

## 二甲双胍下调谷胱甘肽 S 转移酶和拓扑异构酶 II $\alpha$ 对 SiHa/cDDP 增殖的抑制作用

朱小兰<sup>1</sup>, 夏承来<sup>2\*</sup>, 梁少芬<sup>2</sup>, 何志鸿<sup>2</sup>, 陈锐洪<sup>2</sup>

1. 广州医科大学附属第三医院 药学部, 广东 广州 510150

2. 佛山市妇幼保健院 南方医科大学附属佛山妇幼保健院 科研实验室, 广东 佛山 528000

**摘要:** 目的 探讨二甲双胍下调谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTpi) 和拓扑异构酶 II  $\alpha$  (TopII $\alpha$ ) 对顺铂 (cDDP) 耐药的宫颈癌细胞系 SiHa/cDDP 增殖的抑制作用。方法 构建 SiHa/cDDP 耐药细胞株并进行鉴定。CCK8 法测定 cDDP 对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率; 绘制 SiHa、SiHa/cDDP 细胞的生长曲线, 按 Patterson 公式计算 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的群体倍增时间; 观察 cDDP 对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞形态的影响; CCK8 法测定不同浓度二甲双胍对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率; 细胞迁移实验、Transwell 细胞侵袭实验分别检测二甲双胍对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞侧向迁移能力及纵向迁移能力的影响; RT-qPCR 法检测 SiHa/cDDP 细胞较 SiHa 细胞 GSTpi、TopII $\alpha$  mRNA 的表达变化, 以及二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞作用后 GSTpi、TopII $\alpha$  mRNA 的表达变化。结果 cDDP 对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞的抑制作用与 cDDP 的浓度正相关, 相同浓度下对 SiHa/cDDP 细胞的抑制率明显低于对 SiHa 细胞的抑制率 ( $P < 0.01$ ); SiHa、SiHa/cDDP 细胞的群体倍增时间分别为 (30.69  $\pm$  0.58)、(38.39  $\pm$  1.05) h, 比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 顺铂对 SiHa 细胞形态的影响较大, 而对 SiHa/cDDP 细胞基本没有影响; 二甲双胍对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞生长均有抑制作用, 抑制率与二甲双胍浓度正相关, 相同浓度下对 SiHa/cDDP 细胞的抑制率明显高于对 SiHa 细胞的抑制率 ( $P < 0.01$ ); 与 SiHa 细胞相比, 二甲双胍能更明显抑制 SiHa/cDDP 细胞迁移和侵袭 ( $P < 0.01$ ); RT-qPCR 结果显示, 与 SiHa 细胞相比, SiHa/cDDP 中 GSTpi、TopII $\alpha$  mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.01$ 、0.05), 且二甲双胍能抑制 SiHa/cDDP 细胞中 GSTpi、TopII $\alpha$  mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ )。结论 二甲双胍能通过下调 GSTpi、TopII $\alpha$  的表达抑制 SiHa/cDDP 的增殖、侵袭和迁移。

**关键词:** 二甲双胍; 谷胱甘肽 S 转移酶; 拓扑异构酶 II  $\alpha$ ; 顺铂耐药; 宫颈癌

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2019)04 - 0941 - 08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.04.013

## Inhibition of metformin on SiHa/cDDP cells proliferation by down-regulating GSTpi and TopII $\alpha$

ZHU Xiao-lan<sup>1</sup>, XIA Cheng-lai<sup>2</sup>, LIANG Shao-fen<sup>2</sup>, HE Zhi-hong<sup>2</sup>, CHEN Rui-hong<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China

2. Research Laboratory, Foshan Women and Children Hospital, Affiliated Foshan Women and Children Hospital of South Medical University, Foshan 528000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of metformin on SiHa/cDDP cells proliferation by down-regulating GSTpi and TopII $\alpha$ . **Methods** SiHa/cDDP cells were constructed and authenticated. The inhibition rates of cDDP on SiHa and SiHa/cDDP cells were estimated by Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay. Cell growth curve of SiHa and SiHa/cDDP cells was drawn, and population doubling time of SiHa and SiHa/cDDP cells was calculated by the manner of Patterson formula. The effects of cDDP on the morphology of SiHa and SiHa/cDDP cells were observed. The inhibition rates of metformin in different concentration on SiHa and SiHa/cDDP cells were estimated by CCK8 assay. The effects of metformin on SiHa and SiHa/cDDP cells were detected by wound healing assay to evaluate lateral migration, and by transwell assay to evaluate longitudinal migration, respectively. Changes of expression of GSTpi and TopII $\alpha$

收稿日期: 2018-12-24

基金项目: 佛山市科技创新项目 (2018AB000031); 广州医科大学博士、留学回国人员科研项目 (2016C23); 佛山市科技创新项目 (医学科技创新平台建设项目, FS0AA-KJ218-1301-0008)

作者简介: 朱小兰, 女, 药师, 硕士研究生, 研究方向为抗病毒抗肿瘤药物药理学。E-mail: zhuxljulia@126.com

\*通信作者 夏承来, 男, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 研究方向为抗病毒抗肿瘤药物药理学。E-mail: xiachenglai@126.com

mRNA in SiHa/cDDP cells compared with those in SiHa cells were detected by RT-qPCR, and changes of expression of GSTpi and TopII $\alpha$  mRNA in SiHa/cDDP cells treated with metformin were detected. **Results** The inhibition of cDDP on SiHa and SiHa/cDDP cells was positively correlated with the concentration of cDDP. The inhibition rate in SiHa/cDDP cells was significantly lower than that in SiHa cells ( $P < 0.01$ ) under the same concentration of cDDP. The population doubling time of SiHa and SiHa/cDDP cells was  $(30.69 \pm 0.58)$  h and  $(38.39 \pm 1.05)$  h respectively, ( $P < 0.001$ ). Cisplatin had a significant effect on the morphology of SiHa cells, but had few effects on SiHa/cDDP cells. Metformin inhibited the growth of both SiHa and SiHa/cDDP cells, with positively correlated with the concentration of merformin. The inhibition rate in SiHa/cDDP cells was significantly higher than that in SiHa cells ( $P < 0.01$ ) under the same concentration of merformin. Compared with SiHa cells, metformin inhibited the migration and invasion of SiHa/cDDP cells more significantly ( $P < 0.01$ ). RT-qPCR results showed that the expression of GSTpi, and TopII $\alpha$  mRNA in SiHa/cDDP cells was significantly higher than that in SiHa cells ( $P < 0.01, 0.05$ ), and metformin could inhibit mRNA expression of GSTpi, TopII $\alpha$  in SiHa/cDDP cells ( $P < 0.01$ ). **Concousion** Metformin inhibits SiHa/cDDP cells proliferation, motility, and invasiveness by down-regulating expression levels of genes GSTpi and TopII $\alpha$ .

**Key words:** metformin; GSTpi; TopII $\alpha$ ; cisplatin resistant; cervical cancer

宫颈癌是全世界女性 4 大常见癌症之一。据报道, 全球宫颈癌的死亡率有 85% 是发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。在中国, 宫颈癌发病率逐年升高, 并有年轻化的趋势<sup>[2]</sup>。故为宫颈癌患者寻找有效的治疗方法和药物是迫切需求的。顺铂 (cDDP) 是 20 世纪 60 年代发现的一种铂类化合物, 为目前临床治疗多种癌症最有效的化疗药物之一。据统计, 治疗包括宫颈癌在内的多种癌症 (如头颈癌、非小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌等) 的一线化疗药物都优先使用顺铂。然而, 反复使用顺铂经常会引起肿瘤对药物的获得性耐药<sup>[3]</sup>, 这可能是导致很多癌症化疗失败的一个重要原因<sup>[4]</sup>。所以, 针对已经对顺铂产生耐药的宫颈癌, 如果能够找到一种新的、有效的、副作用少的治疗或辅助治疗药物, 将大大提升宫颈癌患者的治疗效果, 这对于降低宫颈癌的死亡率具有重要的意义。

二甲双胍是一种用于降低 2 型糖尿病患者血糖水平的口服药物<sup>[5]</sup>。近年研究发现二甲双胍能够降低 2 型糖尿病患者患癌的风险<sup>[6-7]</sup>, 对乳腺癌细胞<sup>[8-9]</sup>、肝癌细胞<sup>[10]</sup>生长均有抑制作用。还有研究发现, 二甲双胍对 p53 缺陷型结直肠癌患者具有放射增敏作用<sup>[11]</sup>。通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 和抑制哺乳动物雷帕霉素靶点 (mTOR), 二甲双胍对乳腺癌细胞有杀伤和放射增敏作用, 并优先杀死肿瘤干细胞<sup>[12]</sup>。同时, 本实验室前期的研究结果显示, 二甲双胍具有抑制宫颈癌侵袭的作用, 在与奈非那韦联合用药时发挥明显的抗肿瘤效应<sup>[13]</sup>; 且可以破坏 LncRNA MALAT1/miR-142-5p 海绵, 抑制宫颈癌细胞增殖<sup>[14]</sup>。基于这些研究结果, 为了探讨二甲双胍对顺铂耐药的宫颈癌细胞是否有抑制作用, 本研

究首先构建了顺铂耐药的宫颈癌细胞系 SiHa/cDDP, 并以 SiHa 细胞作为对照细胞, 检测了二甲双胍对两株细胞的抑制作用及其侧向与纵向迁移能力的影响, 结果发现与 SiHa 细胞相比, 二甲双胍可明显下调耐药相关基因谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTpi) 和拓扑异构酶 II  $\alpha$  (TopII $\alpha$ ) mRNA 表达, 抑制 SiHa/cDDP 细胞增殖、侵袭和迁移。本研究将为二甲双胍抑制肿瘤耐药提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人宫颈鳞癌 SiHa 细胞系 (HTB-35) 来自美国菌种保藏中心 (ATCC)。

### 1.2 试剂及仪器

顺铂 (2 mL : 10 mg, 齐鲁制药有限公司, 产品批号 1A1A1605021A); 二甲双胍 (0.5 g/片, 中美上海施贵宝制药, 产品批号 AAL7649); 胎牛血清 FBS (美国 Gibco 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); CCK8 试剂 (日本株式会社同仁化学研究所); Transwell 小室 (8.0  $\mu$ m, 美国 Corning 公司); 结晶紫 (北京雷根生物技术有限公司); RNA 抽提试剂盒 Quick-RNA<sup>TM</sup> Miniprep Plus Kit (美国 Zymo Research 生物科技公司); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、GSTpi、Top II  $\alpha$  的 qPCR 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 序列: GAPDH 正义: CGACCACTTTGTCAAGCTCA, 反义: CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT; GSTpi 正义: CACTCAAAGCCTCCTGCCTA, 反义: TGCTGGTCCTTCCATAGAG; Top II  $\alpha$  正义: GCTGGATCAGTGGCTGAAAT, 反义: AATGGGCTGCAAGAGGTTTA。美国 GE Amersham 酶标仪。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

**2.1.1 SiHa 细胞的培养** 采用含 10% (100 mL/L) 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 U/L 链霉素的 DMEM 培养基, 将 SiHa 细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 细胞培养 2~3 d 更换培养基, 待细胞生长至 80% 左右时, 予 0.25% (2.5 g/L) 胰酶消化、传代培养。

**2.1.2 SiHa/cDDP 耐药细胞株的构建与鉴定** 采用逐步提高培养基中顺铂浓度的方法进行 SiHa/cDDP 耐药细胞系的诱导培养。简而言之, SiHa 细胞先在低浓度 (0.5 μg/mL) 的顺铂培养基中进行刺激培养, 待其稳定生长并传代后, 提高一个顺铂的浓度等级重复该过程, 以此类推。参考文献报道<sup>[16-17]</sup>并根据细胞生长情况适度调整, 研究中使用的顺铂诱导浓度依次为 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、3.0 μg/mL, 每个浓度的刺激时间约 4 周。获得能在含有 3.0 μg/mL 顺铂的培养基中稳定生长, 并可传代及冻存的耐药细胞系 SiHa/cDDP。诱导成功的 SiHa/cDDP 细胞在 2.1.1 项的基础上添加 3.0 μg/mL 的顺铂进行培养。

### 2.2 顺铂对宫颈癌细胞的抑制作用

**2.2.1 顺铂对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率** 取对数生长期的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞以每孔含 4 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 设立 3 个复孔。培养 24 h 后, 更换培养基为含顺铂的 DMEM 完全培养基, 顺铂从最高浓度 25 μg/mL 开始, 倍比稀释成 5 个梯度 (通过预实验来确定浓度范围): 25.0、12.5、6.25、3.13、1.56 μg/mL, 和一组不含顺铂的空白对照。培养 48 h 后, 去除孔板中的培养基, 加入含 10% CCK8 的 DMEM 完全培养基, 每孔 100 μL。此时加入一组无细胞, 含 10% CCK8 的 DMEM 完全培养基复孔作为吸光值的背景对照。继续培养 4 h 后, 于酶标仪上进行 450 nm 处吸光度 (*A*) 值的测定。以空白对照细胞活率为 100%, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - [(A_{\text{药物}} - A_{\text{背景}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{背景}})]$$

**2.2.2 倍增时间** 取对数生长期 SiHa、SiHa/cDDP 细胞分别制成单细胞悬液, 以每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞接种至 24 孔板, 设置 3 个复孔, 置于培养箱培养, 分别于培养 24、48、72、96、120、144、168 h 各取 3 孔细胞进行台盼蓝染色计活细胞数。以培养时间为横坐标、活细胞数为纵坐标绘制两株细胞的生长曲线。按照 Patterson 公式<sup>[15]</sup>计算细胞群体倍增时间 (*T<sub>d</sub>*)。

$$T_d = \Delta T \cdot \lg 2 / \lg N_t / N_0$$

*N<sub>t</sub>* 为终末细胞数, *N<sub>0</sub>* 为初始细胞数,  $\Delta T$  为 *N<sub>t</sub>*~*N<sub>0</sub>* 的时间。

**2.2.3 顺铂对宫颈癌细胞形态的影响** 取对数生长期的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞经胰酶消化, 收集细胞并计数, 各取 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板内, 两种细胞均使用含 3.0 μg/mL 顺铂的培养基进行培养, 每两天换液, 并置于倒置显微镜下观察, 比较两种细胞的形态、大小以及生长状态并拍照。

### 2.3 二甲双胍对宫颈癌细胞的抑制作用

按照 2.2.1 项下实验方法测定二甲双胍对宫颈癌细胞的抑制率。二甲双胍从最高浓度 10.00 mmol/L 开始 (通过预实验来确定浓度范围), 倍比稀释设置 6 个梯度: 10.00、5.00、2.50、1.25、0.63、0.31 mmol/L, 和一组不含二甲双胍的空白对照。

### 2.4 二甲双胍对宫颈癌细胞侧向迁移的影响

于 6 孔板的背面画两条平行的直线作为参考标记, 取对数生长期的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞经胰酶消化, 收集细胞并计数, 分别以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板内, 常规培养 24 h 后见各组细胞达到 90% 以上融合度, 弃培养基, 垂直于孔板背面的直线划痕, 间隔 0.5~1 cm 划 3~4 条平行线, PBS 清洗脱落的细胞 2 次, 加入不同浓度的二甲双胍: 0 mmol/L (对照)、2.5、10 mmol/L, 且含 1% BSA 的无血清 DMEM 培养基, 将 6 孔板放于倒置显微镜下, 每孔至少选取 3 个视野观察划痕位置并拍照, 做好标记; 再将细胞重新放回培养箱培养, 48 h 后以同样的方法在选取的视野处观察并拍照。并计算不同浓度二甲双胍对宫颈癌细胞侧向迁移的迁移率和迁移抑制率。

$$\text{迁移率} = (D_{0h} - D_{48h}) / D_{0h} \quad (D \text{ 为划痕宽度})$$

$$\text{迁移抑制率} = 1 - \text{药物组迁移率} / \text{对照组迁移率}$$

### 2.5 二甲双胍对宫颈癌细胞纵向迁移的影响

取对数生长期的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞经胰酶消化, 收集细胞并计数, 分别以每孔 1×10<sup>6</sup> 个细胞接种于 6 孔板内, 常规培养 24 h 后, 弃培养基, 分别加入含不同浓度二甲双胍: 0 mmol/L (对照)、2.5、10 mmol/L 的 DMEM 完全培养基, 继续培养 48 h 后备用。将 Matrigel 基质胶在冰浴条件下用冰浴的无血清培养液稀释至 300 μg/L, 每个 transwell 小室加入 100 μL 稀释后的基质胶, 于 37 °C 孵育 1 h 后, 将残留的培养液吸出; 将二甲双胍处理培养 48 h 后的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞经胰酶消化, 收集细胞后, 用含 1% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞并计数, 调整细胞浓度为 1×10<sup>5</sup>/L, 向 24 孔板中的 Transwell 小室内分别加入 200 μL 细胞悬液, 加入 500 μL 含

15% FBS 的 DMEM 培养基, 将 24 孔板放置培养箱培养 48 h; 取出小室, 弃培养液后, 将小室置于含 95% 乙醇的 24 孔板中固定 30 min, 0.1% 结晶紫室温染色 20 min, 用棉签刮去小室内的细胞和基质胶, 清水冲洗小室至水流没有颜色为止。在镜下观察并拍照, 每个小室随机取 3 个视野 (100 倍) 计数细胞; 计算不同浓度二甲双胍对宫颈癌细胞纵向迁移的抑制率。

迁移抑制率 = 1 - 药物组迁移细胞数 / 对照组迁移细胞数

### 2.6 二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞 GSTpi 和 TopIIα 基因表达的影响

取对数生长期的 SiHa、SiHa/cDDP 细胞经胰酶消化, 收集细胞并计数, 分别以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板内, 两种细胞分别设置一个对照组, SiHa/cDDP 细胞设置两个药物组, 置于培养箱培养。在培养 24、48、72 h 时, 弃培养基, 对照组使用正常培养基换液, 两个药物组分别使用含 2.5、10 mmol/L 二甲双胍的培养基进行换液。最后一次换液后继续培养 24 h, 胰酶消化并收集细胞, PBS 洗两遍后, 各取约  $1 \times 10^6$  个细胞按 RNA 抽提试剂盒说明书对细胞进行总 RNA 的抽提; 取 1 μg 总 RNA 按反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链; 以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参, 分别对 GSTpi、TopIIα 基因进行 qPCR 检测, 反应条件为 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 进行 40 个循环。按下列公式计算不同浓度二甲双胍对宫颈癌细胞 GSTpi、TopIIα 基因水平表达的影响。

$$\begin{aligned} \text{mRNA Fold} &= 2^n \\ n &= -(\Delta\Delta\text{Ct}) \\ \Delta\Delta\text{Ct} &= \Delta\text{Ct}(\text{各组}) - \Delta\text{Ct}(\text{SiHa 对照组}) \\ \Delta\text{Ct} &= \text{Ct}(\text{GSTpi/TopII}\alpha) - \text{Ct}(\text{GAPDH}) \end{aligned}$$

### 2.7 统计学分析

使用 SPSS 19.0 统计分析软件对实验结果进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用非配对 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 顺铂对宫颈癌细胞的抑制作用

**3.1.1 抑制率** CCK8 结果显示, SiHa、SiHa/cDDP 细胞随着培养液中顺铂浓度的增加, 所受抑制作用也逐渐增强, 呈现浓度相关性。与对照组比较, SiHa 细胞在顺铂为 1.56 μg/L 时, 抑制率就有明显差异 ( $P < 0.05$ ), 而 SiHa/cDDP 细胞在顺铂为 12.5 μg/L 时才有明显差异; 相同顺铂浓度下, SiHa/cDDP 细胞受顺铂的抑制作用均明显低于 SiHa 细胞 ( $P <$

0.01), 不同浓度顺铂对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率见表 1。

表 1 不同浓度顺铂对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Inhibition rate of SiHa and SiHa/cDDP cells treated with different concentration of cDDP ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(μg·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	
		SiHa	SiHa/cDDP
对照	—	0	0
cDDP	1.56	29.13 ± 5.35*	-0.83 ± 1.17 <sup>▲▲</sup>
	3.13	57.06 ± 4.08**	2.61 ± 1.55 <sup>▲▲</sup>
	6.25	78.47 ± 2.15**	1.46 ± 0.98 <sup>▲▲</sup>
	12.50	89.38 ± 2.54***	3.89 ± 1.57 <sup>▲▲</sup>
	25.00	97.08 ± 0.64***	18.46 ± 1.48 <sup>▲▲</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与同一剂量下 SiHa 细胞比较: <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs SiHa cell in the same dosage

**3.1.2 倍增时间** SiHa、SiHa/cDDP 细胞的生长曲线见图 1, 根据 Patterson 公式计算得 SiHa、SiHa/cDDP 细胞群体倍增时间分别为 ( $30.69 \pm 0.58$ )、( $38.39 \pm 1.05$ ) h, 耐药细胞株 SiHa/cDDP 的生长速度明显减慢 ( $P < 0.001$ )。

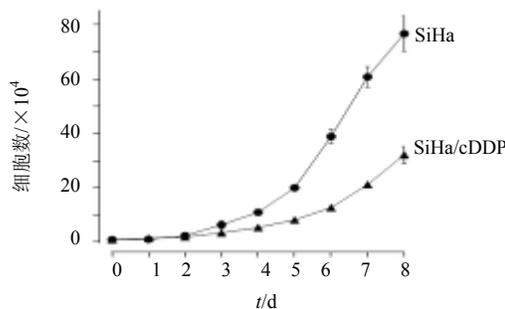


图 1 SiHa、SiHa/cDDP 细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of SiHa and SiHa/cDDP cell lines

### 3.2 顺铂对宫颈癌细胞形态的影响

SiHa、SiHa/cDDP 细胞在含有 3 μg/L 顺铂的培养基中培养, 细胞形态见图 2。培养 2 d 时, SiHa 细胞较 SiHa/cDDP 细胞贴壁较好, 数量更多, 细胞形状也更规则; 培养 4 d 时, SiHa/cDDP 细胞的整体状态反而比 SiHa 细胞更好, SiHa 细胞数量变少; 培养 6 d 时, SiHa 细胞已死亡大部分, 个别存活的细胞体积变大, 出现带“触角”形状的细胞, 而 SiHa/cDDP 长势更好。

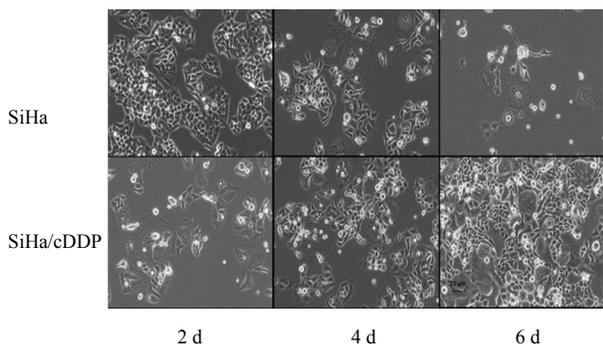


图 2 顺铂对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞形态的影响

Fig. 2 Effects of cDDP on morphology of SiHa and SiHa/cDDP cell lines

### 3.3 二甲双胍对宫颈癌细胞的抑制作用

CCK8 结果显示, SiHa、SiHa/cDDP 细胞随着培养液中二甲双胍浓度的增加, 所受抑制作用也逐渐增强, 呈现浓度相关性, 见表 2。与对照组比较, SiHa 细胞在二甲双胍为 0.63 mmol/L 时, 抑制率开始有明显差异 ( $P < 0.05$ ), 而 SiHa/cDDP 细胞在二甲双胍为 0.31 mmol/L 时就有明显差异; 不同二甲双胍浓度下, SiHa/cDDP 细胞受二甲双胍的抑制作用均明显高于 SiHa 细胞 ( $P < 0.01$ )。结果表明 SiHa/cDDP 比 SiHa 对二甲双胍更加敏感。

表 2 不同浓度二甲双胍对 SiHa 和 SiHa/cDDP 细胞的抑制率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Inhibition rate of SiHa and SiHa/cDDP cells treated with different concentration of metformin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mmol·L <sup>-1</sup> )	抑制率/%	
		SiHa	SiHa/cDDP
对照	—	0	0
二甲双胍	0.31	1.13 ± 0.66	20.20 ± 0.89 <sup>***</sup>
	0.63	5.74 ± 1.25 <sup>*</sup>	26.19 ± 3.17 <sup>***</sup>
	1.25	12.37 ± 1.79 <sup>*</sup>	44.64 ± 1.22 <sup>***</sup>
	2.50	22.62 ± 1.18 <sup>**</sup>	50.90 ± 3.30 <sup>***</sup>
	5.00	27.40 ± 1.36 <sup>**</sup>	60.14 ± 3.15 <sup>***</sup>
	10.00	39.19 ± 4.47 <sup>**</sup>	73.50 ± 2.33 <sup>***</sup>

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与同一剂量下 SiHa 细胞比较: <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs SiHa cell in the same dosage

### 3.4 二甲双胍对宫颈癌细胞侧向迁移的影响

迁移实验结果显示, 相比于 0、48 h 后 SiHa 细胞、SiHa/cDDP 细胞的对照组有明显的愈合, 二甲双

胍 2.5、10 mmol/L 组的细胞愈合程度依次减弱; 且 SiHa/cDDP 细胞的愈合能力均比 SiHa 细胞对应组的要低, 见图 3。定量分析结果显示, 两株细胞愈合能力 (迁移率) 随二甲双胍浓度增加而降低, 与各自的对照组相比, 均有明显差异 ( $P < 0.01$ ); 迁移抑制率的计算结果显示, SiHa/cDDP 细胞比 SiHa 细胞在 2.5、10 mmol/L 二甲双胍的作用下所受到的抑制作用均更加明显 ( $P < 0.01$ 、0.05), 见表 3。结果表明 SiHa/cDDP 比 SiHa 对二甲双胍更加敏感。

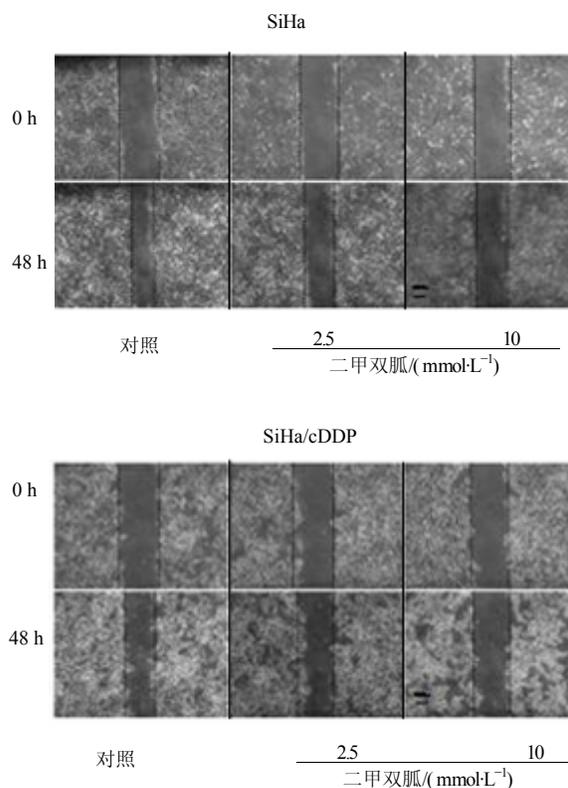


图 3 二甲双胍对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞侧向迁移能力的影响

Fig. 3 Effects of metformin on lateral migration of SiHa and SiHa/cDDP cell lines

### 3.5 二甲双胍对宫颈癌细胞纵向迁移的影响

Transwell 侵袭实验结果显示 SiHa 细胞、SiHa/cDDP 细胞在 2.5、10 mmol/L 二甲双胍的作用下, 穿膜细胞数逐渐减少, 见图 4; 定量分析显示, 两株细胞在 2.5、10 mmol/L 二甲双胍的作用下穿膜细胞数与各组的对照组相比, 均有明显差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 4。侵袭抑制率的计算结果显示, SiHa/cDDP 细胞比 SiHa 细胞在 2.5、10 mmol/L 二甲双胍的作用下所受到的抑制作用均更加明显 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

表 3 二甲双胍对宫颈癌细胞侧向迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of metformin on lateral migration of SiHa and SiHa/cDDP cell lines ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mmol·L <sup>-1</sup> )	SiHa		SiHa/cDDP	
		迁移率/%	迁移抑制率/%	迁移率/%	迁移抑制率/%
对照	—	41.24 ± 2.98	0	19.64 ± 1.27	0
二甲双胍	2.5	23.47 ± 1.41**	43.09 ± 3.42	7.72 ± 0.79**	60.67 ± 4.02 <sup>▲▲</sup>
	10	16.69 ± 0.24**	59.52 ± 0.60	4.19 ± 1.09**	78.68 ± 5.53 <sup>▲</sup>

与对照组比较: \*\*P<0.01; 与同一剂量下 SiHa 细胞比较: <sup>▲</sup>P<0.05 <sup>▲▲</sup>P<0.01

\*\*P<0.01 vs control group; <sup>▲</sup>P<0.05 <sup>▲▲</sup>P<0.01 vs SiHa cell in the same dosage

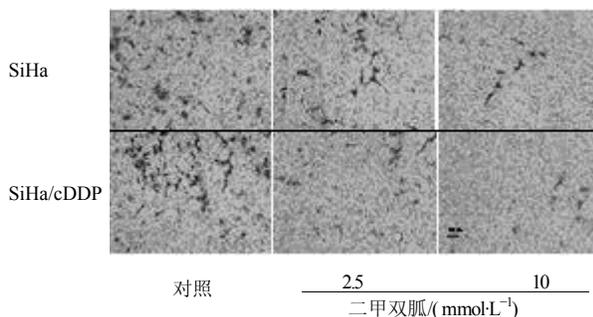


图 4 二甲双胍对 SiHa、SiHa/cDDP 细胞侧向迁移能力的影响  
Fig. 4 Effects of metformin on lateral migration of SiHa and SiHa/cDDP cell lines

### 3.6 二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞 GSTpi 和 TopIIα 基因表达的影响

RT-qPCR 结果显示, 相比于 SiHa 细胞, SiHa/cDDP 细胞中 GSTpi mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.01$ )、TopIIα mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); SiHa/cDDP 细胞经二甲双胍作用后, GSTpi、TopIIα mRNA 的表达与 SiHa/cDDP 对照组相比均不同程度地降低, 10 mmol/L 二甲双胍处理组的降低水平均有明显差异 ( $P < 0.05$ )。二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞 GSTpi 和 TopIIα 基因表达的影响见表 5。

表 4 二甲双胍对宫颈癌细胞纵向迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effects of metformin on longitudinal migration of SiHa and SiHa/cDDP cell lines ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mmol·L <sup>-1</sup> )	SiHa		SiHa/cDDP	
		穿膜细胞数	侵袭抑制率/%	穿膜细胞数	侵袭抑制率/%
对照	—	70.00 ± 2.65	0	64.67 ± 5.03	0
二甲双胍	2.5	25.67 ± 2.08**	63.33 ± 0.03	17.00 ± 2.00**	73.71 ± 0.03 <sup>▲</sup>
	10	9.00 ± 1.00**	87.14 ± 0.01	3.67 ± 1.15**	94.33 ± 0.02 <sup>▲</sup>

与对照组比较: \*\*P<0.01; 与同一剂量下 SiHa 细胞比较: <sup>▲</sup>P<0.05

\*\*P<0.01 vs control group; <sup>▲</sup>P<0.05 vs SiHa cell in the same dosage

表 5 二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞 GSTpi 和 TopIIα 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effects of metformin on mRNA expression for GSTpi and TopIIα in SiHa/cDDP cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(mmol·L <sup>-1</sup> )	GSTpi	TopIIα
SiHa	—	1.02 ± 0.26	1.02 ± 0.25
SiHa/cDDP	—	17.21 ± 5.08**	5.31 ± 1.69*
二甲双胍	2.5	9.59 ± 2.11	4.43 ± 1.05
	10	6.89 ± 1.29 <sup>▲</sup>	2.25 ± 0.35 <sup>▲</sup>

与 SiHa 细胞比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01; 与 SiHa/cDDP 细胞比较:

<sup>▲</sup>P<0.05

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs SiHa cell; <sup>▲</sup>P<0.05 vs SiHa/cDDP cell

## 4 讨论

宫颈癌是全球妇女中仅次于乳腺癌的常见恶性肿瘤, 其死亡率为妇女恶性肿瘤之首, 其侵袭转移是患者治疗失败和死亡的主要原因之一。同时, 顺铂耐药也是临床上宫颈癌在药物治疗过程中经常遇到的难题。研究表明顺铂耐药机制涉及到多种因素, 包括药物摄取减少, 药物外流增加, 细胞内谷胱甘肽 (GSH) 增加等<sup>[18]</sup>。针对其作用机制, 有研究显示可以通过药物干预来反转或抵抗顺铂耐药, 如去甲基化试剂 5-aza-CdR 通过抑制 DNA 甲基转移酶, 从而随着 DNA 的拓扑学变化协同增加了 cDDP 的抗肿瘤作用<sup>[19]</sup>。二甲双胍对肿瘤细胞的干预作用<sup>[8-9]</sup>

以及放射增敏作用<sup>[12]</sup>提示其可能对耐药细胞保持着敏感性,那么二甲双胍对耐药的宫颈癌是否也保持着敏感性值得探究。按常规的药物浓度梯度诱导法<sup>[17]</sup>,本研究成功建立了宫颈癌细胞系 SiHa/cDDP,为深入研究宫颈癌顺铂耐药机制和筛选耐药逆转剂提供了实验材料。

肿瘤细胞的群体倍增时间反映了细胞的增殖速度。研究认为肿瘤细胞的增殖速度越快,对化疗越敏感,反之,肿瘤细胞的增殖速度越慢,对化疗的敏感性就越低<sup>[20]</sup>。本研究中,耐药细胞系 SiHa/cDDP 较亲代细胞 SiHa,群体倍增时间延长,表示其对顺铂的敏感性下降。那么耐药细胞对二甲双胍的敏感性如何,本研究通过测定二甲双胍对 SiHa 细胞、SiHa/cDDP 细胞作用 48 h 后发现,对 cDDP 耐药的 SiHa/cDDP 细胞,对二甲双胍并不耐药,而是比其亲代细胞 (SiHa) 更加敏感。既然如此,本研究采用了经典的划痕实验和侵袭实验来进一步探讨耐药细胞 SiHa/cDDP 与其亲代细胞 SiHa 在二甲双胍的作用下,其迁移能力和侵袭能力所受到的影响,结果一致地表明,顺铂耐药细胞系 SiHa/cDDP 的侧向迁移能力、纵向迁移能力受二甲双胍的影响均比其亲代细胞 SiHa 更加明显,表明耐药细胞对二甲双胍更加敏感。随后,从耐药相关基因的表达水平来分析耐药细胞受二甲双胍的影响。

GSTpi 催化 GSH 的巯基和多种体内外来源的亲电化合物结合,形成极性较大的复合物,这些复合物可以被多药耐药蛋白和 P-糖蛋白等泵出体外,从而实现它的解毒作用。但同时,大多数化疗药物也可被 GSTpi 催化和 GSH 结合形成 GSH-药物复合物,同样易被上述多药耐药相关蛋白泵出体外,使抗肿瘤药物在体内作用时间变短,不能有效发挥作用,导致临床上发生严重的肿瘤细胞多药耐药(代谢性耐药)<sup>[21]</sup>。2018 年发表的 1 篇报道表明, GSTpi 在宫颈癌细胞的调控和进展中起着至关重要的作用,二者在宫颈癌肿瘤进展中均被上调,通过 NF- $\kappa$ B 和 MAP 激酶途径参与细胞维持、细胞存活和细胞应激反应,当敲除 GSTpi 基因时,细胞的凋亡逃逸受到抑制,肿瘤细胞的增殖明显减少,该研究认为 GSTpi 是治疗宫颈癌的新生物标志物和潜在治疗靶点<sup>[22]</sup>。本研究中,二甲双胍抑制宫颈癌细胞 SiHa/cDDP 增殖且下调 GSTpi,但其机制尚不明确,还需要进行更深入的研究。

TopII $\alpha$  蛋白在肿瘤的耐药中起到非常重要的作

用,它调节染色体的聚合与染色单体的分离,其表达水平的变化与耐药性的发生有关<sup>[23]</sup>。本研究中,TopII $\alpha$  mRNA 在 SiHa/cDDP 细胞中的表达比在 SiHa 细胞的要高,表明 SiHa 细胞对顺铂耐药后,TopII $\alpha$  被上调,而当 SiHa/cDDP 细胞在受到二甲双胍作用后,TopII $\alpha$  mRNA 的表达下降,这与 SiHa 受顺铂作用的结果刚好相反,也解释了二甲双胍对 SiHa/cDDP 细胞比对 SiHa 更加敏感的原因。Kaplan 等<sup>[24]</sup>报道了 TopII $\alpha$ 、MSH 2 和 MLH 1 表达水平的降低可能在乳腺癌对依托泊苷的化疗耐药发生中起重要作用,这里是 TopII $\alpha$  的降低与乳腺癌对依托泊苷耐药的发生有关,与本研究中 TopII $\alpha$  的降低与二甲双胍对顺铂耐药性宫颈癌细胞逆耐药的结果似乎是相反的,提示二甲双胍在不同肿瘤细胞中对不同药物耐药机制的影响可能不同,或 TopII $\alpha$  在不同肿瘤细胞中对于不同药物耐药的变化不同,这些研究都非常具有挑战性,需要进一步深入。

综上所述,二甲双胍对顺铂耐药的宫颈癌细胞 SiHa/cDDP 比对其亲代细胞 SiHa 更加敏感,这为二甲双胍治疗顺铂耐药的宫颈癌提供了实验依据。

#### 参考文献

- [1] Ager B J, Gallardo-Rincón D, de León D C, *et al*. Advancing clinical research globally: Cervical cancer research network from Mexico [J]. *Gynecol Oncol Rep*, 2018, 25: 90-93.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7265-7279.
- [4] Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs [J]. *Drug Resist Updat*, 2005, 8(3): 131-146.
- [5] Bailey C J, Turner R C. Metformin [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(9): 574-579.
- [6] Muszynska-Oglaza A, Zarzycka-Lindner G, Olejniczak H, *et al*. Use of metformin is associated with lower incidence of cancer in patients with type 2 diabetes [J]. *Endokrynol Pol*, 2017, 68(6): 652-658.
- [7] Kim H J, Lee S, Chun K H, *et al*. Metformin reduces the risk of cancer in patients with type 2 diabetes: an analysis based on the Korean National Diabetes Program Cohort [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(8): e0036.
- [8] Stambolic V, Woodgett J R, Fantus I G, *et al*. Utility of

- metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor? [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 114(2): 387-389.
- [9] Hadad S M, Appleyard V, Thompson A M. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 114(2): 391.
- [10] Cai X, Hu X, Cai B, *et al.* Metformin suppresses hepatocellular carcinoma cell growth through induction of cell cycle G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase arrest and p21CIP and p27KIP expression and downregulation of cyclin D1 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5): 2449-2457.
- [11] Jeong Y K, Kim M S, Lee J Y, *et al.* Metformin radiosensitizes p53-deficient colorectal cancer cells through induction of G2/M arrest and inhibition of DNA repair proteins [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143596.
- [12] Song C W, Lee H, Dings R P, *et al.* Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 362.
- [13] Xia C, Chen R, Chen J, *et al.* Combining metformin and nelfinavir exhibits synergistic effects against the growth of human cervical cancer cells and xenograft in nude mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43373.
- [14] Xia C, Liang S, He Z, *et al.* Metformin, a first-line drug for type 2 diabetes mellitus, disrupts the MALAT1/miR-142-3p sponge to decrease invasion and migration in cervical cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 830: 59-67.
- [15] 严泉剑, 郭金龙, 刘恩靖, 等. 绘制细胞生长曲线及细胞群体倍增时间的简化计算 [J]. *前卫医药杂志*, 2000, 17(4): 228-229.
- [16] 陈新莲, 王 和, 张雪梅, 等. 人宫颈癌顺铂耐药细胞系 SiHa/cDDP 的建立 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2012, 43(2): 151-155.
- [17] 林 雯, 李德锐, 王鸿彪, 等. 人鼻咽癌顺铂耐药细胞系建立及其与凋亡关系的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(8): 572-575.
- [18] Bai T, Tanaka T, Yukawa K, *et al.* A novel mechanism for acquired cisplatin-resistance: suppressed translation of death-associated protein kinase mRNA is insensitive to 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin in cisplatin-resistant cervical squamous cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(2): 497-508.
- [19] Ellerhorst J A, Frost P, Abbruzzese J L, *et al.* 2'-deoxy-5-azacytidine increases binding of cisplatin to DNA by a mechanism independent of DNA hypomethylation [J]. *Br J Cancer*, 1993, 67(2): 209-215.
- [20] 潘洪明, 费洪新, 杜静平, 等. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(18): 2009-2013.
- [21] Tew K D, Manevich Y, Grek C, *et al.* The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(2): 299-313.
- [22] Checa-Rojas A, Delgadillo-Silva L F, Velasco-Herrera M D C, *et al.* GSTM3 and GSTP1: novel players driving tumor progression in cervical cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(31): 21696-21714.
- [23] Wang T L, Song Y Q, Ren Y W, *et al.* Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) polymorphism predicts prognosis of inoperable non-small cell lung cancer after chemoradiotherapy [J]. *Clin Lab*, 2016, 62(3): 301-310.
- [24] Kaplan E, Gunduz U. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(1): 29-35.