



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.012
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3987.shtml

· 基础研究 ·

二甲双胍对人胆管癌 RBE 细胞的作用及其机制

黄为, 黄飞舟, 邓刚, 罗宏武, 聂晚频, 刘浚阳

(中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要

目的: 探讨二甲双胍对人肝胆管癌细胞的增殖、凋亡和细胞周期的影响及机制。

方法: 将人肝胆管癌 RBE 细胞分别用二甲双胍、Compound C (AMPK 抑制剂)、二甲双胍 + Compound C 处理, 以未处理的 RBE 细胞作为空白对照, 分别用 MTT 法检测细胞增殖、流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期、Western blot 检测细胞 AMPK/mTOR 通路蛋白的表达。

结果: 与空白对照组比较, 二甲双胍作用后的 RBE 细胞存活率降低; 细胞凋亡率升高; G_0/G_1 期比例增加, 而 S 期比例减少; 磷酸化 AMPK (p-AMPK) 蛋白表达上调, 而磷酸化 mTOR (p-mTOR) 蛋白表达明显下调, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。二甲双胍与 Compound C 联合作用 RBE 细胞后, 二甲双胍的上述作用均被取消, 各项指标与空白对照组差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。单独的 Compound C 作用 RBE 细胞后, 各项指标未见明显改变, 与空白对照组差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

结论: 二甲双胍能抑制人胆管癌 RBE 细胞的增殖、促进凋亡和细胞周期阻滞, 该作用可能其与激活 AMPK 从而抑制 mTOR 下游效应分子有关。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1072-1076]

关键词

胆管肿瘤; 二甲双胍; 环 AMP 依赖性蛋白激酶类; 细胞增殖; 细胞凋亡
中图分类号: R735.8

Effect of metformin on human cholangiocarcinoma RBE cells and its mechanism

HUANG Wei, HUANG Feizhou, DENG Gang, LUO Hongwu, NIE Wanpin, LIU Xunyang

(Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Corresponding author: HUANG Feizhou, Email: huangfeizhou@medmail.com.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of metformin on cell proliferation, apoptosis and cell cycle in human cholangiocarcinoma cells and the mechanism.

Methods: Human cholangiocarcinoma RBE cells were exposed to metformin, Compound C (AMPK inhibitor) or metformin plus Compound C respectively, using the untreated RBE cells as blank control. The cell proliferation was determined by MTT assay, apoptosis and cell cycle were measured by flow cytometry, and the expressions of proteins associated with AMPK/mTOR signaling pathway were detected by Western blot analysis, respectively.

Results: In RBE cells treated with metformin compared with blank control, the survival rate was decreased, apoptosis rate was increased, the ratio of G_0/G_1 cells was increased while ratio of S cells was decreased, and the phosphorylated AMPK (p-AMPK) level was increased while the phosphorylated mTOR (p-mTOR) was

收稿日期: 2014-03-04; 修订日期: 2014-07-08。

作者简介: 黄为, 中南大学湘雅三医院住院医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通信作者: 黄飞舟, Email: huangfeizhou@medmail.com.cn

decreased, and all differences had statistical significance (all $P < 0.05$). The above effects exerted by metformin were all abolished by the combination treatment of Compound C, and the differences in all tested indexes had no statistical significance compared with blank control group (all $P > 0.05$). All the indexes in RBE cells treated with Compound C alone had no statistical significance compared with blank control group (all $P < 0.05$).

Conclusion: Metformin can inhibit cell growth and promote apoptosis and cell cycle arrest in human cholangiocarcinoma RBE cells, and the mechanism may be associated with its activating AMPK and thereby suppressing mTOR downstream effector molecules.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(8):1072-1076]

KEYWORDS Bile Duct Neoplasms; Metformin; Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases; Cell Proliferation; Apoptosis

CLC number: R735.8

近年来, 众多临床研究发现, 二甲双胍可降低糖尿病患者多种肿瘤的发生率^[1-3], 基础研究也表明二甲双胍可抑制肿瘤细胞的增殖^[4], 缩小荷瘤裸鼠肿瘤体积^[5], 然而, 二甲双胍对胆管癌的生长增殖是否有相似的作用尚未见报道。本实验通过研究二甲双胍对胆管癌细胞增殖、凋亡、细胞周期以及信号通路相关蛋白表达的影响, 探讨二甲双胍抗肿瘤的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Compound C (AMPK 抑制剂) 和二甲双胍均由美国 Sigma Aldrich 公司生产; 人肝胆管癌细胞 RBE 购自中国科学院上海细胞库; RPMI 1640 细胞培养液、MTT 试剂、十二烷基硫酸钠 (SDS)、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和碘化丙啶 (PI) 均购自北京鼎国公司; 兔抗人 AMPK 抗体, 兔抗人磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体, 兔抗人 mTOR 抗体, 兔抗人磷酸化 mTOR (p-mTOR) 抗体均由 Assay Biotech 公司生产; 羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗由 Jackson 公司生产; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物技术有限公司; 新生牛血清为杭州四季青产品。

1.2 方法

1.2.1 二甲双胍实验浓度筛选 人肝胆管癌细胞株 RBE 培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 2~3 d 传一代。选取 5 个浓度梯度 (0、5、10、20、30 mmol/L) 的二甲双胍处理细胞, MTT 法检测细胞存活率 (具体步骤见 1.2.3), 根据结果选择存活率在 50% 左右的二甲双胍浓度进行下面的分组实验。

1.2.2 实验分组 将 BE 细胞分别用二甲双胍、Compound C (20 μmol/L)、二甲双胍+Compound C 处理, 以未处理的 RBE 细胞作为空白对照组。

1.2.3 MTT 检测细胞存活率 以 5×10^3 /孔接种细胞于 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔, 根据要求加入不同药物, 24、48、72 h 后, 加入 MTT 溶液, 4 h 后终止培养, 加入 DMSO, 震荡 10 min, 测量吸光值。细胞存活率计算方法: 细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (空白对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) × 100%。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的说明进行操作。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 收集细胞, 离心去上清液, 加入 70% 预冷乙醇, 4 °C 固定 18 h, 离心去上清液, 加入 RNA 酶 (50 μg/mL) 10 μL 每孔和碘化丙啶 (50 μg/mL) 300 μL 每孔, 震荡混匀, 室温避光 30 min, 流式细胞仪检测。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达量 收集细胞, 加入适量的细胞裂解液, Bradford 法测定蛋白样品浓度, 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后进行转膜, 封闭, 孵育一抗, 二抗, 按 ECL 试剂盒说明书进行显色, 显影, 定影。应用 IPP 6.0 软件对 Western blot 结果进行灰度扫描和分析。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析比较各组间差异; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍实验浓度筛选

MTT 检测结果显示, 随着二甲双胍浓度的增

大,胆管癌 RBE 细胞的存活率呈下降趋势(图 1),20 mmol/L 二甲双胍组在作用 48 h 和 72 h 存活率均在 50% 左右,故选择 20 mmol/L 二甲双胍浓度进行后续实验。

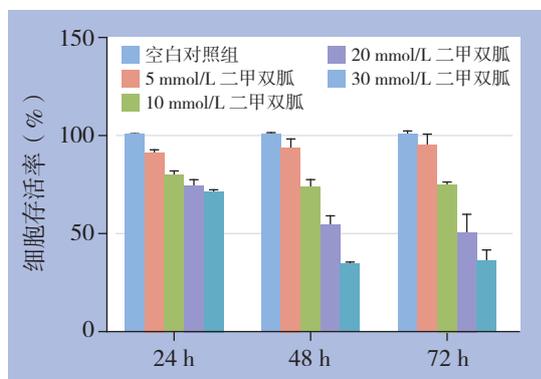


图 1 二甲双胍对胆管癌细胞存活率的影响

Figure 1 Effect of metformin on survival rate of cholangiocarcinoma cells

2.2 二甲双胍抑制 RBE 细胞增殖

MTT 测定结果显示,20 mmol/L 二甲双胍处理胆管癌 RBE 细胞后,细胞存活率较空白对照组明显下降($P < 0.05$),并呈一定时间依赖趋势;二甲双胍被 Compound C 所取消,二甲双胍 + Compound C 组细胞的存活率与空白对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$);单独的 Compound C 对胆管癌 RBE 细胞的存活率无明显影响,与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2)。

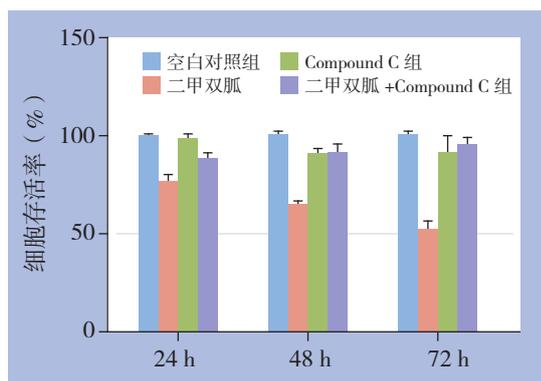


图 2 各组胆管癌细胞存活率比较

Figure 2 Comparison of the survival rates among groups of cholangiocarcinoma cells

2.3 二甲双胍对胆管癌 RBE 细胞周期的影响

流式细胞术细胞周期分析结果显示,二甲双胍处理后 G_0/G_1 期细胞数量明显增多, S 期细胞数量明显减少,与空白对照组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),而 G_2 期细胞数量无明显变化。

二甲双胍 + Compound C 组中, G_0/G_1 期细胞较二甲双胍组明显减少, S 期细胞较二甲双胍组明显增多,与二甲双胍组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),而与空白对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。单独的 Compound C 对胆管癌 RBE 细胞的细胞周期无明显影响,与空白对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 各组胆管癌细胞细胞周期情况 (%)

Table 1 Distributions of cell cycle on each group of cholangiocarcinoma cells (%)

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2 期
空白对照组	26.24 ± 3.59	67.08 ± 6.38	6.68 ± 8.50
二甲双胍组	71.30 ± 2.70 ¹⁾	25.30 ± 2.10 ¹⁾	3.39 ± 3.99
Compound C 组	38.02 ± 5.74	54.61 ± 6.02	7.37 ± 4.24
二甲双胍 + Compound C 组	39.95 ± 6.60 ²⁾	46.56 ± 2.00 ²⁾	13.48 ± 4.61

注: 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与二甲双胍组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. metformin treatment group

2.4 二甲双胍对胆管癌 RBE 细胞凋亡率的影响

流式细胞术分析结果显示,二甲双胍组细胞早期凋亡率明显增加,与空白对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$),而二甲双胍 + Compound C 组与空白对照组之间早期凋亡率无明显差异($P > 0.05$),单独 Compound C 对细胞凋亡无明显影响,与空白对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

表 2 各组胆管癌细胞早期凋亡率比较 (%)

Table 2 Comparison of early apoptosis rates among groups of cholangiocarcinoma cells (%)

组别	凋亡率
空白对照组	0.93 ± 0.52
二甲双胍组	6.43 ± 0.55 ¹⁾
Compound C 组	1.35 ± 0.18
二甲双胍 + Compound C 组	1.74 ± 0.42 ²⁾

注: 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与二甲双胍组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. metformin treatment group

2.5 二甲双胍对胆管癌 RBE 细胞内蛋白表达的影响

Western blot 检测 AMPK、p-AMPK、mTOR 和 p-mTOR 的表达,结果显示,二甲双胍处理细胞后,细胞内 p-AMPK 表达明显上调, p-mTOR 表达水平明显下调(均 $P < 0.05$);二甲双胍

+Compound C 组 p-AMPK 的表达量较二甲双胍组相明显降低, p-mTOR 的表达量明显上调, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 但各蛋白的表达量与

空白对照组的差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); Compound C 组各蛋白的表达量与空白对照组的差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 3)。

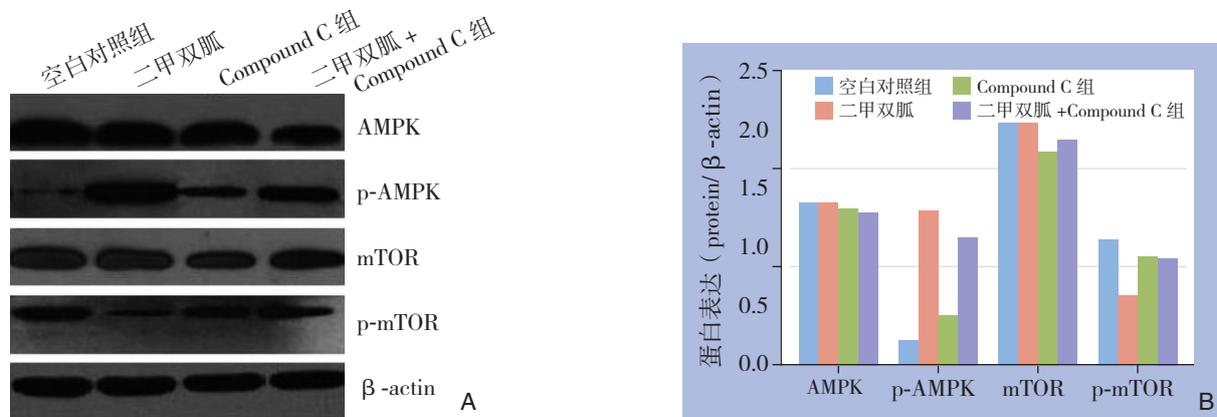


图 3 各组胆管癌 AMPK/mTOR 通路蛋白表达水平 A: Western blot 检测蛋白表达水平; B: Western blot 条带灰度分析
Figure 3 Expressions of proteins in AMPK/mTOR pathway in each group of cholangiocarcinoma cells A: Protein expression levels determined by Western blot; B: Gray value analysis for quantification of the bands

3 讨论

手术切除是目前最主要的治疗胆管癌方法, 但是, 在现有的条件下, 手术病死率仍然很高, 且许多胆管癌患者发现时已是晚期, 无法进行手术切除。同时, 胆管癌对化疗极不敏感, 5-FU、吉西他滨等是最常用的化疗药物, 一些研究^[6-7]显示辅助化疗并不会对胆管癌患者生存率产生影响。近年来, 大量临床研究发现, 使用二甲双胍治疗的糖尿病患者, 其肿瘤发生率和癌症致死率均明显降低^[8]。体外研究发现二甲双胍对乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌、喉癌等多种肿瘤均有生长抑制作用^[9-13]。

本课题研究表明二甲双胍可抑制胆管癌 RBE 细胞的增殖和诱导细胞凋亡, 促进 p-AMPK 表达增加和 p-mTOR 表达下降, 而 Compound C 作为 AMPK 的抑制剂, Compound C 可以阻断二甲双胍上述作用。以往研究^[14-15]显示 mTOR 在肿瘤细胞的增殖、迁移、血管生成等方面都发挥重要的调控作用, 多种肿瘤细胞中, mTOR 信号通路均不同程度活化, 而 AMPK 激活后可通过 TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) 抑制 mTOR 的活性^[16-17]。这提示, 二甲双胍可能通过激活 AMPK 继而抑制 mTOR 信号通路活化, 最后抑制胆管癌 RBE 细胞生长。

胆管癌细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路处于

活化状态^[18], Wang 等^[19]研究显示肝内胆管癌患者 mTOR 活性明显增高, Chung 等^[20]分析了 221 例肝外胆管癌患者中与预后相关蛋白的表达情况, 结果表明, 胆管癌患者中磷酸化的 Akt 和 mTOR 均显著增加。体外细胞培养发现雷帕霉素可以通过抑制 mTOR 信号通路抑制胆管癌细胞系的增殖^[21]。因此, 靶向 mTOR 及其相关信号通路可能是重要的潜在治疗胆管癌的化疗方法。

参考文献

- [1] Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(9):1620-1625.
- [2] Chen HF, Chen P, Li CY. Risk of malignant neoplasms of liver and biliary tract in diabetic patients with different age and sex stratifications[J]. *Hepatology*, 2010, 52(1):155-163.
- [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] 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.
- [5] Liu B, Fan Z, Edgerton SM, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(13):2031-2040.
- [6] Yi B, Zhang BH, Zhang YJ, et al. Surgical procedure and prognosis of hilar cholangiocarcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004,

- 3(3):453-457.
- [7] Farhat MH, Shamseddine AI, Tawil AN, et al. Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(20):3224-3230.
- [8] Lega IC, Shah PS, Margel D, et al. The effect of metformin on mortality following cancer among patients with diabetes[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, [Epub ahead of print]
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Becker C, Jick SS, Meier CR, et al. Metformin and the risk of head and neck cancer: a case-control analysis[J]. Diabetes Obes Metab, 2014, [Epub ahead of print]
- [12] 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.
- [13] Bensimon L, Yin H, Suissa S, et al. The use of metformin in patients with prostate cancer and the risk of death[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, [Epub ahead of print]
- [14] Menon S, Manning BD. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors[J]. Oncogene 2008, 27(Suppl 2):S43-S51.
- [15] Monsalves E, Juraschka K, Tateno T, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway in the pathophysiology and treatment of pituitary adenomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(4):R331-R344.
- [16] Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival[J]. Cell 2003, 115(5):577-590.
- [17] Inoki K, Li Y, Zhu T, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(9):648-657.
- [18] Leelawat K, Leelawat S, Narong S, et al. Roles of the MEK1/2 and AKT pathways in CXCL12/CXCR4 induced cholangiocarcinoma cell invasion[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(10):1561-1568.
- [19] Wang Z, Zheng T, Wu Q, et al. Immunohistochemical analysis of the mTOR pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Neoplasma, 2012, 59(2):137-141.
- [20] Chung JY, Hong SM, Choi BY, et al. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(2):660-667.
- [21] Okada T, Sawada T, Kubota K. Rapamycin inhibits growth of cholangiocarcinoma cells[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(89):6-10.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式：黄为，黄飞舟，邓刚，等. 二甲双胍对人胆管癌 RBE 细胞的作用及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1072-1076. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.012
Cite this article as: HUANG W, HUANG FZ, DENG G, et al. Effect of metformin on human cholangiocarcinoma RBE cells and its mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(8):1072-1076. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.012

本刊 2014 年下半年各期重点内容安排

本刊 2014 年各期重点内容安排如下，欢迎赐稿。

第 7 期 肝脏外科基础与临床

第 8 期 胆道肿瘤及内镜技术

第 9 期 胰腺肿瘤及胰腺外科

第 10 期 胃肠道肿瘤及其转移癌的外科治疗

第 11 期 乳腺肿瘤整复外科技术及内分泌外科

第 12 期 血管外科动静脉疾病及其他

中国普通外科杂志编辑部