

二甲双胍联合奥沙利铂抗肿瘤作用*

武汉市第四医院(华中科技大学附属普爱医院) 郭敦伟 王建祥 周锐*, 武汉 430034

摘要 目的:探究二甲双胍联合奥沙利铂对结肠癌移植瘤小鼠的抗肿瘤作用。方法:32 只 BALB/C 雄性小鼠左前肢腋下接种 c26 小鼠结肠腺癌细胞,随机分为恶病质组、二甲双胍组、奥沙利铂组以及联合组,另外 8 只小鼠作为正常组。奥沙利铂组小鼠每周 1 次腹腔注射奥沙利铂注射液 0.01 mg/g,同时每日灭菌蒸馏水 0.1 mL/g 灌胃;二甲双胍组小鼠每日给予二甲双胍 0.2 mg/g 灌胃,同时每周 1 次腹腔注射生理盐水 0.02 mL/g;联合组小鼠每日给予二甲双胍 0.2 mg/g 灌胃,同时每周 1 次腹腔注射奥沙利铂注射液 0.01 mg/g;正常组和恶病质组小鼠每日灭菌蒸馏水 0.1 mL/g 灌胃,同时每周 1 次腹腔注射生理盐水 0.02 mL/g。每日检测小鼠体重、肿瘤大小、自发性活动、精神毛发等。连续给药 42 d 后,颈椎脱臼法处死小鼠,解剖分离并称重右下肢腓肠肌组织,ELISA 法检测腓肠肌组织炎症因子水平,HE 染色观察腓肠肌形态。结果:荷瘤小鼠体重、腓肠肌质量、腓肠肌横切面积较正常组均明显降低(均 $P < 0.05$),奥沙利铂组和联合组小鼠肿瘤重量及体积均明显减少,且联合组减少最为明显(均 $P < 0.05$),各荷瘤小鼠腓肠肌组织中 IL-6 及 TNF- α 水平较正常组均明显升高,其中二甲双胍组及联合组较恶病质组则明显下降(均 $P < 0.05$)。结论:二甲双胍联合奥沙利铂能够抑制肿瘤生长,且能延缓癌性恶液质的发生。

关键词 二甲双胍; 奥沙利铂; 肿瘤

中图分类号 R735.3+5

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20180121

Effect of Metformin Combined with Oxaliplatin on Colon Cancer Transplanted Mice GUO Dun-wei, WANG Jian-xiang, ZHOU Rui*. The Fourth Hospital of Wuhan(Puai Hospital of Huazhong University of Science and Technology), Wuhan 430034, China

Abstract Objective: To investigate the antitumor effect of metformin combined with oxaliplatin on colon cancer transplanted mice. Methods: 32 male BALB/C mice, inoculated subcutaneously with murine colon adenocarcinoma C26 cells, were randomly divided into control group, metformin group, oxaliplatin group, and combination group, and 8 normal mice were chosen as normal group. The body weight, tumor size, spontaneous activity and hair were monitored daily. After 42 days of treatment, samples were collected and tested by different methods. The levels of inflammatory factors in gastrocnemius muscle were detected by ELISA, and the morphology of gastrocnemius muscle was observed by HE staining. Results: The mice body weight, gastrocnemius muscle weight and cross-sectional area in colon cancer transplanted mice were significantly lower than those in normal group ($P < 0.05$). Compared with control group, the tumor weight and volume were significantly decreased in oxaliplatin group and combination group ($P < 0.05$), while the tumor weight and volume in combination group were lower than those in oxaliplatin group. The levels of IL-6 and TNF- α in the gastrocnemius tissues decreased significantly in the order of oxaliplatin group, control group, combination group, metformin group and normal group ($P < 0.05$). Conclusion: Metformin combined with oxaliplatin can inhibit the growth of tumor and delay the occurrence of cancer cachexia.

Keywords Metformin; Oxaliplatin; Cancer

奥沙利铂是第三代铂类药物。有研究认为,奥沙利铂在抗肿瘤的同时,也会加剧癌性恶液质的进程^[1]。研究发现,二甲双胍具有一定的抗肿瘤作用^[2~4],且二甲双胍与抗肿瘤药物联合使用,能够产生协同效应,增强化疗药物的抗肿瘤作用,同时还可能减轻副作用^[5~7]。本研究采用二甲双胍与奥沙利铂联合治疗结肠癌移植瘤小鼠,探讨两者的协同作用,报道如下。

材料与方法

材料 40 只 SPF 级 BALB/C 雄性小鼠(6~8 周,18~20 g),由湖北省实验动物研究中心[SCXK(鄂)2015-0018]提供。小鼠结肠腺癌 C26 细胞(ATCC 细胞库)冻存于本实验室。IL-6、TNF- α ELISA 试剂盒购于武汉博士德公司。二甲双胍(metformin)和奥沙利铂(oxaliplatin)购于 Sigma 公司。

造模与分组 小鼠适应性喂养 1 周。取对数生长期的 C26 细胞,重悬于 PBS 缓冲液中,调整浓度至 1×10^7 mL。32 只小鼠左前肢腋窝皮下接种 C26

*基金项目:湖北省卫生计生科研项目(No:WJ2015MB156)

*通信作者:周锐,E-mail:zhourei0815@126.com

细胞,每只0.1 mL(1×10^6 个细胞)^[8]。另外8只小鼠相同部位接种 PBS 缓冲液0.1 mL作为正常组。荷瘤小鼠随机分为4组,恶病质组、二甲双胍组、奥沙利铂组以及联合组,每组8只。每日定时观察小鼠肿瘤大小、毛发、精神状态、体重。

干预方法 接种C26细胞后第6天,荷瘤小鼠可触及皮下肿瘤结节生长。从第7天开始,奥沙利铂组小鼠每周1次腹腔注射奥沙利铂注射液0.01 mg/g^[9],同时每日灭菌蒸馏水0.1 mL/g灌胃;二甲双胍组小鼠每日给予二甲双胍0.2 mg/g灌胃,同时每周1次腹腔注射生理盐水0.02 mL/g;联合组小鼠每日给予二甲双胍0.2 mg/g灌胃,同时每周1次腹腔注射奥沙利铂注射液0.01 mg/g;正常组和恶病质组小鼠每日灭菌蒸馏水0.1 mL/g灌胃,同时每周1次腹腔注射生理盐水0.02 mL/g。连续给药42 d^[9]。

连续给药42 d后,采用静脉注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,颈椎脱臼法处死小鼠,解剖小鼠肿瘤和腓肠肌^[8],并称重。部分腓肠肌直接冻存于-80℃,其余腓肠肌于4%多聚甲醛固定。

取少量冻存的腓肠肌组织匀浆后,12 000r/min离心10 min,去除沉淀。严格按照说明书步骤,ELISA法分别检测IL-6和TNF- α 含量。

经多聚甲醛固定后的腓肠肌组织,常规进行程

表1 各组小鼠体质量、腓肠肌质量和腓肠肌横切面积比较

($\bar{x} \pm s$)

分组	只	初始体质量(g)	终末去瘤体质量(g)	腓肠肌质量(mg)	横切面积(μm^2)
正常组	8	20.1 $\pm$ 1.4	27.1 $\pm$ 1.5 Δ^{Δ}	140.8 $\pm$ 4.9 Δ^{Δ}	2.5 $\pm$ 0.1 Δ^{Δ}
二甲双胍组	8	20.2 $\pm$ 1.2	24.4 $\pm$ 0.9 $^{*}\Delta^{\Delta}$	98.7 $\pm$ 7.5 $^{*}\Delta^{\Delta}$	2.6 $\pm$ 0.1 $^{*}\Delta^{\Delta}$
联合组	8	20.1 $\pm$ 1.1	21.3 $\pm$ 0.7 $^{*}\Delta^{\Delta}$	88.6 $\pm$ 4.5 $^{*}\Delta^{\Delta}$	1.4 $\pm$ 0.1 $^{*}\Delta^{\Delta}$
恶病质组	8	20.1 $\pm$ 1.2	18.6 $\pm$ 1.1 $^{*}\Delta^{\Delta}$	65.2 $\pm$ 4.2 $^{*}\Delta^{\Delta}$	1.1 $\pm$ 0.1 $^{*}\Delta^{\Delta}$
奥沙利铂组	8	20.0 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.5 $^{*}\Delta^{\Delta}$	56.5 $\pm$ 2.3 $^{*}\Delta^{\Delta}$	1.0 $\pm$ 0.1 $^{*}\Delta^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^{*}P < 0.05$;与二甲双胍组比较, $^{*}P < 0.05$;与联合组比较, $\Delta P < 0.05$;与奥沙利铂组比较, $\Delta P < 0.05$

肿瘤质量和体积 与其他组荷瘤小鼠比较,联合组小鼠肿瘤质量及体积最小,奥沙利铂组小鼠肿瘤质量及体积均小于二甲双胍组及恶病质组($P < 0.05$),二甲双胍组小鼠肿瘤质量和体积与恶病质组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 各组小鼠瘤重及肿瘤体积比较

($\bar{x} \pm s$)

分组	只	瘤重(g)	肿瘤体积(cm^3)
二甲双胍组	8	4.2 $\pm$ 0.1 $^{\Delta}$	5.3 $\pm$ 0.2 $^{\Delta}$
联合组	8	2.0 $\pm$ 0.2 *	2.6 $\pm$ 0.2 *
恶病质组	8	4.4 $\pm$ 0.1 $^{\Delta}$	5.3 $\pm$ 0.1 $^{\Delta}$
奥沙利铂组	8	2.52 $\pm$ 0.27 *	2.91 $\pm$ 0.22 *

注:与联合组比较, $^{*}P < 0.05$;与奥沙利铂组比较, $\Delta P < 0.05$

炎症因子水平 与正常组比较,各荷瘤小鼠组

序脱水后,采用石蜡包埋固定,5 μm 厚度连续切片^[10]。采用HE染色后,光学显微镜下观察并拍照,使用Image J软件分析肌纤维的平均面积。

统计学处理 使用SPSS17.0统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异采用单因素方差检验,两两组间差异采用SNK-q检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一般情况 各组小鼠初始体质量差异无统计学意义。接种C26细胞后第6天,荷瘤小鼠皮下可触及肿瘤结节。第12天,荷瘤小鼠肿瘤明显增长。干预42 d后,各组荷瘤小鼠毛发粗糙、失去光泽,精神萎靡,全部处于恶液质状态^[11],分离瘤体后净体质量较正常组均减轻($P < 0.05$),其中联合组小鼠去瘤体重比二甲双胍组轻,比恶病质组和奥沙利铂组重,而奥沙利铂组小鼠去瘤体重最轻(均 $P < 0.05$),见表1。

腓肠肌质量和横切面积 与正常组比较,其他各组荷瘤小鼠腓肠肌质量和肌纤维横切面积均明显下降(均 $P < 0.05$),其中奥沙利铂组小鼠腓肠肌质量和肌纤维横切面积下降最为明显(均 $P < 0.05$)。联合组小鼠腓肠肌质量和肌纤维横切面积较恶病质组明显增加,但小于二甲双胍组(均 $P < 0.05$),见表1。

腓肠肌组织IL-6、TNF- α 水平显著升高 (均 $P < 0.05$)。其中奥沙利铂组、恶病质组、联合组和二甲双胍组小鼠腓肠肌组织IL-6、TNF- α 水平依次降低(均 $P < 0.05$),见表3。

表3 各组小鼠腓肠肌组织炎症因子水平比较

($\bar{x} \pm s$)

分组	只	IL-6(ng/g)	TNF- α (ng/g)
正常组	8	2.3 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.6
二甲双胍组	8	31.6 $\pm$ 1.4 *	32.7 $\pm$ 3.9 *
联合组	8	41.4 $\pm$ 2.2 *	40.1 $\pm$ 2.8 *
恶病质组	8	49.7 $\pm$ 2.0 $^{*}\Delta^{\Delta}$	50.9 $\pm$ 2.7 $^{*}\Delta^{\Delta}$
奥沙利铂组	8	70.0 $\pm$ 1.5 $^{*}\Delta^{\Delta}$	67.4 $\pm$ 3.0 $^{*}\Delta^{\Delta}$

注:与正常组比较, $^{*}P < 0.05$;与二甲双胍组比较, $^{*}P < 0.05$;与

联合组比较, $\Delta P < 0.05$;与奥沙利铂组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

本研究显示奥沙利铂能够明显抑制肿瘤生长,但同时会加剧癌性恶液质进程;二甲双胍能够延缓恶液质的进程,但对肿瘤生长的抑制作用不明显;二甲双胍联合奥沙利铂能够明显抑制肿瘤生长,同时能够延缓癌性恶液质进程。

癌症严重威胁着人类的健康^[12],有数据显示恶性肿瘤的发病率正在逐步增长^[13]。奥沙利铂因其疗效好、毒性小,并且对顺铂、卡铂耐药患者仍具有较好的抑癌作用,在临床上得到了广泛的应用^[14]。癌性恶液质(cancer cachexia, CC)是伴发于晚期肿瘤患者的一种多因素综合征,严重影响患者的生存质量和寿命,对治疗也产生不良影响^[15]。炎症反应在恶病质进程中具有重要作用。IL-6、TNF- α 能引起机体产生厌食、改变蛋白质和脂肪代谢,进一步加剧恶液质进程^[16]。化疗药物能够增强机体炎症因子的释放,在达到其抗肿瘤细胞生长的同时,也能导致机体的恶液质进程加剧^[17]。本研究发现单用奥沙利铂治疗肿瘤模型小鼠,能够明显抑制肿瘤生长,但其明显增加了骨骼肌组织中炎症因子的产生,加速骨骼肌萎缩的作用也非常突出。

二甲双胍是临床上治疗 2 型糖尿病的一线药物,流行病学调查结果显示,二甲双胍还能够明显降低肿瘤患者的死亡率^[18]。Kumar 等^[19]发现二甲双胍能够提高卵巢癌患者的生存率。二甲双胍对乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌等不同类型肿瘤也具有一定的抑制作用^[2-4,20]。Hanna 等^[7]发现联合使用二甲双胍与紫杉醇能够协同抑制子宫内膜癌细胞增殖;二甲双胍与吉非替尼联合使用,能够增强后者对肺鳞癌的敏感性^[21];此外 Lin 等^[22]也发现二甲双胍能够增强顺铂的细胞毒作用。在肺癌转移瘤裸鼠模型中,联合使用二甲双胍和奥沙利铂较奥沙利铂单药治疗具有更好的抗肿瘤作用^[9]。本文联合二甲双胍与奥沙利铂治疗结肠癌移植瘤小鼠,较单用奥沙利铂治疗,具有更明显的抑制肿瘤生长作用,同时能够减轻奥沙利铂的副作用,延缓癌性恶液质的进程。这可能是因为二甲双胍本身同时具有一定的抑制肿瘤作用和抑制炎症因子作用^[23]。本研究单用二甲双胍对肿瘤的抑制作用十分微弱,可能与所用二甲双胍剂量、治疗周期有关。

参 考 文 献

- Barreto R, Waning DL, Gao H, et al. Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):43442-43460.

- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, et al. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(21):10269.
- Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, et al. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Cancer Prevention Research*, 2008, 1(5):369-75.
- Liu J, Li M, Song B, et al. Metformin inhibits renal cell carcinoma in vitro and in vivo xenograft [J]. *Urologic Oncology*, 2013, 31(2):264-270.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types [J]. *Cancer Research*, 2011, 71(9):3196.
- Zhang HH, Guo XL. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. [J]. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 2016, 78(1):13-26.
- Hanna RK, Zhou C, Malloy KM, et al. Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway [J]. *Gynecologic Oncology*, 2012, 125(2):458-469.
- 张天平, 陈志雄, 安昌勇, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG132 对肿瘤恶病质的改善作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(19):1940-1943.
- 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、CD44 v6 和 β -catenin 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2015(9):1-4.
- 桂书彦, 袁刚, 余毅恺, 等. 糖尿病急症并发横纹肌溶解综合征的实验研究 [J]. *内科急危重症杂志*, 2015, 21(2):132-135.
- 王强, 李春红, 王朝义, 等. Carfilzomib 联合 Z-VAD-FMK 对肿瘤恶病质的防治作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(22):2292-2295.
- 刘威, 沈红梅. 恶性肿瘤与睡眠障碍关系的研究进展 [J]. *内科急危重症杂志*, 2017, 23(1):61-64.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(1):5-29.
- Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy [J]. *Current Oncology*, 2011, 18(1):18.
- Murphy KT, Chee A, Trieu J, et al. Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2012, 5(4):533-545.
- 吴国豪. 恶性肿瘤患者营养不良的原因及防治对策 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2010, 13(3):170-172.
- Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, et al. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis [J]. *Chemotherapy Research & Practice*, 2014, 2012:490804.
- Evans J M M, Donnelly L A, Emsliesmith A M, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients [J]. *Bmj*, 2005, 330(7503):1304-1305.
- Kumar S, Meuter A, Thapa P, et al. Metformin intake associates with better survival in ovarian cancer: A case control study [J]. *Cancer*, 2013, 119(3):555.
- Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, et al. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation - implications for a novel treatment strategy [J]. *Gynecologic Oncology*, 2010, 116(1):92-98.
- Ko JC, Chiu HC, Wo TY, et al. Inhibition of p38 MAPK-dependent MutS homologue-2 (MSH2) expression by metformin enhances gefitinib-induced cytotoxicity in human squamous lung cancer cells. [J]. *Lung Cancer*, 2013, 82(3):397.
- Lin CC, Yeh HH, Huang WL, et al. Metformin enhances cisplatin cytotoxicity by suppressing signal transducer and activator of transcription-3 activity independently of the liver kinase B1-AMP-activated protein kinase pathway [J]. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, 2013, 49(2):241.
- 王慧兰, 徐霞, 郑志群. 二甲双胍对多囊卵巢综合征大鼠的排卵及对卵巢中 IL-6、TNF- α 表达的影响 [J]. *福建医科大学学报*, 2013(5):288-292.

(2017-10-09 收稿 2017-12-30 修回)