

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.02.008

基于肝癌细胞线粒体功能受损和 caspase-3 信号通路 探讨罗哌卡因促进肝癌细胞凋亡的作用机制研究*

王侃¹ 程志¹ 吕刚飞² 刘志飞³ 张蕾¹ 刘星汝¹(1 枣庄矿业集团中心医院检验科 山东 枣庄 277800; 2 枣庄矿业集团中心医院肝病科 山东 枣庄 277800;
3 山东省立医院病理科 山东 济南 250021)

摘要 目的:基于肝癌细胞线粒体功能受损和天冬氨酸蛋白水解酶 3(caspase-3)信号通路探讨罗哌卡因促进肝癌细胞凋亡的作用机制。**方法:**选用细胞株人肝癌细胞 BEL-7402 进行实验研究。用不同浓度罗哌卡因处理 BEL-7402 细胞后,采用溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法检测肝癌细胞的增殖情况,光镜及 4,6-二苯胺-2-苯咪唑二盐酸盐(DAPI)溶液染色观察细胞形态,台盼蓝染色法测定细胞活力,流式细胞术分析 BEL-7402 细胞的凋亡情况,电子显微镜下观察细胞线粒体,激光共聚焦显微镜观察 caspase-3 在 BEL-7402 细胞中的细胞核迁移情况,蛋白免疫印迹试验评价罗哌卡因对细胞质凋亡相关蛋白、线粒体凋亡相关蛋白、BEL-7402 细胞和线粒体凋亡相关蛋白表达的影响。**结果:**罗哌卡因能够抑制肝癌细胞的生长,并呈剂量依赖性和时间依赖性。罗哌卡因可诱导 BEL-7402 细胞发生凋亡,显著增加 BEL-7402 细胞的凋亡率。罗哌卡因能够损伤肝癌细胞线粒体功能。激光共聚焦显微镜观察显示 caspase-3 分子迁移到细胞核。罗哌卡因与 caspase-3 相互作用,促进 caspase-3 向细胞核内迁移,刺激 caspase-3 和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP-1)、天冬氨酸蛋白水解酶 9(caspase-9)蛋白的表达,抑制 B 细胞淋巴瘤-2 基因(Bcl-2)的表达,促进凋亡酶激活因子(Apaf-1)的表达,促进线粒体释放细胞色素 C(Cytochrome C),激活 caspase-3 活性。**结论:**罗哌卡因具有促进肝癌细胞凋亡的作用,其作用机制可能与破坏肝癌细胞线粒体功能和激活 caspase-3 信号通路有关。

关键词:罗哌卡因;肝癌细胞;线粒体;caspase-3;凋亡

中图分类号:R-33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)02-244-07

To Investigate the Mechanism of Ropivacaine Promoting Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells Based on Mitochondrial Function Impairment and Caspase-3 Signaling Pathway*

WANG Kan¹, CHENG Zhi¹, LÜ Gang-fei², LIU Zhi-fei³, ZHANG Lei¹, LIU Xing-ru¹

(1 Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong, 277800, China;

2 Department of Hepatology, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong, 277800, China;

3 Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan, Shandong, 250021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of ropivacaine promoting apoptosis of hepatoma carcinoma cell based on mitochondrial dysfunction and caspase-3 signaling pathway. **Methods:** Human hepatoma carcinoma cell line BEL-7402 was used for experimental study. After Bel-7402 cells were treated with different concentrations of ropivacaine, the proliferation of hepatoma carcinoma cell was detected by MTT method, the cell morphology was observed by light microscopy and DAPI solution staining, the cell viability was determined by trypan blue staining, the apoptosis of Bel-7402 cells was analyzed by flow cytometry, and the mitochondria were observed under electron microscopy. The nuclear migration of caspase-3 in Bel-7402 cells was observed by laser confocal microscopy, and the effects of ropivacaine on the expression of cytoplasmic apoptosis-related proteins, mitochondrial apoptosis-related proteins, Bel-7402 cells and mitochondrial apoptosis-related proteins were evaluated by western blot assay. **Results:** Ropivacaine can inhibit the growth of hepatoma carcinoma cell in a dose-dependent and time-dependent manner. The apoptosis of Bel-7402 cells was induced by ropivacaine, and the apoptosis rate of Bel-7402 cells was significantly increased. Ropivacaine can injure mitochondrial function of hepatoma carcinoma cells. Laser confocal microscopy showed the migration of caspase-3 molecules to the nucleus. Ropivacaine interacts with caspase-3 to promote the migration of caspase-3 into the nucleus, stimulate the expression of caspase-3, PARP-1 and caspase-9 proteins, inhibit the expression of Bcl-2, promote the expression of APAF-1, promote mitochondria to release Cytochrome C and activate caspase-3 activity. **Conclusion:** Ropivacaine can promote the apoptosis of hepatoma carcinoma cell, and its mechanism may be related to the destruction of mitochondrial function and activation of caspase-3 signaling pathway.

Key words: Ropivacaine; Hepatoma carcinoma cell; Mitochondria; Caspase-3; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)02-244-07

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2017DX0355)

作者简介:王侃(1983-),男,本科,主管技师,研究方向:肿瘤免疫,E-mail: w18963290170@163.com

(收稿日期:2022-05-23 接受日期:2022-06-18)

前言

原发性肝癌近年来发病率逐渐上升,是常见的恶性肿瘤之一,发展迅速,是我国第4位常见恶性肿瘤及第2位肿瘤致死病因,严重威胁我国人民的生命和健康,目前主要治疗方法有手术切除、化疗、介入治疗、消融治疗、肝移植等,但各种治疗方法均具有一定的局限性,治疗效果不尽人意^[1-3]。局部麻醉药具有广泛的治疗功能,不仅具有镇痛和抗心律失常,同时可以预防或减轻急性疼痛、慢性疼痛和癌痛^[4,5]。近年来部分研究显示,局部麻醉药具有一定的抗肿瘤作用,如罗哌卡因、利多卡因、布比卡因等能够有效降低肿瘤切除后复发和转移的风险^[6,7]。局部麻醉药(如罗哌卡因)在一定浓度范围内可抑制细胞增殖、侵袭和迁移,抑制肿瘤细胞的增殖和转移,并促进细胞凋亡,且罗哌卡因能有效抑制特定浓度的肺癌细胞的侵袭性^[8,9]。有研究显示局部麻醉药对肝癌细胞具有抗增殖和诱导凋亡的作用^[10],提示局部麻醉药可抑制肝癌细胞的生长。然而,罗哌卡因诱导肝癌细胞凋亡的潜在机制尚未完全阐明。因此,本研究通过观察罗哌卡因对人肝癌细胞 BEL-7402 增殖和凋亡的影响,探索罗哌卡因促进肝癌细胞凋亡的作用机制,以期对肝癌患者的局部麻醉治疗提供新的见解与策略。

1 资料与方法

1.1 细胞培养

选用细胞株人肝癌细胞 BEL-7402 进行实验研究,购于上海欧易生物医学科技有限公司。将细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-160 培养基中,并置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2 MTT 法检测细胞增殖

利用溴化噻唑蓝四氮唑(MTT,上海前尘生物科技有限公司)法检测细胞增殖。制成 $1.5 \times 10^4 \cdot L^{-1}$ 的 BEL-7402 细胞悬液,接种于 96 孔板,在 RPMI-1640 培养基中添加 10% 胎牛血清,并置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h,然后用不同浓度的罗哌卡因处理(0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L 和 4.0 mmol/L)24 h、48 h 和 72 h。以不加罗哌卡因处理为空白对照组。然后采用 MTT 法检测肝癌细胞的增殖情况。

1.3 镜检观察细胞形态,DAPI 染色细胞核

将 BEL-7402 细胞以每孔 2.0×10^4 个细胞置于 24 孔板中。在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养 48 h,置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养,然后用 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 或 2.0 mmol/L 罗哌卡因处理。处理 48 h 后,光镜下观察细胞形态,用 4,6-二苯胺-2-苯吡啶二盐酸盐(DAPI)溶液染色。细胞在 100 倍的荧光显微镜下成像。

1.4 台盼蓝染色法测定细胞活力和代谢活性

为测定细胞活力,将 BEL-7402 细胞以每孔 2.5×10^4 个细胞接种于 6 孔板,在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养 48 h。用不同浓度的罗哌卡因(0.5-2.0 mmol/L)处理 48 h 后,采用台盼蓝染色法测定细胞活力,使用台盼蓝染色细胞活力测定试剂盒(海门碧云天生物技术有限公司)。正常的活细胞,胞膜结构完整,能够排斥台盼蓝,使之不能进入胞内,而丧失活性或细胞膜不完整的细胞,可被

台盼蓝染成蓝色。细胞活力比 = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100%。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将 BEL-7402 细胞培养于添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。将细胞用 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 或 2.0 mmol/L 罗哌卡因处理 48 h,用流式细胞术分析 BEL-7402 细胞的凋亡情况。

1.6 电子显微镜观察

将 BEL-7402 细胞培养于添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养。细胞用 2.0 mmol/L 罗哌卡因处理 48 h,然后收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液冲洗 2 次(4℃,10 mL 持续 8 min),转移到 1.5 mL 离心管中。用 PBS 洗涤 3 次(15 min/次),然后用 1% 锇酸(60 min)和 2% 醋酸铀酰(30 min)固定。不同浓度乙醇脱水后,将细胞在纯丙酮和包埋介质(1:1)中浸泡 60 min,然后单独浸泡在包埋介质中 60 min。样品在 37℃ 烘箱中烘干 24 h、45℃ 烘箱中烘干 24 h、60℃ 烘箱中烘干 48 h。制作超薄切片(0.1 μm)并在电子显微镜下观察。每组随机选取 10 个细胞观察线粒体。

1.7 激光共聚焦显微镜观察

将 BEL-7402 细胞固定在 4% 多聚甲醛中,与小鼠抗人天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体孵育 12 h。异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的次级抗小鼠免疫球蛋白 G 孵育 2 h,然后加入 100 μL DAPI(1 μg/mL)30 min。采用激光共聚焦显微镜观察细胞。

1.8 蛋白免疫印迹试验

蛋白免疫印迹试验评价罗哌卡因对细胞质凋亡相关蛋白、BEL-7402 细胞和线粒体凋亡相关蛋白表达的影响。用 2.0 mmol/L 罗哌卡因治疗 BEL-7402 细胞 48 h,细胞凋亡相关蛋白如活化 caspase-3 (cleaved caspase-3)、活化 PARP-1 (cleaved-PARP-1)、B 细胞淋巴瘤-2 基因(Bcl-2)、凋亡酶激活因子(Apaf-1)、cleaved-caspase-9 和细胞色素 C(Cytochrome C)在 BEL-7402 细胞中的表达采用蛋白免疫印迹试验分析。提取细胞总蛋白,BCA 法定量检测样品蛋白含量。然后在蛋白样品中加入 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,加入一抗孵育过夜(4℃),TBST 洗膜 3 次,加入二抗孵育 2 h(室温),TBST 洗膜 3 次,用 ImageJ 图像分析软件对图中印迹条带进行定量分析。

1.9 caspase-3 活性分析

BEL-7402 细胞分别用罗哌卡因(2.0 mmol/L)或 caspase-3 抑制剂(Z-DEVD-FMK)1.0 μmol/L 处理 48 h。按照 caspase-3 活性检测试剂盒(海门碧云天生物技术有限公司)说明书进行相关具体操作。

1.10 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗哌卡因能抑制肝癌细胞的生长

如表 1 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,在 24 h、48 h、72 h

三个时间段中,随着罗哌卡因浓度(0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L 和 4.0 mmol/L)的增加,肝癌细胞增殖逐渐降低,且随时间延长,在罗哌卡因浓度为1.0 mmol/L、2.0

mmol/L 和 4.0 mmol/L 中肝癌细胞增殖降低最显著,且差异均有统计学意义($P<0.05$)。上述结果提示罗哌卡因能够抑制肝癌细胞的生长,并呈剂量依赖性和时间依赖性。

表 1 罗哌卡因对 BEL-7402 和 HLE 细胞生长的影响
Table 1 Effects of ropivacaine on the growth of BEL-7402 and hle cells

Groups	Hepatoma cell proliferation(%)		
	24 h	48 h	72 h
Control group(0 mmol/L)	78.63± 3.30	91.52± 3.64	125.91± 4.85
Ropivacaine 0.25 mmol/L	70.84± 2.75	101.20± 5.71	131.05± 5.21
Ropivacaine 0.5 mmol/L	65.77± 2.64	80.61± 4.25*	105.61± 4.46*
Ropivacaine 1.0 mmol/L	56.91± 2.51*	62.07± 3.14*	71.56± 3.10*
Ropivacaine 2.0 mmol/L	54.82± 2.57*	41.87± 3.05*	18.94± 2.10*
Ropivacaine 4.0 mmol/L	51.07± 2.50*	23.06± 2.01*	11.52± 1.52*
F value	2.674	56.397	81.063
P value	0.531	0.000	0.000

Note: Compared with the control group (0 mmol/L), * $P<0.05$.

2.2 罗哌卡因促进肝癌细胞凋亡

如图 1 所示,用不同浓度罗哌卡因(0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L)处理 BEL-7402 细胞 48 h 后,可在罗哌卡因浓度为 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 中观察到凋亡细胞形成,细胞核凝结和固缩明显增加,凋亡形成和核收缩等形态学特征明显(红箭);而罗哌卡因(0.5 mmol/L)处理组和对照组(0 mmol/L)的细胞变化不大。表明罗哌卡因(1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L)处理后,BEL-7402 细胞发生了形态学改变,提示罗哌卡因可诱导 BEL-7402 细胞发生凋亡。如图 2 所示,用不同浓度罗哌卡因(0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L)处理

BEL-7402 细胞后,可在罗哌卡因浓度为 1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 中观察到细胞被台盼蓝染成蓝色;而罗哌卡因(0.5 mmol/L)处理组和对照组(0 mmol/L)的细胞变化不大。如表 2 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,罗哌卡因(0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L)处理 BEL-7402 细胞后,细胞凋亡率增加,以罗哌卡因(1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L)处理组显著,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明罗哌卡因(1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L)处理后,BEL-7402 细胞凋亡率显著增加。上述结果提示罗哌卡因具有促进肝癌细胞凋亡的作用。

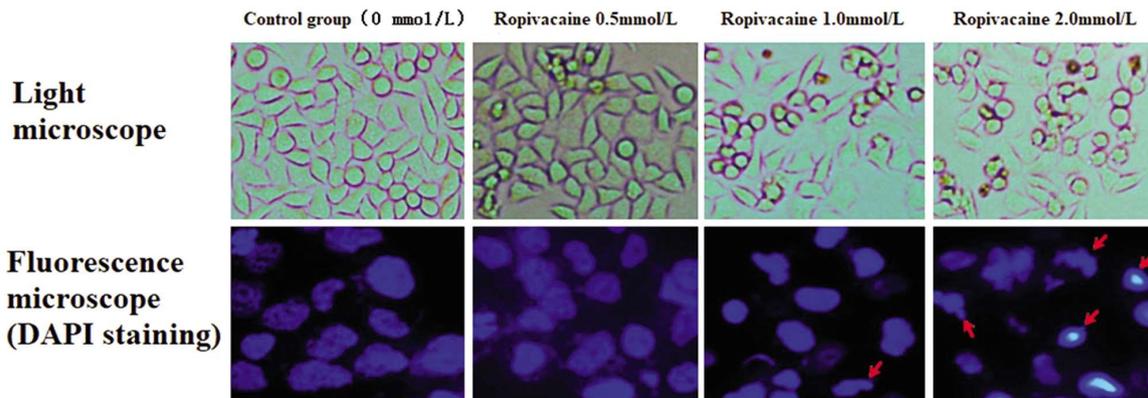


图 1 罗哌卡因对 BEL-7402 细胞凋亡小体发生的影响

Fig.1 Effect of ropivacaine on apoptotic bodies of BEL-7402 cells

2.3 罗哌卡因损伤肝细胞线粒体功能

如图 3 所示,罗哌卡因 2.0 mmol/L 处理 BEL-7402 细胞 48 h 后,可见凋亡细胞,凋亡的肝癌细胞线粒体肿胀、嵴断裂。提示罗哌卡因能够损伤肝癌细胞线粒体功能。

2.4 罗哌卡因刺激肝癌细胞 caspase-3 活性,促进凋亡相关蛋白表达

如图 4 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,罗哌卡因 2.0

mmol/L 处理 BEL-7402 细胞 48 h 后,激光共聚焦显微镜观察显示 caspase-3 分子迁移到细胞核。如图 5、表 3 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,罗哌卡因 2.0 mmol/L 处理 BEL-7402 细胞 48 h 后,cleaved caspase-3 和 cleaved-PARP-1 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。如图 6、表 4 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,罗哌卡因 2.0 mmol/L 处理 BEL-7402 细胞后,Apaf-1、caspase-9 和 Cy-

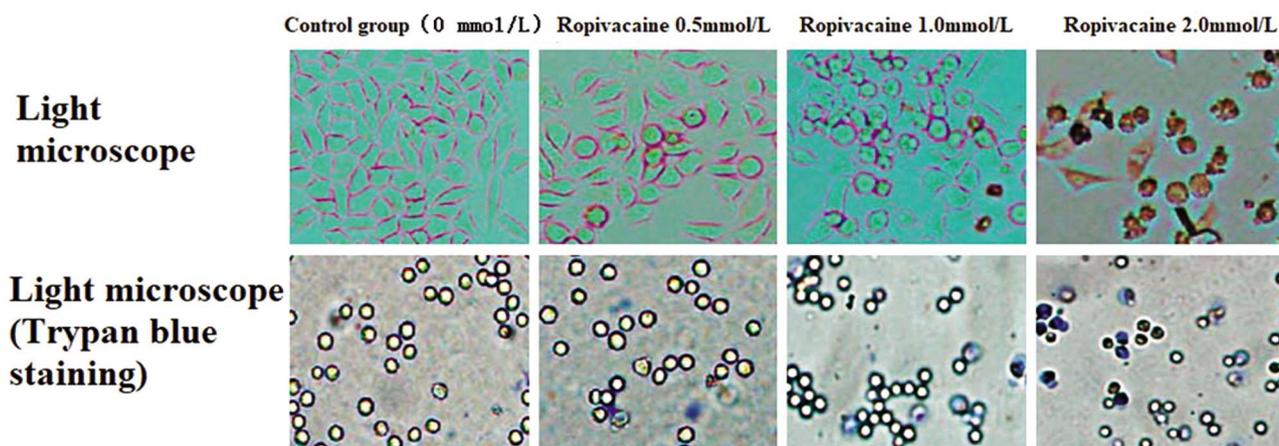


图2 罗哌卡因对 BEL-7402 细胞细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of ropivacaine on apoptosis of BEL-7402 cells

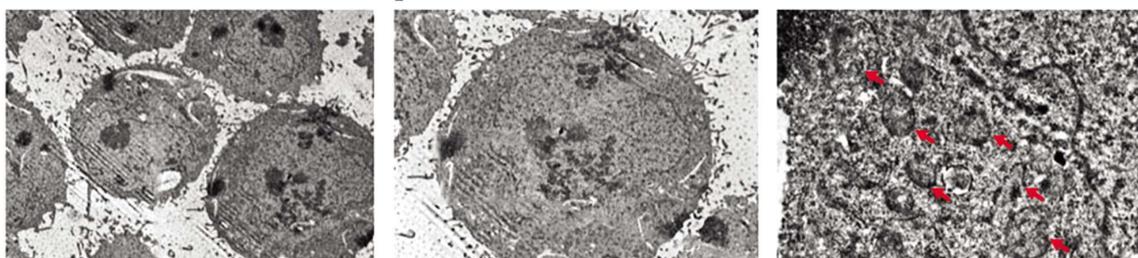
表2 罗哌卡因对 BEL-7402 细胞细胞凋亡率的影响

Table 2 Effect of ropivacaine on apoptosis rate of BEL-7402 cells

Groups	Apoptosis rate(%)
Control group(0 mmol/L)	3.05± 0.30
Ropivacaine 0.5 mmol/L	6.31± 0.50*
Ropivacaine 1.0 mmol/L	31.08± 2.64*
Ropivacaine 2.0 mmol/L	56.72± 3.57*
F value	52.064
P value	0.000

Note: Compared with the control group (0 mmol/L), * $P < 0.05$.

Normal expression of mitochondria in BEL-7402 cells



Mitochondrial expression in BEL-7402 cells treated with 2.0mmol/l ropivacaine

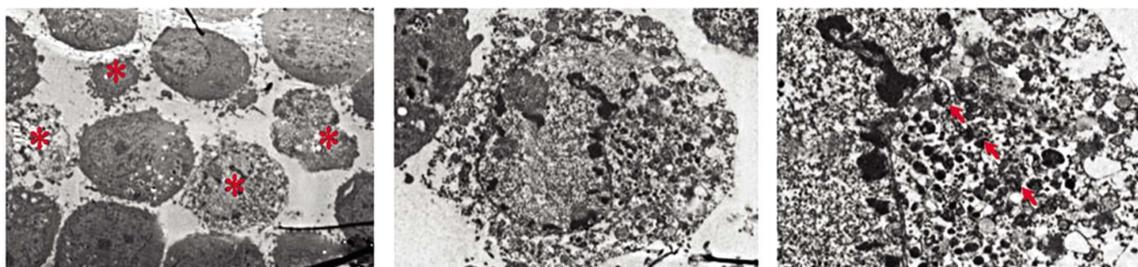


图3 罗哌卡因对 BEL-7402 细胞线粒体功能的影响

Fig.3 Effect of ropivacaine on mitochondrial function of BEL-7402 cells

Note: *means apoptotic cell, red arrow means mitochondria.

tochrome C 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。如表 5 所示,与对照组(0 mmol/L)比较,罗哌卡因 2.0 mmol/L 处理 BEL-7402 细胞后,caspase-3 活性明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果提示罗哌卡因与 caspase-3 相交互

用,促进 caspase-3 向细胞核内迁移,刺激 caspase-3 和 PARP-1、caspase-9 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 的表达,促进 Apaf-1 的表达,促进线粒体释放 Cytochrome C,激活 caspase-3 活性,从而促进肝癌细胞线粒体凋亡相关蛋白的表达。

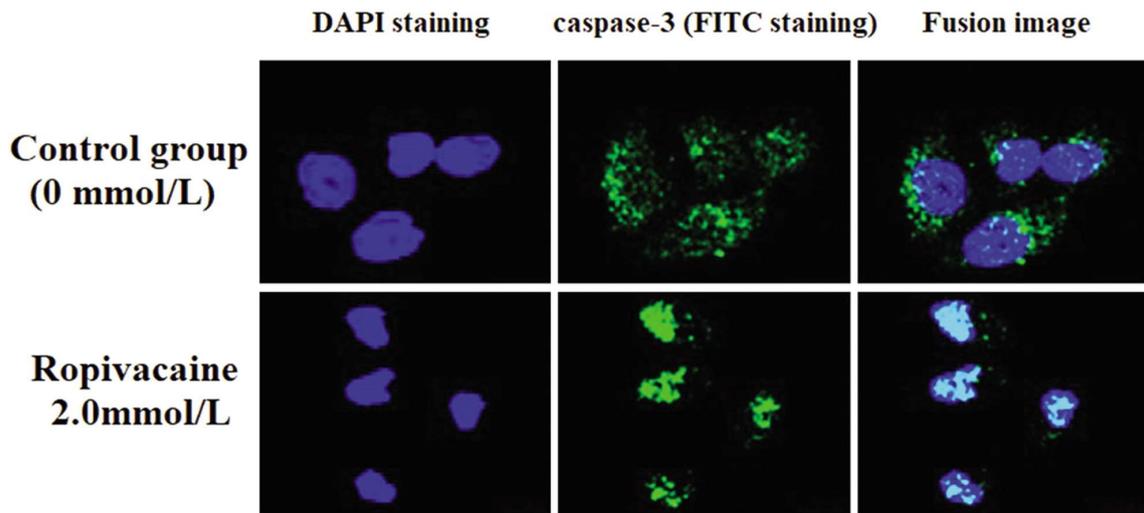


图4 激光共聚焦显微镜观察 caspase-3 在 BEL-7402 细胞中的细胞核迁移情况

Fig. 4 The nuclear migration of Caspase-3 in BEL-7402 cells observed by laser confocal microscopy

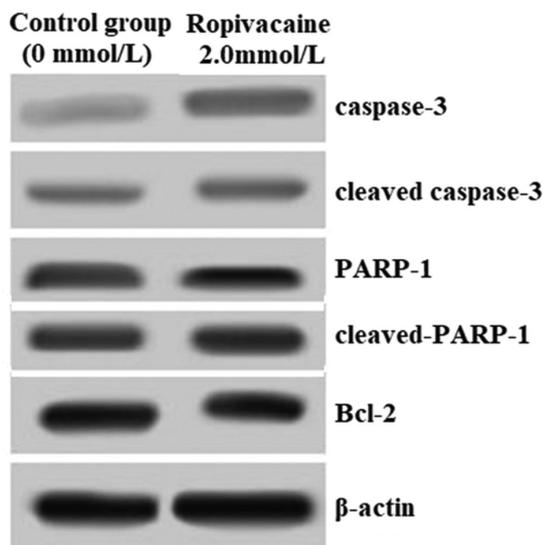


图5 caspase-3、cleaved caspase-3、PARP-1、cleaved-PARP-1 和 Bcl-2 的蛋白表达

Fig.5 Protein expression of caspase-3, cleaved caspase-3, PARP-1, cleaved-PARP-1 and Bcl-2

3 讨论

罗哌卡因是临床上常应用的局部麻醉药物之一,具有对心脏毒性小、作用时间长、麻醉效果确切等优点,可降低乳腺癌、甲状腺癌等多种肿瘤细胞的增殖能力^[11-13]。有研究认为局部麻醉刺激癌细胞凋亡可能与钠通道阻断无关^[14],而有研究报道局部麻醉的作用是抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的转导^[15]。罗哌卡因对肿瘤细胞的凋亡有一定的诱导作用,还具有刺激某些癌细胞凋亡的能力^[8-10],但究竟是什么因素决定了其凋亡能力尚不清楚。唐努尔·艾尔肯等^[16]研究表明罗哌卡因可呈剂量依赖性降低乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生长和迁移能力。在本研究结果表明,罗哌卡因能够抑制肝癌细胞的生长,并呈剂量依赖性和时间依赖性,且在罗哌卡因浓度 ≥ 1.0 mmol/L 时其抑制肝癌细胞的增殖最显著,显著增加 BEL-7402 细胞的凋亡率。说明罗哌卡因可抑制肝癌细胞增殖,并诱导其凋亡,是治疗肝癌的潜在药物。

线粒体通过促进碳水化合物的代谢为细胞的生长提供能量。线粒体功能损伤可导致细胞死亡或凋亡,肿胀和嵴断裂表

表3 cleaved caspase-3、cleaved-PARP-1 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Protein expression levels of cleaved caspase-3, cleaved-PARP-1 and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s$)

Groups	cleaved caspase-3	cleaved-PARP-1	Bcl-2
Control group(0 mmol/L)	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.25 \pm 0.03
Ropivacaine 2.0 mmol/L	0.29 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01
T value	98.251	72.064	88.205
P value	0.000	0.000	0.000

明线粒体功能缺失^[17-19]。肝癌细胞的恶变可能与部分基因表达失调有关,线粒体凋亡通路可直接或间接调控肝癌相关基因表达,从而引起肝癌细胞凋亡^[20-22]。本研究电镜观察显示,罗哌卡因作用于 BEL-7402 细胞时,线粒体肿胀,嵴断裂。表明罗哌卡因促进了肝癌细胞的凋亡,参与了线粒体结构的破坏和线粒体功能的抑制。Caspase-3 是促进肿瘤细胞凋亡的重要分子,是细

胞凋亡的关键执行者,具有不可替代的作用^[23,24]。Caspase-3 被称之为 " 死亡执行蛋白酶 ",是凋亡途径的效应分子,在线粒体介导细胞的凋亡途径中受凋亡信号的刺激下,其上游信号分子作用于线粒体膜,线粒体膜通透性发生改变,致使线粒体内膜蛋白如 Cytochrome C 等从线粒体释放到细胞质中,引起下游 caspase 家族蛋白活化或者直接作用,引起一系列的酶激反应,

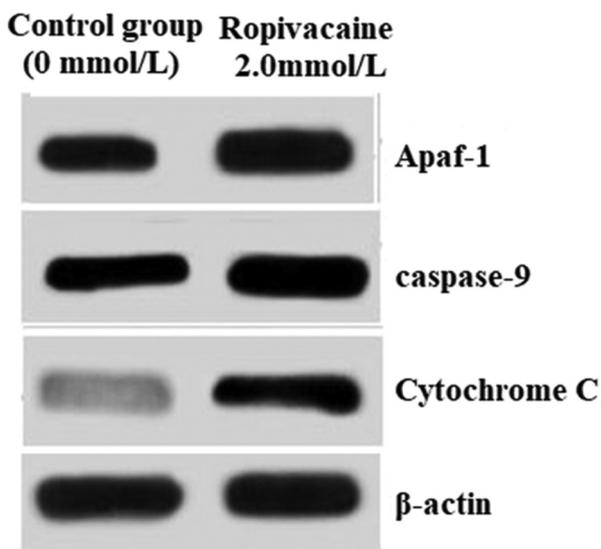


图 6 Apaf-1, caspase-9 和 Cytochrome C 的蛋白表达
Fig.6 Protein expression of Apaf-1, caspase-9 and Cytochrome C

继而激活 caspase-3,启动级联反应,引起细胞凋亡^[25,26]。Cleaved caspase-3 是 caspase-3 的活性形式,是促进细胞凋亡的主要裂解酶^[27]。凋亡过程中 PARP-1 可被 caspase-3 剪切,参与 DNA 损伤和修复,剪切的 PARP-1 导致细胞凋亡^[28]。Xu J 等^[29]研究发现,促癌基因 PAK1 以及抗凋亡分子 Bcl-2 的上调可使肝癌细胞拮抗线粒体通路介导的失巢凋亡,进而促进肝癌的发展。Bcl-2 对 caspase-3 活性有抑制作用,但是 Apaf-1 能够激活 caspase-9^[30]。裂解型 caspase-9(活化形式)和 Cytochrome C 能够激活 caspase-3^[28]。Ma Y 等^[31]研究发现,腺苷酸可激活 caspase、caspase-3、caspase-8、caspase-9 及 PARP 等效应分子,促进 Bak 的募集,下调 Bcl-x 等的表达,诱导线粒体释放 Cytochrome C 等进入胞质,继而促进肝癌细胞凋亡。本研究结果显示,罗哌卡因与 caspase-3 相互作用,促进 caspase-3 向细胞核内迁移,刺激 caspase-3 和 PARP-1、caspase-9 蛋白的表达,抑制 Bcl-2 的表达,促进 Apaf-1 的表达,促进线粒体释放 Cytochrome C,激活 caspase-3 活性,从而能够促进肝癌细胞线粒体凋亡相关蛋

表 4 Apaf-1、caspase-9 和 Cytochrome C 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Protein expression levels of Apaf-1, caspase-9 and Cytochrome C($\bar{x} \pm s$)

Groups	Apaf-1	caspase-9	Cytochrome C
Control group(0 mmol/L)	1.00± 0.01	1.00± 0.01	0.25± 0.01
Ropivacaine 2.0 mmol/L	1.25± 0.01	1.62± 0.02	0.73± 0.01
T value	38.274	59.967	52.067
P value	0.000	0.000	0.000

表 5 Caspase-3 活性(%)

Table 5 Caspase-3 activity(%)

Groups	caspase-3
Control group(0 mmol/L)	100.00± 1.00
Ropivacaine 2.0 mmol/L	478.34± 14.05
Z-DEVD-FMK(1.0 μmol/L)	25.84± 2.68
F value	106.845
P value	0.000

白的表达。有研究发现罗哌卡因抑制癌细胞生长和生存涉及抑制细胞周期相关基因的表达和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的转导^[32]。Kang DK 等^[33]发现罗哌卡因具有细胞毒性,其作用方式取决于罗哌卡因的作用时间和浓度,并且细胞的凋亡是通过 caspase-3 和 caspase-8 的活性介导。罗哌卡因对细胞凋亡的影响同时可通过调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达量来实现^[34]。因此,若线粒体功能受损,线粒体介导的凋亡通路失调,caspase-3 信号通路激活,肝癌蛋白的表达亦会发生异常,从而促进肝癌的发生、发展。上述结果表明,罗哌卡因诱导的肝癌细胞凋亡与 caspase-3 的激活和线粒体功能的损害密切相关。

综上所述,罗哌卡因促进肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞生长、侵袭和迁移。罗哌卡因通过与 caspase-3 相互作用刺激肝癌细胞凋亡,抑制 caspase-3 活性,破坏线粒体功能。为使用罗哌卡因与其他抗癌药物协同治疗肝癌患者提供了一种新思路。

参考文献(References)

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J].中国实用外科杂志,2020,40(2):121-138
- [2] 格桑旺姆,常中飞,杜雅璐,等.2001-2017年我院原发性肝癌流行病学特征分析[J].中华介入放射学电子杂志,2019,7(3):206-210
- [3] 朱笑生,刘文超.原发性肝癌全球流行情况和危险因素的新进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(14):2297-2301
- [4] Finn DM, Ilfeld BM, Unkart JT, et al. Post-mastectomy cancer recurrence with and without a continuous paravertebral block in the immediate postoperative period: a prospective multi-year follow-up pilot study of a randomized, triple-masked, placebo-controlled investigation[J]. J Anesth, 2017, 31(3): 374-379
- [5] Tamura T, Mori S, Mori A, et al. A randomized controlled trial comparing paravertebral block via the surgical field with thoracic epidural block using ropivacaine for post-thoracotomy pain relief[J]. J Anesth, 2017, 31(2): 263-270
- [6] Zhang Y, Peng X, Zheng Q. Ropivacaine inhibits the migration of esophageal cancer cells via sodium-channel-independent but prenylation-dependent inhibition of Rac1/JNK/paxillin/FAK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 1074-1079
- [7] Yang W, Cai J, Zabkiewicz C, et al. The Effects of Anesthetics on Recurrence and Metastasis of Cancer, and Clinical Implications [J]. World J Oncol, 2017, 8(3): 63-70
- [8] 朱婧,张世平,张文娟,等.盐酸罗哌卡因对胃癌 MGC-803 细胞增殖和凋亡的作用[J].现代肿瘤医学,2020,28(8):1261-1265

- [9] 赖晓红,杨承祥,刘洪珍,等.盐酸罗哌卡因对低氧诱导的肺癌细胞生长和转移能力的影响[J]. 重庆医学, 2020, 49(20): 3337-3341
- [10] Jurj A, Tomuleasa C, Tat TT, et al. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Lidocaine on Human Hepatocarcinoma Cells. A preliminary study[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2017, 26(1): 45-50
- [11] 姬宁宁,夏明,花景煜,等.罗哌卡因对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长、凋亡诱导和周期阻滞的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(21): 3527-3530
- [12] 陈颖,殷佳晗,顾建华,等.罗哌卡因对人甲状腺癌细胞线粒体呼吸作用的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(9): 916-919
- [13] 李福祥,王圆.罗哌卡因抑制 THRIL 对子宫内膜癌细胞增殖、细胞周期和迁移的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(3): 441-444
- [14] Baptista-Hon DT, Robertson FM, Robertson GB, et al. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and NaV1.5 channel function[J]. Br J Anaesth, 2014, 113(1): i39-i48
- [15] Zheng Q, Peng X, Yu H. Local Anesthetic Drug Inhibits Growth and Survival in Chronic Myeloid Leukemia Through Suppressing PI3K/Akt/mTOR[J]. Am J Med Sci, 2018, 355(3): 266-273
- [16] 唐努尔·艾尔肯,阿孜古·祖农.盐酸罗哌卡因对人乳腺癌细胞运动作用的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 128-130
- [17] 贺兴波,陈曼,肖海,等.高迁移率族蛋白 1 激活线粒体生物合成促进二乙基亚硝酸胺诱发小鼠肝癌的形成[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(2): 141-146
- [18] 字友梅,黄琰,张媛,等.小檗碱通过破坏线粒体功能选择性诱导淋巴瘤细胞的凋亡[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(1): 30-37
- [19] 周修明,郑粤洋,陈保东. α -caesalpin 抑制 CSPG4 通路诱导胶质瘤细胞线粒体功能障碍引发凋亡的机制[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2020, 51(2): 168-175
- [20] 闫海力,李金耀,许贯诚,等.吡唑啉酮铜配合物通过内外信号途径诱导人肝癌细胞 BEL-7404 凋亡[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(4): 568-576
- [21] 任艳青,田宇柔,李葆林,等.黄连含药血清联合顺铂对人肝癌 HepG2 细胞增殖与线粒体凋亡途径的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4): 107-111
- [22] 连娇燕,金海,文国容,等.线粒体凋亡通路在肝细胞癌发生、发展中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2016, 56(8): 95-97
- [23] Jeelani R, Chazicharalampous C, Kohan-Ghadr HR, et al. Hypochlorous acid reversibly inhibits caspase-3: a potential regulator of apoptosis[J]. Free Radic Res, 2020, 54(1): 43-56
- [24] 张立,刘江伟,康燕,等.姜黄素预处理对沙漠干热环境中暑大鼠心肌细胞凋亡和 Caspase-3 活性的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(21): 4022-4026
- [25] 余春波,李大玉,范芳,等.线粒体凋亡途径在 DNA-PKcs 抑制肝癌耐药细胞 BEL7402/5-Fu 凋亡中的作用研究[J]. 遵义医学院学报, 2019, 42(3): 260-264
- [26] 尹东亮,卢沛林,尹润龙,等.过表达 PRRX1 通过 p53 介导的线粒体凋亡途径诱导肝癌 SMMC7721 细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(6): 662-668
- [27] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103
- [28] Wang W, Zhu M, Xu Z, et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity[J]. Biol Res, 2019, 52(1): 36
- [29] Xu J, Liu H, Chen L, et al. Hepatitis B virus X protein confers resistance of hepatoma cells to anoikis by up-regulating and activating p21-activated kinase 1[J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 199-212.e4
- [30] 崔宏,高琴琴,王效谦,等.白花蛇舌草注射剂调节 Bcl-2/CytC 信号通路诱导线粒体凋亡抑制肝癌细胞增殖的研究 [J]. 陕西中医, 2019, 40(4): 418-420
- [31] Ma Y, Zhang J, Zhang Q, et al. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 448(1): 8-14
- [32] Le Gac G, Angenard G, Clément B, et al. Local Anesthetics Inhibit the Growth of Human Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. Anesth Analg, 2017, 125(5): 1600-1609
- [33] Kang DK, Zhao LY, Wang HL. Cytotoxic effects of local anesthesia through lidocaine/ropivacaine on human melanoma cell lines[J]. Braz J Anesthesiol, 2016, 66(6): 594-602
- [34] 欧益金,徐世元,张庆国.罗哌卡因惊厥对大鼠海马细胞凋亡及学习记忆能力的影响[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2017, 38(4): 333-337