

吗啡与布托啡诺对肺腺癌细胞 A549 侵袭与迁移的影响

李彬^{1,2}, 薛昀^{1,2}

摘要 目的 分析吗啡与布托啡诺对肺腺癌细胞 A549 侵袭与迁移的影响及可能的作用机制。方法 人肺腺癌 A549 细胞随机分为吗啡组与布托啡诺组。每组均分别设置吗啡、布托啡诺与拮抗剂不同浓度。采用免疫组化法、Transwell 法、细胞划痕法评估吗啡与布托啡诺及其对应的拮抗剂对肺腺癌细胞 A549 侵袭与迁移及相关蛋白表达的影响及作用机制。结果 随着布托啡诺剂量的增加, A549 细胞侵袭数明显减少, 而随着吗啡剂量的增加, A549 细胞侵袭数明显增加 ($P < 0.05$); 随着布托啡诺剂量的增加及时间延长, A549 细胞迁移变化不明显, 而随着吗啡剂量的增加, A549 细胞迁移数明显增加 ($P < 0.05$); Nor-Binaltorphimine (Nor-BNI) 剂量为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时, A549 细胞侵袭数明显增加。与单纯布托啡诺组比较, 加入 Nor-BNI 后, 每组对应剂量的 A549 细胞侵袭数明显增加。与单纯吗啡组比较, 随着甲基纳曲酮剂量的增加, A549 细胞侵袭数明显减少。10 $\mu\text{mol/L}$ 布托啡诺作用肺腺癌 A549 细胞 24 h 后, 相关蛋白表达下调, 而吗啡作用后表达上调 ($P < 0.05$)。结论 吗啡可促进肺腺癌细胞 A549 的迁移与侵袭, 并上调 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达, 而布托啡诺则抑制肺腺癌细胞 A549 的迁移与侵袭, 并下调 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达。

关键词 肺腺癌细胞 A549; 吗啡; 布托啡诺; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)09-1392-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.015

目前肺癌主要的治疗方法为手术、化疗及生物靶向治疗等综合治疗, 而患者的主要死亡原因是肿瘤的复发和转移。研究^[1-2]表明, 阿片类药物对肿瘤的发展有一定的影响, 其中 μ 受体及其激动剂可能促进肿瘤生长; 而 κ 受体激动剂则抑制肿瘤生长。肿瘤患者在围术期镇痛及癌痛治疗中吗啡作为镇痛药物“金标准”被大量使用。吗啡为 μ 受体激动剂, 是否促进肿瘤的侵袭及迁移; 布托啡诺为 κ

受体激动剂是否抑制肿瘤的侵袭及迁移, 目前这一领域的研究资料还较少, 且研究方法不统一^[3-4]。同时新型的阿片类药物开始用于临床麻醉和镇痛, 对肿瘤的短期作用和长期影响亟待研究。该研究旨在探讨吗啡与布托啡诺对人肺腺癌细胞 A549 的侵袭及迁移的影响, 以及对相关蛋白表达的作用机制, 期望有助于优化临床用药习惯及改善肺癌患者术后生存。

1 材料与方法

1.1 实验对象及分组 人肺腺癌 A549 细胞购自中科院上海细胞库, 接种于培养板, 培养 24 h 后, 随机分为吗啡组与布托啡诺组。每组分别设置不同浓度组: 对照组 (生理盐水)、 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 。同时在吗啡组与布托啡诺组的基础上分别设置两组对应的特异性拮抗剂组: 吗啡 + 甲基纳曲酮, 布托啡诺 + Nor-Binaltorphimine (Nor-BNI); 盐酸吗啡注射液 (东北制药集团沈阳第一制药有限公司, $1 \text{ ml} : 10 \text{ mg}$, 国药准字 H20013351); 甲基纳曲酮 (上海意杰生物科技有限公司, 5 mg , 国药准字 A3596); 布托啡诺注射液 (江苏恒瑞医药股份有限公司, $2 \text{ ml} : 4 \text{ mg}$, 国药准字 H20143106); Nor-BNI (博奥派克生物, 10 mg , 货号 ab120078)。每组分别加入对应浓度药物后孵育 36 h, 检测其侵袭及迁移能力。

1.2 试剂与仪器 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Hyclone 公司; RPMI-1640 细胞培养液购自美国 Gibco-BRL 公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯) 购自江苏鸿声化工厂; Western blot 试剂 (抗体稀释液和抗体去除液)、免疫荧光试剂 (细胞核荧光染液 DAPI) 购自上海碧云天公司; ECL 发光液购自美国 Thermo Scientific 公司; 免疫组化试剂 (SP9000 通用型组化试剂盒、DAB 显色剂) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 苏木精、伊红等染色液及 Triton X-100 购自北京索莱宝生物公司; PVDF 膜 ($0.45 \mu\text{m}$) 购自美国 Millipore 公司; 3111 型 CO_2 培养箱、CLI7R 型冷冻高速离心机购自美国 Thermo Forma 公司; 低温冰箱购自台湾 SANYO 公司; SENCO R-201 旋转蒸发仪

2018-05-10 接收

基金项目: 重庆市科技计划项目 (编号: cstc2013jcyjA10023)

作者单位: ¹ 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000

² 重庆市涪陵中心医院麻醉科, 重庆 408000

作者简介: 李彬, 男, 硕士研究生;

薛昀, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: yunxue2010@hotmail.com

购自上海中顺生物科技有限公司; 细胞培养板和培养瓶购自丹麦 NUN CLON 公司; XPS-18 型倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; Western blot 检测系统与凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司; Leica Bond-Max 免疫组化仪购自北京昊诺斯科技有限公司(德国生产)。

1.3 Transwell 法检测细胞侵袭能力 将冻存于 -20°C 的 Matrigel 与无血清培养液 1:6 稀释, 每孔 $15\ \mu\text{l}$ 加入 Transwell 小室, 37°C 静置 1 h。转染 24 h 消化后, $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 1 min, 去上清液, 加入各组无血清培养液及 1×10^5 个细胞, 用 DMEM 稀释至 $400\ \mu\text{l}$, 每组设 3 个复孔。向小室下层加入含 10% FBS DMEM 的 $600\ \mu\text{l}$ 培养液, 培养在含 5% CO_2 , 37°C 恒温箱 24 h。然后吸去嵌室内液体, 用 PBS 洗 3 次, 加入 90% 乙醇固定 30 min, 吸出乙醇后 PBS 洗 2 次, 用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 风干后, 荧光显微镜下 ($\times 200$) 随机选择 5 个视野拍照并计平均数。

1.4 细胞划痕法检测细胞迁移 将 A549 细胞接种到 6 孔板, 细胞密度为铺满培养板 80% 时转染, 转染 6 h 后换液, 继续培养至细胞长满培养板, 用 $20\ \mu\text{l}$ 枪头垂直于细胞平面划痕, 用 PBS 洗 5 次, 洗去细胞残留, 更换培养基, 以划痕时间点记做 0 h, 每隔 12 h 拍照。各样品均取 5 个视野测量距离。细胞迁移率(%) = (0 h 时划痕距离 - 24 h 时划痕距离) / 0 h 时划痕距离 $\times 100\%$ 。

1.5 Western blot 实验 每组 1×10^7 个细胞, 加入预冷蛋白裂解液 $200\ \mu\text{l}$, 4°C 下裂解 1 h, 冰浴下超声裂解 15 min, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 20 min, 上清液用 BCA 定量试剂盒测定基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-2、MMP-9、成束蛋白(Fascin) 的浓度。

利用 8% SDS-PAGE 电泳 $50\ \mu\text{g}$ 总蛋白, 转膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入 1:1 000 稀释的小鼠抗人单克隆抗体, 4°C 孵育 12 h。接着 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入 1:3 000 稀释的山羊抗小鼠 HRP 标记二抗, 重复以上清洗, 最后采用 Pierce 公司生产的超敏 ECL 试剂暗室曝光检测蛋白条带。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 每组侵袭迁移情况、MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 布托啡诺和吗啡对 A549 细胞侵袭能力的影响 与对照组比较, 随着布托啡诺剂量的增加, A549 细胞侵袭数明显减少, 而随着吗啡剂量的增加 A549 细胞侵袭数明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明布托啡诺可抑制肺腺癌细胞的侵袭能力, 而吗啡反之。见图 1。

2.2 各组细胞培养 0、12、24 h 的迁移情况比较 与对照组比较, 随着布托啡诺剂量的增加及时间延长, A549 细胞迁移变化不明显, 而随着吗啡剂量的增加 A549 细胞迁移数明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明布托啡诺可抑制肺腺癌细胞的迁移能力, 而吗啡反之。见表 1 和图 2、3。

表 1 各组细胞迁移率的比较 ($n=6$, % $\bar{x} \pm s$)

组别	对照组	0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$	1 $\mu\text{mol}/\text{L}$	10 $\mu\text{mol}/\text{L}$
吗啡	10.23 \pm 0.56	68.34 \pm 2.31*	76.25 \pm 2.45*#	91.02 \pm 2.65*# Δ
布托啡诺	4.03 \pm 0.24	3.12 \pm 0.13*	2.22 \pm 0.11*#	1.02 \pm 0.08*# Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 比较: # $P < 0.05$; 与 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 比较: $\Delta P < 0.05$

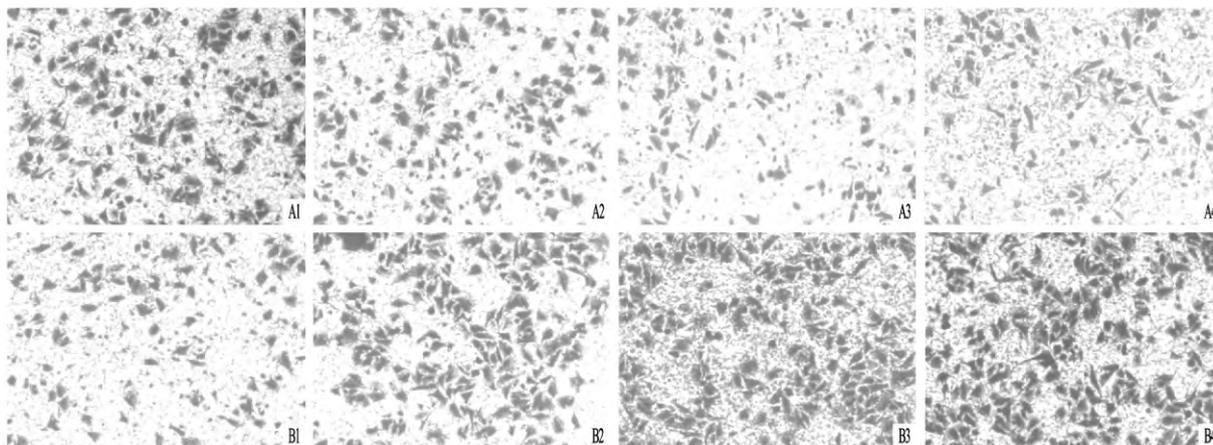


图 1 布托啡诺与吗啡对 A549 细胞侵袭能力的影响 $\times 200$

A: 布托啡诺; B: 吗啡; 1: 对照组; 2: 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$; C: 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$; D: 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$

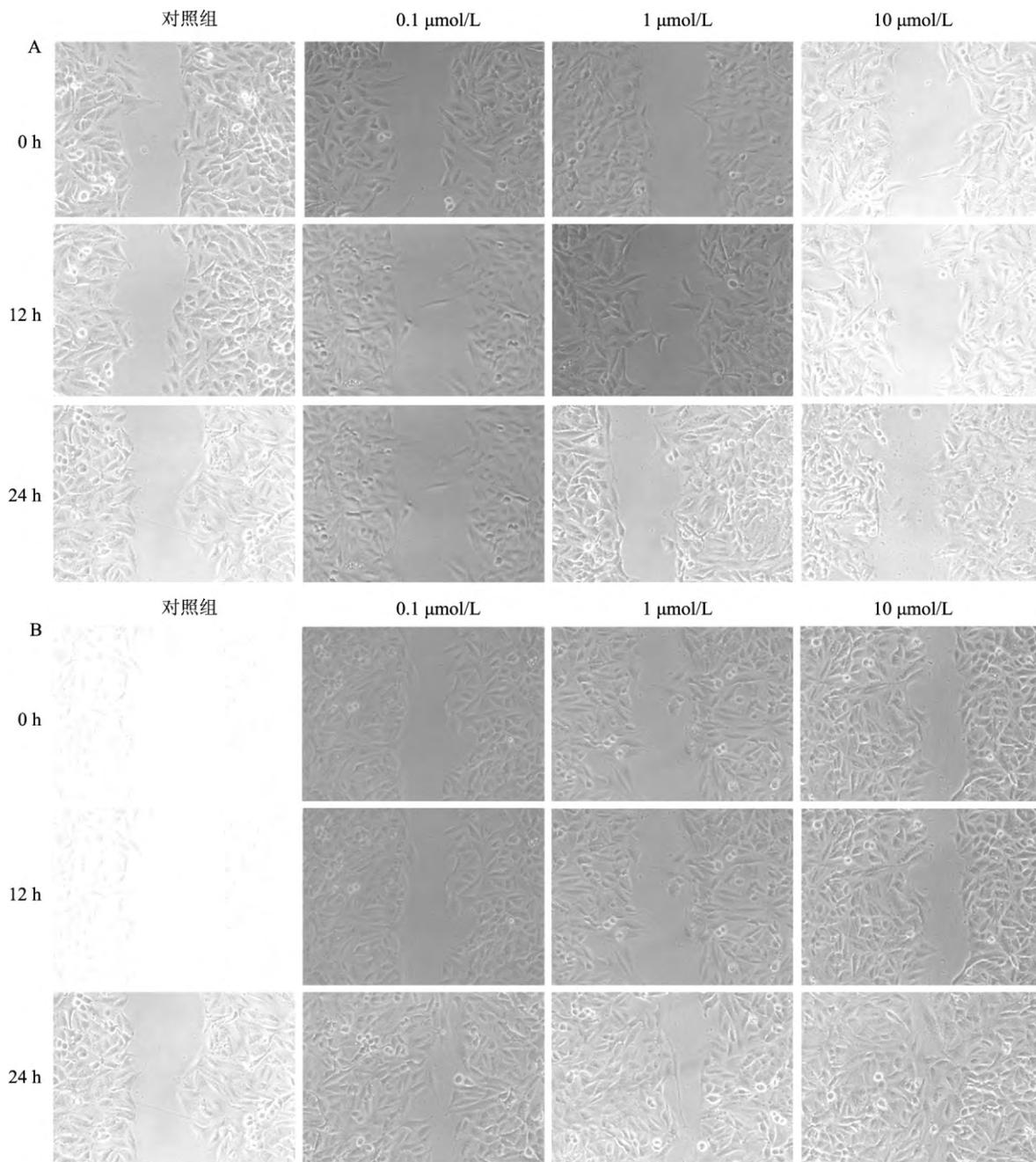


图2 各组细胞培养0、12、24 h 的迁移情况比较 ×100

A: 布托啡诺; B: 吗啡

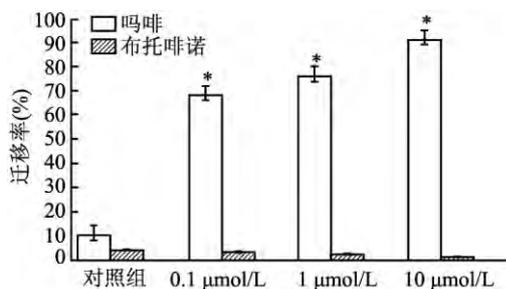


图3 各组细胞迁移率的比较

2.3 Transwell 法检测加入拮抗剂各组的侵袭能力

与对照组比较,随着布托啡诺特异性拮抗剂 Nor-BNI 剂量为 0.1 μmol/L 时, A549 细胞侵袭数明显增加,而 1 μmol/L 与 10 μmol/L 的剂量变化不明显。与单纯布托啡诺组对应的剂量比较,可明显观察到加入 Nor-BNI 后,每组对应剂量的 A549 细胞侵袭数明显增加。与单纯吗啡组对应的剂量比较,随着吗啡特异性拮抗剂甲基纳曲酮剂量的增加, A549

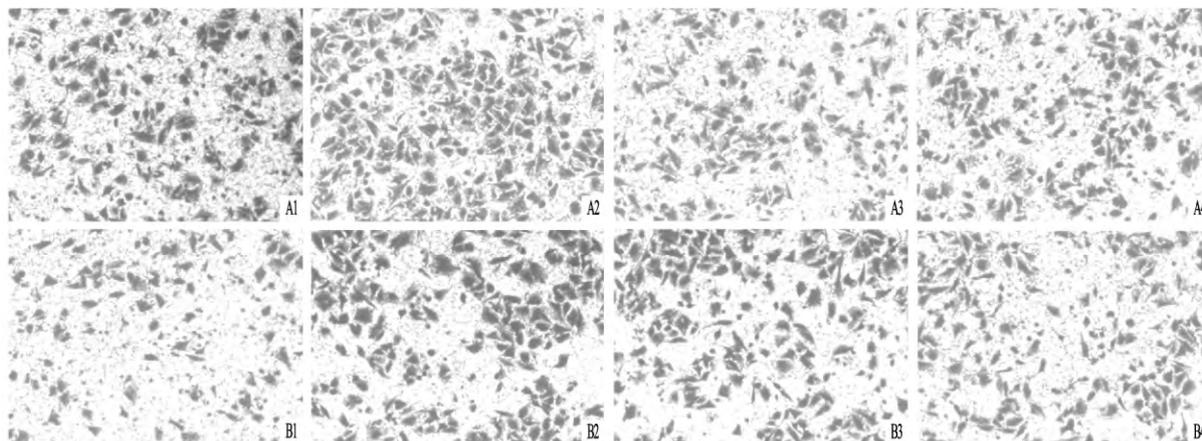


图4 Transwell 实验检测培养 24 h 布托啡诺 + Nor-BNI 与吗啡 + 甲基纳曲酮对 A549 细胞侵袭能力的影响 ×200
A: 布托啡诺 + Nor-BNI; B: 吗啡 + 甲基纳曲酮; 1: 对照组; 2: 0.1 μmol/L; C: 1 μmol/L; D: 10 μmol/L

细胞侵袭数明显减少。结果表明布托啡诺可抑制肺腺癌细胞的侵袭能力,而吗啡反之。见图 4。

2.4 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白的表达 与对照组比较,10 μmol/L 布托啡诺作用肺腺癌 A549 细胞 24 h 后, MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达下调,而吗啡作用后 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明布托啡诺可以抑制肺腺癌细胞的迁移能力,而吗啡反之。见图 5、6、表 2。

表 2 10 μmol/L 布托啡诺与吗啡作用肺腺癌 A549 细胞 24 h 后 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白的表达 ($\mu\text{g/L}$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

项目	MMP-2	MMP-9	Fascin
对照	0.89 ± 0.05	1.03 ± 0.07	1.12 ± 0.09
10 μmol/L 吗啡	1.07 ± 0.08	1.22 ± 0.09	1.35 ± 0.11
10 μmol/L 布托啡诺	0.57 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.93 ± 0.05
t_1 值	3.305	2.886	2.925
P_1 值	0.030	0.045	0.043
t_2 值	9.505	3.222	2.860
P_2 值	0.001	0.032	0.046

t_1 、 P_1 : 10 μmol/L 吗啡与对照组比较; t_2 、 P_2 : 10 μmol/L 布托啡诺与对照组比较

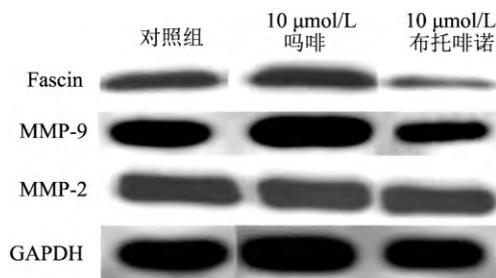


图 5 Western blot 法检测各稳定转染细胞系 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白的表达

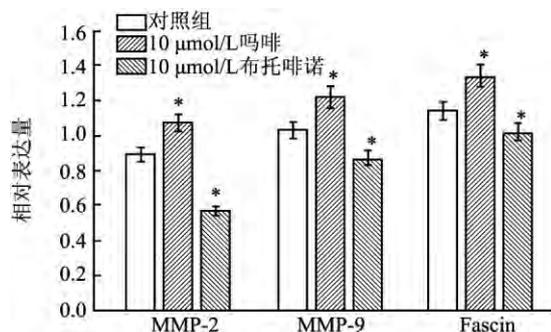


图 6 10 μmol/L 布托啡诺与吗啡作用肺腺癌 A549 细胞 24 h 后 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白的表达

3 讨论

研究^[5]显示术后阿片类药物的使用可能会增加癌症的复发,降低 I 期和 IIa 期非小细胞型肺癌 (NSCLC) 患者的存活率。另一项研究^[6]也表明术后 μ 受体激动剂可降低整体生存率和早期 NSCLC 患者的无病生存时间。然而, Cata et al^[7]却发现静脉或者硬膜外镇痛的 NSCLC 患者在 2 年或 5 年生存率方面没有显著差异。目前,阿片类受体激动剂是目前最常用的癌症慢性疼痛及围手术期的止痛药,如吗啡为阿片 μ 受体激动药,而布托啡诺则是 κ 受体激动剂。对于 μ 受体激动剂而言,一方面可通过抑制机体免疫力,同时促进术后残留癌细胞的存活而增加癌症复发率;对于 κ 受体激动剂而言,可能通过降低肺癌细胞糖原合成激酶 3 β 的磷酸化从而抑制 NSCLC 细胞生长^[8]。近年来,阿片类镇痛药

物对肺癌的作用机制受到国内外关注,但争议较大^[9]。研究^[10]显示吗啡、布托啡诺等对肿瘤转移和侵袭有一定的影响,并表明不同的麻醉药物及浓度对不同类型的肿瘤细胞的影响差异较大。本研究显示,随着吗啡浓度的增加对促进肺腺癌细胞 A549 的侵袭和迁移能力逐渐增强。

目前 MMP 家族中明胶酶 MMP-2、MMP-9 是研究较普遍的 2 种^[8]。研究^[9]表明, MMP-2、MMP-9 的表达对肿瘤的侵袭和转移有影响。吗啡在肿瘤细胞侵袭和迁移中的作用仍存在较多争议,有促进或抑制转移侵袭的结果^[11],而布托啡诺多用于胃癌、肝癌、食管癌等术后自控镇痛、镇静,在肿瘤的转移和侵袭方面国内没有相关报道。本研究显示,吗啡促进肺腺癌细胞 A549 的侵袭和迁移,并上调了 MMP-2、MMP-9 的表达;而布托啡诺反之,这与阿片类药物 μ 受体及其激动剂可能促进肿瘤生长;而 κ 受体激动剂则抑制肿瘤生长较一致。成束蛋白 Fascin 在脑、卵巢等组织中呈高表达,其在不同类型细胞中表达不同^[12]。韩铁鹏等^[13]发现无论鳞癌还是腺癌, Fascin 蛋白高表达与肿瘤的分期、淋巴结转移和患者预后显著相关,而且 Fascin 蛋白高表达是早期 NSCLC 患者预后的独立危险因素。本研究显示,吗啡明显上调了肺腺癌细胞 A549 中 Fascin 蛋白的表达;而布托啡诺反之,而具体的作用机制需研究药物作用的药代动力学、靶点相关基因表达及相关蛋白受体的表达,阿片 μ 受体的多态性,同时学习 μ 受体和 κ 受体表达的表达式对于不同患者肺癌预后的影响^[11]。

Oosten et al^[14]研究了癌症患者吗啡代谢的药代动力学表明,血药浓度与治疗结果呈正相关性。Afsharimani et al^[15]认为所用模型间差异导致目前吗啡对癌细胞转移和侵袭性的差异性结论。本研究显示,吗啡促进肺腺癌细胞 A549 的侵袭和迁移,而布托啡诺反之,这与阿片类药物 μ 受体及其激动剂可能促进肿瘤生长,而 κ 受体激动剂则抑制肿瘤生长较一致。这不排除其是共同作用的通路,但具体机制仍有待进一步研究。同时,本研究在不同浓度的吗啡与布托啡诺中加入对应的特异性拮抗剂,显示布托啡诺可抑制肺腺癌细胞的侵袭能力,而吗啡反之。

综上所述,吗啡可促进肺腺癌细胞 A549 的迁移与侵袭,而布托啡诺则抑制肺腺癌细胞 A549 的迁移与侵袭,可能与 MMP-2、MMP-9、Fascin 蛋白表达相关,但具体机制有待进一步探究。

参考文献

- [1] Mo D, Yang D, Xiao X, et al. MiRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma cell invasion and migration by targeting N-cadherin [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(5): 701-10.
- [2] Song S G, Yu H Y, Ma Y W, et al. Inhibition on Numb/Notch signal pathway enhances radiosensitivity of lung cancer cell line A549 [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10): 1-15.
- [3] 夏明, 张咏梅, 段满林, 等. 麻醉药物对乳腺癌细胞生长和转移作用的研究进展 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(8): 816-8.
- [4] 周成茂, 阮林. 阿片类受体与肝癌关系的研究进展 [J]. *山东医药*, 2015, 55(45): 93-4.
- [5] Maher D P, Wong W, White P F, et al. Association of increased postoperative opioid administration with non-small-cell lung cancer recurrence: a retrospective analysis. [J]. *Br J Anaesth*, 2014, 113(7): i88-i94.
- [6] Kai W, Xiao Q, Ying W, et al. Effect of mu agonists on long-term survival and recurrence in nonsmall cell lung cancer patients [J]. *Medicine*, 2015, 94(33): e1333-41.
- [7] Cata J P, Gottumukkala V, Thakar D, et al. Effects of postoperative epidural analgesia on recurrence-free and overall survival in patients with nonsmall cell lung cancer [J]. *J Clin Anesth*, 2014, 26(1): 3-17.
- [8] Lee M M, Chen Y Y, Liu P Y, et al. Pipoxolan inhibits CL1-5 lung cancer cells migration and invasion through inhibition of MMP-9 and MMP-2 [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 236: 19-30.
- [9] Chen G, Yue Y, Qin J, et al. Plumbagin suppresses the migration and invasion of glioma cells via downregulation of MMP-2/9 expression and inactivation of PI3K/Akt signaling pathway *in vitro* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 134(1): 59-67.
- [10] Kuzumaki N, Suzuki A, Naria M, et al. Effect of κ -opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(6): 1148-52.
- [11] Piegeler T, Schlöpfer M, Dull R O, et al. Clinically relevant concentrations of lidocaine and ropivacaine inhibit TNF α -induced invasion of lung adenocarcinoma cells *in vitro* by blocking the activation of Akt and focal adhesion kinase [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(5): 784-91.
- [12] Qin Y, Xu S Q, Pan D B, et al. Silencing of WWP2 inhibits ad-

- hesion, invasion, and migration in liver cancer cells [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(5): 6787–99.
- [13] 韩铁鹏, 杨磊, 谭金晶, 等. Fascin 蛋白在早期非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2017, 33(1): 36–40.
- [14] Oosten A W, Abrantes J A, Jönsson S, et al. A prospective population pharmacokinetic study on morphine metabolism in cancer patients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56(7): 733–46.
- [15] Afsharimani B, Doornebal C W, Cabot P J, et al. Comparison and analysis of the animal models used to study the effect of morphine on tumour growth and metastasis [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(2): 251–9.

Effects of morphine and butorphanol on the invasion and migration of lung adenocarcinoma A549 cells

Li Bin^{1,2}, Xue Yun^{1,2}

(¹*School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000;*

²*Dept of Anesthesiology, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000)*

Abstract Objective To investigate the effect of morphine and butorphanol on the invasion and migration of lung adenocarcinoma A549 cells and its possible mechanism. **Methods** Human lung adenocarcinoma A549 cells were randomly divided into morphine group and butorphanol group. Each group was given different concentrations of morphine, butorphanol and antagonists. The influence of morphine, butorphanol and their corresponding antagonists on the invasion and migration of lung adenocarcinoma A549 cells was evaluated by immunohistochemistry, Transwell assay and cell scratch assay. **Results** With the increase of butorphanol dose, the number of invasiveness of A549 cells decreased significantly, while with the increase of morphine dose, the invasion number of A549 cells increased significantly ($P < 0.05$). With the increase of dose of butorphanol and the prolongation of time, the migration of A549 cells was not obvious. However, the migration of A549 cells was significantly increased with the increase of morphine dose ($P < 0.05$). When the dose of Nor-binaltorphimine (Nor-BNI) was $0.1 \mu\text{mol/L}$, the invasion of A549 cells was significantly increased. Compared with simple butorphanol group, the invasion number of A549 cells in each group significantly increased after addition of Nor-BNI. Compared with simple morphine group, with the increase of methylnaltrexone dose, the invasion number of A549 cells decreased obviously. After treated with $10 \mu\text{mol/L}$ butorphanol for 5 days, A549 cells were down-regulated, while up-regulated after morphine treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Morphine can promote the migration and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and up-regulate the expression of MMP-2, MMP-9 and Fascin protein, while butorphanol inhibits the migration and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and down-regulates the expression of MMP-2, MMP-9, Fascin protein expression.

Key words lung adenocarcinoma A549; morphine; butorphanol; invasion; migration