

盐酸罗哌卡因对人乳腺癌细胞运动作用的研究*

唐努尔·艾尔肯¹, 阿孜古·祖农² (1. 新疆喀什地区第一人民医院麻醉科, 新疆喀什 844000;
2. 新疆喀什地区肺科医院检验科, 新疆喀什 844000)

摘要:目的 探讨不同剂量的盐酸罗哌卡因对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长和运动行为学的影响。方法 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞常规培养后加入不同剂量盐酸罗哌卡因。分组为低剂量组 150 $\mu\text{g/ml}$ (A 组), 中剂量组 250 $\mu\text{g/ml}$ (B 组) 和高剂量组 450 $\mu\text{g/ml}$ (C 组), 设空白对照组 (D 组)。MTT 法检测细胞生长情况, 同时观察细胞划痕和趋化运动能力变化。结果 低剂量盐酸罗哌卡因组乳腺癌细胞生长不受影响, 而中剂量和高剂量组乳腺癌细胞生长受到较大的抑制, 与对照组相比差异有统计学意义 ($t=8.845\sim 11.654, P<0.05$)。低剂量盐酸罗哌卡因组乳腺癌细胞的迁移和趋化运动能力与对照组相比差异无统计学意义 ($t=1.025\sim 1.124, P>0.05$)。中剂量组和高剂量组乳腺癌细胞的迁移和趋化运动能力比对照组明显减低, 组间差异有统计学意义 ($t=6.054\sim 12.412, t=8.654\sim 10.214$, 均 $P<0.05$)。结论 盐酸罗哌卡因能抑制乳腺癌细胞生长和运动, 具有剂量依赖性。

关键词: 盐酸罗哌卡因; 乳腺癌; 迁移; 趋化运动

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)03-128-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.035

Study on Effect of Ropivacaine on Migration of Breast Cancer Cells

TANGNUER · Aierken¹, AZIGU · Zunong² (1. Department of Anesthesia,
the First People's Hospital of Xinjiang Kashi, Xinjiang Kashi 844000, China; 2. Department
of Clinical Laboratory, the Pulmonary Hospital of Xinjiang Kashi, Xinjiang Kashi 844000, China)

Abstract: Objective To observe the different behavior of migration in breast cancer cells, when exposure to ropivacaine of different concentrations. **Methods** The breast cancer cells MDA-MB-231 were inoculated into culture medium. They were divided into four groups: low-dose group (150 $\mu\text{g/ml}$, A group), medium-dose group (250 $\mu\text{g/ml}$, B group), high-dose group (450 $\mu\text{g/ml}$, C group) and control group (D group), and detected the cell proliferation, abilities of cell scratch and chemotaxis. **Results** MDA-MB-231 cell viability of B and C group was significantly lower than that of D group ($t=8.845\sim 11.654, P<0.05$). Migration and chemotaxis abilities of B group and C group were decreased than those of D group ($t=6.054\sim 12.412, t=8.654\sim 10.214, P<0.05$), and there was no difference between A group and D group ($t=1.025\sim 1.124, P>0.05$). **Conclusion** Ropivacaine could restrain the viability and migration abilities of breast cancer cells depending on its different concentrations.

Keywords: ropivacaine; breast cancer; migration; chemotaxis

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤, 约占女性新发癌症总数的一半以上^[1]。临床主要采用盐酸罗哌卡因对乳腺肿物局麻, 进而切除乳腺包块。盐酸罗哌卡因的使用对乳腺组织病理诊断是否存在潜在的影响, 已得到学术界的普遍关注。有文献报道罗哌卡因对体外培养的乳腺癌细胞增殖和细胞周期有抑制作用^[2]。其对乳腺癌细胞的运动行为学是否存在影响未见国内外详实报道。本研究对体外培养的乳腺癌细胞采用不同浓度的盐酸罗哌卡因进行作用, 观察乳腺癌细胞的生长情况, 研究罗哌卡因的不同作用浓度对乳腺癌细胞运动功能的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所提供)。

1.2 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基(RP-

MI-1640 Medium, Hyclone 公司); 盐酸罗哌卡因注射液(齐鲁制药有限公司); 超净工作台(中国 Air Tech); Boyden 小室(美国 Millipore 公司); 细胞培养板(美国康宁公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组: 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在 37℃, 5 ml/dl CO₂ 条件常规传代培养。当细胞生长处于对数生长期时, 制成细胞悬浮溶液, 调整细胞计数浓度为 $1\times 10^5/\text{ml}$, 随机分组加入不同剂量盐酸罗哌卡因, 即低剂量组 150 $\mu\text{g/ml}$ (A 组); 中剂量组 250 $\mu\text{g/ml}$ (B 组); 高剂量组 450 $\mu\text{g/ml}$ (C 组)。设空白对照组 (D 组)。继续常规培养 48 h 后进行细胞相关的运动行为学检测。

1.3.2 MTT 实验: 将对照组和给药组细胞分别种植到同一个 96 孔板中, 每孔细胞数相同, 共种植两块板。接种细胞的培养板分别在 24 h 和 48 h

* 作者简介: 唐努尔·艾尔肯(1975—), 女, 副主任医师, 主要从事临床麻醉工作。

取出,在每个含有细胞的孔中加入甲基噻唑基四唑工作液 20 μ l,培养 3 h 后吸干上层溶液,再加入终止液 100 μ l/孔,室温混合 5 min,紫外分光光度计 580 nm 测 A 值计算细胞抑制率。

1.3.3 划痕实验:把加入不同剂量罗哌卡因的乳腺癌细胞(浓度为 5×10^5 /ml)培养皿孵育过夜,以能铺满细胞为佳。每隔 1 cm 划横线一道,横穿过孔。用 PBS 洗悬浮的死细胞,饥饿培养分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 测量细胞迁移距离,每个时间点测量三次取均值,绘制曲线。

1.3.4 趋化运动实验:将加入不同剂量盐酸罗哌卡因的单细胞制成浓度为 5×10^3 个悬液加入 Boyden 小室的上室中,24 孔细胞培养板中每孔加入含有 20 ml/dl 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 800 ml,将小室放入培养液中,做 3 个复孔,将 24 孔培养板放入 37℃ 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 min,刮除上膜面,5 ml/dl 的戊二醛室温固定 10 min,结晶紫染色 30 min,用 PBS 缓冲液漂洗小室,室温晾干,在显微镜下计数并照相。

1.4 统计学分析 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据资料用 SPSS 11.0 软件进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞的生长影响 应用 MTT 法检测细胞生长情况,结果显示与空白对照组相比,培养 24 h 后低剂量盐酸罗哌卡因组 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率大约 3%,48 h 后 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率大约 8%。中剂量盐酸罗哌卡因组 24 h 细胞生长的抑制率大约 20%,48 h 后大约 28%。高剂量盐酸罗哌卡因组 24 h 细胞生长的抑制率大约 30%,48 h 后大约 40%。可见低剂量盐酸罗哌卡因组乳腺癌细胞生长不受影响,而中剂量和高剂量盐酸罗哌卡因组乳腺癌细胞生长受到较大的抑制,与对照组比较差异有统计学意义($t = 8.845 \sim 11.654, P < 0.05$)。

2.2 不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 见图 1。依据不同剂量盐酸罗哌卡因作用时间点测量迁移距离,对细胞的运动情况进行观察。结果发现 24 h 后,对照组划痕两侧细胞几乎愈合,而加入不同剂量盐酸罗哌卡因的 MDA-MB-231 细胞经划痕后两侧细胞仍有距离,且距离的大小与加入盐酸罗哌卡因剂量高低具有一致性,即与对照组相比高剂量组 MDA-MB-231 细胞“伤口”愈合的最慢,中剂量组次之,与对照组比较差异均有统计学意义($t = 6.054 \sim 12.412, P < 0.05$)。低剂量组 MDA-MB-231 细胞

“伤口”基本愈合,差异无统计学意义($t = 1.124, P > 0.05$)。

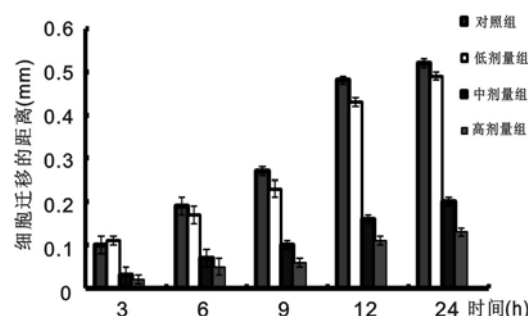


图 1 不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞的迁移影响

2.3 不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞的趋化运动影响 见图 2。

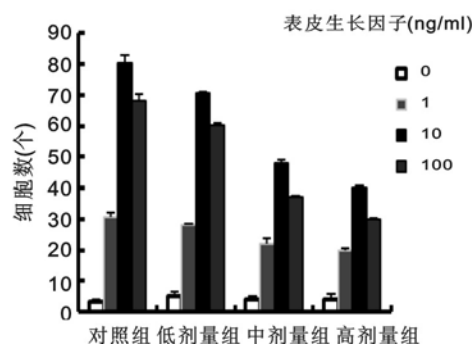


图 2 不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞的趋化运动影响

采用以 mic-Boyden 小室为基础的实验方法检测不同剂量盐酸罗哌卡因对 MDA-MB-231 细胞趋化运动的影响。在不同浓度的表皮生长因子刺激下,中剂量组和高剂量组的盐酸罗哌卡因能明显的降低 MDA-MB-231 细胞的趋化运动能力。与空白对照组相比差异有统计学意义($t = 8.654 \sim 10.214, P < 0.05$)。低剂量组的盐酸罗哌卡因对乳腺癌细胞的趋化运动几乎无影响($t = 1.025, P > 0.05$)。

3 讨论 肿瘤的发生是一个较复杂的病变过程。临床治疗手段主要依靠手术对肿物切除。如今麻醉药物种类较多,对手术效果所起的作用不尽相同。有些麻醉药物的使用会加大患者应激反应,同时激发患者免疫系统释放多种细胞介质参与肿瘤细胞的转归^[3]。有效地控制患者的疼痛,以减少免疫应答缺乏引发的癌细胞增殖及转移显得尤为重要。

近年来乳腺癌的发生已严重影响妇女的生存,更导致生活质量的下降。临床乳腺包块切除时医生通常使用盐酸罗哌卡因作为麻醉剂。它是一种新型长效酰胺类局麻药,其生物安全性已得到同行的认可。麻醉剂量的最佳使用是近年来关注的焦点。本研究通过乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外

生物行为学实验发现,低剂量盐酸罗哌卡因对乳腺癌细胞的生长及迁移没有影响,中剂量和高剂量组能有效地抑制乳腺癌细胞的生长及迁移速度。且乳腺癌细胞的抑制率高低与盐酸罗哌卡因的使用具有剂量依赖性。即高剂量的盐酸罗哌卡因对乳腺癌细胞的运动行为抑制效果更明显。

肿瘤治疗效果好的关键是癌细胞的增殖受到抑制,远端转移率得到遏制。所以选择那些既能提供较好的镇痛效果,又能抑制肿瘤生长及转移的麻醉药物是肿瘤治疗的重要研究方向。

本研究为临床更好地使用盐酸罗哌卡因作为麻醉剂提供了实验依据。不同患者麻醉剂的使用剂量不可千篇一律。肿瘤治疗正朝着个体化治疗方向迈进,因此麻醉剂量的合理化使用应引起临床医生的高度重视。

参考文献:

- [1] Browaeys-Poly E, Perdereau D, Lescuyer A, et al. Akt interaction with PLC(gamma) regulates the G(2)/M transition triggered by FGF receptors from MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(12): 4965-4969.
- [2] 夏明, 王少华, 童建华, 等. 不同浓度罗哌卡因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和细胞周期的作用研究[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(7): 680-683.
Xia M, Wang SH, Tong JH, et al. The effect of ropivacaine on proliferation and cell cycle of human breast cancer MCF-7 cells[J]. *J Clin Anesthesiol*, 2016, 32(7): 680-683.
- [3] Sala G, Dituri F, Raimondi C, et al. Phospholipase C gamma 1 is required for metastasis development and progression[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10187-18196.

收稿日期: 2017-02-26

修回日期: 2017-03-27

(上接 127 页)以在镜下直接观察到菌落为依据,可提供确诊报告;液体培养敏感度高,并且可以提供快速药敏报告;两者优势互补,提高培养准确率。目前报道的联合培养方案主要有两种:其一是^[3],原代培养单独采用液体培养,继而筛选阳性培养液转种固体培养基继续培养,以转种固体培养为最终结果。其二是^[4,5]通过固体与液体平行培养完成支原体鉴定与药敏,以固体培养为最终鉴定结果。该两种联合培养方案(旧培养方案)均是仅包含一次固体培养步骤。

本实验研究发现,原代固体培养与转种固体培养有较大差异率:其一,假阳性培养液(固体与液体原代培养同时检出支原体,但种类不同)经转种固体培养检出的支原体种类可能与固体原代培养不同,或者经转种固体培养变为阴性;其二,假阳性培养液(固体原代培养阴性)经转种固体培养可能被证实为真阳性。这说明旧培养方案因仅仅采用单次固体培养而无法包含两次固体培养结果,容易导致支原体漏检,综合两次固体培养结果比单次固体培养检出率高。本研究设计的新联合培养方案,合计原代固体培养与转种固体培养结果(总体固体培养)为最终鉴定结果,相对单次固体培养能检出更多支原体,提高了敏感度;又因为以固体培养为结果,能够纠正液体培养的假阳性,特异度高。因此,新方案提高了支原体培养的准确度。虽然新方案较旧方案多耗费一些试剂与时间,但无须特殊设备与昂贵试剂,具有很好的实用价值。

当然,本实验也存在一些缺陷:①考虑到两次固体培养结果不一致,若将原代培养真阳性(固体

与液体原代培养支原体同时阳性)的培养液进行转种固体培养,预计能够检出更多种(两次固体培养均阳性,但是支原体种类不同)支原体。②支原体培养所需的最适时间尚须进一步研究。

参考文献:

- [1] 张德庆, 张萌, 李忠培, 等. 解脲支原体感染对男性不育者精浆活性氧与细胞因子的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1): 44-46, 51.
Zhang DQ, Zhang M, Li ZP, et al. Influence of seminal plasma reactive oxygen species and cell factors in infertile men with *Ureaplasma urealyticum* infection[J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(1): 44-46, 51.
- [2] Kim JK. Epidemiological trends of sexually transmitted infections among women in Cheonan, South Korea, 2006 ~ 2012[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2013, 23(10): 1484-1490.
- [3] 张红升, 韩晶. 支原体液体培养法假阳性原因探讨[J]. *检验医学*, 2012, 27(4): 316-318.
Zhang HS, Han J. The discussion of false positive of broth culture for *Mycoplasma*[J]. *Laboratory Medicine*, 2012, 27(4): 316-318.
- [4] 潘新娣, 施前锋, 邵伟芳. 支原体属固体与液体培养相结合在临床感染诊断中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(4): 949-951.
Pan XD, Shi QF, Shao WF. *Mycoplasma* solid culture combined with liquid culture in clinic diagnosis of infections[J]. *Chin J Nosocomiol*, 2013, 23(4): 949-951.
- [5] 周运恒, 马红霞, 曹广亚, 等. 两种培养方法检测解脲支原体及其菌落形态学的比较研究[J]. *检验医学*, 2013, 28(5): 362-365.
Zhou YH, Ma HX, Cao GY, et al. Comparison study on the determination of colony morphology of *Ureaplasma urealyticum* by two kinds of culture media[J]. *Laboratory Medicine*, 2013, 28(5): 362-365.

收稿日期: 2016-06-30

修回日期: 2017-03-12