

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.003

二甲双胍对低级别非侵袭性膀胱肿瘤细胞增殖的影响*

苗 帅 张光远 琚官群 邹翔宇 顾 迪 朱英坚[△]

(上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 201600)

摘要 目的:初步探讨降糖药物二甲双胍对膀胱肿瘤细胞 253J 的作用及其相关作用机制。**方法:**采用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒分析二甲双胍对膀胱肿瘤细胞增殖的影响。应用流式细胞仪检测二甲双胍对细胞周期及凋亡的影响。并通过免疫印迹方法检测相关蛋白确定可能参与其中的信号分子。**结果:**在各时间点(24 小时,48 小时,72 小时)二甲双胍处理组与对照组相比膀胱肿瘤细胞的增殖受到明显抑制($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与对照组比较,二甲双胍处理组 G0/G1 期细胞比例上升,S 期细胞比例下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$);免疫蛋白印迹发现,二甲双胍处理组中的磷酸化 AMP 激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)表达升高,同时细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论:**体外实验中二甲双胍能够明显抑制膀胱肿瘤细胞的增殖,通过下调 cyclin D1 的表达诱导细胞周期停滞于 G0/G1 期。这些结果表明二甲双胍可能成为治疗膀胱癌的潜在药物。

关键词:二甲双胍;膀胱癌;AMP 激活的蛋白激酶;细胞周期;细胞周期蛋白 D1

中图分类号:R737.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)12-2209-04

Effects of Metformin on the Proliferation of Noninvasive Low-grade Bladder Cancer Cells*

MIAO Shuai, ZHANG Guang-yuan, JU Guan-qun, ZOU Xiang-yu, GU Di, ZHU Ying-jian[△]

(Department of Urology Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201600, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the effects of metformin on human bladder cancer cell line 253J and its underlying mechanisms. **Methods:** Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to investigate the effects of metformin on 253J cells growth. Flow cytometry was used to evaluate the cell cycle changes after metformin treatment. The possible signaling molecules involved in this process were determined by immunoblot analysis of various proteins. **Results:** In 24 h, 48 h, and 72 h, the proliferation of bladder cancer cells was significantly inhibited compared with that in control group ($P<0.01$ or $P<0.05$); Compared with control group, a significant increase was observed in the percentage of cells in the G0/G1 phases. In parallel, there was a reduction in the percentage of cells in the S and G2/M phases ($P<0.01$ or $P<0.05$). Western blot analysis found that the expression of phosphorylated AMP-activated protein kinase (AMP-activated protein kinase, AMPK) increased, while the expression of cyclin D1 decreased in metformin-treated group. ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion:** Metformin can induce G0/G1 cell cycle arrest and inhibit 253J cells proliferation in vitro, suggesting that metformin may be a potential therapeutic drug for the treatment of human bladder cancer.

Key words: Metformin; Bladder cancer; AMPK; Cell cycle; CyclinD 1

Chinese Library Classification (CLC):R737.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2209-04

前言

膀胱癌是最常见的泌尿系统肿瘤,同时也是美国成年男性因癌症致死的重要原因之一^[1]。约 70% 的膀胱癌患者病变局限于粘膜及粘膜下层,但其中 50%-70% 的患者会复发,且 10%-20% 的患者会侵犯固有肌层。多数膀胱癌对顺铂联合化疗药物敏感,但其应用受限于患者年龄、健康状态、基础疾病、肾脏功能等因素,且 5 年生存率仅有 26%^[2,3]。目前膀胱癌的治疗方案因其较低的安全性并不让人满意,一种新的具有较少毒副作用的治疗药物迫在眉睫。

二甲双胍是临床上广泛应用的双胍类降糖药物,主要用于

治疗 2 型糖尿病。它可以提高葡萄糖利用率,减少肝葡萄糖生产和游离脂肪酸的利用率,增加胰岛素敏感性。但本药无刺激胰岛素分泌作用,对正常人无明显降血糖作用,2 型糖尿病患者单用本药时一般不引起低血糖,引起乳酸性酸中毒的危险性小,较为安全。流行病学研究显示,与其他降糖药物相比,二甲双胍确实能够降低 2 型糖尿病患者的肿瘤发生率及肿瘤相关病死率^[4]。最近的一些研究也显示,二甲双胍同样抑制膀胱癌细胞系 T24 和 5637 的增殖^[5],但是在低级别膀胱肿瘤方面,对于非侵袭性膀胱癌细胞系中的研究还较少。目前最新报告显示,对于非肌层浸润膀胱癌患者的临床资料随访,发现同时患有糖尿病的膀胱肿瘤患者使用二甲双胍可减低肿瘤复发的风险^[6]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170642)

作者简介:苗帅(1987-),男,硕士研究生,电话:18817821668,E-mail:msdiyi@163.com

△ 通讯作者:朱英坚,博士生导师,主任医师,电话:(021)37798597,E-mail:zhuyingjian_sjtu@126.com

(收稿日期:2014-08-07 接受日期:2014-08-29)

但是具体机制仍不清楚。

因此,本实验采用低级别非侵袭性膀胱肿瘤细胞系 235J 作为研究对象,观察二甲双胍对低级别非侵袭性膀胱肿瘤细胞系 235J 增殖的影响作用并初步探讨其相关的分子作用机制,希望为临床中常见的低级别非侵袭性膀胱肿瘤的治疗带来一些帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱肿瘤细胞 253J 来自上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科。RPMI1640 培养基,胎牛血清购自 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒来自日本同仁化学研究所;二甲双胍试剂、抗 AMPK、cyclin D1 抗体来自 Abcam 公司,抗 pAMPK 来自 Cell Signaling Technology (CST)。其他试剂均国产。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖检测 采用 CCK-8 试剂盒对 253J 细胞增殖进行检测。取对数期细胞接种于 96 孔板(2×10^3 细胞/孔),每孔 100 μ L 新鲜培养基,每组设 6 个复孔,置于培养箱 24 小时使其贴壁。细胞贴壁后,吸取培养基 PBS 液冲洗后,每孔各加入新鲜培养基稀释后的二甲双胍 100 μ L,浓度分别为 0.1、0.5、1、5、10 mM。药物作用 24、48 和 72 小时,PBS 液冲洗,每孔加入 100 μ L 培养基和 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。使用酶标仪检测在 450 nm 波长处的吸光度值(OD 值)。将未经二甲双胍处理的 253J 细胞设为对照组,同时以无细胞的培养基为空白对照组。各组减去空白对照 OD 值后计算细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期 采用流式细胞术分析二甲双胍对 253J 细胞周期的影响。将细胞培养于六孔板(4×10^4 细胞/孔)以不同浓度二甲双胍(0.5 mM)处理 48 小时。胰蛋白酶消化收集处理后细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,以 70% 冰乙醇重悬后过夜。上机分析前,PBS 洗涤细胞,用含 50 μ g/mL 碘化丙锭,

0.1 % Triton X-100 和 50 μ g/mL RNA 酶的 PBS 重悬,室温下孵育 30 分钟,尼龙网过滤。采用 FACSCalibur 流式细胞分析仪上机检测,ModFit 软件进行分析。

1.2.3 蛋白提取与蛋白印记分析 253J 细胞接种于六孔板加入新鲜 RPMI1640 培养基培养 12 小时后,更换为含不同浓度二甲双胍 (0.5 mM) 培养基处理 48 小时。收集 253J 细胞,用 PBS 洗涤 3 次,在冰上用 100 mL 含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液裂解细胞。收集细胞裂解物,10303 $\times$ g 下离心 15 分钟。使用 BCA 蛋白测定法测定蛋白质浓度。各样品总蛋白在 8 %-10 % SDS-PAGE 凝胶进行电泳并转移到硝酸纤维素膜上。使用 5 % 脱脂奶粉溶于含有 0.1 % Tween 20 的 Tris 缓冲液 (TBST) 室温下封闭 1 小时,加一抗 (AMPK、pAMPK、cyclin D1) 孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 冲洗后,加辣根过氧化物标记的二抗室温下孵育 1 小时,然后用 ECL 化学发光系统进行检测。

1.3 统计学分析

结果用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。各组之间采用 t 检验或方差分析,采用 SPSS 统计学软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制膀胱肿瘤细胞的增殖

为了确定二甲双胍是否会影响人类膀胱癌细胞的增殖。在体外实验中,我们分析了药物对膀胱癌细胞系 253J 的作用。细胞生长于含 10 % 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,以不同药物浓度处理 24、48 和 72 小时后,通过 CCK-8 检测细胞增殖抑制情况。实验结果表明,二甲双胍处理组与对照组比较细胞增殖均受到明显抑制($*P < 0.05$ 或 $**P < 0.01$)。如图 1A 所示,各浓度 (0.1、0.5、1、5、10 mM) 增殖抑制率分别为 $(14.20 \pm 5.36)\%$ 、 $(23.44 \pm 8.33)\%$ 、 $(33.27 \pm 9.27)\%$ 、 $(46.00 \pm 6.28)\%$ 和 $(65.19 \pm 7.69)\%$ 。这些结果表明,二甲双胍通过时间和剂量依赖的方式抑制膀胱癌细胞的增殖。

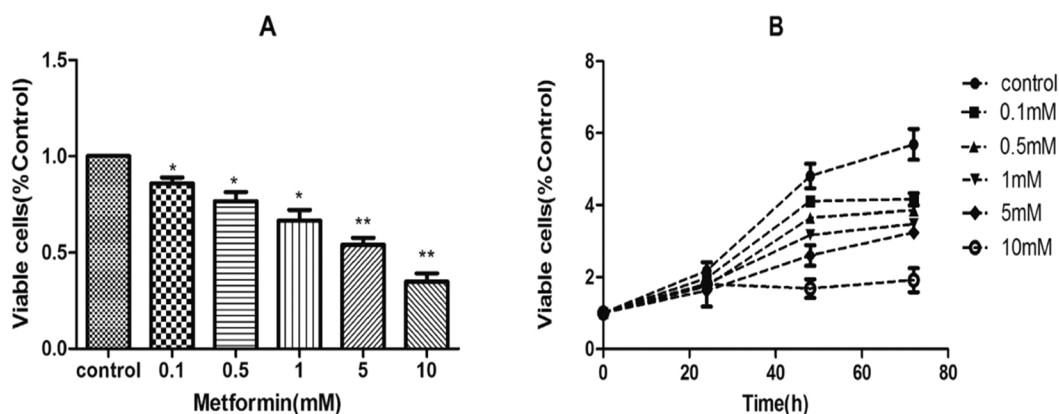


图 1 二甲双胍抑制膀胱肿瘤细胞的增殖

Fig. 1 Metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells

2.2 二甲双胍诱导膀胱肿瘤细胞出现 G0/G1 周期阻滞

通过流式细胞仪进一步检测二甲双胍对细胞周期进程的影响。以不同浓度二甲双胍(0.5 mM)处理 253J 细胞 48 小时后检测细胞周期变化。如图 2 所示,与对照组(图 2A)相比,二

甲双胍处理过的细胞(图 2B)中,G0/G1 期的细胞比例由 $(58.72 \pm 1.96)\%$ 上升至 $(71.82 \pm 2.86)\%$ ($P < 0.01$)。与此相反,S 期细胞比例由 $(36.72 \pm 5.23)\%$ 下降至 $(22.63 \pm 2.07)\%$ ($P < 0.05$)。这些结果表明二甲双胍诱导膀胱癌细胞出现 G0/G1 细胞

周期阻滞。

2.3 二甲双胍激活膀胱癌细胞中的 AMPK 并下调 cyclin D1 蛋白的表达

为了探讨二甲双胍抑制膀胱癌细胞增殖的潜在机制,我们利用蛋白印迹方法检测相关蛋白的表达情况。以往实验表明,二甲双胍可激活多种肿瘤细胞的 AMPK 来抑制其增殖^[5,17]。于

是,我们检测二甲双胍处理过的 253J 细胞是否也出现 AMPK 的激活。与此同时,对细胞周期中 G0/G1 期的关键蛋白 cyclin D1 进行检测。如图 3 所示,与对照组相比较,5 mM 二甲双胍处理过的细胞其 pAMPK 表达升高(* $P<0.05$),并且 cyclin D1 蛋白表达下调(** $P<0.01$)。

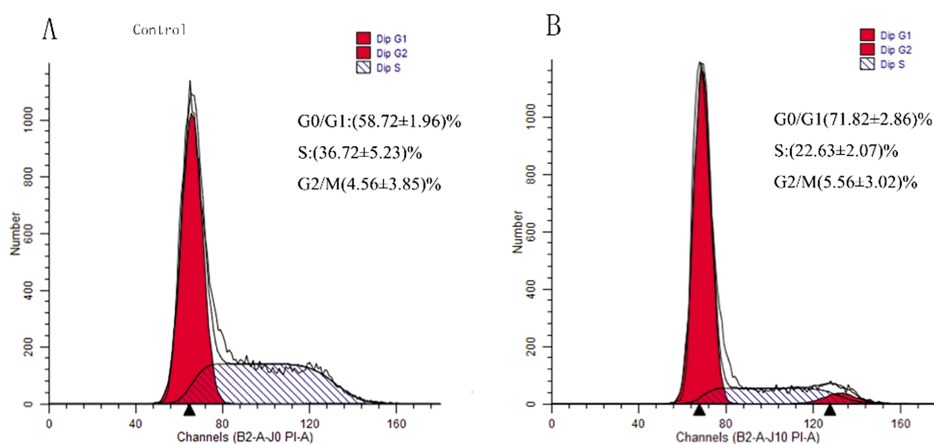


图 2 二甲双胍阻滞细胞周期于 G0/G1 期

Fig. 2 Metformin blocks the cell cycle in G0/G1 phases

注:A:对照组;B:二甲双胍处理组。

Note: A: Control group; B: Metformin-treated group.

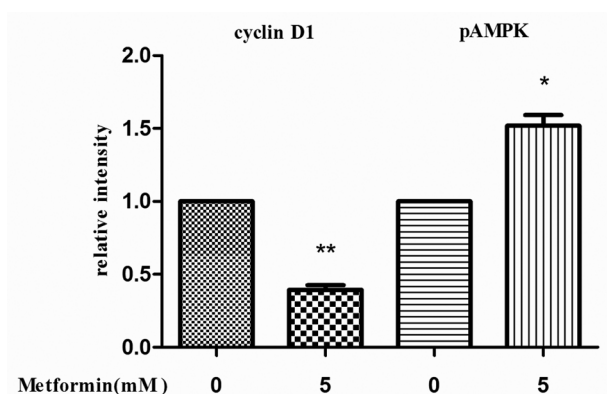
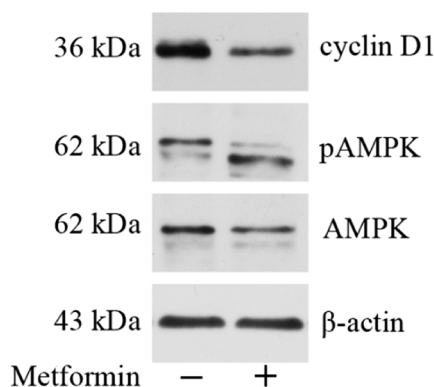


图 3 蛋白分析印迹分析周期相关蛋白

Fig. 3 Western blot analysis of related cell cycle proteins

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control group.

3 讨论

二甲双胍是一种用于治疗 2 型糖尿病的口服药物,具有高效低毒副作用的优势。在本次体外实验中,采用低级别膀胱肿瘤细胞系 253J,以此观察二甲双胍对低级别非侵袭型膀胱肿瘤的影响。我们发现了二甲双胍对低级别膀胱肿瘤细胞系 253J 的抑增殖作用且具有浓度和时间依赖性。这些结果表明二甲双胍对膀胱癌具有抗肿瘤作用。

流行病学研究显示,二甲双胍可以降低肿瘤发生危险及相关病死率^[4],实验证明在体内、体外二甲双胍对多种肿瘤具有抑制其细胞增殖的作用,如卵巢癌^[7]、前列腺癌^[8]、胃癌^[9]、肝癌^[10]等。在前列腺癌和胰腺癌细胞中,二甲双胍通过下调 cyclin D1 的表达将细胞周期阻滞于 G0/G1 期,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[8,11]。在低级别膀胱肿瘤中,cyclin D1 的表达下调对于二甲双胍发挥抗肿瘤效应可能也是必需的。有报告指出,cyclin D1 基因(CCND1)在多种肿瘤中包括膀胱肿瘤存在表达增强和/或过表达的现象^[12,13]。cyclin D1 的过表达通常出现在低级别高分化的膀胱癌组织中,且与浅表型膀胱癌的早期复发相关^[14,15]。我们的研究发现,二甲双胍可通过下调 cyclin D1 的表达使细胞周期阻滞于 G0/G1 期,进而抑制低级别非侵袭性膀胱癌细胞的增殖。因此,cyclin D1 表达的下调可能成为二甲双胍治疗膀胱癌尤其是低级别膀胱肿瘤中重要的分子靶点之一。

我们的研究还发现,二甲双胍激活了 253J 细胞中的 AMPK。AMPK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,作为细胞能量传感器在真核细胞中起着维持能量平衡的作用。当面临细胞能量水平降低和 AMP/ATP 比率升高的情况下,AMPK 可被激活而抑制细胞增殖和生物合成。AMPK 途径的失活可能在肿瘤细胞的异常增殖中发挥重要作用,研究者已经发现 AMPK 在乳腺

癌中存在功能障碍^[6]。因此, AMPK 的激活也成为抗癌治疗的新兴策略。研究者已经证实, 在乳腺癌细胞中, 二甲双胍正是通过 AMPK 的激活来发挥抗增殖作用的, 采用 RNA 干扰技术沉默 AMPK($\alpha 1$ 亚基)或应用 AMPK 抑制剂可以解除二甲双胍诱导的抗增殖作用^[7]。研究者证实, 在膀胱肿瘤细胞系 T24 和 5637 中, 二甲双胍可激活 AMPK 抑制雷帕霉素靶蛋白活性从而抑制肿瘤细胞增殖^[8]。我们的实验也发现, 二甲双胍可以激活 253J 细胞中的 AMPK。AMPK 可以直接抑制雷帕霉素靶蛋白活性, 激活 P53, 促进脂肪酸合成从而发挥其抗增殖效应。但也有研究者发现二甲双胍在 AMPK 沉默的卵巢癌细胞中亦可发挥抗增殖作用^[7]。在前列腺癌细胞中二甲双胍亦可在不激活 AMPK 的情况下, 抑制雷帕霉素靶蛋白活性发挥抗肿瘤效应^[18]。这种差异可能是由于细胞种类的不同产生的, 具体原因需要进一步研究。

尽管存在有相当数量的侵袭性膀胱肿瘤细胞系, 但临床中诊断的膀胱癌类型大多数都属于低级别, 非侵袭性肿瘤。因此, 本实验中我们采用了低级别非侵袭性肿瘤细胞 -253J。经基因分析鉴定, 253J 细胞属于低级别, 非肌层侵袭性膀胱肿瘤细胞系, 并且其基因表达谱与肿瘤病人的长期生存率相关^[19,20]。

总之, 对于低级别非侵袭性膀胱肿瘤细胞, 二甲双胍可诱导 253J 细胞停滞于 G0/G1 期并抑制其增殖。由于临床中多数膀胱癌都属于低级别非侵袭性肿瘤, 因此这些结果可能更加具有临床价值。同时, 由于 cyclin D1 与浅表型膀胱癌的早期复发具有一定相关性, 我们将在未来的工作中对低级别膀胱癌的预防等做进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2013, 63(1): 11-30
- [2] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update[J]. European urology, 2011, 59(6): 997-1008
- [3] Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, et al. Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines [J]. European urology, 2011, 59(6): 1009-1018
- [4] Noto H, Goto A, Tsujimoto T, et al. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis [J]. PloS one, 2012, 7(3): e33411
- [5] Zhang T, Guo P, Zhang Y, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells in vitro and in vivo [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12): 24603-24618
- [6] Rieken M, Xylinas E, Kluth L, et al. Association of diabetes mellitus and metformin use with oncological outcomes of patients with non muscle invasive bladder cancer [J]. BJU international, 2013, 112(8): 1105-1112
- [7] Rattan R, Graham RP, Maguire JL, et al. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo[J]. Neoplasia, 2011, 13(5): 483-491
- [8] Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level[J]. Oncogene, 2008, 27(25): 3576-3586
- [9] Kato K, Gong J, Iwama H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo [J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(3): 549-560
- [10] Cai X, Hu X, Cai B, et al. Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G1/G0 phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 in vitro and in vivo[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2449-2457
- [11] 王琛琛, 施毕旻, 王勤, 等. 二甲双胍抑制人胰腺癌细胞株 Patu8988 的增殖[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(3): 234-236
- [12] Wang Chen-chen, Shi Bi-min, Wang Qin, et al. Metformin inhibits proliferation of human pancreatic cancer cell line Patu8988 [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2012, 28 (3): 234-236
- [13] Bringuier P, Tamimi Y, Schuurin E, et al. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification[J]. Oncogene, 1996, 12(8): 1747-1753
- [14] Schuurin E, Verhoeven E, Mooi W, et al. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas [J]. Oncogene, 1992, 7(2): 355-355
- [15] Shin K, Kong G, Kim W, et al. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers [J]. British journal of cancer, 1997, 75(12): 1788-1788
- [16] Tut V, Braithwaite K, Angus B, et al. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67[J]. British Journal of cancer, 2001, 84(2): 270
- [17] Hadad SM, Baker L, Quinlan PR, et al. Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 307-307
- [18] Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, et al. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells [J]. Cancer research, 2006, 66(21): 10269-10273
- [19] Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1[J]. Cancer Res, 2011, 71(13): 4366-4372
- [20] Dancik GM, Ru Y, Owens CR, et al. A framework to select clinically relevant cancer cell lines for investigation by establishing their molecular similarity with primary human cancers [J]. Cancer Res, 2011, 71(24): 7398-7409
- [21] Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, et al. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer [J]. J Urol, 1996, 156 (6): 1934-1940