

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211227.1843.010.html\(2021-12-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211227.1843.010.html(2021-12-28))

瑞芬太尼调控 Linc00462/miR-2355-5p 对肾癌细胞生物学行为的影响*

文竹,李军[△],何洁

(电子科技大学医学院附属绵阳医院/绵阳市中心医院麻醉科,四川绵阳 621000)

[摘要] **目的** 探讨瑞芬太尼对肾癌(RCC)细胞生物学行为的影响和机制。**方法** 通过四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、克隆形成实验、Transwell 实验、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测不同浓度的瑞芬太尼对 RCC 细胞 786-0 增殖、克隆迁移与侵袭,以迁移及基因间长链非编码 RNA00462(Linc00462)、微 RNA(miR)-2355-5p 表达的影响。将 Linc00462 小干扰 RNA(si-Linc00462)、Linc00462 过表达质粒(pcDNA-Linc00462)分别转染 786-0 细胞,观察干扰 Linc00462 或过表达 Linc00462 对 786-0 细胞生物学行为的影响。双荧光素酶报告实验和 RT-qPCR 分析 Linc00462 和 miR-2355-5p 的靶向关系。**结果** 瑞芬太尼处理显著降低 786-0 细胞活力、克隆形成数、迁移数和侵袭数($P < 0.05$),降低 Linc00462 表达水平($P < 0.05$),增加 miR-2355-5p 表达水平($P < 0.05$)。干扰 Linc00462 表达显著降低 786-0 细胞克隆形成数、迁移数和侵袭数($P < 0.05$),增加 miR-2355-5p 表达水平($P < 0.05$)。过表达 Linc00462 显著增加 786-0 克隆形成数、迁移数和侵袭数($P < 0.05$),降低 miR-2355-5p 表达水平($P < 0.05$)。过表达 Linc00462 显著减弱瑞芬太尼处理对 786-0 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验结果显示 Linc00462 能与 miR-2355-5p 直接结合。**结论** 瑞芬太尼可抑制 RCC 细胞增殖、迁移和侵袭,其机制可能与下调 Linc00462/miR-2355-5p 通路表达有关。

[关键词] 肾癌;瑞芬太尼;细胞增殖;迁移;侵袭;Linc00462;miR-2355-5p**[中图分类号]** R737.11**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1093-07

Effects of remifentanyl on the biological behavior of renal cancer cells by regulating Linc00462/miR-2355-5p*

WEN Zhu, LI Jun[△], HE Jie

(Department of Anesthesiology, Mianyang Central Hospital/Affiliated Mianyang Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Mianyang, Sichuan 621000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of remifentanyl on the biological behavior of renal cancer (RCC) cells. **Methods** The effects of different concentrations of remifentanyl on the proliferation, cloning, migration, invasion and long intergenic non-coding RNA (Linc00462) and microRNA (miR)-2355-5p expression of RCC cells 786-0 were detected by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method, clone formation assay, Transwell assay, real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Linc00462 small interfering RNA (si-Linc00462), Linc00462 overexpression plasmid (pcDNA-Linc00462) were respectively transfected into 786-0 cells to observe the effect of interference with Linc00462 or Linc00462 overexpression on the biological behavior. The dual luciferase report assay and RT-qPCR were applied to analyze targeting relationship between Linc00462 and miR-2355-5p. **Results** Remifentanyl treatment significantly reduced the viability of 786-0 cells, clonal formation number, migration number and invasion number of 786-0 cells ($P < 0.05$), decreased the expression level of Linc00462 ($P < 0.05$), and increased the expression level of miR-2355-5p ($P < 0.05$) in 786-0 cells. Interference with Linc00462 expression significantly reduced clonal formation number, migration and invasion number of 786-0 cells ($P < 0.05$), and increased the expression level of miR-2355-5p ($P < 0.05$). Overexpression level of Linc00462 significantly increased clonal formation number, migration and invasion number of 786-0 ($P < 0.05$), and decreased the expression of miR-2355-5p ($P < 0.05$). Overexpression of Linc00462

* 基金项目:四川省重点实验室研究基金 2020 年度项目(SYS20-01)。 作者简介:文竹(1983-),副主任医师,本科,主要从事超声在围术期中应用研究。 [△] 通信作者, E-mail:lj89199@163.com。

significantly reduced the inhibitory effects of remifentanyl on the proliferation, migration and invasion of 786-0 cells ($P < 0.05$). The results of the dual luciferase report assay showed that Linc00462 could directly bind to miR-2355-5p. **Conclusion** Remifentanyl can inhibit the proliferation, migration and invasion of RCC cells, and its mechanism may be related to the down-regulation of Linc00462/ miR-2355-5p axis.

[Key words] renal cancer; remifentanyl; cell proliferation; migration; invasion; Linc00462; miR-2355-5p

肾癌(RCC)是泌尿系统常见的恶性肿瘤,近年其发病率呈上升趋势。手术、放疗和分子靶向治疗的应用在一定程度上改善了 RCC 患者生存现状,但其 5 年生存率仍非常低,其中远处转移和复发是 RCC 患者治疗失败和复发的主要原因^[1]。瑞芬太尼是 μ -阿片类全身麻醉药物,具有麻醉起效快、镇痛作用强、代谢快、不良反应少等优势。近年研究表明,瑞芬太尼可抑制 T 淋巴细胞增殖和炎症因子释放,从而缓解结肠癌患者术后氧化应激和炎症反应^[2]。此外,瑞芬太尼通过激活糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)诱导胶质瘤细胞凋亡^[3],并通过上调微 RNA-206(miR-206)、miR-519d-3p 表达水平抑制胃癌细胞增殖并诱导凋亡^[4-5]。然而瑞芬太尼抗 RCC 的相关研究十分有限。长链非编码 RNA(lncRNA)是长度超过 200 nt 但不编码蛋白的 RNA 分子,其参与基因调控和肿瘤细胞稳态的各个方面,可能表现出肿瘤抑制和促进功能^[6]。研究发现基因间 lncRNA00462(Linc00462)在肝癌中显著上调,并通过激活磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)/蛋白激酶(AKT)通路增强肝癌细胞侵袭表现^[7]。但目前 Linc00462 在 RCC 中的表达和功能尚不清楚。miR-2355-5p 在膀胱癌中表达水平减少,过表达 miR-2355-5p 能够抑制膀胱癌细胞恶性表型^[8]。但目前 Linc00462、miR-2355-5p 在 RCC 中的表达和功能尚未见研究。本研究通过观察瑞芬太尼、Linc00462 对 RCC 细胞 786-0 增殖、迁移、侵袭的影响,旨在揭示瑞芬太尼在 RCC 中的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

RCC 细胞 786-0 购自美国 ATCC 公司;瑞芬太尼购自江苏恩华药业股份有限公司;Linc00462 小干扰 RNA(si-Linc00462)、小干扰 RNA 阴性对照(si-NC)、Linc00462 过表达载体(pcDNA-Linc00462)、荧光素酶报告质粒由上海吉凯基因公司合成或生产;四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒购自南京森贝伽生物公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;E-cadherin 兔抗单克隆抗体、N-cadherin 兔抗单克隆抗体、GAPDH 兔抗多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒购自上海联迈生物工程公司;化学发光试剂盒购自南京诺唯赞生物公司;Prime Script 逆转录试剂盒、SYBR Prime Script 实时荧光定量(RT-qPCR)试剂盒、miRNA cDNA 合成试剂盒购自大连宝生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验分组

786-0 细胞用含 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO_2 、湿度饱和的培养箱培养。胰酶消化 80% 融合细胞,1:3 传代。以 3×10^5 /孔的细胞密度接种对数期 786-0 细胞至 6 孔板,参照 LipofectamineTM 2000 说明书分别转染 si-NC、si-Linc00462、pcDNA-Linc00462 至 50% 融合的 786-0 细胞,转染 48 h 用 RT-qPCR 检测转染效果后进行下一步实验。实验分组,对照组:正常培养的 786-0 细胞;瑞芬太尼 10 nmol/L 组、瑞芬太尼 20 nmol/L 组、瑞芬太尼 40 nmol/L 组;分别用含有 10、20、40 nmol/L 瑞芬太尼^[4]的培养液孵育细胞 24 ~ 72 h;si-NC 组、si-Linc00462 组、pcDNA-Linc00462 组;分别转染 si-NC、si-Linc00462、pcDNA-Linc00462 的 786-0 细胞;瑞芬太尼+pcDNA-Linc00462 组;用含 40 nmol/L 瑞芬太尼的培养液孵育转染 pcDNA-Linc00462 的细胞 48 h。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力

以 6×10^3 /孔的密度接种 786-0 细胞至 96 孔板,分别用含 10、20、40 nmol/L 瑞芬太尼的培养液孵育细胞,在培养 24、48、72 h 时分别取出 1 板细胞,每孔加入 20 μ L 的 MTT,孵育 4 h 后终止培养,吸尽孔内培养液。每孔内加入 150 μ L 的二甲基亚砜,至摇床上低速震荡 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值。

1.2.3 克隆形成实验检测细胞克隆能力

以 500/孔的细胞密度接种 786-0 细胞至 6 孔板,轻轻抖动平板使细胞分散均匀,放入培养箱常规培养直至出现细胞集落。用甲醇固定集落 10 min,结晶紫染色 15 min,显微镜下计数含有 50 个以上细胞的集落数。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭

将各组 786-0 细胞重悬于无血清培养基中,取 100 μ L 细胞悬液转移至未包被(迁移)或包被(侵袭)基质胶的 Transwell 上室,下室中加入约 600 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后,用甲醇固定 Transwell 底部膜表面细胞,用结晶紫染色,光镜下计数 5 个视野细胞数总和,以均值表示细胞侵袭或迁移数。

1.2.5 蛋白免疫印记(Western blot)检测 E-cadher-

in、N-cadherin 蛋白表达

用预冷的 PBS 洗涤各组 786-0 细胞 1 次,于冰上加入细胞裂解液提取细胞总蛋白。取 30 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,设置电压为 100 V、电泳 100 mA。用湿式转膜装置将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,电流设置 30 mA。室温下,用封闭缓冲液孵育 5 h;然后用 E-cadherin (1 : 10 000)、N-cadherin (1 : 5 000)、GAPDH (1 : 2 500)一抗溶液孵育 PVDF 膜 2 h;随后用二抗溶液与 PVDF 膜反应 1 h。用化学发光试剂盒检测 PVDF 膜上的免疫条带,以 Image 软件测得相对灰度值表示目的蛋白表达水平。

1.2.6 RT-qPCR 检测 Linc00462、miR-2355-5p 表达

根据 TRIzol 试剂说明书提取各组 786-0 细胞总 RNA。利用 Prime Script 反转录试剂盒合成 cDNA,再用 SYBR Prime Script RT-qPCR 试剂盒进行 PCR 反应。Linc00462 正向引物 5'-ACT AGG TCC TTC TGG TGT TTT-3',反向引物 5'-GTA AAA CTT GCT GCT GAT G-3'; GAPDH 正向引物 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3',反向引物 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'; miR-2355-5p 正向引物 5'-ATC CCC AGA TAC AAT GGA CAA-3',反向引物 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; U6 正向引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',反向引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算靶基因表达水平。GAPDH 为 Linc00462 的内参,U6 为 miR-2355-5p 的内参。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验

为确定 Linc00462 与 miR-2355-5p 的靶向关系,利用 LipofectamineTM 2000 将 miR-2355-5p mimic 或 miR-NC 分别转染 miR-2355-5p 结合位点的 Linc00462 野生型 (wt-Linc00462) 及突变型 (mut-Linc00462) 荧光素酶报告载体。在转染后 48 h 利用双荧光素酶活性检测试剂盒分析荧光素酶活性。

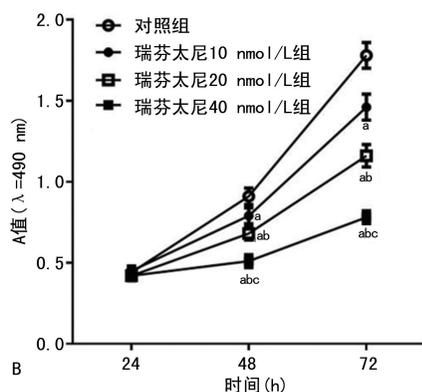
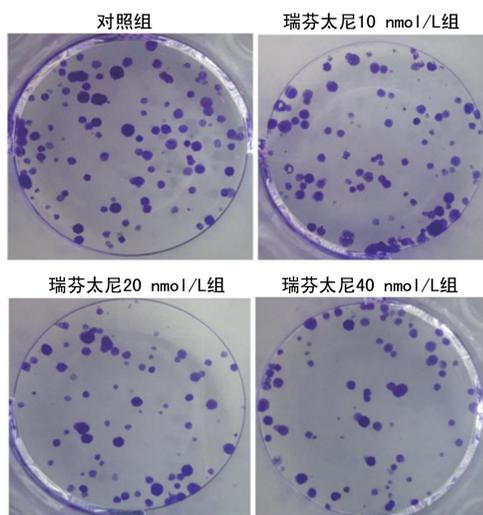
1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间数据比较采用独立样本 *t* 检验,3 组及以上组间比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 瑞芬太尼对 786-0 细胞增殖及 Linc00462、miR-2355-5p 表达的影响

与对照组比较,瑞芬太尼 10、20、40 nmol/L 组 786-0 细胞克隆形成数、细胞 A 值 (48 h、72 h)、Linc00462 表达水平显著降低 (*P* < 0.05),miR-2355-5p 表达水平显著增加 (*P* < 0.05)。见图 1 和表 1。



A: 克隆形成实验; B: MTT 实验。^a: *P* < 0.05, 与对照组比较; ^b: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

图 1 瑞芬太尼抑制 786-0 细胞克隆形成和细胞活性

表 1 瑞芬太尼对 786-0 Linc00462、miR-2355-5p 表达水平和细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462	miR-2355-5p	克隆形成数(个)
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	132.67 ± 4.99
瑞芬太尼 10 nmol/L 组	0.78 ± 0.05 ^a	1.67 ± 0.06 ^a	112.33 ± 2.87 ^a
瑞芬太尼 20 nmol/L 组	0.47 ± 0.03 ^{ab}	2.71 ± 0.12 ^{ab}	85.00 ± 2.16 ^{ab}
瑞芬太尼 40 nmol/L 组	0.22 ± 0.01 ^{abc}	3.95 ± 0.15 ^{abc}	61.00 ± 1.63 ^{abc}
<i>F</i>	402.829	491.188	291.166
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

^a: *P* < 0.05, 与对照组比较; ^b: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: *P* < 0.05, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

2.2 瑞芬太尼对 786-0 细胞迁移、侵袭的影响

与对照组比较,瑞芬太尼 10、20、40 nmol/L 组 786-0 细胞迁移数、侵袭数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05),E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 (*P* < 0.05)。见图 2 和表 2。

2.3 沉默 Linc00462 对 786-0 细胞增殖、迁移、侵袭的影响

与对照组、si-NC 组比较,si-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05),E-

cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著增加($P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

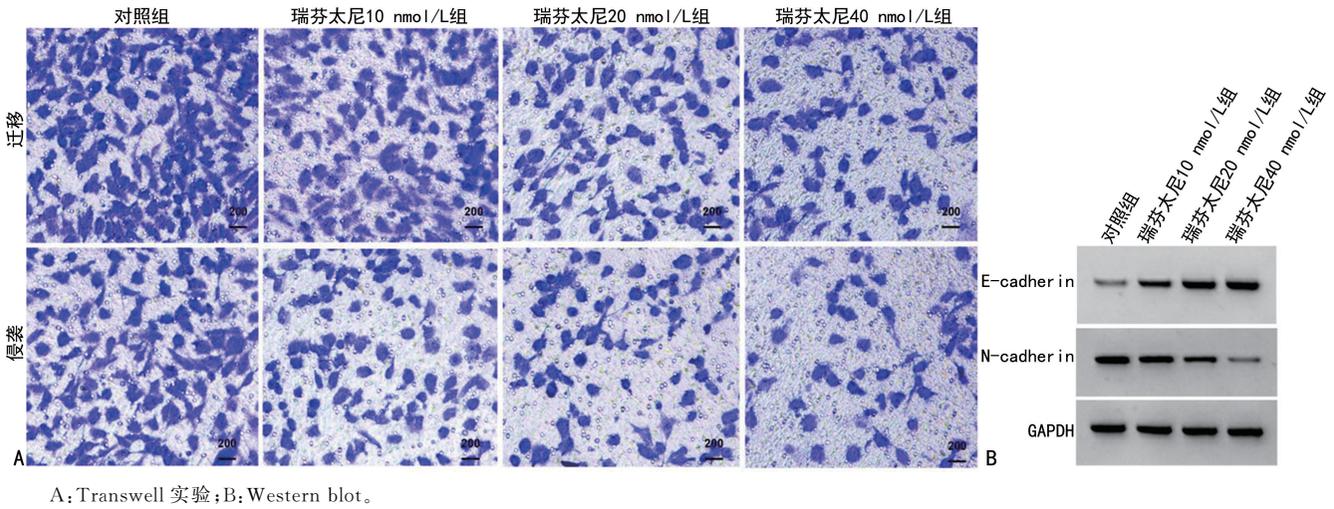


图 2 瑞芬太尼抑制 786-0 迁移、侵袭

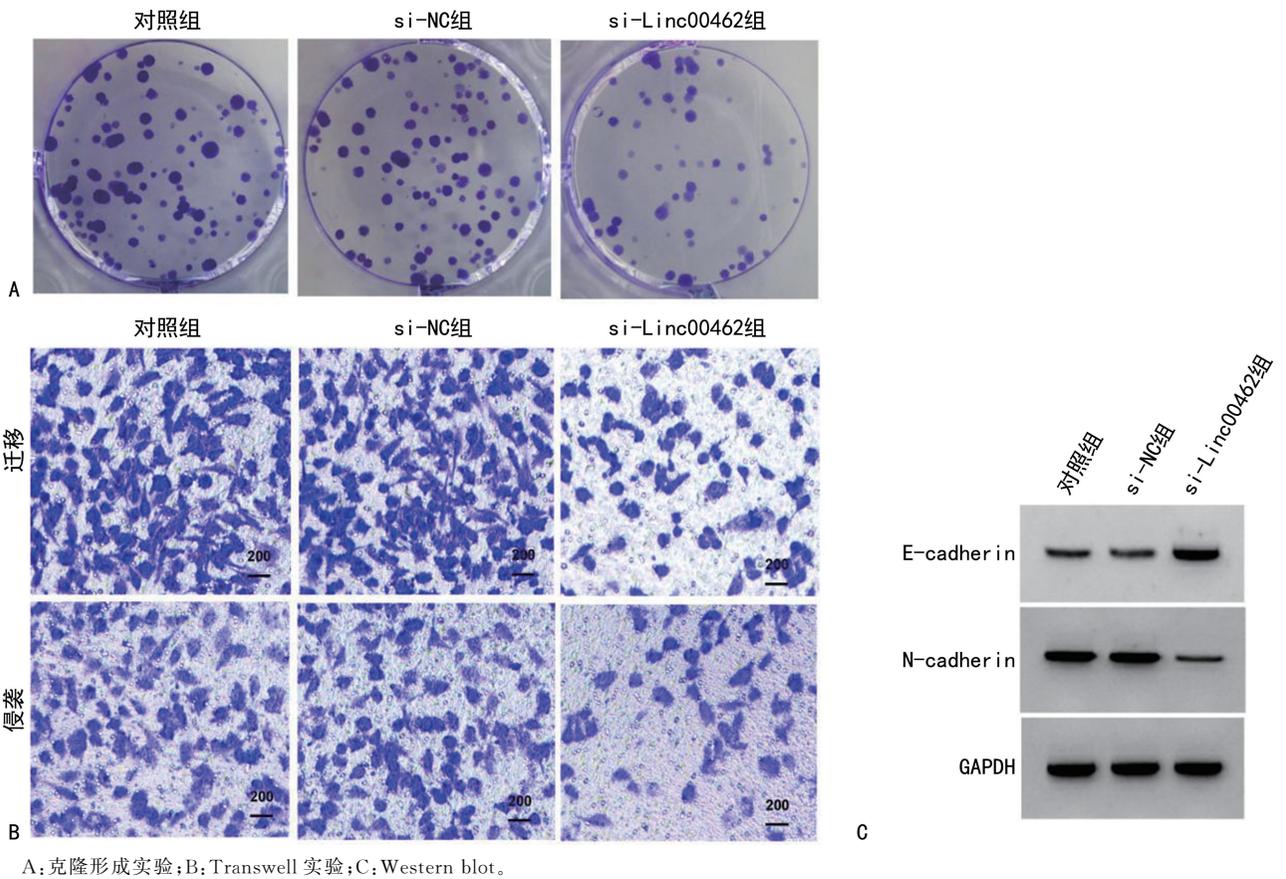


图 3 沉默 Linc00462 抑制 786-0 细胞克隆形成、迁移、侵袭

表 2 瑞芬太尼对 786-0 组迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	迁移细胞数(n)	侵袭细胞数(n)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	185.67 ± 5.31	135.67 ± 3.86	0.24 ± 0.02	0.79 ± 0.05
瑞芬太尼 10 nmol/L 组	147.00 ± 4.08 ^a	108.00 ± 2.45 ^a	0.46 ± 0.04 ^a	0.52 ± 0.04 ^a
瑞芬太尼 20 nmol/L 组	106.67 ± 3.86 ^{ab}	75.33 ± 1.70 ^{ab}	0.67 ± 0.04 ^{ab}	0.30 ± 0.02 ^{ab}
瑞芬太尼 40 nmol/L 组	72.00 ± 2.94 ^{abc}	43.33 ± 1.25 ^{abc}	0.86 ± 0.05 ^{abc}	0.14 ± 0.01 ^{abc}
F	425.685	757.526	140.639	207.370
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与瑞芬太尼 10 nmol/L 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与瑞芬太尼 20 nmol/L 组比较。

2.4 Linc00462 能逆转瑞芬太尼对 786-0 增殖、迁移、侵袭的影响

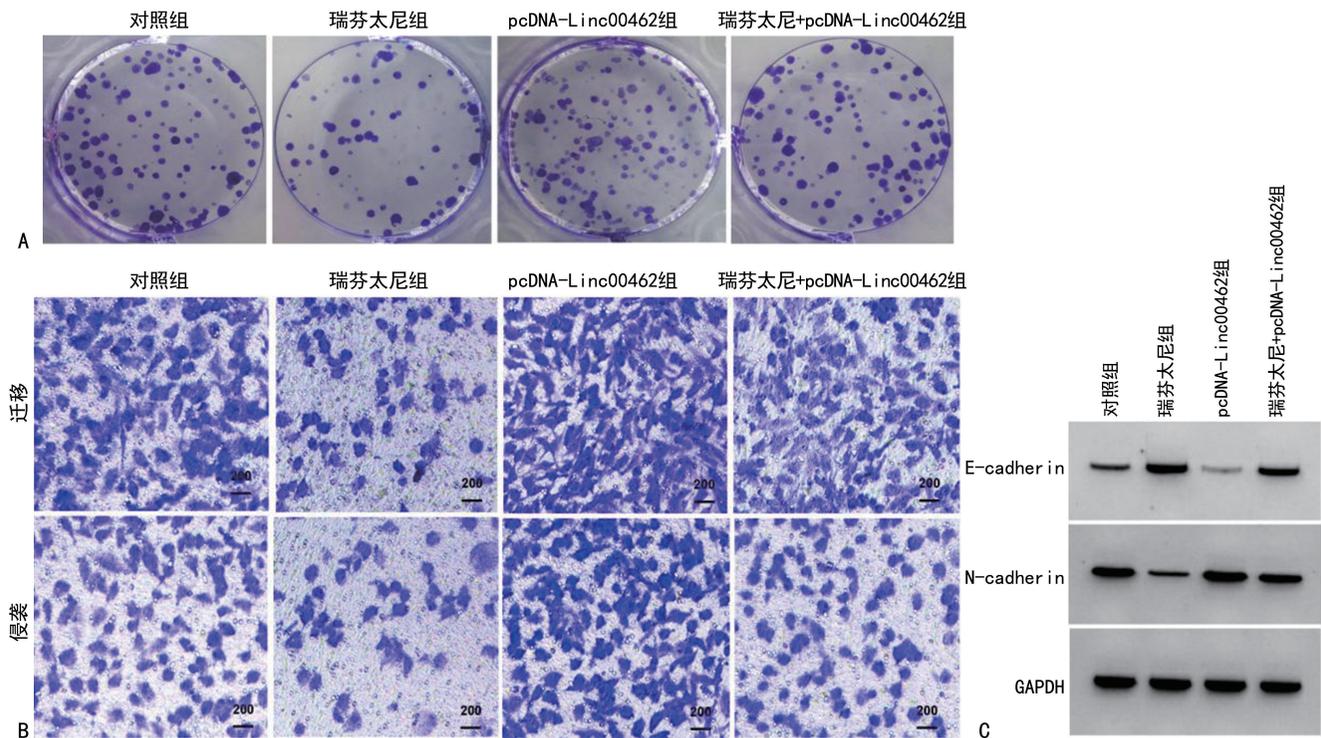
与对照组比较,瑞芬太尼组(40 nmol/L)786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著增加($P < 0.05$);与对照组比较,pcDNA-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭

数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著降低($P < 0.05$);与瑞芬太尼组比较,瑞芬太尼(40 nmol/L) + pcDNA-Linc00462 组 786-0 细胞 Linc00462 表达水平、克隆形成数、侵袭数、迁移数、N-cadherin 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白表达水平、miR-2355-5p 表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 4 和表 4。

表 3 沉默 Linc00462 对 786-0 细胞克隆形成、迁移、侵袭及 Linc00462 及 miR-2355-5p 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462 基因	miR-2355-5p 基因	克隆形成数 (个)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	132.67 ± 6.65	187.33 ± 4.92	134.67 ± 5.44	0.25 ± 0.02	0.80 ± 0.06
si-NC 组	0.98 ± 0.02	1.01 ± 0.02	135.33 ± 7.13	183.67 ± 5.44	136.67 ± 4.11	0.24 ± 0.02	0.79 ± 0.07
si-Linc00462 组	0.13 ± 0.01 ^{ab}	4.73 ± 0.12 ^{ab}	46.00 ± 0.82 ^{ab}	51.33 ± 1.70 ^{ab}	34.33 ± 0.94 ^{ab}	0.94 ± 0.05 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}
F	4 439.400	2 812.642	242.844	953.165	650.598	439.182	193.640
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较。



A: 克隆形成实验; B: Transwell 实验; C: Western blot。

图 4 过表达 Linc00462 逆转瑞芬太尼对 786-0 克隆形成、迁移和侵袭的抑制作用

表 4 过表达 Linc00462 逆转瑞芬太尼对 786-0 克隆形成、迁移、侵袭的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Linc00462 基因	miR-2355-5p 基因	克隆形成数 (个)	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)	E-cadherin 蛋白	N-cadherin 蛋白
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	133.00 ± 5.89	187.33 ± 4.92	136.67 ± 3.86	0.25 ± 0.02	0.79 ± 0.06
瑞芬太尼组	0.22 ± 0.01 ^a	3.99 ± 0.20 ^a	60.67 ± 1.89 ^a	72.00 ± 4.08 ^a	44.00 ± 1.63 ^a	0.86 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.01 ^a
pcDNA-Linc00462 组	4.69 ± 0.12 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	189.00 ± 7.12 ^a	263.67 ± 6.13 ^a	208.00 ± 3.74 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	1.07 ± 0.08 ^a
瑞芬太尼+pcDNA-Linc00462 组	0.84 ± 0.04 ^b	1.42 ± 0.12 ^b	124.00 ± 5.10 ^b	172.67 ± 4.99 ^b	118.00 ± 2.94 ^b	0.35 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.04 ^b
F	3 070.677	645.099	288.365	720.959	1 356.043	300.533	155.650
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与瑞芬太尼组比较。

2.5 Linc00462 靶向 miR-2355-5p

Starbase 预测到 miR-2355-5p 是 Linc00462 的潜在靶基因, miR-2355-5p 与 Linc00462 之间的预测结合区域见图 5。进行双荧光素酶报告基因检测, miR-2355-5p mimics 和 wt-Linc00462 共转染后相对荧光素酶活性与 miR-2355-5p mimics 和 mut-Linc00462 共转染比较显著降低($P < 0.05$), 见表 5。



图 5 Starbase 预测 Linc00462 和 miR-2355-5p 的靶向关系

表 5 荧光素酶活性($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	wt-Linc00462	mut-Linc00462
miR-NC	0.95 ± 0.08	1.01 ± 0.09
miR-2355-5p mimics	0.28 ± 0.03 ^a	1.03 ± 0.12
<i>t</i>	13.582	0.231
<i>P</i>	<0.001	0.829

^a: $P < 0.05$, 与 miR-NC 组比较。

3 讨论

麻醉是手术治疗的重要组成部分, 但手术过程中麻醉药与癌细胞的接触可能直接影响癌细胞生物学行为, 甚至影响癌症的复发和转移。因此, 探讨麻醉药对 RCC 细胞生物学行为的影响对临床治疗 RCC 意义重大。

瑞芬太尼因其起效快、麻醉苏醒时间短、不良反应发生率低、代谢可预测等优点在临床肿瘤切术中应用广泛^[8]。LU 等^[9]研究发现瑞芬太尼对宫颈癌根治术患者的认知功能、T 淋巴细胞和炎症因子的影响相对较小。唐优仕等^[10]、赵莉等^[11]证实瑞芬太尼在体外能抑制胰腺癌细胞、结肠癌细胞增殖, 并促进其凋亡。孟俊青^[12]研究表明瑞芬太尼以剂量依赖方式诱导肺癌细胞 G₂/M 期周期阻滞和凋亡。可见, 瑞芬太尼对肿瘤细胞生物学行为具有重要影响。本研究以 10、20、40 nmol/L 瑞芬太尼处理 RCC 细胞 786-0, 结果表明 786-0 细胞活力、克隆能力、迁移和侵袭能力均显著下降, 且呈浓度依赖性, 提示瑞芬太尼对 RCC 细胞恶性表型具有抑制作用。E-cadherin 和 N-cadherin 参与细胞上皮间质转化(EMT)调控, N-cadherin 表达水平上调、E-cadherin 表达缺失是肿瘤细胞浸润、转移的重要机制, 通过调控二者的表达情况可有效调节肿瘤细胞迁移和侵袭行为^[13]。本研究中瑞芬太尼处理明显下调 N-cadherin 蛋白表达水平, 上调 E-cadherin 蛋白表达水平, 这与瑞芬太尼的抗迁移、抗侵袭作用相符和。以上研究表明瑞芬太尼对 RCC 细胞恶性生物学行为具有抑制作用。

lncRNA 通过在转录和转录后水平调控基因表达, 在细胞增殖、分化、凋亡和转移中具有关键作用,

与肿瘤发生、转移关系密切。Linc00462 是长度为 1 023 nt 的 lncRNA, 胰腺癌中 Linc00462 表达水平显著上调, 其表达水平与肿瘤大小、肿瘤分化、TNM 分期和远处转移有关, 过表达 Linc00462 显著抑制胰腺癌细胞凋亡和黏附, 促进胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和细胞周期过程^[14]。Linc00462 表达水平与肝癌患者生存相关, Linc00462 和其他 4 个 lncRNA 联合检测是肝癌预后的可靠标志物^[15]。本研究探讨 Linc00462 在 RCC 中的功能, 结果表明转染 si-Linc00462 沉默 Linc00462 表达可明显抑制 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭能力, 抑制 N-cadherin 蛋白表达, 促进 E-cadherin 蛋白表达, 而转染 pcDNA-Linc00462 过表达 Linc00462 则增强 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭能力, 提示 Linc00462 在 RCC 中表现出肿瘤促进功能。同时, 本研究发现瑞芬太尼处理后 786-0 细胞中 Linc00462 表达水平以剂量依赖方式降低, 且瑞芬太尼与沉默 Linc00462 的抗癌效果类似, 提示瑞芬太尼可能通过下调 Linc00462 在 RCC 中发挥抗癌功能。深入研究显示, 过表达 Linc00462 还可明显削弱瑞芬太尼对 786-0 细胞克隆形成、迁移和侵袭的抑制作用, 并改变 N-cadherin 和 E-cadherin 蛋白表达水平。

多项研究证实 lncRNA 充当 miRNA 海绵作用是其参与调控肿瘤进展的重要机制, 例如 lncRNA 面生殖发育不良基因 5 反义 RNA1(FGD5-AS1)通过靶向抑制 miR-5590-3p 促进 RCC 细胞增殖、迁移、EMT 和侵袭^[16]。研究表明 miR-2355-5p 在膀胱癌中表达水平减少, 过表达 miR-2355-5p 能够抑制膀胱癌恶性表型^[17]。miR-2355-5p 可作为 lncRNA WD 重复和 FYVE 结构域蛋白 3 反义 RNA2(WDFY3-AS2)的靶基因, 介导 WDFY3-AS2 对食管鳞癌细胞增殖、迁移的促进作用^[18]。此外, lncRNA 受体活性修饰蛋白 2-反义 RNA(RAMP2-AS1)通过下调 miR-2355-5p 表达促进血管生成^[19]。本研究证实 miR-2355-5p 是 Linc00462 的靶基因, 且 miR-2355-5p 的表达受到 Linc00462 的负性调控。瑞芬太尼处理后 miR-2355-5p 表达上调, 这与沉默 Linc00462 上调 miR-2355-5p 表达的作用一致, 提示瑞芬太尼可能通过调控 Linc00462/miR-2355-5p 通路对 RCC 具有抗癌作用。然而, 本研究仍存在不足之处, 如敲低或过表达 miR-2355-5p 对 RCC 细胞生物学行为的影响仍需验证。

综上所述, 本研究首次证实瑞芬太尼对 RCC 细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用, 其机制可能与下调 Linc00462/miR-2355-5p 通路有关, 这些发现为瑞芬太尼在 RCC 治疗中的应用奠定了理论基础, 为 RCC 的基因治疗提供潜在有效靶点。

参考文献

- [1] NOGUCHI G, NAKAIGAWA N, TAGURI M, et al. Time-dependent change in relapse sites of renal cell carcinoma after curative surgery[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(1/2): 69-75.
- [2] DING S, MA H, WANG G, et al. Effect of remifentanyl combined anesthesia on cytokines and oxidative stress in patients undergoing laparoscopic surgery for colon cancer[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(1): 8-11.
- [3] 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.
- [4] 陈晓军, 沈鑫宁, 陈亮. 瑞芬太尼通过 miR-206/GOLPH3 调控胃癌细胞增殖和凋亡的实验研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(4): 25-34.
- [5] 孙成成, 刘宇, 胡旭明. 瑞芬太尼通过 miR-519d-3p/STAT3 对胃癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2019, 27(16): 20-26.
- [6] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-3981.
- [7] GONG J, QI X, ZHANG Y, et al. Long noncoding RNA linc00462 promotes hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(1): 40-47.
- [8] 龙晓静, 周玉娜. 分析瑞芬太尼用于甲状腺切除手术的麻醉效果[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(69): 153-154.
- [9] LU X Y, CHEN M, CHEN D H, et al. Remifentanyl on T lymphocytes, cognitive function and inflammatory cytokines of patients undergoing radical surgery for cervical cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2854-2859.
- [10] 唐优仕, 玉龙, 马浩文, 等. 瑞芬太尼对胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *中国热带医学*, 2017, 17(12): 1193-1197.
- [11] 赵莉, 王志红, 李学斌, 等. 瑞芬太尼对人结肠癌 COLO205 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2017, 38(5): 401-403.
- [12] 孟俊青. 芬太尼和瑞芬太尼对人肺癌细胞 A549 细胞活力的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [13] WANG G, ZHANG Z J, JIAN W G, et al. Novel long noncoding RNA OTUD6B-AS1 indicates poor prognosis and inhibits clear cell renal cell carcinoma proliferation via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 15-25.
- [14] ZHOU B, GUO W, SUN C, et al. Linc00462 promotes pancreatic cancer invasiveness through the miR-665/TGFBR1-TGFBR2/SMAD2/3 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 706-716.
- [15] SUN J R, KONG C F, XIAO K M, et al. Integrated analysis of lncRNA-mediated ceRNA network reveals a prognostic signature for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Genet*, 2020, 11(1): 602542-602552.
- [16] YANG Y, DONG M H, HU H M, et al. LncRNA FGD5-AS1/miR-5590-3p axis facilitates the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma through ERK/AKT signalling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17): 8756-8766.
- [17] CHEN D, CHEN J, GAO J, et al. LncRNA DDX11-AS1 promotes bladder cancer occurrence via protecting LAMB3 from downregulation by sponging miR-2355-5p[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(5): 319-328.
- [18] ZHANG Q, GUAN F, FAN T, et al. LncRNA WDFY3-AS2 suppresses proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-2355-5p/SOCS2 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 8206-8220.
- [19] CHENG C, ZHANG Z, CHENG F, et al. Exosomal lncRNA RAMP2-AS1 derived from chondrosarcoma cells promotes angiogenesis through miR-2355-5p/VEGFR2 Axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13(1): 3291-3301.