

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0001-05

基础研究 · 论著

二甲双胍对人胰腺癌细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响及机制*

徐萍¹, 蒋小猛², 葛璐², 黄红梅², 周朦², 张尤历², 徐岷²

(江苏大学附属医院 1. 内分泌科, 2. 消化内科, 江苏 镇江 212001)

摘要: **目的** 探索不同浓度二甲双胍对人胰腺癌 Panc-1 细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响及其可能的分子机制。**方法** 用不同浓度的二甲双胍处理人胰腺癌 Panc-1 细胞后, 采用 MTT 法检测其对癌细胞增殖能力的影响, 流式细胞术检测其对细胞凋亡和细胞周期的影响, Western blot 观察 PTEN、p-Akt (Ser473)、mTOR 蛋白表达水平的变化。**结果** 干预 48 h 时, 不同浓度二甲双胍 (0.5、2.0 和 8.0 mmol) 对细胞生长的抑制率依次为 (7.20±5.92)%、(18.35±4.77)% 和 (33.45±4.10)%; 72 h 时对细胞生长的抑制率分别为 (24.81±4.04)%、(53.42±4.18)% 和 (61.36±2.00)%。该抑制作用随着药物浓度增加和干预时间延长而增强, 呈药物浓度依赖性和时间依赖性。流式细胞术检测结果显示, 二甲双胍干预 48 h 时, 8.0 mmol 组 G₁ 期细胞比例与对照组和 0.5 mmol 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8.0 mmol 组低于对照组和 0.5 mmol 组; G₂/M 期细胞比例与对照组和 0.5 mmol 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8.0 mmol 组高于对照组和 0.5 mmol 组。二甲双胍作用 48 h 时 8.0 mmol 组细胞的中晚期凋亡率为 (12.64±2.74)%, 与对照组 (7.01±1.14)% 和 0.5 mmol 组 (6.19±0.32)% 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8.0 mmol 组高于对照组和 0.5 mmol 组。Western blot 检测结果显示二甲双胍作用 48 h 时, 2.0 mmol 组和 8.0 mmol 组与对照组和 0.5 mmol 组比较, PTEN 蛋白表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2.0 mmol 组和 8.0 mmol 组升高, 而 p-Akt (Ser473) 和 mTOR 的表达水平降低。**结论** 二甲双胍能抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞的增殖能力, 引起 G₂/M 细胞周期阻滞, 同时诱导胰腺癌细胞的凋亡, 其可能的机制是通过激活 PTEN 的表达, 抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路。

关键词: 二甲双胍; 胰腺肿瘤; 增殖; 细胞周期; 细胞凋亡; PTEN; PI3K/Akt/mTOR

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

Influence of Metformin on proliferation, cell cycle and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cells and mechanisms*

Ping Xu¹, Xiao-meng Jiang², Lu Ge², Hong-mei Huang², Meng Zhou², You-li Zhang², Min Xu²

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Metformin on proliferation, cell cycle and apoptosis of pancreatic adenocarcinoma Panc-1 cells *in vitro*, and appraise the possible mechanism. **Methods** Panc-1 cells were treated with 0.5, 2.0 and 8.0 mmol Metformin *in vitro*. Cell proliferation was measured by MTT assay. Cell apoptosis and cell cycle distribution were detected by flow cytometry. The expression of PTEN, p-Akt (Ser473)

收稿日期: 2017-03-27

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81472333; No: 81672402)

[通信作者] 徐岷, E-mail: peterxu1974@163.com

and mTOR were detected by Western blot. **Results** After 48 h, the inhibition rates of Metformin at dosage of 0.5, 2.0 and 8.0 mmol were $(7.20 \pm 5.92)\%$, $(18.35 \pm 4.77)\%$ and $(33.45 \pm 4.10)\%$, respectively. After 72 h, the inhibition rates of Metformin at dosage of 0.5, 2.0 and 8.0 mmol were $(24.81 \pm 4.04)\%$, $(53.42 \pm 4.18)\%$ and $(61.36 \pm 2.00)\%$, respectively. The proliferation of Panc-1 cells was inhibited by Metformin in a dose- and time-dependent manner. After 48 h, the percentage of G1 phase cells in the 8.0 mmol Metformin group was significantly lower than that in the controlled group and the 0.5 mmol Metformin group ($P < 0.05$). The percentage of G2/M phase cells in the 8.0 mmol Metformin group was remarkably higher than that in the other groups ($P < 0.05$). After 48 h, the percentage of cells in the middle and late stages of apoptosis was increased from $(7.01 \pm 1.14)\%$ in the controlled group and $(6.19 \pm 0.32)\%$ in the 0.5 mmol Metformin group to $(12.64 \pm 2.74)\%$ in the 8.0 mmol Metformin group ($P < 0.05$). After 48 h, compared with the controlled group and the 0.5 mmol Metformin group, the expression of PTEN was activated and the expressions of p-Akt (Ser473) and mTOR were reduced in the 2.0 and 8.0 mmol Metformin groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Metformin can suppress the proliferation of human pancreatic adenocarcinoma Panc-1 cells, cause G2/M phase checkpoint arrest and induce cell apoptosis *in vitro* at moderate to high dosage. The mechanism may be inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway by activating the expression of PTEN.

Keywords: Metformin; pancreatic neoplasm; proliferation; cell cycle; apoptosis; PTEN; PI3K/Akt/mTOR

二甲双胍是临床上用于治疗 2 型糖尿病的一种安全有效的药物, 它通过减少糖异生, 促进外周组织对糖的摄取和利用, 从而在机体内发挥降低血糖的作用^[1]。近来有研究^[2-4]已证实二甲双胍可以抑制胃癌、乳腺癌及肺癌等癌细胞的增殖, 具有抗肿瘤的作用。本研究探索不同浓度二甲双胍对人胰腺癌 Panc-1 细胞株的作用, 观察其对癌细胞生长、凋亡及细胞周期的影响, 并进一步探讨二甲双胍在胰腺癌细胞中的抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

人胰腺癌 Panc-1 细胞株购自中国科学院上海生命科学细胞所 (由江苏大学基础医学研究所保存), 细胞培养用胎牛血清、RPMI1640 培养基及双抗 (链霉素、青霉素) 购自美国 Gibco 公司, 二甲双胍、MTT 购自美国 Sigma 公司, DMSO 购自美国 Sigma 公司, Annexin V-FITC 流式细胞凋亡检测试剂盒为南京凯基生物科技公司产品, 兔抗 PTEN、p-Akt、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、actin 抗体购自美国 Santa Cruze 公司, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自美国 Sigma 公司。酶联免疫检测仪为美国 Thermo 公司产品, 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 细胞培养和二甲双胍干预

人胰腺癌 Panc-1 细胞培养于 37°C , 5% 二氧化碳 CO_2 的无菌、湿润环境中, 常规培养于含 10% 胎

牛血清、100 ng/ml 链霉素、100 u/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中。将处于对数生长期的 Panc-1 细胞消化收集, 按细胞量 5×10^3 个 / 孔于 96 孔板中均匀接种或 3×10^3 个 / 孔接种于 6 孔板中。实验分为 4 组, 分别是对照组、二甲双胍 0.5 mmol 组、2.0 mmol 组和 8.0 mmol 组。细胞接种 24 和 48 h 后, 各组分别更换含有二甲双胍的细胞培养基, 药物终浓度分别为 0.5、2.0 和 8.0 mmol, 对照组的培养基中加入体积相同的 PBS。

1.3 MTT 法测定细胞存活率

处于对数生长期的人胰腺癌 Panc-1 细胞均匀接种于 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔。二甲双胍作用 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 $10 \mu\text{l}$ 、5 mg/ml 的 MTT 试剂后培育 4 h, 移液器谨慎吸出每孔培养液, 再加入 DMSO $150 \mu\text{l}$, 于避光条件下轻微震荡 5 ~ 8 min 使结晶完全溶解, 吸光度 (A) 值由酶联免疫检测仪检出, 设定检测波长为 570 nm, 以不含细胞的全细胞培养液孔调零。根据 A 值计算细胞存活率, 细胞存活率 = (实验孔 A570 - 调零孔 A570) / (对照孔 A570 - 调零孔 A570) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将处于对数生长期的 Panc-1 细胞消化收集, 均匀接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。二甲双胍处理 48 h 后将各组细胞收集, 并以预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入预冷 70% 乙醇固定, 4°C 环境下过夜。加入浓度 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 RNase $10 \mu\text{l}$, 浓度 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 PI 缓冲液 $300 \mu\text{l}$, 4°C 环境中避光条件下孵育 15 min, 用

流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。

1.5 Western blot 检测 PTEN、p-Akt、mTOR 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液常规提取细胞总蛋白, 100℃ 加热 10 min, 高速离心 5 min, -20℃ 保存待用。12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转法转至 PVDF 膜上。室温条件下 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 一抗 (PTEN、p-Akt、mTOR、actin), 4℃ 孵育过夜, 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 ~ 2 h, 用 ECL 发光试剂检测显影, 图像用灰度分析软件处理分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 LSD-t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制人胰腺癌 Panc-1 细胞的生长

二甲双胍处理 24 h 时, 细胞存活率仅 8.0 mmol 组与其他各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其他各组之间的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预 48 h 时, 0.5、2.0 和 8.0 mmol 组细胞生长抑制率分别为 (7.20 ± 5.92)%、(18.35 ± 4.77)% 和 (33.45 ± 4.10)%; 干预 72 h 时各组细胞生长的抑制率分别为 (24.81 ± 4.04)%、(53.42 ± 4.18)% 和 (61.36 ± 2.00)%。二甲双胍处理癌细胞 48 和 72 h 后, 与对照组比较, 二甲双胍 0.5、2.0 和 8.0 mmol 组细胞生长抑制率均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着二甲双胍药物浓度的增加或干预时间的延长, 其对 Panc-1 细胞的抑制作用逐渐增强。见图 1。

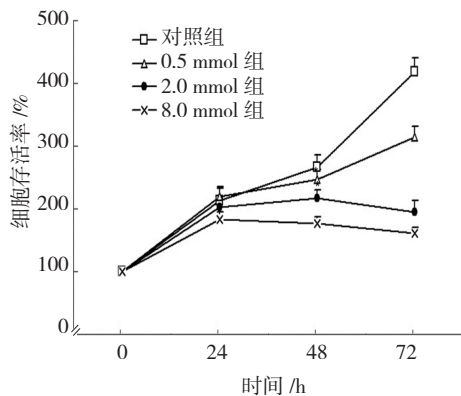


图 1 不同浓度二甲双胍干预对胰腺癌 Panc-1 细胞存活率的影响

2.2 二甲双胍对胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡的影响

二甲双胍干预 48 h 后, 2.0 mmol 组与 8.0 mmol 组癌细胞的早期凋亡与中晚期凋亡的比例呈现增高趋势, 但各组之间早期细胞凋亡率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 仅 8.0 mmol 组中晚期细胞凋亡率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 0.5 mmol 组比较, 8.0 mmol 组的中晚期细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 凋亡率增加。见图 2。

2.3 二甲双胍对胰腺癌 Panc-1 细胞周期的影响

二甲双胍干预 48 h 时, 8.0 mmol 组 G₁ 期细胞所占比例与对照组和 0.5 mmol 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8.0 mmol 组低于对照组和 0.5 mmol 组; 8.0 mmol 组 G₂/M 期细胞所占比例与其他各组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 8.0 mmol 组高于其他各组, 表明在胰腺癌 Panc-1 细胞中, 二甲双胍干预能够使细胞周期阻滞于 G₂/M 期。见图 3。

2.4 二甲双胍对 PTEN、p-Akt、mTOR 蛋白的影响

二甲双胍干预 48 h 时, 2.0 mmol 组和 8.0 mmol

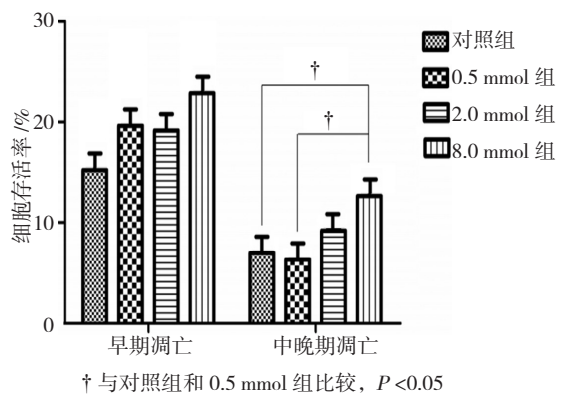


图 2 二甲双胍对胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡的影响

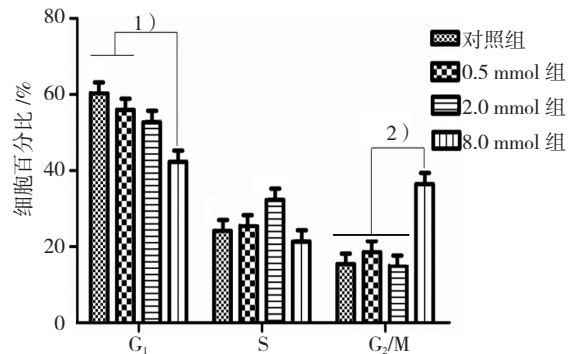


图 3 不同浓度的二甲双胍干预 48 h 后对胰腺癌 Panc-1 细胞周期的影响

组中 PTEN 表达水平与对照组和 0.5 mmol 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), PTEN 表达水平升高, 而 p-Akt (Ser473) 和 mTOR 表达水平降低。见图 4。

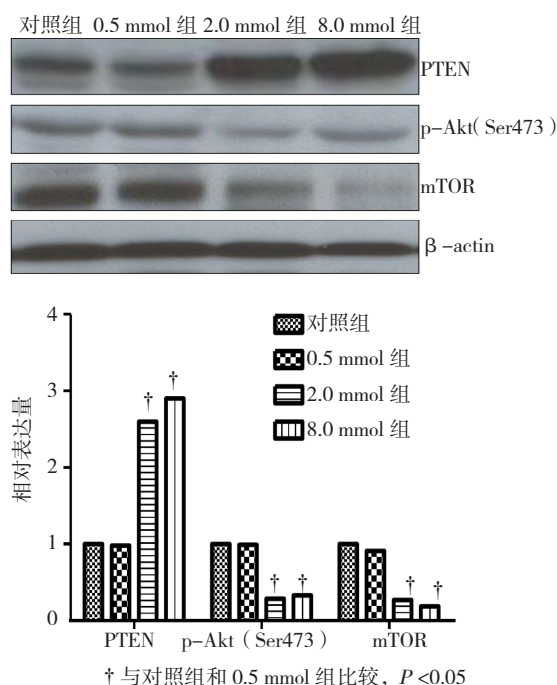


图 4 不同浓度的二甲双胍干预 48 h 后对 PTEN、p-Akt、mTOR 的影响

3 讨论

胰腺癌是一种恶性度高, 病情进展快的消化道恶性肿瘤, 2 型糖尿病与其的关系目前尚未完全阐明。一方面, 胰腺癌可以导致 2 型糖尿病, 另一方面, 2 型糖尿病也是少数胰腺癌患者的早期临床表现之一。近期研究^[5]揭示降糖药物二甲双胍的使用可以减少糖尿病患者发生胰腺癌的可能, 引起了人们对二甲双胍的抗肿瘤机制的研究兴趣。

二甲双胍作为一种安全有效的降糖药物, 其降血糖的机制被认为与激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 有关。AMPK 信号通路的激活可能调控某些肿瘤细胞增殖和凋亡过程。有学者用二甲双胍干预卵巢癌细胞, 结果发现细胞的增殖活性降低, AMPK 信号通路被活化, 磷酸化的 AMPK 表达增加, 进而抑制其下游的 mTOR 信号分子的表达, 导致与增殖相关的蛋白分子合成受抑制。QUEIROZ 等^[6]证实依赖于 AMPK 信号通路的二甲双胍在乳腺癌细胞中同样有抑制增殖的作用。本研究发现, 用不同浓度的二甲双胍作用于胰腺癌 Panc-1 细胞 48 及

72 h 后, 细胞的生长情况均受到抑制, 且随着二甲双胍药物浓度的递增或药物干预时间的增加, 其对胰腺癌 Panc-1 细胞的生长抑制逐渐增强。这表明二甲双胍能够较有效地抑制胰腺癌细胞的生长。

二甲双胍同样可通过激活 AMPK 途径下调 mTOR 信号来诱发细胞凋亡, QUEIROZ 等^[6]和 HAN 等^[7]分别证实了二甲双胍对乳腺癌细胞和胃癌细胞的促凋亡作用。WANG 等^[8]用二甲双胍处理 4 种胰腺癌细胞株, 发现呈现剂量依赖效应的促凋亡趋势。本研究发现, 二甲双胍干预 48 h 后, 细胞早期及中晚期凋亡比例均呈增高趋势。8.0 mmol 组的细胞凋亡率与 0.5 mmol 组比较, 差异有统计学意义, 这提示二甲双胍对胰腺癌细胞的促凋亡作用有可能存在时间及剂量依赖。

本研究发现二甲双胍 8.0 mmol 组 G_1 期细胞所占比例降低, G_2/M 期细胞所占比例升高, 提示 G_2/M 期细胞周期阻滞。这与 BEN 等^[9]提出二甲双胍联合 2-脱氧葡萄糖可以使前列腺癌细胞周期阻滞于 G_2/M 期结果相一致。但也有学者发现, 二甲双胍可以使细胞阻滞在 G_0/G_1 期^[10], 并假设二甲双胍可能通过肿瘤抑制激酶 LKB1 使得磷酸化 AMPK 增加, 活化后的 AMPK 通过上调 P53-P21 轴和抑制 mTOR 途径使得细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期^[11]。二甲双胍对不同细胞株的周期阻滞时期不同, 仍需深入研究阐明。

KARNEVI 等^[12]发现正常血糖浓度下, 二甲双胍能够激活胰腺癌细胞的 AMPK Thr172, 抑制其下游 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。本研究发现二甲双胍作用 48 h 后, mTOR 和 p-Akt (Ser473) 表达水平下降, 说明二甲双胍抑制了这一细胞生长通路。本研究还发现二甲双胍作用 48 h 后, PTEN 表达增高。PTEN 作为一种新发现的抑癌基因, 在细胞生长、增殖、凋亡等过程中具有重要作用。正常机体中, 抑癌基因 PTEN 拮抗磷酸肌醇激酶 PI3K 的作用, 从而抑制调控细胞增殖和存活的重要信号分子—蛋白激酶 Akt 的磷酸化, 对 Akt 的活化起负性调控作用, 从而使 Akt 的活性维持在正常范围^[13]。KIM 等^[14]发现, 在血管平滑肌细胞中, AMPK 能启动 PTEN 的表达。这一研究提示, 二甲双胍具有抗肿瘤作用的分子机制有可能为其激活 AMPK 的表达, 从而启动 PTEN, 继而抑制下游信号转导通路 PI3K/Akt/mTOR。

上述实验初步探明二甲双胍能够抑制胰腺癌细胞的生长, 阻滞细胞周期, 并促进凋亡, 并可能存在时间及剂量依赖性, 其机制是通过激活 PTEN 的表达,

抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路。需注意的是, 目前关于二甲双胍与肿瘤生长的相关性的体外实验中, 所使用的二甲双胍的药物浓度 (0.5 ~ 8.0 mmol) 均高于其作为降糖药物所需的血药浓度。但是, 有研究认为二甲双胍在外周组织中聚集浓度数倍高于其血液中的浓度, 从而提示二甲双胍用于人体肿瘤治疗中, 有可能达到足够有效的抗肿瘤药物浓度。二甲双胍抗肿瘤效应中涉及到的靶点 (PTEN、Akt、mTOR 等) 及其相关通路的变化也为胰腺癌的分子靶向治疗提供了新的研究方向。

参 考 文 献:

- [1] ZANDERS M M, VAN HERK-SUKEL M P, VISSERS P A, et al. Statin and aspirin use still associated with overall mortality among colorectal cancer patients with diabetes if adjusted for one another[J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3): 403-410.
- [2] LAU Y K, DU X, RAYANAVAR V, et al. Metformin and erlotinib synergize to inhibit basal breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(21): 10503-10517.
- [3] GREENHILL C. Gastric cancer. metformin improves survival and recurrence rate in patients with diabetes and gastric cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(3): 124.
- [4] O'BRIEN A J, VILLANI L A, BROADFIELD L A, et al. Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells ex vivo through inhibition of de novo lipogenesis[J]. *Biochem J*, 2015, 469(2): 177-187.
- [5] SNIMA K S, NAIR R S, NAIR S V, et al. Combination of anti-diabetic drug metformin and boswellic acid nanoparticles: a novel strategy for pancreatic cancer therapy[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(1): 93-104.
- [6] QUEIROZ E A, PUUKILA S, EICHLER R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98207.
- [7] HAN G, GONG H, WANG Y, et al. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(1): 77-87.
- [8] WANG L W, LI Z S, ZOU D W, et al. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(47): 7192-7198.
- [9] BEN S I, LAURENT K, GIULIANO S, et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6): 2465-2475.
- [10] ISAKOVIC A, HARHAJI L, STEVANOVIC D, et al. Dual anti-glioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(10): 1290-1302.
- [11] JONES R G, PLAS D R, KUBEK S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint[J]. *Mol Cell*, 2005, 18(3): 283-293.
- [12] KARNEVI E, SAID K, ANDERSSON R, et al. Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 235.
- [13] YU Y, SAVAGE R E, EATHIRAJ S, et al. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT pathway with an allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140479.
- [14] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132-141.

(张蕾 编辑)