

二甲双胍对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭能力及乳酸生成的影响

谢建将,陈敏东,陈曲海,梁登峰,徐子迅,吕德雄,白文杰
(广州市第一人民医院,广东 广州 510180)

摘要:[目的]探讨二甲双胍对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭能力、乳酸生成的影响。[方法]应用 AnnexinV/PI 和 API 等标记,流式细胞仪对肺癌 A549 细胞凋亡及周期特异性的检测,运用 RT-PCR 的方法检测 Caspase-3、Caspase-9 活化情况。MTT 检测细胞增殖活力;Transwell 体外迁移实验检测细胞体外迁移和侵袭能力;并检测乳酸生成情况。[结果]二甲双胍诱导的细胞凋亡主要在细胞周期的 G₁ 期发生。采用二甲双胍诱导,对照组未做处理,结果显示观察组的 Caspase-3 mRNA (1.12±0.56)、Caspase-9 mRNA (1.10±0.29) 的表达值显著高于对照组(0.82±0.31,0.72±0.26)。Transwell 结果显示,第 7d 二甲双胍组体外迁移细胞数(2.69±0.56)明显增加;二甲双胍组细胞活力(52.39%±5.96%)下降;二甲双胍组乳酸生成(12.89±1.03)明显降低。[结论]二甲双胍诱导的细胞凋亡与肺癌 A549 细胞的细胞周期相关,存在 G₁ 期细胞周期阻滞的周期特异性,且此过程中发生了 caspase 活化,抑制细胞活性及迁移侵袭能力,降低乳酸的生成,促进肿瘤细胞凋亡。

关键词:二甲双胍;肺肿瘤;A549 细胞;细胞凋亡;细胞周期

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2018)04-0323-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2018.04.B007

The Effect of Metformin on Proliferation, Migration, Invasion and Lactic Acid Secretion of Lung Cancer A549 Cells

XIE Jian-jiang, CHEN Min-dong, CHEN Qu-hai, et al.
(Guangzhou No.1 People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

Abstract:[Objective] To observe the effect of metformin on proliferation, migration, invasion and lactic acid secretion of lung cancer A549 cells. [Methods] Apoptosis and specificity of lung cancer A549 cells were detected by Annexin V/PI and API. The activation of Caspase-3 and Caspase-9 by RT-PCR was detected by Flow cytometry. The cell viability was detected by MTT assay. The migration and invasion of cells in vitro was detected by Transwell migration assay. And the lactate secretion was detected. [Results] Metformin-induced apoptosis occurs mainly in the G₁ phase of the cell cycle. The expression of Caspase-3(1.12±0.56) and Caspase-9(1.10±0.29) mRNA in the observation group was significantly higher than those in the control group(0.82±0.31, 0.72±0.26). Transwell results showed that the number of cells migrating in the metformin group(2.69±0.56) was significantly increased on day 7; the cell viability 52.39%±5.96% decreased in the metformin group and the lactic acid production (12.89±1.03) in the metformin group was significantly decreased. [Conclusion] Metformin-induced apoptosis is related to the cell cycle of lung cancer A549 cells. There is a period-specificity of cell cycle arrest in G₁ phase, and Caspase activation occurs during the process, which inhibits cell activity and migration ability, reduces lactate secretion, involved in apoptosis.

Subject words: metformin; lung cancer; A549 cells; apoptosis; cell cycle

肺癌发病率和病死率均呈持续上升趋势,肿瘤在局部呈侵袭性生长并易发生转移,其中肺转移为其死亡的主要原因^[1,2]。细胞的存活和凋亡是生命的

矛盾统一现象,肿瘤的生长和凋亡都不能用细胞的周期和凋亡理论进行单独的完整解释,肿瘤是一类细胞增殖异常的病变,在这一过程中细胞的增殖和凋亡的调控通路受到了破坏。二甲双胍(metformin)是 2 型糖尿病患者口服的一线类降糖药物,通过降低外周组织对胰岛素的抵抗来抑制肝糖异生^[3]。二

通讯作者:谢建将,主治医师,硕士;广州市第一人民医院胸外科,广东省广州市越秀区盘福路 1 号(510180);E-mail:qianbaicao@163.com

收稿日期:2017-03-10; **修回日期:**2017-04-15

甲双胍已经作为潜在的抗癌药物成为研究的热点,二甲双胍对多种癌细胞株有明显的肿瘤抑制效应,在多种不同类型的肿瘤中有抗癌作用,但目前其对肺癌 A549 细胞株是否有抑制作用尚有待进一步研究^[4]。本项目的研究总体思路为通过体外试验,深入探讨二甲双胍促进肺癌 A549 细胞凋亡的效应及其分子机制;然后从整体水平验证研究二甲双胍抑制肺癌 A549 生长的信号机制,为二甲双胍治疗肺癌 A549 提供理论依据,为将其开发作为抗肺癌 A549 的新的治疗药物提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞与仪器

试剂:肺癌 A549 细胞株中国科学院细胞库,含血清的完全培养基及不含血清培养基(美国 GIBCO 公司),PCR 试剂盒(上海硕盟生物),异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白(武汉博士德),MTT 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Transwell 24 孔培养板(美国 Corning 公司),10cm² 培养皿、96 孔板(美国 Corning 公司),含 EDTA 的胰酶(美国 GIBCO 公司),凋亡相关基因 Bax(美国 Santa Cruz 公司)。仪器:细胞培养超净台(苏州净化),培养箱(美国 Queue systems),倒置相差显微镜(日本奥林巴斯),高转速冷冻离心机(德国 Biofuge Stratos),-80℃~4℃ 冰箱(日本松下),高压消毒箱(美国 Tuttnauer),FACSort 流式细胞仪(美国 BD 公司),PCR 仪(澳大利亚 Rotor-gene)。

1.2 细胞培养与传代

人肺癌 A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清及双抗的 DMEM 培养基中,置于 5%CO₂、37℃ 孵箱中传代培养。当细胞密度达到 4×10⁶ 以上时进行传代,清洗培养基后,用含 0.02% EDTA 的胰蛋白酶进行细胞消化,倒置显微镜观察细胞回缩即终止消化,加入同体积的有血清培养基,吹打,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,取细胞悬液,计数后接种到新的培养瓶中。本研究的所有实验均重复 3 次。

1.3 细胞处理

待细胞贴壁生长至 4×10⁶,当细胞处于对数生长期时予二甲双胍凋亡相关基因 Bax 刺激 14 h 后进行细胞收集,加入 tPA 刺激 U251 细胞,对照组未

加 tPA 刺激,然后加入 Bax(12.5μg/ml)的刺激 24h 后收集细胞。

1.4 RT-PCR(半定量逆转录聚合酶链反应)方法

取人肺癌 A549 细胞定量 100mg,提取总 RNA。取 2μg 总 RNA 行逆转录 cDNA,取 20μl 作为反应体系。PCR 反应由逆转录产物 2μl 以及 18s RNA 和 caspase-3、caspase-9 的引物共同组成。反应过程按照标准的 RT-PCR 进行:首先预变性的反应条件为 95℃、5min,接着进行梯度变性反应,94℃、30s,60℃、30s,72℃、60s,72℃、7min 递减,共进行 30 次的循环。然后对所得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,通过拍摄电泳图像对所得到的电泳结果进行凝胶成像分析系统分析。内参选择 18s RNA 作为参照,同样完成以上 PCR 系统的成像,对得到的半定量结果进行对比分析,通过量化的吸光度积分值进行分析(A 值)。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞的凋亡周期

采用 Annexin V/PI 的方法进行凋亡的检测,细胞离心去除培养基之后冷却至 4℃,进行细胞洗涤,调整浓度至 106/ml,取 100μl 的细胞悬液加入 Annexin V-FITC 和 PI,避光 15min 之后进行流式检测。

采用 API 的方法检测细胞的凋亡周期,对收集的细胞加入 Annexin V-FITC,室温避光 30min 以后用 buffer 进行洗涤 2 次,加入不换甲醇的甲醛 1ml 进行细胞固定,buffer 洗涤 2 次,加入 PI 染色剂,静置 1h 之后进行流式细胞的检测。

Cyclins/DNA 双标流式细胞仪分析人肺癌 A549 细胞的周期特异性,对收集的细胞采用乙醇固定过夜,将固定后的细胞用 PBS 冲洗 2 次,用 TritonX-100 处理 5min 2 次,用 PBS 清洗 2 次,用 BSA 稀释抗体,4℃过夜,第 2d 加用羊抗鼠 IgG,室温静置 20min, PBS 洗涤之后,加入 PI 和 RnaseA 进行 DNA 染色,进行流式细胞检测。

1.6 MTT 法检测细胞活力

将细胞接种于 96 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,给予二甲双胍 10μl,二甲双胍 NC。48h 后,加入 20μl 5mg/ml MTT,继续培养 4h 后吸弃培养液,每孔加入 150μl DMSO,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560nm 处测 OD 值,细胞相对活力(%)=(实验组 OD/对照组 OD 值)×100%。

1.7 Transwell 体外迁移体系

于种板前 1d,血清饥饿 12h,常规消化、离心收

集细胞,用低血清 DMEM 培养液(含 0.2% FBS)混悬成密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 的单细胞悬液。将 Transwell 培养池放入 24 孔培养板中,上室内加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液(约 5×10^4 细胞),下室内加入 $500 \mu\text{l}$ 含 10%FBS 的 DMEM 培养液。置于 5% CO_2 , 37°C 孵箱培养 24h 后, PBS 洗 2 次,用棉球小心擦去上室内细胞,4%多聚甲醛固定 20~30min, PBS 洗 2 次,0.1%结晶紫染色 30min, PBS 洗 2 次,去掉多余染料,显微镜下观察拍照。棉签吸掉多余水分,用 1%十二烷基硫酸钠(SDS) $500 \mu\text{l}$ 溶解细胞 30min。完全溶解后,取 $100 \mu\text{l}$ 细胞裂解液,放入 96 孔板细胞培养板中, 570nm 酶标仪测定吸光值。

1.8 乳酸生成检测

运用酶联免疫吸附法(ELISA 法)对细胞培养 24h 后培养基中的乳酸含量进行测定(深圳晶美有限公司),由我院检验科完成。

1.9 统计学处理

所有采集的数据应用 SPSS21.0 统计软件进行分析,其中对符合正态分布资料的数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 Mann-whitney *U* 检验进行两两数据之间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞凋亡情况

对数生长的肺癌 A549 细胞加入二甲双胍诱导 24h, 凋亡细胞增加了 6.8%, 加入 tPA 刺激的肺癌 A549 细胞再加入二甲双胍诱导 24h, 凋亡增加至 15.2%, 加入 tPA 刺激对人肺癌 A549 细胞凋亡影响较只加入二甲双胍诱导的凋亡效果更明显, 见 Figure 1, Figure 2。

2.2 鉴定加入 tPA 的肺癌 A549 细胞进入细胞周期

检测肺癌 A549 细胞加入 tPA 刺激后细胞增殖的情况, 结果显示, 处于静止期的

肺癌 A549 细胞加入 tPA 以后进入细胞周期出现了 $G_2 \sim M$ 期的细胞, 如 Figure 3。

2.3 细胞周期特异性

二甲双胍诱导肺癌 A549 细胞发生在 G_1 期, 二甲双胍诱导 tPA 刺激的肺癌 A549 细胞, 细胞周期发生在 G_1 期, 对照组未加 tPA 没有明显的凋亡发生。

2.4 CyclinE/DNA 双标流式细胞术对细胞周期的分析

肺癌 A549 细胞处在 G_0 期, tPA 刺激之后出现在 G_0 、早/晚 G_1 、 S_2 、 G_2 、 M 期, 加入二甲双胍诱导之后 CyclinE 表达下降, 细胞阻滞存在 G_1 期。

2.5 肺癌 A549 细胞中 caspase-3、caspase-9 mRNA 表达情况

观察组采用二甲双胍诱导, 对照组未做处理, 观察凋亡相关基因 caspase-3、caspase-9 mRNA 的表达, 结果显示观察组的 caspase-3、caspase-9 mRNA 的表达值显著高于对照组, 且差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。随着作用时间延长, 观察组细胞凋亡指数逐渐升高, 与对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见 Table 1~2, Figure 4。

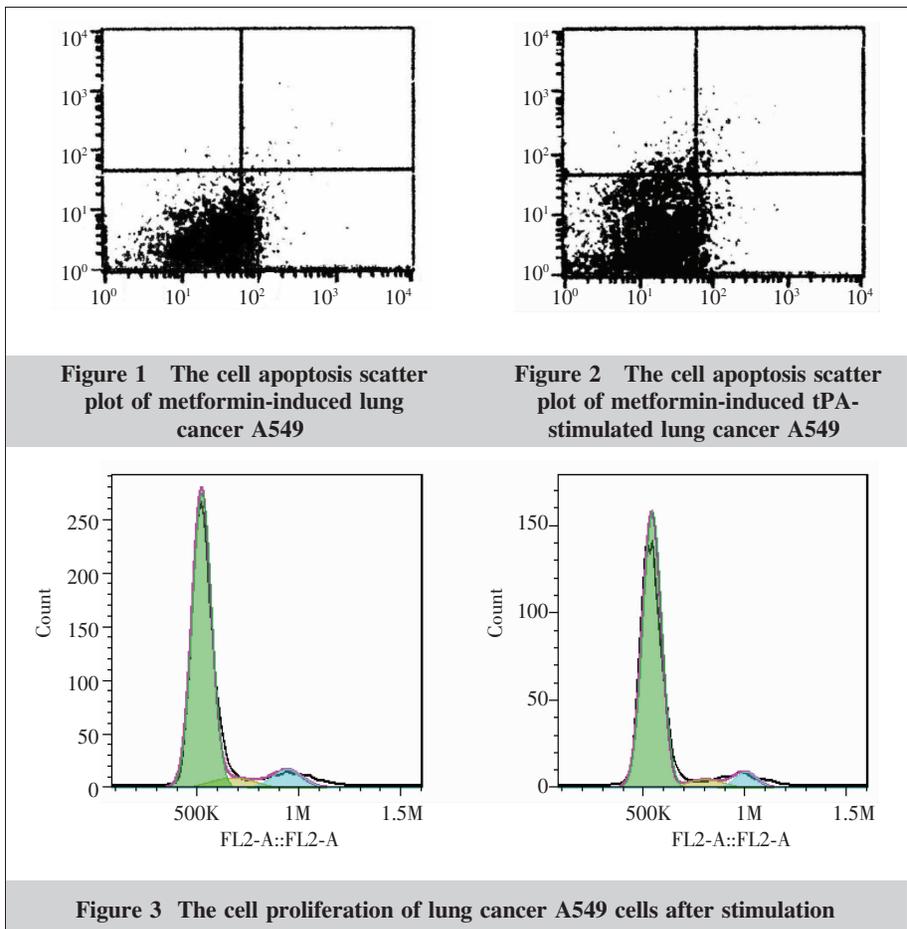


Table 1 Comparison of expression of caspase-3 and caspase-9 mRNA in lung cancer A549 cells

Group	Caspase-3	Caspase-9
Control	0.82±0.31	0.72±0.26
Metformin	1.12±0.56	1.10±0.29
P	0.023	0.031

Table 2 Changes in serum apoptotic index at different times

Group	Apoptotic index(%)				F	P
	3h	6h	12h	24h		
Control	1.50±0.35	2.64±0.89	2.87±0.43	2.73±0.31	2.84	0.075
Metformin	23.84±5.19*	42.51±7.24*#	52.51±8.12*#	55.48±8.44*#	74.25	<0.001

Note: *compared with control group, P<0.05; #compared with 3h, P<0.05.

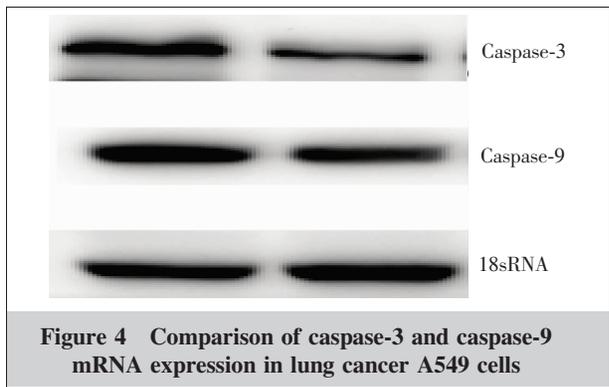


Figure 4 Comparison of caspase-3 and caspase-9 mRNA expression in lung cancer A549 cells

2.6 二甲双胍对肺癌 A549 细胞活力的影响

与 NC 组 (90.48%±8.67%) 比较, 二甲双胍组 (52.39%±5.96%) 中肺癌 A549 细胞活力显著降低, 差异有统计学意义 (P<0.05)。

2.7 肺癌 A549 细胞体外迁移能力

Transwell 体外迁移实验结果显示, 经二甲双胍干预之后肺癌 A549 细胞体外迁移的能力明显降低 (P<0.05)。第 7d, 对照组体外迁移细胞数目明显高于二甲双胍组 (P<0.05), 见 Table 3。

2.8 乳酸生成的影响

ELISA 法对乳酸含量进行测定, 二甲双胍组乳酸生成明显降低 (P<0.05), 见 Table 4。

Table 3 Number of migrated cells in lung cancer A549 cells in vitro

Group	0d	7d	P
Metformin	28.34±8.82	2.69±0.56	0.001
Control	29.63±7.34	48.63±8.17	0.001
P	0.835	0.001	-

Table 4 The effect on the lactic acid secretion

Group	0h	24h	P
Metformin	27.387±5.68	12.89±1.03	0.002
Control	28.64±5.23	35.38±6.312	0.012
P	0.856	0.003	-

3 讨论

近半个世纪来, 发达国家特别是工业发达国家, 肺癌发病率和病死率均呈持续上升趋势, 随着我国逐渐步入老龄人口社会以及工业化进程加快, 肺癌的发病率和死亡率还将持续上升。该病预后较差, 目前主要的治疗方法是手术及全身化疗的综合治疗方法, 但是还是存在复发和转移的可能^[5]。由于肺癌发病隐匿, 进展很快, 很多患者就诊时已达晚期, 同时目前还缺乏肺癌 A549 的诊断和治疗靶标, 因此寻找生物学靶标对于疾病的诊治至关重要。本研究探求肺癌的侵袭机制, 寻找靶点基因与疾病的相关性, 对其的治疗和预后判断提供一定的指导价值^[6-8]。

肿瘤的发生发展是一个复杂的过程, 肿瘤细胞的生存凋亡与细胞周期有关, 细胞周期具有高度的保守性, 凋亡不会对正常机体需要的细胞产生威胁, 能够对不必要的细胞产生精确的生理调控, 凋亡与细胞增殖之间有着潜在相关性, 很多与增殖关系密切的癌基因与细胞凋亡密切相关。随着对细胞凋亡认识的深入, 临床研究发现肿瘤的预后与组织药物反应明显相关, 提示了化疗在肺癌 A549 治疗中的重要作用, 而肺癌 A549 的治疗在近 30 年的时间里进入了平台期, 患者的长期生存率并没有明显提高, 且有部分患者对目前使用的药物不敏感, 探索新的、有效的化疗药物显得尤为重要。细胞的凋亡具有周期性的特征, 往往凋亡的发生是细胞被阻滞在细胞周期的其中一个时相当中, 绝大多数的肿瘤化疗是采用该理论诱导细胞在特定的周期内发生凋亡, 以杀伤肿瘤细胞^[9-11]。

肺癌 A549 细胞在人体炎症和外伤的时候会急剧增殖, 当人体的炎症病灶消退以后其状态又趋向稳定^[12]。我们在体外对肺癌 A549 细胞株进行培养, 在未经刺激的情况下, 细胞处于 G₀ 期的状态, 当细胞被二甲双胍诱导之后, 发生凋亡的细胞较少, 细胞不进入细胞周期, 而在此基础上采用人骨肿瘤中组织型纤溶酶原激活剂 tPA 可以激活肺癌 A549 细胞进入细胞周期, 促使细胞增殖, 细胞进入了 S、G₂/M 期, 细胞凋亡率明显增加^[13, 14]。可见细胞凋亡的发生只有在进入到细胞中期之后才被检测到。这也与临

床放化疗的治疗作用有一定的相似之处,放化疗对细胞产生打击,使细胞进入细胞周期,细胞的凋亡率远高于静止期的肿瘤细胞^[15]。

细胞的凋亡是否具有周期特异性,我们通过API的方法进行检测二甲双胍诱导的细胞凋亡情况,在凋亡的早期细胞凋亡出现伴随着膜外翻的现象,API的方法就是利用AnnexinV与此现象的相结合,通过细胞核染色,对凋亡周期特异性进行判断,结果显示,二甲双胍诱导的细胞凋亡与周期特异性的凋亡主要发生在细胞周期的G₁期。细胞的周期蛋白是一类在细胞周期中特异性表达的蛋白质,可以通过刺激细胞周期的依赖性蛋白激酶使细胞有特异性周期表现,周期蛋白最大的特点是时相性,CyclinE/DNA双标流式细胞术对细胞周期的分析主要是将细胞CyclinE的表达与细胞所处的位置相结合分析,可以得到细胞的详细周期信息^[16]。CyclinE完全在G₁期合成,G₀期不会出现CyclinE,其中以晚G₁期表达最强,CyclinE可以完全将G₀、G₁很好的分开,根据本实验结果可见二甲双胍诱导的细胞凋亡对肺癌A549细胞CyclinE的表达是下降的,细胞在G₁期被阻滞,此过程也伴随着凋亡相关蛋白caspase-3、caspase-9的高表达及活化;同时Transwell结果显示,第3d二甲双胍组体外迁移能力明显加强;二甲双胍组细胞活力下降;二甲双胍干预后可明显降低乳酸生成,说明细胞的糖代谢受到了一定抑制。

综上所述,肺癌A549细胞在静止期并没有启动周期进程,进入周期后细胞凋亡才会变得敏感,二甲双胍诱导凋亡与肺癌A549细胞的周期有密切关系,可抑制细胞活性及迁移侵袭能力,降低乳酸生成,参与细胞凋亡,在特定的时相中,这样也对细胞凋亡和周期特异性做了一个很好的解释,从一方面说明了凋亡的周期性。细胞凋亡在恶性肿瘤中具有重要作用,本研究对二甲双胍诱导凋亡做了探索性的研究,对肿瘤的诱导凋亡和治疗来说有着一定的临床指导意义。

参考文献:

- [1] Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Tumor microenvironment is multifaceted [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(1):13–25.
- [2] Wang D, Precopio M, Lan T, et al. Antitumor activity and immune response induction of a dual agonist of Toll-like receptors 7 and 8[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6):1788–1797.
- [3] Zhao H, He FL, Fang M, et al. High expression of Toll-like receptor in the development of lung cancer in the preliminary study [J]. *Journal of Practical Medicine*, 2009, 25(9):1392–1395. [赵卉, 何凤莲, 方明, 等. 高表达的 Toll 样受体在肺癌发生发展中的初步探讨 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(9):1392–1395.]
- [4] Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2):226–235.
- [5] Sorrentino R, Morello S, Pinto A. Role of plasmacytoid dendritic cells in lung-associated inflammation [J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2010, 4(2):138–143.
- [6] Sorrentino R, Morello S, Forte G, et al. B Cells contribute to the anti-tumour activity of CpG-ODN in a mouse model of metastatic lung carcinoma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(10):1369–1379.
- [7] Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumorderived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2):457–471.
- [8] Sorrentino R, Morello S, Giordano MG, et al. CpG-ODN increases the release of VEGF in a mouse model of lung carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(12):2815–2822.
- [9] Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olausson KA, et al. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2012, 9(3):144–155.
- [10] Belani CP, Wu YL, Chen YM, et al. Efficacy and safety of pemetrexed maintenance therapy versus best supportive care in patients from East Asia with advanced, nonsquamous non-small cell lung cancer: an exploratory subgroup analysis of a global, randomized, phase 3 clinical trial [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(3):567–573.
- [11] Dansin E, Cinieri S, Garrido P, et al. MO19390 (SAiL): bleeding events in a phase IV study of first-line bevacizumab with chemotherapy in patients with advanced non-squamous NSCLC [J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(3):373–379.
- [12] Su KY, Chen HY, Li KC, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(4):433–440.
- [13] Schnabel PA, Smit E, Carpeno Jde C, et al. Influence of histology and biomarkers on first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer in routine care setting: baseline results of an observational study (FRAME) [J]. *Lung Cancer*, 2012, 78(3):263–269.
- [14] Tateishi K, Ichiyama T, Hirai K, et al. Clinical outcomes in elderly patients administered gefitinib as first-line treatment in epidermal growth factor receptor-mutated non-small-cell lung cancer: retrospective analysis in a Nagano Lung Cancer Research Group Study [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):450.
- [15] Kim ST, Jung HY, Sung JS, et al. Can serum be used for analyzing the EGFR mutation status in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *Am J Clin Oncol*, 2013, 36(1):57–63.