

降糖药二甲双胍对甲状腺未分化癌细胞增殖及凋亡的作用

郑文亭¹, 兰玲², 钱玮¹, 杨雪阳¹, 郑旭琴¹, 徐宽枫¹, 崔岱^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; ²北京积水潭医院内分泌科, 北京 100035)

[摘要] 目的:研究二甲双胍对甲状腺未分化癌细胞增殖及凋亡的作用,初步探讨其作用机制。方法:以不同浓度二甲双胍作用于未分化癌 SW1736 细胞,MTT 法检测其增殖,流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况。结果:二甲双胍可显著抑制 SW1736 细胞增殖,其抑制作用呈剂量依赖性,并随着作用时间的延长抑制作用逐渐增强,于 72 h 达到最大抑制效果。流式细胞检测结果显示二甲双胍可阻滞未分化癌细胞周期至 G0/G1 期;并可促进肿瘤细胞凋亡,随着二甲双胍作用浓度的递增,肿瘤细胞的凋亡率逐渐增加,20 mmol/L 二甲双胍作用 48 h 后,可使 SW1736 细胞凋亡率从 8.3% 增加至 13.3%,与对照组相比,有显著统计学差异。结论:二甲双胍可抑制甲状腺未分化癌细胞的增殖活性,阻滞细胞周期进程,诱导细胞凋亡,为甲状腺未分化癌的治疗研究提供了新的方向。

[关键词] 二甲双胍;甲状腺癌;增殖;凋亡

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-442-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140408

Effect of metformin on proliferation and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells

Jia Wenting¹, Lan Ling², Qian Wei¹, Yang Xueyang¹, Zheng Xuqin¹, Xu Kuanfeng¹, Cui Dai^{1*}

(¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Endocrinology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of metformin on proliferation and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells, and explore the underlying mechanisms. **Methods:** Human anaplastic thyroid cancer cell line SW1736 was treated with different doses of metformin. MTT assay was used to detect proliferation viability of cell line. Cell cycle progression and apoptosis were analyzed by flow cytometry. **Results:** Metformin significantly inhibited the growth of SW1736 cells in time- and dose-dependent manner with a maximal effect at 72 h. The results of flow cytometry showed that anaplastic cancer cell cycle was arrested to G0/G1 phase by metformin. Furthermore, metformin also enhanced apoptosis of SW1736 cells in a dose-dependent manner. Compared with the control group, addition of 20 mmol/L metformin for 48 h increased the percentage of apoptotic cells from 8.3% to 13.3% in SW1736 cells. **Conclusion:** Metformin can inhibit proliferation and cell cycle progression and induce apoptosis of thyroid carcinoma cell line. Therefore, it may be a potential therapeutic agent for the treatment of human anaplastic thyroid carcinoma.

[Key words] metformin; thyroid carcinoma; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):442-445, 451]

甲状腺肿瘤是内分泌系统最常见的肿瘤,近年来已成为恶性肿瘤中发病率增长最快的肿瘤之一^[1],其中未分化癌发展迅速,易早期发生侵袭转移,常规治疗无效,患者中位生存期往往只有6个月。二甲双胍是2型糖尿病患者一线口服降糖药物,近来因其抗肿瘤作用而获得广泛关注,研究发现二

甲双胍治疗可降低糖尿病患者总体病死率及癌症病死率^[2],同时亦有研究报道二甲双胍可抑制多种肿瘤细胞的生长。因此,本研究旨在观察二甲双胍对甲状腺未分化癌细胞增殖和凋亡的作用,初步探讨其作用机制,为进一步深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

[基金项目] 国家自然科学基金(81102032)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cui_dai@163.com

人甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 由德国柏林洪堡大学夏洛特医学院 Derwahl 教授惠赠。人甲状腺组织标本取自就诊于南京医科大学第一附属医院甲状腺外科的甲状腺结节患者手术切除标本,参照文献方法分离原代甲状腺细胞^[3]。DMEM 培养基、非必需氨基酸及胎牛血清购自美国 Gibco 公司;二甲双胍(metformin)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;MTT 购自合肥 BIOSHARP 生物科技公司,DMSO 购自美国 Sigma 公司;细胞周期检测试剂盒和 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 细胞培养

SW1736 细胞和原代甲状腺细胞常规培养于含 10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖活性

取对数生长期细胞,以 $(3\sim 9)\times 10^3$ 个/孔接种于 96 孔培养板中,分别以终浓度为 0、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、50.0 mmol/L 二甲双胍培养液培养 24、48 及 72 h 后,每孔加入浓度为 5 mg/ml 四唑盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 溶液 20 μl,37℃ 孵育 4 h;小心吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μl DMSO,轻微震荡 10 min 使结晶充分溶解,用酶联免疫检测仪于波长 492 nm 处检测吸光度值,每浓度组 6 孔,实验至少重复 3 次。结果以细胞活力比率 (relative cell viability, RCV) 表示, $RCV(\%) = (\text{实验组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的细胞,以 2×10^5 个/皿均匀接种于直径为 6 cm 的培养皿中,24 h 后换用终浓度为 0、5、10 mmol/L 二甲双胍的培养液,48 h 后胰酶消化处理各组细胞,PBS 洗 3 次,加入 1 ml -20℃ 预冷的 75%乙醇固定过夜,PBS 洗 2 遍后加入 100 μl RNase A 37℃ 水浴 30 min,再加入 400 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染液混匀,4℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。结果以处在各个细胞周期的细胞百分数表示。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的细胞,以 4×10^5 个/皿均匀接种于直径为 6 cm 的培养皿中,24 h 后换用终浓度为 0、10、20 mmol/L 二甲双胍的培养液,48 h 后胰酶消化处理各组细胞,PBS 洗 2 次,取细胞沉淀加入

250 μl Binding Buffer 悬浮细胞,在悬液中加入 2.5 μl Annexin V-FITC,2.5 μl PI,2~8℃ 避光孵育 15 min,流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用多因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 或 Dunnett T3 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制甲状腺未分化癌细胞增殖

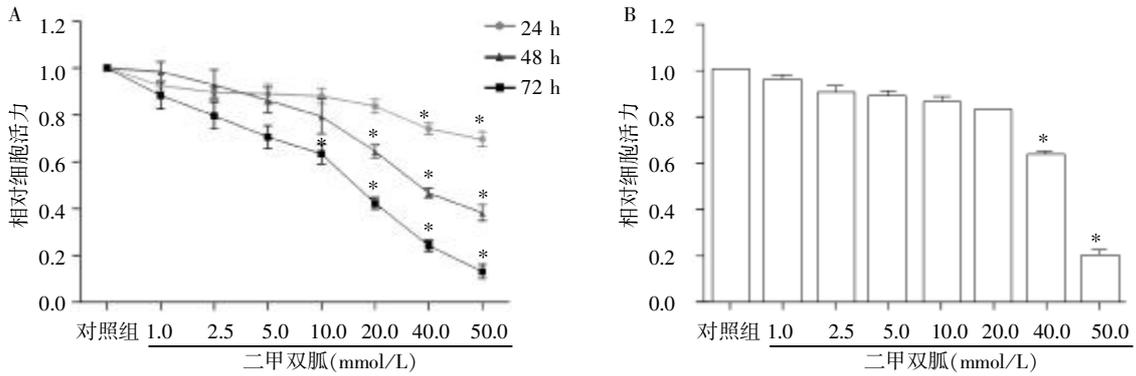
将不同浓度的二甲双胍分别与 SW1736 细胞作用 24、48 和 72 h 后行 MTT 实验,结果显示二甲双胍可显著抑制 SW1736 细胞增殖,且随二甲双胍浓度的增加抑制作用呈剂量依赖性增强;同时随着二甲双胍对 SW1736 细胞作用时间的延长,二甲双胍对其增殖的抑制作用也越明显,与 24 及 48 h 相比,二甲双胍处理 72 h 对 SW1736 细胞抑制作用最强,与对照组相比,有显著统计学差异(图 1);二甲双胍作用于 SW1736 细胞 72 h 后其半数抑制浓度(the half maximal inhibitory concentration, IC_{50})为 (13.09 ± 4.00) mmol/L,48 h 为 (33.44 ± 5.98) mmol/L。而在原代培养的甲状腺细胞中,二甲双胍对细胞生长无明显抑制作用,仅当二甲双胍浓度增加至 40 mmol/L 以上时,对原代培养的甲状腺滤泡细胞的增殖有轻微抑制作用。

2.2 二甲双胍阻滞 SW1736 细胞周期进程

SW1736 细胞加入不同浓度二甲双胍培养 48 h 后流式细胞仪检测细胞周期,对照组、5 mmol/L 组和 10 mmol/L 组 G0/G1 期百分比分别为 $(54.16 \pm 2.29)\%$ 、 $(58.03 \pm 1.72)\%$ 和 $(62.25 \pm 2.74)\%$,S 期分别为 $(39.48 \pm 5.40)\%$ 、 $(32.97 \pm 0.62)\%$ 和 $(28.87 \pm 2.20)\%$,G2/M 期分别为 $(6.35 \pm 3.18)\%$ 、 $(9.01 \pm 2.25)\%$ 和 $(6.33 \pm 5.19)\%$;其中与对照组相比,10 mmol/L 组 G0/G1 期比率增高,S 期比率下降,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。结果表明二甲双胍可阻滞细胞周期至 G0/G1 期,抑制细胞周期进程。

2.3 二甲双胍促进 SW1736 细胞凋亡

二甲双胍作用 SW1736 细胞 48 h 后,Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡情况。如图 3 所示,二甲双胍作用 48 h 后,随着二甲双胍剂量的递增,SW1736 的细胞凋亡率逐渐增加,20 mmol/L 二甲双胍作用后可使 SW1736 细胞凋亡率从 8.3%增加至 13.3%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



与对照组相比, *P < 0.01。

图 1 二甲双胍对 SW1736(A)和原代甲状腺细胞(B)增殖活性的影响

Figure 1 The effect of metformin on proliferation of SW1736(A) and primary thyrocytes(B)

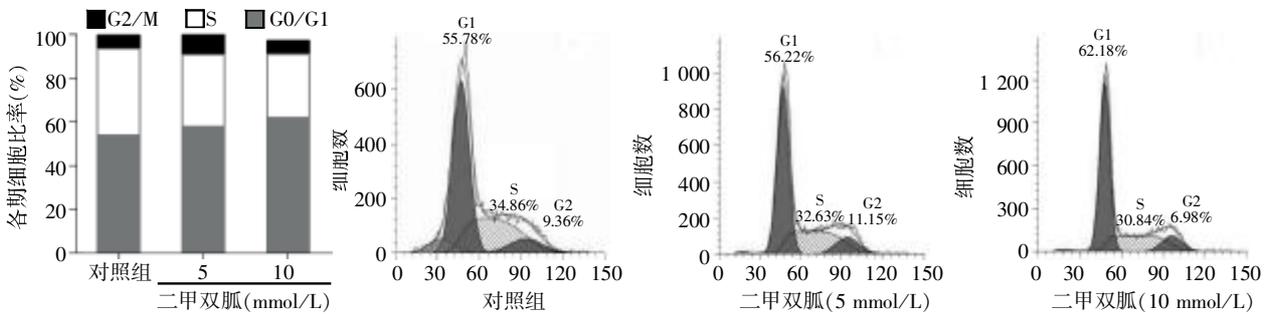
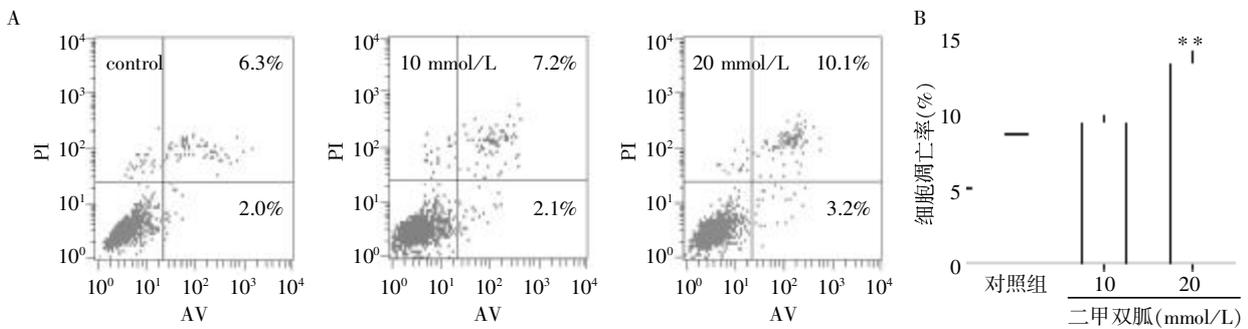


图 2 二甲双胍对 SW1736 细胞周期的影响

Figure 2 The effect of metformin on cell cycle of SW1736 cells



A: 流式细胞散点图, 右上象限为晚期凋亡, 右下象限为早期凋亡; B: 各组统计分析结果, 与对照组相比, **P < 0.01。

图 3 二甲双胍对 SW1736 细胞凋亡的影响

Figure 3 The effect of metformin on apoptosis of SW1736 cells

3 讨论

近几十年来,我国糖尿病的患病率显著增加,糖尿病患者数量急剧上升,研究发现糖尿病可增加结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌和非霍奇金淋巴瘤等多种癌症的发生风险^[4-7]。在 2 型糖尿病患者中甲状腺体积及甲状腺结节发病率均高于非糖尿病人群^[8]。研究者推测糖尿病可通过多种途径增加甲状腺癌的发生风险:①体质指数增加;②高胰岛素水平;③促甲状腺激素水平长期偏高;④高血糖和高

甘油三酯;⑤维生素 D 缺乏;⑥使用胰岛素和磺脲类降糖药物^[9]。

二甲双胍是 2 型糖尿病患者一线口服降糖药物,可抑制肝葡萄糖的输出,改善外周组织对胰岛素的敏感性、增加外周组织对葡萄糖的摄取及利用。近期因其抗癌作用而获得广泛关注。Bowker 等^[2]的一项大型回顾性研究发现,使用二甲双胍的 2 型糖尿病患者肿瘤相关病死率显著低于磺脲类或胰岛素治疗组。荷兰的一项前瞻性观察随访了 1 300 名使用二甲双胍或其他降糖药治疗 9.6 年的糖尿病患者,

得出与 Bowker 一致的结论,二甲双胍治疗可能降低糖尿病患者的癌症病死率,并且具有剂量依赖性^[10]。大量体外研究发现二甲双胍可以抑制包括乳腺、神经胶质、肾脏、胰腺、结肠、卵巢、子宫内膜、前列腺及肺等多种肿瘤细胞系的生长^[11]。动物实验亦发现二甲双胍可抑制结肠癌、乳腺癌、肺癌和前列腺癌的生长^[12-14]。本研究发现二甲双胍可抑制甲状腺未分化癌细胞株的增殖活性,并且具有时间和剂量依赖性。

目前对于二甲双胍抗肿瘤的作用机制尚未明确,诱导细胞周期停滞可能是其作用机制之一。细胞周期可分为 DNA 合成前期(G1)、DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G2)和有丝分裂期(M)。G1/S 和 G2/M 转换是细胞周期内两个重要阶段,细胞能否完成分裂周期取决于此。研究发现二甲双胍可阻滞细胞周期的 G0/G1 期、S 期或 G2/M 期,使细胞的增殖停滞,从而诱导细胞凋亡^[15]。本研究结果显示,10 mmol/L 二甲双胍可使 SW1736 细胞阻滞于 G0/G1 期,抑制细胞周期进程,进而抑制其生长增殖;增加二甲双胍浓度至 20 mmol/L 后可观察到显著的诱导细胞凋亡的作用。与 Liu^[16]和 Wang^[17]分别在三阴性乳腺癌和胰腺癌中诱导凋亡的研究结果一致。

本研究仅在体外水平观察二甲双胍对甲状腺肿瘤增殖和凋亡的作用,且研究中使用的二甲双胍浓度远高于临床糖尿病治疗中所用药物浓度^[18]。研究发现健康受试者每日服用 2 550 mg 二甲双胍,最大血药浓度约为 1 918 ng/ml(约 0.012 mmol/L)^[19]。诚然,体外实验所得结果并不能完全复制于体内研究之中。但体外试验结果仍有重要的临床意义^[20],这是由于:①临床中长期服用二甲双胍可能获得累积抑制效应;②组织中二甲双胍浓度远高于其血浆浓度;③肿瘤治疗中所需最大耐受剂量可能远高于糖尿病治疗剂量。

综上所述,本研究显示二甲双胍可抑制甲状腺癌的增殖,且具有时间和剂量依赖性;并可阻滞细胞周期进程,促进其凋亡。今后将进一步研究其作用机制,为甲状腺癌的治疗寻找新的作用靶点。

[参考文献]

[1] Paes JE, Hua K, Nagy R, et al. The relationship between body mass index and thyroid cancer pathology features and outcomes: a clinicopathological cohort study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(9):4244-4250

[2] Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, et al. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin [J]. *Diabetes Care*,

2006, 29(2):254-258

[3] Eszlinger M, Holzzapfel HP, Voigt C, et al. RGS 2 expression is regulated by TSH and inhibits TSH receptor signaling [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(3):383-390

[4] Tseng CH, Chong CK, Tai TY. Secular trend for mortality from breast cancer and the association between diabetes and breast cancer in Taiwan between 1995 and 2006 [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(2):240-246

[5] Tseng CH. Diabetes and risk of bladder cancer: a study using the National Health Insurance database in Taiwan [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(8):2009-2015

[6] Tseng CH. Diabetes and risk of prostate cancer: a study using the National Health Insurance [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(3):616-621

[7] Tseng CH. Diabetes and non-Hodgkin's lymphoma: analyses of prevalence and annual incidence in 2005 using the National Health Insurance database in Taiwan [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(1):153-158

[8] Rezzonico J, Rezzonico M, Pusiol E, et al. Introducing the thyroid gland as another victim of the insulin resistance syndrome [J]. *Thyroid*, 2008, 18(4):461-464

[9] Aschebrook-Kilfoy B, Sabra MM, Brenner A, et al. Diabetes and thyroid cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study [J]. *Thyroid*, 2011, 21(9):957-963

[10] Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, et al. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16 [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(2):322-326

[11] Rattan R, Ali Fehmi R, Munkarah A. Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis [J]. *J Oncol*, 2012, 2012:928127

[12] Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(9):1620-1625

[13] Tomic T, Botton T, Cerezo M, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2:e199

[14] Taubes G. Cancer prevention with a diabetes pill? [J]. *Science*, 2012, 335(6064):29

[15] Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy [J]. *Science*, 2011, 331(6016):456-461

[16] Liu B, Fan Z, Edgerton SM, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13):

- [15] 戴伟, 方申存, 刘平. 铁线莲皂苷对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及 NF- κ B 表达的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(8): 1074-1078
- [16] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(7): 489-501
- [17] Chakraborty A, Koldobskiy MA, Bello T, et al. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain [J]. Cell, 2010, 143(6): 897-910
- [18] Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer [J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3003
- [19] Shen Y, Wu XF, Tan NH, et al. Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1 - AKT interaction [J]. Toxicol App Pharm, 2013, 267: 95-103
- [20] Lemke LE, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, et al. Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol-3-kinase [J]. Cancer Chemoth Pharm, 1999, 44(6): 491-497
- [21] Hu L, Zaloudek C, Mills G B, et al. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002) [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(3): 880-886
- [22] Hu L, Hofmann J, Lu Y, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models [J]. Cancer Res, 2002, 62(4): 1087-1092
- [23] Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, et al. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(11): 1093-1103
- [24] Crul M, Rosing H, De Klerk GJ, et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(12): 1615-1621
- [25] 张超, 杨娜, 章雄文, 等. 靶向 PI3K-Akt-mTOR 信号通路抑制剂的研究进展 [J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(12): 1064-1070

[收稿日期] 2013-10-10

(上接第 445 页)
2031-2040

- [17] Wang LW, Li ZS, Zou DW, et al. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(47): 7192-7198
- [18] Frid A, Sterner GN, Londahl M, et al. Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function; clinical recommendations [J]. Diabetes Care, 2010, 33(6): 1291-1293
- [19] Graefe-Mody EU, Padula S, Ring A, et al. Evaluation of the potential for steady-state pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between the DPP-4 inhibitor linagliptin and metformin in healthy subjects [J]. Curr Med Res Opin, 2009, 25(8): 1963-1972
- [20] Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, et al. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines [J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 8-14

[收稿日期] 2013-11-22