

## 研究简报

## 二甲双胍抑制H1299细胞迁移及其机制研究

曹妮妮<sup>1</sup> 陆艳艳<sup>1</sup> 华子春<sup>1,2\*</sup> 庄红芹<sup>1\*</sup><sup>1</sup>南京大学生命科学学院, 南京 210023; <sup>2</sup>常州南京大学-高新技术研究院, 常州 213164)

**摘要** 该文主要研究二甲双胍(metformin, Met)对肺腺癌H1299细胞增殖、迁移和凋亡的影响, 并探讨其可能作用机制。利用显微镜观察二甲双胍处理后细胞形态, 划痕实验检测二甲双胍对细胞迁移的影响; Annexin V/PI标记, 流式检测二甲双胍对细胞凋亡的影响; 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶(Edu)法检测二甲双胍对细胞增殖的影响。结果表明, 二甲双胍能改变H1299细胞形态且能显著抑制细胞迁移; 二甲双胍不能诱导H1299细胞凋亡; 二甲双胍能抑制H1299细胞增殖。进一步研究发现, 二甲双胍能下调p-ERK和p-MEK蛋白水平, 同时增加E-Cadherin和减少FAK、vimentin蛋白表达, 说明二甲双胍主要通过抑制ERK信号通路抑制H1299细胞增殖和迁移, 并通过上调E-Cadherin、下调FAK、vimentin使H1299细胞迁移受到明显抑制, 为二甲双胍应用于肺腺癌的预防及治疗提供了指导依据。

**关键词** 二甲双胍; H1299; 细胞迁移; 细胞增殖; ERK; E-Cadherin

## Metformin Inhibits Proliferation and Migration of H1299 Cells Through Interfering ERK Pathways

Cao Nini<sup>1</sup>, Lu Yanyan<sup>1</sup>, Hua Zichun<sup>1,2\*</sup>, Zhuang Hongqin<sup>1\*</sup><sup>1</sup>School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China;<sup>2</sup>High-Tech Research Institute of Nanjing University, Changzhou 213164, China)

**Abstract** In this paper we investigated the effects of metformin on proliferation, migration and apoptosis of lung adenocarcinoma H1299 cells and its underlying mechanism. The cell morphology of H1299 cells treated with metformin was observed under microscope, and the effect of metformin on the migration of H1299 cells was observed by wound healing, the effect of metformin on the apoptosis of H1299 cells was detected by Annexin V/PI, and the effect of metformin on the proliferation of H1299 cells was detected by 5-acetylene-2'deoxyuracil (Edu) assay. The results show that metformin changed the morphology of H1299 cells and significantly inhibited the migration of H1299 cells while metformin could not induce the apoptosis of H1299 cells. Meanwhile, metformin inhibited the proliferation of H1299 cells. Further study shows that metformin could down-regulate the phosphorylation levels of ERK and MEK proteins. In addition, Metformin increased the expression of E-Cadherin and decreased

收稿日期: 2019-04-01 接受日期: 2019-05-14

国家自然科学基金(批准号: 81630092、81773099)、江苏省自然科学基金(批准号: BZ2017018、BK20171202、BRA2017347)和常州市自然科学基金(批准号: CJ20180013)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 025-83324605, E-mail: huazc@nju.edu.cn; Tel: 025-89683692-213, E-mail: hqzhuang@nju.edu.cn

Received: April 1, 2019 Accepted: May 14, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81630092, 81773099), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BZ2017018, BK20171202, BRA2017347) and the Natural Science Foundation of Changzhou City (Grant No.CJ20180013)

\*Corresponding authors. Tel: +86-25-83324605, E-mail: huazc@nju.edu.cn; Tel: +86-25-89683692-213, E-mail: hqzhuang@nju.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-12 14:56:56 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1456.032.html>

the expression of FAK and vimentin. The results indicate that metformin inhibited the proliferation and migration of H1299 cells mainly by inhibiting ERK signaling pathway. Besides, inhibition of migration was caused by up-regulation of E-Cadherin and down-regulation of FAK and vimentin. The results provide reference for metformin in the prevention and treatment of lung adenocarcinoma.

**Keywords** metformin; H1299; cell migration; cell proliferation; ERK; E-Cadherin

研究发现, 肺癌是全世界男性最常见和最主要的癌症相关死亡原因。它占新发癌症病例总数的17%, 占癌症死亡总数的23%。在女性中, 肺癌已超过乳腺癌, 成为更发达国家癌症死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。随着吸烟人数的增加及环境污染的加剧, 近年来, 许多国家都报道, 肺癌的发病率和死亡率有明显增高。而肺腺癌在所有肺癌类型中占比高达85%, 只有少数患者能够长期生存<sup>[3]</sup>。目前, 临床上治疗肺癌的方法有很多, 最常见的就是放疗和化疗, 但这些治疗方法也存在许多的副作用<sup>[4-6]</sup>。在大多数肺癌治疗的病例中, 临床结果并不令人满意。因此, 寻找新的治疗方案很有必要。

二甲双胍(metformin, Met)是临床上用于治疗II型糖尿病的首选药物, 目前全世界大约有1.5亿人在服用, 它来源于植物法国丁香(*Galega officinalis*)。与现有的糖尿病疗法不同, 双胍类药物具有降低血糖水平而不诱发低血糖的优势<sup>[7]</sup>。由于其优越的安全性, 二甲双胍最终成为治疗II型糖尿病的一线药物, 现已列入世界卫生组织的基本药物清单<sup>[8]</sup>。有趣的是, 二甲双胍的治疗潜力远远超出了其作为抗糖尿病药物的处方用途。二甲双胍在多种疾病包括癌症和心血管疾病的治疗中具有有效作用。此外, 有证据表明, 二甲双胍能延缓衰老过程, 调节肠道微生物种群等<sup>[9-10]</sup>。最近的研究表明, 二甲双胍可能有潜在的治疗肿瘤的作用, 且毒副作用小。目前开展较多的研究是在结肠癌和乳腺癌中, 但也有研究表明, 二甲双胍可以降低糖尿病患者肺癌的发生率<sup>[11-12]</sup>。为了研究二甲双胍与肺癌的关系, 希望通过观察二甲双胍对肺腺癌H1299细胞表型的影响, 本文初步探讨其可能的作用机制, 为二甲双胍应用于肺癌的治疗提供新的理论指导。

## 主要药品及试剂

二甲双胍、4%多聚甲醛购自Sigma公司; 细胞培养瓶和6孔板购自Nunclon公司; DMEM购自Wisent公司; 胎牛血清FBS购自Hyclone公司; Edu试剂

盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V由本实验室纯化所得; Propidiumiodide购自Abcam公司; Anti-MEK、Anti-pMEK、Anti-ERK、Anti-pERK、Anti-FAK、Anti-vimentin、Anti-E-Cadherin均购自Cell Signaling Technology公司; 其他试剂如PBS、无水乙醇、胰酶等均为国产分析纯。

## 实验仪器

倒置生物显微镜购自江南生物科技有限责任公司, 型号为XD-202; 移液枪购自Glison公司; 细胞工作超净台购自苏州AIRTECH有限责任公司; 细胞CO<sub>2</sub>培养箱、流式细胞仪均购自Thermo Fisher Scientific公司; 电子天平购自METTLER TOLEDO公司; 台式普通离心机、台式低温冷冻离心机均购自Eppendorf公司; 蛋白凝胶电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

## 实验细胞

肺腺癌H1299细胞株购自中国科学院上海细胞库。所用培养液为含10%胎牛血清和双抗(100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)的DMEM完全培养基, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养及传代。

## 显微镜观察细胞形态

H1299细胞胰酶消化后铺至6孔板, 待细胞生长汇合度为40%~50%后, 加入10 mmol/L二甲双胍处理48 h, 显微镜下观察细胞形态, 并拍照记录。

## 划痕实验检测细胞迁移

在6孔板接种H1299细胞, 待单层细胞汇合度为80%~90%后, 血清饥饿6 h使细胞同步化。使用无菌200 μL枪头在各培养孔单层细胞间轻轻划痕。PBS轻轻地清洗各培养孔3次除去脱落细胞。更换含10 mmol/L二甲双胍培养液(含1% FBS), 显微镜拍照。24 h后显微镜下观察细胞划痕的相对面积并标记拍照, 拍照结束后, 利用软件分析划痕愈合情况。

## Annexin V/PI双染检测细胞凋亡

H1299细胞胰酶消化后铺至6孔板,待细胞生长汇合度为40%~50%后,加入10 mmol/L二甲双胍分别处理24 h和48 h。收集各孔细胞(包含培养基),转移至对应EP管。1 000 r/min离心5 min,吸弃上清,PBS洗2次。每管避光加入400  $\mu$ L 1 $\times$ 结合缓冲液和1  $\mu$ L Annexin V重悬细胞,冰上孵育30 min后避光加入1  $\mu$ L PI,室温孵育5 min,流式细胞仪进行检测分析。

## Edu检测细胞增殖

H1299细胞胰酶消化后铺至6孔板,待细胞生长汇合度为40%~50%后,加入10 mmol/L二甲双胍处理48 h。每孔留500  $\mu$ L培养液,加入500  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C预热后Edu工作液孵育2.5 h。Edu标记细胞完成后,去除培养液,并加入1 ml 4%多聚甲醛,室温固定15 min。去除固定液,每孔用1 mL洗涤液(含3% BSA的PBS)洗涤细胞3次,每次3~5 min。去除洗涤液,每孔加入1 mL通透液(含0.3% Triton X-100的PBS),室温孵育10~15 min。去除通透液,每孔用1 mL洗涤液洗涤细胞1~2次,每次3~5 min。洗涤期间配制click反应液:吸取2.580 mL点击化学反应缓冲液,依次加入120  $\mu$ L CuSO<sub>4</sub>、6  $\mu$ L Azide 488、300  $\mu$ L点击化学反应缓冲液,轻轻混匀。吸弃洗涤液,每孔加入现配的0.5 mL click反应液,轻轻摇晃匀混。室温避光孵育30 min。吸弃click反应液,洗涤液洗涤3次,每次5 min。吸弃洗涤液,用胰酶消化收集6孔板内细胞,PBS洗2次,流式细胞仪进行检测分析。

## Western blot验证蛋白表达

H1299细胞胰酶消化后铺至6孔板,待细胞生长汇合度为40%~50%后,加入10 mmol/L二甲双胍处理48 h。将6孔板中的细胞消化,收集至对应EP管,PBS洗涤2次,加入适量细胞裂解液和蛋白酶抑制剂混匀,冰上放置30 min,12 000 r/min离心10 min,吸取上清,使用酶标仪测蛋白浓度,上清中加入4 $\times$ 上样缓冲液沸水浴5 min。

配制10%的SDS-PAGE胶,将准备好的蛋白样品取30  $\mu$ g上样,上样过程中应注意快速准确上样,避免蛋白样品扩散,稳压80 V电泳质分离胶后,调成130 V继续电泳,将蛋白样品进行分离。待目的蛋白条带跑至合适的位置后,使用湿转将SDS-PAGE胶

中的蛋白转印至PVDF膜上,根据目的蛋白大小,稳流300 mA转膜1.5 h~2.0 h。

转膜结束后,将转上蛋白的PVDF膜放入5%脱脂奶粉液中,室温条件下封闭1~2 h。包被相应的一抗溶液,4  $^{\circ}$ C过夜,次日使用1 $\times$ PBST溶液洗膜3次,每次5~10 min。包被相应的二抗,在摇床上室温下45 min,1 $\times$ PBST溶液洗膜3次,洗去二抗,每次5~10 min。配置适量的化学发光液,平铺在PVDF膜上,室温放置2 min,用化学发光仪发光,获得目的蛋白条带。

## 统计和误差学分析

所有的实验数据均用means $\pm$ S.D.表示。对于两组数据比较,用Student's *t*-test检验, $P < 0.05$ 时认为差距有统计学意义。使用Graphpad Prism定量分析,\* $P < 0.05$ 表示有统计学差异,\*\* $P < 0.01$ 表示有显著统计学差异,\*\*\* $P < 0.001$ 表示有非常显著统计学差异,\*\*\*\* $P < 0.000 1$ 表示有极其显著统计学差异。

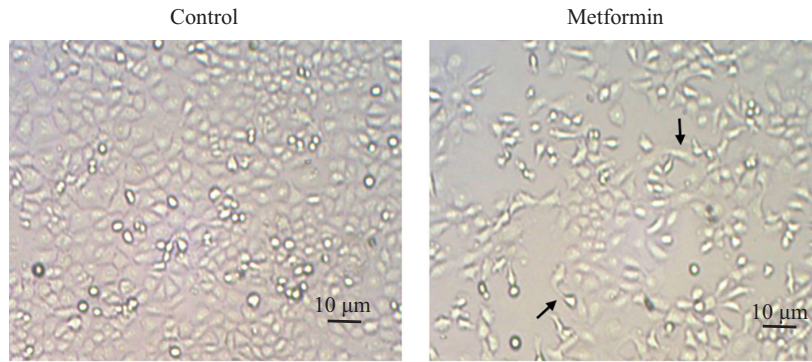
## 二甲双胍改变H1299细胞形态并抑制其迁移

10 mmol/L二甲双胍处理H1299细胞48 h后,显微镜下观察细胞形态。结果如图1所示,与对照组相比,10 mmol/L二甲双胍处理后的细胞数量明显减少,细胞外形变得非常不规则,形态拉长,首尾相连,说明二甲双胍能够改变H1299的细胞形态,很可能会影响细胞的迁移。所以进一步探索二甲双胍对细胞迁移的影响。

H1299细胞长至80%~90%后进行划痕实验,检测二甲双胍处理24 h划痕伤口愈合情况。如图2所示,与对照组相比,使用10 mmol/L二甲双胍处理H1299细胞24 h后,划痕愈合面积显著减少。对愈合面积进行定量分析,发现具有极其显著统计学差异( $P < 0.000 1$ ),说明二甲双胍能够抑制H1299细胞迁移:10 mmol/L二甲双胍能使细胞迁移能力下降近50%。

## 二甲双胍不能诱导H1299细胞凋亡

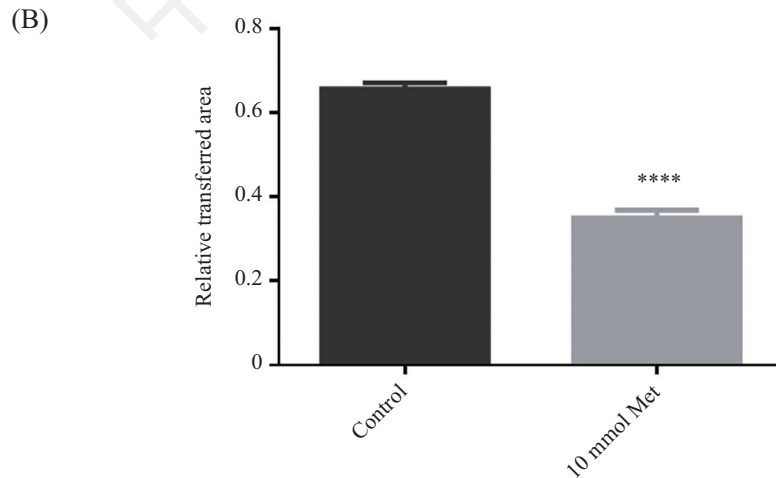
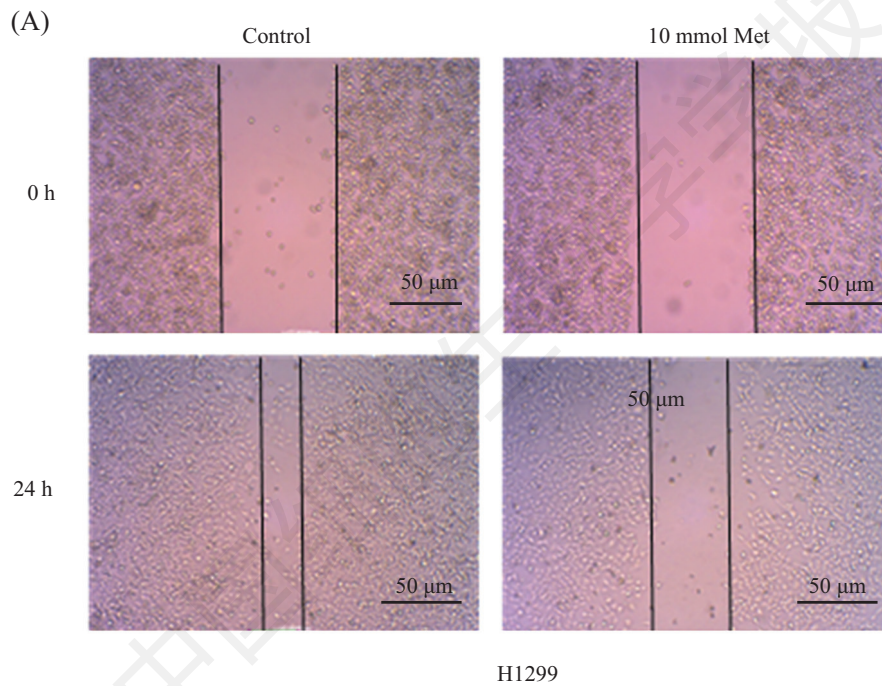
二甲双胍能够抑制H1299细胞迁移有可能是细胞的运动能力受到影响,也可能是影响细胞死亡或增殖的结果。因此,用10 mmol/L二甲双胍分别处理H1299细胞24 h和48 h。收集细胞用Annexin V/PI法检



箭头所指处为细胞形态改变。

The arrows refer to changes of cell morphology.

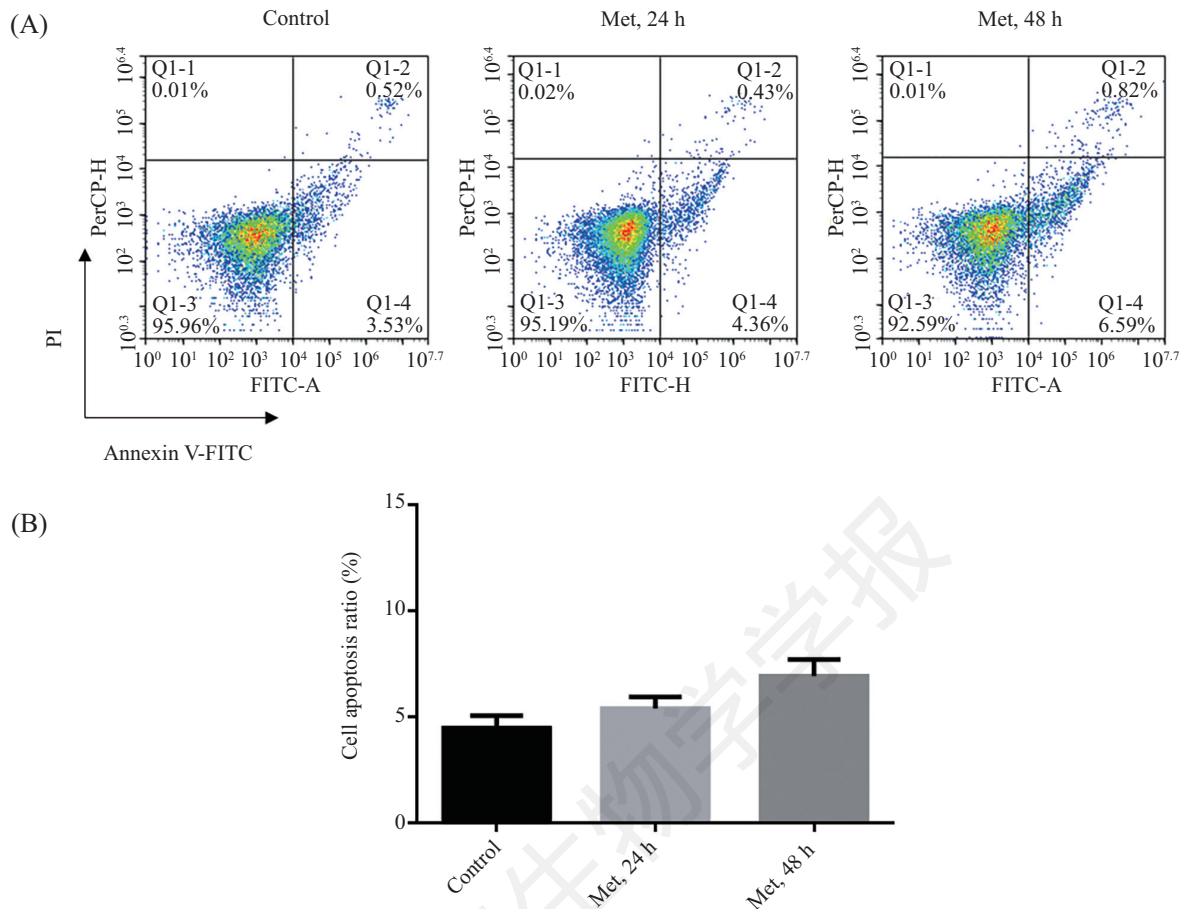
图1 二甲双胍改变H1299细胞形态  
Fig.1 Metformin changes H1299 cell morphology



A: 显微镜下细胞划痕情况; B: 细胞迁移面积相对定量。\*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与对照组比较。

A: scratch of cells under microscope; B: relative quantification of cell migration area. \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs control groups.

图2 二甲双胍抑制H1299细胞迁移  
Fig.2 Metformin inhibited H1299 cell migration



A: 流式检测细胞凋亡; B: 凋亡细胞定量。

A: flow cytometry was used to detect apoptotic cells; B: quantification of apoptotic cells.

图3 二甲双胍对H1299细胞凋亡的影响

Fig.3 The effects of inducing apoptosis in H1299 cells by metformin

测细胞凋亡。如图3所示,与对照组相比,10 mmol/L二甲双胍分别处理细胞24 h、48 h均无细胞的晚期凋亡和坏死。与对照组相比,早期凋亡也无明显增加,24 h仅有不到1%的改变,48 h也仅有3%的增加,说明二甲双胍不能诱导H1299细胞的凋亡,很可能仅影响细胞的移动能力。

### 二甲双胍抑制H1299细胞增殖

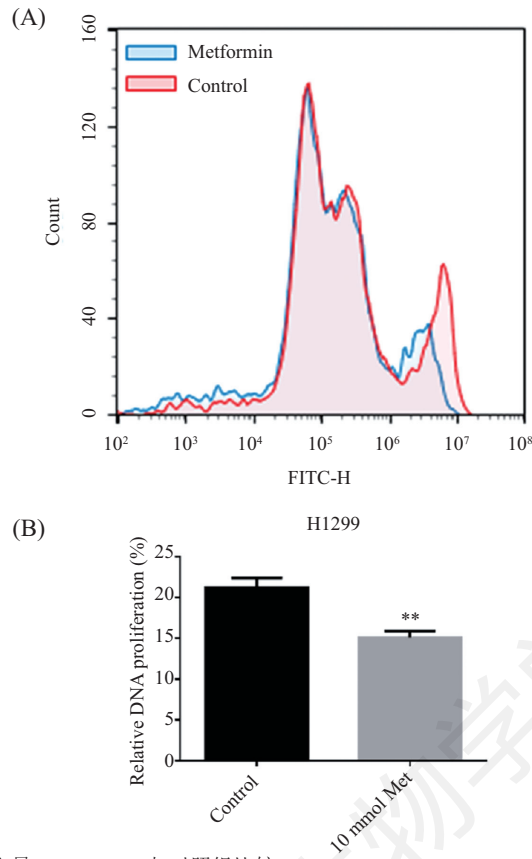
10 mmol/L二甲双胍处理H1299细胞48 h,将化学发光试剂Edu加入到培养基中。Edu结构类似于胸腺嘧啶T,能在DNA合成时掺入到DNA双螺旋结构中,细胞增殖现象可以通过荧光强度被流式细胞术检测到。结果如图4所示,与对照组相比,在10 mmol/L的二甲双胍作用下,Edu阳性细胞比例下降,且荧光强度低于对照组。对Edu阳性细胞进行定量分析,有显著统计学差异( $P < 0.01$ ),说明二甲双胍能抑制H1299

细胞的增殖:10 mmol/L的二甲双胍使细胞增殖能力下降近30%。

### 二甲双胍抑制H1299细胞ERK信号通路

细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)是80年代末发现的一类丝/苏氨酸蛋白激酶,包括ERK1和ERK2,是MAPKS家族的重要一员,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。磷酸化激活的ERK参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建和细胞的恶变等多种生物学反应<sup>[14-15]</sup>。相关研究表明,ERK信号通路的激活与肺癌的发生、转移有密切关系。

为了探索二甲双胍抑制H1299细胞增殖和迁移的机制,在用10 mmol/L二甲双胍处理细胞48 h后,提取细胞蛋白进行Western blot检测ERK和其上游MEK蛋白磷酸化水平。结果如图5所示,在10 mmol/L二

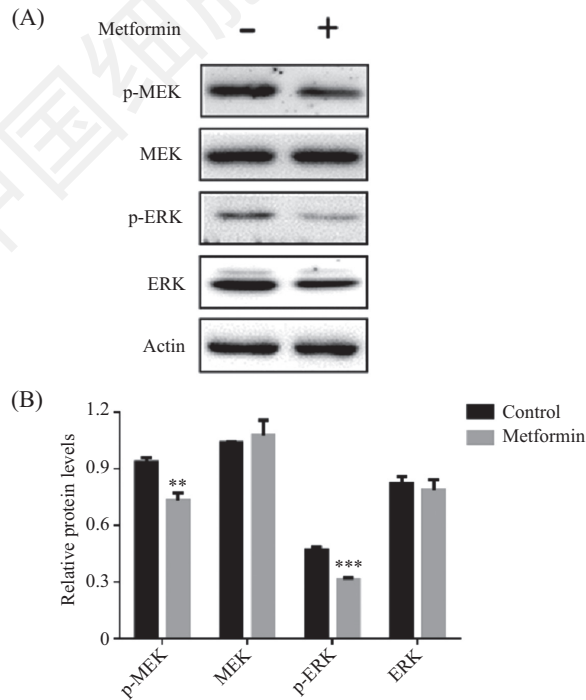


A: 流式检测细胞增殖; B: 增殖细胞定量。 \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

A: flow cytometry was used to detect cell proliferation; B: quantitative analysis of proliferating cells. \*\* $P < 0.01$  vs control groups.

图4 二甲双胍抑制H1299细胞增殖

Fig.4 Metformin inhibited H1299 cell proliferation



A: Western blot检测ERK信号通路相关蛋白; B: ImageJ对蛋白定量分析。

A: Western blot detected ERK signaling pathway related proteins; B: ImageJ quantitative analysis of protein.

图5 二甲双胍抑制H1299细胞ERK信号通路

Fig.5 Metformin inhibited ERK signaling pathway in H1299

甲双胍作用下, ERK的磷酸化水平下调非常明显( $P<0.001$ ), 同时ERK总蛋白相对变化不明显; MEK磷酸化水平也有显著减低( $P<0.01$ ), 同时MEK总蛋白没有显著变化。这些结果表明, 二甲双胍能够抑制ERK蛋白及其上游的MEK蛋白的磷酸化, 说明ERK信号通路可能是二甲双胍抑制H1299细胞增殖和迁移的机制之一。

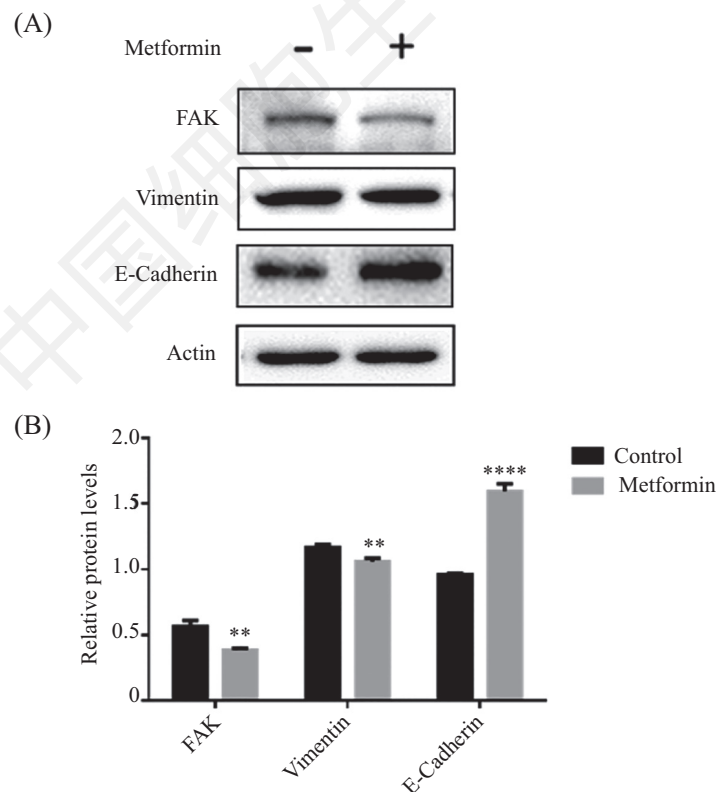
## 二甲双胍影响H1299细胞迁移相关蛋白表达

在之前的研究中已经发现二甲双胍能够明显抑制H1299细胞迁移, 为了进一步探索二甲双胍抑制H1299迁移的机制, 在用10 mmol/L二甲双胍处理细胞48 h后, 提取细胞蛋白进行Western blot检测迁移相关蛋白FAK、波形蛋白(vimentin)和黏附蛋白E-Cadherin水平的变化。结果如图6所示, 在10 mmol/L二甲双胍作用下, FAK、vimentin蛋白水平下调明显, 有显著统计学差异( $P<0.01$ ); E-cadherin蛋白水平上调显著( $P<0.0001$ )。这些结果表明, 二甲双胍能够

通过下调迁移相关蛋白FAK、vimentin和上调黏附蛋白E-cadherin抑制H1299细胞的迁移。

近年来, 随着环境的污染和吸烟人数的增加, 肺癌的发病率日渐增高, 已经成为全世界最主要的癌症相关死亡原因。肺腺癌是最常见的一种肺癌, 在所有肺癌中占比高达85%<sup>[3]</sup>。一些临床数据表明, 肺腺癌前期很少出现特异性症状, 大多数患者就诊时已是中晚期, 而中晚期的肺腺癌治疗和预后都有很大的困难。目前, 肺腺癌的治疗采用多种方式, 最常见的就是放疗和化疗。但这两种方法都有明显的副作用, 包括耐药性、局限性和毒性等<sup>[4-6]</sup>, 只有一小部分患者治疗后能够长期存活<sup>[13-14]</sup>。因此, 寻找新的肺腺癌治疗方法十分必要。

二甲双胍来源于植物*Galega officinalis*。在中世纪欧洲, 它被用来缓解现在归因于糖尿病的症状<sup>[7]</sup>。作为治疗糖尿病的一线药物, 二甲双胍主要是通过抑制肝葡萄糖生成、增加骨骼肌对葡萄糖的吸收和利用、降低外周组织的胰岛素抵抗以及抑制肝脏的糖异生来降低血糖水平的<sup>[15-16]</sup>。有趣的是, 近年来



A: Western blot检测迁移相关蛋白; B: ImageJ对蛋白定量分析。\*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , 与相对应的对照组比较。

A: Western blot was used to detect migration-related proteins; B: ImageJ was used to quantify the proteins. \*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$  vs the corresponding control groups.

图6 二甲双胍影响H1299细胞迁移相关蛋白表达

Fig.6 Metformin affected the expression of migration-related proteins in H1299

二甲双胍由于其抗癌作用引起了越来越多的关注。该药物已被证明可以减少前列腺癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌<sup>[18]</sup>、食管癌<sup>[19]</sup>、结肠癌<sup>[20]</sup>发生,二甲双胍的抗肿瘤作用主要通过激活AMPK信号通路,抑制下游m-TOR的活化,从而抑制肿瘤细胞的增殖。在常见的一些细胞系如人前列腺癌LNCaP和PC3<sup>[17]</sup>、人食管癌Eca-109和TE-1<sup>[19]</sup>中均发现AMPK的上调和m-TOR的下调。另外,二甲双胍还被发现存在独立于AMPK通路的抗肿瘤机制。在乳腺癌SUM159PT细胞中,二甲双胍主要通过调节DICER和c-MYC蛋白改变肿瘤细胞的代谢,从而影响肿瘤细胞的生长<sup>[18]</sup>;在结肠癌MC38细胞中,二甲双胍能够抑制PI3K/AKT信号通路,从而影响肿瘤细胞的增殖、迁移和凋亡<sup>[20]</sup>,但关于二甲双胍治疗肺癌的报道很少。为了探究二甲双胍对肺癌的影响,在本实验中,选取肺腺癌H1299细胞株,通过检测二甲双胍对H1299细胞增殖、迁移和凋亡的影响,初步探讨二甲双胍治疗肺癌的潜在作用及机制。

首先,通过显微镜直接观察二甲双胍处理后的H1299细胞形态。结果发现,对照组H1299细胞分布均匀、大小均一,外形规则,形状呈现为梭型,与对照组相比,10 mmol/L二甲双胍处理后,H1299细胞数量明显减少,细胞外形变得不规则,出现边缘模糊、形态拉长、首尾相连等现象,说明二甲双胍能够改变H1299细胞形态,推测二甲双胍可能通过改变细胞形态影响细胞迁移。所以进一步通过划痕实验探索二甲双胍对细胞迁移的影响。划痕结果显示,与对照组相比,二甲双胍处理后,H1299划痕愈合面积显著减少,定量分析结果具有统计学差异( $P < 0.0001$ ),说明二甲双胍能够抑制H1299细胞迁移。

细胞迁移能力的改变受众多因素影响,可能与细胞增殖、凋亡有关。为了探究二甲双胍抑制细胞迁移的内在因素,研究者通过Annexin V/PI标记细胞及流式细胞仪检测细胞凋亡。结果发现,10 mmol/L二甲双胍不能引起H1299细胞晚期凋亡和坏死。与对照组相比,早期凋亡也无明显增加,24 h仅有不到1%的改变,48 h也仅有3%的增加,说明二甲双胍不能诱导H1299细胞的凋亡,仅可能影响细胞的状态。因此,推测二甲双胍抑制细胞迁移并不是通过诱导细胞凋亡引起,可能与细胞增殖或是自身迁移能力发生改变有关。实验进一步探究了二甲双胍与H1299细胞增殖的关系,通过加入发光试剂Edu检测

细胞增殖能力的改变。实验结果表明,10 mmol/L的二甲双胍能够降低Edu阳性细胞比例,且荧光强度低于对照组。对Edu阳性细胞进行定量分析,结果有显著统计学差异( $P < 0.01$ ),说明二甲双胍能抑制H1299细胞的增殖。进一步分析二甲双胍处理组相比对照组迁移和增殖的抑制。结果发现,10 mmol/L的二甲双胍能使细胞迁移能力下降近50%,增殖能力下降近30%,说明二甲双胍对细胞迁移的抑制可能部分来源于增殖抑制引起的细胞数量减少,另一部分由细胞本身迁移能力下降所致。

肺癌的转移是导致癌症死亡的重要原因之一。研究发现,MAPK/ERK信号通路与癌症的发生、发展及恶性转化密切相关,在多种恶性肿瘤如宫颈癌、食管癌、肝癌、非小细胞肺癌等中ERK处于过度表达,而ERK的过度表达在细胞迁移和黏附中发挥重要作用<sup>[21-22]</sup>。为了探究二甲双胍抑制肿瘤细胞迁移和增殖的具体机制,我们通过Western blot实验检测二甲双胍处理后细胞中ERK和MEK蛋白的磷酸化水平。结果发现,二甲双胍能够抑制ERK和MEK蛋白的磷酸化,说明二甲双胍可能通过抑制ERK信号通路抑制H1299细胞的增殖和迁移。

有研究报道,ERK还能通过调控上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的发生影响肿瘤细胞的迁移<sup>[23]</sup>。黏附蛋白E-Cadherin被认为是EMT中上皮标志物,也是EMT发生过程的重要因子,可维持细胞间的紧密连接,当其表达增多时,细胞极性和稳定性增强,细胞迁移和侵袭能力下降。EMT中的间质标志物较多,其中vimentin是重要成员之一,它的主要作用是维持细胞骨架的完整性,当其表达减少时,说明骨架完整性被破坏,细胞迁移能力下降<sup>[24-25]</sup>。另外,影响肿瘤细胞迁移能力的重要因子还包括局部黏着斑激酶FAK,已有报道证实肿瘤转移与FAK的过度激活相关<sup>[26]</sup>。实验进一步通过Western blot检测E-Cadherin、vimentin、FAK的表达水平,结果显示,FAK、vimentin表达下调,E-Cadherin表达上调,说明二甲双胍可能是通过ERK信号通路调控E-Cadherin、vimentin、FAK的表达,进而影响细胞的迁移能力,实现对肺腺癌H1299细胞迁移调控的作用。

综上所述,二甲双胍能够抑制H1299细胞迁移和增殖,但不能诱导其凋亡。进一步探究相关机制,发现二甲双胍主要通过抑制ERK信号通路抑制



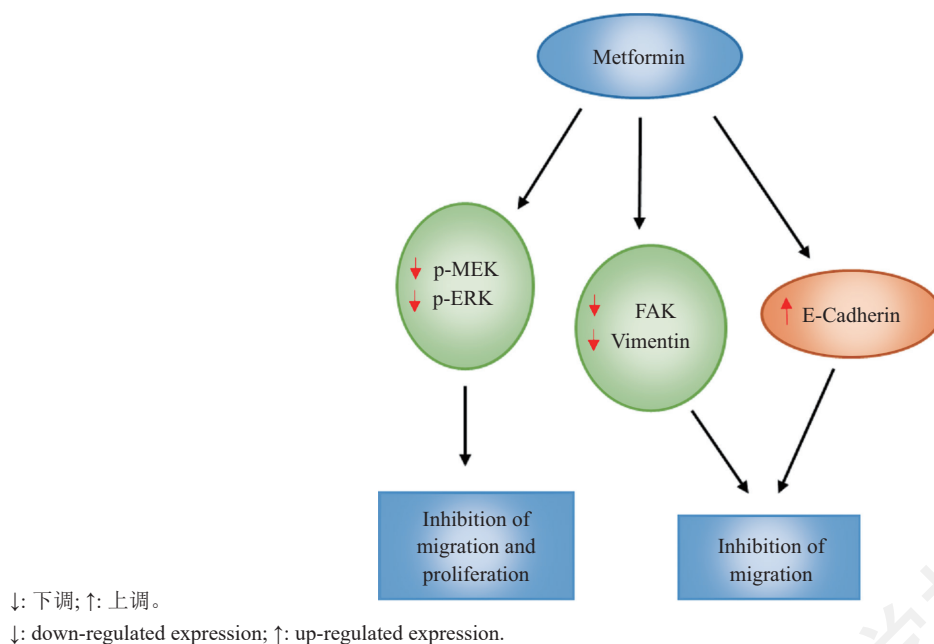


图7 二甲双胍影响H1299细胞增殖和迁移相关蛋白

Fig.7 Metformin affected the expression of proliferation-related proteins and migration-related proteins in H1299

H1299细胞的增殖和迁移, 另外还通过调控EMT的发生, 抑制FAK、vimentin, 促进E-Cadherin蛋白的表达来抑制迁移(图7), 为二甲双胍应用于肺腺癌的治疗提供了理论依据。

### 参考文献 (References)

- 1 Reck M. Pembrolizumab as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy* 2018; 10(2): 93-105.
- 2 Leigh NB. Treatment paradigms for patients with metastatic non-small-cell lung cancer: first-, second-, and third-line. *Curr Oncol* 2012; 19: S52-8.
- 3 Soo RA, Kawaguchi T, Loh M, Ou SI, P Shieh M, Chul Cho B, *et al.* Differences in outcome and toxicity between Asian and Caucasian patients with lung cancer treated with systemic therapy. *Future Oncol* 2012; 8(4): 451-62.
- 4 Roach C, Zhang N, Corigliano E, Jansson M, Toland G, Ponto G, *et al.* Development of a companion diagnostic PD-L1 immol/lunohistochemistry assay for pembrolizumab therapy in non-small-cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2016; 24(6): 392-7.
- 5 Sekine I, Yamamoto N, Nishio K, Saijo N. Emerging ethnic differences in lung cancer therapy. *Br J Cancer* 2008; 99(11): 1757-62.
- 6 Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(21): 2018-28.
- 7 Watanabe C. Studies in the metabolic changes induced by administration of guanidine bases. *J Biol Chem* 1918; 33: 253-65.
- 8 Han G, Gong H, Wang Y, Guo S, Liu K. Ampk/mtor-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(1): 77-87.
- 9 Zhao D, Long XD, Lu TF, Wang T, Zhang WW, Liu YX, *et al.* Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2015; 136(11): 2556-65.
- 10 Zi FM, He JS, Li Y, Wu C, Yang L, Yang Y, *et al.* Metformin displays anti-myeloma activity and synergistic effect with dexamethasone *in vitro* and *in vivo* xenograft models. *Cancer Lett* 2014; 356(2): 443-53.
- 11 Qu C, Zhang W, Zheng G, Zhang Z, Yin J, He Z. Metformin reverses multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2014; 386(1/2): 63-71.
- 12 Lengyel E, Litchfield LM, Mitra AK, Nieman KM, Mukherjee A, Zhang Y, *et al.* Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212(4): 479.e1-10.
- 13 Delaunay M, Cadranel J, Lusque A, Meyer N, Gounant V, Moro-Sibilot D, *et al.* Immol/lune-checkpoint inhibitors associated with interstitial lung disease in cancer patients. *Eur Respir J* 2017; doi: 10.1183/13993003.00050-2017.
- 14 Lee CK, Man J, Lord S, Links M, Gebiski V, Mok T, *et al.* Checkpoint inhibitors in metastatic EGFR-mutated non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2016; 12(2): 403-7.
- 15 Dowling RJ, Goodwin PJ, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Med* 2011; 9: 33.
- 16 Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in 16 muscle cells. *Endocrinology* 1992; 131(3): 1165-73.
- 17 Colquhoun AJ, Venier NA, Vandersluis AD, Besla R, Sugar LM, Kiss A, *et al.* Metformin enhances the antiproliferative

- and apoptotic effect of bicalutamide in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012; 15(4): 346-52.
- 18 Blandino G, Valerio M, Cioce M, Mori F, Casadei L, Pulito C, *et al.* Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of *dicer* and *c-myc*. *Nat Comm* 2012; 3: 865.
- 19 Xu Y, Lu S. Metformin inhibits esophagus cancer proliferation through upregulation of *usp7*. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(5): 1178-86.
- 20 Algire C, Amrein L, Zakikhani M, Panasci L, Pollak M. Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth *in vivo* and is associated with reduced expression of fatty acid synthase. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(2): 351-60.
- 21 Shi YH, Tuokan T, Lin C, Chang H. Aquaporin 8 involvement in human cervical cancer SiHa migration via the EGFR-Erk1/2 pathway. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(5): 6391-5.
- 22 Gao X, Balan V, Tai G, Raz A. Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway. *Oncotarget* 2014; 5(8): 2077-83.
- 23 Zhao XW, Zhou JP, Bi YL, Wang JY, Yu R, Deng C, *et al.* The role of MAPK signaling pathway in formation of EMT in oral squamous carcinoma cells induced by TNF- $\alpha$ . *Mol Biol Rep* 2019 46(3): 3149-56.
- 24 Zhu J, Huang Z, Zhang M, Wang W, Liang H, Zeng J, *et al.* HIF-1 $\alpha$  promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model. *Oncol Lett* 2018; 15(3): 3482-9.
- 25 Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers* 2017; 9(12): 171.
- 26 Wang Y, Zheng J, Han Y, Zhang Y, Su L, Hu D, *et al.* JAM-A knockdown accelerates the proliferation and migration of human keratinocytes, and improves wound healing in rats via FAK/Erk signaling. *Cell Death Dis* 2018; 9(9): 848.

中国细胞生物学学报