doi:10.11659/jjssx.03E018023

·基础研究·

普鲁卡因抑制脂多糖诱导的结肠癌细胞肿瘤侵袭性的作用机制

党晓东[1],来炳祺[2],何 元[1] (1.陕西省肿瘤医院麻醉科,陕西 西安 710061;2.陕西省肿瘤医院重症医学科,陕西 西安 710061)

[摘 要] **目的** 探讨普鲁卡因抑制脂多糖诱导结肠癌细胞肿瘤侵袭性行为的调控及其机制。**方法** CCK-8 细胞活性实验检测不同浓度的普鲁卡因对结肠癌细胞活性的影响,Western blotting 分析普鲁卡因对脂多糖结合蛋白表达水平的影响,划痕愈合实验检测普鲁卡因对结肠癌细胞迁移能力的影响,Transwell 侵袭实验检测普鲁卡因对结肠癌细胞侵袭能力的影响。**结果** 浓度为 0.08 mg/mL的普鲁卡因对结肠癌细胞的活性影响情况最明显,差异有统计学意义($P<0.05$);浓度为 0.08 mg/mL 的普鲁卡因对脂多糖结合蛋白的表达水平抑制最明显,差异有统计学意义($P<0.05$);划痕愈合测定显示普鲁卡因可以直接抑制结肠癌细胞的运动能力;Transwell 侵袭实验测定显示普鲁卡因可以直接抑制结肠癌细胞的侵袭能力,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 普鲁卡因可以通过影响脂多糖诱导结肠癌细胞的迁移和侵袭,可作为化疗辅助药物,为探索结肠癌诊疗的分子机制和新的潜在治疗策略提供相应理论帮助,为结肠癌的临床治疗方式提供有效支持。

[关键词] 普鲁卡因;结肠癌;脂多糖;迁移侵袭

[中图分类号] R735.3+5 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-13

Procaine inhibits tumorigenicity of colon cancer cells induced by lipopolysaccharide

DANG Xiao-dong[1], LAI Bing-qi[2], HE Yuan[1] (1. Department of Anesthesiology, Shaanxi Cancer Hospital, Xi'an Shaanxi 710061, China; 2. Department of Intensive Medicine, Shaanxi Cancer Hospital, Xi'an Shaanxi 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the regulation and mechanism of procaine on tumor aggressive behavior induced by lipopolysaccharide in colon cancer cells. **Methods** CCK-8 cell activity assay was used to detect the effect of different concentrations of procaine on the activity of colon cancer cells. Procaine lipopolysaccharide binding protein expression levels was analyzed by Western blotting. Procaine migration of colon cancer cells was detected by Scratch healing test. Effect of procaine on invasion of colon cancer cells was tested by Transwell invasion assay. **Results** The effect of procaine at a concentration of 0.08 mg/mL on the activity of colon cancer cells was the most significant, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The concentration of procaine at the concentration of 0.08 mg/mL inhibited the expression of lipopolysaccharide binding protein most significantly, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Scratch healing assays showed that procaine could directly inhibit colon cancer cell motility; Transwell invasive assay showed that procaine could directly inhibit the invasiveness of colon cancer cells, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Procaine can affect the migration and invasion of colon cancer cells by affecting lipopolysaccharide, which can be chemotherapeutic adjuvant. It provides theoretical basis for exploring molecular mechanism and new potential therapies, and provides effective supporting for treatment of colon cancer.

Keywords: procaine; colon cancer; lipopolysaccharide; migration and invasion

恶性肿瘤具有细胞生长不受控制的特性,是严重致命的疾病之一[1]。消化道系统恶性肿瘤中最普遍的结肠癌是仅次于肺癌和乳腺癌的第三大癌症,是癌症死亡的第二常见原因[2-4]。与疾病有关的基因,与许多癌症类型有关[5]。结肠癌的发病机制和相关分子是目前的研究热点。化学治疗被认为是控制多种恶性肿瘤有效治疗方法之一。尽管由于其严重的细胞毒性且无法仅作用于恶性肿瘤细胞,标准化疗计划通常只能一定程度上延长生存时间[6-7]。目前主要的问题是化疗药物的靶向性不足,导致作用靶标偏离目标细胞而造成过多的副作用[8]。之前已有相关文献集中讨论了联合使用麻醉药物治疗恶性肿瘤[9]。普鲁卡因是常用的局部麻醉药品,也是常用的化疗药物之一。其表现出一种表观遗传的行动模式,去甲基化剂为 DNA 高甲基化 CpG 岛,因此成为治疗不同类型癌症的选择之一[10]。本研究的主要目的是探讨普鲁卡因(作为 DNMT 抑制剂药物的代表)对结肠癌细胞生物学行为的影响情况,从而明确普鲁卡因在结肠癌细胞中作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织样本和实验器材

脂质体 Lipofectamine 2000 购自上海吉凯基因,Trizol购自美国 Ambion 公司。PCR 试剂盒购自美国

[基金项目] 陕西省自然科学基金(2014D14)

[通信作者] 来炳祺,E-mail:zgqp2002@sina.com

Kapa 公司。荧光素酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司。荧光素酶报告载体由 Promega 公司合成。Transwell 小室购自美国 Millipore 公司(Millipore,Billerica,MA),Matrigel 购自 Bio-Rad (Bio-Rad,Madrid,Spain)。

1.2 细胞株和培养

人类结肠癌细胞系(sw480)获自中国科学院细胞库(中国上海)。所有细胞在含有 10% 胎牛血清和 100 u/mL 青霉素或 100 mg/mL 链霉素的 Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基中培养,培养条件:37 ℃ 含 5% CO_2 的恒温孵箱中。

1.3 细胞活性测定

使用不同浓度的普鲁卡因处理结肠癌细胞,在 24 h 后以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板(每孔 5 000个细胞)中。在接种细胞 24,48 和 72 h 后,使用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)测量细胞增殖。使用微孔板分光光度计在 450 nm 处测定吸光度。实验重复 3 次。

1.4 蛋白质印迹

使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,并将其转移到硝酸纤维素膜。使用 5% 脱脂牛奶充分封闭膜,并与 LPS 抗体(浓度 1∶1 000),内参 GAPDH(浓度 1∶2 000),4 ℃,孵育过夜。次日,TBST 充分冲洗过后,使用二抗辣根酶标记物(浓度1∶5 000)孵育 2 h,TBST 充分冲洗过后,使用增强的化学发光试剂 ECL 显影液检测目标蛋白的表达水平。

1.5 细胞迁移能力检测

使用伤口愈合测定评估细胞迁移。将转染的细胞在 6 孔板(每孔 5×10^4 个细胞)中培养。在 90% ~ 95% 汇合时,使用无菌塑料微量移液枪头刮擦单层细胞,然后将细胞在标准条件下培养 24 h。洗涤几次后,观察伤口的恢复并使用 X71 倒置显微镜(Olympus,Tokyo,Japan)拍照。

1.6 细胞侵袭能力检测

使用 Transwell 侵袭测定以确定细胞侵袭。将 1×10^5个转染的 sw480 细胞接种到具有游离血清培养基的上室中。含有 10% FBS 的培养基作为趋化剂添加到下部室中,将细胞在 37 ℃和 5% CO_2 下侵入48 h。然后将侵入过滤器下表面的细胞在 70% 乙醇中固定 30 min,并用 0.1% 结晶紫染色 10 min。在倒置显微镜下随机选择的 5 个视野中计数迁移到下侧的细胞数。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 版(IBM,USA)进行分析,并用至少 3 次独立实验的平均值 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用 ANOVA 或双向 t 检验比较组间的显著差异。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的普鲁卡因对结肠癌细胞的影响

通过 CCK-8 细胞活性实验检测不同浓度的普鲁卡因对结肠癌细胞细胞活性的影响情况,实验结果显示:质量浓度为 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mg/mL 的普鲁卡因处理结肠癌细胞,细胞活性分别为(0.82 ± 0.12),(2.21 ± 0.35),(2.98 ± 0.41),(4.12 ± 0.81),(1.72 ± 0.81)。说明质量浓度为 0.08 mg/mL 的普鲁卡因对结肠癌细胞的活性影响情况最明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

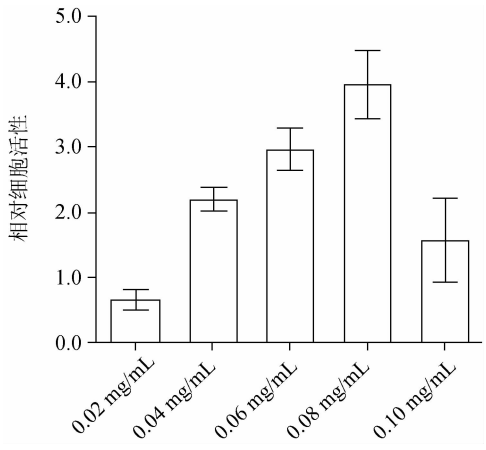


图 1 不同浓度的普鲁卡因对结肠癌细胞细胞活性的影响

2.2 普鲁卡因对脂多糖表达活性的影响

Western blotting 检测不同浓度的普鲁卡因对脂多糖结合蛋白表达情况的影响。实验结果显示:质量浓度为 0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 mg/mL 的普鲁卡因处理结肠癌细胞后,各组脂多糖结合蛋白相对表达量分别为(35.62 ± 4.32),(31.29 ± 5.32),(19.25 ± 3.26),(8.62 ± 2.21),(31.95 ± 3.35)。表明合适浓度的普鲁卡因可以抑制脂多糖结合蛋白的活性,其中质量浓度为 0.08 mg/mL的普鲁卡因对脂多糖结合蛋白的表达水平抑制最明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

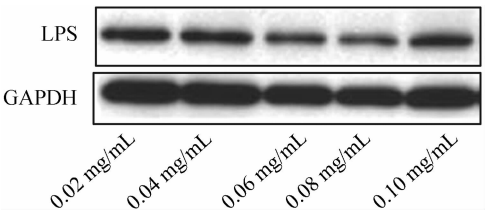


图 2 Western blotting 检测普鲁卡因对脂多糖结合蛋白表达的影响

2.3 普鲁卡因对结肠癌细胞迁移能力的影响

为了进一步评估普鲁卡因对结肠癌细胞体外转移的影响,在用 0.08 mg/mL 的普鲁卡因处理结肠癌 sw480 细胞后测定细胞迁移能力。划痕愈合测定显示普鲁卡因可以直接抑制结肠癌细胞的运动能力,相比对照组细胞,迁移距离比例相对减小,且随着时间进展差异明显加大,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

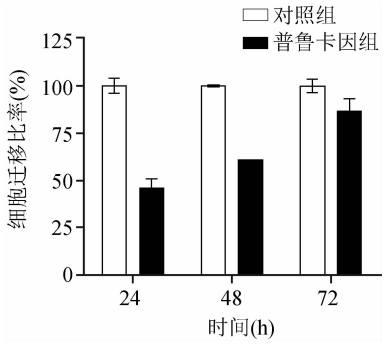


图 3 划痕愈合实验检测普鲁卡因对结肠癌细胞迁移能力的影响

2.4 普鲁卡因对结肠癌细胞侵袭能力的影响

使用 Transwell 侵袭实验检测普鲁卡因对结肠癌细胞侵袭能力的影响,实验结果显示:相比对照组细胞,24 h后的侵袭细胞数目相对减少[(28.35 ± 3.36) *vs.* (19.21 ± 2.62)],差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。上述结果表明普鲁卡因可以直接抑制结肠癌细胞的侵袭行为。

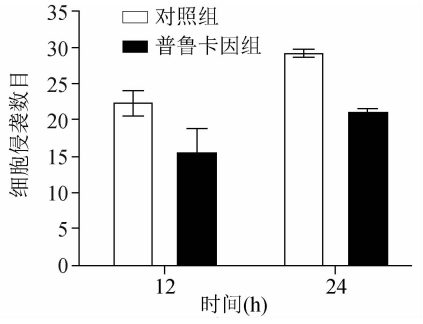


图 4 Transwell 侵袭实验检测普鲁卡因对结肠癌细胞侵袭能力的影响

3 讨论

鉴定临床治疗对恶性细胞的影响最直接的方法之一是评估细胞活力的表达[11],通过对比不同组细胞活力的变化判断药物的作用效果。细胞数量的减少可归因于外源性凋亡途径的激活,通过该外源性凋亡途径,普鲁卡因与苯基丁酸钠联合使一些凋亡相关基因去甲基化,继而激活细胞凋亡,导致细胞活性降低[12-13]。有研究已经表明化疗药物/药物组合在减少恶性细胞活性方面具有显著功效[14-15]。同时有研究指出苯二甲酸丁二醇酯与普鲁卡因联用时有拮抗作用,其中前者可以抑制普鲁卡因起作用[16]。但当普鲁卡因与厄洛替尼或卡铂结合时,细胞活性显著降低。厄洛替尼和卡铂与普鲁卡因相比也具有不同的作用方式[17-18]。

本研究显示,浓度为 0.08 mg/mL 的普鲁卡因对结肠癌细胞的活性影响情况最明显,同时该浓度的普鲁卡因对脂多糖 LPS 的影响作用最明显。进一步探讨普鲁卡因对结肠癌细胞生物学行为的影响,结果表明使用0.08 mg/mL 的普鲁卡因可在一定程度上抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭行为,表明适宜浓度的普鲁卡因可能在一定程度上抑制肿瘤细胞的生物活性,但是针对其可能的调控机制及蛋白表达目前尚无相关研究指出。

有研究表明全身炎症和术后感染在一定程度上可以导致恶性肿瘤的复发[19]。对术后革兰阴性细菌感染促进癌症复发的机制了解甚少。尽管脂多糖诱导的系统性炎症可以增加肿瘤细胞向肝窦的募集和体内肝转移,但是有关脂多糖对体内癌细胞的转移潜能直接影响的文献较为有限[20]。尽管脂多糖可能会改变癌细胞的增殖和凋亡行为,并且可能参与癌细胞的转移过程,但其在结肠癌细胞中的表达作用目前不甚清楚。之前有学者证实了脂多糖可以诱导的 TLR4 信号传导,促进人肝癌细胞在体外对内皮细胞和各种 ECM 底物的黏附能力[21]。事实上,有研究表明,脂多糖可能诱导免疫抑制细胞因子和促血管生成趋化因子的分泌[22]。本实验中,通过检测合适浓度普鲁卡因对脂多糖结合蛋白的表达水平的调控,推测普鲁卡因可以影响脂多糖结合蛋白的表达进一步干扰结肠癌细胞的迁移和侵袭行为,在 sw480 细胞中的实验可以验证这一点。之前有研究指出,一方面,普鲁卡因可以通过与肝窦内的不同的基质组分直接相互作用来介导细胞黏附;另一方面,普鲁卡因可以直接与内皮细胞上的蛋白受体结合配偶体结合发挥调控作用[23]。所以,通过本研究的结果推测普鲁卡因可能通过影响脂多糖结合蛋白的表达调控结肠癌细胞的迁移和侵袭。

当然,本研究存在一定程度的不足,普鲁卡因作为一种化疗辅助药物,可以进一步探讨与其他化疗药物(如卡铂、厄洛替尼、顺铂等)的联合作用,增强普鲁卡因在临床治疗中的应用方式,同时还需要完善动物体内实验,进一步证明普鲁卡因对实体肿瘤的作用效果。

综上所述,本研究结果表明普鲁卡因可作为化疗辅助药物,为探索结肠癌诊疗的分子机制和新的潜在治疗策略提供相应理论帮助,为结肠癌的临床治疗方式提供有效的支持。

[参考文献]

[1] Zhang B,Jia WH,Matsuda K,et al. Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk[J]. Nat Genet,2014,46(6):533 - 542. doi:10.1038/ng.2985.

[2] Wang H,Burnett T,Kono S,et al. Trans-ethnic genome-wide association study of colorectal cancer identifies a new susceptibility locus in VTI1A[J]. Nat Commun,2014,5:4613. doi:10.1038/ncomms5613.

[3] Ogino S,Lochhead P,Giovannucci E,et al. Discovery of colorectal cancer PIK3CA mutation as potential predictive biomarker:power and promise of molecular pathological epidemiology[J]. Oncogene,2014,33(23):2949 - 2955. doi:10.1038/onc.2013.244.

[4] Llosa NJ,Cruise M,Tam A,et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints[J]. Cancer Discov,2015,5(1):43 - 51. doi:10.1158/2159 - 8290.

[5] Renehan AG,Zwahlen M,Egger M. Adiposity and cancer risk:new mechanistic insights from epidemiology[J]. Nat Rev Cancer,2015,15(8):484 - 498. doi:10.1038/nrc3967.

[6] RWeber JS,D'Angelo SP,Minor D,et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037):a randomised,controlled,open-label,phase 3 trial[J]. Lancet Oncol,2015,16(4):375 - 384. doi:org/10.1016/S1470 - 2045(15)70076 - 8.

[7] RYang JC H,Wu YL,Schuler M,et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6):analysis of overall survival data from two randomised,phase 3 trials[J]. Lancet oncol,2015,16(2):141 - 151. doi:org/10.1016/S1470 - 2045(14)71173 - 8.

[8] RMurakami Y,Uemura K,Sudo T,et al. Prognostic impact of normalization of serum tumor markers following neoadjuvant chemotherapy in patients with borderline resectable pancreatic carcinoma with arterial contact[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2017,79(4):801 - 811. doi:10.1007/s00280 - 017 - 3281 - 1.

[9] RDenkert C,Von Minckwitz G,Brase JC,et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers[J]. J Clin Oncol,2014,33(9):983 - 991. doi:10.1200/JCO.2014.58.1967.

[10] Xuan W,Hankin J,Zhao H,et al. The potential benefits of the use of regional anesthesia in cancer patients[J]. Int J Cancer,2015,137(12):2774 - 2784. doi:org/10.1002/ijc.29306.

[11] Giordano C,Chemi F,Panza S,et al. Leptin as a mediator of tumor-stromal interactions promotes breast cancer stem cell activity[J]. Oncotarget,2016,7(2):1262. doi:10.18632/oncotarget.6014.

[12] Williams KE,Bundred NJ,Landberg G,et al. Focal adhesion kinase and Wnt signaling regulate human ductal carcinoma in situ stem cell activity and response to radiotherapy[J]. Stem cells,2015,33(2):327 - 341. doi:org/10.1002/stem.1843.

[13] D'Angelo RC,Ouzounova M,Davis A,et al. Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity[J]. Mol Cancer Ther,2015,14(3):779 - 787. doi:10.1158/1535 - 7163.

[14] Passaro D,Irigoyen M,Catherinet C,et al. CXCR4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Cell,2015,27(6):769 - 779. doi:org/10.1016/j.ccell.2015.05.003.

[15] Borutinskaite V,Bauraite-Akatova J,Navakauskiene R. Anti-leukemic activity of DNA methyltransferase inhibitor procaine targeted on human leukaemia cells[J]. Open Life Sciences,2016,11(1):322 - 330. doi:org/10.1515/biol - 2016 - 0044.

[16] Byun JS,Sohn JM,Leem DG,et al. In vitro synergistic anticancer activity of the combination of T-type calcium channel blocker and chemotherapeutic agent in A549 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett,2016,26(3):1073 - 1079. doi:org/10.1016/j.bmcl.2015.12.010.

[17] Alvaro-Bartolome M,La Harpe R,Callado LF,et al. Molecular adaptations of apoptotic pathways and signaling partners in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats[J]. Neuroscience,2011,196:1 - 15. doi:org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.074.

[18] S Rathore N,Manuja A,Kumar Manuja B,et al. Chemotherapeutic approaches against trypanosoma evansi:retrospective analysis,current status and future outlook[J]. Curr Top Med Chem,2016,16(20):2316 - 2327. doi:2016/00000016/00000020/art00008.

[19] Mohri Y,Miki C,Kobayashi M,et al. Correlation between preoperative systemic inflammation and postoperative infection in patients with gastrointestinal cancer:a multicenter study[J]. Surg Today,2014,44(5):859 - 867. doi:10.1007/s00595 - 013 - 0622 - 5.

[20] Ahmed AU,Sarvestani ST,Gantier MP,et al. Integrin-linked kinase modulates lipopolysaccharide-and Helicobacter pylori-induced nuclear factor κB-activated tumor necrosis factor-α production via regulation of p65 serine 536 phosphorylation[J]. J Biol Chem,2014,289(40):27776 - 27793. doi:10.1007/s00595 - 013 - 0622 - 5.

[21] Guo S,Nighot M,Al-Sadi R,et al. Lipopolysaccharide regulation of intestinal tight junction permeability is mediated by TLR4 signal transduction pathway activation of FAK and MyD88[J]. J Immunol,2015,195(10):4999 - 5010. doi:org/10.4049/jimmunol.1402598.

[22] Ríos DL,López C,álvarez ME,et al. Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor,cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide[J]. BMC Musculoskelet Disord,2015,16(1):153. doi:org/10.1186/s12891 - 015 - 0605 - 3.

[23] Li C,Zhang WJ,Frei B. Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction[J]. Redox Biol,2016,9:104 - 113. doi:org/10.1016/j.redox.2016.06.006.

(编辑:左艳芳)