

二甲双胍对甲状腺未分化癌侵袭转移的影响及机制研究

张丽娟¹, 郑文亭^{1,2}, 兰玲³, 钱玮¹, 杨雪阳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江苏省老年医院内科, 江苏 南京 210024; ³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侵袭转移能力的影响, 初步探讨其作用机制。方法: 以不同浓度的二甲双胍处理甲状腺未分化癌细胞株 SW1736, 分别通过琼脂滴法及 Transwell 侵袭迁移实验, 对比观察二甲双胍组与对照组 SW1736 细胞的侵袭转移能力, real-time PCR 方法检测细胞中与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程密切相关的分子, 包括波形蛋白(vimentin)、E-钙黏素(E-cadherin)、转录因子 Snail1 及 Slug mRNA 表达变化。结果: 琼脂滴法及 Transwell 侵袭迁移实验均发现二甲双胍可降低 SW1736 细胞体外侵袭迁移能力, 且随二甲双胍浓度的增高, 其抑制作用增强; 二甲双胍可显著下调甲状腺未分化癌细胞中 vimentin 及转录因子 Slug 和 Snail1 表达, 促进上皮细胞表型 E-cadherin 表达。结论: 二甲双胍可通过下调 Snail1 和 Slug 的表达促进 E-cadherin 的表达, 从而抑制 EMT 过程, 降低甲状腺癌细胞侵袭迁移能力, 为甲状腺癌的治疗提供新思路。

[关键词] 二甲双胍; 甲状腺未分化癌; 侵袭; 转移; 上皮间质转化

[中图分类号] R736.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-0554-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170507

The study on the effect of metformin on invasion and metastasis of undifferentiated thyroid cancer and its underlying mechanisms

Zhang Lijuan¹, Jia Wenting^{1,2}, Lan Ling³, Qian Wei¹, Yang Xueyang¹, Xu Kuanfeng¹, Cui Dai^{1*}

(¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Internal Medicine, Jiangsu Province Geriatric Hospital, Nanjing 210024; ³Department of Endocrinology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of metformin on the invasion and metastasis of undifferentiated thyroid cancer and to evaluate its underlying mechanisms. **Methods:** The undifferentiated thyroid cancer cell line SW1736 was treated with different concentrations of metformin. The invasive and metastatic abilities of SW1736 cells were measured by agar drop method and Transwell invasion and migration assay. Real-time PCR was used to detect the molecules mRNA involved in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), including vimentin, E-cadherin and transcription factors Snail1 and Slug. **Results:** Metformin inhibited the invasive and migration capacities of SW1736 cells in vitro. The inhibitory effects of metformin were dose dependent. Metformin significantly down-regulated the expressions of vimentin, Slug and Snail1 in SW1736 cells. Meanwhile, it stimulated the expression of E-cadherin, which highly expresses in epithelial cells. **Conclusion:** Metformin can promote the expression of E-cadherin by down-regulating the expression of Snail1 and Slug, thus inhibiting the process of EMT and decreasing the invasive and migration ability of thyroid carcinoma, which may provide a novel strategy for the treatment of thyroid neoplasms.

[Key words] metformin; undifferentiated thyroid cancer; invasion; metastasis; epithelial-mesenchymal transition

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):554-558]

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSN-023)

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

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤。近 30 年其发病率呈持续上升趋势^[1]。部分甲状腺癌尤其是未分化癌患者, 早期可出现远处转移, 对放射碘治疗不敏感, 预后极差。二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的一线药物, 近来研究发现二甲双胍具有抗肿瘤作用, 我们前期研究亦证实二甲双胍可抑制甲状腺未分化癌细胞株的增殖、促进其凋亡^[2]。

侵袭转移是恶性肿瘤的特性之一, 上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤侵袭转移的关键之处。在甲状腺癌细胞中发现 EMT 过程的关键要素之一上皮细胞表型 E-cadherin 表达下调^[3], 且 E-cadherin 的表达降低与甲状腺癌的不良预后和淋巴结转移的风险呈正相关^[4-5]。因此, 本研究旨在观察二甲双胍对甲状腺未分化癌侵袭转移能力及 EMT 过程的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

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。人非必需氨基酸、胎牛血清、DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国); 二甲双胍(metformin, Sigma-Aldrich 公司, 美国); 琼脂糖(Biowest 公司, 西班牙); Matrigel、多聚甲醛(Sigma 公司, 美国); Transwell 小室(BD 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人甲状腺未分化癌细胞株 SW1736 贴壁生长于含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、100 U/mL 青霉素、100 ng/mL 链霉素的 DMEM 完全培养液中。

1.2.2 琼脂滴法检测细胞迁移能力

取对数生长期细胞胰酶消化离心, 收集约 1×10^7 个细胞, 加入 100 μL 无血清 DMEM 培养液重悬, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$; 然后加入 16.7 μL 2% 琼脂糖溶液, 混匀制成 0.3% 琼脂糖肿瘤细胞悬液, 取 1.5 μL 悬液加入 24 孔培养板中, 每孔 3~4 滴, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 20 min 使其凝固, 在倒置相差显微镜下测量琼脂糖滴的半径(r)为基数, 加入含不同浓度二甲双胍的 DMEM 完全培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 和 48 h 后, 测定琼脂糖肿瘤细胞滴 8 个方位的半径值, 计算均值(r'), 以 $r'-r$ 评价细胞迁移的能力。每浓度组计数 5 个琼脂滴, 实验至少重复 3 次。

1.2.3 Transwell 侵袭迁移实验

进行迁移实验时, 将 Transwell 小室置入 24 孔培养板中, 在上室中加入以无血清二甲双胍培养液

调整细胞密度至 $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL 的细胞悬液 100 μL , 在下室中加入含 10% FBS 的不同浓度二甲双胍培养液 600 μL ; 检查上室底部与下室接触液面间没有气泡后, 将 24 孔培养板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养; 观察各组细胞的迁移情况, 24 h 后终止实验。将小室从培养箱中取出, 以无菌棉棒轻轻揩去上室残留细胞, 4% 的多聚甲醛固定, 室温放置 15 min; PBS 洗去固定液, 0.1% 结晶紫染色 20 min; 然后 PBS 冲洗 3 次, 将小室倒置、风干, 观察拍照。于 200 倍的显微镜下随机计数 5 个视野内的细胞数, 计算平均值进行统计学分析。实验重复 3 次。

进行 Transwell 侵袭实验时, 首先将液态的 BD Matrigel 以 1:8 用无血清培养基稀释。把 Transwell 小室小心置入 24 孔培养板中, 在小室上层均匀铺 50 μL 稀释的 Matrigel, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育过夜。细胞撤血清饥饿培养 12~24 h, 以无血清培养液重悬; 细胞计数后以不同浓度无血清二甲双胍培养液调整细胞密度至 $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL 后种入 Transwell 上室, 余步骤同迁移试验。

1.2.4 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测甲状腺肿瘤细胞 vimentin、E-cadherin、Slug、Snail1 mRNA 表达变化

不同浓度二甲双胍培养细胞 48 h 后, 常规方法抽提、定量细胞 RNA, 采用实时定量 PCR 的方法测定各组甲状腺癌细胞 EMT 相关分子的表达。PCR 引物设计由上海英潍捷基生物技术有限公司完成, 各引物序列见表 1。具体扩增体系如下: 10 μL SYBR Premix Ex TaqTM(2 \times), 0.4 μL 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.4 μL 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 模板 DNA、19 μL 无核酸酶的水, 总体积 20 μL 。PCR 反应采用以下步骤: 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 进行 40 个循环。数据的计算应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。 $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{实验组}}} - \Delta C_{t_{\text{对照组}}}$, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示各组样本目的基因的相对表达量。实验至少重复 3 次。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS18.0 统计软件 ONE-WAY ANOVA 方法进行统计学分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍降低 SW1736 细胞体外侵袭迁移能力

2.1.1 琼脂滴法检测 SW1736 细胞体外迁移能力

加入不同浓度二甲双胍培养 24 h 和 48 h 后 SW1736 细胞向琼脂滴边迁移的距离均较对照组明

表 1 实时定量 PCR 中引物序列
Table 1 Primer sequences in real-time quantitative PCR

基因		引物序列(5'→3')	长度(bp)	GenBank 号
vimentin	Forward	CCGAAAACACCCCTGCAATCTTTC	179	NM_003380.3
	Reverse	CACATCGATTITGGACATGCTGT		
E-cadherin	Forward	TTGAAAGAGAAACAGGATGGCTG	151	NM_004360.3
	Reverse	TCATTCTGATCGGTTACCGTGAT		
Snail1	Forward	CCAATCGGAAGCCTAACTACAG	155	NM_005985.3
	Reverse	GACAGAGTCCCAGATGAGCATT		
Slug	Forward	ACAGCGAACTGGACACACATAAC	182	NM_003068.4
	Reverse	GTATCCGGAAAAGAGGAGAGAGG		
β-actin	Forward	CGTCCACCGCAAATGCTT	83	NM_001101.3
	Reverse	GTTTCTGCGCAAGTTAGGTTTTGT		

显缩短,差异有统计学意义;且高浓度二甲双胍组较低浓度组缩短明显,二者亦有统计学差异(图 1)。

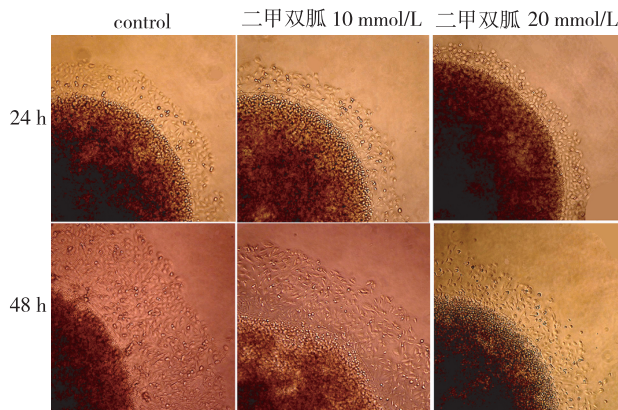


图 1 琼脂滴法检测二甲双胍对 SW1736 细胞迁移能力的影响(×100)

Figure 1 The effect of metformin on migration ability of SW1736 cells detected by agar drop method(×100)

2.1.2 Transwell 小室侵袭迁移实验检测 SW1736 细胞体外侵袭迁移能力

在迁移实验中不同浓度二甲双胍处理的 SW1736 细胞较对照组迁移至下室的细胞数减少,对照组、10 mmol/L 和 20 mmol/L 二甲双胍组每高倍镜视野下(×200)平均迁移小室细胞数分别为:(317±42)个、(227±27)个和(177±30)个(图 2)。且 20 mmol/L 组较 10 mmol/L 组迁移细胞数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在侵袭实验中不同浓度二甲双胍处理的 SW1736 细胞较对照组穿透经 Matrigel 预处理的 Transwell 小室的细胞数减少,对照组、10 mmol/L 和 20 mmol/L 二甲双胍组每高倍镜视野下(×200)平均穿透小室细胞数分别为:(476±68)个、(364±37)个和(251±61)个(图 2)。且 20 mmol/L 组较 10 mmol/L 组穿

透细胞数明显减少,二者有统计学差异($P < 0.01$)。

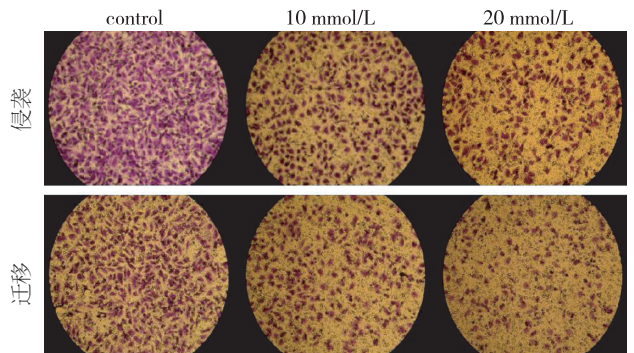


图 2 Transwell 小室侵袭迁移实验检测二甲双胍对 SW1736 细胞体外侵袭迁移能力的影响(×200)

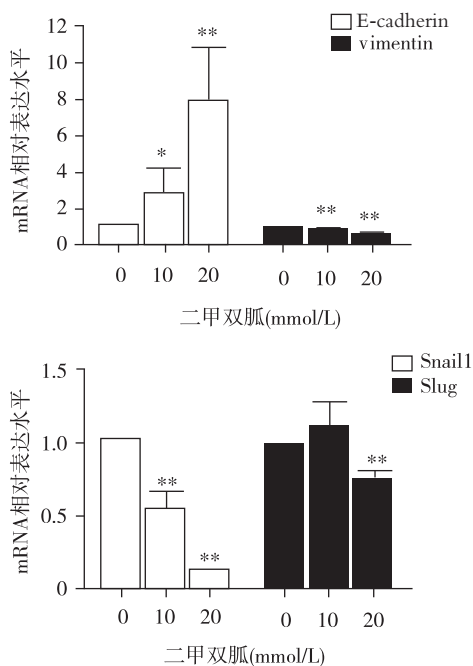
Figure 2 The influence of metformin on invasion and migration ability of SW1736 cells was evaluated by transwell migration assay(×200)

2.2 SW1736 细胞 vimentin、E-cadherin、Snail1 和 Slug mRNA 表达变化

SW1736 细胞加入不同浓度二甲双胍培养 48 h 后,实时定量 PCR 检测 EMT 相关分子 vimentin、E-cadherin、Snail1 和 Slug mRNA 表达情况。结果如图 3 所示,10 mmol/L 组和 20 mmol/L 组 E-cadherin mRNA 表达量分别为对照组(2.82±1.44)和(7.81±3.00)倍;vimentin mRNA 表达量分别为对照组的(0.88±0.02)和(0.59±0.01)倍;Snail1 mRNA 表达量分别为对照组的(0.56±0.11)和(0.13±0.00)倍;Slug mRNA 表达量分别为对照组的(1.12±0.14)和(0.75±0.05)倍,差异有统计学意义。

3 讨论

甲状腺癌是内分泌系统常见肿瘤,其中甲状腺



与 0 mmol/L 对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 二甲双胍对 SW1736 细胞 EMT 相关分子 mRNA 表达的影响

Figure 3 The effect of metformin on mRNA expression of EMT-related molecules in SW1736 cells

未分化癌病情发展迅猛, 确诊时多已侵犯周围组织或器官^[6], 且对甲状腺激素抑制治疗及放射性碘-131 治疗不敏感, 生存率极低, 因此对其治疗是临床难点。

二甲双胍是常用的口服降糖药物, 近年来其抗肿瘤作用日益受到关注, 众多研究表明二甲双胍可抑制多种肿瘤如消化道肿瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌等的发生发展^[7-15]。近来研究发现二甲双胍对肿瘤的侵袭转移亦有抑制作用, 但二甲双胍对甲状腺癌侵袭转移的影响研究较少, 本研究发现经二甲双胍处理后甲状腺未分化癌细胞 SW1736 的侵袭转移能力明显降低, 且呈时间-剂量依赖性, Han 等^[16]在甲状腺癌 SW579 和 TT 细胞中亦观察到类似现象。

二甲双胍抑制肿瘤发生发展的具体机制尚未明确, 目前较公认的是二甲双胍可通过激活 AMPK/mTOR 信号途径发挥其抗肿瘤作用^[16-17], 但二甲双胍如何抑制肿瘤侵袭转移的研究较少, 目前研究发现 EMT 过程与肿瘤的侵袭转移密切相关, 当肿瘤细胞发生 EMT 时, 上皮细胞极性丧失, 细胞松散, 黏附能力下降, 失去与基底膜的连接, 细胞形态变为梭形的间质细胞, 并伴有 EMT 相关信号分子表达变化,

如 E-cadherin 表达下调及 vimentin 表达上调。Vazquez-Martin 等^[18]发现在高侵袭性乳腺癌细胞中, 二甲双胍可抑制 TGF- β 信号通路诱导的 EMT 过程, 表现为 TGF- β 介导的 E-cadherin 下调与 vimentin 上调作用被抑制。Nakayama 等^[19]的研究表明二甲双胍可通过抑制 TGF- β -Smad 磷酸化途径和部分非 Smad 途径抑制电离辐射诱导的食管癌鳞状细胞 EMT。本研究发现经二甲双胍作用后, 在 SW1736 细胞中, 间质细胞表型 vimentin mRNA 及转录因子 Snail1、Slug 表达降低, 上皮细胞表型 E-cadherin mRNA 表达增加, 从而抑制 SW1736 细胞中 EMT 激活。在 Han 等^[16]研究中发现二甲双胍可以上调上皮标记 E-cadherin 和下调间充质标记 N-cadherin 和 Snail, 通过调节 EMT 抑制甲状腺癌的进展和转移^[16], 这与我们的研究结果一致。因此, 二甲双胍可抑制 SW1736 细胞中上皮间质转化过程, 且这一抑制作用可能与降低转录因子 Snail1 和 Slug 表达有关。

本研究仅在体外水平观察二甲双胍对甲状腺未分化癌侵袭转移的影响, 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, 根据美国食品和药物管理局研究报告显示, 非糖尿病的健康受试者每日服用 2 550 mg 二甲双胍, 其血药浓度峰值约为 0.012 mmol/L^[20]。尽管体外实验结果不能完全推广至体内研究中, 但亦有文献报道在临床中长期服用二甲双胍可获得累积效应, Wilcock 等^[21]的研究证明二甲双胍在组织中积累的浓度比在血液中高几倍, 而且临床肿瘤治疗中可能需要更高耐受量的二甲双胍。

综上所述, 二甲双胍可通过下调 Snail1、Slug、N-cadherin、vimentin, 上调 E-cadherin 的表达抑制 EMT 过程, 进而降低甲状腺肿瘤细胞侵袭转移能力, 但二甲双胍抑制肿瘤 EMT 的完整过程尚未明确, Juliana 等^[22]在甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞中发现 AMPK 通路被激活后细胞中与 EMT 相关的分子如 vimentin、TCF/Zeb1、N-cadherin 表达降低, 这提示肿瘤的 EMT 过程与 AMPK 的激活相关, 而二甲双胍可直接或间接激活 AMPK, 今后我们将进一步探究二甲双胍抑制甲状腺未分化侵袭转移的完整机制, 为甲状腺肿瘤的治疗探索新的治疗方案。

[参考文献]

[1] Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on

- epidemiology and risk factors [J]. *J Cancer Epidemiol*, 2013,2013:965212
- [2] 郑文亭, 兰玲, 崔岱, 等. 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[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(4):442-451
- [3] Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, et al. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(20):4987-4993
- [4] Naito A, Iwase H, Kuzushima T, et al. Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms[J]. *J Surg Oncol*, 2001, 76(3):176-180
- [5] Fluge O, Bruland O, Akslen LA, et al. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas [J]. *Thyroid*, 2006, 16(2):161-175
- [6] 张宗敏, 徐震纲, 唐平章, 等. 重新认识甲状腺未分化癌[J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28(3):323-324
- [7] Garrett CR, Hassabo HM, Bhadkamkar NA, et al. Survival advantage observed with the use of metformin in patients with type II diabetes and colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(8):1374-1378
- [8] Chlebowski RT, McTiernan A, Wactawski-Wende J, et al. Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(23):2844-2852
- [9] Nevadunsky NS, van Arsdale A, Strickler HD, et al. Metformin use and endometrial cancer survival [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(1):236-240
- [10] Patel T, Hruby G, Badani K, et al. Clinical outcomes after radical prostatectomy in diabetic patients treated with metformin[J]. *Urology*, 2010, 76(5):1240-1244
- [11] Han D, Li SJ, Zhu Y, et al. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in non-small-cell lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(7):4033-4039
- [12] Green AS, Chapuis N, Maciel TT, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation[J]. *Blood*, 2010, 116(20):4262-4273
- [13] Chaudhary SC, Kurundkar D, Elmets CA, et al. Metformin, an antidiabetic agent reduces growth of cutaneous squamous cell carcinoma by targeting mTOR signaling pathway [J]. *Photochem Photobiol*, 2012, 88 (5):1149-1156
- [14] Wang Z, Lai ST, Xie L, et al. Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 106(1):19-26
- [15] Skinner HD, McCurdy MR, Echeverria AE, et al. Metformin use and improved response to therapy in esophageal adenocarcinoma[J]. *Acta Oncol*, 2013, 52(5):1002-1009
- [16] Han BY, Cui HZ, Kang L, et al. Metformin inhibits thyroid cancer cell growth, migration, and EMT through the mTOR pathway[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(8):6295-6304
- [17] Chen GF, Xu SH, Renko K, et al. Metformin inhibits growth of thyroid carcinoma cells, suppresses self-renewal of derived cancer stem cells, and potentiates the effect of chemotherapeutic agents[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(4):E510-20
- [18] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Cuff S, et al. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition(EMT)status [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(18):3807-3814
- [19] Nakayama A, Ninomiya I, Harada S, et al. Metformin inhibits the radiation-induced invasive phenotype of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5):1890-1898
- [20] Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3003-3006
- [21] Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse [J]. *Xenobiotica*, 1994, 24(1):49-57
- [22] Juliana M, Raquel G, Fabio H, et al. 5'-AMP-activated protein kinase regulates papillary (TPC-I and BCPAP) thyroid cancer cell survival, migration, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Thyroid*, 2016, 26(7):933-942

[收稿日期] 2017-01-07

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。