

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01261

二甲双胍对人肝细胞癌 SMMC7721 增殖的抑制作用

Effects of metformin on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC7721

郑龙轶, 邹大进*

第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433

[摘要] **目的** 检测二甲双胍作用下肝细胞癌 SMMC-7721 细胞的增殖和凋亡情况, 并初步探讨了其中的机制。

方法 以不同浓度(0.2、1、2、5 mmol/L)二甲双胍处理 SMMC-7721, 用 CCK-8 法检测其对细胞增殖的影响, Hoechst33342 DNA 染色检测细胞凋亡, 实时定量 PCR 法检测 Bcl-2 和 Bid mRNA 的表达情况。**结果** 二甲双胍处理 48 h 和 96 h 后, 人肝细胞癌 SMMC7721 细胞的增殖明显受到抑制($P < 0.05$), 以 2 mmol/L 和 5 mmol/L 组最为明显($P < 0.01$), 并呈时间和剂量依赖性。Hoechst33342 染色发现, 1 mmol/L 和 5 mmol/L 浓度的二甲双胍可促进细胞凋亡, 细胞凋亡率与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。二甲双胍处理后, SMMC7721 细胞内抗凋亡分子 Bcl-2 表达下降($P < 0.01$), 促凋亡分子 Bid 表达升高($P < 0.05$)。**结论** 二甲双胍能抑制人肝细胞癌 SMMC7721 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能与细胞内抗细胞凋亡分子 Bcl-2 表达下降及促凋亡分子 Bid 表达升高有关。

[关键词] 二甲双胍; 肝细胞癌; 细胞增殖

[中图分类号] R 735.7

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)11-1261-03

二甲双胍为双胍类口服降糖药, 能有效降低血糖水平而不致低血糖发生, 因而临床上被广泛应用于 2 型糖尿病的药物治疗。随着研究的不断深入, 发现二甲双胍可能同时具有抑制肿瘤生长的作用, 其抗肿瘤作用越来越受到重视。本研究通过二甲双胍处理人肝细胞癌细胞系 SMMC7721, 观察其对肝癌细胞增殖和凋亡的影响, 并通过检测细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bid 的表达水平改变, 初步探讨二甲双胍对肝细胞癌作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝细胞癌细胞株 SMMC7721 购自中国科学院细胞库。细胞培养用胎牛血清和 DMEM 培养基购自奥地利 PAA 公司。二甲双胍(metformin)和 Hoechst33342 购自美国 Sigma 公司。荧光显微镜为日本 Olympus 公司 IX-70 型。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司。CCK-8、RNA 逆转录试剂盒及 SYBR Real-time PCR 试剂盒均购自大连宝生物公司。PCR 用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。Real-time PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司 7300 型。

1.2 CCK8 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的完全培养液配制单细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^4 /ml 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下常规培养, 24 h 后弃上清液, 加入含有 0、0.2、1、2、5 mmol/L 二甲双胍的完全培养液, 分别于 48、96 h 检测。检测时每孔加入 20 μ l CCK-8 液, 孵育箱内常规培养 1 h, 以不加细胞空白孔为对照, 用酶标仪检测 450 nm 处的光密度值。

1.3 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡 取对数生长期细胞

以 5×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔培养板中, 细胞贴壁 24 h 后, 弃上清, 各组分别加入终浓度为 0、1、5 mmol/L 的二甲双胍, 孵育 96 h 后以 PBS 清洗细胞, 固定液固定 5 min, DNA 结合荧光染料 Hoechst33342 染色 10 min 后, 通过荧光显微镜对细胞核形态观察拍照, 以区分均质的正常细胞核及染色质浓缩的凋亡细胞核。在 400 倍镜下, 每组细胞计数 20 个视野内的细胞总数和凋亡细胞数, 然后计算平均凋亡率。

1.4 Real-time PCR 检测 Bcl-2 和 Bid 表达水平 二甲双胍干预细胞 96 h 后, TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA。将抽取的 RNA 取 2 μ g 经逆转录成 cDNA, 以 cDNA 产物为模板, 用 Real-time PCR 法检测 Bcl-2 和 Bid mRNA 表达。Bcl-2 引物: 上游: 5'-GAA CTG GGG GAG GAT TGT GG-3'; 下游: 5'-CCG GTT CAG GTA CTC AGT CA-3'; 产物长度为 124 bp, 退火温度为 60 $^{\circ}$ C。Bid 引物: 上游: 5'-CCT ACC CTA GAG ACA TGG AGA AG-3'; 下游: 5'-TTT CTG GCT AAG CTC CTC ACG-3'; 产物长度为 166 bp, 退火温度为 60 $^{\circ}$ C。 β -actin 引物: 上游: 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3'; 下游: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'; 产物长度为 250 bp, 退火温度为 60 $^{\circ}$ C。Real-time PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环, 实验重复 3 次。以 β -actin 作为内参照, 以 ABI PRISM 7300 SDS 软件分析结果, 目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta CT}$, 以对照组目的基因 mRNA 的均数为 1, 计算其他各组目的基因 mRNA 的相对表达量。

2 结果

2.1 二甲双胍对 SMMC7721 细胞增殖的影响 CCK8 检测

[收稿日期] 2010-07-22 **[接受日期]** 2010-09-19

[作者简介] 郑龙轶, 博士生, 住院医师。E-mail: longyizheng@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873279, E-mail: zwjd22@medmail.com.cn

结果显示,二甲双胍干预 48 h 和 96 h 后,2 mmol/L 和 5 mmol/L 组 SMMC7721 细胞的生长均受到抑制,与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$);随着二甲双胍作用时间

的延长,其对 SMMC7721 细胞的抑制作用更加明显,表现出明显的时间和剂量依赖性(表 1)。

表 1 不同浓度的二甲双胍处理 48 h 和 96 h 后对 SMMC7721 细胞生长的抑制率

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

分组	二甲双胍处理 48 h		二甲双胍处理 96 h	
	光密度	抑制率 (%)	光密度	抑制率 (%)
对照组	0.61±0.01	—	1.77±0.07	—
二甲双胍组 $c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$				
0.2	0.61±0.01	0.4±1.2	1.75±0.09	1.2±2.5
1	0.57±0.01	7±2.2*	1.29±0.04	27±2.2**
2	0.56±0.01	7.4±0.6**	1.10±0.04	38±2.1**
5	0.48±0.01	22±0.2**	0.85±0.03	52±1.7**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组相比

2.2 二甲双胍对 SMMC7721 细胞凋亡的影响 不同浓度的二甲双胍处理 SMMC7721 细胞 96 h 后,用 Hoechst33342 对细胞进行染色。在荧光显微镜下观察,正常细胞的细胞核呈正常的蓝色,而凋亡细胞的细胞核会呈致密浓染,或呈碎

块状致密浓染(图 1)。结果显示,二甲双胍作用 96 h 后,1 mmol/L 组和 5 mmol/L 组细胞中凋亡率均明显升高(分别为 $1.94\% \pm 0.21\%$ 和 $3.73\% \pm 0.48\%$),与对照组($0.89\% \pm 0.33\%$)相比差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

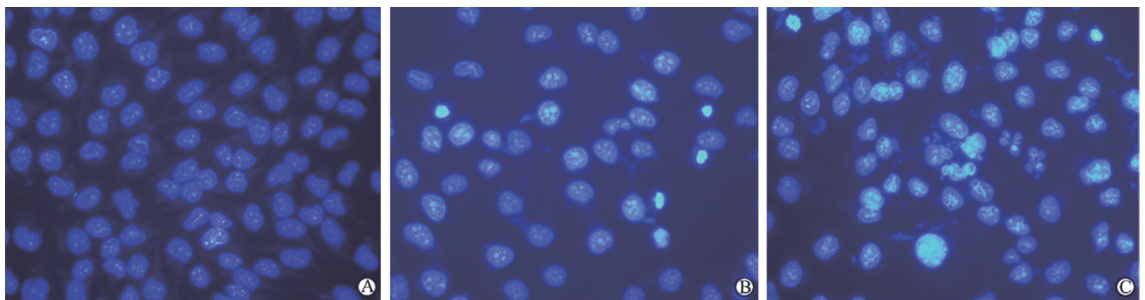


图 1 不同浓度的二甲双胍处理 96 h 后 SMMC7721 细胞的 Hoechst33342 DNA 染色

A: 对照组; B: 1 mmol/L 二甲双胍组; C: 5 mmol/L 二甲双胍组. Original magnification: $\times 400$

2.3 二甲双胍对 SMMC7721 细胞 Bcl-2 和 Bid mRNA 表达水平的影响 不同浓度的二甲双胍处理 SMMC7721 细胞 96 h 后,用 Real-Time PCR 的方法检测相关凋亡分子的 mRNA 表达水平。与对照组相比,二甲双胍 1 mmol/L 组和 5 mmol/L 处理组细胞促凋亡相关的 Bid mRNA 的表达水平升高,分别为对照组的(1.20 ± 0.01)倍和(1.23 ± 0.04)倍($P < 0.05$),抗凋亡相关的 Bcl-2 mRNA 的表达水平降低,分别为对照组的(0.32 ± 0.03)倍和(0.38 ± 0.05)倍($P < 0.01$)。

3 讨论

二甲双胍在机体内主要通过激活 AMPK 通路抑制肝脏的糖异生,同时通过促进肌肉和脂肪组织对葡萄糖的摄取及无氧酵解,改善机体胰岛素的敏感性,从而降低血糖^[1]。进一步研究发现,作为一种丝/苏氨酸蛋白激酶,AMPK 的活化还能够激活 p53-p21^{waf1} 途径,导致细胞发生 G₁ 期阻滞^[2]。同时,ATP 降低也可激活 AMPK,AMPK 又通过负调控 mTOR 信号途径抑制细胞的生长^[3]。因此,二甲双胍的抗肿瘤作用逐渐受到重视^[4]。多项临床研究^[5-7]表明,2 型糖尿病患者服用二甲双胍能够降低结肠癌、胰腺癌、肝细胞癌等多种肿瘤

的发生率。体外实验和动物实验的研究也表明,二甲双胍对多种肿瘤具有抑制增殖和促进凋亡的作用。本研究同样发现,二甲双胍能抑制肝细胞癌 SMMC7721 的增殖,促进肝癌细胞凋亡,从体外实验水平证实了二甲双胍对肝细胞癌的生长具有抑制作用。

研究表明,糖尿病是肝细胞癌发生的危险因素之一^[8],而且二甲双胍治疗能降低糖尿病患者肝细胞癌的发生率,对肝细胞癌的进展也有保护作用^[7]。本研究通过对肝细胞癌细胞系 SMMC7721 的体外实验观察,发现二甲双胍能显著抑制肝细胞癌的增殖,这可能与二甲双胍促进促凋亡基因、抑制抗凋亡基因的表达导致的细胞凋亡增加有关。

肿瘤的发生与肿瘤细胞的过度增殖和凋亡减少有关。细胞凋亡是一个多基因调控的复杂过程,受到抑制细胞凋亡的基因和促进细胞凋亡的基因的共同调控。Bcl-2 家族基因是调控细胞凋亡的重要基因,根据在细胞凋亡中的作用分为两大类,一类是抑制细胞凋亡(Bcl-2、Bcl-w、Bcl-x_L、Mcl-1 等),另一类为促进细胞凋亡(Bid、Bax、Bcl-x_S 和 Bad 等)^[9]。本研究发现,1 mmol/L 和 5 mmol/L 的二甲双胍能抑制抗凋

亡的 Bcl-2 的表达, 促进促凋亡的 Bid 的表达, 提示细胞内的凋亡调控平衡改变, 促进细胞发生凋亡, 与 Hoechst33342 DNA 染色观察到的二甲双胍处理组 (1 mmol/L 和 5 mmol/L) 凋亡细胞比例增加一致。

本研究结合临床研究提示, 二甲双胍有可能在肝细胞癌的治疗中发挥着一定的作用。然而, 由于二甲双胍的作用机制在不同的细胞系中不尽相同, 不同组织来源的细胞对二甲双胍的敏感性也不同, 仍需对二甲双胍抗肿瘤作用的细胞和分子机制进行进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Judy F M, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 1167-1174.
- [2] Motoshima H, Goldstein B J, Igata M, Araki E. AMPK and cell proliferation—AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer[J]. *J Physiol*, 2006, 574(Pt 1): 63-71.
- [3] Zakikhani M, Dowling R, Fantus I G, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 10269-10273.
- [4] Ben S, I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J F, Bost F. Metformin

in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug [J]? *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 1092-1099.

- [5] Evans J M, Donnelly L A, Emslie-Smith A M, Alessi D R, Morris A D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. *BMJ*, 2005, 330: 1304-1305.
- [6] Bowker S L, Majumdar S R, Veugelers P, Johnson J A. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin: response to Farooki and Schneider[J]. *Diabetes Care*, 2006, 29: 1990-1991.
- [7] Donadon V, Balbi M, Mas M D, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease[J]. *Liver Int*, 2010, 30: 750-758.
- [8] Davila J A, Morgan R O, Shaib Y, McGlynn K A, El-Serag H B. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study[J]. *Gut*, 2005, 54: 533-539.
- [9] Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer[J]. *Liver Int*, 2007, 27: 155-162.

[本文编辑] 尹 茶

· 消 息 ·

“全军心理卫生研究中心”在第二军医大学卫勤系正式挂牌成立

2010 年 11 月 11 日上午, “全军心理卫生研究中心”成立授牌仪式在第二军医大学卫勤系第一会议室隆重举行。总后卫生部陈新年副部长、防疫局主皓局长, 学校刘振全校长、王延军副校长、训练部方国恩部长等总部、学校首长和领导亲临现场, “中心”全体成员、相关专家代表、全军兼职心理医生班人员、研究生等参加了授牌仪式。

授牌仪式由训练部方国恩部长主持。会上, 总后卫生部防疫局主皓局长宣读了《关于在第二军医大学成立全军心理卫生研究中心的通知》, 总后卫生部陈新年副部长亲自为“全军心理卫生研究中心”成立授牌。刘振全校长代表校党委作讲话, 讲话中简单介绍了近年来我校心理学科发展情况和取得成绩, 对总后长期以来对心理学科给予的关心和支持表示感谢, 表示今后将进一步加强心理卫生工作的组织领导, 加大经费投入和政策倾斜力度, 加快我校心理学科发展步伐。他希望“中心”成立后, 能充分把握机遇, 针对部队心理卫生工作实际, 瞄准学科发展前沿, 开展高水平科学研究, 早出、多出高质量科研成果。

最后, 总后卫生部陈新年副部长作了重要指示。陈副部长充分肯定了我校近年来在心理卫生工作方面所作出的努力和取得成绩, 并就今后如何进一步加强工作提出了几点希望: 一是心理卫生工作非常重要, 军委领导十分重视, 要切实以“中心”成立为契机, 积极加快心理学科发展; 二是要发挥好第二军医大学人才高地优势, 为全军心理卫生培养更多高素质心理专业人才; 三是要加强心理卫生工作基础研究, 突出方法学研究, 紧紧围绕部队战斗力生成, 努力提高部队官兵心理健康水平。

近年来, 卫勤系心理学教研室积极整合野战内科学、神经生物学、军事航海学、生理学、卫生勤务学、精神卫生学, 形成心理学学科群, 从多个方面开展军事心理研究, 取得了多项研究成果, 承担了国家“863”、“973”、科技部支撑计划重点项目、国家自然科学基金重大项目等多项课题。已在基层部队建立了 7 个官兵心理研-教-训基地。2004 年以来, 先后组织了 340 余人次心理学专业人员深入全军 95 个基层单位开展工作, 累计授课 209 场、开展心理测评 4 万余人次、实施心理服务 12 万余人次, 在军内享有较高声誉和影响。此次依托卫勤系心理学教研室成立“全军心理卫生研究中心”, 必将有力推动我校心理学科发展, 为全军心理卫生工作提供更多、更优质的服务。