

二甲双胍对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡的影响及其机制研究

李宇 徐瑾 贺会清 唐婉 黄娅军

【摘要】 目的 探讨二甲双胍对甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 用不同浓度(0 mmol/L、1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L)二甲双胍分别处理 TPC-1 细胞 24 h。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖能力;采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同浓度二甲双胍对 TPC-1 细胞凋亡的影响,同时在 40 mmol/L 组加入腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂 Compound C,观察其对 TPC-1 细胞凋亡的影响;采用 Western blot 法检测磷酸化 AMPK(p-AMPK)及 Caspase-9 蛋白的表达。**结果** 与 0 mmol/L 组比较,1 mmol/L 及 5 mmol/L 组的 TPC-1 细胞增殖能力无明显改变($P > 0.05$);而 10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 二甲双胍均可明显抑制 TPC-1 细胞的增殖能力,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。与 0 mmol/L 组比较,不同浓度二甲双胍均可明显增加 TPC-1 细胞凋亡率($P < 0.001$);而加入 Compound C 后,40 mmol/L 组 TPC-1 细胞凋亡率较前明显下降($P < 0.001$)。与 0 mmol/L 组比较,1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 组 p-AMPK、Caspase-9 表达量增加。**结论** 二甲双胍可诱导甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞凋亡,且二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡的过程可能与激活 AMPK 通路有关,可能由 Caspase-9 介导。

【关键词】 二甲双胍; 甲状腺乳头状癌; 细胞凋亡; 腺苷酸活化蛋白激酶; Caspase-9

Effect and mechanism of metformin on apoptosis of papillary thyroid carcinoma TPC - 1 cells
Li Yu*, Xu Jin, He Huiqing, Tang Wan, Huang Yajun. * Department of Endocrinology, the Second People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of metformin on the apoptosis of papillary thyroid carcinoma TPC-1 cells. **Methods** TPC-1 cells were treated with different doses (0 mmol/L, 1 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L and 40 mmol/L) of metformin for 24 h. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to measure the proliferation viability of cell lines. Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the rate of apoptosis of TPC-1 cells treated by different concentrations of metformin. At the same time, the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) inhibitor Compound C was added to the 40 mmol/L group, and its effect on the apoptosis of TPC-1 cells was observed. Western blotting was performed to determine the protein expressions of p-AMPK and Caspase-9. **Results** Compared with the 0 mmol/L group, the proliferation viability of TPC-1 cells in 1 mmol/L and 5 mmol/L groups had no significant changes ($P > 0.05$). But 10 mmol/L, 20 mmol/L and 40 mmol/L metformin all significantly inhibited the proliferation activity of TPC-1 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the 0 mmol/L group, the different concentrations of metformin could significantly increase the apoptosis rate of TPC-1 cells ($P < 0.001$). However, after the addition of Compound C, the apoptosis rate of TPC-1 cells in 40 mmol/L group was significantly lower than that before ($P < 0.001$). Compared with the 0 mmol/L group, the different concentrations of metformin could increase the protein expression of p-AMPK and Caspase-9. **Conclusion** Metformin can induce apoptosis of TPC-1 cells. The process of apoptosis induced by metformin is probably related to the activation of AMPK signaling pathway, which may be mediated by Caspase-9.

【Key words】 Metformin; Papillary thyroid carcinoma; Apoptosis; Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; Caspase-9

DOI:10.3969/j.issn.1001-9057.2019.12.015

基金项目:肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金项目资助(2017KZL01);三峡大学学位论文培优基金项目资助(2019SSPY116)

作者单位:443000 湖北宜昌,三峡大学第二人民医院 宜昌市第二人民医院内分泌科(李宇、徐瑾、贺会清、唐婉),放射肿瘤科(黄娅军)

通讯作者:贺会清, E-mail:578009512@qq.com

甲状腺乳头状癌(PTC)好发于儿童和中青年女性,是甲状腺癌最常见的病理类型,其分化程度高、恶性程度低,患者的 10 年生存率在 90% 以上^[1]。近年来 PTC 的发病率在全球范围内呈逐年增长趋势^[2]。虽然常规抗肿瘤治疗对其有较好的疗效,但在肿瘤术后的内分泌药物治疗过程中,患者仍需面临如亚临床甲状腺功能亢进症、骨质疏松、心律失常等药物不良反应,严重影响患者的生活质量^[3]。因此,能从现有药物中寻找出一种不良反应少且能改善 PTC 患者预后的药物具有重要意义。二甲双胍作为临床一线降糖药物,其安全性和有效性已得到充分肯定。近年来有研究表明,二甲双胍具有抗肿瘤效应^[4]。关于二甲双胍对 PTC 细胞的影响,目前为数不多的研究主要集中在其对 PTC 细胞增殖的抑制作用,且发现其抑制程度呈剂量-时间依赖性^[5-6]。而关于二甲双胍对 PTC 细胞凋亡的影响,目前研究较少。本研究拟以体外培养的甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞为研究模型,并从分子水平探讨二甲双胍对 TPC-1 细胞凋亡的影响及其可能机制,以期为今后二甲双胍治疗 PTC 提供新的理论依据。

材料与方法

1. 材料:人 PTC 细胞系 TPC-1 细胞购自武汉大学细胞库;二甲双胍、培养液 RPMI 1640 购自 Gibco 公司;四季青胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液(稀释 100 倍)、胰蛋白酶、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 Solarbio 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自上海浩然生物技术有限公司;Compound C 购自 Selleck 公司;磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)、Caspase-9、GAPDH 单克隆抗体均购自 Cell Signal 公司;过氧化物酶标记的山羊抗兔和 ECL 化学发光试剂盒购自 Santa Cruz 公司;其他试剂和耗材均为国产。

2. 方法

(1)细胞培养:选取人 PTC 细胞系 TPC-1 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

(2)MTT 法检测细胞增殖能力:取对数生长期细胞,按 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每孔 200 μ l,培养 24 h 待细胞贴壁后,各孔分别加入 0 mmol/L、1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 二甲双胍的培养液,每组设 6 个平行孔,继续培养 24 h,每孔加入 20 μ l MTT(5 g/L)溶液,孵育 4 h,吸去上清液,每孔加入 150 μ l DMSO 轻微震荡 15 min 至深紫色结晶全部消失。用酶标仪测定 490 nm 波长处各孔的吸光度

(OD)值,以 OD₄₉₀ 表示细胞增殖能力。每组实验重复 3 次,取平均值。

(3)Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡:取生长状态良好的细胞,用胰蛋白酶消化后制成浓度为 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,每孔 2 ml 接种于 6 孔板,培养 24 h 后换成含 0 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 二甲双胍的培养基,24 h 后用 PBS 洗涤 3 次,加入 100 μ l Annexin V-FITC/PI 孵育液(1:100),避光室温孵育 15 min 后加入 400 μ l 孵育液终止反应后经流式细胞仪检测细胞凋亡情况。同时在二甲双胍 40 mmol/L 组加入 20 μ mol/L 的 AMPK 抑制剂 Compound C,24 h 后再用上述方法检测细胞凋亡情况。每组实验重复 3 次,取平均值。

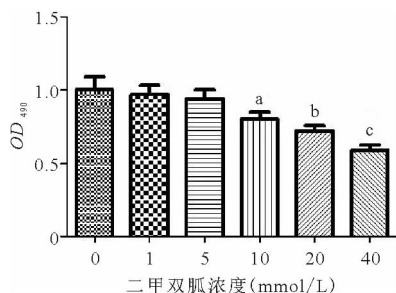
(4)Western blot 法检测 p-AMPK 及 Caspase-9 蛋白表达:用裂解液收集不同浓度二甲双胍处理 24 h 后的细胞蛋白,每孔取 50 μ g 蛋白 100℃煮沸 8 min 变性后上样,用 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,一抗 p-AMPK(1:1 000)、Caspase-9(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)室温孵育 1 h 后 4℃孵育过夜,漂洗,二抗使用山羊抗兔(1:5 000)孵育 2 h。蛋白条带用增强化学发光(ECL)化学发光剂显色 1 min 后进行曝光显影。每组实验重复 3 次,取平均值。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

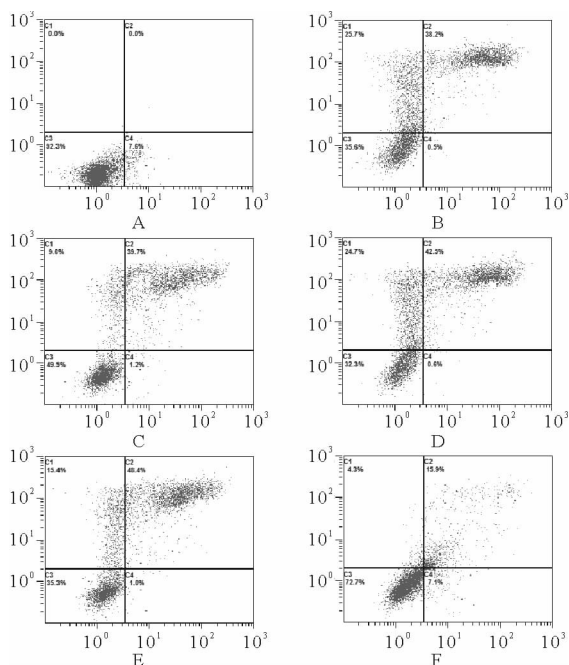
1. 不同浓度二甲双胍对 TPC-1 细胞增殖能力的影响:与 0 mmol/L 组比较,1 mmol/L、5 mmol/L 组 TPC-1 细胞增殖能力无明显改变($P > 0.05$);而 10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 二甲双胍均可明显抑制细胞的增殖活性,且随着二甲双胍浓度增加,其对 TPC-1 细胞增殖的抑制作用增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2. 不同浓度二甲双胍及加入 Compound C 后对 TPC-1 细胞凋亡的影响:与 0 mmol/L 组比较,5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 组细胞凋亡率均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$)。40 mmol/L 二甲双胍使 TPC-1 细胞凋亡率从 7.6% 上升至 49.4%,而在加入 20 μ mol/L Compound C 后,TPC-1 细胞凋亡率下降至 23.0%,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2、3。



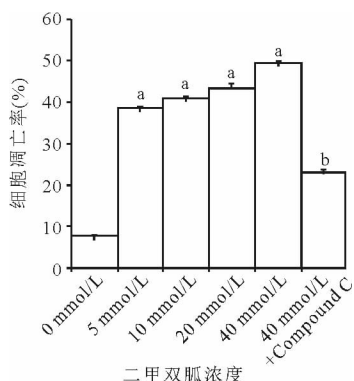
注:与 0 mmol/L 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$

图 1 不同浓度二甲双胍对 TPC-1 细胞增殖能力的影响



注:左下象限为正常细胞,左上象限为坏死细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞;A:0 mmol/L; B:5 mmol/L; C:10 mmol/L; D:20 mmol/L; E:40 mmol/L; F: 40 mmol/L + Compound C

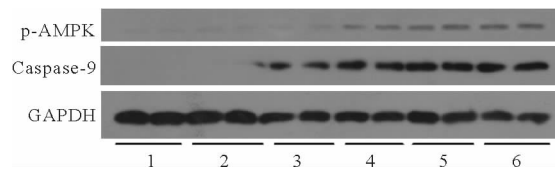
图 2 流式细胞术检测不同浓度二甲双胍组及加入 Compound C 后的 TPC-1 细胞凋亡情况



注:与 0 mmol/L 组比较,^a $P < 0.001$;与 40 mmol/L 组比较,^b $P < 0.001$

图 3 不同浓度二甲双胍及加入 Compound C 后对 TPC-1 细胞凋亡的影响

3. 不同浓度二甲双胍对 TPC-1 细胞 p-AMPK 及 Caspase-9 蛋白表达的影响:Western blot 检测结果显示,与 0 mmol/L 组比较,1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 组 p-AMPK 及 Caspase-9 蛋白表达量增加。见图 4。



注:1:0 mmol/L 组;2:1 mmol/L 组;3:5 mmol/L 组;

4:10 mmol/L 组;5:20 mmol/L 组;6:40 mmol/L 组

图 4 不同浓度二甲双胍对 TPC-1 细胞 p-AMPK 及 Caspase-9 蛋白表达的影响

讨 论

目前临床上针对 PTC 患者的治疗通常采用手术切除及术后促甲状腺激素(TSH)抑制治疗或放射性碘治疗^[7],虽然常规治疗有较好的临床疗效,但不良反应也较多,严重影响 PTC 患者的生活质量^[3]。因此,寻找一种既能改善 PTC 患者预后,又能减少药物不良反应的新治疗方法颇为重要。

二甲双胍是一种亲脂性双胍,由于其安全性和有效性,是临床上常用的一线降糖药物。其经典的降糖途径是通过激活 AMPK,将体内的合成代谢转换为分解代谢,从而抑制肝糖原异生、增加外周组织对胰岛素的敏感性等,最终达到降低血糖的目的。近年来,有研究表明二甲双胍还具有降低肿瘤发生风险和肿瘤死亡率及改善肿瘤预后的作用^[8-9]。目前已有研究表明,二甲双胍主要通过以下途径发挥抗肿瘤作用:(1)二甲双胍抑制肿瘤细胞线粒体代谢,使腺嘌呤核苷酸(AMP)产生增多、AMP/三磷酸腺苷(ATP)比值增加,进而激活 AMPK,抑制其下游效应分子雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的活性,最终导致肿瘤细胞生长受限^[10]。(2)二甲双胍通过下调细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)的表达,使得肿瘤细胞 G₁/S 期的进展受限,从而诱导细胞周期阻滞及细胞凋亡^[11]。(3)二甲双胍还能抑制肿瘤细胞的“瓦伯格效应”,通过影响肿瘤细胞的能量代谢而诱导细胞凋亡^[12]。(4)二甲双胍通过增加外周组织对胰岛素的敏感性,降低血胰岛素和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)含量,从而抑制胰岛素/IGF-1 的促细胞增殖作用,间接发挥抗肿瘤效应^[13]。

目前相关报道主要集中于二甲双胍对 PTC 细胞增殖的作用。Cho 等^[5]在二甲双胍抑制 PTC 细胞株 BCPAP 细胞增殖的研究中发现,BCPAP 细胞生长受抑

制与二甲双胍激活 AMPK 通路有关,且抑制程度依赖于二甲双胍的浓度及作用时间。董丽儒等^[6]在二甲双胍作用于 PTC 裸鼠移植瘤的实验中发现,二甲双胍可抑制 PTC 细胞生长。本实验以体外培养的 PTC 细胞(TPC-1)为研究模型,采用 MTT 法检测不同浓度二甲双胍培养 24 h 后 TPC-1 细胞增殖能力的变化,结果显示,10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L 二甲双胍可不同程度地有效抑制 TPC-1 细胞增殖,且呈剂量依赖性。本结果与上述研究结果一致,提示二甲双胍是抑制 TPC-1 细胞增殖的影响因素。

本研究结果显示,在同一作用时间内,不同浓度二甲双胍均可有效诱导 TPC-1 细胞凋亡;经 40 mmol/L 二甲双胍处理后,TPC-1 细胞的凋亡率明显增加,表明二甲双胍除了能抑制 TPC-1 细胞增殖外,还能诱导细胞凋亡。关于二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡的机制,有研究结果表明,AMPK 通路亦是二甲双胍发挥抗肿瘤作用的主要途径^[10]。AMPK 作为真核生物细胞能量感受器,主要功能为维持细胞的能量代谢平衡。机体内能量平衡失调会出现如肥胖、2 型糖尿病,甚至肿瘤等一系列疾病^[14]。AMPK 在控制能量稳态方面具有关键作用,有望成为预防和(或)治疗多种代谢性疾病及部分恶性肿瘤的有效药物靶点。鉴于 AMPK 的这种特异性,我们采用 AMPK 抑制剂 Compound C 对 40 mmol/L 二甲双胍组 TPC-1 细胞处理 24 h 后,再次行 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测发现,该组 TPC-1 细胞凋亡率明显下降。Western blot 法检测结果显示,TPC-1 细胞经不同浓度二甲双胍作用后,其 p-AMPK 的表达量增加,提示二甲双胍可激活 AMPK,二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡可能与其激活 AMPK 通路有关,与既往研究结果一致^[5],提示 AMPK 通路是二甲双胍抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的共同途径。本实验未对二甲双胍激活 AMPK 的具体信号转导通路进行深入研究,有待进一步探讨。此外,二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡是否还存在其他途径,尚有待进一步研究。

在哺乳动物中存在两条凋亡途径,包括内源性或线粒体应激诱导途径,及外源性或受体诱导途径,这两条凋亡途径均通过 Caspase 实现细胞结构的物理溶解^[15]。其中 Caspase-9 作为目前研究最多的细胞凋亡启动子,是参与包括化疗、应激和辐射等在内的多种刺激反应的内源性关键分子^[15]。在整个生命周期中,Caspase-9 通过不断清除不可修复的细胞,达到维持细胞内稳态的目的。目前 Caspase-9 已成为多种与凋亡相关疾病的重要治疗靶点^[15]。关于 Caspase-9 介导二

甲双胍诱导肿瘤细胞凋亡的过程在骨髓瘤中已有相关报道^[16],但在 PTC 中的研究较少。本实验结果显示,TPC-1 细胞经不同浓度二甲双胍处理后,其 Caspase-9 表达量增加,提示二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡可能由 Caspase-9 介导。但其介导的具体机制及是否与二甲双胍激活 AMPK 通路有关,有待进一步研究。

综上所述,二甲双胍对 TPC-1 细胞的影响,除了抑制细胞增殖外,还能诱导细胞凋亡。二甲双胍诱导 TPC-1 细胞凋亡的过程可能与其激活 AMPK 通路有关,可能由 Caspase-9 介导。本研究证实,二甲双胍除降糖作用外,还具有良好的抗 PTC 作用,为今后 PTC 的治疗提供了新思路,但尚需大量的动物实验和临床试验来验证。

参 考 文 献

- [1] Choi H, Kasaian K, Melck A, et al. Papillary thyroid carcinoma: prognostic significance of cancer presentation[J]. Am J Surg, 2015, 210(2):298-301.
- [2] Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer[J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(11):646-653.
- [3] 杨晓勇, 于洋, 李大鹏, 等. 部分类型甲状腺癌患者诊治现状与思考[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 52(4):305-308.
- [4] Christodoulou MI, Scorilas A. Metformin and Anti-Cancer Therapeutics: Hopes for a More Enhanced Armamentarium Against Human Neoplasias? [J]. Curr Med Chem, 2017, 24(1):14-56.
- [5] Cho SW, Yi KH, Han SK, et al. Therapeutic potential of metformin in papillary thyroid cancer in vitro and in vivo[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 393(1-2):24-29.
- [6] 董丽儒, 王欣, 胡琨, 等. 二甲双胍抑制甲状腺乳头状癌裸鼠移植瘤生长的实验观察[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 32(7):518-521.
- [7] 梁坤, 李诗运, 戴儒奇, 等. 放射性碘-131 治疗分化型甲状腺癌转移灶的疗效及其影响因素[J]. 临床内科杂志, 2017, 34(5):323-325.
- [8] Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudhe VV, et al. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence [J]. Diabetologia, 2017, 60(9):1639-1647.
- [9] Muszynska-Oglaza A, Zarzycka-Lindner G, Olejniczak H, et al. Use of metformin is associated with lower incidence of cancer in patients with type 2 diabetes[J]. Endokrynol Pol, 2017, 68(6):652-658.
- [10] Kheirandish M, Mahboobi H, Yazdanparast M, et al. Anti-cancer Effects of Metformin: Recent Evidences for its Role in Prevention and Treatment of Cancer[J]. Curr Drug Metab, 2018, 19(9):793-797.
- [11] Zhao S, Yi M, Yuan Y, et al. Expression of AKAP95, Cx43, CyclinE1 and CyclinD1 in esophageal cancer and their association with the clinical and pathological parameters[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5):7324-7332.
- [12] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(3):211-218.
- [13] Tang Y, Yan T, Wang G, et al. Correlation between Insulin Resistance and Thyroid Nodule in Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Int J Endocrinol, 2017:1617458.
- [14] Cotan D, Paz MV, Alcocer-Gomez E, et al. AMPK As A Target in Rare Diseases[J]. Curr Drug Targets, 2016, 17(8):921-931.
- [15] Li P, Zhou L, Zhao T, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application[J]. Oncotarget, 2017, 8(14):23996-24008.
- [16] Zi F, He J, Li Y, et al. Metformin displays anti-melanoma activity and synergistic effect with dexamethasone in vitro and in vivo xenograft models[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2):443-453.

(收稿日期:2019-07-15)

(本文编辑:张一冰)