

二甲双胍对人血清诱导的胰腺癌细胞增殖及 MMPs 表达的影响

王琛琛¹, 金 晖^{1*}, 施毕旻², 孙子林¹

(¹东南大学附属中大医院内分泌科, 江苏 南京 210009; ²苏州大学附属第一医院内分泌科, 江苏 苏州 215006)

[摘要] 目的:探讨二甲双胍对糖尿病患者血清诱导的胰腺癌细胞株 Patu8988 增殖的影响及相关基因表达的变化。方法:以糖尿病患者血清诱导细胞株 Patu8988 为糖尿病组,以健康人血清为对照组,用不同浓度的二甲双胍(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)干预两组细胞,通过 CCK-8 细胞增殖实验检测不同血清诱导后细胞的增殖能力,采用 RT-PCR 检测二甲双胍干预后基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-8 和 MMP-11 mRNA 表达的差异。结果:与健康对照组相比,糖尿病患者血清诱导后促进 Patu8988 细胞增殖(0.74 ± 0.03 vs. 0.62 ± 0.02 , $P<0.01$);二甲双胍抑制糖尿病患者血清诱导的细胞增殖($P<0.01$);RT-PCR 结果显示二甲双胍减弱 MMP-2、MMP-8、MMP-11 的 mRNA 表达。结论:二甲双胍抑制糖尿病患者血清诱导的细胞增殖,这种抑制效应可能与其对 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 表达的下调作用有关。

[关键词] 二甲双胍;糖尿病;胰腺肿瘤;增殖

[中图分类号] R735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)04-419-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170407

Effects of metformin on proliferation and expression of MMPs of cancer cells treated by human diabetic serum

Wang Chenchen¹, Jin Hui^{1*}, Shi Bimin², Sun Zilin¹

(¹Department of Endocrinology, Zhongda Hospital, Medical School, Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effects of metformin on proliferation and related gene expression of human pancreatic cancer cell line Patu8988 treated by diabetic serum. **Methods:** Patu8988 cells were cultured with diabetic serum, or healthy human serum as control. The two groups were treated with different concentrations of metformin (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, and 40.0 mmol/L). The proliferation was measured by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and matrix metalloproteinase-11 (MMP-11) were examined by real-time PCR. **Results:** Compared with the control group, the proliferation of Patu8988 was promoted after treatment with diabetic serum (0.74 ± 0.03 vs. 0.62 ± 0.02 , $P<0.01$); Metformin inhibited the proliferation of Patu8988 treated with diabetic serum ($P<0.01$), and the expressions of MMP-2, MMP-8 and MMP-11 were downregulated. **Conclusion:** Metformin inhibits the proliferation of cancer cells induced by the serum from patients with diabetes, which may be related to the down regulation of MMP-2, MMP-8, and MMP-11.

[Key words] metformin; diabetes mellitus; pancreatic neoplasms; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(04):419-422]

大量流行病学研究提示糖尿病与恶性肿瘤的发生发展密切相关,糖尿病患者结直肠癌、乳腺癌和子宫内膜癌等的死亡风险比非糖尿病患者显著增加。这可能归咎于糖尿病患者高胰岛素血症、超标的胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF-1)、

细胞免疫调节功能紊乱、T 淋巴细胞比例失调、糖基化终产物等^[1-2]。糖尿病患者血清中的多种成分与肿瘤的发生、发展关系密切。二甲双胍是临床上治疗糖尿病的一线药物,同时二甲双胍还可以降低多种肿瘤的发病率,如乳腺癌、胰腺癌、大肠癌、肝癌、泌尿系肿瘤以及女性生殖系统肿瘤等^[3-4]。

[基金项目] 国家高技术发展计划(863 计划)(2015AA020314)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jinhuison@126.com

基质金属蛋白酶(MMPs)是一类具有 Zn²⁺依赖性的内源性蛋白水解酶,通过破坏肿瘤周围基质降

解平衡而促进癌细胞突破基底膜和细胞外基质的组织学屏障,促进肿瘤转移,是反映肿瘤细胞迁移和侵袭的经典指标。Xiao等^[5]发现MMP-8可以促进血管平滑肌细胞的增殖,但是关于MMPs和肿瘤细胞增殖相关性的研究很少,值得深入探讨。本研究旨在观察糖尿病患者血清对胰腺癌细胞增殖的影响,同时检测二甲双胍干预后患者血清诱导的细胞增殖及MMP-2、MMP-8、MMP-11mRNA表达的变化,进一步探讨二甲双胍在糖尿病合并肿瘤患者治疗中的重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺癌细胞株 Patu8988 由上海第六人民医院实验室赠送,细胞培养于含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,培养条件为 37℃、5%CO₂、饱和湿度、每隔 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。

二甲双胍 (Sigma 公司, 美国), DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国), 小牛血清 (Hyclone 公司, 美国); CCK-8 试剂盒 (Dojindo 公司, 日本), TRIzol 抽提液 (Invitrogen 公司, 美国), RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本), PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 血清制备

选取门诊及住院确诊的 2 型糖尿病患者 20 例, 诊断均符合 1999 年世界卫生组织 (WHO) 糖尿病诊断和分型标准, 其中男 13 例, 女 7 例, 平均年龄 (54.6±6.2) 岁。平均随机血糖 (16.4±7.3) mmol/L, 空腹血糖 (8.7±3.9) mmol/L, 餐后 2 h 血糖 (14.8±6.8) mmol/L。随机选取健康志愿者 20 例作为对照组, 男 9 例, 女 11 例, 平均年龄 (49.5±8.1) 岁。平均随机血糖 (5.1±2.4) mmol/L, 空腹血糖 (3.7±1.5) mmol/L, 餐后 2 h 血糖 (5.2±3.6) mmol/L。排除标准: ①急性感染性疾病; ②糖尿病肾病、高脂血症、结缔组织病、自身免疫性疾病等其他慢性疾病; ③肿瘤、心脑血管意外、使用二甲双胍、胰岛素等对研究有影响的药物等。糖尿病患者和健康志愿者空腹取血, 采用分离胶的真空采集管收集受试者的血液标本, 以 2 000 r/min、4℃ 离心 15 min。取上层血清分装于无菌 EP 管中, 56℃ 灭活 30 min, -20℃ 冻存、备用。

1.2.2 糖尿病患者血清诱导 Patu8988 细胞

取对数生长期的 Patu8988 细胞, 以 5×10^3 个/孔

的密度接种于 96 孔板进行分组干预, 组别为采用健康人血清处理的健康对照组和糖尿病患者血清处理的糖尿病患者组, 其中健康人血清、糖尿病患者血清分别占总体积的 10%, 每个样本 3 个复孔。培养 72 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μ L/孔继续孵育 1 h, 酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度值。

1.2.3 二甲双胍干预人血清诱导的 Patu8988 细胞

细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 以不同浓度的二甲双胍 (药物浓度分别为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L) 干预健康对照组和糖尿病患者组的 Patu8988 细胞, 以无药物为对照, 每组 3 个复孔, 培养 72 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μ L/孔继续孵育 1 h, 酶标仪 450 nm 波长处读取吸光度值。

1.2.4 RT-PCR 检测糖尿病患者血清诱导后 MMP-2、MMP-8、MMP-11mRNA 的表达

细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 以不同浓度的二甲双胍 (药物浓度分别为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L) 干预糖尿病患者血清诱导的胰腺癌细胞 72 h 后, TRIzol 法抽提各组细胞总 RNA, 以 β -actin 为内参, 按试剂盒说明进行 RT-PCR。引物序列: MMP2A: 5'-GAATGAATACTGGATCTACTCA-3', MMP2B: 5'-TTGTCTCCAGCAAAGATGTATGTC-3'; MMP8A: 5'-GAAGTAGAACCCCTTGCTAAGGAC-3', MMP8B: 5'-GAAGTAAAGAACTGACGAACATCAG-3'; MMP11A: 5'-CTGGAGTGTCTTGCTGTATCC-3', MMP11B: 5'-GCACCTACCAAGACCTGACCTC-3'; 扩增产物电泳后在凝胶成像系统下拍照, 测定各电泳条带光密度值, 计算每组 MMP/ β -actin。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间实验结果比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验或 Dunnett's *t* 检验 (方差不齐时)。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

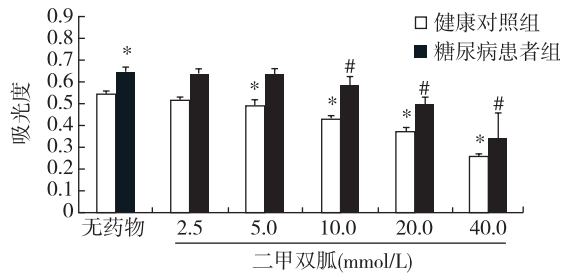
2.1 糖尿病患者血清对 Patu8988 细胞增殖的影响

与健康对照组相比, 糖尿病患者血清促进 Patu8988 细胞增殖 (0.74±0.03 vs. 0.62±0.02, $t = -11.665$, $P < 0.01$, 图 1)。

2.2 二甲双胍对糖尿病患者血清诱导 Patu8988 细胞增殖的影响

与无药物对照相比, 糖尿病患者组在二甲双胍浓度 2.5 mmol/L 时开始抑制细胞增殖, 至 10.0 mmol/L

时差异有统计学意义,至 40.0 mmol/L 时抑制作用尤为显著(0.39 ± 0.14 vs 0.74 ± 0.03 , $t=25.799$, $P<0.01$);健康对照组在二甲双胍浓度 2.5 mmol/L 时开始出现抑制趋势,至 5.0 mmol/L 时差异有统计学意义,至 40.0 mmol/L 时抑制作用尤为显著(0.29 ± 0.03 vs 0.62 ± 0.02 , $t=27.612$, $P<0.01$,图 1)。



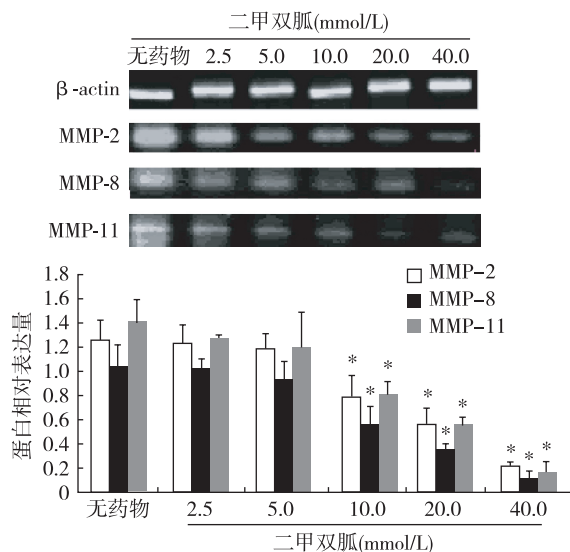
与健康对照组无药物相比,* $P<0.01$;与糖尿病患者组无药物相比,* $P<0.01$ 。

图 1 不同浓度二甲双胍对 Patu8988 细胞增殖的影响

Figure 1 Effect of metformin with different concentrations on proliferation of Patu8988 cells

2.3 二甲双胍对 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 表达的影响

糖尿病患者血清干预后,与无药物对照相比,二甲双胍减弱 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 表达,随着药物浓度逐渐增加,mRNA 表达进一步减弱,二甲双胍浓度 10.0 mmol/L 时差异有统计学意义,药物浓度 40.0 mmol/L 时表达最弱(图 2)。



与相应的无药物组比较,* $P<0.01$ 。

图 2 不同浓度二甲双胍对 MMP-2、MMP-8、MMP-11 的 RNA 表达的影响

Figure 2 Effect of metformin with different concentrations on the expression of MMP-2, MMP-8, and MMP-11 of cancer cells

3 讨论

MMPs 通过促进生长因子分泌、诱导肿瘤细胞耐受凋亡、新生血管形成、创造出适应肿瘤细胞生长的微环境等方式,参与肿瘤细胞增殖、黏附、迁移、分化、血管生成、衰老、细胞自噬、细胞凋亡和免疫系统的逃避等癌症的所有发展阶段^[6]。研究发现 MMP-2 的表达越高,肿瘤复发的可能性越大,MMP-2 的表达与肿瘤转移密切相关,并且始终与患者的生存期呈负相关^[7]。Xiao 等^[5]发现 MMP-8 可以促进血管平滑肌细胞的增殖。MMP-11 的作用机制可能与细胞凋亡有关,且与 SP1 位点及 ERK1/2-有丝分裂原活化激酶(mitogen activated proteinkinase, MAPK)信号通路有关^[8]。有研究发现,MMP-11 通过改变基质环境而创造有利于肿瘤细胞生存的环境,影响肿瘤的进展^[9]。因此,MMPs 对肿瘤的影响不仅仅限于促进转移。

二甲双胍为双胍类口服降糖药物,是美国糖尿病学会和欧洲糖尿病研究协会共识推荐的糖尿病一线治疗的最佳选择。近年研究发现,二甲双胍除了调节糖代谢外,同时还能抑制恶性肿瘤细胞的增殖、分化、转移,降低糖尿病人群肿瘤性疾病的发病率^[10],Lee 等^[11]通过 41 个月的随访观察发现,合并 T2DM 的结直肠癌患者,术后口服二甲双胍较其他降糖方案病死率降低。国外研究发现,二甲双胍能抑制 Her-2 阳性乳腺癌细胞的增殖、转移,促进其凋亡^[12]。对于二甲双胍抑制肿瘤的机制有多种假说。研究显示二甲双胍可以抑制黑色素瘤的侵袭,抑制 MMP-2 的表达,起到抗肿瘤作用^[13-14]。二甲双胍可通过抑制 MMP-9 的活性抑制肿瘤细胞增殖^[15]。还有研究表明,二甲双胍可通过激活腺苷活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin, AMPK/ mTOR)信号通路降低 MMPs 表达,从而抑制纤维肉瘤、黑色素瘤、子宫内膜癌等恶性程度极高的肿瘤细胞转移^[16-17]。

本研究运用 CCK-8 法分别检测了人胰腺癌细胞株 Patu8988 在糖尿病患者血清和健康人血清作用后的增殖情况,结果表明糖尿病患者血清可显著促进 Patu8988 细胞增殖。这一方面证实了糖尿病患者血清中的多种成分异常有关,具体还有待进一步研究。本研究发现在二甲双胍干预后,糖尿病患者血清诱导的高增殖状态可以被抑制。MMPs 表达促进肿瘤转移,然而其与肿瘤细胞增殖相关性的研

究甚少,因此本研究为进一步探讨肿瘤细胞 Patu8988 增殖抑制与 MMPs 的关系,检测了二甲双胍干预前后 Patu8988 细胞中 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 表达的变化,结果显示二甲双胍显著下调 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 的表达,与二甲双胍的药物浓度呈正相关,并观察到这种下调与二甲双胍对肿瘤细胞增殖的抑制是一致的。这些结果说明二甲双胍可能通过诱导肿瘤细胞内 MMPs 基因的转录下调,发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。在后续研究中,将增大各组的样本含量,并予 MMPs 的特异性组织抑制因子——基质金属蛋白酶抑制物 (TIMPs) 阻断 MMPs 的表达,以进一步确认二甲双胍抑制糖尿病患者血清诱导的细胞增殖与其对 MMP-2、MMP-8、MMP-11 mRNA 表达下调的相关性。

恶性肿瘤的治疗是目前医学界的一大难题,因此迫切需要新的策略延缓肿瘤的进展并改善肿瘤患者的生存率,进一步研究二甲双胍对肿瘤细胞内 MMPs 基因的调控将为肿瘤生物学和肿瘤治疗提供一个极有希望的发展方向。

参考文献

- [1] Kong AP, Chan JC. Cancer risk in type 2 diabetes[J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(4):325-328
- [2] Yang X, So WY, Ma RC, et al. Diabetes and cancer: the mechanistic implications of epidemiological analyses from the Hong Kong Diabetes Registry[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(5):379-387
- [3] Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, et al. Metformin in cancer: translational challenges [J]. *J Mol Endocrinol*, 2012, 48(3):R31-R43
- [4] Tseng CH. Diabetes, metformin use, and colon cancer: a population-based cohort study in Taiwan[J]. *Eur J Endocrinol*, 2012, 167(3):409-416
- [5] Xiao Q, Zhang F, Grassia G, et al. Matrix metalloproteinase-8 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(1):90-98
- [6] Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis [J]. *Cancer and Metastasis Rev*, 2006, 25(1):9-34
- [7] Hung WC, Tseng WL, Shiea J, et al. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 288(2):156-161
- [8] Barrasa J, Olmo N, Santiagoga MA, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate MMP11 gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2):570-581
- [9] Motrescu ER, Rio MC. A vicious tumor progression cycle [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(8):1037-1041
- [10] Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, et al. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent [J]. *Cancer Treat Res*, 2014, 159(期缺失):355-376
- [11] Lee JH, Kim TI, Jeon SM, et al. The effects of metformin on the survival of colorectal cancer patients with diabetes mellitus [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(3):752-759
- [12] Chen TW, Liang YN, Feng D, et al. Metformin inhibits proliferation and promotes apoptosis of HER2 positive breast cancer cells by downregulating HSP90 [J]. *J BUON*, 2013, 18(1):51-56
- [13] Cerezo M, Tichet M, Abbe P, et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(8):1605-1615
- [14] Esfahanian N, Shakiba Y, Nikbin B, et al. Effect of metformin on the proliferation, migration, and MMP-2 and -9 expression of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4):1068-1074
- [15] Safari Z, Safaralizadeh R, Seyedzadeh MH, et al. The induction of metformin inhibitory effects on tumor cell growth in hypoxic condition [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2015, 14(6):605-614
- [16] Tan BK, Adya R, Chen J, et al. Metformin treatment exerts antiinvasive and antimetastatic effects in human endometrial carcinoma cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(3):808-816
- [17] Hwang YP, Jeong HG. Metformin blocks migration and invasion of tumour cells by inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation through a Calcium and protein kinase Calpha-dependent pathway: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced/extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(5):1195-1211

[收稿日期] 2016-06-12