

基础研究

丙泊酚对荷瘤大鼠肿瘤肺转移及MTA1和Wnt1表达的影响

张雅静, 林春水, 汪 威, 陈 莺

南方医科大学南方医院麻醉科, 广东 广州 510515

摘要:目的 探讨不同剂量丙泊酚对大鼠MADB106细胞肺转移及肿瘤组织中MTA1和Wnt1表达的影响。方法 Fischer344雄性大鼠40只,随机分为:生理盐水组(S组);脂肪乳剂组(F组);丙泊酚30 mg/kg组(P30组)和50 mg/kg组(P50组),每组10只。1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射经股静脉分别泵入等容量上述药物,1 h后均静注0.5 ml MADB106肿瘤细胞(2×10^5 个)。3周后处死,计数肺转移瘤数目;免疫组化检测肺肿瘤组织中MTA1和Wnt1的表达,IPP软件定量分析。结果 F组和S组肺转移瘤数目及肿瘤组织中MTA1和Wnt1的表达无显著差异($P > 0.05$)。与S组相比,P30和P50组的肺转移瘤数目及肿瘤组织中MTA1和Wnt1的表达均显著减少($P < 0.01$),肺转移瘤数目及MTA1和Wnt1的表达与丙泊酚的剂量负相关,Pearson相关系数分别为-0.879、-0.980和-0.916($P < 0.01$)。MTA1和Wnt1的表达呈正相关,Pearson相关系数为0.902($P < 0.01$)。结论 丙泊酚呈剂量依赖性抑制MADB106肿瘤细胞肺转移,并下调转移瘤中MTA1和Wnt1的表达。

关键词:丙泊酚;肿瘤转移;MTA1;Wnt1

Effects of propofol on pulmonary metastasis of intravenous injected tumor cells and expressions of MTA1 and Wnt1 in rats

ZHANG Yajing, LIN Chunshui, WANG Wei, CHEN Ying

Department of Anesthesiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different doses of propofol on pulmonary metastasis of intravenous injected tumor cells and expression of MTA1 and Wnt1 in the metastatic tumor in rats. **Methods** Forty male Fischer344 rats were randomly divided into 4 equal groups for intravenous administration of normal saline, intralipid, or propofol at the dose of 30 or 50 mg/kg pumped via the femoral vein. One hour after the infusion, MADB106 tumor cells (2×10^5) were injected intravenously in the rats. Pulmonary metastasis of the tumor cells was observed and the expression of MTA1 and Wnt1 in the metastatic tumor detected by immunohistochemistry 3 weeks later. **Results** The rats receiving saline and intralipid treatments showed a comparable number of pulmonary metastasis and similar expression levels of MTA1 and Wnt1 in the metastatic tumor ($P > 0.05$); the tumor number and MTA1 and Wnt1 were significantly lower in the two propofol groups ($P < 0.01$). The doses of propofol was inversely correlated with the number of pulmonary metastasis ($r = -0.879$) and expressions of MTA1 ($r = -0.980$) and Wnt1 ($r = -0.916$) ($P < 0.01$), and MTA1 and Wnt1 expression levels in the metastatic tumors were closed correlated ($r = 0.902$, $P < 0.01$). **Conclusion** Propofol can dose-dependently suppress pulmonary metastasis of intravenously injected tumor cells and down-regulate MTA1 and Wnt1 expressions in the metastatic tumor tissue.

Key words: propofol; tumor metastasis; MTA1; Wnt1

静脉麻醉药丙泊酚,广泛用于肿瘤切除手术的全身麻醉。多项研究表明,丙泊酚可以抑制肺癌、卵巢癌、食管癌等多种肿瘤细胞的侵袭和转移^[1-4],显示丙泊酚具有抗肿瘤作用。肿瘤转移相关蛋白(MTA)包括MTA1、MTA2和MTA3,是一类新发现的与肿瘤分级相关的基因和编码产物^[5];Wnt1作为Wnt经典信号通路中的主要成员之一,参与细胞分化、细胞极性形成、细胞迁移和增殖等生物学过程^[6]。最新研究发现,MTA1和Wnt1的过

度表达与人类多种肿瘤的细胞增殖和侵袭转移过程密切相关^[7-9]。丙泊酚是否通过降低MTA1和Wnt1在肿瘤组织中的表达发挥抗肿瘤效应,未见报道。本研究通过MADB106肿瘤细胞大鼠肺转移模型,观察丙泊酚对肿瘤肺转移及转移瘤中MTA1和Wnt1表达的影响及其量效关系。

1 材料和方法

1.1 动物、药品和试剂

清洁级Fischer344雄性大鼠,12~14周龄,体质量200~220 g(北京维通利华实验动物有限公司提供)。MADB106肿瘤细胞系(武汉大学中国典藏培养物保藏中心提供)是乳腺癌肺转移经Fischer344大鼠卵化培养的选择性细胞系,该细胞株经静脉注射后高选择性的种

收稿日期:2014-04-15

基金项目:广东省科技计划项目(2012A030400014);广州市科技计划项目(12C22121552)

作者简介:张雅静,硕士,E-mail: yajingzhang666@163.com

通信作者:林春水,主任医师,医学博士,博士生导师,E-mail: lcsnfyy@126.com

植在大鼠肺部。MADB106细胞培养于RPMI 1640培养液(1640基础培养基90%,FBS 10%,双抗0.1%),放置在37℃,100%湿度和5% CO₂的培养箱中,用0.25%的胰蛋白酶消化传代培养。丙泊酚注射液由阿斯利康公司提供(规格为200 mg/20 ml,批号为:jk222);实验所需抗体包括:MTA1单克隆抗体(Abnova公司提供,PAB19550),Wnt1单克隆抗体(Abcam公司提供,ab85060)。

1.2 动物模型与分组

40只Fischer344雄性大鼠随机分为4组:生理盐水组(S组);脂肪乳剂组(F组);丙泊酚30 mg/kg组(P30组)和50 mg/kg组(P50组),每组10只。1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射,麻醉后仰卧固定于操作台上,铺无菌单、消毒,行右侧股静脉置管,4组分别泵入等容量生理盐水,脂肪乳剂和丙泊酚,维持鼠肛温在36~37℃,呼吸频率约为60次/min,心率320~340次/min;1 h后经股静脉注入0.5 ml MADB106肿瘤细胞(2×10^5 个),拔除股静脉置管,缝合切口,肌肉注射青霉素 2×10^4 U/kg,在清洁级环境中饲养3周。

1.3 检测指标

1.3.1 肺转移瘤计数 大鼠经股静脉注入0.5 ml MADB106肿瘤细胞(2×10^5 个)。饲养3周后处死。取

出肺组织浸泡于4%多聚甲醛固定液中24 h,经70%的酒精洗脱后,由两名未参与实验的人员直接计数肺转移瘤的数目。

1.3.2 肺转移瘤MTA1和Wnt1的表达 按照试剂说明书,采用免疫组织化学SP二步法进行免疫组织染色。所有切片显微镜下盲法观察,MTA1以细胞核内出现棕褐色颗粒,Wnt1以细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。在400倍高倍镜视野下随机选取5个视野用Olympus DP70CCD采集图像。采用Image-proplus 10.0免疫组化彩色图像分析系统测定图片的平均光密度值做定量分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用Pearson法,以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺转移瘤数目

S组和F组肺转移瘤数目无明显差异($P > 0.05$,图1、2);与S组相比,P30和P50组肺转移瘤数目减少($P < 0.01$,图1、2),肺转移瘤数目与丙泊酚剂量负相关,Pearson相关系数为-0.879($P < 0.01$)。

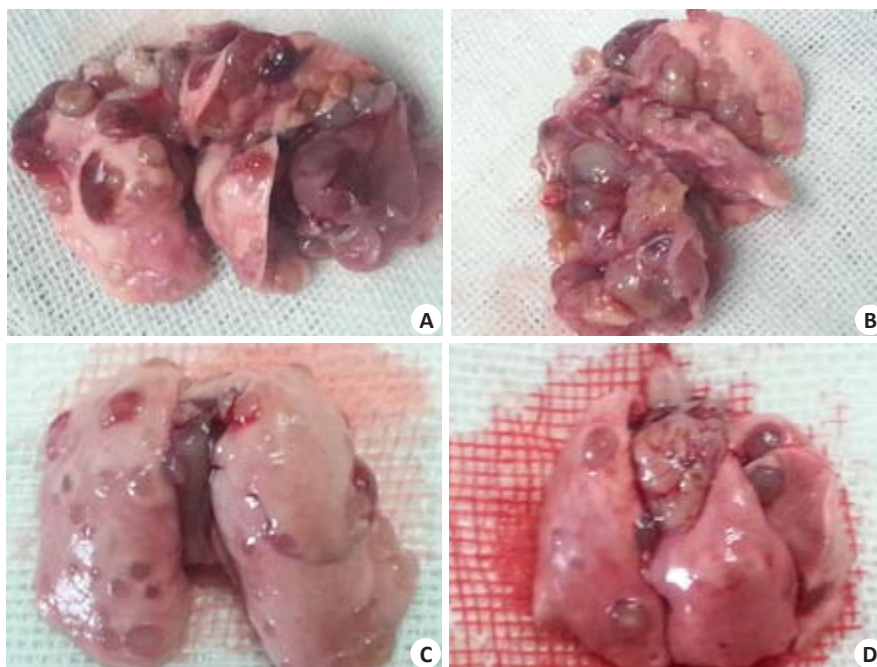


图1 肺转移瘤

Fig.1 Pulmonary metastasis of the injected tumor cells. A: Saline (S) group; B: Intralipid (F) group; C: 30 mg/kg propofol (P30) group; D: 50 mg/kg propofol (P50) group.

2.2 转移瘤MTA1和Wnt1表达

MTA1的表达定位于细胞核,出现棕褐色颗粒。S组和F组肿瘤组织中细胞核染色深,数量多,平均光密

度值的差异无统计学意义,两组MTA1的表达无显著差异($P > 0.05$,表1,图3);与S组相比,P30组和P50组肿瘤组织中细胞核染色浅,数量少,平均光密度值减少,

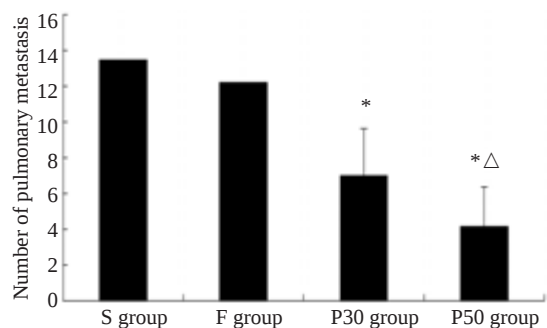


图2 肺转移瘤数目

Fig.2 Number of pulmonary metastasis in the 4 groups.

* $P < 0.01$ vs S group; $^{\Delta}P < 0.01$ vs P30 group.

MTA1的表达减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1,图3),MTA1的表达与丙泊酚负相关,Pearson相关系数分别为-0.980($P < 0.01$)。

Wnt1 主要在细胞质内表达,出现棕黄色颗粒。S组和F组肿瘤组织中细胞质染色深,数量多,平均光密度值无显著差异,Wnt1的表达无显著差异($P > 0.05$,表1,图4);P30和P50组肿瘤组织中细胞质染色浅,数量少,平均光密度值减少,Wnt1的表达减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$,表1,图4),Wnt1的表达与丙泊酚剂量负相关,Pearson相关系数-0.916($P < 0.01$);MTA1和Wnt1的表达呈正相关,Pearson相关系数为0.902($P < 0.01$)。

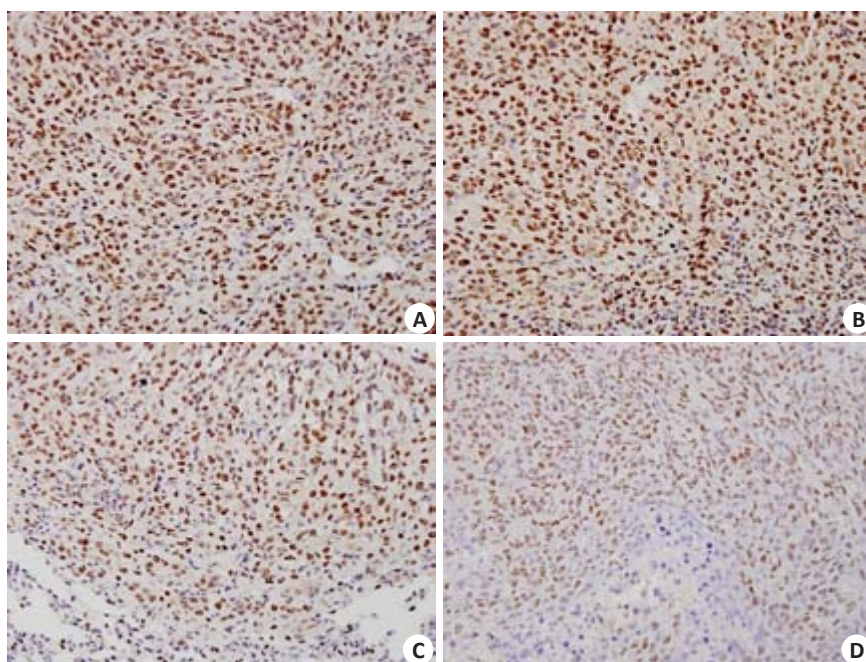


图3 大鼠肺转移瘤组织中MTA1的表达

Fig.3 Expression of MTA1 in the lung tumor tissues (Immunohistochemistry with SP method, original magnification: $\times 400$). A: S group; B: F group; C: P30 group; D: P50 group.

表1 肿瘤组织中MTA1和Wnt1表达

Tab.1 Expression of MTA1 and Wnt1 in the tumor tissues (Mean $\pm$ SD, $n=10$)

Group	Mean optical density	
	MTA1	Wnt1
S	1.33 $\pm$ 0.14	0.67 $\pm$ 0.90
F	1.27 $\pm$ 0.83	0.63 $\pm$ 0.73
P30	0.93 $\pm$ 0.91*	0.35 $\pm$ 0.30*
P50	0.53 $\pm$ 0.13* $^{\Delta}$	0.24 $\pm$ 0.34* $^{\Delta}$

* $P < 0.01$ vs S group; $^{\Delta}P < 0.01$ vs P30 group.

3 讨论

肿瘤侵袭和转移是一个复杂的生物学过程,受到许

多基因和蛋白的调控及其它许多因素的影响。手术切除是治疗肿瘤的主要手段之一,但难以避免术后肿瘤的复发和转移。近来研究发现,全身麻醉用药可能影响肿瘤的侵袭和转移,如七氟烷可下调MMP-2和MMP-9及肌束蛋白和埃兹蛋白的表达,抑制肺癌A549细胞的侵袭和转移,并认为是P38MAPK信号通路钝化所致^[10];芬太尼可改变胃癌MGC-803细胞的形态学,降低其运动能力,而且可下调NF- κ B及上调PTEN,抑制胃癌进一步发展^[11]。

目前临床最常用的静脉麻醉药丙泊酚,可以抑制肺癌、卵巢癌、食管癌等多种肿瘤的侵袭和转移^[1-4],显示丙泊酚有抗肿瘤作用。许多研究表明,丙泊酚对不同肿瘤细胞的作用及其机制有所不同。丙泊酚能抑制A549肺

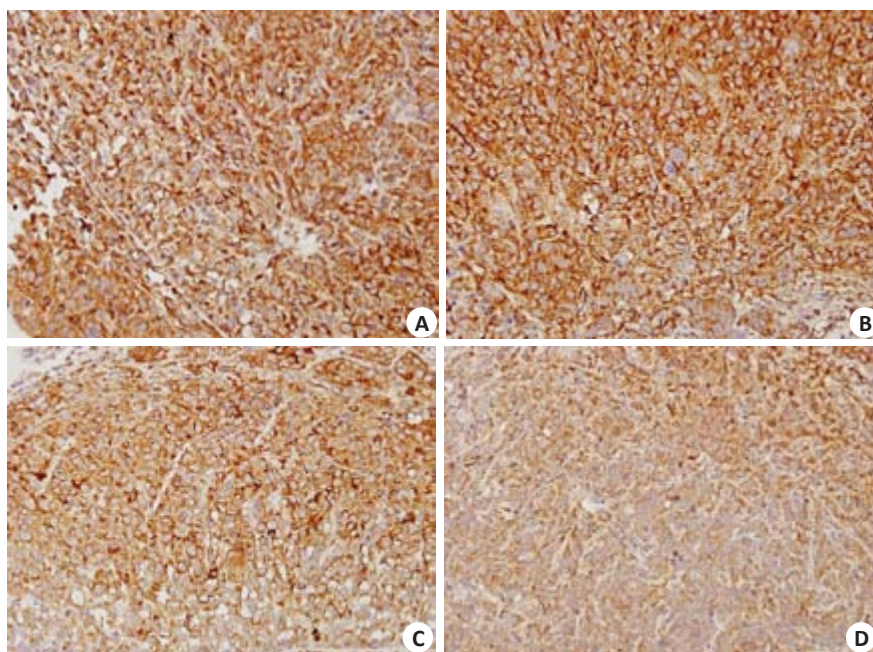


图4 大鼠肺转移瘤组织中Wnt1的表达

Fig.4 Expression of Wnt1 in the lung tumor tissues (Immunohistochemistry with SP method, original magnification: $\times 400$). A: S group; B: F group; C: P30 group; D: P50 group.

腺癌上皮细胞中MMP-2和9的表达,减弱细胞的侵袭和转移能力^[1];丙泊酚还可作为肺癌H460细胞内质网应激和JNK信号通路的正向调节因子,抑制该细胞的增殖,诱导其凋亡^[2]。另外,丙泊酚通过减少Slug的表达,抑制卵巢癌细胞的侵袭和转移^[3];通过下调食管鳞状癌细胞Eca-109中ERK-VEGF/MMP-9信号表达,抑制其增殖、侵袭、甚至血管新生^[4]。上述研究,主要是细胞学研究,而非在体研究。本实验通过MADB106乳腺腺癌细胞的大鼠肺转移模型,在体观察丙泊酚对肿瘤转移的影响及其量效关系。结果发现:生理盐水组(S组)和脂肪乳剂组(F组)肺转移瘤数目的差异无统计学意义,而丙泊酚剂量组P30和P50的肺转移瘤数目与S组和F组相比均明显减少,随着丙泊酚剂量的增大肺转移瘤数目相应减少,说明丙泊酚可呈剂量依赖性抑制肿瘤转移。尽管有研究表明,丙泊酚可以增加T细胞的活性,促进T细胞诱导协同刺激分子ICOS的表达,具有增加细胞免疫的作用^[12,13],但其抗肿瘤作用的机制有待深入的研究。

肿瘤转移相关蛋白是一类新发现的与肿瘤分级相关的基因和编码产物,包括MTA1、MTA2和MTA3三大类^[5],其中MTA1在大肠癌^[14]、食管癌^[15]、喉鳞状细胞癌^[7]、扁桃体^[16]等肿瘤组织中过度表达,且与肿瘤的分期和分级、侵袭转移能力甚至预后等相关,是肿瘤侵袭转移的重要生物学标志之一。Wnt1是原癌基因家族中一员,有促进细胞增殖的作用,作为Wnt经典信号通路中的主要成员之一,不仅参与细胞分化、细胞极性形成、细胞迁移和增殖等生物学过程^[6],其异常或异位表达,参与

非小细胞肺癌^[17]、胃癌^[9]、大肠癌^[18]的细胞增殖和侵袭转移等过程。因此,减少MTA1和Wnt1在肿瘤细胞或组织中的表达,可抑制肿瘤的侵袭转移,丙泊酚的抗肿瘤效应是否通过此作用尚不明确。本研究发现:S组和F组的肿瘤组织中MTA1和Wnt1的表达无显著差异,P30和P50组的肿瘤组织中MTA1和Wnt1的表达均比S组和F组明显减少,而且MTA1和Wnt1的表达与丙泊酚的剂量负相关,说明丙泊酚呈剂量依赖性抑制MTA1和Wnt1的表达。研究表明,敲除MTA1或用小干扰RNA沉默MTA1后,非小细胞肺癌、前列腺癌细胞的侵袭转移能力减弱^[19-20]。抗肿瘤药物沙利霉素也可通过抑制Wnt1的表达,减少Oct4和CD44的表达,抑制胃癌细胞的侵袭转移能力,缩小肿瘤体积^[9];大麻素通过抑制Wnt/ β -catenin通路,抑制乳腺癌上皮间质转化过程,减弱该细胞的侵袭转移能力^[21]。可见,阻断或抑制MTA1或Wnt1的表达可抑制肿瘤细胞的转移能力。我们的实验结果也印证了这一点,即丙泊酚可抑制肿瘤组织MTA1和Wnt1的表达,从而减少肿瘤肺转移。

MTA1和Wnt1的表达程度均与肿瘤的侵袭和转移密切相关。本研究发现:MTA1和Wnt1的表达呈正相关,Pearson相关系数为0.902,可见在肿瘤转移过程中,MTA1和Wnt1具有协同作用。Kumar等^[22]发现,MTA1可作为Wnt1转录和翻译的重要的上游调节因素,通过抑制Six3的表达导致Wnt1去阻遏,促进Wnt1的转录和翻译。我们的研究佐证了该研究结果,表明MTA1可与Wnt1共同参与肿瘤侵袭和转移过程,二者可作为肿

瘤治疗的靶目标。

本研究表明,丙泊酚可呈剂量依赖性地抑制MADB106肿瘤细胞肺转移,下调转移瘤组织中MTA1和Wnt1的表达。因此,在肿瘤手术的麻醉方面,丙泊酚可能有益于患者的预后。但丙泊酚通过什么途径下调MTA1和Wnt1的表达以及临床依据,均值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Wu KC, Yang ST, Hsia TC, et al. Suppression of cell invasion and migration by propofol are involved in down-regulating matrix metalloproteinase-2 and p38 MAPK signaling in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(11): 4833-42.
- [2] Cui WY, Liu Y, Zhu YQ, et al. Propofol induces endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis in lung cancer cell H460[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5213-7.
- [3] Wang P, Chen J, Mu LH, et al. Propofol inhibits invasion and enhances paclitaxel- induced apoptosis in ovarian cancer cells through the suppression of the transcription factor slug[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(13): 1722-9.
- [4] Xu YB, Du QH, Zhang MY, et al. Propofol suppresses proliferation, invasion and angiogenesis by down-regulating ERK-VEGF/MMP-9 signaling in Eca-109 esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(18): 2486-94.
- [5] Manavathi B, Kumar R. Metastasis tumor antigens, an emerging family of multifaceted master coregulators[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(3): 1529-33.
- [6] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease [J]. *Cell*, 2006, 127(3): 469-80.
- [7] Zhang H, Yang D, Wang H, et al. Metastasis-associated gene 1 promotes invasion and migration potential of laryngeal squamous cell carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(2): 399-404.
- [8] Luo H, Li H, Yao N, et al. Metastasis-associated protein 1 as a new prognostic marker for solid tumors: a meta-analysis of cohort studies[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5823-32.
- [9] Mao J, Fan S, Ma W, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1039.
- [10] Liang H, Gu M, Yang C, et al. Sevoflurane inhibits invasion and migration of lung cancer cells by inactivating the p38 MAPK signaling pathway[J]. *J Anesth*, 2012, 26(3): 381-92.
- [11] Qin Y, Li L, Chen J, et al. Fentanyl inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by NF-kappaB downregulation and PTEN upregulation *in vitro*[J]. *Oncol Res*, 2012, 20(2/3): 61-9.
- [12] Kushida A, Inada T, Shingu K. Enhancement of antitumor immunity after propofol treatment in mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2007, 29(3/4): 477-86.
- [13] 林长赋, 潘英丽, 丁锦屏, 等. 丙泊酚对肺癌根治术患者T淋巴细胞可诱导协同刺激分子的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2010, 26(4): 284-6.
- [14] Du B, Yang ZY, Zhong XY, et al. Metastasis-associated protein 1 induces VEGF-C and facilitates lymphangiogenesis in colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(9): 1219-26.
- [15] Miyatani T, Kurita N, Mikami C, et al. Malignant potential of Barrett's esophagus: special reference to HDAC-1 and MTA-1 expression[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(16): 472-6.
- [16] Park JO, Jung CK, Sun DI, et al. Relationships between metastasis-associated protein (MTA) 1 and lymphatic metastasis in tonsil cancer[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011, 268(9): 1329-34.
- [17] Nakashima T, Liu D, Nakano J, et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(1): 203-9.
- [18] 罗德富, 李毅, 徐海. Wnt-1与Smad4在大肠癌中的表达及其临床病理意义[J]. *临床和实验医学杂志*, 2008, 7(10): 17-9.
- [19] Zhu X, Zhang X, Wang H, et al. MTA1 gene silencing inhibits invasion and alters the microRNA expression profile of human lung cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(1): 218-24.
- [20] Wang H, Fan L, Wei J, et al. Akt mediates metastasis-associated gene 1 (MTA1) regulating the expression of E-cadherin and promoting the invasiveness of prostate cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e46888.
- [21] Laezza C, D'alessandro A, Paladino S, et al. Anandamide inhibits the Wnt/ β -catenin signalling pathway in human breast cancer MDA MB 231 cells[J]. *Eur J cancer*, 2012, 48(16): 3112-22.
- [22] Kumar R, Balasenthil S, Manavathi B, et al. Metastasis-associated protein 1 and its short form variant stimulates Wnt1 transcription through promoting its derepression from Six3 corepressor [J]. *cancer Res*, 2010, 70(16): 6649-58.

(编辑:吴锦雅)