

·基础研究·

右美托咪定对缺氧诱导人肝癌细胞增殖和血管生成的影响

陈泳花¹, 陈东泰¹, 潘家浩¹, 严 俨³, 元云飞², 曾维安¹

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. 麻醉科; 2. 肝胆科, 广东 广州 510060; 3. 惠州市中心人民医院, 广东 惠州 516001)

摘要:【目的】通过建立肝癌细胞体外缺氧模型分析右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞作用效应的影响及其初步机制的探讨。【方法】人肝癌细胞株 MHCC97H、SMCC7721 分别使用化学(二氯化钴)及物理(1% O₂)这两种方法来建立缺氧状态下的肝癌细胞体外模型,均培养在含有或者没有 100 μmol/L 的右美托咪定的培养基中。将以上处理的细胞进行细胞增殖实验、单克隆形成实验、小管形成实验来检测右美托咪定对缺氧条件培养的肝癌细胞的增殖能力及血管生成能力的影响,并同时使用 western blot 检测 α2A、HIF-1a 及 VEGF 蛋白的表达情况。【结果】化学方法诱导的肝癌细胞缺氧可以加快肝癌细胞株 MHCC97H、SMCC7721 的增殖速度(二氯化钴组 vs. 对照组, MHCC97H 和 SMCC7721 增殖效应分别为: 第 3 天, 142.2% 和 133.8%; 第 4 天, 134.7% 和 131.0%; 第 5 天, 133.5% 和 136.2%, 均 $P < 0.05$), 也诱导肝癌细胞的血管生成能力加强。而右美托咪定可抑制缺氧引起的肝癌细胞的增殖效应(联合组 vs. 二氯化钴组, MHCC97H 和 SMCC7721 增殖效应分别为: 第 3 天, 55.7% vs 60.7%; 第 4 天, 46.9% vs 58.1%; 第 5 天, 46.4% vs 57.0%, 均 $P < 0.05$), 减弱肝癌细胞的血管生成能力。而使用物理方法建立的肝癌细胞体外缺氧模型同样得到一致的结果。另外 Western blot 结果发现右美托咪定可以下调缺氧诱导的肝癌细胞株 MHCC97H、SMCC7721 的 α2A、HIF-1a 及 VEGF 等蛋白的表达。【结论】缺氧可以加快肝癌细胞株 MHCC97H、SMCC7721 的增殖,同时诱导血管生成能力加强,右美托咪定则可能通过激活 α2A 肾上腺受体,下调 HIF-1a 及 VEGF 蛋白的表达来抑制缺氧诱导的肝癌细胞的作用效应。

关键词: 人肝癌细胞; 右美托咪定; 缺氧; 增殖; 血管生成

中图分类号: R738.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)02-0229-08

Effect of Dexmedetomidine on Proliferation and Angiogenesis of Human Hepatocellular Carcinoma Cell Cultured in Hypoxia Condition and Possible Mechanism

CHEN Yong-hua¹, CHEN Dong-tai¹, PAN Jia-hao¹, YAN Yan³, YUAN Yun-fei², ZENG Wei-an¹

(1. Department of Anesthesiology; 2. Department of Hepatobiliary Oncology, State Key Laboratory of Oncology in South China, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China; 3. Huizhou Municipal Central Hospital, Huizhou 516001, China)

Corresponding to: ZENG Wei-an, E-mail: zengwa@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 This study was conducted to examine the effects of dexmedetomidine on the proliferation and angiogenesis of MHCC97H and SMCC7721 human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines cultured in hypoxia condition in vitro, and investigated the possible mechanism involved. 【Methods】 MHCC97H and SMCC7721 human HCC cell lines under hypoxia culture condition were treated with presence or absence of dexmedetomidine (100 μmol/L). Cell viability, colony formation, vasculogenic mimicry (VM) formation were assessed. The effects of dexmedetomidine on α-2A adrenergic receptor (α2A), hypoxia induced factor -1a (HIF-1a), and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression were evaluated with Western blot analysis. 【Results】 Cell proliferation assay and colony formation assay indicated that hypoxia obviously promoted the proliferation of MHCC97H and SMCC7721 cells (CoCl₂ group vs corresponding control group, the proliferation rate of MHCC97H and SMCC7721: Day 3, 142.2% and 133.8%; Day 4, 134.7% and 131.0%; Day 5, 133.5% and 136.2%; all $P < 0.05$), and VM formation assay suggested that hypoxia increased angiogenesis of MHCC97H and SMCC7721 cells. Whereas dexmedetomidine significantly inhibited the proliferation

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(30972849)

作者简介: 陈泳花, 麻醉学在读博士生, E-mail: chenyh@sysucc.org.cn; 曾维安, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: zengwa@mail.sysu.edu.cn

(Dex+CoCl₂ group vs CoCl₂ group, the proliferation rate of MHCC97H and SMCC7721: Day 3, 55.7% vs 60.7%; Day 4, 46.9% vs 58.1%; Day 5, 46.4% vs 57.0%, all $P < 0.05$) and angiogenesis of MHCC97H, SMCC7721 cells induced by hypoxia. Dexmedetomidine may exert these functions by activating α -2A adrenergic receptor, causing an decrease in HIF-1 α and VEGF protein, while hypoxia activated HIF-1 α and VEGF protein to promote the growth and angiogenesis of cells. 【Conclusion】 The findings provide evidence that hypoxia could promote the proliferation and angiogenesis of MHCC97H and SMCC7721 cells, while dexmedetomidine might inhibit these effects by down-regulating HIF-1 α and VEGF protein expression through activating α -2A adrenergic receptor.

Key words: human hepatocellular carcinoma cell; dexmedetomidine; hypoxia; proliferation; angiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2): 229-236]

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是恶性度最高的恶性肿瘤之一, 也是世界上第三大常见肿瘤相关性死亡的肿瘤^[1]。跟其他实体肿瘤一样, 肝癌在发生发展过程中出现组织缺氧的现象。肿瘤缺氧微环境可能是通过调节缺氧诱导因子 1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α) 促进肿瘤细胞的增殖转移能力以及血管生成能力, 从而影响肿瘤的进展^[2]。近年来, 围手术期相关因素以及手术麻醉方式对肿瘤患者预后的影响越来越受到关注^[3-4]。研究发现全身麻醉药物可能是通过免疫调节^[5-6]或者调节 HIF-1 α 和胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 来影响肿瘤细胞的增殖转移能力^[7-8]。右美托咪定 (dexmedetomidine, Dex) 是一个高选择性的 α 2 肾上腺素受体激动药物, 可以产生镇痛、镇静、抗焦虑以及抗交感的作用, 在临床上被广泛应用于 ICU 患者以及手术患者的镇痛镇静中^[9]。近年来有研究发现右美托咪可以促进乳腺癌细胞 4T1 的小鼠脂肪垫成瘤模型的增殖转移能力, 而且细胞实验也证实了这一点^[10]。而右美托咪定在肝癌中的作用尚未见报道。因此本研究是通过建立肝癌细胞体外缺氧模型分析右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞作用效应的影响及其初步机制的探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养条件

人肝癌细胞株 MHCC97H、SMCC7721, 均来自中山大学肿瘤防治中心肝胆外科。细胞系培养于在含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM (高糖) 培养基 (Gibco) 中。正常氧培养是置于湿度 85%、CO₂ 体积分数为 5% 的 37 °C 恒温培养箱中连续传代培养。而缺氧

培养的气体条件是 84.9% N₂, 5% CO₂, 9.1 % H₂ 和 1% O₂。

1.2 试剂

右美托咪定 (Cat. NO: S2090), 购自 Selleck 公司; 二氯化钴 (Cat. NO: C8661), 购自 Sigma-Aldrich 公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8, Cat. NO: CK04), 购自同仁化工研究所; 兔抗人多克隆抗体 α 2A adrenergic receptor (Cat. NO: NBP1-19562, 抗体稀释浓度 1: 500), 购自 Novus 公司; 小鼠单克隆抗体 HIF-1 α (Cat. NO: ab16066, 抗体稀释浓度 1: 1 000), 购于 Abcom 公司; 兔多克隆抗体 VEGF (Cat. NO: ab46154, 抗体稀释浓度 1: 1 000), 购于 Abcom 公司; 兔抗人抗体 beta-tubulin (Cat. NO: 5346, 抗体稀释浓度 1: 1 000) 购自 Cell Signaling Technology 公司; Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor (Cat. NO: 356231), 购于 Corning 公司。

1.3 药物处理

使用两种方法来建立缺氧状态下的肝癌细胞模型: 第一种是化学方法, 即使用 100 μ mol/L 浓度的二氯化钴处理肝癌细胞 48 h, 二氯化钴 (CoCl₂) 是一种缺氧模拟试剂, 被广泛运用细胞增殖分化以及多种缺氧反应的研究中^[11]; 第二种是物理方法, 即将肝癌细胞放置于仅含 1% 氧气的密闭培养装置中培养 48 h。上述的两种方法建立的缺氧状态下的肝癌细胞模型均培养在含有或者没有 100 μ mol/L 的右美托咪定的培养基中。并用这些细胞进行细胞增殖实验、单克隆形成实验、小管形成实验以及 Western blot。

1.4 细胞增殖实验

用细胞增殖-毒性检测试剂盒 CCK-8 按照说明书方法进行细胞增殖实验。在化学方法诱导的体外缺氧模型中, 将肝癌细胞按 6 000 个细胞/孔的密度均匀地种植在 96 孔板中, 分别培养在含有

或者没有右美托咪定的培养基中。在物理方法诱导的体外缺氧模型中,用含有或者没有右美托咪定的培养基培养在低氧装置 48 h 后取出种植在 96 孔板中,加入不含有药物的培养基进行培养。连续 5 d 取同一个时间进行检测,检测时每孔加入 CCK8 10 μL ,使用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度($D_{450\text{nm}}$)。每个实验至少重复 3 次。增殖率计为该组 $D_{450\text{nm}}$ 均值/该组第 1 天 $D_{450\text{nm}}$ 均值 $\times 100\%$;组间增殖率的比较则为增殖效应。增殖效应 $< 100\%$ 则为抑制增殖;反之则为促进增殖。

1.5 单克隆形成实验

细胞处理及分组如 1.4,将肝癌细胞按 200 个细胞/孔的密度种植在 6 孔板进行培养。14 d 后吸走培养基,用甲醇固定 15 min 后,使用 0.5% 结晶紫进行染色 30 min。然后记录每个孔的克隆数量。

1.6 小管形成实验

除去 ibidi 血管生成载玻片无菌包装,每孔加入 10 μL Matrigel,将血管生成载玻片放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱凝胶 30 min。按 2×10^4 /孔密度将肝癌细胞种植于胶上,加入相应的培养基,孵育 24 h。采用研究性倒置显微镜采集图像进行分析。

1.7 Western Blot

使用含有蛋白酶抑制剂 cocktail (Roche Boehringer Mannheim Diagnostics) 的 RIPA 溶液提取细胞蛋白,并用 BSA 蛋白试剂盒 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 进行细胞蛋白定量。配制 10% SDS-PAGE 胶,各孔加入 25 μg 蛋白样品,电泳后蛋白转移至 PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) 上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ HIF1 α 抗体 (1:1 000)、 $\alpha 2\text{A}$ 抗体 (1:500)、VEGF 抗体 (1:1 000) 及 beta-tubulin 抗体 (1:1 000) 孵育过夜。室温下孵育酶标二抗 1 h,用 ECL 化学发光试剂 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 显影曝光,图片经 ImageJ 软件分析灰度值。

1.7 统计学方法

所有实验数据运用 SPSS 16.0 软件 (Chicago, IL, USA) 进行统计学分析。所有数据以均数 \pm 标准差表示。独立样本 Student's t 检验用来分析比较两组连续性数据的差异;单因素方差分析 (ANOVA) 用来分析不同处理组的差异。当 $P < 0.05$ 是被定义为有统计学意义。

2 结果

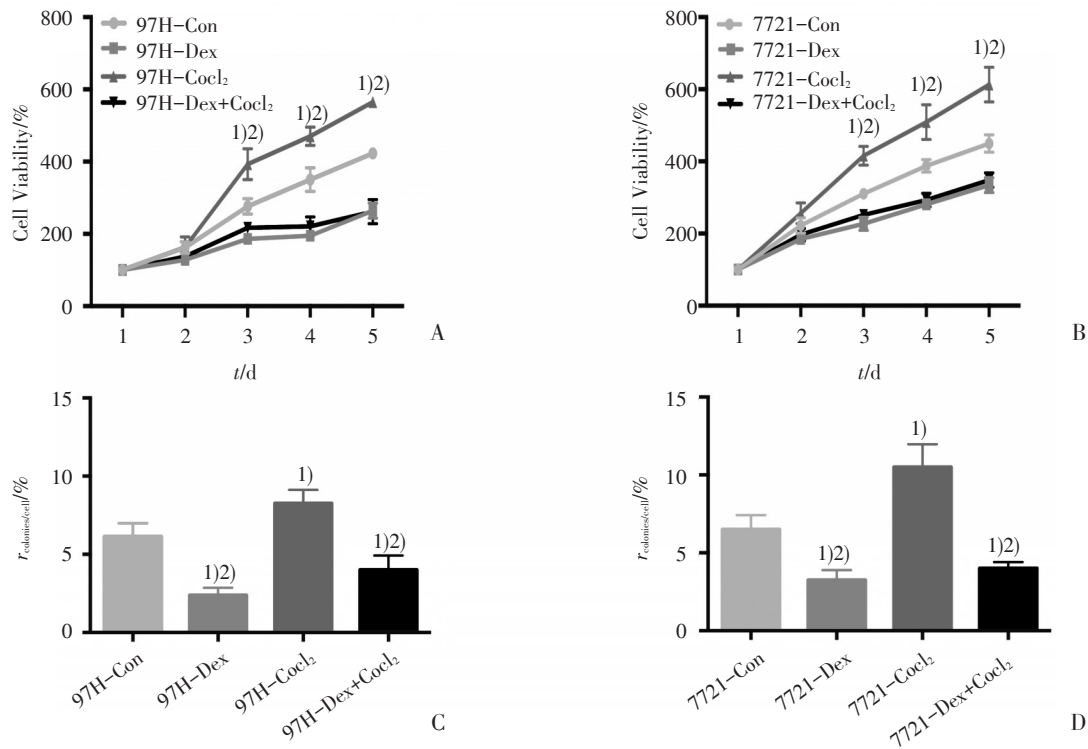
2.1 右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞株增殖效应的影响

在使用化学方法建立肝癌细胞体外缺氧模型中,我们分为对照组,右美托咪定组 (100 $\mu\text{mol/L}$),二氯化钴组 (100 $\mu\text{mol/L}$),和联合组 (右美托咪定+二氯化钴)。细胞增殖 CCK8 实验数据使用单因素 ANOVA 统计学方法分析发现,第 3 天、第 4 天、以及第 5 天的 4 组差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。平板克隆实验结果同样使用单因素 ANOVA 统计学方法分析得出与 CCK8 实验一致的结果 ($P < 0.000 1$)。跟对照组比,二氯化钴组细胞增殖明显增快 (二氯化钴组 vs. 对照组 CCK8 实验结果, MHCC97H 和 SMCC7721 增殖效应分别为:第 3 天, 142.2% 和 133.8%;第 4 天, 134.7% 和 131.0%;第 5 天, 133.5% 和 136.2%, 均 $P < 0.05$), 单用右美托咪定则可以抑制细胞增殖,结果有统计学意义。而二氯化钴组与联合组比较的结果发现,联合使用右美托咪定+二氯化钴不仅可以扭转化学缺氧诱导的肝癌细胞增殖效应,还有抑制细胞增殖的作用 (CCK8 实验结果: MHCC97H 和 SMCC7721 增殖效应分别为:第 3 天, 55.7% vs 60.7%;第 4 天, 46.9% vs 58.1%;第 5 天, 46.4% vs 57.0%, 均 $P < 0.05$; 平板克隆实验结果: MHCC97H 和 SMCC7721 均 $P < 0.05$; 图 1)。

在使用物理方法建立肝癌细胞体外缺氧模型中,我们分为对照组,右美托咪定组 (100 $\mu\text{mol/L}$)。结果使用 t 检验统计学方法分析发现,使用右美托咪定可以抑制缺氧对照组的细胞增殖效应 ($P < 0.05$; 图 2)。

2.2 右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞株血管生成能力的影响

为了研究右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞株血管生成能力的影响,我们首先分别通过使用化学和物理这两种方法建立肝癌细胞株 MHCC97H 和 SMCC7721 体外缺氧模型,然后联合使用右美托咪定后,将细胞种植在 matrigel 胶上进行成管实验。使用二氯化钴 (100 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的缺氧细胞形成拟血管样小管能力比对照组细胞强,而使用右美托咪定组 (100 $\mu\text{mol/L}$) 或者联合组,则没有形成小管样结构。在低氧条件培养的细胞中,无



(A, C) MHCC97H cell. (B, D) SMCC7721 cell. (A, B) Cells were exposed to culture medium alone (Con), Dex (100 $\mu\text{mol/L}$), CoCl_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), or the combination of Dex and CoCl_2 for 5 d. Treatment with Dex in the presence or absence of CoCl_2 resulted in significant reductions in cell viability, whereas treatment with CoCl_2 increased cell proliferation significantly. (C, D) The colony formation assay was scored after 14 d. Statistical analyses showing that treatment with Dex in the presence or absence of CoCl_2 inhibited cell growth. Statistical differences were determined using a one-way ANOVA. These results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. 1) $P < 0.05$ different with the corresponding control group; 2) $P < 0.05$ different with the corresponding CoCl_2 group.

图1 单用右美托咪定或者联合使用二氯化钴对人肝癌细胞株 MHCC97H 和 SMCC7721 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of dexmedetomidine (Dex) treatment in the presence or absence of CoCl_2 on cell growth of human MHCC97H and SMCC7721 cell lines

右美托咪定(100 $\mu\text{mol/L}$)处理过的细胞形成的拟血管样结构明显比使用右美托咪定(100 $\mu\text{mol/L}$)处理过的细胞形成的多(图3)。

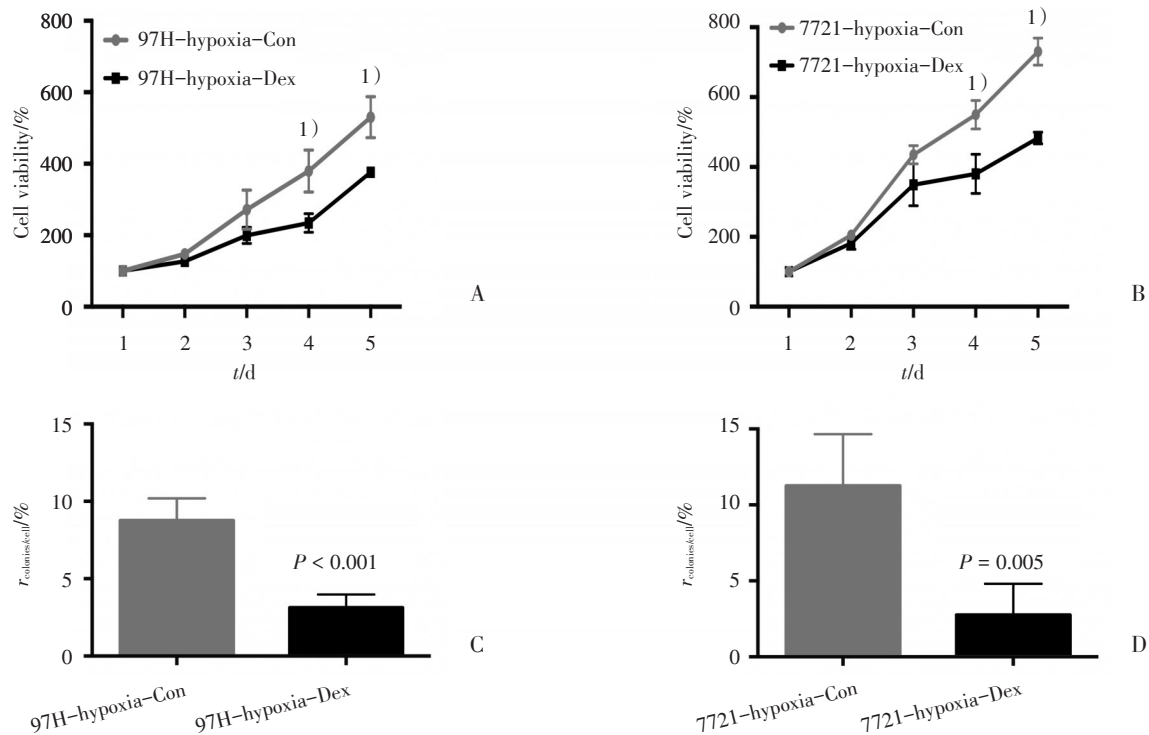
2.3 右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞株 $\alpha 2\text{A}$, HIF-1 α 及 VEGF 等蛋白表达的影响

在使用化学方法建立肝癌细胞体外缺氧模型中,数据使用单因素 ANOVA 统计学方法分析组间差异($P < 0.0001$)。如图4所示,与对照组相比,二氯化钴组(100 $\mu\text{mol/L}$)的 $\alpha 2\text{A}$ 蛋白明显下调, HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达明显增多,右美托咪定组(100 $\mu\text{mol/L}$)则上调 $\alpha 2\text{A}$ 蛋白, HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达明显下降,结果有统计学意义。而在右美托咪定联合二氯化钴组中, $\alpha 2\text{A}$ 蛋白表达增加, HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达下降(与二氯化钴组比较:两个细胞株 $P < 0.05$)。在使用物理方法建立肝

癌细胞体外缺氧模型中,数据使用 t 检验统计学方法分析组间差异。结果发现,右美托咪定处理组可以上调 $\alpha 2\text{A}$ 蛋白的表达,下调缺氧引起肝癌细胞 HIF-1 α 及 VEGF 等蛋白的表达($P < 0.05$)。

3 讨论

麻醉以及围手术期的相关因素被认为是影响术后肿瘤患者预后的一个重要因素^[12-13]。近年来的回顾性分析发现麻醉药物的选择可能影响术后癌症患者的预后^[14-15]。右美托咪定是一个高度选择激活 $\alpha 2$ 肾上腺素受体的静脉麻醉药。近年来, $\alpha 2$ 肾上腺素受体及其激动剂和肿瘤预后复发、细胞增殖分化的研究屡有报道。Shkurnikov等^[16]在乳腺癌基因芯片分析发现高 $\alpha 2\text{A}$ 基因表达提示乳



(A, C) MHCC97H cell. (B, D) SMCC7721 cell. Cells were treated with the presence or absence of Dex (100 $\mu\text{mol/L}$) in hypoxia condition (1% O_2) for 48 h. (A, B) Treatment with Dex inhibited cell viability with a significant inhibition rate. (C, D) The colony formation assay was scored after 14 d. Statistical analyses showing that treatment with Dex resulted in significant inhibition in cell proliferation. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical differences were determined using a Student *t* test. 1) $P < 0.05$ between treatment group and the corresponding control group.

图2 右美托咪定对低氧条件培养的人肝癌细胞株MHCC97H和SMCC7721细胞增殖的影响

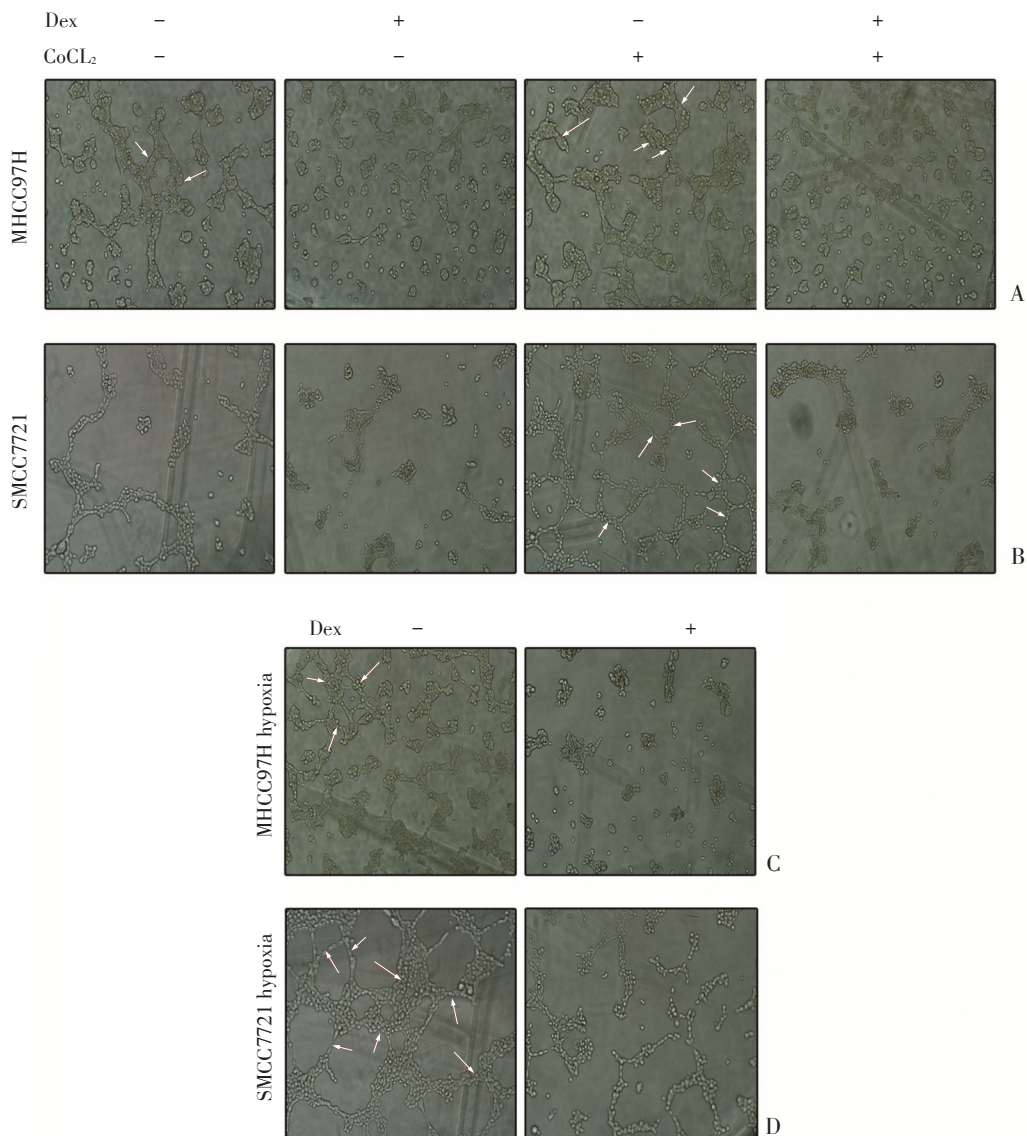
Fig.2 Effect of dexmedetomidine (Dex) treatment on cell growth of human MHCC97H and SMCC7721 cell lines under hypoxia culture condition

腺癌患者高复发率。相关研究发现使用激动剂激活 α_2 肾上腺素受体可以促进乳腺癌细胞的增殖转移能力^[10],但在胆管癌中却得出相反的结果^[17]。上述结果提示作为 α_2 肾上腺素受体的激动剂右美托咪定可以影响肿瘤的生长,但在不同肿瘤类型中的作用不一。目前右美托咪定对肝癌的作用的研究未见报道,因此,本次的研究目的是通过建立肝癌细胞体外缺氧模型分析右美托咪定对缺氧诱导肝癌细胞作用效应的影响及其初步机制的探讨。

肝细胞癌的发生、发展、转移和复发涉及多种因素,而细胞缺氧常发生在肝细胞癌发生发展中。肿瘤缺氧微环境影响实体肿瘤发生发展、侵袭转移以及治疗效果。研究发现,肿瘤缺氧微环境可以诱导多个蛋白质生物学上的改变而引起肿瘤细胞代谢的改变,而多种缺氧诱导基因则由HIF-1来调控,参与血管的生成、肿瘤的侵袭和对化疗治疗的抵抗^[18-19]。在本研究的肝癌细胞体

外缺氧模型中,发现缺氧可以促进两株肝癌细胞的增殖,而联合右美托咪定却可以扭转缺氧对肿瘤细胞的增殖作用,甚至可以达到抑制效果。在肿瘤血管形成方面,缺氧可以使肿瘤细胞更加容易形成血管,而联合使用右美托咪定,这种现象却被抑制了。以上的实验结果提示了右美托咪定可以抑制缺氧诱导肝癌细胞的增殖和血管生成。

HIF-1a是缺氧环境下的一个重要的转录因子,可以通过激活转录程序来促进肿瘤的增殖转移能力,抑制其凋亡以及促进血管的生成。研究发现HIF-1a可以通过调控细胞周期蛋白A和D来促进细胞的增殖以及加快细胞周期^[20]。更有研究报道在大鼠肝癌移植模型中,经过20周的肝癌肿瘤的形成,大鼠体内的HIF-1a和内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)显著升高,这个提示了HIF-1a可能通过促进血管生成来参与肝癌的发生发展^[21]。结合本次的实验结果发



(A, C) MHCC97H cell. (B, D) SMCC7721 cell. Matrigel 3D culture was utilized as a well-established in vitro model for investigating VM formation. (A, B) CoCl₂ demonstrated the strongest ability to form VM compared to the other groups. Treatment with Dex in the presence or absence of CoCl₂ showing unable to form VM. (C, D) The Dex group showed more pipe-like structures than the control group when cells were exposed to hypoxia. The arrowheads indicate vasculogenic-like networks (objective magnification, $\times 100$).

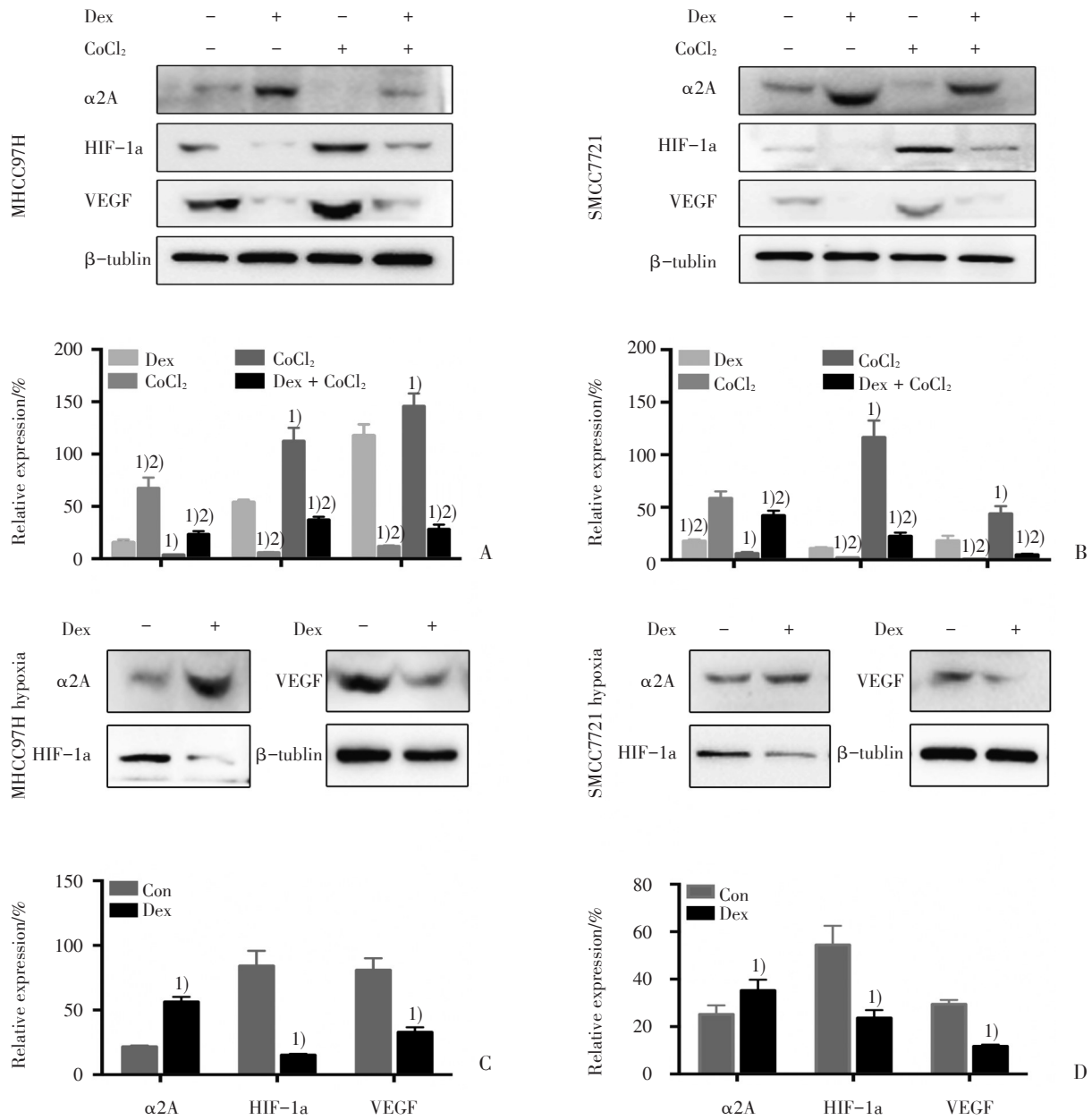
图3 不同处理条件下两种肝癌细胞株MHCC97H和SMCC7721的拟血管形成能力

Fig.3 Effect of different treatments on vasculogenic mimicry (VM) formation in Matrigel of MHCC97H and SMCC7721 cell lines

现,缺氧状态下,肝癌细胞的 $\alpha 2A$ 表达下降而HIF-1 α 和VEGF表达增加,而联合使用右美托咪定后, $\alpha 2A$ 表达增加,而HIF-1 α 和VEGF明显下调。因此我们大胆的猜测,右美托咪定可以激活 $\alpha 2A$ 肾上腺素受体,通过下调HIF-1 α 和VEGF蛋白的表达来抑制缺氧微环境引起的肝癌细胞的生长以及血管生成。

综上所述,右美托咪定可以抑制肝癌细胞株

MHCC97H、SMCC7721的增殖,且在肝癌细胞缺氧模型实验中发现右美托咪定可以通过下调HIF-1 α 的蛋白表达来抑制缺氧诱导肝癌细胞的增殖以及血管生成。在今后的工作中,我们将继续研究右美托咪定、 $\alpha 2$ 肾上腺素受体和肝癌的关系以及其进一步的作用机制,并且建立肝癌移植瘤动物模型探索右美托咪定在体内是否具有抑制肝癌的生长和转移的作用。



(A, C) MHCC97H cell. (B, D) SMCC7721 cell. (A, B) Cells were exposed to culture medium alone (Con), Dex (100 μmol/L), CoCl₂ (100 μmol/L), or the combination of Dex and CoCl₂ for 72 h. (C, D) Cells were treated with the presence or absence of Dex (100 μmol/L) in hypoxia condition (1% O₂) for 48 h. Expression levels of α2A, HIF-1a and VEGF were assayed by western blot analysis and quantified using the ImageJ program. β-tubulin was used as a loading control. The image is representative of three independent experiments yielding similar results. These results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments. A one-way ANOVA was used to analyzed difference among 4 groups. Student's *t* test was used to compared difference between 2 groups. 1) *P* < 0.05 different with the corresponding control group; 2) *P* < 0.05 different with the corresponding CoCl₂ group.

图4 不同处理条件下两种肝癌细胞株MHCC97H和SMCC7721的α2A、HIF-1a及VEGF蛋白的表达情况

Fig.4 Expression profile of HIF-1a protein in MHCC97H and SMCC7721 cell lines with different treatments

参考文献:

[1] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255.

[2] Soeda A, Park M, Lee D, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133- positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha [J]. Oncogene, 2009, 28(45): 3949-3959.

- [3] Wigmore TJ, Mohammed K, Jhanji S. Long-term survival for patients undergoing volatile versus iv anesthesia for cancer surgery: a retrospective analysis [J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(1):69-79.
- [4] Zhao J, Mo H. The impact of different anesthesia methods on stress reaction and immune function of the patients with gastric cancer during peri-operative period [J]. *J Med Assoc Thai*, 2015, 98(6):568-573.
- [5] Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, et al. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine, thiopental, and halothane, but not by propofol: mediating mechanisms and prophylactic measures [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(5):1331-1339.
- [6] Buckley A, McQuaid S, Johnson P, et al. Effect of anaesthetic technique on the natural killer cell anti-tumour activity of serum from women undergoing breast cancer surgery: a pilot study [J]. *Br J Anaesth*, 2014, 113 Suppl 1:i56-62.
- [7] Huang H, Benzonana LL, Zhao H, et al. Prostate cancer cell malignancy via modulation of HIF-1alpha pathway with isoflurane and propofol alone and in combination [J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(7):1338-1349.
- [8] Luo X, Zhao H, Hennah L, et al. Impact of isoflurane on malignant capability of ovarian cancer in vitro [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 114(5):831-839.
- [9] Mahmoud M, Mason KP. Dexmedetomidine: review, update, and future considerations of paediatric perioperative and periprocedural applications and limitations [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(2):171-182.
- [10] Szpunar MJ, Burke KA, Dawes RP, et al. The antidepressant desipramine and alpha2-adrenergic receptor activation promote breast tumor progression in association with altered collagen structure [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(12):1262-1272.
- [11] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18):15911-15916.
- [12] Lin L, Liu C, Tan H, et al. Anaesthetic technique may affect prognosis for ovarian serous adenocarcinoma: a retrospective analysis [J]. *Br J Anaesth*, 2011, 106(6):814-822.
- [13] Christopherson R, James KE, Tableman M, et al. Long-term survival after colon cancer surgery: a variation associated with choice of anesthesia [J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(1):325-332.
- [14] Call TR, Pace NL, Thorup DB, et al. Factors associated with improved survival after resection of pancreatic adenocarcinoma: a multivariable model [J]. *Anesthesiology*, 2015, 122(2):317-324.
- [15] Afsharimani B, Cabot P, Parat MO. Morphine and tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(2):225-238.
- [16] Shkurnikov MY, Galatenko VV, Lebedev AE, et al. On statistical relationship between ADRA2A expression and the risk of breast cancer relapse [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2014, 157(4):454-458.
- [17] Kanno N, Lesage G, Phinizy JL, et al. Stimulation of alpha2-adrenergic receptor inhibits cholangiocarcinoma growth through modulation of Raf-1 and B-Raf activities [J]. *Hepatology*, 2002, 35(6):1329-1340.
- [18] Muz B, de la Puente P, Azab F, et al. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy [J]. *Hypoxia (Auckl)*, 2015, 3(5):83-92.
- [19] Chan N, Koritzinsky M, Zhao H, et al. Chronic hypoxia decreases synthesis of homologous recombination proteins to offset chemoresistance and radioresistance [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2):605-614.
- [20] Xu Z, Liu E, Peng C, et al. Role of hypoxia-inducible-1alpha in hepatocellular carcinoma cells using a Tet-on inducible system to regulate its expression in vitro [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(2):573-578.
- [21] Wang W, Xu GL, Jia WD, et al. Expression and correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor and microvessel density in experimental rat hepatocarcinogenesis [J]. *J Int Med Res*, 2009, 37(2):417-425.

(编辑 刘清海)