doi:10.11659/jjssx.03E018127

·基础研究·

右美托咪啶对人宫颈癌细胞 Hela 生长和转移能力的影响

王仕斌[1,2],王雪婷[2],薛蓉亮[1] (1.西安交通大学第二附属医院麻醉科,陕西 西安 710004;2.安康市中医医院麻醉科,陕西 安康 725000)

[摘 要] **目的** 探究右美托咪啶(Dex)对人宫颈癌 Hela 细胞增殖和侵袭的作用及机制。**方法** 将细胞分为 Hela 组、Dex(1 μM)组、Dex(2 μM)组和 Dex(5 μM)组,分别用 0,1,2,5 μM 的 Dex 处理细胞,用 CCK8 检测细胞增殖,Hoechst 染色检测细胞凋亡,Transwell 检测细胞侵袭能力,划痕实验检测细胞迁移能力,Western blot 检测 Ki67、Caspase-3、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的表达。**结果** Dex 作用于细胞 4 d 后,Dex(1,2,5 μM)组细胞增殖速度和 Ki67 表达水平与 Hela 组比较明显降低,细胞凋亡率和 Caspase-3 表达水平明显升高;同时,与 Hela 组比较,Dex(1,2,5 μM)组侵袭细胞数明显减少,划痕闭合率及 VEGF 表达水平也明显降低;此外,Dex(1,2,5 μM)还能显著降低 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值。**结论** Dex 能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活抑制人宫颈癌 Hela 细胞存活和转移。

[关键词] 宫颈癌;细胞增殖;细胞凋亡;转移;PI3K/Akt 通路

[中图分类号] R737.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-30

Effects of dexmedetomidine on cell growth and metastasis of human cervical cancer cell Hela

WANG Shi-bin[1,2], WANG Xue-ting[2], XUE Rong-liang[1] (1. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Xi' an Jiaotong University, Xi' an Shaanxi 710004, China; 2. Department of Anesthesiology, Ankang Traditional Chinese Medicine Hospital, Ankang Shaanxi 725000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of dexmedetomidine (DEX) on cell growth and metastasis of human cervical cancer cell line Hela. **Methods** Cells were divided into Hela group, Dex(1 μM) group, Dex(2 μM) group and Dex(5 μM) group, and they were treated with Dex(0,1,2,5 μM) respectively. Cell proliferation was detected with CCK8. Cell apoptosis was determined by Hoechst staining. The invasion ability of Hela cells were measured by Transwell, and the migration ability was measured by Wound healing assay. The expressions of Ki67, Caspase-3, vascular endothelial growth factor (VEGF), phosphatidy inositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K, Akt and p-Akt were determined by Western blot. **Results** After treating with Dex for 4 days, the cell growth rate and expression level of Ki67 were decreased in Dex(1,2,5 μM) group compared with the Hela group, and the apoptosis rate and level of Caspase-3 were increased notably. Meanwhile, compared with the Hela group, the invasion cells was decreased in Dex(1,2,5 μM) group, and wound closure rate and expression level of VEGF were down-regulated in Dex(1,2,5 μM) group. In addition, Dex(1,2,5 μM) down-regulated the ratio of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt. **Conclusion** Dex inhibits cell growth and metastasis of human cervical cancer cell line Hela by inhibiting activation of PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords: cervical cancer; cell proliferation; cell apoptosis; matastasis; PI3K/Akt pathway

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,发病率占女性癌症发病率的第二位,并且呈逐年上升的趋势[1]。每年全球宫颈癌的新发病例可高达 50 万人,每年有超过 27 万女性死于宫颈癌[2]。虽然近年来癌症诊疗水平提高,宫颈癌的病死率有所降低,但仍是导致发展中国家女性死亡的重要原因[3]。腹腔镜手术是目前治疗宫颈癌的最主要方法,但术后复发率仍然较高[4]。研究表明,癌细胞转移是导致宫颈癌复发的重要原因[5]。因此,有效减少手术过程中癌细胞的转移可能有利于降低宫颈癌的复发率。右美托咪啶(dexmedetomidine,Dex)是一类脂溶性的 α2 肾上腺素激动剂,具有镇静、止痛及血流动力学效应,是临床常用的手术麻醉辅助用药[6-7]。有研究表明,吗啡、丙泊酚等麻醉药会影响癌症的发展[8-9]。还有研究发现 Dex 也能调控乳腺癌细胞的增殖及转移,但 Dex 对宫颈癌细胞生长和转移能力的影响还未见报道[10]。因此,本文采用不同浓度的 Dex 处理宫颈癌 Hela 细胞,以探究 Dex 对宫颈癌细胞生长及转移的作用及机制。

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2014K11-02-01-04)

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Dex 购自江西恒瑞医药公司(生产批号:13120134)。人宫颈癌细胞系 Hela 细胞由中国科学院上海细胞库提供。RPMI 1640 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。CCK8 试剂盒、Hoechst 染色剂和 RIPA 裂解液购自北京索莱宝生物公司;Transwell 小室和 Matrigel 购自美国 Millipore 公司。Ki67、Caspase-3、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、磷酸肌醇 3 激酶(phosphatidy inositol 3-kinase,PI3K)、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 一抗购自英国 Abcam 公司,山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗购自北京博奥森生物公司。

1.2 细胞分组及给药

用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液将人宫颈癌 Hela 细胞培养于 37 ℃、5% CO_2 的细胞恒温培养箱中,隔天换液,细胞融合率达到 80% 以上时进行传代培养。将细胞随机分为 Hela 组、Dex(1 μM) 组、Dex(2 μM) 组和 Dex(5 μM) 组,每组 6 个复孔,并分别加入 0,1,2,5 μM 的 Dex 处理细胞,24 h 后进行检测。

1.3 CCK8 检测细胞增殖

将细胞接种于 96 孔板内,接种密度为 1×10^4 个/mL。待细胞贴壁后将细胞随机分为 Hela 组、Dex(1 μM) 组、Dex(2 μM) 组和 Dex(5 μM) 组,加入相应浓度的 Dex 分别处理 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 后,根据 CCK8 试剂盒说明书检测各组细胞的细胞活性。

1.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将用不同浓度 Dex 处理后的细胞弃去培养液,并用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞30 min,随后弃去多聚甲醛并洗净,加入少量 Hoechst 染色液,以覆盖底部细胞为宜,室温染色 30 min后,弃染色液,用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.5 Transwell 检测细胞侵袭能力

将 Hela 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 Transwell 小室上层,并用含有不同浓度 Dex 的无血清培养液培养细胞,小室下层则加入正常培养液进行培养,24 h后用结晶紫对侵袭到小室下层的细胞进行染色,于显微镜下拍照记录。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

实验前用灭菌的 Maker 笔于 12 孔板背面每孔划 5 条平行直线,灭菌后备用。将细胞接种于 12 孔空板内,密度为 1×10^5 个/mL,待细胞贴壁后,用 10 μL 的枪头垂直于培养板背面直线划痕,用缓冲液洗去悬浮细胞,将培养液更换为含有不同浓度 Dex 的无血清培养液继续培养,于 0 h 和 24 h 拍照记录,计算各组细胞的划痕闭合率,划痕闭合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取各组细胞蛋白,用 BCA 试剂盒检测各组细胞总蛋白浓度并调平,取等量蛋白用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质并采用半干法将蛋白质转移到 PVDF 膜,加入 5% BSA 室温封闭蛋白质 2 h,随后加入一抗于 4 ℃封闭过夜。第 2 天用缓冲液洗去未结合一抗,加入二抗室温孵育 1 h 后,洗去未结合二抗并滴加化学发光显色液于暗室曝光显影,以 GAPDH 为内参,用 ImageJ 对蛋白质条带灰度值进行半定量分析。

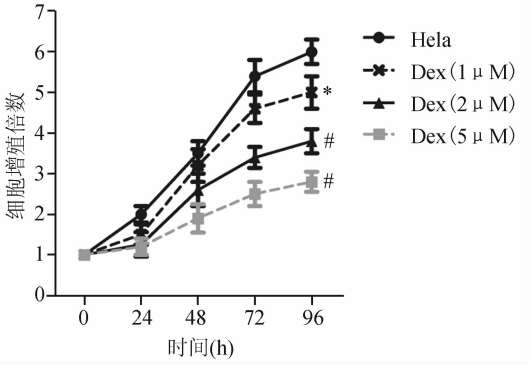
1.8 统计学分析

用统计学软件 SPSS 17.0 对所有实验数据进行统计学分析,组间差异采用单因素方差分析进行统计。所有试验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 Dex 对宫颈癌 Hela 细胞生长的影响

用 Dex 处理细胞 4 d 后,与 Hela 组细胞比较,Dex(1 μM)组、Dex(2 μM) 组和 Dex (5 μM)组细胞增殖速度均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),见图 1;同时,Dex(1,2,5 μM) 组细胞凋亡率也显著高于 Hela 组($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.01$),进一步表明 Dex 能抑制 Hela 细胞存活(图 2);此外,Dex(1,2,5 μM)还能显著降低 Hela 细胞增殖相关蛋白 Ki67 的表达水平($P<0.01$),升高细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的蛋白表达水平($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.01$),进一步表明 Dex 能抑制 Hela 细胞生长(图 3)。



*:与 Hela 组比较,$P<0.5$;#:与 Hela 组比较,$P<0.01$

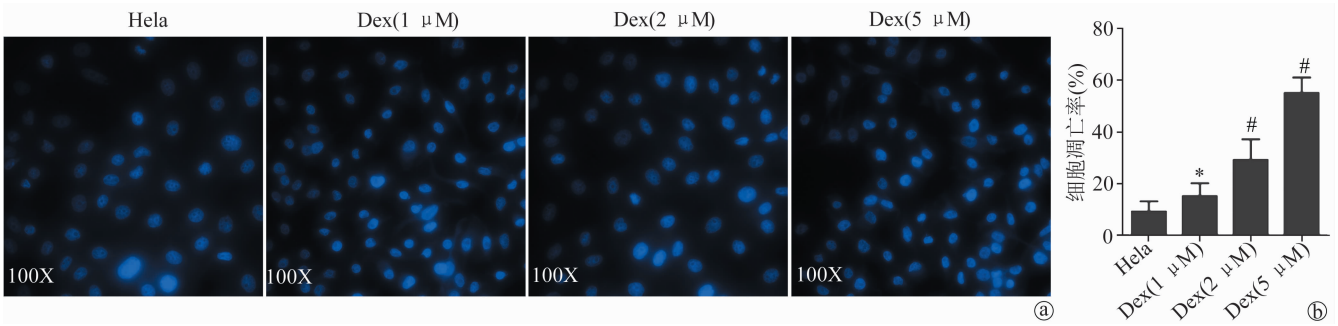
图 1 Dex 对 Hela 细胞增殖的影响

2.2　Dex 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Western blot 实验结果表明,Dex(1,2,5 μM) 能抑制 p-PI3K 和 p-Akt 的表达,显著降低 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值($P<0.01$),并随浓度升高作用逐渐增强,表明 Dex 能抑制 Hela 细胞 PI3K/Akt 通路的激活(图 4)。

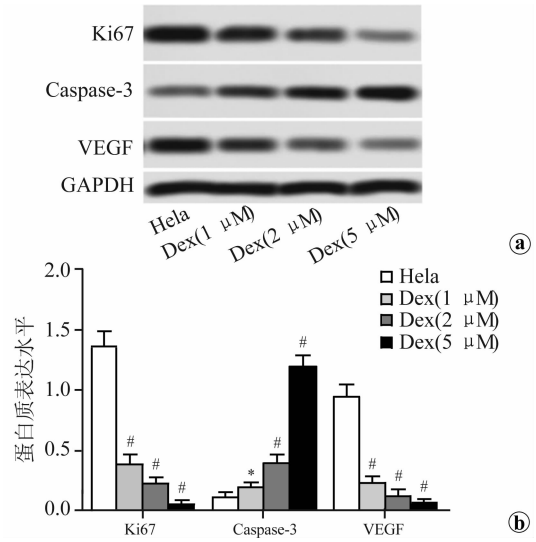
2.3　Dex 对宫颈癌 Hela 细胞转移的影响

与 Hela 组比较,Dex(1,2,5 μM)组侵袭细胞数明显减少,并具有量效关系($P<0.01$),见图 5;如图 6 所示,Dex (2,5 μM) 还能显著抑制 Hela 细胞迁移($P<0.01$),提示 Dex 能降低 Hela 细胞的转移能力;此外,Dex(1,2,5 μM)还能显著降低 Hela 细胞 VEGF 的蛋白表达水平($P<0.01$),进一步表明 Dex 具有抑制 Hela 细胞转移的能力(图 3)。



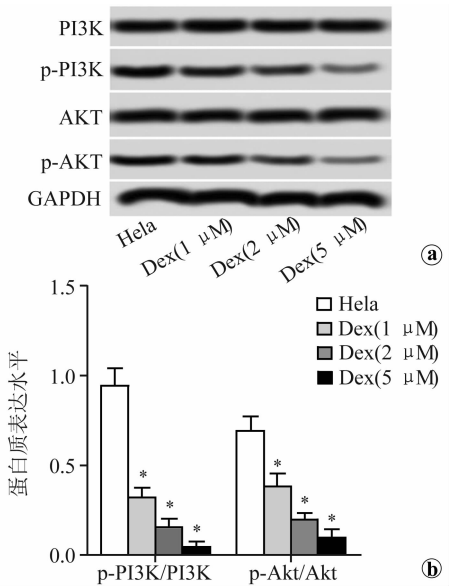
a:Hoechst 染色结果;b:细胞凋亡率统计　*:与 Hela 组比较,$P<0.05$;#:与 Hela 组比较,$P<0.01$

图 2　Dex 对 Hela 细胞凋亡的影响



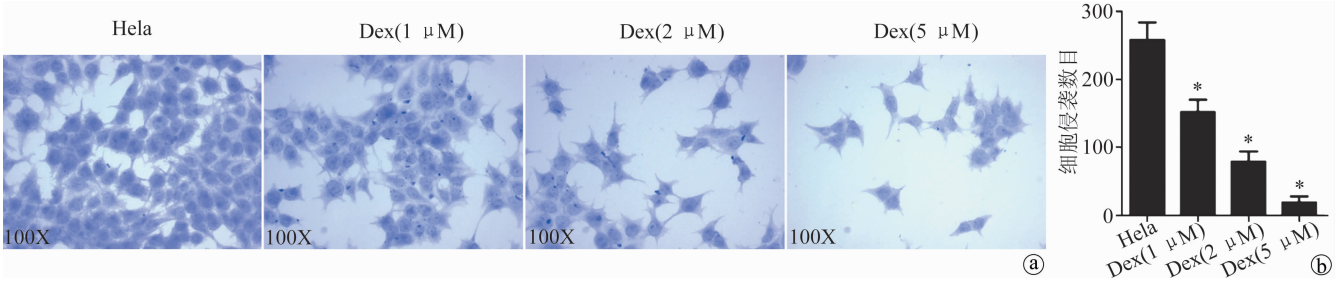
a:Western blot 图片;b:蛋白表达水平　*:与 Hela 组比较,$P<0.05$;#:与 Hela 组比较,$P<0.01$

图 3　Dex 对 Ki67、Caspase-3 和 VEGF 表达的影响



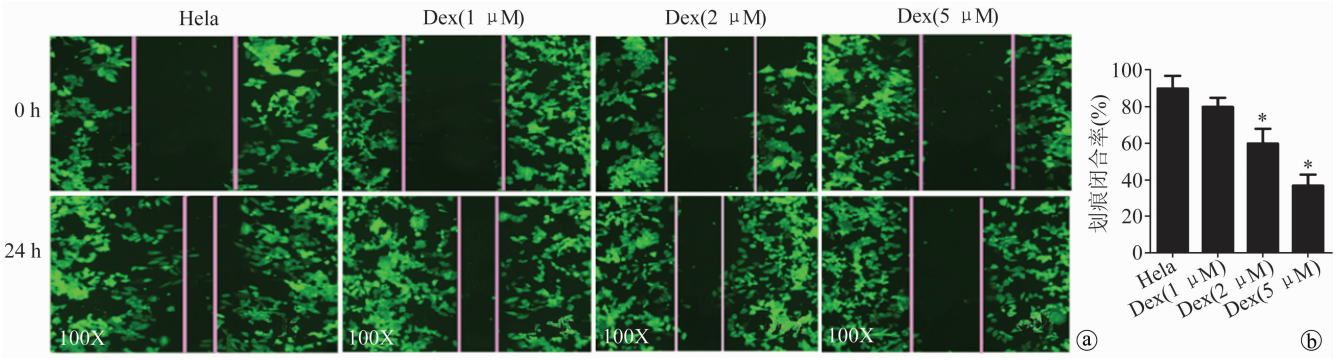
a:Western blot 图片;b:蛋白表达水平　*:与 Hela 组比较,$P<0.01$

图 4　Dex 对 PI3K/Akt 信号通路的影响



a:结晶紫染色结果;b:细胞侵袭数目统计　*:与 Hela 组比较,$P<0.01$

图 5　Dex 对 Hela 侵袭能力的影响



a:划痕实验检测结果;b:划痕闭合率 *:与 Hela 组比较,$P<0.01$

图 6 Dex 对 Hela 迁移能力的影响(GFP⁺ ×100)

3 讨论

宫颈癌是导致女性死亡的主要原因之一,虽然目前有很多抗癌的新药和方法能减缓宫颈癌的发展,但其副作用使癌症患者的生活质量下降,且病死率并未出现降低的趋势[11]。手术切除是临床治疗癌症的常用方法,手术期是影响癌症预后的一个重要时期[12]。近年来的研究表明,手术期的操作不当会增加癌症的术后复发率,同时,麻醉药的正确使用能有效降低手术期间癌细胞转移的风险[13-14]。Zhang 等[15]的研究表明,麻醉药物丙泊酚能有效抑制乳腺癌 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞系细胞的转移,并抑制细胞转化基因 1 的表达,还能通过调控 mTOR 信号通路诱导宫颈癌细胞凋亡[16]。Dex 是临床常用的麻醉辅助用药,能增强布比卡因等麻醉药物的麻醉效果,并能有效降低其副作用,但其对癌症的作用还较少见报道[17]。本研究采用不同浓度的 Dex 处理人宫颈癌 Hela 细胞,并检测细胞的生长及转移能力以探究 Dex 对宫颈癌的作用。

细胞无限增殖及凋亡抑制是导致癌症发生及发展的主要原因。抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞凋亡是目前癌症化疗和放疗的主要机制,抑制癌细胞增殖及促进癌细胞凋亡能有效减缓癌症的发展,延长癌症患者的存活时间[18]。研究表明,Dex 能通过抑制 p38MAPK/NF-κB 信号通路激活提高卵巢癌大鼠的自身免疫功能,从而抑制卵巢癌细胞增殖和转化,提示 Dex 可能具有一定的抗癌活性[19]。本研究发现,用 Dex 处理 Hela 细胞 4 d 后,Hela 细胞增殖速度明显降低,并随 Dex 浓度的升高作用逐渐增强。Ki67 是细胞增殖有丝分裂期间表达的一类蛋白,因此常被用作细胞增殖的标志性蛋白[20]。本研究显示,Dex 还能显著抑制细胞增殖相关蛋白 Ki67 的表达,提示 Dex 能抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖。此外,Dex 还能显著增加 Hela 细胞的凋亡率,并上调细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达,表明 Dex 能促进 Hela 细胞凋亡,从而降低宫颈癌 Hela 细胞的生长能力。

癌细胞转移是癌症恶化和术后癌症复发的主要原因。据报道,出现癌细胞转移的患者 5 年生存率仅有 25%,因此有效降低癌细胞的转移能力是降低癌症复发率和减缓癌症恶化的关键[21]。癌细胞转移是由多种细胞因子调控的过程,如基质金属蛋白酶、VEGF 等[22]。其中 VEGF 是血管新生相关蛋白,能够促进新血管的形成。研究表明,新血管形成是癌细胞转移的第一步,新形成的血管能为转移的癌细胞提供充足的氧气和营养成分[23]。此外,VEGF 还能促进细胞外基质的降解,从而促进癌细胞的转移,因此常被作为癌细胞转移的标志蛋白[24]。本研究发现,Dex 能降低 Hela 细胞 VEGF 的表达水平,同时还能显著减少侵袭细胞,降低 Hela 细胞的划痕闭合率,提示 Dex 能抑制 Hela 细胞的侵袭和转移,从而降低 Hela 细胞的转移能力。

PI3K/Akt 信号通路是调控细胞增殖、凋亡、分化和转移的重要信号通路之一。同时,PI3K/Akt 信号通路在调控癌细胞及肿瘤的生长过程中起到了关键作用[25]。抑制 PI3K/Akt 信号通路激活能抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭和迁移,从而减缓宫颈癌的发展[26]。研究表明,Dex 能通过促进 PI3K/Akt 信号通路的激活对抗缺血引起的脑损伤及肺损伤[27-28]。本研究发现,Dex 能抑制 Hela 细胞 p-PI3K 和 p-Akt 的表达,降低 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值,表明 Dex 能抑制宫颈癌 Hela 细胞 PI3K/Akt 信号通路的激活。

综上所述,Dex 能降低 Hela 细胞的增殖速度和 Ki67 的表达水平,增加 Hela 细胞凋亡率和 Caspase-3 的表达水平;同时,Dex 能降低 Hela 细胞侵袭数和划痕闭合率,降低 VEGF 的表达水平;此外,Dex 还能降低 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值,表明 Dex 可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活抑制 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移,促进 Hela 细胞凋亡,从而降低 Hela

细胞的生存和转移能力。本研究探讨了 Dex 对宫颈癌 Hela 细胞的作用,可能为降低宫颈癌术后复发率提供了一种新的潜在药物。

[参考文献]

[1] Chou RH, Hsieh SC, Yu YL, et al. Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF-kappaB signaling pathway[J]. PloS One, 2013, 8(8): e71983. doi:10.1371/journal.pone.007198.

[2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29. doi:10.3322/caac.21208.

[3] Yang B, Lu Y, Zhang A, et al. Doxycycline induces apoptosis and inhibits proliferation and invasion of human cervical carcinoma stem cells [J]. PloS One, 2015, 10(6): e0129138. doi:10.1371/journal.pone.0129138.

[4] Lin F, Pan L, Li L, et al. Effects of a simulated CO_2 pneumoperitoneum environment on the proliferation, apoptosis, and metastasis of cervical cancer cells in vitro[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 2497-2503. doi: 10.12659/MSM.891179.

[5] Tewari KS, Sill MW, Long HR, et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 370(8): 734-743. doi:10.1056/NEJMoa1309748.

[6] Cui J, Zhao H. Dexmedetomidine attenuates oxidative stress induced lung alveolar epithelial cell apoptosis in vitro[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 358396. doi:10.1155/2015/358396.

[7] Xia R, Yin H, Xia ZY, et al. Effect of intravenous infusion of dexmedetomidine combined with inhalation of isoflurane on arterial oxygenation and intrapulmonary shunt during single-lung ventilation[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 67(3): 154715-154750. doi:10.1007/s12013-013-9659-8.

[8] Khabbazi S, Goumon Y, Parat MO. Morphine modulates interleukin-4 or breast cancer cell-induced pro-metastatic activation of macrophages[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11389. doi: 10.1038/srep11389.

[9] Yang C, Gao J, Yan N, et al. Propofol inhibits the growth and survival of gastric cancer cells in vitro through the upregulation of ING3[J]. Oncol Rep, 2016, 37(1): 587-593. doi:10.3892/or.2016.5218.

[10] Xia M, Ji NN, Duan ML, et al. Dexmedetomidine regulate the malignancy of breast cancer cells by activating α2-adrenoceptor/ERK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(16): 3500-3506.

[11] Duenas-Gonzalez A, Serranoolvera A, Cetina L, et al. New molecular targets against cervical cancer[J]. Int J Womens Health, 2014, 6: 1023-1031. doi: 10.2147/IJWH.S49471

[12] Jakobsson J, Johnson MZ. Perioperative regional anaesthesia and postoperative longer-term outcomes[J]. F1000Res, 2016, 5. doi: 10.12688/f1000research.9100.1.

[13] Masae I, Zhao H, Tanweer J, et al. Volatile anaesthetics enhance the metastasis related cellular signalling including CXCR2 of ovarian cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 26042-26056. doi:10.18632/oncotarget.8304.

[14] Sellbrant I, Brattwall M, Jildenstål P, et al. Anaesthetics and analgesics; neurocognitive effects, organ protection and cancer reoccurrence an update[J]. Int J Surg, 2016, 34: 41-46. doi:10.1016/j.ijsu.2016.08.235.

[15] Zhang D, Zhou XH, Zhang J, et al. Propofol promotes cell apoptosis via inhibiting HOTAIR mediated mTOR pathway in cervical cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 561-567. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.129.

[16] Ecimovic P, Murray D, Doran P, et al. Propofol and bupivacaine in breast cancer cell function in vitro-role of the NET1 gene[J]. Anticancer Res, 2014, 34(3): 1321-1331.

[17] Fares KM, Othman AH, Alieldin NH. Efficacy and safety of dexmedetomidine added to caudal bupivacaine in pediatric major abdominal cancer surgery[J]. Pain Physician, 2014, 17(5): 393-400.

[18] Yusup G, Akutsu Y, Mutallip M, et al. A COX-2 inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1146-1152. doi:10.3892/ijo.2014.2300.

[19] Cai QH, Tang Y, Fan SH, et al. In vivo effects of dexmedetomidine on immune function and tumor growth in rats with ovarian cancer through inhibiting the p38MAPK/NF-κB signaling pathway[J]. Retour Au Numéro, 2017, 95: 1830-1837. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.086.

[20] Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2013, 66(6): 512-516. doi:10.1136/jclinpath-2012-201085.

[21] Kozlowski J, Kozlowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis-insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2015, 69: 447-451.

[22] Lin X, Li HR, Lin XF, et al. Silencing of Livin inhibits tumorigenesis and metastasis via VEGF and MMPs pathway in lung cancer[J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 657-667. doi:10.3892/ijo.2015.3058.

[23] Dimova I, Popivanov G, Djonov V. Angiogenesis in cancer-general pathways and their therapeutic implications[J]. J BUON, 2014, 19(1): 15-21.

[24] Li Y, Zhai Z, Liu D, et al. CD105 promotes hepatocarcinoma cell invasion and metastasis through VEGF[J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 737-745. doi:10.1007/s13277-014-2686-2.

[25] Bai X, Ma Y, Zhang G. Butein suppresses cervical cancer growth through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 33(6): 3085-3092. doi:10.3892/or.2015.3922.

[26] Teng P, Jiao Y, Hao M, et al. microRNA-383 suppresses the PI3K-AKT-MTOR signaling pathway to inhibit development of cervical cancer via down-regulating PARP2[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7): 5243-5252. doi:10.1002/jcb.26585.

[27] Shen M, Wang S, Wen X, et al. Dexmedetomidine exerts neuroprotective effect via the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with traumatic brain injury[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 885-893. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.125.

[28] Zhang W, Zhang JQ, Meng FM, et al. Dexmedetomidine protects against lung ischemia-reperfusion injury by the PI3K/Akt/HIF-1α signaling pathway[J]. J Anesth, 2016, 30(5): 826-833. doi:10.1007/s00540-016-2214-1.

(编辑:杨 颖)