

七氟醚抑制人乳腺癌细胞株 MCF-7 黏附的机制研究*

李超¹, 胡啸玲¹, 旷昕¹, 刘文捷¹, 曾希^{2Δ}

(1. 南华大学附属第一医院麻醉科, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 观察不同浓度七氟醚对人乳腺癌细胞株 MCF-7 黏附能力、CD44 表达的影响。方法 实验细胞分 4 组: 不经任何处理的 Control 组、1.7% 七氟醚作用的 Treat 1 组、3.4% 七氟醚组作用的 Treat 2 组和 5.1% 七氟醚作用的 Treat 3 组。Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组人乳腺癌 MCF-7 细胞通入 95% O₂ 和 2.5% CO₂ 混合气体 6 L/min, 经 1.7%、3.4%、5.1% 七氟醚作用 2、4、6 h。检测细胞黏附率; 采用 qRT-PCR 法检测 CD44 的 mRNA 表达。结果 与处理前比较, Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4、6 h 时细胞黏附率降低, CD44 的 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$); 与处理 2 h 时比较, Treat 2 组和 Treat 3 组处理 4 和 6 h 时细胞黏附率降低, CD44 的 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$); 与处理 4 h 时比较, Treat 2 组和 Treat 3 组处理 6 h 时细胞黏附率降低, CD44 的 mRNA 表达下调 ($P < 0.05$); 与 Control 组比较, Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 时细胞黏附率均降低, CD44 的 mRNA 表达均下调 ($P < 0.05$); 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 七氟醚可降低人乳腺癌细胞株 MCF-7 的黏附能力, 且呈浓度和时间依赖性, 其机制可能与下调 CD44 的表达有关。

关键词: 乳腺肿瘤; 七氟醚; 细胞黏附; CD44

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)15-1884-02

Effects of different concentrations of sevoflurane on adhesion and expression of CD44 in human breast cancer cell line MCF-7*

Li Chao¹, Hu Xiaoling¹, Kuang Xin¹, Liu Wenjie¹, Zeng Xi^{2Δ}

(1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Institute of Cancer Research, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different concentrations of sevoflurane on adhesion and expression of CD44 in human breast cancer cell line MCF-7. Methods The cells were randomly divided into 4 groups: control group and 3 sevoflurane groups exposed to 1.7%, 3.4% and 5.1% sevoflurane for 2, 4 and 6 h respectively. Cell adhesion rate was detected by adhesion test and the expression of CD44 mRNA and protein was determined by qRT-PCR. Results In Treat 1, 2, 3, the adhesion rate at 2, 4, 6 h were lower than that before treat, mRNA expression of CD44 reduced ($P < 0.05$); the adhesion rate of Treat 2 and Treat 3 at 4 and 6 h were lower than that of 2 h, and the mRNA expression of CD44 reduced ($P < 0.05$); the adhesion rate of Treat 2 and Treat 3 at 6 h were lower than that of 4 h, and the mRNA expression of CD44 reduced ($P < 0.05$); compared with Control group, the adhesion rate of Treat 1, 2 and 3 at 2, 4, 6 h were all lower, mRNA expression of CD44 reduced ($P < 0.05$); the differences between each group were statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Sevoflurane can inhibit cell adhesion in a concentration and duration of exposure dependent manner, and its mechanism could be related with the down regulation of CD44 expression.

Key words: breast neoplasms; sevoflurane; cell adhesion; CD44

七氟醚于 1968 年由 Regan 合成, 1986 年完成 3 期临床试验, 1990 年首先由日本的药监部门批准临床使用。近年来, 被许多著名麻醉学专家誉为吸入麻醉的里程碑式药物。研究表明, 七氟醚可抑制结肠癌细胞和喉癌细胞的生长, 以及肺癌细胞的黏附^[1-2]。但七氟醚对人乳腺癌细胞株黏附能力的影响尚未见报道。CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白, 属于黏附分子, 其分布十分广泛, 功能主要参与细胞间及细胞与基质间的特异性粘连过程, 且在恶性肿瘤的发生、发展中起着十分重要的作用。目前, CD44 作为多种已知肿瘤干细胞的标记物, 包括乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肝细胞癌。CD44 参与了这些肿瘤的发生、发展、复发和转移的过程^[3-6]。本研究拟评价七氟醚对人乳腺癌细胞株 MCF-7 黏附能力、CD44 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 人乳腺癌细胞株 MCF-7(南华大学研究所), 1640 培养基、10% 胎牛血清(Hyclone 公司, 美国), 麻醉气体监测仪(Datex AS/3 公司, 芬兰), AestivaR/5 型麻醉机(Datex Ohmeda 公司, 芬兰)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 实验分组与处理 取对数生长长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞, 采用随机数字表法, 将其随机分为 4 组: 不经任何处理的 Control 组、1.7% 七氟醚作用的 Treat 1 组、3.4% 七氟醚作用的 Treat 2 组和 5.1% 七氟醚作用的 Treat 3 组。

1.2.3 细胞黏附实验 分别处理好细胞将 100 μL 细胞悬液加入 96 孔板中, 继续培养 1 h。每孔加入 200 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)振荡 5 min, 洗 2 遍。弃 PBS 后加入噻唑蓝(MTT), 用酶标仪于波长 490 nm 测定吸光度值, 并计算黏附率=(各实验孔黏附细胞吸光度值/对照孔黏附细胞吸光度值-1)×100%。

1.2.4 CD44 mRNA 表达的测定 采用 qRT-PCR 法测定 CD44 mRNA 的表达 qRT-PCR 反应: 反应体系为 20 μL, 包括稀释后的 RT 产物 2 μL、2×qRT-PCR 缓冲液 10 μL、5 μmol/L miR-155 特异性 PCR 引物 0.4 μL、5 U/μL 耐热 DNA 聚合酶

表 1 4 组细胞黏附率的比较 (%)

组别	处理前	处理 2 h	处理 4 h	处理 6 h
Control 组	87.0±6.0	86.0±5.0	85.0±4.5	86.0±4.6
Treat 1 组	87.0±2.9	81.0±2.7 ^{ad}	74.0±5.0 ^{ad}	71.0±6.7 ^{ad}
Treat 2 组	84.0±5.6	68.0±6.9 ^{ade}	61.0±3.9 ^{abde}	56.0±5.2 ^{abcde}
Treat 3 组	88.0±3.9	57.0±5.4 ^{def}	47.0±4.3 ^{abdef}	36.0±3.1 ^{abcdef}

^a: $P<0.05$,与处理前比较;^b: $P<0.05$,与处理 2 h 时比较;^c: $P<0.05$,与处理 4 h 时比较;^d: $P<0.05$,与同时间点 Control 组比较;^e: $P<0.05$,与同时间点 Treat 1 组比较;^f: $P<0.05$,与同时间点 Treat 2 组比较。

表 2 4 组细胞 CD44 mRNA 表达比较

组别	处理前	处理 2 h	处理 4 h	处理 6 h
Control 组	1.55±0.09	1.53±0.08	1.49±0.10	1.42±0.09
Treat 1 组	1.57±0.04	1.37±0.09 ^{ad}	1.28±0.05 ^{ad}	1.11±0.08 ^{ad}
Treat 2 组	1.42±0.04	0.99±0.08 ^{ade}	0.79±0.04 ^{abde}	0.71±0.06 ^{abde}
Treat 3 组	1.49±0.05	0.89±0.08 ^{abdef}	0.70±0.07 ^{abdef}	0.50±0.04 ^{abcdef}

^a: $P<0.05$,与处理前比较;^b: $P<0.05$,与处理 2 h 时比较;^c: $P<0.05$,与处理 4 h 时比较;与处理 4 h 时比较;^d: $P<0.05$,与同时间点 Control 组比较;^e: $P<0.05$,与同时间点 Treat 1 组比较;^f: $P<0.05$,与同时间点 Treat 2 组比较。

0.2 μL、灭菌双蒸水 7.4 μL。反应条件:先 95 ℃ 3 min 活化 Tag 酶;然后 95 ℃ 12 s,62 ℃ 35 s 共 40 个循环。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞黏附能力的比较 与处理前比较,Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞黏附率降低($P<0.05$);与处理 2 h 比较,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 4 和 6 h 细胞黏附能力降低($P<0.05$);与处理 4 h 比较,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 6 h 细胞黏附能力降低($P<0.05$);与 Control 组比较,Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞黏附能力降低($P<0.05$);与 Treat 1 组比,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞黏附能力降低($P<0.05$);与 Treat 2 组比,Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞黏附能力降低($P<0.05$),见表 1。

2.2 4 组人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞 CD44 mRNA 表达改变 与处理前比较,Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$);与处理 2 h 比较,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 4 和 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$);与处理 4 h 比较,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$);与 Control 组比较,Treat 1 组、Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$);与 Treat 1 组比,Treat 2 组和 Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$);与 Treat 2 组比,Treat 3 组处理 2、4 和 6 h 细胞 CD44 的 mRNA 表达下调($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

乳腺癌是女性第一大恶性肿瘤,据美国癌症协会(ACS)2011 年数据统计,2008 年世界女性乳腺癌新发病例 1 383 500 例,占女性全部恶性肿瘤的 23%,死亡 458 400 例,其中,大约一半的乳腺癌新发病例和 60% 的死亡例数发生在发展中国家^[7]。在中国,乳腺癌的发病高峰年龄则出现在 45~50 岁,这意味着在中国,乳腺癌已经严重危害了广大处于事业和家庭巅峰时期的女性的生命和生活,成为威胁女性健康的“首要杀手”。其对人类健康的严重危害已引起了世界卫生组织和医疗界人士的高度重视。

越来越多的研究者从癌细胞中筛选出表达一个或多个表面蛋白标记物(CD44、CD24 和 ALDH1)的细胞^[8],这些表面标

志有 CD44⁺/CD24⁻/Low/ALDH1⁺ 的细胞亚群仅占癌细胞总数的 0.2%~0.8%,其致癌能力较其他的癌细胞强 100 倍,100 个这类细胞即可在小鼠乳腺中形成与人类乳腺癌相同的肿瘤并具有干细胞特性,因此,具有这类特异性标记的细胞被认为是肿瘤干细胞,即肿瘤“种子”。这些肿瘤干细胞与肿瘤的发生、发展、复发转移、放化疗抵抗等密切相关^[9-13]。本研究七氟醚浓度为临床常用浓度,七氟醚可以安全而有效地用于成人,儿童和老年人的诱导。其诱导迅速快,不良反应少,心血管稳定性好。与氟烷相比,七氟醚吸入诱导的心血管不良反应少;与异丙酚等静脉麻醉药相比,诱导时间,心血管稳定性和不良反应相似,可以作为临床用药的另一选择。此外,七氟醚吸入诱导还可以用于困难插管患者的麻醉处理和对没有建立静脉通道的患者。本研究结果表明,与处理前比较,处理 2、4 和 6 h 时,不同浓度七氟醚组细胞黏附率依次降低;与对照组比较,经 1.7%、3.4% 和 5.1% 的七氟醚处理后细胞黏附率依次降低,提示七氟醚可降低人乳腺癌细胞株 MCF-7 的黏附能力,且呈浓度和时间依赖性。本研究结果表明,与处理前比较,处理 2、4 和 6 h 时,不同浓度七氟醚组 CD44 表达依次下调;与对照组比较,经 1.7%、3.4% 和 5.1% 的七氟醚处理后 CD44 表达依次下调。细胞黏附分子 CD44 是一种跨膜糖蛋白,其存在一个高度保守的氨基酸末端,与透明质酸结合结构区域之间具有氨基酸序列的高度同源性,CD44 具有广泛的组织分布,但目前的研究表明 CD44 异常表达与肿瘤的黏附及转移相关,CD44 表达越高,肿瘤细胞的黏附能力越强^[14]。因此,该研究提示七氟醚降低人乳腺癌细胞株 MCF-7 的黏附能力可能与其抑制 CD44 的表达有关。

综上所述,七氟醚可降低人乳腺癌 MCF-7 的黏附能力,且呈浓度和时间依赖性,其机制可能与下调 CD44 的表达有关。

参考文献:

[1] Kvolik S,Dobrosevic B,Marci S, et al. Different apoptosis ratios and gene expressions in two human cell lines after sevoflurane anaesthesia[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2009,53(9):1192-1199.
 [2] 黄翔,杨承祥,梁桦. 不同浓度七氟醚对人肺腺癌细胞株 A549 黏附能力、CD44 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2012,63(1):60-63.
 [3] Wang X,Wang G,Zhao Y, et al. STAT3 mediates resistance of CD44(+)CD24(-/low) breast (下转第 1888 页)

要有促进 B 细胞增生分化和分泌抗体,活化 T 细胞和 NK 细胞、刺激肝细胞分泌急性肝细胞蛋白,促进造血干细胞增殖,使垂体分泌促肾上腺皮质激素,使形状细胞分泌神经生长因子样活性物质等。有研究表明细胞因子 IL-6, sIL-2R 参与了 ITP 的发病过程^[16]。

本实验研究结果显示中药方剂加味四物汤具有与泼尼松一样能增加 ITP 模型小鼠外周血 WBC、PLT 水平,促进骨髓有核细胞增殖,使血清 IL-6 的水平明显上升的作用。

参考文献:

- [1] 杨宇飞,周霁祥,麻柔. 免疫性血小板减少性紫癜动物模型的建立[J]. 中华血液学杂志,1994,15(3):160-161.
- [2] 富琦,范颖,王家辉,等. 免疫性血小板减少性紫癜病证结合动物模型建立与评价[J]. 中国中医基础医学杂志,2004,10(2):30-32.
- [3] Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J, et al. Treatment with liposome-encapsulated clodronate as a new strategic approach in the management of immune thrombocytopenic purpura in a mouse model[J]. Blood, 2000, 96(8):2834-2840.
- [4] 付必莽,苏莹珍,何小文,等. 逆向解剖法游离股骨/胫骨快捷制备小鼠骨髓细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(14):2601-2604.
- [5] 陈信义,麻柔,李冬云. 规范常见血液病中医病名建议[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(11):1040-1041.
- [6] 赵永强. 特发性血小板减少性紫癜的诊治进展[J]. 中国

医学科学院学报,2009,31(5):517-521.

- [7] 康世珍. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜述略[J]. 实用中医内科杂志,2004,18(1):15-15,18.
- [8] 唐世锋,杜忠海. 中医药治疗原发性血小板减少性紫癜的临床研究进展[J]. 河北中医,2013,35(3):467-470.
- [9] 冯泳,申惠鹏. 方剂学[M]. 北京:中医古籍出版社,2003:137-142.
- [10] 冯晓燕. 加味四物汤对再生障碍性贫血大鼠模型 IL-2 影响的实验研究[J]. 江西中医学院学报,2009,4(4):55-57.
- [11] 冯晓燕,顾鸿,严鲁萍. 加味四物汤治疗特发性血小板减少性紫癜 46 例[J]. 中外健康文摘,2011,8(27):65-66.
- [12] 哈敏文,李振,何安光,黄芪合剂防治化疗性骨髓抑制的实验研究[J]. 中国医科大学学报,1997,26(5):12-15,25.
- [13] 李美芬,蒋德昭. 黄芪促进小鼠粒系造血[J]. 湖南医科大学学报,1991,16(2):135-137.
- [14] 盛光耀,王春美. 特发性血小板减少性紫癜发病机制研究进展[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(3):157-159.
- [15] Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, et al. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(24):9035-9039.
- [16] 张国利,张剑白,蒋丽鑫. 特发性血小板减少性紫癜患儿血清 IL-6, sIL-2R 的变化及意义[J]. 哈尔滨医科大学学报,2009,43(5):486-489.

(收稿日期:2013-11-06 修回日期:2014-02-24)

(上接第 1885 页)

- cancer stem cells to tamoxifen in vitro[J]. J Biomed Res, 2012, 26(5):325-335.
- [4] Yang X, Sarvestani SK, Moeinzadeh S, et al. Effect of CD44 binding peptide conjugated to an engineered inert matrix on maintenance of breast cancer stem cells and tumorsphere formation[J]. PLoS One, 2013, 8(3):591-597.
- [5] Chen W, Zhang X, Chu C, et al. Identification of CD44⁺ cancer stem cells in human gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(2):155-159.
- [6] Lun SW, Cheung ST, Cheung PF, et al. CD44⁺ cancer stem-like cells in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(4):524-529.
- [7] DeSantis C, Siegel R, Bandi P, et al. Breast cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(6):409-418.
- [8] Charafe-Jauffret E, Ginestier C. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature[J]. Cancer Res, 2009, 69(4):1302-1313.
- [9] Hayashida T, Jinno H, Kitagawa Y, et al. Cooperation of cancer stem cell properties and epithelial-mesenchymal transition in the establishment of breast cancer metastasis[J]. J Oncol, 2011, 22(3):591-602.
- [10] Velasco-Velazquez MA, Popov VM, Lisanti MP, et al. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications[J]. Am J Pathol, 2011, 179(1):

2-11.

- [11] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression[J]. Clin Cancer Res, 2014, 19(20):5602-5612.
- [12] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22[J]. Cancer Lett, 2013, 340(2):72-81.
- [13] Li B, Song Y, Liu TJ, et al. miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. Oncology Reports, 2013, 29(1):1932-1938.
- [14] Xiong J, Yu D, Wei N, et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples[J]. FEBS J, 2010, 277(7):1684-1694.
- [15] Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production[J]. Cancer Res, 2013, 73(13):4112-4122.

(收稿日期:2014-01-16 修回日期:2014-03-21)