

论著·临床研究

二甲双胍诱导人胎盘绒毛癌细胞系 JAR 凋亡的机制初探

柳光芬¹, 姚春艳²

(1. 武警重庆市消防总队医院检验科, 重庆 401120;

2. 中国人民解放军陆军军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

摘要:目的 探索二甲双胍诱导人胎盘绒毛癌细胞系 JAR 凋亡的作用机制。方法 将 JAR 细胞分为对照组和二甲双胍处理组(终浓度 5、10、20、40、80 mmol/L)处理 24 h 后选取合适的药物浓度。激光共聚焦显微镜检测细胞凋亡, 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)和免疫蛋白印记(Western blot)检测凋亡相关基因 AMPK, p-AMPK, mTOR, Caspase-3, Bcl-2 和 Bax 的变化趋势。结果 40 mmol/L 的二甲双胍处理能够引发 JAR 细胞凋亡, 并且激活 AMPK 的磷酸化并下调 mTOR 的蛋白水平; 同时上调 Caspase-3 和 Bax 的 mRNA 及蛋白水平, 并且下调 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达, 降低 Bcl-2 和 Bax 的蛋白水平比例。结论 二甲双胍可能是通过 AMPK/mTOR 和 Caspase-3 及 Bcl-2/Bax 两个通路的共同作用诱导 JAR 细胞发生凋亡。

关键词:人绒毛膜癌细胞; 二甲双胍; 细胞凋亡; AMPK/mTOR

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.027

中图法分类号:R329.2

文章编号:1673-4130(2018)07-0859-04

文献标识码:A

The mechanism of metformin induced human choriocarcinoma cell line JAR apoptosis

LIU Guangfen¹, YAO Chunyan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Municipal Fire Corps Hospital, Chongqing 401120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the possible mechanism of metformin on apoptosis of human choriocarcinoma cell. **Methods** The human choriocarcinoma cell line JAR was selected and divided into control and metformin groups (final concentrations were 5, 10, 20, 40 and 80 mmol/L). Confocal microscope was adopted to detect cell apoptosis after 48 h treatment. The mRNA and protein expression of AMPK, p-AMPK, mTOR, Caspase-3, Bcl-2 and Bax were measured by Real-time PCR and Western blot respectively. **Results** Compared with the control group, apoptosis rate of JAR cells in the metformin group (final concentration was 40 mmol/L) was remarkably increased. Metformin activated AMPK by phosphorylation and inhibited mTOR protein expression, meanwhile mRNA and protein expression levels of Caspase-3 and Bax were significantly increased, but Bcl-2 mRNA and protein expression were significantly decreased. **Conclusion** Metformin induces the JAR cells to generate apoptosis by the AMPK/mTOR pathways and Caspase-3, Bcl-2/Bax pathways simultaneously.

Key words: human choriocarcinoma cell line; metformin; cell apoptosis; AMPK/mTOR

人胎盘绒毛癌简称绒癌, 是发生于胎盘外层绒毛膜上皮细胞的一种高度恶性的妇科肿瘤。二甲双胍是一种常用的口服降糖药, 常用于 2 型糖尿病和妊娠期糖尿病的血糖控制^[1]。有研究表明, 二甲双胍可以抑制多种肿瘤的生长, 是潜在治疗肿瘤的新型药物^[2-3]。使用二甲双胍为降糖药治疗糖尿病的妇女, 其患肿瘤的概率要低于其他妇女。目前, 二甲双胍抑制绒癌细胞生长的机制还处于初步探索阶段^[4]。因

此, 本研究拟初步探讨二甲双胍对绒癌细胞系 JAR 凋亡信号通路的作用方式和机制, 探寻肿瘤治疗的新靶标和新药物。

1 材料和方法

1.1 试剂材料 人胎盘绒毛癌细胞系 JAR 购置于中国科学院细胞库。胎牛血清 FBS (以色列 BI 公司); RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 细胞活性和增殖检测试剂盒 CCK-8 (美国 AT-gene 公司); 末端

作者简介: 柳光芬, 女, 主任医师, 主要从事临床检验方向的研究。

本文引用格式: 柳光芬, 姚春艳. 二甲双胍诱导人胎盘绒毛癌细胞系 JAR 凋亡的机制初探[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 859-862.

脱氧核苷酰基转移酶介导性 dUTP 切口末端标记试剂盒(TUNEL)(碧云天公司);腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),雷帕霉素靶蛋白(mTOR),半胱天冬酶-3(Caspase-3)、β-肌动蛋白(β-actin)、B 细胞淋巴瘤基因 2(Bcl-2)和凋亡调节蛋白(Bax)抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 细胞培养 JAR 细胞使用含 10% 胎牛血清(FBS)和 100 U/mL 青链霉素的 RPMI-1640 培养基培养。细胞接种于 T25 细胞培养瓶中,放置于 5% 二氧化碳浓度的饱和湿度培养箱,待细胞密度为 80% 左右时进行传代。

1.3 药物最佳处理浓度筛选 选用生长旺盛的 JAR 细胞消化重悬后计数,将密度调整为 10^4 个/mL。将细胞接种于 96 孔板中,每孔加入 200 μL 细胞悬液,拍打混匀后放入培养箱中继续培养 12 h。根据前期预实验结果将 5、10、20、40、80 mmol/L 的二甲双胍溶液分别加入 96 孔板中,以未处理组为对照,每组设立 6 个复孔。二甲双胍处理 24 h 以后换液并加入 CCK-8 检测试剂 37 ℃ 孵育 1 h,使用酶标仪测定各孔的吸

光度值 OD_{490} ,并减去空白孔的读数以消除本底,计算药物对细胞增殖的抑制率。 IC_{50} = (正常对照组 OD_{490} - 二甲双胍处理组 OD_{490}) / 正常对照组 $OD_{490} \times 100\%$ 。选取接近 50% 抑制率的药物浓度为最佳处理浓度以进行后续干预实验。

1.4 TUNEL 检测 取对数期 JAR 细胞, 2×10^4 个/孔接种于放有细胞爬片的 24 孔板中,按照前面实验确定的 IC_{50} 浓度处理 24 h。按照 TUNEL 试剂盒说明书进行染色,封片后使用激光共聚焦显微镜照相,每组选取 8 个视野统计阳性细胞率。阳性细胞率 = 阳性细胞总数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.5 Real-time PCR 二甲双胍处理细胞 24 h 后,采用离心柱法提取各组细胞 RNA,吸光度测定浓度后使用逆转录试剂盒合成 cDNA 备用。采用 Syber-green 法检测 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 表达水平,并以 GAPDH 为内参。将对照组 mRNA 的表达量设为 1,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组 mRNA 量的变化。定量 PCR 的引物见表 1。

表 1 Real-time PCR 各基因的引物序列

基因	上/下游	引物序列	产物长度(bp)
Caspase-3	上游引物	5'-TGC TAT TGT GAG GCG GTT GT-3'	130
	下游引物	5'-GCA GGG CTC GCT AAC TCC-3'	
Bcl-2	上游引物	5'-CAT GTG TGG AGA GCG TCA A-3'	81
	下游引物	5'-GCC GGT TCA GGT ACT CAG TCA-3'	
Bax	上游引物	5'- CCC AGA GGC GGG GTT TCA-3'	164
	下游引物	5'- CAT CCT CTG CAG CTC CAT GT-3'	
GAPDH	上游引物	5'- CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT-3'	138
	下游引物	5'- GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'	

1.6 Western blot BCA 试剂盒对总蛋白定量,每孔蛋白上样量为 40 μg,SDS 电泳后转膜,AMPK、p-AMPK、mTOR、Caspase-3、Bcl-2、Bax 浓度均为 1 : 1 000,GAPDH 浓度为 1 : 2 000。一抗 4 ℃ 过夜后二抗(1 : 5 000)室温 1 h 后化学发光法显色,使用 Quantity One 软件分析各条带的灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。计数资料以百分率(%)表示,组间比较用 χ^2 分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人胎盘绒毛癌细胞 JAR 最佳抑制浓度 使用 5、10、20、40 和 80 mmol/L 的二甲双胍溶液处理 JAR 细胞 24 h,CCK-8 法检测细胞抑制率发现,各浓度二

甲双胍对 JAR 细胞均有一定程度的抑制作用,5 mmol/L 时抑制率最低,80 mmol/L 时抑制率最高且表现为剂量依耐效应(图 1)。当二甲双胍浓度为 40 mmol/L 时细胞抑制率为 $(53.8 \pm 8.2)\%$,最接近 50%,故在后续实验选取 40 mmol/L 为处理浓度。

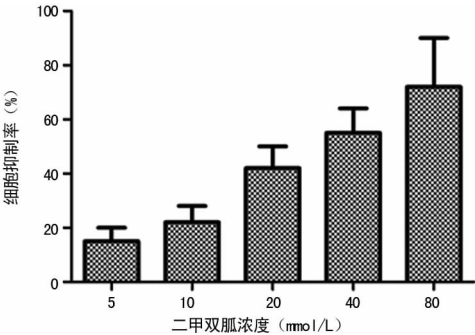
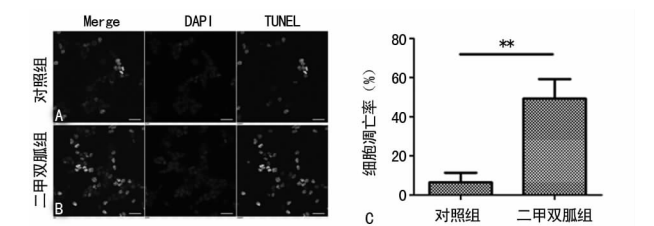


图 1 不同浓度二甲双胍对 JAR 细胞的抑制率

2.2 二甲双胍诱导 JAR 细胞发生凋亡 根据前期最佳药物浓度筛选结果,使用 40 mmol/L 的二甲双胍溶液处理 JAR 细胞 24 h。TUNEL 染色结果显示(图 2),二甲双胍处理可以诱使 JAR 细胞发生凋亡,其凋亡率为 $(49.2 \pm 10.8)\%$,而未处理组的凋亡率为 $(6.4 \pm 5.2)\%$,两组差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,二甲双胍可以促进 JAR 细胞晚期凋亡的发生。

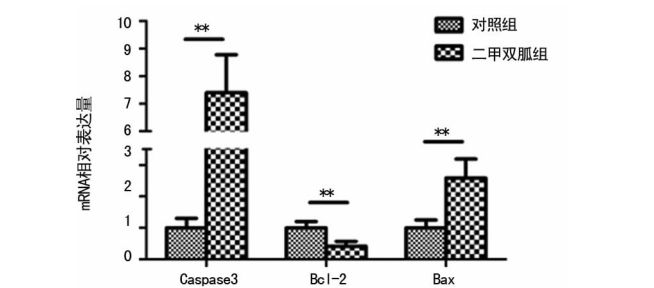


注:A为对照组正常JAR细胞;B为二甲双胍处理后的JAR细胞;C为两组细胞凋亡率统计结果;与对照组比较,** $P < 0.01$

图2 TUNEL法检测二甲双胍对JAR细胞凋亡的影响

2.3 二甲双胍调控凋亡相关基因表达 二甲双胍作用 24 h 后,使用荧光定量 PCR 检测细胞凋亡相关基因的 mRNA 变化水平发现(图 3),促凋亡基因 Caspase-3 和 Bax 相对于对照组细胞表达增加,抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低。二甲双胍处理组和对照组的

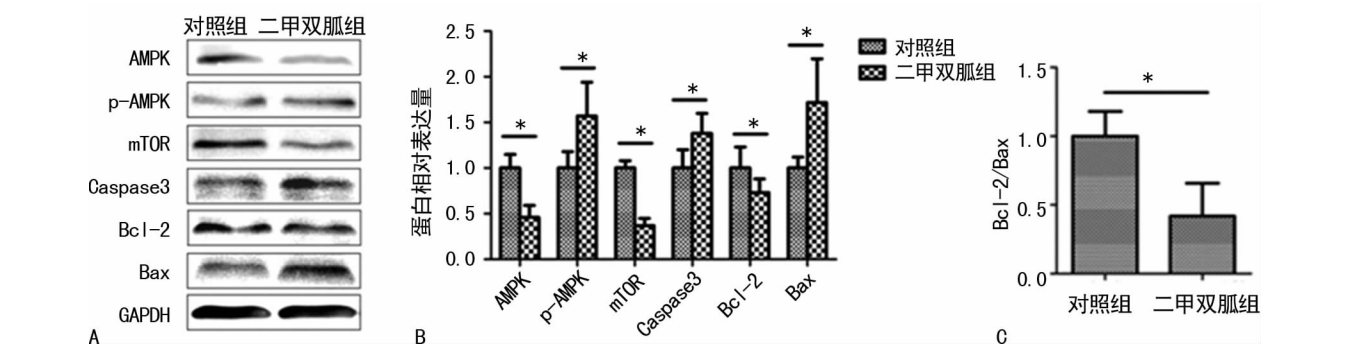
mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:与对照组比较,** $P < 0.01$

图3 二甲双胍对凋亡相关基因 mRNA 的调控

2.4 二甲双胍调控凋亡相关蛋白表达 二甲双胍处理可以增强 p-AMPK,降低 AMPK 和 mTOR 的表达,提示其通过激活 AMPK 的磷酸化水平进而抑制 mTOR 的蛋白表达(图 4);检测细胞凋亡相关基因的蛋白表达水平发现,二甲双胍可以降低抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白水平,同时上调 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达。通过分析蛋白条带的灰度值计算 Bcl-2/Bax 比值,发现 Bcl-2/Bax 比值下调。提示其可能是引发 JAR 细胞凋亡的潜在因素。



注:A为Western blot图;B为AMPK、p-AMPK、Caspase-3、Bcl-2和Bax的蛋白半定量分析结果;C为Bcl-2和Bax蛋白相对表达量比;与对照组比较,* $P < 0.05$

图4 二甲双胍对凋亡相关蛋白的调控

3 讨论

作为临床上常用的降糖药,二甲双胍疗效确切、不良反应小。近年来随着临床应用多样性研究的不断深入,发现其可以抑制多种肿瘤细胞的生长,是潜在的肿瘤治疗药物^[5-7]。KO等^[8]对363例糖尿病合并子宫内膜癌患者进行的回顾性研究发现,服用二甲双胍患者的病死率比未使用二甲双胍治疗的患者低。有研究表明,二甲双胍对卵巢癌、宫颈癌和子宫内膜癌等常见妇科肿瘤细胞有非常显著的抑制作用^[9-10]。

目前的研究表明二甲双胍主要通过以下两种方式抑制肿瘤:(1)调控 Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 等凋亡相关蛋白的表达,从而促使肿瘤细胞凋亡^[11-12];(2)激

活 AMPK/mTOR 通路,减少 ATP 合成,影响能量代谢和蛋白翻译,或者下调细胞周期蛋白 D1 从而将肿瘤细胞阻滞于 G₀/G₁ 期抑制其生长^[13]。

mTOR 是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,其在细胞的增殖、生长、凋亡和血管生成过程中发挥着重要作用。AMPK 通过磷酸化激活后可以对 mTOR 起负调控,从而引起 mTOR 下游如翻译起始因子 4E 结合蛋白(4E-BPs)和核糖体 S6 激酶(S6Ks)等翻译过程相关分子失活,进而抑制肿瘤细胞蛋白的合成;同时 mTOR 也能够抑制在大多数肿瘤细胞中都过度激活的 PI3K-PKB/Akt 信号通路,最终抑制肿瘤细胞的生长和增殖^[14-15]。

细胞凋亡是一个动态平衡的过程,其受到促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的共同作用。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族的重要成员,当促凋亡蛋白如 Bax 表达上升或者抗凋亡 Bcl-2 的降低时,细胞开启凋亡进程。Bcl-2 和 Bax 的动态平衡是调节细胞凋亡的重要指标,通常使用二者的比值来衡量细胞的凋亡水平变化^[16-18]。Caspase-3 是线粒体介导的细胞凋亡通路中的关键蛋白,其功能是促进细胞增殖并抑制细胞发生凋亡。本研究发现,使用二甲双胍处理绒毛癌细胞 JAR 后 Caspase-3、Bax 蛋白表达增加而 Bcl-2 蛋白表达下降, Bcl-2/Bax 比值下降,其比例下调后可以破坏线粒体外膜完整性,阻碍细胞色素 C 的释放,从而激活凋亡途径最终效应因子 Caspase-3。Caspase-3 激活后可降解 DNA 损伤修复酶,同时激活核酸内切酶,引起细胞凋亡^[19]。

综上所述,本研究证实二甲双胍可以诱导人绒毛膜癌细胞系 JAR 发生凋亡,其可能是通过激活 AMPK 抑制 mTOR 下游等和蛋白翻译,细胞增殖的关键分子;开启 Caspase-3、Bcl-2/Bax 等引发线粒体凋亡的重要分子的共同作用来实现的。此结果有望为进一步临床治疗绒癌提供新的治疗思路与治疗方法。

参考文献

- [1] 刘兴会,陈鹏.口服降糖药物在妊娠期糖尿病中的应用[J].中国实用妇科与产科杂志,2013,29(4):252-255.
- [2] KATO K, GONG J, IWAMA H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(3): 549-560.
- [3] KASZNICKI J, SLIWINSKA A, DRZEWSKI J. Metformin in cancer prevention and therapy[J]. Ann Transl Med, 2014, 2(6): 57.
- [4] 柳光芬.二甲双胍对人绒毛膜癌细胞凋亡的影响[J].国际检验医学杂志,2016,37(23):3280-3282.
- [5] ZHANG P, LI H, TAN X, et al. Association of metformin use with cancer incidence and mortality; a meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol, 2013, 37(3): 207-218.
- [6] EVANS J M, DONNELLY L A, EMSLIE-SMITH A M, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. BMJ, 2005, 330(753): 1304-1305.
- [7] RIZOS C V, ELISAF M S. Metformin and cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 705(1-3): 96-108.
- [8] KO E M, WALTER P, JACKSON A, et al. Metformin is associated with improved survival in endometrial cancer[J]. Gynecol Oncol, 2014, 132(2): 438-442.
- [9] 孙莉,谭文华,刘巍.二甲双胍与妇科肿瘤关系的研究现状[J].中国医师进修杂志,2017,40(2):187-190.
- [10] PATEL S, SINGH N, KUMAR L. Evaluation of effects of metformin in primary ovarian cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(16): 6973-6979.
- [11] 庞若宇,关美萍,郑宗基,等.二甲双胍对糖基化终末产物诱导的成纤维细胞凋亡及相关蛋白 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 表达的影响[J].南方医科大学学报,2015,35(6): 898-902.
- [12] BESBES S, MIRSHAHI M, POCARD M, et al. New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins[J]. Oncotarget, 2015, 6(15): 12862-12871.
- [13] FOSTER S S, DE S, JOHNSON L K, et al. Cell cycle and DNA repair pathway-specific effects of apoptosis on tumor suppression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(25): 9953-9958.
- [14] HAN G, GONG H J, WANG Y D, et al. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(1): 77-87.
- [15] DOWLING R J, GOODWIN P J, STAMBOLIC V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment[J]. BMC Med, 2011, 9(1): 1-6.
- [16] XIE Z, KOYAMA T, SUZUKI J, et al. Coronary reperfusion following ischemia; different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis[J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759-770.
- [17] DELBRIDGE A R, GRABOW S, STRASSER A, et al. Thirty years of BCL-2; translating cell death discoveries into novel cancer therapies[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(2): 99-109.
- [18] HENNESSY E J. Selective inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL: Balancing antitumor activity with on-target toxicity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(9): 2105-2114.
- [19] TAKAHASHI A, KIMURA F, YAMANAKA A, et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14(1): 53.

(收稿日期:2017-09-21 修回日期:2017-11-11)