

研究论文

缺氧条件下右美对胶质瘤细胞活性的影响

陈栋 曾朝阳*

(重钢总医院麻醉科, 重庆 400080)

摘要 该研究探究右美托咪定(dexmedetomidine, 右美, Dex)在常氧和缺氧条件下对U87胶质瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。用氯化钴(CoCl_2 , 400 $\mu\text{mol/L}$)模拟缺氧条件, 利用CCK-8观察在常氧和缺氧条件下, 不同浓度的右美(0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)在不同时间点(24、48、72 h)对U87胶质瘤细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡水平和细胞周期变化, Transwell检测细胞迁移和侵袭能力的变化, 采用Western blot检测各对应蛋白的变化情况。结果显示, 缺氧处理可抑制右美对U87的促增殖和抗凋亡作用, 但是会促进右美对U87迁移和侵袭能力的提升。缺氧处理后AKT磷酸化水平降低, ERK1/2磷酸化水平升高, 周期蛋白和凋亡蛋白也出现部分变化。此外, 在缺氧条件下右美促进MMP7和MMP9的表达。综上, 缺氧抑制右美对胶质瘤细胞的促增殖和抗凋亡作用, 但会辅助右美促进细胞迁移和侵袭。

关键词 缺氧; 右美; 胶质瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移

Effects of Dextromethorax on Glioma Cell Activity under Hypoxia

CHEN Dong, ZENG Zhaoyang*

(Department of Anesthesiology, Chonggang General Hospital, Chongqing 400080, China)

Abstract The aim of the study was to investigate the effects of dexmedetomidine on proliferation, apoptosis, migration and invasion of U87 glioma cell under hypoxic and normoxic conditions. Cobalt chloride (CoCl_2 , 400 $\mu\text{mol/L}$) was used to simulate hypoxia conditions. The study observed the proliferating effect of dexmedetomidine at different concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$) during different time (24, 48, 72 h) on U87 glioma cells under normoxia and hypoxia by CCK-8, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cell cycle changes. Migration and invasion abilities were detected by Transwell. Western blot was used to detect the changes of each proteins. Results showed that hypoxia treatment inhibited the proliferative and anti-apoptotic effects of dexmedetomidine on U87, but promoted the migration and invasion of dexmedetomidine on U87. After hypoxia treatment, the phosphorylation level of AKT was decreased. The phosphorylation level of ERK1/2 was increased, and the cyclins and apoptotic proteins were also partially changed. In addition, dexmedetomidine promoted the expression of MMP7 and MMP9 under hypoxia. In conclusion, hypoxia inhibits the pro-proliferation and anti-apoptotic effects of dexmedetomidine on glioma cells, but assists dexmedetomidine in promoting cell migration and invasion.

Keywords hypoxia; dexmedetomidine; glioma; cell proliferation; cell apoptosis; cell migration

胶质瘤是来源于中枢神经系统的恶性肿瘤, 具有高增殖、高侵袭和多重耐药的特点。胶质瘤的疾

收稿日期: 2020-02-25

接受日期: 2020-06-26

*通讯作者。Tel: 18182282053, E-mail: 309862851@qq.com

Received: February 25, 2020

Accepted: June 26, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-18182282053, E-mail: 309862851@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5282>

病过程发展快, 每10万人中就有5.26人患胶质瘤, 低级别的胶质瘤、间变性胶质瘤和胶质母细胞瘤的中位生存期分别仅为78.1、37.6和14.4个月^[1]。目前, 无论是低级别I型胶质瘤还是IV型高级别的胶质瘤, 面对占位病变对脑组织的压迫和升高颅内压带来的

一系列症状,标准治疗方案是手术切除辅以化疗。胶质瘤在脑组织中呈侵袭性生长,难以定位具体的生长边界,这为手术切除带来了困难。胶质瘤侵袭性生长的特点使胶质瘤在常规手术切除中容易遗留病灶,复发率较高^[2]。越来越多的研究表明,麻醉药和镇痛镇静的药物在手术过程中或是术后对肿瘤的生物学特征和行为具有显著的影响。已有研究表明,曲马多是一种非阿片类镇痛药物,能够通过CX43介导细胞间的缝隙连接通讯,减弱胶质母细胞瘤对化疗药物替莫唑胺的敏感性^[3]。相反,其他的一些研究表明,丙泊酚、利多卡因、七氟醚和硫喷妥钠能够抑制胶质母细胞瘤的增殖和迁移^[4-6]。因此,部分麻醉药品通过不同的机制,进而影响不同的生物学效应来控制癌症的进程。

右美托咪定(dexmedetomidine, 右美, Dex),一种选择性 α_2 肾上腺受体(α_2 -adrenoreceptor, α_2 -AR)激动剂,已经被越来越多地应用于手术镇静、镇痛、抗焦虑和阻滞交感神经等方面。右美不仅具有与其他麻醉药协同麻醉的作用,还具有较强的脑损伤保护作用^[7-8]。此类保护作用主要是依赖 α_2 -AR激活,阻断该受体能够部分切断这些保护作用。 α_2 -AR是一类Gi型G蛋白偶联受体,能够降低细胞内Cyclic AMP(cAMP)的水平。右美和 α_2 -AR具有高亲和力,激活受体,调节大量的信号分子,抑制核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)的表达,减少炎症反应和氧化应激。研究表明,右美可减轻手术期间的压力应激,促进乳腺癌、肺癌和结肠癌在啮齿类动物模型中的转移^[9]。体外研究也表明,右美可以通过 α_2 -AR/ERK信号促进胶质瘤细胞U87和U251的增殖、迁移和侵袭。此外,右美的保护作用可通过调节细胞凋亡和炎症反应进而降低顺铂对肾脏的毒性。研究表明,右美也可保护癌细胞不受顺铂的治疗,低浓度的右美(10~40 μ mol/L)能够在顺铂处理下提升胶质瘤细胞U87和U251的增殖、迁移和侵袭能力。但当右美浓度达到50 μ mol/L时,该促进作用逆转,辅助顺铂抑制U87和U251的增殖、迁移和侵袭。研究者发现,在以0~40 μ mol/L浓度存在时,PI3K/AKT通路的磷酸化水平升高。在低浓度右美处理时,ERK1/2的磷酸化水平是升高的,但是当右美浓度达到50 μ mol/L时,这个磷酸化水平出现下降^[10]。值得注意的是,在低浓度右美处理时,有研究者观察到缺氧诱导因子 α_1 (hypoxia-inducible factor α_1 , HIF- α_1)和

下游血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的升高,但是随着右美的作用浓度提高后,两种蛋白的表达水平下降。随之而来的就是胶质瘤细胞生物学行为的一些转变^[11-12]。

由于胶质瘤本身具有高增殖性,高增殖带来的瘤体内部缺氧值得被重视。缺氧作为肿瘤细胞常见的一个微环境条件,在肿瘤的发生发展中的作用都是不可忽略的^[13-15]。无论体内还是体外,已经有很多研究探讨过右美对于胶质瘤在各种条件下的作用,尽管已经有研究探讨过HIF- α_1 和下游VEGF蛋白在不同浓度右美处理后的蛋白水平变化^[11],但是缺氧这个条件尚未被应用到右美对胶质瘤的作用模型中。我们的研究旨在探索在缺氧的条件下,右美对胶质瘤的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及其对信号通路的作用是否和常氧条件下的一致。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Cyclin D1、Cyclin A1、CDK2均购自美国GeneTex公司; Cyclin D1、p-AKT、AKT、cleaved-Caspase3、Bax、Bcl均购自美国CST公司; 胎牛血清购自美国GIBCO公司; HIF-1 α 、VEGF-A、MMP7均购自美国Proteintech公司; ERK1/2、p-ERK1/2、MMP9购自美国Bimake公司; CCK-8购自美国Biosharp公司; β -actin购自中国Servibio公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U87购自中国科学院细胞库/干细胞库。细胞在正常情况下用含有10%胎牛血清的DEME培养基培养,并置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养。400 μ mol/L的CoCl₂添加至培养基中诱导细胞达到缺氧状态。所有细胞长至80%密度时以1:3比例传代。

1.2.2 CCK-8测定细胞活力 将U87细胞消化,细胞计数,以3 000个/孔接种于96孔板中,缺氧组添加400 μ mol/L的CoCl₂,并设置右美梯度为0、5、10、20、40、80 μ mol/L,总培养体系为100 μ L/孔。于24、48、72 h的时间点向每孔加入10 μ L的CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C孵育2 h后用酶标仪在450 nm处测定吸光度D值。以不含细胞的培养基作为空白组,仅加右美组为对照组,细胞活力=(实验组D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)。

1.2.3 细胞周期测定 用50 μ mol/L的右美在常氧或CoCl₂诱导的缺氧条件下处理细胞48 h,消化细胞,

将细胞用PBS洗涤2次, 100 μL PBS重悬细胞, 缓缓加入300 μL 的无水乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜后流式送检。以PBS作为空白组, 以单 CoCl_2 为对照组1, 以单右美处理为对照组2, 右美和 CoCl_2 共处理为实验组。

1.2.4 细胞凋亡测定 用50 $\mu\text{mol/L}$ 的右美浓度在常氧或缺氧条件下处理细胞48 h, 胰酶消化细胞, 离心后PBS重悬洗涤细胞再离心, 再用PBS重悬后直接送检。以单 CoCl_2 为对照组1, 以单右美处理为对照组2, 以PBS作为空白组。

1.2.5 Western blot 将处理好的细胞用胰酶消化, 离心后弃上清, 将RIPA裂解液、PMSF和抗磷酸水解酶按100:1:1的比例配置并重悬细胞, 在冰上裂解20 min。混匀细胞和裂解液, 置于冷冻离心机中以13 300 r/min离心30 min, 取上清, BCA标准曲线法测得蛋白浓度, 加入1/4体积的蛋白上样缓冲液(5 $\times$), 混匀并在100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上变性5 min, 存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。使用前将所提取的蛋白置于冰上复温, 选择对应百分比的SDS胶, 按30 μg /孔上样, 上层胶80 V, 分离胶100 V。切取对应分子量胶块, 250 mA转至PVDF膜上, 5%的脱脂牛奶37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h, 按1:1 000的比例配置一抗, 将条带浸泡其中4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。隔夜取出条带, 洗涤后放入兔鼠二抗, 室温孵育30 min, 洗涤, ECL体系发光。

1.2.6 Transwell细胞迁移测定 将U87消化, 细胞计数后将细胞用DEME基础培养基配成 10^5 个/mL, 向每个小室上室加入200 μL 细胞悬液(2×10^4 个)。空白组加入等量PBS, 对照组1加入 CoCl_2 诱导缺氧, 对照组2加入右美50 $\mu\text{mol/L}$, 实验组以50 $\mu\text{mol/L}$ 的右美和 CoCl_2 共处理, 将培养液混匀后以600 μL /孔加入小室下室。迁移时间为24 h, 取出小室, 用PBS洗涤小室, 用棉签擦去上室细胞, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 洗涤后用结晶紫染液室温染色30 min, PBS洗净后自然干燥。将小室置于正置显微镜下拍照, 每个小室随机拍摄3个视野。

1.2.7 Transwell细胞侵袭测定 将细胞消化计数, 用基础培养基重悬成 2×10^5 个/mL, 并将基质胶和基础培养基以1:4比例混匀后铺于小室上室, 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h等待基质胶凝固。向每个小室上室加入200 μL 细胞悬液(4×10^4 个)。空白组加入等量PBS, 对照组1加入 CoCl_2 诱导缺氧, 对照组2加入右美50 $\mu\text{mol/L}$, 实验组以50 $\mu\text{mol/L}$ 的右美和 CoCl_2 共处理, 将培养液混匀后以600 μL /孔加入小室下室。迁移时间为48 h, 然后取出小室, 用PBS洗涤, 用棉签擦去上室细胞, 4%多

聚甲醛固定30 min, 洗涤后用结晶紫染液室温染色30 min, PBS洗净后自然干燥。将小室置于正置显微镜下拍照, 每个小室随机拍摄3个视野。

1.3 统计学分析

用Image J对Western blot条带进行灰度分析, 并对Transwell结果进行细胞计数。使用GraphPad Prism 6进行统计学分析。组间差异分析采用 t 检验进行分析。分析结果以 $\bar{x}\pm s$ 来表示。

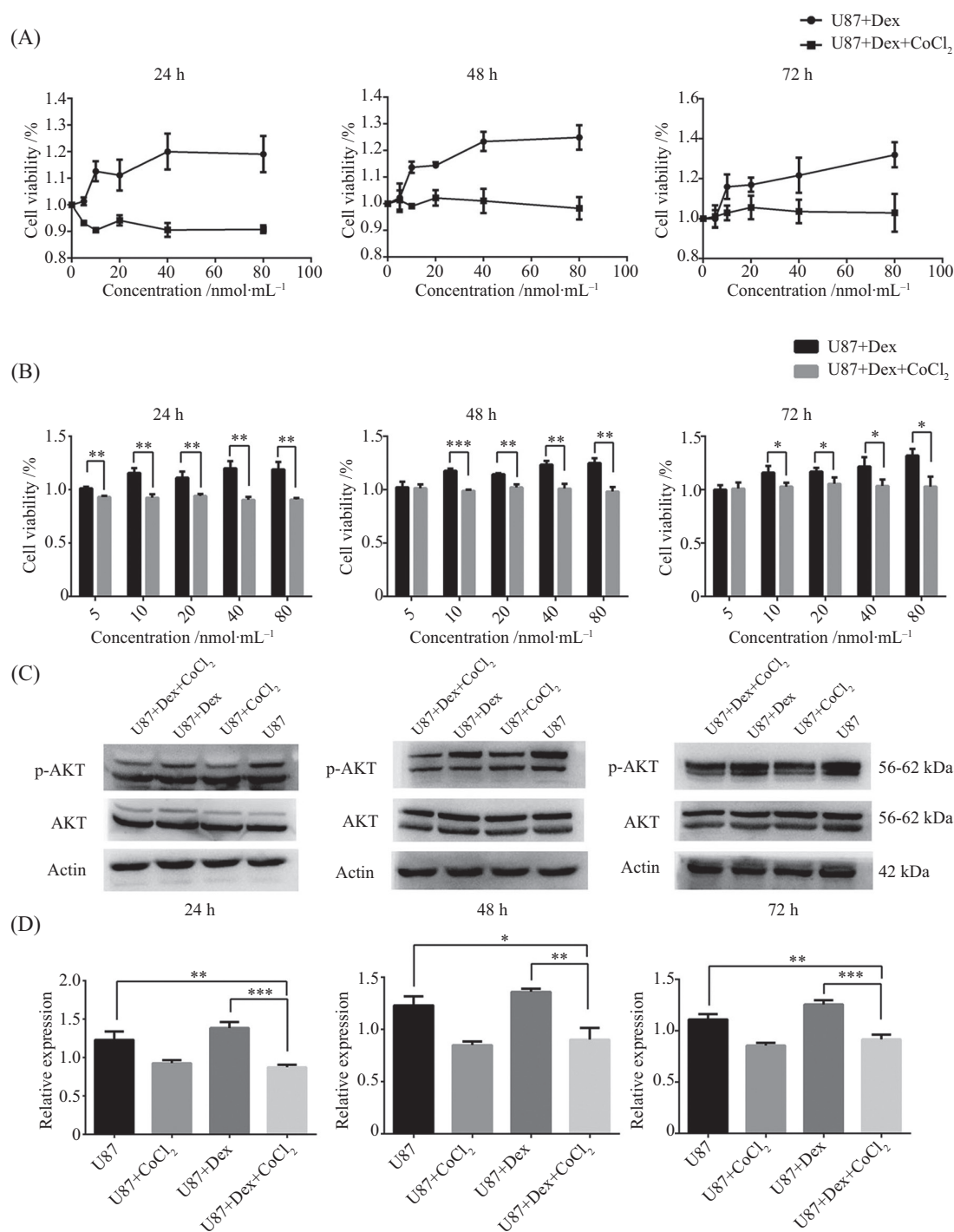
2 结果

2.1 右美呈剂量和时间依赖性促进U87的增殖, 缺氧处理部分阻断了该作用

CCK-8结果显示, 在0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的右美处理下, 细胞活力呈阶梯式增长。和既有文献所述不同的是, 我们并没有在50 $\mu\text{mol/L}$ 左右的作用浓度点发现细胞增殖能力的降低。即使是在80 $\mu\text{mol/L}$ 的右美作用下, 细胞增殖活力仍然上升。但是 CoCl_2 诱导缺氧的实验组细胞活力相对于单右美对照组出现明显的抑制($P<0.05$)。相对于PBS处理的空白组, 实验组细胞的增殖活力没有明显的上升($P>0.05$)。我们对PI3K/AKT通路进行了验证, 结果发现, 对照组中右美处理能够提高AKT的磷酸化水平($P<0.05$), 但是在缺氧条件下的右美处理后AKT的磷酸化水平降低($P<0.05$)。相对比PBS空白组, 缺氧单独处理后AKT的磷酸化水平也是降低的($P<0.05$)。这说明虽然在常氧条件下, 右美能够通过PI3K/AKT通路的活化促进胶质瘤细胞的增殖, 但是缺氧条件的存在部分阻断了PI3K/AKT通路的活化从而阻断了右美的促增殖作用(图1)。

2.2 右美促使胶质瘤细胞U87由S期进入G₂期, 缺氧处理减弱该作用

我们选取在常氧和缺氧条件下, 经右美(浓度为50 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h的U87细胞进行细胞周期分析, 结果显示, 缺氧处理使胶质瘤细胞停滞在S期, 阻止细胞从S期进入G₂期, 抑制细胞完成细胞周期($P<0.05$)。右美促进胶质瘤细胞由S期进入G₂期, 促进细胞周期进程($P<0.05$)。缺氧条件下的右美处理不仅抑制细胞从S期进入G₂期, 也抑制细胞由G₁期进入S期($P<0.05$)。为了探究此现象在细胞周期蛋白水平的变化, 我们对细胞周期相关蛋白进行了探索和验证, 结果显示, Cyclin A1和CDK2在右美处理后上升, 在缺氧条件下的右美处理后下降($P<0.05$)。在



A, B: CCK-8法测定在不同处理浓度和不同处理时长, 右美在常氧和缺氧条件下促进U87细胞增殖的情况; C, D: Western blot显示在24、48、72 h, AKT的磷酸化水平都能被CoCl₂诱导的缺氧部分抑制。n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005。

A, B: CCK-8 was used to determine the proliferation of U87 cells promoted by Dex under the conditions of normoxia and hypoxia at different treatment concentrations and for different treatment duration; C, D: Western blot showed phosphorylation of AKT was partially inhibited by CoCl₂-induced hypoxia at 24, 48 and 72 h. n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.005。

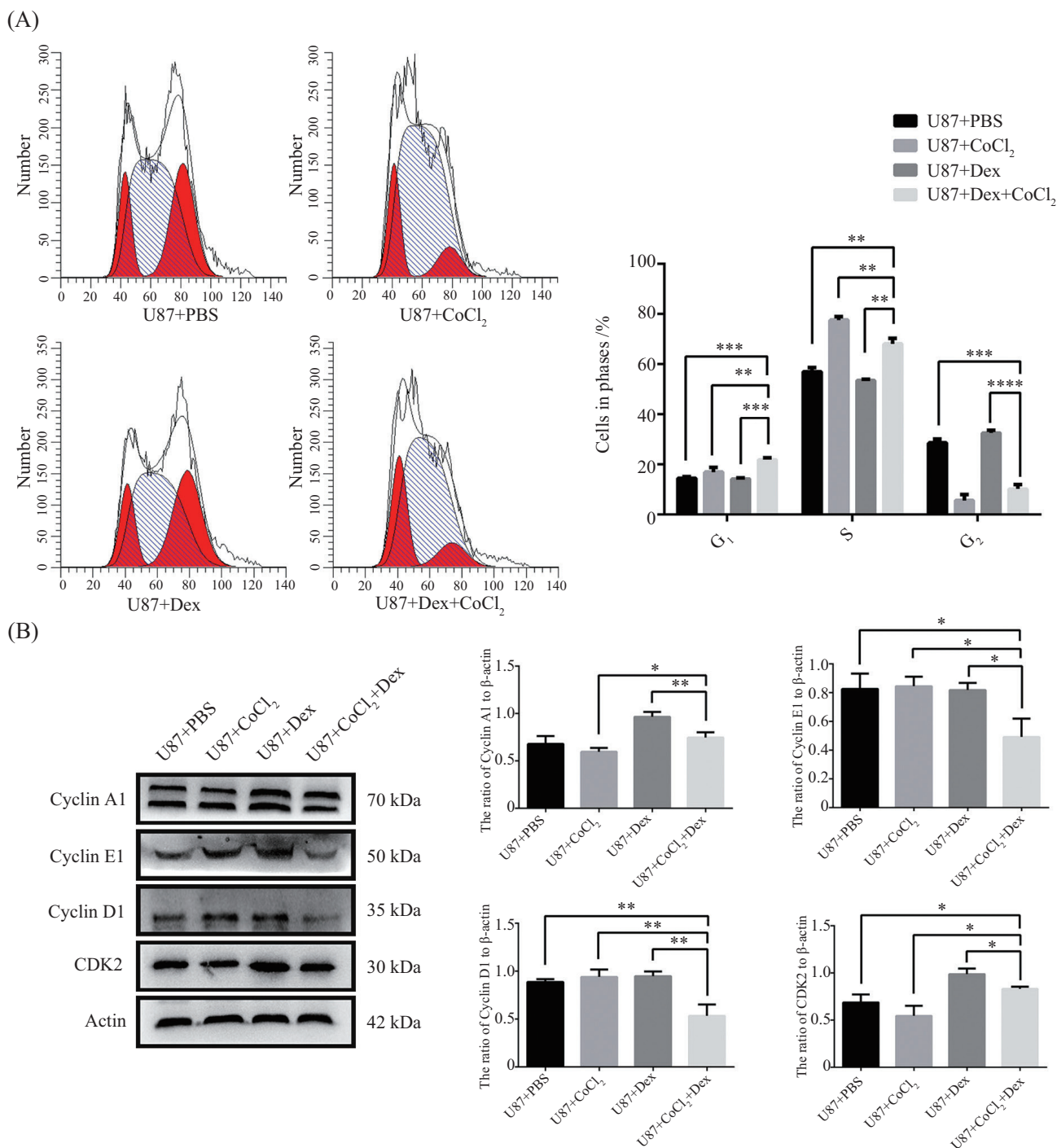
图1 常氧和缺氧条件下右美促进U87增殖情况以及AKT磷酸化水平变化

Fig.1 Dex promoted U87 proliferation and AKT phosphorylation under both hypoxic and hypoxic conditions

缺氧条件下经右美处理后Cyclin D1和Cyclin E1的表达水平下降(*P*<0.05)。我们选取PBS作为空白组(图2)。

2.3 右美抑制胶质瘤细胞U87的凋亡, 缺氧处理部分阻断该作用

我们将在缺氧和常氧条件下, 经50 μmol/L浓度



A: 在常氧和缺氧条件下, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美处理细胞48 h后得到的细胞周期图像; B: 在常氧和缺氧条件下, 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美处理细胞48 h后, Cyclin A1、Cyclin E1、Cyclin D1和CDK2的蛋白水平变化。PBS为空白组, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$ 。

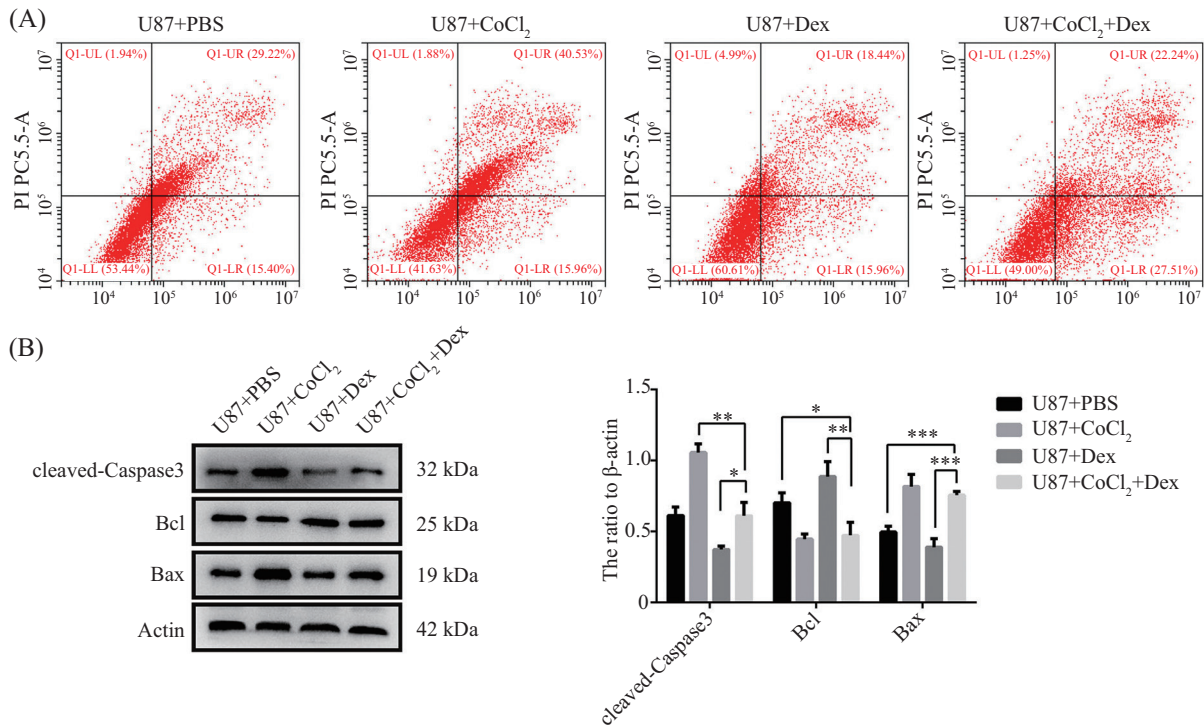
A: cell cycle images obtained by Dex-treated cells at 50 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h under normal and hypoxia conditions; B: protein levels of Cyclin A1, Cyclin E1, Cyclin D1 and CDK2 were changed 48 h after treatment with Dex at 50 $\mu\text{mol/L}$ under normal and hypoxia conditions. PBS was the blank group, $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$.

图2 常氧和缺氧条件下右美对U87周期的改变以及周期蛋白的变化

Fig.2 Changes of U87 cycle and cyclin induced by Dex under normal and hypoxia conditions

的右美处理48 h后的细胞进行流式凋亡分析, PBS作为空白组。结果显示, 仅缺氧处理促进U87的凋亡($P<0.05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 右美抑制U87的凋亡($P<0.05$), 但

是缺氧条件下, 右美的抑制凋亡作用减弱($P<0.05$)。我们检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl和cleaved-Caspase3的表达情况, 结果显示, 缺氧处理后Bax和cleaved-



A: 流式细胞术检测50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的右美在常氧和缺氧条件下对细胞凋亡的影响; B: Western blot检测右美在常氧和缺氧条件处理后凋亡相关蛋白的表达情况。 $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.005$ 。PBS作为空白组。

A: flow cytometry was used to detect the effect of Dex at concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$ on apoptosis under normal and hypoxia conditions; B: Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins of Dex under both normal and hypoxia conditions. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.005$. PBS was used as the blank group.

图3 常氧和缺氧条件下右美对U87细胞凋亡率的变化以及凋亡相关蛋白的改变

Fig.3 Changes of apoptosis rate and apoptosis related proteins of U87 cells induced by Dex under normal and hypoxia conditions

Caspase3表达升高, Bcl表达降低 ($P<0.05$), 右美处理后 Bax和cleaved-Caspase3表达降低, Bcl表达升高 ($P<0.05$)。相比右美处理组, 右美在缺氧条件下处理后 Bax和cleaved-Caspase3表达升高, Bcl表达降低 ($P<0.05$)。PBS作为空白组。这说明缺氧条件的存在部分阻断了右美对胶质瘤细胞U87的抗凋亡作用(图3)。

2.4 右美促进胶质瘤细胞U87迁移, 缺氧处理促进了该作用

Transwell实验通过使细胞迁移至小室下层并被染色观察到, 可以单位视野内细胞数量的多少来衡量细胞迁移能力的高低。我们结果显示, 胶质瘤细胞U87在右美以50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理24 h后, 迁移能力上升 ($P<0.05$), 但是在缺氧条件下, 和细胞增殖结果不一致的是, 在缺氧条件下细胞迁移能力进一步提高 ($P<0.05$)。考虑到右美促进细胞迁移主要是通过ERK1/2通路的磷酸化实现的, 我们对常氧和缺氧条件下右美处理胶质瘤细胞24 h后细胞ERK1/2磷酸化水平的变化进行了检测。结果发现, 在相比于常氧条件下, 缺氧条件下的右美处理

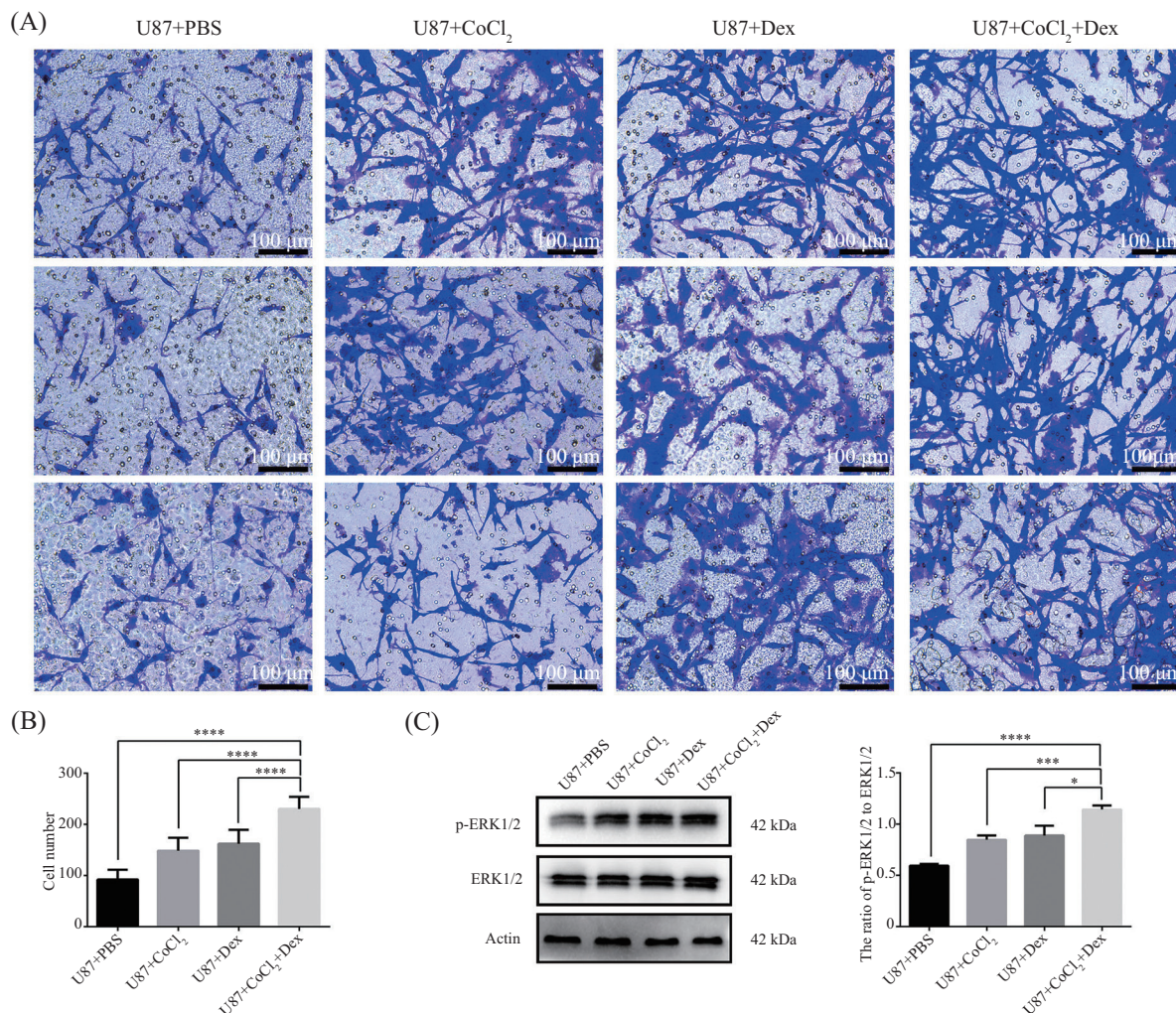
后ERK1/2磷酸化的水平提高更明显 ($P<0.05$)。同样的, 我们选取PBS作为空白组(图4)。

2.5 右美促进U87侵袭, 缺氧处理协同该作用

在侵袭能力方面, 我们所得出的结论和迁移能力基本一致。缺氧处理会协同右美作用促进胶质瘤细胞U87侵袭能力的提升 ($P<0.05$)。右美(50 $\mu\text{mol/L}$)处理U87细胞48 h后, U87细胞的迁移能力提升 ($P<0.05$), 缺氧和右美的共处理进一步提升细胞侵袭能力 ($P<0.05$), 并且我们观察到侵袭相关蛋白金属基质蛋白酶7(metallomatrix protease 7, MMP7)和金属基质蛋白酶9(metallomatrix protease 9, MMP9)的表达升高 ($P<0.05$)。此外, 我们研究表明, 在50 $\mu\text{mol/L}$ 的右美浓度处理胶质瘤细胞48 h, 缺氧和右美在同浓度处理后, 缺氧相关蛋白HIF-1 α 、VEGF表达也明显上升 ($P<0.05$)(图5)。

3 讨论

胶质瘤以其弥漫的侵袭性和高增长率成为中



A、B: Transwell法测定常氧和缺氧条件下, 右美(50 μmol/L)处理细胞24 h后细胞迁移情况, $n=3$; C: Western blot检测各组之间ERK1/2和p-ERK1/2的变化情况。* $P<0.05$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$ 。

A,B: transwell assay cell migration at 50 μmol/L of Dex under normoxic and anoxic conditions for 24 h, $n=3$; C: Western blot was used to detect the changes of ERK1/2 and p-ERK1/2 in each group. * $P<0.05$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$ 。

图4 常氧和缺氧条件下右美对U87细胞迁移能力的改变以及ERK1/2蛋白变化

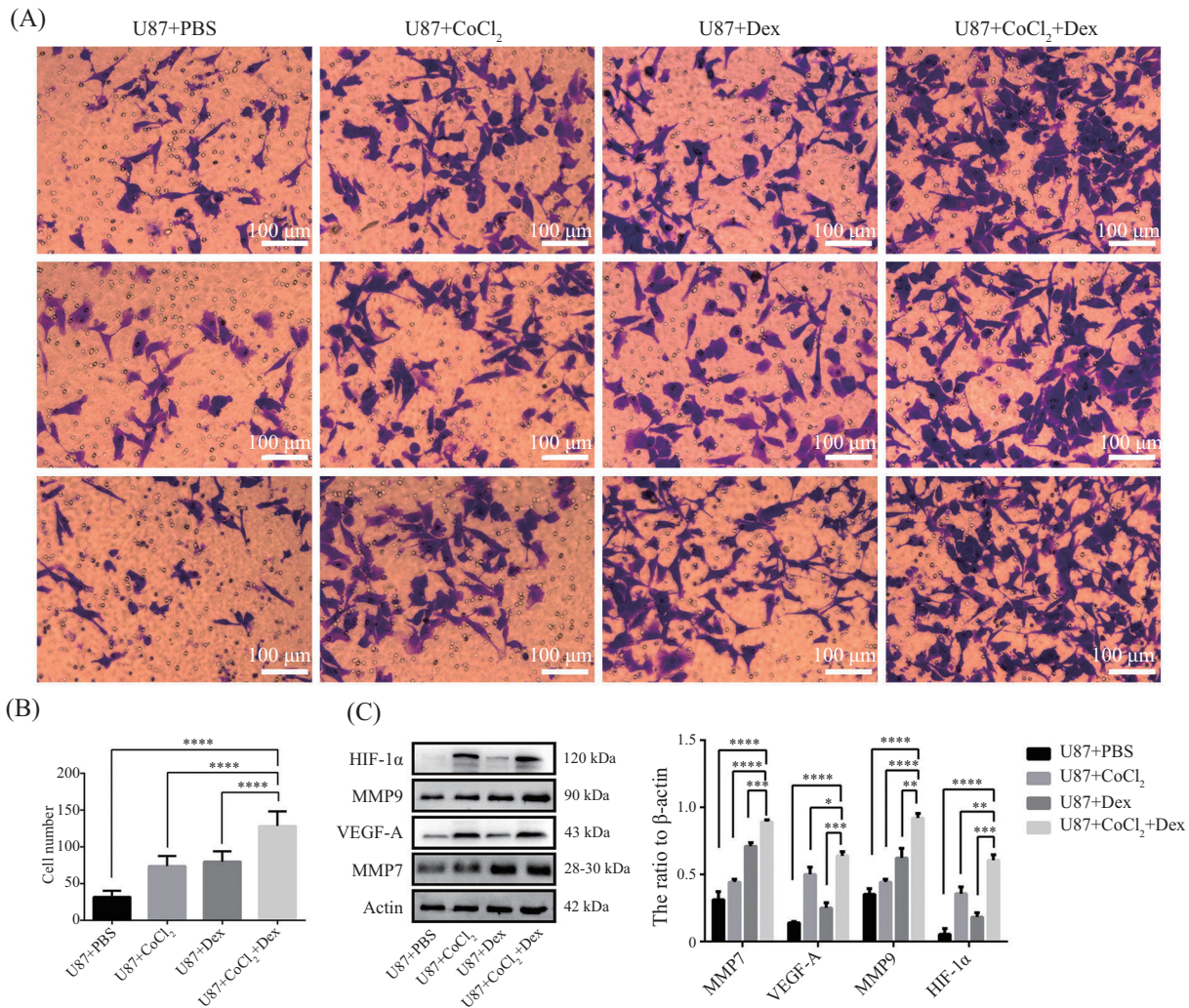
Fig.4 Changes of U87 cell migration ability and ERK1/2 protein induced by Dex under normoxic and anoxic conditions

中枢神经系统疾病的一个难题, 目前仍采用手术切除联合放化疗来控制胶质瘤生长和发展。在手术过程中的镇静、镇痛和手术创伤的影响下, 炎症和应激也会对肿瘤细胞产生生物学影响。右美有辅助麻醉作用和对脑细胞的保护作用, 被部分应用于胶质瘤的外科手术过程当中。但是近期研究却发现, 右美会促进胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 右美对胶质瘤细胞的生物学影响使手术切除的预后变得更加不容乐观。

胶质瘤具有高增长率, 由于瘤体内部的血管生成不能同步, 使得胶质瘤内部弥漫存在缺氧灶, 所以胶质瘤的病理生理特征里, 缺氧是不可或缺的。尽管之前的研究证明, 右美的应用对于神经系统具有

保护作用, 但是这个保护作用同样可以作用于胶质瘤细胞, 促进其增殖和迁移。这一研究结果让右美在术中的应用受到了一定限制。我们的研究将缺氧这个条件添加到右美处理胶质瘤细胞的模型中, 并选取了胶质瘤细胞系U87进行探索。我们的研究结果显示, 在缺氧条件下, 右美对胶质瘤细胞的促增殖作用受到明显的抑制, 相对于非右美处理组, U87的增殖率没有明显的提升, 对可能的机制进行研究后我们发现, 右美处理后PI3K/AKT通路磷酸化水平的升高被缺氧处理抑制了。

为了进一步了解右美对于胶质瘤细胞的促增殖作用, 我们将常氧和缺氧条件下50 μmol/L右美处理48 h后的U87细胞用流式细胞术进行周期分析,



A, B: Transwell法测定常氧和缺氧条件下, 50 μmol/L右美作用48 h后细胞侵袭的结果, $n=5$; C: Western blot测定常氧和缺氧条件下, 右美(50 μmol/L)处理U87细胞48 h后, HIF-1α、VEGF、MMP7和MMP9的表达变化, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$ 。

A, B: transwell assay results of cell invasion under normal and hypoxic conditions with 50 μmol/L Dexmedetomidine for 48 h, $n=5$; C: Western blot analysis of the expression changes of HIF-1, VEGF, MMP7 and MMP9 after treatment with dexmedetomidine (50 μmol/L) for 48 h, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, **** $P<0.001$ 。

图5 常氧和缺氧条件下右美对U87细胞侵袭能力的改变以及蛋白变化

Fig. 5 Changes of invasion ability and protein changes of U87 cells induced by Dex under normoxic and anoxic conditions

分析结果显示, 缺氧抑制细胞由S期进入G₂期, 右美促进细胞由S期进入G₂期, 都伴随着细胞周期蛋白Cyclin A1、CyclinD1、Cyclin E1和CDK2的相应表达差异。在右美和缺氧的共处理抑制胶质瘤细胞由S进入G₂期, 也出现了G₁期细胞百分比增多的情况。这表明右美和缺氧的共处理使细胞由G₁进入S期的能力也被抑制了。这说明缺氧处理可以抑制右美诱导的细胞周期进程推进, 进而抑制细胞增殖。缺氧条件下, 右美引起细胞周期阻滞的分子机制还需要进一步的探索。已有文献表明, 右美可以抑制细胞凋亡, 降低cleaved-Caspase3和Bax的表达, 增加Bcl1的表达。我们将缺氧条件引入后发现右美对细胞的

凋亡抑制作用也减弱, 相对于单右美处理, 细胞的凋亡率明显上升, 细胞的凋亡蛋白也出现一致的改变。有文献表明, 缺氧诱导产生的HIF-1α能够抑制细胞的凋亡, 但是我们在缺氧处理后验证了HIF-1α表达升高, 但是HIF-1α的表达和右美的共同作用却并没有抑制胶质瘤细胞的凋亡。

在胶质瘤细胞的迁移和侵袭方面我们却发现右美和缺氧的共同促进作用。文献表明, 缺氧能够通过各种通路途径促进肿瘤细胞的迁移和侵袭, 如提高ERK1/2的磷酸化水平以及MMP2、MMP7、MMP9的表达水平^[16]。我们的研究和已有文献有部分的一致: 右美能够促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭。但是在

我们的研究中,并未发现右美浓度达到50 $\mu\text{mol/L}$ 对胶质瘤细胞的迁移和侵袭出现抑制作用。在缺氧条件的存在下,胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力进一步提高了,ERK1/2的磷酸化水平和MMP7和MMP9的表达进一步升高。为何缺氧条件下右美对于胶质瘤细胞的不同生物学行为出现了正反两种作用还需要进一步的机制研究,特别是缺氧信号蛋白HIF以及其下游VEGF等信号通路的改变和相互作用。我们浅表地探索了HIF-1 α 和VEGF-A的表达发现,缺氧和右美在促进HIF-1 α 和VEGF-A的表达上有协同作用。右美能够诱导HIF-1 α 和VEGF-A的表达,而缺氧能够大量诱导HIF-1 α 和VEGF-A的表达,两者的共同作用更高地促进HIF-1 α 和VEGF-A的表达。HIF和VEGF在肿瘤细胞的生物学行为中的作用是非常广泛的,如敲除神经胶质瘤细胞中的HIF-1 α 可减少体外迁移和体内侵袭,并削弱其形成肿瘤球的能力^[17],HIF-1 α -shRNA在U87细胞中可有效抑制HIF-1 α mRNA和HIF-1 α 蛋白的表达,抑制U87细胞的侵袭和迁移^[18],ELTD1通过激活JAK/STAT3/HIF-1 α 信号轴促进神经胶质瘤的增殖、迁移和侵袭^[19],瓦巴因通过抑制Akt/mTOR信号通路和下调HIF-1 α 的表达来抑制神经胶质瘤U87MG细胞的生长和迁移^[20],miRNA-451通过靶向与CAB39相关的mTOR/HIF-1 α /VEGF信号通路抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭^[21]。外源精胺可通过抑制ERK1/2和PI3K/AKT相关途径来抑制化学诱导的低氧引起的人肺动脉平滑肌细胞的增殖^[22]。在细胞周期方面,也有文献表明,缺氧可以阻止P27、P21以及Cyclin D的表达,阻滞细胞周期,如HIF-1 α 消耗导致SP1介导的细胞周期阻滞,并提高细胞对化学治疗药物的反应性^[23],HIF-1 α 的缺氧依赖性积累可诱导滋养外胚层细胞瞬时细胞周期停滞^[24]。

综上所述,在缺氧条件的存在下,右美的促增殖作用和抗凋亡作用被阻断,PI3K/AKT通路的磷酸化被明显抑制。但是右美的促进迁移和侵袭作用进一步提高,相关的MAPK通路ERK1/2的磷酸化水平进一步提高。此外,MMP7、MMP9、HIF-1 α 、VEGF-A的表达水平也进一步提高。目前,我们的研究能够部分阐述缺氧条件下右美对于胶质瘤细胞的生物学行为的机制,但是仍有许多问题需要进一步解决。

参考文献 (References)

[1] OSTROM QT, GITTLEMAN H, STETSON L, et al. Epidemiol-

ogy of gliomas [J]. Cancer Treat Res, 2015, 163: 1-14.

[2] YANG P, WANG Y, PENG X, et al. Management and survival rates in patients with glioma in China (2004-2010): a retrospective study from a single-institution [J]. J Neurooncol, 2013, 113(2): 259-66.

[3] WANG L, PENG Y, PENG J, et al. Tramadol attenuates the sensitivity of glioblastoma to temozolomide through the suppression of Cx43-mediated gap junction intercellular communication [J]. Int J Oncol, 2018, 52(1): 295-304.

[4] ZHANG Y, WANG X, WANG Q, et al. Propofol depresses cisplatin cytotoxicity via the inhibition of gap junctions [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(6): 4715-50.

[5] HURMATH FK, MITTAL M, RAMASWAMY P, et al. Sevoflurane and thiopental preconditioning attenuates the migration and activity of MMP-2 in U87MG glioma cells [J]. Neurochem Int, 2016, 94: 32-8.

[6] WIGMORE TJ, MOHAMMED K, JHANJI S. Long-term survival for patients undergoing volatile versus IV anesthesia for cancer surgery: a retrospective analysis [J]. Anesthesiology, 2016, 124: 69-79.

[7] KAUR M, SINGH P M. Current role of dexmedetomidine in clinical anesthesia and intensive care [J]. Anesth Essays Res, 2011, 5: 128-33.

[8] LUO X, ZHENG X, HUANG H. Protective effects of dexmedetomidine on brain function of glioma patients undergoing craniotomy resection and its underlying mechanism [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2016, 146: 105-8.

[9] LAVON H, MATZNER P, BENBENISHTY A, et al. Dexmedetomidine promotes metastasis in rodent models of breast, lung, and colon cancers [J]. Br J Anaesth, 2018, 120(1): 188-96.

[10] YANG H, CHEN Y, YAN H, et al. Effects of dexmedetomidine on glioma cells in the presence or absence of cisplatin [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(1): 723-34.

[11] ZHANG F, DING T, YU L, et al. Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation-induced injury through the I2 imidazoline receptor-PI3K/AKT pathway in rat C6 glioma cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(1): 120-7.

[12] ZHENG H, WANG L, SUN B, et al. Oligomer procyanidins (F2) repress HIF-1 α expression in human U87 glioma cells by inhibiting the EGFR/AKT/mTOR and MAPK/ERK1/2 signaling pathways in vitro and in vivo [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85252-62.

[13] SONG Y, ZHENG S, WANG J, et al. Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion via PI3K/Akt signaling in glioma [J]. Oncotarget, 2017, 8(26): 41947-62.

[14] SHI H, ZHENG B, WU Y, et al. Ubiquitin ligase Siah1 promotes the migration and invasion of human glioma cells by regulating HIF-1 α signaling under hypoxia [J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1185-90.

[15] HUANG W, DING X, YE H, et al. Hypoxia enhances the migration and invasion of human glioblastoma U87 cells through PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway [J]. Neuroreport, 2018, 29(18): 1578-85.

[16] FUJIWARA S, NAKAGAWA K, HARADA H, et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1 α inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas [J]. Int J Oncol, 2007, 30(4): 793-802.

[17] MENDEZ O, ZABADIL J, ESENCAY M, et al. Knock down of

- HIF-1 α in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:133.
- [18] SHEN S, KWAN A, CHEN Y, et al. Effect of silencing HIF-1 α on proliferation, invasion and migration of glioblastoma U87 cells [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(3): 365-71.
- [19] LI J, SHEN J, WANG Z, et al. ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 α signaling axis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13904.
- [20] YANG X, XU Z, YI T, et al. Ouabain suppresses the growth and migration abilities of glioma U-87MG cells through inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway and downregulating the expression of HIF-1 α [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5595-600.
- [21] NAN Y, GUO H, GUO L, et al. MiRNA-451 inhibits glioma cell proliferation and invasion through the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway by targeting CAB39 [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2018, 29(3): 156-66.
- [22] WEI C, LI H, WANG Y, et al. Exogenous spermine inhibits the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells caused by chemically-induced hypoxia via the suppression of the ERK1/2- and PI3K/AKT-associated pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1): 39-46.
- [23] CULVER C, MELVIN A, MUDIE S, et al. HIF-1 α depletion results in SP1-mediated cell cycle disruption and alters the cellular response to chemotherapeutic drugs [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(8): 1249-60.
- [24] JEONG W, JUNG S, BAZER F, et al. Hypoxia-dependent accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α induces transient cell cycle arrest in porcine trophectoderm cells [J]. *Theriogenology*, 2018, 115: 9-15.