

- 23、IL-36 γ 表达水平及临床意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(3): 280-284.
- [10] HUANG WC, DAI YW, PENG HL, et al. Phloretin ameliorates chemokines and ICAM-1 expression via blocking of the NF- κ B pathway in the TNF- α -induced HaCaT human keratinocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 27(1): 32-37.
- [11] 徐文静, 席建元. 银屑平丸对 BALB/c 小鼠银屑病样模型血清中 IL-6 与 IL-21 表达的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(22): 17-20, 32.
- [12] 曹天宇, 李冰, 邵帅, 等. 干扰素诱导蛋白 16 在银屑病患者皮损中的表达及其调控[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, 30(3): 239-241.
- [13] 徐可佳, 史丙俊, 熊霞, 等. 银屑病全基因组关联的易感基因和信号通路的研究进展[J]. 重庆医学, 2016, 45(26): 3725-3727.
- [14] 高军, 任万明, 强志鹏. 雷公藤多甙对银屑病患者 NF- κ B 及细胞因子的影响[J]. 西部中医药, 2013, 26(9): 26-28.
- [15] PARKES M, CORTES A, HEEL DAVAN, et al. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases [J]. Nature Reviews Genetics, 2013, 14(9): 661-673.
- [16] 杨君义, 王艳芝, 徐飞. IL-23/Th17 通路靶向药物在治疗银屑病中的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(11): 1236-1239.
- [17] 马学伟, 陈虎, 张培红, 等. 克银 I 号方对寻常型银屑病患者血清白细胞介素-2、白细胞介素-2 受体及肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 河北中医, 2011, 33(11): 1617-1619.
- [18] 刘秀卿, 李卓成, 吴文中. 雷公藤多甙对咪喹莫特诱导银屑病样小鼠 Wnt/Frizzled 信号传导通路的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(11): 1044-1047.
- (收稿日期: 2020-02-05, 修回日期: 2020-02-22)

引用本文: 曹峰, 刘敏, 赵潇. 舒芬太尼调控 miR-1 抑制肝癌细胞 MHCC97-H 增殖、侵袭和迁移的机制研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(10): 1938-1942. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.007.

◇ 药学研究 ◇



舒芬太尼调控 miR-1 抑制肝癌细胞 MHCC97-H 增殖、侵袭和迁移的机制研究

曹峰^{1a}, 刘敏^{1b}, 赵潇²

作者单位:¹北京中医药大学枣庄医院,^a外三科,^b手术室, 山东 枣庄 277800;

²枣庄矿业集团中心医院手术室, 山东 枣庄 277800

摘要: 目的 探讨舒芬太尼调控微小 RNA-1(miR-1)表达对人肝癌 MHCC97-H 细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其机制。方法 本研究起止时间为 2018 年 3 月至 2019 年 9 月, 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)实验检测不同浓度的舒芬太尼对人肝癌 MHCC97-H 细胞活力的影响, qRT-PCR 检测舒芬太尼对 MHCC97-H 细胞中 miR-1 表达的影响;通过脂质体转染法将 miR-1 抑制剂(inhibitor)及阴性对照转染至 MHCC97-H 细胞, 实验分为 Control 组、舒芬太尼(Sufentanil)组、转染对照(Sufentanil+NC)组和转染(Sufentanil+miR-1)组。细胞计数试剂盒(CCK-8)实验检测各组 MHCC97-H 细胞增殖能力, Transwell 实验检测各组 MHCC97-H 细胞侵袭能力, 划痕实验检测各组 MHCC97-H 细胞迁移能力, 蛋白质印迹法(Western blotting)检测各组 MHCC97-H 细胞中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达情况。**结果** 不同浓度的舒芬太尼对肝癌 MHCC97-H 细胞活力具有不同程度的抑制作用;与 Control 组比, Sufentanil 组 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达[(1.00±0.09)比(2.25±0.24)]明显升高($P<0.05$), 细胞增殖[(0.54±0.05)比(0.34±0.03)]、侵袭[(106.24±8.25)个比(51.34±5.02)个]和迁移能力[(37.36±4.01)%比(16.34±1.72)%]降低($P<0.05$), MMP-2[(0.33±0.04)比(0.15±0.02)]和 MMP-9[(0.24±0.02)比(0.11±0.01)]的表达下调($P<0.05$);与 Sufentanil+NC 组比, Sufentanil+miR-1 组 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达[(2.20±0.21)比(1.42±0.15)]明显降低($P<0.05$), 细胞增殖[(0.32±0.03)比(0.46±0.04)]、侵袭[(52.36±5.14)个比(91.16±6.06)个]和迁移能力[(17.11±1.71)%比(29.85±3.10)%]升高($P<0.05$), MMP-2[(0.15±0.02)比(0.27±0.02)]和 MMP-9[(0.13±0.01)比(0.19±0.02)]的表达上调($P<0.05$)。**结论** 舒芬太尼可通过调控 miR-1 的表达抑制人肝癌 MHCC97-H 细胞的增殖、侵袭和迁移, 其机制可能与调控 MMP-2 和 MMP-9 表达有关。

关键词: 舒芬太尼; 肝肿瘤; 微小 RNA-1; 人肝癌 MHCC97-H 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移

Mechanism of sufentanil inhibiting proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H by regulating miR-1

CAO Feng^{1a}, LIU Min^{1b}, ZHAO Xiao²

Author Affiliations:^{1a}General Surgery Three, ^{1b}Operation Room, Zaozhuang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Zaozhuang, Shandong 277800, China; ²Operation Room, Zaozhuang Mining Group Central Hospital, Zaozhuang, Shandong 277800, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of sufentanil on the proliferation, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H by regulating microRNA-1 (miR-1) expression. **Methods** The start and end time of this research was from March 2018 to September 2019. The effects of different concentrations of sufentanil on the viability of human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H were determined using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The effect of sufentanil on the expression of miR-1 in MHCC97-H cells was detected by qRT-PCR. The miR-1 inhibitor and negative control were transfected into MHCC97-H cells using liposome-mediated transfection. There were control group, sufentanil group, sufentanil+NC group and sufentanil+miR-1 group in this study. The proliferation, invasion and migration ability of MHCC97-H cells in each group was detected by CCK-8 assay, Transwell assay, and scratch test, respectively. Western blotting was used to detect the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MHCC97-H cells. **Results** Different concentrations of sufentanil had different inhibitory effects on the viability of MHCC97-H cells in vitro. Compared with the control group, the expression of miR-1 in MHCC97-H cells in the sufentanil group $[(1.00 \pm 0.09) \text{ vs. } (2.25 \pm 0.24)]$ was significantly higher ($P < 0.05$), the cell proliferation $[(0.54 \pm 0.05) \text{ vs. } (0.34 \pm 0.03)]$, invasion $[(106.24 \pm 8.25) \text{ vs. } (51.34 \pm 5.02)]$ and migration ability $[(37.36 \pm 4.01)\% \text{ vs. } (16.34 \pm 1.72)\%]$ decreased ($P < 0.05$), and MMP-2 $[(0.33 \pm 0.04) \text{ vs. } (0.15 \pm 0.02)]$ and MMP-9 $[(0.24 \pm 0.02) \text{ vs. } (0.11 \pm 0.01)]$ expressions were down-regulated ($P < 0.05$). Compared with sufentanil+NC group, the expression of miR-1 in MHCC97-H cells in the sufentanil+miR-1 group $[(2.20 \pm 0.21) \text{ vs. } (1.42 \pm 0.15)]$ was significantly reduced ($P < 0.05$), cell proliferation $[(0.32 \pm 0.03) \text{ vs. } (0.46 \pm 0.04)]$, invasion $[(52.36 \pm 5.14) \text{ vs. } (91.16 \pm 6.06)]$ and migration ability $[(17.11 \pm 1.71)\% \text{ vs. } (29.85 \pm 3.10)\%]$ increased ($P < 0.05$), and MMP-2 $[(0.15 \pm 0.02) \text{ vs. } (0.27 \pm 0.02)]$ and MMP-9 $[(0.13 \pm 0.01) \text{ vs. } (0.19 \pm 0.02)]$ expressions were up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Sufentanil can inhibit the proliferation, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-H by regulating the expression of miR-1, whose mechanism may be related to the regulation of MMP-2 and MMP-9 expressions.

Key words: Sufentanil; Liver neoplasms; miR-1; Human liver cancer MHCC97-H cells; Proliferation; Invasion; Migration

肝细胞癌是最常见的类型,占肝癌的70%~85%^[1]。外科手术仍是肝癌的主要治疗措施,早期肝癌病人通过手术治疗,如切除部分肝脏或移植,病人5年存活率超过70%^[2]。然而,大多数中晚期肝癌病人5年生存率约为15%^[3]。近期研究显示,在围术期使用的麻醉剂能够影响病人预后及肿瘤复发^[4-6]。在围术期有效抑制肿瘤细胞生长和转移是临床医学研究的热点。

舒芬太尼是临床上常用的麻醉诱导和辅助麻醉剂,其属于苯基哌啶类强效阿片类药物。目前关于舒芬太尼对肝癌细胞侵袭和迁移影响的研究鲜有报道,并且其作用机制尚不明确。多项研究指出微小RNA-1 (microRNA-1, miR-1)在人类多种恶性肿瘤,如结直肠癌、前列腺癌和膀胱癌等中表达下调^[7-9]。有关报道显示,miR-1能够抑制肝癌细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导细胞凋亡^[10]。近期有研究显示,舒芬太尼可通过调控miR-1对大鼠心肌缺血再灌注损伤起保护作用^[11]。提示舒芬太尼可能对miR-1的表达具有调控作用。

本研究起止时间为2018年3月至2019年9月,通过观察舒芬太尼对人肝癌MHCC97-H细胞增殖、侵袭和迁移及miR-1表达的影响,探究舒芬太尼对肝癌细胞影响的机制,以期舒芬太尼在肝癌治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞株MHCC97-H购自中国科学院上海细胞研究所;枸橼酸舒芬太尼注射液购自

宜昌人福药业有限公司;杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)培养基购自美国Hyclon公司;胰蛋白酶和新生小牛血清购自美国Gibco公司;Cell Counting Kit (Cell Counting Kit-8, CCK-8)试剂购自日本同仁研究所;Trizol试剂购自美国Ambion公司;逆转录试剂盒购自赛默飞世尔科技有限公司;SYBR Green PCR Master Mix试剂盒购自日本TaKaRa公司;miR-1抑制剂(inhibitor)和阴性对照均购自广州锐博生物科技有限公司;Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;Transwell小室购自美国Corning公司;基质胶(Matrigel)购自美国BD公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解试剂、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)单抗及辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG均购自美国CST公司;实验所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养 人肝癌细胞MHCC97-H常规复苏后培养在含10%灭活小牛血清的DMEM培养基中,加入100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素-链霉素,放入体积分数为5%二氧化碳、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,细胞贴壁生长,每隔2天换液1次,待细胞生长密度达80%以上时,以0.25%胰蛋白酶消化细胞,按照1:3或1:4的比例进行传代培养。

1.3 CCK-8检测舒芬太尼对MHCC97-H细胞活力的影响 对数期的MHCC97-H细胞以胰酶消化,

计数后取 100 μL 细胞悬液加入到 96 孔板中, 每孔约 5×10^3 个细胞, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养, 待细胞贴壁后, 弃去就培养液, 加入含不同浓度 (0、0.01、0.1、1、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 舒芬太尼的培养液, 分别孵育 24、48、72 h, 在各个时间点向细胞中加入 CCK-8 溶液 20 μL , 继续孵育 4 h, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值 (optical density, OD), 分别计算各组 MHCC97-H 细胞活力, 细胞活力 (%) = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4 细胞分组和处理 对数生长期的 MHCC97-H 细胞接种到 6 孔板中, 接种密度为 2×10^5 个/孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养, 将细胞随机分为 4 组: 对照 (Control) 组即未做任何处理的 MHCC97-H 细胞; 舒芬太尼 (Sufentanil) 组即 1 $\mu\text{mol/L}$ 舒芬太尼干预的 MHCC97-H 细胞; 舒芬太尼和转染 (Sufentanil+miR-1) 组即转染 miR-1 inhibitor 后施加 1 $\mu\text{mol/L}$ 舒芬太尼干预的 MHCC97-H 细胞; 舒芬太尼和对照 (Sufentanil+NC) 组即转染阴性对照后施加 1 $\mu\text{mol/L}$ 舒芬太尼干预的 MHCC97-H 细胞。细胞转染严格参照 Lipofectamine 2000 转染试剂使用说明书进行操作, 各组 MHCC97-H 细胞处理 48 h 后进行相应指标检测。

1.5 qRT-PCR 检测 各组 MHCC97-H 细胞处理 48 h 后, 收集细胞, 采用 Trizol 试剂分别提取 MHCC97-H 细胞中总 RNA, 使用 Nanodrop 超微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 的丰度和纯度。选择合格的 RNA 进行逆转录, 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 U6 为内参, 采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增, 反应程序设为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 共 1 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环。反应结束后获取 Ct 值, 并采用相对定量 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法分别计算各组 MHCC97-H 细胞中 miR-1 相对表达量。所用引物: miR-1 5' -TAGAAGCTTGCTCTGAGCTGCCTTCTCTA-3'; U6 F-5' -CTTCGGCACGCACATATAC-3'; R-5' -GAACGCTTCACGAATTTGC-3'。

1.6 Western blotting 检测 各组 MHCC97-H 细胞弃去培养液, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 用细胞刮刮下细胞, 收集细胞, 加入配置好的 RIPA 细胞裂解液, 于冰上裂解细胞, 离心后收集上清即总蛋白。分别配制 12% 分离胶和 4% 浓缩胶, 取 40 μg 蛋白样品分别加入到每个泳道中, 调整电压行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后断开电源, 将凝胶上的蛋白采用半干法电转至 PVDF 膜上, 于 5% 小牛血清的封闭液中孵育 2 h, TBST 冲洗膜 3 次, 分别加入 1:500 稀释的一抗, 冰上过夜孵育, TBST 冲洗膜 3 次, 再加入 1:3 000 稀释的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 冲洗膜 3 次,

化学发光显影, 采用成像系统采集图像, 使用 Image J 软件分析图像中的各条带灰度值, 以 β 肌动蛋白 (β -actin) 进行标定, 计算各组 MGC-803 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达水平。

1.7 Transwell 实验 以胰酶消化各组 MHCC97-H 细胞, 离心收集并将细胞密度调整至 2×10^5 个/毫升。取 200 μL 细胞悬液加入到 Matrigel 基质胶包被的 Transwell 小室的上室, 在下室加入含 10% 小牛血清的培养液 600 μL , 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中常规培养 48 h。取出小室后弃去培养液, 使用棉签轻轻擦去上室未穿膜的细胞和基质胶, 经无水甲醇固定后, 漂洗晾干, 再使用 0.1% 结晶紫染色, 以 PBS 洗涤 3 遍, 使用倒置显微镜 (400 倍) 观察, 随机选取 5 个视野观察并进行计数穿膜细胞数。

1.8 划痕实验 将各处理组 MHCC97-H 细胞以 1×10^3 个/平铺于 6 孔板上, 在常规培养箱中继续培养, 待细胞呈单层汇合时, 用无菌移液枪枪头垂直划线, 用 PBS 洗去划下的细胞, 加入不含血清的培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养 48 h, 分别在 0 和 48 h 在光镜下观察并记录细胞划痕距离。分别计算各组 MHCC97-H 细胞的迁移率, 细胞迁移率 (%) = (0 h 划痕距离 - 48 h 划痕距离) $\times 100\%$ 。

1.9 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以上实验重复 3 次, 采用单因素方差分析检验多组间差异, 采用 SNK- q 检验分析多组两两组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 舒芬太尼对肝癌 MHCC97-H 细胞活力的影响 CCK-8 检测不同浓度舒芬太尼干预 24、48、72 h 对肝癌 MHCC97-H 细胞活力的影响, 随着舒芬太尼浓度的升高 MHCC97-H 细胞活力随之下降, 在干预 24 h 时, 舒芬太尼的浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时 MHCC97-H 细胞活力降低 ($P < 0.05$), 在干预 48 h 时, 舒芬太尼的浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力降低 ($P < 0.05$)。基于该实验筛选出舒芬太尼干预 MHCC97-H 细胞最适作用浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, 最适作用时间为 48 h。见表 1。

2.2 各组 MHCC97-H 细胞 miR-1 表达比较 在 MHCC97-H 细胞转染 miR-1 inhibitor 后采用 1 $\mu\text{mol/L}$ 舒芬太尼进行干预, qRT-PCR 检测结果显示, Sufentanil 组 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达水平 (2.25 ± 0.24) 高于 Control 组 (1.00 ± 0.09) ($P < 0.05$); Sufentanil+miR-1 组 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达水平 (1.42 ± 0.15) 低于 Sufentanil+NC 组 (2.20 ± 0.21) ($P < 0.05$); 而 Sufentanil 组和 Sufentanil+NC 组

表1 不同浓度的舒芬太尼对肝癌 MHCC97-H 细胞活力的影响/ $\bar{x} \pm s$

舒芬太尼浓度	重复次数	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$	3	100.00 $\pm$ 5.52	98.36 $\pm$ 5.26	97.54 $\pm$ 5.34
0.01 $\mu\text{mol/L}$	3	95.63 $\pm$ 5.09	94.05 $\pm$ 5.10	92.48 $\pm$ 5.01
0.1 $\mu\text{mol/L}$	3	94.11 $\pm$ 5.06	92.00 $\pm$ 5.28	90.04 $\pm$ 5.01
1 $\mu\text{mol/L}$	3	90.51 $\pm$ 5.06	84.2 $\pm$ 4.82	78.33 $\pm$ 4.17
10 $\mu\text{mol/L}$	3	86.51 $\pm$ 4.81	73.16 $\pm$ 4.28	62.09 $\pm$ 4.08
20 $\mu\text{mol/L}$	3	80.19 $\pm$ 4.21	68.49 $\pm$ 3.84	51.16 $\pm$ 3.42
<i>F</i> 值		6.004	18.876	49.405
<i>P</i> 值		0.005	0.000	0.000

中 miR-1 的表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组 MHCC97-H 细胞增殖能力比较 CCK-8 实验结果显示, Sufentanil 组 MHCC97-H 细胞 OD 值 (0.34 ± 0.03) 明显低于 Control 组 (0.54 ± 0.05) ($P<0.05$); Sufentanil+miR-1 组 MHCC97-H 细胞 OD 值 (0.46 ± 0.04) 明显高于 Sufentanil+NC 组 (0.32 ± 0.03) ($P<0.05$); 而 Sufentanil 组和 Sufentanil+NC 组细胞 OD 值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组 MHCC97-H 细胞侵袭和迁移能力比较 Transwell 实验结果显示, Sufentanil 组侵袭细胞数明显少于 Control 组 ($P<0.05$); Sufentanil+miR-1 组侵袭细胞数明显多于 Sufentanil+NC 组 ($P<0.05$)。划痕实验结果显示, Sufentanil 组细胞迁移率明显低于 Control 组 ($P<0.05$); Sufentanil+miR-1 组细胞迁移率明显高于 Sufentanil+NC 组 ($P<0.05$)。见表 2。

表2 各组 MHCC97-H 细胞侵袭细胞数和细胞迁移率比较/ $\bar{x} \pm s$

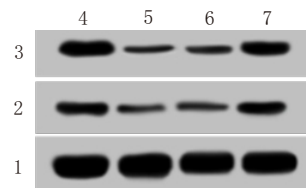
组别	重复次数	侵袭细胞数/个	细胞迁移率/%
Control	3	106.24 $\pm$ 8.25	37.36 $\pm$ 4.01
Sufentanil	3	51.34 $\pm$ 5.02 ^①	16.34 $\pm$ 1.72 ^①
Sufentanil+NC	3	52.36 $\pm$ 5.14	17.11 $\pm$ 1.71
Sufentanil+miR-1	3	91.16 $\pm$ 6.06 ^②	29.85 $\pm$ 3.10 ^②
<i>F</i> 值		59.040	39.540
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注: MHCC97-H 为肝癌细胞株, Control 为对照组, Sufentanil 为舒芬太尼组, Sufentanil+NC 为转染对照组, Sufentanil+miR-1 为转染组。

①与 Control 组比, $P<0.05$ 。②与 Sufentanil+NC 组比, $P<0.05$ 。

2.5 各组 MHCC97-H 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平比较 Western blotting 检测结果显示, Sufentanil 组 MHCC97-H 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平低于 Control 组 ($P<0.05$); Sufentanil+miR-1 组 MHCC97-H 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显低于 Sufentanil+NC 组 ($P<0.05$); 而 Sufentanil 组和 Sufentanil+NC 组细胞中 MMP-2 和

MMP-9 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1 和表 3。



注: 1— β -肌动蛋白; 2—基质金属蛋白酶-9(MMP-9); 3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2); 4—对照组; 5—舒芬太尼组; 6—转染对照组; 7—转染组。

图1 Western blotting 检测各组 MHCC97-H 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平**表3** 各组 MHCC97-H 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	MMP-2	MMP-9
Control	3	0.33 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.02
Sufentanil	3	0.15 $\pm$ 0.02 ^①	0.11 $\pm$ 0.01 ^①
Sufentanil+NC	3	0.15 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01
Sufentanil+miR-1	3	0.27 $\pm$ 0.02 ^②	0.19 $\pm$ 0.02 ^②
<i>F</i> 值		35.306	41.900
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注: MHCC97-H 为肝癌细胞株, MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, MMP-9 为基质金属蛋白酶-9, Control 为对照组, Sufentanil 为舒芬太尼组, Sufentanil+NC 为转染对照组, Sufentanil+miR-1 为转染组。

①与 Control 组比, $P<0.05$ 。②与 Sufentanil+NC 组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

舒芬太尼常做麻醉辅助药物用于癌症手术中, 近年来, 舒芬太尼等阿片类药物对肿瘤转移和复发等影响受到国内外研究者的广泛关注^[12-15]。但关于其对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响亟待研究。因此, 本研究采用不同浓度的舒芬太尼干预人肝癌 MHCC97-H 细胞, CCK-8 实验结果显示, 不同浓度的舒芬太尼对 MHCC97-H 细胞活力具有不同程度的抑制作用。基于 CCK-8 实验结果筛选出最适作用浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 和最适作用时间 48 h, 以用于后续实验加药标准浓度及处理时间。此外本实验 qRT-PCR 检测结果发现, 舒芬太尼处理后 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达水平明显升高, 这与 Qiao 等^[11]人的研究相似, 提示舒芬太尼可能调控 miR-1 的表达。

miR-1 能够参与调控人类多种恶性肿瘤的发生和进展^[16]。Xie 等^[17]报道指出, miR-1 在胃癌组织和细胞系中的表达明显降低, 在胃癌细胞中过表达 miR-1 能够抑制内皮细胞的增殖、迁移和血管形成, 起到肿瘤抑制剂的作用。另一项研究指出, miR-1 在卵巢癌组织中表达下调, 并且可能通过抑

制 c-Met 表达抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭^[18]。在肝癌中, miR-1 亦呈低表达, 且 miR-1 可能通过抑制死亡结构域沉默子(BAG4)的表达诱导肝癌 Hep3B 细胞发生凋亡^[19]。为探究舒芬太尼通过调控 miR-1 的表达影响肝癌 MHCC97-H 细胞体外增殖、侵袭和迁移能力, 本研究通过脂质体转染技术将 miR-1 inhibitor 转染至 MHCC97-H 细胞下调 miR-1 的表达。CCK-8、Transwell 实验和划痕实验结果发现, 舒芬太尼能够抑制 MHCC97-H 细胞增殖、侵袭和迁移, 而下调 miR-1 的表达能够部分逆转舒芬太尼诱导的细胞增殖、侵袭和迁移抑制作用。本研究表明, 舒芬太尼可能通过调控 miR-1 的表达来影响 MHCC97-H 细胞增殖、侵袭和迁移。

肿瘤转移是一个极其复杂的过程, 包括肿瘤细胞从原发肿瘤部位脱离, 侵犯周围正常组织, 并转移到远处部位继续增殖形成继发性瘤。在该过程中, 细胞外基质被降解, 血管基底膜被破坏, 这些均与基质金属蛋白酶密切相关^[20]。MMP-2 和 MMP-9 均属于基质金属蛋白酶家族重要成员, 其主要功能是降解细胞外基质蛋白成分^[21]。研究显示, MMP-2 和 MMP-9 表达量与肿瘤细胞侵袭和迁移能力呈正相关^[22-23]。本研究通过 Western blotting 检测发现, 舒芬太尼干预的 MHCC97-H 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达降低, 而下调 miR-1 的表达后 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平可部分恢复。表明舒芬太尼通过抑制 miR-1 的表达对 MHCC97-H 细胞侵袭和迁移能力的抑制作用可能通过下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达实现的。

综上, 本研究发现舒芬太尼能够抑制肝癌 MHCC97-H 细胞增殖、侵袭和迁移, 其作用机制可能与抑制 MHCC97-H 细胞中 miR-1 的表达有关。

参考文献

- [1] SCHERBER PR, GÄBELEIN G, EISELE RM, et al. Early stage liver cancer: hepatocellular carcinoma. [J]. *Chirurg*, 2018, 89(4):281-288.
- [2] SAPISOCHIN G, BRUIX J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(4):203-217.
- [3] 张杰, 段伯煊, 朱功兵. 肝细胞癌患者外科手术根治术后生存分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2017, 20(1):93-96.
- [4] KIM R. Effects of surgery and anesthetic choice on immunosuppression and cancer recurrence [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):8.
- [5] VAHABI S, EATEMADI A. Effects of anesthetic and analgesic techniques on cancer metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87:1-7.
- [6] HAN XR, WEN X, LI YY, et al. Effect of different anesthetic methods on cellular immune functioning and the prognosis of patients with ovarian cancer undergoing oophorectomy [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5): 20170915. DOI: 10.1042/BSR20170915.
- [7] XU W, ZHANG Z, ZOU K, et al. MiR-1 suppresses tumor cell proliferation in colorectal cancer by inhibition of Smad3-mediated tumor glycolysis [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2761-e2770. DOI: 10.1038/cddis.2017.60.
- [8] WEI W, LENG J, SHAO H, et al. MiR-1, a potential predictive biomarker for recurrence in prostate cancer after radical prostatectomy [J]. *Am J Med Sci*, 2017, 353(4):315-319.
- [9] SHANG A, YANG M, SHEN F, et al. MiR-1-3p suppresses the proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells by up-regulating SFRP1 expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3):1179-1188.
- [10] 孔艺璇. miR-1-3p 通过靶定 CAAP1 抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭[D]. 唐山: 华北理工大学, 2018.
- [11] QIAO Q, TI T, GAO Y, et al. Sufentanil protects rat myocardium against ischemia-reperfusion injury through miR-1 and Bcl-2 pathway [J]. *J Biol*, 2018, 6(10):1-8.
- [12] 韦云婷, 吕金英, 邵军进, 等. 右美托咪定复合舒芬太尼对癌症自控镇痛有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *浙江实用医学*, 2017, 22(6):408-413.
- [13] 曾维安. Mu 型阿片受体: 肿瘤的潜在治疗靶点 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2017, 9(1):5-8.
- [14] YEN TY, CHIOU JF, CHIANG WY, et al. Proportional dose of rapid-onset opioid in breakthrough cancer pain management: an open-label, multicenter study [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(30):e11593. DOI: 10.1097/MD.00000000000011593.
- [15] 李彬. 不同类型阿片类药物对肺癌细胞系 A549 增殖、迁移的影响[D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [16] LIU C, ZHANG S, WANG Q, et al. Tumor suppressor miR-1 inhibits tumor growth and metastasis by simultaneously targeting multiple genes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26):42043-42060.
- [17] XIE M, DART DA, GUO T, et al. MicroRNA-1 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(1): 41-54.
- [18] QU W, CHEN X, WANG J, et al. MicroRNA-1 inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration through c-Met pathway [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 473:237-244.
- [19] 刘煜, 李华, 李东, 等. MicroRNA-1 对肝癌细胞 BAG4 表达的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(6):479-482.
- [20] LV Y, ZHAO X, ZHU L, et al. Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2018, 8(10):2830-2845.
- [21] LI Z, TAKINO T, ENDO Y, et al. Activation of MMP-9 by membrane-type-1 matrix metalloproteinase/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(3):347-353.
- [22] SUN XF, SHAO YB, LIU MG, et al. High-concentration glucose enhances invasion in invasive ductal breast carcinoma by promoting Glut1/MMP2/MMP9 axis expression [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5):2989-2995.
- [23] 邓宇光, 刘宁, 郝振民, 等. 超声检查联合 MMP-2、MMP-9 水平检测对甲状腺癌的诊断价值 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(4):754-757.

(收稿日期: 2019-12-11, 修回日期: 2020-01-03)