

瑞芬太尼调节Fas/FasL信号通路对食管癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

刘森¹ 席志龙² 李丽萍^{1*}

(¹南京大学医学院附属金陵医院麻醉科, 南京 210018; ²南京大学医学院附属金陵医院胸外科, 南京 210018)

摘要 该文旨在探究瑞芬太尼对食管癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响, 并分析其机制是否与脂肪酸合成酶(Fas)/脂肪酸合成酶配体(FasL)信号通路有关。该研究体外培养人食管癌细胞kyse30, 将细胞分为对照组, 瑞芬太尼低、中、高浓度组(10、20、40 nmol/L瑞芬太尼), 瑞芬太尼高浓度+sh-NC组, 瑞芬太尼高浓度+sh-Fas组。透射电镜观察细胞形态, 细胞活性、凋亡、迁移、侵袭及Fas/FasL信号通路相关蛋白检测分别采用CCK-8法、流式细胞术、划痕实验、Transwell法以及Western blot; 裸鼠移植瘤实验检测移植瘤体积和质量。结果显示, 对照组细胞质内粗面内质网及线粒体丰富; 瑞芬太尼低、中、高浓度组细胞体积缩小, 细胞核浓缩裂解、多个凋亡小体形成; 瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组细胞D值、侵袭细胞数、划痕愈合率以及Bcl-2、PCNA、N-cadherin、Vimentin蛋白水平降低, 细胞凋亡率以及Bax、Fas、FasL蛋白水平升高($P<0.05$); 瑞芬太尼高浓度+sh-Fas组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数以及PCNA、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin蛋白水平升高, 细胞凋亡率以及Bax、Fas、FasL蛋白水平降低($P<0.05$)。瑞芬太尼组相较于模型组肿瘤体积、质量降低($P<0.05$)。结果表明, 瑞芬太尼可抑制食管癌细胞增殖、侵袭, 诱导凋亡, 其机制可能与Fas/FasL信号通路的激活相关。

关键词 瑞芬太尼; Fas/FasL信号通路; 食管癌; 增殖; 凋亡; 侵袭

Impacts of Remifentanyl on the Proliferation, Apoptosis, and Invasion of Esophageal Cancer Cells by Regulating Fas/FasL Signaling Pathway

LIU Sen¹, XI Zhilong², LI Liping^{1*}

(¹Department of Anesthesiology, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210018, China;

²Department of Thoracic Surgery, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210018, China)

Abstract This study aims to investigate the impacts of remifentanyl on the proliferation, apoptosis, and invasion of esophageal cancer cells, and to analyze whether its mechanism is related to the Fas (fatty acid synthase)/FasL (fatty acid synthase ligand) signaling pathway. Human esophageal cancer cells kyse30 were cultured *in vitro* and assigned into control group, remifentanyl low, medium, and high concentration groups (10, 20, 40 nmol/L remifentanyl), remifentanyl high concentration+sh-NC group, and remifentanyl high concentration+sh-Fas group. The cell morphology was observed under the transmission electron microscope. Cell viability, apoptosis, migration, invasion, and the expression of proteins related to Fas/FasL signaling pathway were detected using CCK-8 assay, flow cytometry, scratch assay, Transwell assay, and Western blot, respectively. The volume and mass of the transplanted tumors were detected by the nude mouse xenograft experiment.

收稿日期: 2025-02-21

接受日期: 2025-06-17

黑龙江省中医药管理局科研项目(批准号: ZHY2024-080)资助的课题

*通信作者。Tel: 15305172360, E-mail: mzllp001@126.com

Received: February 21, 2025

Accepted: June 17, 2025

This work was supported by the Scientific Research Project of Heilongjiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.ZHY2024-080)

*Corresponding author. Tel: +86-15305172360, E-mail: mzllp001@126.com

The results showed that the rough endoplasmic reticulum and mitochondria were abundant in the cytoplasm in the control group. In the remifentanyl low, medium and high concentration groups, the cell volume shrank, the nucleus was concentrated and lysed, and multiple apoptotic bodies were formed. Compared with the control group, the remifentanyl low, medium, and high concentration groups showed a decrease in cell *D* value, number of invasive cells, scratch healing rate, and Bcl-2, PCNA, N-cadherin and Vimentin protein expression levels, and an raise in cell apoptosis rate, and Bax, Fas, and FasL protein expression levels ($P<0.05$). Compared with the remifentanyl high concentration group and the remifentanyl high concentration+sh-NC group, the remifentanyl high concentration+sh-Fas group showed an raise in cell *D* value, scratch healing rate, number of invasive cells, and PCNA, Bcl-2, Vimentin, N-cadherin protein expression levels, and a decrease in cell apoptosis rate, and Bax, Fas, and FasL protein expression levels ($P<0.05$). The tumor volume and mass in the remifentanyl group were lower than those in the model group ($P<0.05$). The results indicate that remifentanyl can inhibit the proliferation and invasion of esophageal cancer cells and induce their apoptosis. The mechanism may be related to the activation of the Fas/FasL signaling pathway.

Keywords remifentanyl; Fas/FasL signaling pathway; esophageal cancer; proliferation; apoptosis; invasion

食管癌是全球范围内较为常见且具有较强侵袭性的一类恶性肿瘤,其发病率呈现逐年攀升的趋势^[1]。2022年相关统计数据显示,全球食管癌新发病例数达到51.11万例,死亡数达44.54万例,在各类恶性肿瘤中其发病率位于第11位,死亡率位于第7位^[2]。相关预测显示,到2040年,全球食管癌的发病人数和死亡人数预计分别升至73.97万例和72.35万例^[3]。由于食管癌在早期难以察觉,且缺乏高效的筛查方式,患者易错过最佳治疗时机^[4]。当前,早期患者主要治疗方式为手术治疗,但中、晚期患者需结合放、化疗进行治疗,且其治疗效果不佳,5年生存率不足10%^[5]。所以,深入钻研食管癌的发生发展机理,在寻求有效治疗药物和改善患者预后方面意义重大。瑞芬太尼属于阿片类药物的一种,具有镇静、麻醉的作用,主要用于临床麻醉^[6]。过往研究表明,瑞芬太尼对多种癌症(如子宫内膜癌^[7]、肺癌^[8]等)的病情发展具有抑制作用。脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, Fas)和脂肪酸合成酶配体(fatty acid synthase ligand, FasL)均属于跨膜蛋白, FasL与Fas的结合具有高度的特异性。在细胞凋亡的进程中, Fas/FasL通路发挥至关重要的作用^[9]。据相关研究显示,在食管癌的进展中, Fas/FasL信号通路发挥重要作用^[10]。但瑞芬太尼是否可以通过调控 Fas/FasL信号通路影响食管癌细胞增殖、凋亡和侵袭尚不清楚。因此,本研究探究瑞芬太尼对食管癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响,分析其机制是否与Fas/FasL信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人食管癌细胞kyse30(深圳市豪地华拓生物科技有限公司,货号: HT-X1898)。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI1640培养基[攸碧艾(上海)生物技术有限公司,货号: U21-279B]; 瑞芬太尼(武汉人福药业有限责任公司,国药准字: H20030199); CCK-8试剂盒[和元李记(上海)生物技术有限公司,货号: AC11L053]; Annexin V-FITC/PI试剂盒(上海博尔森生物科技有限公司,货号: BE-S2AS0185); PCNA、Bax、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin、Fas、FasL、GAPDH一抗和IgG二抗(英国Abcam公司,货号: ab265609、ab263897、ab270252、ab316214、ab280375、ab178076、ab303666、ab313651、ab205718); CO₂细胞培养箱(德国Eppendorf公司,型号: CellXpert); 凝胶电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号: DYCZ-24EN); 流式细胞仪(美国ACEA Biosciences公司,型号: Novo Quanteon)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将kyse30细胞加入RPMI1640培养基(10% FBS+100 U/mL青霉素+100 μg/mL链霉素),并将样本置于培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养,细胞按照1:3的比例进行传代,用于后续实验。

1.2.2 细胞分组与处理 实验将细胞分为6组。(1)对照组:采用正常培养基对细胞进行常规培养;(2)瑞芬太尼低浓度组:细胞常规培养24 h后,转移到含有10 nmol/L瑞芬太尼的培养基中进行72 h培养(37 °C、5% CO₂)^[11];(3)瑞芬太尼中浓度组:细胞

常规培养24 h后, 转移到含有20 nmol/L瑞芬太尼的培养基中进行72 h培养(37 °C、5% CO₂)^[11]; (4) 瑞芬太尼高浓度组: 细胞常规培养24 h后, 转移到含有40 nmol/L瑞芬太尼的培养基中进行72 h培养(37 °C、5% CO₂)^[11]; (5) 瑞芬太尼高浓度+sh-NC组: 细胞常规培养24 h后, 转移到含有40 nmol/L瑞芬太尼的培养基中进行72 h培养(37 °C、5% CO₂), 同时转染短发卡RNA慢病毒阴性对照物; (6) 瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组: 细胞常规培养24 h后, 转移到含有40 nmol/L瑞芬太尼的培养基中进行72 h培养(37 °C、5% CO₂), 同时转染*Fas*短发卡RNA慢病毒。其中sh-NC序列为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'(正义链), 5'-AAG AGG CUU GCA CAG UGC AA-3'(反义链); sh-*Fas*序列为: 5'-GGA GUA CUG UCU GAA UCU UTT-3'(正义链), 5'-CUC ACU GAC AGA CUU AGA A-3'(反义链)。通过进行mRNA水平检测发现, sh-*Fas*组的*Fas* mRNA相对表达量低于sh-NC组, 表明sh-*Fas*慢病毒载体能够有效抑制*Fas*基因在mRNA水平的表达。

1.2.3 细胞活性检测 取各组培养的细胞接种到96孔板(5×10³/孔)中, 37 °C、5% CO₂条件下培养48 h后, 每孔添加10 μL CCK-8溶液, 继续培养2 h, 酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(*D*₄₅₀)值。

1.2.4 细胞形态观察 收集各组细胞并离心(4 °C、1 000 r/min、5 min), 在4%冷戊二醛液中4 °C固定2 h, 再用1%锇酸4 °C固定1 h, 乙醇梯度脱水(依次经30%、50%、70%、80%、90%、95%乙醇各脱水15 min, 最后用100%乙醇脱水2次, 每次15 min), 环氧树脂包埋, 然后用超薄切片机切成50 nm切片, 醋酸铀染液室温染色30 min, 清洗干燥之后, 用柠檬酸铅染液室温染色15 min, 清洗干燥后进行透射电镜观察。

1.2.5 细胞凋亡检测 收集各组kyse30细胞, PBS清洗, 4 °C、1 000 r/min离心5 min后用结合缓冲液重悬(1×10⁶/mL), 离心管中加入100 μL细胞悬液以及Annexin V-FITC和PI各5 μL对细胞进行室温避光染色10 min, 上流式细胞仪, 分析细胞凋亡率。

1.2.6 细胞迁移检测 收集细胞并接种于6孔板(5×10⁵/孔)中, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h, 待细胞铺满孔底后划线, 划线后继续置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h。观察0 h、24 h划痕情况, 计算划痕愈合率。划痕愈合率=[(0 h划痕宽度-24 h划

痕宽度)/0 h划痕宽度]×100%。

1.2.7 细胞侵袭检测 Transwell上室加入基质胶, 收集细胞添加于Transwell上室(100 μL, 3×10⁵/mL), Transwell下室加培养液(500 μL), 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 0.1%结晶紫染液室温避光染色20 min。观察并记录细胞侵袭数。

1.2.8 细胞增殖、凋亡、迁移和Fas/FasL信号通路相关蛋白检测 收集各组细胞, 加入RIPA裂解液, 4 °C、12 000 r/min离心20 min, BCA法测定蛋白含量, 每孔取20 μg样本行SDS-PAGE电泳分离, 4 °C条件下300 mA恒流转膜90 min、5%脱脂奶粉封闭120 min。将膜与稀释后的PCNA(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、Fas(1:1 000)、FasL(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)一抗在4 °C条件下过夜孵育, 之后加入二抗(1:5 000), 室温孵育2 h。Image Lab™定量蛋白条带。

1.2.9 移植瘤体积和质量检测 收集细胞制成5×10⁶/mL的细胞悬液, 每只裸鼠于右腋下接种0.1 mL细胞悬液, 当肿瘤直径为0.5 cm时, 选取20只符合条件的移植瘤裸鼠, 分为模型组和瑞芬太尼组(各10只), 瑞芬太尼组皮下注射5 mg/kg瑞芬太尼, 模型组将瑞芬太尼换为生理盐水, 1天/次, 共注射21天。最后一次给药24 h后, 处死裸鼠获取肿瘤组织, 测量肿瘤组织长径(*a*)和短径(*b*), 计算肿瘤体积(肿瘤体积=1/2×*a*×*b*²), 并称量肿瘤质量。本研究经南京大学医学院附属金陵医院动物伦理委员会批准(批准号: JL2024013)。

1.2.10 数据统计与分析 数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 利用SPSS 25.0软件进行分析, 两组间比较用*t*检验, 多组比较用单因素方差分析, 多组间两两比较用SNK-*q*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞芬太尼降低kyse30细胞活性

瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组细胞*D*值降低(*P*<0.05); 瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组细胞*D*值增加(*P*<0.05)(图1)。

2.2 瑞芬太尼对kyse30细胞形态的影响

对照组细胞质内粗面内质网及线粒体丰富; 瑞

芬太尼低、中、高浓度组细胞体积缩小,细胞核浓缩裂解、多个凋亡小体形成;瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组较瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组凋亡小体形成有所减少(图2)。

2.3 瑞芬太尼促进kyse30细胞凋亡

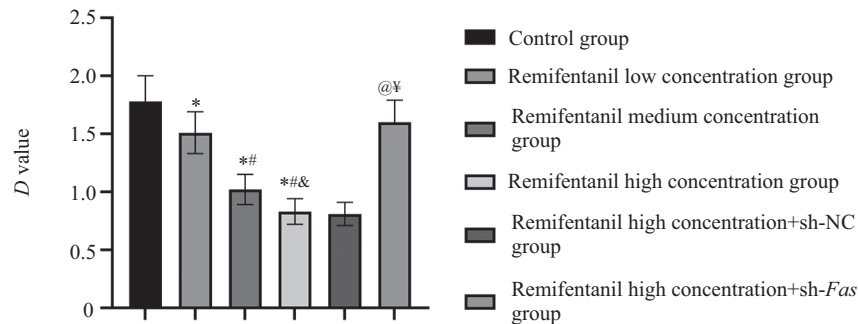
瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组细胞凋亡率升高($P<0.05$);瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组细胞凋亡率降低($P<0.05$)(图3和图4)。

2.4 瑞芬太尼抑制kyse30细胞迁移

瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组划痕愈合率降低($P<0.05$);瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组划痕愈合率升高($P<0.05$)(图5和图6)。

2.5 瑞芬太尼抑制kyse30细胞侵袭

瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组侵袭细胞数下降($P<0.05$);瑞芬太尼高浓度+sh-*Fas*组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬太尼高浓度+sh-NC组



* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与瑞芬太尼低浓度组相比; & $P<0.05$, 与瑞芬太尼中浓度组相比; @ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度组相比; ¥ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度+sh-NC组相比。n=6。

* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with remifentanyl low concentration group; & $P<0.05$ compared with remifentanyl medium concentration group; @ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration group; ¥ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration+sh-NC group. n=6.

图1 瑞芬太尼降低kyse30细胞活性

Fig.1 Remifentanyl reduces the activity of kyse30 cells

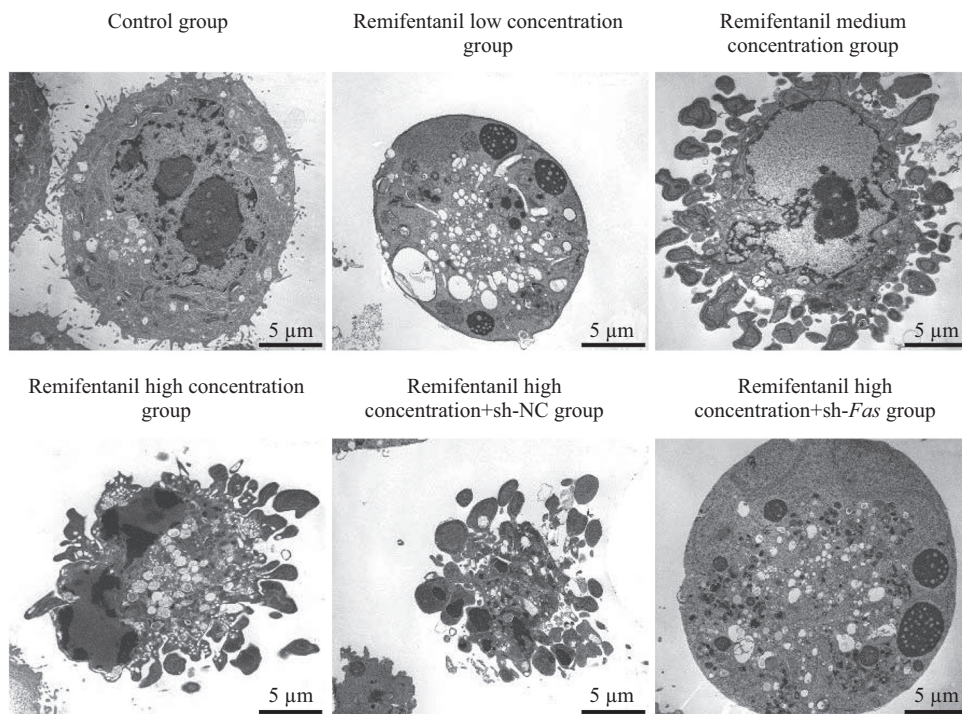


图2 透射电镜观察细胞形态

Fig.2 Transmission electron microscopy is used to observe the cell morphology

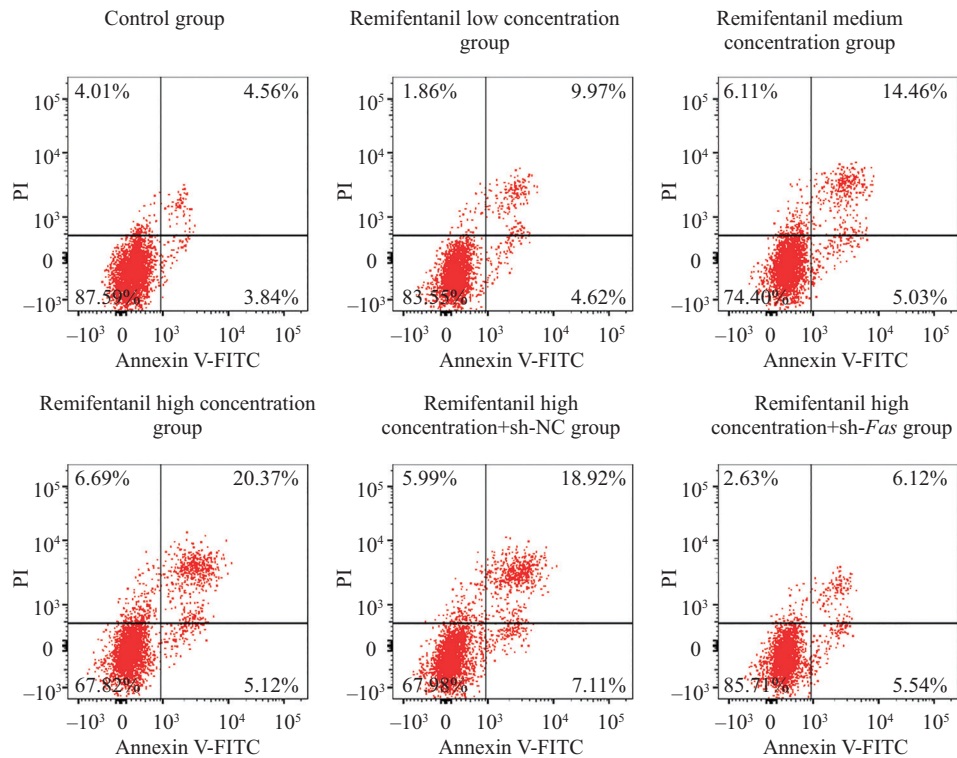
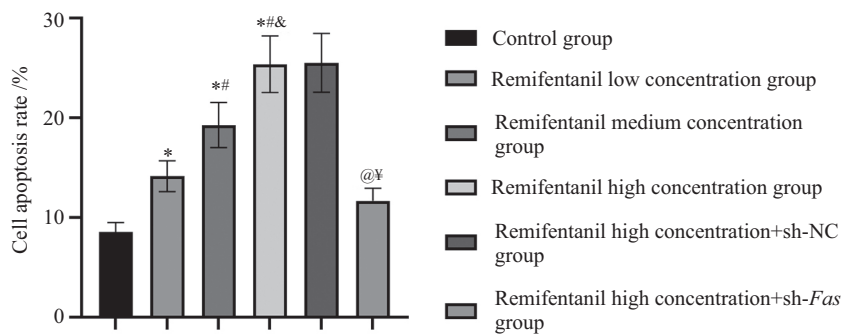


图3 流式细胞术检测细胞凋亡情况
Fig.3 Flow cytometry is used to detect cell apoptosis



* $P<0.05$, 与对照组相比; ** $P<0.05$, 与瑞芬太尼低浓度组相比; *** $P<0.05$, 与瑞芬太尼中浓度组相比; @ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度组相比; ¥ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度+sh-NC组相比。n=6。
* $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with remifentanyl low concentration group; *** $P<0.05$ compared with remifentanyl medium concentration group; @ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration group; ¥ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration+sh-NC group. n=6.

图4 瑞芬太尼促进kyse30细胞凋亡
Fig.4 Remifentanyl promotes apoptosis of kyse30 cells

侵袭细胞数增加($P<0.05$)(图7和图8)。
2.6 瑞芬太尼对kyse30细胞增殖、凋亡、迁移和Fas/FasL信号通路相关蛋白表达的影响
瑞芬太尼低、中、高浓度组相较于对照组Bax、Fas、FasL蛋白水平升高, PCNA、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin蛋白水平降低($P<0.05$); 瑞芬太尼高浓度+sh-Fas组相较于瑞芬太尼高浓度组、瑞芬

太尼高浓度+sh-NC组Bax、Fas、FasL蛋白水平降低, PCNA、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin蛋白水平升高($P<0.05$)(图9和图10)。
2.7 瑞芬太尼对裸鼠移植瘤体积和质量的影响
与模型组相比, 瑞芬太尼处理组的裸鼠移植瘤呈现出明显变化: 肿瘤体积显著缩小, 同时肿瘤质量也明显降低($P<0.05$)(表1和图11)。

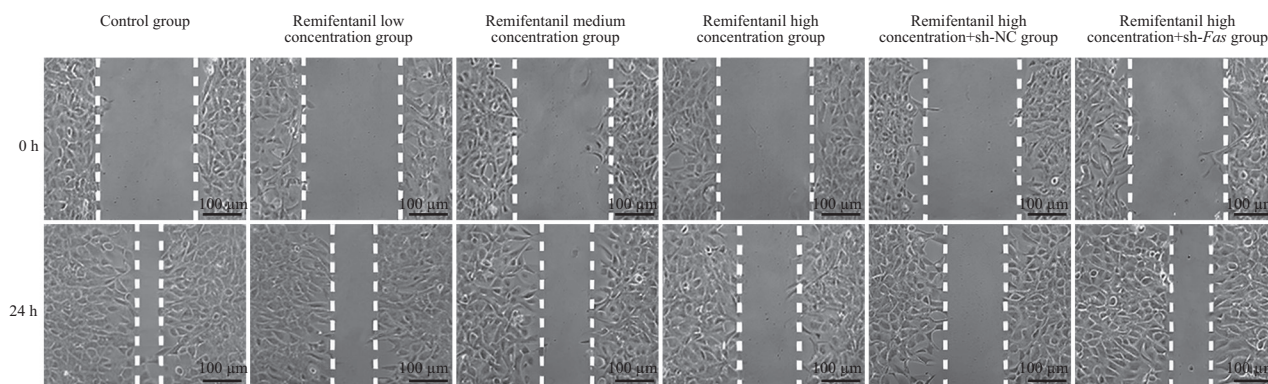
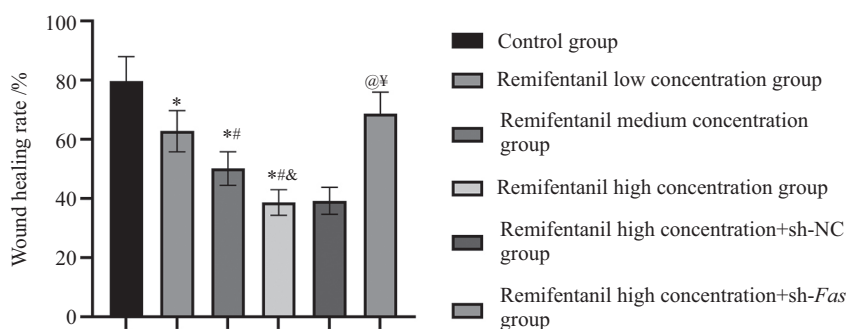


图5 各组kyse30细胞的迁移能力

Fig.5 The migration ability of kyse30 cells in each group



* $P < 0.05$, 与对照组相比; ** $P < 0.05$, 与瑞芬太尼低浓度组相比; * $P < 0.05$, 与瑞芬太尼中浓度组相比; @ $P < 0.05$, 与瑞芬太尼高浓度组相比; # $P < 0.05$, 与瑞芬太尼高浓度+sh-NC组相比。n=6。

* $P < 0.05$ compared with control group; ** $P < 0.05$ compared with remifentanyl low concentration group; * $P < 0.05$ compared with remifentanyl medium concentration group; @ $P < 0.05$ compared with remifentanyl high concentration group; # $P < 0.05$ compared with remifentanyl high concentration+sh-NC group. n=6.

图6 瑞芬太尼抑制kyse30细胞迁移

Fig.6 Remifentanyl inhibits the migration of kyse30 cells

3 讨论

目前,关于食管癌的发病机制并不清晰,但一般认为其影响因素包括人口老龄化、饮食习惯以及遗传环境等^[12]。目前,食管癌的治疗方式包括放疗、免疫治疗以及手术等,但仍存在复发率高、治疗效果不佳等问题^[13]。因此,积极寻找食管癌的有效治疗药物十分重要。

研究发现,瑞芬太尼除用于镇静麻醉外,还在抗肿瘤方面发挥重要作用。已有报道显示,瑞芬太尼对肝癌细胞的增殖起抑制作用,同时可诱导细胞凋亡的发生^[14]。唐婧英等^[7]研究结果显示,在子宫内膜癌的治疗中,瑞芬太尼可通过调控miR-212-3p/LIN28B轴,进而抑制癌细胞增殖、迁移及侵袭。研究发现,瑞芬太尼可通过降低lncRNA SUMO1P3的表达水平,有效抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[15]。综合上述研究结果表明,瑞芬太尼对多种癌症的进展过程有影响。在肿瘤的研究中,多种关键分子可对肿瘤细胞的

行为产生重要影响,研究发现,PCNA在DNA复制过程中有着关键作用,是DNA聚合酶的辅助因子,并且能够反应细胞的增殖状态^[16]。细胞凋亡属于程序性细胞死亡,当其出现异常时会造成肿瘤的进展,其中Bcl-2和Bax在细胞凋亡中扮演着重要角色,分别发挥抗凋亡和促凋亡效能^[17]。肿瘤细胞的迁移和侵袭是患者预后不良的主要因素,研究发现,当癌细胞发生转移时,N-cadherin蛋白表达水平会升高^[18]。Vimentin与肿瘤细胞的迁移、侵袭紧密相连,是间质细胞特有的微丝蛋白^[19]。以上分子PCNA、Bcl-2、Bax、N-cadherin、Vimentin从不同层面影响肿瘤的恶性生物学行为,共同参与肿瘤进展过程。与瑞芬太尼类似,丙泊酚、七氟醚是临床常用麻醉药,且已被证实具有抗肿瘤潜力。丙泊酚主要通过调控PI3K/AKT等通路,抑制肺癌等多种肿瘤细胞的恶性生物学行为^[20]。七氟醚通过调控VEGF/VEGFR2通路,影响子宫内膜癌细胞恶性表型,且可抑制肿瘤血管生成^[21]。不同麻醉

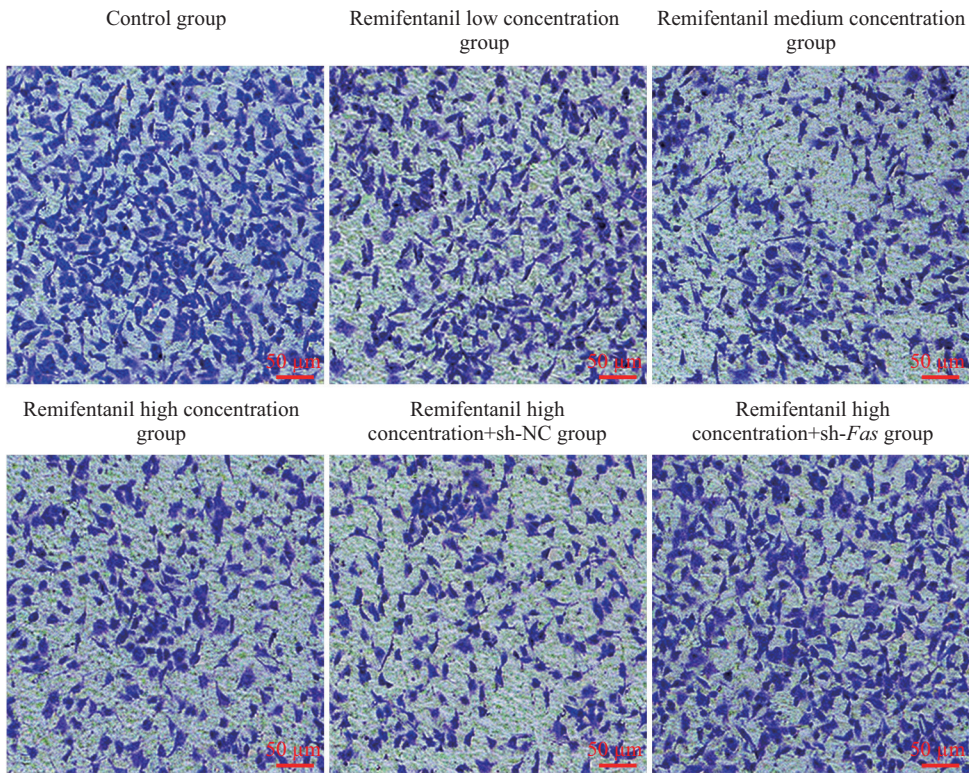
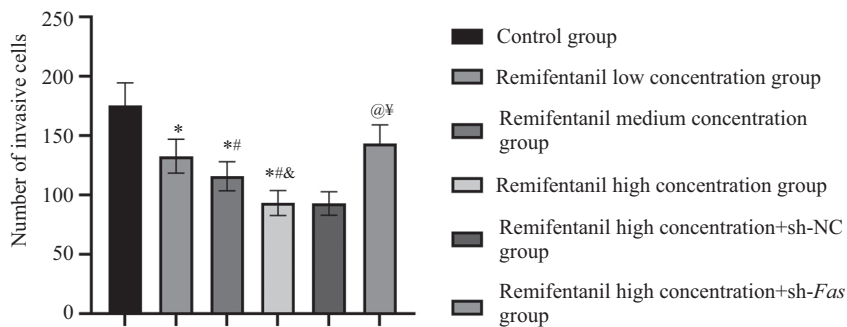


图7 各组kyse30细胞的侵袭能力

Fig.7 The invasive ability of kyse30 cells in each group



* $P<0.05$, 与对照组相比; ** $P<0.05$, 与瑞芬太尼低浓度组相比; & $P<0.05$, 与瑞芬太尼中浓度组相比; @ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度组相比; ¥ $P<0.05$, 与瑞芬太尼高浓度+sh-NC组相比。 $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with control group; ** $P<0.05$ compared with remifentanyl low concentration group; & $P<0.05$ compared with remifentanyl medium concentration group; @ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration group; ¥ $P<0.05$ compared with remifentanyl high concentration+sh-NC group. $n=6$.

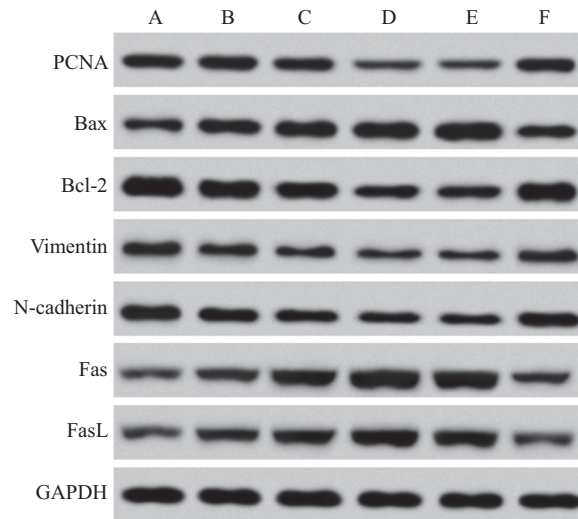
图8 瑞芬太尼抑制kyse30细胞侵袭

Fig.8 Remifentanyl inhibits the invasion of kyse30 cells

药物可能通过不同的分子机制参与肿瘤调控。相较于二者,本研究通过透射电镜观察到瑞芬太尼能够有效抑制食管癌细胞增殖,进一步采用不同浓度的瑞芬太尼对细胞予以处理后,细胞凋亡率以及Bax蛋白水平升高,而D值、划痕愈合率、侵袭细胞数以及PCNA、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin蛋白水平降低,这意味着瑞芬太尼具有抑制食管癌细胞增殖、迁移、

侵袭以及促进其凋亡的作用。本研究中的裸鼠移植瘤实验显示,与模型组相比较,瑞芬太尼组肿瘤体积减小、肿瘤质量降低,说明瑞芬太尼可以抑制肿瘤细胞生长。

Fas属于肿瘤坏死受体家族,广泛分布于多种组织器官中,FasL可与Fas结合,参与细胞凋亡过程^[22]。多项研究表明,辣椒素对胃癌细胞凋亡的促进作用

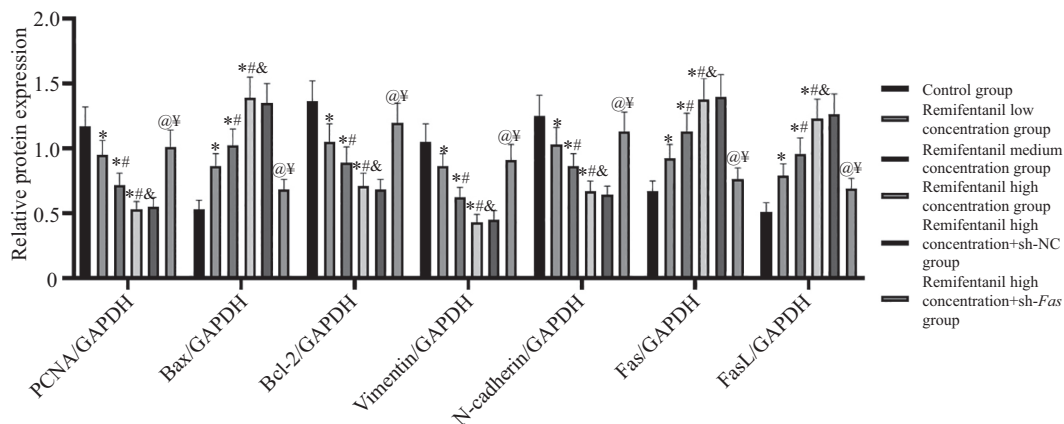


A: 对照组; B: 瑞芬太尼低浓度组; C: 瑞芬太尼中浓度组; D: 瑞芬太尼高浓度组; E: 瑞芬太尼高浓度+sh-NC组; F: 瑞芬太尼高浓度+sh-Fas组。

A: control group; B: remifentanyl low concentration group; C: remifentanyl medium concentration group; D: remifentanyl high concentration group; E: remifentanyl high concentration+sh-NC group; G: remifentanyl high concentration+sh-Fas group.

图9 Western blot检测蛋白表达情况

Fig.9 Western blot is used to detect protein expression



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与瑞芬太尼低浓度组相比; & $P < 0.05$, 与瑞芬太尼中浓度组相比; @ $P < 0.05$, 与瑞芬太尼高浓度组相比; ¥ $P < 0.05$, 与瑞芬太尼高浓度+sh-NC组相比。 $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with remifentanyl low concentration group; & $P < 0.05$ compared with remifentanyl medium concentration group; @ $P < 0.05$ compared with remifentanyl high concentration group; ¥ $P < 0.05$ compared with remifentanyl high concentration+sh-NC group. $n=6$.

图10 各组kyse30细胞蛋白水平

Fig.10 The protein levels of kyse30 cells in each group

表1 瑞芬太尼影响裸鼠移植瘤肿瘤体积和质量

Table 1 Remifentanyl affects the tumor volume and weight of transplanted tumors in nude mice

组别 Groups	肿瘤体积/ mm^3 Tumor volume / mm^3	肿瘤质量/g Tumor weight / g
Model group	761.23±79.52	1.03±0.12
Remifentanyl group	514.37±54.60*	0.59±0.07*

* $P < 0.05$, 与模型组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n=10$ 。

* $P < 0.05$ compared with model group. $\bar{x} \pm s$, $n=10$.

是通过激活 Fas/FasL 通路实现的^[23]。李雨颖等^[24]研究指出, 激活 Fas/FasL 通路, 可促进卵巢癌细胞凋亡。本研究借助 Western blot 实验观察到, 在瑞芬太尼的

作用下, Fas、FasL 蛋白表达水平呈现上升趋势, 意味着瑞芬太尼具有激活 Fas/FasL 通路的能力。本研究在进行瑞芬太尼处理的基础上, 同时对 Fas 进行沉

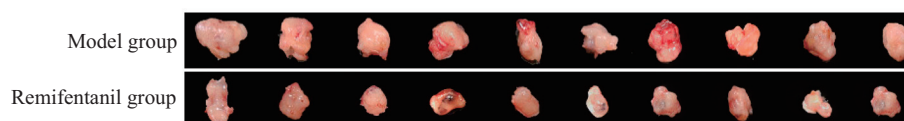


图11 裸鼠移植瘤观察

Fig.11 Observation of transplanted tumors in nude mice

默处理发现, 细胞凋亡率以及Bax、Fas、FasL蛋白水平降低, 细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数以及PCNA、Bcl-2、Vimentin、N-cadherin蛋白水平增加, 表明瑞芬太尼对食管癌增殖、侵袭的抑制以及对其凋亡的促进可能是通过激活Fas/FasL信号通路实现的。

综上所述, 瑞芬太尼可能通过激活Fas/FasL通路, 实现对食管癌细胞增殖与侵袭的抑制, 以及对其凋亡的促进。但当前研究局限于细胞层面实验探索, 为深入探究其具体机制, 后续将设计体内实验加以验证。

参考文献 (References)

- [1] XUN J, MA Y, WANG B, et al. RGS1 targeted by miR-191-3p inhibited the stemness properties of esophageal cancer cells by suppressing CXCR4/PI3K/AKT signaling [J]. *Acta Histochem*, 2024, 126(7): 152190-8.
- [2] TENG Y, XIA C, CAO M, et al. Esophageal cancer global burden profiles, trends, and contributors [J]. *Cancer Biol Med*, 2024, 21(8): 656-66.
- [3] LIU C Q, MA Y L, QIN Q, et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040 [J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(1): 3-11.
- [4] JING Z, CHEN K, GONG L. The significance of exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of esophageal cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16(1): 6115-27.
- [5] 倪峰, 徐健, 邵国梅, 等. 复方苦参注射液联合放疗治疗老年中晚期食管癌临床疗效及对患者血清CEA、CA199及CA50水平的影响[J]. *湖北中医药大学学报*(NI F, XU J, TAI G M, et al. Therapeutic effect of compound injection combined with radiotherapy on advanced esophageal cancer in the elderly and its effect on serum CEA, CA199 and CA50 levels [J]. *Journal of Hubei University of Chinese Medicine*), 2022, 24(1): 38-41.
- [6] 杨定, 田毅, 田国刚. 预防瑞芬太尼诱发术后痛觉过敏的处理措施[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*(YANG D, TIAN Y, TIAN G G. Measures for preventing postoperative hyperalgesia induced by remifentanyl [J]. *International Journal of Anesthesiology and Resuscitation*), 2018, 39(8): 784-8.
- [7] 唐婧英, 李选发, 邓小华, 等. 瑞芬太尼通过调控miR-212-3p/LIN28B表达影响子宫内癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *中国老年学杂志*(TANG J Y, LI X F, DENG X H, et al. Remifentanyl affects the proliferation, migration and invasion of endometrial cancer cells by regulating the expression of miR-212-3p/LIN28B [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2021, 41(23): 5370-5.
- [8] 王豆豆, 张明明, 周彬. 瑞芬太尼调节AKT/GSK-3 β /Snail信号通路对肺癌细胞增殖、凋亡和上皮间质转化的影响[J]. *临床肺科杂志*(WANG D D, ZHANG M M, ZHOU B. Impacts of remifentanyl on the proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transformation of lung cancer cells by regulating AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*), 2025, 30(1): 98-103.
- [9] MAO M G, XU J, LIU R T, et al. Fas/FasL of pacific cod mediated apoptosis [J]. *Dev Comp Immunol*, 2021, 119(1): 104022-9.
- [10] 纪昕, 王崇, 李洁, 等. 淫羊藿苷通过增强Fas-FasL表达活性诱导裸鼠食管癌细胞凋亡[J]. *重庆医学*(JI X, WANG C, LI J, et al. Icarin induces apoptosis of esophageal cancer cell through enhancing Fas-FasL expression activity [J]. *Chongqing Medicine*), 2016, 45(12): 1608-11.
- [11] 文竹, 李军, 何洁. 瑞芬太尼调控Linc00462/miR-2355-5p对肾癌细胞生物学行为的影响[J]. *重庆医学*(WEN Z, LI J, HE J. Effects of remifentanyl on the biological behavior of renal cancer cells by regulating Linc00462/miR-2355-5p [J]. *Chongqing Medicine*), 2022, 51(7): 1093-9.
- [12] MORGAN E, SOERJOMATARAM I, RUMGAY H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020 [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(3): 649-58.
- [13] YAO J, ZHAO X, CHEN J, et al. Treatment strategies for elderly patients with locally advanced esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 1101-8.
- [14] 夏德国, 颜克实, 陆大浩, 等. 瑞芬太尼抑制人肝癌细胞Notch信号通路及细胞生长的研究[J]. *实用临床医药杂志*(XIA D G, YAN K S, LU D H, et al. Study on remifentanyl inhibiting Notch signal pathway and cell growth of human hepatocarcinoma cells [J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*), 2022, 26(8): 32-6.
- [15] 赵铤, 赵全丰, 李坤庆, 等. 瑞芬太尼通过调控lncRNA SUMO1P3表达抑制肾癌细胞786-O的增殖、迁移和侵袭[J]. *山西医科大学报*(ZHANG T, ZHAO Q F, LI K Q, et al. Remifentanyl inhibits proliferation, migration and invasion of renal cancer cells 786-O by regulating the expression of lncRNA SUMO1P3 [J]. *Journal of Shanxi Medical University*), 2021, 52(11): 1396-402.
- [16] QIN Z, BAI Z, SUN Y, et al. PCNA-Ub polyubiquitination inhibits cell proliferation and induces cell-cycle checkpoints [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(24): 3390-401.
- [17] KLIMENTOVA E A, SUCHKOV I A, SHCHULKIN A V, et al. Expression of apoptotic markers Bcl-2 and Bax in the vascular wall [J]. *Sovrem Tekhnologii Med*, 2021, 13(2): 46-50.
- [18] GAO M, LAI K, DENG Y, et al. Eriocitrin inhibits epithelial-mesenchymal transformation (EMT) in lung adenocarcinoma cells via triggering ferroptosis [J]. *Aging*, 2023, 15(19): 10089-104.
- [19] WAN G, LIU Y, ZHU J, et al. SLFN5 suppresses cancer cell

- migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway [J]. *Cell Signal*, 2019, 59(1): 1-12.
- [20] 谢圆媛, 胡海峰, 赵莉, 等. 丙泊酚调控PI3K/AKT信号通路对肺癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. *临床误诊误治* (XIE Y Y, HU H F, ZHAO L, et al. Effects of propofol regulating PI3K/AKT signaling pathway on proliferation, migration and apoptosis of lung cancer cells [J]. *Clinical Misdiagnosis & Mistherapy*), 2021, 34(6): 107-12.
- [21] 李正凯, 冯玉, 冯锋, 等. 七氟醚调节VEGF/VEGFR2信号通路对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡和血管生成的影响[J]. *中国计划生育学杂志* (LI Z K, FENG Y, FENG F, et al. Impact of the signaling pathway of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor 2 regulated by sevoflurane on the proliferation, apoptosis, and angiogenesis of the endometrial cancer cells [J]. *Chin J Fam Plann*), 2023, 31(8): 1777-82.
- [22] MASUDA A, ISOBE Y, SUGIMOTO K, et al. Efficient recruitment of c-FLIPL to the death-inducing signaling complex leads to Fas resistance in natural killer-cell lymphoma [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(3): 807-16.
- [23] 宋文龙, 汪建军. 辣椒素通过Fas/FasL死亡受体通路诱导胃癌细胞发生凋亡的研究[J]. *实用中医内科杂志* (SONG W L, WANG J J. Apoptosis of gastric cancer cells induced by capsaicin through Fas/FasL death receptor pathway [J]. *Journal of Practical Traditional Chinese Internal Medicine*), 2021, 35(5): 129-32.
- [24] 李雨颖, 邵喜英, 金莉婷, 等. 川楝素通过Fas/FasL信号通路诱导人卵巢癌细胞凋亡[J]. *中国中西医结合杂志* (LI Y Y, SHAO X Y, JIN L T, et al. Apoptosis of ovarian cancer cells induced by Toosendanin through Fas/FasL signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*), 2019, 39(9): 1089-94.