

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.007.html>

右美托咪定对人肝癌 Huh-7 细胞增殖和迁移的影响

虞乐^{1,2}, 黄春霞^{1,2}, 胡军^{1,2}, 周大臣³, 张野^{1,2}

摘要 目的 探讨右美托咪定对人肝癌 Huh-7 细胞增殖和迁移的影响及其潜在机制。方法 实验分成细胞和动物两部分。首先, 将人肝癌 Huh-7 细胞随机分为 6 组: 对照组 (CON 组)、0.1 nmol/L 右美托咪定组 (D1 组)、1 nmol/L 右美托咪定组 (D2 组)、10 nmol/L 右美托咪定组 (D3 组)、氧糖剥夺/复氧复糖组 (OGD/R 组)、右美托咪定 + 氧糖剥夺/复氧复糖组 (D + OGD/R 组)。采用 MTT 比色法检测细胞活性, Western blot 测定 SIRT1 的蛋白表达量; 采用 Transwell 法检测细胞迁移能力。其次, 将 SPF 级 BALB/c-nu 雄鼠 6 只, 随机分为对照组 (CON 组) 和右美托咪定组 (DEX 组)。皮下种植 Huh-7 细胞, DEX 组裸鼠注射右美托咪定 (0.5 mg/kg), CON 组注射相应体积的生理盐水, 连续 6 d, 肿瘤 30 d 后处死裸鼠, 取出瘤体, 计算肿瘤体积。结果 右美托咪定可以促进 Huh-7 细胞的细胞活力及迁移能力, 减轻因 OGD/R 造成的损伤, 同时增加 SIRT1 的表达。而右美托咪定对裸鼠肿瘤的体积无明显影响。结论 右美托咪定可以增强人肝癌 Huh-7 细胞株的增殖和迁移能力, 这种作用可能是通过上调 SIRT1 表达来完成。

关键词 右美托咪定; 肝癌; Huh-7 细胞; SIRT1

中图分类号 R 735.7; R 73-37

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1019-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.007

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 其转移与复发是造成肝癌患者死亡的主要原因。因此, 探究肝癌转移与复发机制具有重要的临床意义^[1-2], 大量研究^[3]显示围手术期的治疗与处理对癌症远期结局具有重要的影响。

右美托咪定 (dexmedetomidine, DEX) 是一类高选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂, 作为一种理想的

镇静药物被广泛应用于临床实践中^[4]。有报道^[5]认为 DEX 可以有效地减轻围术期刺激所造成的应激与炎症反应, 而最新的研究^[6]提示 DEX 可促进腺癌细胞在肺脏、肝脏、肾脏等多个器官生长与转移, 关于 DEX 对肝癌细胞的研究鲜有报道。该研究旨在探讨右美托咪定对人肝癌细胞 Huh-7 增殖和迁移的影响, 并探究其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肝癌 Huh-7 细胞株由安徽医科大学第二附属医院肝胆胰外科馈赠。

1.2 实验动物 6 只 δ BALB/c 裸鼠, 4~6 周龄, 体质量为 (20 $\pm$ 2) g, 购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCKK(苏)2018-0008。

1.3 试剂和仪器 DMEM 高糖培养基由 Hyclone 公司提供 (货号: SH30022.01); 南美胎牛血清购自美国 Gibco 公司 (货号: 10437-028); MTT (货号: ST316)、RIPA 细胞裂解液 (货号: P0013B)、和结晶紫水溶液 (货号: C0121) 均购自北京碧云天生物技术公司; β -actin (货号: 3700) 和沉默信息调节因子 1 (SIRT1) (货号: 8469) 购于美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (货号: ZB-2301) 和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (货号: ZB-2305) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 右美托咪定购自江苏恒瑞医药股份有限公司 (货号: 180425BP)。生物安全柜 (型号: NU-425-400S)、二氧化碳细胞培养箱 (型号: NU-5810E) 购于美国 NUAIRE 公司; 荧光倒置显微镜 (型号: DeltaVision) 购于美国 GE 公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将人肝癌细胞 Huh-7 细胞培育于含 10% 南美胎牛血清的高糖培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱。待密度为 80% 左右时, 经 0.25% 的胰蛋白酶消化, 重悬, 吹打成单细胞悬液, 以 1:3 传代培养。

1.4.2 细胞实验分组与处理 将处于对数生长期 Huh-7 细胞常规接种于 96 孔板 (3.5 $\times 10^4$ 个/孔, 100 μl /孔) 或 6 孔板 (3 $\times 10^5$ 个/孔, 2 ml/孔), 采取

2020-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81471145、81801050), 安徽医科大学基础与临床提升研究计划 (编号: 2019xkjT026)

作者单位: ¹ 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230601

安徽医科大学第二附属医院² 麻醉与围术期医学科、³ 肝胆外科, 合肥 230601

作者简介: 虞乐, 女, 硕士研究生;

张野, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangye_hassan@sina.com

随机数表法将细胞分为 6 组 ($n = 5$): 对照组 (CON 组)、0.1 nmol/L 右美托咪定组 (D1 组)、1 nmol/L 右美托咪定组 (D2 组)、10 nmol/L 右美托咪定组 (D3 组)、氧糖剥夺/复氧复糖组 (OGD/R 组)、右美托咪定 + 氧糖剥夺/复氧复糖组 (D + OGD/R 组)。CON 组正常培养; D1、D2、D3 组分别加入终浓度为 0.1、1、10 nmol/L 的右美托咪定; OGD/R 组和 D + OGD/R 组氧糖剥夺 6 h, 复氧复糖 24 h 制备氧糖剥夺/复氧复糖损伤模型; D + OGD/R 组于复氧复糖前加入终浓度 0.1 nmol/L 的右美托咪定处理 24 h。

1.4.3 构建氧糖剥夺—复氧复糖损伤模型 当细胞贴壁后, 将 OGD/R 组和 D + OGD/R 组完全培养液更换为无糖无血清培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 及 95% N₂ 的密闭小室中缺氧培养 6 h, 之后换成完全培养基, 复氧复糖培养 24 h, 制备氧糖剥夺/复氧复糖损伤模型。

1.4.4 细胞活力的测定 将 Huh-7 细胞接种于 96 孔板内, 处理结束后每组取 3 孔, 加入 5 g/L MTT 溶液 10 μ l 37 °C 孵育 4 h 后加入 150 μ l 二甲亚砜室温震荡 10 min, 采用 Synergy HT 型多功能酶标仪于波长 570 nm 和 630 nm 处测定 OD 值, 用 570 nm 处 OD 值减去 630 nm 处 OD 值反映细胞活力。

1.4.5 Western blot 法检测 SIRT1 的表达 CON 组和 D1 组 (根据 MTT 实验结果选择) PBS 洗 3 遍, 加入 RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白质后, 用 BCA 法进行蛋白质定量, 加上样缓冲液煮沸 10 min 变性, 以蛋白质 60 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳。转膜后, 用含 5% ~ 8% 脱脂奶粉的 TBST 室温慢摇封闭 3 h, 分别加入 β -actin 或 SIRT1 抗体。4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 对应加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (稀释浓度 1 : 10 000) 和羊抗鼠抗体 (稀释浓度 1 : 10 000), 室温慢摇孵育 1 h。洗膜后用 ECL 化学发光法检测蛋白表达量, 以 SIRT1 条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值反映 SIRT1 的表达水平。

1.4.6 Transwell 实验检测细胞迁移能力 DMEM 培养基饥饿 Huh-7 细胞 24 h 后, 重悬细胞悬液至浓度为 2×10^7 个/L。下室中加入含 30% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μ l, 上室中加入经过不同药物处理的细胞悬液 150 μ l, 放入孵箱中孵育 24 h, 每组设 2 个复孔。PBS 洗涤后, 4% 多聚甲醛固定 60 min, 风干加入 0.1% 结晶紫染色 25 min, PBS 洗涤 3 次。用棉签擦净上室里存留的液体, 在倒置显微镜下拍照且计数, 随机选择 4 个不同的视野进行统计学分

析。

1.4.7 动物分组及处理 SPF 级 BALB/c-nu 雄鼠 6 只, 4 ~ 6 周龄, 饲养于恒温恒湿、置于 12 h/12 h 昼夜交替的环境中, 自由摄取水和食物。采用随机数表法分裸鼠为 2 组 ($n = 3$): 对照组 (CON 组) 和右美托咪定组 (DEX 组)。将 Huh-7 细胞 (5×10^9 个/L) 皮下种植于裸鼠右侧腋窝下。待瘤体达 50 mm³ 时, DEX 组裸鼠连续 6 d 注射右美托咪定 (0.5 mg/kg) [6], CON 组连续 6 d 注射相应体积生理盐水, 每次注射前记录裸鼠的体质量和瘤体的大小。接种肿瘤细胞 30 d 后处死裸鼠, 取出瘤体记录相应的体积。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定对肝癌细胞活力的影响 MTT 比色法检测结果显示, 与对照组相比, 加药处理 24 h 后, D1、D2 和 D3 组的细胞活性上升 ($P < 0.05$), 且当右美托咪定浓度为 0.1 nmol/L 时, 人肝癌 Huh-7 的细胞活性最强 ($P < 0.01$)。因此选择 0.1 nmol/L 为本实验的最适浓度。见表 1。

表 1 右美托咪定对 Huh-7 细胞活力的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力相对表达量	F 值	P 值
CON	1.0 $\pm$ 0.00	—	—
D1	1.28 $\pm$ 0.03 **	67.586	0.007
D2	1.24 $\pm$ 0.01 **	67.586	0.006
D3	1.20 $\pm$ 0.03 *	67.586	0.034

与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 右美托咪定对肝癌迁移能力的影响 如图 1 所示, 0.1 nmol/L 右美托咪定作用于人肝癌 Huh-7 细胞 24 h 后, 穿膜的细胞数多于对照组。结果表明, 右美托咪定增强了人肝癌 Huh-7 细胞的体外迁移能力, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 右美托咪定后处理对肝癌细胞缺氧缺糖/复氧损伤的影响 如表 2 所示, 与对照组相比, OGD/R 组的细胞活力下降 ($P < 0.05$)。与 OGD/R 组相比, 0.1 nmol/L 的右美托咪定处理 24 h 可以减轻缺氧缺糖后复氧复糖造成的细胞损伤, 提高人肝癌细胞 Huh-7 的细胞活力 ($P < 0.05$)。

2.4 右美托咪定后处理对缺氧缺糖/复氧复糖损伤

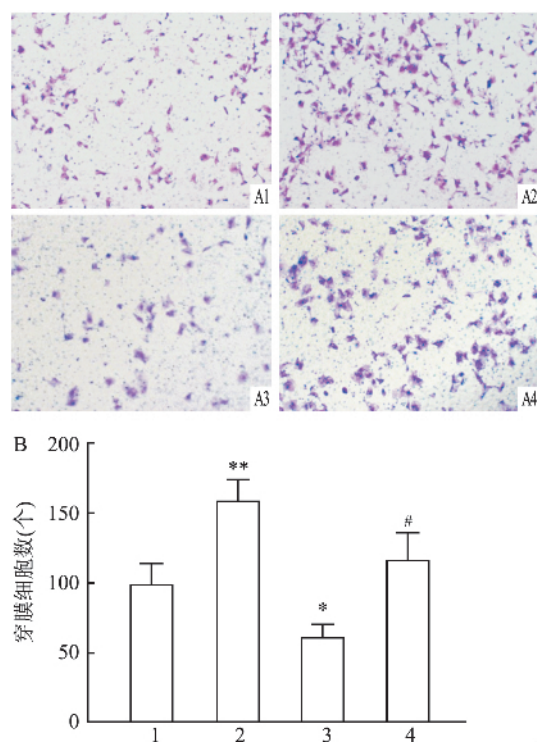


图1 右美托咪定对 Huh-7 细胞迁移能力的影响

A: Transwell 法评估 Huh-7 的迁移能力 $\times 200$; B: 穿过小室膜的细胞数目; 1: CON 组; 2: D1 组; 3: OGD/R 组; 4: D + OGD/R 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

表2 右美托咪定对 OGD/R 损伤后 Huh-7 细胞活力的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力相对表达量	F 值	P 值
CON	1.0 $\pm$ 0.00	—	—
OGD/R	0.64 $\pm$ 0.04*	8.768	0.026
D + OGD/R	0.82 $\pm$ 0.02#	8.768	0.037

与 CON 组比较: * $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

后肝癌细胞迁移能力的影响 如图1所示,与对照组相比,右美托咪定组穿膜的细胞数增多,而 OGD/R 组穿膜的细胞数相对减少。与 OGD/R 组相比,D + OGD/R 组穿膜的细胞数增加。结果表明,右美托咪定后处理可增强缺氧缺血/复氧损伤后人肝癌细胞的迁移能力($P < 0.05$)。

2.5 右美托咪定对 Huh-7 细胞 SIRT1 表达的影响

Western blot 结果显示,与 CON 组比较,D1 组 SIRT1 的蛋白表达量增加,而 OGD/R 损伤后 SIRT1 表达下降。加入 0.1 nmol/L 右美托咪定后处理 24 h 可以减弱 OGD/R 损伤造成的 SIRT1 的表达减低。提示右美托咪定可以上调 SIRT1 表达($P < 0.05$),右美托咪定促进人肝癌 Huh-7 细胞株增殖与迁移可能与 SIRT1 上调有关。见图2。

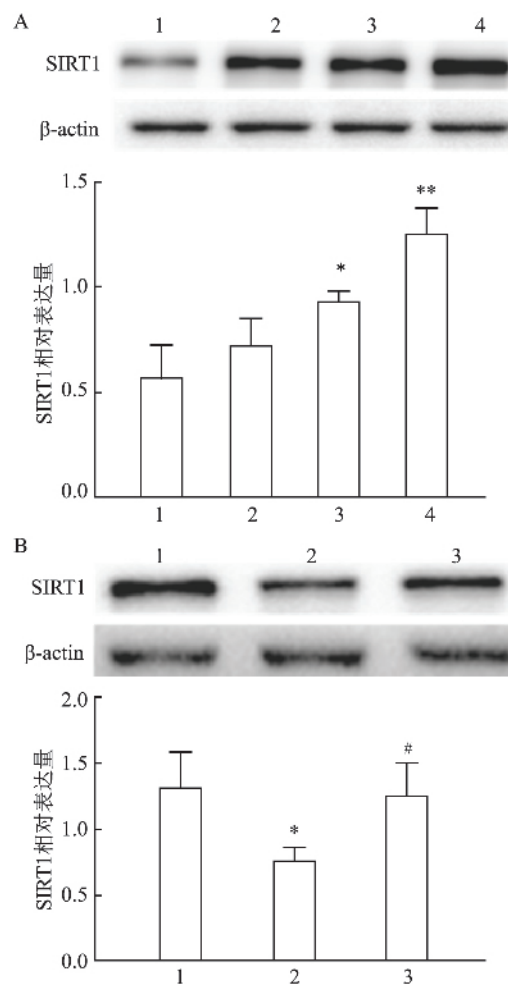


图2 右美托咪定对 Huh-7 细胞 SIRT1 表达的影响

A: Western blot 检测 Huh-7 细胞内 SIRT1 的表达; 1: CON 组; 2: D3 组; 3: D2 组; 4: D1 组; B: SIRT1 和 β -actin 的比值; 1: CON 组; 2: OGD/R 组; 3: D + OGD/R 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 组比较: # $P < 0.05$

2.6 右美托咪定对裸鼠肿瘤体积的影响 如图3所示,DEX 组裸鼠的体质量和肿瘤瘤体的大小较 CON 组无明显差异。

3 讨论

肝癌是世界第三大恶性肿瘤,近年来在世界范围内的发病率急剧增加。我国作为肝炎大国,每年新发肝癌患者占全球新发总数的 50%,发病率位列世界第一^[7]。尽管肝癌诊疗水平不断提高,手术切除仍是最主要治疗手段。外科干预可以通过多种途径影响肿瘤的转移和复发,而肿瘤的复发与转移已经成为影响肝癌患者术后远期预后的关键性因素。研究表明围术期麻醉药物,可以直接影响癌细胞增殖和细胞介导的免疫,从而间接干扰肿瘤的复发和

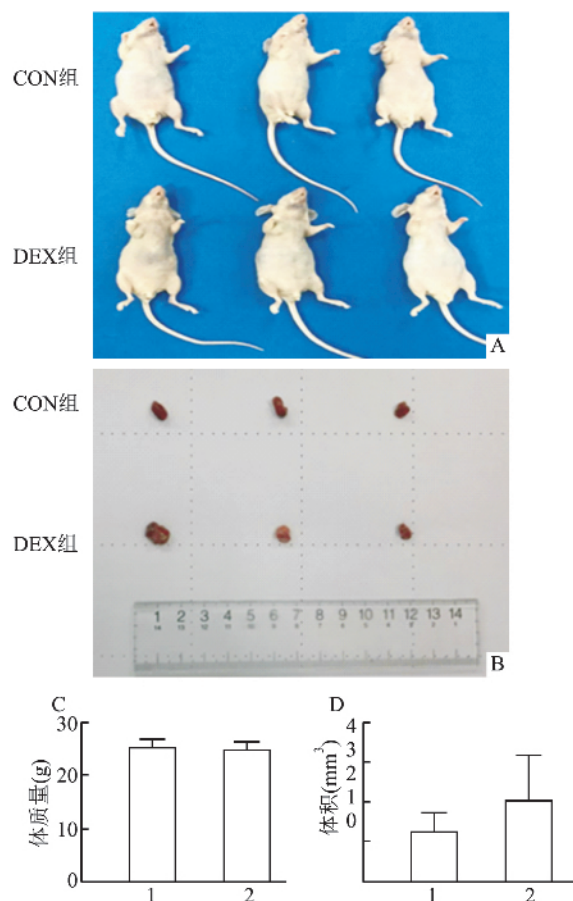


图3 右美托咪定对裸鼠瘤体大小的影响

A: 取出瘤体前裸鼠图片; B: 裸鼠处死后瘤体图片; C: 裸鼠体重; D: 裸鼠瘤体大小无明显差异; 1: CON 组; 2: DEX 组

转移^[8]。

右美托咪定作为一种常用的麻醉药物,研究显示其对肿瘤患者有双重作用。一方面,它可以治疗肿瘤引起的持续性疼痛、躁动和谵妄,为肿瘤患者提供新的治疗方案^[9]。另一方面,有研究^[10]指出右美托咪定可以通过改变上皮黏附因子表达,增加毛细血管通透性来影响肿瘤的扩散和转移。探寻右美托咪定对肝癌细胞的生物学行为的影响具有重要意义。在本研究中采用 MTT 法检测右美托咪定对人肝癌 Huh-7 细胞的影响,结果表明 0.1 nmol/L 的右美托咪定处理 24 h 对人肝癌 Huh-7 的促增殖效果最明显。并在体外缺氧缺糖模型中证实 0.1 nmol/L 右美托咪定后处理 24 h,可以逆转缺氧缺糖/复氧复糖造成的人肝癌细胞损伤。运用 Transwell 法检测右美托咪定对人肝癌细胞 Huh-7 迁移能力的影响,证实右美托咪定可以增强人肝癌 Huh-7 的迁移能力。Wang et al^[11]研究提示右美托咪定增强肿瘤细胞的增殖和转移能力,可能是通过增加 Ki67 蛋白和

细胞周期蛋白 D 的表达来完成。而陈泳花等^[12]研究表明右美托咪定通过下调 HIF-1 α 的蛋白表达来抑制由缺氧诱导的肝癌 MHCC97H 和 SMCC7721 细胞的增殖以及血管生成。这种差异可能是因为缺氧诱导的细胞线粒体损伤程度的不同所造成。

本研究裸鼠实验显示右美托咪定并不能增加裸鼠肿瘤的体积。Wang et al^[11]的研究同样证实右美托咪定不能增加 A549 细胞构建肿瘤大小。这可能是由于在体模型复杂的病理生理状态影响了右美托咪定的药理作用。同时观察时间较短(30 d)与样本量较小($n=3$)也造成了实验一定的局限性。

SIRT1 是 Sir2 的哺乳动物同源体,是高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶。SIRT1 可以调控细胞增殖、应激反应、维持基因稳定性和肿瘤的发生发展。但是 SIRT1 在肿瘤中的作用仍存在很大争议^[13]。有临床研究^[14]证实 SIRT1 高表达的患者,其肿瘤体积更大并且远期生存率更低。本实验采用 Western blot 法证实,右美托咪定促进人肝癌细胞 Huh-7 增殖和迁移的同时上调了 SIRT1 的表达。

综上,右美托咪定可以增强人肝癌 Huh-7 细胞增殖和迁移的能力,其分子机制可能与上调 SIRT1 表达有关。在后期研究中将进一步完善右美托咪定作用于人肝癌细胞的分子机制,为提高患者远期生存率提供新的思路。

参考文献

- [1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: globocan sources and methods [J]. Int J Cancer 2019, 144(8): 1941-53.
- [2] Wang Y, Lee M, Yu G, et al. CTHRC1 activates pro-tumorigenic signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(62): 105238-50.
- [3] Tedore T. Regional anaesthesia and analgesia: relationship to cancer recurrence and survival [J]. Br J Anaesth 2015, 115 Suppl 2: ii34-45.
- [4] Li A, Yuen V M, Goulay-Dufay S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intranasal and intravenous dexmedetomidine [J]. Br J Anaesth 2018, 120(5): 960-8.
- [5] Li Y, Wang B, Zhang L L, et al. Dexmedetomidine combined with general anesthesia provides similar intraoperative stress response reduction when compared with a combined general and epidural anesthetic technique [J]. Anesth Analg, 2016, 122(4): 1202-10.
- [6] Lavon H, Matzner P, Benbenishty A, et al. Dexmedetomidine promotes metastasis in rodent models of breast, lung, and colon cancers [J]. Br J Anaesth 2018, 120(1): 188-96.

- [7] Baldari S , Di Rocco G , Magenta A , et al. Extracellular vesicles-encapsulated microRNA-125b produced in genetically modified mesenchymal stromal cells inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation[J]. *Cells* 2019 , 8(12) : 219 – 30.
- [8] Byrne K , Levins K J , Buggy D J. Can anesthetic-analgesic technique during primary cancer surgery affect recurrence or metastasis [J]. *Can J Anaesth* 2016 , 63(2) : 184 – 92.
- [9] Menon D V , Wang Z , Fadel P J , et al. Central sympatholysis as a novel countermeasure for cocaine-induced sympathetic activation and vasoconstriction in humans [J]. *J Am Coll Cardiol* 2007 , 50(7) : 626 – 33.
- [10] Follain G , Osmani N , Azevedo A S , et al. Hemodynamic forces tune the arrest , adhesion , and extravasation of circulating tumor cells [J]. *Dev Cell* , 2018 , 45(1) : 33 – 52.
- [11] Wang C , Datto T , Zhao H , et al. Midazolam and dexmedetomidine affect neuroglioma and lung carcinoma cell biology *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anesthesiology* , 2018 , 129(5) : 1000 – 14.
- [12] 陈泳花 , 陈东泰 , 潘家浩 , 等. 右美托咪定对缺氧诱导人肝癌细胞增殖和血管生成的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)* 2017 , 38(2) : 229 – 36.
- [13] 柳 晓 , 徐 涛. SIRT1 与类风湿关节炎的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2019 , 54(9) : 1496 – 500.
- [14] Wei Z , Jia J , Heng G , et al. Sirtuin-1/mitochondrial ribosomal protein s5 axis enhances the metabolic flexibility of liver cancer stem cells [J]. *Hepatology* 2019 , 70(4) : 1197 – 213.

Effect of dexmedetomidine on proliferation and migration of Huh-7 human hepatocellular carcinoma cells

Yu Le^{1,2} , Huang Chunxia^{1,2} , Hu Jun^{1,2} , et al

(¹Key Laboratory of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes , Hefei 230601; ²Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

Abstract Objective To study whether dexmedetomidine could affect the proliferation and migration of Huh-7 human hepatocellular carcinoma cells and to investigate the potential molecular mechanism. **Methods** The experiment was divided into two parts: cells and animals. Firstly , Huh-7 cells were randomly classified into six groups: normal control (group CON) , dexmedetomidine 0.1 nmol/L (group D1) , dexmedetomidine 1 nmol/L (group D2) , dexmedetomidine 10 nmol/L (group D3) , group OGD/R , OGD/R with dexmedetomidine 0.1 nmol/L (group D + OGD/R) . Cells proliferation was measured by MTT assay. SIRT1 protein expression was assessed by Western blot. Transwell migration assay was used to detect the migration of Huh-7 cells. Secondly , the mouse xenograft model of hepatocellular carcinoma was established , and then randomly divided into 2 groups: group DEX and group CON. Normal saline or dexmedetomidine (0.5 mg/kg) was daily injected (s. c.) to the mice for six days in group CON or group DEX , respectively. Mice were euthanized after 30 days and the tumor size was recorded. **Results** Dexmedetomidine alone increased the cell viability of Huh-7 cells , and further improved the cell viability induced by OGD/R injury. On the other hand , the ability of migration was significantly increased by dexmedetomidine. Dexmedetomidine increased the expression of SIRT1 in normal condition and in OGD/R injury. However , there was no difference in tumor burden between group DEX and group CON. **Conclusion** Dexmedetomidine can affect the proliferation and migration of Huh-7 human hepatocellular carcinoma cells , in which SIRT1 may participate.

Key words dexmedetomidine; hepatocellular carcinoma; Huh-7; SIRT1