

二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡 及其机制研究

乔晋宇¹, 付思雨¹, 陈明雪¹, 贾子贤¹, 于大永², 史丽颖¹

(1. 大连大学生命健康学院, 辽宁 大连 116622)

(2. 承德医学院基础医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 探讨二甲双胍(Met)联合热疗(HT)诱导人白血病 U937 细胞凋亡及其可能的作用机制。MTT 法检测二甲双胍联合温热(HT+Met)处理对 U937 细胞增殖的影响; Hoechst 33342 染色观察 U937 细胞形态变化; 流式细胞术检测 U937 细胞凋亡、周期、活性氧以及线粒体膜电位的变化情况; Western Blot 检测 U937 细胞中凋亡相关蛋白的表达情况。通过细胞计数及活力实验确定 Met 10 mmol/L 和 HT 44 °C、15 min 为化疗联合热疗的实验条件。Hoechst 33342 荧光染色及 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术分析表明, 与 Met 或 HT 单独处理相比, HT+Met 诱导 U937 细胞凋亡作用增强、活性氧(ROS)产生增加、线粒体膜电位(MMP)降低及 G2/M 期阻滞。Western Blot 结果表明, 与 Met 或 HT 单独处理相比, HT+Met 组 Bax/Bcl-2 蛋白表达上调, Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达下调, 周期蛋白依赖性激酶 CDK1 和周期蛋白 Cyclin B1 表达下调, p-P38/P38 水平显著升高, 加入 NAC(一种 ROS 清除剂)后可显著恢复 HT+Met 组诱导的 p-P38 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达。二甲双胍联合热疗能够诱导 U937 细胞凋亡, 其可能的作用机制为通过死亡受体(外源性)途径、ROS 介导调节线粒体(内源性)途径以及 P38 MAPK 信号通路诱导人白血病 U937 细胞凋亡。

[关键词] 二甲双胍, 热疗, 细胞凋亡, P38 MAPK 信号通路

[中图分类号] R733.7 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2024)03-0087-10

Metformin Combined with Hyperthermia Induces Apoptosis in U937 Cells and Its Mechanisms

Qiao Jinyu¹, Fu Siyu¹, Chen Mingxue¹, Jia Zixian¹, Yu Dayong², Shi Liying¹

(1. School of Life and Health, Dalian University, Dalian 116622, China)

(2. School of Basic Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

Abstract: To investigate the induction of apoptosis in human leukemia U937 cells by metformin (Met) combined with hyperthermia (HT) and its possible mechanism of action. MTT assay was used to detect the effect of metformin combined with warm (HT + Met) treatment on the proliferation of U937 cells. Hoechst 33342 staining was used to observe the morphological changes of U937 cells. Flow cytometry was used to detect the changes of apoptosis, cycle, reactive oxygen species, and mitochondrial membrane potential in U937 cells, and Western Blot assay was used to detect the expression of apoptosis-related proteins in U937 cells. The expression of apoptosis-related proteins in U937 cells was detected by Western Blot. The cell counting and viability assays determined that Met 10 mmol/L and HT 44 °C for 15 min were the experimental conditions for the combination of chemotherapy and hyperthermia. Hoechst 33342 fluorescence staining and Annexin V-FITC/PI flow cytometry analysis showed that HT+Met induced enhanced apoptosis, increased reactive oxygen species (ROS) production, and mitochondrial membrane potential in U937 cells, as compared with Met or HT treatment alone. ROS production was increased, mitochondrial membrane potential (MMP) was decreased, and G2/M phase was blocked. Western Blot showed that Bax/Bcl-2 protein expression was up-regulated, Caspase-3 and Caspase-8 protein expression was down-regulated, CDK1 and Cyclin B1 expression was down-regulated in HT+Met compared with Met or HT alone, p-P38/P38

收稿日期: 2023-07-13.

基金项目: 中国科学院分离分析化学重点实验室开放基金项目(KI2208)、辽宁省教育厅面上项目(LJKMZ20221837).

通讯作者: 史丽颖, 副教授, 研究方向: 天然活性物质研究. E-mail: shiliying@dlu.edu.cn

flow cytometry analysis showed that HT+Met induced apoptosis in U937 cells. The expression of Caspase-3 and Caspase-8, CDK1 and Cyclin B1 was down-regulated. The level of p-P38/P38 was significantly elevated, and the addition of NAC, a ROS scavenger, significantly restored the HT+Met-induced expression of p-P38 and Caspase-3 proteins. Metformin combined with hyperthermia induced apoptosis in U937 cells, and its possible mechanism of action is to induce cell death in human leukemia U937 cells through the death receptor(exogenous) pathway, ROS-mediated regulation of the mitochondrial (endogenous) pathway, and the P38 MAPK signaling pathway.

Key words: metformin, hyperthermia, apoptosis, P38 MAPK signal pathway

二甲双胍(Metformin)是在提取欧洲传统草药山羊豆(*Galega officinalis L.*)时被发现的一种胍类衍生物^[1]. 1918 年,二甲双胍被发现具有降低动物血糖的功效^[2-3]. 自 1957 年上市以来,因其诸多优点被广泛应用于临床,目前已成为世界范围内治疗二型糖尿病最广泛的处方药^[4]. 二甲双胍还可抑制肿瘤细胞的生长、增殖和分化,并可改变肿瘤细胞代谢和表观遗传修饰方面以抑制癌症的发展.

热疗(HT)作为肿瘤的重要辅助治疗手段,是继手术、化疗、放疗和免疫治疗之后的第五种肿瘤治疗手段,可提高肿瘤细胞对药物的敏感性,热疗温度通常在 41~45 °C^[5-7]. 很多研究涉及二甲双胍与其他药物、疗法的联合应用,联合治疗将在未来成为有前途的抗癌疗法. 本研究初步探讨二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡及可能的作用机制.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系来源

人白血病 U937 细胞系获取于日本人类科学基金会.

1.1.2 实验试剂

二甲双胍购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;标准级胎牛血清购自北京索莱宝科技有限公司;Bax 抗体、GAPDH 抗体购自美国 BBI Life Sciences 公司;Bcl-2 抗体购自美国 BOSTER 公司;Caspase-3 抗体购自美国 BOSTER 公司;Caspase-8 抗体及山羊抗兔二抗购自美国 Affinity Biosciences 公司;CCNB1 抗体、CDK1 抗体购自生工生物工程(上海)股份有限公司.

1.1.3 试剂配制

MTT 溶液:250 mg MTT 用 50 mL 1×PBS 溶液避光超声旋涡,微孔滤膜过滤避光分装后置于-20 °C 备用.

RPMI-1640 细胞培养液:RPMI-1640 完全培养液 180 mL,提前缓冻胎牛血清 20 mL,双抗 2 mL,超净台内配制后置于 4 °C 冰箱.

10%过硫酸铵(AP)溶液:取 38.0 mg 混悬助溶于 380 μL 单蒸水中,现用现配.

细胞冻存液:RPMI-1640 完全培养液 3 mL,优级胎牛血清 1.5 mL,DMSO 溶液 0.5 mL,提前预冷,4 °C 短期保存.

蛋白封闭液:取 1 g 脱脂奶粉溶于 20 mL TBST 中,室温下摇床震荡助溶,现用现配.

1.2 实验方法

1.2.1 人白血病 U937 细胞的培养及传代

将置于-80 °C 冻存盒中的人白血病 U937 细胞解冻,800 rpm 离心 3 min,吸弃上清液后再与适量细胞培养液混悬,转移至培养皿内,用显微镜观察无误后,放入细胞培养箱隔时观察细胞生长状态,根据细胞培养液颜色及细胞密度变化,判断细胞是否需要传代.

1.2.2 MTT 实验测定人白血病 U937 细胞活力

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液(密度约为 10⁵/mL),进行以下实验:

①Control 组:将 U937 细胞均匀接种在 96 孔板.

②Met 组:依次加入 10 μL 含有不同浓度(终浓度为 6.25、12.5、25、50 mmol/L)二甲双胍的 1×PBS 溶液,分别在细胞培养箱中培养 24 h、48 h.

③HT 组:将 U937 细胞悬液置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,均匀接种在 96 孔板。

④HT+Met 组:将细胞悬液中加入 10 μL 含二甲双胍的 1×PBS 溶液(终浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L),放入细胞培养箱 30 min,随后将 U937 细胞悬液置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,均匀接种在 96 孔板,放入细胞培养箱中培养 24 h。

⑤Z-VAD-fmk(caspase 广谱抑制剂)组:将 U937 细胞均匀接种在 96 孔板,加入 10 μL 含 Z-VAD-fmk 的 DMSO 溶液(终浓度为 5 μmol/L)。

⑥HT+Met+Z-VAD-fmk 组:将细胞悬液中加入二甲双胍及 Z-VAD-fmk 溶液,使其终浓度分别为 10 mmol/L 和 5 μmol/L,放入细胞培养箱 30 min,随后将装有 U937 细胞悬液的 EP 管置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,均匀接种在 96 孔板(每孔约 9 000 个细胞),放置细胞培养箱中培养 24 h。

药物处理结束前 4 h,每孔加入 10 μL MTT 溶液并充分混匀,再在细胞培养箱中培养 4 h,使其生成甲臞紫色结晶,结束后每孔加入 150 μL 三联液,继续放入细胞培养箱中使其完全溶解(约需 8~12 h),用酶标仪测 570 nm 处 OD 值。

1.2.3 人白血病 U937 细胞增殖实验

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液,Control 组、HT 组、HT+Met 组同“1.2.2”,每 24 h 进行一次细胞计数,共计数 5 次。

1.2.4 人白血病 U937 细胞凋亡形态学观察

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液,①Control 组:继续常规培养;②Met 组:将细胞悬液中加入含二甲双胍的 1×PBS 溶液(终浓度为 10 mmol/L);③HT 组:将装有 U937 细胞悬液的培养皿置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,放入细胞培养箱中;④HT+Met 组:将细胞悬液中加入含二甲双胍的 1×PBS 溶液(终浓度为 10 mmol/L),放入细胞培养箱 30 min,随后将装有 U937 细胞悬液的培养皿置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,放入细胞培养箱中。6 h 后加入适量 Hoechst 33342 染色液(1 mg/mL),轻柔吹打,孵育 30 min 后 4 ℃ 3 000 rpm 离心 5 min,弃去上清,加入 1×PBS 溶液调节密度,混匀后取适量细胞混悬液放在荧光显微镜载玻片上进行观察。

1.2.5 流式细胞术检测人白血病 U937 细胞凋亡

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液,实验分组同“1.2.4”。12 h 后,收集各组细胞,1 000 rpm 离心 5 min,吸弃上清液后在各组离心管中分别加入 1 mL 1×Binding Buffer 溶液,混悬后每组取 500 μL 细胞悬液过 300 目筛网于流式管中,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染液,避光孵育 15 min 后上机检测。

1.2.6 流式细胞术检测人白血病 U937 细胞内活性氧水平

将细胞悬液中加入含二甲双胍的 1×PBS 溶液(终浓度为 10 mmol/L)和 NAC 溶液(终浓度为 5 mmol/L),放入细胞培养箱 30 min,随后将装有 U937 细胞悬液的培养皿置于水浴锅中加热 2 min 后温度达到 44 ℃,继续加热 15 min 后,放入细胞培养箱中。3 h 后,收集各组细胞,离心后吸弃上清液,在每组加入适量 1×PBS 溶液重悬,3 000 rpm 4 ℃离心 5 min,吸弃上清液后加入 500 μL 1×PBS 溶液,混悬后过 300 目筛网于流式管中,避光加入适量的 DCFH-DA 溶液(10 μmol/L),孵育 30 min 后流式细胞仪检测。

1.2.7 流式细胞术检测人白血病 U937 细胞线粒体膜电位

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液,3 h 后,收集各组细胞,1 000 rpm 离心 5 min,吸弃上清液后加入适量 1×PBS 溶液,重悬后,3 000 rpm 4 ℃离心 5 min,吸弃上清液后加入 500 μL 1×PBS 溶液,混悬后过 300 目筛网于各组流式管中,在各组细胞悬液中避光加入适量 Dioc6 溶液(40 nmol/L),孵育 30 min 后流式细胞仪上机检测。

1.2.8 流式细胞术检测人白血病 U937 细胞周期

常规培养人白血病 U937 细胞并制备细胞悬液,实验分组同“1.2.4”。12 h 后,收集各组细胞,弃上清后加入适量预冷的-20 ℃ 70%乙醇溶液,3 000 rpm 4 ℃离心 5 min,吸弃上清液加入 500 μL 1×PBS 溶液混悬,过 300 目筛网后加入适量 RNase(20 μg/mL)20 min,避光加入适量 PI(50 μg/mL),孵育 10 min 后流式

细胞仪检测.

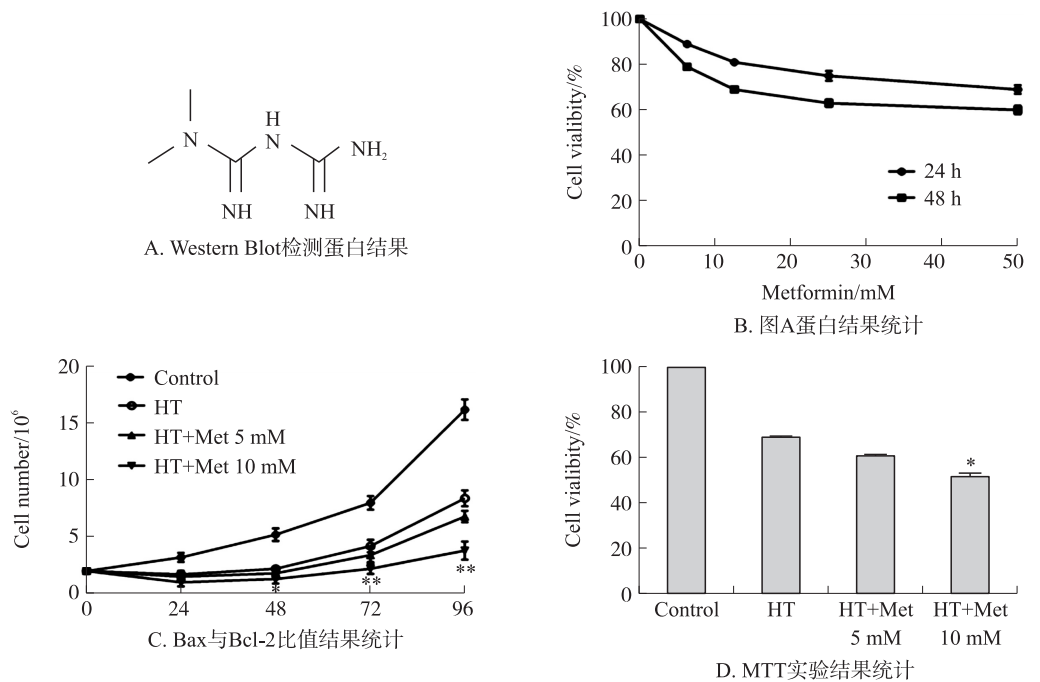
1.2.9 Western Blot 检测实验相关蛋白的表达含量

加入细胞裂解液,4 ℃ 离心后取上清,使用 BCA 法测蛋白浓度,计算加入 4×Loading Buffer 调节直至蛋白浓度达到 20 μg/20 μL,进行 SDS-PAGE 和冰浴转膜,PVDF 膜用封闭液室温封闭 2 h,目的蛋白依次用一抗、二抗稀释液孵育. 洗去一抗二抗,铺上显影液并避光孵育 2 min 后,使用显影仪使 PVDF 膜上目的条带显影.

2 结果与讨论

2.1 二甲双胍联合热疗对人白血病 U937 细胞增殖的影响

二甲双胍(metformin, Met)是一种胍类衍生物(图 1A),如图 1B,在实验药物浓度(−50 mmol/L)范围内,作用于人白血病 U937 细胞 24 h、48 h,U937 细胞的增殖活性与 Met 呈剂量和时间负依赖性,其中 Met 浓度低于 12.5 mmol/L 时对 U937 细胞产生的毒作用很小. 如图 1C,选取 Met 5 mmol/L 和 10 mmol/L 联合热疗处理,检测细胞增殖数量,发现 48 h 时,HT+Met 10 mmol/L 组与 HT 组相比,有显著差异($P<0.05$);在 72 h 后,有极显著差异($P<0.01$). 接下来选取 5 mmol/L 和 10 mmol/L 二甲双胍分别与热疗联合处理 24 h,检测细胞活力,发现 HT+Met 10 mmol/L 组与 HT 组相比,有显著差异($P<0.05$). 综上,选用 10 mmol/L 二甲双胍作为后续作用机理研究条件.



A:二甲双胍结构式;B:不同浓度二甲双胍对人白血病 U937 细胞毒性影响;C:二甲双胍与热疗对 U937 细胞持续增殖的影响;D:二甲双胍与热疗对 U937 细胞活力的影响. 与 HT 组相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$.

图 1 二甲双胍对 U937 细胞毒性及热疗增敏作用效果

Fig. 1 The toxicity of metformin on U937 cells and effect of hyperthermia sensitization

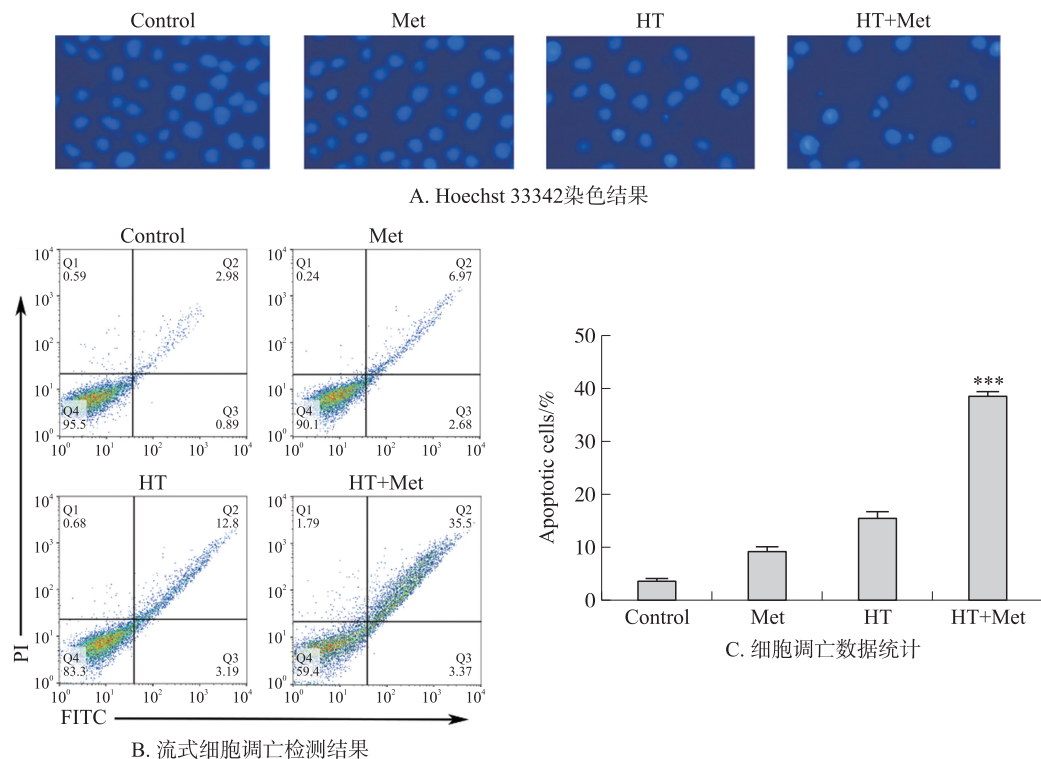
2.2 二甲双胍联合热疗对人白血病 U937 细胞凋亡的影响

如图 2A,显微镜观察可见 Control 组细胞核饱满,排布紧密;Met 组与 Control 组相比,细胞数量轻微减少;HT 组与 Control 组相比,细胞数量明显减少,细胞核皱缩,出现凋亡小体;HT+Met 组与 Control 组相比,细胞数量大量减少,凋亡小体数量增多. 流式细胞术检测 Control、Met、HT、HT+Met 组内人白血病 U937 细胞凋亡比例(图 2B),发现 HT+Met 组与 Met 或 HT 单独处理相比,总凋亡比例增高, $P<0.001$. 综上,二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡作用增强.

2.3 二甲双胍联合热疗对人白血病 U937 细胞内活性氧水平的影响

活性氧(reactiveoxygenspecies,ROS)是生物体内新陈代谢的产物,对机体有益. 但在病理条件下,活性

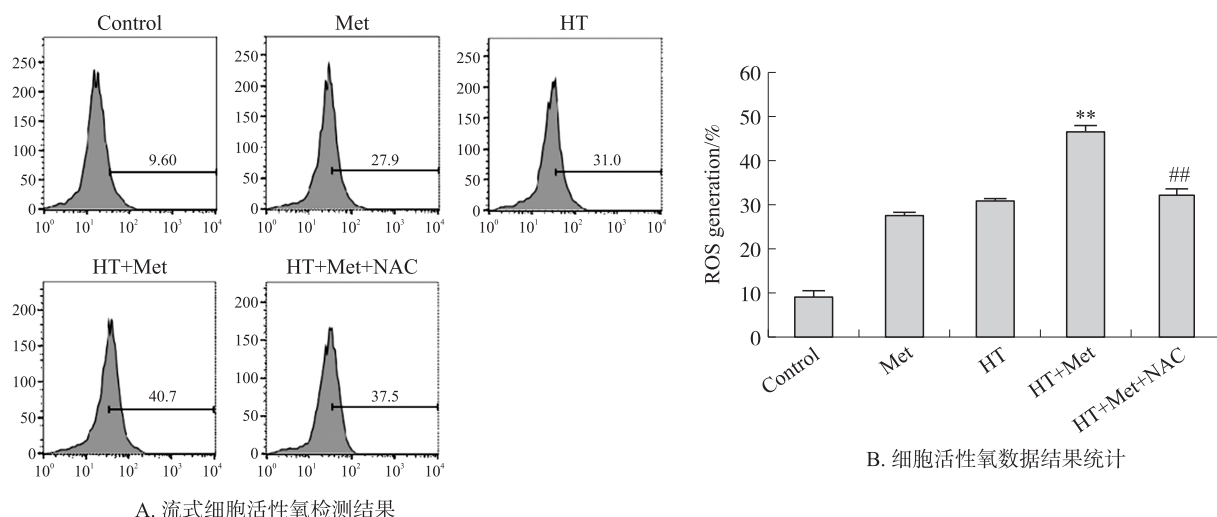
氧过量累积会造成氧化应激损伤,从而启动细胞的程序性死亡^[8]. 利用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 含量,流式细胞术结果如图 3A、3B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组细胞内 ROS 水平显著增加($P<0.01$);与 HT+Met 组相比,HT+Met+NAC 组细胞内 ROS 水平显著减少($P<0.01$). 综上推断,二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡可能是由 ROS 过量累积引发的.



A: Hoechst 33342 染色结果; B: 流式细胞凋亡检测结果; C: 细胞凋亡数据统计. 与 HT 组相比, *** $P<0.001$.

图 2 二甲双胍对热疗诱导 U937 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of metformin on apoptosis of U937 cells induced by hyperthermia



A: 流式细胞活性氧检测结果; B: 细胞活性氧数据结果统计. 与 HT 组相比, ** $P<0.01$; 与 HT+Met 组相比, ## $P<0.01$.

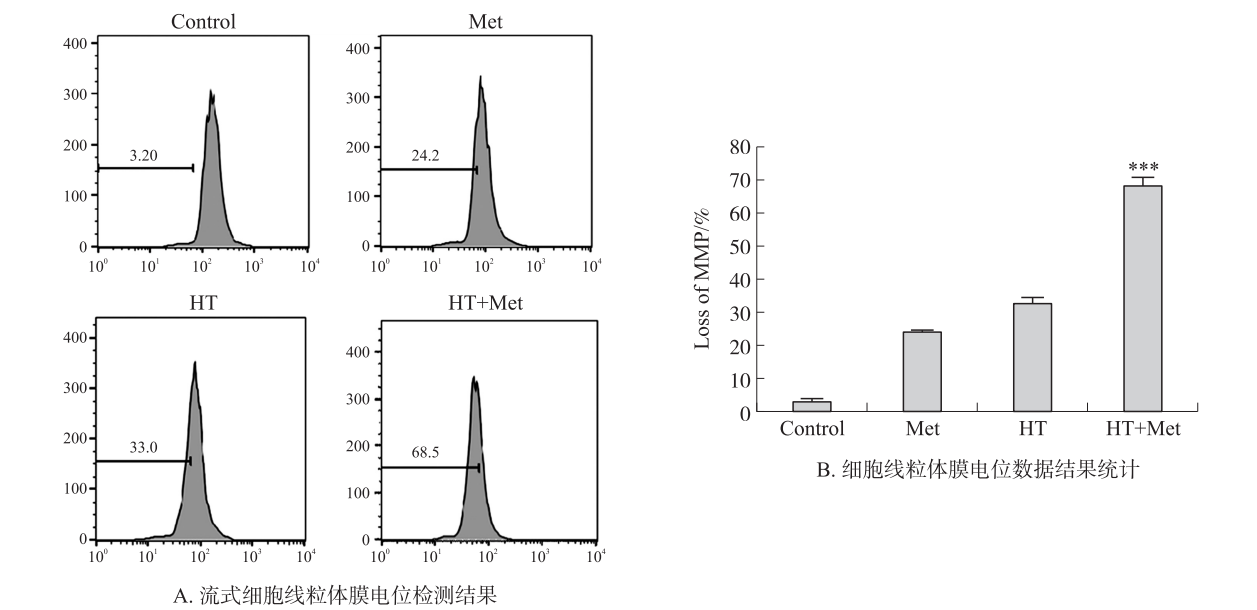
图 3 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞内活性氧含量的影响

Fig. 3 Effect of metformin combined with hyperthermia on ROS of U937 cells

2.4 二甲双胍联合热疗对人白血病 U937 细胞线粒体膜电位的影响

正常的线粒体功能是维持细胞正常生命活动的基础. 线粒体遭到破坏和功能异常时,将会诱导细胞发生不可逆的凋亡过程^[9]. 线粒体膜电位 (mitochondrial membranepotential, MMP) 已成为细胞线粒体功能的重要指标. 利用 DiOC6 染料检测 MMP, 结果如图 4A、4B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组

细胞 MMP 损失显著增加($P<0.001$). 综上推断,二甲双胍联合热疗引起 U937 细胞线粒体功能异常,诱导细胞发生凋亡.



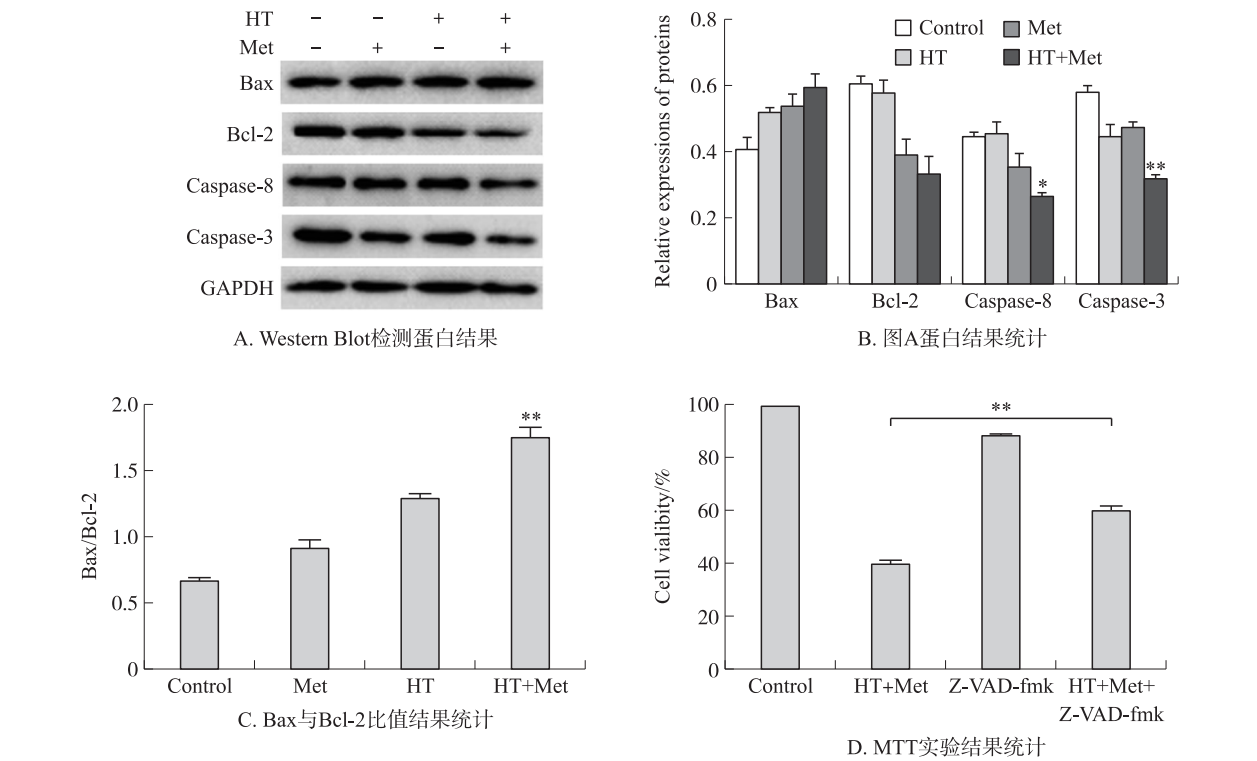
A:流式细胞线粒体膜电位检测结果;B:细胞线粒体膜电位数据结果统计. 与 HT 组相比, *** $P<0.001$.

图 4 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 4 Effect of metformin combined with hyperthermia on MMP of U937 cells

2.5 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞 Caspase 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 5A、B、C 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,Bax/Bcl-2 值显著增加($P<0.01$),表明通过线粒体途径介导 U937 细胞发生凋亡. Caspase



A:Western Blot 检测蛋白结果;B:图 A 蛋白结果统计;C:Bax 与 Bcl-2 比值结果统计;D:MTT 实验结果统计. 与 HT 组相比, * $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与 HT+Met 组相比,## $P<0.01$

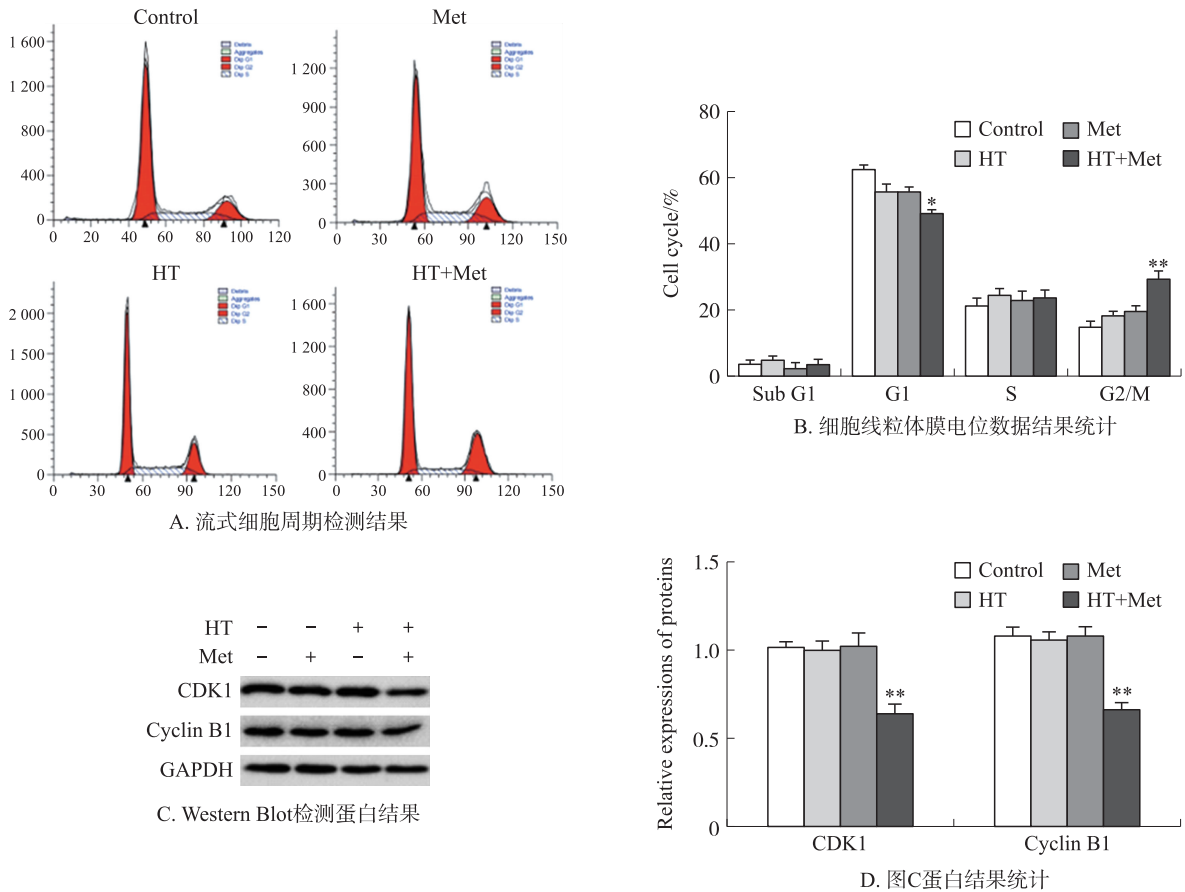
图 5 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞 Caspase 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 5 Effect of metformin combined with hyperthermia on Caspase signal pathway related proteins of U937 cells

在凋亡机制中起着重要的作用,分别通过线粒体途径和死亡受体途径诱导细胞凋亡,而 Caspase-3 和 Caspase-8 是其中最重要的 2 个启动因子^[10]. 结果如图 5B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 U937 细胞 Caspase-3 表达显著下调($P<0.01$),Caspase-8 表达显著下调($P<0.05$). 为进一步验证 Caspase 信号通路参与细胞凋亡机制,在二甲双胍与热疗联合作用前加入 Z-VAD-fmk (Caspase 广谱抑制剂),如图 5D 所示,与 HT+Met 组相比,HT+Met+Z-VAD-fmk 组 U937 细胞活力被显著恢复($P<0.01$). 综上推断,二甲双胍联合热疗通过线粒体途径和死亡受体途径,致使 U937 细胞发生凋亡.

2.6 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞周期的影响

为证实二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡与细胞周期阻滞有关,利用流式细胞术检测细胞各周期比例,结果如图 6A、6B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 U937 细胞在 G2/M 期阻滞($P<0.01$). CDK1 在细胞周期的调控中处于核心地位,其表达紊乱可导致细胞周期进程的失调^[11]. CyclinB1 在调节细胞周期的 G2/M 期进展中起关键作用^[12]. 结果如图 6A、6B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 U937 细胞 CDK1、Cyclin B1 表达下调($P<0.01$). 综上,二甲双胍联合热疗通过引发 G2/M 期阻滞,诱导 U937 细胞发生凋亡.



A:流式细胞周期检测结果;B:细胞线粒体膜电位数据结果统计;C:Western Blot 检测蛋白结果;D:图 C 蛋白结果统计. 与 HT 组相比, * $P<0.05$ 、** $P<0.01$.

图 6 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞周期的影响

Fig. 6 Effect of metformin combined with hyperthermia on cell cycle of U937 cells

2.7 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞 P38 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

P38 MAPK 信号通路介导对细胞生长、分化、增殖、凋亡以及对应激和应激反应的调节^[13]. Western Blot 结果如 7A、7B 所示,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 p-ERK/ERK 水平显著降低($P<0.01$), p-JNK/JNK 和 p-P38/P38 水平显著升高($P<0.05$). 综上表明,二甲双胍与热疗联合引发的氧化应激可通过调节 P38 MAPK 信号通路诱导 U937 细胞发生凋亡,且比 Met 或 HT 单独处理效果显著.

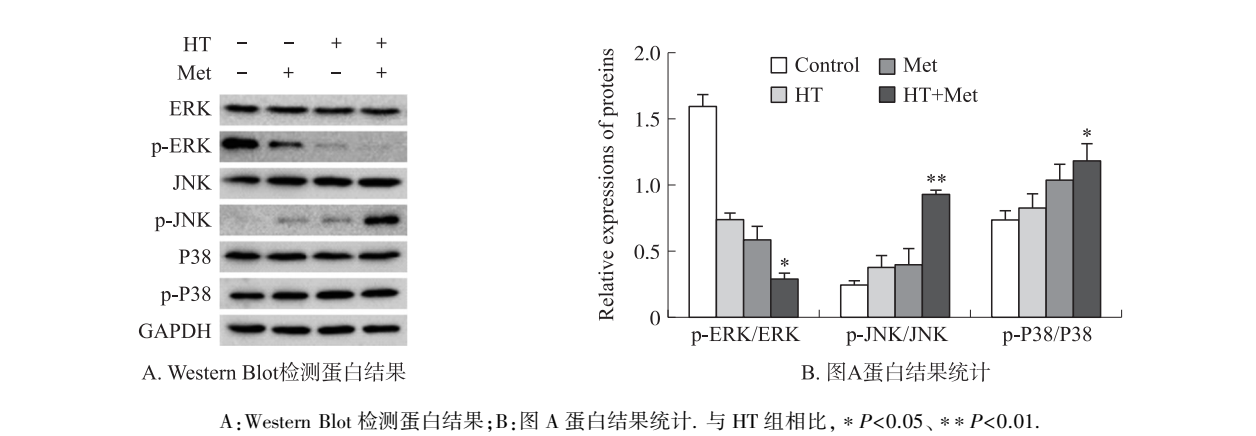


图 7 二甲双胍联合热疗对 U937 细胞 P38 MAPK 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 7 Effect of metformin combined with hyperthermia on P38 MAPK signal pathway related proteins of U937 cells

2.8 NAC 对二甲双胍联合热疗诱导 U937 细胞凋亡的影响

加入 NAC(一种 ROS 抑制剂)进行预处理,验证二甲双胍联合热疗对 P38 MAPK 信号通路相关蛋白和 U937 细胞凋亡的影响是否由氧化应激引发. 如图 8(A、B、C)所示,与 HT+Met 组相比,HT+Met+NAC 组 p-P38/P38 水平显著降低 ($P<0.01$),Caspase-3 表达量显著升高(NAC 2.5 mmol/L 时 $P<0.01$,NAC 5.0 mmol/L 时 $P<0.001$),说明二甲双胍联合热疗通过引起氧化应激调节 P38 MAPK 信号通路相关蛋白从而诱导 U937 细胞凋亡.

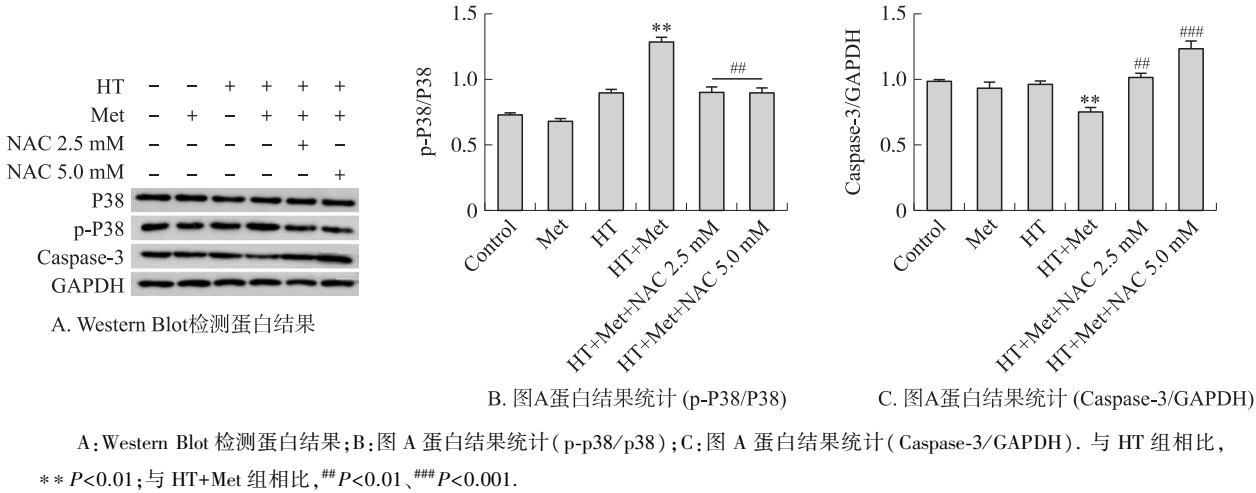


图 8 NAC 对二甲双胍联合热疗 U937 细胞的影响

Fig. 8 Effect of NAC treated with metformin combined with hyperthermia of U937 cells

2.9 讨论

本文通过 Hoechst 33342 荧光染色和 AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测发现,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组诱导 U937 细胞凋亡作用增强 ($P<0.001$)、提高 U937 细胞活性氧(ROS)产生 ($P<0.01$)、降低线粒体膜电位(MMP) ($P<0.001$)及 G2/M 期阻滞 ($P<0.01$),Western Blot 结果表明,与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 Bax/Bcl-2 蛋白表达量升高 ($P<0.01$),Caspase-3 蛋白、CDK1 和 Cyclin B1 表达量降低 ($P<0.01$);与 Met 或 HT 单独处理相比,HT+Met 组 p-ERK/ERK 水平降低 ($P<0.01$),p-JNK/JNK 和 p-P38/P38 水平升高 ($P<0.05$),加入 NAC(一种 ROS 清除剂)后可显著恢复 HT+Met 组诱导的 p-P38 蛋白 ($P<0.01$)和 Caspase-3 蛋白表达 ($P<0.001$),表明 HT+Met 组通过 P38 MAPK 信号通路诱导 U937 细胞凋亡.

细胞周期的失控是肿瘤发生的重要原因之一,抑制肿瘤增殖往往是通过阻断细胞分裂来实现的^[14-15]. 据报道,ROS 的过量产生导致的氧化应激以及线粒体膜电位下降导致线粒体的功能异常,均会诱导细胞凋亡^[16-19].

本文探讨二甲双胍联合热疗诱导人白血病 U937 细胞凋亡及其作用机理,发现 Met 与 HT 联合作用通

过死亡受体(外源性)途径、ROS 介导调节线粒体(内源性)途径、P38 MAPK 信号通路诱导 U937 细胞发生凋亡(图 3),为二甲双胍联合热疗治疗白血病的临床应用提供实验依据.接下来将进一步探究其他信号通路,并完善其之间的联系,为二甲双胍联合热疗治疗白血病和实体瘤提供理论基础.

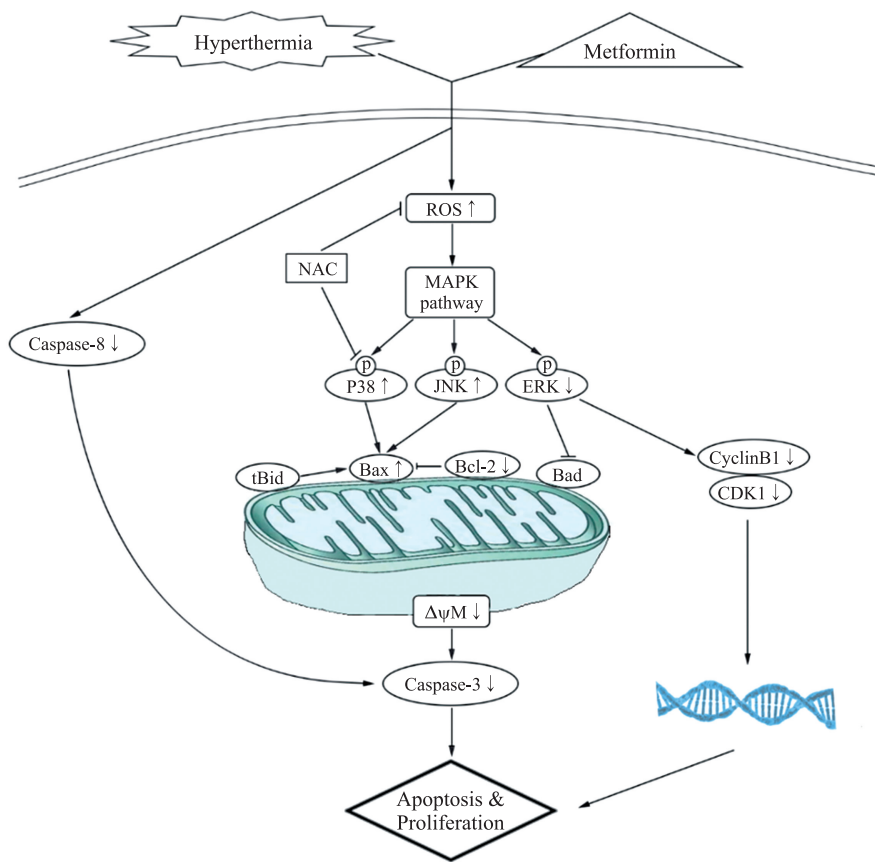


图 9 二甲双胍增强热疗诱导 U937 细胞凋亡和周期阻滞机制
Fig. 9 Mechanism of metformin enhancing apoptosis and cycle arrest of U937 cells induced by hyperthermia.

3 结论

二甲双胍 10 mmol/L 联合热疗(44 ℃,15 min)通过死亡受体(外源性)途径、ROS 介导调节线粒体(内源性)途径以及 P38 MAPK 信号通路诱导人白血病 U937 细胞凋亡.

[参考文献]

[1] BAILEY,CLIFFORD J. Metformin:historical overview[J]. Diabetologia,2017,60:1566-1576.
[2] GOMES M B,RATHMANN W,CHARBONNEL B,et al. Treatment of type 2 diabetes mellitus worldwide: Baseline patient characteristics in the global DISCOVER study[J]. Diabetes research and clinical practice,2019,151:20-32.
[3] 郑海珍,陈彩飞. 达英-35、二甲双胍联合克罗米芬治疗多囊卵巢综合征不孕患者的临床疗效[J]. 中国妇幼保健,2010,25(30):4431-4433.
[4] SHUBHA S,AMBLER G R,BAUR L A,et al. Randomized,controlled trial of metformin for obesity and insulin resistance in children and adolescents:improvement in body composition and fasting insulin[J]. Journal of clinical endocrinology and metabolism,2016,91(6):2074-2080.
[5] LI X,ZHANG X,KHAN I U,et al. The anti-tumor effects of the combination of microwave hyperthermia and lobaplatin against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J].Bioscience reports,2022,42(2):BSR20190878.
[6] LI P,ZHAO Q L,REHMAN M U,et al. Isofraxidin enhances hyperthermia-induced apoptosis via redox modification in acute monocytic leukemia U937 cells[J]. Molecular medicine reports,2023,27(2):46-87.
[7] PIAO J L,JIN Y J,LI M L,et al. Excessive oxidative stress in the synergistic effects of shikonin on the hyperthermia-induced

- apoptosis[J]. *Current molecular medicine*, 2018, 18(5):322–334.
- [8] DAI G, LI Y, ZHANG M, et al. The regulation of the ampk/mtor axis mitigates tendon stem/progenitor cell senescence and delays tendon aging[J]. *Stem cell reviews and reports*, 2023, 16(9):126–137.
- [9] 尹春金. 人参皂苷 Re 对乙醇诱导的大鼠 H4IIE 肝细胞线粒体功能损伤的作用机制[D]. 吉林:延边大学, 2022.
- [10] JIKUN D, DAIBO S, JINWEN L, et al. Paeonol triggers apoptosis in HeLa cervical cancer cells; the role of mitochondria-related caspase pathway[J]. *Psychopharmacology*, 2022, 239(7):2083–2092.
- [11] YANG Y, DAI Y, YANG X, et al. DNMT3A mutation-induced CDK1 overexpression promotes leukemogenesis by modulating the interaction between EZH2 and DNMT3A[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6):781.
- [12] FAN X, ZHAO Z, MA L, et al. PTBP1 promotes IRES-mediated translation of cyclinB1 in cancer[J]. *Acta biochimica et biophysica sinica*, 2022, 54(5):696–707.
- [13] WANG Y, HAN Y, WANG Y, et al. Expression of p38MAPK and its regulation of apoptosis under high temperature stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2022, 122:288–297.
- [14] 马金苗, 项志兵, 朱杰, 等. 附黄汤改善心力衰竭大鼠的心室重构: 基于抑制 AMPK/mTOR 通路介导的细胞自噬[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3):466–473.
- [15] CHEN N, LI P, LIU L, et al. Cucurbitacin IIb extracted from *hemsleya penxianensis* induces cell cycle arrest and apoptosis in bladder cancer cells by regulating cell cycle checkpoints and mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Plant foods for human nutrition*, 2023, 23(1):56–80.
- [16] SAHOO B M, BANIK B K, BORAH P, et al. Reactive Oxygen Species (ROS): Key components in cancer therapies[J]. *Anticancer agents in medicinal chemistry*, 2022, 22(2):215–222.
- [17] NAKAMURA H, TAKADA K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions[J]. *Cancer science*, 2021, 112(10):3945–3952.
- [18] SAKAMURU S, ZHAO J, ATTENE-RAMOS M S, et al. Mitochondrial membrane potential assay[J]. *Methods in molecular biology*, 2022, 247(4):11–19.
- [19] GREEN D R, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. *Science*, 2004, 305(5684):626–629.

[责任编辑:黄 敏]