二甲双胍对食管鳞状细胞癌细胞的体内外抑制作用及机制Δ

刘　山*,胡　梦,张　倬,熊　飞,吴平尚,李雪曼#(武汉市第三医院胸外科,武汉　430074)

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2025)17-2113-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.17.06

摘　要　目的　基于低氧诱导因子1α(HIF-1α)/白细胞介素8(IL-8)信号通路探讨二甲双胍对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞的体内外抑制作用及机制。**方法**　将人食管鳞癌细胞TE1分为空白组,二甲双胍低、中、高浓度组(0.5、1、2 mmol/L),IDF-11774(HIF-1α抑制剂)组(20 μmol/L)和二甲双胍高浓度+HIF-1α激活剂二甲基乙二酰氨基乙酸(DMOG)组(2 mmol/L二甲双胍和10 μmol/L DMOG)。处理24 h后,检测细胞增殖[以5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷(EdU)阳性率和光密度(OD_{450}值)计]、凋亡、侵袭、迁移情况以及细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、Bcl-2相互作用的细胞死亡介质(Bim)、迁移侵袭增强因子1(MIEN1)、基质金属蛋白酶9(MMP-9) mRNA表达和HIF-1α、IL-8蛋白表达。构建裸鼠移植瘤模型。将30只裸鼠随机分为空白组,二甲双胍低、中、高剂量组(灌胃62.5、125、250 mg/kg二甲双胍并腹腔注射等体积生理盐水),IDF-11774组(灌胃50 mg/kg IDF-11774并腹腔注射等体积生理盐水)和二甲双胍高剂量+DMOG组(灌胃250 mg/kg二甲双胍并腹腔注射250 mg/kg DMOG),每组5只。每天给药1次,持续4周后,检测小鼠瘤体质量、体积及肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达。**结果**　二甲双胍可呈浓度/剂量依赖性地降低/减少TE1细胞的EdU阳性率、OD_{450}值、侵袭数、划痕愈合率以及细胞中PCNA mRNA、MIEN1 mRNA、MMP-9 mRNA、HIF-1α蛋白、IL-8蛋白表达水平和移植瘤瘤体质量、体积及肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平($P<0.05$),升高细胞凋亡率和细胞中Bim mRNA表达水平($P<0.05$);IDF-11774组对应指标变化趋势与二甲双胍组一致,而DMOG能显著减弱高浓度/剂量二甲双胍的上述作用($P<0.05$)。**结论**　二甲双胍可抑制TE1细胞增殖、侵袭、迁移及裸鼠体内移植瘤生长,诱导细胞凋亡;其机制可能与抑制HIF-1α/IL-8信号通路有关。

关键词　二甲双胍;食管鳞状细胞癌;HIF-1α/IL-8信号通路;侵袭;增殖;迁移;凋亡

The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of metformin on esophageal squamous cell carcinoma cells

LIU Shan, HU Meng, ZHANG Zhuo, XIONG Fei, WU Pingshang, LI Xueman (Dept. of Thoracic Surgery, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects and mechanism of metformin on the malignant biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells by the hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)/interleukin-8 (IL-8) signaling pathway. **METHODS** Human ESCC TE1 cells were assigned into blank group, metformin low-, medium-, and high-dose groups (0.5, 1, 2 mmol/L), IDF-11774 (HIF-1α inhibitor) group (20 μmol/L), and high-dose metformin+HIF-1α activator dimethyloxalylglycine (DMOG) group. After 24 h treatment, cell proliferation [measured by the positive rate of 5-ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU) and optical density at 450 nm (OD_{450} value)], apoptosis, invasion and migration as well as mRNA expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim), migration and invasion enhancer 1 (MIEN1), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and protein expressions of HIF-1α and IL-8 in the cells were detected. The xenograft tumor model of nude mice was established. Thirty nude mice were randomly divided into blank group, metformin low-, medium-, and high-dose groups (i.g. administration of metformin 62.5, 125, 250 mg/kg+i.p. administration of equal volume of normal saline), IDF-11774 group (i.g. administration of 50 mg/kg IDF-11774+i.p. administration of equal volume of normal saline) and high-dose metformin+DMOG group (i.g. administration of metformin 250 mg/kg+i.p. administration of DMOG 250 mg/kg), with 5 mice in each group. They were given relevant medicine, once a day, for 4 consecutive weeks; the mass and volume of the tumor and protein expressions of HIF-1α and IL-8 in the tumor tissue were determined. **RESULTS** The EdU positive rate, OD_{450} value, cell invasion number, scratch healing rate, mRNA expressions of PCNA, MIEN1 and MMP-9, protein expressions of HIF-1α and IL-8, as well as the mass and volume of transplanted tumors and protein expressions of HIF-1α and IL-8 in tumor tissues were decreased by metformin in concentration/dose-dependent manner ($P<0.05$). Additionally, metformin increased the apoptosis rate and mRNA expression of Bim in cells ($P<0.05$). The trend of changes in corresponding indicators in the IDF-11774 group was consistent with that in the metformin groups, whereas DMOG

Δ**基金项目** 武汉市医学科学研究项目(No.WX23A32);武汉市中医药科研项目(No.WZ24Q18)

＊**第一作者** 主治医师,硕士。研究方向:食管癌的综合治疗。电话:027-65399971。E-mail:l6p9ivd@163.com

\# **通信作者** 副主任医师,硕士。研究方向:食管癌的综合治疗。E-mail:nk0aj6d@163.com

could significantly attenuate the aforementioned effects of high-concentration/high-dose metformin ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Metformin can inhibit the proliferation, invasion, migration of TE1 cells, and tumor growth of nude mice, and induce cell apoptosis, the mechanism of which may be related to the inhibition of HIF-1α/IL-8 signaling pathway.

KEYWORDS metformin; esophageal squamous cell carcinoma; HIF-1α/IL-8 signaling pathway; invasion; proliferation; migration; apoptosis

食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）是一种常见的食管癌，其临床症状包括吞咽困难、疼痛、反流和体重减轻，严重降低了患者的生活质量[1]。尽管随着科学的发展，ESCC的治疗取得了很大进步，但ESCC患者的低生存率仍然是一个亟待解决的问题[2]。相关证据表明，ESCC细胞不受控制地增殖、转移是ESCC进展的主要原因[3]，且手术、放化疗和免疫治疗这些目前常用治疗手段仍存在创伤大、毒副作用明显、治疗响应率有限等问题。因此，寻找新的有效的药物抑制ESCC细胞增殖、转移具有重要意义。二甲双胍是一种广泛使用的抗糖尿病药物，且已成为包括ESCC在内的多种癌症的潜在治疗剂[4]。已有研究报道，二甲双胍可抑制食管癌细胞侵袭和迁移[5]，但具体机制尚不完全明确。相关研究显示，低氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor-1α，HIF-1α）/白细胞介素8（interleukin-8，IL-8）信号通路的激活可促进食管癌的恶性进展[6]，且二甲双胍能够有效降低食管低级别上皮内瘤变患者瘤变组织中HIF-1α蛋白水平[7]。但二甲双胍是否可通过调控HIF-1α/IL-8信号通路来影响ESCC细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移尚不清楚。为此，本研究拟从HIF-1α/IL-8信号通路角度出发，探究二甲双胍对ESCC细胞的体内外抑制作用及机制，以期为ESCC的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BX53型荧光显微镜（日本Olympus公司）、Multiskan FC型酶标仪[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]、FACS Celesta型流式细胞仪（美国BD公司）、QuantStudio 5型荧光定量PCR仪（美国ABI公司）、Mini-PROTEAN Tetra型蛋白电泳仪（美国Bio-Rad公司）、Tanon 5200型化学发光成像仪（上海天能科技有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

二甲双胍片（批号20231101，规格0.5 g）购自中美上海施贵宝制药有限公司；HIF-1α抑制剂IDF-11774对照品、HIF-1α激活剂二甲基乙二酰氨基乙酸（dimethyloxalylglycine，DMOG）对照品（批号分别为HY-111387、HY-15893，纯度分别为99.30%、99.69%）均购自美国MCE公司；CCK-8试剂盒（批号20231009）购自上海泽叶生物科技有限公司；5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷（EdU）染色试剂盒（批号C01503）购自上海东寰生物科技有限公司；Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡试剂盒（批号BC1050）购自湖北百奥斯生物科技有限公司；兔源HIF-1α、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）、IL-8一抗及山羊抗兔IgG二抗均购自英国Abcam公司。

1.3 细胞与动物

人食管鳞癌细胞TE1购自通派（上海）生物科技有限公司。

5～6周龄SPF级BALB/c雄性裸鼠由武汉贝赛模式生物科技有限公司提供[生产许可证号为SCXK（鄂）2022-0029]，共30只，体重18～20 g。所有BALB/c裸鼠均在特定的无病原体条件下饲养，适应性饲养5 d后进行实验。本动物实验获得武汉贝赛模式生物科技有限公司实验动物福利与伦理管理委员会批准[编号：BSMS动（福）第2024-03-251A号]。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养

使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在37 ℃、5%CO_2条件下培养TE1细胞，每2～3 d更换1次培养基。

2.1.2 细胞分组、给药

将TE1细胞分为空白组，二甲双胍低、中、高浓度组，IDF-11774组，二甲双胍高浓度+DMOG组，每组设置6个复孔。空白组细胞正常培养；二甲双胍低、中、高浓度组细胞分别用0.5、1、2 mmol/L二甲双胍处理24 h[5]；IDF-11774组细胞用20 μmol/L IDF-11774处理24 h[8]；二甲双胍高浓度+DMOG组细胞用2 mmol/L二甲双胍和10 μmol/L DMOG处理24 h[9]。

2.1.3 TE1细胞增殖检测

（1）EdU染色法检测：将TE1细胞接种于6孔板中（5×10^5个/孔），按“2.1.2”项下方法分组、给药后，每孔加入100 μL EdU溶液，孵育2 h；以4%多聚甲醛固定15 min，再以0.5% Triton X-100孵育10 min，最后用4′，6-二氨基-2-苯基吲哚染色20 min。使用荧光显微镜观察细胞图像（阳性染色呈红色荧光），并计算TE1细胞EdU阳性率。EdU阳性率（%）=EdU阳性细胞数/总细胞数×100%。

（2）CCK-8法检测：将TE1细胞接种于96孔板中（1×10^4个/孔），按“2.1.2”项下方法分组、给药后，各孔加入10 μL CCK-8溶液，孵育1.5 h。使用酶标仪测定各孔

在450 nm处的光密度（即OD_{450}值），OD_{450}值越大说明细胞增殖活性越强。

2.1.4　TE1细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。取TE1细胞按“2.1.2”项下方法分组、给药后，用不含EDTA的胰酶消化2 min，加入含血清培养基终止消化，以1 000 r/min离心5 min，收集细胞。将收集的TE1细胞（5×10^5个）用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤2次后重悬于500 μL结合缓冲液中，向细胞悬液中加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和5 μL碘化丙啶（PI）并避光孵育15 min，然后上机检测细胞凋亡情况。

2.1.5　TE1细胞侵袭检测

采用Transwell小室法检测。取TE1细胞按“2.1.2”项下方法分组、给药后，将200 μL不含胎牛血清的细胞悬液（5×10^5个/mL）置于基质胶包被的Transwell小室的上室中，向小室的下室加入500 μL含胎牛血清的培养基，在37 ℃、5%CO_2培养箱中孵育24 h后，用棉签轻轻擦去上室中未侵袭的细胞，用PBS漂洗3次。以4%多聚甲醛固定30 min，以0.1%结晶紫染色20 min。采用Image J软件计数侵袭的细胞数。

2.1.6　TE1细胞迁移检测

采用划痕实验法检测。取TE1细胞按“2.1.2”项下方法分组、给药后，分别将各组TE1细胞接种于6孔板中（1×10^5个/孔），连续孵育至单层细胞均匀分布于板底。用移液器尖端在细胞表面制造划痕。用PBS冲洗细胞数次以去除所有漂浮细胞，并用不含胎牛血清的培养基孵育细胞，分别于0、24 h时观察划痕。使用Image J软件分析划痕宽度，并计算划痕愈合率[划痕愈合率（%）=（0 h时划痕宽度－24 h时划痕宽度）/0 h时划痕宽度×100%]。

2.1.7　TE1细胞中增殖、凋亡、迁移和侵袭相关基因mRNA表达检测

采用荧光定量PCR法检测细胞中增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）、Bcl-2相互作用的细胞死亡介质（Bcl-2 interacting mediator of cell death，Bim）、迁移侵袭增强因子1（migration and invasion enhancer 1，MIEN1）、基质金属蛋白酶9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）mRNA表达。取TE1细胞按“2.1.2”项下方法分组、给药后，采用TRIzol试剂分别提取各组细胞中总RNA，进行浓度和纯度检测后，取1 μg RNA逆转录合成cDNA，并以cDNA为模板进行荧光定量PCR反应。PCR反应条件为：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性10 s，62 ℃退火1 min，72 ℃延伸20 s，共循环40次。PCR反应体系为：cDNA模板2 μL，正、反向引物各1 μL，SYBR Green Mix 10 μL，去离子水6 μL。GAPDH的正向引物序列为5′-TCATTTCCTGGTATGACA-3′，反向引物序列为5′-GTCTTACTCCTTGGAGGCC-3′，扩增产物大小为218 bp；PCNA的正向引物序列为5′-AAGGCTTCGACACATACCGC-3′，反向引物序列为5′-AGCTGTACTCCTGTTCTGGGA-3′，扩增产物大小为181 bp；Bim的正向引物序列为5′-TGTTCATCACCACACAGCAG-3′，反向引物序列为5′-GCAGGATTTTGTGTAAGAAT-3′，扩增产物大小为160 bp；MIEN1的正向引物序列为5′-CTGTCATTCCACTCCTCTAG-3′，反向引物序列为5′-GCGTCATCCTGTGACTGCAC-3′，扩增产物大小为162 bp；MMP-9的正向引物序列为5′-GCCGGGAACGTATCTGGAAA-3′，反向引物序列为5′-GGTTGTGGAAACTCACACGC-3′，扩增产物大小为165 bp。上述引物均由广州基迪奥生物科技有限公司设计并合成。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因的相对表达量。

2.1.8　TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取TE1细胞按“2.1.2”项下方法分组、给药后，采用RIPA缓冲液提取各组细胞中的总蛋白，通过BCA法对总蛋白进行定量。将蛋白进行高温变性后，取45 μg上样进行10% SDS-PAGE分离（电压100 V，时间1 h），然后转移（电流300 mA，时间2 h）到PVDF膜上，以5%脱脂牛奶阻断膜1 h；加入HIF-1α（稀释比例1∶3 000）、GAPDH（稀释比例1∶4 000）、IL-8（稀释比例1∶2 000）一抗，在4 ℃下孵育24 h；加入二抗（稀释比例1∶4 000），在室温下孵育1.5 h。利用增强的化学发光试剂显影以可视化免疫反应条带，采用化学发光成像仪捕获蛋白质信号，采用Image J软件测量和分析蛋白条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2　荷瘤小鼠实验

将TE1细胞悬液通过皮下注射接种到BALB/c裸鼠右外侧腋窝区（5×10^6个/只），每日观察肿瘤生长情况。当瘤体体积长至约100 mm^3时，表明裸鼠移植瘤模型构建成功[10]。本研究共30只裸鼠建模成功。将这30只裸鼠随机分为空白组，二甲双胍低、中、高剂量组，IDF-11774组和二甲双胍高剂量+DMOG组，每组5只。二甲双胍低、中、高剂量组裸鼠分别灌胃62.5、125、250 mg/kg二甲双胍，并腹腔注射等体积的生理盐水[10]；IDF-11774组裸鼠灌胃50 mg/kg IDF-11774，并腹腔注射等体积的生理盐水[11]；二甲双胍高剂量+DMOG组裸鼠灌胃250 mg/kg二甲双胍，并腹腔注射250 mg/kg DMOG[12]；空白组裸鼠灌胃并腹腔注射等体积的生理盐水，每天1次，持续4周。4周后处死裸鼠，收集移植瘤瘤体，称定瘤体质量，采用游标卡尺测量瘤体的长径（L）和短径（W），按公式计算肿瘤体积：肿瘤体积$=L\times W^2/2$。采用Western blot法检测肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白的表达（具体操作同“2.1.8”项下）。

2.3 统计学方法

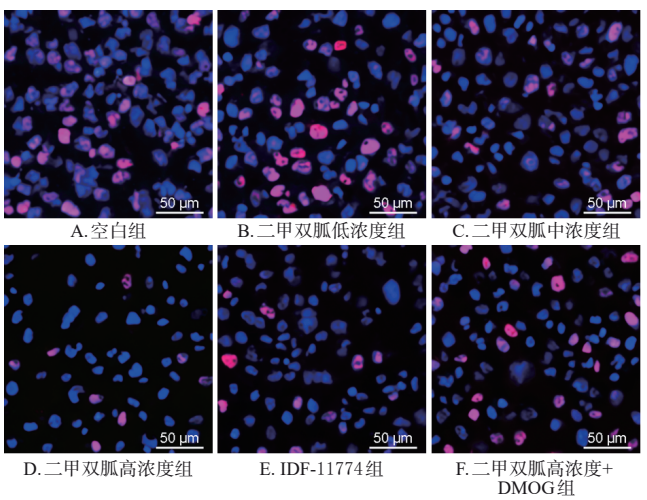
采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 TE1细胞增殖实验结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞的EdU阳性率、OD_{450}值均显著降低（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞的EdU阳性率、OD_{450}值均显著升高（$P<0.05$）。结果见图1、表1。



A.空白组　B.二甲双胍低浓度组　C.二甲双胍中浓度组

D.二甲双胍高浓度组　E. IDF-11774组　F.二甲双胍高浓度+DMOG组

图1 各组TE1细胞增殖检测的EdU染色结果

表1 各组TE1细胞的EdU阳性率、OD_{450}值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	EdU阳性率/%	OD_{450}值
空白组	34.67±1.83	1.19±0.11
二甲双胍低浓度组	29.88±1.94[a]	1.00±0.09[a]
二甲双胍中浓度组	21.56±1.03[ab]	0.81±0.08[ab]
二甲双胍高浓度组	11.83±0.62[abc]	0.43±0.03[abc]
IDF-11774组	14.78±0.73[a]	0.50±0.04[a]
二甲双胍高浓度+DMOG组	20.58±1.14[d]	0.85±0.08[d]

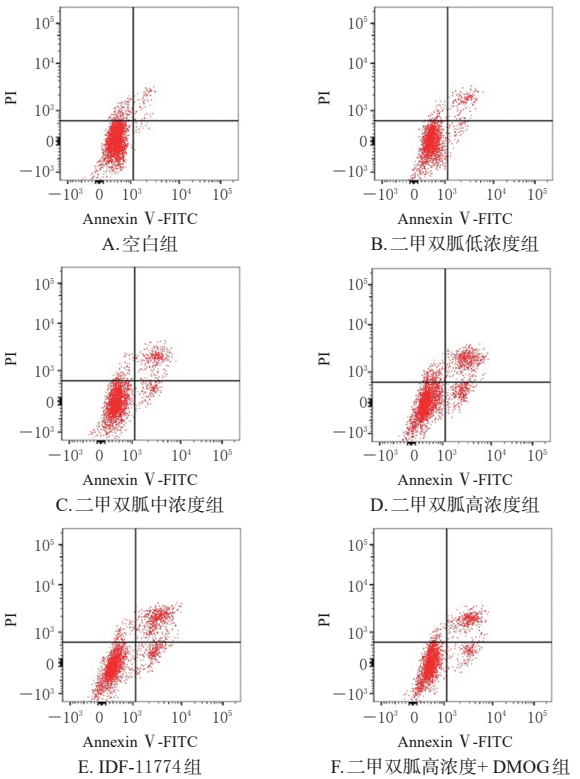
a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低浓度组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中浓度组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高浓度组比较，$P<0.05$。

3.1.2 TE1细胞凋亡实验结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞的凋亡率均显著升高（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞的凋亡率显著降低（$P<0.05$）。结果见图2、表2。

3.1.3 TE1细胞侵袭实验结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞的侵袭数均显著减少（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞的侵袭数显著增加（$P<0.05$）。结果见表2、图3。



A.空白组　B.二甲双胍低浓度组

C.二甲双胍中浓度组　D.二甲双胍高浓度组

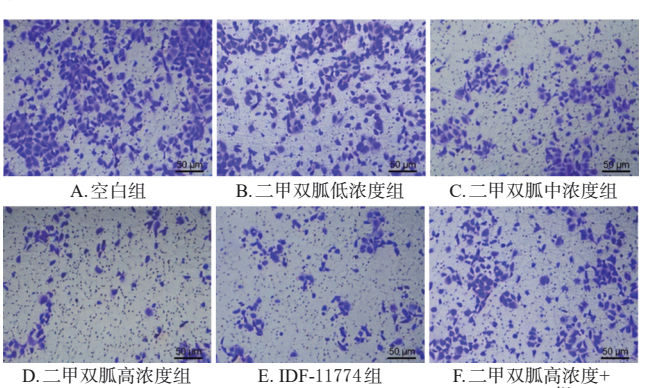
E. IDF-11774组　F.二甲双胍高浓度+DMOG组

图2 各组TE1细胞凋亡检测的流式细胞图

表2 各组TE1细胞的凋亡率、侵袭数、划痕愈合率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	细胞凋亡率/%	细胞侵袭数/个	划痕愈合率/%
空白组	4.93±0.26	85.56±4.86	43.57±2.21
二甲双胍低浓度组	10.76±0.54[a]	73.44±3.67[a]	37.78±1.87[a]
二甲双胍中浓度组	18.96±1.01[ab]	58.69±3.01[ab]	29.68±1.51[ab]
二甲双胍高浓度组	30.54±1.59[abc]	31.72±1.64[abc]	11.54±0.62[abc]
IDF-11774组	26.77±1.43[a]	35.73±1.84[a]	13.86±0.73[a]
二甲双胍高浓度+DMOG组	20.11±1.08[d]	60.61±3.12[d]	27.56±1.34[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低浓度组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中浓度组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高浓度组比较，$P<0.05$。



A.空白组　B.二甲双胍低浓度组　C.二甲双胍中浓度组

D.二甲双胍高浓度组　E. IDF-11774组　F.二甲双胍高浓度+DMOG组

图3 各组TE1细胞侵袭能力检测的Transwell染色结果

3.1.4　TE1细胞迁移实验结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞的划痕愈合率均显著降低（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞的划痕愈合率显著升高（$P<0.05$）。结果见表2、图4。

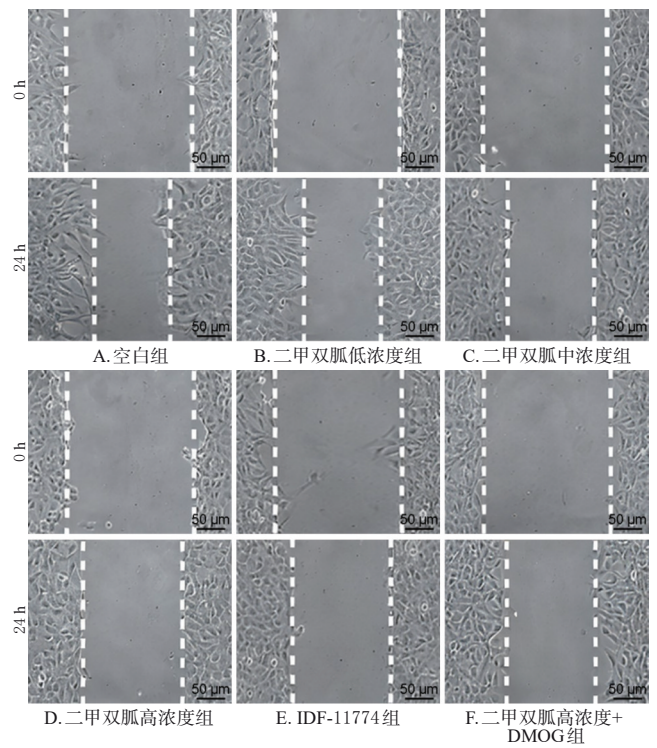


图4　各组TE1细胞迁移能力检测的划痕结果

3.1.5　TE1细胞中PCNA、Bim、MIEN1、MMP-9 mRNA表达检测结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA相对表达量均显著降低（$P<0.05$），Bim mRNA相对表达量均显著升高（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA相对表达量均显著升高（$P<0.05$），Bim mRNA相对表达量显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

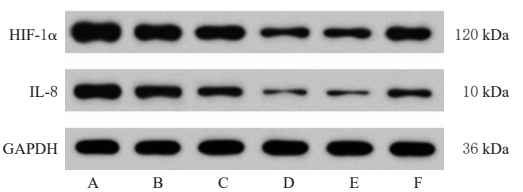
3.1.6　TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达检测结果

与空白组比较，二甲双胍低、中、高浓度组和IDF-11774组TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有浓度依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高浓度组比较，二甲双胍高浓度+DMOG组TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图5、表4。

表3　各组TE1细胞中PCNA、Bim、MIEN1、MMP-9 mRNA表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	PCNA mRNA	Bim mRNA	MIEN1 mRNA	MMP-9 mRNA
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
二甲双胍低浓度组	0.86±0.07[a]	1.32±0.11[a]	0.81±0.09[a]	0.78±0.08[a]
二甲双胍中浓度组	0.43±0.04[ab]	1.79±0.13[ab]	0.59±0.06[ab]	0.52±0.04[ab]
二甲双胍高浓度组	0.25±0.02[abc]	2.38±0.21[abc]	0.28±0.02[abc]	0.11±0.01[abc]
IDF-11774组	0.30±0.03[a]	2.23±0.19[a]	0.34±0.03[a]	0.17±0.01[a]
二甲双胍高浓度+DMOG组	0.45±0.04[d]	1.86±0.17[d]	0.55±0.06[d]	0.46±0.04[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低浓度组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中浓度组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高浓度组比较，$P<0.05$。



A：空白组；B：二甲双胍低浓度组；C：二甲双胍中浓度组；D：二甲双胍高浓度组；E：IDF-11774组；F：二甲双胍高浓度+DMOG组。

图5　各组TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达的电泳图

表4　各组TE1细胞中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	HIF-1α/GAPDH	IL-8/GAPDH
空白组	1.96±0.18	1.12±0.11
二甲双胍低浓度组	1.57±0.14[a]	0.86±0.08[a]
二甲双胍中浓度组	1.18±0.12[ab]	0.53±0.04[ab]
二甲双胍高浓度组	0.67±0.06[abc]	0.18±0.01[abc]
IDF-11774组	0.71±0.07[a]	0.22±0.02[a]
二甲双胍高浓度+DMOG组	1.09±0.10[d]	0.54±0.05[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低浓度组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中浓度组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高浓度组比较，$P<0.05$。

3.2　动物实验结果

3.2.1　裸鼠体内移植瘤生长情况

与空白组比较，二甲双胍低、中、高剂量组和IDF-11774组裸鼠瘤体体积及质量均显著减小/降低（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有剂量依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高剂量组比较，二甲双胍高剂量+DMOG组裸鼠瘤体体积及质量均显著增大/升高（$P<0.05$）。结果见图6、表5。

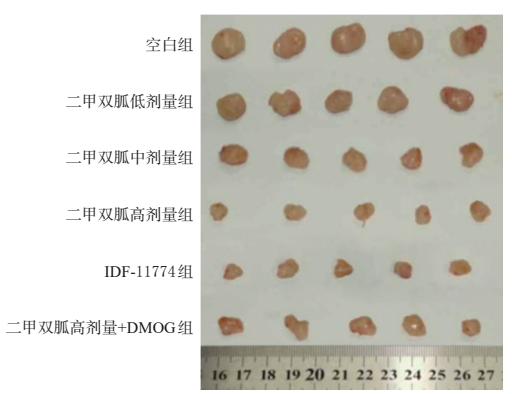


图6　各组裸鼠体内移植瘤生长情况

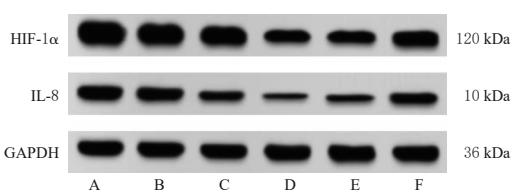
表5　各组裸鼠体内瘤体体积及质量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	瘤体体积/mm³	瘤体质量/g
空白组	827.16±43.32	0.67±0.06
二甲双胍低剂量组	666.67±32.55[a]	0.54±0.04[a]
二甲双胍中剂量组	506.17±26.14[ab]	0.41±0.03[ab]
二甲双胍高剂量组	234.57±12.03[abc]	0.19±0.01[abc]
IDF-11774组	271.60±14.06[a]	0.22±0.02[a]
二甲双胍高剂量+DMOG组	481.48±25.08[d]	0.39±0.03[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低剂量组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中剂量组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2.2　瘤裸鼠肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达情况

与空白组比较，二甲双胍低、中、高剂量组和IDF-11774组移植瘤裸鼠肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），且二甲双胍的作用具有剂量依赖性（$P<0.05$）；与二甲双胍高剂量组比较，二甲双胍高剂量+DMOG组移植瘤裸鼠肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图7、表6。



A：空白组；B：二甲双胍低剂量组；C：二甲双胍中剂量组；D：二甲双胍高剂量组；E：IDF-11774组；F：二甲双胍高剂量+DMOG组。

图7　各组移植瘤裸鼠肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达的电泳图

表6　各组移植瘤裸鼠肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	HIF-1α/GAPDH	IL-8/GAPDH
空白组	1.76±0.19	0.96±0.10
二甲双胍低剂量组	1.58±0.16[a]	0.81±0.08[a]
二甲双胍中剂量组	1.23±0.14[ab]	0.45±0.05[ab]
二甲双胍高剂量组	0.75±0.08[abc]	0.16±0.01[abc]
IDF-11774组	0.79±0.08[a]	0.23±0.03[a]
二甲双胍高剂量+DMOG组	1.01±0.11[d]	0.59±0.06[d]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与二甲双胍低剂量组比较，$P<0.05$；c：与二甲双胍中剂量组比较，$P<0.05$；d：与二甲双胍高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

ESCC是一种在世界范围内高度普遍且致命的疾病。目前，ESCC的主要治疗方法为手术、化疗和放疗。有研究报道，化疗药物治疗ESCC存在一定的局限性，且副作用严重[13—14]。二甲双胍作为一种治疗2型糖尿病的经典药物，除具有降血糖作用外，还具有抗癌等功效[15]。已有研究报道，二甲双胍可抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭[16]，抑制结直肠癌细胞的生长[17]，减弱胃癌细胞增殖能力[18]。以上研究表明，二甲双胍可对消化道肿瘤发挥抗癌作用。本研究结果与上述研究结果基本一致，即低、中、高浓度/剂量的二甲双胍均可抑制TE1细胞的增殖、侵袭、迁移及裸鼠体内移植瘤生长，诱导细胞凋亡，且二甲双胍的作用具有浓度/剂量依赖性。

研究指出，PCNA是一种滑动夹蛋白，可协调细胞DNA复制，增强其增殖能力[19]；MIEN1过表达是多种癌症的特征，并可促进癌细胞迁移和侵袭[20]；MMP-9可通过降解细胞外基质的方式增强细胞的侵袭及迁移能力[21]；Bim属于执行凋亡途径的关键蛋白之一[22]。本研究结果显示，低、中、高浓度的二甲双胍均可下调TE1细胞中PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA表达，上调Bim mRNA表达，且具有浓度依赖性。这从分子水平上证实了二甲双胍的抗ESCC作用。

HIF-1α可以刺激各种细胞因子和趋化因子的表达，IL-8是一种具有致瘤特性的趋化因子，HIF-1α可通过激活IL-8促进肿瘤进展[23]。相关研究显示，HIF-1α/IL-8信号通路的激活促进了肝癌细胞的侵袭及迁移行为[24]。本研究结果显示，与空白组比较，IDF-11774组TE1细胞中HIF-1α和IL-8蛋白表达水平、EdU阳性率、OD_{450}值、细胞侵袭数、划痕愈合率及PCNA、MIEN1、MMP-9 mRNA相对表达量均显著降低/减少，细胞凋亡率及Bim mRNA相对表达量均显著升高；移植瘤裸鼠体内瘤体体积、质量及肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达水平均显著减小/降低。该结果表明，IDF-11774处理后TE1细胞的增殖、侵袭、迁移能力减弱，凋亡能力增强，裸鼠体内移植瘤生长缓慢。由于IDF-11774为HIF-1α抑制剂，该结果也提示，HIF-1α/IL-8信号通路的抑制减缓了ESCC的进展。此外，低、中、高浓度/剂量的二甲双胍均可下调TE1细胞/肿瘤组织中HIF-1α、IL-8蛋白表达，遂笔者推测二甲双胍可能通过抑制HIF-1α/IL-8信号通路发挥抗ESCC的作用。为了验证上述推测，本研究用HIF-1α激活剂DMOG设计了回复实验，结果显示，DMOG减弱了高浓度/剂量二甲双胍对TE1细胞恶性生物学行为及裸鼠体内移植瘤生长的抑制作用，证实了二甲双胍可能通过抑制HIF-1α/IL-8信号通路来抑制ESCC进展。

综上所述，二甲双胍可减缓TE1细胞增殖、侵袭、迁移及裸鼠体内移植瘤生长，促进细胞凋亡，该机制可能与抑制HIF-1α/IL-8信号通路有关。本研究证实了二甲双胍在体内外实验中均具有抗ESCC作用，为临床治疗提供了重要依据，但仍存在以下局限性：（1）未通过染色质免疫共沉淀技术等进一步验证HIF-1α对IL-8启动子的直接调控作用；（2）缺乏IL-8过表达或外源添加的挽救实验；（3）二甲双胍的作用机制可能还涉及其他通路；（4）未分析临床样本中HIF-1α/IL-8表达与预后的关系；（5）本研究仅基于TE1细胞展开，需在其他ESCC细胞系中验证。这些不足将为后续研究提供方向。

参考文献

[1] LIANG H P, CHE W B, PENG F Y, et al. Triptolide inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating the circNOX4/miR-153-3p/SATB1 signaling pathway[J]. Thorac Cancer, 2024, 15(7): 538-549.

[2] SONG D, YE Z Q, CHEN F Y, et al. circFNDC3B promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by targeting MYO5A via miR-370-3p/miR-136-5p[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 821.

[3] TAN Z R, LUAN S J, WANG X P, et al. Mechanism study of lncRNA RMRP regulating esophageal squamous cell carcinoma through miR-580-3p/ATP13A3 axis[J]. Discov Oncol, 2024, 15(1): 150.

[4] LI J H, HSIN P Y, HSIAO Y C, et al. A narrative review: repurposing metformin as a potential therapeutic agent for oral cancer[J]. Cancers (Basel), 2024, 16(17): 3017.

[5] 李雪曼，熊飞，刘冲，等. 二甲双胍通过巨噬细胞抑制食管癌TE-1细胞的侵袭和迁移[J]. 现代肿瘤医学，2022，30(22)：4040-4046.

[6] SONG S, ZHANG Y H, DUAN X C, et al. HIF-1α/IL-8 axis in hypoxic macrophages promotes esophageal cancer progression by enhancing PD-L1 expression[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(2): 358-367.

[7] 吕学宁，杨炳银，宗君，等. 二甲双胍抑制食管癌前病变中HIF-1α和p53的表达[J]. 现代肿瘤医学，2022，30(20)：3703-3709.

[8] 王进军，梅凌，文斌，等. 雷公藤内酯醇联合HIF-1α抑制剂对人乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 中药药理与临床，2023，39(10)：59-64.

[9] 姚刘旭，滕文彬，黄素琴，等. mTOR/P70S6K/HIF-1α信号通路在脂多糖诱导Caco-2细胞屏障损伤中的作用及机制[J]. 中国病理生理杂志，2022，38(1)：122-129.

[10] 陈虹羽，宁守斌，陈晓，等. 二甲双胍调控Gas6/Axl信号通路抑制食管鳞癌细胞增殖及迁移[J]. 中国癌症防治杂志，2023，15(5)：516-524.

[11] BAN H S, KIM B K, LEE H, et al. The novel hypoxia-inducible factor-1α inhibitor IDF-11774 regulates cancer metabolism, thereby suppressing tumor growth[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2843.

[12] HE J, QIN Z S, CHEN X, et al. HIF-1α ameliorates diabetic neuropathic pain via parkin-mediated mitophagy in a mouse model[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 5274375.

[13] YUAN Q, SHI Y S, ZHANG Y H, et al. Domperidone inhibits cell proliferation via targeting MEK and CDK4 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2024, 24(1): 114.

[14] JU Q Q, SHI Q Y, LIU C, et al. Bufalin suppresses esophageal squamous cell carcinoma progression by activating the PIAS3/STAT3 signaling pathway[J]. J Thorac Dis, 2023, 15(4): 2141-2160.

[15] LIN H, AO H Y, GUO G H, et al. The role and mechanism of metformin in inflammatory diseases[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 5545-5564.

[16] SUGIMOTO Y, OKAMOTO K, SAITO H, et al. Metformin suppresses esophageal cancer progression through the radiation-induced cellular senescence of cancer-associated fibroblasts[J]. Oncol Rep, 2024, 52(4): 129.

[17] XIAO Q, XIAO J N, LIU J Q, et al. Metformin suppresses the growth of colorectal cancer by targeting INHBA to inhibit TGF-β/PI3K/AKT signaling transduction[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(3): 202.

[18] CHEN R, CHEN J H, CHEN M L, et al. Metformin suppresses proliferation and glycolysis of gastric cancer by modulating ADAMTS12[J]. Genes Environ, 2024, 46(1): 1.

[19] MAGRINO J, MUNFORD V, MARTINS D J, et al. A thermosensitive PCNA allele underlies an ataxia-telangiectasia-like disorder[J]. J Biol Chem, 2023, 299(5): 104656.

[20] TRIPATHI A K, DESAI P P, TYAGI A, et al. Short peptides based on the conserved regions of MIEN1 protein exhibit anticancer activity by targeting the MIEN1 signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2024, 300(3): 105680.

[21] SHI H M, KONG R Y, MIAO X, et al. Decreased PPP1R3G in pre-eclampsia impairs human trophoblast invasion and migration via Akt/MMP-9 signaling pathway [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2023, 248(16): 1373-1382.

[22] FENG Y, LI T J, LI Y, et al. Glutaredoxin-1 promotes lymphangioleiomyomatosis progression through inhibiting Bim-mediated apoptosis via COX2/PGE2/ERK pathway[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(7): e1333.

[23] FEI M Y, GUAN J M, XUE T, et al. Hypoxia promotes the migration and invasion of human hepatocarcinoma cells through the HIF-1α-IL-8-Akt axis[J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23: 46.

[24] 吴思，艾芬，朱聚，等. HIF-1α/IL-8/NF-κB轴介导缺氧诱导肝癌细胞迁移、侵袭的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志，2018，23(9)：780-784.

（收稿日期：2025-05-26　修回日期：2025-07-17）

（编辑：林　静）