

二甲双胍对胰腺癌 BxPC-3 细胞恶性表型的影响[△]

黄志铨*, 王振文, 朱亮[#](南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)02-0202-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.02.14

摘要 目的:探索二甲双胍对胰腺癌 BxPC-3 细胞恶性表型的影响。方法:以 *Smad4* 基因天然缺失型人胰腺癌 BxPC-3 细胞为对象,采用 CCK-8 法和流式细胞术分别检测不同剂量二甲双胍(5、10、20 mmol/L)作用 24 h 后的细胞增殖和凋亡情况,并计算细胞存活率和凋亡率;采用 Transwell 迁移试验检测不同剂量二甲双胍(10、20 mmol/L)作用 24 h 后的细胞迁移情况,记录迁移细胞数;采用实时定量聚合酶链反应法和 Western blotting 法分别检测细胞中钙黏着蛋白 E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、补体反应基因 32(RGC-32)的 mRNA 及蛋白表达情况。结果:与对照组和 5 mmol/L 二甲双胍组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞的存活率均显著降低,凋亡率均显著升高,且 20 mmol/L 二甲双胍组细胞的凋亡率显著高于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$)。与对照组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组迁移细胞数均显著减少,且 20 mmol/L 二甲双胍组显著少于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$);10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 E-cadherin mRNA 及其蛋白的相对表达量均显著升高,且 20 mmol/L 二甲双胍组 E-cadherin mRNA 的相对表达量显著高于 10 mmol/L 二甲双胍组;10 mmol/L 二甲双胍组细胞中 Vimentin mRNA, 20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 Vimentin mRNA 及其蛋白以及 10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 RGC-32 mRNA 及其蛋白的相对表达量均显著降低,且 20 mmol/L 二甲双胍组 Vimentin mRNA 及其蛋白、RGC-32 mRNA 的相对表达量均显著低于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:二甲双胍可剂量依赖性地通过 *Smad4* 非依赖性通路抑制 BxPC-3 细胞的增殖和迁移,促进其凋亡,这可能与胰腺癌细胞上皮间质转化过程以及 RGC-32 表达受到抑制有关。

关键词 二甲双胍;胰腺癌;BxPC-3 细胞;增殖;凋亡;上皮间质转化;补体反应基因 32

Effects of Metformin on the Malignant Phenotype of Pancreatic Cancer BxPC-3 Cells

HUANG Zhiquan, WANG Zhenwen, ZHU Liang (Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of metformin on malignant phenotype of pancreatic cancer BxPC-3 cells. **METHODS:** Using human pancreatic cancer BxPC-3 cells with natural deletion of *Smad4* gene as reaserch objects, CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of BxPC-3 cells after treated with different doses of metformin (5, 10, 20 mmol/L) for 24 h. The cell survival rate and apoptosis rate were calculated. Transwell assay was used to test the migration of cells after treated with different doses of metformin (10, 20 mmol/L) for 24 h. The number of migrating cells was recorded. qRT-PCR and Western blotting assay were performed to determine mRNA and protein expression of E-cadherin, Vimentin and RGC-32 in cells. **RESULTS:** Compared with control group and 5 mmol/L metformin group, survival rate of cells were decreased significantly in 10, 20 mmol/L metformin groups, while apoptosis rate was increased significantly; the apoptosis rate in 20 mmol/L metformin group was significantly higher than 10 mmol/L metformin group ($P < 0.05$). Compared with control group, the number of migrating cells was decreased significantly in 10, 20 mmol/L metformin groups, and the 20 mmol/L metformin group was significantly lower than 10 mmol/L metformin group ($P < 0.05$). Relative mRNA and protein expression of E-cadherin were increased significantly in 10, 20 mmol/L metformin groups, and relative mRNA expression of E-cadherin in 20 mmol/L metformin group was significantly higher than 10 mmol/L metformin group. Relative mRNA expression of Vimentin in 10 mmol/L metformin group, relative mRNA and protein expression of Vimentin in 20 mmol/L metformin group, relative mRNA and protein expression of RGC-32 in 10, 20 mmol/L metformin groups were decreased significantly; relative mRNA and protein expression of Vimentin as well as mRNA expression of RGC-32 in 20 mmol/L metformin group were significantly lower than 10 mmol/L metformin group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS:** Metformin can inhibit the proliferation and migration of pancreatic

[△] 基金项目:江西省青年科学基金资助项目(No.20171BAB215044);江西省教育厅科学技术研究项目(No.170006);江西省卫生计生委科技计划项目(No.20195082)

* 硕士研究生。研究方向:胰腺癌的侵袭和转移机制。电话:0791-88694228。E-mail:hzq4010@163.com

[#] 通信作者:副主任医师,硕士生导师,博士。研究方向:胰腺癌的侵袭和转移机制。电话:0791-88694228。E-mail:89493075@qq.com

cancer cells through smael-independent pathways in a dose-dependent manner, and promote their apoptosis, which is associated with the inhibition epithelial-mesenchymal transition and the expression of RGC-32 of pancreatic cancer.

KEYWORDS Metformin; Pancreatic cancer; BxPC-3 cell; Proliferation; Apoptosis; Epithelial-mesenchymal transition; RGC-32

胰腺癌是一种早期诊断困难、进展迅速、预后极差的消化系统肿瘤,患者的5年生存率不到10%^[1]。近年来流行病学研究显示,糖尿病是胰腺癌的危险因素之一^[2-3]。多项研究表明,二甲双胍作为治疗2型糖尿病的一线治疗用药,可显著降低糖尿病患者发生胰腺癌的风险,并可显著延长胰腺癌患者的生存期,但并不能改善晚期或转移性胰腺癌患者的预后^[4-7]。这提示二甲双胍可能对胰腺癌的早期治疗具有重要的临床意义。

目前学者普遍认为,上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是胰腺癌由早期发展至进展期的重要病理过程,其发生机制是目前研究的热点之一^[8]。研究显示,有多条通路参与了胰腺癌的EMT过程,目前研究最多的是转化生长因子 β (TGF- β)通路,该通路可通过其下游Smad依赖性和Smad非依赖性两种信号通路来诱导肿瘤细胞发生EMT^[9]。其中,Smad4基因是Smad依赖性信号通路中的关键调节因子,也被认为是一种重要的抑癌因子^[10];同时,相关研究指出,超过半数的胰腺癌患者存在Smad4基因缺失或失活,且后者与患者预后不良密切相关^[11-12]。鉴于此,本研究拟通过检测不同剂量二甲双胍对Smad4基因天然缺失型胰腺癌BxPC-3细胞增殖、凋亡、迁移、EMT等生物学行为的影响,初步探讨该药对胰腺癌细胞上述恶性表型的影响及其基于Smad非依赖性通路的可能作用机制,以期为其抑制胰腺癌分子机制的阐释以及胰腺癌治疗新靶点的挖掘提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Heal Force HFI51型CO₂培养箱、Heal Force Neofuge13R型台式冷冻离心机(上海力康医疗设备有限公司);ChemiDoc XRS+型超高灵敏度化学发光成像系统、T100型聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);StepOne型荧光定量PCR仪(美国ABI公司);CKX31-A12PHP型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);NovoCyte 2060R型流式细胞仪(美国ACEA Bio公司);RT-6100型酶标仪(美国Rayto公司);DYCP-31DN型电泳槽(北京六一仪器厂);THZ-98型温控摇床(江苏太仓创造电子有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸二甲双胍对照品(批号:D9351,纯度:≥98.0%,后文简称“二甲双胍”)、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液、胰蛋白酶(不含EDTA)、胎牛血清、结晶紫染色液均购自北京索莱宝科技有限公司;RPMI 1640完全培养液(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:KGM31800S-500);Trizol试剂、Ultrapure RNA超纯RNA提取试剂盒、HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒、UltraSYBR混合液、BCA蛋白定量试剂盒均购自北京康

为世纪生物科技有限公司;RIPA细胞裂解液(北京普利莱基因技术有限公司);超敏发光液(批号:RJ239676)、预染蛋白Marker(批号:26617)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CCK-8增殖检测试剂盒(日本Dojindo公司,批号:CK04);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号:AP101-100-kit);小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(内参,批号:TA-08)、山羊抗小鼠IgG二抗(批号:ZB-2305)、山羊抗兔IgG二抗(批号:ZB-2301)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔钙黏着蛋白E(E-cadherin)多克隆抗体(美国Bioss公司,批号:bs-1519R);兔波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(英国Abcam公司,批号:ab92547);兔补体反应基因32(RGC-32)多克隆抗体(美国OmnimAbs公司,批号:OM227971);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 上海帝博思生物科技有限公司);其余试剂均为市售分析纯,水为双蒸水。

1.3 细胞

人胰腺癌BxPC-3细胞由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

2 方法

2.1 细胞培养

将BxPC-3细胞接种至含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养液(以下简称“完全培养基”)中,置于37℃、5%CO₂培养箱(下同)中进行常规培养。

2.2 细胞增殖情况考察

采用CCK-8法检测。取对数生长期BxPC-3细胞,用PBS清洗2次,加入胰蛋白酶-EDTA消化液消化3 min,加入RPMI 1640完全培养液(以下简称“普通培养基”)适量,混匀,吹打,以1 000 r/min离心5 min;弃去上清液,加入普通培养基重悬,制成密度为1×10⁵个/mL的单细胞悬液,按每孔100 μL(即1×10⁴个/孔)接种至96孔板中,培养;待细胞生长融合至60%时,将其随机分为对照组和二甲双胍组(5、10、20 mmol/L,剂量设置参考文献[13]),每组设5个复孔。弃去培养液,对照组加入普通培养基100 μL,各给药组加入含相应药物的普通培养基100 μL,继续培养24 h;每孔加入CCK-8试剂10 μL,避光培养2 h后,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率。细胞存活率=(试验组平均OD值/对照组平均OD值)×100%。上述试验重复3次(下同)。

2.3 细胞凋亡情况考察

采用流式细胞术检测。按“2.2”项下方法配制密度为1×10⁴个/mL的单细胞悬液,按每孔2 mL(即2×10⁴个/孔)接种至6孔板中,培养;待细胞生长融合至60%时,将其

随机分为对照组和二甲双胍组(5、10、20 mmol/L),每组设5个复孔。弃去培养液,对照组加入普通培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的普通培养基2 mL,继续培养24 h;弃去上清液,用PBS清洗2次,用不含EDTA的胰蛋白酶消化后,以1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,细胞用PBS清洗2次,以1 000 r/min离心5 min,收集细胞(约 1.5×10^5 个)。用凋亡检测试剂盒中的Binding buffer试剂500 μ L重悬细胞,于暗室中依次加入Annexin V-FITC染液5 μ L、PI染液5 μ L,混匀,室温避光反应15 min,使用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

2.4 细胞迁移能力考察

采用Transwell迁移试验考察。按“2.2”项下方法配制密度为 2×10^6 个/mL的单细胞悬液,按每孔100 μ L(即 2×10^5 个/孔)接种至Transwell小室(即“上室”)中,将其随机分为对照组和二甲双胍组(10、20 mmol/L,剂量参考“2.2”“2.3”项下结果设置),于各组下室24孔板中加入含相应药物的普通培养基600 μ L,每组设3个复孔,培养24 h。取出小室,以PBS清洗后,用棉签擦拭除去底部内面未穿膜的细胞,用4%多聚甲醛溶液固定30 min后,以0.1%结晶紫染色液染色15 min。用PBS冲洗Transwell小室,并晾干、倒置。使用倒置相差显微镜观察,随机选取8个高倍视野($\times 200$),记录每个视野内的迁移细胞数(染成紫色者),取其平均值作为迁移细胞数。

2.5 相关基因mRNA表达情况考察

采用实时定量聚合酶链反应法(qRT-PCR)检测。按“2.2”项下方法配制密度为 1×10^4 个/mL的单细胞悬液,按每孔2 mL(即 2×10^4 个/孔)接种于6孔板中,培养,待细胞生长融合至60%时,将其随机分为对照组和二甲双胍组(10、20 mmol/L),每组设3个复孔。弃去培养液,对照组加入普通培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的普通培养基2 mL,继续培养24 h。采用Trizol试剂提取细胞总RNA,使用HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒将其逆转录为cDNA,再以GAPDH为内参,分别对E-cadherin、Vimentin、RGC-32编码基因进行实时定量PCR扩增。反应体系(共20 μ L):cDNA模板2 μ L,UltraSYBR混合液10 μ L,上、下游引物(序列见表1)各0.8 μ L,双蒸水6.4 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性60 s,95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法以Excel 2017软件计算各目标mRNA的相对表达量(Ct表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数)。

2.6 相关蛋白表达情况考察

采用Western blotting法检测。按“2.5”项下方法进行细胞接种、分组、给药,每组设3个复孔。培养24 h后,采用RIPA细胞裂解液裂解细胞,于4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min

表1 qRT-PCR引物序列

Tab 1 qRT-PCR primer sequence

基因	引物序列	引物长度, bp	产物长度, bp
E-cadherin	上游:5'-CTCACATTTCCCACTCTCT-3'	21	234
	下游:5'-TGCACCTTCAGCCATCCT-3'	19	
Vimentin	上游:5'-TGGATTCACCTCCCTCTGGT-3'	20	103
	下游:5'-TGATGCTGAGAAGTTTCGTG-3'	21	
RGC-32	上游:5'-GCGCTGCGAGTTGA-3'	17	220
	下游:5'-CTGGGGTAGAGTCTGTTGGAG-3'	21	
GAPDH	上游:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3'	20	224
	下游:5'-CCTGGAAGATGGTATGGG-3'	19	

离心10 min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白于100 $^{\circ}$ C变性后,取50 μ g进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后湿法转移至PVDF膜上,以5%胎牛血清于4 $^{\circ}$ C封闭过夜;加入相应一抗(GAPDH、E-cadherin、Vimentin、RGC-32)的稀释度分别为1:2 000、1:500、1:2 000、1:1 500,于室温摇床中孵育3 h;用TBST缓冲液清洗10 min \times 3次,加入二抗(GAPDH加入山羊抗小鼠IgG二抗,其余蛋白加入山羊抗兔IgG二抗,稀释度均为1:2 000),于室温摇床中孵育2 h;用TBST缓冲液清洗10 min \times 3次,以超敏发光液显色后,置于超高灵敏度化学发光成像系统中成像。采用Image J 1.8软件分析,以目标蛋白与内参GAPDH的灰度值比值来表示该蛋白的相对表达量。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。采用Kolmogorov-Smirnov检验进行正态分布分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验;不符合正态分布的计量资料以中位数 \pm 四分位数间距表示,采用Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 二甲双胍对BxPC-3细胞增殖的影响

与对照组比较,10、20 mmol/L二甲双胍组细胞存活率均显著降低,且显著低于5 mmol/L二甲双胍组($P < 0.05$);而5 mmol/L二甲双胍组细胞存活率与对照组比较,10、20 mmol/L二甲双胍组细胞存活率组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表2。

表2 二甲双胍对BxPC-3细胞增殖和凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 Effects of metformin on the proliferation and apoptosis of BxPC-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	细胞存活率, %	细胞凋亡率, %
对照组	100	3.63 \pm 0.25
5 mmol/L二甲双胍组	95.34 \pm 2.11	5.29 \pm 0.19
10 mmol/L二甲双胍组	82.77 \pm 3.52**	8.90 \pm 0.29**
20 mmol/L二甲双胍组	78.52 \pm 3.38**	24.98 \pm 0.87***

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与5 mmol/L二甲双胍组比较,[#] $P < 0.05$;与10 mmol/L二甲双胍组比较,[^] $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. 5 mmol/L metformin group, [#] $P < 0.05$; vs. 10 mmol/L metformin group, [^] $P < 0.05$

3.2 二甲双胍对 BxPC-3 细胞凋亡的影响

与对照组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞凋亡率均显著升高,且 10、20 mmol/L 二甲双胍组显著高于 5 mmol/L 二甲双胍组,20 mmol/L 二甲双胍组显著高于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$);而 5 mmol/L 二甲双胍组细胞凋亡率与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见图 1、表 2。

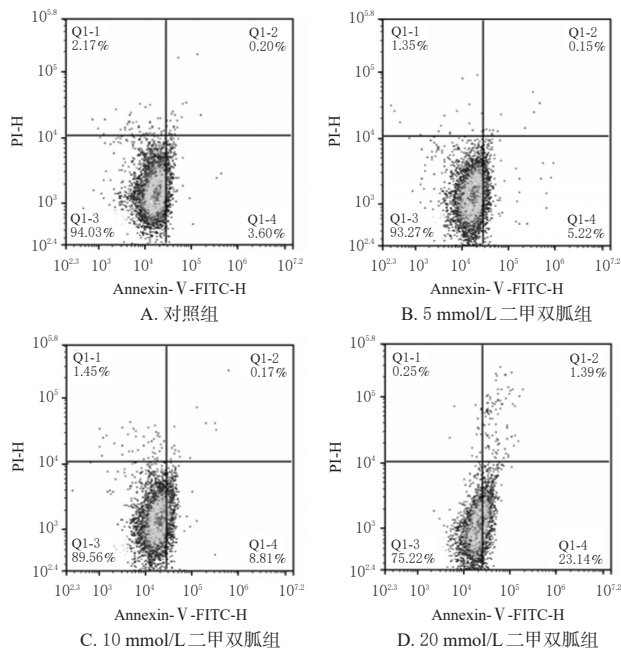


图 1 二甲双胍对 BxPC-3 细胞凋亡影响的流式细胞图
Fig 1 Flow cytograms of the effects of metformin on the apoptosis of BxPC-3 cells

3.3 二甲双胍对 BxPC-3 细胞迁移能力的影响

与对照组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组迁移细胞数均显著减少,且 20 mmol/L 二甲双胍组显著少于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$),详见图 2(图中,“箭头”所示为迁移细胞)、表 3。

3.4 二甲双胍对 BxPC-3 细胞中 E-cadherin、Vimentin、RGC-32 mRNA 表达的影响

与对照组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 E-cadherin mRNA 的相对表达量均显著升高,且 20 mmol/L 二甲双胍组显著高于 10 mmol/L 二甲双胍组; Vimentin、RGC-32 mRNA 的相对表达量均显著降低,且 20 mmol/L 二甲双胍组均显著低于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$),详见表 3。

3.5 二甲双胍对 BxPC-3 细胞中 E-cadherin、Vimentin、RGC-32 蛋白表达的影响

与对照组比较,10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 E-cadherin 蛋白的相对表达量均显著升高;20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 Vimentin 蛋白以及 10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞中 RGC-32 蛋白的相对表达量均显著降低,且 20 mmol/L 二甲双胍组 Vimentin 蛋白的相对表达量显著低于 10 mmol/L 二甲双胍组($P < 0.05$);而各给药组其

余指标组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图 3、表 4。

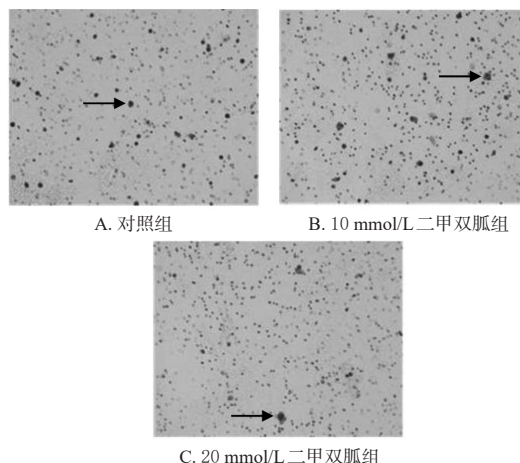


图 2 二甲双胍对 BxPC-3 细胞迁移能力影响的显微图 (结晶紫染色, $\times 200$)

Fig 2 Micrographs of the effects of metformin on migration ability of BxPC-3 cells (crystal violet staining, $\times 200$)

表 3 二甲双胍对 BxPC-3 细胞迁移能力及 E-cadherin、Vimentin、RGC-32 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 3 Effects of metformin on migration ability and mRNA expression of E-cadherin, Vimentin and RGC-32 in BxPC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	迁移细胞,个	mRNA 表达水平		
		E-cadherin	Vimentin	RGC-32
对照组	33.00 \pm 5.00	1.00	1.00	1.00
10 mmol/L 二甲双胍组	15.00 \pm 4.00*	2.11 \pm 0.09*	0.75 \pm 0.01*	0.65 \pm 0.01*
20 mmol/L 二甲双胍组	6.00 \pm 2.00 ^{*Δ}	3.74 \pm 0.16 ^{*Δ}	0.41 \pm 0.05 ^{*Δ}	0.32 \pm 0.01 ^{*Δ}

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 10 mmol/L 二甲双胍组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. 10 mmol/L metformin group, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

由于胰腺癌常用的化疗药(如吉西他滨等)疗效不佳、不良反应多,故寻找安全有效的抗肿瘤新药尤为重要^[14]。有研究表明,糖尿病与胰腺癌密切相关:一方面,长期罹患糖尿病的患者发生胰腺癌的风险增高;另一方面,随着胰腺癌的进展,患者糖尿病的发生率也会升高^[3]。二甲双胍是目前是降糖药物抗肿瘤作用研究的热点之一,但其抗肿瘤机制尚未阐明^[15]。本研究结果显示,与对照组比较,5 mmol/L 二甲双胍组 BxPC-3 细胞的增殖率和凋亡率均无明显变化,而 10、20 mmol/L 二甲双胍组细胞存活率则显著降低、凋亡率显著上升,且 20 mmol/L 二甲双胍组细胞的凋亡率显著高于 10 mmol/L 二甲双胍组。这提示,10、20 mmol/L 的二甲双胍可明显抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞的增殖并促进其凋亡,与 Nair

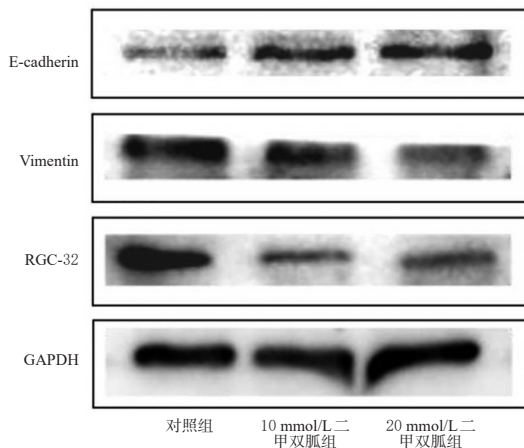


图3 二甲双胍对BxPC-3细胞E-cadherin、Vimentin、RGC-32蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophorograms of the effects of metformin on protein expression of E-cadherin, Vimentin and RGC-32 in BxPC-3 cells

表4 二甲双胍对BxPC-3细胞E-cadherin、Vimentin、RGC-32蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of metformin on protein expression of E-cadherin, Vimentin and RGC-32 in BxPC-3 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	E-cadherin	Vimentin	RGC-32
对照组	0.46 ± 0.08	0.97 ± 0.10	0.85 ± 0.12
10 mmol/L二甲双胍组	0.90 ± 0.11*	0.83 ± 0.15	0.58 ± 0.09*
20 mmol/L二甲双胍组	0.83 ± 0.16*	0.42 ± 0.06 [△]	0.61 ± 0.10*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与10 mmol/L二甲双胍组比较,[△] $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. 10 mmol/L metformin group, [△] $P < 0.05$

V等^[16]在Panc1、Panc28、L3.6pL等胰腺癌细胞株中的研究结果类似,但后者并未采用Smad4基因天然缺失型的BxPC-3细胞,本研究可作为上述研究的补充。

有研究显示,二甲双胍可能是通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)来抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(mTOR/PI3K/Akt)信号通路,进而抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡和自噬^[17-18]。Incio J等^[9]研究显示,二甲双胍可通过改善胰腺癌患者促炎微环境来延缓其疾病进展,而这一过程可能与EMT受到抑制有关。EMT是指在某些生理和病理状态下出现的上皮细胞向间质细胞转化的现象,主要表现为细胞极性丧失、黏性下降或消失、运动和侵袭能力增强;同时,细胞表型也发生了改变,E-cadherin等上皮表型标记分子表达逐渐减少,而Vimentin等间皮表型标记分子表达则逐渐升高^[20]。本研究结果显示,10、20 mmol/L二甲双胍组细胞迁移数均较对照组显著减少,且20 mmol/L二甲双胍组显著少于10 mmol/L二甲双胍组。这提示,二甲双胍可抑制胰腺癌BxPC-3细胞的侵袭和转移,且

呈剂量依赖性。此外,本研究结果还显示,10、20 mmol/L二甲双胍组细胞中E-cadherin蛋白及其mRNA表达水平均较对照组显著升高,且20 mmol/L二甲双胍组E-cadherin mRNA表达水平显著高于10 mmol/L二甲双胍组;10 mmol/L二甲双胍组细胞Vimentin mRNA以及20 mmol/L二甲双胍组细胞Vimentin蛋白及其mRNA表达水平均较对照组显著降低,且20 mmol/L二甲双胍组Vimentin蛋白及其mRNA表达水平均显著低于10 mmol/L二甲双胍组。这提示,二甲双胍可能通过抑制EMT来扼制胰腺癌细胞的侵袭和转移,且这种作用具有剂量依赖性,但具体机制尚有待后续研究予以完善。此外,由于BxPC-3细胞为Smad4基因天然缺失型胰腺癌细胞株,结合上述结果可知,二甲双胍对胰腺癌细胞EMT的抑制作用可能是通过Smad非依赖性通路完成的,提示该非依赖性通路可能对于胰腺癌的发生发展更为重要,值得进一步研究。

RGC-32作为诱导补体激活的反应因子,在包括胰腺在内的多种正常组织中均有表达,具有调控细胞周期、促进细胞分化、调节免疫等生物学功能^[21]。本课题组在前期研究中首次对RGC-32在胰腺癌进展中的作用进行了深入探讨。结果显示,RGC-32是胰腺癌的促癌因子,在胰腺癌组织中呈高表达,且可通过介导胰腺癌的EMT过程而促进肿瘤细胞的侵袭和转移;同时,这一作用并不依赖于Smad4基因,相反可通过Smad非依赖性通路实现^[22-25],但RGC-32在二甲双胍治疗胰腺癌中的作用如何尚未见相关报道。有研究表明,RGC-32与脂质代谢和胰岛素抵抗有关,该因子可介导高脂饮食诱导的肥胖,并在胰岛素抵抗机制中发挥重要作用^[26];同时,RGC-32可通过促进脂肪从头合成,从而诱导脂肪肝的形成^[27]。考虑到二甲双胍是通过改善胰岛素抵抗、调控脂质代谢来发挥降糖作用,故本课题组推测RGC-32很可能是二甲双胍的下游作用靶点之一。本研究结果显示,10、20 mmol/L二甲双胍组细胞中RGC-32蛋白及其mRNA的表达水平均较对照组显著降低,且20 mmol/L二甲双胍组RGC-32 mRNA的表达水平显著低于10 mmol/L二甲双胍组。这提示,二甲双胍可下调RGC-32的表达,该因子可能是二甲双胍发挥抑癌作用的靶点之一,但具体作用及相关信号通路机制有待进一步研究。

综上所述,二甲双胍可通过Smad非依赖性通路抑制BxPC-3细胞增殖和迁移,促进其凋亡,这可能与胰腺癌细胞EMT过程以及RGC-32表达受到抑制有关。但本研究尚存在不足之处,例如未设置阳性对照组与抗肿瘤药物进行比较等,故仍有待后续研究进一步完善。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics: 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1):7-30.
- [2] AGGARWAL G, KAMADA P, CHARI ST. Prevalence of

- diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers[J]. *Pancreas*, 2013, 42(2):198-201.
- [3] ELENA JW, STEPLOWSKI E, YU K, et al. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium[J]. *Cancer Causes Control*, 2013, 24(1):13-25.
- [4] CHOI Y, KIM TY, OH DY, et al. The impact of diabetes mellitus and metformin treatment on survival of patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy[J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48(1):171-179.
- [5] XIN W, FANG L, FANG Q, et al. Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: a meta-analysis[J]. *Mol Clin Oncol*, 2018, 8(3):483-488.
- [6] RENI M, DUGNANI E, CEREDA S, et al. (Ir)relevance of metformin treatment in patients with metastatic pancreatic cancer: an open-label, randomized phase II trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(5):1076-1085.
- [7] KORDES S, POLLAK MN, ZWINDERMAN AH, et al. Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(7):839-847.
- [8] RHIM AD, MIREK ET, AIELLO NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation[J]. *Cell*, 2012, 148(1/2):349-361.
- [9] DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958):577-584.
- [10] LEVY L, HILL CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor β (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(18):8108-8125.
- [11] BARDEESY N, DEPINHO RA. Pancreatic cancer biology and genetics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(12):897-909.
- [12] WILENTZ RE, IACOBUZIO-DONAHUE CA, ARGANI P, et al. Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7):2002-2006.
- [13] TONG D, LIU Q, LIU G, et al. Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE₂/STAT3 axis[J]. *Cancer Lett*, 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.031.
- [14] KAMISAWA T, WOOD LD, ITOI T, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10039):73-85.
- [15] WANG YW, HE SJ, FENG X, et al. Metformin: a review of its potential indications[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017. DOI:10.2147/DDDT.S141675.
- [16] NAIR V, PATHI S, JUTOORU I, et al. Metformin inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth and downregulates SP transcription factors[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(12):2870-2879.
- [17] GONG J, ROBBINS LA, LUGEA A, et al. Diabetes, pancreatic cancer, and metformin therapy[J]. *Front Physiol*, 2014. DOI:10.3389/fphys.2014.00426.
- [18] DE SOUZA A, KHAWAJA KI, MASUD F, et al. Metformin and pancreatic cancer: is there a role? [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(2):235-242.
- [19] INCIO J, SUBOJ P, CHIN SM, et al. Metformin reduces desmoplasia in pancreatic cancer by reprogramming stellate cells and tumor-associated macrophages[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0141392.
- [20] NIETO MA, HUANG RY, JACKSON RA, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166(1):21-45.
- [21] WANG Q, QU X. New insights into the roles of RGC-32[J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(8):803-804.
- [22] ZHU L, QIN H, ZHAO Q, et al. Response gene to complement-32 enhances metastatic phenotype by mediating transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line BxPC-3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012. DOI: 10.1186/1756-9966-31-29.
- [23] ZHU L, DING Y, ZHAO Q. Response gene to complement-32 mediates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition via Erk-p38-MAPK signaling pathways in human pancreatic cancer cell line BxPC-3[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(6):7135-7143.
- [24] ZHU L, ZHAO Q. Hypoxia-inducible factor I alpha participates in hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition vis response gene to complement 32[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1825-1831.
- [25] ZHU L, DING Y. RGC-32 induces transition of pancreatic cancer to epithelial mesenchyme in vivo[J]. *Pancreatolology*, 2018, 18(5):572-576.
- [26] CUI XB, LUAN JN, YE J, et al. RGC32 deficiency protects against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice[J]. *J Endocrinol*, 2015, 224(2):127-137.
- [27] CUI XB, LUAN JN, CHEN SY. RGC-32 deficiency protects against hepatic steatosis by reducing lipogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(33):20387-20395.

(收稿日期:2019-05-14 修回日期:2019-10-19)

(编辑:张元媛)