

二甲双胍通过调控 RAGE/NOXs 信号通路抑制胃癌的机制研究

金丹, 郭群依, 金剑英, 谢静静

【摘要】目的 探究二甲双胍(Met)对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭的调控机制。**方法** 胃癌细胞株 SGC7901 和 BGC823 经培养并进行 Met 干预, CCK-8 检测细胞的增殖能力, Tanswell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, RT-PCR 及 Western blot 检测上皮间质转化(EMT)标志物 E-cadherin 和 Vimentin 的表达, 以及 RAGE/NOXs 信号通路的表达。慢病毒转染构建过表达 RAGE 细胞系 SGC7901-RAGE 细胞, 建立裸鼠胃癌模型, 并行 Met 治疗, 肿瘤体积每 3 天测量 1 次, 28 d 后, 肿瘤组织称重, 并进行免疫组化染色和 Western blot 检测, 验证 Ki-67, 以及 RAGE、NOXs 的表达水平。**结果** 体外实验发现, Met 能有效抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。同时, Met 增加 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达, 降低 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达。Met 可以限制 RAGE、NOX4 的表达。体内实验证实腹腔注射 Met 能抑制过表达 RAGE 诱导的胃癌细胞过度增长, 免疫组化结果显示 Met 能降低 Ki-67 阳性率。Western blot 显示, Met 可以抑制 RAGE 和 NOX4 在肿瘤组织中的表达。**结论** Met 可以调控 RAGE/NOXs 信号通路逆转 EMT 抑制胃癌侵袭转移。

【关键词】 二甲双胍; 胃癌; 上皮间质转化; RAGE/NOXs 信号通路

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.02.003

【中图分类号】 R735.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)02-0120-05

The mechanism of metformin inhibiting gastric cancer by regulating RAGE/NOXs signaling pathway

JIN Dan, GUO Yiqun, JIN Jianying, XIE Jingjing (Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou 317000, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To explore the regulatory mechanism of metformin (Met) on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer. **Methods** Gastric cancer cell lines SGC7901 and BGC823 were cultured and subjected to Met intervention. Cell count kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation ability, tanswell assay was used to detect the cell migration and invasion ability; RT-PCR and Western blot were used to detect the expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers E-cadherin and Vimentin, and the expression of the RAGE/NOXs signaling pathway. Construction of overexpressing RAGE cell line SGC7901-RAGE by lentivirus transfection, and establish the nude mouse gastric cancer model, treat with Met. Tumor volume was measured every three days, and weighed after 28 days; immunohistochemical and western blot were used to detect the expressions of Ki-67, RAGE and NOX4. **Results** In vitro experiments, Met treatment could effectively inhibit the proliferation, migration, and invasion abilities of SGC7901 and BGC823. Meanwhile, Met could increase the mRNA and protein expression of E-cadherin, and reduce the mRNA and protein expression of Vimentin. Met could suppress the expressions of RAGE and NOX4. In vivo experiments, intraperitoneal injection of Met could inhibit the excessive growth of gastric cancer cells induced by RAGE overexpression. Immunohistochemical showed that Met could reduce the positive rate of Ki-67. Western blot showed Met could inhibit the expressions of RAGE and NOX4 in tumor tissue. **Conclusions** Met inhibited gastric cancer migration, invasion and reverse EMT by regulating the RAGE/NOXs signaling pathway.

【Key words】 Metformin; Gastric carcinoma; Epithelial-mesenchymal transition; RAGE/NOXs signaling pathway

[Modern Practical Medicine, 2025, 37(2): 120-124]

基金项目: 台州市科技计划项目(21ywa19)

作者单位: 317000 浙江省台州, 浙江省台州医院

通信作者: 谢静静, Email: xiejingj@enzemed.com

胃癌是全球第五大常见恶性肿瘤, 死亡率位居第三^[1]。超过 60% 的患者确诊时已为中晚期, 预后较差^[2]。因此, 有效降低胃癌的转移率已成为临床亟待解决的关键问题。二甲双胍(metformin, Met)是广

泛用于治疗 2 型糖尿病的药物,近年来其抗肿瘤潜力逐渐被发现^[4-5]。研究显示 Met 可显著延长胃癌患者的中位总生存期和无病生存期^[7]。然而, Met 在胃癌中的具体抗癌机制仍未完全明确。晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 是癌症的重要分子靶点之一, RAGE 高表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移及远处转移相关,是胃癌患者预后评估的重要指标^[8]。RAGE 与其配体结合后激活的 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 可减少癌细胞凋亡,促进癌细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 恶性转化^[9]。因此,本研究通过体内外实验探究 Met 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及对 EMT 的影响,为胃癌的临床治疗提供理论依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 胃癌细胞株 SGC7901 和 BGC823 购于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), BALB/c 裸鼠 (4 ~ 6 周龄, 雌性) 由宁波大学试验动物中心提供, RPMI1640 培养基、新生牛血清、Trizol 试剂和 Lipofectamine 3000 购于美国 Invitrogen 公司, pLVX、pLVX-RAGE 质粒购于上海吉玛制药技术有限公司, CCK-8 试剂盒购于 Sigma-Aldrich 公司, 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂和细胞裂解液购于北京全式金生物技术有限公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体购于 Bioworld 公司, anti-RAGE、anti-E-cadherin、anti-Vimentin、anti-NOX4 购于美国 Santa Cruz 公司, 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜和增强化学发光 (ECL) 试剂盒购于美国 Millipore 公司, 逆转录试剂盒、凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司, 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo 公司。HERA cell 240 CO₂ 细胞培养箱购于德国 Heraeus 公司, Meddel680 酶标仪、Western blot 转膜系统购于美国 BIO-RAD 公司, Mastercycler pro 梯度 PCR 仪购于美国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 细胞复苏后, 采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基 (含 2 mmol/L L-谷氨酰胺) 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞每 2 ~ 3 天传

代 1 次, 当细胞融合度达到 90% 时, 将其分为空白对照组 (未经任何处理)、1 mmol/L 组 (1 mmol/L Met 处理)、5 mmol/L 组 (5 mmol/L Met 处理)、10 mmol/L 组 (10 mmol/L Met 处理)、pLVX 组 (pLVX 处理)、pLVX-RAGE 组 (pLVX-RAGE 处理)、pLVX-RAGE+Met 组 (pLVX-RAGE+10 mmol/L Met 处理)。

1.2.2 CCK-8 实验 将各组细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10^3 个细胞, 每孔加入 200 μ l 细胞悬液, 每组设 3 个复孔。培养 72 h 后, 在每孔细胞内加入 10 μ l CCK-8 反应液, 继续在培养箱中孵育 1 h。孵育结束后, 在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度值, 以评估细胞增殖情况。

1.2.3 Transwell 实验

1.2.3.1 迁移实验 将各组细胞接种于培养板上, 当细胞达到适合实验的状态后, 用 0.25% 的 Trypsin-EDTA 消化细胞, 并用无血清培养基重悬。将细胞悬液 (适宜浓度) 接种至 Transwell 小室的上室中, 下室加入含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。细胞通过变形运动穿过带有聚碳酸酯膜的小孔进入下室。经过规定的培养时间后, 取出 Transwell 小室, 用结晶紫染色穿膜的细胞。染色后在显微镜下观察, 并计数聚碳酸酯膜下层的细胞数, 以评估细胞迁移能力。

1.2.3.2 侵袭实验 首先将 Transwell 小室中的聚碳酸酯膜预处理为 Matrigel 胶 (模拟细胞外基质), 然后将细胞浓度调整为 1×10^6 /ml, 并将细胞悬液接种于 Transwell 上室中, 下室中加入 600 μ l 含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。细胞在培养箱中培养 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 滤膜经过 4% 的多聚甲醛固定后, 用结晶紫染色。染色后, 在显微镜下观察并计数穿过 Matrigel 和聚碳酸酯膜进入下室的细胞数, 以评估细胞侵袭能力。

1.2.4 Western blot 实验 首先, 将各组细胞用适量的 RIPA 裂解液 (含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 充分裂解, 裂解后在冰上孵育 30 min。接着, 将裂解液在 12 000 r/min 下离心 10 ~ 15 min, 收集上清液作为蛋白样品。为了确保后续实验中各样品之间的蛋白量一致, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测量。取等量蛋白样品用 10% 的 SDS-PAGE 进行分离, 并转移到 PVDF 膜上。5% BSA-PBST 室温封闭 1 h 后, 与一抗 (anti-RAGE、anti-E-

cadherin、anti-Vimentin、anti-NOX4, 抗体稀释比例为 1 : 1 000) 在 4 °C 孵育过夜。使用 GAPDH 作为内参。PBST 溶液洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后用 HRP 标记的二抗孵育膜 1 h。最后, 采用化学发光法显影。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 细胞总 RNA 使用 Trizol 试剂提取, 经过 DNase 处理以去除基因组 DNA 污染后, 按逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成。引物序列从 Gene Bank 查阅并使用 Primer Express 2.0 软件设计, 所有引物由上海基康生物工程公司合成。实时定量 PCR 体系包括 cDNA 模板、SYBR Green I 染料、上下游引物和无核酸酶水, 总反应体系为 20 μl。PCR 反应条件为 94 °C 变性 2 min, 94 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环, 溶解曲线用于验证扩增产物特异性。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 使用 2^{-ΔΔCT} 方法对 RAGE、NOX4、E-cadherin 和 Vimentin 的相对表达量进行定量分析, 引物序列见表 1。

1.2.6 胃癌裸鼠动物实验 BALB/c 裸鼠适应性饲养 1 周, 饲养环境为标准的无菌条件, 温度控制在 22 ~ 24 °C, 湿度为 50% ~ 60%, 并给予无菌水和标准饲料。实验过程遵循《实验动物福利和伦理指南》, 所有动物实验程序台州恩泽医疗中心(集团)实验动物中心动物实验伦理委员会审核并批准(批准编号: tzy-2021178)。

采用过表达 RAGE 的 SGC7901-RAGE 细胞系 (5×10⁶ 细胞) 构建胃癌皮下移植瘤模型, 待模型成功构建后, 将裸鼠随机分为 Met 治疗组和对照组, 各 5 只。Met 治疗组通过腹腔注射给予 Met (250 mg • kg⁻¹ • d⁻¹), 持续给药 2 周; 对照组给予等量的 0.9% 氯化钠注射液。实验结束时, 切除裸鼠的肿瘤组织, 用

4% 的多聚甲醛固定 24 h。固定后的组织进行石蜡包埋, 随后切片并进行 HE 染色检测增殖标志物 Ki-67 的表达, Western blot 检测对 RAGE/NOXs 信号通路相关蛋白的表达。

1.3 统计方法 使用 GraphPad Software 软件进行统计分析, 计量数据以均值±标准差表示, 多组比较采用方差分析, 组间比较采用 Student's *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Met 对胃癌细胞增殖、侵袭转移的影响 随着 Met 浓度的增加两种细胞系的增殖能力显著降低, 且呈剂量依赖性, 特别是 5 和 10 mmol/L 浓度下, Met 对细胞增殖的抑制效果最为显著, 见图 1A。基于此, 选用 10 mmol/L 的 Met 进行 Transwell 实验。10 mmol/L 组细胞的迁移和侵袭能力低于空白对照组(均 *P* < 0.05), 见图 1B ~ C。

2.2 Met 对胃癌细胞的 EMT 的影响 随着 Met 浓度的增加, E-cadherin 的 mRNA 和蛋白水平显著升高, Vimentin 的 mRNA 和蛋白水平显著下降(均 *P* < 0.05), 见图 2。

2.3 Met 对胃癌细胞中 RAGE、NOXs 的影响 随着 Met 浓度的增加, RAGE 和 NOX4 的 mRNA 和蛋白水平显著下降(*P* < 0.05), 见图 3。

2.4 Met 对 RAGE 过表达胃癌细胞增殖、侵袭、转移能力和 EMT 的影响 pLVX-RAGE 组细胞中 RAGE mRNA 水平高于 pLVX 组(*P* < 0.05), 见图 1A。pLVX-RAGE 组细胞增殖、迁移和侵袭能力高于 pLVX 组(均 *P* < 0.05); pLVX-RAGE+Met 组细胞增殖、迁移和侵袭能力低于 pLVX-RAGE 组(均 *P* < 0.05), 见图 1B ~ D。pLVX-RAGE 组 E-cadherin 水平低于 pLVX 组, Vimentin 水平高于 pLVX 组(均 *P* < 0.05); pLVX-RAGE+Met 组 E-cadherin 水平高于 pLVX-RAGE 组, 而 Vimentin 水平低于 pLVX-RAGE 组(均 *P* < 0.05), 见图 1E。

2.5 胃癌裸鼠动物情况 Met 组裸鼠治疗 28 d 后, 肿瘤体积和质量明显低于对照组(均 *P* < 0.05), 见图 2A ~ B。Met 组 Ki-67 阳性率显著升低于对照组, 见图 2C ~ D。Met 组 RAGE 和 NOX4 的表达低于对照组, 见图 2E。

表 1 Real-time PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5' → 3')
RAGE	F: ACAGAAACCGGTGATGAAGGA R: TGTCGTTTTTCGCCACAGGAT
NOX4	F: CCAAGCAGGAGAACCAGGAGATT R: AGAAGTTGAGGGCATTACCAGAT
E-cadherin	F: CACCACGTACAAGGGTCAGGT R: CAGCTGTGAGGATGCCAGTT
Vimentin	F: AAATGGCTCGTCACCTTCGT R: AGAAATCCTGCTCTCCTCGC
GAPDH	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R: TGGTGAAGACGCCAGTGA

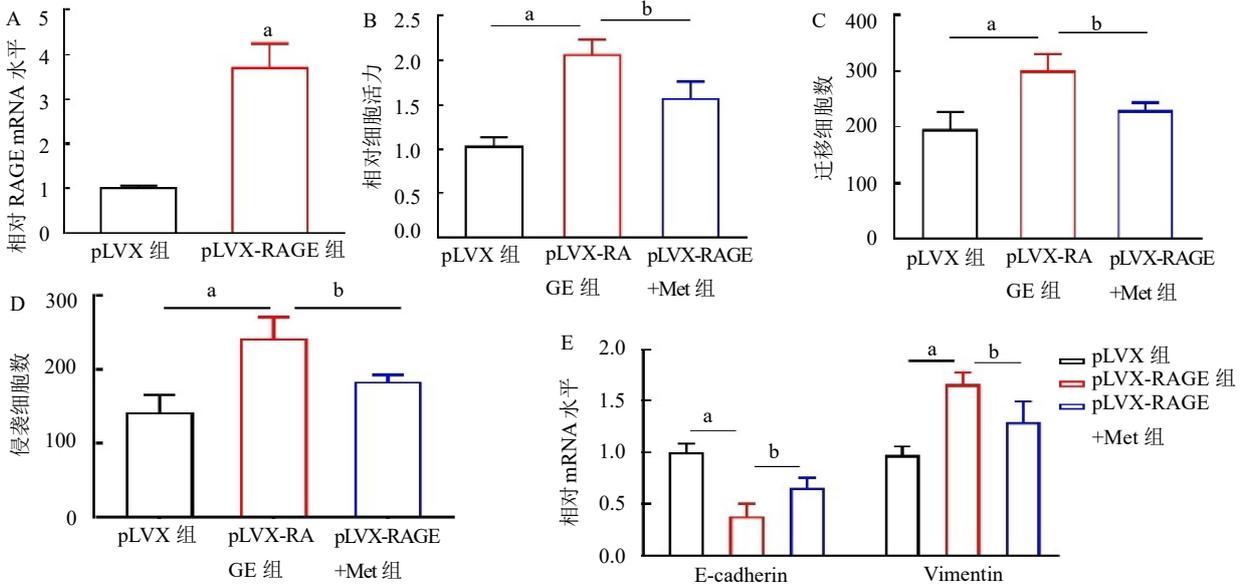
3 讨论

胃癌是我国肿瘤发病率较高的肿瘤之一，50%的胃癌患者5年生存率低于35%，晚期胃癌患者5年生存率仅10%~20%^[10]。癌细胞发生侵袭转移是导致肿瘤患者治疗失败的重要原因之一；因此，探讨胃癌的侵袭转移机制是临床研究的热点。

Met最初作为治疗2型糖尿病的药物，近年来越来越多的研究表明它在多种癌症中具有抑制肿瘤

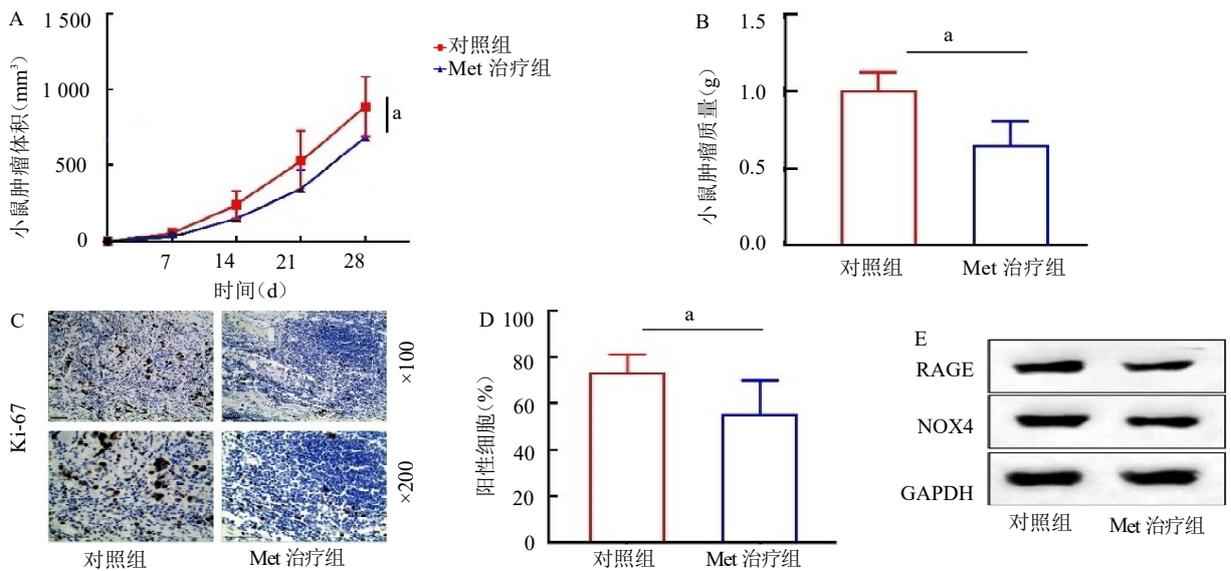
的潜在作用。流行病学研究表明，Met在糖尿病患者中的使用与癌症发病率降低相关，尤其是在胃癌患者中，Met显著延长了患者的生存期^[11]。体内体外实验表明，Met处理能够抑制胃癌细胞增殖、代谢、诱导细胞自噬，同时抑制IL-6诱导的胃癌细胞EMT的作用^[12-13]。本研究结果显示，Met通过抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力，并逆转EMT过程。

RAGE是一种多配体跨膜信号转导受体，能够



注：A为逆转录-聚合酶链反应检测RAGE的转染效率；B为CCK-8检测Met对SGC7901-RAGE细胞活力的影响；C、D为Transwell检测细胞迁移和侵袭能力；E为RT-PCR检测E-cadherin、Vimentin的mRNA水平。与pLVX组相比， $aP < 0.05$ ；与pLVX-RAGE组相比， $bP < 0.05$

图1 二甲双胍对RAGE过表达胃癌细胞增殖、迁移及侵袭能力和E-cadherin、Vimentin mRNA水平比较



注：A为肿瘤生长曲线；B为瘤体质量；C为免疫组化检测细胞增殖标志物Ki-67的表达($\times 100$ 、 $\times 200$)；D为Ki-67阳性细胞的百分比；E为Western blot检测信号通路蛋白的表达，GAPDH作内参。与对照组相比， $aP < 0.05$

图2 Met抑制胃癌体内生长

与多种配体结合,包括 β 淀粉样蛋白(A β)、晚期糖基化终末产物(AGEs)、两性素/高迁移族蛋白 B1(HMGB1)及 S100/钙粒蛋白等。这些相互作用参与了多种生理和病理过程,例如炎症反应、细胞侵袭及迁移^[14]。研究表明,RAGE 与其配体结合后,可激活 NOX,引发细胞内活性氧(ROS)水平升高,进而激活多条细胞内信号传导通路,促进肿瘤细胞的增殖、浸润和 EMT 转移^[8]。在多种恶性肿瘤中,包括乳腺癌^[15]、结直肠癌^[16]、前列腺癌^[17]和肝癌^[18],RAGE 的表达水平显著升高。Wang 等^[19]研究证实,RAGE 在胃癌组织中的高表达与患者的不良预后密切相关。此外,RAGE 还能够调控晶状体上皮细胞和胃上皮细胞的 EMT 过程^[20-21]。RAGE 通过 PI3K/Akt 和 KRAS/RAF-1 信号通路,调控非小细胞肺癌细胞的增殖、转移及 EMT 过程。本研究结果显示,Met 能够显著抑制 RAGE 及其下游的 NOX4 表达,且过表达 RAGE 能够逆转 Met 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 的抑制作用。因此,Met 可能通过调控 RAGE/NOXs 信号通路来抑制胃癌的生长和转移。本研究体内动物实验也证实了 Met 可抑制胃癌细胞的生长和 Ki-67 表达。

综上所述, Met 可以调控 RAGE/NOXs 信号通路逆转 EMT 抑制胃癌侵袭转移。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 金丹:实验操作、论文撰写;金丹、谢静静:数据整理、统计学分析;郭群依、金剑英:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. *Tumour Biology*, 2017, 39(7): 1010428317714626.
- 田园园.浅析胃癌的发病率与患者年龄的关系[J].*当代医药论丛*, 2015,13(7):207-208.
- ZHANG J, WEN L P, ZHOU Q, et al. Preventative and therapeutic effects of metformin in gastric cancer: A new contribution of an old friend[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 8545-8554.
- SUI Q H, HU Z Y, LIANG J Q, et al. Targeting TAM-secreted S100A9 effectively enhances the tumor-suppressive effect of metformin in treating lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2024, 581: 216497.
- PERNICOVA I, KORBONITS M. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(3): 143-156.
- 陈晓,林翎,陈吉祥.二甲双胍对胃癌合并 2 型糖尿病患者预后影响的 Meta 分析[J].*现代肿瘤医学*,2022,30(19):3534-3538.
- JING R, CUI M, WANG J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) soluble form (sRAGE): A new biomarker for lung cancer[J]. *Neoplasma*, 2010, 57(1): 55-61.
- LI J Z, BAKER J R, AGLAGO E K, et al. Pre-diagnostic plasma advanced glycation end-products and soluble receptor for advanced glycation end-products and mortality in colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2024, 155(11): 1982-1995.
- KAMANGAR F, DORES G M, ANDERSON W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14): 2137-2150.
- TSENG H H, CHEN Y Z, CHOU N H, et al. Metformin inhibits gastric cancer cell proliferation by regulation of a novel Loc100506691-CHAC1 axis[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2021, 22: 180-194.
- 熊芬,王德强,李小琴.二甲双胍抗胃癌机制的研究进展[J].*中国肿瘤外科杂志*,2023,15(4):413-416.
- 迪利亚尔·阿地力,张文斌.二甲双胍在糖尿病患者胃癌治疗中的研究进展[J].*世界最新医学信息文摘*,2023,23(14):1-4.
- TESAROVA P, CABINAKOVA M, MIKULOVA V, et al. RAGE and its ligands in cancer - culprits, biomarkers, or therapeutic targets [J]? *Neoplasma*, 2015, 62(3): 353-364.
- NASSER M W, AHMAD WANI N, AHIRWAR D K, et al. RAGE mediates S100A7-induced breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(6): 974-985.
- DAHLMANN M, OKHRIMENKO A, MARCINKOWSKI P, et al. RAGE mediates S100A4-induced cell motility via MAPK/ERK and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 3220-3233.
- ZHAO C B, BAO J M, LU Y J, et al. Co-expression of RAGE and HMGB1 is associated with cancer progression and poor patient outcome of prostate cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(4): 369-377.
- CHEN R C, YI P P, ZHOU R R, et al. The role of HMGB1-RAGE axis in migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 390(1/2): 271-280.
- WANG D, LI T T, YE G T, et al. Overexpression of the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) is associated with poor prognosis in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122697.
- RAGHAVAN C T, NAGARAJ R H. Erratum to: AGE-RAGE interaction in the TGF β 2-mediated epithelial to mesenchymal transition of human lens epithelial cells[J]. *Glycoconj J*, 2016, 33(5): 837-838.
- ZHAO J H, GENG L L, DUAN G Y, et al. REC8 inhibits EMT by downregulating EGR1 in gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4): 1583-1590.

收稿日期:2024-10-17
(本文编辑:孙海儿)