DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240823.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.r.20240823.1306.002

二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路诱导胆囊癌细胞凋亡

周汉旭[1,2],严华悦[1],王胜威[1],刘子祥[1],周少波[1]✉
(1.蚌埠医科大学第二附属医院普外科,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**:本研究旨在探讨二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路对胆囊癌细胞凋亡以及生物学功能产生影响的具体机制。**方法**:通过使用不同浓度梯度的二甲双胍处理胆囊癌细胞,采用CCK-8实验法测定二甲双胍对NOZ细胞的抑制效果。实验随后被分为3组:空白对照组、MET组以及MET+BAY-3827组合。为了评估二甲双胍对NOZ细胞增殖的影响,进行细胞集落形成实验。本研究采用Western blot技术探讨与细胞凋亡相关的蛋白质及AMPK/mTOR信号通路的调控机制。本研究采用了流式细胞术计算胆囊癌细胞中凋亡细胞的比例。细胞划痕实验和Transwell实验被用来评估胆囊癌细胞的迁移能力。**结果**:二甲双胍可以通过激活AMPK/mTOR信号通路的方式,抑制胆囊癌细胞增殖和迁移,并促进细胞凋亡。CCK-8和集落形成实验已验证了其对胆囊癌细胞抑制作用,流式细胞术检测到其具有促进胆囊癌细胞凋亡的效果,且使用BAY-3827抑制该信号通路后,二甲双胍对凋亡相关蛋白的表达趋势的影响有逆转作用,Western blot结果显示,二甲双胍上调凋亡相关蛋白Caspase-3和Bax以及AMPK/mTOR信号通路相关蛋白AMPK、p-AMPK的表达,下调抗凋亡蛋白Bcl-2和AMPK/mTOR信号通路相关蛋白mTOR、p70S6K、4E-BP1、p-mTOR、p-p70S6K、p-4E-BP1的表达。**结论**:二甲双胍可通过上述机制抑制胆囊癌细胞的相关生物学活动,诱导其凋亡。

[关键词] 胆囊癌;二甲双胍;信号通路;细胞凋亡
[中图分类号] R735.8 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)06-0415-06

Metformin increases apoptosis of human Gallbladder cancer cells through AMPK/mTOR signaling pathway

ZHOU Hanxu[1,2], YAN Huayue[1], WANG Shengwei[1], LIU Zixiang[1], ZHOU Shaobo[1]✉
(1. *The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical University*, *Bengbu* 233000, *China*; 2. *Anhui Province key Laboratory of Tissue Trasplatation*, *Bengbu* 233000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by Key Project of Natural Science Research in Higher Education Institutions in Anhui Province* (2022*AH*051476); *Key Natural Science Project of Bengbu Medical College* (2021*byzd*197); *Bengbu Medical College* 2023 *Graduate Research Innovation Plan* (*Byycx*23110)

[*Author*]: *ZHOU Hanxu*, *E-mail*: *zhou*0608@*stu.bbmc.edu.cn.*
[*Correspondence to*]: *ZHOU Shaobo*, *Professor*, *Chief Physician*, *E-mail*: *zhoushaobodoctor@sina.com.*

Received: *X*2024-05-27 *Revised*: 2024-08-12 *JHMU*, 2025;31(6):415-420

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

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of metformin on the apoptosis and biological function of gallbladder cancer cells through AMPK/mTOR signaling pathway. Methods: Gallbladder carcinoma cells were treated with different concentrations of metformin, and the inhibitory rate of metformin on NOZ cells was detected using the CCK-8 assay. The experiments were divided into three groups: blank control group, MET group and MET+BAY-3827 group. Colony formation assay was performed to detect the effect of metformin on the proliferation of NOZ cells. Western blot was used to detect the expressions of proteins linked to the AMPK/mTOR signaling pathway and proteins related to apoptosis, and flow cytometry was used to estimate the pro-

[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(Byycx23110)
[作者简介]周汉旭,E-mail:zhou0608@stu.bbmc.edu.cn。
[通讯作者]周少波,教授,主任医师,E-mail:zhoushaobodoctor@sina.com。
[收稿日期]2024-05-27 [修回日期]2024-08-12 网络出版时间:2024-08-26 08:47:19

portion of apoptotic cells. Wound healing assay and transwell assay were used to estimate cell migration efficiency. **Results**: Metformin inhibited the proliferation and migration of gallbladder carcinoma cells and induced apoptosis *via* AMPK/mTOR signaling pathway. CCK-8 assay and colony formation assay showed that metformin could inhibit the proliferation of gallbladder carcinoma cells. Flow cytometry results indicated that metformin increased the ratio of apoptotic cells in gallbladder carcinoma cells, and the trend of metformin′s effect on the expression of apoptosis-related proteins was reversed after inhibiting this signaling pathway with BAY-3827. Western blot results indicated that metformin upregulated the expression of apoptosis-related proteins Caspase-3 and Bax as well as AMPK and p-AMPK, and downregulated anti-apoptotic protein Bcl-2 and AMPK/mTOR signaling pathway-related proteins mTOR, p70S6K, 4E-BP1, p-mTOR, p-p70S6K, and p-4E-BP1. Proliferation and migration of human gallbladder carcinoma were inhibited *via* metformin by activating the AMPK/mTOR signaling pathway, Besides, metformin upregulated the expression of apoptosis-related proteins Caspase-3 and Bax and downregulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, thereby increased the proportion of apoptotic cells in normal gallbladder carcinoma cells. **Conclusions**: Metformin inhibits the proliferation and migration of gallbladder carcinoma cells and induces apoptosis by activating the AMPK/mTOR signaling pathway.

[**Key words**] Gallbladder carcinoma; Metformin; Signal pathway; Apoptosis

胆囊癌(gallbladder carcinoma)是胆道系统内最为普遍的恶性肿瘤之一,其发病过程较为隐秘,通常在疾病晚期被诊断,预后较差,外科手术切除是唯一有效治愈胆囊癌的方法[1,2]。此外,有研究指出糖尿病合并胆囊癌的发病率较高[3]。胍类药物比如二甲双胍(metformin,Met)。是治疗2型糖尿病中最常用且广受欢迎的选择[4]。近年来,关于二甲双胍在降低血糖外的诸多作用的研究得到了广泛的关注与探讨,如延缓衰老[5]、治疗心血管疾病[6]等。近期研究表明二甲双胍在癌症治疗中的有效性,表现在其抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡等方面[7]等。因此,作为一种既能降糖又具抗肿瘤作用的药物,二甲双胍在胆囊癌治疗中显得尤为重要。AMPK/mTOR信号通路作为细胞能量代谢中的关键组成部分,在肿瘤细胞的发生、发展过程中同样发挥着至关重要的作用[8]。二甲双胍对于胆囊癌细胞抑制作用的具体机制尚不明确,本项研究旨在初步明确二甲双胍对于胆囊癌细胞活性抑制以及诱导凋亡的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的NOZ细胞系和胎牛血清(FBS)从武汉普诺赛公司购得。自GIBCO处购基础培养基DMEM和胰蛋白酶。链霉素-青霉素双抗来自白鲨生物公司。Beyotime公司处购CCK-8试剂盒。Transwell小室来自康宁公司。Caspase-3, Bax和BCL-2等抗体由affnity公司购得。山羊抗兔二抗购自爱博泰克生物公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒购自联科生物公司。二甲双胍和AMPK信号通路抑制剂BAY-3827购自MedChem Express(MCE)公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、处理和分组 NOZ细胞培养所使用的培养基为DMEM,其中添加了10% 胎牛血清(FBS)及100单位/mL的青霉素-链霉素双抗以防止细菌污染。培养过程在含有5% CO_2的恒湿培养箱内进行,温度保持在37 ℃。细胞的状态和生长情况通过显微镜进行观察,当细胞生长至80%时用胰酶消化进行传代,以便下一步研究。按着实验的要求对细胞进行处理分组,分为空白对照组(CON),二甲双胍处理组(MET)和二甲双胍+AMPK抑制剂组(MET+ BAY-3827)以便下一步研究。

1.2.2 细胞活性实验 取对数生长期的NOZ细胞,用胰酶消化,按3×10^4/孔的浓度均匀地种在96孔板中。然后用0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mmol/L的二甲双胍处理细胞24 h后,为了测试处理后NOZ细胞的活性,使用了CCK-8试剂。通过测量450 nm处的光密度(OD)值来反映细胞的存活率。

1.2.3 集落形成实验 分别取1 000个/孔的NOZ接种于6孔板中,然后分别根据研究需要处理24 h。培养14 d后用结晶紫染液染色,观察细胞克隆形成的情况。

1.2.4 流式细胞术 将经过分组处理的细胞放置在37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养24 h,作为对照组的NOZ细胞则采用未经药物处理的正常状态。收集5×10^5个处理后的细胞,将样品与冷却的缓冲液充分混合后,接着加入5 μL的Annexin V-FITC和5 μL的碘化丙啶(PI)。在室温条件下,将此混合物放置于黑暗中孵育15 min,随后再利用流式细胞仪对其进行检测。

1.2.5 Western blot 使用RIPA缓冲液进行提取蛋白,蛋白浓度通过BCA法测定。样品在SDS上样缓冲液中煮沸后,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行

分离。蛋白分离后转印至PVDF膜上,使用针对Caspase-3、Bax、Bcl-2及β-actin等蛋白的特异性抗体进行孵育,之后再使用山羊抗兔二抗进行孵育。最终通过ECL显影法检测各蛋白的表达水平。

1.2.6 细胞划痕实验 细胞以1×10^6个细胞/孔的浓度种植于6孔板中。待细胞生长至密集状态后,用200 μL无菌移液管在细胞中划出划痕。后用PBS进行清洗,以去除脱落的细胞。在0 h和24 h分别观察和记录划痕区域细胞的恢复情况,评估细胞的迁移能力。

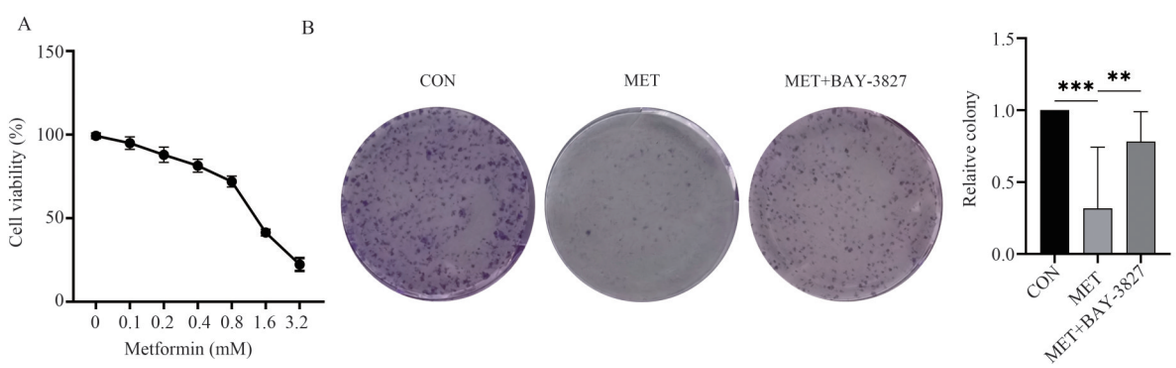
1.2.7 Transwell实验 NOZ细胞在无血清DMEM基础培养基中处理,以进行迁移实验。实验设置为上腔处理24 h,下腔则添加500 μL含10% FBS的培养基,并继续培养24 h。迁移至膜上的细胞用多聚甲醛固定,使用结晶紫染色后PBS清洗,并在显微镜下拍摄并计数迁移细胞的数量,以评估细胞迁移能力。

1.2.8 统计学方法 使用Graphpadprism 9进行统计学分析以及绘制图表,所有数据均以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。为了确定统计学显著性,采用了Student t检验和单因素方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路对胆囊癌细胞增殖的影响

在本项研究中,CCK-8实验结果显示,二甲双胍显著抑制了胆囊癌细胞的活性,且随着二甲双胍浓度提升,细胞活性逐渐下降,其IC_{50}约为1.6 mmol/L(图1A)。在随后的实验中,使用该浓度的二甲双胍处理NOZ细胞。使用细胞集落形成实验来测试二甲双胍对于NOZ细胞增殖的影响,为了验证其是否通过AMPK/mTOR信号通路发挥作用,采用特异性的AMPK信号通路抑制剂BAY-3827,并与二甲双胍共同处理NOZ细胞,实验结果显示二甲双胍能明显抑制NOZ细胞的增殖,而AMPK信号通路抑制剂可以逆转这种趋势(图1B)。



与对照组比较,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

图1 二甲双胍通过AMPK/mTOR抑制胆囊癌细胞的增殖

Fig 1 Metformin inhibits the proliferation of gallbladder carcinoma through AMPK/mTOR signaling pathway

2.2 二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路对胆囊癌细胞凋亡的影响

在通过流式细胞术检测CON组和MET组以及MET+ BAY-3827组的NOZ细胞凋亡率的过程中,发现二甲双胍可以增加NOZ细胞中的凋亡细胞比例(图2A)。通过Western Blot实验,发现相比CON组MET组的NOZ细胞的促Caspase-3、Bax表达增加,Bcl-2表达降低。同样,AMPK抑制剂可以逆转这些趋势(图2B)。

2.3 二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路对于胆囊癌细胞生物学行为的影响

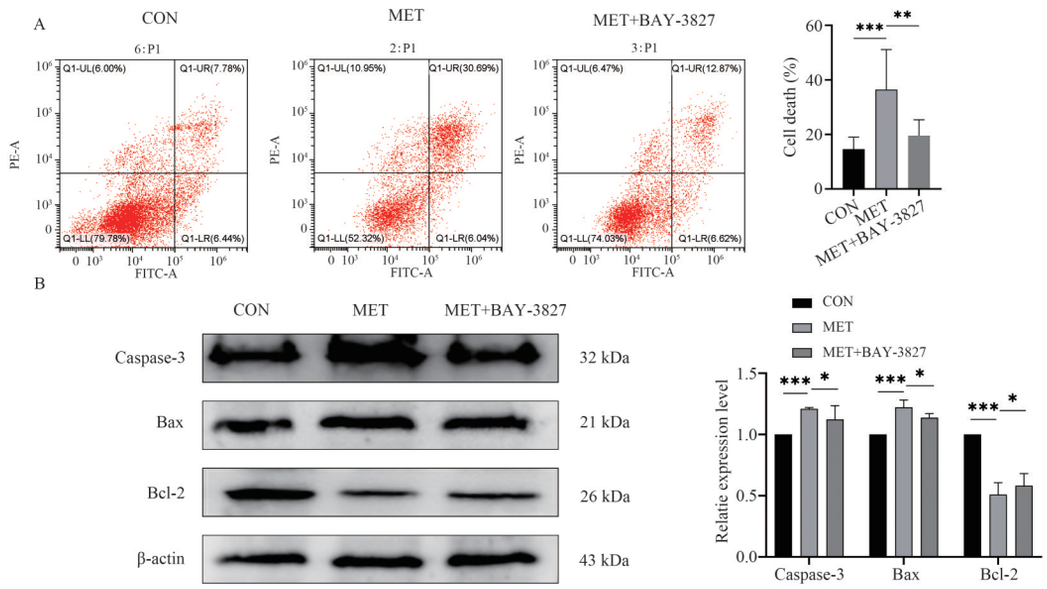
经过细胞划痕实验和Transwell实验,观察到二甲双胍处理后的NOZ细胞迁移速率明显减少,这一发现与空白对照组形成明显对比。在抑制AMPK信号通路的分组的实验中,同样逆转了这种趋势,见图3A、B。

2.4 二甲双胍对于AMPK/mTOR信号通路的相关蛋白的影响

通过本项研究发现相较于空白对照组,经过二甲双胍处理后的NOZ细胞AMPK表达上升,mTOR、p70S6K、4E-BP1表达下降。在相关磷酸化蛋白的检测中发现相较于空白对照组MET能够上调p-AMPK的表达,抑制p-mTOR、p-p70S6K、p-4E-BP1的表达。见图4。

3 讨论

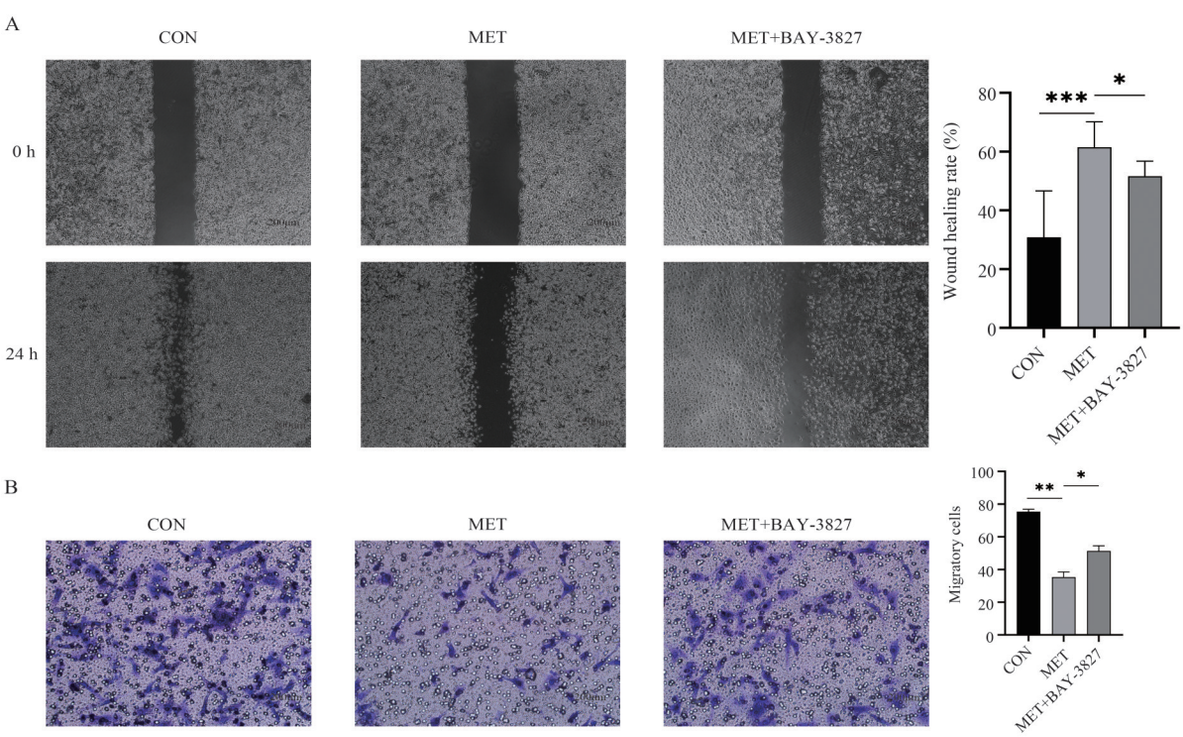
细胞凋亡作为一种细胞程序性死亡,在维持细



与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图2　二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路诱导胆囊癌细胞凋亡

Fig 2　Metformin increase the apoptosis of gallbladder carcinoma cells through AMPK/mTOR signaling pathway

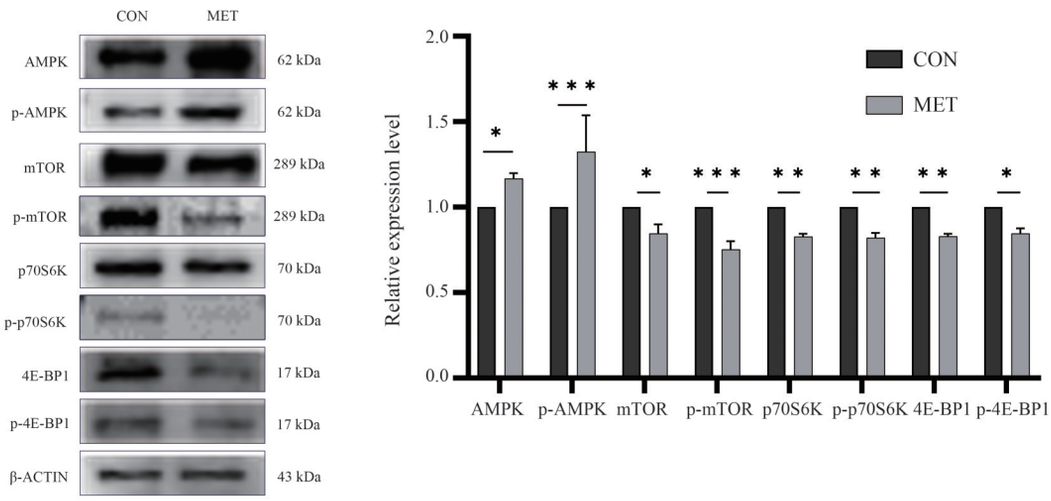


与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图3　二甲双胍通过AMPK/mTOR信号通路抑制胆囊癌细胞的迁移

Fig 3　Metformin inhibits migration of gallbladder carcinoma cells through AMPK/mTOR signaling pathway

胞的正常生长发展中起着重要的作用[9,10]。主要分为3种途径，即线粒体介导的内源性途径、死亡受体介导的外源性途径和内质网介导途径[11]，这3种途径相互作用，在细胞凋亡的机制中共同起着至关重要的作用。BCL-2/BAX是调控细胞凋亡过程的内在系统之一[12]。BCL-2是一种维持癌细胞存活并支持其分裂的细胞凋亡抑制分子[13]，另一方面，BAX是一种促凋亡蛋白[14]，在凋亡的过程中，Caspase-3作为一个关键的蛋白酶抑制剂，扮演着最终执行者的角色[15]。研究表明二甲双胍对于多种癌



与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图4　二甲双胍介导的AMPK/mTOR信号通路激活

Fig 4　Metformin-mediated activation of AMPK/mTOR signaling pathway

症的细胞有着诱导凋亡的作用，如胆管癌[16]、乳腺癌[17]、肺癌[18]等。本研究中，相较于未经处理的对照组胆囊癌细胞，二甲双胍处理组中的凋亡细胞明显增加。同时，通过Western blot实验观察到，二甲双胍可以抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达，上调促凋亡蛋白Bax与Caspase-3的表达。这些发现充分证实二甲双胍对胆囊癌细胞NOZ具有诱导凋亡的作用。

在细胞的正常代谢及癌症的发生过程中，AMPK/mTOR信号通路扮演着至关重要的角色[8]。AMPK是一种关键的细胞能量传感器，由三种不同的亚基组成，分别是α亚基、β亚基和γ亚基[19]。α亚基展现出显著的催化活性，而β亚基则承担着支架结构的角色，负责将α和γ亚基紧密结合在一起[20]。同时，γ亚基在该复合物中发挥着重要的调节功能[21]。当AMPK的γ亚单位上的ATP被AMP所替换时，会导致其结构发生明显变化，这一变化进一步促进AMPKα亚基在苏氨酸-172位点进行磷酸化，进而有效激活AMPK[22]。通过磷酸化多个下游靶标，AMPK调节细胞生长，其中涉及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）[23]。在细胞内有两种不同的复合体，一种是mTOR复合物1（mTORC1），另一种是mTOR复合物2（mTORC2），它们是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶mTOR的不同形式[24]，mTORC1在细胞生长与分裂调控过程中的作用至关重要[25]，主要功能有磷酸化p70S6K和结合4E-BP促进蛋白质合成[26]。本研究揭示了，二甲双胍能够通过磷酸化机制激活AMPK，进而继续通过抑制磷酸化的机制调控mTOR的活性，再而减少p70S6K和4E-BP1的磷酸化以及表达，从而有效降低胆囊癌细胞的蛋白质合成，最终抑制其增殖，CCK-8实验和细胞集落形成实验证明了这点，细胞划痕实验和Transwell实验也验证了二甲双胍对于胆囊癌细胞生物学活性的影响，而AMPK抑制剂组的实验结果则验证了其是通过AMPK/mTOR信号通路发挥作用的。

综上所述，二甲双胍能够通过激活AMPK/mTOR信号传导通路，促使胆囊癌细胞发生凋亡，并有效抑制其增殖与迁移能力。本研究验证了二甲双胍对胆囊癌细胞的抑制效果，深入探讨了其背后的分子机制，为二甲双胍在临床胆囊癌治疗中的应用奠定了理论基础。但是本项研究尚有不足之处，二甲双胍抑制胆囊癌迁移效率的具体机制还尚待探究，还缺少体内的实验佐证，后续本课题组将继续明确其分子机制，并继续开展动物实验加以验证。

作者贡献度说明：

周汉旭：关键实验的进行以及实验数据的处理和文章撰写；严华悦：负责部分实验及稿件审校；王胜威：负责实验操作及指标检测；刘子祥：负责相关文献查阅与资料整合；周少波：指导实验关键问题、文章审核、修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1　Roa JC, Garcia P, Kapoor VK, et al. Gallbladder cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2022,8(1):69.

2 Sturm N, Schuhbaur JS, Huttner F, et al. Gallbladder cancer: Current multimodality treatment concepts and future directions[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(22): 5580.
3 Sheng BW, Zhang JQ, Chen M, et al. The inverse association between fasting blood glucose and the occurrence of gallbladder cancer in type 2 diabetes mellitus patients: A case-control study[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023,149(12):10387-10398.
4 LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin action[J]. Endocr Rev, 2021, 42(1):77-96.
5 Chen S, Gan D, Lin S, et al. Metformin in aging and aging-related diseases: Clinical applications and relevant mechanisms[J]. Theranostics, 2022,12(6):2722-2740.
6 Poznyak AV, Litvinova L, Poggio P, et al. From diabetes to atherosclerosis: Potential of metformin for management of cardiovascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17):9738.
7 Tadel K, Wiatrak B, Bodetko D, et al. Metformin and proliferation of cancer cell lines[J]. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab, 2020,26(4):159-166.
8 Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia[J]. Int J Mol Sci, 2021,22(18): 9765.
9 Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11):678-695.
10 Lu X, Shi S, Wu C, et al. The shikimate pathway regulates programmed cell death[J]. J Genet Genomics, 2022,49(10):943-951.
11 Wu Z, Deng J, Zhou H, et al. Programmed cell death in sepsis associated acute kidney injury[J]. Front Med (Lausanne), 2022,9:883028.
12 Flores-Romero H, Hohorst L, John M, et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis[J]. EMBO J, 2022,41(2):e108690.
13 Lopez A, Reyna DE, Gitego N, et al. Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer[J]. Nat Commun, 2022,13(1):1199.
14 Jenner A, Pena-Blanco A, Salvador-Gallego R, et al. DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis[J]. EMBO J, 2022,41(8):e108587.
15 Hentzen NB, Mogaki R, Otake S, et al. Intracellular photoactivation of caspase-3 by molecular glues for spatiotemporal apoptosis induction[J]. J Am Chem Soc, 2020,142(18):8080-8084.
16 Fujimori T, Kato K, Fujihara S, et al. Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. Oncol Rep, 2015,34(6):2987-2996.
17 Yang J, Zhou Y, Xie S, et al. Metformin induces ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021,40(1):206.
18 Lu T, Li M, Zhao M, et al. Metformin inhibits human non-small cell lung cancer by regulating AMPK-CEBPB-PDL1 signaling pathway[J]. Cancer Immunol Immunother, 2022,71(7):1733-1746.
19 Sanli T, Linher-Melville K, Tsakiridis T, et al. Sestrin2 modulates AMPK subunit expression and its response to ionizing radiation in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012,7(2):e32035.
20 Ovens AJ, Gee YS, Ling N, et al. Structure-function analysis of the AMPK activator SC4 and identification of a potent pan AMPK activator[J]. Biochem J, 2022,479(11):1181-1204.
21 Yan Y, Zhou XE, Xu HE, et al. Structure and physiological regulation of AMPK[J]. Int J Mol Sci, 2018,19(11):3534.
22 Zhang CS, Hawley SA, Zong Y, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK[J]. Nature, 2017,548(7665):112-116.
23 Chomanicova N, Gazova A, Adamickova A, et al. The role of AMPK/mTOR signaling pathway in anticancer activity of metformin[J]. Physiol Res, 2021, 70(4): 501-508.
24 Battaglioni S, Benjamin D, Walchli M, et al. MTOR substrate phosphorylation in growth control[J]. Cell, 2022,185(11):1814-1836.
25 Mota-Martorell N, Jove M, Pradas I, et al. Gene expression and regulatory factors of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 predict mammalian longevity[J]. Geroscience, 2020,42(4):1157-1173.
26 Wang L, Wu H, Wang Y, et al. Synergistic anti-tumour activity of sorafenib in combination with pegylated resveratrol is mediated by Akt/mTOR/p70S6k-4EBP-1 and c-Raf7MEK/ERK signaling pathways[J]. Heliyon, 2023,9(8):e19154.

[**本文编辑**] 雷 燕 宋睿璞 朱 昊