二甲双胍通过TGF-β1/Smads通路抑制肝癌细胞的增殖和迁移

陈胜松[1*]，李欢欢[1]，吴惠蓉[2]

（1. 成都京东方医院肿瘤科，成都 610200；2. 成都市武侯区第三人民医院肿瘤科，成都 610200）

摘　要：为探究二甲双胍对人肝癌细胞的增殖、迁移及TGF-β1/Smads信号通路的调控作用，体外培养人肝癌MHCC97H细胞，分为对照组（不做干预）、1.25、2.50、5.00 mmol/L二甲双胍组和抑制剂组（5.00 mmol/L二甲双胍+10 μmol/L LY2109761）。本研究中5.00 mmol/L二甲双胍组细胞活力接近50%，故选其为最佳浓度。用细胞计数试剂盒-8（CCK-8）、5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷（EdU）、Transwell小室、实时荧光定量PCR（RT-qPCR）及蛋白免疫印迹法对人肝癌MHCC97H细胞的增殖活力、增殖率、迁移能力及相关因子的表达水平进行分析。与对照组相比，2.50、5.00 mmol/L二甲双胍组和抑制剂组细胞的增殖活力、增殖率减少（$P<0.05$）。1.25、2.50、5.00 mmol/L二甲双胍组和抑制剂组细胞的迁移数、TGF-β1和p-Smad3蛋白的表达水平、N-钙黏蛋白（N-cadherin）、波形蛋白（vimentin）及纤维黏连蛋白（FN）的mRNA与蛋白质的表达水平较对照组减少，而p-Smad7蛋白的表达水平、E-钙黏蛋白（E-cadherin）的mRNA与蛋白质的表达水平显著增加，且浓度越高变化越显著（$P<0.05$）；与5.00 mmol/L二甲双胍组相比，抑制剂组抑制剂的加入使各指标变化更显著（$P<0.05$）。二甲双胍可抑制人肝癌MHCC97H细胞的增殖、迁移和上皮间质转化（EMT）依赖于对TGF-β1/Smads通路的抑制作用，这为肝癌的研究提供了参考依据。

关键词：肝癌；二甲双胍；转化生长因子-β1/Smads信号通路；细胞增殖；细胞迁移

中图分类号：R735.7　　**文献标志码：**A　　**DOI：**10.3969/j.issn.1007-7146.2024.04.008

Metformin Inhibits Proliferation and Migration of Liver Cancer Cells Through TGF-β1/Smads Pathway

CHEN Shengsong[1*], *LI Huanhuan*[1], *WU Huirong*[2]

(1. Department of Oncology, Chengdu BOE Hospital, Chengdu 610200, China; 2. Department of Oncology, Wuhou District Third People's Hospital, Chengdu 610200, China)

Abstract: In order to explore the regulatory effects of metformin on the proliferation, migration and TGF-β1/Smads signaling pathway of human liver cancer cells, human liver cancer MHCC97H cells were cultured *in vitro*. They were divided into control group (no intervention), 1.25, 2.50, 5.00 mmol/L metformin group and inhibitor group (5.00 mmol/L metformin +10 μmol/L LY2109761). In this study, the cell viability of 5.00 mmol/L metformin group was close to 50%, hence 5.00 mmol/L metformin was selected as the optimal concentration. Cell counting kit-8 (CCK-8) , 5-acetylidene-2′deoxyuracil riboside (EdU), Transwell chamber, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to analyze the proliferation activity, proliferation rate, migration ability and expression levels of related factors of human hepatocellular carcinoma MHCC97H cells. Compared with the control group, the proliferation activity and proliferation rate of 2.50 and 5.00 mmol/L metformin groups and inhibitor groups decreased ($P<0.05$). The cell migration number, TGF-β1 and p-Smad3 protein expression levels, N-cadherin, vimentin and fibronectin (FN) mRNA and protein expression levels of 1.25, 2.50 and 5.00 mmol/L metformin groups and inhibitor group decreased compared with the control group. The expression level of p-Smad7 protein, E-cadherin mRNA

收稿日期：2023-08-23；**修回日期：**2023-09-27。

*** 通信作者：**陈胜松，副主任医师，主要从事腹部肿瘤相关疾病的研究。E-mail: qlscss@163.com。

and protein significantly increased, and the changes were more significant with the increase of concentration ($P<0.05$). Compared with 5.00 mmol/L metformin group, the addition of inhibitors in the inhibitor group made the changes of all indexes more significant ($P<0.05$). The inhibition of metformin on the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of MHCC97H cells of human liver cancer depends on the inhibition of TGF-β1/Smads pathway, which provides a reference for the study of liver cancer.

Key words: liver cancer; metformin; TGF-β1/Smads signaling pathway; cell proliferation; cell migration

（*Acta Laser Biology Sinica*, 2024, 33(4): 357-364）

肝癌（liver cancer）属于临床常见危害性较大的恶性肿瘤之一，在全球范围内的癌症中死亡率和复发率位居前列。根据全球癌症统计数据显示，每年大约有 750 000 人死于肝癌，且该病具有发展速度快、恶性程度高的特点[1]。临床上通常采用手术切除治疗肝癌，辅助以放化疗，但由于肝癌病发具有隐匿性，通常发现时就已为中晚期，大多数患者失去了最佳的手术治疗的机会，且由于进行放化疗对患者的机体具有相对较大的毒副作用，因此，找寻更具疗效且相对安全的药物对于临床肝癌的治疗意义重大。临床治疗 2 型糖尿病时，二甲双胍（metformin）是较常用的一类药物。近年来的研究显示，二甲双胍对乳腺癌、肝癌等肿瘤的生长和转移具有一定的抑制作用[2-3]，但二甲双胍与肝癌之间的作用需要探索。TGF-β1/Smads 是一种重要的胞内通路，可以参与调控多种细胞的生长、凋亡、侵袭等过程，有研究显示，TGF-β1 对肿瘤细胞发生上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）有一定的诱导作用，TGF-β1 在肝癌组织中高表达，可被用于判断肝癌的恶性程度及预后[4-5]。但目前二甲双胍与 TGF-β1/Smads 信号通路的关系在肝癌中尚不明确，因此，本试验基于此方向进行研究，旨在为肝癌的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人肝癌 MHCC97H 细胞购自上海中科院细胞库。二甲双胍（纯度≥98%）、TGF-β1/Smads 通路抑制剂 LY2109761（纯度≥99%）购自源叶 / 上海；蛋白裂解液、细胞计数试剂盒 -8（Cell count kit -8, CCK-8）购自南京诺唯赞公司；5- 乙炔基 -2′脱氧尿嘧啶核苷（5-acetylidene-2′deoxyuracil nucleoside, EdU）试剂盒购自上海 Beyotime 公司；一抗包括 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、p-Smad7、纤维黏连蛋白（fibronectin, FN）、波形蛋白（vimentin）、N- 钙黏蛋白（N-cadherin）、E- 钙黏蛋白（E-cadherin）及 β-actin，均购自英国 Abcam 公司；碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）标记的二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。完全培养基为 10% 胎牛血清 + 改良 Eagle 培养基（Dulbecco’s modified Eagle medium, DMEM）。仪器包括 BB150 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司）、DM2000 光学显微镜（德国徕卡公司）、DM IL LED 荧光显微镜（德国徕卡公司）、GelDoc2000 型凝胶成像系统（美国 Backman 公司）、SpectraMax Mini 多功能酶标仪（上海闪谱生物科技有限公司）等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

在培养基（含 10% 胎牛血清、100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 DMEM 完全培养基）中接种 MHCC97H 细胞，条件设置为 37℃、5% CO_2，传代（密度达到 80%）后用于试验研究。

1.2.2 分组及给药

将 MHCC97H 细胞分为 5 组：对照组、1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组、抑制剂组。对照组细胞不作干预，1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组分别加入 1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍进行处理。根据细胞活力试验得到 5.00 mmol/L 二甲双胍为最佳浓度，故抑制剂组细胞加入 5.00 mmol/L 二甲双胍和 10 μmol/L LY2109761 进行处理，各组（重复 3 次）分别干预 24 h。

1.2.3 细胞的增殖活力的测定

将细胞于 96 孔板上进行接种（细胞密度为 1×10^4 个 / 孔）后，加药进行培养（24 h），再加入 CCK-8 溶液（10 μL）反应完成（2 h）后，测各孔在 450 nm 处的吸光度（optical density, *OD*）值并进行计算。细胞活力为 $OD_{\text{对照组/1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组/抑制剂组}}$ 与 $OD_{\text{对照组}}$ 的百分比。

1.2.4　细胞的增殖率的测定

各组在处理 24 h 后, 利用 EdU 对细胞孵育 2 h, 依次进行如下步骤: 固定 30 min (4% 多聚甲醛), 透化 10 min (0.3% TritonX-100), 避光孵育 30 min (100 μL Click 反应液); 再利用 Hoechst 对细胞进行复染, 装片后, 进行图片的采集, 利用 Image J 软件对细胞数进行分析。红色占蓝色细胞数的百分比为细胞增殖率。

1.2.5　细胞的迁移能力的测定

各组药物干预后用胰蛋白酶进行消化并离心, 重悬细胞, 对细胞悬液浓度进行调整 (4.5×10^5 个/mL)。Transwell 上室加细胞悬液 200 μL, 下室加含 10% 胎牛血清的细胞培养液 500 μL。在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 采用甲醇对小室进行 15 min 固定, 染色 (1% 结晶紫染色液) 20 min。光学显微镜下观察拍照, Image J 分析迁移细胞数。

1.2.6　细胞中 EMT 相关因子 mRNA 相对表达量的测定

提取各组的细胞总 RNA, 利用超微量分光光度计法检测浓度、纯度, 逆转录试剂盒逆转得到的第一链 DNA 通过 PCR 仪进行片段扩增, 内参为甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (*GAPDH*), 使用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算目的 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1　引物序列
Tab. 1　Primer sequence

Gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5′-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3′
	R: 5′-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3′
E-cadherin	F: 5′-CGAGAGCTACACGTTCACGG-3′
	R: 5′-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3′
Vimentin	F: 5′-GCGTGACGTACGTCAGCAATATGA-3′
	R: 5′-GTTCCAGGGACTCATTGGTTCCTT-3′
N-cadherin	F: 5′-AGAGGAAGACCAGGACTATGACTTGAG-3′
	R: 5′-TACTGTGGCTCAGCGTGGATAGG-3′
FN	F: 5′-TGGAGGAAGCCGAGGTTT-3′
	R: 5′-CAGCGGTTTGCGATGGTA-3′

1.2.7　细胞中 EMT 和 TGF-β1/Smads 通路相关蛋白表达的测定

干预后提取蛋白, 定量并上样, 进行凝胶电泳, 转膜, 利用脱脂牛奶法进行膜封闭, 接着加入抗 TGF-β1、Smad3、p-Smad3、p-Smad7、FN、vimentin、N-cadherin、E-cadherin 及 β-actin 的抗体稀释液, 4℃ 孵育过夜; 随后使用二抗稀释液, 室温孵育 2 h; 最后加入碱性磷酸酯酶染色工作液, 室温避光孵育 30 min 或更长时间, 最后在凝胶成像系统中进行图片采集。蛋白灰度值的分析方法为 Image J 软件, 目的蛋白表达值用目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值的比值来表示。

1.3　统计学分析

利用 GraphPad Prism 9 软件作图, 利用 Image J 软件分析计算蛋白灰度值, 所有数据均符合正态分布。数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间利用单因素方差分析, 两组间采用 Dunnett's *t* 检验。$P<0.05$ 为差异性有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　细胞增殖活力的比较

2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组细胞增殖活力低于对照组 ($P<0.05$)。抑制剂组细胞的增殖活力低于 5.00 mmol/L 二甲双胍组 ($P<0.05$) (图 1)。

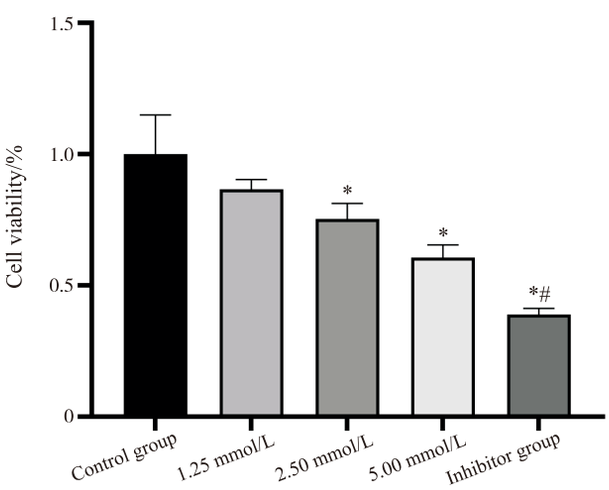

图 1　各组细胞的增殖活力比较
Fig. 1　Comparison of proliferation activity of cells in each group
与对照组相比, $^*P<0.05$; 与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比, $^\#P<0.05$。
Compared with control group, $^*P<0.05$; compared with 5.00 mmol/L metformin group, $^\#P<0.05$.

2.2　细胞增殖率的比较

2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组细胞增殖率低于对照组 ($P<0.05$); 抑制剂组细胞的增殖率则低于 5.00 mmol/L 二甲双胍组 ($P<0.05$) (图 2)。

2.3 细胞迁移能力的的对比

1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组和抑制剂组的迁移数低于对照组（$P<0.05$）；抑制剂组的迁移数低于 5.00 mmol/L 二甲双胍组（$P<0.05$）（图 3）。

2.4 细胞中 EMT 相关因子表达水平的比较

由图 4 可见，各处理组 N-cadherin、vimentin 和 FN 的 mRNA 和蛋白质的表达水平均低于对照组，E-cadherin 的 mRNA 和蛋白质的表达水平高于对照

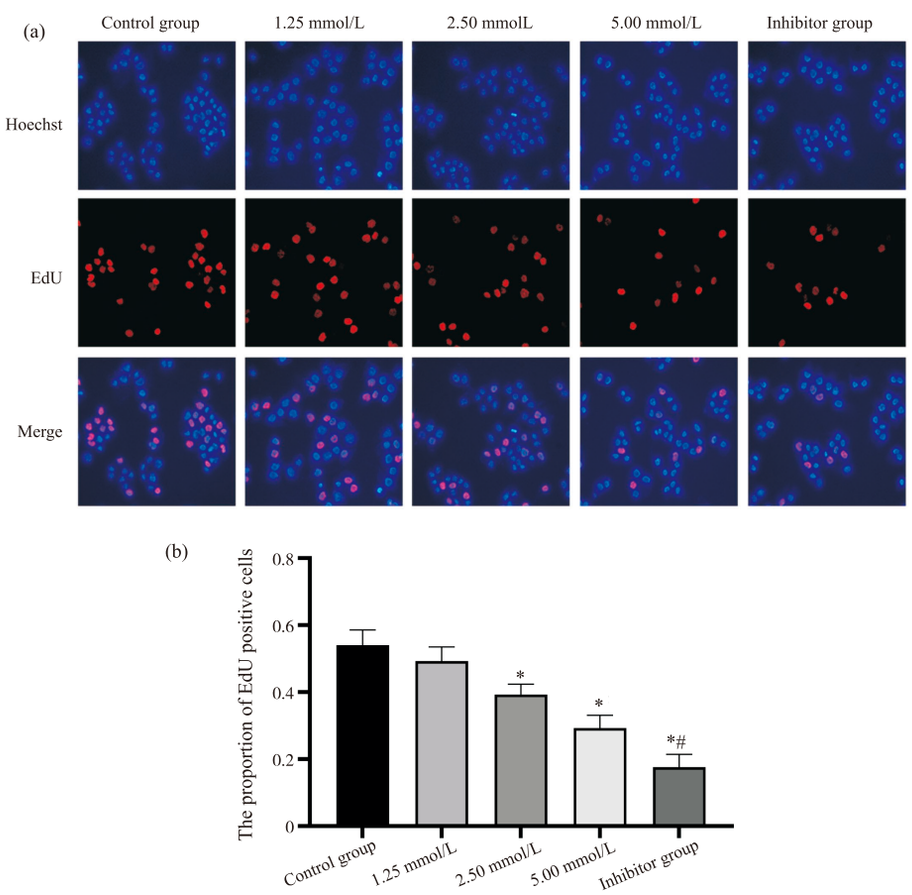

图 2 各组细胞的增殖率比较

Fig. 2 Comparison of the proliferation rate of cells in each group

（a）EdU 增殖图片（20 ×）；（b）细胞增殖率。与对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比，$^{\#}P<0.05$。

(a) EdU multiplication picture (20 ×); (b) Cell proliferation rate. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with 5.00 mmol/L metformin group, $^{\#}P<0.05$.

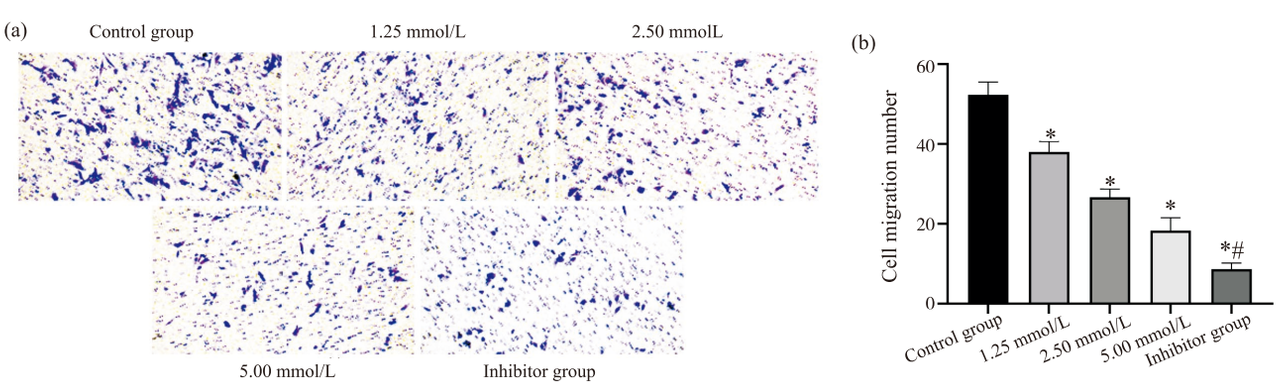

图 3 各组细胞中的迁移情况

Fig. 3 Migration in cells in each group

（a）24 h 迁移观察（20 ×）；（b）迁移的定量分析。与对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比，$^{\#}P<0.05$。

(a) 24-hour migration observation (20 ×); (b) Quantitative analysis of migration. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with 5.00 mmol/L metformin group, $^{\#}P<0.05$.

组（$P<0.05$）。抑制剂组 N-cadherin、Vimentin 和 FN 的 mRNA 和蛋白质的表达水平低于 5.00 mmol/L 二甲双胍组，E-cadherin 的 mRNA 和蛋白质的表达水平高于 5.00 mmol/L 二甲双胍组（$P<0.05$）。

2.5　细胞中 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白表达水平的比较

由图 5 可知：1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组和抑制剂组 TGF-β1 和 p-Smad3 蛋白的表达水平

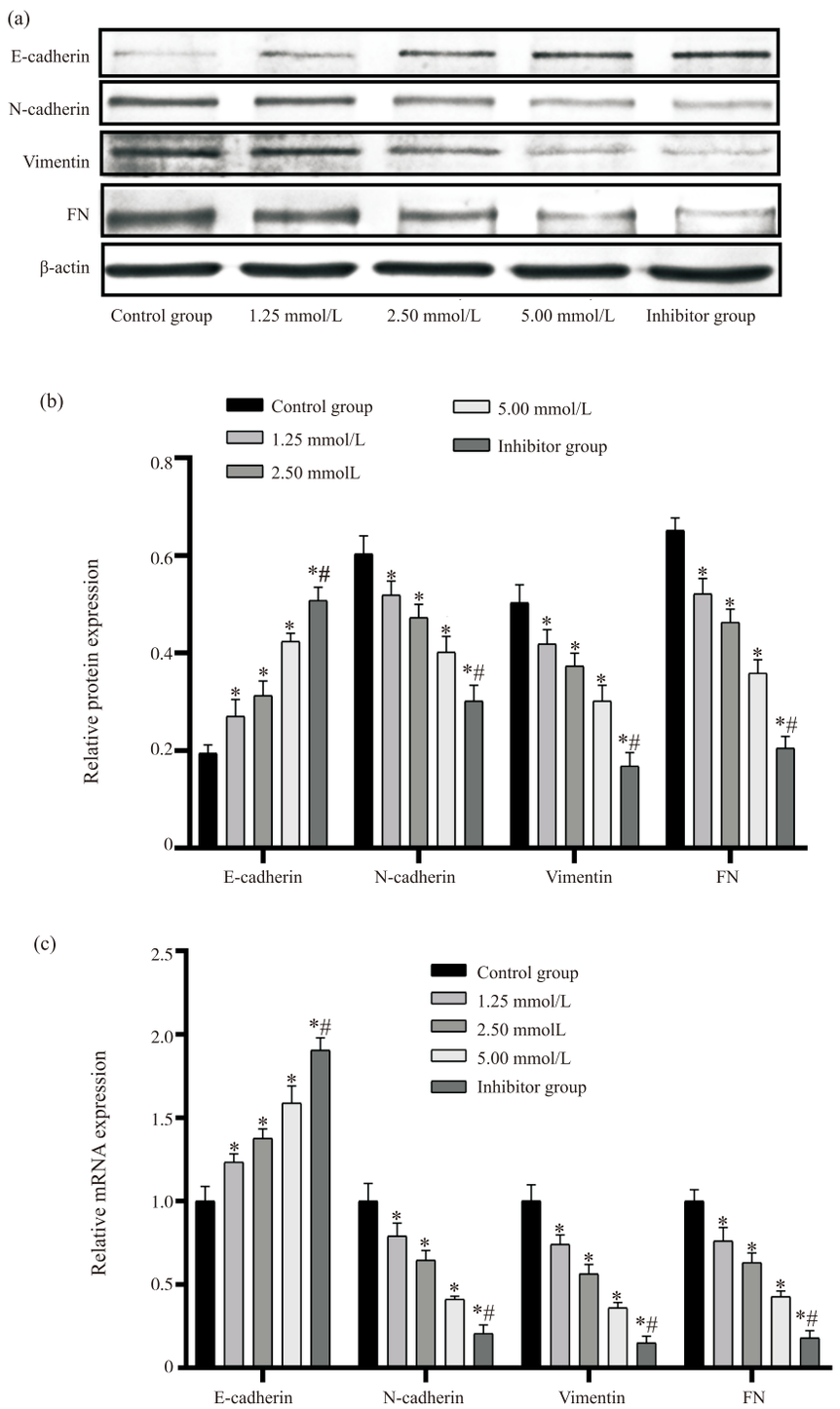

图 4　各组细胞中 EMT 相关因子表达

Fig. 4　Expression of EMT-related factors in cells of each group

（a）蛋白质印迹观察；（b）蛋白水平；（c）mRNA 水平。与对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比，$^{\#}P<0.05$。

(a) Western blot observation; (b) Protein level; (c) mRNA level. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with 5.00 mmol/L metformin group, $^{\#}P<0.05$.

低于对照组，p-Smad7 蛋白的表达水平高于对照组（$P<0.05$）；Smad3 蛋白的表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$）；抑制剂加入后，与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比，TGF-β1 和 p-Smad3 蛋白的表达水平进一步减少，而 p-Smad7 蛋白的表达水平增加（$P<0.05$）。

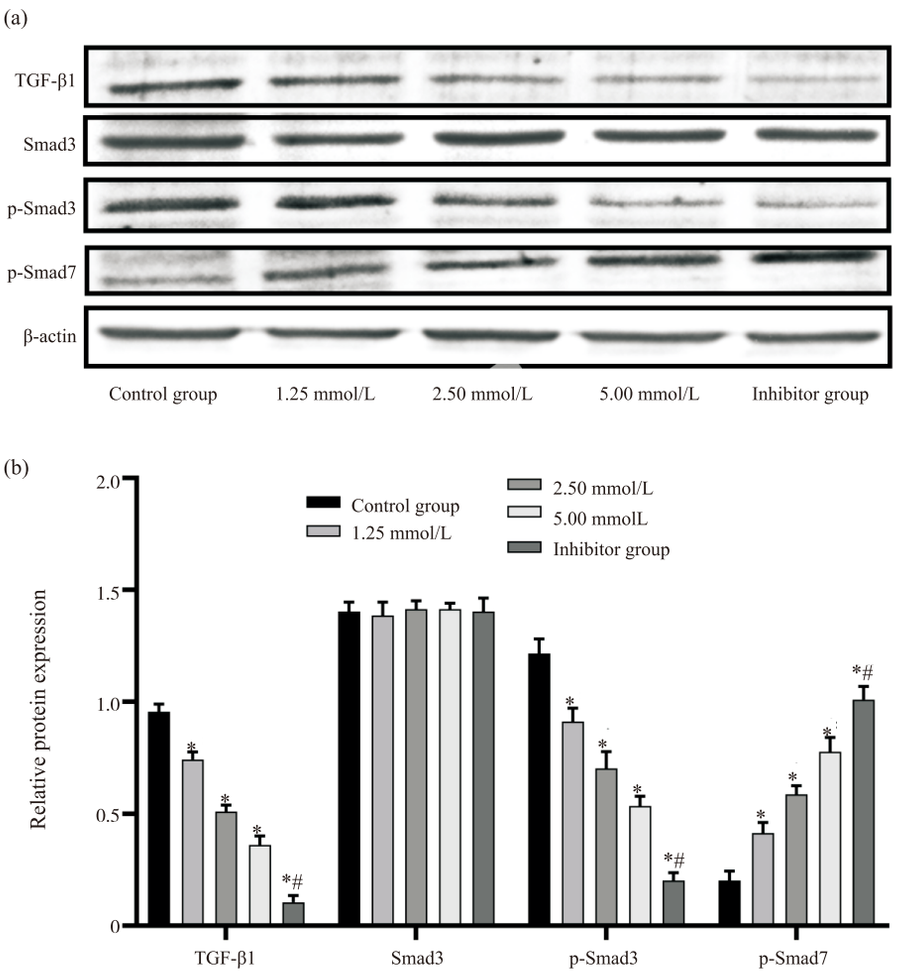

图 5 各组细胞中 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白表达

Fig. 5 Expression of TGF-β1/Smads signaling pathway protein in cells of each group

（a）蛋白质印迹观察；（b）蛋白水平。与对照组相比，$^{*}P<0.05$；与 5.00 mmol/L 二甲双胍组相比，$^{\#}P<0.05$。

(a) Western blot observation; (b) Protein level. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with 5.00 mmol/L metformin group, $^{\#}P<0.05$.

3 讨论

在全球癌症中，肝癌有着较高的死亡率，病因较复杂，环境、肥胖及基因遗传等都会成为其发病的诱因。近年来，其发病率呈现逐年上升且年轻化的趋势。大多数患者在早期几乎没有明显的症状，诊疗时往往已是中晚期。目前治疗肝癌的手段尚存在复发等问题。因此，对肝癌治疗药物相关机制进行相关研究，在临床辅助治疗肝癌方面具有极为重要的意义。

二甲双胍是双胍类口服降糖药，其发现由来已久。17 世纪，Nicholas Culpeper 发现了山羊豆的抗糖尿病作用；19 世纪初，人们发现山羊豆含大量胍类化合物，且证实其具有降血糖功效；1922 年，爱尔兰科学家 Werner 和 Bell 首次人工合成了二甲双胍，但使其真正的成为临床降糖药物是 Jean Sterne。自此，二甲双胍由于其低毒、价廉、效果佳的特点，成为了治疗 2 型糖尿病的临床药物[6-7]。二甲双胍能够抑制包括前列腺癌、结肠癌及肺癌在内的等多种恶性肿瘤，且能够抑制其细胞增殖，进而发挥抗肿瘤作用[8-11]。Ma 等[12]通过 Meta 分析发现，二甲双胍可以降低糖尿病患者的肝癌发生率。Kim 等[13]的研究显示，二甲双胍能够抑制肝癌细胞的增殖。这

提示，二甲双胍能够在一定程度上抑制肝癌细胞的恶性生物学反应，但其作用机制当前尚不清晰。本研究发现，2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组细胞活力、增殖活力高于对照组，且 1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组细胞迁移能力低于对照组，提示二甲双胍能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移。胡晨等[14]的研究表明，二甲双胍可以逆转 EMT，抑制癌细胞的增殖和迁移。在肝癌中，二甲双胍抑制 EMT 也有相关报道[15]。本研究发现，1.25、2.50、5.00 mmol/L 二甲双胍组中 N-cadherin、vimentin 和 FN 的 mRNA 与蛋白质的表达水平较对照组减少，E-cadherin 的 mRNA 与蛋白质的表达水平较对照组增加，说明二甲双胍对肝癌细胞的 EMT 进程具有抑制作用。

TGF-β1/Smad 信号通路具有多种生物学活性，参与肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭等过程，是比较经典的信号传导通路[16]。TGF-β1 和 Smad7 在肝癌组织中表达显著，说明 TGF-β1/Smads 通路参与了肝癌的发生发展[17]。因此，调控 TGF-β1/Smads 通路的表达和治疗肝癌直接具有密切关系。研究表明，TGF-β1 是目前研究较为广泛、有效的 EMT 诱导因子之一，能够诱导肿瘤细胞发生 EMT[18]。EMT 是癌细胞转移的关键，抑制癌症细胞中的 EMT 有助于控制癌细胞的转移。已有研究表明，二甲双胍在宫颈癌中可以逆转 TGF-β1 建立的 EMT，其可通过抑制 SMAD3 的磷酸化打断与其他因子间的相互作用，抑制黑色素瘤的发生发展[19-20]。吕美娴等[21]研究表明，在肝癌中，TGF-β1/Smad 通路与细胞迁移和 EMT 进程相关。另有研究显示，TGF-β/Smad 通路与肝癌细胞迁移作用有关[22]。在本研究中，各处理组 E-cadherin 的 mRNA 与蛋白质的表达水平、p-Smad7 蛋白的表达水平较对照组增加，TGF-β1、p-Smad3 蛋白的表达水平、N-cadherin、vimentin、FN 的 mRNA 和蛋白质的表达水平较对照组减少，说明二甲双胍能够抑制肝癌细胞的 EMT 进程。本研究发现 5.00 mmol/L 二甲双胍组细胞活力接近 50%，故选择该浓度进行后续试验。结果显示，抑制剂组细胞的增殖活力、增殖率、迁移数以及 TGF-β1、p-Smad3、N-cadherin、vimentin 和 FN 相关蛋白的表达水平较 5.00 mmol/L 二甲双胍组减少，E-cadherin 和 p-Smad7 蛋白的表达水平较 5.00 mmol/L 二甲双胍组增加。这提示，二甲双胍可以抑制 MHCC97H 细胞增殖、迁移及 EMT 进程，可能依赖于 TGF-β1/Smad 通路抑制。

综上所述，二甲双胍可抑制 MHCC97H 细胞的增殖、迁移及 EMT 进程，依赖于对 TGF-β1/Smad 通路的抑制作用。但目前对于二甲双胍的抗肝癌作用的分子传导机制有待进一步深入探讨。

参考文献（References）：

[1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
ZHENG Rongshou, SUN Kexin, ZHANG Siwei, *et al*. Prevalence of malignant tumors in China in 2015[J]. Chinese Journal of Cancer, 2019, 41(1): 19-28.

[2] FARIA J, NEGALHA G, AZEVEDO A, *et al*. Metformin and breast cancer: molecular targets[J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2019, 24(2): 111-123.

[3] 殷威达, 吴秋秋, 刘一帆, 等. 低浓度二甲双胍对肝癌细胞株 Huh-7 迁移、侵袭能力的影响及其机制[J]. 山东医药, 2021, 61(12): 1-4.
YIN Weida, WU Qiuqiu, LIU Yifan, *et al*. Effects of low concentration metformin on migration and invasion ability of hepatocellular carcinoma cell line Huh-7 and its mechanism[J]. Shandong Medicine, 2021, 61(12): 1-4.

[4] TSCHERNIA N P, GULLEY J L. Tumor in the crossfire: inhibiting TGF-β to enhance cancer immunotherapy[J]. BioDrugs, 2022, 36(2): 153-180.

[5] LIN J. Concern about: echinacoside exerts anti-tumor activity via the miR-503-3p/TGF-β1/Smad aixs in liver cancer[J]. Cancer Cell International, 2021, 21(1): 617.

[6] MA R, YI B, RIKER A I, *et al*. Metformin and cancer immunity[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2020, 41(11): 1403-1409.

[7] NG C W, JIANG A A, TOH E M S, *et al*. Metformin and colorectal cancer: a systematic review, meta-analysis and meta-regression[J]. International Journal of Colorectal Disease, 2020, 35(8): 1501-1512.

[8] 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.

[9] KANG B G, SHENDE M, INCI G, *et al*. Combination of metformin/efavirenz/fluoxetine exhibits profound anticancer activity via a cancer cell-specific ROS amplification[J]. Cancer Biology & Therapy, 2023, 24(1): 20-32.

[10] YUAN H, HAN Y, WANG X, *et al*. SETD2 restricts prostate cancer metastasis by integrating EZH2 and AMPK signaling pathways[J]. Cancer Cell, 2020, 38(3): 350-365.

[11] 陶荔, 曹莺. 二甲双胍对肝癌细胞凋亡及PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响[J]. 山东医药, 2020, 60(26): 15-18.
TAO Li, CAO Ying. Effects of metformin on apoptosis and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of hepatocellular carcinoma cells[J]. Shandong Medicine, 2020, 60(26): 15-18.

[12] MA S, ZHENG Y, XIAO Y, *et al*. Meta-analysis of studies using metformin as a reducer for liver cancer risk in diabetic patients[J]. University of Maryland Medicine (Baltimore), 2017, 96(19): e6888.

[13] KIM T S, LEE M, PARK M, *et al*. Metformin and dichloroacetate suppress proliferation of liver cancer cells by inhibiting mTOR complex 1[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(18): 10027.

[14] 胡晨, 李力, 卢从华, 等. 二甲双胍对生物电场下肺癌H1975细胞增殖和定向迁移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019,

41(6): 521-528.
HU Chen, LI Li, LU Conghua, *et al*. Effects of metformin on proliferation and directed migration of lung cancer H1975 cells under bioelectric field[J]. Journal of the Third Military Medical University, 2019, 41(6): 521-528.

[15] 郭杏. 二甲双胍联合索拉非尼影响HepG2干细胞样细胞增殖的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
GUO Xing. Effects of metformin combined with Sorafenib on proliferation of HepG2 stem cell-like cells[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2018.

[16] HACHIM M Y, HACHIM I Y, DAI M, *et al*. Differential expression of TGFβ isoforms in breast cancer highlights different roles during breast cancer progression[J]. Tumor Biology, 2018, 40(1): 1010428317748254.

[17] 熊世红, 杨成, 潘德璋, 等. 黄精皂苷对TGF-β1诱导的HK-2细胞EMT、补体系统和PI3K/AKT/NF-κB信号通路的影响[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(2): 157-163.
XIONG Shihong, YANG Cheng, PAN Dezhang, *et al*. Effects of *Polygonatum* saponins on the EMT, complement system and PI3K/AKT/NF-κB signal pathway of HK-2 cells induced by TGF-β1[J]. Immunological Journal, 2022, 38(2): 157-163.

[18] WU X, ZHAO J, RUAN Y, *et al*. Sialyltransferase ST3GAL1 promotes cell migration, invasion, and TGF-β1-induced EMT and confers paclitaxel resistance in ovarian cancer[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(11): 1102.

[19] 程科研. mTOR/p70s6k/PKM2通路影响TGF-β1诱导宫颈癌上皮间质变机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2017.
CHENG Keyan. Study on the mechanism of mTOR/p70s6k/PKM2 pathway affecting TGF-β1 induced cervical cancer interepithelial degeneration[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2017.

[20] 张婷婷. 二甲双胍抑制黑色素瘤发生发展机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
ZHANG Tingting. Mechanism of metformin inhibiting melanoma development[D]. Jinan: Shandong University, 2018.

[21] 吕美娴, 廖智红, 周欢, 等. 裂果薯皂苷单体Ⅰ通过TGF-β1调控上皮间质转化对人肝癌细胞SMMC-7721侵袭和转移的影响[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 408-413.
LYU Meixian, LIAO Zhihong, ZHOU Huan, *et al*. Effect of saponin monomer l of *Schizocapsa plantaginea* Hance on invasion and migration of hepatocellular carcinoma celSMMc.7721 by regulating epithelial-mesenchymal transition through TGF-β1[J]. Chinese Pharmacology Bulletin, 2020, 36(3): 408-413.

[22] 陈春苗, 张国哲, 刘平平, 等. 小檗碱通过TGF-β/Smad通路抑制TGF-β1诱导的人肝癌HepG2细胞上皮间质转化的研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 261-267.
CHEN Chunmiao, ZHANG Guozhe, LIU Pingping, *et al*. Berberine inhibits TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer HepG2 cells *via* TGF-β/Smad pathway[J]. Chinese Pharmacology Bulletin, 2020, 36(2): 261-267.

（上接第 356 页）

[26] 杨倩, 蔡茜茜 郭淋凯, 等. 响应面优化提取小球藻蛋白质及其性质研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 183-190.
YANG Qian, CAI Qianqian, GUO Linkai *et al*. Optimization of protein extraction from *Chlorella vulgaris* using respone surface methodology and study on its property[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(6): 183-190.

[27] SHEN X, ZHANG D, YAO C, *et al*. Formation mechanism of surface metamorphic layer and influence rule on milling TC17 titanium alloy[J]. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2021, 112: 2259-2276.

[28] RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ V M, FEMENIA A, MINJARES-FUENTES R, *et al*. Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: optimization using response surface methodology[J]. LWT - Food Science and Technology, 2012, 47(2): 225-232.

[29] 夏迎利. 丹凤牡丹花蕊蛋白质研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2022.
XIA Yingli. Study on the protein of the stamens of Danfeng peony[D]. Luoyang: Hennan University of Science and Technology, 2022.

[30] LONG G, JI Y, PAN H, *et al*. Characterization of thermal denaturation structure and morphology of soy glycinin by FTIR and SEM[J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18(4): 763-774.

[31] 陆洪省, 刘亚樵, 刘文君, 等. 养殖污水中蛋白核小球藻的分离鉴定及其污水处理效果[J]. 农业工程学报, 2017, 33(4): 273-277.
LU Hongxing, LIU Yaqiao, LIU Wenjun, *et al*. Isolation, identification of *Chlorella pyrenoides* from aquaculture wastewater and its purification of wastewater[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 33(4): 273-277.

[32] SHENG J, YU F, XIN Z, *et al*. Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 533-539.

[33] 李书媛, 王际辉, 王波, 等. 小球藻多肽的制备、表征及抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(20): 303-310.
LI Shuyuan, WANG Jihui, WANG Bo, *et al*. Preparation, characterization and antioxidant activity of *Chlorella pyrenoidosa* polypeptides[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(20): 303-310.

[34] BROWN M R, JEFFREY S W, VOLKMAN J K, *et al*. Nutritional properties of microalgae for mariculture[J]. Aquaculture, 1997, 151(1/4): 315-331.

[35] MEDINA C, RUBILAR M, SHENE C, *et al*. Protein fractions with techno-functional and antioxidant properties from *Nannochloropsis gaditana* microalgal biomass[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2015, 9(4): 417-425.

[36] TEJANO L A, PERALTA J P, YAP E E S, *et al*. Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana*[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(7): 2381-2390.