

网络出版时间: 2023-12-28 11:18:37 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0752.002>

右美托咪定对肝细胞肝癌肿瘤学行为的影响 及 Nrf2 在其中的作用

吴瑞欣^{1,2}, 周大臣³, 唐赛兰^{1,2}, 黄春霞^{1,2}

摘要 目的 从在体和离体两个层面评价右美托咪定对肝细胞肝癌肿瘤学行为的影响及核转录因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2) 在其中的作用。方法 在体层面: 将雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照 (Ctrl) 组、肝细胞肝癌 (HCC) 组、HCC + 右美托咪定 (HCC + Dex) 组。小鼠经 N-亚硝基二乙胺 (DEN)/四氯化碳 (CCl₄) 联合诱导形成 HCC, 随后 2 周每日腹腔注射右美托咪定 10 μg/kg, 继续饲养小鼠 1 个月后, 检测小鼠肝脏肿瘤的数量及最长径, 利用 Ki67 免疫组化评估肝癌的增殖能力, 通过免疫荧光检测肿瘤组织中 Nrf2 蛋白的表达水平。离体层面: 在 Hepa1-6 细胞中, 给予不同浓度的右美托咪定 (0.1、1.0、5.0 nmol/L) 孵育 48 h, 分别采用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT 法)、Transwell 法检测细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 使用 Western blot 和免疫荧光检测肝癌细胞中 Nrf2 蛋白的表达水平。经 si-RNA 转染敲低 Nrf2, 继以 1 nmol/L 右美托咪定孵育 48 h 后, 分别使用 MTT、Transwell 法检测细胞的增殖、侵袭和迁移能力。结果 与 HCC 组比较, 解剖学检查结果显示 HCC + Dex 组小鼠肝脏肿瘤数量增多、最长径增长 ($P < 0.05$); Ki67 免疫组化结果显示, HCC + Dex 组肝癌组织 Ki67 阳性细胞数增加 ($P < 0.01$); 免疫荧光结果显示, HCC + Dex 组 Nrf2 表达水平上调 ($P < 0.01$)。MTT 结果显示 1 nmol/L 的右美托咪定增强了 Hepa1-6 细胞的细胞活力 ($P < 0.05$); Transwell 法结果显示 0.1、1 和 5 nmol/L 的右美托咪定增强了 Hepa1-6 细胞的侵袭能力, 0.1、1 nmol/L 的右美托咪定增强了 Hepa1-6 细胞的迁移能力 ($P < 0.05$); Western blot 和免疫荧光结果显示, 使用 1 nmol/L 的右美托咪定处理后, 细胞的 Nrf2 表达水平上调 ($P < 0.01$); 使用 si-RNA 敲低细胞的 Nrf2 表达水平, 再继以 1 nmol/L 的右美托咪定处理后, MTT、Transwell 检测结果显示, Hepa1-6 细胞的活力降低, 侵袭和迁移的能力降低 ($P < 0.01$)。结论 右美托咪定可能通过提高 Nrf2 的表达水

平来促进肝癌的增殖、侵袭和迁移能力。

关键词 右美托咪定; 肝细胞肝癌; 核因子 E2 相关因子 2; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 735.7; R 73-37

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0015-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.003

肝癌在全球发病率极高, 肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 为最常见的原发性肝癌 (90%), 病死率位居全球恶性肿瘤第四位^[1]。手术切除病灶是治疗 HCC 的首选方法。围手术期使用的麻醉药物可能会对肿瘤的生物特性产生影响^[2]。右美托咪定是一种 α_2A -肾上腺素能受体激动剂, 具备独特的镇静能力且不存在呼吸抑制的风险, 在临床中被广泛应用^[3]。然而, 右美托咪定可能会对肿瘤患者造成不利影响。有研究^[4]表明, 通过激活细胞外信号相关蛋白激酶, 右美托咪定在体外和体内均促进乳腺癌的进展。核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 的过度激活在肺癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌和结肠直肠癌的发展中起到了关键作用^[5]。并且, Kcpal/Nrf2 通路可以抵抗外来生物和活性氧对生物体的损害^[6]。课题组前期研究^[7]结果表明, 右美托咪定可以通过上调沉默调节因子 1 (SIRT1) 来促进人肝癌细胞的增殖和迁移, 但尚未通过动物实验进一步验证并阐明其机制。因此, 该研究通过动物和细胞实验来评估右美托咪定对 HCC 肿瘤学行为的影响, 并对 Nrf2 在其中的作用进行探讨, 以进一步明确其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只, 5~6 周龄, 体质量 18~25 g, 购买于安徽医科大学实验动物中心, 许可证号: SYXK(皖) 2017-006。小鼠在光/暗 (12 h/12 h) 交替循环、恒温 24 °C、相对湿度 50% 的环境条件下饲养。所有小鼠都可以自由获得食物和水。所有实验方案和动物处理程序

2023-11-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81801050); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划 (编号: 2019xkjT026)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 麻醉与围术期医学科、³ 肝胆外科, 合肥 230601

² 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230601

作者简介: 吴瑞欣, 女, 硕士研究生;

黄春霞, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huangchunxia@ahmu.edu.cn

经安徽医科大学实验动物伦理委员会审查和批准(编号: LLSC20211512)。

1.1.2 细胞株 鼠肝癌细胞 Hepa1-6 为安徽医科大学第二附属医院肝胆胰外科馈赠。

1.1.3 试剂和仪器 N-亚硝基二乙胺(N-Nitrosodiethylamine, DEN)(货号: 73861)、戊巴比妥钠均购自美国 Sigma 公司; 四氯化碳(CCl_4) 购自上海振企化学试剂有限公司; 体内实验采用的盐酸右美托咪定注射液(艾贝宁 2 ml/200 μg , 批号: 220528BP) 购自江苏恒瑞医药股份有限公司; 增殖标记 Ki-67(Ki67) 抗体(1:400, 批号: 12202)、Nrf2 抗体(1:1000, 批号: 12721S) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; RPMI-1640 培养基由美国 GE 公司提供; 胰蛋白酶(货号: C0201)、免疫封闭液(货号: P0102)、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)(货号: C1005) 均购自北京碧云天生物技术公司; 体外实验采用的右美托咪定购自美国 Selleck 公司; 基质购自美国 Corning 公司。激光共聚焦显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司; VS200 研究级全玻片扫描系统购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物选择与分组 采用随机数字表法将 18 只小鼠分为 3 组($n=6$): 对照(Ctrl)组、HCC 组、HCC + 右美托咪定(HCC + Dex)组。HCC 模型的建立过程: HCC 组、HCC + Dex 组小鼠于 6 周龄时腹腔注射 1% DEN(10 ml/kg, 每周 1 次, 连续 2 周, 共 2 次), 并自 8 周龄开始通过灌胃方式给予 20% CCl_4 (10 ml/kg, 每周 3 次, 连续 18 周, 共 54 次)。Ctrl 组在相应时间节点接受相同体积的溶媒处理(DEN 溶媒为生理盐水, CCl_4 溶媒为橄榄油)。在 HCC 模型建立之后, HCC + Dex 组自 26 周龄起腹腔注射右美托咪定(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 次/d, 连续 2 周, 共 14 次)。Ctrl 组和 HCC 组于对于时间节点腹腔注射同体积的生理盐水。注射右美托咪定结束后, 再将小鼠进行正常饲养 4 周, 于 32 周龄时腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠。麻醉后, 使用生理盐水进行心脏灌流, 并迅速取出肝脏, 立即进行解剖学检查, 观察肝脏大小、质地及有无肿瘤结节形成, 并计数肿瘤结节的数量, 测量肿瘤结节的最长直径。

1.2.2 Ki67 免疫组化染色观察肝癌增殖能力 将小鼠肝组织置入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后, 脱水、石蜡包埋、切片(4 μm)。采用免疫组化法检测肝组织 Ki67 表达水平, 取上述肝组织石蜡切片, 经脱蜡、水化、枸橼酸钠热修复、灭活过氧化物酶、

Triton X-100 通透、山羊血清封闭后, 滴加兔源 Ki67 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗去一抗后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 HRP 标记的山羊抗兔二抗 30 min, DAB 避光显色, 苏木精复染后脱水封片。VS200 研究级全玻片扫描系统下观察并采集图像。Ctrl 组每只小鼠在正常肝组织区域内随机选取 3 个视野, HCC 组、HCC + Dex 组每只小鼠在肝脏肿瘤区域内随机选取 3 个视野, 计数 Ki67 阳性细胞数占总细胞数的比例。

1.2.3 免疫荧光染色观察肝组织 Nrf2 表达情况 采用免疫荧光染色检测肝组织 Nrf2 的表达水平, 取上述肝组织石蜡切片, 经脱蜡、水化、枸橼酸钠热修复、灭活过氧化物酶、Triton X-100 通透、山羊血清封闭后, 滴加兔源 Nrf2 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 冲洗去一抗后, 加入山羊抗兔荧光二抗(1:400), 室温孵育 1 h, 用 PBS 洗 3 遍后使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片, VS200 研究级全玻片扫描系统下观察并采集图像。Ctrl 组在正常肝组织区域每只鼠随机选取 4 个视野, HCC 组、HCC + Dex 组在肿瘤区域每只鼠随机选取 4 个视野, 并使用 Image J 软件分析 Nrf2 荧光强度。

1.2.4 细胞培养及分组 将鼠源 Hepa1-6 细胞培育于含 10% 南美胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱。待密度为 80% 左右时经胰蛋白酶消化, 吹打成单细胞悬液, 并传代培养。将 Hepa1-6 细胞随机分为 6 组: 对照(CON)组、右美托咪定 0.1 nmol/L(Dex1)组、右美托咪定 1 nmol/L(Dex2)组、右美托咪定 5 nmol/L(Dex3)组、Dex2 + si-Nrf2 组(Dex2 + si-Nrf2)组、Dex2 + si-NC 组(Dex2 + si-NC)组。CON 组正常培养; Dex1、Dex2、Dex3 组分别加入终浓度为 0.1、1、5 nmol/L 的右美托咪定, 孵育 48 h; Dex2 + si-Nrf2 组、Dex2 + si-NC 组使用 si-RNA 转染 24 h 后, 将培养液更换为正常培养液, 并加入 1 nmol/L 的右美托咪定继续培养 48 h。

1.2.5 四甲基偶氮唑盐(methylthiazolyl tetrazolium, MTT) 比色法检测细胞活力 Hepa1-6 细胞消化混匀成单细胞悬液, 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板内, 不同浓度右美托咪定孵育 48 h 后, 加入 5 g/L MTT 溶液 10 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后加入 150 μl 二甲基亚砜, 室温下震荡 10 min, 酶标仪于 570 nm 处测定吸光度值, 以此反映细胞活力。

1.2.6 Transwell 法检测细胞的侵袭迁移能力 使用无血清培养基饥饿 Hepa1-6 细胞 12 h。① 迁移能力检测: 下室中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-

1640 培养基 600 μl , 上室加入提前经过不同浓度右美托咪定处理的细胞悬液 200 μl , 放入细胞培养箱中孵育 48 h。② 侵袭能力检测: 上室涂布基质, 其余按照迁移试验的步骤进行后续处理。每组设置 2 个复孔。PBS 洗涤后 4% 多聚甲醛固定 30 min, 风干后加入结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤 3 次。用棉签擦净上室里存留的液体, 在倒置显微镜下拍照且计数, 随机选择 4 个不同的视野进行统计学分析。最后根据 MTT 实验和 Transwell 实验选出右美托咪定的最适浓度, 后续实验均在此浓度下进行。

1.2.7 Western blot 法检测 1 nmol/L 右美托咪定处理后肝癌细胞 Nrf2 表达情况 取 CON 组、Dex2 组细胞, 提取蛋白样本。样本经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上。快速蛋白封闭液封闭 15 min 后, PVDF 膜孵育一抗 (Nrf2 抗体) 4 $^{\circ}\text{C}$ 水平摇床中孵育过夜, 次日 TBST 洗涤 3 次后, 加入相应的生物二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 4 次后, 配置化学发光液, 化学发光成像, 采用 Image J 软件进行灰度分析。

1.2.8 免疫荧光法观察 1 nmol/L 右美托咪定处理后肝癌细胞 Nrf2 表达情况 取 Hepa1-6 细胞, 细胞计数后接种于含爬片的 24 孔板中 (5×10^3 细胞/孔), 待细胞贴壁后加入 1 nmol/L 的右美托咪定孵育 48 h, 取出爬片, 置于 PBS 中洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。加入免疫封闭液封闭 1 h。加入兔源 Nrf2 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日复温 30 min 后使用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入山羊抗兔荧光二抗 (1:400) 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) 封片后, 激光共聚焦显微镜拍照。使用 Image J 软件半定量分析肝癌细胞内 Nrf2 表达水平。

1.2.9 si-RNA 转染 靶向 Nrf2 的小干扰 si-RNA 片段和无关对照 si-RNA 片段 由上海吉玛基因设计。其中 si-Nrf2 的正义链序列为 5'-GCAACUGUG-GUCCACAUUUTT-3', 反义链序列为 5'-AAAUGUG-GACCACAGUUGCTT-3'; si-NC 的正义链序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义链序列为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; si-RNA 转染根据美国赛默飞公司的 lipofectamine2000 说明书进行 si-RNA 转染 24 h 后继以 1 nmol/L 的右美托咪定孵育 48 h, 使用 MTT 法检测细胞活力, 使用 Transwell 法检测细胞的侵袭和迁移能力。

1.2.10 MTT 比色法检测敲低 Nrf2 后细胞活力 将 Hepa1-6 细胞常规接种于 96 孔板中, 当细胞达到 40% 的汇合度时, 加入 si-RNA 转染 24 h, 将培养液

更换为正常培养液。然后, 在 Dex2 组、Dex2 + si-Nrf2 组和 Dex2 + si-NC 组中加入 1 nmol/L 的右美托咪定并继续培养 48 h。接下来, 每组细胞加入 5 g/L MTT 溶液 10 μl , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h 后加入 150 μl 二甲亚砜, 室温下震荡 10 min。最后使用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值来反映细胞活力。

1.2.11 Transwell 法检测 Nrf2 敲低对细胞侵袭迁移能力的影响 将 Hepa1-6 细胞常规接种于 6 孔板中, 当细胞汇合度达到 40% 时, 加入 si-RNA 转染 24 h, 将 Dex2 组、Dex2 + si-Nrf2 组和 Dex2 + si-NC 组细胞的培养基更换为无血清的 RPMI-1640 培养基饥饿 12 h, 并按照上述 1.2.6 项的方法检测 Hepa1-6 细胞的侵袭、迁移能力。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 27.0 软件进行分析, 正态分布的计数资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验或单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右美托咪定对小鼠 HCC 进展的影响 对小鼠的肝脏进行解剖学检查, 结果显示, 与 Ctrl 组相比, HCC 组、HCC + Dex 组的小鼠肝脏表面粗糙、迟钝, 边缘皱起, 有明显的米白色颗粒状增生性结节。与 HCC 组相比, HCC + Dex 组小鼠肝脏表面更加粗糙, 边缘皱起, 米白色颗粒状结节的数量和最大直径增加 ($F = 22.347, P < 0.05; F = 10.852, P < 0.05$), 见图 1。上述结果表明, 肝癌模型制备成功, 在体内右美托咪定能够促进原发性 HCC 的发生和进展。

2.2 右美托咪定对小鼠肝癌增殖能力的影响 Ki67 染色法结果显示, 与 Ctrl 组相比, HCC 组和 HCC + Dex 组肿瘤组织中 Ki67 表达增加 ($P < 0.01$), 且与 HCC 组相比, HCC + Dex 组肿瘤组织中 Ki67 表达增加了约 2 倍 ($F = 135.425, P < 0.01$), 见图 2。上述结果表明, 在体内右美托咪定能够促进肝脏肿瘤增殖。

2.3 右美托咪定处理后对小鼠肝脏肿瘤区域 Nrf2 表达的影响 免疫荧光分析结果显示, 与正常肝组织相比, HCC 组、HCC + Dex 组肝脏肿瘤区域的 Nrf2 表达水平上调 ($P < 0.05$); 与 HCC 组相比, HCC + Dex 组肝脏肿瘤区域的 Nrf2 表达水平上调 ($F = 10.653, P < 0.05$), 见图 3。上述结果表明, 右美托咪定促进肝癌增殖可能与 Nrf2 表达上调相关。

2.4 右美托咪定对肝癌细胞活力、侵袭和迁移能力的影响 在体外采用 MTT 法检测 Hepa1-6 细胞的

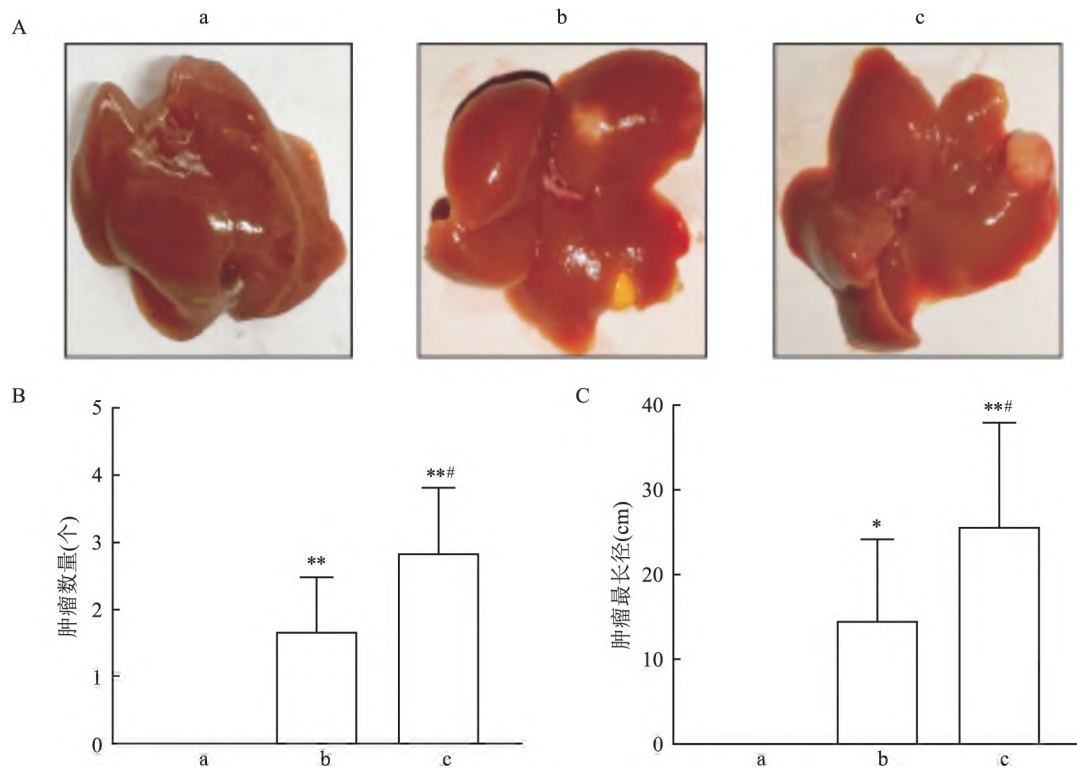


图1 右美托咪定处理对3组小鼠的HCC进展的影响

A: 代表性肝脏活组织检查图片; B: 各组肝脏肿瘤的数量; C: 各组肝脏肿瘤的最长径; a: Ctrl组; b: HCC组; c: HCC + Dex组; 与Ctrl组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与HCC组比较: # $P < 0.05$

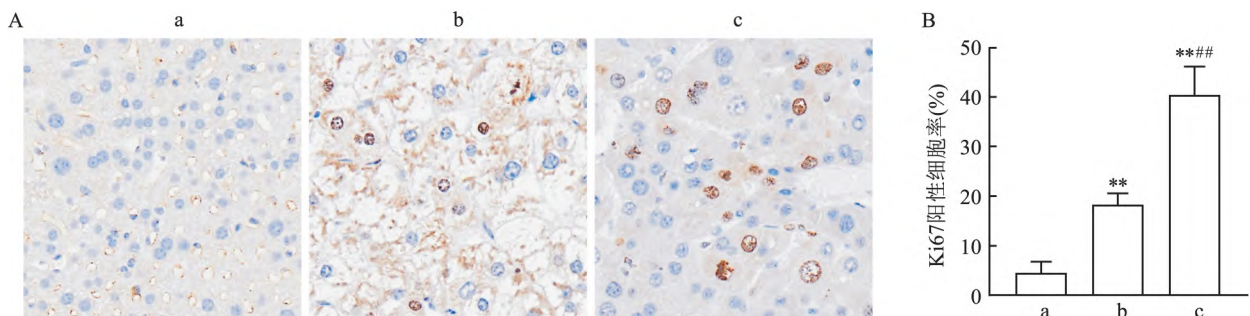


图2 右美托咪定处理对肝组织增殖能力的影响

A: 3组小鼠的Ki67免疫组化染色图 $\times 200$; B: 3组小鼠Ki67阳性细胞数占总细胞数的比例; a: Ctrl组; b: HCC组; c: HCC + Dex组; 与Ctrl组比较: ** $P < 0.01$; 与HCC组比较: ## $P < 0.01$

活力,结果显示,与CON组相比,Dex2组Hepa1-6的细胞活力增强,该细胞系对MTT检测的敏感性最高($P < 0.05$),见表1。Transwell实验结果显示,在侵袭实验中,与CON组相比,Dex1、Dex2、Dex3组的穿膜细胞数增加($F = 58.448, P < 0.01$);在迁移实验中,与CON组相比,Dex1组和Dex2组细胞的穿膜细胞数增加($F = 18.348, P < 0.05$),右美托咪定浓度为1 nmol/L时,细胞增殖活力最强,见图4。上述体外实验结果表明,右美托咪定促进了Hepa1-6细胞的增殖、侵袭和迁移能力。故将右美托咪定1

nmol/L浓度确定为本研究的最佳浓度,并且后续的相关细胞实验都在此浓度下进行。

表1 不同浓度右美托咪定对Hepa1-6细胞活力的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力	F值	P值
CON	1.00 ± 0.09	-	-
Dex1	1.02 ± 0.22	9.736	0.853
Dex2	1.17 ± 0.11*	0.121	0.011
Dex3	1.03 ± 0.07	0.279	0.525

与CON组比较: * $P < 0.05$

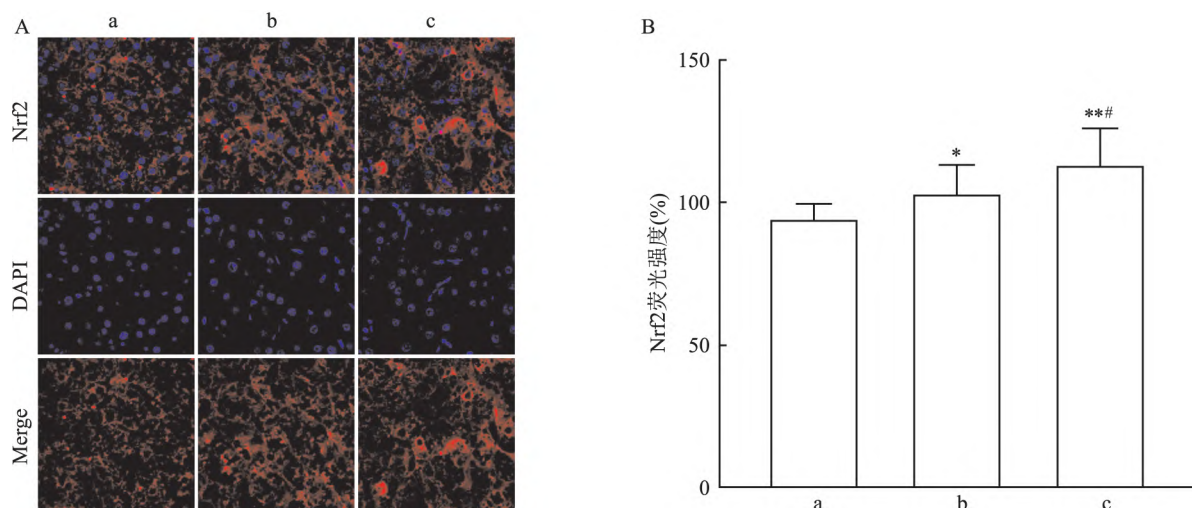


图3 右美托咪定对肝组织 Nrf2 表达水平的影响

A: 3 组小鼠肝组织免疫荧光染色图 ×200; B: 3 组小鼠免疫荧光半定量分析; a: Ctrl 组; b: HCC 组; c: HCC + Dex 组; 与 Ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HCC 组比较: # $P < 0.05$

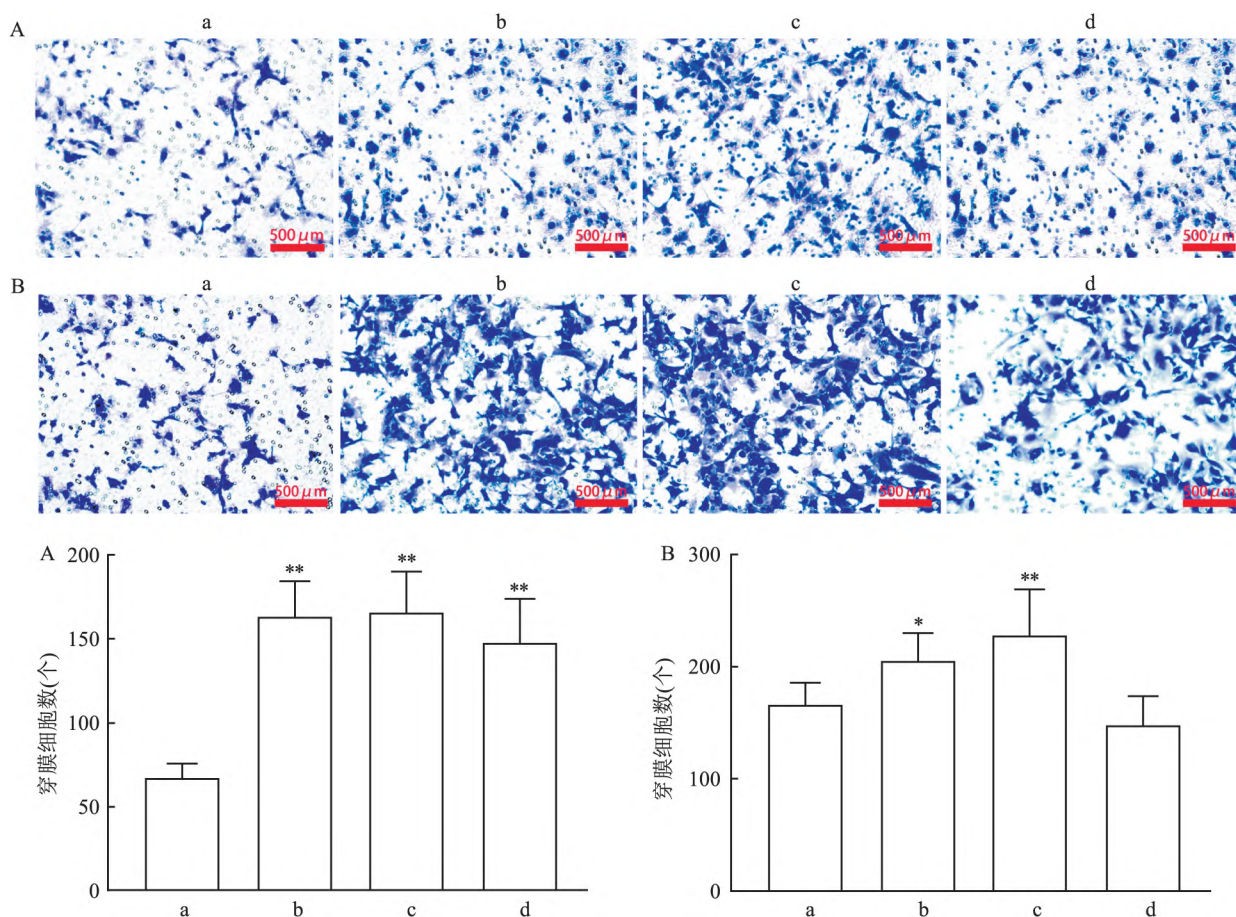


图4 不同浓度右美托咪定对 Hepal-6 细胞侵袭迁移能力的影响 结晶紫染色 ×200

A: 右美托咪定对 Hepal-6 细胞侵袭能力的影响; B: 右美托咪定对 Hepal-6 细胞迁移能力的影响; a: CON 组; b: Dex1 组; c: Dex2 组; d: Dex3 组; 与 CON 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 右美托咪定处理后对肝癌细胞 Nrf2 表达水平的影响 通过 Western blot 法和免疫荧光法,在体外

验证了右美托咪定 1 nmol/L 处理后肝癌细胞 Nrf2 的表达变化。结果显示,与 CON 组相比,Dex2 组

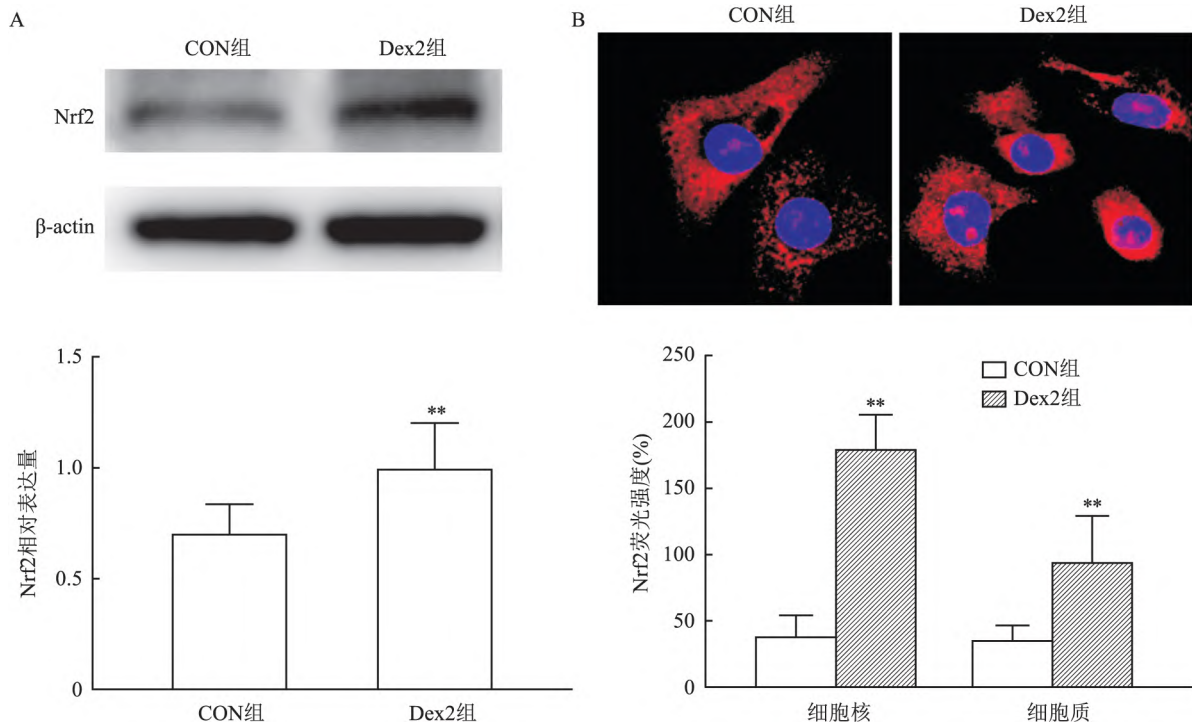


图5 1 nmol/L 右美托咪定对 Hepa1-6 细胞 Nrf2 表达水平的影响

A: Western blot 法检测 Nrf2 在各组的表达水平; B: Hepa1-6 细胞 Nrf2 免疫荧光染色图 ×630; 与 CON 组比较: ** $P < 0.01$

Hepa1-6 细胞中的 Nrf2 蛋白灰度值增加, Nrf2 的表达上调 ($F = 0.659, P < 0.01$)。另外, Dex2 组 Hepa1-6 细胞的胞核中 Nrf2 的表达水平上调 ($F = 8.678, P < 0.01$), 胞质中 Nrf2 的表达水平也上调 ($F = 23.900, P < 0.01$), 见图 5。以上结果表明, 右美托咪定处理后, 肝癌细胞的 Nrf2 表达水平上调。

2.6 降低 Nrf2 水平后右美托咪定对肝癌细胞活力、侵袭与迁移能力的影响 采用 MTT 法检测敲低 Nrf2 后的细胞活力, Transwell 法检测敲低 Nrf2 后细胞的侵袭和迁移能力。与 Dex2 组相比, Dex2 + si-Nrf2 组 Hepa1-6 细胞的细胞活力降低 ($P < 0.01$)、侵袭穿膜细胞数减少 ($F = 67.694, P < 0.01$)、迁移穿膜细胞数减少 ($F = 26.168, P < 0.01$), 见表 2 和图 6。上述结果表明, 敲低 Nrf2 后, 右美托咪定不再具有促进肿瘤增殖、侵袭和迁移的能力。

表2 敲低 Nrf2 对 Hepa1-6 细胞活力的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力	F 值	P 值
Dex2	1.00 ± 0.13	-	-
Dex2 + si-Nrf2	0.59 ± 0.08 **	4.904	< 0.01
Dex2 + si-NC	1.03 ± 0.10	1.680	0.550

与 Dex2 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

麻醉和手术等围术期因素与 HCC 患者的预后

相关^[8]。右美托咪定广泛应用于临床麻醉, 可以通过调节肿瘤患者的免疫功能, 减少炎症反应, 增加癌细胞的增殖和转移活性, 影响肿瘤进展^[9-10]。右美托咪定对肿瘤生物学行为的影响会因癌症类型的不同而有所差异, 可通过增加手术后单核样骨髓来源的抑制性细胞 (M-MDSCs) 的数量, 促进肺癌转移^[11]。右美托咪定可通过 ERK 信号通路, 调控 C-Myc 基因表达, 抑制食管癌细胞增殖^[12]。但是, 目前关于右美托咪定对 HCC 进展的影响仍然不明确, 研究^[7]表明, 右美托咪定可以促进人肝癌细胞的增殖和迁移, 但这仅限于离体层面。本研究从离体和在体两个层面探究了右美托咪定对于小鼠原发性 HCC 的肿瘤生物学行为的影响及可能的机制。首先使用 DEN/CCl₄ 联合诱导的 HCC 模型, 相较于移植性裸鼠肝癌模型可以更好地模拟人肝癌的发生发展过程。对肝组织进行解剖学检查和 Ki67 染色分析结果显示, 在给予 10 μg/kg 右美托咪定处理的小鼠中, 肝脏肿瘤数量增加, 最长径增大, 并且 Ki67 阳性细胞的数量增加, 肝细胞肝癌的增殖能力增强。进一步对小鼠源的 Hepa1-6 细胞的研究表明, 不同浓度的右美托咪定增强了细胞的增殖能力, 且细胞在右美托咪定浓度为 1 nmol/L 时活力最强, Hepa1-6 细胞的侵袭和迁移能力也显著增强。因

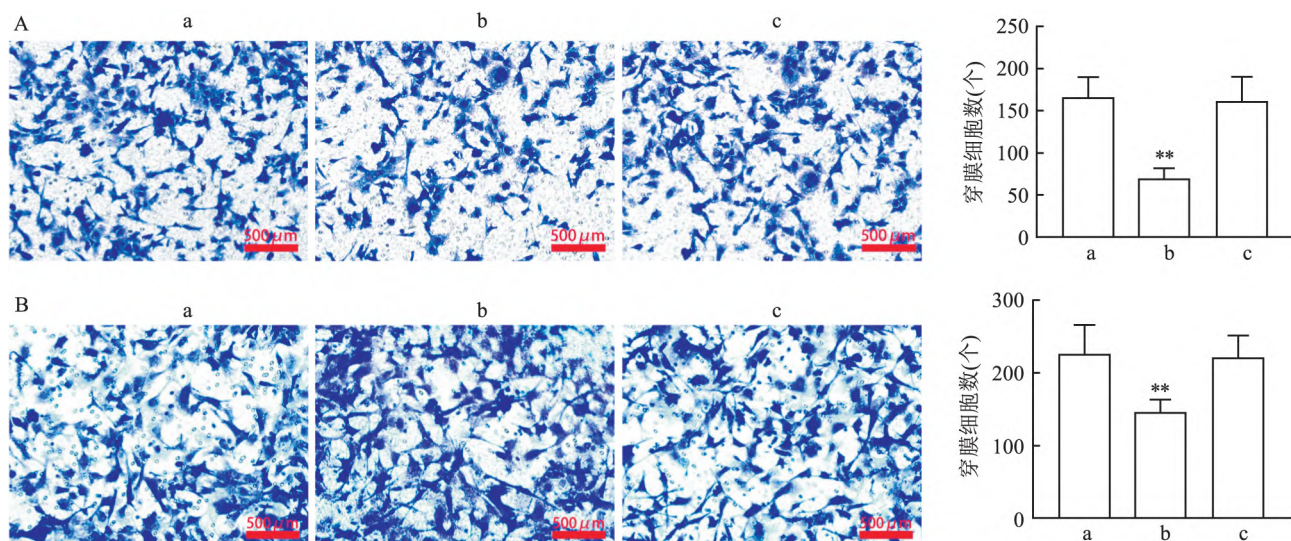


图6 敲低 Nrf2 对 Hepa1-6 细胞侵袭迁移能力的影响 结晶紫染色 × 200

A: 敲低 Nrf2 后 Hepa1-6 细胞侵袭能力的改变; B: 敲低 Nrf2 后 Hepa1-6 细胞迁移能力的改变; a: Dex2 组; b: Dex2 + si-Nrf2 组; c: Dex2 + si-NC 组; 与 Dex2 组比较: ** $P < 0.01$

此,一定浓度的右美托咪定可以加速肝细胞肝癌的进展。此外,使用右美托咪定还可能加速肝细胞肝癌的转移。

研究^[13-14]表明,p62-Keap1-Nrf2 信号通路通过激活 ROS 和铁代谢基因,导致肝癌细胞产生耐药;TRIM25 通过激活 Nrf2 信号传导系统,降低内质网应激的 ROS 水平,从而促进肝癌细胞存活。以上研究表明 Nrf2 在肝癌进展中起关键作用。本研究结果显示,小鼠肝脏肿瘤区域的 Nrf2 表达水平明显高于正常小鼠的肝组织,给予 10 μg/kg 右美托咪定后,小鼠肿瘤组织中 Nrf2 的表达水平进一步升高。这些结果与既往研究^[15]一致,表明右美托咪定是可以调节 Nrf2 通路的。为了进一步验证 Nrf2 通路,本研究使用 si-RNA 敲低了 Hepa1-6 细胞的 Nrf2 表达水平,结果显示,右美托咪定不再促进肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。以上表明,Nrf2 介导了右美托咪定对 HCC 肿瘤生物学行为的影响。

本研究仅在细胞层面上验证了右美托咪定对肝癌侵袭和迁移能力的影响,敲低 Nrf2 水平进行的研究也仅限于细胞层面,右美托咪定促进肝细胞肝癌增殖、侵袭和迁移能力的作用机制还需要进一步的探究。

综上所述,右美托咪定可能通过提高 Nrf2 的表达水平来促进肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。本课题为进一步明确右美托咪定对于 HCC 的影响机制提供理论依据。

参考文献

- [1] Llovet J M, Kelley R K, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 7.
- [2] Bezu L, Díaz-Cambronero O, Kepp O. Editorial: anesthesia and cancer: friend or foe? [J]. Front Oncol, 2022, 12: 1095800.
- [3] Huang Y, Hu S, Li Y, et al. Dexmedetomidine, an alpha 2a adrenergic receptor agonist, mitigates experimental autoimmune encephalomyelitis by desensitization of CXCR7 in microglia [J]. Biochemistry, 2018, 57(28): 4197-205.
- [4] 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.
- [5] Hast B E, Cloer E W, Goldfarb D, et al. Cancer-derived mutations in Keap1 impair Nrf2 degradation but not ubiquitination [J]. Cancer Res, 2014, 74(3): 808-17.
- [6] Pillai R, Hayashi M, Zavitsanou A, et al. Nrf2: KEAPing tumors protected [J]. Cancer Discov, 2022, 12(3): 625-43.
- [7] 虞乐, 黄春霞, 胡军, 等. 右美托咪定对人肝癌 Huh-7 细胞增殖和迁移的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(7): 1019-23.
- [8] Horowitz M, Neeman E, Sharon E, et al. Exploiting the critical perioperative period to improve long-term cancer outcomes [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(4): 213-26.
- [9] Cai Q, Liu G, Huang L, et al. The role of dexmedetomidine in tumor-progressive factors in the perioperative period and cancer recurrence: a narrative review [J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 2161-75.
- [10] Wang C, Datto T, Zhao H, et al. Midazolam and dexmedetomidine affect neuroglioma and lung carcinoma cell biology *in vitro* and *in vivo* [J]. Anesthesiology, 2018, 129(5): 1000-14.
- [11] Su X, Fan Y, Yang L, et al. Dexmedetomidine expands monocyte-

- ic myeloid-derived suppressor cells and promotes tumour metastasis after lung cancer surgery [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 347.
- [12] Hu Y, Qiu L L, Zhao Z F, et al. Dexmedetomidine represses proliferation and promotes apoptosis of esophageal cancer cells by regulating C-Myc gene expression *via* the ERK signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(2): 950 – 6.
- [13] Sun X, Ou Z, Chen R, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 173 – 84.
- [14] Liu Y, Tao S, Liao L, et al. TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 348.
- [15] Sha J, Zhang H, Zhao Y, et al. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced liver oxidative stress and cell apoptosis in rats by increasing GSK-3 β /MKP-1/Nrf2 pathway activity *via* the α 2 adrenergic receptor [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364: 144 – 52.

Effects of dexmedetomidine on the oncological behavior of hepatocellular carcinoma and role of Nrf2

Wu Ruixin^{1,2}, Zhou Dachen³, Tang Sailan^{1,2}, Huang Chunxia^{1,2}

(¹Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, ³Dept of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Key Laboratory of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the impact of dexmedetomidine on the oncological behavior of hepatocellular carcinoma and explore the role of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) at both *in vitro* and *in vivo* levels. **Methods** *In vivo* experiment, Male C57BL/6J mice were randomly divided into a control group (Ctrl group), a hepatocellular carcinoma group (HCC group), and a hepatocellular carcinoma + dexmedetomidine group (HCC + Dex group). Hepatocellular carcinoma was induced in mice by combining N-Nitrosodiethylamine (DEN) /carbon tetrachloride (CCl₄), followed by daily intraperitoneal injection of 10% dexmedetomidine for two weeks. After feeding the mice for one month, the mice were assessed for the quantity and size of liver tumors. The proliferation ability of liver cancer was evaluated using Ki67 immunohistochemistry. Additionally, the expression level of Nrf2 protein in tumor tissue was measured through immunofluorescence. *In vitro* experiment, Hepa1-6 cells were incubated with different concentrations of dexmedetomidine (0.1, 1, 5 nmol/L) for 48 hours to examine their effects. The proliferation, migration and invasion abilities of Hepa1-6 cells were evaluated using the MTT and Transwell methods. The expression level of Nrf2 protein in the Hepa1-6 cells was measured using Western blot and immunofluorescence. Additionally, the proliferation, migration and invasion abilities of cells were assessed after Nrf2 knockdown *via* si-RNA transfection, in combination with incubation with 1 nmol/L dexmedetomidine for 48 hours. **Results** Compared to the HCC group, the anatomical examination results revealed an increase in the number of liver tumors and the longest diameter in the HCC + Dex group ($P < 0.05$). Ki67 immunohistochemistry results indicated the number of Ki67 positive cells in liver cancer tissue increased in the HCC + Dex group ($P < 0.01$). The immunofluorescence assay demonstrated an upregulation of Nrf2 expression level in the HCC + Dex group ($P < 0.05$). MTT results showed that 1 nmol/L of dexmedetomidine increased the cell viability of Hepa1-6 cells ($P < 0.05$). Transwell results indicated that 0.1, 1, and 5 nmol/L of dexmedetomidine enhanced the invasive ability of Hepa1-6 cells, while 0.1 and 1 nmol/L of dexmedetomidine enhanced the migration ability ($P < 0.05$). Western blot and immunofluorescence results showed an upregulation of Nrf2 expression level in cells after treatment with 1 nmol/L dexmedetomidine ($P < 0.01$). The Nrf2 expression level of cells was reduced using si-RNA, followed by treatment with 1 nmol/L dexmedetomidine. The results from MTT and Transwell assays revealed a decrease in the viability, invasion and migration ability of Hepa1-6 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Dexmedetomidine may enhance the proliferation, invasion and migration capacity of hepatocellular carcinoma by upregulating the expression of Nrf2.

Key words dexmedetomidine; hepatocellular carcinoma; Nrf2; proliferation; invasion; migration