

二甲双胍联合单次高剂量放疗对 小鼠非小细胞肺癌治疗机制和效果

李慧超¹ 赵明娟² 田龙¹

¹(河北北方学院附属第一医院 张家口 075000)

²(河北省人民医院 石家庄 050000)

摘要 探究二甲双胍联合单次高剂量放疗对小鼠非小细胞肺癌的治疗机制和效果。体外细胞试验:通过细胞存活曲线评价二甲双胍在不同氧和葡萄糖含量条件下的细胞毒性。体内异种移植瘤试验:将 NSCLC-A549 细胞注入小鼠,分为对照组、单独给予二甲双胍组、单独接受单次高剂量放疗组、放疗前 1 h 给予二甲双胍组和放疗后 24 h 给予二甲双胍组。评价各组肿瘤生长情况,对肿瘤组织进行血流量和组织学分析。体外试验结果显示:低氧低糖条件下二甲双胍细胞毒性最高。肿瘤生长结果显示:单次高剂量放疗前 1 h 和后 24 h 给予二甲双胍组小鼠肿瘤体积最小((0.47 ± 0.12) cm^3 vs (0.49 ± 0.21) cm^3)。血流量分析结果显示:单次高剂量放疗破坏了肿瘤组织微血管,降低了氧和葡萄糖灌注。组织学分析结果显示:肿瘤组织中心低氧低糖区域细胞优先被二甲双胍杀死,周围灌注较好区域存在存活细胞。二甲双胍联合单次高剂量放疗可通过改变肿瘤细胞代谢增强毒性,试验结果为未来二甲双胍联合立体定向放疗提供了理论和数据支持。

关键词 非小细胞肺癌,二甲双胍,单次高剂量放疗,作用机制

中图分类号 R73-36⁺,R734.2

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0040

Study on the therapeutic mechanism and effect of metformin combined with single high-dose radiotherapy in mice with non-small cell lung cancer

LI Huichao¹ ZHAO Mingjuan² TIAN Long¹

¹(The First Affiliated Hospital of Hebei Northern University, Zhangjiakou 075000, China)

²(Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT To explore the therapeutic effect of metformin combined with single high-dose radiotherapy in mice with non-small cell lung cancer and the mechanism involved. *In vitro* cell test: the cytotoxicity of metformin under different oxygen and glucose contents was evaluated using cell survival curves. *In vivo* xenograft tumor test: NSCLC-A549 cells were injected into mice, which were then divided into the following five groups: control group, metformin group, single high-dose radiotherapy group, metformin 1 h before radiotherapy group, and metformin 24 h after radiotherapy group. Growth of the tumor was evaluated in each group, and the blood flow and histology of the tumor tissues were analyzed. According to the *in vitro* test results, metformin was the most cytotoxic under

基金资助:张家口市重点研发计划项目(1921002B)资助

第一作者:李慧超,女,1990年8月出生,2013年毕业于河北北方学院,现就职于河北北方学院附属第一医院药学部,研究方向为放疗药学

通信作者:田龙,硕士,主任研究员,E-mail: 1277473912@qq.com

收稿日期:初稿 2022-04-11;修回 2022-05-01

Supported by Zhangjiakou Key R & D Program (1921002B)

First author: LI Huichao (female) was born in August 1990, and graduated from Hebei North University in 2013. Now she is working in the pharmacy department of The First Affiliated Hospital of Hebei North University, focusing on radiotherapy pharmacy

Corresponding author: TIAN Long, master's degree, chief researcher, E-mail: 1277473912@qq.com

Received 11 April 2022; accepted 01 May 2022

hypoxic and low-glucose conditions. The *in vivo* results showed that the tumor volume was the smallest in the mouse groups administered metformin 1 h before high-dose radiotherapy and 24 h after radiotherapy ((0.47 ± 0.12) cm³ and (0.49 ± 0.21) cm³, respectively). Blood flow analysis showed that single high-dose radiotherapy destroyed the microvessels of tumor tissue and reduced the perfusion of oxygen and glucose. Histological analysis revealed that cells in hypoxic and hypoglycemic area of the tumor tissue center were preferentially killed by metformin, whereas there were viable cells in the surrounding well perfused areas. Metformin combined with single high-dose radiotherapy enhanced the toxicity by changing tumor cell metabolism. These results provide theoretical and data support for the future use of metformin combined with stereotactic body radiotherapy.

KEYWORDS Non-small cell lung cancer, Metformin, Single high-dose radiotherapy, Action mechanism

CLC R73-36⁺, R734.2

二甲双胍是治疗 II 型糖尿病的一线药物, 最近因其在放疗中的细胞毒性而广受关注。有综述归纳了二甲双胍在非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 放疗中的作用机制^[1-2], 包括降低细胞内耗氧量并诱导活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 生成, 激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路、抑制丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号传导通路或下调 IGF1 水平而停滞细胞生长周期并促使细胞凋亡和近年来提出的改变肿瘤细胞代谢^[3-4]。

二甲双胍通过抑制糖原而改变肿瘤细胞代谢^[5], 尤其在单次高剂量放疗导致的低糖、低氧条件下给予二甲双胍可显著提高细胞死亡率^[6-7]。目前国内尚无关于该治疗机制和效果试验。因此, 本研究进行了人 NSCLC-A549 细胞的体外和体内异种移植瘤试验, 以期检验该治疗机制和效果, 从而为未来二甲双胍同立体定向放疗 (Stereotactic body radiotherapy, SBRT) 联合应用奠定理论基础和提供数据参考。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人 NSCLC-A549 细胞由河北医科大学公共卫生学院实验室提供。细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内的含 10% 胎牛血清的 DMEM (美国默克公司) 高糖培养基中 (含 4.5 mg/mL 葡萄糖, 下同) 培养, 每日更换培养基一次。2~3 d 传代后, 将处于对数生长期的细胞接种于两套 96 孔板、5×10³/孔的新培养基中。第一套 96 孔板新培养基分组包括 DMEM 高糖培养基对照组、DMEM 高糖培养基+5 mg/mL 二甲双胍 A_{oxygen} 组、DMEM 中糖 (含 1.0 mg/mL 葡萄糖) 培

养基+5 mg/mL 二甲双胍 B_o 组、DMEM 无糖培养基+5 mg/mL 二甲双胍 C_o 组, 以上均购买自湖北午时药业; 每孔设置 4 个复孔, 继续培养 4 h、8 h、12 h、16 h。于培养结束前 2 h 每孔加入 MTT (5 mg/mL, 上海碧云天公司) 10 μL, 培养结束后移除孔内培养基, 加入 DMSO (100 μL/孔)。于 Varioskan LUX 酶标仪 (美国赛默飞世尔公司) 上检测各孔吸光度值 OD₄₉₀, 试验重复 3 次。第二套 96 孔板培养基接种后置于一个持续注入 5% CO₂+95% N₂ 混合气体以模拟低氧环境的细胞培养箱中, 其他条件同前, 并分为 A_{hypoxia}、B_{ho}、C_{ho} 组。细胞生存率=试验组 OD 值/第一套培养基对照组 OD 值×100%。

1.2 肿瘤生长评价

SPF 级 CD-1 无胸腺裸小鼠 75 只, 购自北京维通利华试验动物技术有限公司, 体重 19~20 g, 3 周龄。使用微量进样器将 1×10⁵ 个对数生长期的 A549 细胞注射至小鼠右侧腓肠肌中。之后正常饲养小鼠 7 d 后用于试验。将小鼠分为 5 组进行处理: 无任何处理对照 A_m 组、单独给予二甲双胍 (腹腔注射, 200 mg/kg, 下同) B_m 组、单独接受单次高剂量放疗 C_m 组、单次高剂量放疗前 1 h 给予二甲双胍 D_m 组、单次高剂量放疗后 24 h 给予二甲双胍 E_m 组, 每组 15 只 (其中 5 只仅用于之后的组织学分析, 不用作其他评价)。

利用 Synergy Platform 加速器 (瑞典医科达公司) 对小鼠进行单次高剂量放疗。使用 80 mg/kg 氯胺酮+8 mg/kg 甲苯噻嗪麻醉小鼠, 调整加速器剂量率为 6 Gy/min, 将小鼠右腿肿瘤置于治疗等中心位置处, 身体其余部分由铅块遮挡, 照射 2.5 min。肿瘤估算为球体, 每周使用精确到 0.1 mm 的游标卡尺测量其直径 3 次, 并取平均值, 使用公式 $4\pi r^3/3$ 计算体积, 以评价 42 d 内各组选定的 10 只小鼠肿瘤生长情况。

1.3 血流量和组织学分析

各组处理完全结束1 h后,于各组选定的10只小鼠尾静脉注射 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 示踪剂(中国同位素公司)5 MBq。使用2BY2集成闪烁辐射探测器测量反映肿瘤组织血流量的放射性计数,并计算平均值。同时,通过吸入 CO_2 处死用于组织学分析的5只小鼠。对肿瘤组织进行解剖并固定于Bouin氏液中,常规脱水后石蜡包埋并切成厚5 μm 的切片。使用二甲苯脱蜡,95%乙醇脱水后进行苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)(上海碧云天公司)染色。首先使用苏木精染色5 min,盐酸酒精分化后再进行伊红染色3 min。最后经不同浓度梯度的二甲苯和乙醇彻底脱水透明后封盖,在高倍镜($\times 400$)下观察肿瘤区域损伤情况并拍片。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件,对符合正态分布的剂量资料以“平均值 \pm 标准差”表示,组间多重比较采用LSD- t 检验。 $p < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率

两套培养基所有分组A549细胞存活曲线如图1所示。16 h时第1套培养基中同时段细胞存活率 $A_o > B_o > C_o$;第2套培养基中同时段细胞存活率 $A_{ho} > B_{ho} > C_{ho}$;总体比较 $A_o > A_{ho} > B_o > B_{ho} > C_o > C_{ho}$ 。同第1套培养基对照组相比,二甲双胍显著降低了细胞生存率,且随着低氧低糖条件加剧,生存率逐渐降低。

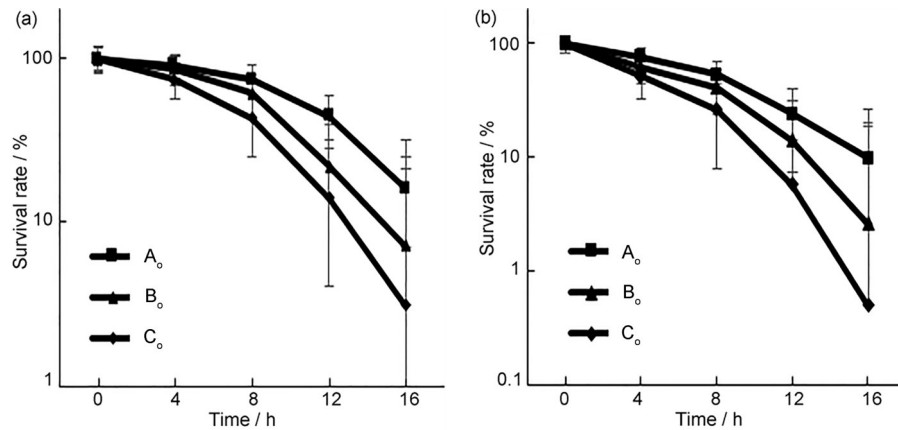


图1 A549细胞体外试验存活曲线:(a)有氧条件下不同葡萄糖浓度培养基中细胞存活率;
(b)无氧条件下不同葡萄糖浓度培养基中细胞存活率

Fig.1 Survival curves of A549 cell in *in vitro* test: (a) cell survival rate in different glucose concentrations medium under aerobic condition; (b) cell survival rate in different glucose concentrations medium under anaerobic condition

2.2 肿瘤生长评价

试验前测得小鼠肿瘤平均体积为 $(0.34 \pm 0.14) \text{ cm}^3$ 。图2为42 d时由高至低依次为 A_m 、 B_m 、 C_m 、 D_m 、 E_m 组小鼠肿瘤体积平均值变化曲线。42 d时结果为 $A_m (1.34 \pm 0.39) \text{ cm}^3 > B_m (1.19 \pm 0.31) \text{ cm}^3 > C_m (1.01 \pm 0.24) \text{ cm}^3 > D_m (0.47 \pm 0.12) \text{ cm}^3 > E_m (0.49 \pm 0.21) \text{ cm}^3$ 。 D_m 和 E_m 组间比较差异不具有统计学意义($p > 0.05$);除此之外,两两组间多重比较差异均具有统计学意义($p < 0.05$)。 D_m 同 E_m 结果比较说明,二甲双胍于放疗前1 h和后24 h给予对结果影响较小; D_m 、 E_m 结果同 A_m 、 B_m 、 C_m 比较说明,二甲双胍联合单次高剂量放疗显著延缓了肿瘤生长。

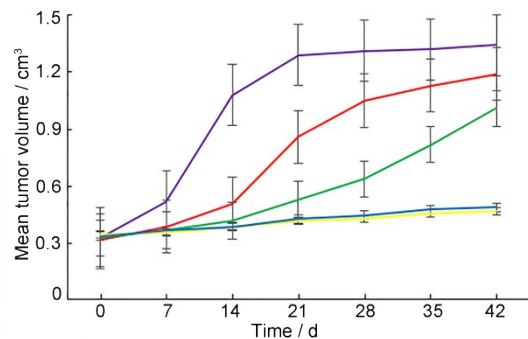


图2 小鼠肿瘤体积随时间变化的曲线
(42 d时由高至低依次为 A_m 、 B_m 、 C_m 、 D_m 、 E_m 组)

Fig.2 Curves of tumor volume of mice along with time
(at 42 d, the sequence from high to low is the group of A_m , B_m , C_m , D_m , E_m)

2.3 血流量分析

图3为6 min时由高至低依次为A_m、B_m、D_m、C_m、E_m组小鼠肿瘤区域示踪剂测量结果平均值变化曲线。

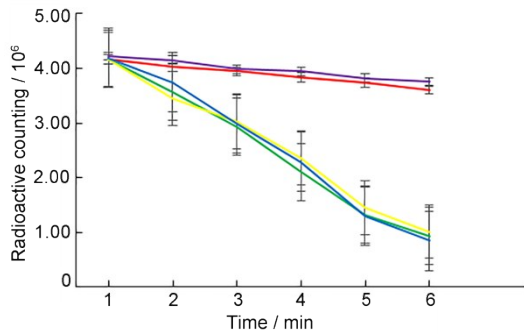


图3 小鼠肿瘤区域示踪剂测量结果 (6 min时由高至低依次为A_m、B_m、C_m、D_m、E_m组)

Fig.3 Results of tracer in mice tumor area (at 6 min, the sequence from high to low is the group of A_m, B_m, C_m, D_m, E_m)

由图6可知,6 min时示踪剂所代表的血流量A_m (3.75×10⁶)≈B_m(3.61×10⁶)>C_m(0.94×10⁶)≈D_m(1.02×10⁶)≈

E_m (0.85×10⁶)。A_m~E_m曲线平均斜率分别为0.06、0.10、0.62、0.66、0.69。由此可见,二甲双胍对血流量变化影响较小,而单次高剂量放疗导致肿瘤区域血流量迅速减少,从而降低了氧和葡萄糖灌注。

2.4 组织学分析

小鼠组织学分析结果如图4所示。对照组和单独给予二甲双胍组中肿瘤组织未出现显著变化,HE染色后肿瘤细胞呈整体聚集分布,中心部位高密度分布(箭头),无凝固性坏死。单独接受放疗组中开始出现局部损伤,肿瘤细胞整体密度开始下降,中心部位高密度分布开始消失,中心部位凝固性坏死(箭头)开始出现。放疗前1 h给予二甲双胍组和放疗后24 h给予二甲双胍组中肿瘤细胞整体密度显著下降,中心部位高密度分布完全消失,同时存在更广泛的凝固性坏死(箭头)。周围组织受损较小且仍有存活的肿瘤细胞。

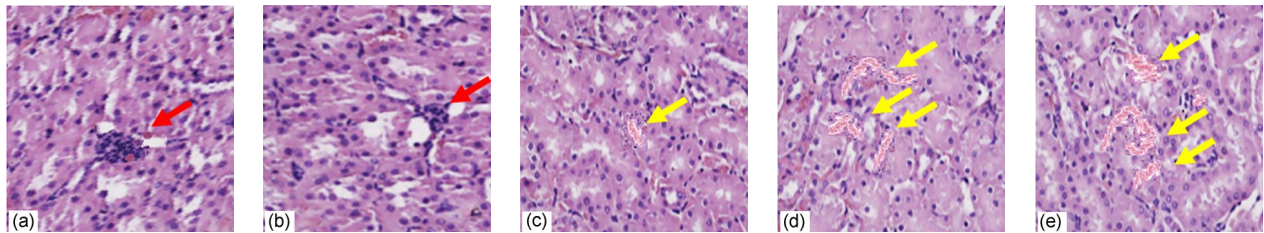


图4 各组小鼠肿瘤组织HE染色(×400):(a)对照组;(b)单独给予二甲双胍组;(c)单独接受放疗组;(d)放疗前1 h给予二甲双胍组;(e)放疗后24 h给予二甲双胍组

Fig.4 HE staining of tumor tissues of mice in each group (×400): (a) control group; (b) metformin alone group; (c) radiotherapy alone group; (d) metformin 1 h before radiotherapy group; (e) metformin 24 h after radiotherapy group

3 讨论

二甲双胍在NSCLC放疗中主要基于两类作用机制。第一种是在低氧条件下,通过降低细胞内耗氧量并诱导ROS生成。首先,当细胞微环境中氧含量较低时,二甲双胍通过抑制线粒体电子传递链复合体I促进细胞再氧和。通过阻断细胞的呼吸过程并降低耗氧量,从而对抗低氧状态下的细胞放疗耐受。二甲双胍通过抑制线粒体电子传递链复合体I和下调细胞内谷胱甘肽的表达,均会造成ROS水平显著提高,从而进一步造成细胞损伤和毒性^[9]。第二种是二甲双胍通过激活AMPK信号传导通路,抑制MAPK信号传导通路,或通过降低胰岛素和胰岛素样生长因子结合蛋白水平而下调IGF1的水平来停滞细胞生长周期,最终抑制NSCLC细胞的生长与增殖并加速凋亡^[9]。近年来,国外有研究提出了第三

种机制,即改变肿瘤细胞代谢机制^[1]。有研究发现,二甲双胍仅在禁食诱导的低血糖期间治疗时显著抑制了接种了人结肠癌细胞的试验小鼠的肿瘤生长^[10],即肿瘤细胞只在低糖环境下才会对二甲双胍敏感。深入研究证实,二甲双胍在低血糖环境下作用机制是促进了PP2A下游的糖原合成酶激酶3β(GSK3β)过度活化,导致肿瘤细胞中促存活蛋白MCL-1的表达降低和细胞死亡。而放疗恰恰通过破坏微血管而改变肿瘤细胞代谢微环境,降低了葡萄糖水平,从而显著增强了二甲双胍细胞毒性。

本研究体外细胞试验中,通过对两套培养基组间比较发现,低氧环境下细胞存活率进一步下降,这是第一种机制作用的结果;通过对两套培养基组内比较发现,随着细胞微环境中葡萄糖含量下降,二甲双胍细胞毒性显著增强,细胞存活率也显著下

降,这是第三种机制作用的结果。

本研究细胞体内异种移植瘤试验的肿瘤生长评价中,由于单次高剂量放疗破坏了肿瘤细胞微环境,改变了肿瘤代谢,导致低氧低糖情况,从而显著增强了二甲双胍细胞毒性,使得不同处理组小鼠肿瘤体积产生了显著差异。其次,血流量分析结果也支持了肿瘤生长评价的结论,即单次高剂量放疗损伤了肿瘤微血管,造成了氧和葡萄糖灌注量下降。最后,组织学分析中,肿瘤中心部位相较严重的低氧低糖条件导致该区域细胞被优先杀死。而微血管破坏程度、细胞微环境和代谢受影响较小的肿瘤周围区域则依然存在存活的细胞。

总之,由表及里,由浅入深的三个试验结果均是第三种机制作用的结果。

本试验的意义在于:(1)为未来二甲双胍同SBRT联合应用提供了理论和数据支持;(2)首次探讨了二甲双胍单次高剂量放疗前1 h注入和后24 h注入结果差异。目前,国内外研究均关注放疗前注入结果^[11-12];(3)通过改变肿瘤特定区域代谢优先杀死细胞,进行“靶向”放疗。但本试验尚存一些问题有待解决。(1)二甲双胍联合常规分次放疗的研究有待深入开展;目前国外已有临床试验研究每日低剂量二甲双胍与常规分次放疗的联合应用^[13],或许二甲双胍未来应用会更广泛。(2)二甲双胍最佳注入时机有待确定:小鼠腹腔注射二甲双胍药代动力学^[14]结果显示,注射30 min后达到血药峰值,1 h后剩余药物为最高水平的25%,因此,二甲双胍究竟是在何时作用和最佳注入时机显然值得继续深入研究。(3)以示踪剂间接地反映血流量,无法准确量化肿瘤组织氧和葡萄糖变化及其同二甲双胍细胞毒性关系。(4)同时患有NSCLC和糖尿病患者,二甲双胍如何给药^[15]。

4 结论

通过体外细胞试验发现,低氧低糖条件下二甲双胍细胞毒性最高;通过小鼠体内异种移植瘤试验发现,单次高剂量放疗破坏了肿瘤组织微血管,降低了氧和葡萄糖灌注,于放疗前1 h和后24 h给予二甲双胍均会导致肿瘤组织中心低氧低糖区域细胞优先被二甲双胍杀死,从而显著延缓了肿瘤的生长。总之,二甲双胍联合单次高剂量放疗可通过改变肿瘤细胞代谢增强毒性,试验结果为未来二甲双胍联合立体定向放疗提供了理论和数据支持。

作者贡献声明 李慧超负责试验的设计、执行以及论文的撰写;赵明娟负责资料和数据的收集和析;田龙负责试验数据的统计、分析以及论文的审阅和校对。所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

参考文献

- 1 吴广博. 二甲双胍在恶性肿瘤放疗中的应用研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, **48**(1): 45-49. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2021.01.194.
WU Guangbo. Progress in application of metformin in radiotherapy for malignant tumors[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2021, **48**(1): 45-49. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2021.01.194.
- 2 杨洛, 郝亚荣. 二甲双胍的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2019, **25**(9): 1816-1821. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.09.028.
YANG Luo, HAO Yarong. Research progress on pharmacological effects of metformin[J]. Medical Recapitulate, 2019, **25**(9): 1816-1821. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.09.028.
- 3 王高祥, 徐美青, 解明然. 二甲双胍抗肺癌机制研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2020, **23**(4): 282-285. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.02.
WANG Gaoxiang, XU Meiqing, XIE Mingran. Research advance in anti-lung cancer mechanism of metformin[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2020, **23**(4): 282-285. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.102.02.
- 4 穆春青, 周磊, 赵楠, 等. 二甲双胍通过PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路对肺癌A549细胞增殖的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, **47**(3): 637-643. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210313.
MU Chunqing, ZHOU Lei, ZHAO Nan, *et al.* Effect of metformin on proliferation of lung cancer A549 cells through PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2021, **47**(3): 637-643. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210313.
- 5 Song C W, Lee Y J, Griffin R J, *et al.* Indirect tumor cell death after high-dose hypofractionated irradiation: implications for stereotactic body radiation therapy and stereotactic radiation surgery[J]. International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics, 2015, **93**(1): 166-172. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.05.016.
- 6 Matthews Q, Isabelle M, Harder S J, *et al.* Radiation-induced glycogen accumulation detected by single cell

- Raman spectroscopy is associated with radioresistance that can be reversed by metformin[J]. PLoS One, 2015, **10**(8): e0135356. DOI: 10.1371/journal.pone.0135356.
- 7 Brown S L, Kolozsvary A, Isrow D M, *et al.* A novel mechanism of high dose radiation sensitization by metformin[J]. Frontiers in Oncology, 2019, **9**: 247. DOI: 10.3389/fonc.2019.00247.
- 8 郭婉怡, 袁蓓, 张妮雪, 等. 活性氧(ROS)对类风湿性关节炎骨破坏的影响研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, **37**(18): 2182-2186. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.18.002.
- GUO Wanyi, YUAN Bei, ZHANG Nixue, *et al.* Effect of reactive oxygen species (ROS) on bone destruction in rheumatoid arthritis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, **37**(18): 2182-2186. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.18.002.
- 9 杨日云, 潘静莹, 李奕, 等. 甲基萘醌-4对少突胶质细胞缺氧性损伤的保护作用[J]. 解剖学杂志, 2020, **43**(5): 388-392. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2020.05.006.
- YANG Riyun, PAN Jingying, LI Yi, *et al.* Protective effect of menaquinone-4 on oligodendrocytes under hypoxia[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2020, **43**(5): 388-392. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2020.05.006.
- 10 Elgendy M, Cirò M, Hosseini A, *et al.* Combination of hypoglycemia and metformin impairs tumor metabolic plasticity and growth by modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 axis[J]. Cancer Cell, 2019, **35**(5): 798-815. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.03.007.
- 11 郭倩, 任倩梅, 毛熙光, 等. 二甲双胍对宫颈癌干细胞增殖及放化疗敏感性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, **41**(23): 5351-5356. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.23.045.
- GUO Qian, REN Qianmei, MAO Xiguang, *et al.* Effect of metformin on proliferation and chemosensitivity of cervical cancer stem cells[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2021, **41**(23): 5351-5356. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.23.045.
- 12 乔璐, 贾漪涛. 二甲双胍在结直肠癌治疗中的研究进展[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2021, **13**(1): 25-28. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7402.2021.01.006.
- QIAO Lu, JIA Yitao. Research progress of metformin in the treatment of colorectal cancer[J]. Journal of Digestive Oncology (Electronic Version), 2021, **13**(1): 25-28. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7402.2021.01.006.
- 13 孙玉成, 刘晓巍, 片光哲. 二甲双胍对直肠癌细胞放疗敏感性的影响[J]. 中国癌症防治杂志, 2019, **11**(1): 37-42. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2019.01.07.
- SUN Yucheng, LIU Xiaowei, PIAN Guangzhe. Effect of metformin on radiosensitivity of rectal cancer cells[J]. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2019, **11**(1): 37-42. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5671.2019.01.07.
- 14 Dowling R J O, Lam S, Bassi C, *et al.* Metformin pharmacokinetics in mouse tumors: implications for human therapy[J]. Cell Metabolism, 2016, **23**(4): 567-568. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.03.006.
- 15 李美晔, 许文超, 曲卫, 等. 二甲双胍对糖尿病合并肺癌患者生存期的影响[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, **27**(7): 1147-1150. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2020.07.013.
- LI Meiye, XU Wenchao, QU Wei, *et al.* The effects of metformin on survival of diabetic patients complicated with lung cancer[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2020, **27**(7): 1147-1150. DOI: 10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2020.07.013.