

Research Progress on Anti-Tumor Effect of Metformin in Gastric Cancer

Liqin He, Shuangshuang Zhang, Yichao Feng

Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an Shaanxi
Email: 842585037@qq.com

Received: Jun. 23rd, 2019; accepted: Jul. 8th, 2019; published: Jul. 15th, 2019

Abstract

At present, more and more evidence that metformin has the effect of lowering blood sugar; it also can reduce the cancer risk of diabetes. Previous research has shown that metformin may work alone or in combination with some anticancer drugs synergy, through single adenosine phosphate activated protein kinase (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) signaling pathway having antitumor effects on various types of cancer. However, metformin research on antitumor effect of gastric cancer is less in this paper. Combined with domestic and foreign literature, this paper introduces the metformin in different mechanisms of antitumor, gastric cancer from genes, signaling pathways to the function of gastric cancer cell lines and gastric cancer stem cells and the interaction between tumor cells and tumor microenvironment. And they summarized as follows.

Keywords

Metformin, Gastric Cancer, Anti-Tumor Effect

二甲双胍对胃癌抗肿瘤作用的研究进展

贺礼琴, 张双双, 冯义朝

延安大学附属医院, 陕西 延安
Email: 842585037@qq.com

收稿日期: 2019年6月23日; 录用日期: 2019年7月8日; 发布日期: 2019年7月15日

摘要

目前越来越多的证据表明,二甲双胍除了具有降低血糖的作用外,还可降低糖尿病患者的癌症发生风险,

先前的研究表明二甲双胍可以单独作用或与某些抗癌药物协同作用,通过腺苷单磷酸活化蛋白激酶(Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)信号通路对各种类型的肿瘤产生抗肿瘤作用。然而,二甲双胍对胃癌的抗肿瘤作用研究较少。本文结合国内外文献,介绍了二甲双胍在胃癌抗肿瘤作用中的不同机制,从基因、信号通路到对胃癌细胞系和胃癌干细胞的功能影响以及肿瘤细胞与肿瘤微环境之间的相互作用,并综述如下。

关键词

二甲双胍, 胃癌, 抗肿瘤作用

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

胃癌(Gastric cancer, GC)是全球发病率第四位的恶性肿瘤,在肿瘤中致死率居第二位[1],由于其恶性程度高,是最常见的癌症类型之一。胃癌的传统治疗方法有胃切除术和放化疗,即使在根治切除和辅助放化疗后,其复发率和死亡率也很高,5年总生存率(Overall survival, OS) < 25% [2],而且70%以上的胃癌发生在发展中国家,东亚的发病率占世界总量的一半,且主要发生在中国[3]。因此,在这种背景下开发新的有效的治疗方法是改善GC预后的必要条件。

二甲双胍是一种公认的降糖药物,也被认为是治疗2型糖尿病的一线药物[4] [5]。它通过抑制糖异生而降低肝脏葡萄糖的产生,改善骨骼肌对葡萄糖的摄取,降低胰岛素抵抗[6],与其他降糖药物相比,二甲双胍不会导致体重增加和低血糖风险增加。除了降血糖特性,流行病学研究表明,接受二甲双胍治疗的糖尿病患者比未接受二甲双胍治疗的患者患癌症的风险明显降低[7]。Evans等[8]首先假设二甲双胍可以降低罹患癌症的风险,他们对糖尿病患者进行了试点病例对照研究,发现二甲双胍治疗的糖尿病患者的癌症发生率为36.4%,而其他降糖药物治疗糖尿病患者的癌症发生率为39.7%。Wu等人[9]在2015年的一项荟萃分析中评估了二甲双胍在2型糖尿病患者中的使用情况,结果显示,与未接受二甲双胍治疗的糖尿病患者相比,接受二甲双胍治疗的糖尿病患者的发病率降低了14%,死亡率降低了30%。此外,其他荟萃分析[10] [11] [12] [13]也得到了类似的结果,表明二甲双胍总体上降低了患癌症的风险。虽然一些实验室和流行病学研究表明二甲双胍可能在糖尿病患者中发挥普遍的抗肿瘤作用,但二甲双胍是否能降低胃癌等特定类型癌症的风险仍不清楚。因此,本文综述旨在阐明二甲双胍在胃癌中抗肿瘤作用的研究进展。

2. 二甲双胍对胃癌细胞株具有抗增殖作用

Kato等[14]在体内外研究了二甲双胍对不同GC细胞株(MKN1、MKN45、MKN74)的影响。他们发现,随着二甲双胍剂量的增加及时间的延长降低体外细胞增殖的效应越强,在体内他们对裸鼠皮下注射了MKN74细胞,每日腹腔注射二甲双胍1或2 mg,连续4周,在治疗结束时,治疗组小鼠的肿瘤明显小于对照组小鼠。这是因为二甲双胍在体内和体外均阻断了G(0)-G(1)的细胞周期,这种阻断伴随着G(1)细胞周期蛋白的大量减少,尤其是在cyclin D1、周期蛋白依赖性激酶(Cdk) 4、Cdk6中,以及视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)磷酸化水平的降低。

3. 二甲双胍抑制上皮细胞向间质转化

Shiva 等[15]发现二甲双胍通过对上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)的抑制作用,对胃癌细胞的侵袭和迁移具有较强的抑制作用,其作用随着时间延长而增强,且不受培养基葡萄糖浓度的影响。单争争等[16]发现 IL-6 作为肿瘤炎症微环境的重要组成部分,能通过诱导胃癌细胞发生 EMT 而增强其侵袭转移能力,加重病情,而经二甲双胍处理后,这种效应能得到明显的抑制。Huang 等[17]发现二甲双胍通过抑制 Bmi-1 来抑制 EMT, Bmi-1 是一种促进肿瘤细胞自我更新和上皮向间质转化的转录调控因子,其上调与肿瘤的进展有关。这种抑制作用是依赖于 TNF- α (LITAF)转录因子, LITAF 被转移到细胞核中,在细胞核中诱导不同 mi-RNA 的表达: hsa-miR-15a、hsa-miR-194、hsa-miR-128、和 hsa-miR-192,这些 mi-RNA 降低了 Bmi-1 的表达。Li 等人[18]的研究通过长链非编码 RNA (Long noncoding RNAs, lncRNA)分析了二甲双胍处理的 AGS 细胞系中长链非编码 RNA (lncRNA)的表达水平。已知 lncRNAH19 在胃癌组织中过表达。他们发现, lncRNAH19 在二甲双胍存在的情况下显著下调,在二甲双胍存在条件下的 lncRNAH19 下调可能是 AMPK 活化和 MMP9 表达降低的原因。经二甲双胍处理后 lncRNAH19 在体外对细胞迁移和侵袭的依赖减少,在体内抑制肿瘤的形成,当把 lncRNAH19 敲除后的效果与二甲双胍治疗的效果相同,因此 lncRNAH19 可能是二甲双胍抑制胃癌细胞侵袭过程中的关键成分。

4. 二甲双胍抑制超音 hedgehog 基因在胃癌细胞中的表达

已知超音 hedgehog 基因(Sonic hedgehog, Shh)信号通路异常激活可导致胃癌[19] [20] [21],且通路的激活对维持胃(Cancer stem cell, CSC)特性(自我更新和耐药)至关重要。Song 等[22]发现二甲双胍可以调节 Shh 信号通路,在胃癌细胞株中(HGC 27 和 MKN 45), Shh 经二甲双胍作用后降低,使用小干扰 RNA (si-RNA)抑制腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)后,这种效应消失[23]。因此,二甲双胍是通过 AMPK 来抑制 Shh 信号通路。

5. 二甲双胍通过抑制 HIF1 α /PKM2 信号来抑制胃癌的发展

Chen 等人[24]的研究发现缺氧诱导因子 1 α (HIF1 α)和丙酮酸激酶 M2 (PKM2)在胃癌组织中高表达,二甲双胍通过抑制 HIF1 α 和 PKM2 的表达来抑制恶性行为的 GC 细胞,从而诱导细胞凋亡,抑制细胞入侵和胃癌细胞的迁移。

6. 二甲双胍通过激活 AMPK 和抑制 mTOR/AKT 信号通路,在人 AGS 胃腺癌细胞中触发固有的凋亡反应

LU 等[25]研究报道发现二甲双胍对人 AGS 胃腺癌细胞具有较强的抗增殖作用和诱导凋亡特性。经二甲双胍处理后增加了腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)的磷酸化,降低了 AKT、列帕霉素(mTOR)和 p70S6k 的磷酸化,用化合物 C(AMPK 抑制剂)抑制 AMPK 磷酸化后,显著消除二甲双胍对 AGS 细胞活力的影响。二甲双胍改变凋亡相关信号通路,通过下调 AGS 细胞中 BAD 磷酸化和 Bcl-2、pro-caspase-9、pro-caspase-3、pro-caspase-7 表达,上调 BAD、细胞色素 c 和 Apaf-1 蛋白水平完成的。吴诗文等[26]研究发现二甲双胍呈时间-剂量依赖性抑制 AGS 细胞增殖,二甲双胍还可协同顺铂(DDP)、阿霉素(ADM)、紫杉醇(PTX)3 种化疗药物促进 AGS 细胞凋亡。竹梦等[27]发现二甲双胍和奥沙利铂联合用药时抑制 SGC-7901 细胞的增殖,抑制 SGC-7901 细胞 cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达水平,抑制 SGC-7901 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平,增加促凋亡蛋白 Bax 以及凋亡执行 caspase3 的 mRNA 和蛋白表达水平,两者联合应用时比单用药物时的调控力度大。二甲双胍与奥沙利铂能够抑制胃癌细胞的增殖并诱导细胞发生凋亡,可能是通过促进 Bax 和 caspase3 的表达,抑制 cyclin D1 和 Bcl-2 表达来实现的。

7. 二甲双胍通过 Akt 通路调控胃癌干细胞的增殖与凋亡

查璐琴等[28]研究报告称二甲双胍可通过抑制 Akt 信号通路抑制胃癌干细胞增殖并诱导其凋亡。他们发现,胰岛素样生长因子 1(Insulin-like growth factors, IGFs1)可以提高胃癌干细胞中 Akt 和 p-Akt 蛋白表达,明显减弱二甲双胍对细胞中 Akt 和 p-Akt 的抑制作用,说明二甲双胍下调胃癌干细胞中 p-Akt 蛋白的表达是通过抑制 Akt 信号通路实现的。

8. 二甲双胍靶向胃癌干细胞

Courtois 等[29]评估了二甲双胍对来源于患者的原发性肿瘤异种移植(Patient-derived xenograft, PDX)和胃癌细胞系(MKN45、AGS 和 MKN74)胃 CSC 增殖和致肿瘤特性的影响,对二甲双胍在传统的二维(2D)和三维(3D)培养体系(其中只有 CSC 能够形成肿瘤球)和小鼠异种移植模型体内的体外效果进行了评估。在三维培养系统中,二甲双胍可以减少肿瘤球的数量,显示其靶向 CSC 的能力,这种效应与 CSC 标志物(CD44 和 Sox2)表达下降和分化标志物(kruppel 样因子 4 和 MUC5AC)表达增加有关。最后,二甲双胍在体内治疗肿瘤异种移植(PDXs)导致肿瘤生长延迟,降低了 CSCs 的自我更新能力。

9. 二甲双胍对胃癌体外及腹膜转移的抗肿瘤作用

SEKINO 等人[30]的研究发现二甲双胍抑制了所有 GC 系(MKN1、MKN45-GFP、KATO-III 和 SNU-1)的细胞增殖,并在体外低糖条件下提高了其敏感性,此外,二甲双胍通过抑制管理 NF- κ B 信号来抑制腹膜转移,与 AMPK 信号途径无明显相关性。

10. 二甲双胍对 ALDH+胃癌干细胞的抑制作用及其机制

王一等[31]研究发现乙醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDH)细胞具有肿瘤干细胞特性,即自我更新能力、分化能力、致瘤能力。他们发现,不同浓度二甲双胍均可降低胃癌细胞 MKN45 中 ALDH+细胞的比例,且随着二甲双胍浓度的升高,ALDH+细胞的比例明显下降,表明二甲双胍对 CSC 具有抑制作用。他们还进一步探索了二甲双胍对干性相关基因 Oct4 和 Sox2 表达的影响,最终 Oct4 和 Sox2 基因表达量下降与干细胞量下降有关。

11. 二甲双胍可调节肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用

Chen 等[32]研究表明二甲双胍能够调节 GC 细胞与其微环境之间的相互作用。他们从胃癌患者中分离出胃肿瘤相关成纤维细胞(Tumor-associated fibroblasts, TAFs),这些 TAFs 经二甲双胍预处理后与 GC 细胞一起培养,与未处理的 TAFs 共培养的 GC 细胞相比,预处理的 TAFs 共培养的 GC 细胞增殖明显减少。他们发现二甲双胍对胃 TAFs 培养基中 32 种蛋白(14 种上调,18 种下调)的分泌有显著影响,其中钙调素样蛋白 3(Calml3)在二甲双胍处理后在胃 TAFs 培养液中上调 2.88 倍。将重组 Calml3 蛋白加入 GC 细胞培养液中,模拟二甲双胍治疗 TAFs 的培养液,结果表明 Calml3 抑制了这些胃癌细胞的克隆性和增殖,所以二甲双胍是通过刺激 TAFs 中 Calml3 的分泌来抑制胃癌细胞的增殖。

12. 二甲双胍的潜在副作用

Aroda 等人[33]对糖尿病前期个体(空腹血糖升高、糖耐量下降、超重/肥胖)进行了前瞻性对照研究发现长期服用二甲双胍与维生素 B12 缺乏和贫血有关,维生素 B12 缺乏在一定程度上又会引起外周神经病变,故应考虑对接受二甲双胍治疗的患者进行维生素 B12 水平的常规检测。目前认为是二甲双胍对钙依赖膜作用的干扰所引起的,钙依赖膜作用负责维生素 B12 内因子在回肠末端的吸收[34] [35] [36] [37]。尽

管大量研究表明二甲双胍对胃癌等其他类型的癌症有一定的抗肿瘤作用，但同时了解二甲双胍治疗的潜在的不良后果也是至关重要的。

13. 结论

二甲双胍是一种广泛用于治疗 2 型糖尿病的药物，耐受性良好，副作用较少。大量数据表明二甲双胍在胃癌中也有抗肿瘤作用，并调控已知与胃癌发生有关的不同基因、信号通路，同时，二甲双胍还能靶向胃 CSC，抑制胃癌体外、腹膜转移及 ALDH+胃癌干细胞，调节肿瘤细胞与肿瘤微环境之间的相互作用。这些特性均表明二甲双胍是一种有前途的新型的胃癌抗癌药物，可提高胃癌患者的生存率，但长期作用还需要我们有待进一步去研究。

参考文献

- [1] Yamamoto, H., Watanabe, Y., Maehata, T., *et al.* (2014) An Updated Review of Gastric Cancer in the Next-Generation Sequencing Era: Insights from Bench to Bedside and *Vice Versa*. *World Journal of Gastroenterology*, **20**, 3927-3937. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3927>
- [2] Durães, C., Almeida, G.M., Seruca, R., *et al.* (2014) Biomarkers for Gastric Cancer: Prognostic, Predictive or Targets of Therapy? *Virchows Arch*, **464**, 367-378. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1533-y>
- [3] Wang, J., Yu, J.C., Kang, W.M., *et al.* (2012) Treatment Strategy for Early Gastric Cancer. *Surgical Oncology*, **21**, 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2010.12.004>
- [4] Hou, Y.C., Hu, Q., Huang, J., *et al.* (2017) Metformin Therapy and the Risk of Colorectal Adenoma in Patients with Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncotarget*, **8**, 8843-8853. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13633>
- [5] Castilla-Guerra, L., Fernandez-Moreno, M.D., Leon-Jimenez, D., *et al.* (2018) Antidiabetic Drugs and Stroke Risk. Current Evidence. *European Journal of Internal Medicine*, **48**, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.09.019>
- [6] Zhou, G., Myers, R., Li, Y., *et al.* (2001) Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action. *Journal of Clinical Investigation*, **108**, 1167-1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>
- [7] Decensi, A., Puntoni, M., Goodwin, P., *et al.* (2010) Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Prevention Research*, **3**, 1451-1461. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0157>
- [8] Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., *et al.* (2005) Metformin and Reduced Risk of Cancer in Diabetic Patients. *BMJ*, **330**, 1304-1305. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>
- [9] Wu, L., Zhu, J., Prokop, L.J., *et al.* (2015) Pharmacologic Therapy of Diabetes and Overall Cancer Risk and Mortality: A Meta-Analysis of 265 Studies. *Scientific Reports*, **5**, Article ID: 10147. <https://doi.org/10.1038/srep10147>
- [10] Thakkar, B., Aronis, K.N., Vamvini, M.T., *et al.* (2013) Metformin and Sulfonylureas in Relation to Cancer Risk in Type II Diabetes Patients: A Meta-Analysis Using Primary Data of Published Studies. *Metabolism*, **62**, 922-934. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.014>
- [11] Franciosi, M., Lucisano, G., Lapice, E., *et al.* (2013) Metformin Therapy and Risk of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: Systematic Review. *PLoS ONE*, **8**, e71583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071583>
- [12] Soranna, D., Scotti, L., Zambon, A., *et al.* (2012) Cancer Risk Associated with Use of Metformin and Sulfonylurea in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncologist*, **17**, 813-822. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-0462>
- [13] Noto, H., Goto, A., Tsujimoto, T., *et al.* (2012) Cancer Risk in Diabetic Patients Treated with Metformin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, **7**, e33411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033411>
- [14] Kato, K., Gong, J., Iwama, H., *et al.* (2012) The Antidiabetic Drug Metformin Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation *in Vitro* and *in Vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics*, **11**, 549-560. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0594>
- [15] Valaee, S., Yaghoobi, M.M. and Shamsara, M. (2017) Metformin Inhibits Gastric Cancer Cells Metastatic Traits through Suppression of Epithelial-Mesenchymal Transition in a Glucose-Independent Manner. *PLoS ONE*, **12**, e0174486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174486>
- [16] 单争争, 王峰, 何炜, 等. 二甲双胍对 IL-6 诱导的胃癌 SGC7901 细胞上皮间质转化的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(3): 361-367.
- [17] Huang, D., He, X., Zou, J., *et al.* (2016) Negative Regulation of Bmi-1 by AMPK and Implication in Cancer Progression. *Oncotarget*, **7**, 6188-6200. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6748>

- [18] Li, P., Tong, L., Song, Y., *et al.* (2019) Long Noncoding RNA H19 Participates in Metformin-Mediated Inhibition of Gastric Cancer Cell Invasion. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 4515-4527. <https://doi.org/10.1002/jcp.27269>
- [19] Suzuki, H., Minegishi, Y., Nomoto, Y., *et al.* (2005) Down-Regulation of a Morphogen (Sonic Hedgehog) Gradient in the Gastric Epithelium of *Helicobacter pylori*-Infected Mongolian Gerbils. *The Journal of Pathology*, **206**, 186-197. <https://doi.org/10.1002/path.1763>
- [20] Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., *et al.* (2003) Widespread Requirement for Hedgehog Ligand Stimulation in Growth of Digestive Tract Tumours. *Nature*, **425**, 846-851. <https://doi.org/10.1038/nature01972>
- [21] Ma, X., Chen, K., Huang, S., *et al.* (2005) Frequent Activation of the Hedgehog Pathway in Advanced Gastric Adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, **26**, 1698-1705. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi130>
- [22] Song, Z., Yue, W., Wei, B., *et al.* (2011) Sonic Hedgehog Pathway Is Essential for Maintenance of Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer. *PLoS ONE*, **6**, e17687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017687>
- [23] Song, Z., Wei, B., Lu, C., *et al.* (2017) Metformin Suppresses the Expression of Sonic Hedgehog in Gastric Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, **15**, 1909-1915. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6205>
- [24] Chen, G., Feng, W., Zhang, S., *et al.* (2015) Metformin Inhibits Gastric Cancer via the Inhibition of HIF1 α /PKM2 Signaling. *American Journal of Cancer Research*, **5**, 1423-1434.
- [25] Lu, C.C., Chiang, J.H., Tsai, F.J., *et al.* (2019) Metformin Triggers the Intrinsic Apoptotic Response in Human AGS Gastric Adenocarcinoma Cells by Activating AMPK and Suppressing mTOR/AKT Signaling. *International Journal of Oncology*, **54**, 1271-1281. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4704>
- [26] 吴诗文, 张自森, 刘谦, 等. 二甲双胍联合化疗药物对人胃癌 AGS 细胞的作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(1): 37-41.
- [27] 竹梦, 王建祥, 范渊, 等. 二甲双胍联合奥沙利铂抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖和诱导凋亡[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(11): 4398-4405.
- [28] 查璐琴, 韩本高, 张超杰. 二甲双胍通过 Akt 通路调控胃癌干细胞的增殖与凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(5): 657-662.
- [29] Courtois, S., Durán, R.V., Giraud, J., *et al.* (2017) Metformin Targets Gastric Cancer Stem Cells. *European Journal of Cancer*, **84**, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.07.020>
- [30] Sekino, N., Kano, M., Matsumoto, Y., *et al.* (2018) The Antitumor Effects of Metformin on Gastric Cancer *in Vitro* and on Peritoneal Metastasis. *Anticancer Research*, **38**, 6263-6269. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12982>
- [31] 王一, 向勇平, 刘丹丹, 等. 二甲双胍对 ALDH⁺胃癌干细胞的抑制作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(1): 7-11.
- [32] Chen, G., Yu, C., Tang, Z., *et al.* (2019) Metformin Suppresses Gastric Cancer Progression through Calmodulin-Like Protein 3 Secreted from Tumor-Associated Fibroblasts. *Oncology Reports*, **41**, 405-414. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6783>
- [33] Aroda, V.R., Edelstein, S.L., Goldberg, R.B., *et al.* (2016) Long-Term Metformin and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **101**, 1754-1761. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3754>
- [34] Caspary, W.F., Zavada, I., Reimold, W., *et al.* (1977) Alteration of Bile Acid Metabolism and Vitamin-B12-Absorption in Diabetics on Biguanides. *Diabetologia*, **13**, 187-193. <https://doi.org/10.1007/BF01219698>
- [35] Berchtold, P., Dahlqvist, A., Gustafson, A., *et al.* (1971) Effects of a Biguanide (Metformin) on Vitamin B 12 and Folic Acid Absorption and Intestinal Enzyme Activities. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **6**, 751-754. <https://doi.org/10.3109/00365527109179948>
- [36] Bauman, W.A., Shaw, S., Jayatilleke, E., *et al.* (2000) Increased Intake of Calcium Reverses Vitamin B12 Malabsorption Induced by Metformin. *Diabetes Care*, **23**, 1227-1231. <https://doi.org/10.2337/diacare.23.9.1227>
- [37] Bell, D.S. (2010) Metformin-Induced Vitamin B12 Deficiency Presenting as a Peripheral Neuropathy. *The Southern Medical Journal*, **103**, 265-267. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181ce0e4d>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网首页：<http://cnki.net/>，点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”，跳转至：<http://scholar.cnki.net/new>，搜索框内直接输入文章标题，即可查询；
或点击“高级检索”，下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版：<http://www.cnki.net/old/>，左侧选择“国际文献总库”进入，搜索框直接输入文章标题，即可查询。

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org