

利多卡因调节PINK1/Parkin信号通路对胃肠间质瘤细胞伊马替尼耐药性的影响

王长勇¹ 陈威龙^{1*} 李龙浩²

(¹重庆市梁平区人民医院肿瘤科, 重庆 405200; ²重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016)

摘要 该文探讨利多卡因(LIC)调节PTEN诱导激酶1(PINK1)/Parkin信号通路对胃肠间质瘤(GIST)细胞伊马替尼耐药性的影响。体外培养GIST细胞(GIST-T1), 并利用伊马替尼诱导产生耐药性GIST-T1细胞。将耐药性GIST-T1细胞随机分成NC组(0 $\mu\text{mol/L}$ LIC处理)、LIC低剂量组(500 $\mu\text{mol/L}$ LIC处理)、LIC中剂量组(750 $\mu\text{mol/L}$ LIC处理)、LIC高剂量组(1 000 $\mu\text{mol/L}$ LIC处理)、T0467组(1 000 $\mu\text{mol/L}$ LIC+5 $\mu\text{mol/L}$ PINK1/Parkin信号通路激活剂T0467), 选取正常GIST-T1细胞为GIST-T1组(即对照组)。采用MTT法检测细胞活力; 克隆形成实验检测细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; 划痕和Transwell实验检测细胞迁移、侵袭情况; JC-1法检测线粒体膜电位; DCFH-DA检测试剂盒检测活性氧(ROS)含量; Western blot检测自噬相关蛋白[细胞微管相关蛋白1轻链3II/I(LC3II/I)、苡氯素1(Beclin-1)]以及PINK1/Parkin信号通路蛋白表达情况。裸鼠致瘤实验观察LIC对伊马替尼耐药性胃肠间质瘤细胞移植瘤的影响。与GIST-T1组相比, NC组细胞凋亡率、ROS、存活率、迁移率、侵袭数、线粒体膜电位以及LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin表达水平无统计学差异($P>0.05$); 与NC组相比, LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组凋亡率、ROS水平均升高($P<0.05$), 存活率、迁移率、侵袭数、线粒体膜电位以及LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin水平均降低($P<0.05$); 与LIC高剂量组相比, T0467组凋亡率、ROS含量均降低($P<0.05$), 存活率、迁移率、侵袭数、线粒体膜电位以及LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin表达水平均升高($P<0.05$)。裸鼠移植瘤结果显示, LIC组裸鼠移植瘤生长速度较慢, 移植瘤体积和质量减少, LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。LIC可增强GIST-T1细胞对伊马替尼的敏感性, 可能与抑制PINK1/Parkin信号通路有关。

关键词 利多卡因; PTEN诱导激酶1/Parkin; 胃肠间质瘤细胞; 伊马替尼耐药性

Effect of Lidocaine on Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumor Cells by Regulating PINK1/Parkin Signaling Pathway

WANG Changyong¹, CHEN Weilong^{1*}, LI Longhao²

(¹Department of Oncology, Liangping District People's Hospital, Chongqing 405200, China;

²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This study was to explore the effect of LIC (lidocaine) on imatinib resistance in GIST (gastro-intestinal stromal tumor) cells by regulating PINK1 (PTEN induced putative kinase 1)/Parkin signaling pathway. GIST cells (GIST-T1) were cultured *in vitro* and treated with imatinib to induce drug resistant cells. Drug resistant

收稿日期: 2025-07-09

接受日期: 2025-08-07

重庆市自然科学基金(批准号: CSTB2024NSCQ-MSX0159)资助的课题

*通信作者。Tel: 13668489510, E-mail: 2470929330@qq.com

Received: July 9, 2025

Accepted: August 7, 2025

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTB2024NSCQ-MSX0159)

*Corresponding author. Tel: +86-13668489510, E-mail: 2470929330@qq.com

GIST-T1 cells were randomly assigned into NC group (0 $\mu\text{mol/L}$ LIC treatment), LIC low-dose group (500 $\mu\text{mol/L}$ LIC treatment), LIC medium-dose group (750 $\mu\text{mol/L}$ LIC treatment), LIC high-dose group (1 000 $\mu\text{mol/L}$ LIC treatment), and T0467 group (1 000 $\mu\text{mol/L}$ LIC+5 $\mu\text{mol/L}$ PINK1/Parkin signaling pathway activator T0467). Normal GIST-T1 cells were selected as GIST-T1 group (control group). MTT assay was performed to detect cell viability. Clone formation experiment was performed to measure cell proliferation. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis. Scratch experiment and Transwell experiment were used to measure cell migration and invasion. The JC-1 method was used to detect mitochondrial membrane potential. DCFH-DA detection kit was used to detect ROS (reactive oxygen species). Western blot was used to measure autophagy related proteins (LC3II/I, Beclin-1) and PINK1/Parkin signaling pathway proteins. Compared with GIST-T1 group, there was no significant difference in apoptosis rate, ROS, survival rate, migration rate, invasion number, mitochondrial membrane potential, and the level of LC3II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin in NC group ($P>0.05$). Compared with the NC group, the LIC low-dose group, LIC medium-dose group, and LIC high-dose group showed an increase in apoptosis rate and ROS ($P<0.05$), and a decrease in survival rate, migration rate, invasion number, mitochondrial membrane potential, LC3II/I, Beclin-1, PINK1, and Parkin ($P<0.05$). Compared with the LIC high-dose group, the T0467 group showed a decrease in apoptosis rate and ROS ($P<0.05$), and an increase in survival rate, migration rate, invasion number, mitochondrial membrane potential, LC3II/I, Beclin-1, PINK1, and Parkin ($P<0.05$). The results of nude mice transplanted tumors showed that the growth rate of nude mice transplanted tumors in the LIC group was slower, the volume and mass of transplanted tumors were reduced, and the expression of LC3 II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin protein was decreased ($P<0.05$). LIC can enhance the sensitivity of GIST-T1 cells to imatinib, which may be related to the inhibition of PINK1/Parkin signaling pathway.

Keywords lidocaine; PTEN induced putative kinase 1/Parkin; gastrointestinal stromal tumor cells; imatinib resistance

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)是胃肠道最常见的间叶性肿瘤,主要来源于Cajal间质细胞或其前体细胞,伴有广泛的淋巴结和骨骼转移^[1-2]。Cajal间质细胞是胃肠道中的起搏细胞,主要负责调节胃肠道蠕动^[3]。GIST多发于中老年人,最常见于胃,其次是小肠,其治疗方式主要是手术切除,辅以靶向治疗^[4]。大多数GIST中KIT或血小板衍生生长因子 α (platelet-derived growth factor α , PDGFR α)突变是致癌驱动因素^[5]。伊马替尼是一种KIT和PDGFR α 酪氨酸激酶抑制剂,用于GIST一线治疗,使用后可产生初始肿瘤反应和疾病控制^[6]。然而,伊马替尼长时间的应用,会导致GIST细胞产生耐药性,不利于GIST治疗。目前关于伊马替尼耐药GIST的治疗药物包括舒尼替尼、瑞派替尼,但仍存在局限性。因此,亟需深入研究新的药物或治疗靶点,降低GIST细胞的耐药性,提高GIST患者生存预后。利多卡因(lidocaine, LIC)属于一种局部麻醉药和抗心率失常药,广泛用于术后疼痛和恢复^[7]。LIC的主

要作用机制是阻断电压门控钠通道(voltage-gated sodium channels, VGSCs), VGSCs在电兴奋细胞的生理中起着重要作用,促进动作电位的上升,被认为是LIC的主要药理靶点。已有研究发现LIC能够通过下调miR-10b表达,降低胃癌细胞顺铂耐药性^[8]。PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)属于线粒体靶向的丝氨酸/苏氨酸激酶,主要定位于线粒体外膜,对线粒体质量至关重要^[9]。Parkin是一种E3泛素连接酶,在正常情况下分布于细胞质,但在PINK1的调控下可被招募到线粒体上^[10]。PINK1/Parkin信号通路主要参与清除受损或功能异常的线粒体,即线粒体自噬^[11]。有研究表明PINK1/Parkin依赖性线粒体自噬促进胃癌顺铂耐药^[12]。然而, LIC是否能够通过调节PINK1/Parkin信号通路对伊马替尼耐药性GIST细胞产生影响却未见报道。本研究以GIST-T1细胞为研究对象,构建伊马替尼耐药细胞,深入探究LIC调节PINK1/Parkin信号通路对GIST-T1细胞伊马替尼耐药性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂及仪器

GIST-T1细胞(货号: STM-CL-5520)购自思泰默上海生物科技有限公司; 伊马替尼购自安庆奇创药业有限公司; PINK1/Parkin信号通路激活剂T0467(货号: GC63669)购自上海宏叶生物科技有限公司; MTT试剂盒(货号: A600799)购自上海生工生物工程股份有限公司; JC-1线粒体膜电位检测试剂盒、DCFH-DA活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光探针(货号: J6004S、D1002)购自优逸兰迪生物科技有限公司; 抗体细胞微管相关蛋白1轻链3II/I(microtubule-associated protein 1 light chain 3II/I, LC3II/I)、苋氯素1(Beclin-1)、PINK1、Parkin、GAPDH、HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(货号: 14600-1-AP、11306-1-AP、23274-1-AP、14060-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 荧光显微镜(型号: WSF400)购自广州微域光学仪器有限公司; 酶标仪(型号: Infinite® 200 PRO)购自恩科生物科技有限公司; 流式细胞仪(型号: EVA)购自成都棱镜泰克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 制备伊马替尼耐药性GIST-T1细胞 GIST-T1细胞在DMEM培养基中培养, 培养基中含10%血清和1%双抗。细胞在恒温37℃、5% CO₂的培养箱中过夜培养, 传代处理。按照秦龙等^[13]的文献方法制备伊马替尼耐药性GIST-T1细胞。使用浓度25 μmol/L的伊马替尼处理细胞, 48 h更换新培养基, 继续培养, 重复操作至GIST-T1细胞能够在含25 μmol/L的伊马替尼培养液中正常生长, 然后将伊马替尼浓度再增加至37.5 μmol/L培养, 最终将伊马替尼浓度增加到50 μmol/L, 且细胞能正常生长, 与此同时检测伊马替尼耐药性GIST-T1细胞的半数抑制浓度, 当其高于野生型GIST-T1细胞时, 提示伊马替尼耐药性GIST-T1细胞成功制备。

1.2.2 LIC浓度的筛选 为了研究不同浓度LIC对GIST-T1细胞的影响, 设置6个不同浓度LIC药物处理组: 0、250、500、750、1 000、1 250 μmol/L。细胞在含不同浓度LIC的DMEM完全培养基中处理48 h, 将MTT试剂加入细胞培养基孵育细胞, 使用酶标仪在450 nm波长下检测吸光度值, 绘制标准曲线, 根据标准曲线计算细胞存活率。为了探讨LIC对伊马替尼耐药性GIST-T1细胞株的影响, 通过上述不同

浓度处理后, 观察细胞存活率。

1.2.3 细胞分组 将伊马替尼耐药性GIST-T1细胞随机分为5个实验组: NC组(0 μmol/L LIC处理, 作为对照)、LIC低剂量组(500 μmol/L LIC处理)、LIC中剂量组(750 μmol/L LIC处理)、LIC高剂量组(1 000 μmol/L LIC处理)、T0467组(1 000 μmol/L LIC+5 μmol/L PINK1/Parkin信号通路激活剂T0467^[14])。

1.2.4 细胞增殖能力的检测 将各组细胞悬液分别按每孔2×10⁴/mL和5×10⁵/mL接种至96孔板和6孔板中。接种过程中, 需轻轻混匀, 以确保细胞均匀分布于孔板底部。96孔板主要用于细胞存活率检测, 6孔板则用于克隆形成实验。接种完成后, 继续培养细胞。将CCK-8试剂加入96孔板, 按说明书进行孵育, 使用酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度值, 记录数据并分析存活率。在6孔板中, 当肉眼可见克隆团时, 停止培养。PBS清洗细胞后, 加入多聚甲醛室温固定细胞30 min, 然后加入结晶紫染色进行室温下染色处理20 min。清洗后, 在显微镜下观察, 并计算克隆数。

1.2.5 细胞迁移能力的检测 将制备好的细胞悬液均匀铺于6孔板中, 接着把细胞置于适宜的环境(恒温37℃、5% CO₂)下继续培养, 取用200 μL的无菌枪头垂直于培养皿底部, 进行划线操作。划线完成后, 使用PBS清洗细胞, 继续在培养箱中培养。在0 h和24 h时, 将培养皿放置于倒置显微镜下观察划痕区域细胞状态, 使用ImageJ软件进行分析细胞的迁移率。

1.2.6 细胞侵袭能力的检测 将预先配制好的基质胶与无血清DMEM培养基充分混合, 并均匀加入Transwell上室。同时在Transwell下室加入含10%血清的DMEM培养基。将细胞悬液以每孔5×10⁵/mL均匀铺至Transwell上室, 继续培养细胞24 h, 然后取出Transwell小室, 使用专门的4%多聚甲醛固定液对细胞进行固定处理30 min(室温), 再使用结晶紫染液对细胞进行染色20 min(室温), 于显微镜下观察细胞的侵袭情况。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡能力和ROS水平 将各组细胞通过胰酶37℃消化3 min后, 制成细胞悬液, 分成两部分, 一部分用于细胞凋亡能力的检测, 一部分用于ROS水平检测。使用凋亡试剂盒和DCFH-DA ROS荧光探针分别处理对应的细胞悬液,

实验步骤严格按照说明书操作,并通过流式细胞仪分析细胞凋亡和ROS水平。

1.2.8 线粒体膜电位的检测 将各组细胞以每孔 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 均匀铺至24孔板,在恒温 37°C 、含5% CO_2 浓度的培养箱中培养过夜,每孔加入JC-1工作液,室温避光孵育1 h, PBS清洗细胞3次,每次5 min,然后使用胰酶消化细胞(37°C 消化3 min),将其制成细胞悬液。最后于倒置显微镜下观察各组细胞的荧光表达情况。

1.2.9 自噬以及PINK1/Parkin信号通路相关蛋白检测 将各组细胞悬液1 mL中加入含蛋白酶抑制剂的裂解液,充分混合确保细胞完全裂解。随后,将裂解液以1 500 r/min (4°C)离心15 min,取上清液为总蛋白。使用定量试剂盒对总蛋白浓度进行检测。采用试剂盒制备分离胶和浓缩胶,根据计算的上样量上样,电泳分离。电泳完成后,将蛋白转移至膜上,无蛋白快速封闭液室温封闭30 min, TBST洗膜。与一抗LC3II/I(1:1 000)、Beclin-1(1:1 000)、PINK1(1:1 000)、Parkin(1:1 000)以及GAPDH(1:2 000)进行过夜孵育(4°C)。随后, TBST清洗膜后,室温继续孵育二抗(1:3 000) 1 h。最后在膜上滴加发光液,在凝胶成像系统下拍照,并使用图像分析软件分析并计算各组蛋白表达量。

1.2.10 裸鼠致瘤试验 实验用6周龄BALB/c裸鼠(体质量18~22 g)均购自武汉云克隆动物有限公司[许可证号: SCXK(鄂)2023-0021],在SPF环境中适应性饲养7天,实验通过重庆市梁平区人民医院动物伦理委员会审查(批准号: 202503-17)。选取处于对数生长期的伊马替尼耐药性GIST-T1细胞,使用PBS缓冲液调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,将10 μL 伊马替尼耐药性GIST-T1细胞悬液注射至小鼠右前肢腋下皮下组织,持续监测肿瘤生长情况,待肿瘤体积达

到30 mm^3 时进行分组干预。将裸鼠随机分为Control组和LIC组,每组各6只,其中LIC组每周2次注射30 mg/kg LIC^[15], Control组以同样方式注射等量生理盐水。使用游标卡尺每周测量肿瘤长径和短径,计算体积。28天后安乐死小鼠,称量肿瘤湿质量,检测移植瘤LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达情况。

1.3 统计学分析

本研究采用SPSS Statistics 26.0软件进行统计学分析。所有实验数据均经过正态性检验,符合正态分布的计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行多组间比较。对于两组间比较,选用SNK-*q*检验,设定显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 LIC浓度的确定

250、500、750、1 000、1 250 $\mu\text{mol/L}$ LIC与0 $\mu\text{mol/L}$ LIC处理的GIST-T1细胞相比,存活率无统计学意义($P > 0.05$)(表1),说明LIC对细胞没有杀伤作用。进一步通过上述浓度继续处理伊马替尼诱导耐药性GIST-T1细胞,发现随着LIC浓度升高,细胞存活率降低($P < 0.05$)(表2),其半数抑制浓度(IC_{50})值为1 087.56 $\mu\text{mol/L}$ 。基于研究结果,将500、750、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作为LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组的处理浓度。

2.2 LIC对各组细胞增殖的影响

NC组与GIST-T1组相比,细胞存活率、克隆形成数无明显变化($P > 0.05$); LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组与NC组相比,细胞存活率、克隆形成数降低($P < 0.05$); T0467组与LIC高剂量组相比,细胞存活率、克隆形成数升高($P < 0.05$)。见表3和图1。

表1 LIC对GIST-T1细胞存活的影响
Table 1 Effects of LIC on survival of GIST-T1 cells

LIC / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/% Survival rate /%
0	99.17 $\pm$ 0.83
250	98.69 $\pm$ 1.31
500	99.58 $\pm$ 0.42
750	97.86 $\pm$ 2.14
1 000	99.63 $\pm$ 0.37
1 250	98.27 $\pm$ 1.73

$n=6$, $\bar{x} \pm s$.

表2 LIC对伊马替尼耐药性的GIST-T1细胞存活的影响
Table 2 Effects of LIC on the survival of imatinib resistant GIST-T1 cells

LIC / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/% Survival rate /%
0	99.17 $\pm$ 0.83
250	89.52 $\pm$ 6.84*
500	80.37 $\pm$ 5.45*
750	70.49 $\pm$ 6.83*
1 000	50.78 $\pm$ 5.26*
1 250	37.36 $\pm$ 6.12*

* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

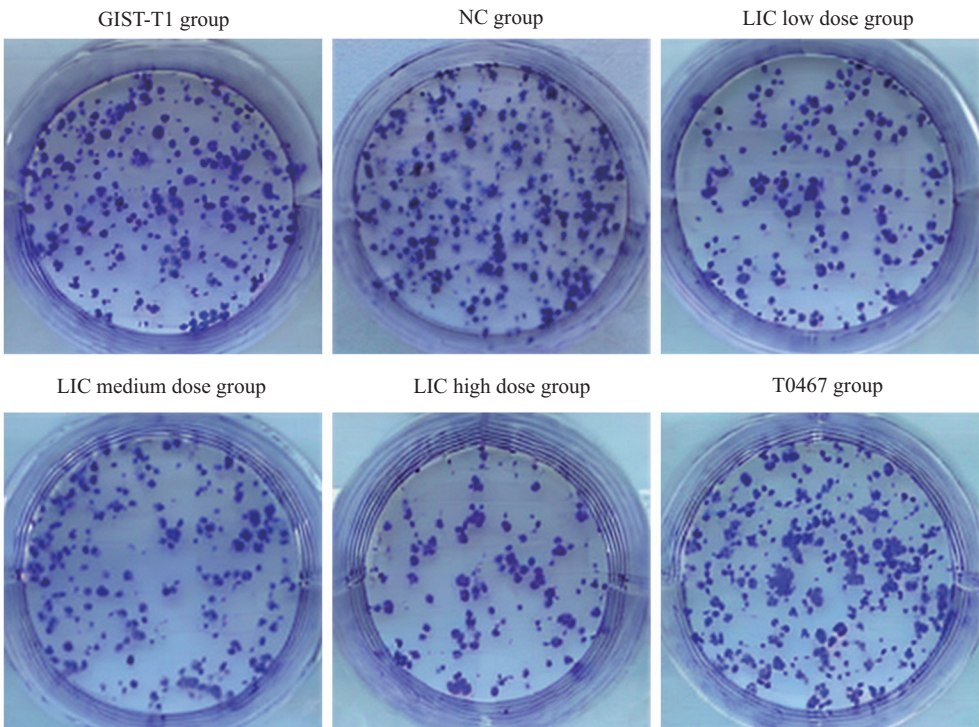


图1 克隆形成实验检测细胞增殖情况
Fig.1 Cell proliferation was detected by colony formation assay

2.3 LIC对各组细胞迁移、侵袭的影响

NC组与GIST-T1组相比,细胞迁移率、侵袭数无明显变化($P>0.05$); LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组与NC组相比,细胞迁移率、侵袭数降低($P<0.05$); T0467组与LIC高剂量组相比,细胞迁移率、侵袭数升高($P<0.05$)。见图2、图3和表4。

2.4 LIC对各组细胞凋亡的影响

NC组与GIST-T1组相比,细胞凋亡率无明显变化($P>0.05$); LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组与NC组相比,细胞凋亡率升高($P<0.05$); T0467组与LIC高剂量组相比,细胞凋亡率降低($P<0.05$)。

见图4和表5。

2.5 LIC对各组细胞线粒体功能的影响

NC组与GIST-T1组相比,细胞ROS水平、线粒体膜电位无明显变化($P>0.05$); LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组与NC组相比,细胞ROS水平升高($P<0.05$),线粒体膜电位降低($P<0.05$); T0467组与LIC高剂量组相比,细胞ROS水平降低($P<0.05$),线粒体膜电位升高($P<0.05$)。见图5、图6和表6。

2.6 LIC对各组细胞自噬以及PINK1/Parkin信号通路相关蛋白的影响

NC组与GIST-T1组相比,细胞LC3II/I、Be-

表3 LIC对细胞存活率、增殖率的影响
Table 3 Effects of LIC on cell viability and proliferation rate

组别 Groups	存活率/% Survival rate /%	克隆数 Number of clones
GIST-T1 group	98.26±0.96	129.47±18.57
NC group	99.32±0.68	132.73±21.24
LIC low dose group	84.83±5.94 [#]	95.26±17.42 [#]
LIC medium dose group	73.75±6.58 ^{#@}	63.65±13.89 ^{#@}
LIC high dose group	50.96±5.60 ^{#@%}	33.49±8.83 ^{#@%}
T0467 group	86.72±7.91 ^{&}	124.27±27.16 ^{&}
<i>F</i> value	67.309	28.082
<i>P</i> value	<0.001	<0.001

[#]*P*<0.05, 与NC组比较; [@]*P*<0.05, 与LIC低剂量组比较; [%]*P*<0.05, 与LIC中剂量组比较; [&]*P*<0.05, 与LIC高剂量组比较。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。
[#]*P*<0.05 compared with NC group; [@]*P*<0.05 compared with LIC low dose group; [%]*P*<0.05 compared with LIC medium dose group; [&]*P*<0.05 compared with LIC high dose group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

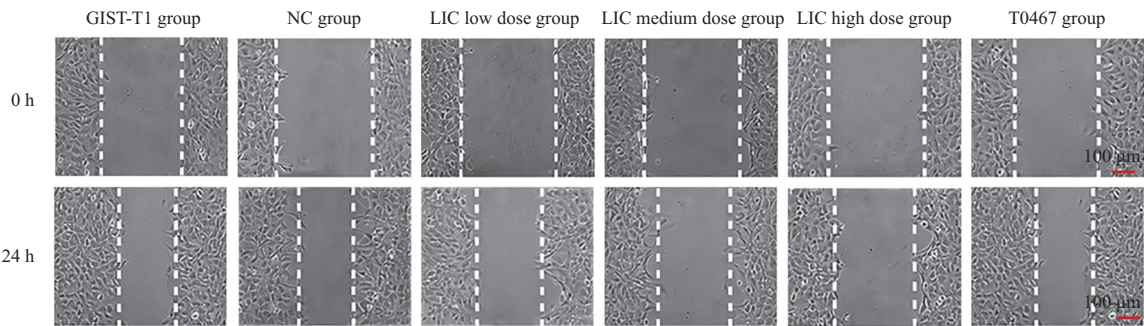


图2 划痕实验检测细胞的迁移情况
Fig.2 The migration of cells was detected by scratch assay

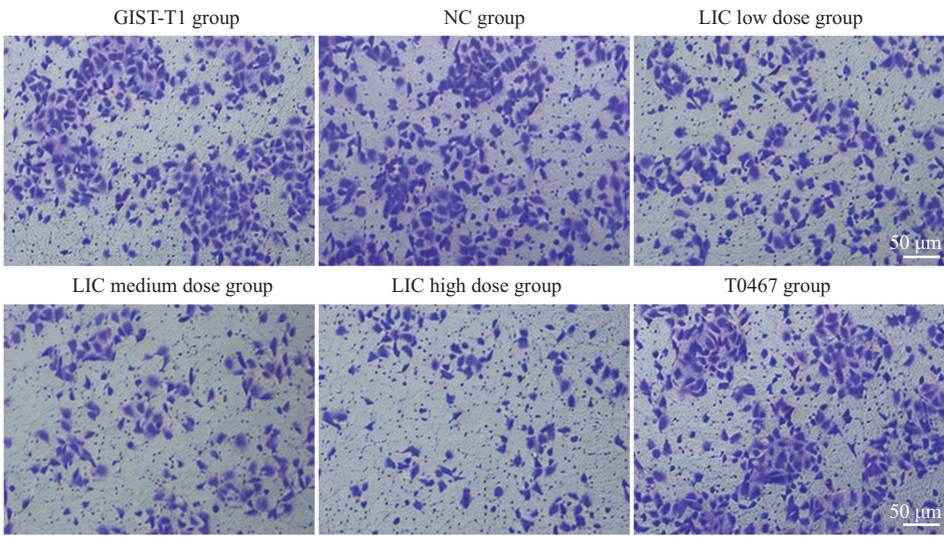


图3 Transwell实验检测细胞侵袭情况
Fig.3 Cell invasion of cells was detected by Transwell assay

clin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平无明显变化 (*P*>0.05); LIC低剂量组、LIC中剂量组、LIC高剂量组与NC组相比, 细胞LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平降低(*P*<0.05); T0467组与LIC高剂量组相比, 细胞LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平升高(*P*<0.05)。见图7和表7。

表4 各组细胞迁移和侵袭的比较

Table 4 Comparison of cell migration and invasion in each group

组别 Groups	迁移率/% Mobility /%	侵袭数 Number of invasion
GIST-T1 group	39.27±5.96	109.84±14.52
NC group	42.56±10.18	116.25±12.75
LIC low dose group	31.71±7.57 [#]	91.83±14.27 [#]
LIC medium dose group	20.83±4.61 ^{#@}	69.67±9.22 ^{#@}
LIC high dose group	9.25±3.42 ^{#@@}	47.92±8.31 ^{#@@}
T0467 group	39.18±5.06 ^{&}	109.62±18.54 ^{&}
<i>F</i> value	23.836	24.455
<i>P</i> value	<0.001	<0.001

[#]*P*<0.05, 与NC组比较; [@]*P*<0.05, 与LIC低剂量组比较; [%]*P*<0.05, 与LIC中剂量组比较; [&]*P*<0.05, 与LIC高剂量组比较。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。
[#]*P*<0.05 compared with NC group; [@]*P*<0.05 compared with LIC low dose group; [%]*P*<0.05 compared with LIC medium dose group; [&]*P*<0.05 compared with LIC high dose group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

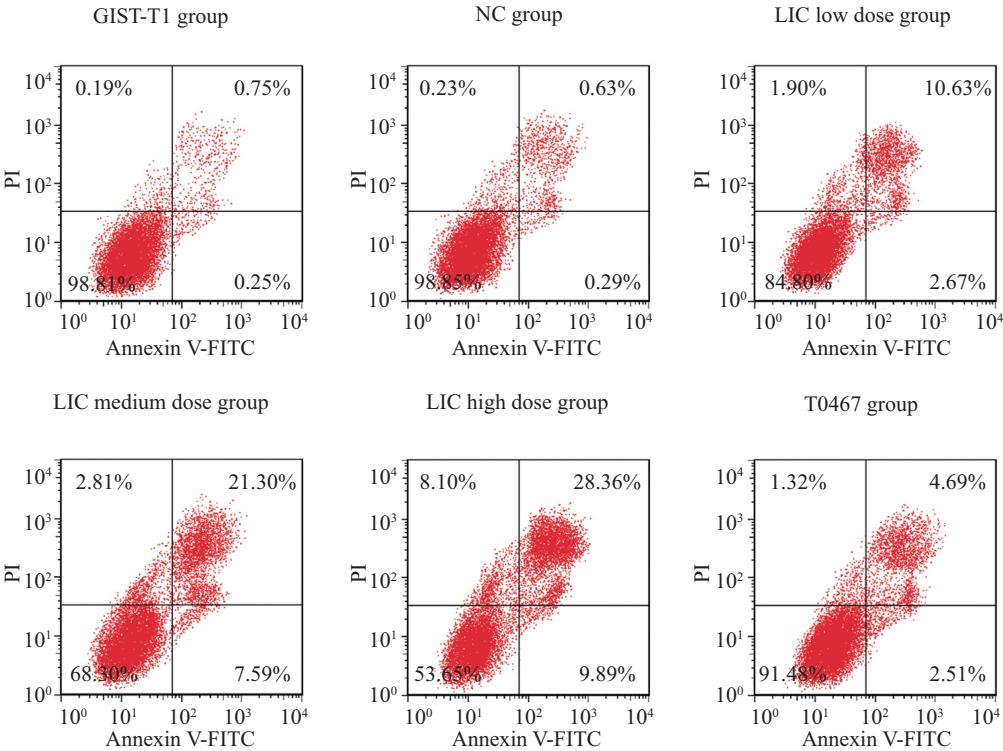


图4 流式细胞仪检测细胞的凋亡情况

Fig.4 Apoptosis of cells was measured by flow cytometry

2.7 LIC对裸鼠移植瘤影响

LIC组裸鼠移植瘤生长速度减慢, 移植瘤质量(0.54±0.08) g低于Control组(1.16±0.15) g; 移植瘤体积(498.85±34.75) mm³低于Control组(914.26±57.14) mm³。与Control组比较, 裸鼠移植瘤中LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平降低(*P*<0.05), 见图8~图10、表8和表9。

3 讨论

GIST是一种罕见但具有高度侵袭性的肿瘤, 由于其早期症状不明显, 诊断往往较为困难^[16]。尽管手术切除是目前治疗GIST最有效的方法, 但术后复发和转移发生率较高^[17]。伊马替尼作为一线治疗药物, 显著改善复发型、转移性、不可切除的GIST患者预后。然而, 大部分患者在治疗后出现获得性耐

表5 各组细胞凋亡率的比较
Table 5 Comparison of apoptosis rate in each group

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
GIST-T1 group	0.96±0.27
NC group	1.28±0.32
LIC low dose group	13.67±3.58 [#]
LIC medium dose group	28.41±4.26 ^{#@}
LIC high dose group	42.59±8.29 ^{#@%}
T0467 group	8.52±1.84 ^{&}
F value	95.204
P value	<0.001

[#] $P<0.05$, 与NC组比较; [@] $P<0.05$, 与LIC低剂量组比较; [%] $P<0.05$, 与LIC中剂量组比较, [&] $P<0.05$, 与LIC高剂量组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

[#] $P<0.05$ compared with NC group; [@] $P<0.05$ compared with LIC low dose group; [%] $P<0.05$ compared with LIC medium dose group; [&] $P<0.05$ compared with LIC high dose group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

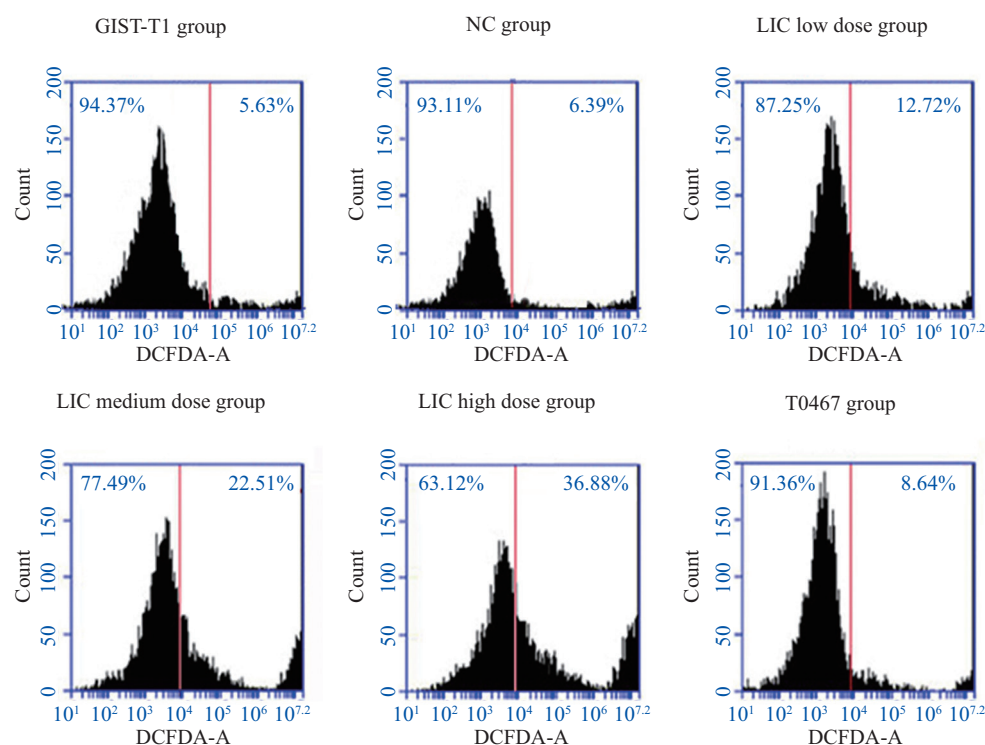


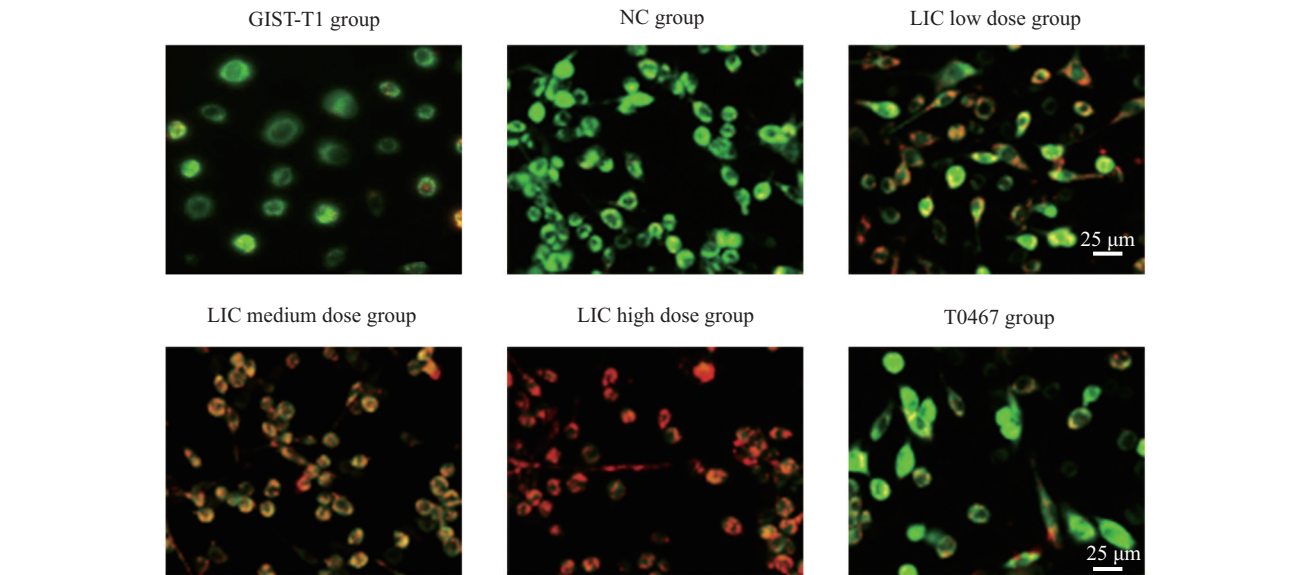
图5 流式细胞仪检测细胞的ROS水平

Fig.5 ROS level in cells was measured by flow cytometry

药, 限制其长期疗效^[18]。针对这一现状, 迫切需要寻找新的治疗策略和生物标记物, 以期改善患者的预后和生活质量。

LIC作为一种常见的局部麻醉剂, 长期以来被广泛应用于临床手术和疼痛管理^[19]。然而, 最近的研究表明LIC可能具备显著的抗肿瘤特性, 这一发现在学术界引起广泛关注^[20]。GUAN等^[21]研究发现, LIC调节circ_ANO5/miR-21-5p/LIFR轴, 抑制胃

癌细胞增殖、迁移、侵袭, 促进胃癌细胞凋亡, 对胃癌细胞具有抗增殖和抗转移作用, 为胃癌治疗提供新的见解。ZHANG等^[8]研究表明, LIC通过抑制miR-10b表达, 进而抑制AKT/mTOR和 β -catenin通路, 降低胃癌细胞顺铂耐药性, 促进胃癌细胞凋亡, 抑制胃癌细胞转移。以上研究均显示, LIC在抑制胃癌进展方面发挥重要的作用。本研究结果发现, LIC能够呈剂量依赖性抑制伊马替尼耐药性GIST-



红色(JC-1聚合物)代表健康细胞线粒体; 绿色(JC-单体)代表凋亡或不健康细胞线粒体。
Red (JC-1 polymer) represents healthy cell mitochondria; green (JC-monomer) represents apoptotic or unhealthy cell mitochondria.

图6 JC-1检测各组细胞线粒体膜电位的变化

Fig.6 JC-1 detection of changes in mitochondrial membrane potential in each group of cells

表6 各组细胞ROS水平的比较

Table 6 Comparison of ROS levels in each group

组别 Groups	ROS水平/% ROS levels /%	JC-1绿/红 JC-1 green/red
GIST-T1 group	5.83±0.86	1.39±0.24
NC group	6.49±1.16	1.56±0.32
LIC low dose group	12.58±1.82 [#]	1.19±0.17 [#]
LIC medium dose group	22.73±3.57 ^{#@}	0.82±0.21 ^{#@}
LIC high dose group	35.26±5.75 ^{#@%}	0.45±0.09 ^{#@%}
T0467 group	7.95±1.38 ^{&}	1.39±0.26 ^{&}
F value	92.481	20.575
P value	<0.001	<0.001

[#]*P*<0.05, 与NC组比较; [@]*P*<0.05, 与LIC低剂量组比较; [%]*P*<0.05, 与LIC中剂量组比较; [&]*P*<0.05, 与LIC高剂量组比较。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。

[#]*P*<0.05 compared with NC group; [@]*P*<0.05 compared with LIC low dose group; [%]*P*<0.05 compared with LIC medium dose group; [&]*P*<0.05 compared with LIC high dose group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

T1细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 提示LIC可以提高GIST-T1细胞对伊马替尼的敏感性。

PINK1/Parkin信号通路是细胞内一个重要的质量控制机制, 主要参与线粒体自噬的调控, 该通路在维持线粒体功能以及细胞凋亡过程中起关键作用^[22]。近年来, 研究发现PINK1/Parkin信号通路在癌症中扮演着复杂而重要的角色^[23]。WANG等^[24]研究显示, 8-*paradol*通过调节PINK1/Parkin相关自噬, 诱导线粒体功能障碍, 从而诱导胃腺癌细胞凋亡。XIAO等^[12]研究发现, 二甲双胍通过激活AMPK信号通路, 进而通过激活PINK1/Parkin信号通路, 促进胃

癌细胞的线粒体裂变和线粒体自噬, 导致ATP产生减少, 保护胃癌细胞免受顺铂的细胞毒性。以上研究表明, PINK1/Parkin信号通路参与线粒体自噬, 在胃癌的进展过程中发挥重要作用。本研究结果发现, 不同剂量LIC处理伊马替尼耐药性GIST-T1细胞能下调PINK1、Parkin、LC3II/I、Beclin-1蛋白表达, 抑制PINK1/Parkin信号通路, 从而抑制线粒体自噬, 促进ROS生成, 降低线粒体膜电位, 有效抑制伊马替尼耐药性GIST进展。然而, 使用PINK1/Parkin信号通路激活剂T0467, 可促进伊马替尼耐药性GIST-T1细胞增殖、迁移和侵袭, 抑制细胞凋亡, 加快GIST

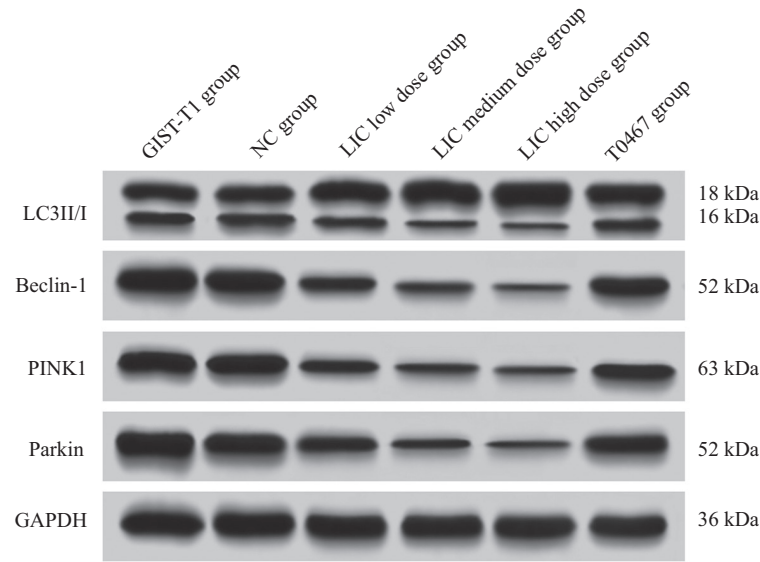


图7 Western blot检测各组细胞自噬以及PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达情况

Fig.7 Western blot detection of autophagy and PINK1/Parkin signaling pathway-related protein expression in each group

表7 各组细胞自噬以及PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达水平比较

Table 7 Comparison of autophagy and PINK1/Parkin signaling pathway-related protein expression in each group

组别 Groups	LC3II/I	Beclin-1	PINK1	Parkin
GIST-T1 group	0.96±0.15	1.04±0.18	0.94±0.13	1.02±0.16
NC group	0.98±0.22	1.02±0.23	0.91±0.17	0.99±0.11
LIC low dose group	0.74±0.16 [#]	0.75±0.12 [#]	0.69±0.08 [#]	0.75±0.14 [#]
LIC medium dose group	0.49±0.13 ^{#@}	0.48±0.14 ^{#@}	0.51±0.13 ^{#@}	0.46±0.09 ^{#@}
LIC high dose group	0.25±0.06 ^{#@%}	0.21±0.05 ^{#@%}	0.33±0.04 ^{#@%}	0.24±0.07 ^{#@%}
T0467 group	0.85±0.09 ^{&}	0.92±0.11 ^{&}	0.78±0.05 ^{&}	0.93±0.21 ^{&}
F value	23.936	29.538	27.633	31.788
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[#]*P*<0.05, 与NC组比较; [@]*P*<0.05, 与LIC低剂量组比较; [%]*P*<0.05, 与LIC中剂量组比较; [&]*P*<0.05, 与LIC高剂量组比较。n=6, $\bar{x}\pm s$ 。
[#]*P*<0.05 compared with NC group; [@]*P*<0.05 compared with LIC low dose group; [%]*P*<0.05 compared with LIC medium dose group; [&]*P*<0.05 compared with LIC high dose group. n=6, $\bar{x}\pm s$.

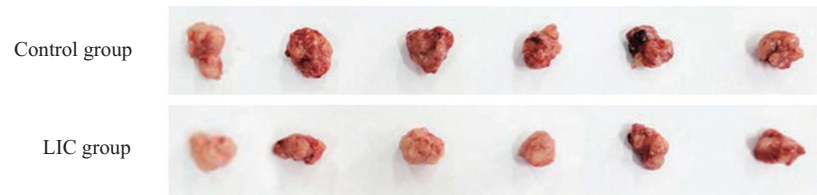
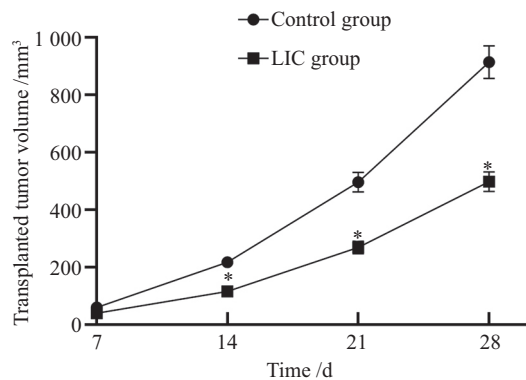


图8 裸鼠移植瘤外观图

Fig.8 Appearance of transplanted tumor in nude mice

进展,提示LIC可增强GIST-T1细胞对伊马替尼的敏感性,其机制可能是通过调控PINK1/Parkin信号通路实现的,本研究继续构建裸鼠致瘤模型发现,与Control组相比,LIC组裸鼠移植瘤体积和质量减少,

LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平降低,进一步证实上述结论。然而,已有研究表明胃肠间质瘤细胞GIST常发生KIT和AKT信号通路的变化^[13]。后续研究可能探讨不同剂量LIC对伊马替尼耐药性



* $P<0.05$, 与Control组比较。
* $P<0.05$ compared with Control group.

图9 移植瘤体积变化曲线
Fig.9 Change curve of transplanted tumor volume

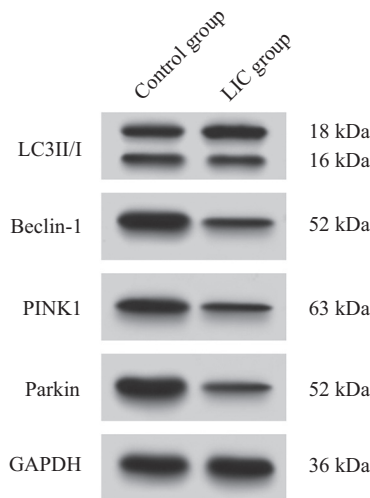


图10 移植瘤中自噬以及PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达情况
Fig.10 Autophagy and PINK1/Parkin signaling pathway related protein expression in xenograft tumors

表8 各组裸鼠移植瘤LC3II/I、Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平比较
Table 8 Comparison of LC3II/I, Beclin-1, PINK1 and Parkin protein expression
in xenograft tumors of nude mice in each group

组别 Groups	LC3II/I	Beclin-1	PINK1	Parkin
Control group	0.92±0.11	0.98±0.13	0.89±0.12	1.06±0.14
LIC group	0.42±0.06*	0.39±0.04*	0.36±0.05*	0.45±0.07*
<i>t</i> value	9.775	10.625	9.986	9.546
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与Control组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$.
* $P<0.05$ compared with Control group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

胃肠间质瘤细胞KIT与AKT信号通路的影响。

综上所述, LIC能够通过抑制PINK1/Parkin信号通路, 抑制线粒体自噬, 从而增强GIST细胞对伊马替尼的敏感性。本研究为临床治疗GIST伊马替尼耐药

性患者提供一定参考, 但LIC的临床作用和机制尚未被完全阐明。为了更全面地评估其在临床应用中的可行性, 未来的研究将转向动物模型, 以进行深入研究, 为开发新型治疗策略奠定坚实的科学基础。

表9 裸鼠移植瘤体积和质量比较

Table 9 Comparison of volume and mass of transplanted tumor in nude mice

组别 Groups	体积/mm ³ Volume /mm ³	质量/g Weight /g
Control group	914.26±57.14	1.16±0.15
LIC group	498.85±34.75*	0.54±0.08*
<i>t</i> value	15.215	8.933
<i>P</i> value	<0.001	<0.001

**P*<0.05, 与Control组比较。 *n*=6, $\bar{x}\pm s$ 。

**P*<0.05 compared with Control group. *n*=6, $\bar{x}\pm s$.

参考文献 (References)

[1] MUNTEANU A, PATRASCU S, BORDU S, et al. Clinical and morphological characteristics of gastrointestinal stromal tumor [J]. *Chirurgia*, 2023, 118(6): 618-23.

[2] SAINI V K, MARKAM K, ORA M. Gastrointestinal stromal tumor with extensive lymph node and skeletal metastases [J]. *Radiol Imaging Cancer*, 2022, 4(5): e220083-e94.

[3] FOONG D, ZHOU J, ZARROUK A, et al. Understanding the biology of human interstitial cells of cajal in gastrointestinal motility [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4540-51.

[4] SHARMA A K, KIM T S, BAUER S, et al. Gastrointestinal stromal tumor: new insights for a multimodal approach [J]. *Surg Oncol Clin Am*, 2022, 31(3): 431-46.

[5] HUANG W K, WU C E, WANG S Y, et al. Systemic therapy for gastrointestinal stromal tumor: current standards and emerging challenges [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2022, 23(9): 1303-19.

[6] BAUER S, JONES R L, BLAY J Y, et al. Ripretinib versus sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor after treatment with imatinib (intrigue): a randomized, open-label, phase III trial [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(34): 3918-28.

[7] VOUTE M, MOREL V, PICKERING G. Topical lidocaine for chronic pain treatment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4091-103.

[8] ZHANG X, GU G, LI X, et al. Lidocaine alleviates cisplatin resistance and inhibits migration of MGC-803/DDP cells through decreasing miR-10b [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(19): 2530-7.

[9] LEE S Y, AN H J, KIM J M, et al. PINK1 deficiency impairs osteoblast differentiation through aberrant mitochondrial homeostasis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 589-99.

[10] KANE L A, LAZAROU M, FOGEL A I, et al. PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity [J]. *J Cell Biol*, 2014, 205(2): 143-53.

[11] MAO Z, TIAN L, LIU J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101(7): 154111-21.

[12] XIAO Y Y, XIAO J X, WANG X Y, et al. Metformin-induced AMPK activation promotes cisplatin resistance through PINK1/Parkin dependent mitophagy in gastric cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12(10): 956190-201.

[13] 秦龙, 罗彬予, 李婷, 等. 胰岛素样生长因子1受体抑制剂对甲磺酸伊马替尼继发耐药性胃肠道间质瘤细胞增殖及蛋白激

酶B蛋白磷酸化的影响[J]. *广西医学*(QIN L, LUO B Y, LI T, et al. Effects of insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor on proliferation and phosphorylation of protein kinase B in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor cells [J]. *Guangxi Med*), 2021, 43(6): 703-6,24.

[14] LI T, QU J, HU C, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppresses mitophagy through disturbing the protein interaction of PINK1-Parkin in sepsis-associated acute kidney injury [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 473-84.

[15] GUAN E, LIU H, XU N. Lidocaine suppresses gastric cancer development through Circ_ANO5/miR-21-5p/LIFR axis [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(6): 2244-56.

[16] YAN M, LIN J, SHU M, et al. Diagnosis, treatment, and prognosis of patients with primary familial gastrointestinal stromal tumor: a case report and literature review [J]. *Oncologist*, 2023, 28(12): e1134-41.

[17] SUN X, ZHANG Q, LIN X, et al. Imatinib induces ferroptosis in gastrointestinal stromal tumors by promoting STUB1-mediated GPX4 ubiquitination [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(12): 839-50.

[18] KELLY C M, GUTIERREZ SAINZ L, CHI P. The management of metastatic GIST: current standard and investigational therapeutics [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 2-12.

[19] HASANPOUR F, BUDAI-SZÜCS M, KOVÁCS A, et al. Improvement of lidocaine skin permeation by using passive and active enhancer methods [J]. *Int J Pharm*, 2024, 660(7): 124377-89.

[20] CHIDA K, KANAZAWA H, KINOSHITA H, et al. The role of lidocaine in cancer progression and patient survival [J]. *Pharmacol Ther*, 2024, 259(7): 108654-65.

[21] GUAN E, LIU H, XU N. Lidocaine suppresses gastric cancer development through circ_ANO5/miR-21-5p/LIFR axis [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(6): 2244-56.

[22] IORIO R, CELENZA G, PETRICCA S. Mitophagy: molecular mechanisms, new concepts on parkin activation and the emerging role of AMPK/ULK1 axis [J]. *Cells*, 2021, 11(1): 30-8.

[23] PANIGRAHI D P, PRAHARAJ P P, BHOL C S, et al. The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66(11): 45-58.

[24] WANG R, LEE Y G, DHANDAPANI S, et al. 8-paradol from ginger exacerbates PINK1/Parkin mediated mitophagy to induce apoptosis in human gastric adenocarcinoma [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187(1): 106610-21.