

基础研究

DOI :10.13406/j.cnki.cyx.001809

乳腺癌拉帕替尼耐药模型建立及二甲双胍逆转其耐药性的初步探讨

王 婷¹ 陈 鹏¹ 徐 婷¹ 郭 丹² 黄佳祎¹

(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 重庆 400016 2. 重庆医科大学附属第二医院三腺外科, 重庆 400010)

【摘要】目的 建立乳腺癌拉帕替尼耐药模型并初步探讨二甲双胍对其耐药性的逆转作用。方法 体外建立乳腺癌拉帕替尼耐药模型, 实验分为亲本组、空白耐药组、拉帕替尼组二甲双胍组和联合用药组 ($n=3$)。CCK-8 法检测并计算空白耐药组细胞耐药倍数及二甲双胍组细胞逆转耐药倍数; 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测各组细胞凋亡率和周期; Western blot 检测各组细胞 PI3K 信号通路相关蛋白的表达水平。结果 空白耐药组细胞对拉帕替尼敏感性降低, 亲本组、空白耐药组及二甲双胍组细胞 IC_{50} 值分别为 (2.64 ± 0.12) 、 (1.21 ± 0.03) 、 (5.62 ± 0.13) $\mu\text{mol/L}$, 耐药倍数约为 4.25, 逆转耐药倍数约为 2.0; 二甲双胍组 (0.73 ± 0.04) 细胞增殖指数较空白耐药组 (1.11 ± 0.02) 明显降低 ($P=0.004$), 联合用药组 (0.63 ± 0.06) 细胞增殖指数较空白耐药组 (1.11 ± 0.02) 同样明显降低 ($P=0.031$); 二甲双胍组 $[(10.70 \pm 0.76)\%]$ 细胞凋亡率较空白耐药组 $[(5.05 \pm 0.59)\%]$ 明显增高 ($P=0.007$), 联合用药组 $[(24.68 \pm 1.52)\%]$ 细胞凋亡率较空白耐药组 $[(5.05 \pm 0.59)\%]$ 同样明显增高 ($P=0.006$), 联合用药组中 PI3K 信号通路相关磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白表达较空白耐药组均下降。结论 成功建立乳腺癌拉帕替尼耐药模型, 二甲双胍通过抑制 PI3K 信号通路逆转乳腺癌拉帕替尼耐药性。

【关键词】乳腺癌; 二甲双胍; 拉帕替尼; 逆转耐药; PI3K 信号通路

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-25

Establishment of lapatinib-resistant breast cancer and preliminary study on the resistance-reversing function of metformin

Wang Ting¹, Chen Peng¹, Xu Ting¹, Guo Dan², Huang Jiayi¹

(1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Thyroid, Pancreatic and Breast Surgery of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective To establish a model of lapatinib-resistance in breast cancer and explore the reversal effect of metformin on the resistance. **Methods** The model of lapatinib-resistance in breast cancer was established in vitro. The experiment cells were divided into the parent group, blank resistance group, lapatinib group, metformin group and lapatinib-metformin group ($n=3$). CCK-8 method was used to detect and calculate the resistance times of blank resistance group and the resistance-reversing times of metformin group. The apoptosis rate and cycle of each group were detected by FCM, and the expressions of proteins related to PI3K signaling pathway in each group by Western blot. **Results** The sensitivity of cells to lapatinib in blank resistance group was lowered. IC_{50} values in the parent group, blank resistance group and metformin group were (2.64 ± 0.12) , (1.21 ± 0.03) and (5.62 ± 0.13) $\mu\text{mol/L}$ respectively. The drug resistance was about 4.25 and the reversal of drug resistance was approximately 2.0. Compared with the blank resistance group, the cell proliferation index significantly decreased in both metformin group $(0.73 \pm 0.04$ vs. $1.11 \pm 0.02)$ ($P=0.004$) and the lapatinib-metformin group $(0.63 \pm 0.06$ vs. $1.11 \pm 0.02)$ ($P=0.031$), while the cell apoptosis rate significantly increased in both metformin group $[(10.70 \pm 0.76)\%]$ vs. $[(5.05 \pm 0.59)\%]$ ($P=0.007$) and the lapatinib-metformin group $[(24.68 \pm 1.52)\%]$ vs. $[(5.05 \pm 0.59)\%]$ ($P=0.006$). The expressions of PI3K signaling pathway-associated phosphorylated and non-phosphorylated proteins in lapatinib-metformin group were lower than those in the blank resistance group. **Conclusion** The lapatinib-resistant model of breast cancer has been successfully established. Metformin can reverse the drug resistance of lapatinib in breast cancer cell by inhibiting the PI3K signaling pathway.

作者介绍 王 婷, Email: 763284765@qq.com,

研究方向 乳腺癌耐药基础研究。

通信作者 黄佳祎, Email: z738741@126.com。

基金项目 国家自然科学基金青年资助项目 (编号: 81201679)。

优先出版 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1016.014.html>
(2018-07-04)

【Key words】breast cancer; metformin; lapatinib; reversal resistance; PI3K signaling pathway

乳腺癌是全球高发性疾病,严重威胁女性健康^[1]。其中表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2)阳性的患者肿瘤恶性程度更高、更易复发和远处转移^[2-3]。近年来,新型靶向药物拉帕替尼 (apatinib)是治疗 HER2 阳性乳腺癌的重要手段之一^[4-5]。然而,相当一部分患者最终会发展为拉帕替尼耐药,为临床治疗带来了新的障碍和难题^[6]。目前为止,人们对拉帕替尼的耐药机制尚不完全清楚。二甲双胍 (metformin, MET)是一类广泛用于治疗 2 型糖尿病的降糖药物。近来有研究表明,二甲双胍可抑制包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生和发展^[7-8],且能够增加非小细胞肺癌对化疗药物的敏感性^[9],逆转卵巢癌细胞对化疗药物的耐药性^[10]。本文拟建立拉帕替尼乳腺癌耐药株模型,试探究二甲双胍能否逆转乳腺癌细胞对拉帕替尼的耐药性,以及是否通过调节 PI3K 信号通路中相关磷酸化和非磷酸化蛋白的表达而发挥作用,以期对乳腺癌临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞株 SKBR3 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂 拉帕替尼购自德诺和生物公司 (04),二甲双胍购自美仑生物公司 (MB1927),CCK-8 试剂购自日本同仁公司 (CK04),结晶紫试剂、二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (C2H6SO) 均购自碧云天生物技术研究,BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪公司 (00121506),SDS-PAGE 凝胶速配试剂盒购自金斯瑞生物科技有限公司 (L00670-50T),兔抗人 PI3K 抗体、P-PI3K (Ser249) 抗体、mTOR 抗体、P-mTOR (Ser2448) 抗体、AKT 抗体和 P-AKT (Ser473) 抗体均购自 Cell Signaling Technology (CST),超敏 ECL 化学发光检测试剂盒购自爱必信 (上海) 生物科技有限公司 (EL0511005)。

1.1.3 主要仪器 Thermo 二氧化碳细胞培养箱 (371),Eppendorf 低温离心机 (5415D),Thermo 全波长酶标仪 (Multi-skan GO),Bio-Rad 电泳仪 (1645050),Bio-Rad 自动凝胶成像仪 (Universal Hood, DOC)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及药物配制 用含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养细胞,置于 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中,当细胞融合度约为 80%时传代。拉帕替尼药物用 DMSO 溶解配制成浓度为 20 mmol/L 的储备液,二甲双胍药物用双蒸水溶解配制成浓度为 20 mmol/L 的储备液,-20 °C 保存,使用时根据需要再稀释成不同浓度的工作液。

1.2.2 耐药细胞模型的建立与鉴定

1.2.2.1 耐药模型建立与分组 采用逐步增加拉帕替尼药物浓度方法建立耐药模型。拉帕替尼浓度依次为 0.5、1.0、

2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0、22.5、25.0 μmol/L。历时 7 个月,SKBR3 细胞可在含 25 μmol/L 拉帕替尼培养液中稳定生长。将此模型细胞命名为 SKBR3-LR。本实验分 5 组,亲本组、空白耐药组、拉帕替尼组 (25 μmol/L 拉帕替尼)、二甲双胍组 (5 mmol/L 二甲双胍)和联合用药组 (25 μmol/L 拉帕替尼和 5 mmol/L 二甲双胍) (n=3)。

1.2.2.2 结晶紫染色实验 将处于对数增殖期的细胞用胰蛋白酶消化后,以每孔 1×10⁵ 数量接种于 6 孔板,24 h 后待细胞贴壁,分别加入浓度为 25 μmol/L 和 10 μmol/L 的拉帕替尼及药物溶剂 DMSO。培养 48 h 后,吸弃培养液,PBS 清洗 2 遍,加入结晶紫染液常温染色。

1.2.2.3 CCK-8 法检测细胞敏感性 将处于对数增殖期的细胞用胰蛋白酶消化后,以每孔 5×10³ 数量接种于 96 孔板。设置空白对照组和阴性对照组,设 3 个复孔。24 h 后,依次加入不同浓度的拉帕替尼 (0.5、1.5、5.0、15.0 和 40.0 μmol/L)。48 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C 孵育 3 h 后终止培养。酶标仪 (波长 450nm)测吸光度值,实验重复 3 次取均值,计算 IC₅₀ 值、耐药倍数及逆转耐药倍数。耐药倍数=耐药细胞株 IC₅₀ 值/亲本细胞株 IC₅₀ 值。逆转耐药倍数=使用逆转剂前 IC₅₀ 值/使用逆转剂后 IC₅₀ 值。

1.2.3 流式细胞术揭示的细胞周期的改变

1.2.3.1 流式细胞术检测细胞周期 取对数增殖期的各组细胞,用胰蛋白酶消化收集。800 r/min 离心 5 min,弃上清。PBS 液清洗 2 次后用预冷的 70%乙醇固定过夜,PBS 清洗去除乙醇。流式细胞仪检测细胞周期,根据公式计算细胞增殖指数。增殖指数=(S 期百分比+C₂M 期百分比)/(G₀/G₁ 期百分比)。

1.2.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数增殖期的各组细胞,用胰蛋白酶消化收集。800 r/min 离心 5 min,弃上清。PBS 液清洗 2 次后用预冷的 PBS 重悬细胞并进行计数,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 Western blot 检测各组细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达 各组细胞用相应药物处理 48 h 后,按试剂盒步骤处理收集蛋白,BCA 法检测各蛋白样本浓度;10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后转移至 PVDF 膜;用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗 (mTOR、P-mTOR、AKT、P-AKT、PI3K、P-PI3K 和 β-actin) 均 1:1 000 稀释,4 °C 过夜,TBST 溶液摇床洗 5 min,重复 3 次,加入二抗 (1:3 000)室温孵育 2 h;TBST 溶液摇床洗 5 min,重复 3 次;于自动曝光显影仪检测。

1.3 统计学分析

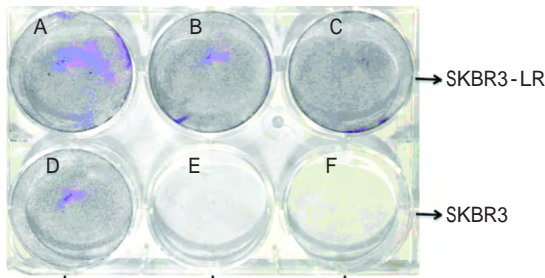
使用 GraphPad Prism5.0 和 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,结晶紫染色结果和存活率结果采用析因分析,其余数据的比较用单因素方差分析,其中两两比较采用 SNK-q 检验,实验数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 结晶紫染色结果

随着拉帕替尼药物浓度的增加,空白耐药组 (A~C)活细

胞数量明显多于亲本组 (D~F), 且差异具有统计学意义。说明耐药组细胞对拉帕替尼的敏感性明显降低 (图 1)。



0 μmol/L lapatinib 10 μmol/L lapatinib 25 μmol/L lapatinib

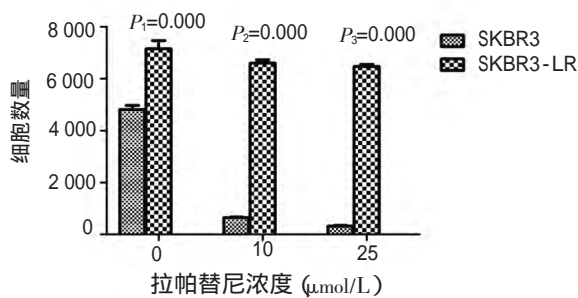


图 1 亲本组 (SKBR3) 与空白耐药组 (SKBR3-LR) 细胞结晶紫染色结果

2.2 CCK-8 检测结果

拉帕替尼浓度为 1.5、5.0、15 μmol/L 时, 空白耐药组存活率明显高于亲本组, 差异具有统计学意义; 拉帕替尼浓度为 5 和 15 μmol/L 时, 二甲双胍组存活率明显低于空白耐药组, 差异具有统计学意义。计算结果显示, 亲本组细胞、空白耐药组细胞及二甲双胍组细胞 IC₅₀ 值分别为 (2.64 ± 0.12)、(11.21 ± 0.03)、(5.62 ± 0.13) μmol/L。耐药倍数约为 4.25。耐药逆转倍数约为 2.0 (表 1, 图 2)。

2.3 各组细胞周期及增殖指数变化

各组细胞周期结果见表 2。根据公式计算增殖指数, 结果显示 (F=23.895, P=0.000) 二甲双胍组增殖指数低于空白耐

药组 (P=0.004), 联合用药组增殖指数低于空白耐药组 (P=0.031), 差异具有统计学意义。

表 1 CCK-8 法检测亲本组 (SKBR3)、空白耐药组 (SKBR3-LR) 及二甲双胍组 (SKBR3-LR+MET) 细胞对拉帕替尼的敏感性

	亲本组、空白耐药组及二甲双胍组细胞存活率 (%)				
	亲本组	空白耐药组	二甲双胍组	P ₁ 值	P ₂ 值
0.5 μmol/L	90.73 ± 0.31	97.68 ± 2.37	95.37 ± 1.76	0.125	0.951
1.5 μmol/L	56.54 ± 7.22	93.80 ± 1.87	88.50 ± 2.08	0.000	0.071
5.0 μmol/L	39.60 ± 6.01	64.63 ± 2.15	43.88 ± 0.08	0.000	0.000
15.0 μmol/L	13.79 ± 2.55	44.91 ± 2.07	30.89 ± 2.64	0.000	0.000

注 P₁ 为亲本组与空白耐药组相比 P₂ 为空白耐药组和二甲双胍组相比

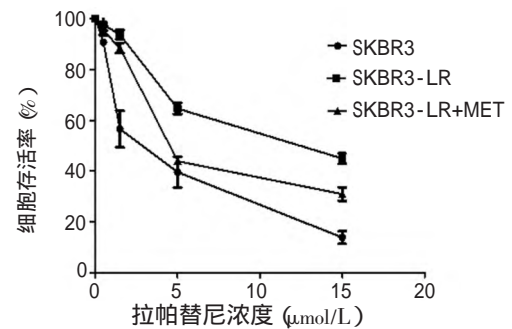


图 2 CCK-8 法检测亲本组 (SKBR3)、空白耐药组 (SKBR3-LR) 及二甲双胍组 (SKBR3-LR+MET) 细胞对拉帕替尼的敏感性

2.4 各组细胞凋亡变化

亲本组、空白耐药组、拉帕替尼组、二甲双胍组和联合用药组的细胞凋亡率分别为 (6.12 ± 1.10)%、(5.05 ± 0.59)%、(7.90 ± 0.74)%、(10.7 ± 0.76)%、(24.68 ± 1.52)%。统计结果显示 (F=193.001, P=0.000) 二甲双胍组凋亡率高于空白耐药组 (P=0.07), 联合用药组凋亡率高于空白耐药组 (P=0.06)。差异具有统计学意义 (图 3)。

2.5 各组细胞内 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达变化

相比于空白耐药组细胞, 联合用药组细胞 PI3K 信号通

表 2 流式细胞术检测各组细胞周期结果及增殖指数

指标	亲本组	空白耐药组	拉帕替尼组	二甲双胍组	联合用药组	F 值	P 值
G ₀ /G ₁ 期 (%)	51.31 ± 2.41	47.44 ± 0.47	53.30 ± 2.50	57.61 ± 1.33	61.53 ± 2.36	22.947	0.000
G ₂ /M 期 (%)	6.37 ± 1.56	10.76 ± 4.29	5.65 ± 2.10	9.72 ± 1.72	5.58 ± 1.45	2.952	0.075
S 期 (%)	42.31 ± 3.14	41.80 ± 4.14	37.00 ± 7.29	32.66 ± 2.53	32.89 ± 3.62	3.248	0.060
增殖指数	0.95 ± 0.09	1.11 ± 0.02	0.88 ± 0.09	0.73 ± 0.04	0.63 ± 0.06	23.895	0.000

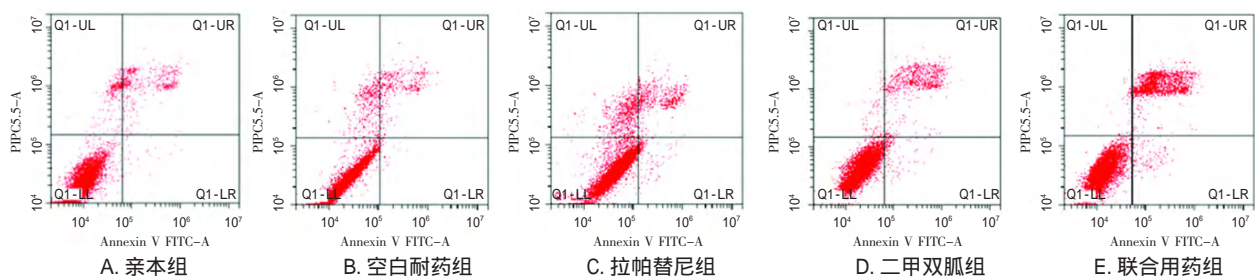


图 3 流式细胞术检测各组细胞凋亡结果

路 P-mTOR 蛋白表达水平降低 ($P=0.019$) ,mTOR 蛋白表达水平降低 ($P=0.017$) ,P-PI3K 蛋白表达水平降低 ($P=0.045$) ,PI3K 蛋白表达水平降低 ($P=0.009$) ,P-AKT 蛋白表达水平降低 ($P=0.005$) ,AKT 蛋白表达水平降低 ($P=0.010$) ,差异具有统计学意义 (表 3 图 4、图 5)。

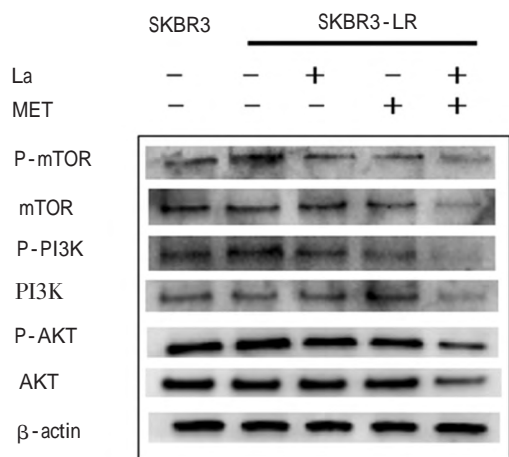


图 4 Western blot 法检测各组细胞中 PI3K、AKT、mTOR、P-PI3K、P-AKT 和 P-mTOR 蛋白表达变化

3 讨论

乳腺癌拉帕替尼耐药的发生是其治疗的主要障碍,故寻找合适的耐药逆转剂成为改善乳腺癌靶向治疗效果的关键^[11]。近年来,二甲双胍的抗肿瘤作用被日益关注,其机制可能与下调 mTOR 表达有关^[12-13]。而乳腺癌中常见 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的异常激活,是肿瘤细胞抗凋亡的主要机制之一^[14-15]。因此,本实验主要探究二甲双胍能否提高乳腺癌耐药细胞对拉帕替尼的敏感性。

结果显示,耐药细胞对拉帕替尼的敏感性明显降低,且耐药倍数约为 4.25 倍,表明乳腺癌拉帕替尼耐药模型建立成功。二甲双胍处理后的乳腺癌耐药细胞对拉帕替尼的敏感性明显增加,其耐药逆转倍数约为 2.0 倍,说明二甲双胍对乳腺癌耐药细胞具有逆转耐药作用。流式细胞术结果显示二甲双胍组和联合用药组凋亡率明显增高且增殖指数明显降低,凋亡率增加可能与二甲双胍激活 bax、p53 等基

表 3 Western blot 法检测各组细胞中 PI3K、AKT、mTOR、P-PI3K、P-AKT 和 P-mTOR 蛋白表达变化

	亲本组	空白耐药组	拉帕替尼组	二甲双胍组	联合用药组	F 值	P 值
P-mTOR	0.020 ± 0.003	0.03 ± 0.01	0.020 ± 0.008	0.020 ± 0.009	0.002 ± 0.004	3.881	0.037
mTOR	0.030 ± 0.003	0.03 ± 0.01	0.030 ± 0.006	0.03 ± 0.01	0.009 ± 0.002	5.253	0.015
P-PI3K	1.31 ± 0.35	1.48 ± 0.45	1.31 ± 0.34	1.48 ± 0.43	0.50 ± 1.78	3.928	0.036
PI3K	0.020 ± 0.007	0.03 ± 0.01	0.020 ± 0.004	0.03 ± 0.01	0.001 ± 0.000	6.324	0.008
P-AKT	0.93 ± 0.51	1.73 ± 0.51	1.07 ± 0.35	0.98 ± 0.44	0.31 ± 0.22	5.871	0.011
AKT	0.91 ± 0.21	1.03 ± 0.12	0.91 ± 0.17	1.06 ± 0.10	0.51 ± 0.10	6.820	0.006

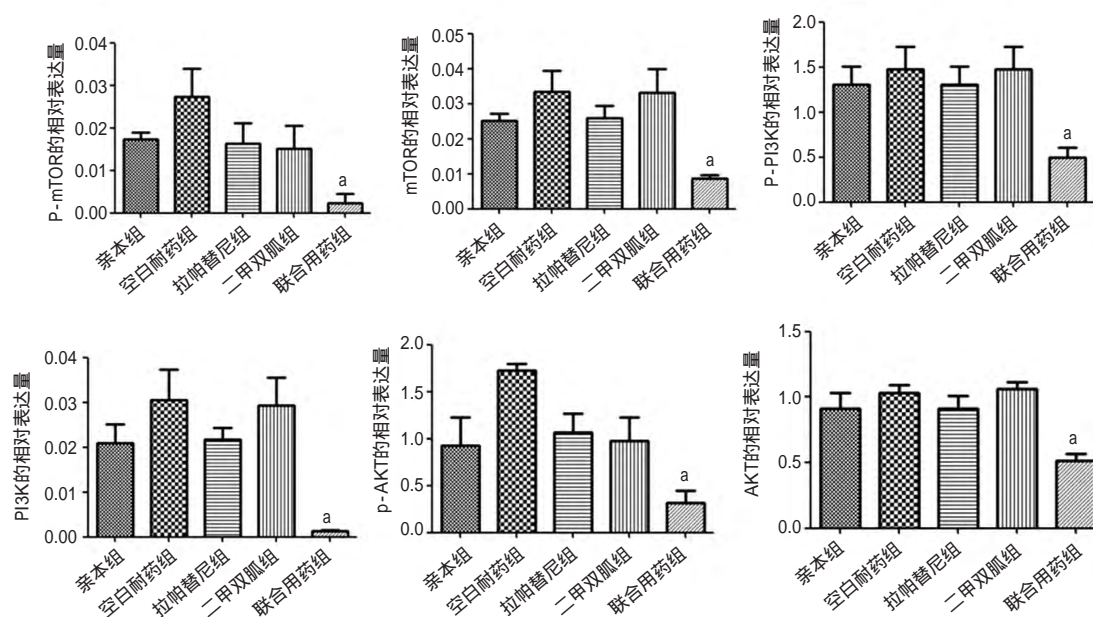


图 5 Western blot 法检测各组细胞中 PI3K、AKT、mTOR、P-PI3K、P-AKT 和 P-mTOR 蛋白表达变化

因有关^[16-17]。增殖指数降低且细胞多被阻滞于 G₀/G₁ 期,说明二甲双胍可抑制乳腺癌耐药细胞的增殖。朱智峰等^[18]研究同样证实,二甲双胍可抑制人结肠癌细胞增殖,并促进细胞凋亡。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 信号通路异常表达是乳腺癌拉帕替尼耐药发生的重要机制之一^[19-20]。金晶晶等^[21]发现,二甲双胍可通过降低 PI3K 和 AKT 的表达而影响多卵巢综合征的发生。因此本研究选用 PI3K 信号通路进行深入探究。Western blot 检测结果显示,二甲双胍组中相关蛋白表达变化不明显,而联合用药组中 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白及其磷酸化蛋白表达水平均明显降低,说明二甲双胍联合拉帕替尼可降低 PI3K 信号通路及其下游分子的表达。Yu 等^[22]研究同样表明,二甲双胍可抑制 PI3K、AKT 和 mTOR 在体内的表达,对其活化起负调控作用。然而单独使用二甲双胍对 PI3K 信号通路的抑制作用并无差异,其原因可能是在此乳腺癌细胞中,二甲双胍单独使用时并非通过 PI3K 信号通路而发挥逆转作用,具体通过何种信号通路,目前尚不清楚。据此,临床上可联合二甲双胍和拉帕替尼共同治疗 HER2 阳性乳腺癌,以降低其化疗耐药性的发生。

综上所述,以体外建立乳腺癌拉帕替尼耐药细胞株模型为基础,初步研究证实二甲双胍对乳腺癌拉帕替尼耐药细胞 SKBR3-LR 具有逆转耐药作用。二甲双胍与拉帕替尼的联合应用,可有效增加耐药细胞的凋亡率、抑制细胞的增殖指数、阻碍耐药细胞周期进程,其机制可能与抑制 PI3K 信号通路相关蛋白表达有关。这为临床 HER2 阳性乳腺癌的治疗提供了新的理论参考。

参 考 文 献

[1] Wang T, Mao B, Cheng C, et al. YAP promotes breast cancer metastasis by repressing growth differentiation factor-15[J]. *Biochim Biophys Acta* 2018, 1864 (5 Pt A): 1744-1753.

[2] Crist SB, Ghajar CM. Friends with benefits: microenvironmental NRG1β and HGF mediate HER2-targeted resistance in L-HER2+ and HER2 breast cancer[J]. *Cell Syst* 2018, 6 (3): 268-270.

[3] Carey LA. Breast cancer HER-2: a good addiction[J]. *Nat Rev Clin Oncol* 2012, 9 (4): 196-197.

[4] Jiao XD, Ding C, Zang YS, et al. Rapid symptomatic relief of HER2-positive gastric cancer leptomeningeal carcinomatosis with lapatinib, trastuzumab and capecitabine: a case report[J]. *BMC Cancer* 2018, 8 (1): 206.

[5] Guan M, Tong Y, Guan M, et al. Lapatinib inhibits breast cancer cell proliferation by influencing PKM2 expression[J]. *Technol Cancer Res Treat* 2018, 17: 1533034617749418.

[6] Tan Q, Wei C. Comment on a meta-analysis evaluating the cardiac

toxicity of lapatinib in patients with breast cancer and other HER2-positive cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat* 2018, 168 (3): 769-770.

[7] Anisimov VN, Egormin PA, Piskunova TS, et al. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo[J]. *Cell Cycle* 2010, 9 (1): 188-197.

[8] Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, et al. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells[J]. *Cancer Res* 2007, 67 (22): 10804-10812.

[9] 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 Res* 2011, 71 (9): 3196-3201.

[10] 彭铮, 史惠蓉, 谢娅, 等. 二甲双胍通过抑制 p38MAPK 信号通路逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性[J]. *肿瘤* 2015, 35 (2): 129-138.

[11] Limon-Miro AT, Lopez-Teros V, Astiazaran-Garcia H. Dietary guidelines for breast cancer patients: a critical review[J]. *Adv Nutr* 2017, 8 (4): 613-623.

[12] Marrone KA, Zhou X, Forde PM, et al. A randomized phase II study of metformin plus paclitaxel/carboplatin/bevacizumab in patients with chemotherapy-naïve advanced or metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer[J]. *Oncologist* 2018[Epub ahead of print].

[13] Song Y, Chen Y, Li Y, et al. Metformin inhibits TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition-like process and stem-like properties in GBM AKT/mTOR/ZEB1 pathway[J]. *Oncotarget* 2017, 9 (6): 7023-7035.

[14] Lee KT, Yeh YH, Chang SH, et al. Metformin is associated with fewer major adverse cardiac events among patients with a new diagnosis of type 2 diabetes mellitus: a propensity score-matched nationwide study[J]. *Medicine (Baltimore)* 2017, 96 (28): e7507.

[15] Lurati AR. Metformin adjunct therapy in cancer treatment[J]. *Workplace Health Saf* 2017, 65 (12): 568-571.

[16] Malki A, Youssef A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling[J]. *Oncol Res* 2011, 19 (6): 275-285.

[17] Mano CM, Guaratini T, Cardozo KHM, et al. Astaxanthin restrains nitrate-oxidative peroxidation in mitochondrial-mimetic liposomes: a pre-apoptosis model[J]. *Mar Drugs* 2018, 16 (4): E126.

[18] 朱智峰, 梁琳琅. 二甲双胍对结肠癌细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. *中国医科大学学报* 2012, 41 (2): 115-119.

[19] Brady SW, Zhang J, Seok D, et al. Enhanced PI3K p110α signaling confers acquired lapatinib resistance that can be effectively reversed by a p110α-selective PI3K inhibitor[J]. *Mol Cancer Ther* 2014, 13 (1): 60-70.

[20] Ren H, Ma J, Si L, et al. Low dose of acacetin promotes breast cancer MCF-7 cells proliferation through the activation of ERK/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2018[Epub ahead of print].

[21] 金晶晶. 二甲双胍通过 PI3K/AKT 通路影响多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗的研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2017.

[22] Yu Y, Savage RE, Eathiraj S, et al. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT pathway with an allosteric AKT inhibitor, ARQ 092[J]. *PLoS One* 2015, 10 (10): e0140479.

(责任编辑: 方 济)