

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.008
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190614.1326.035.html(2019-06-14)

Fascin、HPA 蛋白在丙泊酚抑制人胃癌 MKN-45 细胞转移中的作用

赖晓红,梁桦,刘洪珍,王汉兵,李露君
(广东省佛山市第一人民医院麻醉科 528000)

[摘要] **目的** 观察 Fascin、HPA 蛋白在丙泊酚抑制人胃癌 MKN-45 细胞转移中的作用。**方法** 将人胃癌细胞株 MKN-45 接种于培养板中,培养 24 h 后,分为 5 组:空白对照组(C 组)、溶剂脂肪乳剂组(I 组)、4 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚组(P_4 组)、8 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚组(P_8 组)、16 $\mu\text{g/mL}$ 丙泊酚组(P_{16} 组),给予相应处理 24 h 后,继续培养 24 h。采用细胞划痕实验检测细胞的迁移能力,Transwell 法检测细胞的侵袭能力,Western blot 法检测 Fascin 和 HPA 蛋白的表达。**结果** 与 C 组比较, P_4 、 P_8 和 P_{16} 组 MKN-45 细胞的迁移能力和侵袭能力下降($P<0.05$),Fascin 和 HPA 蛋白表达下调($P<0.05$),且呈浓度依赖性;与 C 组比较,I 组上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 丙泊酚可能通过下调 Fascin 和 HPA 蛋白的表达,抑制人胃癌 MKN-45 细胞的转移。

[关键词] 二异丙酚;MKN-45 细胞;肿瘤转移
[中图法分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2734-03

The role of Fascin and HPA in inhibiting the metastatic ability of human gastric cancer MKN-45 cells by propofol
LAI Xiaohong, LIANG Hua, LIU Hongzhen, WANG Hanbing, LI Lujun
(Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Foshan City, Foshan, Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Fascin and HPA in propofol inhibiting metastasis ability of human gastric cancer cell line MKN-45. **Methods** Human gastric cancer MKN-45 cells were seeded in culture plates. After 24 h of culture, they were divided into five groups; the control group (group C), intralipid group (group I), 4 $\mu\text{g/mL}$ propofol group (group P_4), 8 $\mu\text{g/mL}$ propofol group (group P_8) and 16 $\mu\text{g/mL}$ propofol group (group P_{16}), and the corresponding dose of fat emulsion or propofol was given for 24 h. Five groups of cells were then cultured for another 24 h. The migration of cells was evaluated by wound healing assay, the invasion of cells was determined by Transwell invasion assay. The protein expressions of Fascin and HPA in cells were analyzed by Western blot. **Results** When compare of group C, the migration and invasion ability of the cells in group P_4 , P_8 , P_{16} were significantly decreased ($P<0.05$), the protein expression of Fascin and HPA protein in group P_4 , P_8 , P_{16} were significantly down-regulated ($P<0.05$) in a dose-dependent manner. There were no significant difference in the above indexes between group C and group I. **Conclusion** Propofol can inhibited the invasion of MKN-45 cell and this effect might be mediated by down-regulating the expression of Fascin and HPA.

[Key words] propofol; MKN-45 cells; neoplasm metastasis

胃癌是常见的恶性肿瘤,由胃癌导致的死亡人数在恶性肿瘤中位居第二,仅次于肺癌,而大多数胃癌患者被发现时往往已处于胃癌晚期^[1]。手术是胃癌最重要的治疗方法之一。丙泊酚是胃癌根治术中常用的静脉麻醉药,而关于丙泊酚对肿瘤细胞的作用结果不一致^[2-4]。笔者前期研究表明丙泊酚可抑制体外培养的人胃癌 MKN-45 细胞的转移能力^[5],但具体机制不明。本研究拟探讨丙泊酚抑制人胃癌 MKN-45 细胞转移能力与 Fascin、HPA 蛋白表达的相关性,为

胃癌患者在麻醉期间用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂和仪器 胃癌 MKN-45 细胞(中国科学院上海细胞生物医学研究所),胎牛血清、DMEM 高糖培养基、RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司,美国),丙泊酚(阿斯利康公司,批号 NJ059,英国),Transwell 小室(Corning 公司,美国),Matrigel 胶(BD 公司,美国),聚偏氟乙烯(PVDF)膜(Millipore 公司,美国),兔抗人 Fascin 蛋白多克隆抗体(CST 公

司,美国),兔抗人 HPA 多克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 抗体(Santa Cruz 公司,美国),倒置光学显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 细胞培养 准备好含 10 % 的胎牛血清,且每毫升含 100 U 青霉素和 100 U 链霉素的 DMEM 高糖培养基,将符合细胞计数要求的人胃癌 MKN-45 细胞放入培养基,并放入条件为 37 ℃、含 5 % CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。每 3~4 天用含 0.02 % 乙二胺四乙酸的 0.25 % 胰蛋白酶溶液消化,以 1 : 3 传代培养。

1.3 丙泊酚干预 细胞培养 24 h 后,细胞分为 5 组,分别为加入 4、8、16 μg/mL 丙泊酚的 P₄、P₈、P₁₆ 组,不做干预的空白对照组(C 组)和丙泊酚的溶剂脂肪乳组(I 组),以上处理时间均为 24 h。

1.4 细胞划痕实验检测细胞的迁移能力 在 6 孔板背后用标记笔均匀地划上横线,每道横线相隔 5 mm,横穿过孔,每孔 5 条线。每组取 6 个培养孔。各组细胞处理后换液,再用丝裂霉素处理 1 h。用 20 μL 移液器枪头比着直尺,垂直于背后的横线进行细胞划痕。洗涤 3 次后加入无血清培养基并拍照,此时的划痕距离为 T₀,放入 37 ℃、含 5 % CO₂ 培养箱继续培养 24 h 后再拍照,此时的划痕距离为 T₂₄。计算细胞迁移率=(T₀-T₂₄)/T₀×100 %。

1.5 Transwell 法检测细胞侵袭能力 于 4 ℃ 溶解 Matrigel 胶 24 h 后,取 40 μL,加入预冷的 Transwell 小室,上室和下室用孔径为 8 μm 的聚碳酸酯微孔膜分隔,于 37 ℃ 下聚合 30 min 以凝固 Matrigel 胶。吸走小室中多余的液体,在上室加 100 μL 无血清 RPMI-1640 培养基、下室加入 600 μL 含血清的 RPMI-1640 培养基,于 37 ℃ 下放置 12 h 后洗涤。消化各组 MKN-45 细胞,每组取 6 个复孔,用含 0.2 % 牛血清清蛋白(BSA)的培养基重悬,收集细胞。以每室 100 μL 的量分别加入上室,于 37 ℃、含 5 % CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后取出小室,用 4 % 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 1 次,加入 0.5 % 结晶紫染色 10 min,后用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,于倒置光学显微镜下观察,计数下室的细胞数(即穿过滤膜的细胞数),随机选取 5 个视野,取其平均值。

1.6 Western blot 法检测人胃癌 MKN-45 细胞中 Fascin、HPA 蛋白的表达 胰酶消化收集各组细胞,离心 10 min 后弃培养液,用 PBS 清洗,再加入 100 μL 的细胞裂解液裂解细胞,离心 5 min 后,取上清液。BCA 法进行蛋白定量。取 10 μg 蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),后冲洗凝胶,将蛋白转移至 PVDF 膜,用含 5 % 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液(含 0.1 % Tween 20)封闭,后分别加入 1 : 500 稀释的兔抗人 Fascin 多克隆抗体,1 : 500 稀释的兔抗人 HPA 蛋白多克隆抗体,内参为 1 : 1 000 稀释的鼠抗人 GAPDH,于 24 ℃ 下孵育 4 h,用含 0.1 % Tween20 的 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加入

1 : 2 000 辣根过氧化物酶体 HRP 标记的二抗,24 ℃ 作用 1 h,后用 TBST 避光洗膜 3 次,每次 15 min,后放置暗盒中显影。扫描 PVDF 膜,进行吸光度(A)值分析,将 Fascin 和 HPA 的 A 值与 GAPDH 的 A 值对比,其比值反映 Fascin 和 HPA 蛋白相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD(方差齐)或 Dunnett's T3 法(方差不齐)分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

与 C 组比较,P₄、P₈、P₁₆ 组细胞的迁移能力和侵袭能力降低($P < 0.05$),I 组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$);随着丙泊酚浓度的增加,细胞的迁移能力和侵袭能力逐渐降低($P < 0.05$),见表 1,图 1、2。与 C 组比较,P₄、P₈、P₁₆ 组 Fascin 和 HPA 蛋白表达下调($P < 0.05$),I 组上述指标均差异无统计学意义($P > 0.05$);随着丙泊酚浓度的增加,Fascin 和 HPA 蛋白的表达逐渐下调($P < 0.05$),见图 3、表 2。

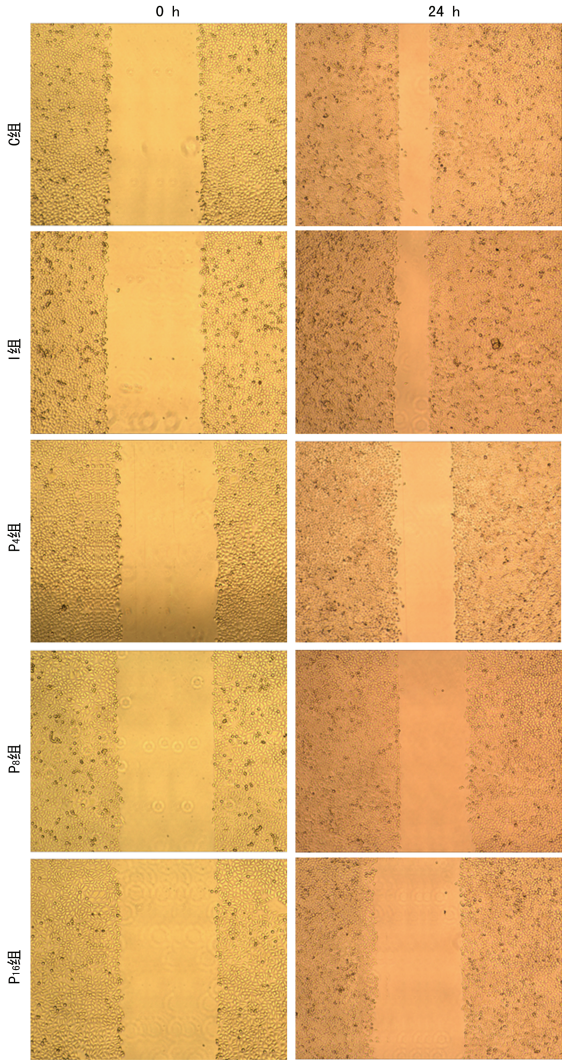
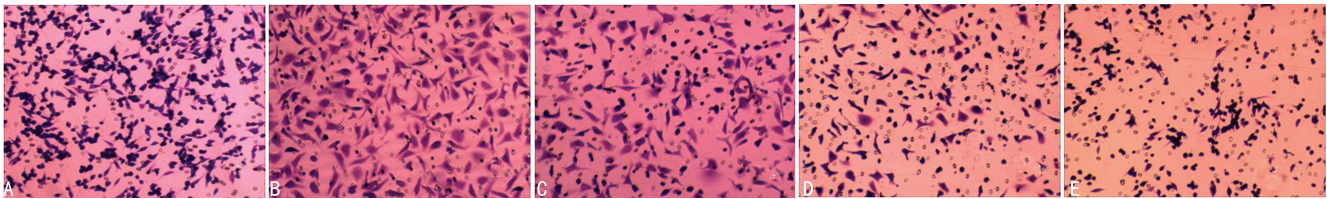


图 1 各组人胃癌 MKN-45 细胞的迁移能力检测(×40)



A: C 组; B: I 组; C: P₄ 组; D: P₈ 组; E: P₁₆ 组

图 2 各组人胃癌 MKN-45 细胞侵袭能力检测 (Transwell×200)

表 1 各组细胞 24 h 迁移与侵袭能力 ($\bar{x} \pm s, n=6$)		
组别	迁移率 (%)	侵袭细胞数 (n)
C 组	72±9	112±11
I 组	74±11	111±13
P ₄ 组	63±8 ^a	83±11 ^a
P ₈ 组	55±6 ^{ab}	64±10 ^{ab}
P ₁₆ 组	43±5 ^{abc}	37±8 ^{abc}

^a: $P<0.05$, 与 C 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 P₄ 组比较; ^c: $P<0.05$, 与 P₈ 组比较

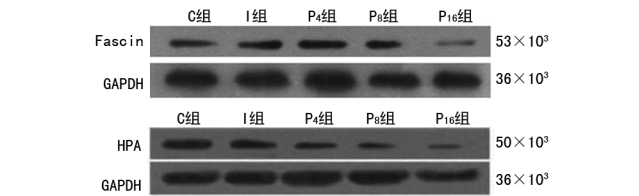


图 3 各组人胃癌 MKN-45 细胞 Fascin 和 HPA 蛋白 Western blot 图

表 2 各组细胞 Fascin、HPA 蛋白的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)		
组别	Fascin	HPA
C 组	0.87±0.12	1.97±0.33
I 组	0.98±0.11	2.08±0.28
P ₄ 组	0.49±0.13 ^a	1.49±0.27 ^a
P ₈ 组	0.27±0.06 ^{ab}	1.01±0.14 ^{ab}
P ₁₆ 组	0.11±0.02 ^{abc}	0.53±0.16 ^{abc}

^a: $P<0.05$, 与 C 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 P₄ 组比较; ^c: $P<0.05$, 与 P₈ 组比较

3 讨 论

细胞划痕实验可模拟肿瘤细胞迁移的过程,在一定程度上是评价体外肿瘤细胞迁移能力的有效方法;Transwell 实验中小室上、下室之间的基质胶与细胞外基质的结构相似,肿瘤细胞分解并穿过基质胶的能力反映了细胞的侵袭能力^[6-7]。本研究结果表明,丙泊酚可抑制体外培养的人胃癌 MKN-45 细胞的迁移和侵袭,且随着丙泊酚浓度的增加,细胞的迁移和侵袭能力逐渐降低,这与笔者前期的研究结果一致^[5]。肿瘤细胞转移是癌症患者死亡的重要原因。肿瘤细胞分泌蛋白酶降解细胞外基质和基底膜发生的侵袭过程,以及游离出细胞外基质后发生的迁移过程,是转移能否成功的两个较为关键因素^[8]。因此,抑制肿瘤细胞迁移和侵袭是防止肿瘤细胞转移的重要手

段^[9]。Fascin 蛋白是一种细胞骨架蛋白,在细胞迁移、黏附和细胞间相互作用中起重要作用,在正常上皮结构中几乎检测不到,但在胃癌患者中高度表达。Fascin 蛋白的过度表达与胃癌患者的不良预后呈正相关;在小鼠的实验模型中,抑制 Fascin 蛋白的表达,可抑制肿瘤细胞迁移和体外侵袭,从而减少肿瘤的转移^[10-11]。HPA 蛋白是一种内-B-D-葡萄糖醛酸苷酶,具有切割细胞表面和细胞外基质中硫酸乙酰肝素的能力,而硫酸乙酰肝素则起着维持细胞外基质稳定性的重要作用,同时 HPA 蛋白可重塑细胞基底膜的结构,这有利于肿瘤细胞穿破细胞外基质和血管壁,促进肿瘤细胞的侵袭。HPA 蛋白在很多肿瘤患者中均高度表达,包括结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、肝癌、膀胱癌、宫颈癌、乳腺癌、胃癌和前列腺癌等^[12-13]。本研究结果提示,经丙泊酚处理后的人胃癌 MKN-45 细胞迁移和侵袭能力下降,并随着丙泊酚浓度的增加,其迁移和侵袭能力逐渐下降,同时 Fascin、HPA 蛋白表达也逐渐下调,提示丙泊酚抑制人胃癌 MKN-45 细胞转移的作用可能与其下调人胃癌 MKN-45 细胞中 Fascin、HPA 蛋白表达,进而抑制细胞的迁移和侵袭能力有关。

综上所述,丙泊酚可呈浓度依赖性地抑制人胃癌 MKN-45 细胞的迁移和侵袭,其机制可能与下调 Fascin 和 HPA 蛋白的表达有关。

参考文献

[1] LI L L, CAO F, LIU B A, et al. TGF-beta induces fascin expression in gastric cancer via phosphorylation of smad3 linker area[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(6): 1890-1896.

[2] GARIB V, NIGGEMANN B, ZÄNKER K S, et al. Influence of non-volatile anesthetics on the migration behavior of the human breast cancer cell line MDA-MB-468[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2002, 46(7): 836-844.

[3] MAMMOTO T, MUKAI M, MAMMOTO A, et al. Intravenous anesthetic, propofol inhibits invasion of cancer cells[J]. Cancer Lett, 2002, 184(2): 165-170.

[4] MIAO Y F, ZHANG Y W, WAN H J, et al. GABA-receptor agonist, propofol inhibits invasion of colon carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(9): 583-588.

[5] 赖晓红, 梁桦, 杨承祥, 等. 异丙酚对人胃癌 MKN-45 细胞侵袭力的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(9): 1076-1078.

[6] WELLS C M, PARSONS M. Cell Migration[M]. Totowa, NJ Humana Press, 2011. (下转第 2742 页)

带有活络效灵丹低、中、高 3 个剂量组之间的比较,笔者也发现了在某些时间点,活络效灵丹低、高剂量组之间存在统计学差异。故在后期,本课题组会考虑加入针对此通路的拮抗剂,进一步深入探索。

参考文献

- [1] 胡超伟. 超微针刀疗法[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2014.
- [2] 袁建迪,朱少兵,沈彦,等. 中医外治急性软组织损伤的临床研究进展[J]. 中医外治杂志,2008,17(1):41-43.
- [3] 韦贵康. 中医筋伤学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006.
- [4] 章建华,丁伟国. 三黄软膏外敷治疗大鼠急性软组织损伤的实验研究[J]. 中医正骨,2010,22(3):6-9.
- [5] 张锡纯. 河北新医大学《医学衷中参西录》修订小组修订. 医学衷中参西录[M]. 石家庄:河北人民出版社,1977.
- [6] HONG Y Z, EUN M S, LISA Y G, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonkiole is function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264. 7 macrophages via NF- κ B, JNK and p38MAPK INACTIVATION[J]. Eur J Pharmacol,2018,24(586):340-349.
- [7] 刘丽燕,倪秀雄. TLRs/MyD88 信号转导通路树突状细胞的研究进展[J]. 海峡药理学,2009,21(10):1-4.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.
- [9] 徐卫东,罗红梅,喻建平. 加味活络效灵丹对啤酒诱发痛风模型大鼠关节组织中 IL-1 β 表达的影响[J]. 风湿病与关节炎,2017,6(3):12-14,63.
- [10] 徐琳本,陈丽萍,肖梅英. 活血促愈胶囊对外伤血瘀证大鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):270-273.
- [11] 李进辉,魏威,陈鲜. 玄神活血消肿方对急性软组织损伤大鼠 IL-6、IL-1 β 和血液流变学的影响[J]. 河南中医, 2016,36(12):2087-2089.

- [12] XIE D Q, SUN G Y, ZHANG X G, et al. Osthole Preconditioning protects rats against renal ischemia-reperfusion Injury[J]. Transplant Proc,2016,47(6):1620-1626.
- [13] 朱换平,许晓英,邱桐. 踝舒对急性软组织损伤动物模型 IL-1B 影响的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报,2013,20(3):20-21.
- [14] SONODA Y, KASAHARA T, YAMAGUCHI Y, et al. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline[J]. Anesth Pain Med,2012,2(1):32-35.
- [15] 苗雪,官杰. IL-8 的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011,32(22):3693-3695.
- [16] CASSATELLA M A, MEDA L, BONORA S, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med,1993,78(6):2207-2211.
- [17] 张道杰,段胡霞. IL-10 的研究进展[J]. 国外医学(免疫学分册),2003,26(1):40.
- [18] MOSSER D M, ZHANG X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine[J]. Immunol Rev,2008,226(1):205-218.
- [19] 刘丽燕,倪秀雄. TLRs/MyD88 信号转导通路树突状细胞的研究进展[J]. 海峡药理学,2009,21(10):1-4.
- [20] ZHU Y G, QU J M. Toll like receptors and inflammatory factors in Sepsis and differential expression related to age [J]. Chin Med J,2011,120(1):56-61.
- [21] FERRERO R L. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori* [J]. Mol Immunol,2016,42(8):879-885.

(收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-04-14)

(上接第 2736 页)

- [7] LIU X, WU X. Utilizing matrigel transwell invasion assay to detect and enumerate circulating tumor cells[J]. Methods Mol Biol,2017,1634:277-282.
- [8] WOOD S L, PERNEMALM M, CROSBIE P A, et al. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets [J]. Cancer Treat Rev,2014,40(4):558-566.
- [9] LANGLEY R R, FIDLER I J. The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stromal interactions in metastasis to different organs[J]. Int J Cancer,2011,128(11):2527-2535.
- [10] PAPASPYROU K, BROCHHAUSEN C, SCHMIDTMANN I, et al. Fascin upregulation in primary head and neck squa-

mous cell carcinoma is associated with lymphatic metastasis [J]. Oncol Lett,2014,7(6):2041-2046.

- [11] HAN S Q, HUANG J Y, LIU B Q, et al. Improving fascin inhibitors to block tumor cell migration and metastasis [J]. Mol Oncol,2016,10(7):966-980.
- [12] NADIR Y, BRENNER B. Heparanase procoagulant activity in cancer progression [J]. Thromb Res, 2016, 140 (S1):S44-48.
- [13] SANDERSON R D, ELKIN M, RAPRAEGER A C, et al. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy[J]. FEBS J,2017,284(1):42-55.

(收稿日期:2019-03-12 修回日期:2019-04-26)