

· 肿瘤学研究 ·

二甲双胍联合培美曲塞对人肺腺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响

谢寒丹, 刘 单, 邓述恺*

西南医科大学第一附属医院呼吸内科, 四川 泸州 646000

[摘要] 目的: 研究二甲双胍(metformin, Met)联合培美曲塞(pemetrexed, Pem)对人肺腺癌 A549 细胞株的增殖及凋亡的影响。方法: 不同浓度 Met(0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)、Pem(0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$) 48 h 下处理 A549 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖率并确定 Met 及 Pem 的半抑制浓度(IC_{50}); Met(IC_{50})及 Pem(IC_{50}) 单用或联用, 不同时间(24、36、48 h)下处理 A549 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖率; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Mcl-1、Noxa 蛋白表达。结果: ①不同浓度 Met 及 Pem 对 A549 细胞均有增殖抑制作用, 呈剂量依赖性($P < 0.05$); ②Met+Pem 组作用 A549 细胞增殖抑制率优于单药组($P < 0.05$), 呈时间依赖性($P < 0.05$); ③Met+Pem 组作用 A549 细胞的凋亡率($30.6 \pm 0.4\%$) 优于 Met 组凋亡率($13.3 \pm 0.3\%$) 和 Pem 组凋亡率($12.9 \pm 0.1\%$) ($P < 0.05$); ④与单药组相比, Met+Pem 组明显下调 Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达, 上调 Bax、Noxa 蛋白表达($P < 0.05$)。结论: Met 联合 Pem 可抑制 A549 细胞增殖、诱导凋亡, 其效果优于单药, 机制可能与下调 Bcl-2、Mcl-1 蛋白, 上调 Bax、Noxa 蛋白的表达有关。

[关键词] 二甲双胍; 培美曲塞; A549; Bcl-2; Bax; Mcl-1; Noxa**[中图分类号]** R734.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)08-1188-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190817

Effects of metformin combined with pemetrexed on proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells

Xie Handan, Liu Dan, Deng Shukai*

Department of Respiration, First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of metformin combined pemetrexed on proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods:** The A549 cells were treated with different doses of metformin (0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mmol/L) and pemetrexed (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, CCK8 assay to assess the antiproliferative of the differently treated A549 cell lines and detect the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of metformin and pemetrexed; The A549 cells were treated with metformin at IC_{50} , pemetrexed at IC_{50} , and metformin combined pemetrexed to assess the antiproliferative of the differently treated A549 cell lines by the CCK8 assay; The apoptosis of A549 cells was detected by the flow cytometry; The protein expressions of Bcl-2, Bax, Mcl-1 and Noxa were detected by Western blot. **Results:** The proliferation of A549 cells was inhibited by metformin and pemetrexed monotherapy in a dose-dependent manner compared with the control groups ($P < 0.05$); The combination of metformin and pemetrexed induced higher percentage of cell proliferation than that of metformin and pemetrexed used alone ($P < 0.05$) in a time-dependent manner ($P < 0.05$); Apoptosis rate of metformin combining pemetrexed [$(30.6 \pm 0.4)\%$] was significantly higher than that of metformin [$(13.3 \pm 0.3)\%$] and pemetrexed [$(12.9 \pm 0.1)\%$] group, respectively ($P < 0.05$), The combination of metformin and pemetrexed down regulated the protein expression of Bcl-2 and Mcl-1, up-regulated the protein expression of Bax and Noxa compared with metformin and pemetrexed monotherapy. **Conclusion:** metformin combined with pemetrexed can inhibit *in vitro* human lung adenocarcinoma A549 cells proliferation and apoptosis, the mechanism may be connected with down-regulation of Bcl-2 and Mcl-1, up-regulation of Bax and Noxa expression.

[Key words] metformin; pemetrexed; A549; Bcl-2; Bax; Mcl-1; Noxa

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08): 1188-1192]

[基金项目] 西南医科大学校基金(2017-ZRQN-075)

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

肺癌是严重危害人类健康的疾病,在世界范围内其发病率和病死率均已跃居至癌症的首位,非小细胞肺癌占有所有肺癌的85%。近年来随着靶向治疗的推广,非小细胞肺癌患者的生存期有所延长,但对于无表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)敏感突变以及不能经受手术的ⅢB~Ⅳ期的患者仍需要接受传统的放化疗^[1]。培美曲塞(pemetrexed, Pem)是一种抗叶酸代谢物,常与铂类药物联合使用作为非小细胞肺癌的一线化疗方案。二甲双胍(metformin, Met)为双胍类的降糖药,其抗肿瘤效应使得它可以作为一种新药,与其他治疗方式结合从而起到治疗增效的作用。本研究通过Met与Pem联合干预体外培养的肺腺癌A549细胞株,检测其细胞增殖抑制、细胞凋亡作用以及对Bcl-2、Bax、Mcl-1、Noxa蛋白表达的影响,探讨Met联合Pem方案的可行性及机制,为临床上优化肺癌的化疗提供有效方案及理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌A549细胞(西南医科大学实验室赠送);Pem(纯度99%)、Met(纯度99%)(礼来公司,美国);RPMI-1640培养基、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、DMEM/F-12培养基、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(武汉碧云天);Bcl-2抗体、Bax抗体、Mcl-1抗体、Noxa抗体(Abcam公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8法检测不同浓度Met及Pem对肺癌A549细胞增殖抑制作用

收集对数生长期的A549细胞,接种到96孔板,培养24 h后,用不同浓度的Met(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)及Pem(0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$)处理A549细胞株,培养48 h取出,每个浓度样本设5个重复,每孔加10 μL CCK-8溶液,孵育4 h,酶标仪测定450 nm吸光度值用于后续实验。

1.2.2 CCK-8法检测Met、Pem及两药联合对A549细胞的增殖抑制率

选取对数生长期的A549细胞接种于96孔板,分为Control组(无药干预组)、Met组(8.759 mmol/L)、Pem组(1.426 $\mu\text{mol/L}$)和Met+Pem组(8.759 mmol/L+1.426 $\mu\text{mol/L}$),每组设5个重复,分别培养24、36、48 h取出,CCK-8法(同上)检测不同组增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(对照组-实验组)/(对照组-

空白组) $\times 100\%$ 。

1.2.3 Annexin-V/PI双染流式法检测细胞凋亡率

取对数生长期的A549细胞,接种于6孔板,培养48 h后,分组同上,48 h后用流式细胞仪检测Control组、Met组、Pem组和Met+Pem组对细胞凋亡率的影响,操作步骤按照试剂盒说明进行,实验独立重复3次。

1.2.4 Western blot法检测蛋白的表达

A549细胞接种于6孔板中,分组同上,每组设3个复孔,48 h后提取总蛋白,在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白转膜至PVDF膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭后,加入一抗(Bcl-2、Bax、Mcl-1、Noxa、GAPDH)。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST漂洗后与二抗反应,室温孵育30 min;TBST漂洗,加入发光液后显影、定影、拍照,实验重复3次。

1.3 统计学方法

用SPSS17.0统计软件对数据进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用LSD-*t*检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8法检测不同浓度Met及Pem对肺癌A549细胞增殖抑制作用

48 h条件下,随Met(0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)及Pem(0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{mol/L}$)浓度增加,A549细胞增殖抑制率增加,呈剂量依赖性,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。并由此将Met联用浓度的半数抑制浓度(IC_{50})定为8.759 mmol/L,Pem联用浓度的 IC_{50} 定为1.426 $\mu\text{mol/L}$ (图1)。

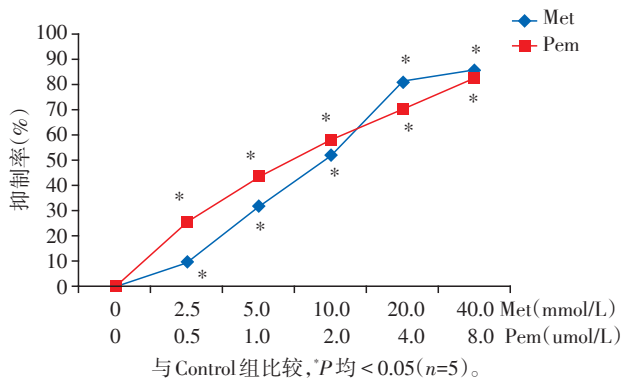


图1 CCK-8检测Met及Pem对A549增殖的影响
Figure 1 Effect of Met and Pem on proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells detected by CCK-8

2.2 CCK-8法检测 Met 联合 Pem 对肺癌 A549 细胞增殖抑制作用

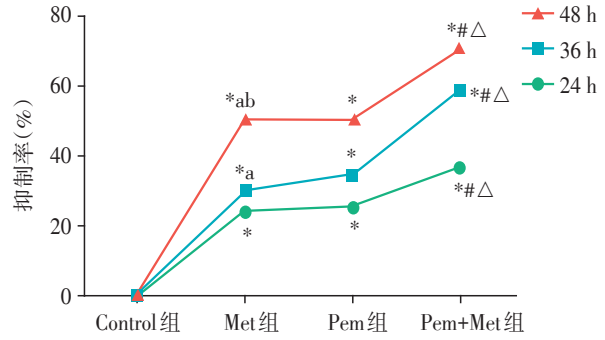
Met 联合 Pem 处理 A549 细胞,在不同时间点下(24、36、48 h)与 Control 组相比, Met 组、Pem 组、Met+Pem 组均能抑制体外培养的人肺腺癌 A549 细胞增殖(P 均 <0.05),随着时间的延长,抑制作用明显增加(P 均 <0.05);而 Met+Pem 组 A549 细胞增殖抑制作用较单药组(Met 组及 Pem 组)明显增强(P 均 <0.05 ,图2)。

2.3 Met 联合 Pem 对 A549 细胞凋亡的影响

Met 联合 Pem 处理 A549 细胞,干预 48 h 后凋亡率分别为:Control 组(3.7 ± 0.2)%、Met 组(13.3 ± 0.3)%、Pem 组(12.9 ± 0.1)%、Met+Pem 组(30.6 ± 0.4)%。与 Control 组相比, Met 组、Pem 组、Met+Pem 组细胞凋亡率更高(P 均 <0.05), Met+Pem 组 A549 细胞凋亡率较 Met 组及 Pem 组明显上升(P 均 <0.05 ,图3)。

2.4 Western blot 法检测 Met 联合 Pem 对 A549 细胞 Bcl-2、Bax、Noxa、Mcl-1 表达的影响

Met 联合 Pem 处理 A549 细胞,干预 48 h 后 Met 组 Bcl-2 表达量(0.383 ± 0.030)、Mcl-1 表达量(0.213 ± 0.029),较 Control 组下降(P 均 <0.05), Bax 表达量(0.402 ± 0.072)、Noxa 表达量(0.309 ± 0.041),较 Control 组升高(P 均 <0.05); Pem 组 Bcl-2 表达量(0.397 ± 0.031)、Mcl-1 表达量(0.349 ± 0.027),较



与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Met 组比较, * $P < 0.05$; 与 Pem 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 Met 组(24 h)比较, * $P < 0.05$; 与 Met 组(36 h)比较, Δ $P < 0.05$ ($n=5$)。

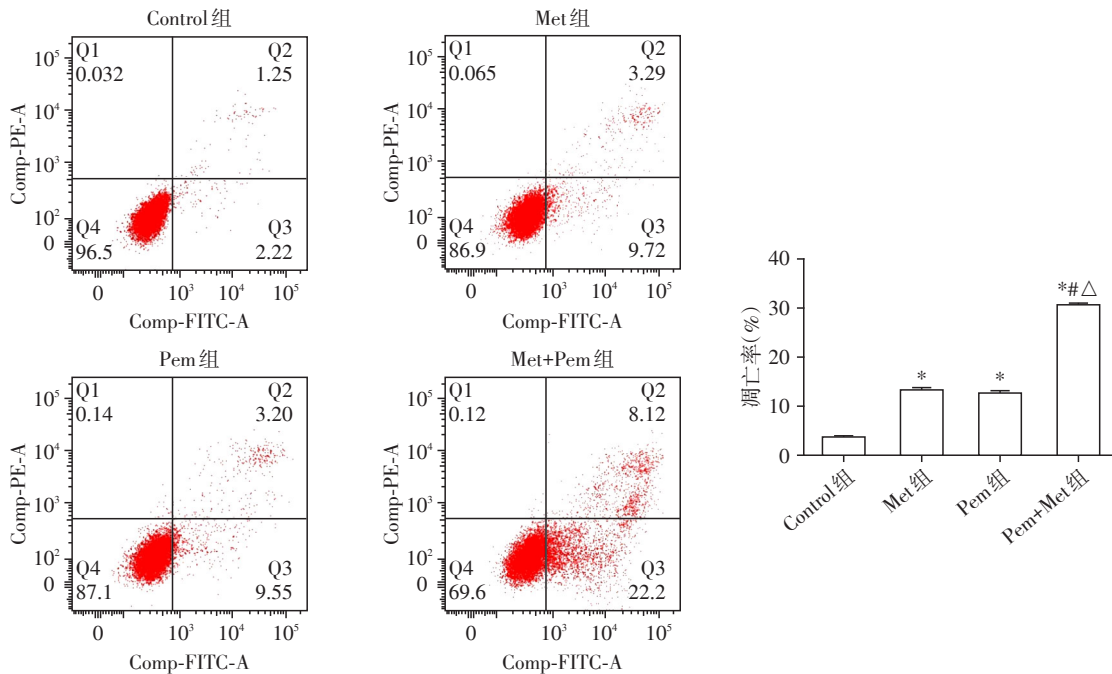
图2 各组 A549 细胞增殖抑制率的比较

Figure 2 Comparison of the inhibition rate of human lung adenocarcinoma A549 cells in each group

Control 组下降(P 均 <0.05), Bax 表达量(0.402 ± 0.044)、Noxa 表达量(0.283 ± 0.068),较 Control 组升高(P 均 <0.05); Met+Pem 组 Bcl-2 表达量(0.159 ± 0.030)、Mcl-1 表达量(0.087 ± 0.007),较单药组下降(P 均 <0.05), Bax 表达量(0.662 ± 0.034)、Noxa 表达量(0.569 ± 0.042),较单药组升高(P 均 <0.05 ,图4)。

3 讨论

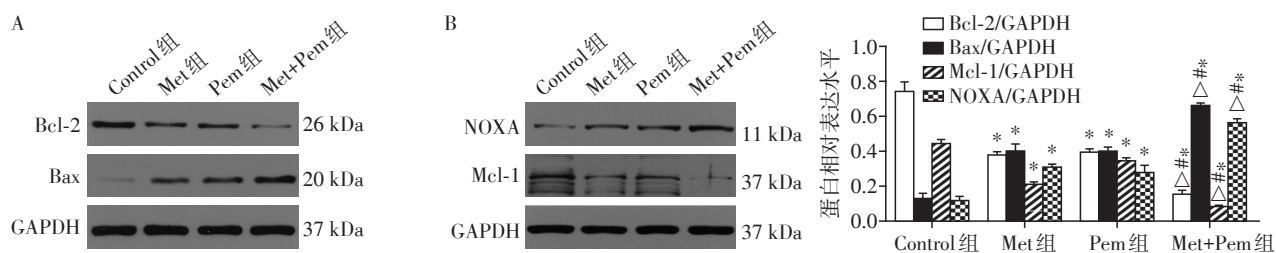
Met 为双胍类的降糖药物,近年来研究发现, Met 有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[2],其可联合相关药



与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Met 组比较, * $P < 0.05$; 与 Pem 组比较, Δ $P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 Met 及 Pem 对 A549 细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of Met and Pem on apoptosis of A549 cells



A: Western blot 检测各组细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况; B: Western blot 检测各组细胞 Noxa 和 Mcl-1 蛋白表达情况;与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 Met 组比较, # $P < 0.05$;与 Pem 组比较, ## $P < 0.05$, $n=3$ 。

图4 Western blot 法检测相关蛋白表达水平

Figure 4 Expressions of the related proteins detected by Western blot

物增强肿瘤细胞对放化疗、靶向治疗的敏感性^[3-5]。Pem 作为一种新型化疗药物,广泛应用于非小细胞肺癌的一线治疗,然而与多西他赛等其他化疗药物相比,并没有改善肺腺癌患者治疗有效率及总生存期,因此迫切需要新的策略提高 Pem 的疗效。

与单用一种药物比较,联合使用两种药物可增强药物疗效,克服长期单用一种药物所引起的耐药。一项研究发现, Met 在 0~50 mmol/L 浓度、不同作用时间(24、48、72 h),对 A549 细胞产生显著的抑制增殖作用,抑制率呈浓度-时间依赖性^[6]。此外, Hatakeyama 等^[7]研究中发现, Pem 作用于 A549 细胞的浓度范围为 0~25.6 $\mu\text{mol/L}$,同时其可明显抑制 A549 细胞的增殖。本实验选取不同浓度的 Met 及 Pem 作用于 A549 细胞后发现,随着浓度增加,不同浓度 Met 及 Pem 对细胞增殖的抑制作用均增强,联合两种药物之后,表现出更强的抑制肿瘤细胞增殖能力,证实了 Met 联合 Pem 作用于 A549 细胞具有相加作用,且本研究结果与 Yan 等^[1]的研究结果一致。

凋亡是细胞在基因组的调控下发生的程序性死亡的过程,肿瘤细胞在相关药物作用下,有关代谢通路或信号转导通路被抑制,进而启动细胞的凋亡^[8]。有研究证实^[9], Met 可抑制 A549 细胞的凋亡,并将细胞周期阻滞在 G₀/G₁, Pem 可通过内源性凋亡途径引起 A549 细胞的凋亡^[10]。本实验发现, Met 及 Pem 能使 A549 细胞产生明显的凋亡诱导效应,而 Met 和 Pem 的联合使 A549 细胞凋亡率最高,且本研究结果与上述研究者研究结果一致。这预示着两药联合效应可能是通过增强凋亡诱导效应来实现的。

Bcl-2、Mcl-1 与 Bax、Noxa 是 Bcl-2 家族中重要的抗凋亡与促凋亡因子,与肿瘤细胞凋亡密切相关。近年来有研究显示:药物引起 Bcl-2/Bax 信号通路的激活可使非小细胞肺癌细胞凋亡,改善肿瘤治疗

效应^[11],另外 Noxa 表达的增加、Mcl-1 的表达水平的下降,均可以提高肿瘤细胞对化疗的敏感性^[12-13],本研究检测了不同干预条件下细胞凋亡相关蛋白的表达,发现单用 Met 或 Pem 可使 Bcl-2、Mcl-1 蛋白的表达水平下调, Bax、Noxa 蛋白表达水平上调,而两药联合使用时,作用更为明显。因此,推测联合用药作用于 A549 细胞协同效应可能与细胞凋亡相关途径有关,但其具体机制仍需要进一步深入研究。目前研究认为, Met 可以通过抑制 PI3k/AKT/MTOR 通路间接发挥抗肿瘤的作用^[14],而 PI3k/AKT/MTOR 通路的抑制可下调 Mcl-1 表达增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[15]; Met 可通过激活 AMPK 途径上调 P53, Noxa 和 Bax 是 P53 转录因子的靶点^[16-17];同时, Wu 等^[9]研究发现 Met 可以启动内质网应激,上调 Noxa 蛋白表达。另外有研究显示: Pem 可通过阻断 AICART,从而抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路^[18]。 Zhao 等^[19]研究发现 Pem 联合化疗药物可激活内质网应激反应,引起 Noxa 表达上调, Mcl-1 的表达降低,从而诱导肿瘤细胞凋亡。综上所述, Met 与 Pem 联合作用的机制有可能是通过抑制共同的通路 PI3k/AKT/mTOR 或激活内质网应激途径引起非小细胞肺癌的凋亡。

[参考文献]

[1] Zhang Y, Feng XL, Li T, et al. Metformin synergistic pemetrexed suppresses non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion *in vitro* [J]. Cancer Medicine, 2017, 6(8):1965-1975
[2] Xiao ZG, Gaertner S, Morresi-Hauf A, et al. Metformin triggers autophagy to attenuate drug-induced apoptosis in NSCLC cells, with minor effects on tumors of diabetic patients [J]. Neoplasia, 2017, 19(5):385-395
[3] Wang J, Wang Y, Han J, et al. Metformin attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis in a murine model [J].

- Radiat Res, 2017, 188(1):105-113
- [4] Xiong Y, Zhao Y, Miao L, et al. Co-delivery of polymeric metformin and cisplatin by self-assembled core-membrane nanoparticles to treat non-small cell lung cancer [J]. J Control Release, 2016, 11(5):63-73
- [5] Wang XF, Chen KQ, Yu Y, et al. Metformin sensitizes lung cancer cells to treatment by the tyrosine kinase inhibitor erlotinib [J]. Oncotarget, 2017, 8(65):109068-109078
- [6] Wang JL, Gao QL, Wang DC, et al. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway [J]. Oncology Letters, 2015, 10(3):1343-1349
- [7] Hatakeyama Y, Kobayashi K, Nagano T, et al. Synergistic effects of pemetrexed and amrubicin in non-small cell lung cancer cell lines: Potential for combination therapy [J]. Cancer Lett, 2014, 343(1):74-79
- [8] 黄耀, 姚欣. 新型双芳基脲类化合物对非小细胞肺癌 A459 细胞的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(12):1683-1687
- [9] Wu N, Gu C, Gu H, et al. Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153 [J]. Neoplasma, 2011, 58(6):482-490
- [10] Yan J, Zhong N, Liu G, et al. Usp9x- and Noxa-mediated Mcl-1 downregulation contributes to pemetrexed-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells [J]. Cell Death and Disease, 2014, 5:1316
- [11] Yu S, Gong LS, Li NF, et al. Galangin(GG) combined with cisplatin(DDP) to suppress human lung cancer by inhibition of STAT3-regulated NF- κ B and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:213-224
- [12] 曹彬, 何晓峰, 王又公, 等. SIRT1 通过调节 Noxa 表达影响非小细胞肺癌细胞株 A549 对顺铂的敏感性 [J]. 中国肺癌杂志, 2016, 19(2):57-63
- [13] Ma J, Zhao ZX, Wu KM, et al. MCL-1 is the key target of adjuvant chemotherapy to reverse the cisplatin-resistance in NSCLC [J]. Gene, 2016, 587(2):147-154
- [14] Li C, Xue Y, Xi YR, et al. Progress in the application and mechanism of metformin in treating non-small cell lung cancer [J]. Oncology Letters, 2017, 13(5):2873-2880
- [15] Chan ML, Yu CC, Hsu JL, et al. Enantiomerically pure β -dipeptide derivative induces anticancer activity against human hormone-refractory prostate cancer through both PI3K/Akt-dependent and independent pathways [J]. Oncotarget, 2017, 8(57):96668-96683
- [16] Villunger A, Michalak EM, Coultas L, et al. p53 and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa [J]. Science, 2003, 302:1036-1038
- [17] Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene [J]. Cell, 1995, 80:293-299
- [18] Booth L, Roberts JL, Tavallai M, et al. [Pemetrexed + Sorafenib] lethality is increased by inhibition of ERBB1/2/3-PI3K-NF κ B compensatory survival signaling [J]. Oncotarget, 2016, 7(17):23608-23632
- [19] Zhao X, Kong F, Wang L, et al. c-FLIP and the NOXA/Mcl-1 axis participate in the synergistic effect of pemetrexed plus cisplatin in human choroidal melanoma cells [J]. PloS one, 2017, 12(9):135-184

[收稿日期] 2018-07-29