

于敬坤,李明志,随振阳,等. 二甲双胍与顺铂联合诱导人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (2): 43-50.

Yu JK, Li MZ, Sui ZY, et al. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-8 cells by metformin in combination with cisplatin [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 43-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.008

二甲双胍与顺铂联合诱导人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡的研究

于敬坤¹,李明志¹,随振阳¹,张琪¹,田炜²,胡琨¹,杨光华¹,张国志¹,王长友^{1*}

(1. 华北理工大学附属医院普通外科,河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学医学实验研究中心,河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 研究二甲双胍联合顺铂对 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡的影响及其可能机制。**方法** 将 HCT-8 人类结肠癌细胞分成二甲双胍组 (MET)、顺铂组 (DDP)、二甲双胍联合顺铂组 (MET+DDP)、空白对照组 (CK) 4 组,MTT 实验观察 4 组细胞于 24 h、48 h、72 h 时的增殖能力;流式细胞术观察各组细胞 48 h 的凋亡比例;Western blotting 观察各组细胞 48 h 时凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3(激活型)以及 AKT/GSK-3 α 通路蛋白的表达水平。**结果** 该实验中 MET+DDP 组的细胞增殖能力弱于其它三组 ($P<0.05$);细胞凋亡比例高于其它三组 ($P<0.05$);Bax、caspase-3(激活型)表达量高于其它组群,Bcl-2、P-AKT、P-GSK-3 α 表达量低于其它组群,AKT、GSK-3 α 在 4 组中表达量相对恒定 ($P>0.05$)。**结论** 二甲双胍、顺铂可能通过下调 AKT/GSK-3 α 信号通路,改变 Bcl-2 家族蛋白的表达活性从而促进 HCT-8 人类结肠癌细胞的凋亡,并促进 p-caspase-3 剪切转化为 caspase-3(激活型);二甲双胍与顺铂可协同发挥促 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡的作用。

【关键词】 HCT-8 人类结肠癌细胞;二甲双胍;凋亡;AKT/GSK-3 β 信号通路
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0043-08

Induction of apoptosis in human colon cancer HCT-8 cells by metformin in combination with cisplatin

YU Jingkun¹, LI Mingzhi¹, SUI Zhenyang¹, ZHANG Qi¹, TIAN Wei², HU Kun¹, YANG Guanghua¹,
ZHANG Guozhi¹, WANG Changyou^{1*}

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei, 063000, China. 2. Medical research center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei, 063000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects and mechanisms of action of metformin combined with cisplatin on the apoptosis in human colon cancer HCT-8 cells. **Methods** Human colon cancer HCT-8 cells were divided into four groups: metformin group (MET), cisplatin group (DDP), metformin combined with cisplatin group (MET+DDP), and blank control group (CK). The proliferative ability of HCT-8 cells was determined by an MTT experiment at 24, 48 and 72 h. The apoptosis rate was determined by flow cytometry at 48 h. Western blotting was used to reveal the expression of apoptosis-related proteins such as bcl-2, Bax and caspase-3 (activated), as well as proteins of the AKT/GSK-3 β pathway

【基金项目】 中国煤炭工业协会 2017 年度科学技术研究指导性计划项目 (MTKJ2017-331)。
【作者简介】 于敬坤 (1991—),男,山东聊城,硕士研究生,研究方向:结肠癌;E-mail: 1843293446@qq.com
【通信作者】 王长友 (1971—),男,河北唐山,硕士,主任医师,研究方向:胃肠外科学。E-mail: fhhj-2004@163.com

at 48 h. **Results** The cell proliferative ability in the MET+DDP group was weaker than that of the other three groups ($P < 0.05$). Moreover, its apoptosis rate was higher than those of the other three groups ($P < 0.05$). The expressions of Bax and caspase-3 (activated) was higher than that of the other groups, the expression of Bcl-2, p-AKT and p-GSK-3 β was lower than that of the other groups, and the expression of AKT and Gsk-3 was relatively consistent among the four groups.

Conclusions Metformin and cisplatin in combination can reduce the activity of the AKT/GSK-3 β signaling pathway, and change the expression of Bcl-2 family proteins, to promote the apoptosis of human colon cancer HCT-8 cells. They also promote the p-caspase-3 conversion to caspase-3 (activated), metformin and cisplatin can thus play a role in promoting the apoptosis of HCT-8 human colon cancer cells.

[Keywords] human colon cancer HCT-8 cell; metformin; apoptosis; AKT/GSK-3 β signaling pathways

结肠癌是最常见的胃肠道恶性肿瘤之一,在我国,其发病率及死亡率均高于世界水平,无数患者饱受结肠癌病痛的折磨^[1]。目前,我国治疗结肠癌的主要方式包括外科手术切除及以其为基础的综合治疗、化学药物治疗、放射治疗、新辅助放化疗等;但我国结直肠癌患者术后 5 年生存期依然徘徊在 60% 左右。二甲双胍(metformin)是临床上常用的降糖药物,但有相关病例对照研究资料表明,二甲双胍的使用与恶性肿瘤发生风险的下降具有一定相关性,二甲双胍使用时间的延长及使用次数的增加,可使恶性肿瘤的发病风险降低^[2-3]。凋亡是细胞生长增殖过程中重要的调节方式,在肿瘤细胞的发生、发展及死亡过程中发挥着重要作用。该实验研究二甲双胍联合顺铂对 HCT-8 人类结肠癌细胞的影响,并探究其机制,为二甲双胍优化化疗方案提供实验依据及理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HCT-8 人类结肠癌细胞获赠于华北理工大学医学实验研究中心分子诊断实验室。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 完全培养基(赛默飞世尔[苏州]仪器有限公司);四季青胎牛血清(浙江天杭生物公司);青链霉素混合液、胰蛋白酶(美国 Gibco);盐酸二甲双胍(北京索莱宝科技有限公司);顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司);MTT 试剂盒、caspase-3 (激活型)抗体、HRP 标记山羊抗小鼠/兔 IgG (H+L)(上海碧云天生物技术研究);96 孔板、6 孔板(德国 Eppendorfna);显微镜(日本 Nikon Eclipse TS100);酶标仪、显影仪、电泳转膜相关器材(上海 Bio-Rad 公司);Bcl-2、Bax、Akt、p-Akt、Gsk-3、p-Gsk-3 抗体(Cell Signaling);GAPDH 抗体(天德悦[北京]生物科技有限责任公司);流式细胞仪及 FITC

偶联 Annexin V 凋亡检测试剂盒 I(美国 BD 公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液、约 90% DMEM 完全培养基的细胞培养液培养 HCT-8 人类结肠癌细胞,并置于 37℃ 恒温、95% O₂、5% CO₂ 空气孵箱中(相对湿度为 95%)。细胞生长密度达 80% 以上时,可 1:2 或 1:3 传代(传代时间约为 2~3 d),HCT-8 细胞呈单层贴壁生长,待形成致密单层细胞时,可利用胰酶消化,取状态良好的对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 MTT 实验检测细胞增殖能力

将 HCT-8 人类结肠癌细胞均匀地播种在 96 孔板中(每孔约 10⁴ 个细胞),待细胞完全贴壁后,分别用含有不同浓度盐酸二甲双胍(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mg/mL)、不同浓度顺铂(0.5、10、15、20、25、30、35、40、45 μ g/mL)的细胞培养液培养;培养 24、48、72 h 后移除细胞培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两次。每孔加入了 100 μ L 的单纯细胞培养液及 10 μ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 试剂;将 96 孔板置于恒温箱内孵化,待紫蓝色结晶完全形成后移除细胞培养液,然后加入 100 μ L 的二甲基亚砷溶液(DMSO),轻轻晃动使结晶完全溶解,并用酶标仪测定各孔在 490 nm 波长下的吸光值。注意设置空白对照组。

根据 MTT 剂量依赖性实验结果,1.50 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂对 HCT-8 细胞具有抑制作用,且在有效抑制范围内,便于调控,因此可采用 1.50 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂作为后续实验的药物浓度,设置二甲双胍组(MET)、顺铂组(DDP)、二甲双胍联合顺铂组(MET+DDP)、空白对照组(CK)4 组,继续行 MTT 实验,观察 HCT-8 细胞 24、48、72 h 的增殖能力,并判断两种药物的协同作用。

药物协同作用效能用协同指数 (combined index, CI) 来表示,采用金正均法(概率相加法)计算:

$$E_{A+B} = E_A + E_B - E_A \times E_B$$

其中 E_A 代表 A 药单独作用时的效应; E_B 是 B 药单独作用时的效应; E_{A+B} 是 A 药与 B 药联合作用时的效应,为联合用药效应的期望值。

$$Q = E_{A+B} \div (E_A + E_B - E_A \times E_B)$$

Q 值的意义:0.85-1.15 为效应单纯相加;1.15-20 为效应增强;>20 为效应显著增强;0.85-0.55 为效应拮抗;<0.55 为相应明显拮抗(协同作用;两种以上药物联合应用时,如各药物的作用方向一致为协同作用;反之成为拮抗作用;当 Q 值 ≥ 0.85 时,即两种药物具有协同作用)。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡比例

将 HCT-8 人类结肠癌细胞均匀地播种在 6 孔板中并培养,密度达 70%~80%时分别给予含 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍 (MET 组)、20 μ g/mL 顺铂 (DDP 组)、1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍及 20 μ g/mL 顺铂 (MET+DDP 组)、不含药物 (CK 组) 的细胞培养液 2 mL 继续培养,48 h 后移除细胞培养液,各组均收集约 10^6 个细胞于 5 mL 试管内;试管内加入 400 μ L 的 1X Binding Buffer 及 5 μ L FITC Annexin V,室温孵化 15 min 后加入 5 μ L PI,在流式细胞仪中检测各组细胞的凋亡比例,并计算联合用药的协同指数。

1.3.4 Western blotting 观察 HCT-8 人类结肠癌细胞 Bcl-2、Bax、caspase-3 (激活型) 以及 AKT/GSK-3 通路蛋白的表达水平

将 HCT-8 人类结肠癌细胞同上分组并培养,48 h 后用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,每孔内加入 100 μ L 含有 1%PMSF 的组织细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后刮下细胞并在预冷的低温高速离心机中离心 15 min (14000 r/min),收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度并变性,依次制备 8%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转转膜将蛋白转到硝酸纤维素膜 (PVDF 膜) 上,室温下封闭液 (5% 脱脂奶粉、0.02 mmol/L Tris-HCL、0.5 mmol/L NaCl、0.1% 吐温 20、pH 7.5) 封闭 2 h, TBST (0.02 mmol/L Tris-HCL、0.5 mmol/L NaCl、0.1% 吐温 20、pH 7.5) 洗膜 3 次后,4 $^{\circ}$ C 敷一抗过夜, TBST 洗膜 3 次后加入二抗孵化 2 h, TBST 洗净二抗,加入显影剂在显影仪内显影,以 GAPDH 为内参蛋白,在内参平齐的前提下,观察各组细胞

中各蛋白的表达。

1.4 统计学方法

每组实验重复 3 次,实验数据使用 SPSS Statistic 17.0 软件进行统计分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,资料数据采用单因素方差分析或重复测量方差分析,进一步两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测细胞增殖能力

2.1.1 盐酸二甲双胍及顺铂对 HCT-8 人类结肠癌细胞增殖能力、相对增殖能力的影响

在不同浓度盐酸二甲双胍作用下,24 h 时 HCT-8 人类结肠癌细胞在盐酸二甲双胍浓度下约 0~2.00 mg/mL 范围内,出现细胞增殖强于无药物干预(可能由于药物诱发细胞应激性增殖),药物浓度高于 2 mg/mL 时,HCT-8 细胞增殖能力随药物浓度升高而逐渐递减;48、72 h 时,在盐酸二甲双胍浓度为 0~4.50 mg/mL 范围内,HCT-8 细胞的增殖能力总体上与药物浓度呈负相关关系,随着盐酸二甲双胍药物浓度的增高,细胞增殖能力随之递减(图 1)。在不同浓度顺铂作用下,24 h 时 HCT-8 细胞的增殖能力与顺铂药物浓度呈负相关;48、72 h 时 HCT-8 细胞增殖能力均在一定浓度范围内随顺铂浓度增高而降低,48 h 顺铂浓度约高于 30 μ g/mL、72 h 顺铂浓度约高于 15 μ g/mL 时,HCT-8 细胞增殖能力不随顺铂浓度增高而发生明显改变(图 2)。在盐酸二甲双胍及顺铂作用下,HCT-8 细胞的相对增殖能力随着作用时间的延长(相对增殖能力=某一时间内实验组的细胞增殖能力/同时刻对照组的细胞增殖能力 $\times 100\%$;相对增殖能力可反映细胞增殖受抑制程度),总体上表现为递减趋势(图 1、图 2)。

MTT 检测 HCT-8 人类结肠癌细胞在 1.50 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合作用 24、48、72 h 时的细胞增殖能力;如表 1,盐酸二甲双胍组 (MET)、顺铂组 (DDP) 及联合用药组 (MET+DDP) 的细胞增殖能力要弱于空白对照组 (CK),联合用药组 (MET+DDP) 的细胞增殖能力明显低于其它 3 组 ($P < 0.05$)。药物协同指数 (CI) Q 值在药物作用 24、48、72 h 时均大于 0.85,提示 MET+DDP 的联合抗 HCT-8 细胞增殖能力的作用强于 MET 组、DDP 组。

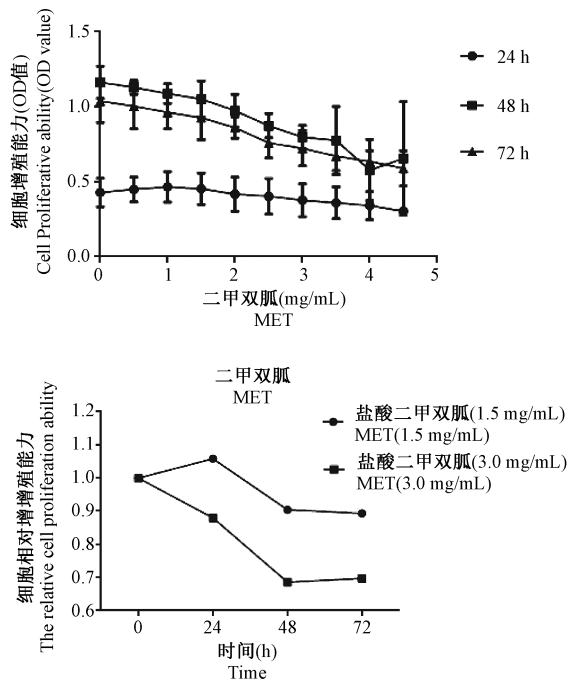


图 1 盐酸二甲双胍对 HCT-8 人类结肠癌细胞增殖能力及相对增殖能力的影响

Figure 1 The effect of metformin hydrochloride on proliferation and relative proliferation ability of human colon cancer HCT-8 cells

1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药作用于 HCT-8 人类结肠癌细胞 48 h 时(图 3),对照组的 HCT-8 细胞体积较小,排布密集,形态较为规整,可见分裂核;顺铂组较对照组细胞体积增大明显,多核细胞比例增多;二甲双胍组较对照组,细胞体积增大,胞质空泡化明显;联合用药组细胞既体积增大明显,胞质又出现空泡化。

2.2 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药对 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡的影响

DDP 组、MET 组、MET+DDP 组、CK 组四组的总凋亡比例分别是 (19.7267 $\pm$ 0.2043) %、(16.2567 $\pm$ 1.3258) %、(33.7567 $\pm$ 0.7182) %、(10.3667 $\pm$ 0.1301) %;本实验中,当 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药作用于 HCT-8 人类结肠癌细胞 48 h 时(图 4),均可引起 HCT-8 细胞的总凋亡比例上升(对比 CK 组,并具有统计学差异, $P < 0.05$);MET+DDP 组 HCT-8 细胞的总凋亡比例最高,且均强于 MET 组、DDP 组及 CK 组, $P < 0.05$ 。MRT+DDP 组促 HCT-8 细胞凋亡的协同指数为 1.0299 $>$ 0.85,提示 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍与 20 μ g/mL 顺铂对促进 HCT-8 细胞具有协同作用。

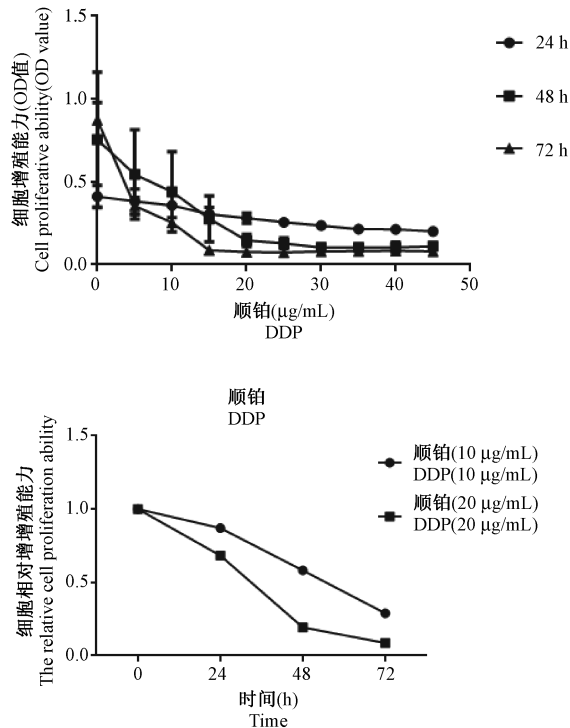


图 2 顺铂对 HCT-8 人类结肠癌细胞增殖能力及相对增殖能力的影响

Figure 2 The effect of cisplatin on proliferation and relative proliferation ability of human colon cancer HCT-8 cells

2.3 Western blotting 检测药物作用 48 h 时相关蛋白的表达活性

2.3.1 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药影响 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达

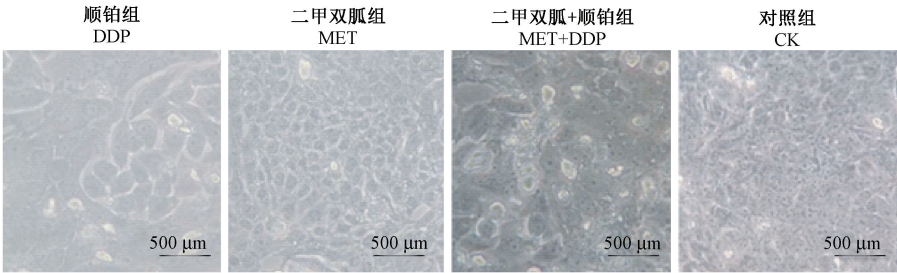
Bcl-2 的活性在 CK、MET、DDP、MET+DDP 4 组内依次为 (1.0383 $\pm$ 0.1496)、(0.8422 $\pm$ 0.1228)、(0.6507 $\pm$ 0.1493)、(0.4629 $\pm$ 0.1315),4 组间彼此存在统计学差异,且呈递减趋势, $P < 0.05$;而 Bax 的活性在 CK、MET、DDP、MET+DDP 4 组内依次为 (0.5714 $\pm$ 0.1226)、(0.7379 $\pm$ 0.1108)、(0.9001 $\pm$ 0.1008)、(1.1355 $\pm$ 0.1302),4 组间也彼此存在统计学差异,且呈递增趋势, $P < 0.05$;Bax/Bcl-2 值在 CK、MET、DDP、MET+DDP 4 组内分别是 (0.6398 $\pm$ 0.1988)、(0.8887 $\pm$ 0.1505)、(1.2557 $\pm$ 0.1943)、(1.9982 $\pm$ 0.3168),依次递增,并具有统计学意义, $P < 0.05$ (图 5)。

2.3.2 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药影响 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡相关蛋白 caspase-3(激活型)的表达

表 1 盐酸二甲双胍联合顺铂对 HCT-8 人类结肠癌细胞增殖能力的影响 (OD 值) ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 The effect of metformin hydrochloride combined with cisplatin on the proliferation capacity of human colon cancer HCT-8 cells (OD value)

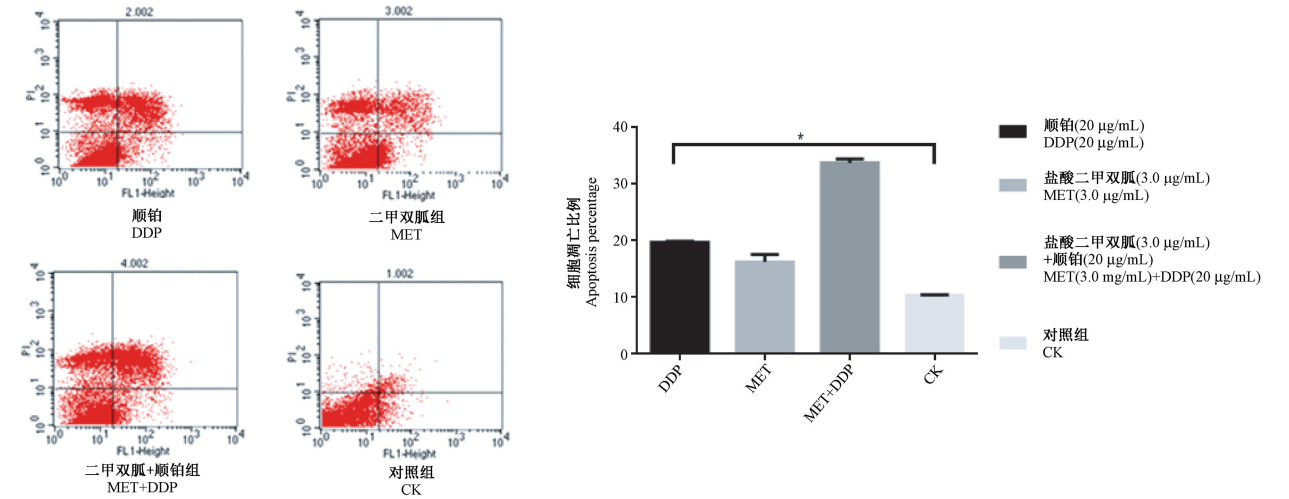
组别 Groups	24 h	48 h	72 h
顺铂组 DDP	0.46767±0.03931 ^{#※}	0.63367±0.02350 ^{#※}	0.51333±0.01901 ^{#※}
二甲双胍组 MET	0.58650±0.06759 ^{*※}	0.83300±0.08464 ^{*※}	1.08800±0.10378 ^{*※}
二甲双胍+顺铂组 MET+DDP	0.40183±0.04577 ^{*#}	0.50267±0.05020 ^{*#}	0.32200±0.00625 ^{*#}
对照组 CK	0.79950±0.03731 ^{*※}	1.12433±0.05393 ^{*※}	1.56033±0.17242 ^{*※}
药物协同指数 CI (Q)	0.8713	0.9571	1.0309

注:与 DDP 组相比, * $P<0.05$;与 MET 组相比, [#] $P<0.05$;与 MET+DDP 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 CK 组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note: Compared with the DDP group, * $P < 0.05$. Compared with the MET group, [#] $P < 0.05$. Compared with the MET+DDP group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with the CK group, [&] $P < 0.05$.



注:DDP、MET、MET+DDP、CK 四组给予相应处理 48 h 后各组细胞的形态学改变。
图 3 DDP、MET、MET+DDP、CK 各组 HCT-8 细胞于培养 48 h 的细胞观察 (×200)
Note. The morphological changes of HCT-8 cell in the DDP, MET, MET+DDP and CK groups were given corresponding treatment for 48 h.

Figure 3 Observation of the HCT-8 cells in DDP, MET, MET+DDP and CK groups after 48 h



注:DDP、MET、MET+DDP、CK 四组相比较, * $P<0.05$ 。
图 4 盐酸二甲双胍联合顺铂作用于 HCT-8 人类结肠癌细胞 48 h 时对其凋亡的影响
Note. Compared with the four groups of DDP, MET, MET+DDP and CK, * $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of metformin hydrochloride combined with cisplatin on apoptosis in the HCT-8 human colon cancer cells at 48 h after treatment.

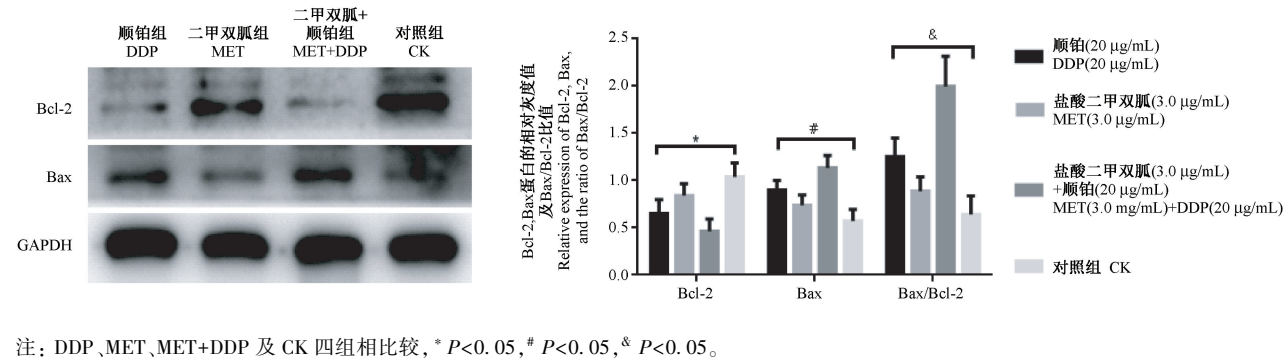
药物作用 48 h 时, caspase-3 (激活型) 的表达在 CK、MET、DDP、MET+DDP 4 组内分别是 (0.5701±0.0535)、(0.7288±0.0855)、(0.8302±0.0506)、(0.9347±0.0902), 且 caspase-3 (激活型) 的表达呈依次递增的趋势, 并具有统计学意义, $P<0.05$ (图 6), 提示在 MET+DDP 组 HCT-8 细胞中无凋亡促进

活性的 p-caspase-3 进行蛋白剪切形成具有促凋亡活性的 caspase-3(激活型)的比例增高。

2.3.3 1.5 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药影响 HCT-8 人类结肠癌细胞 AKT/GSK-

3 β 通路蛋白的表达

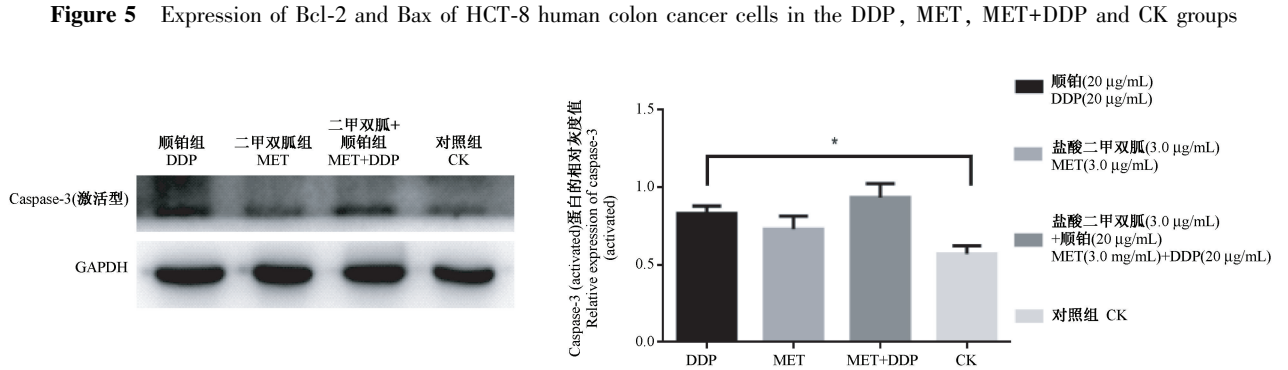
AKT/GSK-3 β 通路蛋白在 CK、MET、DDP、MET+DDP 各组内的活性如图 7 所示,AKT、GSK-3 β 在 4 组内表达活性无明显差异, $P>0.05$;p-AKT、p-GSK-



注: DDP、MET、MET+DDP 及 CK 四组相比较, * $P<0.05$, # $P<0.05$, & $P<0.05$ 。

图 5 DDP、MET、MET+DDP、CK 各组 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达活性

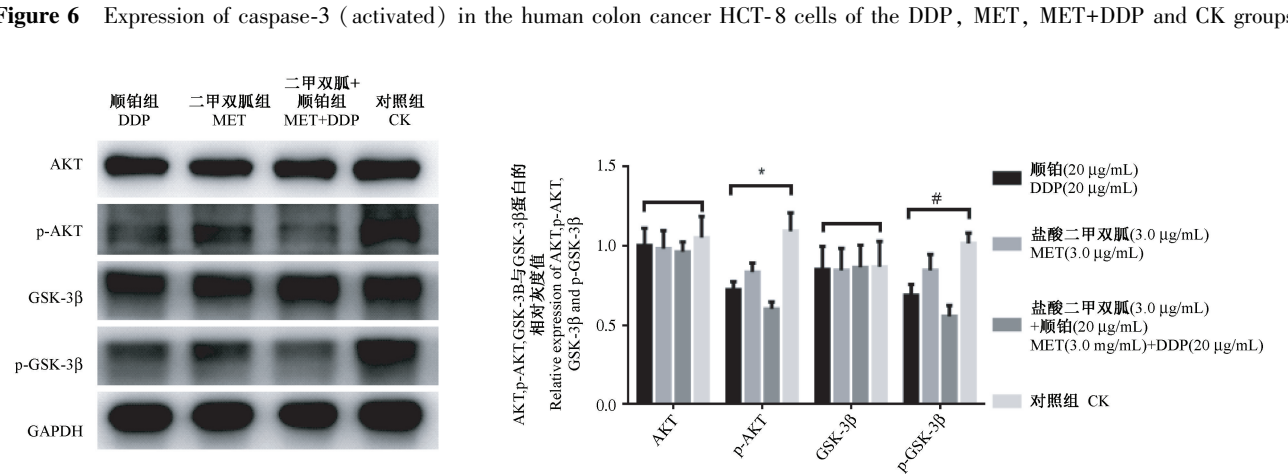
Note. Compared with the four groups of DDP, MET, MET+DDP and CK, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, & $P < 0.05$.



注: DDP、MET、MET+DDP 及 CK 四组相比较, * $P<0.05$ 。

图 6 DDP、MET、MET+DDP、CK 各组 HCT-8 人类结肠癌细胞凋亡相关蛋白 caspase-3(激活型)的表达活性

Note. Compared with the four groups of DDP, MET, MET+DDP and CK, * $P < 0.05$.



注: DDP、MET、MET+DDP 及 CK 四组相比较, * $P<0.05$, # $P<0.05$ 。

图 7 DDP、MET、MET+DDP、CK 各组 HCT-8 人类结肠癌细胞 AKT/GSK-3 β 通路蛋白的表达活性

Note. Compared with the four groups of DDP, MET, MET+DDP and CK, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$.

Figure 7 Protein expression of AKT/GSK-3 β signaling pathways in the human colon cancer HCT-8 cells in the DDP, MET, MET+DDP and CK groups

3 β 在 CK、MET、DDP、MET+DDP 4 组内分别表达为 (1.0928 $\pm$ 0.1182)、(0.8350 $\pm$ 0.0579)、(0.7247 $\pm$ 0.0500)、(0.6021 $\pm$ 0.0447) 及 (1.0167 $\pm$ 0.0669)、(0.8467 $\pm$ 0.1017)、(0.6899 $\pm$ 0.0680)、(0.5551 $\pm$ 0.0710), 且均表现为依次递减趋势, 并具有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

结肠癌是我国第 6 大高发恶性肿瘤, 在癌症死亡患者中排第 5 位^[4]; 主要是由长期不合理饮食、肠道慢性病恶变、遗传等因素引起, 近年来逐渐趋于青少年发展^[5-6], 相关研究指出肥胖患者及糖尿病患者结肠癌的发病风险会高于正常人^[7-9]。铂类药物 (platinum drugs) 是治疗结肠癌的重要化疗药物, 具有较高的抗肿瘤效能, 诸多基础实验及临床研究已证明单用或联合应用铂类药物均有明显的抗肿瘤作用^[10-13]。顺铂 (cisplatin、DDP) 是第一代铂类药物, 属于细胞周期非特异性药物, 可通过抑制细胞核分裂使癌细胞生长周期受抑制^[14], 但胞质受影响较小, 因此可出现胞体增大现象。实验中顺铂可明显降低 HCT-8 人类结肠癌细胞的增殖能力, 并存在剂量及时间依赖性。但顺铂也有明显的不良反应, 如恶心、呕吐等消化道反应及肾毒性、神经毒性、骨髓抑制、过敏反应、心肺功能异常等, 减少顺铂用药可减少不良反应的发生或减轻不良反应的程度^[15]; 另外, 随着顺铂等铂类药物的使用, 肿瘤细胞耐药性也会逐渐增强^[16]。因此联合用药、减少顺铂的使用成为现代医学研究的重点之一。二甲双胍是临床上的一线降糖药物。随着对其研究的不断深入, 部分学者提出二甲双胍具有降低肿瘤发生风险的作用^[17-19]; 有实验表明二甲双胍可能通过促进胞内脂类物质代谢、调节机体内分泌水平、抑制血小板亢进及降低血液高凝状态等途径, 抑制肿瘤细胞的发生、发展^[20]; 在一定药物范围内, 随着盐酸二甲双胍浓度的增高及作用时间的增加, HCT-8 人类结肠癌细胞的增殖能力也随之降低, 表明二甲双胍可抑制 HCT-8 细胞的生长、增殖, 并存在剂量、时间依赖性 (图 1)。且二甲双胍与顺铂具有一定的协同效果, 二者联合用药时, HCT-8 细胞的增殖能力均明显弱于单药使用, 提示二甲双胍可减少化疗药物的使用剂量, 优化化疗方案。

凋亡是细胞生长增殖过程中重要的调节方式, 可主动清除衰老、破损、具有异常功能及潜在危险

的细胞, 如有癌变危险且自身又无法修复逆转的细胞等^[21]。胞质空泡化是细胞凋亡的重要表现形式, 二甲双胍可使 HCT-8 人类结肠癌细胞出现胞质空泡化, 可见二甲双胍具有促进 HCT-8 细胞凋亡的潜能^[22]。流式细胞术检测结果 (图 4) 提示, 1.50 mg/mL 盐酸二甲双胍、20 μ g/mL 顺铂及联合用药可增强 HCT-8 细胞的凋亡, 并且联合用药引起 HCT-8 细胞的凋亡比例明显高于单药使用。细胞凋亡的调控信号通路主要分为外在信号通路 (细胞表面死亡受体途径) 及内在信号通路 (线粒体凋亡通路)^[22-23]。Bcl-2 家族蛋白是调控细胞凋亡的关键因子, 主要调控内在凋亡途径, 作用靶点是线粒体^[24]。Bcl-2 是 Bcl-2 家族中典型的抗凋亡蛋白, 而 Bax 是促凋亡蛋白, 二者协同发挥作用, 通过改变线粒体外膜的通透性、改变线粒体形态、影响膜间隙蛋白释放及 caspase 级联活化等途径影响细胞凋亡过程^[25]。HCT-8 细胞在二甲双胍、顺铂作用下, 促凋亡蛋白 Bax 活性明显增高, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 活性降低, Bax/Bcl-2 值明显增高, 表明二甲双胍及顺铂均可通过调控线粒体凋亡途径促进 HCT-8 细胞的凋亡, 且二者联合作用时, Bax/Bcl-2 值较单药作用结果均明显增高, 说明联合用药可能调控线粒体凋亡途径作用更强。

天冬氨酸特异性蛋白酶 (caspases) 是另一组与细胞凋亡密切相关的蛋白酶家族, 在细胞凋亡最终途径的调控中具有关键作用^[26]。caspase-3 (激活型) 是重要的凋亡效应因子, 是凋亡的执行蛋白、凋亡关键的蛋白酶^[27]; 正常细胞中的 caspase-3 是以无活性的 p-caspase-3 存在的, 在一定条件下, p-caspase-3 可通过蛋白剪切形成具有活性的 caspase-3 (激活型), 从而诱发级联放大效应, 促进细胞凋亡。在 MET、DDP、MET+DDP 组中, HCT-8 人类结肠癌细胞的 caspase-3 (激活型) 活性均高于 CK 组, 且 MET+DDP 组的 caspase-3 (激活型) 活性也高于其他各组, 再次说明二甲双胍与顺铂具有协同促 HCT-8 细胞凋亡作用。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 是细胞内重要的通路蛋白, 可广泛参与细胞的生理病理过程, 其活性表达形式 p-AKT (磷酸化 AKT) 可以通过促进丝氨酸/苏氨酸残基底物磷酸化从而发挥促进细胞增殖、抑制凋亡作用^[28-29]; 糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 是 AKT 的直接作用底物之一, p-AKT 可以与 GSK-3 β 直接结合, 改变其 Ser9 位点结构, 使 GSK-3 β 发生磷酸化修饰, 从而抑制

GSK-3 β 活性^[30]。盐酸二甲双胍、顺铂分别作用于 HCT-8 人类结肠癌细胞后,肿瘤细胞内 AKT、GSK-3 β 活性相对恒定不变,p-AKT、p-GSK-3 β 活性明显降低,说明二甲双胍及顺铂均可能通过抑制 AKT/GSK-3 β 信号通路实现促凋亡作用;当盐酸二甲双胍联合顺铂作用于 HCT-8 细胞时,p-AKT、p-GSK-3 β 的活性较单药作用减弱,表明联合用药可协同加强对 AKT/GSK-3 β 信号通路的抑制作用。

综上,二甲双胍、顺铂可能通过调控 AKT/GSK-3 β /Bcl-2 家族蛋白通路促进 HCT-8 人类结肠癌细胞的凋亡,并促进 p-caspase-3 转化为 caspase-3(激活型);二甲双胍与顺铂对 HCT-8 细胞凋亡具有协同作用,联合用药促凋亡作用强于单药作用。

参考文献:

[1] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等.2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2018,27(01):1-14.

[2] Evans JM,Donnelly LA,Emslie-Smith AM,et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J].BMJ,2005,330(7503):1304-1305.

[3] 母文明,纪立农,宁光,等.二甲双胍临床应用专家共识(2016 年版)[J].中国糖尿病杂志,2016,24(10):871-884.

[4] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. Ann Transl Med, 2014, 2(7): 61.

[5] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J].CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[6] 姜艳芳,魏志,孙自勤.中国青年大肠癌发病趋势分析[J].胃肠病学和肝病杂志,2016,25(09):982-987.

[7] Matsuo K,Mizoue T,Tanaka K, et al. Association between body mass index and the colorectal cancer risk in Japan: pooled analysis of population-based cohort studies in Japan [J].Ann Oncol,2012,23(2): 479-490.

[8] Ben Q, An W, Jiang Y, et al. Body mass index increases risk for colorectal adenomas based on meta-analysis [J]. Gastroenterol, 2012,142(4): 762-772.

[9] De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer[J]. Br J Surg,2013,100(11):1421-1429.

[10] Chen X, Wu Y, Dong H, et al. Platinum-based agents for individualized cancer treatment [J]. Curr Mol Med, 2013, 13(10):1603-1612.

[11] Hato SV, Khong A, De Vries IJ, et al. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics [J].

Clin Cancer Res,2014,20(11): 2831-2837.

[12] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J].Nat Rev Cancer,2007,7(8): 573-584.

[13] Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design[J].Ann Pharm Fr,2011,69(6): 286-295.

[14] 高传柱,王天帅,陈佳,等.铂类抗肿瘤药物作用机制研究进展[J].昆明理工大学学报(自然科学版),2014,39(04):83-92.

[15] 李华梅.静脉输注顺铂副作用的预防措施及效果观察[J].医疗装备,2014,27(10):42-43.

[16] 郗照勇,刘扬中.顺铂耐药的分子机制[J].中国科学:化学,2014,44(04):410-422.

[17] DILMAN VM. Age-associated elevation of hypothalamic, threshold to feedback control, and its role in development, ageing, and disease[J]. Lancet,1971,297(7711):1211-1219.

[18] 周侠,缪珩.二甲双胍抗癌作用的研究进展[J].天津医药,2017,45(07):767-771.

[19] 许光煜.二甲双胍或延缓肿瘤生长[N].医药经济报,2013-04-05(003).

[20] 姜宁,路平.二甲双胍抗肿瘤作用机制[J].新乡医学院学报,2016,33(2):150-152.

[21] 陈津,张如松.细胞凋亡机制概述[J].中华中医药学刊,2011,29(04):886-889.

[22] 张浩赞,夏艳,王鹏飞,等.胞质空泡化的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(34):66-68.

[23] Liu L, Zhang Z, Xing D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage[J]. Free Radic Biol Med,2011;51(1):53-68.

[24] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2011;351:41-58.

[25] 许茸茸,李应东.Bcl-2 家族与线粒体凋亡通路相互作用研究进展[J].中国老年学杂志,2013,33(12):2977-2979.

[26] 赵瑞杰,李引乾,王会,等.Caspase 家族与细胞凋亡的关系[J].中国畜牧杂志,2010,46(17):73-78.

[27] Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex[J]. Mol Cell 2002,9:601-610.

[28] 龚青,陈洁.PTEN/PI3K/Akt 信号转导通路与结直肠癌关系的研究现状[J].胃肠病学和肝病杂志,2016,25(06):706-710.

[29] 石雪萍,李静,冉建华,等.人参皂苷 Rh2 调控 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路诱导人结肠癌细胞凋亡[J].中国药理学通报,2017,33(01):114-119.

[30] 朱敬丽,路赵硕,吴越,等.铜、铁、锌、铝通过 Akt/GSK-3 β 信号通路诱导 SH-SY5Y 细胞的凋亡[J].实用老年医学,2017,31(08):723-727.