

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.049

二甲双胍在 II 型糖尿病合并肝癌中的研究进展 *

李明程 宿华威[△] 彭战利 马 朕 任玉伟

(哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:多年来二甲双胍以其安全性高、价格低及疗效好的优点而广泛应用于临床治疗糖尿病。糖尿病增加了肝癌的罹患率并影响其预后。近年来研究发现二甲双胍在治疗 II 型糖尿病(T2MD)患者时亦降低了其罹患肝癌的风险,大量研究证明其具有抗癌及协同抗癌作用。现本文对二甲双胍在 II 型糖尿病患者中对肝癌发生的影响进行探讨,对二甲双胍抑制肿瘤的分子生物学机制进行了介绍,列举了最新的实验研究数据,并对现有临床数据进行分析,对于二甲双胍未来的研究方向提出了预期,对于二甲双胍未来在 II 型糖尿病患者中肝癌的预防作用进行了简要的总结及未来使用的展望,对于其在 II 型糖尿病合并肝癌的患者中的治疗作用进行了前瞻性的探讨,为二甲双胍在其他癌症防治中的应用提出了可能性。

关键词:肝癌;二甲双胍;II 型糖尿病;治疗

中图分类号:R587.2;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)27-5392-04

The Research Progress of Metformin in Type II Diabetes Mellitus with Liver Cancer*

LI Ming-cheng, SU Hua-wei[△], PENG Zhan-li, MA Zhen, REN Yu-wei

(Department of general surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT: As a safe, cheap and effective diabetes drug, metformin has been used for many years. Diabetes increases the risk of liver cancer and affects its prognosis. In recent years, it is found that metformin reduces the pancreatic cancer risk in the treatment of diabetic patients, a large of experiments also prove that it has anti-cancer and synergistic anticancer effect. This paper focused on the effects of metformin on treatment of II type diabetes, discussed the curative effect on liver cancer, suggested the molecular biology mechanism of inhibiting tumor, listed the latest experiment researches, analyzed the existed clinical data, proposed the further study of anticancer mechanism and clinical treatment. Metformin for a future role in prevention of hepatocellular carcinoma in patients with type II diabetes are briefly summarized and future prospects, which in type II diabetic patients with liver cancer in a prospective study of the effect of treatment. Metformin for application in other cancer prevention also raises possibilities.

Key words: Liver cancer; Metformin; Type 2 diabetes; Therapy

Chinese Library Classification(CLC): R587.2; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)27-5392-04

前言

近年来由于人口老龄化及现代生活方式的普及等原因,我国糖尿病患者数量激增并且以 T2MD 为主。因肥胖、胰岛素抵抗、代谢失衡等因素在 T2MD 患者中肝癌的发病率较健康人群增高,且研究发现肝癌患者 T2MD 患病率也明显增高^[1]。肝癌是一种恶性程度高、进展快、预后极差、病死率高、术后极易复发且对化疗不敏感的肿瘤,5 年存活率低于 40%^[2]。近年来糖尿病的治疗不断发展,手段不断丰富。目前二甲双胍是 T2MD 治疗的最常用药物之一。另外,二甲双胍已被证明可有效地预防非酒精性脂肪性肝病进展。无论是病例数据研究还是分子生物学基础研究都有越来越多的数据支持二甲双胍的使用与降低糖尿病患者患癌症风险相关联^[3]。二甲双胍应用于肿瘤化学预防的研究最早由 Evans 等于 2005 年提出,他的一项大型队

列研究^[4]表明二甲双胍的应用明显降低了 T2MD 患者的癌症患病率。Libby 团队^[5]和 Bowker 团队^[6]分别进行的前瞻性队列研究也均支持这一观点。这些研究的发表促进了对于二甲双胍在 T2MD 合并肝癌中的作用的进一步研究。

1 二甲双胍抗肝癌机制的研究

目前提出的二甲双胍抑制肝癌发生的机制主要包括以下几种^[7]:(1)通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)抑制哺乳动物的雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路;(2)通过 p53 相关或非相关的机制诱导了细胞凋亡;(3)通过负向调控缺氧诱导因子 1 α 和血管内皮生长因子抑制血管生长;(4)通过降低细胞周期蛋白 D1 的表达水平和视网膜母细胞瘤样蛋白磷酸化来阻断部分的细胞循环。

* 基金项目:教育部春晖计划项目(z201409);黑龙江省教育厅科研基金项目(12541358)

作者简介:李明程,男,硕士研究生,主要研究方向:外科学,E-mail: limc1002@live.com,电话:13100875121

[△] 通讯作者:宿华威,男,副主任医师,博士后,硕士生导师,E-mail: huawei97@msn.com,电话:13704806099

(收稿日期:2017-03-09 接受日期:2017-04-02)

1.1 二甲双胍在机体中的作用过程

二甲双胍的降糖作用源于对于肝细胞中糖异生和糖原分解的抑制作用^[9],并且通过降低血清葡萄糖,间接的下调了血液中胰岛素^[9]和胰岛素生长因子-1的含量^[10]。另外,二甲双胍在肝细胞中与线粒体电子传递链上的复合酶1的可逆结合引起了细胞的应激反应^[11]。这一反应导致了磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)的增加和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的产生减少,进而导致了与磷酸腺苷激酶(AMP kinase, AMPK)结合的AMP数量增加,而AMPK在正常细胞和肿瘤细胞中都是构象变化和激活的关键调节点。在缺氧和营养不良等条件下出现的细胞应激同样增加了AMP的数量。构象变化被AMPK激活后促进了肝激酶B1(liver kinase B1, LKB1),使AMPK磷酸化,反过来又促进了Tsc1/2基因的磷酸化。这一系列反应形成了对mTOR的负向调控^[14]。二甲双胍通过激活AMPK改善了胰岛素抵抗,进而阻止了肝细胞释放葡萄糖,促进骨骼肌吸收葡萄糖^[15]。二甲双胍还可能通过多种机制恢复了胰岛素敏感性,包括抑制游离脂肪酸形成限制了脂质储存,乙酰辅酶A羧化酶1(acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1),乙酰辅酶A羧化酶2(acetyl-CoA carboxylase2, ACC2)和HMG-CoA还原酶的AMPK抑制^[16]减少了脂肪酸合酶的表达,并激活了丙二酰辅酶A羧化酶^[17]。此外,AMPK通过对转录因子SREBP-1c的抑制作用进而抑制了脂肪酸合成^[18],该转录因子由于葡萄糖和胰岛素的过量引导^[19],在非酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者中可见升高。有趣的是二甲双胍在调节脂肪因子合成中也显现出了作用,这个其中就包括了肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素-6这两种脂肪因子,这个作用可以直接刺激AMPK从而增加了游离脂肪酸的 β -氧化^[20],进一步防止了肝脏脂肪堆积。张等研究^[21]表明二甲双胍通过减少环磷酸腺苷的产生对儿茶酚胺诱导的脂肪分解过程产生拮抗作用。

1.2 二甲双胍对PI3K/Akt/mTOR通路的影响

PI3K/Akt/mTOR通路的激活在恶性肿瘤中十分常见,这一通路参与了细胞周期进程、蛋白质合成、细胞生长和血管生成过程中下游信号效应分子的磷酸化。在对缺少二甲双胍作用的LKB1缺失小鼠试验中显示二甲双胍至少通过LKB1-AMPK依赖机制对mTOR通路产生了抑制作用^[22]。我们可以通过它的这个机制以及它的降低胰岛素效果解释它在细胞存活和代谢中的作用。胰岛素对细胞有促进有丝分裂和促进存活的作用,而在肿瘤细胞中胰岛素受体通常呈现高表达状态,这使得肿瘤细胞对胰岛素的刺激更敏感。最终,二甲双胍抑制了mTOR通路及其下游效应器^[23]。这些效应器中包括了eIF4E,而eIF4E通常以eIF4E-结合蛋白(eIF4E-binding proteins, 4E-BPs)的形式存在。当4E-BPs通过mTORC1磷酸化时便分离出eIF4E,这些eIF4E与其他蛋白分子结合开始翻译,这其中就包括了与肿瘤发生进程(尤其包括了细胞循环、血管生成和细胞凋亡过程)相关的蛋白质的mRNAs编码的翻译^[24]。mTORC1的其他效应器还包括了调控细胞周期的cyclin D1,控制核糖体产生的p70S6K $\Rightarrow$ phospho-S6,和调控脂质合成的SREBP,这些均于肿瘤的发生过程有密切的关系。

1.3 二甲双胍在肿瘤细胞生长中的负向调节

Weinberg和Hanahan对于二甲双胍对肿瘤的具体影响已经给出了解释^[25]。在肿瘤发生过程中细胞团的迅速生长很快造成了营养和氧的供应不足,快速生长的肿瘤被缺氧所阻碍。然而肿瘤细胞却有能力规避这些限制。在细胞在应激的条件下可能出现AMPK活性不足、mTOR途径被激活和不受控的细胞生长,二甲双胍作为AMPK的活化剂便起到了化学性预防的作用。血管生长在肿瘤细胞的生长和侵袭过程中起到至关重要的作用,有研究^[14]表明二甲双胍对于氧诱导因子1 α 、肿瘤坏死因子 α 、纤溶酶原激活剂抑制物-1和冯血管性假血友病因子的负向调节作用降低了血管内皮生长因子(VEGF)水平,最终抑制了血管生成。

1.4 二甲双胍在肿瘤发生过程中的抑制作用

二甲双胍通过p53依赖或独立的机制在诱导细胞凋亡过程中起到了作用,肿瘤抑制基因p53参与了DNA损伤修复和细胞周期调控。p53的激活在营养匮乏的条件下诱导了细胞的凋亡。p53调控细胞色素c氧化酶2(cytochrome c oxidase 2, SCO2)合成过程,允许线粒体进行有效的氧化磷酸化。在超过50%肿瘤中可见p53缺乏细胞,这些细胞中SCO2活动减少,而且在缺氧环境下细胞代谢处于监管放松状态^[10]。当这些细胞暴露于二甲双胍导致的能量危机时便由于节约能量机制的匮乏最终导致细胞凋亡。二甲双胍降低了细胞周期蛋白D1的表达,通过细胞增殖的剂量相关抑制作用部分阻止了细胞周期。因此二甲双胍在以上这些肿瘤发生过程中的关键点起到了抑制作用。

在体外实验数据^[26]中已经证实二甲双胍在HepG2型和Huh7型肝癌细胞增殖^[27]中有效的抑制作用。在几个肝癌细胞株中观察到细胞周期阻滞在G₀/G₁期^[28],这与G₁期细胞周期蛋白十分相关,尤其是细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白依赖性激酶4。体内试验^[11]中也已经证明了二甲双胍可能通过mTOR通路在细胞凋亡、细胞循环、细胞增殖过程中产生了影响。熊等^[29]在一项HepG2裸鼠细胞移植到裸鼠体内研究中证明200毫克/千克每日剂量的二甲双胍治疗导致肿瘤体积减少了40.8%。这项研究还显示二甲双胍抑制了mTOR下游的蛋白质合成机制、抑制了细胞增殖、诱导了细胞凋亡。在二乙基亚硝胺诱发肝癌小鼠模型中,二甲双胍被证明通过下调酯酶的表达下调了脂质含量^[30],此外这些酯酶通过异位表达释放了二甲双胍介导的生长抑制作用。

2 二甲双胍抗肝癌作用的临床数据

人口数据证明了二甲双胍在糖尿病人群中是一种有效的肝癌化学预防药物^[31,32]。在一项大样本量的病例对照研究^[33]中已经证明了二甲双胍有助于降低糖尿病患者患肝癌风险,而且糖尿病患者使用二甲双胍的时间每增加一年均可降低7%并发肝癌的概率。在一项meta分析^[34]中显示二甲双胍的使用在T2MD的患者中降低了约70%并发肝癌的风险。另一个meta分析^[35]共分析了334,307例T2MD患者数据,其中22,650名患者并发肝癌,结果表明二甲双胍的使用使肝癌发生率减少了50%。在另一项类似的meta分析^[36]中甚至表明二甲双胍比其他降糖药物降低肝癌发生率的效果更明显。虽然这些数据看起来很显然,但是我们要注意这些meta分析选取的都是观察性的

研究,为了确切证明二甲双胍是否有化学预防作用还需要高质量的随机实验研究。

目前关于已诊断肝癌的患者文献报道还比较少见^[37]。目前已经出现了对于已诊断肝癌患者的回顾性临床研究,虽然诊断前的二甲双胍使用时间数据是不可用的。关于二甲双胍在肝癌射频消融术(radiofrequency ablation, RFA)中的联合应用的前瞻性研究^[38]也已经开始尝试。在一项针对并发早期肝癌的糖尿病患者使用 RFA 联合二甲双胍治疗的一项前瞻性队列研究中显示:二甲双胍作为化疗辅助药物可降低患者死亡率。而磺脲类药物和胰岛素均没有达到二甲双胍相同效果。

鉴于偶有乳酸中毒的案例报道,临床上对于二甲双胍在肝硬化患者中的使用一直处于不确定状态。最近一项研究^[39]表明肝硬化患者可以安全的使用二甲双胍。此外二甲双胍可将肝硬化患者死亡率降低 57%,显著的延长了生存时间。因此在慢性肝病患者中使用二甲双胍作为肝癌的化学预防药物是十分合理的,但是在肝癌的治疗中作为辅助化疗药物的疗效尚难以确定。

3 总结

鉴于观察性研究的固有缺陷,我们对于现有的研究结果还应谨慎的看待。原因一是时间偏倚可能造成了二甲双胍对肝癌有效性的假象^[40],其中包括恒定时间偏倚和时间延迟偏倚。原因二是糖尿病患者为了调整血糖水平需要经常调整用药方案,那么其中如唑烷二酮、磺脲类药物和胰岛素等药物是否造成了对二甲双胍抗肝癌效果的高估呢?这一点我们尚不确定。部分患者同时使用了他汀类药物控制血脂,而有研究已经表明他汀类药物对于肝癌有一定的化学预防作用,这对于我们的观察结果可能也会造成影响。考虑到二甲双胍的使用成本较低、安全性好、降糖效果显著、有预防心血管疾病的作用^[41]等优点,其在 T2MD 患者中作为肝癌的预防性用药是值得推荐的。未来我们需要更有说服力的前瞻性随机试验来证实二甲双胍预防肝癌的效果,对于二甲双胍在肝癌治疗中的应用我们还需要更多的研究。

参考文献(References)

- [1] Gao Lin, Shan Dong. Analysis of the clinical features of type 2 diabetes mellitus complicated with malignant tumor [J]. Chinese Journal of diabetes, 2015, 23(10): 873-876
- [2] Fan Jia, Zhou Jian, Yang Xinrong. Precision medical surgical treatment of liver cancer in the age of [J]. Chinese Journal of digestive surgery, 2017, 16(1)
- [3] Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth[J]. Cancer Res, 2007, 67: 6745-6752
- [4] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. BMJ, 2005, 330: 1304-1305
- [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: 1620-1625
- [6] Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, et al. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure [J]. Diabetologia, 2010, 53: 1631-1637
- [7] Bhat A, Sebastiani G, Bhat M. Systematic review: preventive and therapeutic applications of metformin in liver disease [J]. World J Hepatol, 2015, 7: 1652-1659
- [8] Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Int J Mol Med, 2008, 21: 507-511
- [9] Pollak M. Potential applications for biguanides in oncology [J]. J Clin Invest, 2013, 123: 3693-3700
- [10] Li D. Metformin as an antitumor agent in cancer prevention and treatment[J]. J Diabetes, 2011, 3: 320-327
- [11] Pawasowska M, Markowska A. The influence of metformin in the etiology of selected cancers [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2012, 16: 223-229
- [12] Rosilio C, Ben-Sahra I, Bost F, et al. Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia [J]. Cancer Lett, 2014, 346: 188-196
- [13] Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9: 563-575
- [14] Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, et al. Metformin: taking away the candy for cancer?[J]. Eur J Cancer, 2010, 46: 2369-2380
- [15] Aljada A, Mousa SA. Metformin and neoplasia: implications and indications[J]. Pharmacol Ther, 2012, 133: 108-115
- [16] Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin[J]. Nat Med, 2013, 19: 1649-1654
- [17] Shaw RJ. Metformin trims fats to restore insulin sensitivity [J]. Nat Med, 2013, 19: 1570-1572
- [18] Li Y, Xu S, Mihaylova MM, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Cell Metab, 2011, 13: 376-388
- [19] Mazza A, Fruci B, Garinis GA, et al. The role of metformin in the management of NAFLD[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 716404
- [20] Huypens P, Quartier E, Pipeleers D, et al. Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 518: 90-95
- [21] Zhang S, Liu X, Brickman WJ, et al. Association of plasma leptin concentrations with adiposity measurements in rural Chinese adolescents[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94: 3497-3504
- [22] Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9: 563-575
- [23] Chen Jitao, Chen Liangcai, Jia Xiaoting, et al. low concentration of metformin on the morphology of hepatocellular mitochondria structure and function of [J]. Journal of practical medicine, 2016, 32 (6): 875-878
- [24] Bhat M, Sonenberg N, Gores GJ. The mTOR pathway in hepatic malignancies[J]. Hepatology 2013, 58: 810-818
- [25] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100: 57-70
- [26] Peng Xiaoren, Liu yan, Zou Dajin, et al. metformin on human hepatoma HepG2 cells and fatty acid synthase [J]. Journal of medical graduate, 2015, (4): 360-364

- [27] Qu Z, Zhang Y, Liao M, et al. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2012, 42: 922-933
- [28] Qu Z, Zhang Y, Liao M, et al. In vitro and in vivo antitumoral action of metformin on hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2012, 42: 922-933
- [29] Xiong Y, Lu QJ, Zhao J, et al. Metformin inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells by inducing apoptosis via mitochondrion-mediated pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 3275-3279
- [30] Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, et al. Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5: 544-552
- [31] Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies[J]. *Gut*, 2013, 62: 606-615
- [32] Hassan MM, Curley SA, Li D, et al. Association of diabetes duration and diabetes treatment with the risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2010, 116: 1938-1946
- [33] Zhang H, Gao C, Fang L, et al. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients: a meta-analysis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48: 78-87
- [34] Zhang ZJ, Zheng ZJ, Shi R, et al. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 2347-2353
- [35] Singh S, Singh PP, Singh AG, et al. Anti-diabetic medications and the risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108: 881-891
- [36] Lai SW, Chen PC, Liao KF, et al. Risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients and risk reduction associated with anti-diabetic therapy: a population-based cohort study [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107: 46-52
- [37] Bhat M, Chaiteerakij R, Harmsen WS, et al. Metformin does not improve survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 15750-15755
- [38] Chen TM, Lin CC, Huang PT, et al. Metformin associated with lower mortality in diabetic patients with early stage hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26: 858-865
- [39] Zhang X, Harmsen WS, Mettler TA, et al. Continuation of metformin use after a diagnosis of cirrhosis significantly improves survival of patients with diabetes[J]. *Hepatology*, 2014, 60: 2008-2016
- [40] Chaiteerakij R, Petersen GM, Bamlet WR, et al. Metformin use and survival of patients with pancreatic cancer: a cautionary lesson [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 63: 3511
- [41] Du rui, Lu Jieli, Bi Yufang, et al. antidiabetic medication and malignancy [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and metabolism*, 2016, 32 (3): 253-256

(上接第 5391 页)

- [21] Tanphaichitr N, Kongmanas K, Kruevaisayawan H, et al. Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition: roles of acrosomal proteins[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4): 574-582
- [22] Alzayady KJ, Wang L, Chandrasekhar R, et al. Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca^{2+} release[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(422): 35
- [23] Swann K, Lai FA. The sperm phospholipase C-zeta and Ca^{2+} signalling at fertilization in mammals [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44 (1): 267-272
- [24] Chithiwala ZH, Lee HC, Hill DL, et al. Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2015, 32(9): 1415-1419
- [25] Bruno C, Cavalluzzi MM, Rusciano MR, et al. The chemosensitizing agent lubeluzole binds calmodulin and inhibits Ca/calmodulin-dependent kinase II[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 116: 36-45
- [26] Ortega MA, Ko M, Marh J, et al. Presence of the Paternal Pronucleus Assists Embryo in Overcoming Cycloheximide Induced Abnormalities in Zygotic Mitosis [J]. *J Cell Biochem*, 2016. [Epub ahead of print]
- [27] Anifandis G, Messini CI, Dafopoulos K, et al. Sperm contributions to oocyte activation: more that meets the eye [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(3): 313-316
- [28] Tanimoto H, Kimura A, Minc N. Shape-motion relationships of centering microtubule asters[J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(7): 777-787
- [29] Vanden MF, Nikiforaki D, Heindryckx B, et al. Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 28(5): 560-571
- [30] Sfontouris IA, Nastri CO, Lima ML, et al. Artificial oocyte activation to improve reproductive outcomes in women with previous fertilization failure: a systematic review and meta-analysis of RCTs [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(8): 1831-1841