

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241209.001

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.r.20241209.1010.002>

结合生物信息学探究磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 对胆管癌细胞生物学行为的影响及机制

严华悦^{1,2}, 周汉旭¹, 王胜威¹, 杨立春¹, 刘子祥¹, 贾建光¹✉

(1. 蚌埠医科大学第二附属医院, 安徽 蚌埠 233000; 2. 组织移植安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233000)

[摘要] **目的:** 本研究旨在结合生物信息学探讨磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PCK1) 在胆管癌细胞中的表达, 及其对胆管癌细胞增殖、迁移的影响和潜在机制。 **方法:** 基于 GEO 数据库中胆管癌 mRNA 测序数据筛选差异表达基因。通过 STRING 网站及 Cytoscape 软件构建蛋白质-蛋白质互相作用网络 (PPI 网络), 并筛选关键调控网络及基因。通过 TCGA 数据库及 HPA 数据库验证关键基因表达量及病理学特征。通过 KEGG 及 GSEA 富集分析探究差异基因相关功能及 PCK1 相关通路。细胞学实验中采用慢病毒转染胆管癌 RBE 细胞株以过表达 PCK1, 采用 RT-qPCR 及蛋白质印迹法验证转染效率。将实验分为阴性对照组 (RBE 组)、空转组 (RBE-NC 组)、过表达组 (RBE-OE 组) 及 PPAR γ 抑制剂组 (RBE-OE+GW9662 组)。采用集落形成实验及 CCK8 法检测细胞增殖能力, 采用划痕愈合实验及 Transwell 实验检测细胞迁移能力, 采用蛋白质印迹检测通路蛋白表达水平。 **结果:** 生物信息学分析显示 PCK1 可以作为胆管癌的关键调控基因, 在癌组织中表达水平较低, 可能通过 PPAR 通路发挥作用。细胞学实验显示: RBE 细胞经转染后, PCK1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。与阴性对照组相比, 过表达 PCK1 抑制 RBE 细胞体外增殖和迁移能力, 同时 PPAR γ 、PTEN 蛋白表达升高, 而 p-mTOR/mTOR 水平降低, 而抑制剂组则可逆转上述趋势。 **结论:** PCK1 可以作为胆管癌的关键调控基因, 并可能通路激活 PPAR γ /PTEN/mTOR 信号通路抑制胆管癌增殖及迁移。

[关键词] 生物信息学; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1; 胆管癌; 生物学行为; 机制

[中图分类号] R735.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)12-0928-10

Exploring the effects and mechanisms of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 on the biological behavior of cholangiocarcinoma cells through bioinformatics

YAN Huayue^{1,2}, ZHOU Hanxu¹, WANG Shengwei¹, YANG Lichun¹, LIU Zixiang¹, JIA Jianguang¹✉

(1. The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China; 2. Anhui Province Key Laboratory of Tissue Transplantation, Bengbu 233000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the Key Natural Science Research Project of Anhui Provincial Colleges and Universities (2022AH051476), Key Natural Science Project of Bengbu Medical College (2021byzd197), and 2023 Graduate Research Innovation Program of Bengbu Medical College (Byycx23125)

[Author]: YAN Huayue, E-mail: yan11710110416@163.com.

[Correspondence to]: JIA Jianguang, Chief Physician, Professor, Master Supervisor, E-mail: Jiajianguang1978@126.com.

Received: 2024-09-12

Revised: 2024-11-23

JHMu, 2025;31(12):928-937

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) in cholangiocarcinoma cells, its effects on cell proliferation and migration, and the underlying mechanisms through bioinformatics analysis. **Methods:** Differentially expressed genes in cholangiocarcinoma were identified using mRNA sequencing data from the GEO database. A protein-

[基金项目] 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(2022AH051476); 蚌埠医学院自然科学重点项目(2021byzd197); 蚌埠医学院 2023 年度研究生科研创新计划(Byycx23125)

[作者简介] 严华悦, E-mail: yan11710110416@163.com。

[通讯作者] 贾建光, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: Jiajianguang1978@126.com。

[收稿日期] 2024-09-12

[修回日期] 2024-11-23

网络出版时间: 2024-12-09 13:37:55

protein interaction (PPI) network was constructed using STRING and Cytoscape, and key regulatory networks and genes were identified. The expression levels and pathological characteristics of key genes were validated using the TCGA and HPA databases. KEGG and GSEA enrichment analyses were performed to explore the functions of differentially expressed genes and PCK1-associated pathways. RBE cholangiocarcinoma cells were transfected with lentivirus to overexpress PCK1. Transfection efficiency was confirmed by RT-qPCR and Western blot. Experimental groups included a negative control (RBE group), an empty vector control (RBE-NC group), an overexpression group (RBE-OE group), and a PPAR γ inhibitor group (RBE-OE+GW9662 group). Cell proliferation was assessed by colony formation and CCK8 assays, while migration was evaluated using wound healing and Transwell assays. Western blot was employed to analyze pathway protein expression. **Results:** Bioinformatics analysis revealed PCK1 as a key regulatory gene in cholangiocarcinoma, with low expression in tumor tissues and potential involvement in the PPAR signaling pathway. Cellular experiments showed that PCK1 mRNA and protein levels were significantly increased in RBE cells after transfection. Compared to the negative control, PCK1 overexpression inhibited RBE cell proliferation and migration, increased PPAR γ and PTEN protein levels, and decreased p-mTOR/mTOR levels. These effects were reversed in the inhibitor group. **Conclusion:** PCK1 may act as a key regulatory gene in cholangiocarcinoma and potentially suppresses cell proliferation and migration through the activation of the PPAR γ /PTEN/mTOR signaling pathway.

[Key words] Bioinformatics; Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; Cholangiocarcinoma; Biological behavior; Mechanism

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是起源于胆管上皮细胞的高度异质性肿瘤,占原发性肝癌的15%和消化道恶性肿瘤的3%^[1,2]。虽然胆管癌是相对少见的恶性肿瘤,然而流行病学研究显示:在我国流行地区胆管癌发病率是西方发达国家的40倍^[3]。胆管癌发生的主要危险因素主要为炎症、胆道梗阻因素、代谢综合征及遗传因素^[4,5]。对于胆管癌的治疗,手术治疗为唯一可能治愈的方法。对于20%~30%符合手术切除条件的患者行手术治疗后,同时卡培他滨辅助化疗,其中位生存期也仅为53个月^[6]。随着精准医疗的发展,深入研究胆管癌的分子机制并揭示其致病关键点,对其早期诊断、个性化干预和靶向治疗意义重大。

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶1(phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PCK1)是参与生物体内糖异生途径的关键酶之一^[7]。通常PCK1在肝、肾等糖异生器官中高度富集,而当这类器官发生癌变时,往往伴随着PCK1的表达下调或缺失^[8]。PCK1作为糖异生关键酶参与肿瘤细胞中多种生理过程,包括且不限于糖异生与有氧糖酵解、氧化应激、脂质合成等^[9-11]。既往研究表明PCK1在肾透明细胞癌^[12]、肝癌^[13]、结直肠癌^[14]等多种肿瘤中具有调控肿瘤进程的作用,而在胆管癌中的作用及机制尚不明确。本研究旨在探讨PCK1在胆管癌的表达水平及其潜在生物学功能与相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及试剂

本研究使用的RBE细胞系由中国科学院上海细胞库提供。PCK1过表达慢病毒、慢病毒转染试剂盒及嘌呤霉素由上海吉凯基因公司构建与提供。RPMI-1640基础培养基、磷酸盐缓冲液

(PBS)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶购自于美国Thermo Fisher Scientific公司。链霉素-青霉素双抗、CCK-8试剂盒购自于安徽白鲨公司。Transwell小室来自美国Corning公司。PCK1、PPAR γ 、PTEN和mTOR等抗体购自于Affinity公司。山羊抗兔二抗购自于美国Abclonal公司。PPAR γ 抑制剂GW9662购自于美国Med Chem Express公司。Trizol、反转录试剂以及PCR引物购自上海生工生物工程公司。

1.2 生物信息学

1.2.1 差异基因分析 通过下载GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中胆管癌mRNA测序数据GSE76297数据集(癌组织 $n=91$, 癌旁组织 $n=92$)与GSE32879数据集(癌组织 $n=16$, 癌旁组织 $n=7$)进行后续生物信息学分析。基于R Studio 4.2.3软件利用limma包^[15]分别对上述数据集以癌旁组织与癌组织分组进行差异分析并可视化。对差异分析结果以校正 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC|\geq 1.5$ 为标准取交集差异基因。

1.2.2 关键调控基因筛选 基于STRING网站(<https://string-db.org/>)构建交集差异基因的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。基于Cytoscape_v3.10.2软件进行可视化,使用MCODE插件提取PPI网络中的关键子网络,并挖掘其中关键调控基因。

1.2.3 关键调控基因表达量分析及免疫组化 在TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)中胆管癌数据集CHOL对挖掘出的关键调控基因进行表达分析及验证。基于HAP数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)中查找正常胆管组织和胆管癌组织的免疫组化图谱,比较关键调控基因在二者中的

表达水平。

1.2.4 基因功能及通路富集分析 基于 R Studio 4.2.3 软件利用 clusterProfiler 包^[16]对上述交集差异基因进行 KEGG 富集分析,进一步探究胆管癌发生发展的过程中的分子机制。再在癌组织中进行单基因 GSEA 富集分析,探究胆管癌中异常表达的相关通路与关键基因的调控关系。

1.3 细胞实验方法

1.3.1 细胞培养 使用含 10%FBS 及 1% 链霉素-青霉素双抗的 RPMI-1640 完全培养基培养 RBE 细胞系。培养环境为 100% 湿度、5% CO₂、37℃ 的恒温恒湿培养箱。通过显微镜观察细胞的生长状态,并适时进行换液。当细胞生长至 80%~90% 时用胰酶消化进行传代或种板。

1.3.2 慢病毒转染构建 PCK1 稳转株及实验分组 取生长状态良好的 RBE 细胞,使用胰酶消化离心、完全培养基重悬后,按 5×10^4 个/孔接种至六孔板中,将其分为空转组(RBE-NC)、PCK1 过表达组(RBE-OE)。在培养箱培养 24 h 后,根据慢病毒转染操作说明书,以感染复数为 20 的病毒浓度感染细胞。感染 16 h 后进行换液,3 d 后在荧光显微镜下观察转染效率,然后使用嘌呤霉素筛选出稳转细胞进行后续实验。实验随后被分为阴性对照组(RBE 组)、空转组(RBE-NC 组)、过表达组(RBE-OE 组)及 PPAR γ 抑制剂组(RBE-OE+GW9662 组)。

1.3.3 qRT-PCR 检测 PCK1 mRNA 表达情况 在生长状态良好的细胞中加入 Trizol 提取总 mRNA,逆转录试剂盒将其转录为 cDNA。通过 SYBR Green 法,以 β -actin 为内参测定 PCK1 mRNA 表达量,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 PCK1 的相对表达量。PCK1 引物序列为:正向 5'-AGGCGGCT-GAAGAAGTATGACAAC-3',反向 5'-CCCT-GGGAACCTGGCATTGAAC-3', β -actin 引物序列:正向:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCT-3',反向:5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCC-3'。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达情况 提取生长状态良好的细胞,胰酶消化后离心,用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白,并通过 BCA 法定量检测。样品中加入 SDS 上样缓冲液后,在 100℃ 煮沸。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用 PVDF 膜转膜,并用 5% 脱脂牛奶封闭。加入特定抗体(如 PCK1、PPAR γ 、PTEN 等),4℃ 孵育过夜。经 TBST 洗膜后,使用二抗室温孵育 2 h,ECL 显影法检测蛋白表达水平。

1.3.5 集落形成实验及 CCK-8 实验检测细胞增殖 集落形成实验:将对数生长期的细胞经胰酶消

化后离心收集,按 1×10^3 个细胞/孔接种至六孔板,使用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 14 d。多聚甲醛固定后,用结晶紫染色并通过显微镜计数染色的细胞集落,以评估细胞增殖能力。

CCK-8 实验:将对数生长期细胞胰酶消化后离心收集,按 1×10^4 个/孔接种至 96 孔板(每组设 3 个复孔),分别培养 24、48、72 h。各时间点加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,检测 450 nm 吸光度(OD 值)评估细胞增殖能力。

1.3.6 划痕愈合实验及 Transwell 实验检测细胞迁移 划痕愈合实验:将生长状态良好的细胞胰酶消化后离心收集,按 1×10^6 个/孔接种至六孔板并培养至细胞完全融合。使用 200 μ L 移液枪枪头在细胞表面划痕,用 PBS 冲洗脱落细胞。分别在 0 h 和 24 h 显微镜下拍照观察划痕愈合情况,以评估细胞迁移能力。

Transwell 实验:将生长状态良好的细胞胰酶消化后离心收集,重悬于无血清 RPMI-1640 基础培养基。将其种植于 6 孔板的小室上室,下室加入含 10% FBS 的完全培养基以模拟趋化迁移。培养 24 h 后,多聚甲醛固定迁移细胞,用结晶紫染色。显微镜下观察并计数迁移细胞,以评估其迁移能力。

1.4 统计学处理

使用 Graphpad prism10 进行统计学分析并绘制图表,所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。为了确定统计学显著性,不同组间均数的比较采用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

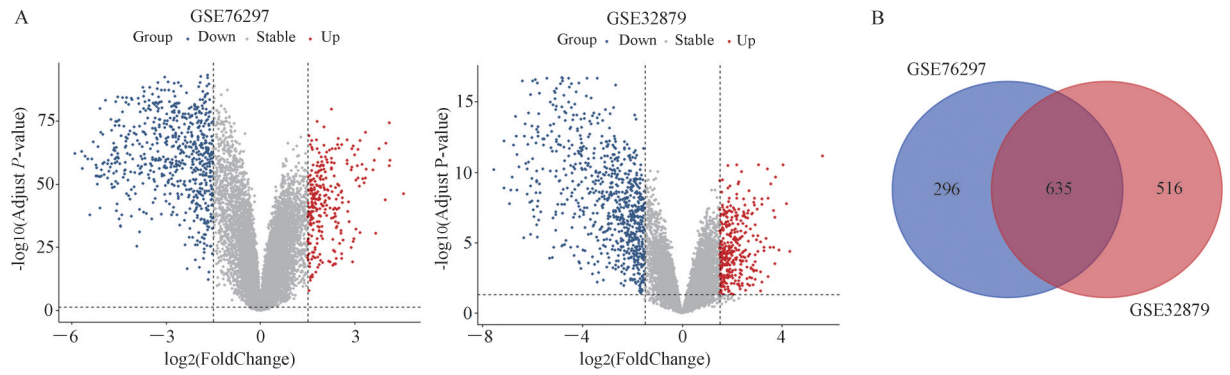
2 结果

2.1 胆管癌数据集差异分析结果

基于 R 语言对 GSE76297 数据集和 GSE32879 数据集以癌旁组织与癌组织分组进行差异分析,以校正 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1.5$ 为标准。GSE76297 数据集共筛选出 931 个差异基因,其中 286 个上调基因,645 个下调基因;GSE76297 数据集共筛选出 1 151 个差异基因,其中 374 个上调基因,777 个下调基因(图 1A)。两个数据集取交集可获得 635 个差异基因(图 1B)。

2.2 交集差异表达基因的 PPI 网络构建及关键子网络分析

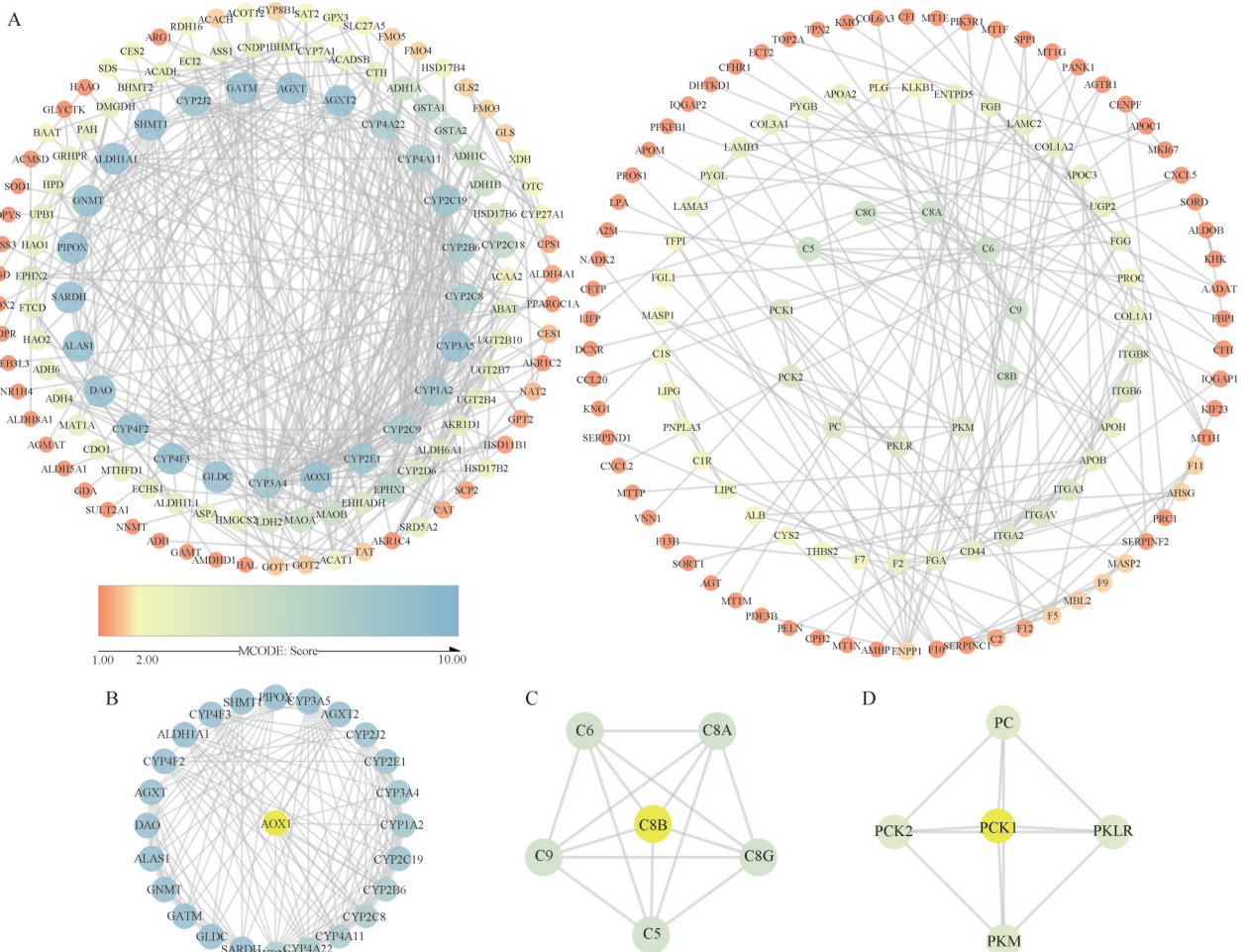
通过 STRING 网站对 635 个交集差异基因进行 PPI 网络构建,使用 Cytoscape 软件进行可视化处理(图 2A)。使用 MCODE 插件提取 PPI 网络中的关键子网络,共得到 17 个子网络。其中得分最高的前 3 个子网络的关键调控基因分别为 AOX1、C8B、PCK1(图 2B~D)。



A:数据集 GSE76297、GSE32879 差异基因火山图;B:两个数据集交集差异基因 Venn图

图1 胆管癌差异基因分析结果

Fig 1 Differential gene analysis results of cholangiocarcinoma



A:交集差异基因的PPI网络;B~D:使用MCODE插件提取的得分最高的前3个子网络

图2 交集差异基因的PPI网络和关键子网络

Fig 2 PPI network and key sub-network of intersection differential genes

2.3 关键调控基因的表达量分析及免疫组化

根据 GSE72697 数据集和 GSE32879 数据集差异分析结果发现: *AOX1*、*C8B*、*PCK1* 在胆管癌组织中均表达下调 (均 $|\log_2FC| < -1.5$)。利用 TCGA 数据库中 CHOL 数据集进一步比较 CCA 组织和癌旁

组织发现: CCA 组织中 *AOX1*、*C8B*、*PCK1* 的表达量均低于癌旁组织 (图 3)。基于 HPA 数据库在线查找 CCA 组织和癌旁组织样本的免疫组化图谱发现: *AOX1* 蛋白表达在正常肝组织中为“+++”, 在正常胆管组织中为“-”, 在胆管癌组织中主要为

“—”;PCK1蛋白表达在正常肝组织中为“+”,在正常胆管组织中为“+”,在胆管癌组织中主要为“—”;C8B蛋白表达在正常肝组织中为“++”,在正常胆管组织中为“—”,在胆管癌组织中为“—~

++”(图4、表1)。结合关键调控基因的表达量分析及免疫组化结果,选取PCK1作为后续进一步研究的基因。

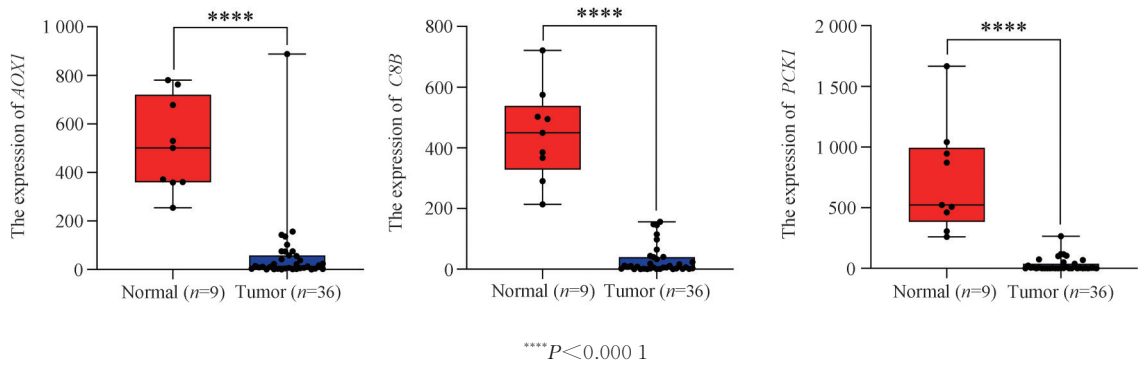


图3 CHOL数据集中AOX1、C8B、PCK1 3个关键基因的癌组织与癌旁组织表达量
Fig 3 Expression levels of *AOX1*, *C8B*, and *PCK1* in cancer tissues and adjacent tissues in CHOL

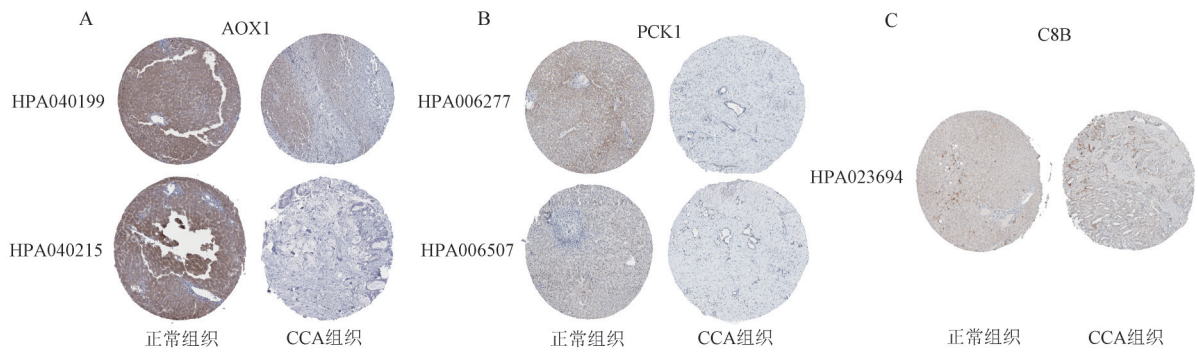


图4 HPA数据库中AOX1、C8B、PCK1 3个关键基因的癌组织与癌旁组织免疫组化图
Fig 4 Immunohistochemical map of cancer tissues and adjacent tissues of the three key genes *AOX1*, *C8B*, and *PCK1* in HPA database

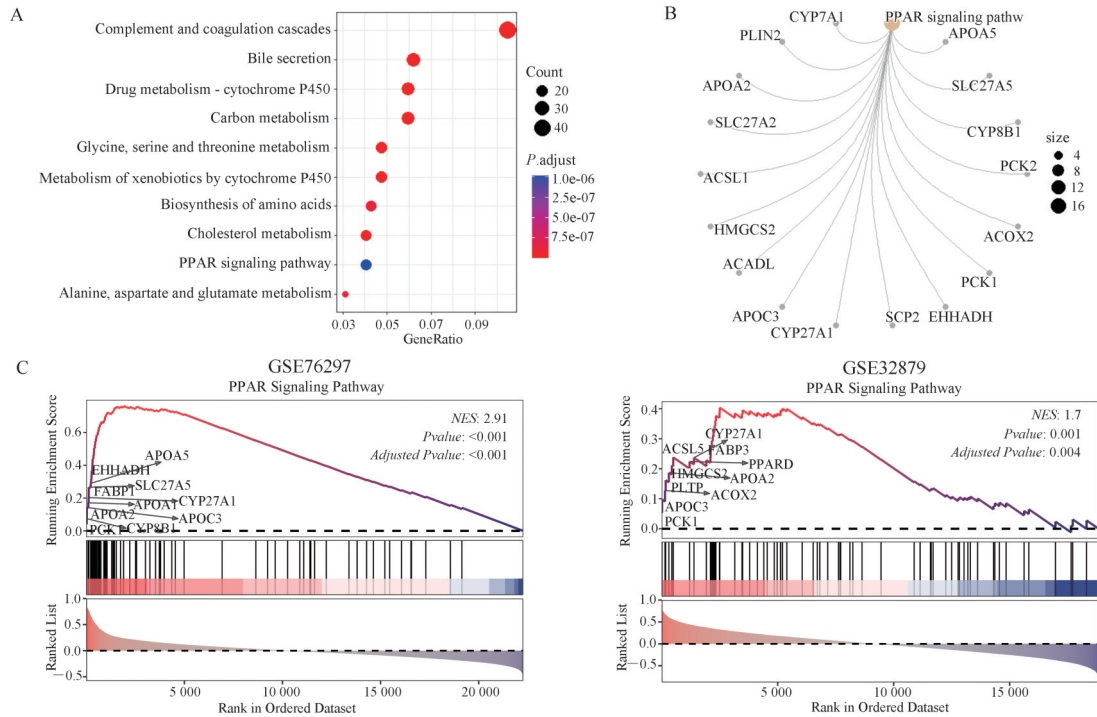
表1 HPA数据库中AOX1、C8B、PCK1基因免疫组化表达量统计表					
Tab 1 Statistical table of immunohistochemical expression of <i>AOX1</i> , <i>C8B</i> , and <i>PCK1</i> genes in HPA database					
组织类型	<i>AOX1</i>		<i>PCK1</i>		<i>C8B</i>
	HPA040199	HPA040215	HPA006277	HPA006507	HPA023694
肝	高	高	中等	低	中等
胆管	阴性	阴性	低	低	阴性
胆管癌	阴性(2/4)	阴性(4/4)	阴性(4/5)	阴性(5/5)	阴性(1/4)
	低(2/4)		低(1/5)		低(1/4)
					中等(2/4)

注:HPA数据库中AOX1在4例胆管癌组织中HPA040199抗体染色下:2例阴性表达,2例低表达;HPA040199抗体染色下:4例阴性表达。PCK1在5例胆管癌组织中HPA006277抗体染色下:4例阴性表达,1例低表达;HPA006507抗体染色下:5例阴性表达。C8B在4例胆管癌组织中HPA023694抗体染色下:1例阴性表达,1例低表达,2例中等表达。

2.4 基因功能及通路富集分析

为探究交集差异基因在胆管癌组织中的功能,对635个交集差异基因进行KEGG富集分析发现:635个交集差异基因主要参与细胞色素P450对药

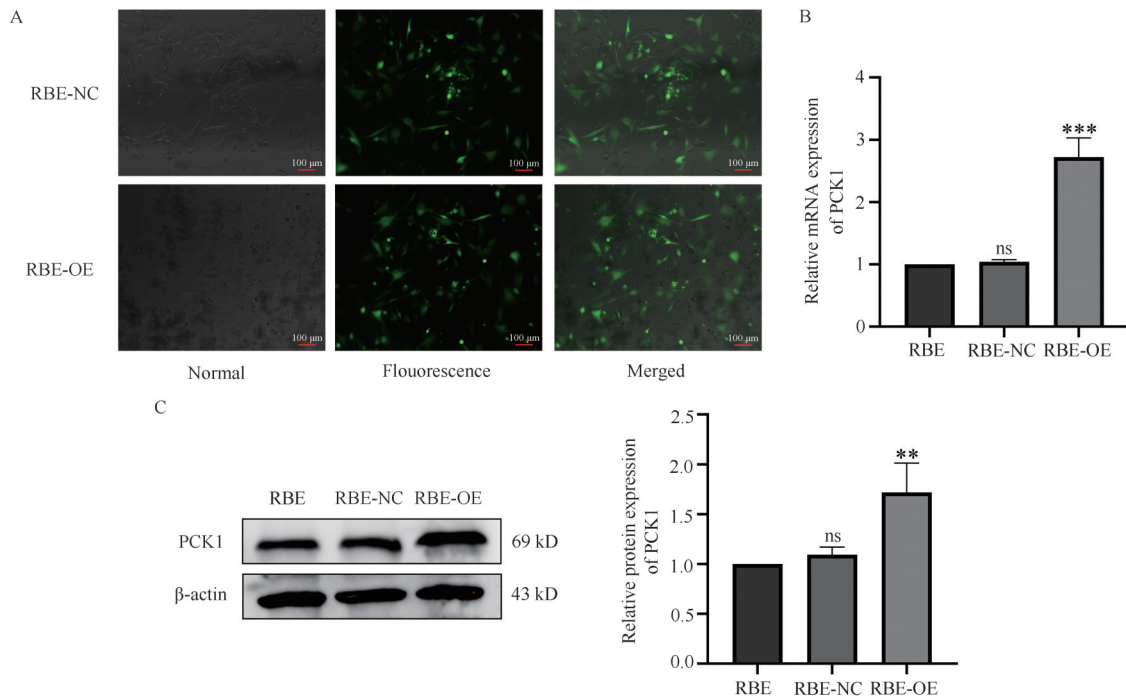
物及外源物质代谢、补体和凝血级联反应、碳代谢、多种氨基酸生物合成及代谢、胆固醇代谢、胆汁分泌及PPAR通路(图5A)。其中,前3种功能与上述得分最高的3个PPI子网络相对应。同时发现关键



A: KEGG 富集分析结果; B: 富集在 PPAR 通路中的差异基因; C: 在数据集 GSE76297、GSE32879 癌组织中 *PCK1* 单基因 GSEA 富集分析

图 5 交集差异基因 KEGG 富集分析和 *PCK1* 单基因 GSEA 富集分析

Fig 5 Intersection differential gene KEGG enrichment analysis and *PCK1* single gene GSEA enrichment analysis



A: RBE 细胞系经携带 GFP 的慢病毒转染后在荧光显微镜下观察到带绿色荧光的成功转染的胆管癌细胞; B~D: qRT-PCR 和 Western blot 检测 *PCK1* mRNA 相对表达量及蛋白表达量; 与对照组相比, ^{ns} $P > 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

图 6 慢病毒转染构建 *PCK1* 过表达的胆管癌细胞系及验证

Fig 6 Construction and verification of *PCK1* overexpression in cholangiocarcinoma cell line by lentivirus transfection

调控基因 *PCK1* 富集到 PPAR 通路中(图 5B)。为进一步探究 *PCK1* 与 PPAR 通路的关系,在

GSE76297 数据集和 GSE32879 数据集的 CCA 样本中以 *PCK1* 进行单基因 GSEA 富集分析发现:在

CCA组织中,*PCK1*作为PPAR通路的领头基因并激活该通路(图5C)。

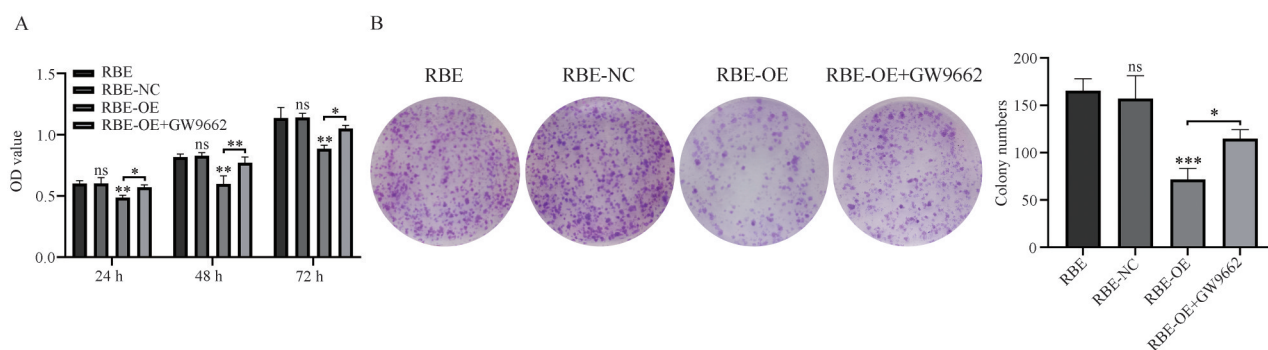
2.5 *PCK1*过表达效果验证

RBE细胞系经携带GFP的慢病毒转染后在荧光显微镜下观察到带绿色荧光的成功转染的胆管癌细胞(图6A)。利用qRT-PCR和Western blot检测结果显示:*PCK1* mRNA相对表达量及蛋白表达

量明显升高(图6B、C)。

2.6 过表达*PCK1*抑制人胆管癌细胞系RBE的增殖

集落形成实验结果显示:与阴性对照组对比,RBE-OE组集落形成能力明显减弱(图7A)。CCK-8结果同样显示:与阴性对照组对比,RBE-OE组增殖能力明显减弱(图7B),而PPAR γ 抑制剂则逆转上述趋势。



A:集落形成实验结果;B:CCK-8实验结果;与对照组相比,^{ns} $P>0.05$,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

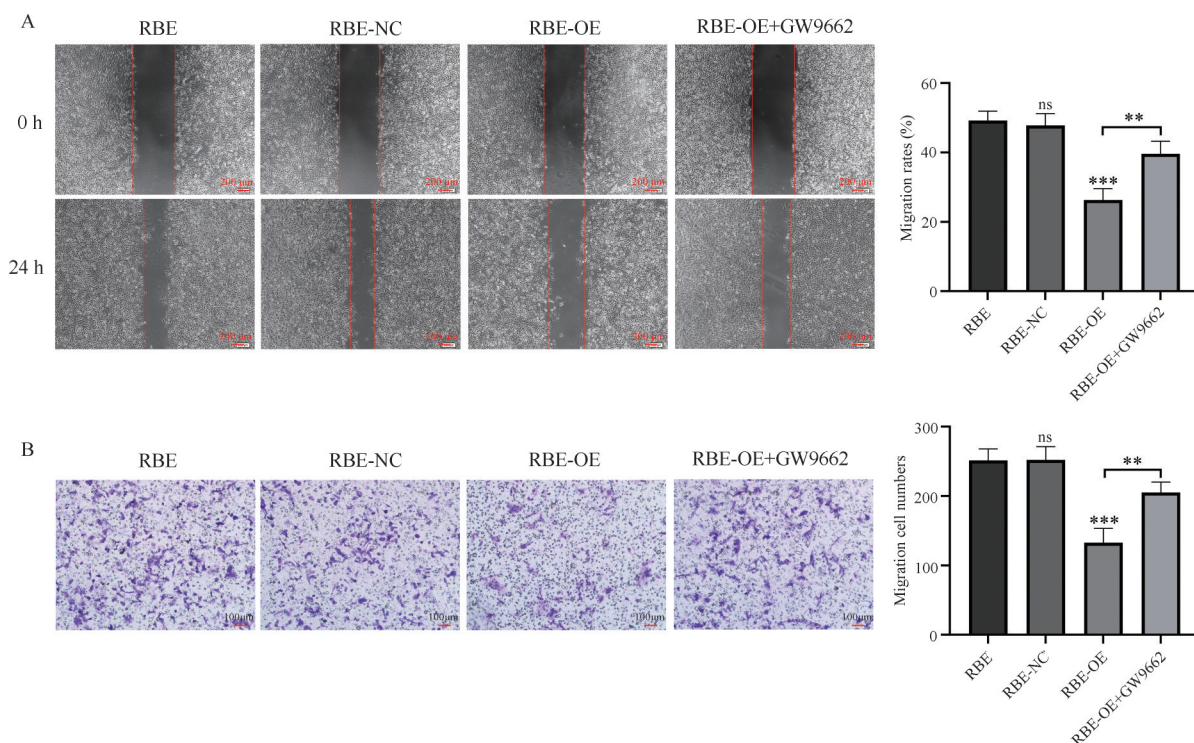
图7 *PCK1*过表达抑制胆管癌细胞RBE的增殖

Fig 7 Inhibition on the proliferation of cholangiocarcinoma cell line RBE by *PCK1* overexpression

2.7 过表达*PCK1*促进人胆管癌细胞系RBE的迁移

划痕愈合实验(图8A)与Transwell实验结果

(图8B)显示:与阴性对照组比较,RBE-OE组细胞迁移速率明显减少。由此表明:过表达*PCK1*使胆管癌细胞系RBE迁移能力减弱。而在抑制剂组中,



A:划痕愈合实验结果;B:Transwell实验结果;与对照组相比,^{ns} $P>0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$

图8 *PCK1*过表达抑制胆管癌细胞RBE的迁移

Fig 8 Inhibition on the migration of cholangiocarcinoma cell line RBE by *PCK1* overexpression

细胞迁移能力较RBE-OE组增强。

2.8 PCK1参与调控PPAR γ /PTEN/mTOR通路

在过表达PCK1后,Western blot检测结果显示:与阴性对照组比较,RBE-OE组的PPAR γ 、

PTEN表达水平显著提升,p-mTOR表达水平显著下降,而mTOR总蛋白则无明显变化。在PPAR γ 抑制剂组中,PTEN与p-mTOR的趋势则被逆转(图9)。

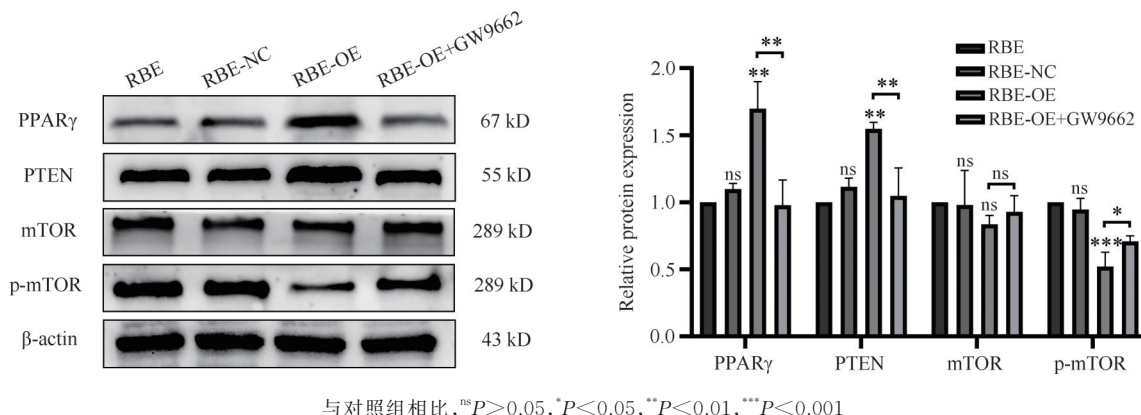


图9 PCK1过表达后对PPAR γ /PTEN/mTOR通路的蛋白水平的影响

Fig 9 Effect of PCK1 overexpression on the protein level of PPAR γ /PTEN/mTOR pathway

3 讨论

CCA是一种少见但恶性程度高的消化系统肿瘤,由于早期症状隐匿且无特异性,70%患者确诊时已为晚期并伴有转移而失去手术机会^[6]。目前,化疗等姑息性治疗效果有限且预后差。因此,寻找胆管癌关键调控基因对其早期诊断和治疗至关重要。本研究的数据库分析结果表明,PCK1在胆管癌细胞中的表达明显低于正常胆管组织,且PPI网络分析表明PCK1可能为胆管癌的关键调控基因。此外,通路富集分析显示PCK1可能通过调控PPAR通路在胆管癌中发挥作用。

与正常细胞相比,肿瘤细胞具有异常代谢特征和更高能量需求,其主要通过代谢重编程实现,表现为有氧糖酵解(Warburg效应),即在有氧条件下仍依赖糖酵解而非氧化磷酸化^[17]。该代谢模式不仅满足快速增殖需求,还提供代谢中间产物以支持细胞合成,因此,代谢重编程被视为肿瘤的重要标志性特征。研究发现,在胆管癌发生发展过程中有氧糖酵解和谷氨酰胺分解利用的增加为CCA细胞提供了产生生物合成中间体的能力^[18]。而糖异生是糖酵解的反向过程,可拮抗癌症中的有氧糖酵解并抑制肿瘤生长。PCK1作为体内糖异生的关键酶,研究发现当其表达上调后可激活糖异生且阻断糖酵解,抑制癌细胞中的Warburg效应,最终抑制肿瘤细胞的增殖和迁移^[12,19,20]。本研究发现在胆管癌细胞中过表达PCK1可抑制胆管癌细胞增殖。Liu

等^[21]研究证实,PCK1通过抑制KAT5的O-乙酰葡萄糖胺糖基化修饰进而促进其泛素化和降解,以抑制肝癌细胞转移。本研究通过Transwell迁移实验同样验证了PCK1对胆管癌细胞迁移能力的抑制作用。基于这些结果,本课题组推测PCK1可能是抑制胆管癌细胞增殖和迁移的关键基因之一,提示其在胆管癌治疗中的潜在调控作用。

此外,本研究发现PCK1可能通过参与PPAR γ /PTEN/mTOR通路发挥抗肿瘤作用。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)是II型核激素受体超家族的配体激活转录因子^[22],在脂肪酸储存、糖代谢调控及肥胖、糖尿病、炎症和肿瘤细胞凋亡中发挥重要作用^[23]。在胆管癌的研究中发现,由配体激活PPAR γ 可以诱导细胞周期阻滞以抑制增殖,并且缓解其对吉西他滨的耐药性^[24,25]。研究表明PPAR γ /PTEN/mTOR通路在肿瘤中经常被异常激活进而发挥抗肿瘤作用,目前已证实与胃癌、非小细胞肺癌、结直肠癌等多种肿瘤的发生发展相关^[26-28]。研究揭示了PPAR γ 可与PTEN上游基因过氧化物酶体增殖物反应元件1(PPRE1)和PPRE2结合,激活PTEN的表达,导致PIP3的浓度降低进而抑制Akt的磷酸化,最终抑制mTORC1的激活,从而促进肿瘤凋亡与自噬^[29,30]。本研究结果显示:PCK1过表达后PPAR γ 、PTEN的蛋白表达量增加,而mTOR磷酸化水平降低。由此可见:PCK1

可以促进PPAR γ /PTEN/mTOR通路的激活。

综上所述,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶1可以作为胆管癌的关键调控基因,并在癌组织中低表达。过表达PCK1可抑制胆管癌细胞的增殖与迁移,这可能与其调控PPAR γ /PTEN/mTOR信号通路的激活有关,但具体机制仍需进一步研究。

作者贡献度说明:

严华悦:负责生物信息学及部分基础实验与文章撰写;周汉旭、王胜威:负责部分基础实验及指标检测;杨立春:负责数据处理与统计学分析;刘子祥:负责文献查阅与经费支持;贾建光:负责关键实验的指导、文章审阅与修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- Banales JM, Marin JJ, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: The next horizon in mechanisms and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(9): 557-588.
- Sarcognato S, Sacchi D, Fassan M, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Pathologica, 2021, 113(3): 158-169.
- Valle JW, Kelley RK, Nervi B, et al. Biliary tract cancer[J]. Lancet, 2021, 397(10272): 428-444.
- Elvevi A, Laffusa A, Scaravaglio M, et al. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: An updated comprehensive review[J]. Ann Hepatol, 2022, 27(5): 100737.
- Xiong J, Lu X, Xu W, et al. Metabolic syndrome and the risk of cholangiocarcinoma: A hospital-based case-control study in China[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 3849-3855.
- Moris D, Palta M, Kim C, et al. Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(2): 198-222.
- Beale EG, Harvey BJ, Forest C. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes[J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 48(2-3): 89-95.
- Xue S, Cai Y, Liu J, et al. Dysregulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in cancers: A comprehensive analysis[J]. Cell Signal, 2024, 120: 111198.
- Yu S, Meng S, Xiang M, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cell metabolism: Roles and mechanisms beyond gluconeogenesis[J]. Mol Metab, 2021, 53: 101257.
- Xiang J, Wang K, Tang N. PCK1 dysregulation in cancer: Metabolic reprogramming, oncogenic activation, and therapeutic opportunities[J]. Genes Dis, 2022, 10(1): 101-112.
- Xu D, Wang Z, Xia Y, et al. The gluconeogenic enzyme PCK1 phosphorylates INSIG1/2 for lipogenesis[J]. Nature, 2020, 580(7804): 530-535.
- Shi L, An S, Liu Y, et al. PCK1 regulates glycolysis and tumor progression in clear cell renal cell carcinoma through LDHA[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 2613-2627.
- Bi Y, Yin B, Fan G. Identification of metabolism genes related to hepatocarcinogenesis and progression in type 2 diabetes mellitus *via* co-expression networks analysis[J]. Hereditas, 2021, 158(1): 14.
- Zhang X, Tao G, Jiang J, et al. PCK1 activates oncogenic autophagy *via* down-regulation serine phosphorylation of UBAP2L and antagonizes colorectal cancer growth[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 68.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(7): e47.
- Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. Innovation (Camb), 2021, 2(3): 100141.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- Raggi C, Taddei ML, Rae C, et al. Metabolic reprogramming in cholangiocarcinoma[J]. J Hepatol, 2022, 77(3): 849-864.
- Zhou X, Huang L, Xing R, et al. *MiR-93-5P* represses the gluconeogenesis of hepatocellular carcinoma while boosting its glycolysis and malignant progression by suppressing *PCK1* [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2022, 32(1): 35-47.
- Tang Y, Zhang Y, Wang C, et al. Overexpression of PCK1 gene antagonizes hepatocellular carcinoma through the activation of gluconeogenesis and suppression of glycolysis pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(1): 344-355.
- Liu R, Gou D, Xiang J, et al. O-GlcNAc modified-TIP60/KAT5 is required for PCK1 deficiency-induced HCC metastasis[J]. Oncogene, 2021, 40(50): 6707-6719.
- Wagner N, Wagner KD. Peroxisome proliferator-activated receptors and the hallmarks of cancer[J]. Cells, 2022, 11(15): 2432.
- Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in metabolism, immunity, and cancer: Unified and diverse mechanisms of action[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 624112.

- 24 Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, et al. PPAR-gamma ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21 pathway [J]. Hepatology, 2003, 38(1): 167-177.
 - 25 Asukai K, Kawamoto K, Eguchi H, et al. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance *via* pparg in cholangiocarcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2017, 24(8): 2344-2352.
 - 26 Guo X, Qin M, Hong H, et al. Circular RNA *hsa_circ_0072309* inhibits the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells *via* inhibition of PI3K/AKT signaling by activating PPARgamma/PTEN signaling [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 349.
 - 27 Ai X, Mao F, Shen S, et al. Bexarotene inhibits the viability of non-small cell lung cancer cells *via* slc10a2/PPARgamma/PTEN/mTOR signaling pathway [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 407.
 - 28 Assumpção JA, Magalhães KG, Corrêa JR. The role of ppary and autophagy in ros production, lipid droplets biogenesis and its involvement with colorectal cancer cells modulation[J]. Cancer Cell Int, 2017, 17: 82.
 - 29 Soto-Avellaneda A, Morrison BE. Signaling and other functions of lipids in autophagy: A review [J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 214.
 - 30 Sun J, Yu L, Qu X, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the tumor microenvironment, tumor cell metabolism, and anticancer therapy [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1184794.
- [本文编辑] 雷 燕 宋睿璞 陈思润

(上接第 927 页)

- 16 Chen J, Liu F, Wu J, et al. Effect of STK3 on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells *via* PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Cell Signal, 2023, 106: 110642.
 - 17 Zhang Y, Liang J, Cao N, et al. ASIC1a up-regulates MMP-2/9 expression to enhance mobility and proliferation of liver cancer cells *via* the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 778.
 - 18 Ren X, Feng C, Wang Y, et al. SLC39A10 promotes malignant phenotypes of gastric cancer cells by activating the CK2-mediated MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways[J]. Exp Mol Med, 2023, 55(8): 1757-1769.
 - 19 Guo Y, Tong Y, Zhu H, et al. Quercetin suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression *via* inhibition of SHH and TGF- β /Smad signaling pathways [J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(3): 479-496.
 - 20 Yang Z, Shi H, Chinnathambi A, et al. Arbutin exerts anticancer activity against rat C6 glioma cells by inducing apoptosis and inhibiting the inflammatory markers and P13/Akt/mTOR cascade [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(9): e22857.
 - 21 Li Z, Song Y, Hou W, et al. Atractylodin induces oxidative stress-mediated apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF-7 cells through inhibition of the P13K/Akt/mTOR pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(8): e23081.
- [本文编辑] 雷 燕 宋睿璞 陈思润