

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.19.014

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200622.1845.012.html\(2020-06-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200622.1845.012.html(2020-06-30))

瑞芬太尼对胶质瘤 U87 细胞恶性侵袭、上皮-间质转化和血管新生的影响机制^{*}

余柄璋¹,孟志贤²,涂欢²,王霞²,张亚军²

(1.湖北省十堰市太和医院麻醉科 442000;2.武汉科技大学附属医院麻醉科,武汉 430064)

[摘要] **目的** 探讨瑞芬太尼(RFTN)对胶质瘤 U87 细胞恶性侵袭、上皮-间质转化(EMT)和血管新生的影响机制。**方法** 采用 CCK8 实验筛选 RFTN 对 U87 细胞的无毒性剂量,显微镜下观察其对 U87 细胞 EMT 的影响,分别采用 Transwell 小室实验、微管形成实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)观察其对 U87 细胞侵袭、血管新生及相关蛋白[E 钙黏素(E-cadherin)、N 钙黏素(N-cadherin)及波形蛋白(vimentin)]的影响。将 U87 细胞分为对照组(Control 组)、RFTN 处理组、血管内皮生长因子(VEGF)组和 VEGF+RFTN 组,构建 VEGF 过表达 U87 细胞,观察各组细胞侵袭能力及相关蛋白的表达。**结果** 与对照组比较,8~100 mg/mL RFTN 处理组的细胞存活率明显降低($P<0.05$),而 0.01~4.00 mg/mL RFTN 对细胞存活率无明显影响($P>0.05$),确定实验剂量为 1.00、2.00、4.00 mg/mL;与对照组比较,RFTN 处理组细胞形态开始转变为椭圆状,细胞间隙缩小,细胞侵袭数、微管样结构数、N-cadherin、Vimentin 及 VEGF 的表达下调,E-cadherin 的表达上调($P<0.05$);过表达 VEGF 后,细胞侵袭数、N-cadherin 表达上调,E-cadherin 表达下调,添加 4.00 mg/mL RFTN 可逆转 VEGF 的作用。**结论** RFTN 可抑制胶质瘤 U87 细胞侵袭,阻碍 EMT,减少血管新生,这可能与降低 VEGF 的表达有关。

[关键词] 瑞芬太尼;胶质瘤 U87 细胞;侵袭;上皮-间质转化;血管新生

[中图法分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)19-3205-06

Study on the mechanism of remifentanyl on the malignant invasion, epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of glioma U87 cells^{*}

YU Bingzhang¹, MENG Zhixian², TU Huan², WANG Xia², ZHANG Yajun²

(1. Department of Anesthesiology, Taihe hospital, Shiyan City, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Anesthesiology, Wuhan University of science and technology, Wuhan, Hubei 430064, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect and mechanism of remifentanyl (RFTN) on the malignant invasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis of glioma U87 cells. **Methods** The CCK8 experiment was used to screen the non-toxic dose of RFTN on U87 cells, and the effect on U87 cells EMT was observed under a microscope. Transwell chamber experiment, microtubule formation experiment, Western blot were used to observe U87 cell invasion, angiogenesis and related proteins [E-cadherin (E-cadherin), N-cadherin (N-cadherin) and vimentin (vimentin)]. Divide U87 cells into blank group (Control group), RFTN group, VEGF group and VEGF+RFTN group, construct vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpressing U87 cells, and observe cell invasion ability and related protein expression in each group. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate of the 8—100 mg/mL RFTN treatment group was significantly reduced ($P<0.05$), while 0.01—4.00 mg/mL RFTN had no significant effect on the cell survival rate ($P>0.05$), confirm the experiment the dose is 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL. Compared with the control group, the cell morphology of the RFTN treatment group began to change to an oval shape, the intercellular space was reduced, the number of cell invasion, the number of microtubule-like structures, the expression of N-cadherin, Vimentin and VEGF was down-regulated, and the expression of E-cadherin was up-regulated ($P<0.05$). After over-expression of VEGF, cell invasion number and N-cadherin expression are up-regulated, and E-cadherin expression is down-regulated. Adding 4.00 mg/mL RFTN can reverse the effect of VEGF. **Conclusion** RFTN

^{*} **基金项目:**湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2015MB123)。 **作者简介:**余柄璋(1987—),住院医师,本科,主要从事麻醉科神经阻滞方面研究工作。

can inhibit U87 cell invasion, hinder EMT, and reduce angiogenesis, which may be related to reducing VEGF expression.

[Key words] remifentanil; glioma U87 cell; invasion; epithelial-mesenchymal transition; angiogenesis

人脑胶质瘤是常见的中枢神经系统恶性肿瘤之一, 占所有颅内肿瘤的 40%~50%^[1]。因大多数胶质瘤呈浸润性生长, 与周围正常脑组织界限不明, 导致其病理学上肿瘤的全部切除十分困难, 使得胶质瘤术后复发率较高^[2]。而且临床观察发现, 随着手术次数和肿瘤复发次数的增多, 胶质瘤会呈恶化趋势^[3]。尽管现代医疗技术已得到飞速发展, 但胶质瘤患者预后情况仍不乐观, 而且颅内病变特殊的解剖位置, 手术过程中可能产生医源性损伤, 影响患者术后的生活质量, 故加强胶质瘤的机制研究仍是临床研究的重要课题^[4]。瑞芬太尼 (remifentanil, RFTN) 是肿瘤细胞根治术中常用的阿片类麻醉镇痛药物, 除了能增强患者术后的免疫功能, 影响其转归外, 还可直接作用于肿瘤细胞的生长、增殖及转移^[5-6]。XU 等^[7]研究发现, RFTN 可介导糖原合酶激酶-3 β , 诱导胶质瘤细胞的凋亡。肿瘤细胞侵袭能力是评价肿瘤转归的重要内容, 因此, 探讨 RFTN 对胶质瘤 U87 细胞侵袭能力的影响十分必要。本研究拟评价 RFTN 对胶质瘤 U87 细胞恶性侵袭、上皮-间质转化 (EMT) 和血管新生的影响及作用机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

U87 细胞购自美国 ATCC 公司, 批号 CL1449。

1.2 仪器与试剂

恒温细胞培养箱 (东莞市谱标实验器材科技有限公司), 低温高速离心机 (德国 Sartorius 公司), 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 全自动凝胶成像仪 (美国 Bio Rad 公司)。RFTN (宜昌人福药业有限责任公司, 国药准字 H20030197, 规格: 1 mg 5 瓶), 胎牛血清 (澳洲 AlphaCell 公司), DMEM 培养基 (美国 Sigma 公司), CCK8 试剂盒 (上海钰博生物科技有限公司), Transwell 小室、Matrigel 胶 (美国 BD 公司), 蛋白一抗、二抗 (美国 Abcam 公司), 脂质体 3000 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

将冻存的 U87 细胞于 37℃ 快速解冻, 离心后重悬于含 15%~20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养, 待细胞融合至 80%~90% 时, 添加胰蛋白酶消化细胞进行传代培养, 取对数生长期细胞用于后续试验。

1.3.2 CCK8 实验

将 U87 细胞以 5×10^3 个/mL 接种于 96 孔板, 培养 24 h; 分别加入 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、20.00、50.00 及 100.00 mg/mL 的

RFTN, 每个剂量 3 个复孔, 并设置对照组 (含有细胞, 但无 RFTN) 和空白组 (无细胞, 无 RFTN), 继续培养 24 h; 每孔加入含有 10 μ L CCK8 试剂的培养基继续孵育 2 h, 应用酶标仪检测各组细胞 450 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率: 细胞存活率 = (吸光度_{实验} - 吸光度_{空白}) / (吸光度_{对照} - 吸光度_{空白}) $\times 100\%$ 。

1.3.3 Transwell 小室实验

分别以 0、1.00、2.00 及 4.00 mg/mL 的 RFTN 处理 U87 细胞 (RFTN 处理组), 再添加无血清 DMEM 培养基饥饿处理 24 h; 经消化后以 4×10^5 个/mL 接种于 Matrigel 胶预处理的 Transwell 小室上层, 下层加入含血清的正常培养液, 培养 48 h; 取出 Transwell 小室, 拭去小室上层的残留细胞, 滴加结晶紫染色, 显微镜下随机挑选 5 个视野进行细胞计数并拍照。

1.3.4 细胞上皮间质形态转换的观察

分别以 0、1.00、2.00 及 4.00 mg/mL 的 RFTN 处理 U87 细胞, 置于 37℃、5% CO₂ 的环境中培养 24 h, 显微镜下随机挑选 5 个视野, 观察各组细胞形态并拍照。

1.3.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测

收集各组细胞, 添加 RIPA 裂解液提取细胞中总蛋白; 参照 BCA 试剂盒说明书, 检测蛋白浓度; 取 70~100 μ g 蛋白进行凝胶电泳分离, 再电转至 PVDF 膜, 浸于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h; 再置于相应的蛋白一抗中, 各蛋白稀释比分别为: 肌动蛋白 (actin) 1: 1 000、E 钙黏素 (E-cadherin) 1: 1 500、N 钙黏素 (N-cadherin) 1: 1 500、波形蛋白 (vimentin) 1: 2 000 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 1: 1 000, 4℃ 孵育过夜; 次日浸于蛋白二抗 (1: 10 000) 中, 室温下孵育 1 h; 最后应用全自动凝胶成像仪显示蛋白条带。利用 Image J 软件检测各蛋白条带灰度值, 以 Actin 为内参基因, 计算各蛋白的相对表达量。

1.3.6 微管形成实验

预先在 96 孔板中加入 Matrigel 胶, 待其凝固后接种 1.5×10^4 个/mL 经 RFTN (0、1.00、2.00 及 4.00 mg/mL) 处理的 U87 细胞, 继续培养 8 h; 显微镜下随机挑选 5 个视野, 计数微管结节数并拍照。

1.3.7 转染实验

参照脂质体 3000 试剂盒说明书, 将 pcDNA-NC 和 pcDNA-VEGF 转染至 U87 细胞, 转染 6 h 后改用常规 DMEM 培养基培养 72 h, 收集各组细胞。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计学软件进行处理, 计量资料

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

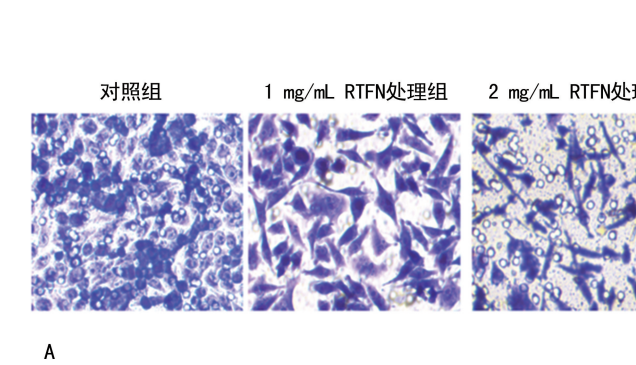
2.1 RTFN 对 U87 细胞存活率的影响

CCK8 结果显示,与对照组比较,8~100 mg/mL RTFN 处理组的细胞存活率明显降低,细胞存活率均低于 80%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。选择 RTFN 无毒剂量 1.00、2.00、4.00 mg/mL 进行后续实验,见图 1。

2.2 RTFN 对 U87 细胞侵袭的影响

与对照组比较,RTFN 各处理组细胞侵袭数显著减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

2.3 RTFN 对 U87 细胞 EMT 的影响



显微镜下细胞形态显示,对照组细胞多呈梭形,细胞间链接松散;相较于对照组,2、4 mg/mL RTFN 处理组细胞形态开始转变为椭圆状,细胞间隙缩小,细胞更密集,见图 3。

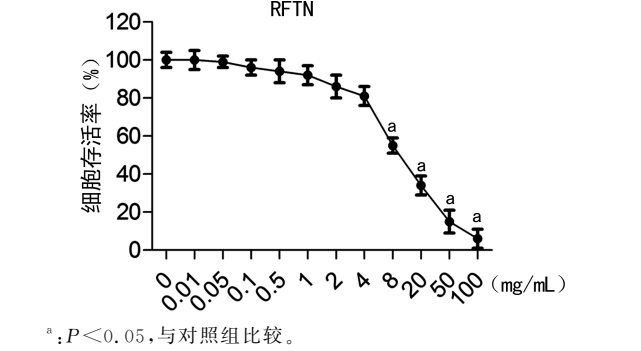


图 1 RTFN 对 U87 细胞存活率的影响

A:结晶紫染色($\times 100$);B:各组侵袭细胞数的比较;^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

图 2 RTFN 对 U87 细胞侵袭的影响

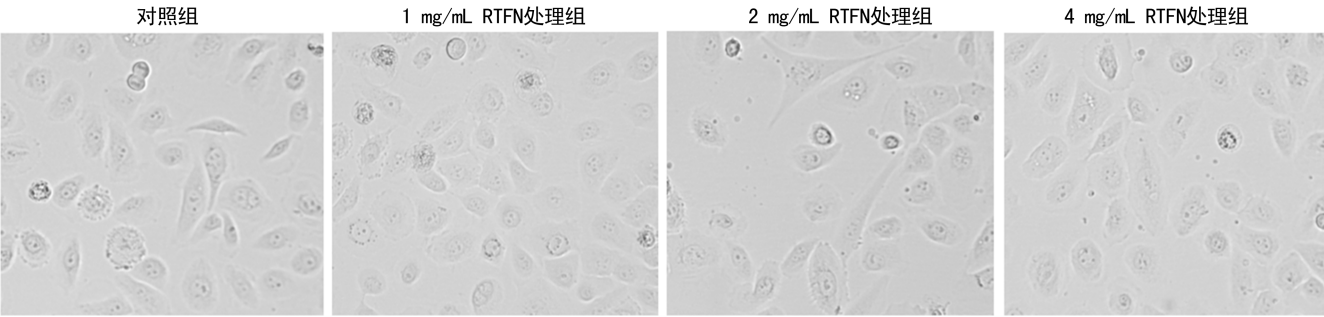
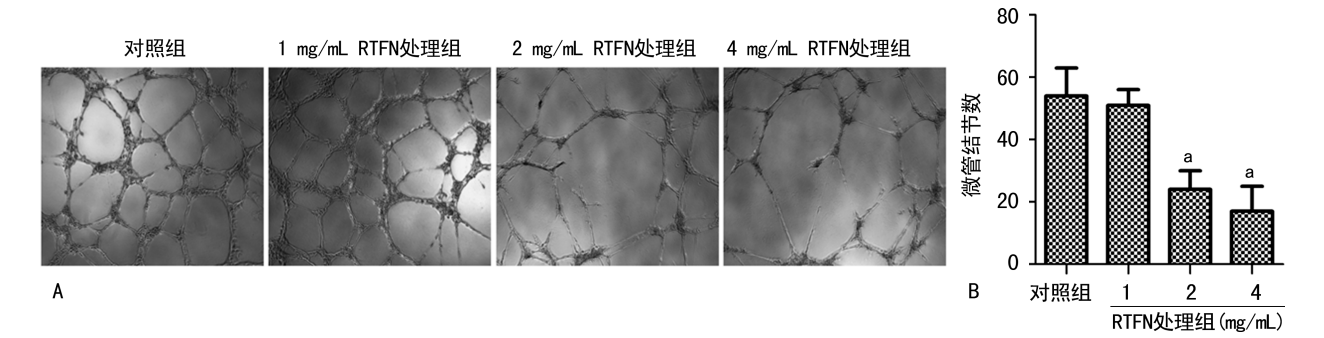


图 3 RTFN 对 U87 细胞 EMT 的影响($\times 100$)



A:显微镜下微管样结构表现($\times 400$);B:各组微管结节数的比较;^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

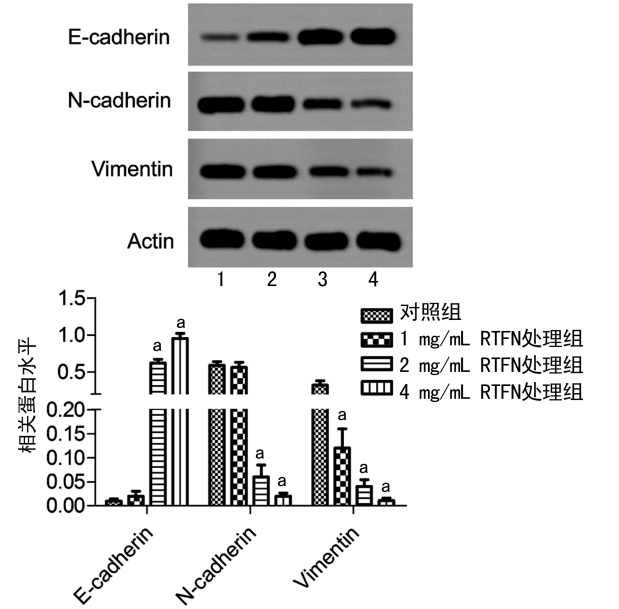
图 4 RTFN 对 U87 细胞血管新生的影响

2.4 RTFN 对 U87 细胞血管新生的影响

微管形成实验结果显示,对照组中的微管样结构

完整而典型,数量多;2、4 mg/mL RTFN 处理组的微管样结构破坏、断续;通过计数,2、4 mg/mL RTFN

处理组的微管样结构数明显少于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



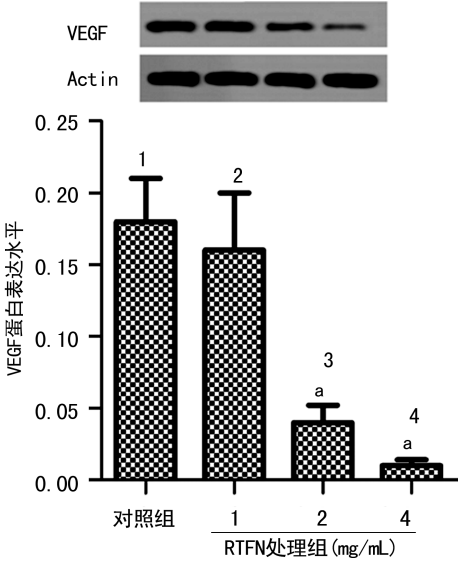
1:对照组;2~4:1、2、4 mg/mL RTFN 处理组;^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 5 RTFN 对 U87 细胞中 EMT 标记分子表达的影响

2.5 RTFN 对 U87 细胞中 EMT 标记分子表达的影响

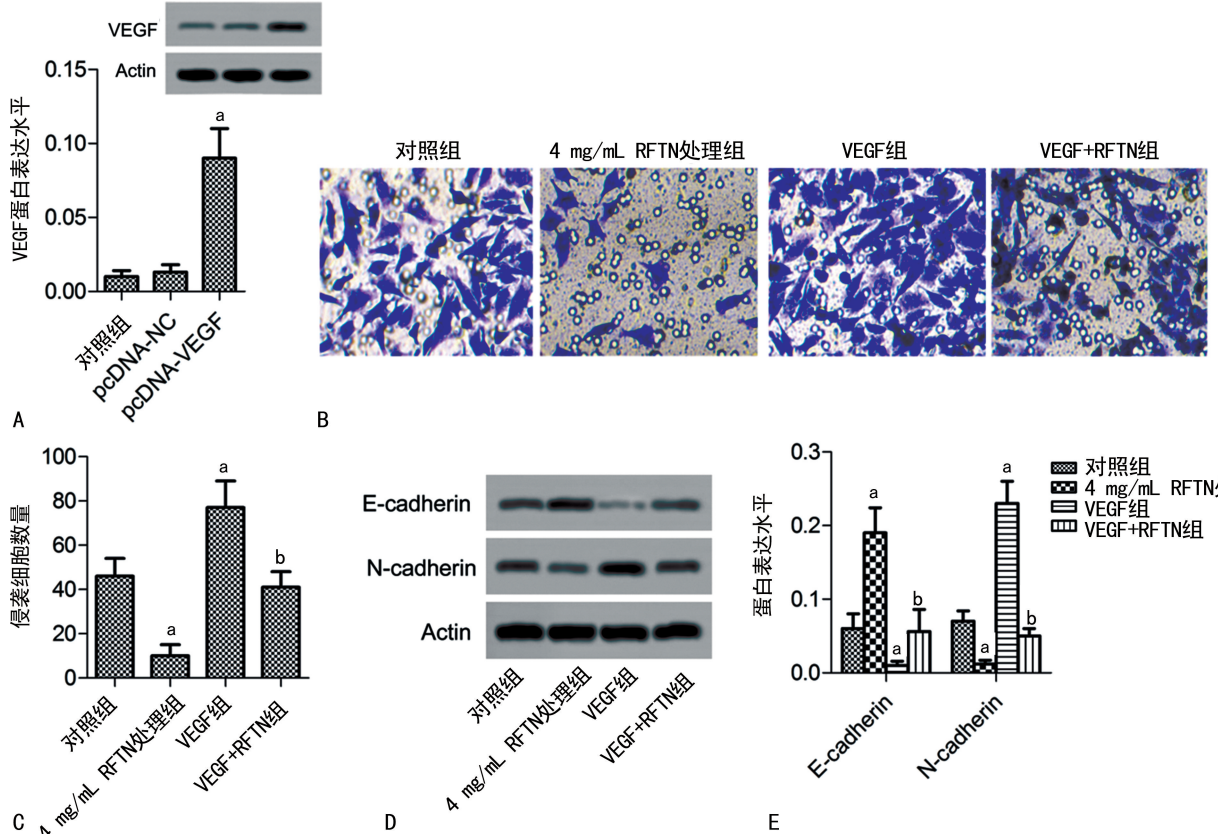
Western blot 结果显示,与对照组比较,2、4 mg/

mL RTFN 处理组的 E-cadherin 蛋白表达明显上调, N-cadherin 蛋白表达明显下调 ($P<0.05$);1、2、4 mg/mL RTFN 处理组的 Vimentin 蛋白表达较对照组显著下调 ($P<0.05$),见图 5。



1:对照组;2~4:1、2、4 mg/mL RTFN 处理组;^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 6 RTFN 对 U87 细胞中 VEGF 表达的影响



A:转染 pcDNA-VEGF 后细胞中 VEGF 蛋白表达的变化;B:RTFN 降低 VEGF 的表达对 U87 细胞侵袭的影响,结晶紫染色($\times 100$);C:RTFN 降低 VEGF 的表达后各组侵袭细胞数比较;D:RTFN 降低 VEGF 的表达对 U87 细胞 EMT 标记分子表达的影响;E:RTFN 降低 VEGF 的表达后各组 EMT 标记分子表达的比较;^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 VEGF 组比较。

图 7 RTFN 降低 VEGF 的表达对 U87 细胞侵袭与 EMT 的影响

2.6 RTFN 对 U87 细胞中 VEGF 表达的影响

与对照组比较,2、4 mg/mL RFTN 处理组,VEGF 表达水平显著下降($P<0.05$),见图 6。

2.7 RTFN 降低 VEGF 的表达对 U87 细胞侵袭与 EMT 的影响

与对照组比较,pcDNA-VEGF 组 VEGF 蛋白的表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$);在 Transwell 小室实验结果中,与对照组比较,VEGF 组的细胞侵袭数明显增多($P<0.05$);Western blot 实验结果显示,与对照组比较,VEGF 组的 E-cadherin 蛋白表达明显下调,N-cadherin 蛋白表达明显上调($P<0.05$);与 VEGF 组比较,VEGF+RFTN 组的 E-cadherin 蛋白表达明显上调,N-cadherin 蛋白表达明显下调($P<0.05$),见图 7。

3 讨 论

胶质瘤的发生、发展是由多因素共同参与的复杂过程,涉及多条信号通路,伴随着抑癌基因的失活及促癌基因的激活;胶质瘤除了一般恶性肿瘤的无限增殖与抗凋亡恶性表型外,还具有异常活跃的侵袭性生长特点^[8]。因此,有效阻断胶质瘤细胞的侵袭有助于其治疗。RTFN 是一种新型阿片受体激动剂,具有镇痛效果强、起效快、易控制等优点^[9]。阿片类药物抑制肿瘤细胞的机制可能有:(1)结合肿瘤细胞表面 μ 受体,抑制其 DNA 的合成;(2)下调炎性细胞因子的表达,保护机体的免疫功能,间接抑制肿瘤细胞生长;(3)诱导肿瘤细胞的凋亡;(4)抑制肿瘤细胞转移^[10-11]。研究显示,RTFN 可降低患者术后的免疫抑制增强机体免疫力,抑制肿瘤的转移^[12]。但 RTFN 对胶质瘤侵袭能力的影响尚不清楚。本研究结果显示,当 RTFN 浓度达到 8 mg/mL 时,可明显抑制 U87 细胞的增殖,与文献报道结果类似^[13]。考虑 RTFN 抑制 U87 细胞增殖对后续实验的影响,故选取其无毒剂量 1.00、2.00、4.00 mg/mL 为实验剂量。

本研究结果显示,RTFN 可显著抑制 U87 细胞的侵袭。在胶质瘤的侵袭性生长过程中,EMT 是重要基础之一。上皮细胞间连接紧密,是细胞一道严密的防线;间质细胞毗邻上皮细胞,但其连接松散,缺乏细胞极性,具有转移和侵袭的能力。EMT 的调控也是一个十分复杂的网络,其中 E-cadherin 表达的缺失,是 EMT 的关键步骤,导致细胞丧失极性^[14]。N-cadherin 和 Vimentin 则是间质细胞的标志物,主要功能是维持间质特性^[15]。本研究结果显示,RTFN 可明显抑制 U87 细胞 EMT,可能通过上调 E-cadherin 的表达,并下调 N-cadherin 和 Vimentin 的表达来实现。

血管新生是恶性实体肿瘤突破上皮基底膜后进一步生长所必须的,肿瘤中新生血管表现为管壁不完整、无平滑肌成分,仅由有孔的内皮细胞和片状基膜构成^[16]。VEGF 是肿瘤血管生成的主要因子,可特异性促进血管内皮细胞的增殖。本研究发现,RTFN 可明显减少 U87 细胞微管样结构数,下调 VEGF 的表达,从而抑制细胞的血管新生。另外,VEGF 也是目前抗肿瘤侵袭转移的重要治疗靶点之一,可通过不同途径参与肿瘤的侵袭和转移,如血管新生、提高血管通透性、调节细胞免疫及诱导内皮细胞黏附分子的表达等^[17]。本研究结果显示,VEGF 过表达后 U87 细胞的侵袭能力增加,EMT 水平提高,但 RTFN 可逆转 VEGF 的作用,提示 RTFN 可能下调 VEGF 的表达,从而抑制 U87 细胞侵袭、EMT 及血管新生。

综上所述,本研究发现 RFTN 可抑制 U87 细胞侵袭,阻碍 EMT,减少血管新生,可能与降低 VEGF 的表达有关。但本研究仅在细胞水平探讨,后续将选取动物载体进一步验证结论,另外,RTFN 下调 VEGF 的作用机制尚有待深入分析。

参考文献

- [1] JONES C,KARAJANNIS M A,JONES D T,et al. Pediatric high-grade glioma:biologically and clinically in need of new thinking[J]. *Neuro Oncol*,2017,19(2):153-161.
- [2] XUE J,ZHAO Z,ZHANG L,et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence[J]. *Nat Nanotechnol*,2017,12(3):46.
- [3] XU W,GAO L,SHAO A,et al. The performance of 11C-Methionine PET in the differential diagnosis of glioma recurrence[J]. *Oncotarget*,2017,8(53):91030-91039.
- [4] WU F,ZHANG C,CAI J,et al. Upregulation of long noncoding RNA HOXA-AS3 promotes tumor progression and predicts poor prognosis in glioma[J]. *Oncotarget*,2017,8(32):53110-53123.
- [5] MOTAMED C,AUDIBERT J,ALBI-FELDZER A,et al. Postoperative pain scores and opioid consumption in opioid-dependent patients with cancer after intraoperative remifentanyl analgesia: A prospective case-controlled study

- [J]. *J Opioid Manag*, 2017, 13(4):221-228.
- [6] 吴远波, 李欣, 鲁胜强, 等. 瑞芬太尼对人肺腺癌细胞转移能力和白细胞介素-7 受体表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(9):1058-1060.
- [7] XU J, XU P, LI Z, et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β in glioma cell apoptosis induced by remifentanyl[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(4):494-506.
- [8] ZHANG M, HUANG N, YANG X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13):1805-1814.
- [9] KIM S Y, KIM N K, BAIK S H, et al. Effects of postoperative pain management on immune function after laparoscopic resection of colorectal cancer: a randomized study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(19):e3602.
- [10] KIM J Y, AHN H J, KIM J K, et al. Morphine suppresses lung cancer cell proliferation through the interaction with opioid growth factor receptor: an in vitro and human lung tissue study[J]. *Anesth Analg*, 2016, 123(6):1429-1436.
- [11] BAO F, LI C L, CHEN X Q, et al. Clinical opioids differentially induce co-internalization of μ - and δ -opioid receptors[J]. *Mol Pain*, 2018, 14:1744806918769492.
- [12] UCHIDA K, YASUNAGA H, MIYATA H, et al. Impact of remifentanyl use on early postoperative outcomes following brain tumor resection or rectal cancer surgery[J]. *J Anesth*, 2012, 26(5):711-720.
- [13] XU Y J, LI S Y, CHENG Q, et al. Effects of anaesthesia on proliferation, invasion and apoptosis of LoVo colon cancer cells in vitro[J]. *Anaesthesia*, 2016, 71(2):147-154.
- [14] ZHU G J, SONG P P, ZHOU H, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, beta-catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):3472-3481.
- [15] LI W, DONG S, WEI W, et al. The role of transcriptional coactivator TAZ in gliomas[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50):82686-82699.
- [16] LANG H L, HU G W, CHEN Y, et al. Glioma cells promote angiogenesis through the release of exosomes containing long non-coding RNA POU3F3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(5):959-972.
- [17] MA X, LI Z, LI T, et al. Long non-coding RNA HOTAIR enhances angiogenesis by induction of VEGFA expression in glioma cells and transmission to endothelial cells via glioma cell derived-extracellular vesicles[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11):5012-5021.

(收稿日期:2020-01-18 修回日期:2020-05-13)

(上接第 3204 页)

- [13] MENG S S, GUO F M, ZHANG X W, et al. mTOR/STAT-3 pathway mediates mesenchymal stem cell-secreted hepatocyte growth factor protective effects against lipopolysaccharide-induced vascular endothelial barrier dysfunction and apoptosis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):3637-3650.
- [14] 尉娜, 王建平, 路坦. 缺氧活化 AMPK/mTOR 通路对脑血管内皮细胞增殖及代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(5):1283-1285.
- [15] 尚粉青, 闫龙龙, 张珂, 等. 高糖通过调节腺苷酸活化蛋白激酶/聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1 的磷酸化抑制 B 细胞淋巴瘤/白血病-6 基因表达的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(11):1012-1015.

(收稿日期:2020-01-08 修回日期:2020-05-22)