

· 综述 ·

DOI:10.12095/j.issn.2095-6894.2018.09.009

二甲双胍治疗乳腺癌的分子细胞机制及临床应用研究进展

冯 蕾¹, 吕兴茹², 刘 伟², 王 原¹ (¹河北医科大学第四医院, ²河北医科大学, 河北 石家庄 050017)

The evolving of metformin in breast cancer treatment: from molecular & cellular mechanism to clinical application

FENG Lei¹, LV Xing-Ru², LIU Wei², WANG Yuan¹¹The Fourth Hospital of Hebei Medical University, ²Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

【Abstract】 Diabetes is a high risk factor for breast cancer and affects the prognosis of breast cancer patients. The increasing evidence indicates that metformin, a first-line oral hypoglycemic drug for the treatment of type 2 diabetes, has anti-tumor effects in a variety of pathways. In recent years, many studies have put forward metformin's role in inhibiting breast cancer stem cells and resensitizing multiple drug resistant breast cancer cell lines. Besides, a study has developed a pharmacological tool to control the release of metformin. In this review, we aim to describe the new molecular cell mechanism of metformin in the treatment of breast cancer and the progress of clinical application.

【Keywords】 metformin; breast cancer; microRNA; multiple drug resistance; cancer stem cells

【摘要】 糖尿病是乳腺癌发病的高危因素,并影响乳腺癌患者的预后。二甲双胍是糖尿病一线用药,越来越多的证据表明,其还能通过多种途径起到抗肿瘤作用。近年来,许多学者提出了二甲双胍在抑制乳腺肿瘤干细胞及逆转乳腺癌细胞耐药性等方面的新思路。此外,有学者新开发出一种药物工具来控制二甲双胍的释放。本文将对二甲双胍治疗乳腺癌分子细胞机制及临床应用研究进展进行阐述。

【关键词】 二甲双胍;乳腺癌;微小RNA;多重耐药性;肿瘤干细胞

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

0 引言

乳腺癌有发病率高、增速快、发病年龄低、治疗率低等特点。研究^[1]表明,二甲双胍具有抗肿瘤活性,并可以提高癌症患者(结肠、乳腺、胰腺、前列腺癌)的存活率。目前认为二甲双胍潜在的抗肿瘤机制包括直接和间接两种方式。直接作用包括激活 AMPK-mTOR 途径,抑制癌细胞增殖;调节 microRNAs,诱导细胞衰老;诱导细胞周期停滞等。间接作用为降低循环胰岛素水平,导致胰岛素受体介导的信号通路减弱,缓解胰岛素在肿瘤细胞中促进有丝分裂和抗凋亡的作用。而最近发现二甲双胍对肿瘤耐药性和乳腺癌干细胞的抑制作用又使其成为焦点,本文将对这些机制的新发现进行阐述。

1 糖尿病与乳腺癌的关联

众多研究发现,糖尿病尤其是 2 型糖尿病是影响

乳腺癌发病的因素之一。据报道,有 18% 的乳腺癌患者都合并患有糖尿病。患糖尿病的女性与没有糖尿病的女性相比,前者患乳腺癌的风险增加 15% ~ 20%^[2]。同时研究^[3]也发现,合并有糖尿病患者的肿瘤体积更大、恶性程度更高,淋巴结转移与浸润的几率更高。患有糖尿病的乳腺癌患者比无糖尿病乳腺癌患者的死亡风险高出两倍^[4],而二甲双胍的使用能够降低 2 型糖尿病患者癌症的发病率^[5]。在原发性 HER-2 阳性和激素受体阳性乳腺癌患者中,二甲双胍可改善与糖尿病、胰岛素治疗相关的预后不良^[6]。最新研究^[7]表明,二甲双胍可以在 T-DM1 (ado-trastuzumab emtansine) 治疗乳腺癌前应用,临床上用 T-DM1 治疗此前已接受曲妥珠单抗和紫杉醇类药物单独或联合治疗的 HER-2 阳性、转移性乳腺癌患者。二甲双胍通过增强微囊蛋白 1 (caveolin-1) 介导的内吞作用来提高 T-DM1 治疗 HER-2 阳性转移

收稿日期:2018-04-05;接受日期:2018-05-21

基金项目:河北省科技计划项目(152777201);河北省博士后科研项目择优资助项目(B2015003029)

作者简介:冯 蕾,硕士生。E-mail:1832059681@qq.com。吕兴茹(共同第一作者)。硕士。E-mail:ayaruru@126.com

通讯作者:刘 伟,博士,副教授。E-mail:pkulw@aliyun.com。王 原(共同通讯作者)。博士,教授。E-mail:wuyan10299@sina.com

性乳腺癌的临床疗效。

2型糖尿病与乳腺癌发生之间呈正相关,但乳腺癌与妊娠期糖尿病的关系尚未明确。Sister 研究发现,多次妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)女性患乳腺癌风险可能升高^[8]。该项前瞻性队列研究旨在分析乳腺癌的环境和遗传危险因素,共纳入50 884名35~70岁女性。Cox比例风险模型分析发现,既往GDM与乳腺癌总体发病无关,但提示既往GDM和雌激素受体(estrogen receptor, ER)阴性乳腺癌间存在关联。多次GDM(≥ 2 次)可增加患浸润性乳腺癌、ER-阳性乳腺癌的风险及整体乳腺癌的发病率。研究^[9]提示“胰岛素生长因子生物活性增加可能具有促有丝分裂和抗凋亡作用,可影响乳腺组织在妊娠晚期的重构,并促进乳腺癌的发病和进展。所以该研究建议:多次GDM的女性应缩短乳腺癌筛查的周期。

一项最近的meta分析^[10]表明糖尿病增加了妇女患乳腺癌的风险。这种关联在2型糖尿病患者中得到证实,并支持糖尿病是乳腺癌独立危险因素的假设。但尚没有足够的研究来计算乳腺癌与1型糖尿病相关的风险。

2 通过抑制 mTOR 通路抑制乳腺癌细胞的增殖及促进其凋亡

已有研究^[11]表明,在乳腺癌中 mTOR(mammalian target of rapamycin)信号的过度激活与肿瘤的侵袭性生长有关,而且 mTOR 途径不仅与乳腺癌的肿瘤发生相关,还涉及乳腺癌对化疗和激素治疗的敏感性。目前二甲双胍对 mTOR 的抑制是直接作用还是间接作用尚未明确。一项研究^[12]显示,二甲双胍能促进腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)的表达,抑制上游的 mTOR 活性,同时还能抑制其下游的 pS076,并诱导细胞周期停滞在 G0-G1 期。这说明二甲双胍在一定程度上具有间接抑制肿瘤细胞增殖的作用。另有实验^[13]也证明二甲双胍可以直接抑制 mTOR 信号,激活 AMPK。最近有研究发现,二甲双胍可能通过启动聚集体形成促使 mTOR 降解^[14],二甲双胍诱导 mTOR 蛋白聚集在核周区域形成聚集体,细胞中积累的蛋白质通常被运送到微管组织中心,在那里它们被隔离成单个大的核周聚集体^[15],而后促进它们通过降解而被清除。该团队发现二甲双胍降低了 MCF-7 乳腺癌细胞中总 mTOR 蛋白的水平,并且总 mTOR 蛋白水平的降低与 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖和迁移能力的降低正相关。该研究还提出,mTOR 蛋白在乳

腺癌细胞中降解速度减慢可能为 mTOR 蛋白在乳腺癌细胞中表达水平较高的潜在原因,而 mTOR 蛋白在非癌性细胞中更快地降解,由此产生的差别也许可以为开发新型抗肿瘤药物提供新思路。该研究也为二甲双胍抑制 AMPK-mTOR 信号通路提供了证据,并且他们认为二甲双胍引导 mTOR 降解在抑制癌细胞生长过程中发挥了重要作用。

3 二甲双胍通过调节胰岛素水平间接对乳腺癌细胞起作用

已有研究^[16]表明胰岛素在多种肿瘤中具有促有丝分裂的和抗凋亡的作用,这其中包括乳腺癌,而且胰岛素还可能通过调控血管内皮生长因子增加肿瘤的供血而促进肿瘤生长,或通过激活胰岛素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1)起作用。

研究^[17]表明,无论在体内还是体外,二甲双胍依赖胰岛素的抗肿瘤机制与胰岛素受体(insulin-receptor, IR)表达降低,Akt 和 ERK1/2 磷酸化(分别是 P13K/Akt 和 RAS-MAPK 通路中重要的下游因子)减少有关。因此,空腹胰岛素水平(fasting insulin levels)和胰岛素受体表达程度也许可以成为二甲双胍治疗敏感性的生物标志。未来的前瞻性临床试验将会更全面地鉴定生物标志来预测二甲双胍治疗肿瘤的疗效评价。但就患者个体而言,Akt 和 ERK1/2 磷酸化的总体改变与循环中胰岛素水平并不相关,提示这些因子减少也可能是由某一不依赖胰岛素的通路介导。

4 二甲双胍调节微小 RNA 表达

近年来发现,微小 RNA(microRNA, miRNA)在糖尿病与乳腺癌患者中的表达谱发生了不同程度的失调。研究^[18]发现,二甲双胍诱导的抗癌效应至少部分与 miRNA 表达的调节有关。miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子。它通常在转录后水平调控基因表达,广泛参与细胞增殖、分化和凋亡等生命过程。下面就最近发现的与二甲双胍抗癌效应相关的 miRNA 举例说明。

4.1 miR-200c 证据^[19]表明 miR-200c 是一个肿瘤抑制因子。miR-200c 过表达可减少 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌细胞增殖,并诱导细胞凋亡,并与乳腺癌患者存活时间的延长显著相关。一项研究^[20]表明,在不同浓度(5、10、20 mM)的二甲双胍治疗后,乳腺癌细胞和肿瘤组织中增加了 miR-200c 的表达,且

其作用是剂量依赖性的。另一方面,miR-200c 的下调可减少乳腺癌细胞凋亡,但二甲双胍治疗后可以逆转这种效应。同样 miR-200c 下调也可以增强癌细胞迁移和浸润的能力。该试验给予 10 mM 二甲双胍治疗达到 48 h 后同样逆转了这种作用,即抑制了迁移和浸润。机制可能为乳腺癌细胞中 miR-200c 的上调导致 AKT2 和 Bcl-2 的抑制,而 miR-200c 下调则进一步上调了 AKT2 和 Bcl-2,促进了乳腺癌的进展。AKT2 是乳腺癌的凋亡抑制因子和细胞存活因子。该研究认为,改变 AKT2 的表达可能至少是影响二甲双胍抗肿瘤活性机制的一部分。但目前还没有研究证明 miR-200c 和 AKT2 之间的直接关系。而最近的一项相关研究^[21]表明,Bcl-2 是 miR-200c 的直接靶点。

4.2 miR-27a 最近有研究^[22]表明,用 20 mmol/L 二甲双胍处理乳腺癌 MCF-7 细胞 48 h 后的 qRT-PCR 结果显示,二甲双胍处理后 miR-27a 的表达相比对照组显著降低 80%。研究人员认为 miR-27a 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡并促进增殖。二甲双胍抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖作用呈浓度依赖性和时间依赖性。P53 的表达可能增加,且 caspase-3 被激活,导致乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡。且荧光素酶测定证实了 miR-27a 与 AMPK α 2 的 3'-UTR 结合,意味着二甲双胍可以增加 AMPK α 2 的表达。

4.3 miR-21-5p 二甲双胍对 miR-21-5p 水平的影响可能是通过调控转录实现的。最近研究^[23]发现在体内和体外试验中应用二甲双胍都使 miR-21-5p 水平下调。已知 E2F3 具有转录抑制能力。在二甲双胍治疗后的时间内显示 E2F3 转录水平的增加,这使得该因子在 miR-21-5p 启动子上结合增加。miR-21-5p 的下调主要发生在 E2F3 增加其启动子结合率后的转录水平。该研究还认为二甲双胍可通过 miR-21-5p 调控的支架蛋白 CAB39L 和 SESN1 调节 AMPK-mTOR 信号,并且这一作用通过模拟 CAB39L 和 SESN1 的过度表达或下调 miR-21-5p 实现。

5 二甲双胍可逆转乳腺癌细胞耐药性

对于许多恶性肿瘤来说,最初成功治疗之后多药物耐药性的出现是一个巨大的难题。乳腺癌的早期诊断筛选以及合并疗法的先进性大大提高了存活期和治愈率^[24]。然而很多患者多年后肿瘤会复发,产生多种药物耐药性(multiple drug resistant, MDR),因此研制出一种非毒性疗法以及预防多重耐药性肿瘤的发展至关重要。MDR 相关蛋白主要包括 ABC 转运家族比如 MDR1 和 BCRP。这些蛋白作为药物输

出泵的过度表达与药物抗性相关。Davies 等^[25]选取了阿霉素作为乳腺癌 MCF7 细胞系的抗性药物。该研究表明二甲双胍可以逆转 MDR 相关蛋白标记的水平,使 MDR 乳腺癌细胞对其最初治疗重新敏感。研究中发现二甲双胍在具有药物抗性的 MCF7 细胞中的抗增殖作用是不依赖 NF- κ B 和 AMPK 的。二甲双胍通过间接抑制组蛋白脱乙酰酶的活性对组蛋白转录后修饰来发挥抗癌细胞的增殖作用。二甲双胍降低了 MDR1 和 BCRP 的表达,在降低了癌症相关基因 S6K 磷酸化的同时降低了转录因子 HIF1 α 水平。在体外细胞抗性培养过程中用二甲双胍预处理细胞并且始终维持二甲双胍的存在,能够阻止甚至延迟 MDR 标记蛋白的聚集(MDR1、BCRP 等),使其保持了药物的敏感性,这为二甲双胍成为长期的口服药物来阻止肿瘤药物抗性发展提供可能。P-gp 作为 MDR1 的基因产物,是一个主要的 ABC 转运蛋白,当药物结合到 P-gp 的时候它们就会泵出细胞外,从而导致细胞内药物浓度的降低和效力的丢失。最新的研究^[26]发现二甲双胍逆转乳腺癌细胞的 MDR 是通过降低 P-gp 的活性,从而抑制阿霉素的泵出,增强了 P-gp 过表达 MCF-7 细胞对其的敏感性,但是二甲双胍不会降低 P-gp 的表达。确定二甲双胍的这种影响是长久性的还是短期的可能是下一步计划的研究方向。还有研究^[27]表明,二甲双胍也可以和 2-脱氧葡萄糖结合逆转 MCF-7/Dox 细胞的多药物耐药性,这是通过恢复 p53 功能同时增加阿霉素的积累来实现的。此外,阿霉素通过加重二甲双胍和 2-脱氧葡萄糖引起的代谢应激,选择性增加 MCF-7/Dox 凋亡,这种相辅相成作用使二甲双胍和 2-脱氧葡萄糖的结合对逆转 MDR 有较好的效果。这两种药物的结合对 P-gp mRNA 表达和 P-gp ATP 酶活性没有影响。

6 二甲双胍抑制乳腺肿瘤干细胞

肿瘤干细胞能够引发肿瘤发生,其与肿瘤转移、耐药性和肿瘤复发密切相关。二甲双胍可以选择性靶向乳腺癌干细胞,当结合化疗时能够显著减少乳房肿瘤的生长,并延长缓解期^[28]。Soo 等^[29]发现二甲双胍在与环磷酰胺合并化疗时,在乳腺癌干细胞中是不依赖 AMPK 发生的,而在亲代乳腺癌细胞系中是依赖 AMPK 的,这说明二甲双胍在肿瘤干细胞中发挥作用的机制可能与亲代细胞系存在不同。二甲双胍在乳腺癌干细胞中加快了葡萄糖的消耗,产生了更多的乳酸,细胞内 ATP 的产生严重受阻,引发能量危机,损害了肿瘤干细胞修复环磷酰胺介导的 DNA 损伤。在乳腺癌干细胞中,二甲双胍降低了 RAS 原癌

基因家族 Rab27A 的表达,而之前报道 Rab27A 的过度表达会促进乳腺癌的生长和转移^[30]。BRCA1 突变引起的 RANKL 过表达,使其突变携带者发展出具有干细胞样性质的侵袭性乳腺肿瘤,有学者^[31]发现二甲双胍能够阻止这一过程发生的同时,还会降低乳腺癌干细胞数量,提高 RANKL 抗体(狄诺塞麦)的抗肿瘤活性。这为二甲双胍合并狄诺塞麦联合治疗 RANKL 相关的乳腺肿瘤发生和转移提供证据。研究证明二甲双胍在不同类型的乳腺肿瘤中通过降低 CSC 特殊基因的表达抑制相关的炎症反应,所以相对于非肿瘤干细胞来说更优先杀死肿瘤干细胞。最近有报道二甲双胍可以通过 PKA-GSK3 β -KLF5 通路来下调干细胞转录因子 KLF5 的表达,进一步实验发现,二甲双胍通过抑制 PKA 活性,进而激活 GSK3 β ,而活化的 GSK3 β 直接磷酸化 KLF5,磷酸化的 KLF5 进而被泛素-蛋白酶体系统降解。在三阴性乳腺癌临床样本中,利用免疫组化染色的方法发现 PKA 高度活化, p-GSK3 β 以及 KLF5 高表达,统计结果揭示 PKA 活化程度、p-GSK3 β 表达均与 KLF5 表达水平呈显著正相关,从而抑制三阴性乳腺癌干细胞,为三阴性乳腺癌的治疗提供靶点^[32]。

7 二甲双胍治疗乳腺癌的临床应用研究进展

目前已有大量观察性研究以及前瞻性研究在人群中证实二甲双胍的抗乳腺癌作用,但如何应用于临床治疗仍有待进一步研究。关键问题之一为二甲双胍抗乳腺癌的治疗剂量。一项体外研究^[33]显示二甲双胍抑制癌细胞增殖的浓度比治疗糖尿病的药物浓度至少高出 10 倍。总的来说,二甲双胍安全性较高,最严重副反应为乳酸酸中毒,但极其罕见,而且其发生低血糖的概率在 2 型糖尿病患者或正常人群中均较低^[34]。而在生物药剂学分类系统中,二甲双胍是 III 类药物,原因为其具有较低口服生物利用度 ($F=55\% \pm 16\%$) 且半衰期约为 5 h^[35]。尚没有一个能够负载足够剂量二甲双胍或控制其释放速率的载体。最新的一项研究^[36]提示生物相容性凝胶可能延长其在注射部位的停留时间,并通过其高度粘稠的结构特性控制二甲双胍的释放。以药用高分子材料泊洛沙姆(Poloxamer)407 和 124 为负载的无菌二甲双胍制剂,在室温下注射可在体温下发生溶胶到凝胶的转变,且已被证明可在 5 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下储存一个月。药代动力学数据表明,从给药开始至 48 h 可明显在血浆中检测到二甲双胍,更重要的是,药物在组织积聚的水平显著高于血浆中观察到的水平。低剂量连续释放二甲双胍可使药物在肿瘤内显著聚积,并发挥抗

增殖和促凋亡活性。研究者认为该热敏凝胶制剂具有良好的稳定性、耐受性、热变性和流变性,其既可以达到满意的疗效,又可以避免血浆中极高的药物浓度带来的副作用,是进一步研究辅助癌症治疗的新工具。

8 结论与展望

二甲双胍对乳腺癌具有一定的抗肿瘤作用已逐渐被认可。但是,二甲双胍抑制乳腺癌细胞的分子机制及临床应用的疗效仍不确切。最新的研究发现二甲双胍可抑制存在耐药性的乳腺癌发展并提高其复敏性,这为二甲双胍作为长期的口服药物来阻止肿瘤耐药性发展提供了理论依据。除本文所提到的 miRNA 外,尚有其他种类 miRNA 可能在抑制肿瘤增殖,促进凋亡中起作用。另外,对二甲双胍抑制肿瘤干细胞机制的研究为治疗三阴性乳腺癌提供了潜在的药物靶点。但其与抑制肿瘤细胞的通路究竟是何种关系仍需进一步的研究。因此需要未来更多探索以明确二甲双胍的作用机制及临床适用征。笔者认为未来几年的研究方向可能包含直接和间接效应在二甲双胍机制中的比例,剂量的探索及如何准确快速地判断患者使用二甲双胍是否获益三个方面,因为这些直接关系到在非糖尿病的癌症患者中是否适用及达到最佳抗癌效果所需剂量等临床实际问题。

【参考文献】

- [1] Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level[J]. *Oncogene*, 2008, 27(25): 3576-3568.
- [2] Bronsveld HK, Jensen V, Vahl P, et al. Diabetes and breast cancer subtypes[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0170084.
- [3] Schrauder MG, Fasching PA, Häberle L, et al. Diabetes and prognosis in a breast cancer cohort[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(6): 975-983.
- [4] Liao S, Li J, Wei W, et al. Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(4): 1061-1065.
- [5] Muszyńska-Oglaza A, Zarzycka-Lindner G, Olejniczak H, et al. Use of metformin is associated with lower incidence of cancer in patients with type 2 diabetes[J]. *Endokrynol Pol*, 2017, 68(6): 652-658.
- [6] Sonnenblick A, Agbor-Tarh D, Bradbury I, et al. Impact of diabetes, insulin, and metformin use on the outcome of patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive primary breast cancer: analysis from the ALTT0 Phase III randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(13): 1421-1429.
- [7] Chung YC, Chang CM, Wei WC, et al. Metformin-induced caveolin-1 expression promotes T-DM1 drug efficacy in breast cancer

- cells[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):3930.
- [8] Weinberg CR, Shore DL, Umbach DM, et al. Using risk-based sampling to enrich cohorts for endpoints, genes, and exposures[J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 166(4):447-455.
- [9] Park YM, O'Brien KM, Zhao S, et al. Gestational diabetes mellitus may be associated with increased risk of breast cancer[J]. *Br J Cancer*,2017,116(7):960-963.
- [10] Hardefeldt PJ, Edirimanne S, Eslick GD. Diabetes increases the risk of breast cancer: a meta-analysis[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(6):793-803.
- [11] Margariti N, Fox SB, Bottini A, et al. "Overcoming breast cancer drug resistance with mTOR inhibitors". Could it be a myth or a real possibility in the short-term future[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011,128(3):599-606.
- [12] Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells[J]. *PLoS ONE*,2014,9(5):e98207.
- [13] 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.
- [14] Alalem M, Ray A, Ray BK. Metformin induces degradation of mTOR protein in breast cancer cells[J]. *Cancer Med*,2016, 5(11):3194-3204.
- [15] Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, et al. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation[J]. *Cancer Res*,2008,68(8):2557-2560.
- [16] Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia[J]. *Nat Rev Cancer*,2008,8(12):915-928.
- [17] Dowling RJ, Niraula S, Chang MC, et al. Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer:a prospective window of opportunity neoadjuvant study[J]. *Breast Cancer Res*,2015,17:32.
- [18] Ji W, Sun B, Su C. Targeting microRNAs in cancer gene therapy[J]. *Genes*,2017,8(1):21.
- [19] Song C, Liu LZ, Pei XQ, et al. miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(33):34968-34978.
- [20] Zhang J, Li G, Chen Y, et al. Metformin inhibits tumorigenesis and tumor growth of breast cancer cells by upregulating miR-200c but downregulating AKT2 expression[J]. *J Cancer*,2017,8(10):1849-1864.
- [21] Zhong X, Zheng L, Shen J, et al. Suppression of microRNA 200 family expression by oncogenic KRAS activation promotes cell survival and epithelial-mesenchymal transition in KRAS-driven cancer[J]. *Mol Cell Biol*,2016,36(21):2742-2754.
- [22] Zhao W, Zhang X, Liu J, et al. miR-27a-mediated antiproliferative effects of metformin on the breast cancer cell line MCF-7[J]. *Oncol Rep*,2016,36(6):3691-3699.
- [23] Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, et al. Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics[J]. *Genes Dev*,2004,18(12):1413-1422.
- [24] Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(21):1998-2005.
- [25] Davies G, Lobanova L, Dawicki W, et al. Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer[J]. *PLoS ONE*,2017,12(12):e0187191.
- [26] Shafiei-Irannejad V, Samadi N, Yousefi B, et al. Metformin enhances doxorubicin sensitivity via inhibition of doxorubicin efflux in P-gp-overexpressing MCF-7 cells[J]. *Chem Biol Drug Des*,2018, 91(1):269-276.
- [27] Xue C, Wang C, Sun Y, et al. Targeting P-glycoprotein function, p53 and energy metabolism: Combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of MCF-7/Dox cells to doxorubicin[J]. *Oncotarget*,2017,8(5):8622-8632.
- [28] Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells[J]. *Cell Stem Cell*,2015,16(3):225-238.
- [29] Soo JS, Ng CH, Tan SH, et al. Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells[J]. *Apoptosis*,2015,20(10):1373-1387.
- [30] Feng F, Zhang J, Fan X, et al. Downregulation of Rab27A contributes to metformin-induced suppression of breast cancer stem cells[J]. *Oncol Lett*,2017,14(3):2947-2953.
- [31] Cuyàs E, Martín-Castillo B, Bosch-Barrera J, et al. Metformin inhibits RANKL and sensitizes cancer stem cells to denosumab[J]. *Cell Cycle*,2017,16(11):1022-1028.
- [32] Shi P, Liu W, Tala , et al. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation[J]. *Cell Discov*,2017,3:17010.
- [33] Menendez JA, Martín-Castillo B, Joven J. Metformin and cancer: Quo vadis et cui bono[J]. *Oncotarget*,2016,7(34):54096-54101.
- [34] Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin in breast cancer: time for action[J]. *J Clin Oncol*,2009,27(20):3271-3273.
- [35] Graham GG, Punt J, Arora M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin[J]. *Clin Pharmacokinet*,2011,50(2):81-98.
- [36] Baldassari S, Solari A, Zuccari G, et al. Development of an injectable slow-release metformin formulation and evaluation of its potential antitumor effects[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):3929.