

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.012

· 基础研究 ·

二甲双胍对急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞增殖及凋亡的影响

袁莹莹¹, 滕榕², 施文瑜²(1. 南通大学医学院 血液内科学教研室, 江苏南通 226001; 2. 南通大学附属医院 血液科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的:**探讨二甲双胍对急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)NB4 细胞增殖与凋亡的影响及其可能的机制。**方法:**二甲双胍单独或联合多柔比星处理 NB4 细胞后,采用 MTT 法检测 NB4 细胞的增殖,采用流式细胞术检测细胞的凋亡,采用 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白 caspase-9 及 caspase-3 的活化。**结果:**二甲双胍可剂量($r = 0.952, P < 0.01$)和时间($r = 0.967, P < 0.01$)依赖性抑制 NB4 细胞的增殖,处理 72 h 后,其对 NB4 细胞的 IC_{50} 值为 (6.39 ± 0.37) mmol/L。二甲双胍可增加 NB4 细胞对多柔比星的化疗敏感性,0.625 mmol/L 二甲双胍联合 0.02 μ mol/L 的多柔比星对 NB4 细胞的增殖抑制率明显高于单用多柔比星组 [29.84 ± 0.21]% vs [10.68 ± 0.45]%, $P < 0.05$]。5 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 后,NB4 细胞的凋亡率明显高于未处理对照组 [43.95 ± 0.29]% vs [7.12 ± 0.29]%, $P < 0.01$];二甲双胍处理 NB4 细胞后,凋亡蛋白 caspase-3、caspase-9 活化片段表达上调。**结论:**二甲双胍能够有效抑制 APL 细胞株 NB4 的增殖、促进其凋亡,并能增强其对多柔比星的化疗敏感性,caspase-3 和 caspase-9 凋亡蛋白可能参与二甲双胍诱导 NB4 细胞凋亡的过程。

[关键词] 二甲双胍;急性早幼粒细胞白血病;多柔比星;凋亡;caspase-3;caspase-9

[中图分类号] R733.71;R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0575-05

Influence of metformin on proliferation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia NB4 cells

Yuan Yingying¹, Teng Rong², Shi Wenyu²(1. Department of Blood Internal Medicine, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the effect of metformin on the proliferation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia (APL) NB4 cells and the possible mechanism. **Methods:** After the treatment of metformin alone or in combination with daunorubicin, MTT assay and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of NB4 cells, respectively. The activation of apoptosis-related proteins caspase-3 and caspase-9 was determined by Western blotting. **Results:** Metformin inhibited proliferation of NB4 cells in a dose-dependent ($r = 0.952, P < 0.01$) and time-dependent ($r = 0.967, P < 0.01$) manner. After metformin treatment for 72 h, its IC_{50} value to NB4 cells was (6.39 ± 0.37) mmol/L. Metformin increased the chemosensitivity of NB4 cells to daunorubicin. The inhibitory rate of NB4 cell proliferation in 0.625 mmol/L metformin and 0.02 μ mol/L daunorubicin combination group was significantly higher than that in daunorubicin used alone group ($[29.84 \pm 0.21]$ % vs $[10.68 \pm 0.45]$ %, $P < 0.05$). After the treatment of 5 mmol/L metformin for 48 h, the apoptotic rate of NB4 cells was significantly increased compared with that of the control group ($[43.95 \pm 0.29]$ % vs $[7.12 \pm 0.29]$ %, $P < 0.01$). The expressions of activated caspase-3 and caspase-9 fragments were up-regulated after metformin treatment. **Conclusion:** Metformin can efficiently inhibit the proliferation, promote the apoptosis of NB4 cells, and enhance the chemosensitivity of NB4 cells to daunorubicin. Caspase-3 and caspase-9 may be involved in the NB4 cell apoptosis induced by metformin.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101786),江苏省“六大人才高峰”基金资助项目(No. 2011-ws-062)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101786), and the “Six Top Talents” Foundation of Jiangsu Province (No. 2011-ws-062)

[作者简介] 袁莹莹(1985-),女,山东省泰安市人,硕士生,主要从事血液学方面的研究。E-mail: yuanyingying3328@126.com

[通信作者] 施文瑜(Shi Wenyu, corresponding author),E-mail: shiwenyu@hotmail.com

[**Key words**] metformin; acute promyelocytic leukemia; daunorubicin; apoptosis; caspase-3; caspase-9

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 575-579]

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是急性髓细胞白血病(acute myelocytic leukemia, AML)的一种特殊类型,被法国、美国、英国协作组(French-American-British Cooperative group, FAB)定为AML-M3型。由于前骨髓细胞癌-维甲酸受体 α (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α , *PML-RAR α*)融合基因^[1]的形成,导致APL的治疗与其他类型AML不同,目前化疗联合全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)或三氧化二砷(arsenic trioxide, *AS₂O₃*/ATO)相继应用于APL的治疗,提高了APL的完全缓解率(complete remission, CR)和总体生存率(overall survival, OS),但部分患者仍不能获得长期生存^[2]。目前白血病的传统治疗方法仍是以蒽环类抗生素,如多柔比星(daunorubicin, DNR)为主的联合化疗,其心脏毒性影响了其临床应用,寻找更安全有效的治疗方法显得非常必要。研究^[3-6]发现,二甲双胍可以降低糖尿病患者癌症的发病率。Buzzai等^[7]也证实,二甲双胍能增加化疗药物的效应。本课题就二甲双胍单用或联合多柔比星对急性早幼粒细胞白血病NB4细胞增殖与凋亡的影响及其机制进行研究,为APL的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

急性早幼粒细胞白血病NB4细胞株由上海交通大学血液实验室赠送,用含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基,37℃、5% CO₂条件下常规培养。盐酸二甲双胍、噻唑蓝购自美国Sigma公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自中国Bestbio公司,caspase-3兔抗人多克隆抗体(产品编号:9665S)、caspase-9兔抗人多克隆抗体(产品编号:9502S)购自美国Cell Signaling公司,标记有辣根过氧化物酶的山羊抗兔二抗(产品编号:89368)购自美国Jackson immuno公司, β -actin抗体(产品编号:4967S)购自美国Cell Signaling公司。

1.2 MTT法检测二甲双胍单药及联合多柔比星作用后NB4细胞的增殖

取对数生长期白血病NB4细胞,以 2×10^4 个/孔接种于96孔板,每组设3个复孔。按二甲双胍终浓度分为4组:1.25、2.5、5、10 mmol/L,对照组加入等体积PBS,细胞培养72 h后加入质量浓度为5

mg/ml的MTT溶液,37℃培养箱孵育4 h,离心弃上清,加入DMSO 150 μ l,酶联免疫检测仪于490 nm处测定光密度(D)值,计算IC₅₀值。使用终浓度为10 mmol/L的二甲双胍与NB4细胞共培养24、48 h,并用不同浓度二甲双胍(0.625、1.25、2.5、5 mmol/L)与不同浓度多柔比星(0.02、0.03、0.04、0.05 μ mol/L)联合作用72 h,计算细胞的增殖抑制率。增殖抑制率(%)=(对照组D值-实验组D值)/对照组D值 \times 100%。

1.3 流式细胞术检测二甲双胍对NB4细胞凋亡的影响

选用对数生长期的NB4细胞,以 6×10^5 个/孔接种于6孔板,实验组选用终浓度为5 mmol/L的二甲双胍与NB4共培养36 h,对照组选用等量PBS与NB4共培养36 h,根据Annexin-V试剂盒说明书操作:(1)收集细胞 1×10^6 个, $1\ 000 \times g$ 离心5 min,弃上清,用预冷PBS洗两次;(2)用100 μ l结合液重悬细胞;(3)加入5 μ l Annexin-V试剂及1 μ l PI试剂(100 μ g/ml)至100 μ l细胞悬液中,避光孵育15 min,流式细胞术检测NB4细胞凋亡。

1.4 Western blotting检测NB4细胞中caspase-3、caspase-9的活化

取对数生长期NB4细胞,按 6×10^6 /ml接种于培养皿,加入终浓度为5 mmol/L二甲双胍,对照组加入等体积的PBS,分别处理24、48 h,收集细胞,加100 μ l裂解液,冰上裂解15~20 min, $1\ 000 \times g$ 离心10 min,取上清液,以BCA法测定蛋白浓度,并调节最终质量浓度为4.0 mg/ml,电泳、转膜、封闭1.5 h,以TBST(1:100)稀释的caspase-3及caspase-9兔抗人抗体4℃孵育过夜,第2天以1:5 000的羊抗兔二抗孵育1 h后,洗膜3次,每次10 min,发光,显影,以Quantity One软件分析结果。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS16.0统计软件,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍抑制NB4细胞株的增殖

不同浓度(0.5、1.25、2.5、5、10 mmol/L)的二甲双胍处理NB4细胞72 h后,MTT检测结果(图1)显示,随着二甲双胍浓度的增加,NB4细

细胞的增殖抑制率逐渐增加 ($r = 0.952, P < 0.01$)。其 IC_{50} 值为 (6.39 ± 0.37) mmol/L。取 10 mmol/L 的二甲双胍与 NB4 细胞分别作用 24、48、72 h 后,随着时间的延长,NB4 细胞的抑制率也明显增加 ($r = 0.967, P < 0.01$)。以上表明二甲双胍对 APL 细胞的增殖抑制存在浓度和时间的依赖性。

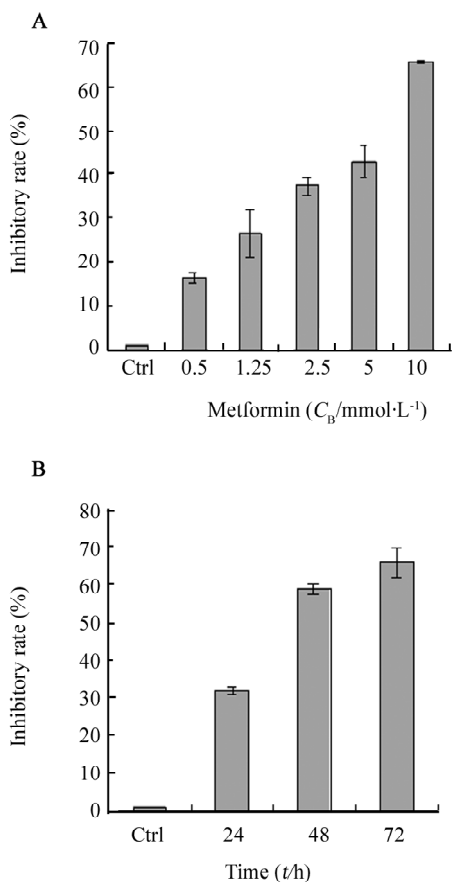


图 1 二甲双胍对 NB4 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of metformin on proliferation of NB4 cells

A: Metformin inhibited the proliferation of NB4 cells in a dose-dependent manner; B: Metformin inhibited the proliferation of NB4 cells in a time-dependent manner

2.2 二甲双胍增加 NB4 细胞对化疗药物多柔比星的敏感性

采用二甲双胍 (0.625、1.25、2.5、5 mmol/L) 联合蒽环类化疗药多柔比星 (0.02、0.03、0.04、0.05 μmol/L) 处理 NB4 细胞 72 h 后,MTT 检测 NB4 细胞的增殖抑制率,结果(图 2)显示,0.625 mmol/L 二甲双胍联合 0.02 μmol/L 的多柔比星对 NB4 细胞的增殖抑制率明显高于单用 0.02 μmol/L 多柔比星

组 [$(29.84 \pm 0.21)\%$ vs $(10.68 \pm 0.45)\%$, $P < 0.05$],表明二甲双胍能提高 NB4 细胞对多柔比星的敏感性。

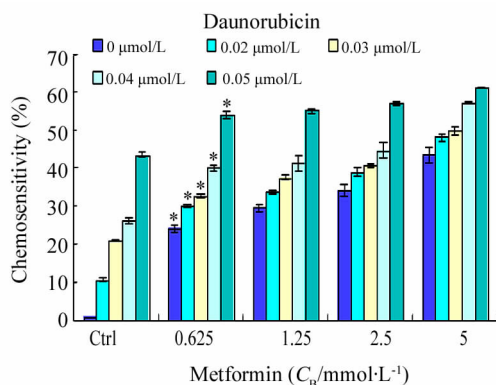


图 2 二甲双胍提高 NB4 细胞对多柔比星的化疗敏感性

Fig. 2 Metformin enhanced chemosensitivity of NB4 cells to daunorubicin

* $P < 0.05$ vs Ctrl group

2.3 二甲双胍诱导 NB4 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 3)显示,5 mmol/L 的二甲双胍处理 NB4 细胞 48 h 后,NB4 细胞的凋亡率明显高于未处理对照组 [$(43.95 \pm 0.29)\%$ vs $(7.12 \pm 0.29)\%$, $P < 0.01$],提示二甲双胍可诱导 NB4 细胞的凋亡。

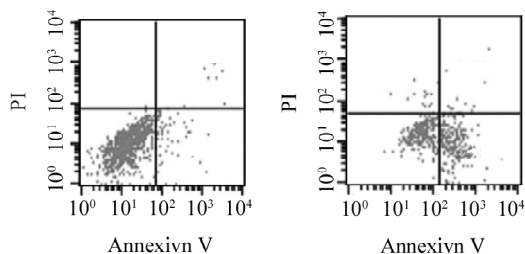


图 3 二甲双胍诱导 NB4 细胞凋亡

Fig. 3 Metformin induced apoptosis of NB4 cells

2.4 二甲双胍促进 NB4 细胞中 caspase-9 及 caspase-3 的活化

Western blotting 检测结果(图 4)显示,5 mmol/L 二甲双胍作用 NB4 细胞 24、48 h 后,NB4 细胞中 caspase-3、caspase-9 前体蛋白表达较对照组明显降低,而 caspase-3 及 caspase-9 的剪接片段表达呈上调趋势,提示二甲双胍能够增强 NB4 细胞中 caspase-9 及 caspase-3 的活化。

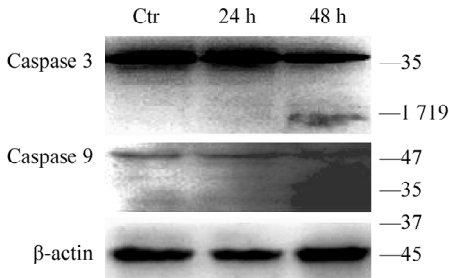


图 4 二甲双胍促进 NB4 细胞中凋亡蛋白 caspase-3 及 caspase-3 的活化

Fig. 4 Metformin enhanced activation of apoptosis proteins caspase-3 and caspase-9 in NB4 cells

3 讨论

白血病是造血系统的恶性肿瘤,是我国较常见的恶性肿瘤之一,目前急性髓系白血病的治疗仍然是以蒽环类抗肿瘤药物如多柔比星的化疗方案为主,但由于耐药性及其心脏毒性的副作用,限制了临床应用。二甲双胍是临床上被广泛应用的有效并且较安全的降糖药,作用机制为:通过对细胞内的 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路的激活,一方面导致肝脏的糖异生减少,另一方面促进骨骼肌更多的吸收和利用糖原,达到降低血糖的作用^[8]。研究^[3-6]显示,二甲双胍可抑制乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌等肿瘤的生长^[9-11],同时联合化疗药物能够改善癌症合并糖尿病患者的预后,表明其具有潜在的治疗癌症的作用^[12-13]。

Kerr 等^[14]从形态学的角度描述了细胞的生理死亡,并把这种细胞的程序性死亡命名为凋亡。肿瘤细胞由于凋亡受阻而异常堆积,成为某些肿瘤发病机制中的重要环节,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡密不可分。大量研究^[15-16]表明,凋亡与肿瘤的发生、发展、治疗及预后密切相关。本研究结果显示, NB4 细胞经二甲双胍处理后,细胞增殖受到抑制,并呈浓度及时间依赖性,流式细胞分析同样证实了经二甲双胍处理后的 NB4 细胞凋亡率明显增高。但二甲双胍诱导 NB4 细胞凋亡的机制尚不明确,有研究^[17]表明,二甲双胍联合 2-脱氧葡萄糖可以显著地抑制 p53 基因缺陷的前列腺癌细胞线粒体的呼吸链

和糖酵解,并且使细胞阻滞在 G₂/M 期,联合用药可以恢复 caspase-3 的活性,促进前列腺癌细胞的凋亡。Wang 等^[18]报道,二甲双胍可以诱导胰腺癌细胞的凋亡,并呈剂量依赖效应,同时还裂解 PARP [poly(ADP-ribose) polymerase],使其经加工后呈活化形式,进一步诱导胰腺癌细胞凋亡。

Caspase 家族在介导细胞凋亡中起着非常重要的作用,其中 caspase-3 为执行此功能的关键分子,它在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能。在正常情况下, caspase-3 以酶原的形式存在于细胞质中,当发生凋亡时,其在凋亡的早期阶段即被激活。活化的 caspase-3 是由两个大亚基(相对分子质量约 17 000)和两个小亚基(相对分子质量约 12 000)组成,活化后的 caspase-3 裂解相应底物,最终导致细胞凋亡。但是,在细胞凋亡晚期以及死亡细胞中, caspase-3 的活性明显下降。目前所知,通过 caspase-3 执行的凋亡通路主要有两条:即内源性激活途径和外源性激活途径,前者是通过线粒体释放 CytC,激活 caspase-9;后者是通过 Fas/FasL 激活 caspase-8^[19]。本研究结果显示, NB4 细胞经二甲双胍处理后,随着时间的延长, caspase-3 的活性较处理前明显增强,其上游分子 caspase-9 活性也同样增强,证实二甲双胍诱导凋亡的机制可能是通过激活 caspase 家族的活化引起的。

化疗药物的使用剂量通常都是采用患者能承受的最大剂量,因为这样才能最有效杀死肿瘤细胞,但由此给病人带来的痛苦也是显而易见的。Grenader 等^[20]报道,对于乳腺癌合并糖尿病患者,在肿瘤化疗的同时联合二甲双胍治疗具有更好的疗效。Hirsch 等^[21]的研究显示,联合化疗药物多柔比星和二甲双胍,可以使动物模型中乳腺癌皮下移植瘤的体积和重量减少,比单独应用多柔比星具有更好的治疗效果,体外实验还证明,联合用药能抑制肿瘤细胞的增殖,延缓乳腺癌的复发。本研究采用二甲双胍联合多柔比星处理 NB4 细胞后,增加了多柔比星的化疗敏感性。综上,二甲双胍具有抑制 NB4 细胞增殖、增加对多柔比星的化疗敏感性、诱导细胞凋亡的作用。由于它具有抗肿瘤增殖、促进凋亡、逆转肿瘤耐药等生物活性,因此有望作为一种新的抗肿瘤药物应用于临床。

[参考文献]

- [1] 金波, 于萍, 侯科佐, 等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病过程中高白细胞血症和维甲酸综合征的特点 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(8): 614-617.
- [2] 卢瑞南, 李建勇, 盛瑞兰, 等. 全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病合并维甲酸综合征的临床研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(6): 584-586.
- [3] Bodmer M, Meier C, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer [J]. Diabetes Care, 2010, 33(6): 1304-1308.
- [4] Wright JL, Stanford JL. Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: Results from a population-based case control study [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1617-1622.
- [5] Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2009, 52(9): 1766-1777.
- [6] Li D, Yeung SC, Hassan MM, et al. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer [J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 482-488.
- [7] Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth [J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6745-6752.
- [8] Sinnott-Smith J, Kisfalvi, Kui R, et al. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: Dependence on glucose concentration and role of AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1): 352-357.
- [9] Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, et al. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs *in vitro* [J]. Anticancer Res, 2012, 32(5): 1627-1637.
- [10] Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK [J]. Br J Cancer, 2013, 108(10): 2021-2032.
- [11] Kawanami T, Takiguchi, Ikeda N, et al. A humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody (R1507) and/or metformin enhance gemcitabine-induced apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Oncol Rep, 2012, 27(3): 867-872.
- [12] He XX, Tu SM, Lee MH, et al. Thiazolidinediones and metformin associated with improved survival of diabetic prostate cancer patients [J]. Ann Oncol, 2011, 22(12): 2640-2645.
- [13] Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(20): 3297-3302.
- [14] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
- [15] Soini Y, Paakko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer [J]. Am J Pathol, 1998, 153(4): 1041-1053.
- [16] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(3): 178-194.
- [17] Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, et al. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2010, 70(6): 2465-2475.
- [18] Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, et al. Dual antiglioma action of metformin: Cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(10): 1290-1302.
- [19] Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, et al. Ponicidin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPES, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Invest, 2006, 24(2): 136-148.
- [20] Grenader T, Goldberg A, Shavit L. Metformin as an addition to conventional chemotherapy in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35): e259-e260.
- [21] Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth [J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6745-6752.

[收稿日期] 2013 - 05 - 02

[修回日期] 2013 - 07 - 07

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳

《 中国肿瘤生物治疗杂志 》 欢迎投稿、欢迎订阅