

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.008

二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 增殖的影响 *

马玉龙 李 红[△] 周雪琴 王刘倩 王 敏

(陆军军医大学附属新桥医院耳鼻喉科 重庆 404100)

摘要 目的: 探讨二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 增殖的影响。**方法:** 分别给予鼻咽癌细胞 CNE-1 二甲双胍(5 mM)、2Gy 放射线照射、二甲双胍(5 mM)联合 2Gy 放射线照射处理后,采用 MTT 实验、克隆形成实验检测和比较其细胞增殖抑制率和克隆形成抑制率。**结果:** MTT 实验结果显示:与二甲双胍组或 2Gy 放射线照射组相比,二甲双胍联合放射线照射组细胞增殖抑制率显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);克隆形成实验结果显示,与二甲双胍组或 2Gy 放射线照射组相比,二甲双胍联合放射线照射组细胞克隆形成抑制率显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 二甲双胍联合放射线照射能够有效的抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 的增殖。

关键词: 二甲双胍;放射线照射;鼻咽癌细胞;细胞增殖

中图分类号:R-33;R739.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)05-839-04

Effects of Metformin combined with Radiation Exposure on the Proliferation of Nasopharyngeal Carcinoma Cells CNE-1 *

MA Yu-long, LI Hong[△], ZHOU Xue-qin, WANG Liu-qian, WANG Min

(Department of Otolaryngology of Xinqiao Hospital, Army Military Medical University, Chongqing, 404100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of metformin combined with radiation exposure on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1. **Methods:** CNE-1 cell was treated with metformin (5 mM), 2Gy radiation exposure, metformin (5 mM) combined with 2Gy radiation exposure, respectively. MTT and clone formation assays were used to detect the cell proliferation inhibition rate and clone formation inhibition rate. **Results:** MTT assay showed that compared with metformin or 2Gy radiation exposure, the cell proliferation inhibition rate of metformin combined with radiation exposure was significantly increased ($P<0.05$). The clone formation assay showed that compared with metformin or 2Gy radiation exposure, the cell clone formation inhibition rate of metformin combined with radiation exposure was significantly increased($P<0.05$). **Conclusion:** Metformin combined with radiation exposure could effectively inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1.

Key words: Metformin; Radiation exposure; Nasopharyngeal carcinoma cells; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-839-04

前言

鼻咽癌是头颈部恶性肿瘤之一,全球约有百分之八十的鼻咽癌发生在我国广东、广西、湖南和东南亚地区^[1]。由于鼻咽癌发病隐匿,早期症状不明显,很多患者就诊时已到中晚期,临床治疗效果较差^[2]。目前,放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,放疗同时结合化疗或手术能有效的提高鼻咽癌患者预后。遗憾的是,放射治疗后鼻咽癌仍有约三分之一的患者出现局部复发,而且很多初始治疗患者存在放射治疗抵抗,这些都是鼻咽癌治疗中面临的难题^[3]。寻找到增加放射治疗敏感性的治疗策略对鼻咽癌的临床治疗有重要意义。

二甲双胍是一种传统的降糖药物,主要用于 2 型糖尿病的治疗,现已发现二甲双胍可通过 AMPK/mTOR 信号通路抑制肿瘤细胞的生长^[4],且多项临床试验报道二甲双胍可以降低多

种肿瘤的发生风险^[5,6]。也有实验研究显示二甲双胍可以增加乳腺癌内分泌治疗药物他莫西芬的疗效^[7]。那么,二甲双胍是否能够在肿瘤放射治疗中发挥作用,尤其是增加放射治疗敏感性,目前尚不完全清楚。因此,本研究以鼻咽癌细胞为研究对象,观察二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系、主要试剂和仪器

鼻咽癌 CNE-1 细胞系源自于中科院上海细胞库,由陆军军医大学附属新桥医院实验中心保存。CNE-1 细胞使用 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清)在 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。二甲双胍(1,1-dimethylbiguanide hydrochloride)、MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)及 Giemsa 染液均购于 Sigma 公司。直线加速器购自德国 Siemens 公司,型号为

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30672299)

作者简介:马玉龙(1984-),男,大学本科,主治医师,电话:023-68774527, E-mail: mayulong928@163.com

△ 通讯作者:李红(1968-),男,博士,副主任医师,主要研究方向:鼻咽部恶性肿瘤的诊疗,电话:023-68774527, E-mail: xqleehong@163.com

(收稿日期:2017-11-05 接受日期:2017-11-30)

Primus。

1.2 放射线照射处理

将正常生长的鼻咽癌 CNE-1 细胞进行直线加速器单剂量 2Gy 照射,剂量率为 266 ccGy/min,细胞距照射源 100 cm,同时保证细胞培养液深度为 0.5 cm。

1.3 MTT 实验

将正常生长的鼻咽癌 CNE-1 细胞传代后接种于 96 孔细胞培养板,每孔细胞数为 2×10^3 个,培养过夜待细胞贴壁正常生长后,分别给予不同浓度的二甲双胍(0、1、5、10 和 20 mM)处理,于第 1、2、3 和 4 天检测细胞增殖情况。另外,同样将细胞接种于 96 孔板贴壁生长后,给予二甲双胍(5 mM)、2Gy 放射线照射和二甲双胍(5 mM)联合 2Gy 放射线照射处理,于 2 天后检测细胞增殖情况。将 MTT 配置浓度为 5 mg/mL,每孔加入 20 μ L 后继续培养 4 h,之后弃培养液,每孔加入 150 μ L 的 DM-SO,在酶标仪上振荡约 5 min,490 nm 检测吸光度(OD)值,绘制细胞生长曲线。每组 3 复孔,并重复 3 次。

1.4 克隆形成实验

将正常生长的鼻咽癌 CNE-1 细胞传代后接种于 6 孔板中,每孔细胞数为 1×10^3 个,培养过夜后分别给予二甲双胍(5 mM)、2 Gy 放射线照射和二甲双胍(5 mM)联合 2 Gy 放射线照射处理,照射后静置培养 14 天,每隔 3 天更换 1 次含二甲双胍的培养液,直至培养皿中出现肉眼可见的细胞克隆。弃掉培养皿中的培养液,用 PBS 将死亡细胞碎片轻轻冲洗干净,每个培养皿中加入 20%的甲醇进行固定约 15-20 min,再用 PBS 清洗后加入 Giemsa 染液染色约 30-40 min,用自来水慢慢冲洗染液,冲洗干净后室温干燥后拍照计数并计算克隆形成抑制率。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞增殖的抑制影响

将不同浓度的二甲双胍(0、1、5、10 和 20 mM)处理鼻咽癌细胞 CNE-1 不同时间(0、1、2、3 和 4 天),MTT 检测细胞增殖情况,如图 1 所示,随着作用时间的延长,CNE-1 细胞 OD490 值升高变缓;随着作用浓度的升高,CNE-1 细胞 OD490 值显著降低,提示二甲双胍能够抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 的增殖。

2.2 二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞增殖的影响

如图 2 所示,二甲双胍单药组 CNE-1 细胞增殖抑制率为 $38.0 \pm 2.9\%$,2Gy 放射线照射组细胞增殖抑制率为 $46.3 \pm 4.9\%$,二甲双胍联合放射线照射组细胞增殖抑制率为 $75.7 \pm 4.4\%$ 。与二甲双胍单药组相比,联合组细胞增殖抑制率明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 2Gy 放射线照射组相比,联合组细胞增殖抑制率明显增高,差异具有统计学意义($\#P < 0.05$)。

2.3 二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞克隆形成的影响

如图 3 所示,二甲双胍单药组细胞克隆形成抑制率为 $50.0 \pm 3.1\%$,2Gy 放射线照射组细胞克隆形成抑制率为 $61.0 \pm$

2.9%,二甲双胍联合放射线照射组细胞克隆形成抑制率为 $92.7 \pm 2.3\%$ 。与二甲双胍单药组相比,联合组细胞克隆形成抑制率明显增高,具有统计学差异($P < 0.05$);与 2Gy 放射线照射组相比,联合组细胞克隆形成抑制率明显增高,具有统计学差异($\#P < 0.05$)。

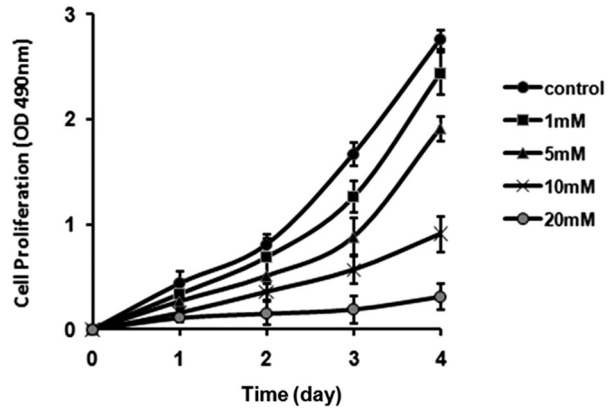


图 1 MTT 检测二甲双胍对鼻咽癌细胞 CNE-1 增殖的抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of metformin on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1 detected by MTT

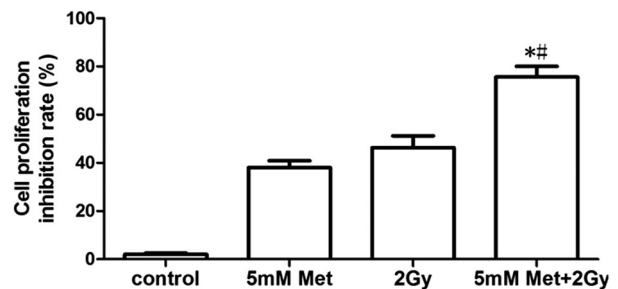


图 2 MTT 检测二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 增殖的抑制作用

Fig.2 The inhibitory effect of metformin and radiation exposure on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1 detected by MTT

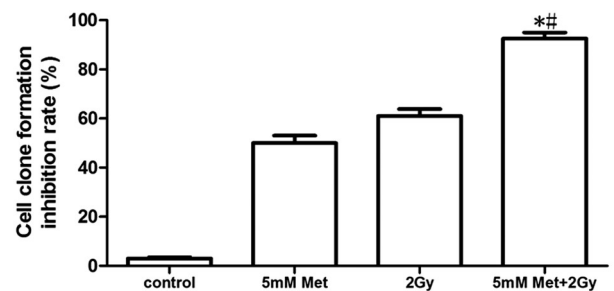


图 3 克隆形成实验检测二甲双胍联合放射线照射对鼻咽癌细胞 CNE-1 克隆形成的抑制作用

Fig.3 The inhibitory effect of metformin and radiation exposure on the cell clone formation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1

3 讨论

放射治疗是目前鼻咽癌治疗的主要手段,大部分鼻咽癌患者对放射治疗敏感,早期鼻咽癌患者在经过手术、放疗、化疗后疾病能接近治愈,即使是晚期鼻咽癌患者通过放射治疗也能将病情较好的控制^[8-12]。尽管如此,放射治疗后鼻咽癌仍有约三分之一的患者出现局部复发,而且很多初始治疗患者存在放射治疗抵抗^[11,13-15]。因此,研究鼻咽癌放射治疗抵抗机制和增敏策略

有着重要的意义。

二甲双胍被广泛用于2型糖尿病的治疗,可以降低胰岛素抵抗和糖尿病相关死亡事件的发生^[16]。研究显示2型糖尿病不仅可以增加肿瘤发生风险,而且增加肿瘤相关死亡率^[17-19]。这种肿瘤风险的增加可能源于胰岛素样生长因子(IGF)信号通路的激活^[20]。因此,通过二甲双胍逆转这些信号通路的活化、抑制肿瘤的发生是一种有意义的抗肿瘤策略。目前,对于二甲双胍的抗肿瘤作用和机制有越来越多的研究,现已证实二甲双胍能够通过激活AMPK、抑制mTOR/p70S6信号通路进而抑制肿瘤细胞的生长^[17-19];通过降低肿瘤干细胞干性从而抑制肿瘤的演进。此外,二甲双胍可以显著下调干细胞转录因子KLF5表达,而KLF5过表达可以部分阻止二甲双胍对三阴性乳腺癌干细胞的抑制,体内成瘤实验发现在三阴性乳腺癌细胞系中敲低KLF5可显著降低体内成瘤,表明二甲双胍部分通过下调KLF5抑制三阴性乳腺癌干细胞^[21]。二甲双胍也可以通过调节肿瘤相关microRNA的表达间接影响肿瘤相关蛋白的表达,最终抑制肿瘤发生^[22-25]。不仅如此,二甲双胍还能够协同他莫西芬、阿霉素等药物有效的抑制乳腺癌细胞增殖、促进凋亡发生^[7,26]。实验研究显示二甲双胍能够提高小鼠肿瘤模型的肿瘤氧合并提高放疗的敏感性^[27];二甲双胍也通过DNA修复机制增加肺癌细胞对放疗的敏感性^[28]。

在本研究中,鼻咽癌细胞增殖率随着二甲双胍浓度的增加逐渐降低,提示二甲双胍能够抑制鼻咽癌细胞的增殖。当较低浓度的二甲双胍与放射线照射联合使用时,鼻咽癌细胞的增殖和克隆形成能力明显受到了抑制,细胞增殖抑制率达到约75.7%,细胞克隆形成抑制率达到93%,这说明二甲双胍能够增加鼻咽癌细胞对放射线照射的敏感性,二甲双胍联合放射线治疗有效的造成肿瘤细胞的杀伤可能作为临床治疗鼻咽癌的一种新的模式。CNE-1细胞为高分化鼻咽癌细胞系,该细胞分化程度较高,对放疗治疗不敏感。本研究之所以选择该细胞为研究对象,主要是模拟临床上对放疗治疗不敏感的鼻咽癌患者,这些患者对放疗敏感性差,并不能很好的从放疗中获益。而二甲双胍可能会让这部分对放疗不敏感的患者变得敏感,提高临床治愈能力。目前研究表明放疗抵抗的发生主要由肿瘤缺氧、DNA修复机制失衡、细胞代谢相关信号的异常等等所致^[29,30],而二甲双胍可能在调节这些细胞事件中发挥作用,最终逆转放疗抵抗。

综上所述,二甲双胍联合放射线照射能够有效的抑制鼻咽癌细胞CNE-1的增殖,可能对鼻咽癌细胞放射线治疗起到一定的增敏作用,这种联合方式有望成为临床逆转鼻咽癌放疗抵抗的一种新模式。

参考文献(References)

- [1] Vlantis AC, Lee DL, Wong EW, et al. Endoscopic nasopharyngectomy in recurrent nasopharyngeal carcinoma: a case series, literature review, and pooled analysis [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2017, 7(4): 425-432
- [2] Niu ZJ, Li T, Liang ZG, et al. The Value of Tumor Diameter in Predicting Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Intensity-Modulated Radiotherapy[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 156(2): 305-311
- [3] BBY M, Hui EP, ATC C. Investigational drugs for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26(6): 677-685
- [4] Lee KH, Hsu EC, Guh JH, et al. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(45): 39247-39258
- [5] Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, et al. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(9): 1620-1625
- [6] Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2010, 3(9): 1077-1083
- [7] Ma J, Guo Y, Chen S, et al. Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 172
- [8] Lee V, Kwong D, Leung TW, et al. Palliative systemic therapy for recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma - How far have we achieved[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 114: 13-23
- [9] Echchikhi Y, Loughlimi H, Touil A, et al. Radiation-induced osteosarcoma of the skull base after radiation therapy in a patient with nasopharyngeal carcinoma: a case report and review of the literature[J]. *J Med Case Rep*, 2016, 10(1): 334
- [10] Chen X, Zhu X, Liang Z, et al. Long-term outcomes of neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (CCRT) vs CCRT alone for nasopharyngeal carcinoma in the era of intensity-modulated radiation therapy using propensity score matching method [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 2909-2921
- [11] Li PJ, Jin T, Luo DH, et al. Effect of Prolonged Radiotherapy Treatment Time on Survival Outcomes after Intensity-Modulated Radiation Therapy in Nasopharyngeal Carcinoma[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(10): e0141332
- [12] Zhang B, Mo Z, Du W, et al. Intensity-modulated radiation therapy versus 2D-RT or 3D-CRT for the treatment of nasopharyngeal carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(11): 1041-1046
- [13] Xu C, Zhang Y, Peng L, et al. Optimal Modality for Detecting Distant Metastasis in Primary Nasopharyngeal Carcinoma during Initial Staging: A Systemic Review and Meta-analysis of 1774 Patients[J]. *J Cancer*, 2017, 8(7): 1238-1248
- [14] Chan JY, To VS, Wong ST, et al. Radiation-induced squamous cell carcinoma of the nasopharynx after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Head Neck*, 2014, 36(6): 772-775
- [15] Sun Y, Zhou GQ, Qi ZY, et al. Radiation-induced temporal lobe injury after intensity modulated radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma patients: a dose-volume-outcome analysis [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 397
- [16] Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, et al. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review[J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(8): e71583
- [17] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients [J]. *BMJ*, 2005, 330(7503): 1304-1305
- [18] Ambe CM, Mahipal A, Fulp J, et al. Effect of Metformin Use on Sur-

- vival in Resectable Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience and Review of the Literature [J]. PLOS ONE, 2016,11 (3): e0151632
- [19] Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2010, 3(9): 1077-1083
- [20] Richardson AE, Hamilton N, Davis W, Brito C, et al. Insulin-like growth factor-2 (IGF-2) activates estrogen receptor-alpha and -beta via the IGF-1 and the insulin receptors in breast cancer cells [J]. Growth Factors, 2011, 29(2-3): 82-93
- [21] Shi P, Liu W, Tala, et al. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation [J]. Cell Discov, 2017, 3: 17010
- [22] Pulito C, Mori F, Sacconi A, et al. Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities [J]. Cell Discov, 2017, 3: 17022
- [23] Arunachalam G, Lakshmanan AP, Samuel SM, et al. Molecular Interplay between microRNA-34a and Sirtuin1 in Hyperglycemia-Mediated Impaired Angiogenesis in Endothelial Cells: Effects of Metformin [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2016, 356(2): 314-323
- [24] Noren HN, Martin-Montalvo A, Dluzen DF, et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence[J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 572-581
- [25] Wang F, Xu J, Liu H, et al. Metformin induces apoptosis by microRNA-26a-mediated downregulation of myeloid cell leukaemia-1 in human oral cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4671-4676
- [26] Kabel AM, Omar MS, Balaha MF, et al. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model [J]. Tissue Cell, 2015, 47 (5): 498-505
- [27] Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK [J]. Br J Cancer, 2013, 108(10): 2021-2032
- [28] Li H, Chen X, Yu Y, et al. Metformin inhibits the growth of nasopharyngeal carcinoma cells and sensitizes the cells to radiation via inhibition of the DNA damage repair pathway [J]. Oncol Rep, 2014, 32(6): 2596-2604
- [29] Skinner HD, Giri U, Yang LP, et al. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11): 2713-2722
- [30] Wang M, Han J, Marcar L, et al. Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway[J]. Cancer Res, 2017, 77(8): 2018-2028

(上接第 857 页)

- [25] Redwood D, Asay ED, Sacco P, et al. Stool DNA Testing for Screen-Detection of Colorectal Neoplasia in Alaska Native People[J]. Mayo Clinic Proceedings, 2016, 91(1): 61-70
- [26] Berger BM, Levin B, Hilsden RJ. Multitarget stool DNA for colorectal cancer screening: A review and commentary on the United States Preventive Services Draft Guidelines [J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2016, 8(5): 450-458
- [27] Abbaszadegan MR, Velayati A, Tavasoli A, et al. Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of colon cancer[J]. Iranian Biomedical Journal, 2007, 11(3): 203-208
- [28] 刘雅文. 浅析 DNA 保存的研究进展[J]. 轻工科技, 2016(7): 12-13
Liu Ya-wen. Research Progress of DNA Preservation[J]. Light Industry Technology, 2016(7): 12-13
- [29] 李娜, 李迪强, 王秀磊, 等. 粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(5): 341-345
Li Na, Li Di-qiang, Wang Xiu-lei, et al. Effects of Different Preservation Methods on Extraction of Genomic DNA from Animals[J]. International Journal of Genetics, 2006, 29(5): 341-345
- [30] 刘艳华, 张明海. 马鹿粪便样品保存方法对 DNA 提取质量的影响[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(2): 67-69
Liu Yan-hua, Zhang Ming-hai. Effects of Preservation Methods on the Quality of DNA Extraction [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2006, 34(2): 67-69
- [31] 王勇, 邹秉杰, 刘云龙, 等. 不同粪便 DNA 提取试剂盒及样本储存时间对粪便人基因组 DNA 提取率的影响[J]. 临床误诊误治, 2014, 27 (4): 77-80
Wang Yong, Zou Bing-jie, Liu Yun-long, et al. Effects of different fecal DNA extraction kits and sample storage time on genomic DNA extraction rate of feces [J]. Clinical misdiagnosis and mistreatment, 2014, 27(4): 77-80
- [32] Kisiel JB, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal cancer: opportunities to improve value with next generation tests [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2011, 45(4): 301-308