

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

2020 年 7 月 28 日      第 28 卷      第 14 期      (Volume 28 Number 14)



**14/2020**

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.



### 述评

- 563 新型冠状病毒通过消化道感染与传播的可能性浅析  
刘纯杰
- 570 抑癌基因miR-302b在恶性肿瘤中的调控机制  
李敏娜, 路宁, 王艺璇, 张晓庆, 周莹, 张明鑫

### 基础研究

- 581 二甲双胍增强索拉非尼诱导HepG2细胞凋亡的分子机制  
叶艳清, 曾斌, 廖跃光, 刘茂生, 华宗荣

### 临床研究

- 587 低氧条件下药物性肝损伤的临床特征及预后分析  
袁玲, 杨永耿
- 594 可溶性fms样酪氨酸激酶-1与急性胰腺炎早期严重程度预测价值的系统评价和meta分析  
吕永才, 姚燕华, 雷静静, 徐菁霞

### 文献综述

- 605 免疫检查点抑制剂治疗原发性肝癌的临床研究进展  
张金枝, 马雨竹, 顾佳麟, 霍介格
- 617 应激与肠道疾病发生机制  
李佳佳, 任文静, 尹海燕, 赵亚飞, 唐勇

### 临床实践

- 628 新型冠状病毒肺炎患者消化系统表现的回顾性研究  
吕飞, 丁祥武, 骆忠华, 方容, 郭秋霞, 吴昌维
- 637 管状吻合并全层间断减张缝合术可以降低食管癌术后颈部吻合口瘘  
郭晓锋, 张曙光
- 643 经粘膜下隧道内镜肿瘤切除手术治疗来源于固有肌层食管贲门粘膜下肿瘤临床效果观察  
左海军, 江堤, 廖素环, 苏剑东, 乐有林, 刘美红, 张卡

研究快报

- 650 希望水平在食管癌化疗患者心理痛苦与生命质量之间的中介作用  
傅云青

## 消 息

- 580 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标  
593 《世界华人消化杂志》正文要求  
616 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事  
636 《肠道微生物与消化系统疾病》书讯

## 封面故事

沙杰, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 靖江市人民医院消化科主任, 擅长消化道肿瘤的诊治及消化内镜技术, 江苏省“333高层次人才培养工程”培养对象, 江苏省中青年学术技术带头人。《世界华人消化杂志》编委, 主要从事消化道早期肿瘤诊治的研究。2016年受邀在美国“Digestive Disease Week, DDW”作学术报告, 论文多次在美国DDW大会壁报交流, 目前主持省级科研项目一项, 市级科研项目二项, 在国内外期刊发表论文20余篇, 其中SCI论文4篇, 中华系列杂志5篇。

## 本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张晗; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇;  
形式规范审核编辑部主任 吴云晓健; 最终清样审核总编辑 马连生

## 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(半月刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2020-07-28

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<https://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路  
62号, 远洋国际中心D座903室  
电话: +86-10-85381892

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录。

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

定价

每期136.00元 全年24期3264.00元

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

# Contents

Volume 28 Number 14 July 28, 2020

## EDITORIAL

- 563 Possibility of SARS-CoV-2 infection and transmission through the digestive tract

*Liu CJ*

- 570 Regulatory mechanism of tumor suppressor gene miR-302b in malignant tumors

*Li MN, Lu N, Wang YX, Zhang XQ, Zhou Y, Zhang MX*

## BASIC RESEARCH

- 581 Molecular mechanism for metformin to enhance pro-apoptotic effect of sorafenib in HepG2 cells

*Ye YQ, Zeng B, Liao YG, Liu MS, Hua ZR*

## CLINICAL RESEARCH

- 587 Clinical features and prognosis of drug-induced liver injury under hypoxia conditions

*Yuan L, Yang YG*

- 594 Value of soluble fms-like tyrosine 1 in early prediction of severity of acute pancreatitis: A systematic review and meta-analysis

*Lv YC, Yao YH, Lei JJ, Xue JX*

## REVIEW

- 605 Clinical research progress of immune checkpoint inhibitors in treatment of primary liver cancer

*Zhang JZ, Ma YZ, Gu JL, Huo JG*

- 617 Underlying mechanisms for intestinal diseases arising from stress

*Li JJ, Ren WJ, Yin HY, Zhao YF, Tang Y*

## CLINICAL PRACTICE

- 628 Retrospective analysis of digestive system manifestations in patients with coronavirus disease 2019

*Lv F, Ding XW, Luo ZH, Fang R, Guo QX, Wu CW*

- 637 Tubular anastomosis with full-thickness discontinuous tension-reduction suture can reduce incidence of cervical anastomotic fistula after surgery for esophageal cancer

*Guo XF, Zhang SG*

- 643 Clinical value of submucosal tunneling endoscopic resection in submucosal tumors of the esophagus and cardia derived from the muscularis propria

*Zuo HJ, Jiang D, Liao SH, Su JD, Le YL, Liu MH, Zhang K*

**RAPID COMMUNICATION**

- 650 Mediating effect of hope level between psychological pain and quality of life in patients on chemotherapy for esophageal cancer

*Fu YQ*



## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 28 Number 14 July 28, 2020

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Jie Sha, PhD, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Jingjiang People's Hospital, No. 28, Zhongzhou Road, Jingjiang 214500, Jiangsu Province, China

### Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, CSTJ and Superstar Journals Database.

### RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Dong-Mei Wang*

Review Editor: *Han Zhang*

Production Editor: *Ji-Hong Liu*

English Language Editor: *Tian-Qi Wang*

Proof Editor: *Yun-Xiaojuan Wu*

Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** July 28, 2020

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Shuang-Suo Dang, Professor**, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Xue-Liang Jiang, Professor**, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Zhan-Ju Liu, Professor**, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Bin Lv, Professor**, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

**Jun-Ping Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi,

Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

**Xiao-Zhong Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Deng-Fu Yao, Professor**, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

#### EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

#### EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

*World Chinese Journal of Digestology*

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

<https://www.wjgnet.com>

#### PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<https://www.wjgnet.com>

#### PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China  
Telephone: +86-10-85381892

#### PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

#### COPYRIGHT

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

#### SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

## 二甲双胍增强索拉菲尼诱导HepG2细胞凋亡的分子机制

叶艳清, 曾斌, 廖跃光, 刘茂生, 华宗荣

叶艳清, 曾斌, 廖跃光, 刘茂生, 华宗荣, 赣南医学院第一附属医院消化内科 江西省赣州市 341000

叶艳清, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤及消化内镜研究.

基金项目: 江西省卫生健康委科技计划资助项目, No. 20201084.

作者贡献分布: 叶艳清、曾斌、廖跃光、刘茂生及华宗荣对此文所作贡献均等; 此课题由叶艳清与刘茂生设计; 研究过程由叶艳清、华宗荣及曾斌操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由叶艳清提供; 数据分析由廖跃光完成; 本论文写作由叶艳清与廖跃光完成.

通讯作者: 叶艳清, 主治医师, 341000, 江西省赣州市青年路23号, 赣南医学院第一附属医院消化内科. [gnmu2002@126.com](mailto:gnmu2002@126.com)

收稿日期: 2020-03-24

修回日期: 2020-06-19

接受日期: 2020-06-24

在线出版日期: 2020-07-28

### Molecular mechanism for metformin to enhance pro-apoptotic effect of sorafenib in HepG2 cells

Yan-Qing Ye, Bin Zeng, Yue-Guang Liao, Mao-Sheng Liu, Zong-Rong Hua

Yan-Qing Ye, Bin Zeng, Yue-Guang Liao, Mao-Sheng Liu, Zong-Rong Hua, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Supported by: Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Health Commission, No. 20201084.

Corresponding author: Yan-Qing Ye, Attending Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, 23 Qingnian Road, Zhanggong District, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China. [gnmu2002@126.com](mailto:gnmu2002@126.com)

Received: 2020-03-24

Revised: 2020-06-19

Accepted: 2020-06-24

Published online: 2020-07-28

### Abstract

#### BACKGROUND

Prolonging the survival time of patients with advanced liver cancer is a major clinical challenge. Sorafenib (Sor) is the only targeted drug for the treatment of advanced liver cancer, but drug resistance has become a problem.

#### AIM

To explore the effect and molecular mechanism of metformin (Met) in enhancing pro-apoptotic effect of Sor in HepG2 cells.

#### METHODS

MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation effects of Met and Sor, alone or in combination. Flow cytometry was employed to analyze cell cycle and cell apoptosis. The expression of Caspase-3, Bax, AMPK, P53, and mTORC1 was evaluated by Western blot.

#### RESULTS

MTT assay showed that both Met and Sor decreased HepG2 cells viability, and Met combined with Sor had a synergistic inhibitory effect. The relative cell viability rates of the control group, Met group, Sor group, and combination group were 100%, 79.96% ± 4.41%, 85.33% ± 1.00%, and 68.60% ± 4.02%, respectively. Flow cytometry showed that both Met and Sor induced HepG2 cell apoptosis, and Met combined with Sor had a synergistic effect. The apoptosis rates of the control group, Met group, Sor group, and combination group were 4.47% ± 1.93%, 13.73% ± 1.18%, 9.50% ± 0.20%, and 29.03% ± 0.35%, respectively. Western blot analysis showed that both Met and Sor increased the expression of Caspase-3, Bax, P53, and AMPK and decreased the expression of mTORC1.

#### CONCLUSION

Met can enhance the pro-apoptotic effect of Sor in



HepG2 cells.

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Metformin; Sorafenib; HepG2 cell; Molecular mechanism

**Citation:** Ye YQ, Zeng B, Liao YG, Liu MS, Hua ZR. Molecular mechanism for metformin to enhance pro-apoptotic effect of sorafenib in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(14): 581-586  
**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i14/581.htm>  
**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i14.581>

## 摘要

### 背景

延长进展期肝癌生存时间是目前临床上一大难点. 索拉菲尼(Sorafenib, Sor)是目前唯一用于治疗进展期肝癌的靶向药物, 但其耐药成为一个问题. 本研究拟通过实验研究二甲双胍(Metformin, Met)增强Sor的疗效, 为进展期肝癌的治疗提供参考.

### 目的

探讨Met增强Sor诱导人肝癌HepG2细胞凋亡及潜在分子机制.

### 方法

MTT法检测Met、Sor及二者联合对人肝癌HepG2细胞的增殖抑制作用, 流式细胞仪测定各组的凋亡率; Western blot检测各组表达Caspase-3、Bax、AMPK、P53及mTORC1水平.

### 结果

MTT结果显示Met和Sor联合对HepG2细胞的增殖抑制作用强于单药组、对照组、Met组、Sor组、联合用药组的细胞相对活力分别为100%、79.96%±4.41%、85.33%±1.00%、68.60%±4.02%, 差别有统计学意义( $P<0.05$ ); 流式细胞分析结果显示Met和Sor联合对HepG2细胞的凋亡诱导作用强于单药组、对照组、Met组、Sor组、联合用药组的凋亡率分别为4.47%±1.93%、13.73%±1.18%、9.50%±0.20%、29.03%±0.35%, 差别有统计学意义( $P<0.05$ ); Western blot显示, 与对照组及单药组相比, 联合用药组Caspase-3、Bax、AMPK、P53的表达增加, 而mTORC1的表达减少.

### 结论

Met可增强Sor诱导人肝癌HepG2细胞凋亡.

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**关键词:** 二甲双胍; 索拉菲尼; HepG2细胞; 分子机制

**核心提要:** 索拉菲尼是唯一推荐用于治疗晚期肝癌的靶向药物, 但耐药是一个恼人的问题! 二甲双胍近年来广泛被报道可以抑制肿瘤增殖、诱导凋亡, 且在临床上可以改善肿瘤病人的预后. 本文就是通过二者的联合作用, 观察其联合对HepG2细胞凋亡的影响及分子机制.

**文献来源:** 叶艳清, 曾斌, 廖跃光, 刘茂生, 华宗荣. 二甲双胍增强索拉菲尼诱导HepG2细胞凋亡的分子机制. *世界华人消化杂志* 2020; 28(14): 581-586

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i14/581.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i14.581>

## 0 引言

肝细胞肝癌的发病率居恶性肿瘤第五位, 也是第三大恶性肿瘤相关性死亡中的死因<sup>[1]</sup>. 中国是乙型病毒性肝炎大国, 因此中国的肝癌占世界的一半以上. 尽管手术切除、介入消融、靶向治疗等治疗方法不断进步, 但大部分肝癌就诊时已处进展期, 因此目前肝癌的治疗仍不理想. 寻找新的进展期肝癌治疗方法, 对延长肝癌患者生存期意义重大. 索拉菲尼(Sorafenib, Sor)是一种新型口服多靶点抗肿瘤药物, 是目前唯一推荐用于治疗进展期肝癌的靶向药物, 且作用机制可能与促进肝癌细胞凋亡有关<sup>[2]</sup>. 然而, 随着Sor在临床的广泛应用, 其耐药问题又随之而来. 我们前期研究发现, 二甲双胍(Metformin, Met)可抑制HepG2细胞增殖和迁移<sup>[3]</sup>、诱导其凋亡及增加靶向药物的敏感性. 新近也有研究证实, Met与Sor通过AMPK途径联合抗肝恶性肿瘤, 但其下游分子却不清楚. 本研究就是进一步探讨Met增强Sor抑制肝癌增殖及促进凋亡的分子机制, 为肝癌的治疗提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Met、Sor(Amresco公司); MTT、PI(Sigma公司); DMSO(BBI公司); DMEM培养基(GIBCO 公司); 胎牛血清(Clark Bio公司); 小鼠抗人AMPK抗体、小鼠抗人Caspase-3抗体、兔抗人P53抗体、兔抗人Bax抗体、兔抗人mTORC1抗体、小鼠抗人 $\beta$ -actin抗体(Santa Cruz公司); 硝酸纤维素膜(Millipore公司); 生物素标记的山羊抗兔(二抗)购自Sigma公司; 生物素标记的山羊抗小鼠(二抗)购自公Sigma公司; Alexa Flour555标记的羊抗兔(荧光二抗)购自Invitrogen 公司; ABC (avidin2biotin complex)试剂盒购自美国Vector Laboratories公司; ECL化学发光试剂盒购自Pierce公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** HepG2细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基(含青、链霉素各100 IU/L)中, 3 d传代一次, 用0.25%的胰酶和0.01%EDTA溶液消化后, 按一比三传代到25 cm<sup>2</sup>培养瓶中培养, 单层培养和孵化于培养

箱中,在37℃,95%湿度和5%CO<sub>2</sub>的条件下进行培养,24 h后进行各项预处理。

1.2.2 MTT法测定细胞相对活力:细胞按每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞在200  $\mu$ L培养基中传代至96孔板中,生长12 h后弃原培养基,分别按对照组(无药物处理)、Sor组(3  $\mu$ mol/L Sor)、Met处理组(5 mmol/L Met)、Met+Sor组(3  $\mu$ mol/L Sor+10 mmol/L Met)进行预处理,每孔设6个复孔,并设调零孔;24 h后每孔分别加入20  $\mu$ LMTT (5 g/L),继续孵育4 h后弃培养基,加入150  $\mu$ L DMSO,避光剧烈振荡5 min后,用酶标仪在492 nm处测吸光值。相对细胞活力计算为加药处理组的吸光值与未加药正常组吸光值的比值。

1.2.3 细胞周期分析:用流式细胞仪进行测定细胞周期,分别按对照组、Sor组、Met处理组、Met+Sor组(具体浓度同MTT法)预处理后,用0.25%的胰酶消化细胞后收集细胞。加入300  $\mu$ L的1 $\times$ Binding Buffer悬浮细胞;加入5  $\mu$ L的Annexin V-FITC混匀后,避光,室温孵育15 min;上机前5 min再加入5  $\mu$ L的PI染色;最后补加200  $\mu$ L的1 $\times$ Binding Buffer进行上机检测细胞凋亡率。用WinMDI 2.9软件对结果进行分析。

1.2.4 免疫印迹法测定蛋白表达情况:按前面分组进行预处理HepG2细胞24 h后,收集细胞后按试剂说明书提取细胞总蛋白,采用Western蛋白印迹法检测Caspase-3、Bax、AMPK、P53及mTORC1表达情况。具体来,等量上样后用SDS-PAGE电泳,转膜到NC膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭30 min,然后分别与兔抗人Caspase-3 (1:1000)、兔抗人mTORC1 (1:1000)、兔抗人P53 (1:1000)、鼠抗人Bax (1:1000)、小鼠抗人AMPK (1:1000)在4℃过夜,接着与二抗山羊抗兔(1:5000)、山羊抗鼠(1:3000)室温孵育60 min,最后用ECL化学发光法曝光。条带灰度用Quantity One软件进行分析。

**统计学处理** 所有的实验均重复3次,采用SPSS 22.0统计学软件进行数据分析,各组数据均用mean $\pm$ SD表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Met、Sor及双药联合对肝癌HepG2细胞增殖抑制作用 从图1可以看出,对照组、Met组、Sor组及联合组细胞相对活力分别为100%、79.96% $\pm$ 4.41%、85.33% $\pm$ 1.00%、68.60% $\pm$ 4.02%,差别有统计学意义( $P<0.05$ ,图1)。

2.2 Met、Sor及双药联合对肝癌HepG2细胞凋亡的影响 从图2及图3可以看出,对照组、Met组、Sor组及联合组细胞经Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪检测细胞凋亡率明显增加,其凋亡率分别为4.47% $\pm$ 1.93%、13.73% $\pm$ 1.18%、9.50% $\pm$ 0.20%、29.03% $\pm$ 0.35%,差

别有统计学意义( $P<0.05$ ,图3)。

2.3 Met、Sor及双药联合对肝癌HepG2细胞表达凋亡相关基因的影响 用Western blot检测对照组、Met、Sor及双药联合组HepG2细胞表达Caspase-3、Bax、AMPK、P53、mTORC1的变化,图4可以看出, Met、Sor均可促进HepG2细胞表达Caspase-3、Bax、AMPK、P53,且减少mTORC1的表达,而二者联合则促进Caspase-3、Bax、AMPK、P53的表达和减少mTORC1的表达更加明显,差别有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

Met是一种广泛用于治疗2型糖尿病的药物,其有不导致低血糖发生、不增加体重等优点。然而近年来,大量流行病学与临床观察发现,与不用Met的糖尿病患者比较,用Met治疗的糖尿病患者发生肝癌<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>、前列腺癌<sup>[7]</sup>、肺癌<sup>[8]</sup>、胰腺癌<sup>[9]</sup>等恶性肿瘤风险降低,还发现Met应用可减少多种恶性肿瘤死亡风险,延长生存时间,改善预后,这引起了研究者的广泛关注<sup>[10]</sup>。进一步的基础研究表明, Met可明显抑制多种恶性肿瘤细胞如肝癌、肺癌、卵巢癌<sup>[11]</sup>、结肠癌<sup>[12]</sup>等肿瘤细胞的增殖并促进凋亡,但其具体机制却各不相同。索拉非尼是唯一推荐用于治疗进展期肝癌的靶向药物,它可通过抑制AMPK通路上的RAF激酶诱导肝癌细胞凋亡。Chun等<sup>[13]</sup>发现, Met可提高肝癌对Sor的敏感性,但机制却不明确。

在早期研究中我们发现, Met可明显抑制HepG2细胞的增殖,可能与诱导凋亡有关,且这个过程可能有VEGF的参与<sup>[3]</sup>。本研究中,我们首先通过MTT证实Met可以增强Sor对HepG2细胞的增殖抑制作用。进一步通过流式细胞仪分析细胞周期还发现,可增强Sor诱导HepG2细胞的凋亡,且Western blot证实伴随凋亡相关蛋白Caspase-3、Bax、P53表达的增加,以上结果表明Met可以增强Sor诱导人肝癌HepG2细胞凋亡,与已报道的部分研究结果一致<sup>[14-16]</sup>。

Met抗肿瘤机制有以下几个方面:(1)激活AMPK途径: AMPK是异三聚体的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过感受细胞内的能量变化起到相应的调节作用,当细胞内AMP/ATP比率增高时AMPK途径被激活<sup>[17]</sup>;(2)促进细胞周期停滞:细胞周期分为DNA复制前的G1期、DNA合成期(S期)、DNA复制后的G2期及有丝分裂期(M期)4期,细胞周期的循环中有G1/S和G2/M两个主要限制点,研究发现在所有的调节因子中,只有G1期的调节因子被发现在肿瘤的发生中出现改变或突变,从而导致细胞增殖的不可控性;(3)降低循环中胰岛素及IGFs:大量流行病学调查及实验室数据提示胰岛素抵抗、高胰岛素血症及细胞膜上胰岛素受体异常都可能导致细胞

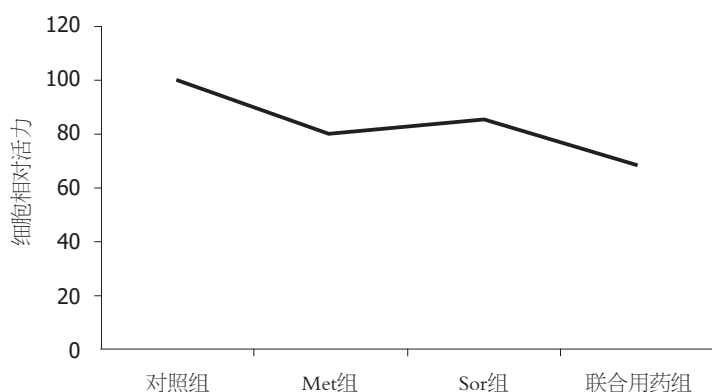


图 1 MTT测定对照组、二甲双胍处理组、索拉菲尼处理组及联合用药组处理HepG2细胞活力的变化. Met: 二甲双胍; Sor: 索拉菲尼.

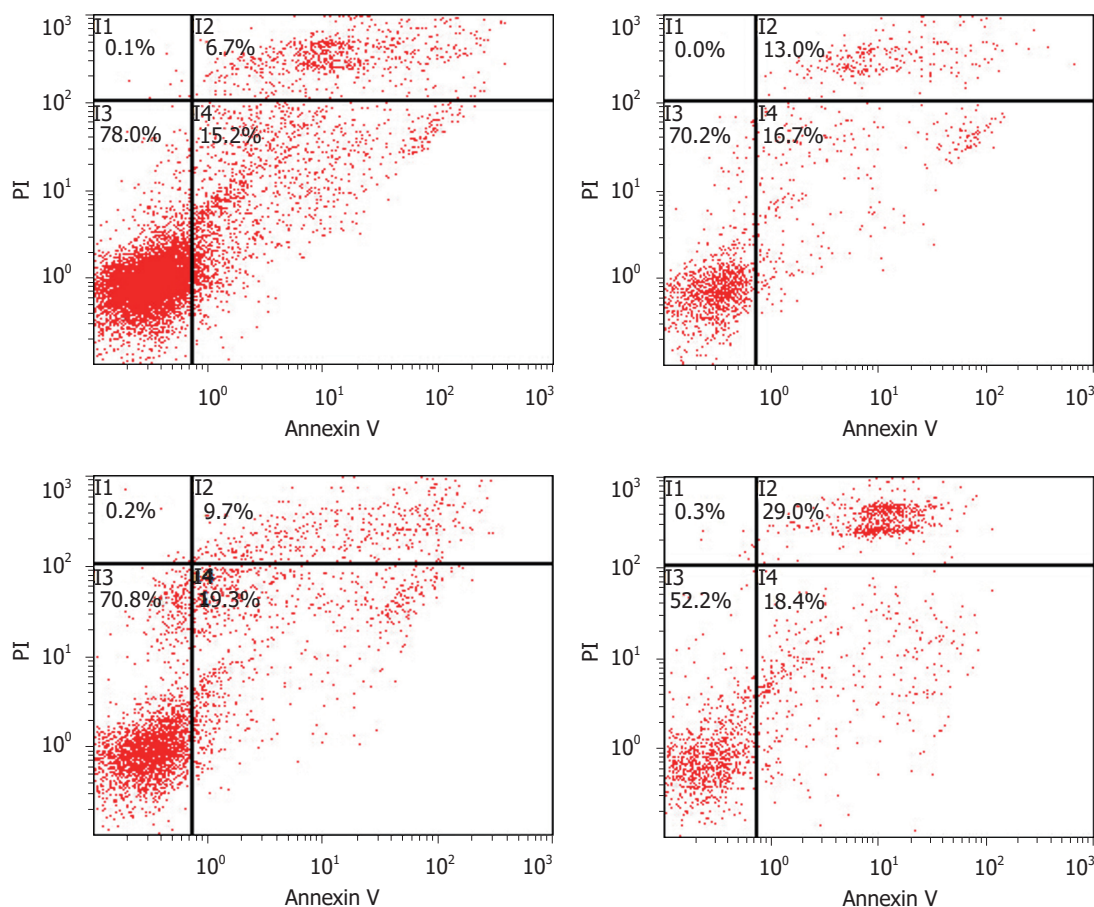


图 2 Annexin-V/PI双染流式细胞仪测定各组凋亡率. A: 对照组; B: 二甲双胍组; C: 索拉菲尼组; D: 联合用药组.

生长异常, 从而发生肿瘤<sup>[18,19]</sup>; (4)抑制肿瘤新生血管生成: Met可以抑制胰岛素和IGF-1诱导的HIF-1 $\alpha$ 和VEGF表达, 也可以抑制血管生成, 发挥抗肿瘤的作用; (5)其它: Met还有调节免疫、杀灭肿瘤干细胞、抗炎、自噬等抗肿瘤机制<sup>[20,21]</sup>. 我们的研究证实, Met联合Sor可增强AMPK的表达, 抑制mTORC1的表达, 提示Met增强Sor诱导肝癌细胞凋亡可能与活化AMPK有关.

综上所述, 我们的结果提示, Met可以增强Sor诱导肝癌HepG2细胞的凋亡, 这个过程可能与AMPK通路有

关, 具体详细机制则需要进一步研究. 另外, 我们的研究均建立在单一细胞株水平的研究, 接下来还需要多株细胞株及动物水平的进一步研究来证实.

文章亮点

实验背景

我国是肝癌大国, 每年新发肝癌占世界至少一半以上. 许多肝癌诊断时已处晚期, 因此, 延长晚期肝癌的生存



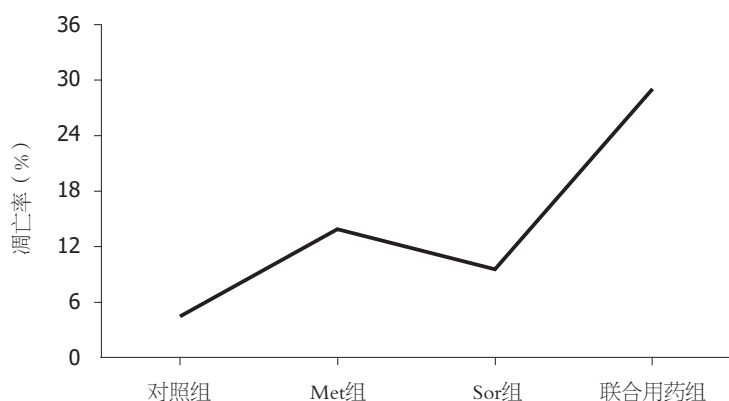


图3 流式细胞仪测定对照组、二甲双胍处理组、索拉菲尼处理组及联合用药组处理HepG2细胞凋亡率的变化。Met: 二甲双胍; Sor: 索拉菲尼。

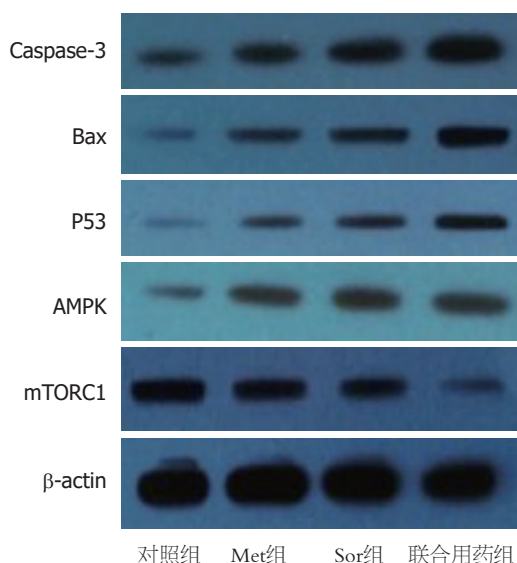


图4 Western blot检测对照组、二甲双胍处理组、索拉菲尼处理组及联合用药组处理HepG2细胞表达Caspase-3、Bax、AMPK、P53、mTORC1的变化。Met: 二甲双胍; Sor: 索拉菲尼。

期显得尤为重要。索拉菲尼(Sorafenib, Sor)是临床上唯一用于晚期肝癌的靶向药物,但耐药问题同样不容乐观。本研究拟通过细胞实验证实二甲双胍(Metformin, Met)可以增强Sor的抑制肝癌细胞增殖和促进其凋亡,为临床提供一定的参考。

### 实验动机

通过细胞实验证实Met可以增强Sor的抑制肝癌细胞增殖和促进肝癌细胞凋亡,为临床应用提供理论依据。

### 实验目标

通过细胞实验证实Met可以增强Sor的抑制肝癌细胞增殖作用,同时证实其过程与促进细胞凋亡有关。

### 实验方法

首先通过MTT法测定单用Sor或Sor联合Met细胞增殖的

影响,再进一步用流式细胞仪测量各组的凋亡率的影响,最后用Western-blot证实这个过程是否与相关蛋白表达的变化。

### 实验结果

MTT实验证实Met可以增强Sor抑制肝癌细胞的增殖,流式细胞技术进一步证实了这个过程与促进凋亡有关。Western-blot实验证实这个过程与AMPK通路活化有关。

### 实验结论

Met可以增强Sor抑制肝癌细胞的增殖,且这个过程会促进其凋亡和AMPK通路的活化。

### 展望前景

本研究仅建立在细胞水平的研究,且只有一个细胞株。未来应该增加细胞株数,同时开展动物实验,进一步证实其作用。还可以在临床上对晚期肝癌合并糖尿病人应用Sor治疗进行分组,按是否用Met分组,观察对生存期的影响。

## 4 参考文献

- 1 La Vecchia C, Negri E. A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 2014; 23: 1-7 [PMID: 23492954 DOI: 10.1097/CEJ.0b013e32836014c8]
- 2 Zhang R, Chen Z, Wu SS, Xu J, Kong LC, Wei P. Celastrol Enhances the Anti-Liver Cancer Activity of Sorafenib. *Med Sci Monit* 2019; 25: 4068-4075 [PMID: 31152143 DOI: 10.12659/MSM.914060]
- 3 叶艳清, 张蕾, 谢军, 朱海燕, 谢云, 曾斌. VEGF在二甲双胍诱导HepG2细胞凋亡的作用. *世界华人消化杂志* 2017; 25: 966-973 [DOI: 10.11569/wjcd.v25.i11.966]
- 4 Zhang ZJ, Zheng ZJ, Shi R, Su Q, Jiang Q, Kip KE. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 2347-2353 [PMID: 22523334 DOI: 10.1210/jc.2012-1267]
- 5 Li P, Zhang C, Gao P, Chen X, Ma B, Yu D, Song Y, Wang Z. Metformin use and its effect on gastric cancer in patients with type 2 diabetes: A systematic review of observational studies. *Oncol Lett* 2018; 15: 1191-1199 [PMID: 29391902 DOI: 10.3892/

- ol.2017.7370]
- 6 De A, Kuppusamy G. Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Curr Probl Cancer* 2020; 44: 100488 [PMID: 31235186 DOI: 10.1016/j.cupr.2019.06.003]
- 7 Kuo YJ, Sung FC, Hsieh PF, Chang HP, Wu KL, Wu HC. Metformin reduces prostate cancer risk among men with benign prostatic hyperplasia: A nationwide population-based cohort study. *Cancer Med* 2019; 8: 2514-2523 [PMID: 30968600 DOI: 10.1002/cam4.2025]
- 8 Zeng S, Gan HX, Xu JX, Liu JY. Metformin improves survival in lung cancer patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Med Clin (Barc)* 2019; 152: 291-297 [PMID: 30173870 DOI: 10.1016/j.medcli.2018.06.026]
- 9 Wynn A, Vacheron A, Zuber J, Solomon SS. Metformin Associated With Increased Survival in Type 2 Diabetes Patients With Pancreatic Cancer and Lymphoma. *Am J Med Sci* 2019; 358: 200-203 [PMID: 31324361 DOI: 10.1016/j.amjms.2019.06.002]
- 10 Mallik R, Chowdhury TA. Metformin in cancer. *Diabetes Res Clin Pract* 2018; 143: 409-419 [PMID: 29807101 DOI: 10.1016/j.diabres.2018.05.023]
- 11 Zou G, Bai J, Li D, Chen Y. Effect of metformin on the proliferation, apoptosis, invasion and autophagy of ovarian cancer cells. *Exp Ther Med* 2019; 18: 2086-2094 [PMID: 31452705 DOI: 10.3892/etm.2019.7803]
- 12 Zhang JJ, Zhang QS, Li ZQ, Zhou JW, Du J. Metformin attenuates PD-L1 expression through activating Hippo signaling pathway in colorectal cancer cells. *Am J Transl Res* 2019; 11: 6965-6976 [PMID: 31814900]
- 13 Chung YK, Hwang S, Song GW, Lee YJ, Kim KH, Ahn CS, Moon DB, Ha TY, Jung DH, Park GC, Ryoo BY, Lee SG. Absence of antitumor effects of metformin in sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma recurrence after hepatic resection and liver transplantation. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg* 2018; 22: 297-304 [PMID: 30588519 DOI: 10.14701/ahbps.2018.22.4.297]
- 14 Chen M, Zhang J, Hu F, Liu S, Zhou Z. Metformin affects the features of a human hepatocellular cell line (HepG2) by regulating macrophage polarization in a co-culture microenvironment. *Diabetes Metab Res Rev* 2015; 31: 781-789 [PMID: 26467463 DOI: 10.1002/dmrr.2761]
- 15 Zhu X, Yan H, Xia M, Chang X, Xu X, Wang L, Sun X, Lu Y, Bian H, Li X, Gao X. Metformin attenuates triglyceride accumulation in HepG2 cells through decreasing stearyl-coenzyme A desaturase 1 expression. *Lipids Health Dis* 2018; 17: 114 [PMID: 29759071 DOI: 10.1186/s12944-018-0762-0]
- 16 Feng Y, Guo X, Huang X, Wu M, Li X, Wu S, Luo X. Metformin reverses stem cell-like HepG2 sphere formation and resistance to sorafenib by attenuating epithelial-mesenchymal transformation. *Mol Med Rep* 2018; 18: 3866-3872 [PMID: 30106125 DOI: 10.3892/mmr.2018.9348]
- 17 Luo Z, Zhu T, Luo W, Lv Y, Zhang L, Wang C, Li M, Wu W, Shi S. Metformin induces apoptotic cytotoxicity depending on AMPK/PKA/GSK-3 $\beta$ -mediated c-FLIP<sub>1</sub> degradation in non-small cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2019; 11: 681-689 [PMID: 30666163 DOI: 10.2147/CMAR.S178688]
- 18 Kamarudin MNA, Sarker MMR, Zhou JR, Parhar I. Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38: 491 [PMID: 31831021 DOI: 10.1186/s13046-019-1495-2]
- 19 Bernstein LM. New developments of metformin in the clinical cancer area. *Oncotarget* 2018; 9: 36820-36821 [PMID: 30627318 DOI: 10.18632/oncotarget.26418]
- 20 Fu H, Zhang J, Pan T, Ai S, Tang L, Wang F. miR-378a enhances the sensitivity of liver cancer to sorafenib by targeting VEGFR, PDGFR $\beta$  and c-Raf. *Mol Med Rep* 2018; 17: 4581-4588 [PMID: 29328399 DOI: 10.3892/mmr.2018.8390]
- 21 Ye J, Chen K, Qi L, Li R, Tang H, Zhou C, Zhai W. Metformin suppresses hypoxia-induced migration via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in gallbladder cancer in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2018; 40: 3501-3510 [PMID: 30272364 DOI: 10.3892/or.2018.6751]

科学编辑: 张晗 制作编辑: 刘继红





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton,  
CA 94566, USA  
**Telephone:** +1-925-3991568  
**E-mail:** [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
**https://**[www.wjgnet.com](https://www.wjgnet.com)



ISSN 1009-3079

