

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.03.003

基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨二甲双胍 对结肠癌 HCT116 细胞的作用 *

朱文忠 谭路露 马田田 姚 潇 高金波[△]

(华中科技大学同济医学院附属协和医院胃肠外科 湖北 武汉 430022)

摘要 目的: 研究二甲双胍通过磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对结肠癌 HCT116 细胞的作用。**方法:** 体外培养结肠癌 HCT116 细胞,分别加入二甲双胍(20,40,80 $\mu\text{mol/L}$)处理 HCT116 细胞 48 h,另设对照组。MTT 法检测各组细胞增殖能力。Transwell 实验检测各组细胞侵袭能力的变化。Annexin-FITC/PI 双染法分别检测各组处理 48 h 后细胞凋亡情况。免疫印迹法检测 48 h 后 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白表达水平。**结果:** 相比于对照组,二甲双胍 20,40,80 $\mu\text{mol/L}$ 各处理组对 HCT116 细胞的增殖具有明显的抑制作用,且呈浓度依赖效应,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,二甲双胍 20,40,80 $\mu\text{mol/L}$ 各处理组细胞凋亡率明显较高,且呈浓度依赖效应,差异具有统计学意义($P<0.05$)。相比于对照组,二甲双胍 20,40,80 $\mu\text{mol/L}$ 各处理组 HCT116 细胞侵袭能力明显减弱,且呈浓度依赖效应,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,二甲双胍 20,40,80 $\mu\text{mol/L}$ 各处理组 Bax 蛋白表达水平明显升高,而 Bcl-2、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平明显降低,且呈浓度依赖效应,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 二甲双胍在体外可抑制人结肠癌 HCT-116 细胞的增殖,促进其凋亡,抑制其侵袭能力,其抗肿瘤机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活相关。

关键词: 二甲双胍;结肠癌;增殖;凋亡;磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

中图分类号: R-33; R735.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)03-413-05

Explore the Effect of Metformin on Colon Cancer HCT116 Cells Based on PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway*

ZHU Wen-zhong, TAN Lu-lu, MA Tian-tian, YAO Xiao, GAO Jin-bo[△]

(Department of Gastrointestinal Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430022, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of metformin on colon cancer HCT-116 cells through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt)-mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods:** Colon cancer HCT116 cells were cultured in vitro, and metformin (20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$) was added to treat HCT-116 cells for 48 hours, and a control group was set up. MTT method was used to detect the proliferation ability of cells in each group. Transwell experiment detects the changes of cell invasion ability in each group. The Annexin-FITC/PI double staining method was used to detect the apoptosis of each group at 48 hours after treatment. Western blotting was used to detect the protein expression level of PI3K/Akt/mTOR pathway after 48 hours. **Results:** Compared with the control group, the metformin 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$ treatment groups had a significant inhibitory effect on the proliferation of HCT-116 cells, and showed concentration-dependent effect, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with the control group, the apoptotic rate of the metformin 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ treatment groups were significantly higher, and showed concentration-dependent effect, with statistical significance($P<0.05$). Compared with the control group, the invasion ability of HCT116 cells in metformin 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ treatment groups was significantly decreased, and showed concentration-dependent effect, with statistical significance ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of Bax protein in metformin 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ treatment groups were significantly increased, while the expression levels of Bcl-2, p-Akt and p-mTOR protein were significantly decreased, and showed concentration-dependent effect, with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion:** Metformin can inhibit the proliferation, apoptosis and invasion of human colon cancer HCT-116 cells in vitro, and its anti-tumor mechanism may be related to the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation.

Key words: Metformin; Colon cancer; Proliferation; Apoptosis; Phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)03-413-05

* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2015CFB710)

作者简介:朱文忠(1992-),男,硕士研究生,从事肿瘤外科方向的研究,E-mail: zzlzzl20211213@163.com

[△] 通讯作者:高金波(1973-),男,博士,主任医师,从事肿瘤外科方向的研究,E-mail: 1967541007@qq.com

(收稿日期:2021-06-28 接受日期:2021-07-23)

前言

结肠癌是常见的胃肠道恶性肿瘤,是第四大肿瘤相关死亡的病因,全世界每年死亡例数达 90 万例^[1]。结肠癌早期临床症状不典型,多数患者发现时已处于中晚期,即使经放化疗等治疗后,患者的长期生存预后仍不佳^[2]。二甲双胍是 AMP 激酶(AMP kinase, AMPK)的激活剂,主要用于治疗 2 型糖尿病^[3]。具体而言,二甲双胍通过激活肝细胞中的 AMPK 信号传导抑制肝脏中的糖异生,抑制葡萄糖产生发挥降糖作用^[4]。近年来研究表明,二甲双胍在各种类型的癌症中均发挥抗肿瘤作用,例如乳腺癌^[5]、甲状腺癌^[6]和前列腺癌^[7]。有学者在结肠癌研究中发现,结肠癌中存在磷脂酰肌醇 3 激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR, mTOR)信号通路激活的现象,并且该通路具有成为结肠癌治疗靶点的潜力^[8]。此外,研究发现,二甲双胍可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活,抑制肿瘤的恶性进展^[9]。但结肠癌中二甲双胍抑制细胞增殖、阻止细胞侵袭和促细胞凋亡的机制尚未得到充分研究。本研究通过观察二甲双胍对结肠癌 HCT116 细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响,初步研究二甲双胍对结肠癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

人结肠癌 HCT116 细胞株购自北京协和细胞库。二甲双胍购自北京索莱宝科技有限公司。RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,MTT 增殖检测试剂盒购自美国 Promega 公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。兔单克隆 Bax 抗体,兔单克隆 Bcl-2 抗体,兔单克隆 p-AKT,兔单克隆 p-mTOR 抗体以及内参蛋白 β -actin 抗体均购自美国 abcam 公司。Transwell 小室购自美国康宁公司。Matrigel 胶购自美国 BD 公司。Varioskan Flash 酶标仪购自美国赛默飞世尔公司。蛋白 Marker、ECL 发光试剂、RIPA 细胞裂解液、PMSF 及 DMSO 购自北京索莱宝科技有限公司。FACS Caliber 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HCT116 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基中进行细胞培养,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱。将细胞密度达到 80%~90%且处于对数生长期的细胞进行传代,进行后续实验。

1.2.2 细胞凋亡检测 将 HCT116 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,细胞计数后调整密度为 1×10^5 /mL,将细胞接种到 6 孔板,继续培养 24 h。将细胞分为二甲双胍组和对照组,二甲双胍组根据加入药物浓度不同分为 20 μ mol/L 组、40 μ mol/L 组、80 μ mol/L 组,处理 48 h 后,0.25% 胰酶消化细胞,PBS 磷酸盐缓冲液洗涤,冲洗 3 次,离心弃上清,取 100 μ L 加入 5 μ L FITC Annexin 和 10 μ L 的 PI 置于细胞悬液中,混匀后 4℃ 下避光染色 10 min,加入 490 μ L 结合缓冲液,避光静置 1 h。上流式细胞仪检测。

1.2.3 细胞增殖能力检测 MTT 法检测不同浓度和时间二甲

双胍对 HCT116 细胞增殖能力的影响。胰酶消化 HCT116 细胞,调整细胞浓度为 1×10^4 /mL,向 96 孔板每孔加入 100 μ L 细胞悬液,37℃ 温箱孵育至细胞贴壁。根据二甲双胍加入浓度不同分为 20 μ mol/L 组、40 μ mol/L 组、80 μ mol/L 组和对照组。分别在加药 12 h、24 h、48 h 后,加入 0.5% MTT 试剂 20 μ L,温箱孵育 4 h,加入 DMSO 150 μ L 充分溶解,10 min 后测量各孔吸光度值(OD),结果取各复孔平均值。

1.2.4 细胞侵袭能力检测 Transwell 实验检测不同浓度二甲双胍对 HCT116 细胞侵袭能力影响。将基质胶与培养基以 1:8 的比例稀释,包被 Transwell 小室的上室面,37℃ 条件下静置 1 h。Transwell 下室中加 500 μ L 含有 20% 胎牛血清的培养基,上室中加 200 μ L 密度 1×10^5 /mL 的细胞悬液。细胞培养箱中培养 12 h、24 h 和 48 h 后,甲醇固定,加 0.3% 结晶紫染色 15 min,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,再用棉球擦去小室上表面细胞,显微镜下观察。随机取 5 个视野,计数细胞,结果取平均值。

1.2.5 凋亡相关蛋白以及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达检测 免疫印迹法检测凋亡相关蛋白以及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达,向细胞中加入含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液进行裂解,冰上裂解 30 min,BCA 法蛋白定量。取 50 μ g 蛋白裂解液,恒压 80V 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒流 300 mA 湿转法转膜 90 min,5% 的 BSA 室温封闭 2 h。加一抗(Bax、Bcl-2、p-AKT、p-mTOR 稀释比为 1:1000, β -actin 稀释比 1:2000)4℃ 孵育 16 h, TBST 洗膜三次,每次 5 min,二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜三次,每次 5 min,使用 ECL 显影。利用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用 F 检验,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对 HCT116 细胞增殖能力的影响

与对照组比较可见二甲双胍在 12 h、24 h 及 48 h 均能够抑制 HCT116 细胞的增殖($P < 0.05$)。浓度越高,HCT116 细胞增殖能力越弱,二甲双胍对 HCT116 细胞增殖能力的抑制具有浓度依赖性($P < 0.05$),见表 1。

2.2 二甲双胍对 HCT116 细胞凋亡的影响

不同浓度二甲双胍处理 HCT116 细胞 48 h 后,结果对照组、20 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L 组细胞凋亡率分别为(2.61% $\pm$ 0.53%)、(15.17% $\pm$ 1.19%)、(29.37% $\pm$ 1.36%)和(35.0% $\pm$ 1.67%),二甲双胍浓度越高,HCT116 细胞凋亡率越高,差异具有统计学意义($F = 11.236, P = 0.000$)。见图 1。

2.3 二甲双胍对 HCT116 细胞侵袭能力的影响

相比于对照组,20 μ mol/L 组、40 μ mol/L 组和 80 μ mol/L 组 HCT116 细胞侵袭能力明显减弱($P < 0.05$),并且二甲双胍浓度越高,HCT116 细胞侵袭能力减弱更为明显,具有浓度依赖性($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 二甲双胍对 HCT116 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的影响

不同浓度二甲双胍(20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)处理 HCT116 细胞 48 h 后, 结果 Bax 蛋白表达水平明显升高, 而 Bcl-2、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且 Bax、Bcl-2、p-Akt 及 p-mTOR 蛋白表达水平变化具有浓度依耐性($P < 0.05$)。见表 3, 图 2。

表 1 二甲双胍对 HCT116 细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$, OD)Table 1 Effect of metformin on proliferation of HCT116 cells($\bar{x} \pm s$, OD)

Groups	12h	24h	48 h
Control group	0.94 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.30
20 $\mu\text{mol/L}$	0.73 $\pm$ 0.10*	0.82 $\pm$ 0.27*	0.81 $\pm$ 0.25*
40 $\mu\text{mol/L}$	0.65 $\pm$ 0.11**	0.72 $\pm$ 0.22**	0.78 $\pm$ 0.19**
80 $\mu\text{mol/L}$	0.55 $\pm$ 0.17** ⁺	0.63 $\pm$ 0.23** ⁺	0.64 $\pm$ 0.19** ⁺

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ group, ** $P < 0.05$. Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ group, ⁺ $P < 0.05$.

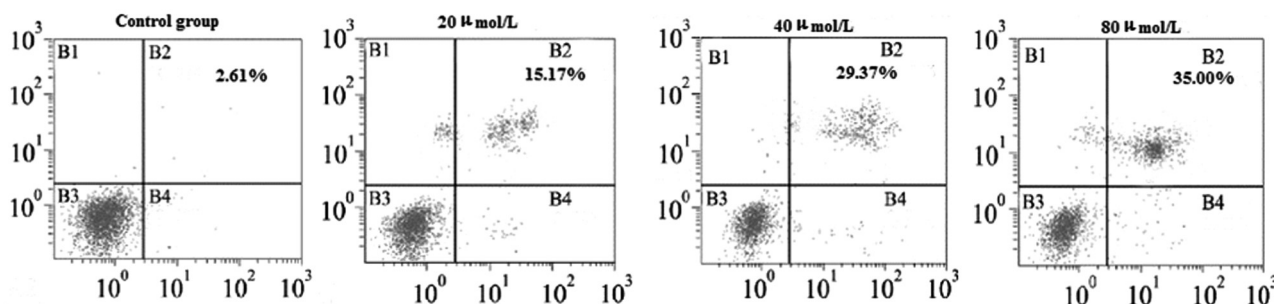


图 1 二甲双胍不同浓度对 HCT116 细胞凋亡细胞率的影响(%)

Fig.1 Effect of different concentrations of metformin on apoptosis rate of HCT116 cells(%)

表 2 二甲双胍对 HCT116 细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$, 个)Table 2 Effect of metformin on invasion ability of HCT116 cells($\bar{x} \pm s$, n)

Groups	Number of transmembrane cells		
	12 h	24 h	48 h
Control group	68.1 $\pm$ 11.05	105.11 $\pm$ 21.12	172.13 $\pm$ 20.44
20 $\mu\text{mol/L}$	51.2 $\pm$ 13.16*	78.10 $\pm$ 16.35*	112.67 $\pm$ 18.70*
40 $\mu\text{mol/L}$	34.29 $\pm$ 10.23**	69.61 $\pm$ 17.27**	86.75 $\pm$ 17.13**
80 $\mu\text{mol/L}$	15.44 $\pm$ 5.09** ⁺	32.33 $\pm$ 12.31** ⁺	40.20 $\pm$ 12.14** ⁺

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ group, ** $P < 0.05$. Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ group, ⁺ $P < 0.05$.

表 3 二甲双胍对 HCT116 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of metformin on apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related proteins of HCT116 cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	Bax	Bcl-2	p-Akt	p-mTOR
Control group	0.34 $\pm$ 0.12	2.87 $\pm$ 0.45	2.14 $\pm$ 0.25	1.21 $\pm$ 0.24
20 $\mu\text{mol/L}$	0.56 $\pm$ 0.14*	1.86 $\pm$ 0.40*	1.38 $\pm$ 0.21*	1.02 $\pm$ 0.13*
40 $\mu\text{mol/L}$	0.72 $\pm$ 0.15**	1.46 $\pm$ 0.32**	0.85 $\pm$ 0.16**	0.83 $\pm$ 0.15**
80 $\mu\text{mol/L}$	1.23 $\pm$ 0.22** ⁺	1.01 $\pm$ 0.14** ⁺	0.67 $\pm$ 0.14** ⁺	0.65 $\pm$ 0.16** ⁺

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with 20 $\mu\text{mol/L}$ group, ** $P < 0.05$. Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$ group, ⁺ $P < 0.05$.

3 讨论

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 目前结肠癌的治疗以根治手术为主, 但部分患者术后仍会出现复发或转移的现象, 最终导致患者死亡^[10,11]。化学治疗是晚期结肠癌患者的主要治疗方案, 但患者化疗过程中可出现毒副反应或耐药性的形

成, 进而影响结肠癌患者的生活质量和生存预后^[12]。因此, 寻找毒副作用小并且治疗效果良好的抗结肠癌药物是目前研究的热点。

近年来研究发现, 糖尿病能够增加癌症、心血管及肾脏疾病等疾病风险, 而二甲双胍作为治疗 2 型糖尿病的临床一线治疗药物, 除具有降低血糖的药理作用外, 还可保护肾脏、心血

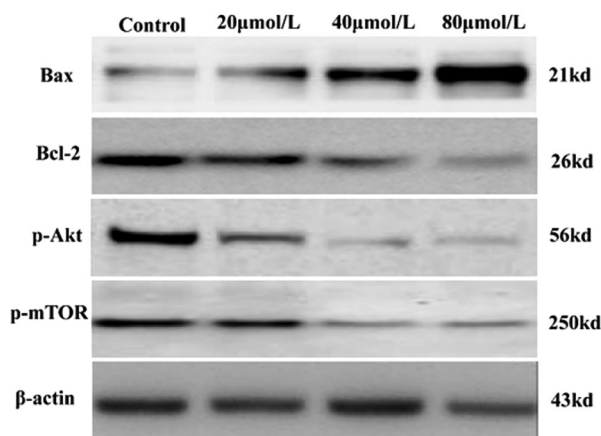


图2 HCT116 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达图

Fig.2 Expression of apoptosis related proteins Bax, Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related proteins of HCT116 cells

管,以及减少老年痴呆的发病率和死亡率^[13-15]。有学者报道,二甲双胍能够通过抑制肿瘤相关炎细胞的浸润,抑制肿瘤的恶性进展,在乳腺癌^[16]、前列腺癌^[17]等癌症中均具有广泛的抗癌能力。二甲双胍能够通过激活 AMP 依赖的蛋白激酶,诱导肿瘤细胞发生 G₀/G₁ 周期停滞、诱导肿瘤细胞凋亡,抑制癌细胞的增殖^[18]。此外,研究证实,二甲双胍能通过改变肿瘤的免疫微环境,增强肿瘤杀伤性 T 淋巴细胞的肿瘤杀伤功能,抑制肿瘤细胞增殖、迁移^[19]。尚有研究报道,二甲双胍通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路激活,减少肿瘤化疗治疗过程中的肿瘤耐药性的形成,有利于辅助化疗提高治疗效果^[20]。目前有关二甲双胍抑制结肠癌的研究报道较少,本研究探讨二甲双胍作用于 HCT116 细胞的影响及作用机制,以期为其临床应用提供一定依据。

本研究结果,20、40、80 μmol/L 二甲双胍作用于结肠癌细胞后,细胞增殖能力显著减弱,而细胞凋亡率显著升高,并且具有浓度依赖性,结果表明二甲双胍能够体外抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖,促进其凋亡,进而抑制肿瘤的进展。二甲双胍能抑制 mTOR 信号通路的信号传导,肿瘤细胞发生 G₁ 期阻滞,抑制肿瘤细胞的恶性增殖^[21]。此外,二甲双胍对肿瘤的抑制作用是通过多条信号通路共同作用的结果。细胞凋亡由促凋亡基因如 Bax 和抗凋亡基因 Bcl-2 等共同调控。目前研究发现的与肿瘤凋亡密切相关的基因包括 Bcl-2、Caspases 家族等,其中 Bcl-2 家族(Bcl-2, Bax 等)介导线粒体凋亡过程。Bax 能够通过调节细胞线粒体膜的通透性,释放细胞色素 C,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶级联反应,发挥促进肿瘤细胞凋亡的生物学作用^[22]。Bcl-2 能够降低线粒体膜的通透性,阻止细胞色素 C 的释放,抑制肿瘤细胞的凋亡^[23]。本研究中,40、80 μmol/L 二甲双胍作用于结肠癌细胞后,Bax 表达显著升高,而 Bcl-2 的表达显著降低,提示二甲双胍能够通过增加促凋亡蛋白 Bax 的表达,降低抗凋亡蛋白表达,促进细胞凋亡。

肿瘤的发生发展是一个多阶段多步骤的过程,涉及原癌基因的激活,抑癌基因的失活,同时涉及 PI3K/AKT/mTOR、丝裂原活化的蛋白激酶及 Hippo 途径等多种信号通路的过度激活,促进肿瘤的恶性进展^[24-26]。PI3K 是定位于细胞质的脂类激酶,

能够催化磷脂酰肌醇的磷酸化激活。AKT 又称蛋白激酶 B,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,磷酸化活化的 AKT 具有促进细胞增殖、抗凋亡的作用。mTOR 也是 PI3K 信号通路下游分子。PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活与结肠癌的发生发展有着密切联系。研究表明,结肠癌中存在 PI3K/Akt/mTOR 信号通路过度激活的现象,并通过抑制细胞凋亡,促进肿瘤细胞 G₂/M 期进行,促进肿瘤的恶性增殖^[27]。在体外或动物体内实验抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路后,能够有效抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤凋亡^[28]。本研究结果显示,不同浓度二甲双胍用于结肠癌 HCT116 细胞后,肿瘤细胞的侵袭能力显著减弱,并且呈浓度依赖性。既往研究表明,PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活后,能够促进下游缺氧诱导因子 1α 的表达,进而促进肿瘤细胞的侵袭和迁移^[29,30]。因此,本研究中,二甲双胍可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活,进而减弱结肠癌 HCT116 细胞的侵袭能力。

综上所述,二甲双胍能体外抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖和侵袭,诱导 HCT116 细胞凋亡,其机制可能与二甲双胍抑制 HCT116 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活有关,值得深入研究探索。

参考文献(References)

- [1] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels J, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480
- [2] 姜志超, 张雯, 周爱萍. 晚期结直肠癌三药联合方案化疗的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(4): 201-205
- [3] Min HK, Kim SH, Choi JH, et al. Impacts of statin and metformin on neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: Korean Health Insurance data[J]. World J Clin Cases, 2021, 9(33): 10198-10207
- [4] Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo [J]. Nat Med, 2018, 24(9): 1384-1394
- [5] Faria J, Negalha G, Azevedo A, et al. Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2019, 24(2): 111-123
- [6] Thakur S, Daley B, Gaskins K, et al. Metformin Targets Mitochondrial Glycerophosphate Dehydrogenase to Control Rate of Oxidative Phosphorylation and Growth of Thyroid Cancer In Vitro and In Vivo[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(16): 4030-4043
- [7] Ahn HK, Lee YH, Koo KC. Current Status and Application of Metformin for Prostate Cancer: A Comprehensive Review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8540-8551
- [8] Narayanankutty A. PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(12): 1217-1226
- [9] Wang Z, Guo J, Han X, et al. Metformin represses the pathophysiology of AAA by suppressing the activation of PI3K/AKT/mTOR/autophagy pathway in ApoE(-/-) mice[J]. Cell Biosci, 2019, 9(5): 68-77
- [10] 韩刚, 龚航军, 曹羽, 等. 腹腔镜结肠癌根治术治疗老年局部进展期结肠癌的疗效和安全性及对患者免疫功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(3): 475-478
- [11] Gunawardene A, Desmond B, Shekhou A, et al. Disease recurrence following surgery for colorectal cancer: five-year follow-up [J]. N Z Med J, 2018, 131(1469): 51-58

- [12] 肖莉, 白兆福, 刘新兰. LRP 蛋白、Twist 蛋白表达与结直肠癌化疗耐药及预后的关系[J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(6): 744-748
- [13] Kawanami D, Takashi Y, Tanabe M. Significance of Metformin Use in Diabetic Kidney Disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4239-4347
- [14] Luo F, Das A, Chen J, et al. Metformin in patients with and without diabetes: a paradigm shift in cardiovascular disease management[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1): 54-63
- [15] Mor DE, Sohrabi S, Kaletsky R, et al. Metformin rescues Parkinson's disease phenotypes caused by hyperactive mitochondria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(42): 26438-26447
- [16] De A, Kuppusamy G. Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence[J]. Curr Probl Cancer, 2020, 44(1): 100488
- [17] Liu Q, Tong D, Liu G, et al. Metformin Inhibits Prostate Cancer Progression by Targeting Tumor-Associated Inflammatory Infiltration[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(22): 5622-5634
- [18] Zhou X, Kuang Y, Liang S, et al. Metformin inhibits cell proliferation in SKM-1 cells via AMPK-mediated cell cycle arrest[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 141(4): 146-152
- [19] Amin D, Richa T, Mollaei M, et al. Metformin Effects on FOXP3(+) and CD8 (+) T Cell Infiltrates of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma[J]. Laryngoscope, 2020, 130(9): E490-E498
- [20] Samuel SM, Varghese E, Koklesová L, et al. Counteracting Chemoresistance with Metformin in Breast Cancers: Targeting Cancer Stem Cells[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(9): 2482-2491
- [21] Wang Y, Xu W, Yan Z, et al. Metformin induces autophagy and G₀/G₁ phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 63-77
- [22] Liu Z, Ding Y, Ye N, et al. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy[J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 313-341
- [23] Raghav PK, Kumar R, Kumar V, et al. Docking-based approach for identification of mutations that disrupt binding between Bcl-2 and Bax proteins: Inducing apoptosis in cancer cells [J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(11): 910-920
- [24] Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, et al. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities [J]. Trends Cancer, 2019, 5(5): 297-307
- [25] Pópilo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(2): 1886-1918
- [26] Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1102-1109
- [27] Zhang Y, Zhao Y, Guo J, et al. Anticancer activity of safranal against colon carcinoma is due to induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest mediated by suppression of mTOR/PI3K/Akt pathway [J]. J BUON, 2018, 23(3): 574-578
- [28] Zhang K, Liu W, Qu Z, et al. In vitro and in vivo human gastric cancer inhibition by Trifolirhizin is facilitated via autophagy, mitochondrial mediated programmed cell death, G₂/M phase cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway[J]. J BUON, 2019, 24(3): 1100-1105
- [29] Huang W, Ding X, Ye H, et al. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway [J]. Neuroreport, 2018, 29(18): 1578-1585
- [30] Ao R, Guan L, Wang Y, et al. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6): 4420-4434

(上接第 426 页)

- [19] 刘佳惠, 王顺."调神畅情三六九针法"治疗失眠伴焦虑状态的临床观察[J]. 黑龙江中医药, 2019, 48(2): 203-204
- [20] 何蜜. 基于"调神畅情"理论的穴位埋线疗法对轻中度血管性痴呆的临床研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2018
- [21] 马宁."调神畅情三六九"针法对 PD 伴失眠模型大鼠血清及脑组织 ccK、sP 含量影响的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2019
- [22] 皮克."调神畅情三六九"针法对 PDD 模型大鼠血清及脑组织中 NP-Y、Ghrelin 影响的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江省中医药科学院, 2019
- [23] 李春江, 於国军, 王晶, 等. 老年烧伤患者康复期抑郁评分与血清 BDNF、MIF、NPY 的相关性分析 [J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(6): 673-675
- [24] 林冬梅. 经颅磁刺激治疗对重度抑郁障碍患者血清 BDNF 和 5-HT 水平的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2016, 41(9): 1088-1091
- [25] 杨媛, 胡明, 葛红敏, 等. 伴有失眠症状的抑郁症患者神经肽 Y 和 P 物质水平的变化研究[J]. 国际精神病学杂志, 2016, 43(5): 781-783
- [26] 杨苗娟, 罗晓光. 帕金森抑郁研究现状[J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(09): 762-765
- [27] 潘清洁. 针刺对 CUMS 抑郁大鼠模型行为学及作用机制的研究 [D]. 广州中医药大学, 2016
- [28] 刘丽军, 刘思尧, 沙春河, 等. 柴胡汤对抑郁症大鼠 HPA 轴的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 133-138
- [29] 宋蕙杉, 白妍, 王顺. 针刺对帕金森抑郁模型大鼠的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(2): 349-355
- [30] 李颖, 王晴, 徐瑾业, 等. 帕金森病抑郁动物模型的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(10): 122-126