vimentin和Slug蛋白表达情况。采用癌症基因组图谱和基因表达数据库进行生物信息学分析, 筛选二甲双胍的潜在靶点。利用膜片钳技术记录二甲双胍对TMEM16A全细胞电流的影响。结果显示, 与空白对照组相比, TGF- β 1处理可显著促进HCT116细胞的迁移与侵袭, 增加克隆形成能力和ROS释放水平, 伴随EMT标志物变化, *CDH1*基因和E-cadherin蛋白表达水平下降, *CDH2*、*SNAIL*、*SLUG*、*VIM*基因和Vimentin、Slug蛋白表达显著上调($P < 0.05$)。二甲双胍干预可显著逆转TGF- β 1诱导的EMT进程和促迁移效应。生物信息学分析显示TMEM16A在结直肠癌中高表达; 电生理结果显示二甲双胍可有效抑制TGF- β 1诱导的TMEM16A通道电流增强($P < 0.05$)。因此, 二甲双胍可能通过下调TMEM16A表达及其介导的氯离子通道活性, 抑制TGF- β 1诱导的结直肠癌细胞EMT和迁移。该研究为二甲双胍的抗肿瘤作用提供了新的分子机制依据。

关键词 二甲双胍; 结直肠癌; 上皮-间充质转化; 跨膜蛋白16A; 转化生长因子- β 1

Metformin Affects Colorectal Cancer Cell Migration by Regulating TMEM16A

HAN Yu, LI Siyuan, TAN Yao, DING Kaizhi, ZHANGSUN Dongting, LUO Sulan*, ZHU Xiaopeng*

(Guangxi Key Laboratory of Special Biomedicine, School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the molecular mechanism through which metformin inhibits TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)-induced migration of colorectal cancer cells, focusing on its regulation of TMEM16A (transmembrane protein 16A). HCT116 cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay. Changes in ROS (reactive oxygen species) levels were evaluated using DCFH₂-DA fluorescent probes. Cell migration and invasion capabilities were determined by scratch wound healing assays and Transwell migration assays, respectively. Plate colony formation assays were employed to assess cell proliferation potential. RT-qPCR

收稿日期: 2025-06-05

接受日期: 2025-08-26

广西重点研发计划“带土移植”人才引进计划(批准号: 桂科AA25069003)和广西自然科学基金重点项目(批准号: 2024GXNSFDA999003)资助的课题

*通信作者。Tel: 0771-3949335, E-mail: sulan2021@gxu.edu.cn; Tel: 0771-3949303, E-mail: zhuxiaopeng@gxu.edu.cn

Received: June 5, 2025

Accepted: August 26, 2025

This research was supported by the “DaiTu YiZhi” Project of Key R&D Program of Guangxi (Grant No. GUIKE AA25069003) and the Key Project of Natural Science Foundation of Guangxi (Grant No. 2024GXNSFDA999003)

*Corresponding authors. Tel: +86-771-3949335, E-mail: sulan2021@gxu.edu.cn; Tel: +86-771-3949303, E-mail: zhuxiaopeng@gxu.edu.cn

(real-time quantitative reverse transcription PCR) was used to detect the expression of EMT (epithelial-mesenchymal transition)-related genes, including *CDH1* (cadherin 1), *CDH2* (cadherin 2), *SNAIL* (snail family transcriptional repressor 1), *SLUG* (snail family transcriptional repressor 2), and *VIM* (Vimentin). Immunofluorescence staining visualized the expression and distribution of E-cadherin and Vimentin proteins. Western blot analysis measured the expression of E-cadherin, Vimentin, and Slug proteins. Bioinformatics analysis utilizing TCGA (The Cancer Genome Atlas) and GEO (Gene Expression Omnibus) databases screened for potential metformin targets. The patch-clamp technique recorded the effect of metformin on TMEM16A whole-cell chloride currents. TGF- β 1 treatment significantly promoted HCT116 cell migration and invasion, enhanced colony formation capacity, and increased ROS release. These effects were accompanied by hallmark EMT marker changes: decreased *CDH1* gene and E-cadherin protein expression, alongside significant upregulation of *CDH2*, *SNAIL*, *SLUG*, *VIM* genes and Vimentin, Slug protein expression ($P < 0.05$). Metformin intervention effectively reversed the TGF- β 1-induced EMT progression and its pro-migratory effects. Bioinformatics analysis revealed high TMEM16A expression in colorectal cancer. Electrophysiological recordings demonstrated that metformin potently inhibited the TGF- β 1-induced enhancement of TMEM16A channel currents ($P < 0.05$). Metformin likely inhibits TGF- β 1-induced EMT and migration in colorectal cancer cells by downregulating TMEM16A expression and suppressing its mediated chloride channel activity. This study provides novel insight into the molecular mechanism underlying metformin's anti-tumor effects.

Keywords metformin; colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition; transmembrane protein 16A; transforming growth factor- β 1

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大常见恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的主要原因之一,目前我国发病率仅次于肺癌^[1],居所有恶性肿瘤的第二位。流行病学数据显示,CRC的发病率呈持续上升趋势,且发病年龄逐渐趋于年轻化,严重威胁公共健康安全^[2]。尽管近年来随着手术、放化疗、靶向治疗及免疫治疗等综合治疗策略的不断发展,CRC患者的预后获得一定改善,但肿瘤转移和耐药性依然是治疗失败和患者死亡的关键因素^[3]。

上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤侵袭转移的始动环节,其核心特征为上皮标志物(如E-cadherin)表达下调及间充质标志物(如Vimentin)表达上调,从而导致细胞黏附性降低与运动能力增强,最终推动肿瘤细胞的迁移与侵袭^[4-5]。大量研究表明,抑制转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、无翅型MMTV整合位点家族蛋白(wingless-type MMTV integration site family, Wnt)/ β -连环蛋白(β -catenin)等信号通路的激活是诱导EMT过程的主要驱动因素,而肿瘤微环境中的血管生成、免疫抑制及炎症反应等因素则进一步促进转移灶的形成与发展^[6-8]。因此,抑制EMT有望成为抑制CRC进展和转移的潜在治疗策略。

二甲双胍(metformin)作为2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的一线治疗药物,近年来其在抗肿瘤领域的潜在作用引起了广泛关注。多项临床回顾性研究发现,长期服用二甲双胍的T2DM患者,其CRC发病风险显著降低^[9-13]。同样,在临床前研究中发现,二甲双胍可以抑制CRC的生长,促进癌细胞的凋亡,降低肿瘤细胞的耐药性^[14-16]。然而,二甲双胍对CRC细胞迁移及其在EMT过程中的调控机制尚未被完全阐明,仍需进一步探索。

钙激活氯通道蛋白即跨膜蛋白16A(transmembrane protein 16A, TMEM16A)(又称ANO1)在多种上皮源性肿瘤中异常高表达,其功能增益性突变或过表达与肿瘤增殖、侵袭及不良预后密切相关^[17-21]。在CRC中, TMEM16A调节细胞容积、EMT进程及钙信号通路促进肿瘤转移,且其表达水平与临床分期和淋巴转移呈显著正相关^[18,20,22-25]。值得注意的是,已有研究报道二甲双胍具有调控多种离子通道功能的潜力,但其是否可调控TMEM16A活性,以及二者在CRC发生发展中的关系,尚未有文献报道。本研究拟通过整合多种实验手段,包括生物信息学、分子生物学及电生理技术,探索二甲双胍对CRC细胞迁移及EMT进程的影响,重点分析其是否通过影响TMEM16A的表达及功能影响肿瘤细胞迁移。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人结肠癌细胞HCT116(货号: ST-CC10803G)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 McCoy's 5A培养基、胰蛋白酶、青/链霉素混合液(100×)、结晶紫溶液、4%多聚甲醛、Cy3荧光二抗、血清白蛋白BSA购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胎牛血清(FBS)、HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 二甲双胍购自美国Sigma-Aldrich公司; TGF- β 1购自北京义翘神州科技股份有限公司; CCK-8试剂、E-cadherin、Vimentin、Slug抗体均购自美国Selleck公司; DCFH₂-DA购自美国MedChemExpress公司; RNAiso Plus购自宝生物工程(大连)有限公司; 山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司; TMEM16A抗体购自美国ImmunoWay Biotechnology公司; 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、细胞裂解液购自上海碧云天生物技术公司; ECL化学发光液购自安徽白鲨生物科技有限公司; 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; GAPDH和 β -actin一抗购自武汉三鹰技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结肠癌细胞HCT116用含10% FBS、1%青/链霉素混合液的McCoy's 5A培养基培养, 当细胞密度达到80%~90%时, 用胰蛋白酶于37 °C消化3 min, 以1:4传代, 于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养。

1.2.2 CCK-8实验 将HCT116细胞以3 000/孔的密度接种于96孔板中, 待细胞完全贴壁后, 分别进行如下处理: (1) 梯度浓度二甲双胍单药组(0、0.5、1、2、4、8 mmol/L); (2) 梯度浓度TGF- β 1单药组(0、2、4、8 ng/mL); (3) 联合用药组(4 ng/mL TGF- β 1与0、0.5、1、2 mmol/L二甲双胍共同处理); 空白对照为未加TGF- β 1和二甲双胍组。处理72 h后, 向每孔加入10 μ L CCK-8工作液, 置于37 °C恒温培养箱避光孵育3 h。最后使用多功能酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度(D)值。根据吸光度计算细胞活力(%)=[D (药物+)- D (空白)]/[D (药物-)- D (空白)] $\times$ 100%; 其中 D (药物+): 含有细胞、二甲双胍和CCK8试剂组的吸光度值; D (药物-): 只含有细胞和CCK8工作液组的吸光度值; D (空白): 只含有培养基

和CCK8工作液组的吸光度值。

1.2.3 DCFH₂-DA检测细胞ROS 将HCT116细胞以2 $\times$ 10⁵/孔的密度接种于6孔板中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中过夜培养。待细胞贴壁后, 实验分为三组进行处理。(1) 空白对照组: 含1% FBS的基础培养基; (2) TGF- β 1刺激组: 更换为含1% FBS的基础培养基并添加4 ng/mL TGF- β 1; (3) 联合干预组: 在TGF- β 1(4 ng/mL)联合2 mmol/L二甲双胍处理。各组持续干预72 h后, 弃去培养基, 加入5 μ mol/L DCFH₂-DA荧光探针工作液, 于37 °C避光孵育30 min。最后分别采用荧光显微镜和流式细胞仪进行荧光成像及定量分析。

1.2.4 划痕实验 将3 $\times$ 10⁵个细胞接种在6孔板中, 待贴壁完全后用200 μ L枪头划伤细胞, 将TGF- β 1(4 ng/mL)与二甲双胍(2 mmol/L)加入到细胞中, 并对划痕位置进行拍照(0 h), 培养箱中培养24 h, 去除孔板进行拍照, 并计算细胞划痕迁移率(%)=[(0 h的初始划痕距离-24 h的最终划痕距离)/0 h的初始划痕距离] $\times$ 100%。

1.2.5 Transwell迁移实验 实验步骤如下。在24孔板中加入500 μ L含有10% FBS的McCoy's 5A完全培养基, 将已经饥饿处理的细胞用含有1% FBS的McCoy's 5A培养基制成密度为1 $\times$ 10⁵/mL的细胞悬液, 小室中加入300 μ L细胞悬液, 用2 mmol/L的二甲双胍预处理2 h后, 加入4 ng/mL TGF- β 1刺激, 37 °C、5% CO₂培养72 h。然后将小室取出用PBS清洗, 置于4%多聚甲醛中室温固定20 min后, 用PBS去除多余的多聚甲醛。将小室置于结晶紫中染色15 min后, PBS清洗染料并用棉棒轻轻擦去上层未穿过的细胞, 镜下拍照。

侵袭: 将基质胶用1% FBS的培养基以1:12比例稀释, 取100 μ L稀释液加入到小室中, 于细胞培养箱中放置1 h, 弃去多余的包被液, 其余步骤同Transwell迁移实验。

1.2.6 平板克隆实验 将HCT116细胞以1 000/孔细胞密度接种于6孔板中, 贴壁完全后, 给药处理14天, 每隔3天换液1次。处理结束后, 弃去培养基, 加入4%多聚甲醛室温固定20 min, 弃去并洗掉多余的多聚甲醛。加入结晶紫溶液染色15 min, PBS清洗多余结晶紫, 拍照并计数。

1.2.7 实时荧光定量逆转录PCR(real-time RT-PCR, RT-qPCR) 使用RNAiso Plus提取各处理组细胞中的总RNA, 按照HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)说明书合成cDNA, qPCR采用qTOWER3 Real-time PCR System, 按照以下循环程序进行

扩增: 先经95 °C预变性30 s; 随后进行45个循环, 每循环包括95 °C变性10 s, 53 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对基因表达水平, *ACTB*为内参基因。引物序列见表1。

1.2.8 免疫荧光 将HCT116细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板中, 于37 °C、5% CO₂培养箱培养至细胞贴壁, 实验分为三组进行处理。(1) 空白对照组: 含1% FBS的基础培养基; (2) TGF- β 1刺激组: 含4 ng/mL TGF- β 1的1% FBS的基础培养基; (3) 联合干预组: TGF- β 1(4 ng/mL)联合2 mmol/L二甲双胍处理。各组持续干预72 h后, 用4%多聚甲醛室温固定15 min, 0.2% Triton X-100透化处理10 min。5%牛血清白蛋白封闭30 min后, 加入一抗(稀释比为1:200)于4 °C孵育过夜。次日PBS清洗3次, 加入Cy3标记二抗(稀释比为1:200)室温避光孵育2 h, DAPI染核10 min。使用荧光显微镜采集后通过ImageJ软件进行定量分析。

1.2.9 生物信息学分析 从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中检索搜集结直肠癌相关数据, 同时从(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库中收集GSE67342和GSE263027数据集, 如前所述^[26], 按照 $P < 0.05$ 标准筛选差异显著的差异基因。使用GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis), 我们分析了TMEM16A与结直肠癌患者总生存率的相关性并绘制了Kaplan-Meier生存曲线。

1.2.10 电生理实验 采用全细胞膜片钳技术检测

不同浓度的二甲双胍干预方式下TMEM16A电流密度的变化。细胞外液成分: 137 mmol/L NaCl、5.9 mmol/L KCl、2.2 mmol/L CaCl₂、1.2 mmol/L MgCl₂、14 mmol/L葡萄糖和10 mmol/L HEPES, 利用NaOH将pH调至7.4。电极内液成分: 20 mmol/L CsCl、20 mmol/L TEA-Cl、2.8 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L ATPNa₂、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L EGTA和4.25 mmol/L(pCa 6.0) CaCl₂, 利用KOH将pH调至7.2。电极电阻3~5 M Ω 。在电压钳模式下, 将细胞钳制于-40 mV。通过一系列步阶电压刺激来激活TMEM16A电流: 测试电位从-80 mV升至+120 mV, 步阶为10 mV, 每个去极化步阶持续500 ms。利用Fitmaster软件(德国HEKA公司)处理数据。

1.2.11 Western blot实验 在冰上使用裂解液(含有1 mmol/L PMSF)收集细胞或组织。4 °C、12 000 $\times g$ 离心20 min, 取上清, 使用BCA试剂盒检测蛋白浓度。将20 μg 蛋白质95 °C煮沸10 min后, 用12%的SDS-PAGE凝胶电泳, 然后将其转移到0.45 μm 的PVDF膜上。将膜用5%的脱脂奶粉室温条件下进行封闭2 h, 并在4 °C的条件下与一抗(Vimentin、E-cadherin和Slug抗体稀释比为1:1 000, GAPDH和 β -actin抗体稀释比为1:5 000)孵育过夜。随后用HRP偶联的二抗(稀释比为1:5 000)室温孵育膜2 h。滴加ECL化学发光溶液并使用显影仪记录, ImageJ进行灰度分析。

1.2.12 统计分析 使用GraphPad Prism 9.0进行统

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	登录号 NCBI number*	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>CDH1</i>	NM_001317184.2	Forward: CTG ATT CTG CTG CTC TTG CTG TTT C Reverse: GGT CCT CTT CTC CGC CTC CTT C
<i>CDH2</i>	NM_001308176.2	Forward: AGG AGT CAG TGA AGG AGT CAG CAG Reverse: TTC TGG CAA GTT GAT TGG AGG GAT G
<i>VIM</i>	NM_003380.5	Forward: CCT TCG TGA ATA CCA AGA CCT GCT C Reverse: AAT CCT GCT CTC CTC GCC TTC C
<i>SLUG</i>	NM_003068.5	Forward: ACT GTG TGG ACT ACC GCT GCT C Reverse: GGA GGA GGT GTC AGA TGG AGG AG
<i>SNAIL</i>	NM_005985.4	Forward: ACT GTG TGG ACT ACC GCT GCT C Reverse: GGA GGA GGT GTC AGA TGG AGG AG
<i>ACTB</i>	NM_001101.5	Forward: AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC Reverse: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<i>TMEM16A</i>	NM_001378092.1	Forward: GAT CCC ATC CAG CCC AAA GTG Reverse: CGG GTT TTG CTG TCG AAA AAG GA

*: NCBI numbers来自NCBI数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)。

*: NCBI numbers are from NCBI database (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

计分析和绘图, 数据显示为 $\bar{x} \pm s$ 。两组间的差异采用 t 检验, 多组间差异选择单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制TGF- β 1诱导的HCT116细胞形态改变和ROS生成

采用CCK-8法评估TGF- β 1与二甲双胍共处理对HCT116细胞的毒性作用。首先, 单独检测不同浓度二甲双胍(0.5~8.0 mmol/L)处理72 h对细胞活力的影响, 结果显示该浓度范围内二甲双胍未显著抑制HCT116细胞活力(图1A)。同理, 当细胞暴露于2~8 ng/mL TGF- β 1 72 h后, 细胞活性亦无明显改变(图1B)。随后采用4 ng/mL TGF- β 1联合0.5、1、2 mmol/L二甲双胍共处理72 h, 观察细胞活力和形态学改变(图1C)。实验发现, 联合处理未产生细胞毒性, 但二甲双胍可有效抑制TGF- β 1诱导的EMT特征性形态改变(图1D)。鉴于ROS在EMT调控中的关键作用, 进一步探究二甲双胍对TGF- β 1诱导ROS生成的影响。荧光统计结果显示, TGF- β 1处理组ROS水平提高99.51%(TGF- β 1处理组 16.42 ± 2.40 vs 空白对照组 8.23 ± 0.06), 而二甲双胍处理组使ROS水平降低了43.67%(二甲双胍处理组 9.25 ± 1.24 vs TGF- β 1处理组 16.42 ± 2.40)(图1E), 流式统计也进一步表明二甲双胍可抑制TGF- β 1诱导ROS生成(图1F)。

2.2 二甲双胍抑制TGF- β 1诱导HCT116细胞的迁移、侵袭和增殖

为进一步探索二甲双胍对TGF- β 1诱导HCT116细胞EMT的抑制作用, 通过划痕实验和Transwell迁移实验系统评估细胞迁移及侵袭的能力。结果显示: 经4 ng/mL TGF- β 1处理72 h后, HCT116细胞迁移能力显著增强($P < 0.05$), 而二甲双胍共处理组细胞迁移受到明显抑制(图2A和图2E)。Transwell迁移实验进一步证实了二甲双胍的作用(图2B和图2F), 二甲双胍可有效逆转TGF- β 1(4 ng/mL浓度条件下)诱导的细胞迁移增强效应[(迁移细胞数减少44.58%, 4 ng/mL TGF- β 1组($1\ 213 \pm 163.6$)个 vs 共处理组(672.3 ± 122.5)个]。在侵袭能力检测中, TGF- β 1(4 ng/mL)处理72 h使穿过基质胶的细胞面积占比增加87.26%(4 ng/mL TGF- β 1组 $31.46\% \pm 7.43\%$ vs 对照组 $16.80\% \pm 3.76\%$), 而二甲双胍处理使侵袭细胞面积占比下降至对照组的82.26%(共处理组 $13.82\% \pm 4.24\%$ vs 对照组 $16.80\% \pm 3.76\%$)(图2C和图2G)。此外, 克隆实验表

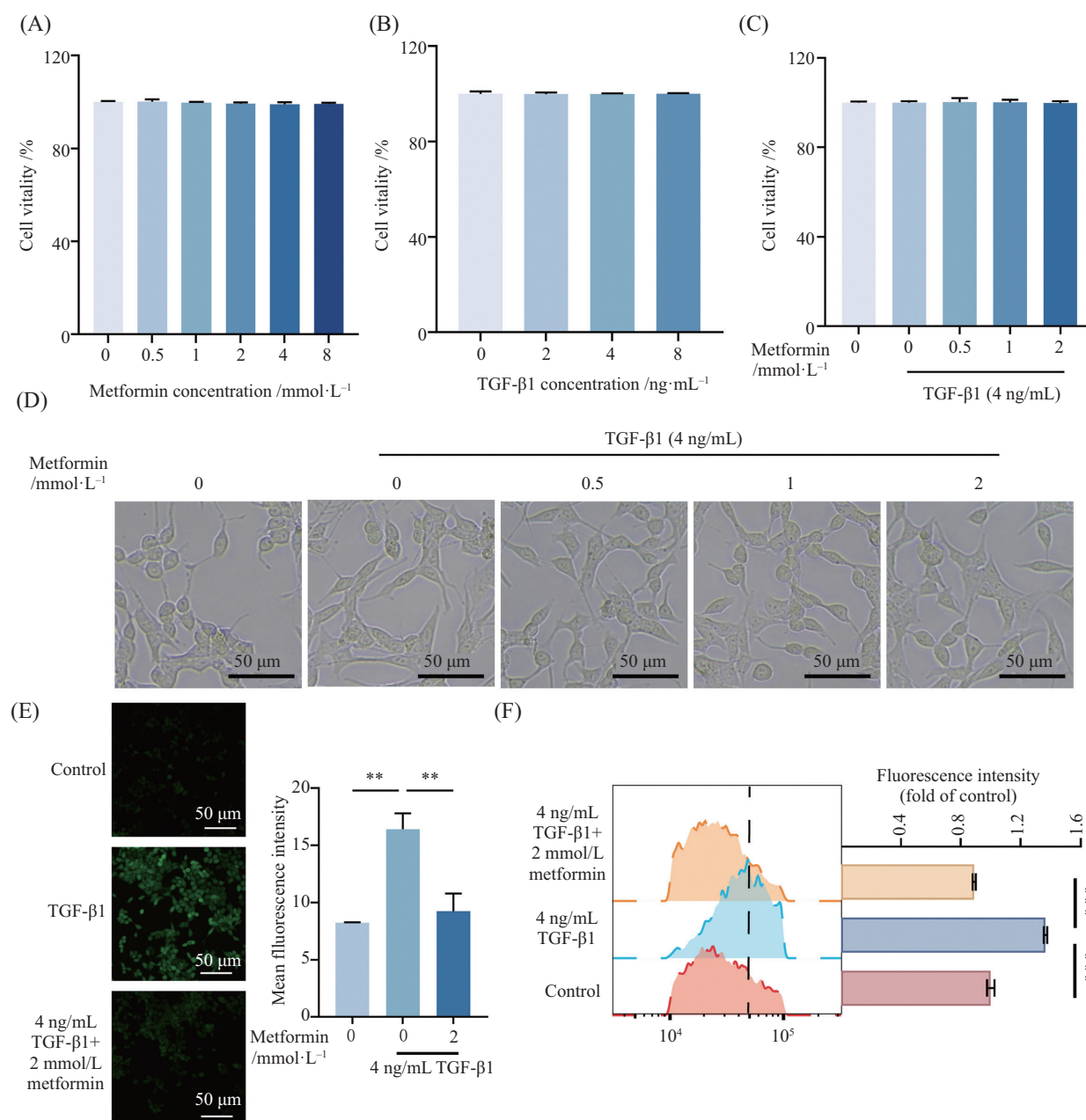
明(图2D和图2H), 与TGF- β 1单独处理组相比, 二甲双胍共处理可使HCT116细胞克隆形成数显著减少($P < 0.05$)。实验结果显示二甲双胍能显著抑制TGF- β 1诱导的HCT116细胞迁移、侵袭及增殖等恶性表型。

2.3 二甲双胍抑制TGF- β 1诱导HCT116细胞的EMT

为探究二甲双胍对TGF- β 1诱导HCT116细胞EMT的影响, 利用RT-qPCR和免疫荧光实验检测了EMT相关标志物。结果表明, 4 ng/mL TGF- β 1处理72 h后 $CDH1$ 转录水平下降, 而 $CDH2$ 、 VIM 、 $SNAIL$ 和 $SLUG$ 的转录水平增加, 然而, 二甲双胍与4 ng/mL TGF- β 1共处理逆转了这些基因的表达(图3A)。同时, 与4 ng/mL TGF- β 1诱导组相比, 二甲双胍使E-cadherin的蛋白水平增加5.88倍(二甲双胍组 8.87 ± 3.72 vs TGF- β 1处理组 1.29 ± 1.07)(图3B和图3D), Vimentin蛋白水平降低了89.31%(二甲双胍组 1.15 ± 0.58 vs TGF- β 1处理组 10.76 ± 4.15)(图3C和图3E)。利用Western blot对蛋白表达情况进一步检测, 结果显示: 与4 ng/mL TGF- β 1组相比, 2 mmol/L二甲双胍与4 ng/mL TGF- β 1联合处理上调E-cadherin表达[上调14.25倍(联合处理组 0.61 ± 0.05 vs 4 ng/mL TGF- β 1组 0.04 ± 0.01)], 同时抑制Vimentin(下调16.67%, 联合处理组 0.75 ± 0.01 vs 4 ng/mL TGF- β 1组 0.90 ± 0.01)和Slug(下调31.33%, 联合处理组 0.57 ± 0.04 vs 4 ng/mL TGF- β 1组 0.83 ± 0.04)表达(图3F), 与RT-qPCR及免疫荧光结果一致, 三重验证二甲双胍逆转EMT的效应。

2.4 确定二甲双胍在CRC中调控的潜在下游效应分子

基于二甲双胍抑制HCT116细胞的侵袭和迁移能力的实验结果, 研究进一步探索了二甲双胍调控的潜在下游效应分子, 先从TCGA数据库中筛选出CRC相关数据集, 分析了肿瘤组织与正常组织中差异基因的表达, 发现了5 734个上调基因和7 029个下调基因($P < 0.05$)(图4A), 并且对数据集GSE263027中的结直肠癌细胞细胞系亲本细胞(SW480-P)及其筛选出的高转移性结直肠癌细胞系(SW480-LM3)进行了差异基因分析, 结果发现2 830个差异基因, 其中包括1 700个基因上调, 1 130个基因下调($P < 0.05$)(图4B)。对两个数据集中的差异基因整合分析, 发现 $TMEM16A$ 在CRC组织及高转移性的细胞系中高表达, 考虑 $TMEM16A$ 可能与CRC转移相关。此外,



A: 二甲双胍对HCT116细胞活性影响; B: TGF- β 1对HCT116细胞活力的影响; C: 二甲双胍和4 ng/mL TGF- β 1共处理对HCT116细胞活力的影响; D: 二甲双胍对4 ng/mL TGF- β 1诱导的HCT116细胞形态的抑制作用; E、F: DCFH₂-DA检测细胞中ROS水平及统计分析结果。n=3, **P<0.01, ***P<0.001, 与TGF- β 1刺激组相比。

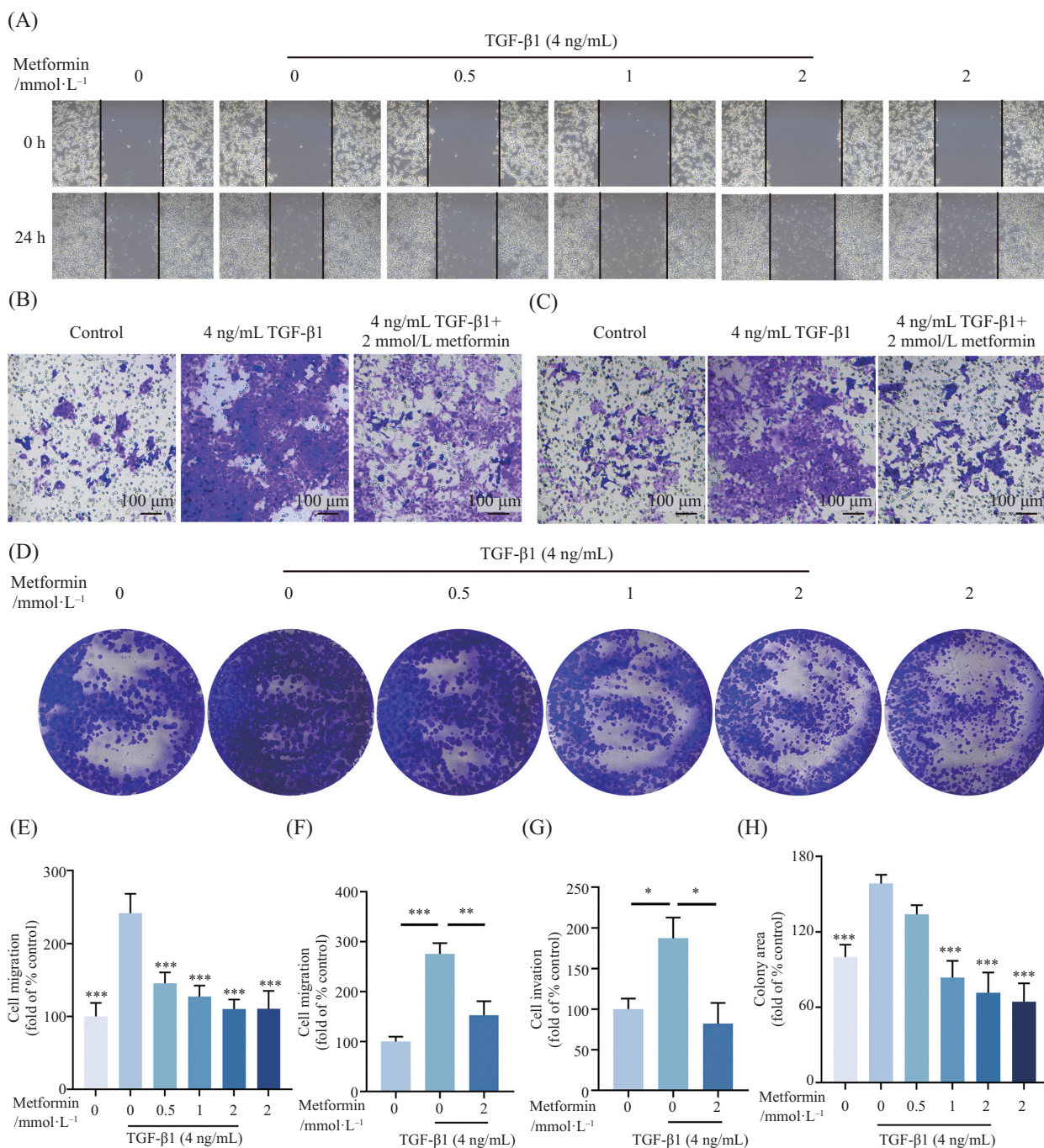
A: the effect of metformin on HCT116 cell activity; B: the effect of TGF- β 1 on HCT116 cell activity; C: the effect of metformin and 4 ng/mL TGF- β 1 co-treatment on HCT116 cell activity; D: the inhibitory effect of metformin on 4 ng/mL TGF- β 1-induced HCT116 cell morphology; E, F: DCFH₂-DA detects the level of ROS in cells and statistical analysis results. n=3, **P<0.01, ***P<0.001 compared with the TGF- β 1 stimulation group.

图1 二甲双胍抑制TGF- β 1诱导的HCT116细胞形态改变和ROS生成

Fig.1 Metformin inhibits TGF- β 1-induced HCT116 cell morphology changes and ROS production

从GEO中获得与二甲双胍与CRC相关的数据集, 分析了该数据集中二甲双胍处理8 h的LoVo细胞与对照组细胞之间差异基因的表达, 发现1 509个上调基因和1 092个下调基因(P<0.05), 并发现TMEM16A在二甲双胍治疗组中下调(图4C), 因此推测TMEM16A

可能是二甲双胍在抑制CRC转移中调控的潜在下游效应分子。此外, 我们利用TCGA数据库评估了CRC样本中TMEM16A与患者预后的关系, 结果表明, TMEM16A水平较高的患者表现出更短的总生存时间(图4D)。



A: 划痕实验评估二甲双胍对4 ng/mL TGF-β1诱导的HCT116细胞迁移能力的抑制作用; B、C: Transwell实验评估二甲双胍对4 ng/mL TGF-β1诱导的HCT116细胞迁移和侵袭的抑制作用; D: 平板克隆检测HCT116细胞增殖情况; E~H: 图A~图D的数据统计结果, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与TGF-β1刺激组比较。

A: scratch experiment to evaluate the inhibitory effect of metformin on 4 ng/mL TGF-β1-induced HCT116 cell migration ability; B,C: transwell experiment to evaluate the inhibitory effect of metformin on 4 ng/mL TGF-β1-induced HCT116 cell migration and aggressiveness; D: tablet cloning to detect HCT116 cell proliferation; E-H: statistical results of figure A-figure D, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with the TGF-β1 stimulation group.

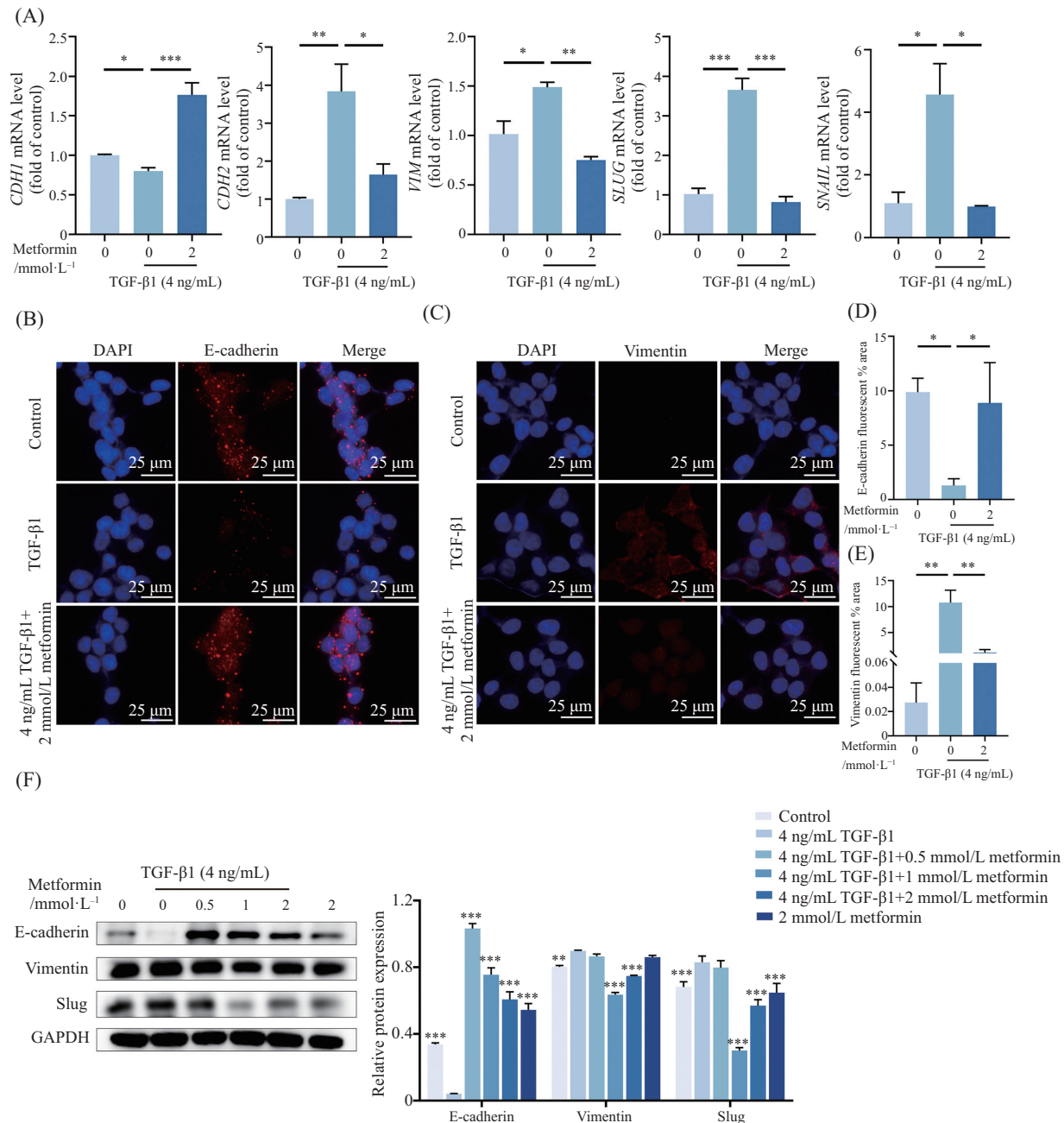
图2 二甲双胍抑制TGF-β1诱导的HCT116细胞的迁移、侵袭和增殖

Fig.2 Metformin inhibits TGF-β1-induced migration, invasion and proliferation of HCT116 cells

2.5 二甲双胍对HCT116细胞TMEM16A的抑制作用

为了确认二甲双胍与TMEM16A之间的关系,

首先检测了HCT116细胞中TMEM16A表达量的变化。结果显示,无论是在基因水平还是蛋白水平,4 ng/mL TGF-β1使TMEM16A表达显著上调,而给



A: RT-qPCR检测细胞中*CDH1*、*CDH2*、*VIM*、*SLUG*、*SNAIL* mRNA水平; B、C: 免疫荧光检测细胞中E-cadherin和Vimentin蛋白表达水平; D、E: 图B和图C的数据统计; F: Western blot检测细胞中E-cadherin、Vimentin和Slug蛋白表达情况和统计分析。n=3; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与TGF-β1刺激组相比。

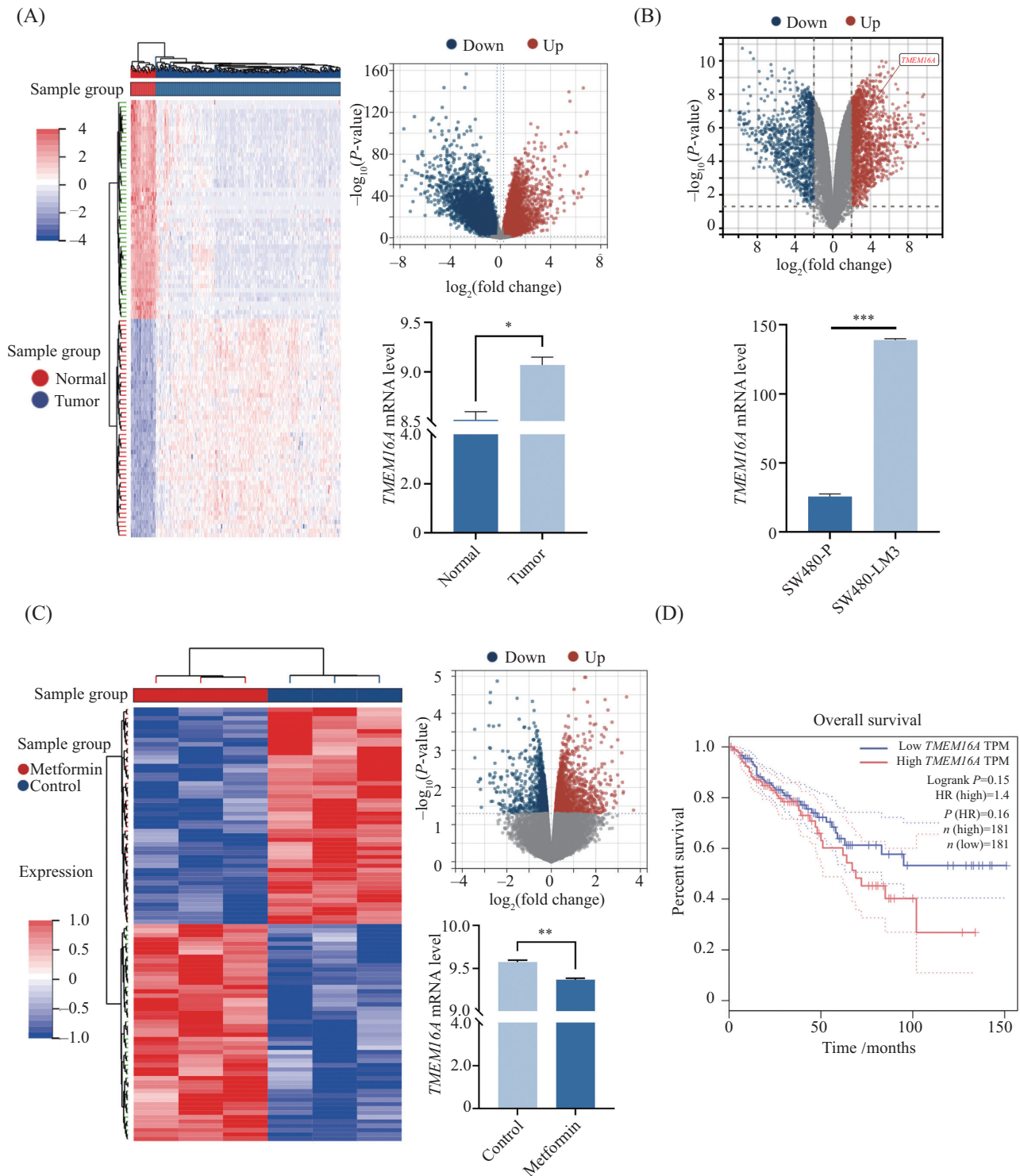
A: RT-qPCR detects the levels of *CDH1*, *CDH2*, *VIMENTIN*, *SLUG*, and *SNAIL* mRNA in cells; B,C: immunofluorescence detects the expression levels of E-cadherin and Vimentin proteins in cells; D,E: statistics of figure B and figure C; F: Western blot was used to detect the expression of E-cadherin, Vimentin and Slug proteins in cells and statistical analysis. n=3; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with TGF-β1 stimulation group.

图3 二甲双胍抑制TGF-β1诱导的HCT116细胞EMT

Fig.3 Metformin inhibits TGF-β1-induced HCT116 cell EMT

予2 mmol/L二甲双胍后其表达量显著下调(图5A和图5B)。TMEM16A是一种钙激活氯通道蛋白, 利用电压进行步阶刺激观察细胞电流变化(图5C)、电流-电压变化(图5D)。统计电流变化, 结果如图5E所示, 在120 mV去极化电压的刺激下, TGF-β1组的电流

密度为空白对照组的1.65倍[TGF-β1组(50.12±14.68) pA/pF vs空白对照组(30.41±15.57) pA/pF], 而二甲双胍共处理组电流密度降低73.32%[2 mmol/L metformin+TGF-β1组(13.37±9.76) pA/pF vs TGF-β1组(50.12±14.68) pA/pF]。

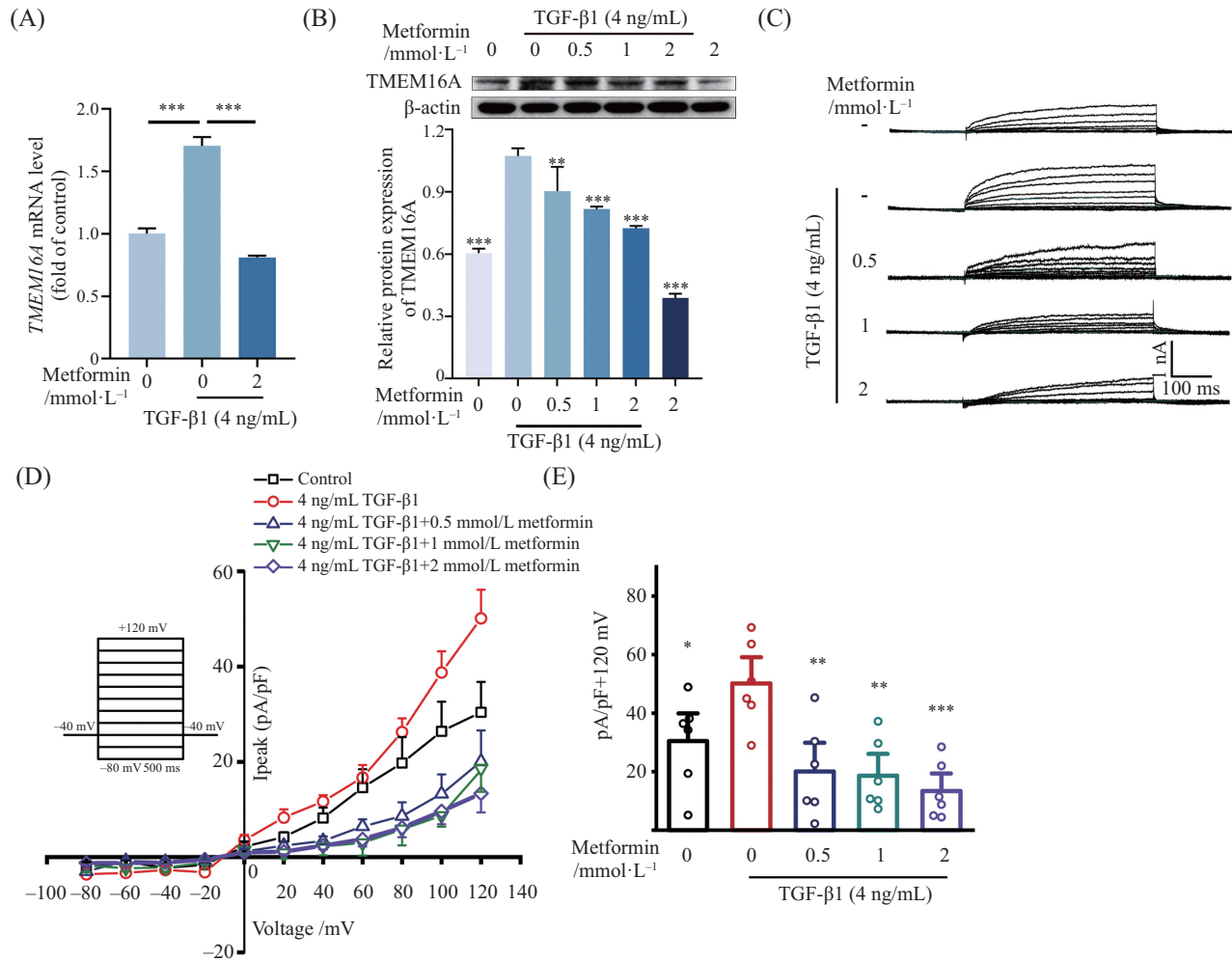


A: TCGA数据库中CRC组织与正常组织之间的差异基因热图、火山图及*TMEM16A*表达; B: 数据集GSE263027中正常SW480(SW480-P)与高转移性SW480(SW480-LM3)差异基因火山图及*TMEM16A*表达; C: 数据集GSE67342中二甲双胍治疗组(8 h)和对照组(8 h)之间差异基因热图、火山图及*TMEM16A*表达; D: Kaplan-Meier曲线显示*TMEM16A* mRNA水平与CRC患者的总生存期。 $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: differential gene heat maps, volcanic maps and *TMEM16A* expressions between CRC tissues and normal tissues in the TCGA database; B: volcanic maps and *TMEM16A* expressions of differential genes between normal SW480 (SW480-P) and highly metastatic SW480 (SW480-LM3) in the dataset GSE263027; C: in the dataset GSE67342 the differential gene heatmaps, volcanograms and *TMEM16A* expressions between metformin treatment group (8 h) and control group (8 h) were differentiated; D: the Kaplan-Meier curve shows the level of *TMEM16A* mRNA and the total survival of CRC patients. $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 筛选CRC中二甲双胍的潜在下游效应分子

Fig.4 Screening for potential downstream effector molecules of metformin in CRC



A: RT-qPCR检测HCT116细胞中*TMEM16A*基因表达水平, $n=3$; B: Western blot检测细胞中TMEM16A蛋白表达水平及统计分析, $n=3$; C: 二甲双胍对HCT116细胞钙激活氯电流TMEM16A电流密度曲线的影响, $n=6$; D: 二甲双胍对HCT116细胞TMEM16A I-V曲线的影响; E: TMEM16A电流密度统计结果, $n=6$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与TGF- β 1刺激组相比。

A: RT-qPCR was used to detect the expression level of *TMEM16A* genes in HCT116 cells, $n=3$; B: Western blot detected the expression level of TMEM16A protein in cells and statistical analysis, $n=3$; C: effect of metformin on the current density curve of calcium-activated chlorine current TMEM16A HCT116 cells, $n=6$; D: effect of metformin on HCT116 cells TMEM16A I-V curves; E: TMEM16A current density curve; D: TMEM16A current density statistics. $n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with TGF- β 1 stimulation group.

图5 二甲双胍抑制HCT116细胞中TMEM16A的表达并降低其通道电流

Fig.5 Metformin inhibits the expression of TMEM16A in HCT116 cells and reduces its channel current

3 讨论

CRC作为全球范围内严重威胁人类健康的恶性肿瘤,其转移过程是导致患者预后不良的关键因素。恶性肿瘤转移作为癌症致死的主要机制,其特征是肿瘤细胞脱离原发灶并通过循环系统侵袭远端器官,大约90%的癌症死亡是由该过程引起的^[27]。在CRC临床转归中,转移性进展构成最具威胁的临床表型,约半数患者最终进展为转移性疾病^[28]。值得注意的是,CRC转移过程高度依赖于EMT这一关键生物学基础。TGF- β 1是诱导EMT和促进肿瘤细胞转移的核心因子。因此在本研究中,我们使用

TGF- β 1来刺激HCT116细胞发生EMT。结果表明4 ng/mL TGF- β 1既可以诱导细胞发生EMT又不具备细胞毒性,可使用该浓度的TGF- β 1进行进一步研究。

二甲双胍作为国际权威指南推荐治疗T2DM的一线药物,其多靶点药理活性使其在肿瘤领域备受关注。既往研究已经证实二甲双胍可通过多种途径发挥抗肿瘤作用,包括促进肿瘤细胞凋亡、抑制细胞迁移和侵袭以及增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[29-31]。值得注意的是,多项研究报道了二甲双胍对TGF- β 1信号通路的抑制作用,并证明该抑制作用

能有效阻断肿瘤细胞的EMT进程,从而抑制肿瘤转移^[32-33]。这些重要发现为了解二甲双胍的抗肿瘤转移机制提供了重要基础。本研究的结果进一步支持了这一结论,即在CRC细胞中,不同浓度的二甲双胍可抑制TGF- β 1诱导细胞迁移、侵袭、增殖和ROS的生成,逆转TGF- β 1诱导的EMT相关标志物表达(E-cadherin下调, Vimentin、N-cadherin和Slug上调)。

离子通道作为重要的药物靶标,在维持生理稳态和肿瘤发生发展中扮演重要的角色^[34]。TMEM16A(亦称ANO1或DOG1)作为钙激活氯通道的重要成员,其在多种癌症中的促癌症转移作用已经得到广泛证实^[21,35-39]。本研究结果发现TGF- β 1不仅可以增加TMEM16A的表达水平,还可以增强该通道电流,进而抑制肿瘤细胞转移和EMT相关因子表达。本研究不仅进一步支持了TMEM16A在CRC中的重要作用,还提出了其可能是TGF- β 信号通路下游潜在效应分子。

TMEM16A在结直肠癌组织中的表达水平较正常结肠组织显著上调($P<0.05$),这一结果与TCGA数据库和GEO数据库的生物信息学分析结果高度一致。值得注意的是,TGF- β 1处理可进一步诱导HCT116细胞中TMEM16A表达上调($P<0.05$),而二甲双胍下调了其表达。在功能验证方面,组织细胞膜片钳结果显示,TGF- β 1处理使HCT116全细胞电流密度从对照组的(30.41 ± 15.57) pA/pF增至(50.12 ± 14.68) pA/pF($P<0.05$),而二甲双胍共处理可显著降低这一电流增强效应[降至(13.37 ± 9.76) pA/pF, $P<0.05$]。这些结果提示二甲双胍可能从转录水平、蛋白表达和通道功能三个方面,有效调控CRC细胞中TMEM16A的活性。

HAN等^[40]研究发现二甲双胍可通过抑制TGF- β 1的磷酸化以及Smad3的核易位和转录活性,从而抑制心脏纤维化和成纤维细胞中胶原蛋白的形成;同样,WANG等^[33]二甲双胍通过AMP活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]非依赖性通路抑制SMAD磷酸化并激活AMPK通路,从而抑制NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)表达来降低TGF- β 1诱导的纤维化程度。与此同时,TONG等^[41]研究发现二甲双胍通过靶向COX2/PGE2/STAT3轴抑制前列腺癌EMT相关标志物的表达和肿瘤细胞的转移;LI等^[32]也发现二甲双胍联合EGF受体酪氨酸激酶抑制剂可抑制EMT和IL-6/STAT3通路,有效抑制具有酪氨酸

激酶抑制剂耐药癌细胞的异种移植的肿瘤生长。本研究进一步证明二甲双胍能够阻断TGF- β 1诱导的EMT。本研究也为二甲双胍在抗肿瘤方面的研究提供了新的思路,研究发现TMEM16A可能是TGF- β 信号通路的下游的关键效应分子,同时二甲双胍可能通过负向调控该效应分子起到抑制CRC细胞转移的作用。

综上,本研究发现二甲双胍通过调控TME-M16A抑制了结肠癌细胞转移,研究结果为二甲双胍的抗肿瘤机制研究提供了新的思路,后续有关二甲双胍调控TMEM16A以及TMEM16A参与调控EMT的分子机制还有待深入解析。

作者贡献

韩雨负责实验、论文写作、数据分析和处理;李思媛、谭瑶负责细胞实验;丁恺志负责细胞膜片钳实验;长孙东亭负责实验设计;罗素兰、朱晓鹏负责论文修改和实验设计。

参考文献 (References)

- [1] HAN B, ZHENG R, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63.
- [3] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications [J]. Pharmacol Ther, 2018, 182: 80-94.
- [4] XUE W, YANG L, CHEN C, et al. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers [J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 79.
- [5] ZHANG Y E, STUELLEN C H. Alternative splicing in EMT and TGF- β signaling during cancer progression [J]. Semin Cancer Biol, 2024, 101: 1-11.
- [6] FANKHAUSER M, BROGGI M A S, POTIN L, et al. Tumor lymphangiogenesis promotes T cell infiltration and potentiates immunotherapy in melanoma [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(407): eaal4712.
- [7] SU J L, YEN C J, CHEN P S, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression [J]. Br J Cancer, 2007, 96(4): 541-5.
- [8] WANG J, JIA Y, LIU T, et al. Tumor cell-intrinsic BIN1 deficiency promotes the immunosuppression and impedes ferroptosis of non-small cell lung cancer via G3BP1-mediated degradation of STAT1 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2025, 44(1): 141.
- [9] 邱汉波, 唐东昕, 杨兵, 等. 二甲双胍与结直肠癌发病关系的两样本孟德尔随机化研究[J]. 现代预防医学(QIU H B, TANG D X, YANG B, et al. A two-sample Mendelian randomized study of the relationship between metformin and colorectal cancer incidence [J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51(13): 72484-

- 90.
- [10] 樊涛, 宋英杰, 程三珍, 等. 二甲双胍与2型糖尿病患者结肠肿瘤发病风险的Meta分析[J]. 肿瘤基础与临床(FAN T, SONG Y J, CHENG S Z, et al. Meta-analysis of metformin and the risk of colorectal tumours in patients with type 2 diabetes [J]. Basic and Clinical Tumors), 2023, 36(5): 409-15.
- [11] LEE J W, CHOI E A, KIM Y S, et al. Metformin usage and the risk of colorectal cancer: a national cohort study [J]. Int J Colorectal Dis, 2021, 36(2): 303-10.
- [12] NG C W, JIANG A A, TOH E M S, et al. Metformin and colorectal cancer: a systematic review, meta-analysis and meta-regression [J]. Int J Colorectal Dis, 2020, 35(8): 1501-12.
- [13] KAMARUDIN M N A, SARKER M M R, ZHOU J R, et al. Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 491.
- [14] LEE D E, LEE H M, JUN Y, et al. Metformin induces apoptosis in TRAIL-resistant colorectal cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2025, 1872(1): 119873.
- [15] SEO Y, KIM J, PARK S J, et al. Metformin suppresses cancer stem cells through AMPK activation and inhibition of protein prenylation of the mevalonate pathway in colorectal cancer [J]. Cancers, 2020, 12(9): 2554.
- [16] HONG X L, YU T C, HUANG X W, et al. Metformin abrogates Fusobacterium nucleatum-induced chemoresistance in colorectal cancer by inhibiting miR-361-5p/sonic hedgehog signaling-regulated stemness [J]. Br J Cancer, 2023, 128(2): 363-74.
- [17] 郑晓恬, 高凤彤, 石权, 等. ANO1介导肿瘤恶性生物学行为的机制探讨[J]. 现代肿瘤医学(ZHENG X T, GAO F T, SHI Q, et al. Mechanism of ANO1-mediated tumor malignant biological behavior [J]. Modern Oncology Medicine), 2024 32(3): 561-5.
- [18] 王皓, 习诗婷, 叶纯希, 等. TMEM16A在肿瘤细胞增殖和迁移过程中作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报(WANG H, XI S T, YE C X, et al. Research progress on the role of TMEM16A in the proliferation and migration of tumor cells [J]. Journal of Jilin Medical University), 2025, 46(4): 290-4.
- [19] LI S, WANG Z, GENG R, et al. TMEM16A ion channel: a novel target for cancer treatment [J]. Life Sci, 2023, 331: 122034.
- [20] 谭佳杰, 张洪, 范月莹, 等. TMEM16A在肿瘤中的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版)(TAN J J, ZHANG H, FAN Y Y, et al. TMEM16A research progress in tumors [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, Medical Edition), 2022, 51(6): 879-83.
- [21] CROTTÈS D, JAN L Y. The multifaceted role of TMEM16A in cancer [J]. Cell Calcium, 2019, 82: 102050.
- [22] 张乐, 李昊泽, 刘凯东, 等. 结肠癌患者血清miR-370-3p、ANO1表达变化及其临床意义[J]. 山东医药(ZHANG L, LI Z H, LIU K D, et al. Changes in serum miR-370-3p and ANO1 expression in patients with colon cancer and their clinical significance [J]. Shandong Medicine), 2023, 63(31): 19-23.
- [23] 孙欣华, 张伟, 刘丽, 等. miR-370-3p靶向ANO1对结肠癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 解剖科学进展(SUN X H, ZHANG W, LIU L, et al. Effect of miR-370-3p targeting ANO1 on colon cancer cell proliferation and migration [J]. Advances In Anatomical Sciences), 2023, 29(1): 33-6.
- [24] YAN Y, DING X, HAN C, et al. Involvement of TMEM16A/ANO1 upregulation in the oncogenesis of colorectal cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022, 1868(6): 166370.
- [25] LIU J J, HE F, GUO S B. TMEM16A overexpression indicates poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2022, 114(7): 390-4.
- [26] CHEN D, XU L, XING H, et al. Sangerbox 2: enhanced functionalities and update for a comprehensive clinical bioinformatics data analysis platform [J]. Imeta, 2024, 3(5): e238.
- [27] STEIN U, SCHLAG P M. Clinical, biological, and molecular aspects of metastasis in colorectal cancer [J]. Recent Results Cancer Res, 2007, 176: 61-80.
- [28] KINDLER H L, SHULMAN K L. Metastatic colorectal cancer [J]. Curr Treat Options Oncol, 2001, 2(6): 459-71.
- [29] GALAL M A, AL-RIMAWI M, HAJEER A, et al. Metformin: a dual-role player in cancer treatment and prevention [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 4083.
- [30] HUA Y, ZHENG Y, YAO Y, et al. Metformin and cancer hallmarks: shedding new lights on therapeutic repurposing [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 403.
- [31] PODHORECKA M, IBANEZ B, DMOSZYŃSKA A. Metformin-its potential anti-cancer and anti-aging effects [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71(0): 170-5.
- [32] LI L, HAN R, XIAO H, et al. Metformin sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* through inhibition of IL-6 signaling and EMT reversal [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(10): 2714-26.
- [33] WANG L, ZHONG N N, WANG X, et al. Metformin attenuates TGF- β 1-induced fibrosis in salivary gland: a preliminary study [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16260.
- [34] OHYA S, KITO H, HATANO N, et al. Recent advances in therapeutic strategies that focus on the regulation of ion channel expression [J]. Pharmacol Ther, 2016, 160: 11-43.
- [35] CHEN W, GU M, GAO C, et al. The Prognostic Value and Mechanisms of TMEM16A in Human Cancer [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 542156.
- [36] JIA L, LIU W, GUAN L, et al. Inhibition of calcium-activated chloride channel ANO1/TMEM16A suppresses tumor growth and invasion in human lung cancer [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136584.
- [37] LEE Y S, LEE J K, BAE Y, et al. Suppression of 14-3-3 γ -mediated surface expression of ANO1 inhibits cancer progression of glioblastoma cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 26413.
- [38] LIU W, LU M, LIU B, et al. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma [J]. Cancer Lett, 2012, 326(1): 41-51.
- [39] SHI Z Z, SHANG L, JIANG Y Y, et al. Consistent and differential genetic aberrations between esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma detected by array comparative genomic hybridization [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(21): 5867-78.
- [40] XIAO H, MA X, FENG W, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1-Smad3 signalling pathway [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(3): 504-13.
- [41] TONG D, LIU Q, LIU G, et al. Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis [J]. Cancer Lett, 2017, 389: 23-32.