DOI:10.16016/j.1000-5404.202103252

二甲双胍通过 PP2A/AKT 通路诱导结直肠癌细胞衰老

杨建英[1,2],王灵巧[2],陈维艳[2],谭 瑶[2],金会东[2],曾 毅[2],郭成威[2],孙 燕[1,2],王文钰[1,2],周紫垣[2],杨光红[1]
550025 贵阳,贵州医科大学公共卫生学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系环境卫生学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 明确二甲双胍(1,1-二甲基双胍盐酸盐,Met)是否通过诱导细胞衰老抑制结直肠癌细胞增殖,并初步探讨其诱导细胞衰老的机制。**方法** 以不同浓度 Met(0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)处理结直肠癌 LOVO、SW480 细胞,采用 CCK-8 检测细胞活力,流式细胞仪检测细胞凋亡和周期。根据凋亡结果将实验分为对照组、5.0 mmol/L Met 组($n=3$),采用 EdU 和克隆形成实验检测细胞增殖,衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色检测细胞衰老代谢,ELASA 检测蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatase 2A,PP2A)酶活性,Western blot 检测蛋白表达。用 PP2A 抑制剂 LB-100 联合 Met 处理细胞并分为对照组、Met 组、Met+LB-100 组、LB-100 组($n=3$),再次用 CCK-8 和克隆形成实验检测细胞增殖,SA-β-ga1 染色检测细胞衰老情况。**结果** Met 以浓度和时间依赖方式显著抑制结直肠癌细胞 LOVO、SW480 增殖($P<0.05$);低浓度(≤5.0 mmol/L)Met 作用下,细胞无明显凋亡,但有明显增殖抑制和 G_0/G_1 期阻滞;细胞呈大而扁平、空泡化增多的典型衰老样态,衰老标志 SA-β-gal 阳性细胞明显增加[LOVO:对照组(5.43±1.37)%,Met 组(17.56±1.89)%,$P<0.001$;SW480:对照组(8.49±2.12)%,Met 组(20.02±3.68)%,$P<0.001$];此时,PP2A 蛋白表达无改变,但磷酸化水平显著降低,PP2A 酶活性则显著升高($P<0.05$),其下游 AKT 蛋白磷酸化水平降低,衰老相关蛋白 P53、P21 等表达明显增加。PP2A 抑制剂 LB-100 联合 Met 处理后,可明显逆转 Met 对细胞增殖的抑制,并延缓 Met 诱导的细胞衰老[LOVO:Met 组(10.55±1.86)%,Met+LB-100 组(3.48±0.85)%,$P<0.001$;SW480:Met 组(20.07±4.89)%,Met+LB-100 组(8.61±1.68)%,$P<0.001$]。**结论** 低浓度 Met 可通过 PP2A/AKT 通路诱导细胞衰老从而抑制结直肠癌细胞增殖。

[**关键词**] 二甲双胍;结直肠癌;细胞衰老;细胞增殖;PP2A
[**中图法分类号**] R735.35; R966; R977.15 [**文献标志码**] A

Metformin induces senescence of colorectal cancer cells through PP2A/AKT pathway

YANG Jianying[1,2], WANG Lingqiao[2], CHEN Weiyan[2], TAN Yao[2], JIN Huidong[2], ZENG Yi[2], GUO Chengwei[2], SUN Yan[1,2], WANG Wenyu[1,2], ZHOU Ziyuan[2], YANG Guanghong[1] [1]School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025; [2]Department of Environmental Health, College of Military Preventive Medicine, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To determine whether metformin(Met) inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by inducing cell senescence, and to preliminarily explore the underlying mechanism. **Methods** LOVO and SW480 colorectal cancer cells were treated with different concentrations of Met(0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 mmol/L). The cell viability was detected by CCK-8 assay, and apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. According to the results of apoptosis, differences between control group (0 mmol/L) and 5.0 mmol/L Met group($n=3$) were compared in following experiments. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, EdU assay, and clone formation assay, senescence metabolism was detected by senescence-

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81273156)
[**通信作者**] 周紫垣,E-mail:ziyuanzhou@tmmu.edu.cn
杨光红,E-mail:280446859@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

associated β-galactosidase (SA-β-gal) staining, protein phosphatase 2A (PP2A) enzyme activity was measured with ELASA, and protein expression was detected with Western blotting. PP2A inhibitor LB-100 was used to treat the cells alone or combined with Met, and then the cells were divided into control group, Met group, Met+LB-100 group, and LB-100 group ($n=3$). Above experiments were performed again. **Results** Met treatment significantly inhibited LOVO and SW480 cells proliferation in a concentration- and time-dependent manner ($P<0.05$). Under the treatment of low concentration (≤5.0 mmol/L) of Met, the cells presented no obvious apoptosis, but were obviously inhibited for proliferation and arrested at G_0/G_1 phase. The cells displayed a typical senescence-like morphology of large, flat and vacuolated, and the number of SA-β-gal positive cells was increased significantly [LOVO: control group (5.43±1.37)% *vs* Met group (17.56±1.89)%, $P<0.001$; SW480: control group (8.49±2.12)% *vs* Met group (20.02±3.68) %, $P<0.001$]. For PP2A, total protein expression showed no change, but phosphorylation level decreased obviously and PP2A activity increased statistically ($P<0.05$), in the meantime, the phosphorylation level of downstream AKT protein decreased and senescence-related proteins p53 and P21 increased significantly. Treatment by PP2A inhibitor LB-100 combined with Met significantly reversed the inhibition of Met on cell proliferation and delayed Met-induced cell senescence [LOVO: Met group (10.55±1.86)% *vs* Met+LB-100 group (3.48±0.85)%, $P<0.001$; SW480: Met group (20.07±4.89)% *vs* Met+LB-100 group (8.61±1.68)%, $P<0.001$]. **Conclusion** Low concentration of Met can induce cell senescence through PP2A/AKT pathway and then inhibit the proliferation of colorectal cancer cells.

[**Key words**] metformin; colorectal cancer; cell senescence; cell proliferation; PP2A

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81273156). Corresponding author: ZHOU Ziyuan, E-mail: ziyuanzhou@tmmu.edu.cn; YANG Guanghong, E-mail: 280446859@qq.com

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)居全球癌症发病率的第3位(10%)、病死率第2位(9.4%),估算仅2020年全球CRC患者达193万人,因CRC死亡的人数约为94万人[1]。近年来,尽管在结直肠癌的治疗方面取得较大进展,但结直肠癌的发病率和病死率仍然呈现不断上升的趋势[2]。结直肠癌发病隐匿,就诊时常已至中晚期导致患者预后、生活质量和生存率大大降低。因此,寻找新的治疗手段,对预防和干预结直肠癌进展,改善患者预后有重要意义。

新近研究证实:诱导细胞衰老是抑制肿瘤细胞生长的重要机制[3]。细胞衰老主要表现为周期停滞状态,且细胞增殖能力不可逆转。虽然衰老细胞不分裂,但它们仍然具有代谢活性,能分泌衰老相关的分泌因子,具有如细胞扁平化、空泡化等形态学改变,衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)活性的增高,细胞增殖能力下降以及周期阻滞等衰老特征[4]。有研究显示:DNA损伤、氧化应激或癌基因激活等非端粒刺激可引起细胞应激性衰老,此时DNA损伤修复反应等信号持续激活并通过p53-p21或p16-Rb途径引发细胞周期阻滞,使细胞提前进入衰老状态[5]。研究表明:在化疗或放疗时,致死剂量下可观察到癌细胞死亡,但在亚致死剂量下则发现细胞有大量衰老[6],衰老的肿瘤细胞可被免疫细胞有效清除,从而抑制肿瘤生长[7]。与诱导细胞凋亡相比,以低剂量的放、化疗诱导细胞衰老可在达到治疗效果的同时减少副作用,提高肿瘤患者的生活质量。因此,在癌症治疗中诱导癌细胞衰老是目前广受关注的癌症治疗策略[8]。

二甲双胍(1,1-二甲基双胍盐酸盐,Met)是一种双胍类衍生物,大量流行病学和实验研究结果提示:Met可抑制多种肿瘤细胞的增殖、对癌症患者的预防和治疗具有一定的作用,已成为一种潜在的癌症治疗候选药物[9-10]。既往认为Met的抗癌作用可能与诱导癌细胞周期阻滞和凋亡、抑制上皮间质转化有关[11-12],但近年来,Met通过诱导如乳腺癌[13-14]、肝癌[15-16]等恶性肿瘤细胞衰老抑制细胞增殖的研究已越来越受关注。目前关于Met是否能诱导结直肠癌细胞衰老以及具体机制仍不清楚。因此,本研究分析不同浓度Met作用对结直肠癌细胞衰老的影响,并探讨其可能的衰老诱导机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结直肠癌SW480、LOVO细胞购于美国ATCC公司,Met购自Sigma Aldrich公司,溶于无菌PBS分装后,于-20 ℃储存备用。胎牛血清、高糖培养基DMEM购于美国HyClone公司。CCK-8试剂购于日本东仁公司,EdU试剂盒购于广州锐博生物有限公司,细胞周期及凋亡试剂盒购于美国BD公司,细胞衰老试剂盒购于上海杰美基因有限公司。ELISA试剂盒购于上海江莱生物技术公司,蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase

2A,PP2A)抑制剂 LB-100 购于上海碧云天公司。PP2A-C、AKT、p-AKT、P53、P21、β-actin 抗体及辣根过氧化酶标记的抗兔、抗鼠二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司,p-PP2A-C 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结直肠癌 LOVO、SW480 细胞培养在含有 10%胎牛血清、1%青-链霉素的高糖培养基 DMEM 中,37 ℃、5%CO_2 条件培养。

1.2.2 CCK-8 检测 Met 对细胞活力的影响 取对数生长期细胞,胰酶消化制成细胞悬液,细胞数 8 000/孔接种于 96 孔板,分为 6 组,每组设 5 个复孔(n=5),待细胞贴壁后,加入终浓度为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L 的 Met,于 37 ℃、5%CO_2 条件培养 24、48、72 h。检测时每孔加入含 10% CCK-8 溶液 100 μL,37 ℃孵育 1 h,检测 450 nm 处的光密度值 D(450)值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞按 15×10^4/孔接种于 6 孔板,分为 6 组(n=3),贴壁后加入终浓度为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L 的 Met,37 ℃、5%CO_2 培养 72 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化,室温 295×g 离心 5 min,预冷 1×PBS 重悬细胞后 295×g 离心 5 min,以 1×Binding Buffer 300 μL 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀,室温避光孵育 15 min,加入 5 μL 的 PI 染色,加 1×Binding Buffer 200 μL 上机检测。

1.2.4 EdU 实验 细胞接种于 24 孔板,贴壁后加入终浓度 5.0 mmol/L 的 Met 培养 72 h,按试剂盒说明书步骤,300 μL 含 EdU 培养基(1 000∶1稀释)孵育 2 h,PBS 清洗 2 次,4%多聚甲醛 300 μL 室温固定 30 min,2 mg/mL 甘氨酸 300 μL 孵育 5 min,PBS 清洗 5 min,加入 300 μL 渗透剂孵育 10 min,PBS 清洗后加入 300 μL 的 1×Apollo® 染色反应液,避光、室温、摇床孵育 30 min,300 μL 渗透剂清洗 3 次,100 μL 甲醇清洗 2 次、PBS 清洗 1 次,300 μL 1× Hoechst 33342 室温避光孵育 30 min 后,PBS 洗 3 次,荧光显微镜下检测。

1.2.5 克隆形成实验 LOVO、SW480 细胞按 2 000/孔接种于 6 孔板,分为对照组、Met 组(n=3)。细胞贴壁后,实验组加入终浓度为 5.0 mmol/L 的 Met,对照组加入等体积培养液,每 3 天换液 1 次,培养 14 d,待有明显克隆形成后,PBS 清洗、结晶紫染色 5 min,依次以 PBS、蒸馏水清洗后晾干、计数,计算克隆形成率。

1.2.6 细胞周期的检测 细胞按 15×10^4/孔接种于 6 孔板,分为对照组、Met 组(n=3),贴壁后加入 5.0 mmol/L 的 Met 处理 72 h,胰酶消化、预冷 PBS 洗涤后,逐滴加入-20 ℃预冷的 75%乙醇 1 mL,于-20 ℃固定 18 h 以上。295×g 离心 5 min,PBS 清洗后,以抗体染色缓冲液清洗细胞 1 次,加入 PI/RNase 染色液 500 μL,室温避光孵育 15 min。4 ℃避光保存样品,1 h 内上流式细胞仪检测。

1.2.7 光学显微镜观察 Met 对细胞形态的影响 以 5.0 mmol/L 的 Met 处理细胞 72 h,4%多聚甲醛室温固定 30 min,PBS 清洗 3 次后于普通光学显微镜下观察。

1.2.8 SA-β-gal 染色实验 细胞接种于 6 孔板,贴壁后以 5.0 mmol/L 的 Met 处理细胞 72 h。按说明书操作,弃原培养液后加入 1 mL 清理液,1 mL 固定液室温固定 5 min,以 1 mL 酸性液清洗细胞表面 2 次后,加入 1 mL 预热的染色工作液。于 37 ℃、无 CO_2 恒温孵育过夜,倒置显微镜下观察。

1.2.9 Western blot 检测相关蛋白的表达 经 Met 处理的细胞,PBS 清洗 3 遍后,加入细胞裂解液 IP、蛋白酶抑制剂 PMSF 以及磷酸酶抑制剂混合液,细胞刮收集细胞,于冰上裂解 30 min,4℃、10 625×g,离心 15 min,收集上清备用。蛋白浓度测定采用 BCA 法。将定量好的蛋白按总体积的 1/5 加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,混匀后 100 ℃水浴 15 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭液封闭,一抗孵育过夜,二抗孵育 1 h 后,再次洗膜 3 次×15 min。ECL 上机曝光显影。

1.2.10 ELASA 检测 PP2A 酶活性 将 LOVO、SW480 细胞接种于 6 孔板,贴壁后用 5.0 mmol/L 的 Met 处理 72 h,按 1.2.9 的方法收集细胞,提取上清备用。然后根据 ELISA 试剂盒操作步骤检测 PP2A 酶活性。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用非配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较,若方差齐采用 LSD 法,若方差不齐采用 Dunnett's T3 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,GraphPad 8.0 软件进行绘图。

2 结果

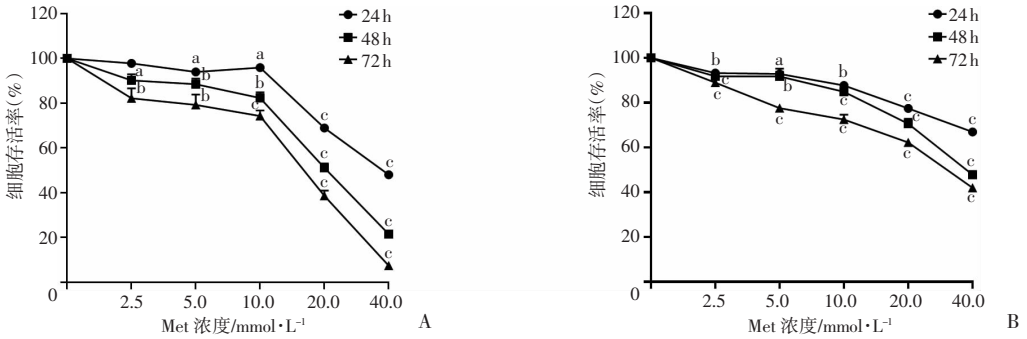
2.1 Met 对结直肠癌细胞的抑制作用

以不同浓度 Met(0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)处理结直肠癌 LOVO、SW480 细胞 24、48、72 h 后,CCK-8 实验结果显示:随着 Met 浓度的增加以及作用时间的延长,两种细胞的活力均下降,呈现明显的时间和剂量关系(图 1)。高剂量 Met 对细胞活性的抑制十分明显,在 10.0 mmol/L 及以下的中低剂量经 72 h 作用后,细胞虽还保留有相当的活性,但已可看到增殖受到明显的抑制(P<0.001),5.0 mmol/L 作用 72 h 时,两种细胞的抑制率均超过了 20%。即使在最低的 2.5 mmol/L 剂量下,也能观察到对细胞有一定的抑制作用,细胞 48 h 存活率:LOVO 为(90.20±2.70)%(P=0.010),SW480 为(91.80±0.89)%(P<0.001);72 h 存活率:LOVO 为(82.24±4.38)%(P=0.007),SW480 为(88.97±1.11)%(P<0.001)。以上结

果提示:Met 对结直肠癌细胞增殖有明显的抑制作用。

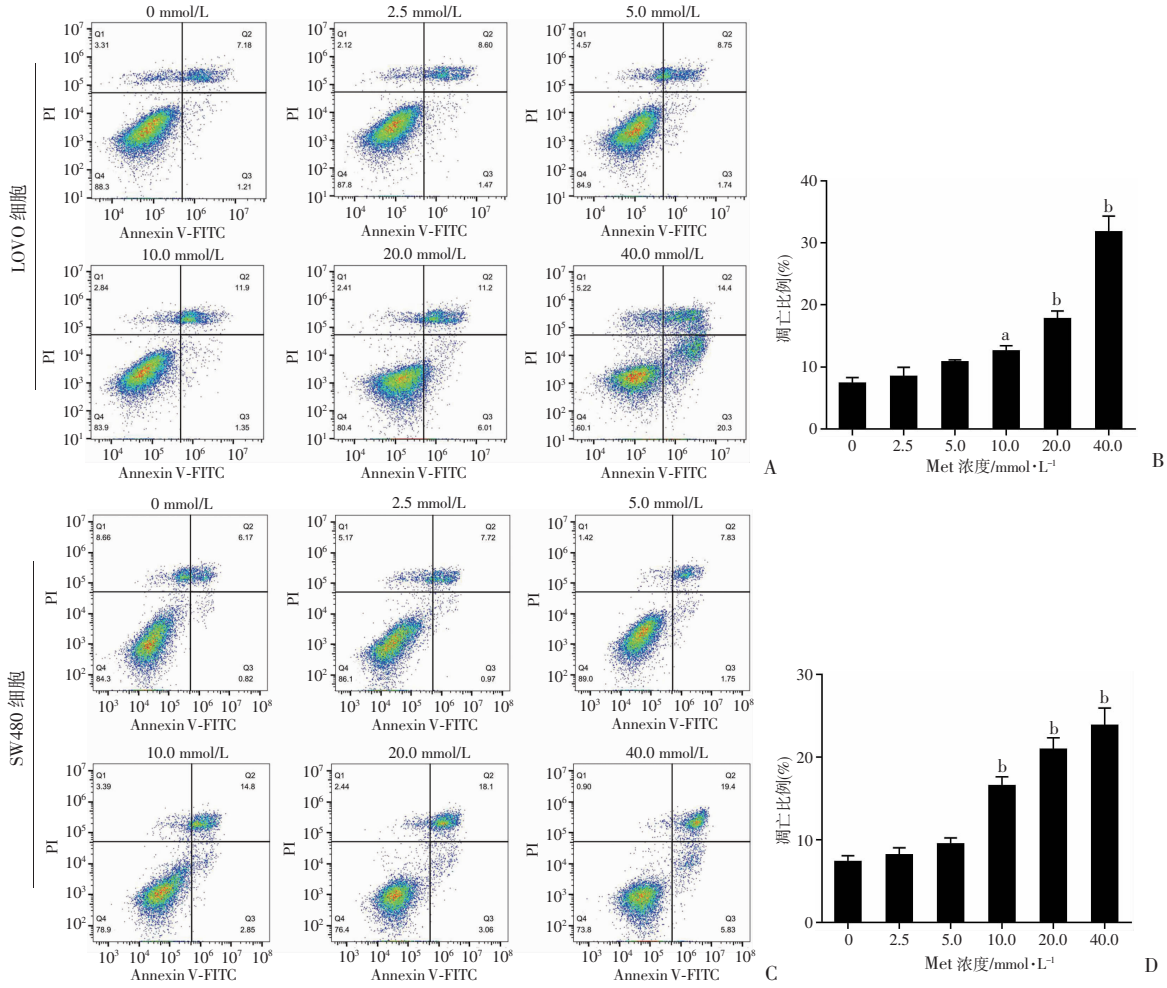
2.2　Met 对结直肠癌细胞凋亡的影响

细胞活性研究结果显示:即使是中低剂量 Met 对结直肠癌细胞也呈现以剂量和时间依赖方式的明显抑制作用。由于既往研究提示 Met 可能直接诱导细胞凋亡,为了明确对结直肠癌细胞的抑制作用是来自于凋亡还是非凋亡的贡献,在前面实验结果基础上,选择细胞抑制作用最明显的 72 h 时间点,检测细胞凋亡情况。结果显示:Met 浓度≥10.0 mmol/L 时有较明显的诱导凋亡作用($P<0.05$),而≤5.0 mmol/L 时细胞无明显凋亡发生(图 2)。为减少后续效应中来自凋亡的影响,选择 5.0 mmol/L 作为后续实验的作用剂量。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 0 mmol/L 比较

图 1　CCK-8 检测不同浓度 Met 对结直肠癌细胞 LOVO(A)、SW480(B)活力的影响($n=5$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 mmol/L 比较

A、C:LOVO 细胞、SW480 细胞凋亡检测;B、D:LOVO 细胞、SW480 细胞凋亡比例

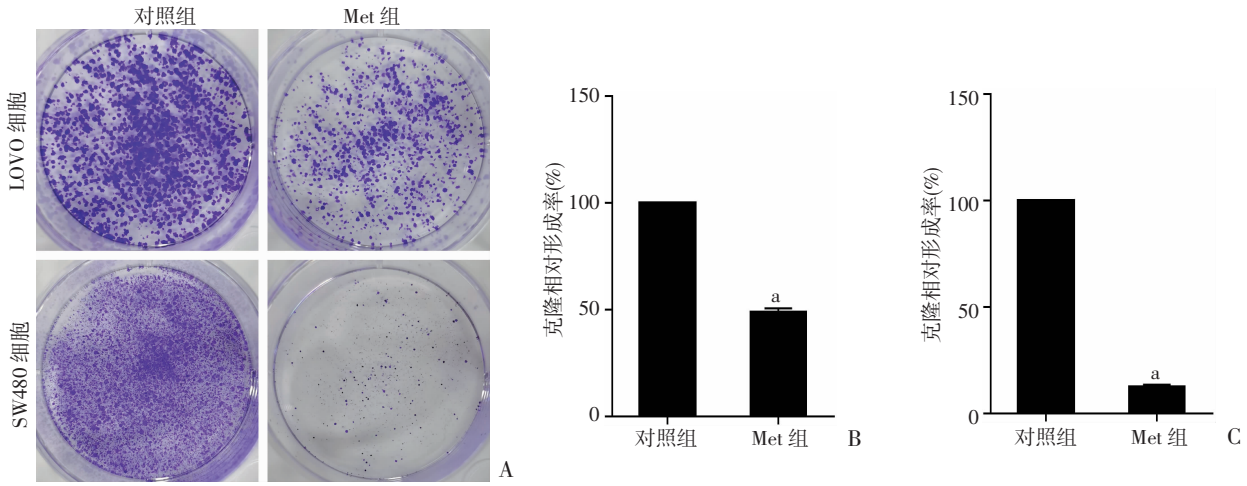
图 2　流式细胞仪检测 Met 对结直肠癌细胞凋亡的影响($n=3$)

2.3　低剂量 Met 抑制结直肠癌细胞克隆形成

用 5.0 mmol/L Met 处理结直肠癌细胞 2 周后,克隆形成实验结果如图 3 所示:Met 处理后,结直肠癌细胞集落数形成明显减少,LOVO 细胞克隆形成数为对照组的(48.97±1.64)%(P<0.001),SW480 细胞克隆形成数为对照组的(12.65±0.85)%(P<0.001)。结果表明:Met 能够抑制结直肠癌细胞的克隆形成能力。

2.4　低剂量 Met 抑制结直肠癌细胞的增殖

为进一步观察 Met 对结直肠癌细胞增殖的影响,采用 EdU 掺入法检测细胞增殖情况。结果如图 4 所示:相对于对照组,经 5.0 mmol/L 的 Met 处理后的细胞,其 EdU 阳性率明显降低,LOVO 细胞 EdU 阳性染色细胞数为(26.47±2.32)%,较对照组(38.80±5.21)%明显减少(P<0.001),SW480 细胞 EdU 阳性染色细胞数为(24.09±4.05)%,较对照组(36.34±4.67)%明显减少(P<0.001)。结果表明:Met 通过抑制 DNA 的合成,进而抑制细胞增殖。



A:克隆形成实验;B、C:LOVO、SW480 细胞克隆相对形成率　a:P<0.001,与对照组比较

图 3　克隆形成实验检测 5.0 mmol/L Met 对结直肠癌细胞 LOVO、SW480 克隆形成的影响(n=3)

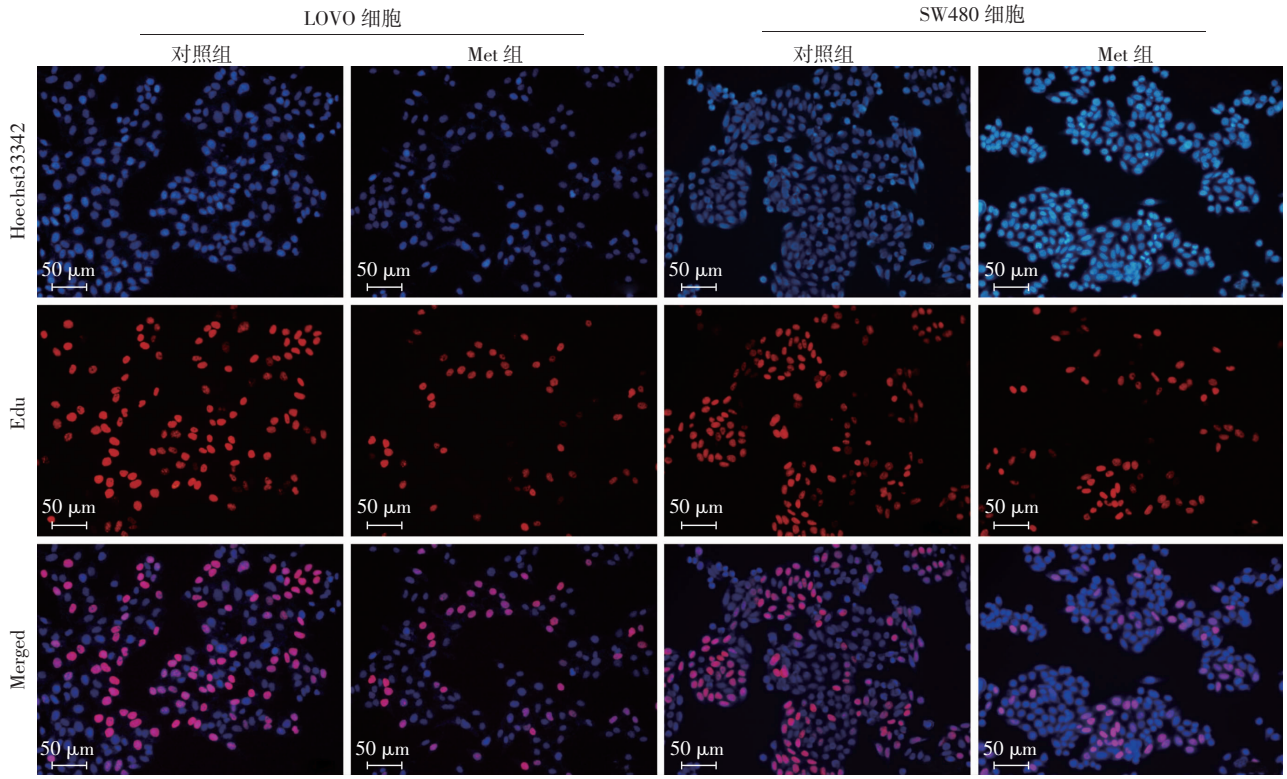


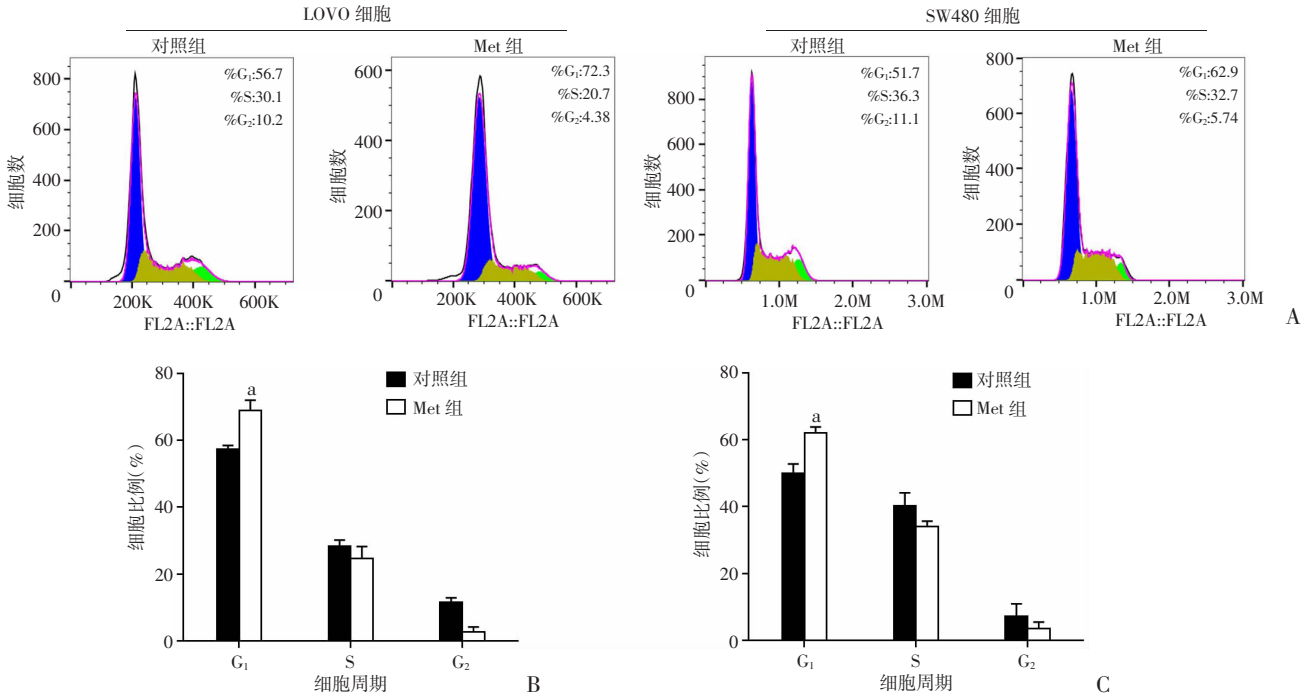
图 4　EdU 实验检测 5.0 mmol/L Met 对结直肠癌细胞增殖的影响(n=9)

2.5　Met 诱导结直肠癌细胞 G_0/G_1 期阻滞

为检测 Met 对结直肠癌细胞增殖的抑制效果是否受到周期调控的影响,采用流式细胞仪进行检测分析。结果显示(图 5):5.0 mmol/L 的 Met 处理后,细胞周期 G_0/G_1 期明显增加[LOVO:对照组(57.43±1.02)%,Met 组(68.93±3.10)%,$P=0.004$;SW480:对照组(50.03±2.72)%,Met 组(62.10±1.74)%,$P=0.003$]。结果表明:Met 可能通过诱导 G_0/G_1 期阻滞来抑制细胞的增殖。

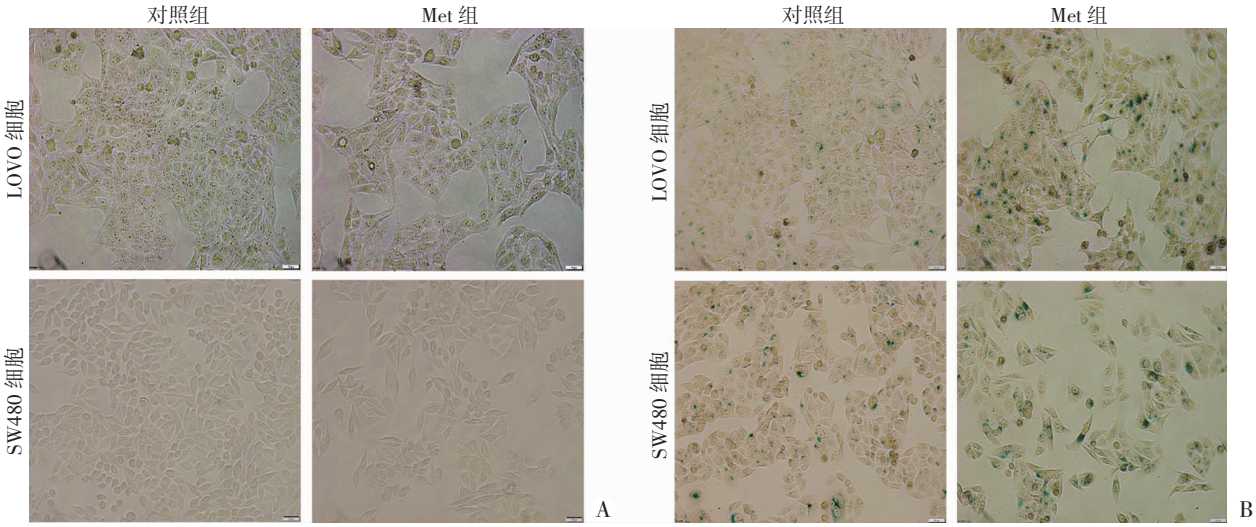
2.6　Met 诱导细胞中 SA-β-gal 活性增加

以 5.0 mmol/L 的 Met 处理结直肠癌细胞 72 h 后,可见处理组细胞数目明显少于对照组,细胞体积、细胞核体积均明显增大,且细胞呈现大而扁平的衰老样形态(图 6A)。经 SA-β-gal 染色发现(图 6B):处理组中呈蓝染 SA-β-gal 阳性细胞显著增多[LOVO:对照组(5.43±1.37)%,Met 组(17.56±1.89)%,$P<0.001$;SW480:对照组(8.49±2.12)%,Met 组(20.02±3.68)%,$P<0.001$],提示 Met 明显诱导了结直肠癌细胞发生衰老样改变。



A:流式细胞仪检测 Met 处理对 LOVO 细胞、SW480 细胞周期的影响;B、C:LOVO 细胞、SW480 细胞周期比例　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　流式细胞仪检测 Met 对结直肠癌细胞周期的影响($n=3$)



A:光镜下观察两种细胞形态(×200);B:两种细胞 SA-β-gal 染色(×200,$n=9$)

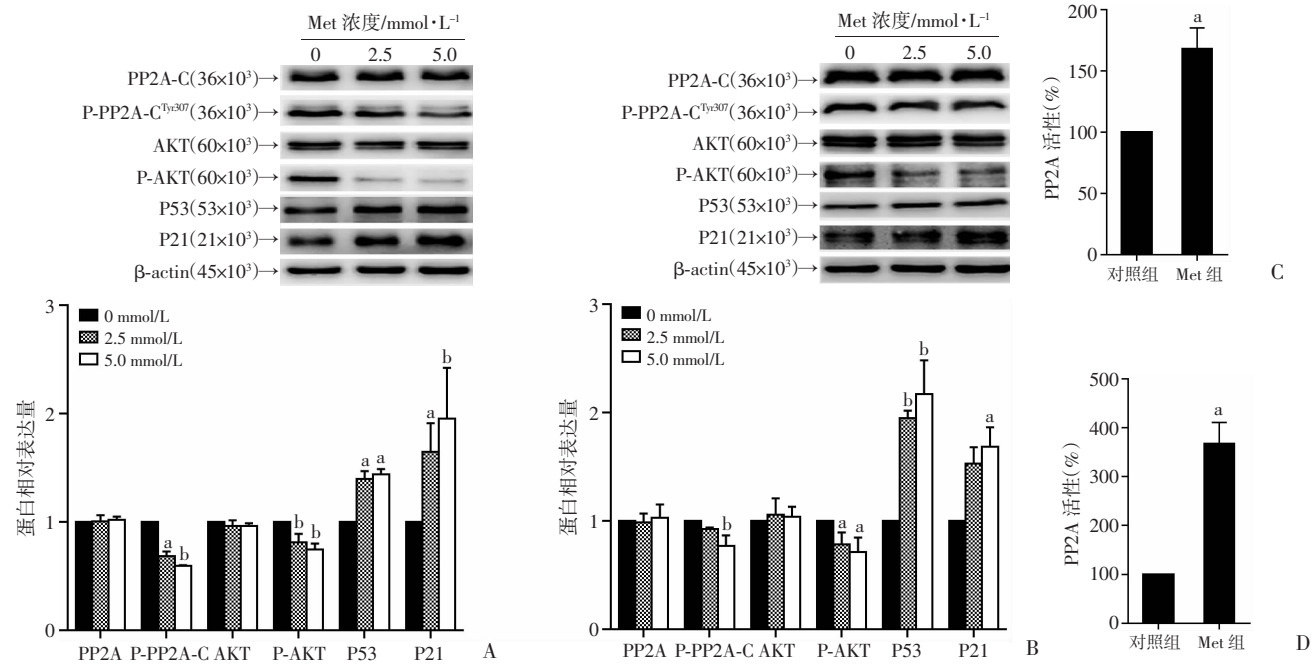
图 6　Met 对细胞衰老的影响

2.7 Met 通过 PP2A 相关通路诱导结直肠癌细胞衰老

为探讨 Met 诱导结直肠癌细胞衰老是否与 PP2A 有关,Western blot 检测结果显示:Met 处理后 PP2A 蛋白表达未发生变化,但在其 C 亚基(PP2A-C)Tyr307 位点上的磷酸化水平则显著降低。由于 PP2A-C 可通过磷酸化失活,进一步检测 PP2A 酶活性,结果显示:Met 处理后细胞中 PP2A 酶活性显著升高($P<0.05$),其变化与 PP2A-C 磷酸化水平降低的影响是一致的。此外,Met 作用后,PP2A 下游靶蛋白 AKT 的磷酸化水平降低,衰老相关蛋白 P53、P21 的表达则明显增加(图 7)。以上结果表明:PP2A/AKT 信号通路可能参与了 Met 诱导的结直肠癌细胞衰老过程。

2.8 PP2A 激活参与 Met 诱导的结直肠癌细胞衰老

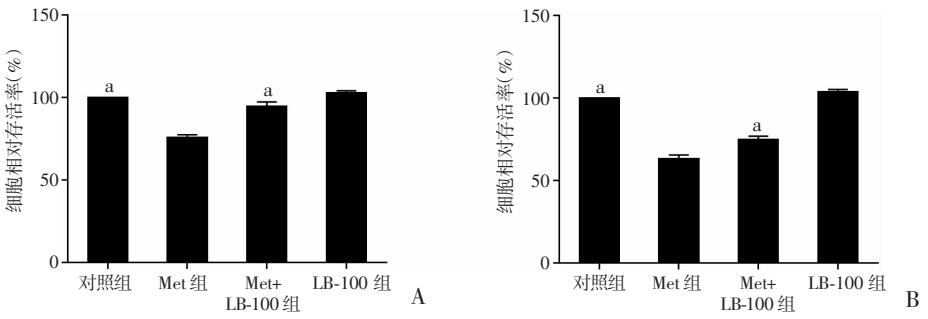
为进一步验证 Met 抑制细胞增殖及诱导细胞衰老是否与激活 PP2A 有关,以 PP2A 抑制剂 LB-100(LB-100 μmol/L)与 Met(5.0 mmol/L)共处理后,再次检测细胞增殖及衰老情况。结果如图 8、9 所示:与对照组相比,Met 单独处理组细胞活力和克隆形成率均明显降低($P<0.001$),衰老细胞则明显增加($P<0.001$),而 LB-100+Met 处理组较单独 Met 处理组显示出更高的细胞活力和增殖($P<0.001$),但衰老细胞明显减少[LOVO:Met 组(10.55±1.86)%,Met+LB-100 组(3.48±0.85)%,$P<0.001$;SW480:Met 组(20.07±4.89)%,Met+LB-100 组(8.61±1.68)%,$P<0.001$],单用 LB-100 组与对照组比较无明显差异。以上结果提示 PP2A 激活参与了 Met 诱导结直肠癌细胞衰老的过程。



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$,与对照组或 0 mmol/L 比较

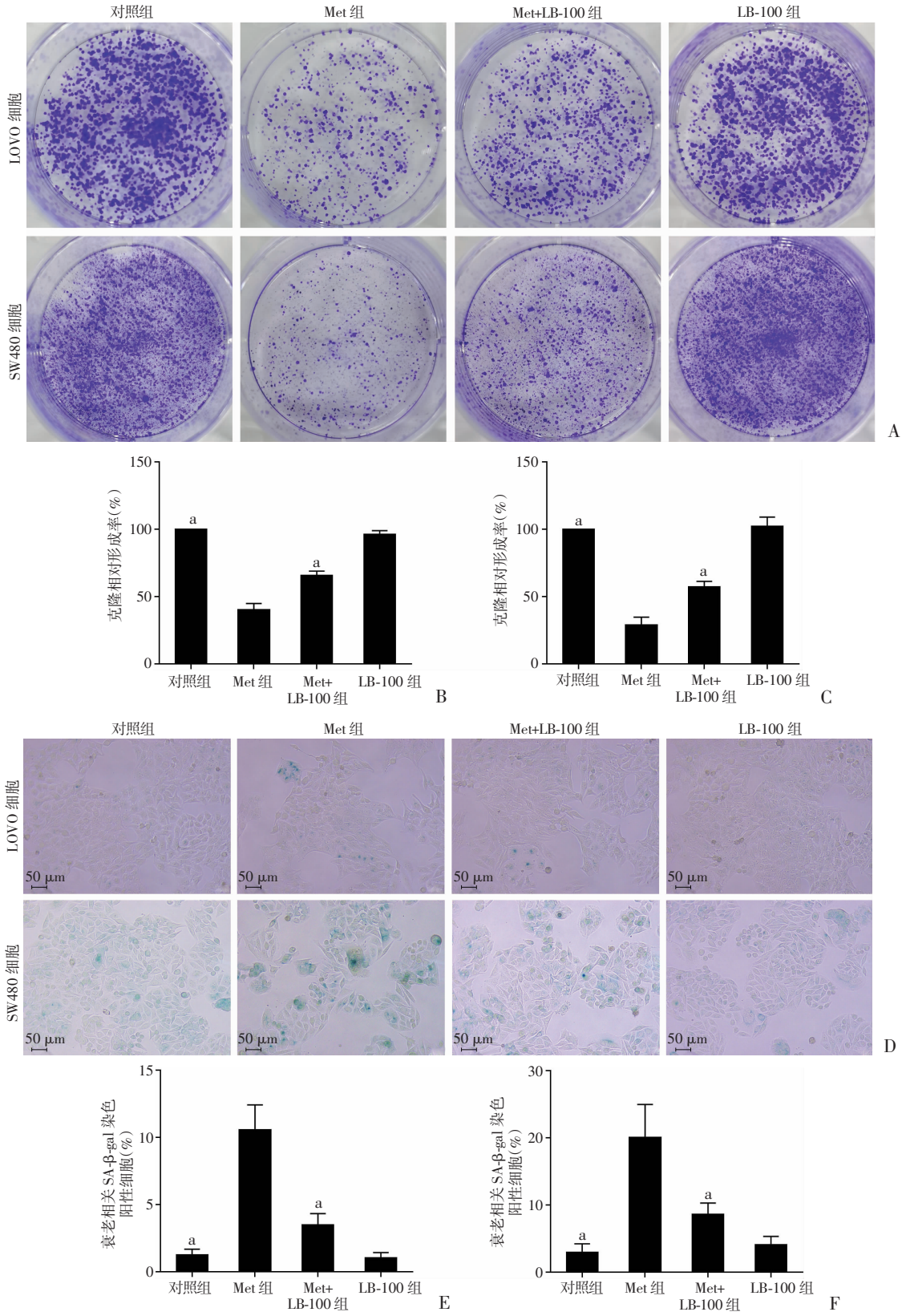
A、B:Western blot 检测 LOVO 细胞、SW480 细胞 PP2A 相关通路蛋白表达;C、D:LOVO 细胞、SW480 细胞 PP2A 磷酸酶活性

图 7 Met 对 PP2A 相关通路蛋白表达及酶活性的影响($n=3$)



a:$P<0.001$,与 Met 组比较

图 8 CCK-8 检测 LOVO 细胞(A)、SW480 细胞(B)活性($n=5$)



a:$P<0.001$,与 Met 组比较

A:LOVO、SW480 细胞克隆形成;B、C:LOVO 细胞、SW480 细胞克隆形成率比较($n=3$);D:LOVO、SW480 细胞 SA-β-gal 染色观察;E、F:LOVO 细胞、SW480 细胞 SA-β-gal 染色阳性细胞计数($n=9$)

图 9 PP2A 抑制剂联合 Met 对结直肠癌细胞增殖及衰老的影响

3 讨论

近年来,Met 对包括结直肠癌在内的多种肿瘤的抑制效应广受关注,但相关分子机制仍有待进一步阐明。体内外研究证实 Met 诱导的 AMPK 激活可单独或与其他抗癌疗法协同抑制结直肠癌细胞生长,但其抗癌作用不仅与 AMPK 的激活有关,可能还存在其他的作用机制[17-19]。本研究分析了不同浓度的 Met 对结直肠癌细胞的效应,发现 Met 以时间-剂量依赖的方式对结直肠癌细胞有显著的抑制作用,并发现其抑制作用在较高剂量(≥10.0 mmol/L)时主要体现为诱导凋亡,但在低剂量时则通过非凋亡途径实现。低剂量(5.0 mmol/L)Met 可诱导细胞呈现典型衰老样形态,同时衰老相关 SA-β-gal 阳性细胞数增多,且周期阻滞在 G_0/G_1 期,提示 Met 剂量较低时对细胞的抑制作用主要可能来自于诱导细胞衰老。有研究报道 Met 具有诱导肝癌、乳腺癌等其他肿瘤细胞衰老的效应[13-16],但是否能诱导结直肠癌细胞衰老及其机制并不清楚。

蛋白磷酸酶 2(PP2A)在调控细胞代谢、增殖、周期、凋亡以及细胞转化等一系列生理过程中发挥着重要作用[20],但 PP2A 在肿瘤细胞中的作用尚不清楚。在癌基因诱导的细胞衰老过程中,敲减 PP2A-B56γ 可抑制 Ras 引起的成纤维细胞衰老[21],人黑色素瘤细胞中过表达 PP2A-B56α 则可诱导 OIS[22],以上结果均提示 PP2A 信号通路在调控细胞衰老过程中可能具有重要作用。PP2A 常通过不同的分子机制失活,包括催化亚基(PP2A-C)在 Tyr307 处的过度磷酸化,影响任何支架或调节亚基的突变或下调,以及内源性 PP2A 抑制剂(如 SET 或 CIP2A)的过表达等[23]。近年来,PP2A-C 过度磷酸化被认为与急性髓系白血病[24]或阿尔茨海默病[25]等有关,有报道在结直肠癌中存在 PP2A-C 的过度磷酸化,但其意义尚不完全清楚[26],但有研究发现 Met 能激活 PP2A,并与其去磷酸化有关[27]。

为进一步探讨 Met 对结直肠癌细胞的衰老诱导是否通过调控 PP2A 来实现,本研究用 Met 诱导结直肠癌细胞衰老后,发现 Met 可下调 PP2A-C 亚基在 Tyr307 位点上的磷酸化水平使 PP2A 激活,PP2A 酶活性显著增加,从而抑制了下游 AKT 磷酸化水平,使衰老相关蛋白 P53、P21 的表达上调,表明低剂量 Met 可能通过 PP2A 激活介导的衰老抑制了结直肠癌细胞的生长和增殖。而用 PP2A 抑制剂 LB-100 处理后,Met 诱导的增殖抑制和细胞衰老明显改善,提示 Met 对结直肠癌细胞衰老的作用主要是由于 PP2A 的激活所引起的。近来有研究显示:用 PP2A 激活剂(FTY720 或 Forskolin)与标准化疗药物联用在抗肿瘤作用中显示出相加效应[26],在结直肠癌中,FTY720 通过抑制 PP2A 的内源性抑制因子 SET 和 CIP2A 的表达从而激活 PP2A,但对 PP2A-C 在 Tyr307 位点磷酸化则无影响。因此,对部分存在 PP2A-C 过度磷酸化的结直肠癌患者,Met 可能具有潜在的治疗应用价值。

本研究证实了 Met 可诱导结直肠癌细胞衰老并初步分析了其作用机制。但是尚缺乏 Met 诱导结直肠癌细胞衰老的体内研究证据,对其作用机制也仅初步分析了 PP2A 途径,并不能确定是否还存在其他可能的衰老诱导机制。此外,在 Tyr307 位点之外的 PP2A 过度磷酸化的结直肠癌,Met 是否也能发挥同样的肿瘤抑制作用,也需进一步研究。

综上所述,本研究发现 Met 可通过诱导结直肠癌细胞衰老而非凋亡途径来抑制细胞的增殖,其诱导衰老可能与 Met 抑制 PP2A 磷酸化,使 PP2A 活化并激活下游相关通路有关。但 Met 激活 PP2A 后的进一步作用机制、是否还存在其他调控通路、Met 是否能与标准化疗药物联合应用等仍需进一步的研究探索。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] WU C, LI M, MENG H, *et al*. Analysis of status and countermeasures of cancer incidence and mortality in China [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(5): 640-647. DOI:10.1007/s11427-018-9461-5.

[3] WYLD L, BELLANTUONO I, TCHKONIA T, *et al*. Senescence and cancer: A review of clinical implications of senescence and senotherapies[J]. Cancers(Basel), 2020, 12(8). DOI: 10.3390/cancers12082134.16/j.canlet.2017.09.027.

[4] ZHOU D, BORSA M, SIMON A K. Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells[J]. Aging Cell, 2021, 20(2): e13316. DOI: 10.1111/acel.13316.

[5] OU H L, SCHUMACHER B. DNA damage responses and p53 in the aging process[J]. Blood, 2018, 131(5): 488-495. DOI:10.1182/blood-2017-07-746396.

[6] EWALD J A, DESOTELLE J A, WILDING G, *et al*. Therapy-induced senescence in cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(20): 1536-1546. DOI:10.1093/jnci/djq364.

[7] XUE W, ZENDER L, MIETHING C, *et al*. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas[J]. Nature, 2007, 445(7128): 656-660. DOI:10.1038/nature05529.

[8] CAIRNEY C J, BILSLAND A E, EVANS T R, *et al*. Cancer cell senescence: a new frontier in drug development[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(5/6): 269-276. DOI:10.1016/j.drudis.2012.01.019.

[9] MALLIK R, CHOWDHURY T A. Metformin in cancer[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 143: 409-419. DOI:10.1016/j.diabres.2018.05.023.

[10] SAFE S, NAIR V, KARKI K. Metformin-induced anticancer activities: recent insights[J]. Biol Chem, 2018, 399(4): 321-335. DOI:10.1515/hsz-2017-0271.

[11] KAMARUDIN M N A, SARKER M M R, ZHOU J R, *et al*. Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 491. DOI:10.1186/s13046-019-1495-2.

[12] XIA C, YANG F, HE Z, *et al*. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the inhibition of cervical cancer cell invasion and migration by metformin[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 123: 109762. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109762.

[13] LI P, ZHAO M, PARRIS A B, *et al*. p53 is required for metformin-induced growth inhibition, senescence and apoptosis in breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(4): 1267-1274. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.07.117.

[14] WILLIAMS C C, SINGLETON B A, LLOPIS S D, *et al*. Metformin induces a senescence-associated gene signature in breast cancer cells[J]. J Health Care Poor Underserved, 2013, 24(1 suppl): 93-103. DOI:10.1353/hpu.2013.0044.

[15] YI G, HE Z, ZHOU X, *et al*. Low concentration of metformin induces a p53-dependent senescence in hepatoma cells *via* activation of the AMPK pathway[J]. Int J Oncol, 2013, 43(5): 1503-1510. DOI:10.3892/ijo.2013.2077.

[16] ZHOU X, CHEN J, CHEN L, *et al*. Negative regulation of Sirtuin 1 by AMP-activated protein kinase promotes metformin-induced senescence in hepatocellular carcinoma xenografts[J]. Cancer Lett, 2017, 411: 1-11. DOI:10.1016/j.canlet.2017.09.027.

[17] ABU E, STRASSBURGER W, QAISER T, *et al*. Differences in p53 status significantly influence the cellular response and cell survival to 1, 25-dihydroxyvitamin D3-metformin cotreatment in colorectal cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2017, 56(11): 2486-2498. DOI:10.1002/mc.22696.

[18] HOSONO K, ENDO H, TAKAHASHI H, *et al*. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(7): 662-671. DOI:10.1002/mc.20637.

[19] MOGAVERO A, MAIORANA M V, ZANUTTO S, *et al*. Metformin transiently inhibits colorectal cancer cell proliferation as a result of either AMPK activation or increased ROS production[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15992. DOI:10.1038/s41598-017-16149-z.

[20] FOWLE H, ZHAO Z, GRAÑA X. PP2A holoenzymes, substrate specificity driving cellular functions and deregulation in cancer[J]. Adv Cancer Res, 2019, 144: 55-93. DOI:10.1016/bs.acr.2019.03.009.

[21] 吴燕芳. PP2A复合物在Ras引起的细胞衰老中的功能初探[D]. 江苏大学,2017.
WU Y F. The preliminary study on the function of PP2A complex in cellular senescence induced by Ras[D]. Jiangsu University, 2017.

[22] MANNAVA S, OMILIAN A R, WAWRZYNIAK J A, *et al*. PP2A-B56α controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells[J]. Oncogene, 2012, 31(12): 1484-1492. DOI:10.1038/onc.2011.339.

[23] O'CONNOR C M, PERL A, LEONARD D, *et al*. Therapeutic targeting of PP2A[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 96: 182-193. DOI:10.1016/j.biocel.2017.10.008.

[24] CRISTÓBAL I, GARCIA-ORTI L, CIRAUQUI C, *et al*. PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect[J]. Leukemia, 2011, 25(4): 606-614. DOI:10.1038/leu.2010.294.

[25] XIONG Y, JING X P, ZHOU X W, *et al*. Zinc induces protein phosphatase 2A inactivation and tau hyperphosphorylation through Src dependent PP2A(tyrosine 307) phosphorylation[J]. Neurobiol Aging, 2013, 34(3): 745-756. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.003.

[26] CRISTÓBAL I, RINCÓN R, MANSO R, *et al*. Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(9): 1823-1829. DOI:10.1016/j.bbadis.2014.06.032.

[27] KAWASHIMA I, KIRITO K. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56alpha subunit[J]. Exp Hematol, 2016, 44(12): 1156-1165. DOI:10.1016/j.exphem.2016.08.005.

(**收稿**:2021-03-30;**修回**:2021-04-13)
(编辑 栾 嘉)