

## 胰岛素及其类似物单独或联合二甲双胍对人乳腺癌细胞系(MCF-7)增殖的影响

皇甫建林<sup>1</sup>,马向华<sup>2</sup>,卢 珊<sup>2</sup>,沈 捷<sup>2</sup>,李 慧<sup>2</sup>,周佳雁<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江苏盛泽人民医院内分泌科,江苏 盛泽 215226;<sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨人胰岛素及其类似物对人乳腺癌细胞系(MCF-7)增殖的影响及二甲双胍联合胰岛素及其类似物对 MCF-7 细胞增殖的影响。**方法:**①使用不同浓度(0、1、10、100、1 000 nmol/L)的人胰岛素及类似物干预 MCF-7 细胞 72 h 后,用 CCK-8 法检测干预后细胞增殖情况。②用胰岛素及类似物(每种胰岛素浓度均为 1 000 nmol/L)干预 MCF-7 细胞,分别用 CCK-8 法检测各胰岛素在干预 24、48、72 h 后的细胞增殖。③用 CCK-8 法检测单纯二甲双胍(0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L),及二甲双胍联合胰岛素及其类似物(浓度均为 1 000 nmol/L)干预 MCF-7 72 h 后细胞的增殖情况。**结果:**人胰岛素及类似物均能促进乳腺癌细胞系增殖并呈时间依赖性,人胰岛素、甘精胰岛素、赖脯胰岛素对细胞的增殖作用呈显著的剂量依赖性,相同条件下不同胰岛素对细胞的增殖作用无明显差异,但甘精胰岛素、赖脯胰岛素在相同条件下促细胞增殖作用高于其他胰岛素。二甲双胍可以呈浓度依赖性地抑制细胞的增殖作用,并减弱胰岛素类似物引起的细胞增殖作用,相同浓度二甲双胍对不同胰岛素类似物促增殖的抑制作用无明显差异,但对地特胰岛素的抑制作用小于其他胰岛素类似物。**结论:**胰岛素类似物和人胰岛素均能促进肿瘤细胞的增殖,二甲双胍可以抑制 MCF-7 细胞增殖,二甲双胍可以拮抗胰岛素及其类似物引起的促细胞增殖作用。

**[关键词]** 人胰岛素;胰岛素类似物;二甲双胍;人乳腺癌

**[中图分类号]** R730.231

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-923-05

## The effect of insulin analogues only or combined with metformin on the proliferation of breast cancer cell line (MCF-7)

HUANGFU Jian-lin<sup>1</sup>, MA Xiang-hua<sup>2</sup>, LU Shan<sup>2</sup>, SHEN Jie<sup>2</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, ZHOU Jia-yan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, The Shengze Hospital of Jiangsu Province, Shengze 215226; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of human insulin and insulin analogues combined with or without metformin on the proliferation of human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Methods:** Firstly, human mammary carcinoma cell line (MCF-7) was treated with different concentrations (1, 10, 100, 1 000 nmol/L) of insulin analogues or human insulin. Secondly, MCF-7 cells was treated with insulin analogues or human insulin at the concentration of 1 000 nmol/L, and the cell proliferation was tested by CCK-8 assay after 24 h, 48 h and 72 h treatment. Thirdly, MCF-7 cells were treated with different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20 mmol/L) of metformin combined with human insulin or insulin analogues (1 000 nmol/L each). The proliferation of MCF-7 cells was also examined by CCK-8 assay. **Results:** Both insulin analogues and human insulin could increase the proliferation of cell line MCF-7. Glargine, Lispro and human insulin had a dose-and time-dependent effect on the cell proliferation while Detemir and Aspart had only a time-dependent effect. Metfomin could inhibit the proliferation of MCF-7 cells in a dose-dependent response. Metformin could decrease the effect on the proliferation that was induced by human insulin and insulin analogues. **Conclusion:** Human insulin and insulin analogues could increase the proliferation of human mammary carcinoma cell line MCF-7. Metformin could decrease the proliferation of MCF-7 induced by human insulin and insulin analogues.

**[Key words]** human insulin; insulin analogue; metformin; mammary carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 923-927]

随着经济的快速发展及人们生活方式的改变,糖尿病已成为全世界最重要的慢性疾病之一。目前

全球糖尿病患者约 2.85 亿人,据估计 2030 年全球糖尿病患者将达 5 亿人,而目前中国糖尿病患者已

达9 200万,居全球第一,是威胁我国人民健康的重要社会问题<sup>[1]</sup>。目前流行病学研究表明,糖尿病与肿瘤的发生、发展密切相关,胰岛素作为治疗糖尿病的最有效的药物是否会增加肿瘤的患病风险也成为全世界关注的焦点<sup>[2]</sup>。胰岛素类似物是目前临床上控制血糖最有效的药物,2009《Diabetologia》公布了4项关于甘精胰岛素增加肿瘤发生风险的流行病学调查结果。该结果的公布引起了人们对胰岛素及其类似物使用安全的关注<sup>[3-5]</sup>。国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)和美国糖尿病学会(American Diabetes Association, ADA)等权威机构均认为这4项研究方法各存在缺陷,对于甘精胰岛素和恶性肿瘤之间的关系既不能确定也不能排除。这为临床使用胰岛素及其类似物量效和时机带来困惑和忧虑。

二甲双胍是治疗2型糖尿病的一线药物,其降糖机制主要是延缓葡萄糖由胃肠道的摄取,提高胰岛素的敏感性而增加外周葡萄糖的利用,以及抑制肝、肾过度的糖原异生<sup>[6]</sup>。最新研究表明二甲双胍具有抑制肿瘤增殖效应,机制可能为直接激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路<sup>[7]</sup>、消除高糖状态、减轻高胰岛素血症、抑制染色体畸变、杀伤肿瘤干细胞<sup>[8]</sup>。

本实验以人乳腺癌细胞系(MCF-7)为研究对象,分别以胰岛素及类似物单独和联合二甲双胍干预,初步探讨胰岛素及类似物对肿瘤细胞增殖的影响和二甲双胍对肿瘤细胞增殖的抑制作用,为临床合理选择用药方案提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

地特胰岛素、门冬胰岛素(丹麦诺和诺德公司),甘精胰岛素(德国赛诺菲安万特公司),赖脯胰岛素(美国礼来公司),二甲双胍(北京万辉双鹤药业有限公司);常规人胰岛素(徐州万邦医药有限公司)。人乳腺癌细胞系(MCF-7)由南京医科大学第一附属医院外科实验室惠赠;胎牛血清、DMEM/F12培养液、青链霉素、胰酶(美国Gibco公司);CCK-8试剂盒(上海信然生物技术有限公司);酶联免疫检测仪(美国Bio-Rad公司),其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MCF-7细胞培养

MCF-7细胞株用常规方法培养于DMEM/F12培养液中(4%胎牛血清,青霉素终浓度为 $1 \times 10^5$  U/L,

链霉素终浓度为100 mg/L),置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>温箱孵育,0.25%胰蛋白酶消化传代。

#### 1.2.2 不同浓度胰岛素及类似物对MCF-7细胞增殖的影响

取对数期的MCF-7细胞悬液分别接种于96孔细胞培养板( $4 \times 10^3$ 个/孔),接种24 h后换含0.1% FBS的DMEM/F12培养液。维持此条件培养16 h后进行干预实验。根据加入人胰岛素及类似物的不同分为甘精胰岛素、地特胰岛素、门冬胰岛素、赖脯胰岛素、常规人胰岛素组,每种胰岛素设5个梯度(0、1、10、100、1 000 nmol/L),其中0 nmol/L为对照组。每组8个复孔。作用72 h CCK-8法检测细胞增殖情况。检测时每孔加入CCK-8 20  $\mu$ l后,孵育4 h,置于酶联免疫检测仪,选择450 nm波长读取吸光度值,实验重复3次。

#### 1.2.3 胰岛素及类似物作用不同时间对MCF-7细胞增殖的影响

取对数期的MCF-7细胞悬液分别接种于96孔细胞培养板( $4 \times 10^3$ 个/孔),同法培养,对照组和实验组每组8个复孔。实验组中加入胰岛素的浓度均为1 000 nmol/L,分别作用24、48、72 h后CCK-8法检测细胞增殖情况。

#### 1.2.4 单纯二甲双胍对细胞增殖作用的影响

取对数期的MCF-7细胞悬液分别接种于96孔细胞培养板( $4 \times 10^3$ 个/孔),同法培养,对照组和实验组每组8个复孔。实验组中加入二甲双胍0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L,作用72 h后CCK-8法检测细胞增殖情况。

#### 1.2.5 二甲双胍联合人胰岛素及类似物对细胞增殖作用的影响

联合用药实验设单纯二甲双胍组、单纯胰岛素组、二甲双胍联合胰岛素组、空白对照组,二甲双胍设0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L 5个梯度,胰岛素及类似物加入浓度均为1 000 nmol/L。作用72 h后CCK-8法检测细胞增殖情况。

### 1.3 统计学方法

检测结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS17.0统计软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胰岛素作用后MCF-7细胞的形态学观察

MCF-7细胞经DMEM/F12培养液作用24 h

后,细胞散在分布,较稀疏,形态亦较为规整。胰岛素作用 72 h 后可见 MCF-7 细胞密度增加,细胞堆

积,大体形态可呈无序多层排列,细胞大小不均,形状各异,多核及大核细胞增多(图 1)。

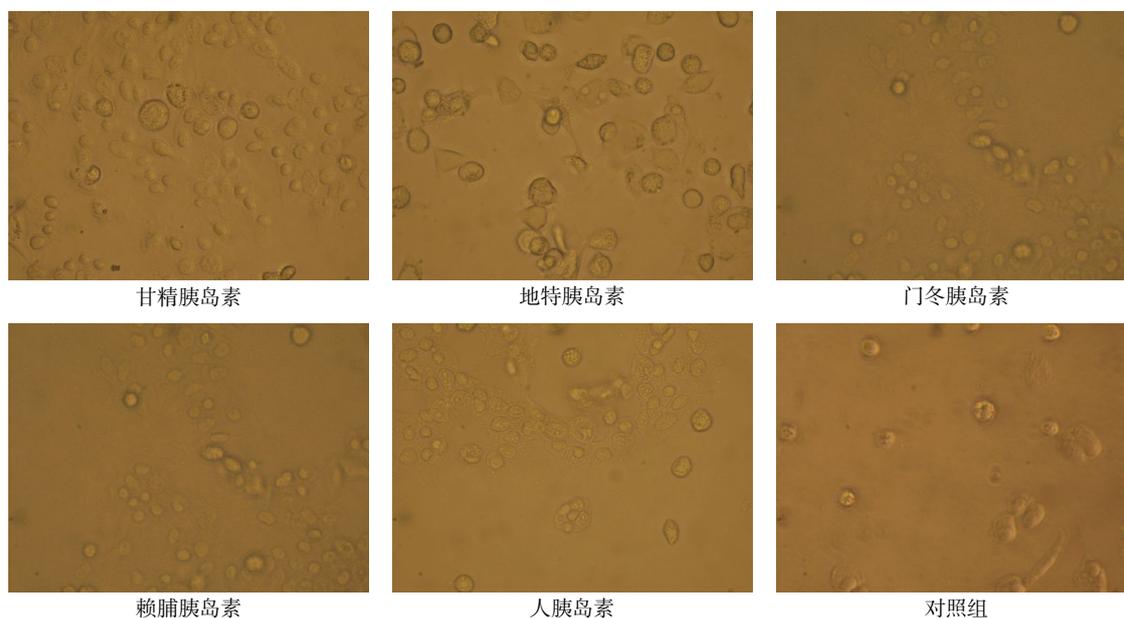


图 1 胰岛素作用后 MCF-7 细胞的形态学观察

Figure 1 The morphology observation of MCF-7 cells after insulin treatment

## 2.2 胰岛素及类似物作用浓度与细胞增殖的关系

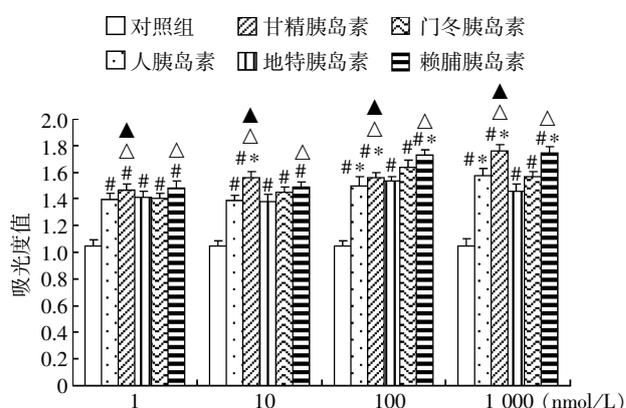
人胰岛素及 4 种类似物干预细胞 72 h 后,与对照组相比,人胰岛素及 4 种类似物均能促进 MCF-7 细胞的增殖,其中人胰岛素、甘精胰岛素及赖脯胰岛素对细胞的增殖作用存在明显的浓度依赖性,甘精胰岛素、赖脯胰岛素在相同浓度下对细胞的增殖作用高于人胰岛素和其他胰岛素类似物。当胰岛素浓度为 1、10、100、1 000 nmol/L 时,甘精胰岛素促细胞增殖作用与人胰岛素、地特胰岛素相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2)。

## 2.3 胰岛素及类似物作用时间与细胞增殖的关系

分别以人胰岛素及 4 种类似物(每种胰岛素浓度皆为 1 000 nmol/L)干预细胞。干预后 24 h,人胰岛素及类似物与对照组相比无明显的促增殖作用,干预后 48、72 h 人胰岛素及类似物对细胞有明显的促增殖作用并呈时间依赖性。在 24、48、72 h 人胰岛素及 4 种类似物对细胞的促增殖作用,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但 72 h 时甘精胰岛素及赖脯胰岛素对细胞的促增殖作用高于人胰岛素、地特胰岛素和门冬胰岛素( $P < 0.05$ ,图 3)。

## 2.4 单纯二甲双胍对细胞增殖作用的影响

单纯二甲双胍可以抑制细胞的增殖作用,呈浓度依赖性,但二甲双胍在 2.5、5.0 mmol/L 两个梯度间对细胞的抑制作用差异无统计学意义(图 4)。



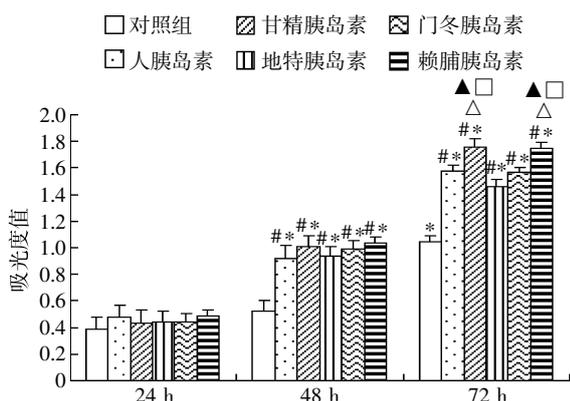
与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与浓度为 1 nmol/L 组相比,\* $P < 0.05$ ;与人胰岛素组相比, $\Delta P < 0.05$ ;与地特胰岛素组相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度人胰岛素及类似物对细胞增殖的影响

Figure 2 Different concentrations of human insulin and its analogs on cell proliferation

## 2.5 二甲双胍联合人胰岛素及类似物对细胞增殖作用的影响

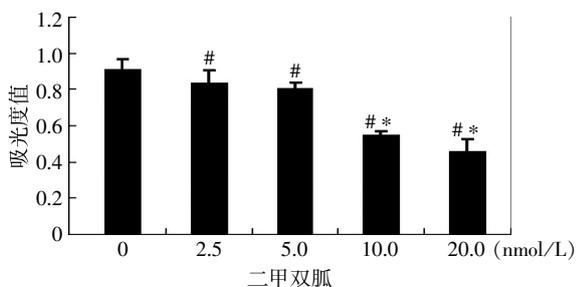
相同二甲双胍浓度下,联合药物组与无胰岛素的对照组比较,其对细胞的增殖作用差异均存在统计学意义( $P < 0.05$ ),不同的胰岛素在相同二甲双胍浓度下对细胞增殖作用无明显差异,但与二甲双胍联用时,地特胰岛素组对细胞的增殖作用强于人胰岛素及其他类似物。随二甲双胍浓度的增加,人胰岛素及类似物对细胞增殖作用逐渐降低,在二甲



与同时间点对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与相同胰岛素处理 24 h 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与人胰岛素组相比,  $\Delta P < 0.05$ ; 与地特胰岛素组相比,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与门冬胰岛素相比,  $\square P < 0.05$ 。

图 3 不同时间人胰岛素及类似物对细胞增殖的影响

Figure 3 Human insulin and its analogs on cell proliferation with different treatment time



与 0 mmol/L 二甲双胍的对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与二甲双胍浓度为 2.5 mmol/L 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 4 不同二甲双胍浓度对细胞增殖作用的影响

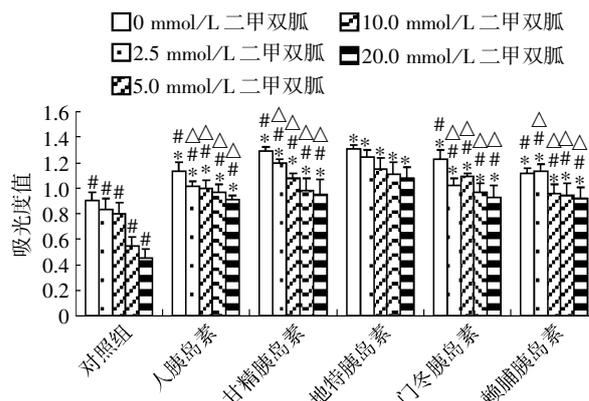
Figure 4 Metformin with different concentrations on cell proliferation

双胍浓度为 20 mmol/L 时, 除地特胰岛素外, 各种胰岛素联合二甲双胍组对 MCF-7 增殖的作用与单纯胰岛素组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 5)。

### 3 讨论

近年来, 胰岛素及其类似物与肿瘤发生风险的关系越来越受到关注, 体外实验研究也表明胰岛素及其类似物可以促进多种细胞的增殖和分化, 胰岛素类似物因其分子结构改变而具有不同于人胰岛素的特殊生物学效应。本实验用胰岛素及类似物干预 MCF-7 发现, 甘精胰岛素、赖脯胰岛素及人胰岛素对该细胞的增殖呈剂量依赖性及时效性, 但甘精胰岛素随着作用时间的延长其对细胞增殖作用渐高于人胰岛素, 而地特胰岛素作用渐低于人胰岛素。

胰岛素及类似物对细胞增殖的差异可能与胰岛素类似物结合受体的种类、与受体的亲和力及与



与相同二甲双胍浓度的对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与相同浓度二甲双胍的地特胰岛素组相比, \* $P < 0.05$ ; 与同胰岛素组 0 mmol/L 二甲双胍相比,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 5 不同浓度二甲双胍联合胰岛素及类似物对细胞增殖的影响

Figure 5 Metformin of different concentration combined with insulin and analogues on cell proliferation

受体的作用时间相关。Kurtzhals 等<sup>[9]</sup>在 2000 年将各种胰岛素类似物的受体结合力、代谢能力和促细胞有丝分裂能力与人胰岛素进行了比较, 发现门冬胰岛素和赖脯胰岛素对细胞代谢和细胞有丝分裂与人胰岛素相比, 无明显差别, 而两种长效胰岛素类似物不论是促代谢作用还是促有丝分裂作用, 在体外实验中都与人胰岛素有很大差别。近年来关于不同胰岛素类似物对肿瘤增殖影响的差异研究结果不尽相同, 但多数研究表明甘精胰岛素有明显的促增殖作用, 而速效胰岛素门冬胰岛素和赖脯胰岛素与人胰岛素相比无明显差异, 而本实验中赖脯胰岛素对细胞的增殖总趋势高于人胰岛素, 实验结果的差异可能与检测手段有关。Shukla 等<sup>[10]</sup>于 2009 年在体外分别以人胰岛素及 4 种胰岛素类似物干预 MCF-7 细胞后发现, 甘精胰岛素主要通过激活 IGF-1 受体经过 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 途径促进 MCF-7 细胞的有丝分裂<sup>[11]</sup>, 亦可以激活胰岛素受体通过 PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) 途径促进细胞的有丝分裂<sup>[12]</sup>, 不同胰岛素类似物促细胞增殖作用的具体机制仍需进一步研究。

近年来研究表明, 降糖药物二甲双胍除降糖作用外还有独特的抗肿瘤作用, 英国 Currie 等<sup>[13]</sup>的 1 项糖尿病流行病的调查结果显示, 与其他降糖药物相比, 二甲双胍能够显著降低糖尿病患者肿瘤发生的风险。体外实验研究表明二甲双胍可以促进肿瘤细胞凋亡, Hirsch 等<sup>[14]</sup>通过二甲双胍及化疗药物体外干预乳腺癌干细胞并将干预后干细胞移植到小

鼠体内,观察小鼠肿瘤的复发情况,该研究表明二甲双胍能够杀伤肿瘤干细胞,并增强化疗药物的敏感性、延缓肿瘤的复发。二甲双胍对细胞增殖的抑制作用主要是通过作用于细胞周期并激活细胞凋亡通路,体外研究表明二甲双胍可以降低细胞周期蛋白 D1 表达,而该蛋白与细胞的增殖相关<sup>[15-16]</sup>。而二甲双胍激活的细胞凋亡通路包括激活 AMPK 信号通路、抑制 mTOR 途径<sup>[17-18]</sup>。本实验通过不同浓度的二甲双胍联合胰岛素及类似物研究发现,二甲双胍能够抑制肿瘤细胞的增殖,并呈浓度依赖性,可以拮抗胰岛素及类似物的促增殖作用,实验中发现在相同浓度的二甲双胍对地特胰岛素的抑制作用低于其他胰岛素,其具体机制有待进一步研究。

综上所述,人胰岛素和类似物均能促进 MCF-7 细胞增殖,甘精胰岛素、赖脯胰岛素对细胞的增殖高于其他胰岛素,二甲双胍可以抑制 MCF-7 细胞增殖,二甲双胍可以拮抗胰岛素及类似物对细胞的增殖作用。

#### [参考文献]

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101
- [2] Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer; a meta-analysis [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(4): 856-862
- [3] Grouven U, Hemkens LG, Bender R, et al. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(1): 209-211
- [4] Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes [J]. *Diabetologia* 2009, 52(9): 1766-1777
- [5] Jonasson JM, Ljung R, Talback M, et al. Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies—a population-based follow-up study in Sweden [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(9): 1745-1754
- [6] Beck E, Scheen AJ. Anti-cancer activity of metformin; new perspectives for an old drug [J]. *Rev Med Suisse*, 2010, 6(260): 1601-1607
- [7] Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Menendez JA. Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(10): 1633-1636
- [8] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Del Barco S, et al. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126(2): 355-364
- [9] Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, et al. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use [J]. *Diabetes*, 2000, 49(6): 999-1005
- [10] Shukla A, Enzmann H, Mayer D. Proliferative effect of Apidra (insulin glulisine), a rapid-acting insulin analogue on mammary epithelial cells [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2009, 115(3): 119-126
- [11] Pasanisi P, Bruno E, Venturelli E, et al. Serum levels of IGF-I and BRCA penetrance; a case control study in breast cancer families [J]. *Fam Cancer*, 2011, 10(3): 521-528
- [12] Cong L, Chen K, Li J, et al. Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-PDE3B dependent mechanism in rat primary adipocytes [J]. *Biochem J*, 2007, 403(3): 519-525
- [13] Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, et al. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes; impact of metformin on survival [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(2): 299-304
- [14] Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsielichis PN, et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7507-7511
- [15] Kato K, Gong J, Iwama H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(3): 549-560
- [16] Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1 [J]. *J Mol Signal*, 2008, 3: 18
- [17] Sahra I Ben, Regazzetti C, Robert G, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4366-4372
- [18] Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level [J]. *Oncogene*, 2008, 27(25): 3576-3586

[收稿日期] 2012-03-31