

· 论 著 ·

二甲双胍对人绒毛膜癌细胞凋亡的影响

柳光芬

(重庆市消防总队医院 401120)

摘要:目的 观察二甲双胍对人绒毛膜癌细胞凋亡的影响和可能的作用机制。方法 选用人绒毛膜癌细胞系 JEG-3, 分为对照组和二甲双胍组(终浓度为 5、10、20、40 mmol/L)处理 48 h 后, 使用流式细胞术和免疫荧光检测细胞凋亡情况, 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)和免疫蛋白印迹检测凋亡相关基因半胱天冬酶-3(Caspase-3)、Bcl-2 和凋亡调节蛋白(Bax)的 mRNA 及蛋白变化趋势。结果 和对照组相比, 二甲双胍组的 JEG-3 细胞早晚期凋亡率显著上升, 同时 Caspase-3 和 Bax 的 mRNA 及蛋白表达水平显著增加, 但 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低。结论 二甲双胍可以通过 Caspase-3 及 Bcl-2/Bax 通路诱导 JEG-3 细胞发生凋亡。

关键词:人绒毛膜癌细胞; 二甲双胍; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3280-03

Effect of metformin on human choriocarcinoma cell apoptosis

LIU Guangfen

(Chongqing Municipal Fire Corps Hospital, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of metformin on apoptosis of human choriocarcinoma cell and its possible action mechanism. **Methods** The human choriocarcinoma cell line JEG-3 was selected and divided into the control group and metformin groups (final concentrations of 5, 10, 20, 40 mmol/L). Flow cytometry and immunofluorescence assay were adopted to detect cell apoptosis at 48 h after treatment. The mRNA and protein change trend of Caspase-3, Bcl-2 and Bax were measured by Real-time PCR and Western Bolt. **Results** Compared with the control group, the early and late apoptosis rate of JEG-3 cells in the metformin groups were remarkably increased, meanwhile mRNA and protein expression levels of Caspase-3 and Bax were significantly increased, but Bcl-2 mRNA and protein expression were significantly decreased. **Conclusion** Metformin induces the JEG-3 cells to generate apoptosis by the Caspase-3 and Bcl-2/Bax pathways.

Key words: human choriocarcinoma; metformin; cell apoptosis

绒毛膜癌是一种较为罕见的妇产科肿瘤, 其来源于滋养层细胞具有高度的增殖力和侵袭性。绒癌通常继发于葡萄胎、流产或分娩后的育龄期妇女, 偶发于儿童或男性。目前的治疗手段主要采取 5-氟尿嘧啶等化疗为主的方法, 尽量保留患者的子宫和卵巢。二甲双胍是常用的糖尿病降糖药, 也可以用于妊娠期糖尿病; 近期有研究发现, 二甲双胍可以抑制宫颈癌、食管癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞的生长和发展, 是潜在治疗肿瘤的新型药物^[1-5]。目前, 二甲双胍对绒癌细胞的抑制能力和机制尚不清楚, 因此本研究拟以人绒毛膜癌细胞系 JEG-3 为模型, 初步探讨二甲双胍处理对 JEG-3 细胞凋亡的影响和可能的作用机制, 为其临床应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 人绒毛膜癌细胞株 JEG-3 购于上海细胞所; 胎牛血清(杭州四季清公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 二甲双胍(美国 Sigma 公司); 流式细胞凋亡检测试剂盒(北京凯基公司), 细胞增殖和活性检测试剂盒(CCK-8)和末端脱氧核苷酰基转移酶介导性 dUTP 切口末端标记试剂盒(TUNEL)(碧云天公司), 半胱天冬酶-3(Caspase-3)、 β -肌动蛋白(β -actin)、Bcl-2 和凋亡调节蛋白(Bax)抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 细胞培养 JEG-3 细胞株使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 培养基中分别加入 100 U/mL 的青链霉素。置于 37 °C、5% 的 CO₂ 浓度湿度饱和的 CO₂ 培养箱中, 当

细胞密度达到 80%~90% 时进行传代。

1.3 细胞分组及药物浓度筛选 取对数生长期的 JEG-3 细胞消化重悬后接种于 96 孔板中, 接种密度为 3 000 细胞/孔。培养过夜后, 分别用终浓度为 5、10、20、40 mmol/L 的二甲双胍处理(二甲双胍组), 每组设 6 个复孔并以未处理组为对照组。处理 48 h 后吸去孔中培养基, 加入预混有 CCK-8 溶液的培养基继续培养 2 h, 酶标仪 490 nm 波长下测定各孔的吸光度值(OD₄₉₀), 并减去空白孔的读数以消除本底, 计算药物对细胞增殖的抑制率。抑制率 = (对照组 OD₄₉₀ - 二甲双胍组 OD₄₉₀) / 对照组 OD₄₉₀ × 100%。选取接近 50% 抑制率的药物浓度进行下面的干预实验。

1.4 TUNEL 取对数生长期的 JEG-3 细胞, 以每孔 2 × 10⁴ 接种于预先放置有 1 cm × 1 cm 玻璃片的 24 孔板中, 按照二甲双胍组干预培养 48 h。4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后使用 0.1% 的 Triton X-100 冰上孵育 2 min, 加入 50 μ L 的 TUNEL 检测液 37 °C 避光孵育 60 min, DAPI 染色 30 min, PBS 洗涤后抗淬灭封片剂封片后使用激光共聚焦显微镜照相, 每组随机取 8 个视野统计平均阳性细胞数。

1.5 流式细胞检测凋亡 收集处理完成的二甲双胍组和对照组细胞, 按照膜联蛋白(Annexin V/PI)凋亡检测试剂盒说明书进行染色。离心去上清液后加入 500 μ L 的固定液重悬细胞, 随后加入 Annexin V 和 PI 染液各 5 μ L, 混匀后避光反应 10 min 后上机进行流式检测。

1.6 实时定量荧光聚合酶链反应(PCR) 取处理完成的二甲双胍组和对照组细胞,胰酶消化后去上清液加入 500 μ L 裂解液,采用离心柱法提取细胞总 RNA。随后根据反转录试剂盒

说明合成 cDNA,采用 Syber-green 法检测 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平,并用 β -actin 为内参。实时荧光定量 PCR 的引物见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 各基因的引物序列

基因	上/下游	引物序列	产物长度
Caspase-3	上游引物	5'-TGC TAT TGT GAG GCG GTT GT-3'	130 bp
	下游引物	5'-GCA GGG CTC GCT AAC TCC-3'	
Bcl-2	上游引物	5'-CAT GTG TGG AGA GCG TCA A-3'	81 bp
	下游引物	5'-GCC GGT TCA GGT ACT CAG TCA-3'	
Bax	上游引物	5'- CCC AGA GGC GGG GTT TCA-3'	164 bp
	下游引物	5'- CAT CCT CTG CAG CTC CAT GT-3'	
β -actin	上游引物	5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG T-3'	238 bp
	下游引物	5'-GGG ATA GCA CAG CCT GGA T-3'	

1.7 免疫印迹试验 二甲双胍处理细胞 48 h 后,胰酶消化离心弃上清液,加入适量的细胞裂解液裂解细胞,冰上振荡 7 min 再用超声破碎仪低档处理 5 min,4 $^{\circ}$ C,15 000 r/min 离心 10 min 获取上清液中的总蛋白。BCA 试剂盒对总蛋白定量,蛋白上样量为 40 μ g,SDS 电泳后转膜,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜二抗室温 1 h 后化学发光法显色,并使用 Quantity One 软件分析各条带的灰度值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。计数资料以百分率表示,组间比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制 JEG-3 细胞的最佳药物浓度 CCK-8 结果显示,5、10、20、40 mmol/L 浓度的二甲双胍处理均对 ABC 细胞的增殖有抑制作用。并且在 5、10、20、40 mmol/L 浓度时表现为剂量依赖性,抑制率随着药物浓度的增加而依次递增,见图 1。20 mmol/L 二甲双胍对 JEG-3 的抑制率为 46.10%,而 40 mmol/L 的抑制率为 58.98% 超过 50%,表明 20 mmol/L 的二甲双胍是 JEG-3 细胞的最佳药物浓度。

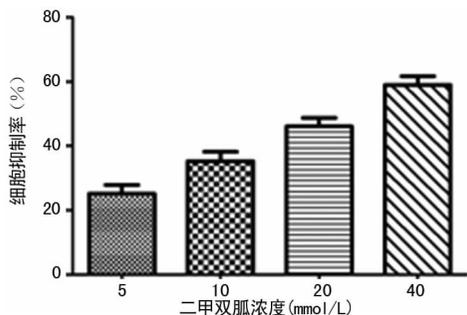
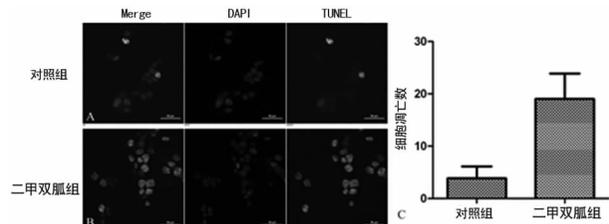


图 1 不同浓度二甲双胍对 JEG-3 细胞的抑制率

2.2 二甲双胍促进 JEG-3 细胞凋亡 二甲双胍作用 48 h 后,流式细胞检测细胞早期凋亡的比率为 25.86%,而对照组仅为 4.32%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TUNEL 实验显示,二甲双胍组中平均每视野阳性细胞数 (19.00 ± 4.86) 高于对照组 (3.83 ± 2.82),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明,二甲双胍可以同时促进 JEG-3 细胞的早/晚期凋亡发生。

2.3 二甲双胍对细胞凋亡相关基因的影响 二甲双胍作用

48 h 后,使用荧光定量 PCR 检测细胞凋亡相关基因的 mRNA 变化水平发现,二甲双胍处理后促凋亡基因 Caspase-3 和 Bax 表达增加,同时下调抗凋亡基因 Bcl-2,和对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



注:A 为正常 JEG-3 细胞;B 为二甲双胍处理后的 JEG-3 细胞;C 为两组细胞凋亡数统计结果。

图 2 TUNEL 法检测二甲双胍对 JEG-3 细胞凋亡的影响

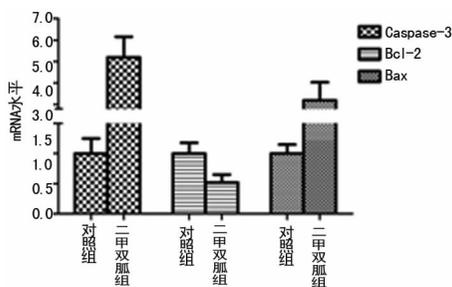
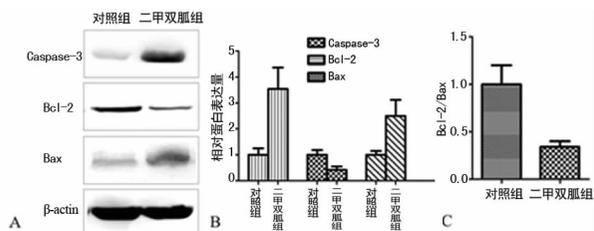


图 3 二甲双胍对凋亡相关基因 mRNA 表达水平的影响



注:A 为 Western bolt 图;B 为 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量分析;C 为 Bcl-2 和 Bax 蛋白相对表达量比。

图 4 二甲双胍对凋亡相关蛋白表达水平的影响

2.4 二甲双胍对细胞凋亡相关蛋白的影响 二甲双胍处理 JEG-3 细胞后通过检测细胞凋亡相关基因的蛋白表达水平发现其和 mRNA 变化程度类似,二甲双胍可以降低抗凋亡因子

Bcl-2 的蛋白表达同时上调 Bax 和 Caspase-3, 并且导致 Bcl-2/Bax 比值上调, 和对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、4。

3 讨 论

二甲双胍疗效确切, 不良反应小, 是临床上常用的降糖药。有流行病学研究发现长期使用二甲双胍控制血糖的肿瘤患者的生存率要高于未服用患者, 提示其对肿瘤可能有一定的治疗作用。有研究者对 10 309 例 2 型糖尿病患者随访调查发现, 合并肿瘤的患者中使用二甲双胍的病死率要明显低于使用胰岛素和磺脲类药物的患者^[6]。近年来, 越来越多的实验证实其对肿瘤细胞的周期、代谢、增殖都有抑制作用, 可能是潜在的肿瘤治疗药物^[7]。

细胞凋亡受到促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两大类蛋白的共同调节, 是一个动态平衡的过程。Bcl-2 家族在线粒体介导的细胞凋亡中起关键作用, 该家族包括 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bcl-w 等抗凋亡蛋白以及 Bax、Bak 和 Bid 等促凋亡蛋白^[8-10]。Bcl-2/Bax 是衡量细胞凋亡程度的重要指标, 通常在恶性肿瘤细胞中 Bcl-2 高表达而 Bax 低表达, 两者的比值较高^[11-13]。本研究发现二甲双胍处理绒癌细胞 JEG-3 后, 具有抗凋亡功能的 Bcl-2 受到抑制而能够促进细胞凋亡的 Bax 则表达增加, Bcl-2/Bax 比值下降和未处理组相比差异有统计学意义。有报道指出二甲双胍可以通过 AMPK 和 mTOR 等信号通路, 动态调节 Bcl-2 和 Bax 的表达水平从而参与调控肿瘤细胞的凋亡^[14], 这将在本实验的后续研究中展开。

经过二甲双胍处理的 JEG-3 细胞早晚期凋亡率上升, 并且凋亡相关蛋白 Caspase-3 升高。当细胞启动凋亡进程后, 激活 Caspase-3 参与多种凋亡发生途径促使细胞凋亡发生。Caspase-3 可以抑制 Bcl-2 的功能, 而 Bcl-2/Bax 比率下调, 结合细胞水平上早/晚期凋亡率的增加, 提示二甲双胍是通过抑制抗凋亡基因 Bcl-2、上调促凋亡基因 Bax 及 Caspase-3, 从而激活线粒体凋亡途径, 促使 JEG-3 细胞发生凋亡^[15-18]。

本研究采用人绒毛膜癌细胞系 JEG-3 为对象, 探讨了二甲双胍对 JEG-3 细胞凋亡的影响及作用机制。通过药物抑制率实验发现二甲双胍的最佳作用浓度, 并且使用流式细胞术和 TUNEL 实验从两方面证实, 二甲双胍处理 48 h 可以显著提高绒毛细胞的早/晚期凋亡率, 其可能是上调 Caspase-3 和 Bax 同时抑制 Bcl-2 以促进肿瘤细胞凋亡的发生。

但是, 本实验所采用的二甲双胍浓度显著高于其作为降糖药时的血药浓度, 其作为肿瘤治疗药物的应用还需要大量严谨的临床前研究来加以证明。

参考文献

[1] Schmedt N, Azoulay L, Hense S. Reduced risk of lung cancer with metformin therapy in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Epidemiol*, 2014, 180(12): 1216-1217.

[2] Agrawal S, Patel P, Agrawal A, et al. Metformin use and the risk of esophageal cancer in Barrett esophagus [J]. *South Med J*, 2014, 107(12): 774-779.

[3] Davide S, Lorenza S, Antonella Z, et al. Cancer risk associated with use of metformin and sulfonylurea in type 2 diabetes: a meta-analysis [J]. *Oncologist*, 2012, 17(6): 813-822.

[4] Miyoshi H, Kato K, Iwama H, et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 322-332.

[5] Du Y, Zheng H, Wang J, et al. Metformin inhibits histone H2B monoubiquitination and downstream gene transcription in human breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2): 809-812.

[6] 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.

[7] 卢清军, 熊宇, 严威, 等. 二甲双胍对肝癌细胞增殖及凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(7): 1107-1110.

[8] Hennessy EJ. Selective inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL: balancing antitumor activity with on-target toxicity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(9): 2105-2114.

[9] Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(2): 99-109.

[10] Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(2): 150845.

[11] Yue W, Zheng X, Lin Y, et al. Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21208-21224.

[12] Zhang T, Saghatelian A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(10): 1542-1554.

[13] Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, et al. New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 12862-12871.

[14] Han G, Gong H, Wang Y, et al. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(1): 77-87.

[15] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Caspase-3 and prosta-glandins signal for tumor regrowth in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2012, 31(23): 2805-2808.

[16] Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98207.

[17] 马华妹, 乔宗旭, 赵贵芬, 等. 二甲双胍对子宫内膜异位症在位内膜细胞增殖与凋亡的影响 [J/CD]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2014, 10(5): 652-657.

[18] 黄文君, 陈健, 田晶. 二甲双胍抑制 Foxp3 的表达诱导乳腺癌细胞凋亡 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(28): 3749-3752.