

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.05.01

❖ 基础研究 ❖

二甲双胍通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对胃癌干细胞增殖和凋亡的研究

王冬梅,冯永刚,姚鸿萍

(西安交通大学第一附属医院药学部,陕西 西安 710061)

【摘要】目的:探讨二甲双胍通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对胃癌干细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**常规培养胃癌 MKN-45 细胞,并分选其干细胞,采用免疫荧光法观察分选前后 MKN-45 细胞中 CD44⁺ 表达情况,通过流式细胞术检测分选前、后 MKN-45 细胞中 CD44⁺ 比例,并通过免疫印迹法检测悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球和贴壁细胞中性别决定区 Y 框蛋白 2 (SOX2)、八聚体结合转录因子 4 (OCT4)、同源域蛋白 (Nanog) 的蛋白表达。采用不同剂量二甲双胍 (0, 1, 5, 10 mmol/L) 处理 MKN-45 干细胞 24 ~ 72 h, RT-qPCR 检测 MKN-45 干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路基因表达情况, CCK-8 法检测各组细胞增殖活力,流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。**结果:**与胃癌干细胞分选前相比,分选后 CD44⁺ 比例在 MKN-45 细胞中由 5.70% 富集至 89.32%;悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球中肿瘤干细胞标志物 SOX2、OCT4、Nanog 蛋白高于贴壁细胞 ($P < 0.05$),提示胃癌干细胞分离成功。随着二甲双胍剂量的增加及处理时间的延长, MKN-45 干细胞增殖活性、 β -连环蛋白 (β -catenin) 呈下调趋势,其细胞凋亡率、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 呈上调趋势 ($P < 0.05$)。**结论:**随着二甲双胍浓度增加及作用时间延长,胃癌干细胞增殖活性增强,凋亡率降低,其作用原因可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关。

【关键词】胃癌干细胞;二甲双胍;Wnt/ β -catenin 信号通路;增殖;凋亡

【中图分类号】R459.9;R394.2 **【文献标志码】**A

Effects of metformin on the proliferation and apoptosis of gastric cancer stem cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway

WANG Dong-mei, FENG Yong-gang, YAO Hong-ping

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of metformin on the proliferation and apoptosis of gastric cancer stem cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods:** Routine culture of gastric cancer MKN-45 cells was performed, and the stem cells were separated. The expression of CD44⁺ in MKN-45 cells before and after separation was observed by immunofluorescence method, the proportion of CD44⁺ in MKN-45 cells before and after separation was detected by flow cytometry, and the protein expressions of SOX2, OCT4 and Nanog in suspended MKN-45 tumor cell spheres and adherent cells were detected by Western blotting. MKN-45 stem cells were treated with different doses of metformin (0, 1, 5, 10 mmol/L) for 24 ~ 72h. Gene expression in the wnt/ β -catenin signaling pathway of MKN-45 stem cells was detected by RT-qPCR. Cell proliferation activity in each group was detected by CCK-8 assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** The proportion of CD44⁺ in MKN-45 cells after sorting was enriched from 5.70% to 89.32% compared with that before sorting, and SOX2, OCT4 and Nanog proteins in suspended MKN-45 tumor cells were significantly higher than those in adherent cells ($P < 0.05$), indicating that gastric cancer stem cells were successfully isolated from gastric cancer cell line MKN-45. With the increase of metformin dose and prolonging of treatment time, the proliferation activity and β -catenin of MKN-45 stem cells were down-regulated, while the apoptosis rate and GSK-3 β were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** With the increase of metformin concentration and the prolongation of action time, the proliferation activity of gastric cancer stem cells is enhanced and the apoptosis rate decreased, which is related to the inhibition of the activation of Wnt/ β -catenin signal pathway.

【Key words】 Gastric cancer stem cell; Metformin; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Proliferation; Apoptosis

胃癌在全世界的患病及致死率较高,主要与患者术后肿瘤细胞发生转移及再复发有关,因此寻找

安全有效的药物是目前临床防治胃癌及改善其预后的研究焦点^[1-3]。胃癌干细胞作为胃癌细胞抗化

基金项目:陕西省自然科学基金(2015JM8447)

作者简介:王冬梅(1964-),女,副主任药师。E-mail:caxxwang@126.com

通讯作者:姚鸿萍。E-mail:yaohp2005@126.com

疗、诱导肿瘤转移复发的根源,因此抑制胃癌干细胞增殖及诱导其凋亡才是治疗胃癌的关键^[4]。Jung等^[5]研究表明,人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)过表达可激活与胃癌干细胞相关的 Wnt/ β -catenin 信号通路,进一步诱导胃癌细胞的侵袭及转移,说明胃癌干细胞的增殖、转移、凋亡等生物行为学机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路被激活密切相关。二甲双胍是临床上常用于治疗糖尿病的一线药物,具有防止肝脏糖异生、提高骨骼肌葡萄糖摄取率的作用^[6-7]。研究^[8-12]发现,二甲双胍在抗肿瘤细胞及肿瘤干细胞活性上具有重要价值。然而,关于二甲双胍通过作用 Wnt/ β -catenin 信号通路来影响胃癌干细胞增殖、凋亡机制的研究鲜有报道。本研究对胃癌 MKN-45 细胞株分离培养并鉴定,并通过不同剂量二甲双胍分别处理,探究胃癌干细胞的增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 MKN-45 由武汉普诺赛生命科技有限公司提供;二甲双胍由美国 Sigma-Aldrich 公司提供;CCK-8 试剂盒由日本 Dojindo 公司提供;RPMI-1640 完全培养基、CD44⁺ 磁珠由北京诺为生物技术有限公司提供;兔抗 CD44 购自美国 abcam 公司;RNA 提取试剂盒由 Invitrogen 公司提供;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒由宝生物工程(中国)有限公司提供; β -连环蛋白(β -catenin)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 以 β -actin 引物交由 Takara 公司设计;BCA 试剂盒由 AmyJet Scientific 公司提供;性别决定区 Y 框蛋白 2 (sex-determining region Y-box protein 2, SOX2, 兔抗)、八聚体结合转录因子 4 (octamer-binding transcription factor 4, OCT4, 兔抗)、同源域蛋白 (nanog homeobox, nanog, 兔抗) 和磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 兔抗) 由 Cell Signaling Technology 公司提供;ImageJ2x 软件由 National Institutes of Health 公司提供;荧光显微镜由浙江湖州莱特科技有限公司提供(型号 XSP-63X);PCR 引物及 PrimeScript RT 试剂盒由宝日生物技术有限公司提供;流式细胞仪由美国 BD 公司提供(型号 FACSCalibur)。

1.2 方法

1.2.1 MKN-45 细胞及其干细胞培养 将 MKN-45 细胞在含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 完全培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁后,

取对数生长期 MKN-45 细胞胰酶消化,放于含无血清 1640 培养液(含有 1% 青霉素、20 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子、100 μ g/L 表皮细胞生长因子、1% N-2 添加剂、2% B-27 添加剂)的 96 孔超低吸附培养皿中培养,在倒置显微镜下定期观察悬浮球体细胞成型情况。并按照 1:3 进行传代。

1.2.2 胃癌干细胞分选 取对数生长期 MKN-45 细胞,胰酶消化成单细胞悬液,细胞计数,细胞浓度 1×10^7 /mL,离心重悬,向其中加入 20 μ L CD44 磁珠,4 °C 孵育 15 min,冲洗离心取上清液,重悬后,将磁珠分选分离柱放置于磁珠分选器中,对从磁珠分选分离柱中流出的细胞(CD44⁻)进行收集,每次待柱内液体流尽时,予以缓冲液冲洗,收集总的流出液,将柱子卸下,与离心管相接,之后予以泵压,分选洗液细胞即为 CD44⁺ 细胞^[13]。胃癌干细胞分选分选成功标准^[13]:通过分选前、后 MKN-45 细胞中 CD44⁺ 含量变化情况来判断胃癌干细胞分选成功与否,具体方法如下:(1)免疫荧光法鉴定 CD44⁺ 表达情况:取分选前及分选后 MKN-45 肿瘤细胞球,胰酶消化成单细胞悬液,种于 6 孔培养板(细胞浓度 1×10^8 /L),培养于 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基中,12 h 后将细胞取出,弃培养液,PBS 漂洗,丙酮室温放置 10 min,PBS 洗涤,用 10% 山羊血清于室温封闭 0.5 h,弃血清,向其中加入 CD44 抗体(稀释 1:200),4 °C 过夜孵育,滴加荧光标记的相应二抗,室温避光孵育 1 h,于荧光显微镜下拍照,图片中绿色荧光显示为含有 CD44⁺ 的细胞。(2)为进一步对 MKN-45 肿瘤细胞球中 CD44⁺ 含量进行定量分析,采用流式细胞术检测分选前及分选后 CD44⁺ 胃癌干细胞比例:取分选前及分选后 MKN-45 细胞,胰酶消化成单细胞悬液,离心弃去上清液,PBS 洗涤,加入 CD44⁺ 抗体,冰上孵育 1 h,离心弃去上清液,PBS 洗涤,离心后,流用含有 1% BSA 的 PBS 重悬,于 400 目滤网中将细胞悬液过滤,置入流式管中,通过流式细胞仪检测分选前、后 CD44⁺ 细胞所占比例,来判断 CD44⁺ 细胞分选成功与否。

1.2.3 胃癌干细胞的鉴定 通过检测胃癌干细胞标记物 SOX2、OCT4、Nanog 表达情况进一步对 1.2.2 分选的 MKN-45 细胞干细胞特性进行鉴定。免疫印迹法鉴定肿瘤干细胞标记物(SOX2、OCT4、Nanog)的表达:提取悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球和贴壁细胞中干细胞标记物 SOX2、OCT4、Nanog 的总蛋白。通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将提取的蛋白与上样缓冲液混合,95 °C 煮 10 min、离心,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜。室温下 5% 脱脂乳在 TBST 中封闭 1 h,滴加一抗(1:1 000 稀释)SOX2、

OCT4、Nanog 和 GAPDH 4 °C 孵育过夜,室温下磷酸盐缓冲液洗涤,加入相应的二抗 37 °C 孵育 1 h,洗涤,化学发光试剂显影,蛋白印记图像用 ImageJ2x 软件分析,蛋白水平通过灰度值/GAPDH 条带灰度值进行表示。

1.2.4 CCK-8 检测各组 MKN-45 干细胞增殖活力

取第 3 代 MKN-45 干细胞,予以 PBS 清洗,进行胰酶消化,制成单细胞悬液。计数后,以每孔 1×10^5 /L 细胞浓度接种于 96 孔板中,在培养箱孵育 24 h,换液,分别向其中加入 3 中浓度的二甲双胍(0、1、5、10 mmol/L)溶液,培养 24、48、72 h 时,取出培养板,根据 CCK8 试剂盒说明书,加入 10 μ L CCK8 继续培养 2 h,在 490 nm 处读取吸光度值(OD),制作增殖曲线图。

1.2.5 流式细胞术检测 MKN-45 干细胞凋亡情况

取第 3 代 MKN-45 干细胞,予以 PBS 清洗,进行胰酶消化,制成单细胞悬液。以细胞浓度为 1×10^{10} /L 接种于培养瓶中,常规培养 1 d,换液,分别加入 3 中浓度的二甲双胍(0、1、5、10 mmol/L)溶液,培养 24、48、72 h 时,取出培养瓶,胰酶消化成单细胞悬液,离心分离去上清,收集细胞于离心管中,PBS 洗涤,加 1 mL 预冷的 70% 乙醇,4 °C 固定,24 h 后离心分离去上清,加 1 mL 预冷 PBS,使细胞悬浮混匀;并加 0.5 mL 碘化丙啶予以染色,37 °C 避光孵育 30 min,通过流式细胞仪于 488 nm 波长处测定 MKN-45 干细胞凋亡情况。

1.2.6 RT-qPCR 检测 MKN-45 干细胞 wnt/ β -catenin 信号通路相关基因表达情况 收集 1.2.4 中不同浓度二甲双胍处理的(24、48、72 h) MKN-45 干细胞,通过 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。按照 PrimeScript RT 试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录体系 10 μ L。 β -catenin、GSK-3 β 以 β -actin 作为内参,引物序列见表 1。参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明书进行 PCR 扩增预变性、变性、退火、延伸反应条件为:94 °C 5 min,94 °C 40 s,55 ~ 60 °C 40 s,72 °C 1min,40 个循环,72 °C 再延伸 10 min。予以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24 软件对数据进行分析与处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌干细胞的培养及鉴定

胃癌细胞系 MKN-45 在无血清培养基 7 d 后形

成各自的悬浮球体细胞(图 1A);随着培养时间的继续延长,培养到 15 d 时肿瘤球体细胞排列致密,中心密度高,呈现肿瘤细胞富集(图 1B)。免疫荧光检测结果显示,与胃癌干细胞分选前相比,分选后 MKN-45 肿瘤细胞球中 CD44⁺(绿色荧光显示含有 CD44⁺的细胞)数量增加(图 1C、图 1D)。进一步流式细胞术对 CD44⁺定量显示,与胃癌干细胞分选前相比,分选后 CD44 明显富集,CD44⁺比例在 MKN-45 细胞中由 5.70% 富集至 89.32% (图 1E、图 1F),提示 CD44⁺细胞分选成功;免疫印迹结果显示,悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球中肿瘤干细胞标志物 SOX2、OCT4、Nanog 蛋白高于贴壁细胞($P < 0.05$)(图 1G、图 1H),提示悬浮球体细胞具有肿瘤干细胞特性。

表 1 引物序列

基因	序列(5' - 3')	长度(bp)	
β -catenin	正向	TACTTGCCTTACACCCCTTCTTG	23
	反向	TGGGATGGTGGGTGAAGAG	20
GSK-3 β	正向	TAGGAACACCAACAAGGGAGC	21
	反向	CACCCGCGAGTACAACCTTG	20
β -actin	正向	GCCATGTACGTAGCCATCCA	20
	反向	GAACCGCTCATTGCCGATAG	20

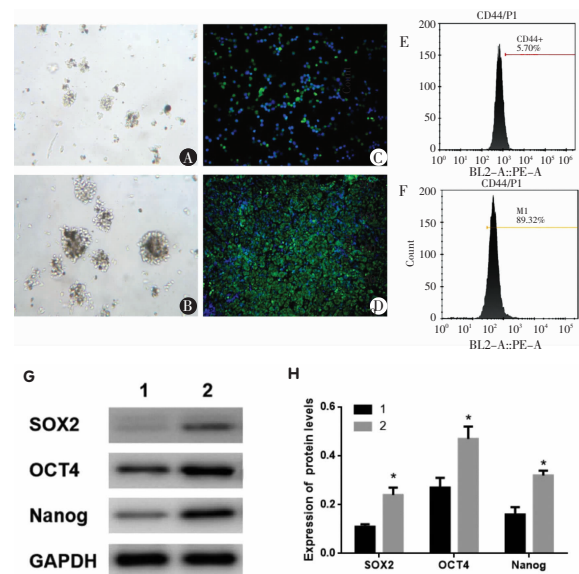


图 1 胃癌干细胞的培养与鉴定

A.培养第 7 天形成的肿瘤细胞球($\times 100$);B.培养第 15 天形成的肿瘤细胞球($\times 100$);C.胃癌干细胞分选前,免疫荧光法检测干细胞标志物 CD44⁺表达情况($\times 100$);D.胃癌干细胞分选后,免疫荧光法检测干细胞标志物 CD44⁺表达情况($\times 100$);E.胃癌干细胞分选前,流式细胞仪检测 CD44⁺阳性细胞的比例;F.胃癌干细胞分选后,流式细胞仪检测 CD44⁺阳性细胞的比例;G. 悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球(2)和贴壁细胞(1)中干细胞标志物 SOX2、OCT4、Nanog 蛋白表达(免疫印迹图);H.悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球(2)和贴壁细胞(1)中干细胞标志物 SOX2、OCT4、Nanog 蛋白表达统计值(* $P < 0.05$,与贴壁细胞相比)。

2.2 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞增殖活力的影响

与未处理的 MKN-45 干细胞相比,经不同浓度(1、5、10 mmol/L)二甲双胍处理的 MKN-45 干细胞在 48 h 及 72 h 增殖能力下降 ($P < 0.05$),且呈时间与剂量依赖性。见图 2。

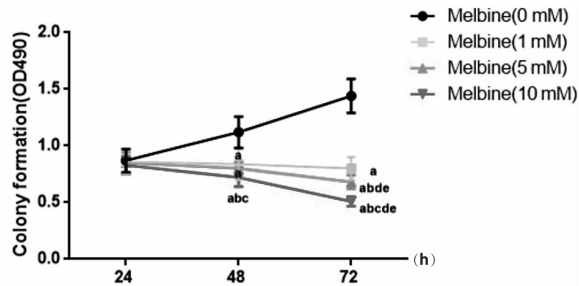


图 2 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞增殖活力的影响

^a $P < 0.05$,与 Melbine(0 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^b $P < 0.05$,与 Melbine(1 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^c $P < 0.05$,与 Melbine(5 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^d $P < 0.05$,与 24 h 处理的 MKN-45 干细胞相比;^e $P < 0.05$,与 48 h 处理的 MKN-45 干细胞相比。

2.3 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞凋亡情况的影响

与未处理的 MKN-45 干细胞相比,经不同浓度(1、5、10 mmol/L)二甲双胍处理的 MKN-45 干细胞随时间延长(48 ~ 72 h)及浓度增加,细胞凋亡率也随之增加 ($P < 0.05$),且呈时间与剂量依赖性。见图 3。

2.4 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞 β -catenin、GSK-3 β 基因表达影响

与未处理的 MKN-45 干细胞相比,随着二甲双胍处理浓度增加及处理时间的延长,MKN-45 干细胞 β -catenin mRNA 表达呈下调趋势,GSK-3 β mRNA 表达呈上调趋势 ($P < 0.05$),且呈时间与剂量依赖性。见图 4。

3 讨论

肿瘤干细胞在肿瘤组织中数量极少,具有较强的自我更新、多向分化及无限增值的能力。近些年来,越来越多的研究报道了在胃癌、结肠癌、乳腺癌、肝癌、肺癌等多种肿瘤中存在肿瘤干细胞^[14]。已有研究^[15-16]证实,胃癌干细胞在化疗药物的耐药方面显著强于普通胃癌细胞。因此,靶向胃癌干细胞已成为现阶段临床治疗胃癌新的方向。

本研究中胃癌细胞株 MKN-45 在超低粘附板中培养,在无血清培养基 7 d 后形成各自的球体细胞,

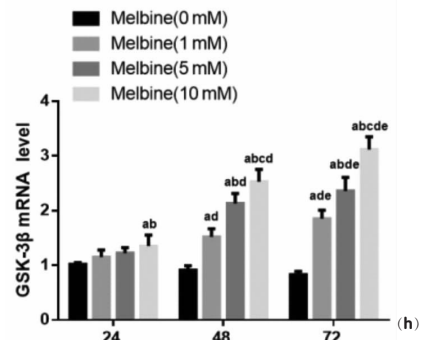
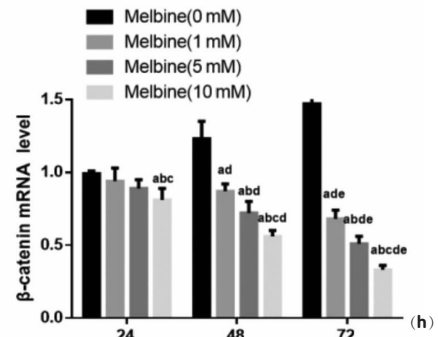


图 3 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞凋亡情况的影响

^a $P < 0.05$,与 Melbine(0 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^b $P < 0.05$,与 Melbine(1 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^c $P < 0.05$,与 Melbine(5 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^d $P < 0.05$,与 24 h 处理的 MKN-45 干细胞相比;^e $P < 0.05$,与 48 h 处理的 MKN-45 干细胞相比。

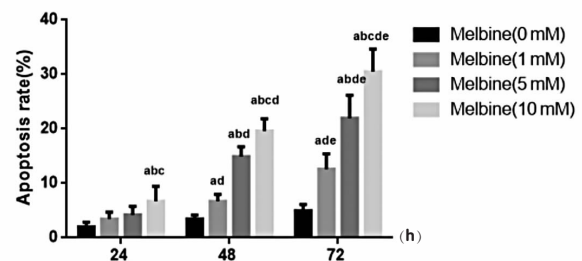


图 4 不同浓度二甲双胍对 MKN-45 干细胞 β -catenin、GSK-3 β 基因表达影响

^a $P < 0.05$,与 Melbine(0 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^b $P < 0.05$,与 Melbine(1 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^c $P < 0.05$,与 Melbine(5 mM)处理的 MKN-45 干细胞相比;^d $P < 0.05$,与 24 h 处理的 MKN-45 干细胞相比;^e $P < 0.05$,与 48 h 处理的 MKN-45 干细胞相比。

培养 15 d 时肿瘤球体细胞排列致密,中心密度高,呈现肿瘤细胞富集。研究^[17-18]显示,CD44⁺、SOX2、OCT4、Nanog 是肿瘤干细胞中常见生物标记物,本研究通过检测肿瘤干细胞标记物来鉴定胃癌干细胞的培养及分选情况,免疫荧光显示,与分选前相比,胃癌干细胞分选后,CD44⁺表达增加,且流式细胞术也显示,分选后 CD44⁺明显富集,CD44⁺比例在 MKN-45 细胞中由 5.70% 富集至 89.32%,同

时悬浮 MKN-45 肿瘤细胞球中肿瘤干细胞标志物 SOX2、OCT4、Nanog 蛋白高于贴壁细胞。进一步证实本研究胃癌干细胞分选成功,可成为靶细胞应用于二甲双胍抗胃癌作用机制的研究^[19]。

二甲双胍是一种用于治疗 2 型糖尿病的临床药物,有研究^[20]认为,该药对预防癌症的发生及降低癌症死亡风险具有促进作用,已有多项研究表明,二甲双胍可通过调控相关基因起到抑制肿瘤增殖及诱导肿瘤细胞凋亡的作用。Teufelsbauer 等^[20]报道发现,二甲双胍可通过间接介导人脂肪基质细胞的支持活性在乳腺癌中发挥抗癌活性。Gulati 等^[9]研究认为,塞来昔布联用二甲双胍可通过抑制局部粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、n-钙粘蛋白和基质金属蛋白酶-9 活性来抑制非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭。本研究 CCK-8 结果显示,与未处理的 MKN-45 干细胞相比,经过不同浓度(1、5、10 mmol/L)二甲双胍处理的 MKN-45 干细胞在 48 h 及 72 h 增殖能力下降,且呈时间与剂量依赖性,表明二甲双胍具有抗胃癌干细胞的增殖的活性,且与其剂量及作用时间成正比。同时本研究又对胃癌干细胞的凋亡机制进行了研究,结果显示,与未处理的 MKN-45 干细胞相比,经过二甲双胍处理时间的延长(48 ~ 72 h)及浓度增加, MKN-45 干细胞凋亡率也随之显著增加,且呈时间与剂量依赖性,说明二甲双胍浓度越高,作用时间越长,其诱导胃癌干细胞的凋亡就越显著。分析原因可能与二甲双胍肿瘤抑制机制有关:(1)通过活化调控胰岛素/胰岛素样生长因子 1 轴、腺苷活化蛋白激酶、阻滞肿瘤细胞周期以及调节能量代谢平衡等,进而起到直接抑制肿瘤细胞增殖的作用^[21];(2)通过调节肠道菌群、激活免疫机制,并与各类抗肿瘤药物协同发挥间接抑制肿瘤的作用^[21];(3)二甲双胍可能激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,调节细胞黏附分子如 β -catenin,来调节肿瘤细胞的增殖迁移,并激活下游相关增殖凋亡基因(cyclinD1、c-myc)表达,来调控肿瘤细胞的增殖凋亡^[22]。

多项研究^[23-24]已表明,Wnt/ β -catenin 信号通路参与胃癌细胞及其干细胞的增殖、凋亡等生物学作用机制,通过采用合适的治疗手段来抑制胃癌干细胞内 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性,已成为现阶段靶向治疗胃癌的重要研究方向。Fan 等^[25]研究报道,通过上调胃癌干细胞中 miR-501-5p 表达,可使 Wnt/ β -catenin 信号通路被过度激活,进而介导胃癌干细胞样表型。Akrami 等^[26]研究报道,布洛芬可通过改变 Wnt/ β -catenin 信号通路及其下游相关基因的表达等来抑制 Wnt 信号通路,起到抗胃癌干细

胞增殖的作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 因子分布于细胞膜,起到维持同型细胞间黏连的作用,其表达的上调可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,而 GSK-3 β 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的负调节因子,可与轴蛋白、结肠腺瘤息肉易感基因等形成复合体,促进 β -catenin 的磷酸化,致使 β -catenin 被水解^[27]。然而现阶段关于二甲双胍通过介导 Wnt/ β -catenin 信号通路来影响胃癌干细胞增殖凋亡机制的研究鲜有报道。本研究 RT-qPCR 检测结果显示,与未处理的 MKN-45 干细胞相比,随着二甲双胍处理浓度增加及处理时间的延长, MKN-45 干细胞 β -catenin mRNA 表达呈显著下调趋势, GSK-3 β mRNA 表达呈显著上调趋势,提示二甲双胍对胃癌干细胞的增殖抑制及凋亡促进与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关。

综上所述,随着二甲双胍浓度的增加及作用时间的延长,可促进胃癌干细胞增殖活性的增强及凋亡率降低,其作用原因可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关。本研究存不足之处在于,由于实验条件有限,未直接验证 Wnt/ β -catenin 信号通对胃癌干细胞增殖凋亡机制的影响,仅对二甲双胍影响胃癌干细胞增殖凋亡机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路关系可能性进行初步探讨,后续可就此问题进一步深入研究。

参考文献

- [1] Lyons K, Le LC, Pham YT, et al. Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review [J]. *European journal of cancer*, 2019, 28(5): 397 - 412.
- [2] 赵佳, 王硕, 曲晶磊. 胃癌化疗的现状与研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(4): 337 - 341.
- [3] 许清, 周彬. 调强放疗在晚期胃癌根治术后淋巴结转移患者中的临床效果及对炎症因子、免疫功能的影响研究 [J]. *川北医学院学报*, 2019, 34(6): 756 - 759.
- [4] Yang F, Zhang Z, Xue XC, et al. Targeted eradication of gastric cancer stem cells by CD44 targeting USP22 small interfering RNA-loaded nanoliposomes [J]. *Future Oncology*, 2019, 15(3): 281 - 295.
- [5] Jung DH, Bae YJ, Kim JH, et al. HER2 Regulates Cancer Stem Cell Activities via the Wnt Signaling Pathway in Gastric Cancer Cells [J]. *Oncology*, 2019, 97(5): 311 - 318.
- [6] 潘英, 李双庆. 二甲双胍治疗糖尿病结直肠癌患者总体生存率的 Meta 分析 [J]. *中国临床研究*, 2020, 33(2): 29 - 32.
- [7] 杜予俊. 二甲双胍联合吡格列酮治疗 2 型糖尿病的疗效观察 [J]. *健康研究*, 2014, 34(2): 212 - 213.
- [8] Marinello PC, Panis C, Silva TNX, et al. Oxidative stress and TGF- β 1 induction by metformin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells are accompanied with the downregulation of genes related to cell proliferation, invasion and metastasis [J]. *Pathology research and practice*, 2020, 216(10): 153135.

- [9] Gulati S, Desai J, Palackdharry SM, *et al.* Phase 1 dose-finding study of metformin in combination with concurrent cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell cancer[J]. *Cancer*, 2020, 126(2):354-362.
- [10] Dankner R, Agay N, Olmer L, *et al.* Metformin Treatment and Cancer Risk: Cox Regression Analysis, With Time-Dependent Covariates, of 320,000 Persons With Incident Diabetes Mellitus[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2019, 188(10):1794-1800.
- [11] Park JH, Kim YH, Park EH, *et al.* Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in chemoresistant rectal cancer[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(9):2834-2845.
- [12] Li P, Tong LH, Song YX, *et al.* Long noncoding RNA H19 participates in metformin-mediated inhibition of gastric cancer cell invasion[J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(4):4515-4527.
- [13] 周雨, 胡程, 段海瑞, 等. CD44⁺ 胃癌细胞的获取及其干细胞特性的初步鉴定[J]. *大家健康(下旬版)*, 2014, 8(2):4-6.
- [14] Ni SJ, Zhao LQ, Wang XF, *et al.* CBX7 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via p16 and AKT-NF- κ B-miR-21 pathways[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018, 11(1):17.
- [15] 徐勇超, 黄涛, 唐礼恭, 等. 胃癌侵袭转移中的胃癌干细胞鉴定价值及其分子机制[J]. *中华普通外科杂志*, 2020, 35(5):401-404.
- [16] 王向阳, 黄开禹, 杜天明, 等. 肿瘤相关性成纤维细胞分泌胞外体增强胃癌干细胞化疗耐药[J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(3):434-436.
- [17] 章伟, 周斌, 郭宁. 胃癌组织中干细胞标志物 Sox2、OCT4、CD44、 β -catenin 表达与胃癌术后复发转移关系[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(15):2281-2284.
- [18] 王华, 蔡红兵, 李树炜, 等. HMGB1 对宫颈癌干性基因 OCT4、Sox2 和 Nanog 表达的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(10):786-791.
- [19] Dou J, Pan M, Wen P, *et al.* Isolation and identification of cancer-stem-like cells from murine melanoma cell lines[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, 4(6):467-472.
- [20] Teufelsbauer M, Rath B, Plangger A, *et al.* Effects of metformin on adipose-derived stromal cell (ADSC)-Breast cancer cell lines interaction[J]. *Life Science*, 2020, 261(12):118371.
- [21] 刘相良, 朱梅开, 芦晋, 等. 二甲双胍抗肿瘤机制研究进展[J]. *山东医药*, 2019, 59(14):108-111.
- [22] 陈玉琴, 陈刚. 二甲双胍联合奥沙利铂对肺癌裸鼠移植瘤 VEGF-C、VEGFR-3、CD44v6 和 β -catenin 表达的影响[J]. *山东医药*, 2015, 9(9):1-4.
- [23] 李康, 且增. Wnt/ β -catenin 信号与胃癌防治研究进展[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(12):1852-1856.
- [24] 贾永森, 江春花, 韩炳生, 等. 通芪方对胃癌 MGC803 细胞周期和 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(5):1126-1129.
- [25] Fan DM, Ren BQ, Yang XJ, *et al.* Upregulation of miR-501-5p activates the wnt/ β -catenin signaling pathway and enhances stem cell-like phenotype in gastric cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1):177.
- [26] Akrami H, Moradi B, Borzabadi FD, *et al.* Ibuprofen reduces cell proliferation through inhibiting Wnt/ β catenin signaling pathway in gastric cancer stem cells[J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(8):949-958.
- [27] 李丽, 顾文燕, 姜红. 萝卜硫素介导 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导胃癌细胞凋亡的研究[J]. *天津中医药*, 2019, 36(11):1133-1136.
- (收稿日期:2020-12-11 修回日期:2021-01-06)