网络出版时间: 2025-06-30 13: 24: 21 网络出版地址: https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0857.013

## 二甲双胍缓解胰腺癌细胞衰老并增敏放疗的效果及机制

许文金<sup>1</sup>,谢雨欣<sup>1</sup>,林心悦<sup>1</sup>,王 昕<sup>1</sup>,姜 伟<sup>1</sup>,魏士杰<sup>2</sup>,刘 强<sup>3</sup>,廖 翔<sup>3</sup> (江苏大学附属医院<sup>1</sup>影像科、<sup>3</sup>检验科,镇江 212001;<sup>2</sup>南通大学附属江阴医院影像科,江阴 214400)

摘要 目的 研究二甲双胍增敏胰腺癌细胞放疗的效果 探讨胰腺癌细胞放疗抵抗的原因 ,初步探究 PERK/P-eIF2/ATF4 通路在上述过程中的调控作用。方法 将胰腺癌细胞(PANC-1 和 PANC-2) 分为对照组、放疗组和药物处理组 ,在经过对应的处理后 ,使用 CCK-8 法、细胞克隆实验和细胞死活染色测定细胞增殖抑制率 ,β 半乳糖苷酶染色检测细胞衰老程度 ,Western blot和免疫荧光实验检测细胞周期相关(P21、P16、 $\gamma$ -H2AX) ,凋亡相关(Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase3) 以及所探究通路相关(PERK、P-eIF2、ATF4) 蛋白的表达水平。使用 PERK 抑制剂(GSK2606414) 和 PERK 激动剂(MK-28) 进一步验证 PERK/P-eIF2/ATF4 轴在二甲双胍抑制胰腺癌细胞衰老及增敏放疗中的作用。结果 放疗显著上调胰腺癌细胞的衰老相关标志物表达(P21、P16、 $\gamma$ -H2AX 和 β-半乳糖苷酶活性) ,衰老细胞在体外和体内均表现出更强的增殖活性 ,并伴随更大的肿瘤体积。二甲双胍可抑制放疗诱导的细胞衰老 降低衰老标志物表达 联合治疗后进一步削弱细胞的克隆增殖能力和活性。机制研究表明 ,放疗激活 PERK 信号通路 ,促进 PERK、P-eIF2 和 ATF4 蛋白表达 ,诱导细胞进入衰老状态。PERK 抑制剂降低细胞 β-半乳糖苷酶活性 ,PERK 激动剂则增加衰老相关蛋白表达 这一效应可被二甲双胍逆转。结论 二甲双胍抑制放疗后胰腺癌细胞中激活的PERK/P-eIF2/ATF4 通路 ,延缓肿瘤细胞衰老进程并降低衰老细胞的放疗抗性 ,起到增敏胰腺癌放疗的作用。

关键词 二甲双胍; 胰腺癌; 放疗抵抗; 细胞衰老; PERK 抑制剂; PERK/P-eIF2/ATF4 通路

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2025)07 - 1282 - 09 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.07.017

据全球癌症统计,胰腺癌是高发恶性肿瘤之一, 患者5年总生存率不足8%,治疗面临严峻挑战<sup>[1]</sup>。 术前新辅助治疗有助于降低肿瘤分期,放疗是其中 关键组成部分。然而,胰腺癌细胞对放疗具有固有 抗性,常导致治疗后肿瘤复发或疾病进展。研究<sup>[2]</sup> 表明,放疗诱导的细胞衰老是导致治疗抵抗的重要 机制之一。衰老细胞通过细胞周期停滞降低治疗敏 感性,分泌衰老相关表型因子,形成促肿瘤的炎症微 环境<sup>[3]</sup>。尽管放疗诱导的细胞衰老在早期可以抑 制肿瘤生长,但其持续存在会导致肿瘤进展的长期 风险<sup>[4]</sup>。因此,靶向清除放疗诱导的衰老细胞,有 望缓解放疗抗性,提升治疗效果。

二甲双胍是临床常用的口服降糖药,近年来因 其潜在抗肿瘤与抗衰老作用受到广泛关注。已有研 究<sup>[5]</sup>表明,二甲双胍可通过多种机制抑制肿瘤进

2025-03-19 接收

基金项目: 江苏省普通高校研究生科研创新项目(编号: SJCX23\_ 2105)

作者简介: 许文金 ,男 ,硕士研究生;

廖 翔,男,主管技师,硕士生导师,通信作者,E-mail: liaoxiang025@126.com;

刘 强,男,主任技师,硕士生导师,通信作者,E-mail: liuqiang\_free@163.com 展,并能改善胰腺癌患者生存结局。此外,二甲双胍 在延缓心血管疾病和神经退行性疾病等衰老相关疾 病方面亦展现出良好疗效<sup>[6]</sup>。然而,关于二甲双胍 能否抑制肿瘤治疗相关衰老并增强放疗敏感性的研 究尚属空白。因此,该研究拟探讨二甲双胍作为抗 衰老药物在消除放疗诱导的胰腺癌细胞衰老及增强 放疗敏感性方面的潜在作用及其机制,为胰腺癌治 疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠 40 只 8 周 龄 体质量(20 ± 2)g,均购买并饲养于自江苏大学 动物中心。本研究已通过江苏大学实验动物管理和 使用 委 员 会 审 查(批准号: UJS-IACUC-APX-2023031701)。

1.1.2 主要试剂与仪器 人胰腺癌细胞系 PANC-1、小鼠胰腺癌细胞系 PANC-2 购自美国 ATCC 公 司; Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase3 一抗购自美国 CST 公司; GAPDH、P21、P16、γ-H2AX、PERK、ATF6、 IRE1、P-eIF2、ATF4 一抗购自美国 Affinity 公司; 山 羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 CST 公司; 山羊抗兔荧光二抗、山羊抗鼠荧光二抗、生物 素标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Jackson immIuno Research 公司; 二甲双胍、极光激酶 A(Alisertib)、PERK 抑制剂(GSK2606414) 和 PERK 激动剂 (MK-28) 购自美国 MCE 公司; β-半乳糖苷酶染色试 剂盒、Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、 苏木精染液购自上海碧云天生物技术有限公司; 结 晶紫染液购自上海默克公司; CCK-8 染色工作液购 自美国 MCE 公司; DAB 显色液购自美国 Vectorlabs 公司; 医用电子直线加速器来自江苏大学附属医院 放疗科; 酶标仪购自美国 Biotek 公司; 正置荧光显微 镜购自德国 Lecia 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞实验分组 实验分组如下: Ctrl 组为正 常培养的胰腺癌细胞; RT 组为放疗处理组; Alisertib 组为使用衰老诱导剂 Alisertib 处理组; Ali + RT 组为 先使用 Alisertib 处理诱导细胞衰老后进行放疗组; RT + Met 组为放疗和二甲双胍联合处理组; RT + GSK 组为放疗和 GSK2606414 联合处理组; MK-28 组为单独 MK-28 处理组; MK-28 + Met 组为 MK-28 和二甲双胍联合处理组。

1.2.2 动物模型构建及治疗 衰老胰腺癌皮下瘤 模型构建方法:在体外使用衰老诱导剂 Alisertib 处 理细胞1周,代表衰老胰腺癌细胞 将其与正常培养 的胰腺癌细胞分别注射到小鼠皮下。Ctrl 组为正常 胰腺癌细胞成瘤后不进行放疗处理; RT 组为正常胰 腺癌细胞成瘤后进行放疗处理; Ali + RT 组为上述 衰老胰腺癌细胞成瘤后进行放疗处理。放疗处理剂 量为单次6 Gy。正常胰腺癌皮下瘤模型构建方法: 使用正常培养的胰腺癌细胞在小鼠皮下成瘤。Ctrl 组为成瘤后不进行处理组; RT 组在成瘤后进行放疗 处理; RT + Met 组为放疗和二甲双胍同时处理组。 放疗处理剂量为单次6 Gy,二甲双胍使用浓度为 100 mg/kg,口服给药。

1.2.3 Western blot 实验 细胞在经过不同处理培养后,弃去培养基,使用 PBS 清洗 2 次,使用 150 μL RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂混合液裂解细胞 30 min ,12 000 r/min 离心 10 min ,取蛋白上清液,按比 例加入 Loading buffer ,100 ℃金属浴煮 10 min 后得 到蛋白样本。组织样本取 100 mg 肿瘤组织,使用 900 μL RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂混合液在组织 破碎仪中充分匀浆,12 000 r/min 离心 10 min ,取蛋 白上清液,按比例加入 Loading buffer ,100 ℃金属浴 煮 10 min 后得到蛋白样本。取适量样本进行聚丙 烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗按 1:1 000 稀释孵育过 夜, 二抗按 1:20 000 稀释孵育 2 h, 通过发光成像 分析仪显影, 显影后使用 ImageJ 软件对蛋白条带进 行定量分析。样本分别检测衰老相关蛋白(P21、 P16、γ-H2AX)、凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2、Cleavedcaspase3) 和 PERK 信号通路相关蛋白(PERK、 ATF6、IRE1、P-eIF2、ATF4) 表达。

1.2.4 免疫荧光染色 获得小鼠肿瘤组织后使用 OCT 包埋胶进行冰冻包埋,将冷冻组织切片后进行 水化和肿瘤区域的描绘。使用多聚甲醛固定1h。 使用含5%胎牛血清的TBST溶液封闭1h。使用对 应的一抗1:200稀释后孵育过夜。用带荧光标记 的二抗1:1000稀释后对样品进行二抗标记,并用 抗荧光猝灭剂封片。使用荧光显微镜检测荧光表达 情况。细胞在进行不同的处理后,进行同样的步骤, 固定、封闭、孵育一抗、孵育二抗和封片,最后使用荧 光显微镜观察拍照。

2.5 β-半乳糖苷酶染色 将不同处理的胰腺癌 细胞清洗干净后,使用多聚甲醛固定 20 min,每孔加入1 mL 染色工作液(10 μL 染色液 A + 10 μL 染色 液 B + 930 μL 染色液 C + 50 μL X-Gal 溶液),在 37 ℃ 密封环境下孵育过夜,用显微镜观察细胞,选 取多个具有代表性的视野拍照。

1.2.6 细胞毒性实验 将胰腺癌细胞铺在 96 孔板 中,每孔 3×10<sup>3</sup> 个细胞,对细胞进行不同的处理后, 使用 CCK-8 实验检测细胞活性。每孔加入用含 10%的 CCK-8 溶液的无血清培养基。在孵育一定 时间后,使用 Biotek Epoch2 酶标仪检测 450 nm 处 的吸光度。

1.2.7 集落形成实验 将 1 × 10<sup>3</sup> 个 PANC-1 和 PANC-2 的单细胞悬液均匀接种到 6 孔板中,在不同 的实验条件下培养约 2 周,直到明显的菌落出现。 然后用多聚甲醛固定这些菌落,并用结晶紫溶液染 色 30 min 后,用显微镜观察细胞菌落的大小与直 径,选取具有代表性的视野拍照。

1.2.8 活死细胞染色 胰腺癌细胞在进行不同的 处理后,弃去细胞培养基并用 PBS 洗涤 2 次后,使 用 Calcein AM/PI Double Staining Kit 评估细胞死活 程度。将细胞与染色液孵育 30 min 后,荧光显微镜 观察染色结果。绿色荧光鉴定细胞为活细胞,红色 荧光为死细胞。

1.2.9 免疫组化 获得小鼠肿瘤组织后 使用多聚 甲醛固定并进行石蜡包埋,将组织石蜡切片进行脱 蜡处理后置于 EDTA 抗原修复缓冲液中,微波炉内

加热煮沸 30 min 使用免疫组化笔勾画感兴趣区域, 用3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶,驴血清封闭, 按1:100 稀释一抗后4 ℃孵育过夜 使用生物素标 记的二抗室温孵育 30 min ,DAB 显色 ,使用苏木精 染液复染细胞核 脱水封片 苏木精复染细胞核为蓝 色 DAB 显出的阳性区域为棕黄色。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.4.0 进 行统计学分析与绘图,所有数据均为独立进行的3 次实验获得 数据以 $\bar{x}$ ±s 表示。多组间的数据比较 采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 ISD-+ 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

2.1 放疗对胰腺癌细胞中衰老相关生物标志物表 达的影响 Western blot 结果显示 衰老相关蛋白表 达呈放疗剂量依赖性升高,PANC-I细胞在4 Gy 剂 量时达到峰值,PANC-2在6 Gy时表达最高(图 1A)。 $\beta$ 半乳糖苷酶染色显示  $\beta$ 半乳糖苷酶活性和 β-Gal 阳性细胞数在放疗后的胰腺癌细胞中升高 (图1B、1C);免疫荧光染色实验结果证实,放疗后 P16 阳性和 P21 阳性细胞数量增加(图1D-1G)表 明放疗诱导肿瘤细胞衰老。

2.2 衰老细胞的放疗抗性检测 β 半乳糖苷酶染 色显示 Alisertib 处理后胰腺癌细胞中 β 半乳糖苷酶 活性和 β-Gal 阳性细胞数增加(图 2A、2B)。与 RT 组 比较,Ali+RT组的凋亡相关蛋白Bax和Cleavedcaspase3 的表达水平降低,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表 达水平升高(图2C)。细胞活性检测显示 Alisertib 处 理后的胰腺癌细胞在放疗后表现出更高的细胞活性 (图 2D)。动物实验结果显示 ,与 Ctrl 组比较 ,RT 组 肿瘤体积减小;与RT组比较,Ali+RT组肿瘤体积增 大(图 2E、2F)。肿瘤组织中凋亡相关蛋白检测得到 与体外实验相似的趋势(图 2G - 2J) 表明衰老肿瘤 细胞具有更强的放疗抵抗能力。



cells; \*\* $P<0.\ 01$  ,\*\*\* $P<0.\ 001$  vs Ctrl group.



#### 图 2 衰老细胞的放疗抗性检测



A:  $\beta$ -Galactosidase staining ×10; B: Quantification of  $\beta$ -Gal-positive cells; C: Detection of apoptosis-related proteins in cell treated radiotherapy with or without alisertib; D: Cell viability assay; E: Tumor presentation(n = 3); F: Tumor volume statistical plot; G: Detection of apoptosis-related proteins in mouse tumor tissues after different treatments; H: Quantification of Bax protein; I: Quantification of Bcl-2 protein; J: Quantification of Cleaved-caspase3 protein; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*

2.3 二甲双胍抑制衰老胰腺癌细胞并增敏放疗的效果 β半乳糖苷酶染色显示 ,与 RT 组比较 ,RT + Met 组中β半乳糖苷酶活性和β-Gal 阳性细胞数减少(图3A、3B)。Western blot 结果显示 ,二甲双胍降

低放疗后衰老相关蛋白表达水平(图 3C)。免疫荧 光染色提示,二甲双胍处理后 P16 阳性和 P21 阳性 的细胞数量减少(图 3D – 3G)。活死细胞染色结果 表明,与 RT 组比较,RT + Met 组中死亡细胞比例增 加(图 3H)。集落形成实验结果显示,RT + Met 组 集落的数量和大小均少于 RT 组(图 3I)。细胞活性 检测结果提示,RT + Met 组中胰腺癌细胞活性低于 RT 组(图 3J),表明二甲双胍可以通过抑制放疗后 胰腺癌细胞衰老的程度起到增敏放疗的作用。

**2.4 PERK/P-eIF2/ATF4** 通路在二甲双胍抑制肿 瘤细胞衰老中的调控机制 Western blot 结果显示,

与 RT 组比较 ,RT + Met 组中 PERK/P-eIF2/ATF4 通 路相关蛋白均被抑制(图 4A)。  $\beta$  半乳糖苷酶染色 显示 ,使用 GSK2606414 处理后,细胞内  $\beta$  半乳糖苷 酶活性和  $\beta$ -Gal 阳性细胞数均减少(图 4B、4C)。 Western blot 结果显示 ,RT + GSK 组中 PERK 信号通 路和衰老相关蛋白的表达均少于 RT 组(图 4D)。 Western blot 结果显示 ,与 Ctrl 组比较 ,使用 MK-28



处理胰腺癌细胞后,细胞中 PERK 信号通路和衰老 相关蛋白表达增加,MK-28 + Met 组中蛋白表达恢复 到初始状态(图 4E),提示二甲双胍通过抑制 PERK/P-eIF2/ATF4 通路缓解放疗诱导的细胞衰 老。

2.5 二甲双胍减少衰老肿瘤细胞并增敏放疗的体内效果 动物实验结果显示,与Ctrl组比较,RT组肿瘤体积减小,RT+Met组相较RT组肿瘤体积进一步缩小(图5A、5B)。免疫荧光染色显示,RT组中P21阳性区域大于Ctrl组,RT+Met组中P21阳性区域小于RT组(图5C、5D)。Western blot结果显示,RT激活肿瘤组织中PERK信号通路及衰老相关蛋白表达,二甲双胍联合处理后相应蛋白被抑制(图5E)。免疫组化染色显示,RT+Met组中PERK、P-eIF2和ATF4的表达均小于RT组(图5F),表明在体内二甲双胍可能通过抑制PERK/P-eIF2/ATF4通路抑制肿瘤细胞衰老并增敏放疗。

3 讨论

胰腺癌作为恶性程度最高的实体肿瘤之一,其 治疗抵抗机制仍是临床亟待突破的难题。放疗通过 诱导肿瘤细胞 DNA 双链断裂促进凋亡,但值得注意 的是,该过程同时激活 ATM 和 P53-P21 信号轴,触 发细胞衰老级联反应<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明,衰老肿瘤细 胞通过上调 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白(如 Bcl-xL 和 MCL-1)形成代谢保护屏障,这一适应性生存机制成 为放疗抵抗的重要病理基础。

近年来,二甲双胍在抗肿瘤领域的多靶点效应 备受关注。该药物通过靶向线粒体复合物 I 抑制氧 化磷酸化,导致三磷酸腺苷合成受阻,迫使肿瘤细胞 进入代谢应激状态<sup>[9]</sup>。机制研究进一步揭示,二甲 双胍可通过以下途径发挥协同抗肿瘤作用:① 激活 AMPK/mTOR 通路诱导自噬性死亡<sup>[10]</sup>;② 下调 HIF-1α抑制瓦博格效应<sup>[11]</sup>;③ 调控 CD8<sup>+</sup> T 细胞



图 4 PERK/P-eIF2/ATF4 通路在二甲双胍抑制肿瘤细胞衰老中的调控机制

#### Fig. 4 Regulatory mechanism of the PERK/P-eIF2/ATF4 pathway in metformin-mediated inhibition of tumor cell senescence

A: Detection of signaling pathway-related proteins treated radiotherapy with or without metformin; B:  $\beta$ -Galactosidase staining ×10; C: Quantification of  $\beta$ -Gal-positive cells; D: Detection of signaling pathway and aging-related proteins in cell treated radiotherapy with or without GSK; E: Detection of signaling pathway and aging-related proteins in cell treated treated MK-28 with or without metformin; \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.000 1 vs RT group.





A: Tumor presentation(n = 4); B: Tumor volume statistical plot; C: Immunofluorescence staining images ×10; D: Quantification of P21-positive areas; E: Detection of signaling pathway and aging-related proteins; F: Immunohistochemical images ×10; \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs Ctrl group; \*P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs Ctrl group;

代谢重编程增强免疫监视<sup>[12]</sup>。Nishida et al<sup>[13]</sup>研究 发现,二甲双胍通过抑制线粒体复合物 I 促进树突 状细胞成熟,增强 CD4<sup>+</sup> T 细胞增殖,从而激活抗肿 瘤免疫反应。临床试验进一步支持了二甲双胍的抗 癌潜力。在一项纳入 3 649 例年龄 < 75 岁、无糖尿 病的 T1-3、NO-3、MO 期乳腺癌高危患者的随机对照 研究中,二甲双胍显著降低了糖尿病乳腺癌患者新 发侵袭性乳腺癌的风险<sup>[14]</sup>。此外,中国科学院的一 项食蟹猴研究<sup>[15]</sup>显示,二甲双胍具有神经保护作 用,可延缓大脑衰老,并提升认知能力,展现了二甲 双胍抵抗衰老的潜力。基于这些发现,二甲双胍联 合放疗的策略有望弥补单纯放疗的局限性,不仅能 有效清除衰老肿瘤细胞,减少放疗耐受,还可增强放 疗的抗肿瘤效应。

本研究揭示,治疗诱导的肿瘤细胞衰老是胰腺 癌放疗耐受的关键因素之一。放疗可促使部分肿瘤 细胞进入衰老状态,其特征包括细胞周期调控蛋白 P21、P16和γ-H2AX的上调,以及β半乳糖苷酶活 性的增强。与未衰老的肿瘤细胞比较,衰老肿瘤细 胞表现出更强的抗凋亡能力,并且其存活率和增殖 潜能均显著提高。放疗可通过激活 PERK/P-eIF2/ ATF4 通路促进肿瘤细胞衰老。进一步干预发现, PERK 信号通路的激动剂可加速衰老进程,而 PERK 抑制剂则可有效延缓衰老的发生。为了克服这一难 治性问题,本研究引入二甲双胍作为衰老清除剂及 放疗增敏剂。结果显示,二甲双胍通过抑制 PERK 通路的过度激活,清除了放疗诱导的衰老肿瘤细胞, 并增强了放疗对肿瘤组织的杀伤效应。

综上所述 本研究填补了二甲双胍抑制治疗诱 导性衰老并增强放疗疗效的研究空白,揭示了 PERK/P-eIF2/ATF4 信号通路在这一过程中可能发 挥的重要作用。然而,本研究主要聚焦于 PERK 信 号通路在胰腺癌放疗耐受中的作用机制,尚未全面 解析其核心分子靶点。因此,未来研究需借助高通 量测序技术,进一步鉴定二甲双胍在放疗增敏中的 最优调控通路。

#### 参考文献

- Halbrook C J , Lyssiotis C A , Pasca Di Magliano M , et al. Pancreatic cancer: advances and challenges [J]. Cell ,2023 ,186(8): 1729 - 54. doi: 10.1016/j.cell.2023.02.014.
- [2] Ji J , Ding K , Cheng B , et al. Radiotherapy-induced astrocyte senescence promotes an immunosuppressive microenvironment in glioblastoma to facilitate tumor regrowth [J]. Adv Sci (Weinh) , 2024 ,11(15): e2304609. doi: 10.1002/advs.202304609.
- [3] Zhao Y , Simon M , Seluanov A , et al. DNA damage and repair in age-related inflammation [J]. Nat Rev Immunol 2023 23(2):75 89. doi: 10.1038/s41577 022 00751 y.
- [4] Bousset L, Gil J. Targeting senescence as an anticancer therapy
  [J]. Mol Oncol 2022, 16(21): 3855 80. doi: 10.1002/1878 -0261.13312.
- [5] Yang J , Zhou Y , Xie S , et al. Metformin induces ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res 2021 40(1):206. doi: 10.1186/s13046 - 021 -02012 - 7.
- [6] Khan J, Pernicova I, Nisar K, et al. Mechanisms of ageing: growth hormone, dietary restriction, and metformin [J]. Lancet Diabetes Endocrinol ,2023 ,11 (4): 261 – 81. doi: 10.1016/ S2213 - 8587(23) 00001 - 3.
- [7] Huang Y , Che X , Wang P W , et al. P53/MDM2 signaling pathway in aging , senescence and tumorigenesis [J]. Semin Cancer Biol 2024 ,101: 44 – 57. doi: 10.1016/j. semcancer. 2024. 05.

001.

- [8] Schmitt C A. Senescence, apoptosis and therapy-cutting the lifelines of cancer [J]. Nat Rev Cancer 2003 3(4): 286 - 95. doi: 10.1038/nrc1044.
- [9] Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential [J]. Nat Rev Endocrinol, 2023 ,19(8): 460 - 76. doi: 10.1038/s41574 - 023 - 00833 -4.
- [10] Finisguerra V , Dvorakova T , Formenti M , et al. Metformin improves cancer immunotherapy by directly rescuing tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes from hypoxia-induced immunosuppression [J].
  J Immunother Cancer 2023 ,11(5): e005719. doi: 10.1136/jite -2022 -005719.
- [11] 段雪玉 廖彬彬 李 蕾 等. 二甲双胍在恶性肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国药房 2024 35(15):1915 22. doi: 10.6039/ j. issn. 1001 - 0408.2024.15.20.
- [11] Duan X Y , Liao B B , Li L , et al. Research progress of metformin in the treatment of malignant tumors [J]. Chin Pharm ,2024 ,35 (15):1915 - 22. doi: 10.6039/j.issn.1001 - 0408.2024.15. 20.
- [12] Huang X , Sun T , Wang J , et al. Metformin reprograms tryptophan metabolism to stimulate CD8 <sup>+</sup> T-cell function in colorectal cancer
   [J]. Cancer Res 2023 83(14):2358 - 71. doi: 10.1158/0008 - 5472.
- [13] Nishida M, Yamashita N, Ogawa T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger metformin-dependent antitumor immunity via activation of Nrf2/mTORC1/p62 axis in tumor-infiltrating CD8T lymphocytes [J]. J Immunother Cancer ,2021 ,9 (9) : e002954. doi: 10.1136/jitc-2021-002954.
- [14] Goodwin P J, Chen B E, Gelmon K A, et al. Effect of metformin versus placebo on new primary cancers in canadian cancer trials group MA. 32: a secondary analysis of a phase Ⅲ randomized double-blind trial in early breast cancer [J]. J Clin Oncol 2023, 41(35):5356-62. doi: 10.1200/JCO.23.00296.
- [15] Yang Y , Lu X , Liu N , et al. Metformin decelerates aging clock in male monkeys [J]. Cell , 2024 ,187 (22): 6358 - 78. doi: 10. 1016/j. cell. 2024. 08.021. Epub 2024 Sep 12.

# Mechanistic study of metformin-mediated modulation of cellular senescence and radiosensitivity in pancreatic cancer

Xu Wenjin<sup>1</sup>, Xie Yuxin<sup>1</sup>, Lin Xinyue<sup>1</sup>, Wang Xin<sup>1</sup>, Jiang Wei<sup>1</sup>, Wei Shijie<sup>2</sup>, Liu Qiang<sup>3</sup>, Liao Xiang<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Dept of Medical Imaging, <sup>3</sup>Dept of Medical Laboratory, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001; <sup>2</sup>Dept of Medical Imaging, The Affiliated Jiangyin Hospital of Nantong University, Jiangyin 214400)

**Abstract** *Objective* To study the effect of metformin sensitizing pancreatic cancer cells with radiotherapy , with a focus on elucidating the underlying mechanisms of radiotherapy resistance. In particular , the role of the PERK/P–eIF2/ATF4 signaling pathway in mediating these effects was preliminarily explored. *Methods* Pancreatic cancer cell lines (PANC-4 and PANC-2) were categorized into control , radiotherapy , and drug treatment groups. Follow–

ing the respective treatments, cell proliferation inhibition was assessed using the CCK-8 assay, colony formation assays , and cell death staining. Senescence was quantified by  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) staining. The expression of cell cycle regulators (P21, P16,  $\gamma$ -H2AX), apoptosis markers (Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3), and pathway-related proteins (PERK, P-eIF2, ATF4) was evaluated by Western blot and immunofluorescence. To further investigate the role of the PERK/P-eIF2/ATF4 axis in metformin-mediated modulation of pancreatic cancer cell senescence and radiosensitization, selective inhibitors (GSK2606414) and agonists (MK-28) of PERK were employed. **Results** Radiotherapy markedly upregulated senescence-associated markers (P21, P16,  $\gamma$ -H2AX, and  $\beta$ galactosidase activity) in pancreatic cancer cells. Senescent cells exhibited enhanced proliferative activity and increased tumor volume both in vitro and in vivo. Metformin mitigated radiotherapy-induced senescence by reducing the expression of senescence markers and significantly suppressing the clonogenic and proliferative capacity of treated cells. Mechanistically, radiotherapy activated the PERK signaling pathway, leading to increased expression of PERK , P-eIF2 , and ATF4 , thereby driving cellular senescence. Pharmacological inhibition of PERK reduced βgalactosidase activity, while PERK activation further promoted the expression of senescence-associated proteins-an effect that was reversed by metformin. Conclusion Metformin inhibits the activation of the PERK/P-eIF2/ATF4 signaling pathway in pancreatic cancer cells following radiotherapy, thereby delaying cellular senescence and reducing the associated radiotherapy resistance of senescent cells. This modulation contributes to the sensitization of pancreatic cancer cells to radiotherapy.

Key words metformin; pancreatic carcinoma; radioresistance; cellular senescence; PERK inhibitor; PERK/P-eIF2/ATF4 signaling pathway

**Fund program** Graduate Student Research Innovation Project of Universities of Jiangsu Province (No. SJCX23\_2105)

**Corresponding authors** Liao Xiang , E-mail: liaoxiang025@126.com; Liu Qiang , E-mail: liuqiang\_free@163.com

## (上接第1281页)

NF- $\kappa$ B p65 , I $\kappa$ B $\alpha$  , p-NF- $\kappa$ B p65 , p-I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression. **Results** Compared with the control group , mice in the model group exhibited significant reductions in body weight , elevated DAI scores , shortened small intestinal length , increased histopathological scores , marked downregulation of ZO-1 and Occludin expression , and elevated levels of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6. Additionally , protein expression levels of TLR4 , MyD88 , p-NF- $\kappa$ B p65 , and p-I $\kappa$ B $\alpha$  were significantly upregulated ( all P < 0.01). In contrast , mice in ATPS-treated groups showed dose-dependent improvements , attenuated weight loss , reduced DAI scores , restored intestinal length , decreased histopathological scores , upregulated ZO-1 and Occludin expression , reduced TNF- $\alpha$  and IL-6 levels , and downregulated TLR4 , MyD88 , p-NF- $\kappa$ B p65 , and p-I $\kappa$ B $\alpha$  protein expression ( all P < 0.01). **Conclusion** ATPS alleviates 5-FU-induced CIM by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words** armillariella tabescens mycelia polysaccharides; TLR4/MyD88/NF-<sub>K</sub>B signaling pathway; chemotherapy-induced intestinal mucositis; 5-fluorouracil; tight junction protein; intestinal barrier function

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 81774051); Collaborative Innovation Project of Anhui Province Universities (No. GXXT-2023-078)

**Corresponding author** Zhang Mei , E-mail: zhangmei@ ahmu. edu. cn