

二甲双胍诱导甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞的凋亡*

董丽儒¹ 李敏² 李双¹ 刘爱东¹ 熊艳杰¹ 唐慧¹ 宋旭东¹

[摘要] 目的:探讨二甲双胍对甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞凋亡的影响及其机制。方法:MTT 实验分别检测不同浓度(0 mmol/L,1 mmol/L,5 mmol/L,10 mmol/L,20 mmol/L)二甲双胍和 20 mmol/L 二甲双胍不同时间点(0 h,4 h,8 h,16 h,24 h,48 h)对 PTC 细胞系 BCPAP 细胞增殖的影响。流式细胞术检测二甲双胍对细胞凋亡的影响,Western blot 检测 GRP78、CHOP、Caspase-12 蛋白的表达。结果:与 0 mmol/L 对照组相比,1 mmol/L 至 20 mmol/L 的二甲双胍可有效降低 BCPAP 癌细胞的增殖活性($P < 0.05$);20 mmol/L 二甲双胍处理 BCPAP 癌细胞 48 h 后,可呈现明显细胞凋亡,且内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 表达明显增加($P < 0.05$)。而抑制剂组则可降低 BCPAP 癌细胞的凋亡率和内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 的表达($P < 0.05$)。结论:二甲双胍可以通过启动内质网应激有效参与诱导 BCPAP 细胞凋亡。

[关键词] 甲状腺乳头状癌;二甲双胍;内质网应激;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.12.010

[中图分类号] R736.1 [文献标志码] A

Metformin induced apoptosis of papillary thyroid carcinoma BCPAP cells

DONG Liru¹ LI Min² LI Shuang¹ LIU Aidong¹ XIONG Yanjie¹
TANG Hui¹ SONG Xudong¹

(¹Department of Pathology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, 063000, China; ²Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology)

Corresponding author: SONG Xudong, E-mail: songxd2002@sina.com

Abstract Objective: To investigate the role of metformin in inducing apoptosis of papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. **Method:** Using MTT methods to detect effects of metformin on cell proliferation of BCPAP in different concentrations(0 mmol/L, 1 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L) and time course(0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h). The experiment was divided into four groups: Con, Met, Met+Sal and Met+DM, flow cytometry to detect the rate of apoptosis of BCPAP. Then detect the protein expressions of CHOP, GRP78 and Caspase-12 of 4 groups by Western blot. **Result:** Compared with the experimental control group, the percentage of cell proliferation index significantly decreased in metformin (0–20 mmol/L and 0–48 h) treatment group. Compared with the experimental control group, the percentage of apoptosis cells significantly increased in metformin treatment group. Compared with the control group, the protein expressions of GRP78, CHOP and Caspase-12 were significantly increased in Met group; While compared with the Met group, the protein expressions of GRP78, CHOP and Caspase-12 were significantly inhibited in the Met+Sal group. **Conclusion:** Metformin can induced available BCPAP cell apoptosis by activating endoplasmic reticulum stress mechanism.

Key words papillary thyroid carcinoma; metformin; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)是临床最常见的甲状腺恶性肿瘤,临床首选手术切除,术后辅以碘¹³¹清灶治疗,但是碘¹³¹清灶治疗会发生包括唾液腺及肝肾功能损伤在内的不良反应和风险^[1]。二甲双胍是治疗Ⅱ型糖尿病的常规药物,近年来研究发现二甲双胍具有抗肿瘤效果^[2-5]。本实验通过探讨二甲双胍与 PTC 细胞 BCPAP 凋亡的关系,以期二甲双胍治疗 PTC 提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

二甲双胍购自上海生工生物工程公司;人 PTC 细胞系 BCPAP 细胞株购自北京康碧泉生物技术有限公司;Salubrial 购自美国 Santa Cruz 公司;噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;DMEM/F12 培养液、胎牛血清、胰酶、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Gibco 公司;GRP78、CHOP、Caspase-12、 β -actin 购自美国 Abcam;100 \times 青/链霉素溶液购自奥地利 PAA 公司。其余试剂及耗材来自于华北理工大学附属医院病理科。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BCPAP 细胞贴壁培养于含

* 基金项目:河北省卫计委医学重点课题(No:20170928)

¹ 华北理工大学附属医院病理科(河北唐山,063000)

² 华北理工大学附属医院药剂科

通信作者:宋旭东, E-mail: songxd2002@sina.com

10%胎牛血清和 1%的 100×青/链霉素溶液的 DMEM/F12 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度孵育箱中培养,0.05%胰酶消化传代。二甲双胍用 DMSO 溶解后保存,使用时用培养液稀释。对照组为相同含量 DMSO 的培养液。

1.2.2 二甲双胍对 BCPAP 细胞增殖的影响 取对数生长期的 BCPAP 细胞经胰酶消化后接种于 96 孔板,细胞接种浓度为 1×10⁵/ml,每孔加入 100 μl 培养液过夜使细胞贴壁。24 h 后各孔分别加入含 0 mmol/L(对照)、1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 二甲双胍的培养液 100 μl,继续培养 48 h。弃去培养液,每孔加入 20 μl 的 MTT(5 mg/ml),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h。吸弃上层液体,每孔加入 10% SDS 150 μl,37℃ 温箱孵育过夜。用酶标仪测定 490 nm 下各孔的吸光度值(OD 值)。

20 mmol/L 组再次分为 0 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h 组,弃去培养液,严格按照分组时间点每孔加入 MTT 20 μl(5 mg/ml),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h。吸弃上层液体,每孔中加入 10%SDS 150 μl,37℃ 孵育过夜。用酶标仪测定 490 nm 下各孔的 OD 值。

细胞存活率(%)=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 实验分为 4 组:实验对照组(Con)、二甲双胍组(Met, 20 mmol/L, 48 h)、二甲双胍+Salubrinal 组(Met+Sal)、二甲双胍+DMSO 组(Met+DM)。Met+Sal 组同时给予 1 μl 的 50 μmol/L 的 Salubrinal 共同作用, Met+DM 组加入等体积的 DMSO。20 mmol/L 二甲双胍处理 BCPAP 细胞 48 h 后弃去培养液,用预冷的 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次。用 0.05%的胰蛋白酶 37℃ 消化 5 min,用 1 ml 口径的吸管轻柔吹打至细胞脱壁,将细胞移入 5 ml 流式管 1 000 r/min,离心 5 min 后弃上清,0.01 mol/L PBS 重复清洗 3 次后弃上清,用 100 μl 的培养液重悬细胞。各组均加入 5 μl FITC 标记的 AnnexinV 和 5 μl PI,混匀后室温避光孵育 15 min 加入培养液补足至 500 μl,立即上流式细胞仪进行检测。

1.2.4 Western blot 检测内质网应激相关蛋白表达 收集 20 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 的 Con 组、Met 组、Met+Sal 组、Met+DM 组细胞提取总蛋白。一抗 GRP78(1:500),CHOP(1:1 000),Caspase-12(1:1 000)和 β-actin(1:1 000)室温孵育 1 h 后 4℃ 孵育过夜。TTBS 洗膜 3 次,每次 10 min,加入用 TTBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的 IgG(按 1:5 000 稀释),37℃ 孵育 2 h。TTBS

洗膜 3 次,每次 15 min,ECL 反应 1 min 后,应用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 软件对 Western 条带进行显影,以目的条带和 β-actin 条带的积分光密度值比值作为最终结果。

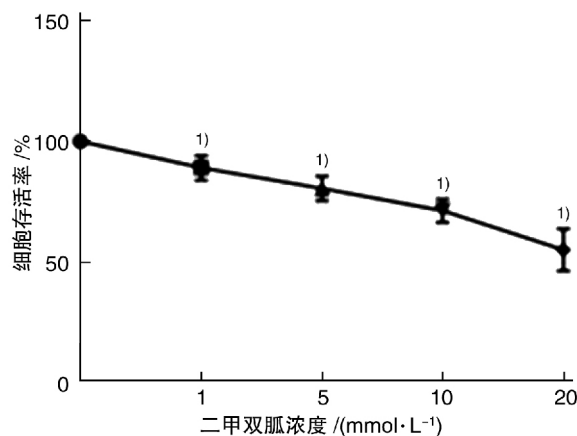
1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计分析软件进行统计学分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数的比较行单因素方差分析(ANOVA),*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 BCPAP 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果提示,与 0 mmol/L 对照组相比,1 mmol/L 至 20 mmol/L 的二甲双胍作用于 BCPAP 细胞 48h 后,癌细胞增殖率明显降低(*P*<0.05),且呈浓度依赖性(图 1)。根据二甲双胍浓度依赖性检测结果,将 20 mmol/L 的二甲双胍作用于癌细胞不同时间(0 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h),采用 MTT 法观察其对癌细胞存活率的影响,结果显示,与 0 mmol/L 对照组相比,20 mmol/L 二甲双胍作用癌细胞 16 h 后,细胞存活率明显降低(*P*<0.05),而作用 4 h、8 h 组,癌细胞存活率没有明显变化(*P*>0.05)(图 2)。



与 0 mmol/L 比较, ¹⁾ *P*<0.05。

图 1 不同浓度二甲双胍对 BCPAP 细胞存活率的影响

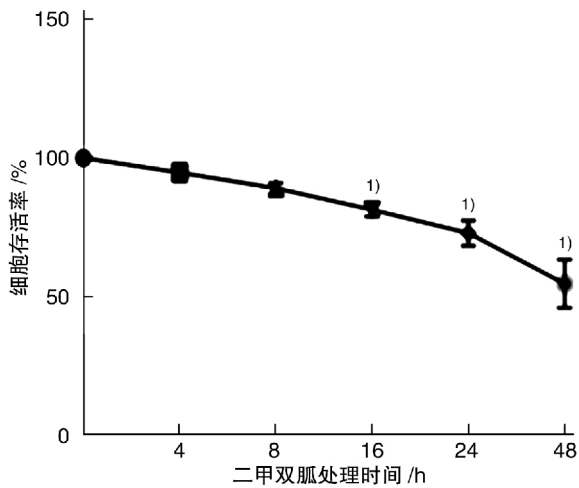
2.2 二甲双胍对内质网应激通路的影响

Western blot 检测结果显示,与 Con 组相比,20 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 后内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 表达明显增加(*P*<0.05),而给予内质网应激抑制剂 Sal 后,GRP78、CHOP 和 Caspase-12 表达明显减少(*P*<0.05),Met+DM 组与 Met 组相比无显著差异(*P*>0.05)。见图 3。

2.3 二甲双胍对细胞凋亡的影响

流式细胞检测结果显示,与 Con 组相比,20 mmol/L 二甲双胍处理 48 h 后,癌细胞呈现明

显凋亡,凋亡率为 $(36.46 \pm 1.55)\%$ ($P < 0.01$),而 Met+Sal 组凋亡率则降至 $(19.73 \pm 2.34)\%$ ($P < 0.01$),Met+DM 组与 Met 组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 4、5。



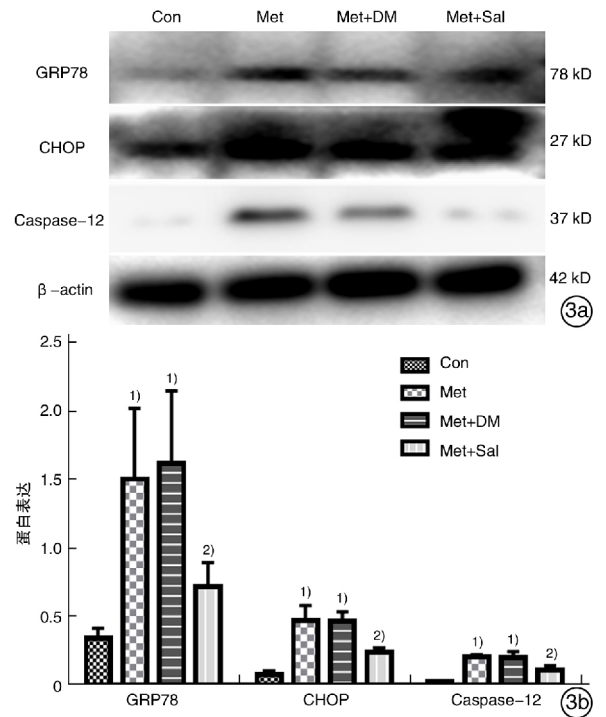
与 0 h 比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 2 二甲双胍作用不同时间对 BCPAP 细胞存活率的影响

3 讨论

二甲双胍是治疗 II 型糖尿病的常规药物,近年来动物实验研究及临床研究发现单独应用或联合应用二甲双胍均有显著的抗肿瘤效果,包括对乳腺癌和前列腺癌等的治疗都取得了良好的效果^[3,5-6]。服用二甲双胍的分化型甲状腺癌大鼠能够显著减小肿瘤体积,并延长无进展生存期,但机制尚不明确,有文献报道二甲双胍很有可能通过抑制肿瘤细胞生长和增加细胞凋亡来达到抑制肿瘤的效果^[7]。

细胞死亡方式包括坏死和凋亡,凋亡是一种高度管控的程序性诱导细胞死亡的方式。目前,关于细胞凋亡的发生机制尚未充分阐明。内质网应激通路是新近提出的可独立诱导细胞凋亡的途径,该途径的核心内容是内质网应激^[8-9]。大量研究表明

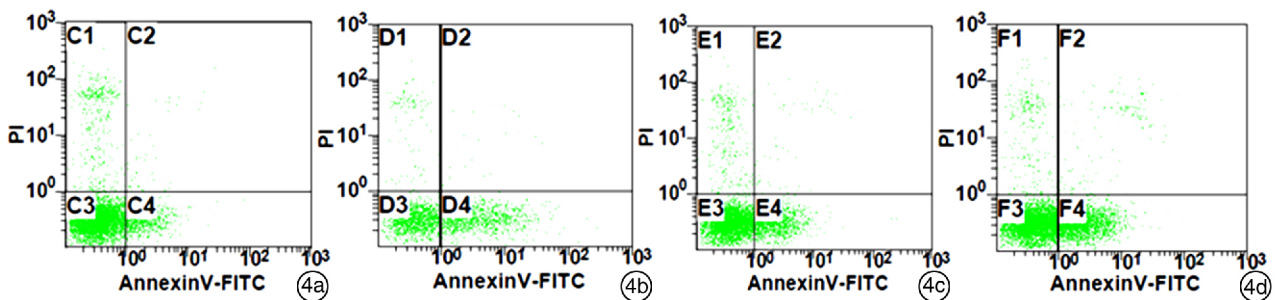


3a: GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表达条带;3b: GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表达情况。与 Con 比较,¹⁾ $P < 0.05$;与 Met 比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 方法检测 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 在 BCPAP 细胞的表达

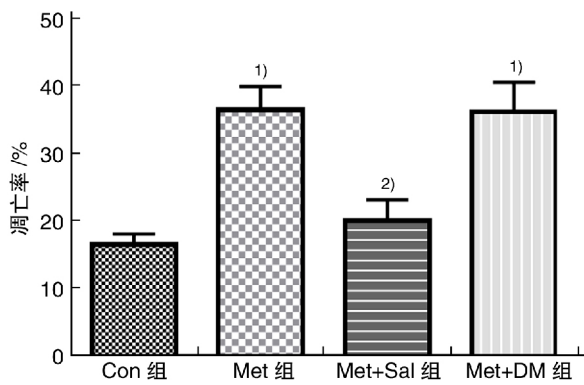
内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 表达增加可诱导细胞凋亡,这些标志性蛋白是内质网应激诱导细胞凋亡的重要媒介^[10]。由于内质网应激常导致内质网内未折叠蛋白或错误折叠蛋白的蓄积,所以常用参与未折叠蛋白反应的标志性分子 GRP78 和内质网应激诱导凋亡的特异性指标 CHOP、Caspase-12 来提示内质网应激的发生^[11-13]。

本实验采用 MTT 法检测二甲双胍在不同浓度和作用时间下对 BCPAP 细胞活性的影响,结果



将所收集的细胞分为 4 个象限,每个象限内代表不同标记的不同状态的细胞:左下象限代表活细胞(Annexin V-/PI-),右下象限为早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-),右上象限为晚期凋亡细胞(Annexin V+/PI+),左上象限代表坏死细胞(Annexin V-/PI+)。4a:Con 组,4b:Met 组,4c:Met+DM 组,4d:Met+Sal 组。

图 4 Annexin V-PI 流式双标染色检测 BCPAP 细胞的凋亡情况



与 Con 组比较, Met 组细胞凋亡率显著增加, 而 Met+Sal 组细胞凋亡率明显减少, Met 组和 Met+DM 组比较无明显差异。与 Con 组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与 Met 组和 Met+DM 组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

图 5 Annexin V-PI 流式双标染色检测各组凋亡情况

显示 1 mmol/L 的二甲双胍作用 48 h 即可显著降低 BCPAP 细胞的活性, 并呈浓度依赖和时间依赖性。该结果提示二甲双胍可以独立发挥对 BCPAP 细胞的损伤作用。与正常对照组相比, Met 组和 Met+DM 组内质网应激标志分子 GRP78 蛋白及内质网应激诱导凋亡的特异性指标 CHOP、Caspase-12 蛋白的表达均显著升高, 而添加内质网应激特异性抑制剂的 Met+Sal 组中上述三种蛋白的表达则明显受到抑制。应用 FITC-Annexin V/PI 流式双标染色检测二甲双胍对 BCPAP 细胞凋亡的影响, 发现 20 mmol/L 的 Met 作用 BCPAP 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率显著高于对照组, 而 Met+Sal 组细胞凋亡率明显降低, Met+DM 组与 Met 组相比无显著差异。

Salubrinal 是一种选择性 eIF2 α 去磷酸化抑制剂, 可以通过抑制内质网应激通路蛋白而阻断内质网应激通路, 进而阻断细胞凋亡^[14]。该结果提示二甲双胍促细胞凋亡的作用机制可能与其启动内质网应激通路有关。

总之, 内质网应激标志蛋白的过表达及细胞凋亡率的增加提示 Met 可能通过激活内质网应激在 PTC 的 BCPAP 细胞凋亡过程中发挥重要促进作用。

参考文献

[1] SFAKIANAKIS G, SFAKIANAKI E. The sodium-iodine symporter and the proton-pump inhibitors in related to the side effects of the treatment of thyroid cancer with iodine-131[J]. Hell J Nucl Med, 2007, 10;2-5.
 [2] JIRALERSPONG S, PALLA S L, GIORDANO S H, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with

breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27: 3297-3302.
 [3] SAEKI K, WATANABE M, TSUBOI M, et al. Anti-tumour effect of metformin in canine mammary gland tumour cells[J]. Vet J, 2015, 205;297-304.
 [4] ONO M, SAWADA K, OKUMURA T, et al. A case of liver hemangioma with markedly reduced tumor size after metformin treatment; a case report[J]. Clin J Gastroenterol, 2017, 10;63-67.
 [5] DEMIR U, KOEHLER A, SCHNEIDER R, et al. Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR down-regulation in prostate cancer cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 52-52.
 [6] KLUBO-GWIEZDZINSKA J, COSTELLO J Jr, PATEL A, et al. Treatment with metformin is associated with higher remission rate in diabetic patients with thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98: 3269-3279.
 [7] CHO S W, YI K H, HAN S K, et al. Therapeutic potential of metformin in papillary thyroid cancer in vivo[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 393;24-29.
 [8] TABAS I, RON D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13: 184-190.
 [9] RASHEVA V I, DOMINGOS P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14: 996-1007.
 [10] CHEN Y, GUI D, CHEN J, HE D, et al. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by Astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33:1975-1987.
 [11] LEE A S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress[J]. Methods, 2005, 35:373-381.
 [12] SIMON-SZABÓ L, KOKAS M, MANDL J, et al. Metformin attenuates palmitate induced endoplasmic stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9: e97868.
 [13] QUENTIN T, STEINMETZ M, POPPE A, et al. Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis[J]. Dis Model Mech, 2012, 5;259-269.
 [14] TAO Y K, YU P L, BAI Y P, et al. Role of PERK/eIF2 α /CHOP Endoplasmic Reticulum Stress Pathway in Oxidized Low-density Lipoprotein Mediated Induction of Endothelial Apoptosis[J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29;868-876.

(收稿日期: 2017-01-22)