doi:10.11659/jjssx.05E022101

·基础研究·

# 顺阿曲库铵对肺腺癌细胞 A549 的影响

闪雅惠,邓梅毓,郭志青,雷雪超,梁国彩 (河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科,河北 张家口 075000)

[摘 要] **目的** 探讨顺阿曲库铵(Cisat)对肺腺癌细胞增殖、侵袭及凋亡的影响。**方法** Cisat 处理肺腺癌细胞 A549,CCK-8 法检测细胞活力;克隆形成实验检测细胞增殖能力;流式细胞仪检测细胞凋亡情况,JC-1 检测线粒体膜电位(MMP)变化;Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力;Western blot 检测 caspase-3、caspase-9、c-Myc、p21、Bax、Bcl-2、血管内皮生长因子(VEGF)、纤连蛋白和波形蛋白的表达。**结果** 选择 0 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L Cisat 进行后续实验。与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 40 μmol/L组和 Cisat 80 μmol/L 组 A549 细胞克隆形成率明显降低($P<0.05$),细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),MMP 下降($P<0.05$),cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-9/caspase-9、Bax/Bcl-2 比值及 p21 的表达显著上调($P<0.05$),c-Myc、VEGF、纤连蛋白和波形蛋白表达显著下调($P<0.05$),细胞侵袭数显著减少($P<0.05$)。Cisat 20 μmol/L 组各指标与 Cisat 0 μmol/L 组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** Cisat 可抑制肺腺癌细胞 A549 的增殖、侵袭能力,并能够通过降低 MMP 诱导细胞凋亡。

[关键词] 肺癌;A549;顺阿曲库铵;线粒体膜电位;增殖;侵袭;凋亡
[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-26

## Effect of cisatracurium on lung adenocarcinoma cell A549

SHAN Ya-hui, DENG Mei-yu, GUO Zhi-qing, LEI Xue-chao, LIANG Guo-cai (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of cisatracurium (Cisat) on the proliferation, invasion and apoptosis of lung adenocarcinoma cells. **Methods** The lung adenocarcinoma cell A549 was treated by Cisat. The cell viability was detected by CCK-8; the cell proliferation ability was detected by clone formation experiment; the cell apoptosis was detected by flow cytometry; the mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by JC-1; the cell invasion ability was detected by Transwell invasion experiment; the expression of casepase-3, caspase-9, c-Myc, p21, Bax, Bcl-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), fibronectin and vimentin were detected by Western blot. **Results** Cisat of 0 μmol/L, 20 μmol/L, 40 μmol/L and 80 μmol/L were selected for subsequent experiments. Compared with the Cisat 0 μmol/L group, the clone formation abilities of the Cisat 40 μmol/L group and the Cisat 80 μmol/L group were significantly decreased ($P<0.05$), the cell apoptosis rates were significantly increased ($P<0.05$), and the MMPs were decreased ($P<0.05$), the ratios of cleaved caspase-3/caspase-3, cleaved caspase-9/caspase-9, Bax/Bcl-2 and the expression of p21 were significantly up-regulated ($P<0.05$), the expression of c-Myc, VEGF, fibronectin and vimentin were significantly down-regulated ($P<0.05$), and the numbers of cell invasion ratios of significantly reduced ($P<0.05$). There was no significant difference in each index between the Cisat 20 μmol/L group and the Cisat 0 μmol/L group ($P>0.05$). **Conclusion** Cisat can inhibit the proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cell A549, and induce cell apoptosis by reducing MMP.

**Keywords:** lung cancer; A549; cisatracurium; mitochondrial membrane potential; proliferation; invasion; apoptosis

肺癌是导致癌症相关死亡的主要原因之一,其发病率和病死率近年来不断增加[1]。其中,非小细胞肺癌是最常见的肺癌组织学类型,占肺癌的 84%,主要包括肺鳞状细胞癌和肺腺癌两种亚型[2]。根治性切除被认为是早期肺腺癌的首选治疗方法,但仍存在一定的复发风险以及远处转移[3]。近年来,越来越多的癌症患者接受手术和麻醉以治疗癌症和控制疼痛[4]。顺阿曲库铵(cisatracurium,Cisat)是一种新开发的非去极化肌松药,已广泛应用于临床麻醉。Cisat 的松弛强度为阿曲库铵的 4~5 倍,具有疗效好、毒性低、代谢不依赖肝肾等特点,已成为最理想的肌松药[5]。最近研究发现,Cisat 在癌症的发展进程中发挥着重要作用,Yang 等[6]研究证实 Cisat 对乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移具有抑制作用;Xia 等[7]的研究结果证明 Cisat 可通过抑制 TGF-β/SMAD2/3 信号通路的激活从而抑制结肠癌进展。但是,对于 Cisat 在肺腺癌进展中的作用目前尚不清楚。因此,本研究主要探讨 Cisat 对肺腺癌 A549 细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响,以期为临床肺癌的治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

Cisat(批号:20200810)购自江苏东英药业有限公司;结晶紫、CCK-8 试剂盒、线粒体膜电位(mitochon-

[基金项目] 中国宋庆龄基金会呼吸疾病专项项目(2018MZFZY-003)
[通信作者] 闪雅惠,E-mail:newclass11@126.com

drial membrane potential,MMP)检测试剂盒(JC-1)购自美国 sigma 公司;RPMI 1640 培养基(批号:22400097)、FBS(批号:12664025C)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;caspase-3(批号:ab184787)、caspase-9(批号:ab184786)、Bax(批号:ab32503)、Bcl-2(批号:ab32124)、纤连蛋白(批号:ab268020)和 GAPDH(批号:ab181602)抗体购自英国 Abcam 公司;抗波形蛋白(批号:bs-8533R)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(批号:bs-34032R)、c-Myc(批号:bs-4963R)、p21(批号:bsm-60698R)抗体购自北京博奥森公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(批号:ZB-2301)购自北京中杉金桥公司;Transwell 小室(带基质)购自美国 BD 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司。

### 1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞系 A549 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海),将细胞置于含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37 ℃、含 5% $CO_2$ 的湿润条件下培养。

### 1.3 CCK-8 法检测细胞活力

将 A549 细胞以 $1\times10^3$ 个/孔的密度接种到 96 孔板中,加入不同浓度(1.25 μmol/L、2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L、160 μmol/L、320 μmol/L)的 Cisat。培养 24 h 后,加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,37 ℃孵育 2 h,酶标仪读取 450 nm 波长处的 OD 值。计算细胞存活率,细胞存活率 =(加药组细胞 OD 值/0 μmol/L 细胞 OD 值)×100%。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

### 1.4 克隆形成实验检测细胞增殖能力

将 Cisat 20 μmol/L、40 μmol/L 和 80 μmol/L 孵育的 A549 细胞稀释后缓慢加入并分散于细胞培养板上。培养 14 d 后,PBS 洗涤细胞 2 次,甲醇固定细胞,0.1% 结晶紫染色。然后对可见菌落进行计数。

### 1.5 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡

将 Cisat 20 μmol/L、40 μmol/L 和 80 μmol/L 孵育的 A549 细胞用 PBS 调整细胞浓度为 $5\times10^5$ 个/孔,并接种至 12 孔板,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 染色液,室温避光孵育 15 min,使用 BD FACSAria Ⅱ流式细胞仪对样品进行分析,Flow Jo 7.6 软件分析结果。

### 1.6 流式 JC-1 检测 MMP[8]

将 Cisat 20 μmol/L、40 μmol/L 和 80 μmol/L 孵育的 A549 细胞用 PBS 调整细胞浓度至 $1\times10^6$/mL,加入终浓度为 10 μg/mL 的 JC-1,于 37 ℃细胞培养箱内孵育 20 min,每隔 5 min 颠倒混匀,PBS 洗涤 3 次,使用 BD FACSAria Ⅱ流式细胞仪对样品进行分析,激发波长为 488 nm,用 Flow Jo 7.6 软件分析结果。

### 1.7 Western blot 检测蛋白表达

将 Cisat 20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 处理的 A549 细胞用 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白。BCA 测定蛋白浓度并调平,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(80 V,40 min;120 V,1 h)分离蛋白,并将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 5% 的脱脂牛奶在 TBST 中封闭 2 h 后,加入一抗 caspase-3、caspase-9、c-Myc、p21、Bax、Bcl-2、VEGF、纤连蛋白和波形蛋白(均按 1∶1 000 的比例稀释),于 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶3 000),37 ℃孵育 1 h,洗膜后 ECL 曝光成像并用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

### 1.8 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力

细胞侵袭通过涂有基质的 Transwell 小室确定。在无血清培养基中,将 Cisat 20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L孵育的 A549 细胞以 $2\times10^4$ 个/孔的密度接种到 Transwell 的上室中。Transwell 的下室装有含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。37 ℃下孵育 48 h 后,用棉签剥离 Transwell 顶部未侵袭的细胞,而 Transwell 下部的侵袭细胞则用 4% 多聚甲醛固定 20 min,然后用 1% 结晶紫染色 15 min。在光学显微镜(Olympus)下随机选择 5 个区域对入侵的细胞进行计数。

### 1.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计数据分析。所有实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析数据。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的 Cisat 对 A549 细胞活力的影响

A549 细胞活力随 Cisat 浓度的增加而降低,Cisat 浓度为 0 μmol/L 时,A549 的细胞活力为 100%,Cisat 浓度为 40 μmol/L 时,A549 细胞活力显著下降($P<0.05$),见图 1。因此,选择 0 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L 和 80 μmol/L Cisat 进行后续实验。

### 2.2 Cisat 对 A549 细胞克隆形成的影响

与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 40 μmol/L 组和 Cisat 80 μmol/L 组 A549 细胞克隆形成率显著降低($P<0.05$),而 Cisat 20 μmol/L 组无明显变化($P>0.05$),见图 2。

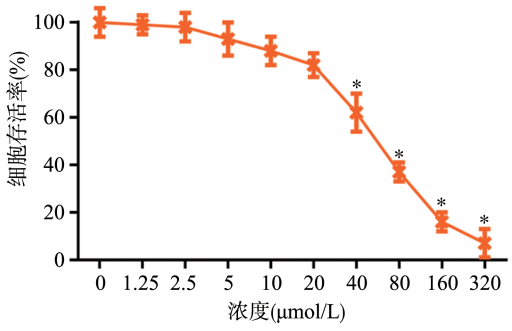
### 2.3 Cisat 对 A549 细胞凋亡的影响

与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 40 μmol/L 组和

Cisat 80 μmol/L 组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),而Cisat 20 μmol/L 组无显著变化($P>0.05$),见图 3a。Cisat 0 μmol/L组 JC-1 红绿荧光比值接近 100%,与之相比,Cisat 20 μmol/L 组红绿荧光比值无明显变化,Cisat 40 μmol/L组和 Cisat 80 μmol/L 组 JC-1 红绿荧光比值明显降低,即 MMP 显著降低,见图 3b。

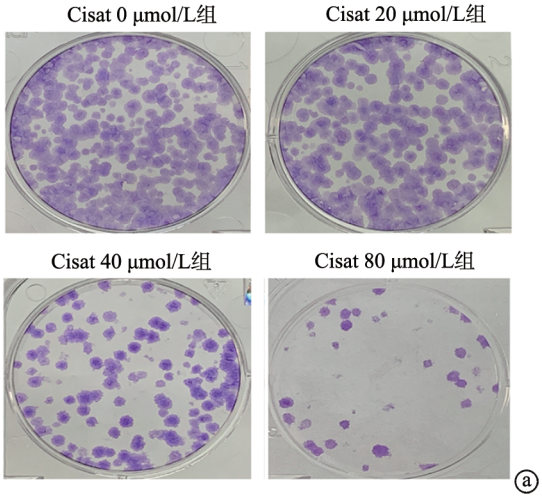
### 2.4　Cisat 对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

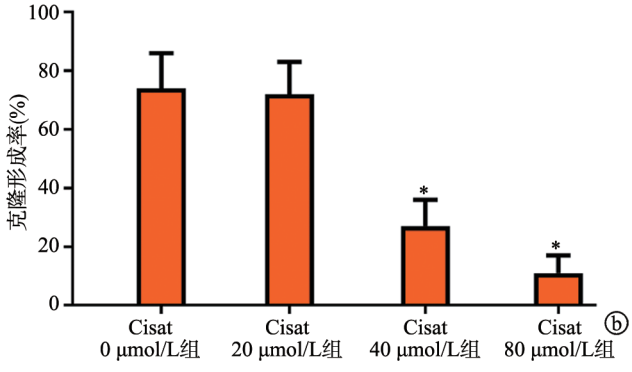
与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 40 μmol/L 组和 Cisat 80 μmol/L 组 cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-9/caspase-9、Bax/Bcl-2 比值及 p21 的表达均显著上调($P<0.05$),c-Myc 的表达显著下调($P<0.05$),而 Cisat 20 μmol/L 组无显著变化($P>0.05$),见图 4。




*:与 0 μmol/L 相比,$P<0.05$

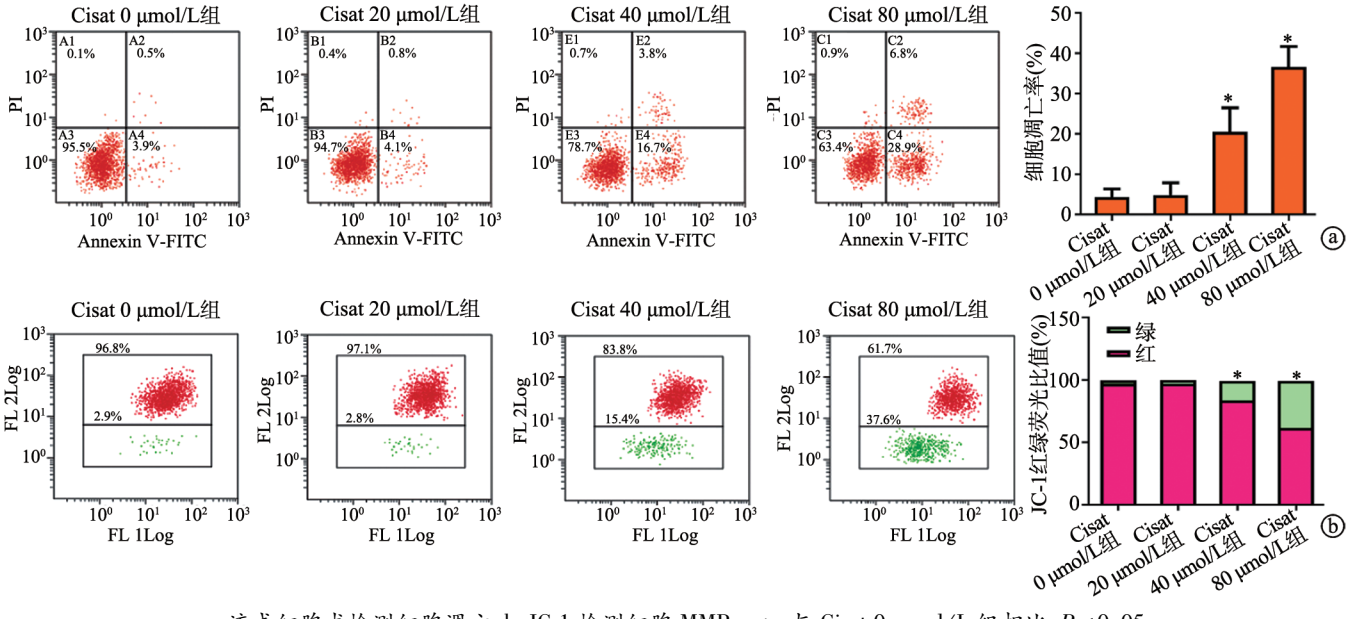
**图 1　CCK-8 法检测 A549 细胞活力**




a:克隆形成实验检测 A549 细胞增殖;b:各组细胞克隆形成率统计　*:与 Cisat 0 μmol/L 组相比,$P<0.05$

**图 2　各组细胞增殖情况**

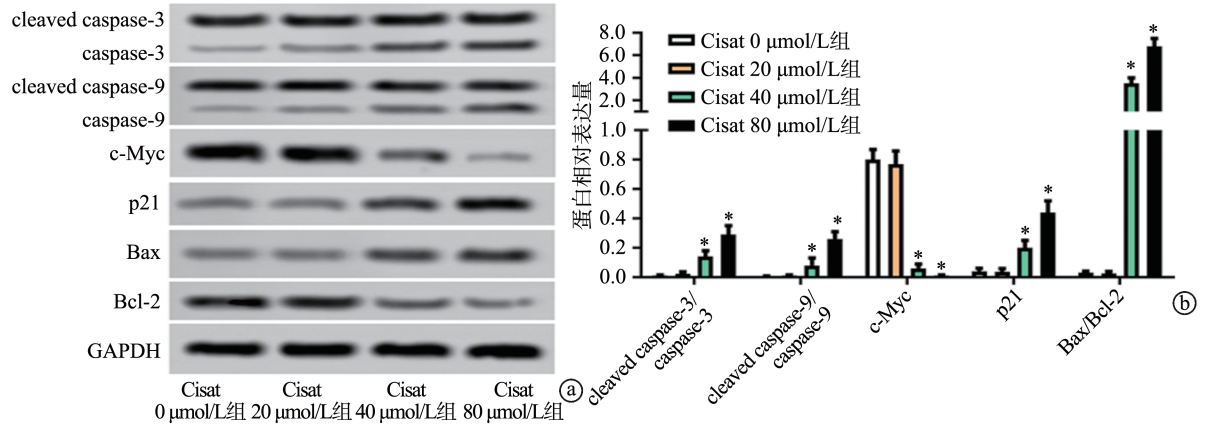



a:流式细胞术检测细胞凋亡;b:JC-1 检测细胞 MMP　*:与 Cisat 0 μmol/L 组相比,$P<0.05$

**图 3　流式细胞仪分析 A549 细胞凋亡情况和 MMP**

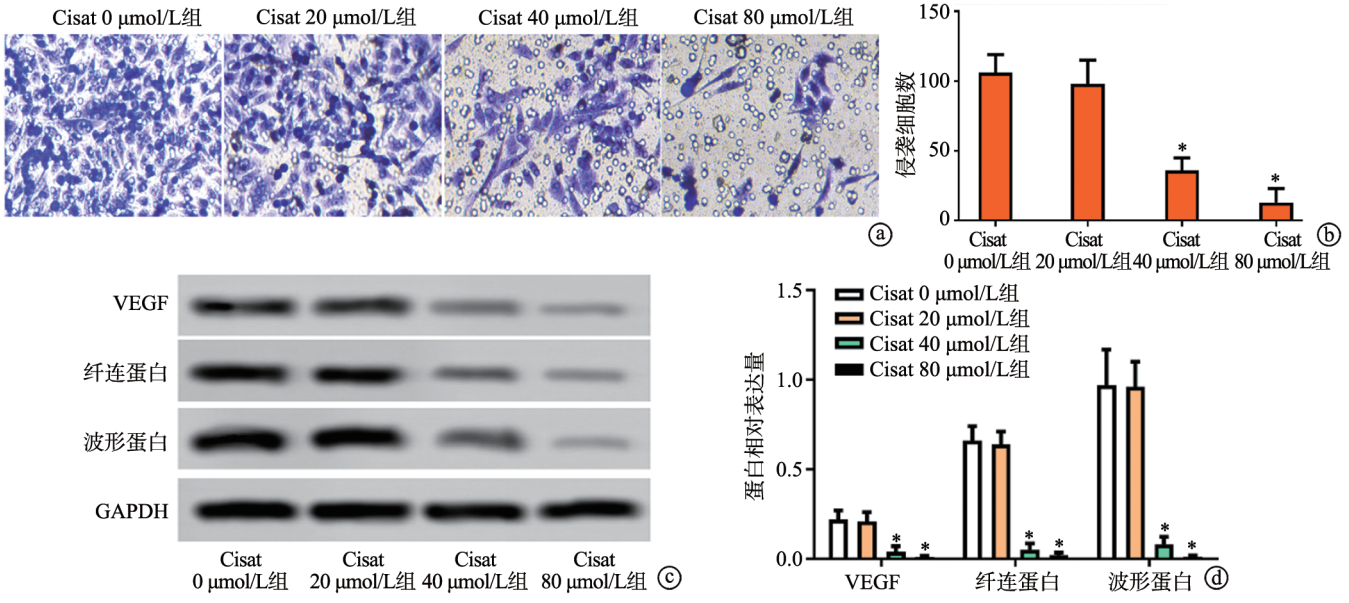
### 2.5 Cisat 对 A549 细胞侵袭能力的影响

与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 20 μmol/L 组细胞侵袭数无显著变化($P>0.05$),Cisat 40 μmol/L 组和 Cisat 80 μmol/L 组细胞侵袭数目显著减少($P<0.05$),见图 5a、b。与 Cisat 0 μmol/L 组相比,Cisat 20 μmol/L组 VEGF、纤连蛋白和波形蛋白的表达无明显变化($P>0.05$),Cisat 40 μmol/L 组和 Cisat 80 μmol/L组 VEGF、纤连蛋白和波形蛋白的表达均显著下调($P<0.05$),见图 5c、d。




a:Western blot 检测各组细胞中凋亡相关蛋白的表达;b:各组蛋白相对表达量统计 *:与 Cisat 0 μmol/L 组相比,$P<0.05$

**图 4 Western blot 检测各组细胞中凋亡相关蛋白的表达**




a:Transwell 检测细胞侵袭能力(×200);b:各组侵袭细胞数统计;c:Western blot 检测 VEGF、纤连蛋白和波形蛋白的表达;d:各组蛋白相对表达量 *:与 Cisat 0 μmol/L 组相比,$P<0.05$

**图 5 各组 A549 细胞侵袭能力**

## 3 讨论

肺腺癌的治疗方案通常为手术切除辅以化疗,但残留的癌细胞可能导致术后复发和转移的发生率变高,是患者死亡的主要原因[9]。这些残留癌细胞的生存和进展取决于多种协同围术期因素,其中包括麻醉药和止痛药[10]。因此,优化手术和麻醉策略至关重要,这可能是减少手术切除后肺癌复发的关键。Cisat 是一种非去极化的肌松药,通常用于需要有效骨骼肌麻痹的手术中。有研究证明,Cisat 可显著抑制人卵巢癌 OVACR-3 细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡[5]。本研究结果显示,A549 细胞活力随着 Cisat 浓度的增加逐渐降低,Cisat 浓度在 40 μmol/L 及以上时,A549 细胞活力明显降低,因此,高浓度 Cisat 可抑制肺癌细胞活力。

MMP 的下降是细胞早期凋亡的一个标志性事件。当 MMP 下降,线粒体膜通透性增加,细胞色素 C 释放到胞内后形成凋亡复合体,凋亡复合体通过招募并激活 caspase-9,caspase-9 进一步激活效应 caspase-3 和 caspase-7,启动 caspase 级联反应,最终导致细胞凋

亡[11]。据报道,c-Myc 蛋白与肿瘤的发生有关,c-Myc 过度表达对细胞增殖、存活、肿瘤血管生成和肿瘤转移有积极的调节作用,此外 c-Myc 还可介导细胞程序性凋亡的发生[12-13]。本研究结果显示,MMP 随着 Cisat 浓度的增加而显著下降,且 cleaved caspase-3/caspase-3、cleaved caspase-9/caspase-9 表达上调,c-Myc 表达明显下调。说明 Cisat 能够降低 A549 细胞 MMP,从而引发细胞早期凋亡。

据报道,肿瘤抑制因子 p21 低表达是肿瘤发生的先决条件[14]。研究表明,激活 p21 表达可导致膀胱癌细胞中的 G0/G1 期细胞周期停滞[15]。Bcl-2 家族蛋白是控制线粒体相关的凋亡因子释放的主要调节因子[16],促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 比值决定了细胞凋亡与否[17]。本研究中,Cisat 浓度为 40 μmol/L 和 80 μmol/L 时细胞克隆形成率明显降低,p21 表达及 Bax/Bcl-2 比值显著上调。说明 Cisat 可以抑制 A549 细胞的增殖并促进其凋亡。

上皮 - 间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)在肿瘤恶性转化中起关键作用,而纤连蛋白和波形蛋白是 EMT 的重要标志物[18]。VEGF 是关键的血管生成因子,可使血管通透性增加,引起肿瘤血管中的蛋白外渗,有助于肿瘤生长、转移[19]。研究发现,Cisat 可抑制食管癌细胞中的 EMT[20]。本研究结果显示,Cisat 显著下调了纤连蛋白、波形蛋白和 VEGF 的表达,表明 Cisat 可通过抑制 A549 细胞发生 EMT 阻遏肿瘤的侵袭和转移。

综上,本研究首次揭示了 Cisat 在抑制 A549 细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 以及诱导细胞凋亡中的重要作用,对于需要充分肌肉松弛或持续控制通气的肿瘤切除术,这些发现具有广阔的应用前景。然而,本研究仅使用单一的肺腺癌细胞系进行实验,未来还需要对更多的细胞系进行综合分析,以了解 Cisat 在肺癌中的作用。

## [参考文献]


[1] 彭 彬,许明明,王光锁,等. 贝伐珠单抗对吉非替尼耐药非小细胞肺癌 H1975 的治疗作用[J]. 解放军医药杂志,2021,33(8):24 - 29. doi:10.3969/j.issn.2095 - 140X.2021.08.005.

[2] 毛 英,刘 黎,张 匠,等. 非小细胞肺癌患者癌组织免疫微环境中 Th1、Th2、Th17 的表达水平及意义[J]. 临床误诊误治,2021,34(1):77 - 82. doi:10.3969/j.issn.1002 - 3429.2021.01.017.

[3] Luan H, Yan L, Zhao Y, et al. Fucoxanthin induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition via inhibiting Wnt/β-catenin pathway in lung adenocarcinoma[J]. Discov Oncol,2022,13(1):98. doi: 10.1007/s12672 - 022 - 00564 - 4.

[4] Hurtado C,Bendure J,Bennetts P. Anesthetic and analgesic influence on cancer recurrence and metastasis[J]. AANA J,2021,89(3):221 - 226.

[5] Zhu D, Shi C, Jiang Y, et al. Cisatracurium inhibits the growth and induces apoptosis of ovarian cancer cells by promoting lincRNA-p21[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 1505 - 1516. doi: 10.1080/21655979.2021.1916271.

[6] Yang X, Ma W. Cisatracurium inhibits the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by regulating the expression of miR-3174[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),2020,66(6):1 - 7.

[7] Xia YZ, Shan GF, Yang H, et al. Cisatracurium regulates the CXCR4/let-7a-5p axis to inhibit colorectal cancer progression by suppressing TGF-β/SMAD2/3 signalling[J]. Chem Biol Interact, 2021, 339: 109424. doi:10.1016/j.cbi.2021.109424.

[8] 陈 微,严丽英,龙 波. 青蒿酯通过线粒体凋亡途径诱导 Y79 细胞凋亡[J]. 医学分子生物学杂志,2021,18(4):286 - 290. doi:10.3870/j.issn.1672 - 8009.2021.04.007.

[9] Tohme S, Simmons RL, Tsung A. Surgery for cancer: a trigger for metastases[J]. Cancer Res,2017,77(7):1548 - 1552. doi:10.1158/0008 - 5472.CAN - 16 - 1536.

[10] Ciechanowicz S,Zhao H,Chen Q,et al. Differential effects of sevoflurane on the metastatic potential and chemosensitivity of non-small-cell lung adenocarcinoma and renal cell carcinoma in vitro[J]. Br J Anaesth, 2018,120(2):368 - 375. doi:10.1016/j.bja.2017.11.066.

[11] 刘 杰,郑 荦,孙晓燕. 紫檀芪诱导卵巢癌 Caov3 细胞凋亡并抑制裸鼠成瘤[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(2):103 - 108. doi:10.3870/j.issn.1672 - 8009.2020.02.004.

[12] Krygier A,Szmajda-Krygier D,Sałagacka-Kubiak A,et al. Association between the CEBPA and c-MYC genes expression levels and acute myeloid leukemia pathogenesis and development[J]. Med Oncol, 2020,37(12):109. doi:10.1007/s12032 - 020 - 01436 - z.

[13] Miller DM,Thomas SD,Islam A,et al. c-Myc and cancer metabolism[J]. Clin Cancer Res,2012,18(20):5546 - 5553. doi:10.1158/1078 - 0432.CCR - 12 - 0977.

[14] Yuan J,Li X,Zhang G,et al. USP39 mediates p21-dependent proliferation and neoplasia of colon cancer cells by regulating the p53/p21/CDC2/cyclin B1 axis[J]. Mol Carcinog,2021,60(4):265 - 278. doi:10.1002/mc.23290.

[15] Wang Y,Zhu W,Chen X,et al. Selenium-binding protein 1 transcriptionally activates p21 expression via p53-independent mechanism and its frequent reduction associates with poor prognosis in bladder cancer[J]. J Transl Med,2020,18(1):17. doi:10.1186/s12967 - 020 - 02211 - 4.

[16] 刘淑贤,张 琦,王立国,等. 奥沙利铂联合放疗对 NSCLC 患者的疗效、免疫功能与 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 解放军医药杂志,2020,32(11):26 - 29. doi:10.3969/j.issn.2095 - 140X.2020.11.006.

[17] Luo X,Lin B,Gao Y,et al. Genipin attenuates mitochondrial-dependent apoptosis,endoplasmic reticulum stress,and inflammation via the PI3K/AKT pathway in acute lung injury[J]. Int Immunopharmacol,2019, 76:105842. doi:10.1016/j.intimp.2019.105842.

[18] Wang W, Chen H, Gao W, et al. Girdin interaction with vimentin induces EMT and promotes the growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Oncol Rep,2020,44(2):637 - 649. doi:10.3892/or.2020.7615.

[19] 吴明燕,康雪芳,林月丽,等. 卵巢上皮性癌中 VEGF、$CD4^+$、$CD8^+$ 及 COX-2 表达与 TIDC 相关性[J]. 分子诊断与治疗杂志,2021,13(6):969 - 972. doi:10.3969/j.issn.1674 - 6929.2021.06.031.

[20] Lv W, Wang J, Zhang S. Effects of cisatracurium on epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 5325 - 5331. doi: 10.3892/ol.2019.10859.


(编辑:贺绍梅)