

研究论文

二甲双胍通过下调c-Myc增强他莫昔芬对 乳腺癌的抗肿瘤作用

徐建昕 管晨 方雪娇 龙露叶 王思萱 钱诗菡 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

摘要 乳腺癌是一种常见的高度恶性肿瘤, 在临床病人的治疗中, 寻找有效的抑制肿瘤生长的治疗方法尤为重要。他莫昔芬目前被用于治疗雌激素受体阳性乳腺癌。二甲双胍是一种抗糖尿病药物, 据报道可以降低人类癌症发病率, 提高乳腺癌患者的生存率。该文主要研究二甲双胍联合他莫昔芬对乳腺癌细胞的协同作用及其机制。采用CCK-8法和平板克隆形成实验检测细胞活力和增殖; 流式细胞术检测细胞凋亡; Transwell实验检测细胞迁移、侵袭能力; 免疫印迹法检测MAPK信号通路和c-Myc蛋白。结果显示, 他莫昔芬与二甲双胍联合用药对乳腺癌细胞增殖、克隆形成、迁移侵袭及凋亡的作用均优于单独用药, 表明二甲双胍可以增强他莫昔芬对肿瘤生长的抑制作用, 并能下调c-Myc蛋白的表达。该研究结果显示, 二甲双胍能明显提高乳腺癌细胞的抗肿瘤作用, 这些影响是通过下调c-Myc蛋白介导的。该发现可能对乳腺癌的治疗有潜在的临床应用价值。

关键词 二甲双胍; 他莫昔芬; c-Myc; 乳腺癌; MAPK

Metformin Sensitizes Tamoxifen Anti-Tumor Efficacy against Breast Cancer through Downregulation of c-Myc

Xu Jianxin, Guan Chen, Fang Xuejiao, Long Luye, Wang Sixuan, Qian Shihan, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract Breast cancer is a common and highly malignant tumor, finding efficient therapy to inhibit tumor growth is particularly important in clinical patient management. Tamoxifen is currently used for the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. Metformin, the anti-diabetic drug, has been reported to reduce human cancer incidence and improves the survival of breast cancer patients. We investigated if the combination of metformin with tamoxifen could exert synergistic efficacy on breast cancer cells and the underlying mechanisms. CCK-8 and plate colony formation assays were used to detect cell viability and proliferation. The flow cytometry was conducted to detect apoptosis. Cell migration assay and cell invasion assays were utilized to measure the ability of metastasis. Proteins of MAPK signaling pathway and c-Myc were

收稿日期: 2018-10-21 接受日期: 2019-01-31

国家自然科学基金(批准号: 81170257)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689717, E-mail: jxlu313@163.com

Received: October 21, 2018 Accepted: January 31, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170257)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689717, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2019-05-09 17:53:40 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1753.020.html>

detected by Western blot. The result showed that combined treatment of tamoxifen with metformin showed greater inhibition on proliferation, colony formation, migration and invasion as well as promotion of apoptosis of breast cancer cells than either agent treatment alone. It showed that metformin could enhance the inhibitory effect of tamoxifen on tumor growth and downregulation of c-Myc protein demonstrated by Western blot. In conclusion, our results demonstrate that metformin enhances tamoxifen anti-tumor efficacy of breast cancer cells. These effects are mediated through down-regulation of c-Myc protein. These findings may have potential clinical applications for breast cancer treatment.

Keywords tamoxifen; metformin; c-Myc; breast cancer; MAPK

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤。研究数据表明,在女性中,乳腺癌的发病率及死亡率均列各肿瘤的第一位^[1]。根据雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和HER2neu的表达情况,乳腺癌分为四种不同类型,(1)Luminal A: ER⁺/PR⁺/HER2⁻; (2)Luminal B: ER⁺/PR⁺/HER2⁺; (3)HER2过表达: ER⁻/PR⁻/HER⁺; (4)三阴性乳腺癌(TNBC): ER⁻/PR⁻/HER⁻^[2]。三阴性乳腺癌的特点是缺乏有效的治疗药物、易转移及预后不良^[3],因此寻找新的有效的治疗方法对临床三阴性乳腺癌患者具有重要意义。

他莫昔芬作为内分泌治疗的金标准,自20世纪70年代开始被广泛应用于激素敏感性乳腺癌的治疗^[4]。此外,他莫昔芬还在激素不敏感性乳腺癌和其他类型的ER阴性肿瘤如胆管癌^[5]、肝细胞癌^[6]和肺癌^[7]中发挥抗肿瘤活性。诸多证据表明,他莫昔芬可通过调节多种信号通路影响癌细胞的生物学功能^[8-9]。目前有多种药物被用来研究是否可以增强他莫昔芬对乳腺癌治疗的疗效。研究表明,thymoquinone^[10]、lignans^[11]、epigallocatechin gallate^[12]等药物与他莫昔芬联用,作用于ER阳性或ER阴性乳腺癌细胞时,均起到协同作用。

二甲双胍被广泛用于治疗2型糖尿病^[13]。近期临床研究表明,二甲双胍降低了癌症发生的风险,提高了包括三阴性乳腺癌在内的癌症患者的生存率^[14]。另有研究表明,二甲双胍通过影响TGF- β 或microRNA的表达实现对三阴性乳腺癌的生物功能的调节^[15-16]。用二甲双胍和2-deoxy-D-glucose^[17]或TRAIL受体激动剂^[18]联合作用三阴性乳腺癌细胞,发现二甲双胍能增强这些药物的抗肿瘤活性。因此,二甲双胍与其他抗肿瘤药物联合,为乳腺癌治疗提供了新的思路。

既往研究表明,二甲双胍和他莫昔芬具有抑制ER阳性乳腺癌细胞生长和诱导凋亡的作用^[19]。在本研究中,我们认为,他莫昔芬与二甲双胍联

合使用对乳腺癌细胞有协同抗肿瘤作用,不仅对ER阳性乳腺癌细胞有效,对三阴性乳腺癌细胞也有效。

1 材料与方法

1.1 材料

二甲双胍(PHR1084)、他莫昔芬(T5648)和二甲基亚砜(DMSO)(V900090)购自Sigma-Aldrich公司。用DMSO稀释他莫昔芬原液(10 mmol/L),在对照组和样本处理组中,DMSO终浓度未超过0.2%(V/V)。用磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)稀释二甲双胍原液(1 mol/L)。青霉素/链霉素购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8试剂盒购自日本Dojindo化学研究所; Annexin V-APC细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物技术公司; Transwell小室购自美国Corning公司; BD基质胶、BD流式细胞仪Acurry C6购自美国BD公司; Varioskan Flash全波长酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司; ChemiDoc MP凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞系MCF-7(ER⁺)、BT-549(TNBC)购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。以上细胞用含10% FBS(Biological Industries公司)的高糖RPMI-1640或DMEM培养基(Gibco公司),于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。

1.3 细胞增殖实验

CCK-8法检测细胞增殖。将MCF-7、BT-549细胞分别按 5.0×10^3 个/孔、 5.0×10^3 个/孔接种于96孔板中,每组设3个复孔。24 h后,以不同药物浓度的他莫昔芬(0~25 μ mol/L)或二甲双胍(0~20 mmol/L),或他莫昔芬和二甲双胍联合处理细胞,加药后于24、48、72 h向每孔中加入10 μ L CCK-8试剂,37 °C孵育1 h。用酶标仪在450 nm波长处测吸光度。

1.4 平板克隆形成实验

将MCF-7、BT-549以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种于6孔板中。培养3天后, 分别用相应浓度的他莫昔芬和二甲双胍单独或联合处理。药物作用3天后, 更换为新鲜培养基继续培养10天, 最终形成的克隆用4%多聚甲醛和0.5%结晶紫固定染色各10 min。可用PBS洗去多余染料, 计数清晰可见的克隆(直径 $>50 \mu\text{m}$)。克隆由Nikon Eclipse TS100显微镜200倍放大后拍照。

1.5 细胞凋亡实验

将MCF-7、BT549细胞(1.5×10^5 个/孔)接种到6孔板中。24 h后, 分别用他莫昔芬和二甲双胍对细胞进行相应浓度和时间处理。之后收集细胞, 用annexin-binding buffer将细胞按照 1.0×10^6 个/mL的密度重悬。避光, 室温孵育PI、V-FITC或APC。1 h内FACS-Calibur流式细胞仪上机检测, 测定细胞凋亡百分率。

1.6 Transwell小室实验

将细胞以 1.5×10^5 个/孔的密度接种到6孔板中。24 h后, 用相应的药物和作用时间孵育细胞, 收集细胞并重悬计数。用培养基原液配成目标浓度细胞悬液(每200 μL 中含 2×10^4 个细胞)后均匀加入上室, 使细胞在小室内分布一致, 下室加入600 μL 含20% FBS的培养基用于诱导细胞向下迁移。24 h后, 用4%多聚甲醛、0.5%结晶紫固定染色各10 min。取出小室, 用湿棉签小心擦净上室细胞及染料, 每孔随机挑选5个高倍镜视野, 计数下室穿膜的细胞数。

细胞侵袭实验与迁移实验类似, 不同之处在于侵袭实验在上室包被了一层基质胶, 接种细胞前上室需加200 μL 无血清培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 水化30 min。其余的步骤如细胞迁移实验所述。

1.7 免疫印迹

通过Western blot检测蛋白表达水平。药物处理后, 裂解细胞并提取蛋白质, 将各蛋白浓度调齐后取20 μg 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 湿转75 min至硝化纤维(NC)膜, 室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗[anti- β -actin抗体、anti-c-Myc抗体、anti-p-extracellular signal-regulated kinases(ERK)抗体、anti-ERK抗体、anti-p-c-Jun N-terminal kinases(JNK)抗体、anti-JNK抗体]过夜。用TBST清洗3次, 每次10 min, 加入二抗(1:2 000)后室温孵育1 h, 再用TBST

清洗3次, 每次10 min。用凝胶成像仪曝光分析。

1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。每个实验独立重复至少3次。采用方差分析(ANOVA)和t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍增强了他莫昔芬对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

如图1A所示, 低浓度他莫昔芬对乳腺癌细胞有轻微的促进增殖作用。随着他莫昔芬浓度的增加和药物作用时间的延长, 细胞存活率显著降低。他莫昔芬处理24 h时, 抑制MCF-7细胞增殖的浓度为12.5 $\mu\text{mol/L}$, 抑制三阴性乳腺癌BT-549细胞增殖的浓度为6.25 $\mu\text{mol/L}$ 。二甲双胍以剂量和时间依赖性的方式抑制MCF-7、BT-549细胞的生长(图1B)。

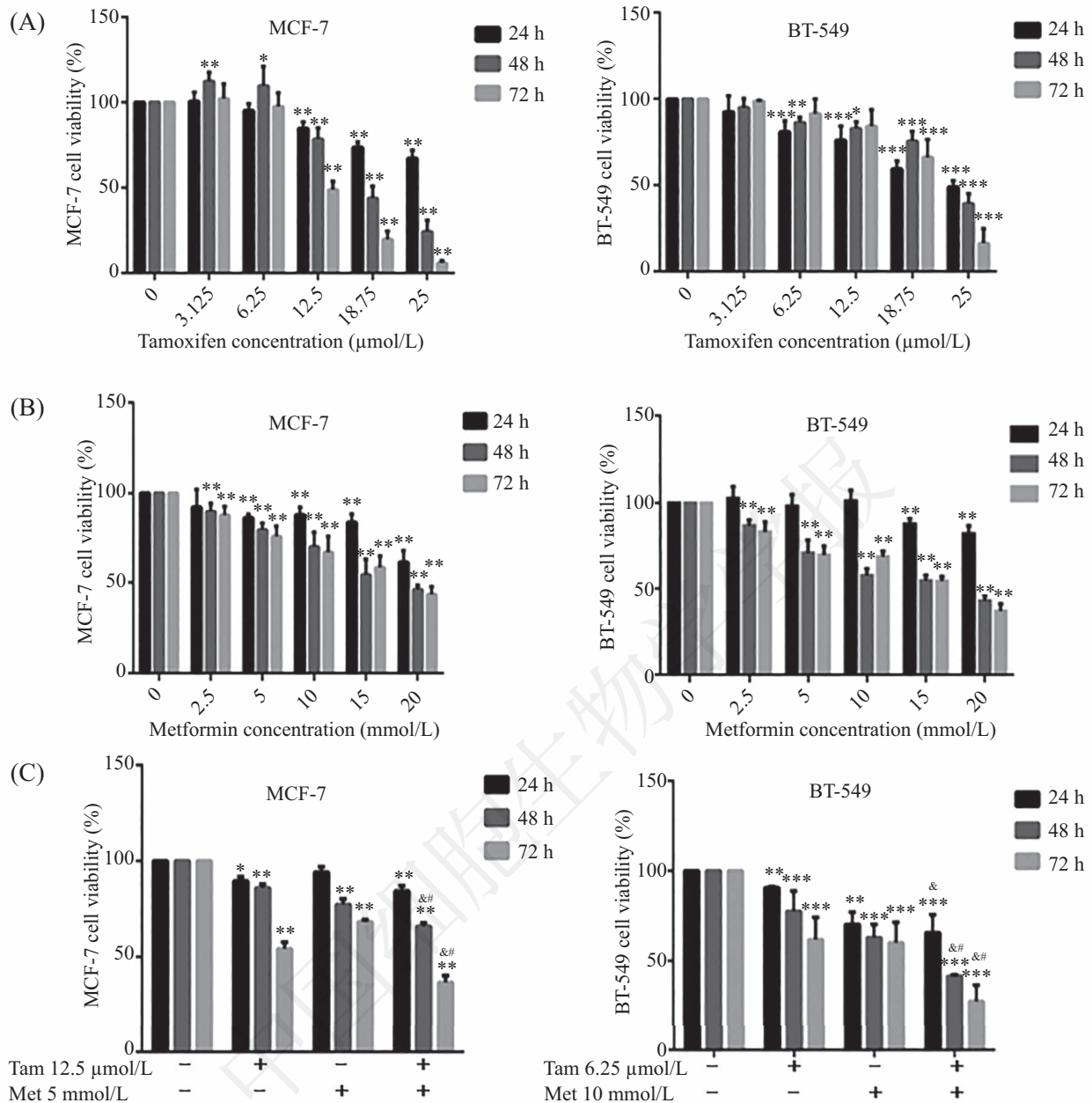
为了明确在MCF-7、BT-549细胞系中他莫昔芬和二甲双胍是否具有协同作用, 基于上述发现我们对其使用下列药物浓度。MCF-7: 他莫昔芬12.5 $\mu\text{mol/L}$, 二甲双胍5 mmol/L; BT-549: 他莫昔芬6.25 $\mu\text{mol/L}$, 二甲双胍10 mmol/L。如图1C所示, 与二甲双胍联合处理后, 他莫昔芬对以上细胞的生长抑制作用增强。两药作用于MCF-7细胞72 h的抑制率为37.5%($P < 0.01$); 作用于BT-549细胞48 h的抑制率为41.2%($P < 0.001$)。

2.2 二甲双胍增强了他莫昔芬抑制乳腺癌细胞克隆形成的能力

经他莫昔芬和二甲双胍单独处理后, MCF-7细胞的克隆形成分别减少44%和38%。他莫昔芬与二甲双胍联合处理后克隆形成可减少82%($P < 0.01$)(图2A和图2B)。在BT549细胞中也发现相似的结果, 他莫昔芬的抑制率为56%, 二甲双胍的抑制率为20%, 两药联合的抑制率为72%($P < 0.01$)(图2C和图2D)。两种细胞的克隆形成由于这两种药物的结合而明显减少。

2.3 二甲双胍促进了他莫昔芬诱导乳腺癌细胞凋亡

如图3所示, 乳腺癌细胞用他莫昔芬处理后, 相较于对照组, 其凋亡的细胞数增多。二甲双胍轻度诱导乳腺癌细胞凋亡。然而, 两种药物联合处理后, 细胞凋亡率明显升高(MCF-7细胞凋亡率为24.8%,



A~C: MCF-7、BT-549细胞经他莫昔芬(0~25 μmol/L)、二甲双胍(0~20 mmol/L)及联合处理后24、48、72 h细胞活力的变化。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与未处理对照组相比; $^{\&}P<0.05$, Tam+Met组与Tam组比较; $^{\#}P<0.05$, Tam+Met组与Met组比较。Tam、Met分别指他莫昔芬和二甲双胍。

A~C: MCF-7, BT-549 cells were treated with Tam (0~25 μmol/L), Met (0~20 mmol/L) or their combination for 24, 48, 72 h followed by a CCK-8 assay. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with control group; $^{\&}P<0.05$, Tam+Met group vs Tam group; $^{\#}P<0.05$, Tam+Met group vs Met group. Tam and Met refer to tamoxifen and metformin, respectively.

图1 二甲双胍增强了他莫昔芬对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

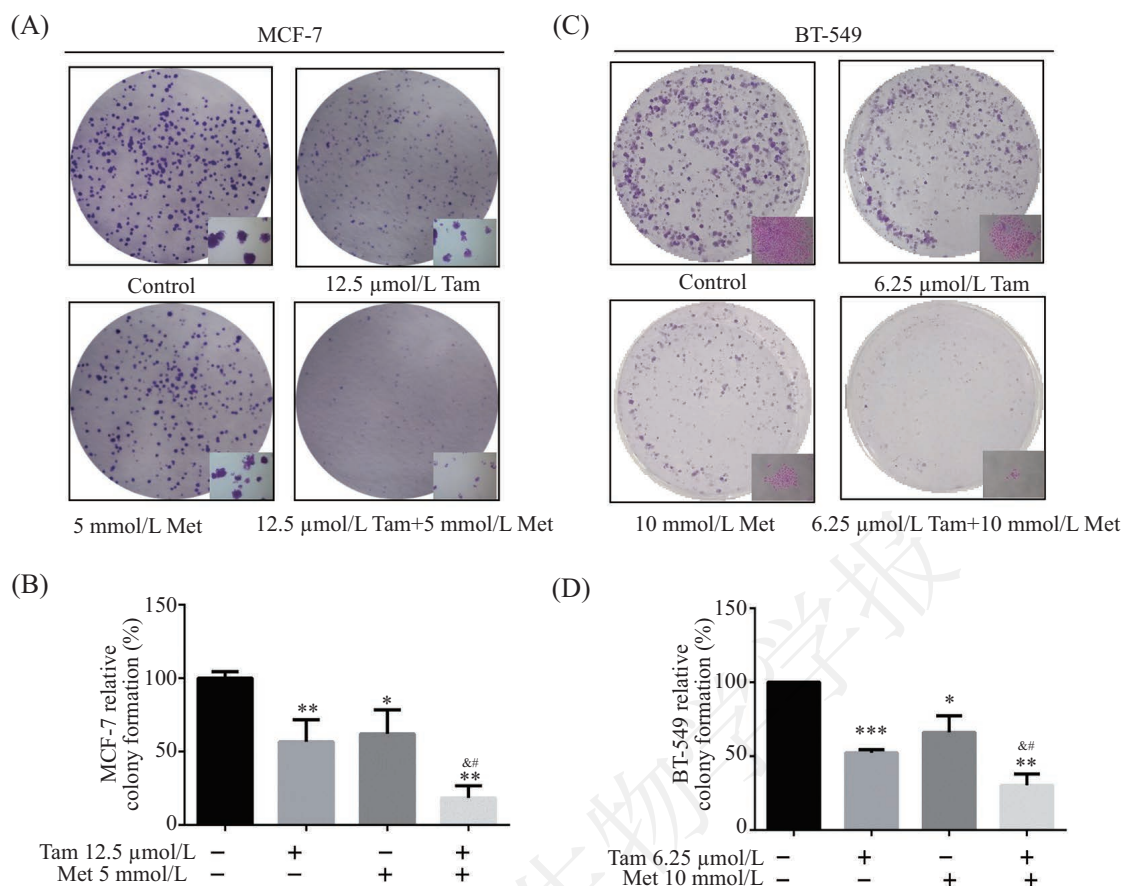
Fig.1 Metformin enhances the anti-proliferative effects of tamoxifen on breast cancer cells

BT-549细胞凋亡率为26.4%, $P<0.01$)(图3A~图3D)。

2.4 二甲双胍和他莫昔芬抑制TNBC细胞的迁移和侵袭能力

BT549细胞经他莫昔芬或二甲双胍单独处理后, 与对照组相比, 细胞迁移的数量减少($P<0.01$)(图

4A)。当他莫昔芬与二甲双胍联合处理时BT549细胞可明显抑制细胞迁移, 与对照组相比, BT-549迁移细胞数减少58.9%($P<0.01$)(图4B)。可见, 联合用药对细胞迁移的抑制作用大于他莫昔芬或二甲双胍单独用药($P<0.05$)。在侵袭实验中也发现了相似的结果。



A~D: 他莫昔芬和二甲双胍抑制乳腺癌细胞克隆形成。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与未处理对照组比较; $\&P<0.05$, Tam+Met组与Tam组比较; $\&P<0.05$, Tam+Met组与Met组比较。Tam、Met分别指他莫昔芬和二甲双胍。

A~D: colony formation by breast cancer cells was significantly suppressed by Tam and Met; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group; $\&P<0.05$, Tam+Met group vs Tam group, $\&P<0.05$, Tam+Met group vs Met group. Tam and Met refer to tamoxifen and metformin, respectively.

图2 二甲双胍增强了他莫昔芬抑制乳腺癌细胞克隆形成的能力

Fig.2 Metformin increases tamoxifen-induced inhibition of the colony formation of breast cancer cells

果(图4C和4D), 当细胞被他莫昔芬或二甲双胍单独处理后, 细胞侵袭能力受到抑制。然而, 同时使用他莫昔芬和二甲双胍处理细胞时, 与对照组或单独处理组比较, BT-549细胞侵袭能力受到明显抑制, 仅留有28.9%($P<0.05$)。

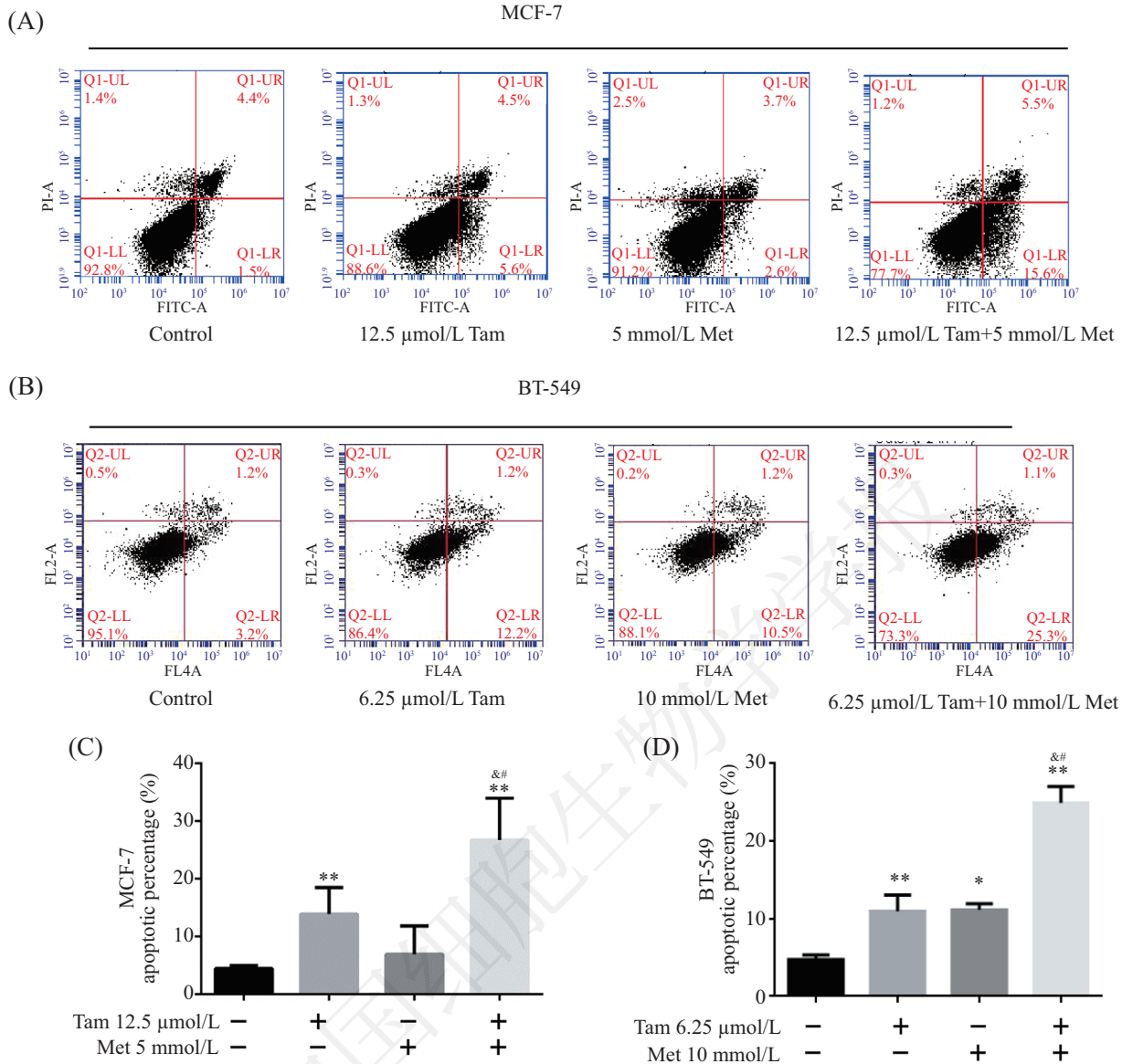
2.5 他莫昔芬和二甲双胍抑制乳腺癌细胞c-Myc蛋白的表达

当用不同浓度的他莫昔芬(0、6.25、12.5 $\mu\text{mol/L}$)或二甲双胍(0、5、15 mmol/L)处理MCF-7细胞时, 对c-Myc蛋白表达的抑制, 呈现出剂量依赖性(图5A)。药物浓度越大, 对c-Myc蛋白表达的抑制作用越大。在MCF-7中, 他莫昔芬、二甲双胍单独或联合处理均可降低c-Myc蛋白表达水平, 联合抑制作用大于他莫昔芬或二甲双胍单独处理(图5B和图5C)。但在BT549细胞中用不同浓度他莫昔芬(0、6.25、

12.5 $\mu\text{mol/L}$)或二甲双胍(0、10、20 mmol/L)处理时未出现此现象, 仅在两药联合处理下c-Myc蛋白表达水平降低。在MCF-7细胞中, 他莫昔芬处理后p-ERK/ERK表达上调, 但在二甲双胍处理后未观察到这一现象, 两种药物联合后均未改变MAPK家族蛋白(p-ERK/ERK、p-JNK/JNK)的表达(图5D)。同样地, 在BT549细胞中, 单独及两药联合均未改变MAPK家族蛋白的表达。

3 讨论

在本研究中, 我们证实他莫昔芬与二甲双胍联合用药在对抗肿瘤方面有协同作用, 降低ER阳性乳腺癌和三阴性乳腺癌细胞增殖活力、克隆形成、迁移侵袭能力以及促进癌细胞的凋亡。与此同时, 他莫昔芬、二甲双胍或两药联合用药后, c-Myc的表达



A~D: 流式细胞术测定细胞凋亡。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与未处理对照组比较; & $P < 0.05$, Tam+Met组与Tam组比较; # $P < 0.05$, Tam+Met组与Met组比较。Tam、Met分别指他莫昔芬和二甲双胍。

A~D: apoptosis was determined at the indicated time points by flow cytometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; & $P < 0.05$, Tam+Met group vs Tam group, # $P < 0.05$, Tam+Met group vs Met group. Tam and Met refer to tamoxifen and metformin, respectively.

图3 二甲双胍促进了他莫昔芬诱导乳腺癌细胞凋亡

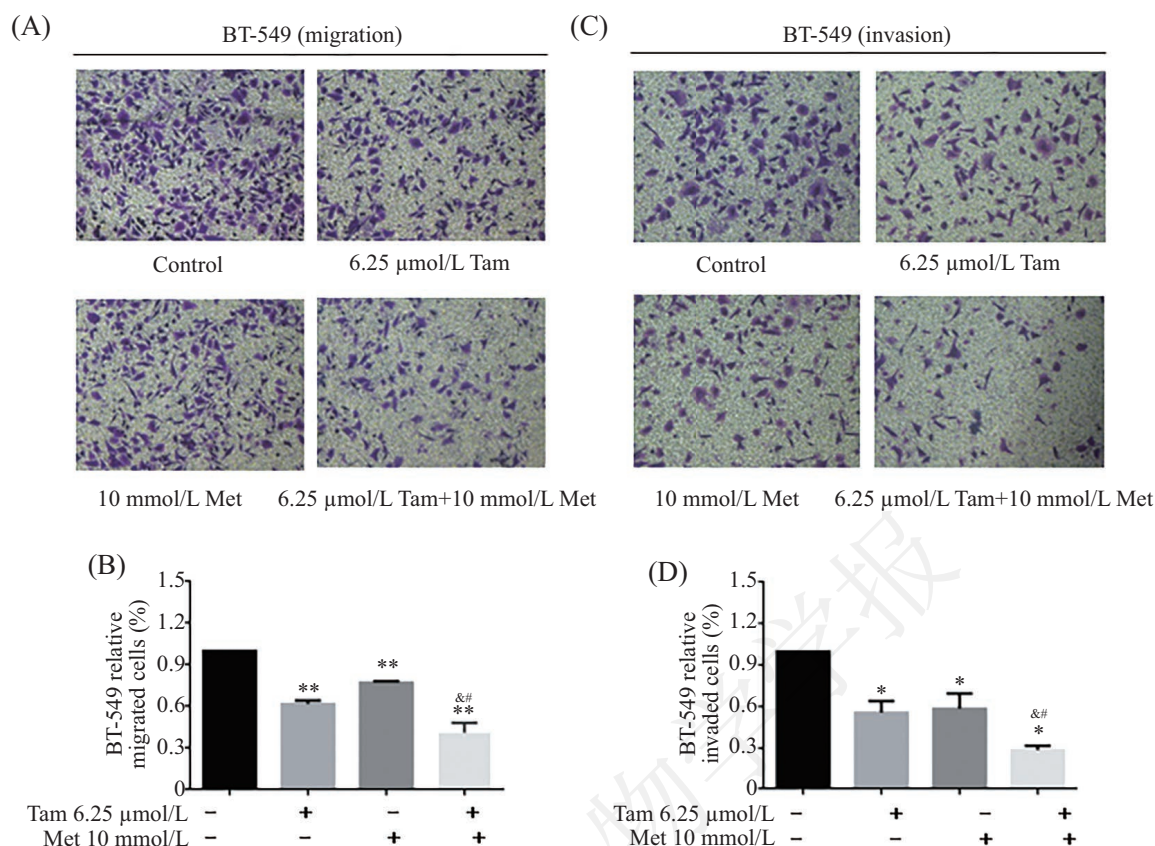
Fig.3 Metformin promotes tamoxifen-induced apoptosis of breast cancer cells

受到了很大地抑制。

他莫昔芬是一种内分泌治疗药物,被广泛应用于ER阳性乳腺癌的治疗,也具有逆转三阴性乳腺癌细胞上皮间质化的新作用^[20],有报道称Src激酶抑制剂KX-01^[21]等其他药物和抗侵袭分子CCN5可使三阴性乳腺癌对他莫昔芬敏感^[22]。二甲双胍作为乳腺癌^[23]、胰腺癌^[24]、前列腺癌^[25]等多种肿瘤的抗肿瘤药物,其单独使用或与其他药物联合使用在临床试验中均已得到应用^[26]。这些为我们研究二甲双胍和

他莫昔芬在乳腺癌治疗中联合用药提供了足够的证据。

我们的结果显示,他莫昔芬在低浓度下会轻微刺激乳腺癌细胞的增殖,当达到较高浓度时,他莫昔芬会抑制乳腺癌细胞的生长。然而,他莫昔芬这一双向作用背后的机制还没有被完全阐明。大部分情况下,他莫昔芬对乳腺癌细胞均有抑制作用^[19,27]。在本实验中,我们证明了他莫昔芬对乳腺癌细胞生物学功能的抑制作用,虽然他莫昔芬使用的最



A、B: 二甲双胍和他莫昔芬抑制TNBC细胞的迁移; C、D: 二甲双胍和他莫昔芬抑制TNBC细胞的侵袭。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与未处理对照组比较; & $P<0.05$, Tam+Met组与Tam组比较; # $P<0.05$, Tam+Met组与Met组比较。Tam、Met分别指他莫昔芬和二甲双胍。

A、B: migration of TNBC cells was significantly suppressed by Tam and Met; C、D: a similar effect was found in the invasion assay. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control group; & $P<0.05$, Tam+Met group vs Tam group, # $P<0.05$, Tam+Met group vs Met group. Tam and Met refer to tamoxifen and metformin, respectively.

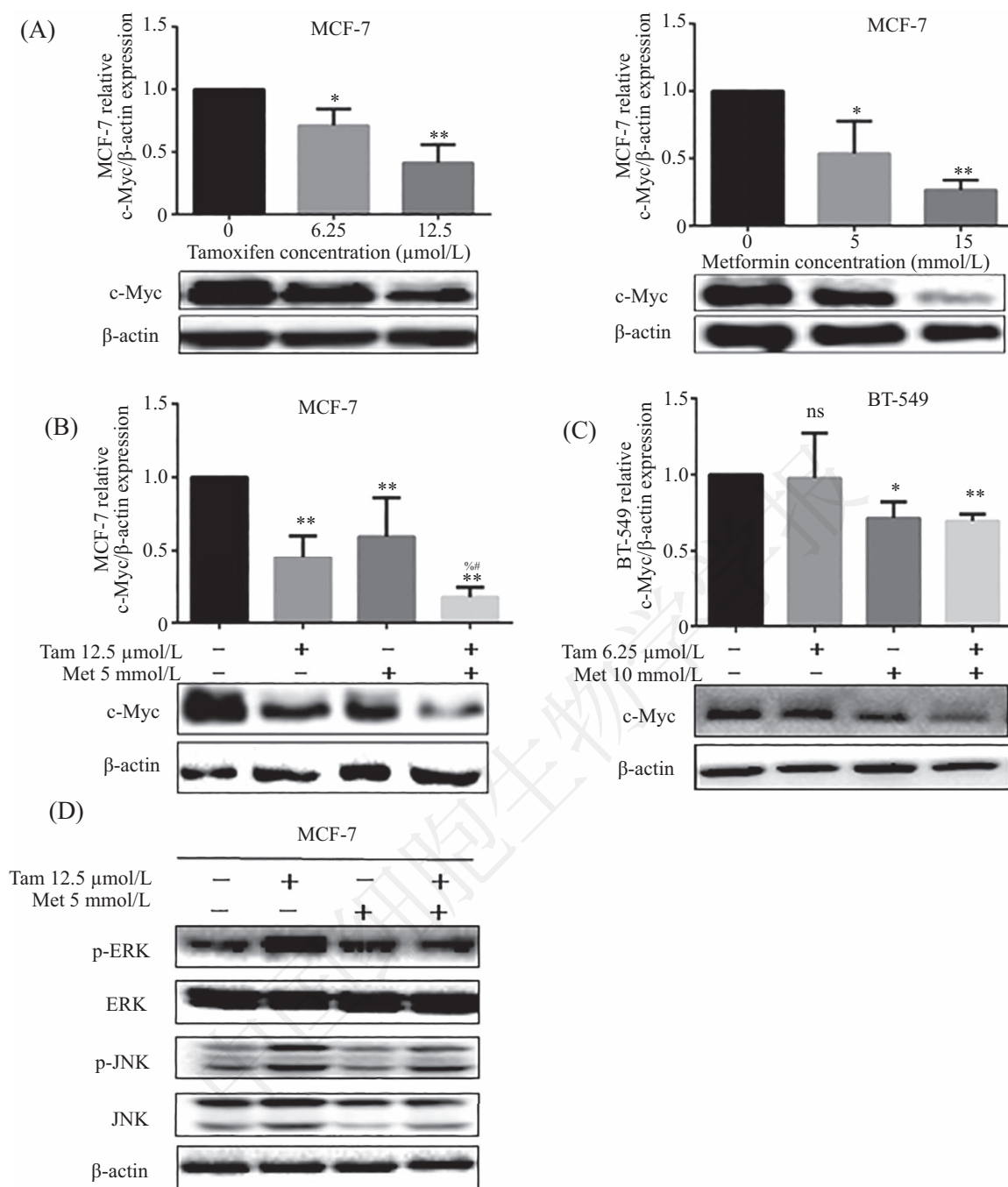
图4 二甲双胍和他莫昔芬抑制TNBC细胞的迁移和侵袭能力

Fig.4 Metformin potentiates the inhibitory effects of tamoxifen on migration and invasion of breast cancer cells

高浓度达25 $\mu\text{mol/L}$, 但据报道, 每日服40 mg他莫昔芬的乳腺癌患者, 其血清浓度为几微摩尔每升(0.07~1.40 $\mu\text{mol/L}$)^[28], 然而, 在乳腺癌组织中的浓度可以达到血清浓度的几十倍^[29]。在我们之前的研究中, 我们证明二甲双胍以剂量和时间依赖性的方式抑制乳腺癌细胞的生长^[30]。本研究中2.5~20 mmol/L的二甲双胍能抑制两种细胞的增殖, 结果和文献中报道的一致^[29]。大多数体外实验中, 二甲双胍使用的剂量在毫摩尔每升水平。在每天服用二甲双胍的病人中其血清浓度为微摩尔每升水平(10~20 $\mu\text{mol/L}$), 而用二甲双胍治疗一段时间后, 癌细胞线粒体内其浓度可达数毫摩尔每升^[29]。因此, 我们研究中使用的这两种药物的浓度在临床上是可以达到的。

基于前人的发现, 二甲双胍和他莫昔芬均增加了MAPK家族蛋白的表达^[27,31], 但我们发现只有他莫昔芬单独使用时上调了p-ERK/ERK的表达, 两药

联合未见协同作用。既往研究表明, 二甲双胍和他莫昔芬可调控包括c-Myc表达在内的信号通路^[8,16,32], 接受他莫昔芬治疗的ER阳性乳腺癌患者c-Myc mRNA水平下降^[33]。我们之前的研究表明, 二甲双胍可下调c-Myc蛋白水平^[30]。因此, 我们选择c-Myc作为我们的目的蛋白, 目前的研究表明, 在ER阳性乳腺癌细胞中, 他莫昔芬和二甲双胍单独使用能够以剂量依赖性的方式降低c-Myc蛋白水平, 而两种药物联合使用可以协同抑制c-Myc表达; 在TNBC细胞中, 仅在两种药物联合使用时可抑制c-Myc表达。Wang等^[34]证实, 缺乏c-Myc的细胞抑制了其增殖活力、克隆形成和裸鼠成瘤, 促进了细胞凋亡。c-Myc在血管生成中也起着关键作用^[35]。Fallah等^[36]描述了c-Myc的过表达通过对癌细胞侵袭和迁移的特异性作用调控肿瘤转移, 并与三阴性乳腺癌不良预后相关。因此, c-Myc可能是治疗三阴性乳腺癌的潜在



A: 用不同浓度的他莫昔芬, 二甲双胍处理MCF-7。B、C: 他莫昔芬、二甲双胍单独及联合处理显著降低了MCF-7、BT-549细胞c-Myc的表达。D: 他莫昔芬处理后上调MCF-7细胞p-ERK/ERK表达。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与未处理对照组比较; % $P < 0.05$, Tam+Met组与Tam组比较; # $P < 0.01$, Tam+Met组与Met组比较。

A: treatment with Tam, Met or Tam+Met significantly reduced c-Myc expression in MCF-7, BT-549 cells. B,C: MCF-7 incubated with different concentration Tam or Met. D: treatment with Tam significantly upregulated p-ERK/ERK expression in MCF-7 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group, % $P < 0.05$, Tam+Met group vs Tam group; # $P < 0.05$, Tam+Met group vs Met group.

图5 他莫昔芬和二甲双胍抑制乳腺癌细胞c-Myc蛋白的表达

Fig.5 Tamoxifen and metformin suppresses c-Myc expression in breast cancer cells

靶点。在我们的结果中, 两药联合能抑制c-Myc的表达, 但其如何影响癌症细胞的生物学功能, 仍然需要进一步的探索。

我们的研究表明, 二甲双胍联合他莫昔芬对治疗ER阳性乳腺癌细胞和三阴性乳腺癌细胞有协同作用, 抑制了乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭等。

这些抗肿瘤作用可能是通过下调c-Myc蛋白而非MAPK信号通路蛋白引起的。结果表明, 他莫昔芬与二甲双胍的联合应用可能对乳腺癌病人的临床治疗提供新的理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(1): 7-30.
- 2 Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8418-23.
- 3 Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15): 4429-34.
- 4 Katzenellenbogen BS, Fang H, Ince BA, Pakdel F, Reese JC, Wooge CH, *et al.* William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen receptors: ligand discrimination and antiestrogen action. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 27(1/2): 17-26.
- 5 Vickers SM, Jhala NC, Ahn EY, McDonald JM, Pan G, Bland KI. Tamoxifen (TMX)/Fas induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma (HCC) by gamma interferon (IFN- γ). *Ann Surg* 2002; 235(6): 872-8.
- 6 Mao J, Yuan J, Wang L, Zhang H, Jin X, Zhu J, *et al.* Tamoxifen inhibits migration of estrogen receptor-negative hepatocellular carcinoma cells by blocking the swelling-activated chloride current. *J Cell Physiol* 2013; 228(5): 991-1001.
- 7 Ko JC, Chiu HC, Syu JJ, Jian YJ, Chen CY, Jian YT, *et al.* Tamoxifen enhances erlotinib-induced cytotoxicity through down-regulating AKT-mediated thymidine phosphorylase expression in human non-small-cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2014; 88(1): 119-27.
- 8 Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6(6): 469-77.
- 9 Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378(9793): 771-84.
- 10 Rajput S, Kumar BN, Sarkar S, Das S, Azab B, Santhekadur PK, *et al.* Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. *PLoS One* 2013; 8(4): e61342.
- 11 Chen J, Thompson LU. Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration *in vitro*. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80(2): 163-70.
- 12 Scandlyn MJ, Stuart EC, Somers-Edgar TJ, Menzies AR, Rosengren RJ. A new role for tamoxifen in oestrogen receptor-negative breast cancer when it is combined with epigallocatechin gallate. *Br J Cancer* 2008; 99(7): 1056-63.
- 13 Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci* 2012; 122(6): 253-70.
- 14 Morales DR, Morris AD. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu Rev Med* 2015; 66: 17-29.
- 15 Wahdan-Alaswad R, Harrell JC, Fan Z, Edgerton SM, Liu B, Thor AD. Metformin attenuates transforming growth factor beta (TGF-beta) mediated oncogenesis in mesenchymal stem-like/ claudin-low triple negative breast cancer. *Cell Cycle* 2016; 15(8): 1046-59.
- 16 Pulito C, Donzelli S, Muti P, Puzzo L, Strano S, Blandino G. microRNAs and cancer metabolism reprogramming: the paradigm of metformin. *Ann Transl Med* 2014; 2(6): 58.
- 17 Wokoun U, Hellriegel M, Emons G, Grundker C. Co-treatment of breast cancer cells with pharmacologic doses of 2-deoxy-D-glucose and metformin: Starving tumors. *Oncol Rep* 2017; 37(4): 2418-24.
- 18 Strekalova E, Malin D, Rajanala H, Cryns VL. Metformin sensitizes triple-negative breast cancer to proapoptotic TRAIL receptor agonists by suppressing XIAP expression. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 163(3): 435-47.
- 19 Ma J, Guo Y, Chen S, Zhong C, Xue Y, Zhang Y, *et al.* Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC cancer* 2014; 14: 172.
- 20 Wang Q, Cheng Y, Wang Y, Fan Y, Li C, Zhang Y, *et al.* Tamoxifen reverses epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-200c in triple-negative breast cancer cells. *BMC cancer* 2017; 17(1): 492.
- 21 Anbalagan M, Sheng M, Fleischer B, Zhang Y, Gao Y, Hoang V, *et al.* Dual Src kinase/pre-tubulin inhibitor KX-01, sensitizes ERalpha-negative breast cancers to tamoxifen through ERalpha reexpression. *Mol Cancer Res* 2017; 15(11): 1491-502.
- 22 Sarkar S, Ghosh A, Banerjee S, Maity G, Das A, Larson MA, *et al.* CCN5/WISP-2 restores ER- proportional, variant in normal and neoplastic breast cells and sensitizes triple negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogenesis* 2017; 6(5): e340.
- 23 Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(21): 10269-73.
- 24 Kisfalvi K, Eibl G, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. *Cancer Res* 2009; 69(16): 6539-45.
- 25 Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, *et al.* Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70(6): 2465-75.
- 26 Safe S, Naira V, Karki K. Metformin-induced anticancer activities: recent insights. *Biol Chem* 2018; 399(4): 321-35.
- 27 Zheng A, Kallio A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* 2007; 148(6): 2764-77.
- 28 Furr BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984; 25(2): 127-205.
- 29 Kisanga ER, Gjerde J, Guerrieri-Gonzaga A, Pigatto F, Pesci-Feltri A, Robertson C, *et al.* Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three

- dose regimens in a randomized preoperative trial. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7): 2336-43.
- 30 Zhang J, Li G, Chen Y, Fang L, Guan C, Bai F, *et al.* Metformin inhibits tumorigenesis and tumor growth of breast cancer cells by upregulating miR-200c but downregulating AKT2 expression. *J Cancer* 2017; 8(10): 1849-64.
- 31 Malki A, Youssef A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res* 2011; 19(6): 275-85.
- 32 Vervoorts J, Luscher-Firzlaff J, Luscher B. The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* 2006; 281(46): 34725-9.
- 33 Le Roy X, Escot C, Brouillet JP, Theillet C, Maudelonde T, Simony-Lafontaine J, *et al.* Decrease of c-erbB-2 and c-myc RNA levels in tamoxifen-treated breast cancer. *Oncogene* 1991; 6(3): 431-7.
- 34 Wang YH, Liu S, Zhang G, Zhou CQ, Zhu HX, Zhou XB, *et al.* Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res* 2005; 7(2): 220-8.
- 35 Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, *et al.* c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002; 16(19): 2530-43.
- 36 Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P, Shajahan-Haq AN. MYC-driven pathways in breast cancer subtypes. *Biomolecules* 2017; doi:10.3390/biom7030053.