

# 丙泊酚通过 MAPK/ERK 途径抑制食管癌细胞系 EC9706 中 VEGF 的表达

杨国庆 刘德军

**摘要** 目的 探究丙泊酚对食管癌细胞系 EC9706 中血管内皮生长因子 VEGF 表达情况的影响及相关分子机制。方法 通过蛋白免疫印迹检测人食管癌细胞系 EC9706 与正常食管上皮细胞系 HEEC 中 VEGF 表达情况。分别用不同浓度的丙泊酚 (0、2、6、10  $\mu\text{g/L}$ ) 培养 EC9706, 孵育后, 对各组 EC9706 细胞株行 MTT、流式细胞术、细胞侵袭实验、细胞划痕修复试验, 观察各组细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力; 使用 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹分别检测各组细胞内 VEGF、p38 (MAPK) 和 p44/42 (ERK1/2) 的表达和磷酸化水平。结果 EC9706 细胞中 VEGF 表达显著强于 HEEC 细胞。丙泊酚干预后, 丙泊酚组细胞增殖、迁移和侵袭显著低于 Ctrl 组; 而丙泊酚组细胞凋亡率显著高于 Ctrl 组。qRT-PCR 和蛋白免疫印迹结果显示, 丙泊酚组瘤细胞内 VEGF mRNA 和蛋白表达水平显著降低; 丙泊酚抑制 p38 (MAPK) 和 p44/42 (ERK1/2) 的表达和磷酸化水平。上述这些影响都存在剂量依赖性。结论 丙泊酚抑制人食管癌细胞系 EC9706 的增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡。其潜在的机制是通过抑制 MAPK/ERK 信号通路, 进而抑制 VEGF 的表达。

**关键词** 丙泊酚 食管癌细胞系 EC9706 MAPK/ERK 途径 VEGF

**中图分类号** R735.1

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.023

**Propofol Inhibiting the Expression of VEGF through MAPK/ERK Signal Pathways in Oesophageal Carcinoma Cells EC9706.** Yang Guoqing, Liu Dejun. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Shaanxi Traditional Chinese Medicine University, Shaanxi 712000, China

**Abstract Objective** To investigate the effect of propofol on the expression of VEGF in Oesophageal carcinoma cells EC9706 and its related molecular mechanism. **Methods** The expression of VEGF in human Oesophageal carcinoma cells EC9706 and normal esophageal epithelium cells HEEC were compared by immunoblotting. EC9706 was treated with different concentrations of propofol (0, 2, 6, 10  $\mu\text{g/L}$ ). After incubation, the EC9706 cell lines were detected with MTT, flow cytometry, cell invasion and cell scratch tests. The expression of VEGF, and the phosphorylation of p38 (MAPK) and p44/42 (ERK1/2) were detected by qRT-PCR and immunoblotting in each group. **Results** The expression of VEGF in EC9706 cells was significantly higher than that in HEEC cells. After propofol intervention, the proliferation, migration and invasion of propofol groups were significantly lower than that of Ctrl group, while the apoptotic rate of propofol groups were significantly higher than that of Ctrl group. The expression of VEGF mRNA and protein in propofol groups were significantly lower than that in Ctrl group. The expression and phosphorylation of p38 (MAPK) and p44/42 (ERK1/2) were inhibited by propofol. Both of these effects were dose-dependent. **Conclusion** Propofol inhibits the proliferation, invasion and migration of OC cells EC9706 and promotes apoptosis. Its potential mechanism may work by inhibiting the MAPK/ERK signaling pathway, thereby inhibiting VEGF expression.

**Key words** Propofol; Oesophageal carcinoma cells EC9706; MAPK/ERK pathway; VEGF

食管癌 (oesophageal carcinoma, OC) 是胃肠道最常见的恶性肿瘤之一, 其发生率和病死率极高, 是癌症死亡的第 6 大原因<sup>[1,2]</sup>。因此新药物及新治疗靶点的探究对于减少 OC 病死率具有十分积极的临床

意义。OC 肿瘤细胞生长相对较快, 且存在淋巴结转移, 因此与其他类型的胃肠肿瘤相比预后较差<sup>[3]</sup>。血管内皮生长因子 (VEGF) 是促进内皮血管生成和分化的重要因子, 能刺激内皮细胞的增殖、迁移和肿瘤形成。研究表明, VEGF 的表达水平与 OC 肿瘤血管的生长及迁移密切相关<sup>[4]</sup>。丙泊酚 (propofol) 是癌症切除术中最常用的静脉麻醉药物之一。研究发现丙泊酚具有抑制人类癌细胞侵袭的能力<sup>[5,6]</sup>。然而,

基金项目: 陕西省咸阳市卫生局科技计划项目 (J2015163)

作者单位: 712000 西安, 陕西中医药大学第二附属医院麻醉科 (杨国庆), 心脏外科 (刘德军)

通讯作者: 刘德军, 电子信箱: yangguoqing19808@163.com

丙泊酚对 OC 是否具有抗肿瘤效果仍然未知。本实验旨在探究丙泊酚对 OC 细胞系 EC9706 中 VEGF 表达的影响,以及所涉及的相关机制,以期为 OC 的治疗及预后改善提供新思路。

### 材料与方法

1. 细胞培养:人 OC 细胞系 EC9706 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所,冻存于本实验室中。人正常食管上皮细胞系 HEEC 及其特异性培养基购自美国 ScienCell 公司。HEEC 用其特异性培养基于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 环境下培养。EC9706 细胞维持在含有 10% 胎牛血清 (FBS, 美国 Life Technologies 公司), 1.5% L-谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的潮湿培养箱中培养。丙泊酚(得普利麻注射液)购自英国 Astra Zeneca 公司(批号:JJ231)。根据之前研究丙泊酚抗癌细胞作用的浓度,细胞分别用浓度为 0、2、6、10 μg/L 的丙泊酚处理,以测度丙泊酚对 EC9706 细胞的影响<sup>[7]</sup>。其中以 0 μg/L 组作为对照组。

2. 细胞活力测定:使用 MTT 测定来评估丙泊酚对 EC9706 细胞活力的影响。将各组细胞(丙泊酚分别为 0、2、6、10 μg/L)以  $1.0 \times 10^5$  个细胞/孔接种至 96 孔微量滴定板 (Bio-Rad) 中,分别培养 72h。向每个孔中加入 50 μg MTT,振荡混匀,将混合物置于恒温培养箱 (37℃、5% CO<sub>2</sub>) 中温育 4h。孵育结束后,去上清液,每孔中加入 100 μl DMSO (Sigma-Aldrich) 振荡 10min,使完全融解。使用酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 于 490nm 波长下测定各孔吸光值。细胞增殖率 (%) =  $A(\text{Propofol})/A(\text{Ctrl}) \times 100\%$ 。

3. 细胞凋亡实验:EC9706 细胞在 96 孔板中以  $5 \times 10^4$  个细胞/毫升的密度培养,分别处理 24h。将各组细胞进行胰蛋白酶消化,并用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 3 次,加入 75% 乙醇于 4℃ 下过夜。用 PBS 洗涤固定的细胞 3 次,用 10 μl RNA 酶在 37℃ 下孵育 30min,用 10 μl PI 进行染色,然后在黑暗中 4℃ 孵育 30min。使用 FACSscan 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司) 进行数据采集和分析。使用 ModFit LT 软件 (美国 Verity Software House 公司) 进行凋亡细胞百分比分析。

4. 细胞划痕修复试验:细胞划痕修复试验进行细胞迁移测定。将  $5 \times 10^4$  个细胞接种在 24 孔培养皿中直至达到 90% 整合。细胞保持在无血清培养基中 12h。使用移液管尖小心地划伤单层细胞。PBS 洗涤除去细胞碎片,将细胞置于无血清培养基中培养。然

后将迁移的细胞用冷的 75% 甲醇吹动 30min,并用 PBS 洗涤 3 次。在 0 和 24h 拍摄培养物,以监测细胞迁移到受伤区域的数量。

5. 细胞侵袭实验:使用 BioCoat™ Matrigel™ 侵袭室进行细胞侵袭测定。Matrigel 涂层在实验前于 DMEM 培养基中水化 30min。将悬浮在 0.5ml 无血清培养基中的细胞 ( $5 \times 10^4$ ) 加入到 Matrigel 上腔中。不同浓度的丙泊酚 (0、2、6、10 μg/L) 分别处理 1h 后,将含有 50nmol/L TPA 0.5ml 的无血清培养基加入到底部孔。然后将腔室孵育 24h。孵育后,用棉签将上室细胞移出,迁移的细胞用含有 0.2% 结晶紫色粉末的 2% 乙醇染色。在光学显微镜下统计侵袭的细胞。

6. 荧光定量实时 PCR (quantitative realtime-PCR, qRT-PCR):使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 从各组细胞提取总 RNA。使用 Reverse Transcription Kit (Takara) 将 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Green (日本 Takara 公司) 进行实时 PCR 分析。以 GAPDH 作为内参。利用 ABI7500 系统 (Applied Biosystems) 进行 qRT-PCR 反应。用熔解曲线分析来确定 PCR 产物的特异性。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 相对表达的倍数变化。 $\beta$ -actin 作为内参。qRT-PCR 反应条件:95℃ 10min, 95℃ 15s, 72℃ 15s, 共 40 个循环。

7. 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测:使用 RIPA 蛋白提取试剂 (Beyotime) 裂解细胞,从细胞中提取蛋白质。在 4℃ 下  $12000 \times g$  离心 10min 后,通过 10% SDS-PAGE 分离上清液,将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜 (Sigma) 上。将膜在 PBS 和 5% 脱脂乳中封闭 1h,并用针对 VEGF、p-38、P-p38、p-44/42、P-p44/42 的一抗 (cell signaling technology) 将膜在 4℃ 孵育过夜。将膜用 HRP 缀合的二抗 (cell signaling technology) 在室温下孵育 1h。 $\beta$ -actin 蛋白表达作为内参。使用 Quantity One 软件 (life technologies) 评估相对蛋白表达水平。

8. 统计学方法:利用 SPSS 20.00 统计学软件进行实验数据统计分析处理。统计数据表示方式为均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,行  $t$  检验,计数资料均采用率 (%) 进行描述,行  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. EC9706 和 HEEC 细胞系中 VEGF 的表达情况:为研究 VEGF 与 OC 之间的关系,本研究采用人食管癌细胞系 EC9706 与正常食管上皮细胞 HEEC,通过蛋白免疫印迹法检测 VEGF 表达水平 (图 1),结

果发现, EC9706 细胞中 VEGF 表达显著强于 HEEC 细胞 ( $P < 0.05$ ), 表明在食管癌细胞 EC9706 中 VEGF 高表达。

2. 丙泊酚对 EC9706 细胞增殖和凋亡的影响: 用 MTT 实验和流式细胞术分析丙泊酚对食管癌细胞增殖及凋亡的影响。如图 2A 所示, 与 Ctrl 组 ( $0\mu\text{g/L}$ ) 相比, 细胞培养 72h 后, 丙泊酚组在 2、6、 $10\mu\text{g/L}$  处理后, 细胞增殖显著降低 ( $P < 0.05$ ), 提示丙泊酚抑制 EC9706 细胞增殖, 且存在剂量依赖性。与对照组比较, 在用不同浓度丙泊酚 (2、6、 $10\mu\text{g/L}$ ) 处理后, 丙泊酚组细胞凋亡显著增加 ( $P < 0.05$ , 图 2B、图 2C)。

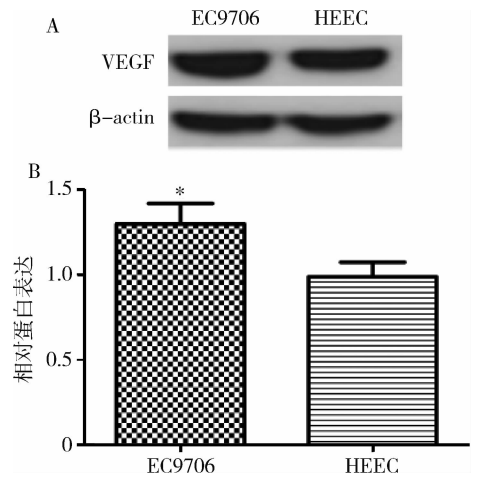


图 1 EC9706 和 HEEC 细胞系中 VEGF 的表达

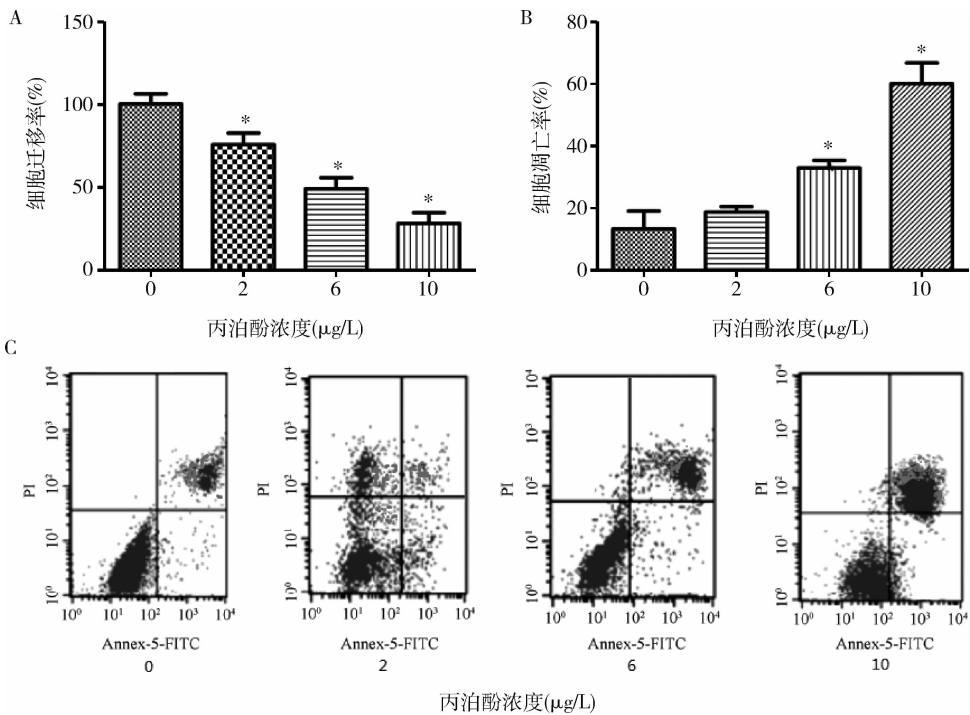


图 2 丙泊酚对 EC9706 细胞增殖和凋亡的影响

3. 丙泊酚对 EC9706 细胞迁移和侵袭的影响: 如图 3A 所示, 与对照组 ( $0\mu\text{g/L}$ ) 比较, 加入丙泊酚 18h

后, EC9706 细胞的迁移显著降低, 且存在剂量依赖性 ( $P < 0.05$ )。与对照组 ( $0\mu\text{g/L}$ ) 比较, EC9706 细胞侵

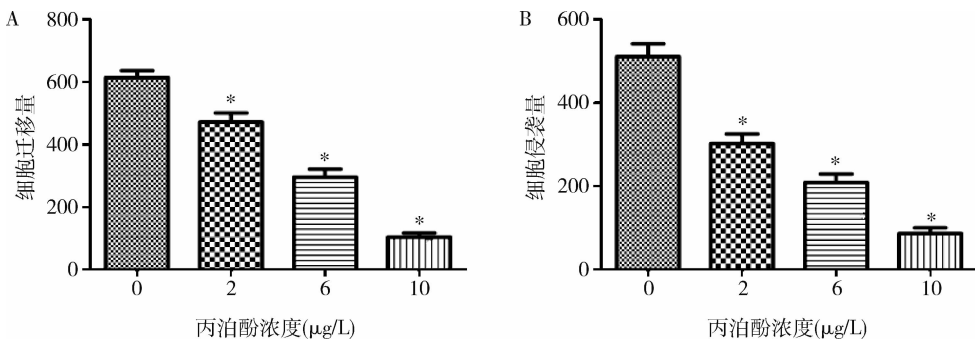


图 3 丙泊酚对 EC9706 细胞迁移和侵袭的影响

与  $0\mu\text{g/L}$  组比较, \*  $P < 0.05$

袭能力以丙泊酚 - 剂量依赖的方式逐渐降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。

4. 丙泊酚对 EC9706 细胞中 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响: 用 qRT - PCR 和蛋白免疫印迹分析丙泊酚对细胞中 VEGF mRNA 表达的影响。如图 4 中 A、B

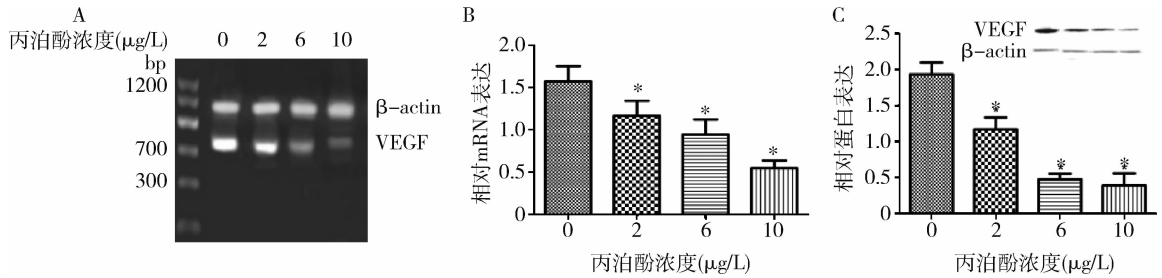
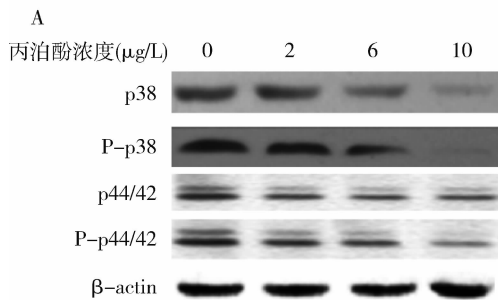


图 4 丙泊酚对 EC9706 细胞中 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响  
与 0 浓度比较, \*  $P < 0.05$

5. 丙泊酚对 EC9706 细胞中 p38 - MAPK、P - p38 - MAPK、p44/42 - MAPK、P - p44/42 - MAPK 表达的影响: MAPK/ERK 信号通路是 VEGF 的下游原始存活途径。为确定丙泊酚对 ERK/MARK 信号通路的影响, 利用蛋白免疫印迹法分析 EC9706 细胞中



p38 (MAPK) 和 p44/42 (ERK1/2) 的表达和磷酸化水平。如图 5 所示, 不同浓度丙泊酚处理后, p38 和 p44/42 的表达及磷酸化水平均有下降趋势, 且与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示丙泊酚抑制 ERK1/2 和 MAPK 信号通路的活性。

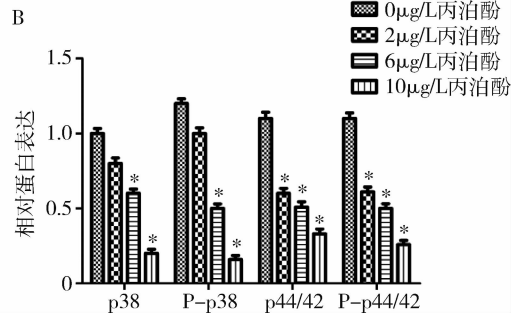


图 5 丙泊酚对 p38、P - p38、p44/42、P - p44/42 蛋白表达的影响

### 讨 论

血管生成的失调与人类癌症的发生、发展密切相关, 抗血管生成已成为治疗人类癌症的主要方式之一。另外, 肿瘤转移是包括 OC 在内的大多数癌症患者死亡的首要原因。因此, 探索有效抗 OC 细胞生长、转移和侵袭, 是治疗 OC 患者并改善预后的关键。

VEGF 是一种内皮细胞刺激因子, 可以特异性地作用于内皮细胞, 诱导血管生成、分化, 促进内皮细胞增殖、迁移, 在这一过程中最主要的作用是肿瘤形成<sup>[8,9]</sup>。在乳腺癌、肝癌、胃癌、直肠癌和前列腺癌等几种实体瘤中均发现 VEGF 高表达<sup>[10]</sup>。临床研究发现, OC 患者癌组织中 VEGF mRNA 表达水平显著高于相邻食管组织, 且与肿瘤侵袭程度和淋巴结转移密切相关<sup>[11,12]</sup>。与此一致, 本实验中笔者发现, 与正常

食管上皮细胞 HEEC 相比, VEGF 在食管癌细胞 EC9706 中高表达。

近年来研究发现, 丙泊酚对多种癌症具有抗肿瘤作用。在肺癌细胞中, 丙泊酚通过抑制 MMP - 9 / - 2 mRNA 和蛋白表达抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移<sup>[13]</sup>。此外, 丙泊酚通过抑制 HOTAIR 促进宫颈癌肿瘤细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。然而, 丙泊酚对 OC 是否具有抗肿瘤效果仍然未知。在本实验中发现, 丙泊酚抑制 OC 细胞系 EC9706 的增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 且这些作用存在剂量依赖性。丝裂原活化蛋白激酶 (MARK) 信号级联是肿瘤形成过程中主要信号通路<sup>[15]</sup>。MARKs 是胚胎发育、细胞分化、增殖及细胞凋亡的关键调控因子, 因此作为新型抗肿瘤化学疗法的理想选择<sup>[16]</sup>。MAPK 信号级联中的最终中间体是

细胞外调节激酶 (ERK)。ERK 具有两种异构体 ERK1 和 ERK2 (ERK1/2), 它们是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能被生长因子如 VEGF 等激活<sup>[17]</sup>。据报道, ERK1/2 直接介导细胞增殖和细胞凋亡<sup>[18]</sup>。研究发现, p-ERK1/2 表达与 OC 呈正相关, ERK1/2 可诱导食管癌细胞生成, 而抑制 ERK1/2 表达可显著降低 OC 细胞增殖<sup>[19]</sup>。

MAPK/ERK 信号转导途径是 VEGF 最重要的下游信号通路。VEGF 与其受体 VEGFR 的结合导致酪氨酸激酶残基的受体二聚化和自磷酸化, 其中 1175 酪氨酸磷酸化能激活蛋白激酶 C, 导致 MAPK/ERK 信号级联的活化<sup>[20]</sup>。研究表明, VEGF 通过丝裂活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (p42/44 - MAPK/ERK1/2) 信号转导来刺激内皮细胞的增殖和分化。因此, 靶向抑制 MAPK/ERK 信号途径可以直接影响 VEGF 的表达。本实验中, 使用蛋白免疫印迹法测定法检测丙泊酚对 ERK1/2 (p44/42 - MAPK) 和 p38 - MAPK 磷酸化水平的影响。结果发现, 丙泊酚使 p38 - MAPK 和 p44/42 - MAPK 的表达和磷酸化水平下降, 也即抑制 MAPK/ERK 信号通路活性。这些结果表明, 在 OC 细胞中, 丙泊酚通过抑制 p38 和 ERK1/2 的磷酸化水平来抑制 MAPK/ERK 信号通路, 进而抑制 VEGF 的表达。

综上所述, 笔者发现丙泊酚抑制 OC 细胞系 EC9706 的增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡, 其可能的途径是通过阻断 MAPK/ERK 信号通路, 进而抑制 VEGF 的表达。结果表明丙泊酚可能是 OC 治疗过程中理想的治疗药物。

#### 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002 [J]. *Ca A Cancer J Clin*, 2005, 55(2):74 - 108
- 2 Wen SW, Zhang YF, Li Y, *et al.* Association of miR - 21 with esophageal cancer prognosis: a meta - analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2):6578 - 6582
- 3 Daly JM, Fry WA, Little AG, *et al.* Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study [J]. *J Am College Surg*, 2000, 190(5):562 - 563
- 4 Zhao ZH, Tian Y, Yang JP, *et al.* RhoC, vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3):905 - 912
- 5 Miao Y, Zhang Y, Wan H, *et al.* GABA - receptor agonist, propofol inhibits invasion of colon carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(9):583 - 588
- 6 Zhang J, Shan W, Jin T, *et al.* Propofol exerts anti - hepatocellular carcinoma by microvesicle - mediated transfer of miR - 142 - 3p from macrophage to cancer cells [J]. *J Translat Med*, 2014, 12(1):279 - 287

- 7 刘叶. 丙泊酚对肝癌细胞 HepG2 生物学行为的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2013
- 8 Hamnvik OR, Chouairi TK, Turchin A, *et al.* Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway [J]. *Cancer*, 2015, 121(2):311 - 319
- 9 Liang ZW, Wang Z, Chen H, *et al.* Nestin - mediated cytoskeletal remodeling in endothelial cells: novel mechanistic insight into VEGF - induced cell migration in angiogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(5):349 - 358
- 10 Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, *et al.* Fibroblast growth factor - 2 (FGF - 2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries; an autocrine mechanism contributing to angiogenesis [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(7):1659 - 1673
- 11 Lin D, Lin Y, Kuang L, *et al.* The study of the expression of VEGF in ESCC and angiopoietin - 2 and clinical significance [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2008, 4(15):268 - 270
- 12 Li Z, Wang Y, Ge B, *et al.* The relationship between the expression of VEGF, EGFR, and HER - 2 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and clinicopathological features of different ethnic groups in Xinjiang [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(12):9277 - 9283
- 13 Wu KC, Yang ST, Hsia TC, *et al.* Suppression of cell invasion and migration by propofol are involved in down - regulating matrix metalloproteinase - 2 and p38 MAPK signaling in A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(11):4833 - 4842
- 14 Zhang D, Zhou X H, Zhang J, *et al.* Propofol promotes cell apoptosis via inhibiting HOTAIR mediated mTOR pathway in cervical cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4):561 - 567
- 15 Bessard A, Frémin C, Ezan F, *et al.* RNAi - mediated ERK2 knock-down inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo [J]. *Oncogene*, 2008, 27(40):5315 - 5325
- 16 McCubrey AJA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia [J]. *Leukemia*, 2002, 16(4):486 - 507
- 17 Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways [J]. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18(4):128 - 131
- 18 Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P, *et al.* Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(1):511 - 527
- 19 Zheng ST, Huo Q, Tuexun A, *et al.* The expression and activation of ERK/MAPK pathway in human esophageal cancer cell line EC9706 [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(2):865 - 872
- 20 Malecic N, Young HS. Novel investigational vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor antagonists for psoriasis [J]. *Exp Opin Invest Drugs*, 2016, 25(4):455 - 462
- 21 Xu J, Liu X, Jiang Y, *et al.* MAPK/ERK signalling mediates VEGF - induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6a):2395 - 2406

(收稿日期:2017 - 04 - 10)

(修回日期:2017 - 04 - 12)