

引用本文:彭湃,杨军,邱勇.氯普鲁卡因通过调控长链非编码RNA TTN-AS1表达对胶质瘤细胞增殖和转移的影响[J].安徽医药,2021,25(11):2140-2143.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.11.005.

◇ 药学研究 ◇



氯普鲁卡因通过调控长链非编码RNA TTN-AS1表达 对胶质瘤细胞增殖和转移的影响

彭湃^a,杨军^a,邱勇^b

作者单位:长江航运总医院、武汉脑科医院,^a麻醉科,^b神经外科,湖北 武汉 430010

通信作者:杨军,男,主任医师,研究方向为神经外科肿瘤麻醉相关研究,Email:pasmvpbz@163.com

基金项目:湖北省自然科学基金(ZRMS2017001731)

摘要: **目的** 探讨氯普鲁卡因(CP)对胶质瘤细胞增殖和转移的影响及分子机制。**方法** 用浓度为1 mmol/L、3 mmol/L、9 mmol/L的CP培养U251细胞作为CP低、中、高浓度组;未经任何处理的细胞作为对照组;此外将U251细胞分为si-NC组、si-TTN-AS1组、CP+pcDNA组、CP+pcDNA-TTN-AS1组。噻唑兰(MTT)检测细胞增殖抑制率;Transwell检测细胞迁移和侵袭;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测lncRNA TTN-AS1表达水平。**结果** CP处理胶质瘤U251细胞后,细胞增殖抑制率升高,细胞迁移侵袭数以及TTN-AS1表达水平降低($P<0.05$)。抑制TTN-AS1表达可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭。TTN-AS1过表达逆转了CP对U251细胞的作用。**结论** CP通过下调lncRNA TTN-AS1表达抑制胶质瘤细胞增殖和转移。

关键词: 神经胶质瘤; 氯普鲁卡因; RNA,反义; lncRNA TTN-AS1; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of chloroprocaine on the proliferation and metastasis of glioma cells by regulating the expression of lncRNA TTN-AS1

PENG Pai^a, YANG Jun^a, QIU Yong^b

Author Affiliation:^aDepartment of Anesthesiology, ^bDepartment of Neurosurgery, General Hospital of the Yangtze River shipping, Wuhan Brain Hospital, Wuhan, Hubei 430010, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of chloroprocaine (CP) on the proliferation and metastasis of glioma cells and its molecular mechanism. **Methods** U251 cells were cultured with chloroprocaine at a concentration of 1 mmol/L, 3 mmol/L, and 9 mmol/L as the low, medium, and high concentration groups of chloroprocaine; cells without any treatment were used as the control group. In addition, U251 cells were divided into si-NC group, si-TTN-AS1 group, CP+pcDNA group, CP+pcDNA-TTN-AS1 group. Thiazole blue (MTT) was used to detect the inhibition rate of cell proliferation; Transwell was used to detect cell migration and invasion; real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of lncRNA TTN-AS1. **Results** After chloroprocaine treatment of glioma U251 cells, the cell proliferation inhibition rate was significantly increased, and the number of cell migration and invasion, TTN-AS1 expression were reduced ($P<0.05$). Inhibition of TTN-AS1 expression can inhibit glioma cell proliferation, migration and invasion. TTN-AS1 overexpression reversed the effect of chloroprocaine on U251 cells. **Conclusion** Chloroprocaine inhibits the proliferation and metastasis of glioma cells by down-regulating the expression of lncRNA TTN-AS1.

Key words: Glioma; Chloroprocaine; RNA, antisense; lncRNA TTN-AS1; Proliferation; Migration; Invasion

胶质瘤是常见的原发性脑肿瘤,其呈浸润性生长,易转移,其治疗方式仍以手术切除为主,同时辅以放、化疗,然而目前胶质瘤的治疗效果还不尽如人意^[1]。研究表明很多肿瘤病人在术后肿瘤易复发和转移,影响病人生存率,而麻醉药可影响肿瘤的微转移^[2]。氯普鲁卡因(chloroprocaine, CP)是一类新型的酯类高效局麻药,其起效快、效果确切、不良反应小、麻醉效应强,麻醉后恢复快的优点^[3]。研究报告CP可抑制人宫颈癌细胞HeLa和CaSki增殖,诱导抑癌基因上皮型钙黏蛋白1(epithelial cadherin 1,

CDH1)、结肠腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli, APC)及P16启动子去甲基化^[4]。CP可抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞活力和迁移^[5]。Titin反义RNA 1(titin antisense RNA 1, TTN-AS1)在肺腺癌的组织中上调,并与较差的总体生存率相关,TTN-AS1可促进肺癌细胞的恶性生物学行为^[6]。TTN-AS1在食管鳞状细胞癌组织和细胞系中高表达,并促进细胞增殖和转移^[7]。TTN-AS1通过miR-573/E2F转录因子3(E2F3)促进宫颈癌中的细胞生长和转移^[8]。以上研究表明CP具有一定的抑癌作

用,TTN-AS1也与癌症的增殖、转移相关,然而CP和长链非编码RNA(lncRNA)TTN-AS1对胶质瘤细胞增殖和转移的影响还尚未可知。因此,本实验自2019年6—11月研究氯普鲁卡是否通过调控TTN-AS1表达影响胶质瘤细胞的增殖和转移。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 胶质瘤细胞株U251购自上海冠导生物工程有限公司;RPMI-1640培养基、胎牛血清购自上海浩然生物技术有限公司;盐酸氯普鲁卡因购自上海广锐生物科技有限公司;噻唑兰(MTT)试剂盒、RIPA蛋白裂解液购自美国Sigma;Transwell小室、Matrigel、荧光定量PCR试剂盒购于上海研卉生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与分组 U251细胞用RPMI-1640培养液常规培养,取对数生长期细胞,分别用浓度为1 mmol/L、3 mmol/L、9 mmol/L的CP培养细胞作为CP低、中、高浓度组;未经任何处理的细胞作为对照组。将si-NC、si-TTN-AS1转染至U251细胞中,记为si-NC组、si-TTN-AS1组;将pcDNA、pcDNA-TTN-AS1转染至U251细胞中再用9 mmol/L的CP培养,记为CP+pcDNA组、CP+pcDNA-TTN-AS1组。

1.3 MTT法检测细胞增殖抑制率 细胞培养48 h,按试剂盒说明书操作,最后检测490 nm处吸光度(OD)值;计算细胞增殖抑制率(%)。

1.4 蛋白质印迹(Western blotting)法检测蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭,加入细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)等一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,再加入二抗(1:2 000)室温孵育2 h,显影后分析蛋白条带的灰度值。

1.5 Transwell检测细胞迁移和侵袭 迁移:将100 μL细胞悬液加入Transwell小室上室,培养24 h,多聚甲醛固定,结晶紫染色,显微镜下观察并计数。侵袭:用Matrigel包被Transwell小室上室,然后与迁移操作一样。

1.6 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测lncRNA TTN-AS1表达水平 提取各组细胞总RNA,反转录成cDNA,按照试剂盒说明以GAPDH为内参进行扩增,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.7 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CP对胶质瘤U251细胞增殖的影响 相较于对照组,低、中、高浓度CP处理可提高U251细胞增殖抑制率和p21表达水平,降低CyclinD1表达水平,且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。见图1、表1。



注:1—GAPDH;2—p21;3—CyclinD1;4—对照组;5—CP-L;6—CP-M;7—CP-H。

图1 氯普鲁卡因(CP)对增殖相关蛋白的影响

表1 氯普鲁卡因(CP)对胶质瘤U251细胞增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	抑制率/%	CyclinD1蛋白	p21蛋白
对照组	9	0.00±0.02	0.77±0.06	0.21±0.03
CP-L	9	19.65±1.87 ^①	0.63±0.05 ^①	0.33±0.03 ^①
CP-M	9	38.12±3.48 ^{①②}	0.49±0.04 ^{①②}	0.45±0.04 ^{①②}
CP-H	9	57.22±5.74 ^{①②③}	0.33±0.03 ^{①②③}	0.58±0.05 ^{①②③}
F值		446.759	148.884	153.915
P值		0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P=0.000$ 。②与CP-L组比较, $P < 0.05$ 。③与CP-M组比较, $P=0.000$ 。

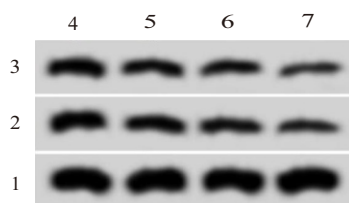
2.2 CP对胶质瘤U251细胞迁移侵袭的影响 相较于对照组,低、中、高浓度CP处理可降低迁移侵袭数及MMP-2、MMP-9的表达水平,呈浓度依赖性($P < 0.05$)见图2、表2。

表2 氯普鲁卡因(CP)对胶质瘤U251细胞迁移侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	9	96.32±9.45	79.36±7.25	0.68±0.06	0.71±0.07
CP-L	9	78.22±7.12 ^①	62.33±6.14 ^①	0.56±0.05 ^①	0.58±0.05 ^①
CP-M	9	61.25±6.32 ^{①②}	49.22±4.58 ^{①②}	0.44±0.04 ^{①②}	0.45±0.04 ^{①②}
CP-H	9	47.52±4.28 ^{①②③}	36.87±4.02 ^{①②③}	0.29±0.03 ^{①②③}	0.31±0.03 ^{①②③}
F值		81.075	93.638	116.477	107.242
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:MMP-2为基质金属蛋白酶2,MMP-9为基质金属蛋白酶9。

①与对照组比较, $P=0.000$ 。②与CP-L组比较, $P < 0.05$ 。③与CP-M组比较, $P=0.000$ 。



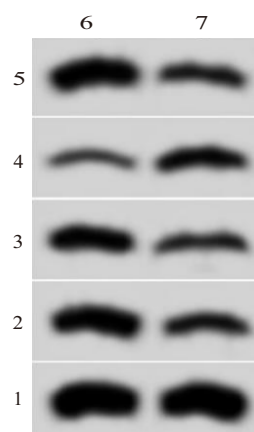
注: 1—GAPDH; 2—MMP-9; 3—MMP-2; 4—对照组; 5—CP-L; 6—CP-M; 7—CP-H。

图2 氯普鲁卡因(CP)对基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白表达的影响

2.3 CP对胶质瘤U251细胞中lncRNA TTN-AS1表达的影响 相较于对照组(1.00 ± 0.09), 低(0.78 ± 0.07)、中(0.65 ± 0.06)、高(0.52 ± 0.05)浓度CP处理可降低TTN-AS1表达水平, 呈浓度依赖性($F=78.958$, $P=0.000$)。

2.4 干扰lncRNA TTN-AS1表达对胶质瘤U251细胞增殖和转移的影响 相较于si-NC组, 干扰lncRNA TTN-AS1可提高细胞增殖抑制率和p21表达水平, 减少细胞迁移侵袭数, 且降低CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平($P<0.05$)。见图3, 表3。

2.5 lncRNA TTN-AS1过表达逆转了CP(9 mmol/L)对胶质瘤U251细胞增殖和转移的作用 相较于CP+pcDNA组, CP+pcDNA-TTN-AS1组细胞增殖抑制率和p21表达水平降低, 而迁移侵袭细胞数以及CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达水平升高($P<0.05$)。见图4, 表4。



注: 1—GAPDH; 2—MMP-9; 3—MMP-2; 4—p21; 5—CyclinD1; 6—si-NC; 7—si-TTN-AS1。

图3 干扰lncRNA TTN-AS1表达对细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白表达的影响

3 讨论

复发和转移是目前肿瘤治疗的难点, 手术是肿瘤治疗的基础和主要方式, 研究表明局部麻醉药可影响某些肿瘤细胞的凋亡、增殖、转移^[9]。且研究报道麻醉药也可影响胶质瘤, 研究麻醉药对胶质瘤侵袭迁移影响, 可为围手术期合理应用麻醉药及改善病人预后提供新思路^[10]。有研究表明, 普鲁卡因可抑制膀胱癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 将肿瘤细胞阻滞于G0/G1期^[11]。罗哌卡因能抑制结肠癌细胞增殖和结肠癌皮下瘤的生长^[12]。利多卡因可抑制乳腺癌和前列腺癌细胞侵袭、迁移^[13]。以上研究表

表3 干扰lncRNA TTN-AS1表达对U251细胞增殖和迁移侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	TTN-AS1	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
si-NC	9	1.01±0.09	6.32±0.64	98.56±9.22	77.25±7.73	0.79±0.07	0.23±0.03	0.67±0.06	0.70±0.07
si-TTN-AS1	9	0.57±0.05 ^①	44.23±4.12 ^①	56.32±5.62 ^①	41.27±4.23 ^①	0.39±0.03 ^①	0.56±0.05 ^①	0.32±0.03 ^①	0.36±0.04 ^①
t值		12.821	27.277	11.736	12.250	15.757	16.978	15.652	12.652
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: CyclinD1为细胞周期蛋白D1, p21为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A, MMP-2为基质金属蛋白酶2, MMP-9为基质金属蛋白酶9。

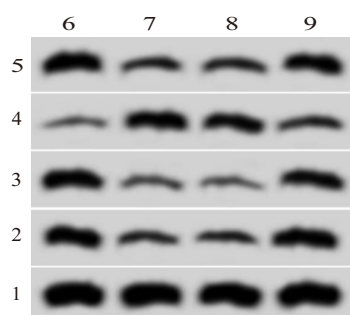
①与si-NC组比较, $P<0.05$ 。

表4 lncRNA TTN-AS1过表达逆转了氯普鲁卡因(CP)(9 mmol/L)对胶质瘤U251细胞增殖和转移的作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	TTN-AS1	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	9	1.00±0.07	0.00±0.01	97.25±9.61	76.25±7.24	0.78±0.07	0.22±0.03	0.69±0.06	0.72±0.07
CP	9	0.56±0.05 ^①	55.32±5.14	46.32±4.22 ^①	38.25±3.84 ^①	0.34±0.03 ^①	0.59±0.05 ^①	0.28±0.03 ^①	0.32±0.03 ^①
CP+pcDNA	9	0.54±0.05	56.87±5.62	44.59±5.38	36.14±3.66	0.32±0.03	0.60±0.06	0.27±0.03	0.30±0.03
CP+pcDNA-TTN-AS1	9	0.83±0.08 ^②	19.68±1.95 ^②	78.25±7.22 ^②	62.47±6.28 ^②	0.67±0.06 ^②	0.33±0.03 ^②	0.57±0.05 ^②	0.61±0.06 ^②
F值		108.865	453.229	123.673	113.178	189.058	164.810	202.443	154.107
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: CyclinD1为细胞周期蛋白D1, p21为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A, MMP-2为基质金属蛋白酶2, MMP-9为基质金属蛋白酶9。

①与对照组比较, $P=0.000$ 。②与CP+pcDNA组比较, $P=0.000$ 。



注:1—GAPDH;2—MMP-9;3—MMP-2;4—p21;5—CyclinD1;6—对照组;7—氯普鲁卡因(CP);8—CP+pcDNA;9—CP+pcDNA-TTN-AS1。

图4 细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白的表达

明,不同麻醉药均有一定的抑癌作用。本实验用不同浓度的CP处理胶质瘤细胞U251后,U251细胞增殖抑制率升高,细胞迁移侵袭数减少;表明氯普鲁卡可抑制胶质瘤U251细胞增殖、迁移和侵袭。

研究表明 lncRNA 也参与调节肿瘤的发生发展^[14]。研究报道 lncRNA TTN-AS1 在甲状腺乳头状癌组织和细胞中高表达,其表达水平与淋巴转移、TNM 分期和病人的整体生存率有关,抑制 TTN-AS1 表达可抑制细胞增殖,迁移,侵袭和 EMT^[15]。TTN-AS1 高表达与肺腺癌病人的 TNM 分期、淋巴结转移和术后预后差也有关,敲除 TTN-AS1 可抑制肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭^[16]。沉默 TTN-AS1 明显抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[17]。沉默 TTN-AS1 通过上调 miR-1271 抑制前列腺癌的增殖和迁移^[18]。以上研究表明 TTN-AS1 参与多种肿瘤的增殖和转移等过程,还与病人的生存及预后有关。本实验抑制 TTN-AS1 表达可提高细胞增殖抑制,降低细胞迁移侵袭数;说明抑制 TTN-AS1 表达可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭。用不同浓度的CP处理胶质瘤细胞U251后,TTN-AS1 表达水平显著降低;而过表达 TTN-AS1 逆转了CP对U251细胞的作用。以上研究表明,CP可能通过调控 TTN-AS1 影响胶质瘤U251细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,CP通过下调 lncRNA TTN-AS1 表达可抑制胶质瘤细胞增殖和转移。

参考文献

- [1] 陈正和,陈忠平.脑胶质瘤的治疗进展[J].新医学,2015,46(7):417-422.
- [2] 严蕾,陈玉培.麻醉药物对肿瘤微转移影响及机制的研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(7):780-784.

- [3] 张鲲,李曼,王力甚.氯普鲁卡因用于门诊手术麻醉的研究进展[J].医学综述,2014,20(23):4353-4355.
- [4] 宋银宏,何苗,符策岗,等.氯普鲁卡因诱导体外人宫颈癌细胞抑癌基因 CDH1、APC 和 P16 启动子去甲基化及基因表达[J].基础医学与临床,2012,32(9):1070-1075.
- [5] LI R, XIAO C, LIU H, et al. Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):666.
- [6] ZHONG Y, WANG J, LV W, et al. LncRNA TTN-AS1 drives invasion and migration of lung adenocarcinoma cells via modulation of miR-4677-3p/ZEB1 axis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):17131-17141.
- [7] LIN C, ZHANG N, WANG Y, et al. Functional role of a novel long noncoding RNA TTN-AS1 in esophageal squamous cell carcinoma progression and metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(2):486-498.
- [8] CHEN P, WANG R, YUE Q, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes cell growth and metastasis in cervical cancer via miR-573/E2F3 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4):2956-2962.
- [9] 王文婷,徐志新,李孟森.局部麻醉药抗肿瘤作用机制的研究进展[J].临床麻醉学杂志,2019,35(2):189-192.
- [10] 杨陈祎,王海云.麻醉药对胶质瘤影响的研究进展[J].国际麻醉学与复苏杂志,2018,39(5):479-483.
- [11] 方洁,朱建坡,张虎,等.普鲁卡因联合肌成束蛋白1对膀胱癌细胞的影响及机制研究[J].癌症进展,2019,17(13):1561-1564,1578.
- [12] 高聪,林大勇,韩勇,等.罗哌卡因对结肠癌细胞增殖和裸鼠人结肠癌皮下瘤生长的影响[J].中国免疫学杂志,2018,34(4):558-563.
- [13] 周勤,黄建新,谢敏,等.利多卡因抑制乳腺癌和前列腺癌细胞侵袭的作用和机制研究[J].现代预防医学,2019,46(1):132-138.
- [14] 王馨悦,李剑.长链非编码 RNA 在肿瘤中的研究进展[J].癌症进展,2018,16(11):1328-1330,1423.
- [15] CUI Z, LUO Z, LIN Z, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 facilitates tumorigenesis of papillary thyroid cancer through modulating the miR-153-3p/ZNF2 axis [J/OL]. J Gene Med, 2019, 21(5):e3083. DOI: 10.1002/jgm.3083.
- [16] JIA Y, DUAN Y, LIU T, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via sponging miR-142-5p to regulate CDK5 [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8):573.
- [17] QIU P, DOU Y, MA LZ, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes the metastasis in breast cancer by epigenetically activating DGCR8 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(24):10835-10841.
- [18] ZHU Y, YANG Z, LUO XH, et al. Long noncoding RNA TTN-AS1 promotes the proliferation and migration of prostate cancer by inhibiting miR-1271 level [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(24):10678-10684.

(收稿日期:2020-01-07,修回日期:2020-02-23)