

- of diabetes mellitus[J]. Lancet, 1975, 1(7897): 14-16.
- 2 Yang SH, Dou KF, Song WJ. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J med, 2010, 362(25): 2425-2426.
- 3 Perry T, Holloway HW, Weerasuriya A, et al. Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy[J]. Exp Neurol, 2007, 203(2): 293-301.
- 4 Hare KJ. Role of GLP-1 induced glucagon suppression in type 2 diabetes mellitus[J]. Dan Med Bull, 2010, 57(9): B4181.
- 5 Holst JJ, Christensen M, Lund A, et al. Regulation of glucagon secretion by incretins[J]. Diabetes Obes Metab, 2011, 13(Suppl1): 89-94.
- 6 Lund A, Vilsboll T, Bagger JJ, et al. The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 300(6): E1038-E1046.
- 7 Rizza RA. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in Type 2 diabetes: implications for therapy[J]. Diabetes, 2010, 59(11): 2697-2797.
- 8 Hare KJ, Vilsboll T, Asmar M, et al. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action[J]. Diabetes, 2010, 59(7): 1765-1770.
- [收稿日期 2013-04-16][本文编辑 宋卓孙 蓝斯琪]

课题研究·论著

不同浓度二甲双胍对子宫内膜癌细胞增殖与凋亡的影响

宋红林, 梁少凤

基金项目: 广西卫生厅重点科研课题(编号: 桂卫重 200972)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学附属肿瘤医院妇科

作者简介: 宋红林(1971-), 女, 硕士研究生, 在读博士, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤诊治。E-mail: shlt03@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 探讨二甲双胍对子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响。方法 以不同浓度及时间二甲双胍作用 Ishikawa 细胞, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法和流式细胞仪检测细胞增殖、凋亡和细胞周期。结果 二甲双胍抑制子宫内膜癌细胞增殖, 并与作用时间浓度相关。流式细胞仪检测提示二甲双胍作用下细胞中 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 期细胞比例降低。结论 二甲双胍能抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖, 使细胞生长周期停滞。

[关键词] 子宫内膜肿瘤; 二甲双胍; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R 737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)08-0739-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.08.04

Effect of metformin on proliferation and apoptosis of human endometrial carcinoma cells SONG Hong-lin, LI-ANG Shao-feng. Department of Gynecology and Oncology, Guangxi Cancer Hospital, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of metformin on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human endometrial carcinoma cell lines in vitro. **Methods** The effects of metformin on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of Ishikawa cell lines were measured by MTT assay and fluorescence-activated cell sorting technique. **Results** Metformin potently inhibited growth in a dose-dependent manner in Ishikawa cell lines in a dose- and time-dependent fashion. Flow cytometric analysis showed that metformin increased the number of cells in G_0/G_1 and reduced the percentage of cells in S phase. **Conclusion** Metformin is a potent inhibitor of cell proliferation in endometrial cancer cell lines.

[Key words] Endometrial carcinoma; Metformin; Cell proliferation; Cell apoptosis

子宫内膜癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 发病机理尚未明了。肥胖和糖尿病是子宫内膜癌发病的

高危因素, 其共同的病理生理基础是高胰岛素血症及胰岛素抵抗。近年来研究发现, 2 型糖尿病的一

线治疗药物二甲双胍,可纠正患者体内胰岛素抵抗状态,进而影响子宫内膜癌的发生和发展^[1,2]。为了探讨二甲双胍在子宫内膜癌发生发展中的作用,本实验以体外培养的人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞为研究对象,观察不同浓度二甲双胍对子宫内膜癌细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株由广西医科大学附属肿瘤医院实验基础部妇瘤实验室冻存。二甲双胍及四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司。无支原体胎牛血清购自恒因公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理 人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,以 5% CO₂、37℃ 培养箱培养,2~3 d 更换培养液一次,直至细胞铺满率达 90% 左右,用胰酶消化传代至 10 cm² 的培养瓶中。

1.2.2 MTT 法细胞增殖率测定 将对数生长期的 Ishikawa 细胞按每孔 1×10^4 个细胞数接种于 96 孔板。5% CO₂、37℃ 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁。各孔分别按分组加入二甲双胍,使终浓度分别为 0.5、1.5、10 mmol/L。对照组以同体积的磷酸盐缓冲液(PBS)代替二甲双胍。每组设 6 个复孔,加药后各组细胞分别培养 24 h、48 h、72 h 终止反应。终止反应后,各组细胞每孔加入 MTT 溶液 20 μ l,37℃ 孵育 4 h,小心吸弃上清,每孔加入二甲[基]亚砷(DMSO)150 μ l,平板摇床摇匀使甲瓚充分溶解后将所有溶液移至另一孔板;选择 492 nm 波长,酶联免疫检测仪测定各孔的吸光值,并记录结果 D₄₉₂。细胞增殖率 = $\frac{\text{实验组 } D_{492} - \text{空白组 } D_{492}}{\text{对照组 } D_{492} - \text{空白组 } D_{492}} \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞生长周期变化 将 Ishikawa 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板,按 0.5、1、5、10 mmol/L 浓度分别予二甲双胍干预 48 h 后终止反应,每组设 3 个复孔。终止培养后,各组细胞分别用 0.25% 胰酶消化,PBS 洗涤细胞 2 次后,加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇,4℃ 固定过夜。次日将细胞取出再次用 PBS 洗涤 2 次,用 PBS 配成细胞浓度 10^6 /ml 的细胞悬液,轻吹打混匀后以每毫升细胞悬液 1 ml 碘化丙啶(PI)的比例加入 PI 液,4℃ 下避光孵育 30 min;300 目筛网过滤后上机检测。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 将 Ishikawa 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板,按 0.5、1.5、10 mmol/L 浓度的二甲双胍干预 48 h 后终止反应,每组设 3 个

复孔。终止培养后,分别取各细胞悬液 1×10^5 个至 1.5 ml EP 管中,随后加入 1 μ l 的 Annexin V-PE 和 7-AAD 染液,上下轻轻吹打混匀,室温,避光反应 15 min 后加入 400 μ l 的 $1 \times$ binding buffer 悬浮细胞,在 1 h 内上机进行流式检测各组细胞的凋亡率。

1.3 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析,不同培养时间比较采用随机区组设计方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖率的影响 不同浓度二甲双胍抑制人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖,随着二甲双胍浓度的增加及作用时间的延长,细胞增殖的抑制率有增加的趋势,在 10 mmol/L 浓度的二甲双胍抑制细胞增殖作用最强。见表 1。

表 1 二甲双胍对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖率的影响[%, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	标本量(DMSO)	24 h	48 h	72 h
对照组	150 μ l	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
0.5 mmol/L 组	150 μ l	96.32 $\pm$ 1.21	95.24 $\pm$ 0.86	92.08 $\pm$ 1.07
1 mmol/L 组	150 μ l	90.35 $\pm$ 4.52*	87.68 $\pm$ 4.56*	80.54 $\pm$ 5.07*
5 mmol/L 组	150 μ l	65.35 $\pm$ 3.87*	60.78 $\pm$ 4.05*	54.58 $\pm$ 3.46*
10 mmol/L 组	150 μ l	58.74 $\pm$ 2.78*	42.57 $\pm$ 3.12*	30.41 $\pm$ 2.34*

注:*F*_{组间} = 121.47, *P*_{组间} < 0.01; *F*_{时间} = 149.9, *P*_{时间} < 0.01; 与对照组相比, **P* < 0.05

2.2 二甲双胍作用后 Ishikawa 细胞周期的变化 不同浓度的二甲双胍作用于 Ishikawa 细胞 48 h 后,停滞于 G₀/G₁ 期的细胞明显增多,S 期的比例明显减少,并呈剂量依赖性。见表 2。

表 2 二甲双胍使用后 Ishikawa 细胞周期的变化[%, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	标本量(μ l)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	200	41.51 $\pm$ 4.01	37.24 $\pm$ 3.65	21.25 $\pm$ 1.87
0.5 mmol/L 组	200	43.27 $\pm$ 2.08*	34.41 $\pm$ 1.52*	22.32 $\pm$ 0.98*
1 mmol/L 组	200	46.34 $\pm$ 1.61	32.27 $\pm$ 0.78	21.39 $\pm$ 1.21
5 mmol/L 组	200	56.42 $\pm$ 0.78 ^①	23.51 $\pm$ 0.61 ^③	20.07 $\pm$ 2.19
10 mmol/L 组	200	64.17 $\pm$ 2.21 ^②	18.23 $\pm$ 1.52 ^④	7.60 $\pm$ 3.04
<i>F</i>	-	0.751	0.577	0.049
<i>P</i>	-	>0.05	>0.05	>0.05

注:与对照组相比, **P* < 0.05; 与对照组比较, ^①*t* = 14.14, *P* < 0.01; 与对照组比较, ^②*t* = 19.16, *P* < 0.01; 与对照组比较, ^③*t* = 14.36, *P* < 0.01; 与对照组比较, ^④*t* = 18.62, *P* < 0.01

2.3 二甲双胍作用后 Ishikawa 细胞凋亡的情况

实验组不同浓度(0.5, 1.5, 10 mmol/L)的二甲双胍作用于 Ishikawa 细胞 48 h 后, 凋亡率[%, ($\bar{x} \pm s$)]分别为(9.51 ± 1.21)、(9.88 ± 0.96)、(10.02 ± 1.43)、(10.21 ± 0.67), 与对照组(9.45 ± 1.07)相比差异均无统计学意义($F = 1.077, P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 高胰岛素血症及胰岛素抵抗的代谢综合征是子宫内膜癌发病的高危因素。近年来有研究认为二甲双胍能降低糖尿病患者子宫内膜癌的发生率及病死率, 其机制可能与二甲双胍可以降低体内高胰岛素血症及改善胰岛素抵抗的状态相关^[3,4]。二甲双胍可以激活静息状态下蛋白激酶(activated protein kinase, AMPK)。AMPK 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在真核细胞生物中广泛存在, AMPK 能量信号传导通路通过 AMP/ATP 比值调节机体的能量代谢, 维持能量的供求平衡, 预期能改善代谢综合征。有研究认为二甲双胍的抗肿瘤途径是通过激活 AMPK 能量代谢传导通路, 进而抑制哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)而实现其抗肿瘤的作用^[5,6]。

3.2 本研究结果提示二甲双胍具有抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞生长的作用, 并呈剂量依赖性, 这也支持了上述观点。在其他的一些肿瘤, 包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌及卵巢癌细胞系的研究中, 研究者们也得到了相似的结果^[7-9]。同时, 本研究发现较高浓度的二甲双胍(>5 mmol/L)可使 Ishikawa 细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期, S 期的比例明显减少, 且与对照组相比差异有显著性。这也与 Cantrell 等报道的研究结果相同^[10]。其可能的机理与二甲双胍激活了 AMPK, 进而抑制了 mTOR 有关。研究表明, 使用 mTOR 阻滞剂的子宫内膜癌、卵巢癌及宫颈癌细胞株都出现了 G₁ 期停滞现象^[11,12]。另外, 本研究发现不同浓度的二甲双胍有促进细胞凋亡的趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。Alimova 等^[13]报道二甲双胍对乳腺癌及结肠癌细胞凋亡无影响。Buzzai 等^[14]认为二甲双胍对 P53 缺失的细胞株有诱导凋亡的作用。所以, 有关二甲双胍对子宫内膜癌细胞凋亡的作用尚需进一步研究探讨。

3.3 二甲双胍是一种便宜且安全的药物, 因其具有抗肿瘤的生物学活性, 日渐受到人们的关注。子宫内膜癌与体内的高胰岛素血症有关, 二甲双胍能改善此生理状态, 并在体外实验中证实能抑制子宫内膜癌细胞的生长, 其抗肿瘤的机制仍有待进一步研

究。我们认为二甲双胍可望成为一种应用于子宫内膜癌预防及治疗的新型抗癌药。

参考文献

- 1 Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, et al. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation—implications for a novel treatment strategy[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(1): 92–98.
- 2 Hanna RK, Zhou C, Malloy KM, et al. Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 125(2): 458–469.
- 3 Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. *BMJ*, 2005, 330(7503): 1304–1305.
- 4 Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, et al. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin: Response to Farooki and Schneider[J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(8): 1990–1991.
- 5 O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1500–1508.
- 6 Rattan R, Giri S, Hartmann LC, et al. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(1): 166–178.
- 7 Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, et al. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2008, 1(5): 369–375.
- 8 Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, et al. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10804–10812.
- 9 Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(2): 246–250.
- 10 Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, et al. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation—implications for a novel treatment strategy[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(1): 92–98.
- 11 Zhou C, Gehrig PA, Whang YE, et al. Rapamycin inhibits telomerase activity by decreasing the hTERT mRNA level in endometrial cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(8): 789–795.
- 12 Bae-Jump VL, Zhou C, Gehrig PA, et al. Rapamycin inhibits hTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(3): 487–494.
- 13 Alimova IN, Liu B, Fan Z, et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(6): 909–915.
- 14 Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6745–6752.

[收稿日期 2013-02-06][本文编辑 杨光和 韦所苏]