

瑞芬太尼抑制MAPK/ERK通路减弱食管胃结合部 腺癌细胞系AGS恶性生物学行为

朱小燕¹ 王丽^{1*} 郭丹² 崔大鹏² 王瑞峰² 刘蔚姝^{1,3} 杨艺萱²

(¹河北北方学院附属第一医院麻醉科, 张家口 075000; ²河北北方学院附属第一医院肝胆外科, 张家口 075000;
³河北北方学院附属第一医院肝胆小儿外科, 张家口 075000)

摘要 该研究旨在探讨瑞芬太尼能否通过调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)通路抑制食管胃结合部腺癌细胞增殖、迁移、侵袭。首先, 将人胃腺癌细胞(AGS细胞)分成五组, 分别为对照组, 瑞芬太尼低、中、高剂量组(50、100、200 nmol/L瑞芬太尼), 瑞芬太尼+MAPK/ERK激活剂组(200 nmol/L瑞芬太尼+5 μ mol/L C16-PAF共同处理)。分别检测AGS细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡、周期阻滞、MAPK mRNA、ERK mRNA、细胞增殖细胞核抗原(PCNA)、E钙黏着蛋白(E-cadherin)、N钙黏着蛋白(N-cadherin)、MAPK/ERK通路相关蛋白、下游信号c-Fos蛋白、c-Jun蛋白及凋亡相关蛋白表达情况。该研究发现, 与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞D值、EdU阳性细胞率、细胞迁移率、侵袭细胞数量、MAPK mRNA、ERK mRNA、PCNA、N-cadherin、p-MAPK/MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2、S期细胞占比、c-Fos、c-Jun水平均降低($P<0.05$), 细胞凋亡率、E-cadherin水平、Cleaved-caspase9水平、G₀/G₁期细胞占比升高($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞以上指标趋势均发生了部分逆转($P<0.05$)。总之, 瑞芬太尼可通过抑制MAPK/ERK通路抑制食管胃结合部腺癌细胞恶性生物学行为。

关键词 瑞芬太尼; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外信号调节激酶; 食管胃结合部腺癌; 增殖

Remifentanil Inhibits the MAPK/ERK Pathway to Attenuate Malignant Biological Behaviors of Esophagogastric Junction Adenocarcinoma Cell Line AGS

ZHU Xiaoyan¹, WANG Li^{1*}, GUO Dan², CUI Dapeng², WANG Ruifeng², LIU Weishu^{1,3}, YANG Yixuan²

(¹Department of Anesthesiology, the First Hospital Affiliated to North China University of Science and Technology, Zhangjiakou 075000, China; ²Department of Hepatobiliary Surgery, the First Hospital Affiliated to North China University of Science and Technology, Zhangjiakou 075000, China; ³Department of Hepatobiliary and Pediatric Surgery, the First Hospital Affiliated to North China University of Science and Technology, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract This study aims to investigate whether remifentanil can inhibit the malignant biological behavior of esophagogastric junction adenocarcinoma cells by regulating the MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) pathway, thereby suppressing proliferation, migration, and invasion. Human gastric adenocarcinoma AGS cells were divided into five groups: control, low-, medium-, and high-dose remifentanil groups (50, 100, 200 nmol/L remifentanil), and remifentanil plus MAPK/ERK activator group (200 nmol/L remi-

收稿日期: 2025-08-18

接受日期: 2025-10-21

河北省卫健委医学科学研究课题计划(批准号: 20250887)资助的课题

*通信作者。Tel: 15530393906, E-mail: hdddxr@163.com

Received: August 18, 2025

Accepted: October 21, 2025

This work was supported by the Hebei Provincial Health Commission Medical Science Research Project (Grant No.20250887)

*Corresponding author Tel: +86-15530393906, E-mail: hdddxr@163.com

fentanil+5 $\mu\text{mol/L}$ C16-PAF)。This article assessed AGS cell proliferation, migration, invasion, apoptosis, cell cycle arrest, *MAPK* mRNA, *ERK* mRNA, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), E-cadherin, N-cadherin, MAPK/ERK pathway-related proteins, downstream signaling proteins c-Fos and c-Jun, and apoptosis-related proteins. The results showed that compared with the control group, the 50, 100, and 200 nmol/L remifentanil groups exhibited decreased *D*-values, EdU-positive cell rates, cell migration rates, numbers of invasive cells, *MAPK* mRNA, *ERK* mRNA, PCNA, N-cadherin, p-MAPK/MAPK, p-ERK1/2/ERK1/2, S-phase cell proportion, and levels of c-Fos and c-Jun ($P<0.05$); apoptosis rate, E-cadherin, Cleaved-CASP9 protein levels, and G_0/G_1 -phase cell proportion were increased ($P<0.05$). Compared with the 200 nmol/L remifentanil group, the remifentanil+C16-PAF group showed partial reversal of these trends in AGS cells ($P<0.05$). In summary, remifentanil can inhibit malignant biological behaviors of esophago-gastric junction adenocarcinoma cells by suppressing the MAPK/ERK pathway.

Keywords remifentanil; mitogen activated protein kinase; extracellular signal regulated kinase; esophago-gastric junction adenocarcinoma; proliferation

越来越多的证据表明阿片类药物可以抑制肿瘤生长,例如,瑞芬太尼和吗啡可促进体外胃癌细胞凋亡并降低细胞活力^[1]。近20年来,食管胃结合部腺癌的发病率迅速上升,其缺乏早期症状,食管癌胃结合部腺癌患者在初诊时已出现广泛的局部侵袭和远处转移。虽手术和化疗放疗取得较大进展,但总体5年生存率仍为10%~15%,因此迫切需要更加有效的治疗策略^[2]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族,有助于将细胞外信号传递到细胞内^[3]。MAPK/ERK级联反应在调节细胞增殖、分化和对各种外部压力反应等过程中起至关重要作用。研究显示,激活MAPK可促进小鼠胃炎和肿瘤发生,阻断MAPK/ERK信号则抑制食管鳞状细胞癌进展,表明有效调控该信号通路可能有助于改善患者治疗结局^[4]。然而,瑞芬太尼能否通过调控MAPK/ERK通路抑制食管胃结合部腺癌细胞恶性生物学行为尚不清楚。为进一步明确瑞芬太尼在食管胃结合部腺癌中的应用价值,本研究展开相关探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 《食管胃结合部腺癌外科治疗中国专家共识(2024年版)》建议, Siewert II型和III型食管胃结合部腺癌参照胃癌进行分期^[5]。人胃腺癌细胞系AGS可从中国科学院上海细胞库获取。

1.1.2 试剂 瑞芬太尼(remifentanil)(国药准字H20143314)购自江苏恩华药业股份有限公司;

MAPK/ERK激活剂(批号HY-108635)(C16-PAF)购自美国MedChemExpress公司; F-12K培养液(批号MA0230)购自大连美仑生物技术有限公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号D806645)购自上海麦克林生化科技有限公司; EdU染色试剂盒(批号R0408)购自广州市锐博生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲液(即用型干粉)(批号BL601A)、4%多聚甲醛(批号BL539A)和Hoechst 33342染色液(批号CS302)购自安徽白鲨生物科技有限公司; 0.5%结晶紫(批号60506ES)、细胞凋亡检测试剂盒(批号40302ES)和BCA蛋白检测试剂盒(批号20200ES76)购自翌圣生物科技上海股份有限公司; Trizol试剂(批号abs60154)、M-MLV RTase试剂盒(批号R423)和SYBR Premix Ex Taq(批号Q713)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PIRA裂解缓冲液(批号P0013B)、QuickBlock™ Western封闭液(批号P0252)和增强化学发光试剂(批号P0018S)购自上海碧云天生物科技有限公司; 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(批号13110)、E钙黏着蛋白(E-cadherin)(批号3195)、N钙黏着蛋白(N-cadherin)(批号13116)、MAPK(批号9212)、p-MAPK(批号8690)、ERK1/2(批号9102)、p-ERK1/2(批号4695)和 α -微管蛋白(α -tubulin)(批号2125)、c-Fos(批号2250)、c-Jun(批号9165)、Cleaved-caspase9(批号31245)一抗以及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(批号7074、7076)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 将AGS细胞接种于F-12K

完全培养液, 37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养。将生长状态良好的 AGS 细胞随机分为对照组 (正常培养, 不进行干预), 瑞芬太尼低、中、高剂量组 (50、100、200 nmol/L 瑞芬太尼), 瑞芬太尼+C16-PAF 组 (200 nmol/L 瑞芬太尼+5 μmol/L C16-PAF 共同处理)。

1.2.2 MTT 检测 将 AGS 细胞接种至 96 孔板 (3×10³/孔), 24 h 后。按照 MTT 试剂盒说明书操作, 并使用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度(D)值。

1.2.3 EdU 染色 将 AGS 细胞接种至 48 孔板 (7×10³/孔), 按照 EdU 试剂盒说明书操作, 并使用 Hoechst 33342 染色液标记细胞核。孵育结束后, 使用荧光显微镜捕获 EdU 阳性细胞, 计算 AGS 细胞 EdU 阳性率。

1.2.4 划痕实验 将 AGS 细胞接种于 24 孔板 (1.5×10⁴/孔), 细胞汇合达 90% 时, 用无菌移液器吸头进行划痕并在显微镜下记录划痕宽度(L₀)。用各组无血清培养液配制的瑞芬太尼在 37 °C 下孵育细胞 24 h, 再次拍摄划痕处并记录划痕宽度(L₂₄)。细胞迁移率(%)=(1-L₂₄/L₀)×100%。

1.2.5 Transwell 小室法 将处理 24 h 后的各组 AGS 细胞分组收集后, 以 PBS 进行洗涤, 用无血清培养基重悬后将各组细胞密度调整为 1×10⁵/mL, 每组取 200 μL 单细胞悬液进行细胞侵袭检测。具体步骤: 将上述各组单细胞悬液接种于 24 孔 transwell 培养板上室 (用基底胶进行了包被) 中培养 6 h, 向下室内加入含 10% 胎牛血清的 F-12K 完全培养液, 细胞继续培养 24 h 后取下室细胞, 以常规方法进行洗涤、固定、结晶紫染色处理。在染色结束和洗涤后进行镜下观察、拍照, 再用 ImageJ 软件定量各组下室内细胞数, 即为各组细胞侵袭数。

1.2.6 流式细胞检测术 各组 AGS 细胞用瑞芬太尼处理 24 h, 收集沉淀并用预冷 PBS 重悬 3 次, 离心 (4 °C、800 r/min、5 min), 细胞沉淀用 0.5 mL 结合缓

冲液重悬, 密度调整为 1×10⁵/mL。室温下, 避光加入 10 μL PI 和 5 μL Annexin V-FITC 溶液染色 15 min, 每 5 min 重悬一次细胞, 使用流式细胞仪分析 AGS 细胞凋亡情况。按照细胞周期检测试剂盒步骤, 对应检测细胞周期阻滞情况。

1.2.7 RT-qPCR 根据制造商的说明书进行 RNA 分离和 RT-qPCR。Trizol 试剂用于提取各组 AGS 细胞总 RNA。使用 M-MLV RTase 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq 进行 RT-qPCR 检测基因表达情况。*α-tubulin* 用作内源性对照, 通过 2^{-ΔΔCt} 方法评估 MAPK 和 ERK 在细胞中的表达情况。各引物序列见表 1。

1.2.8 Western blot 使用预冷 RIPA 裂解液提取各组细胞中蛋白, 按 BCA 法对蛋白定量。并于蛋白变性后行 SDS-PAGE (以 80 V 电压电泳使蛋白样品进入分离胶, 待溴酚蓝跑至两胶交界处, 调节电压为 120 V, 直至溴酚蓝跑出胶板; 电泳具体时间根据蛋白分子量大小做调整, 一般需 1 h 左右), 转膜 (湿法转膜, 250 mA 恒流, 转膜时间 1.5 h 左右。注: 转膜过程中于转膜槽内添加冰块, 低温转膜)。再将蛋白条带与对应一抗 PCNA (1:1 200)、E-cadherin (1:1 500)、N-cadherin (1:1 500)、MAPK (1:1 200)、p-MAPK (1:1 000)、ERK1/2 (1:1 200)、p-ERK1/2 (1:1 000) 和 *α-tubulin* (1:2 000)、c-Fos (1:1 000)、c-Jun (1:1 000)、Cleaved-caspase9 (1:1 000) 4 °C 过夜孵育。次日, 添加对应种属二抗 (1:500) 室温孵育膜 60 min。结束后, 行曝光检测, 并以 ImageJ 软件分析蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

实验数据均以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示并使用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。各组结果采用单因素方差分析后, 再使用 LSD-t 检验进行两组间比较; P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
MAPK	Forward primer: TGC TTC GTG AAC TGA AAC ATC C Reverse primer: CCA GAG TCA ACT GAG TCA TCA CT
ERK	Forward primer: CGG GGC ATC TTC GAG ATC G Reverse primer: CAG AAC AAC GCC GTT TCA GTT
<i>α-tubulin</i>	Forward primer: GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT Reverse primer: GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG

2 结果

2.1 瑞芬太尼抑制AGS细胞增殖

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞 D_{490} 值和EdU阳性细胞率均降低($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞 D_{490} 值和EdU阳性细胞率升高, 且高约2倍($P<0.05$)。见图1。

2.2 瑞芬太尼抑制AGS细胞迁移和侵袭

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞迁移率和侵袭数量减少($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞迁移率和侵袭数量增多($P<0.05$), 且高约

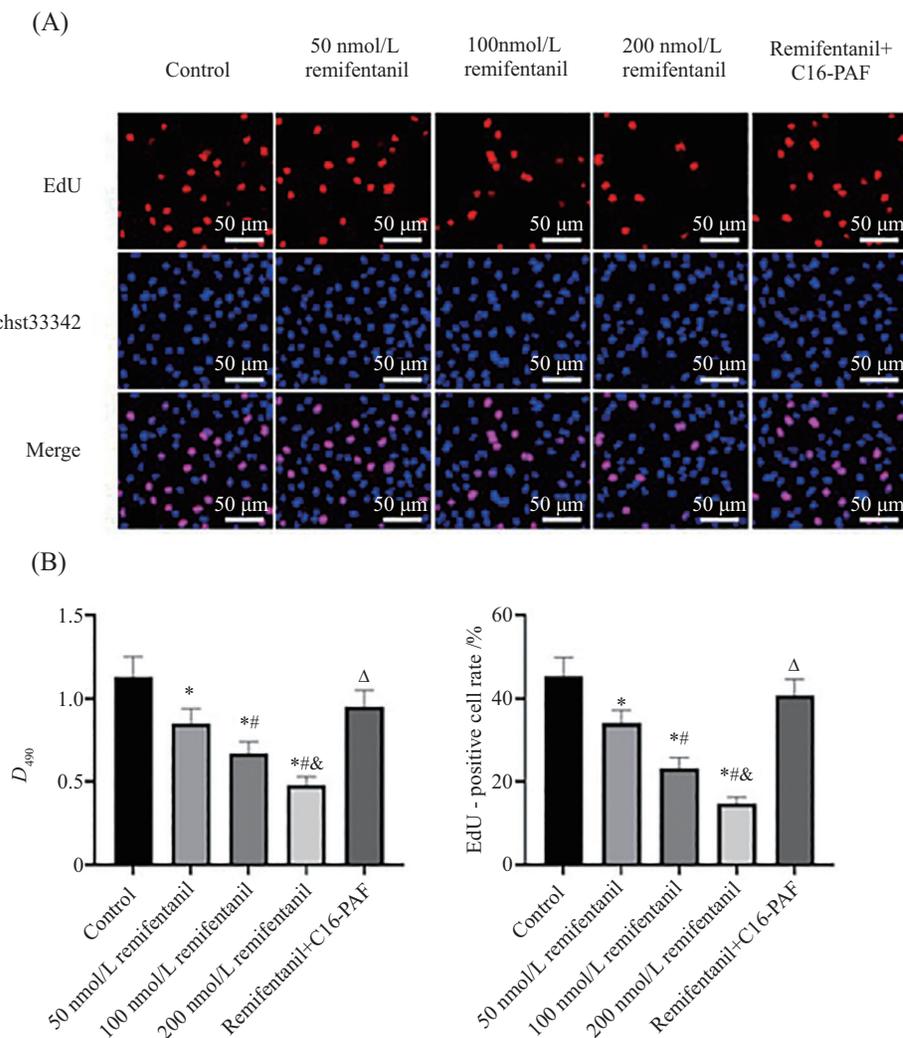
3倍。见图2。

2.3 瑞芬太尼促进AGS细胞凋亡

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞凋亡率升高($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞凋亡率降低($P<0.05$)。见图3。

2.4 瑞芬太尼诱导AGS细胞周期阻滞

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞 G_0/G_1 期细胞占比升高($P<0.05$), S期细胞占比降低($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞 G_0/G_1 期细胞数降低($P<0.05$), S期细胞数升高($P<0.05$)。见图4。

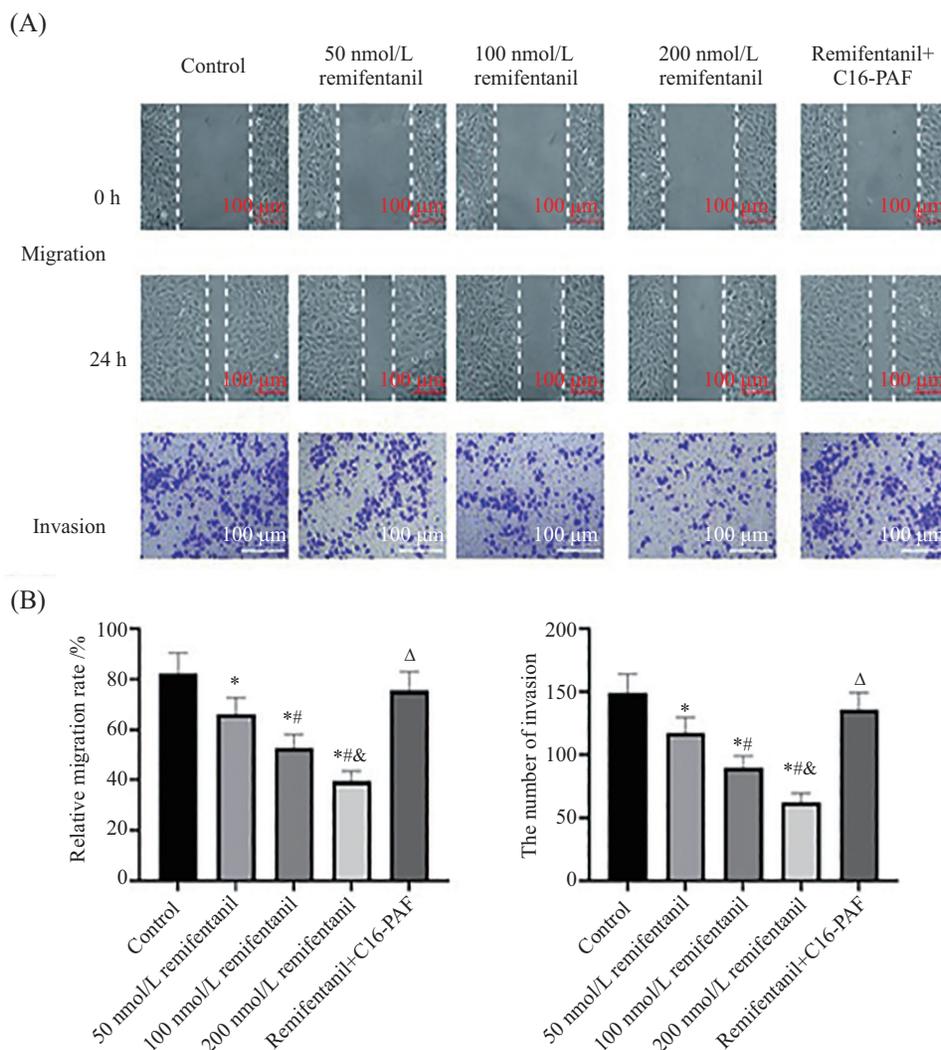


A: AGS细胞EdU染色图; B: AGS细胞 D_{490} 值和EdU阳性细胞率比较。n=6, 实验独立重复3次。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; & $P<0.05$, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; Δ $P<0.05$, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: EdU staining images of AGS cells; B: comparison of AGS cell D_{490} values and EdU-positive cell rates. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with 50 nmol/L remifentanyl group; & $P<0.05$ compared with 100 nmol/L remifentanyl group; Δ $P<0.05$ compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图1 瑞芬太尼抑制AGS细胞增殖

Fig.1 Remifentanyl inhibits AGS cell proliferation



A: AGS细胞迁移和侵袭能力; B: AGS细胞迁移率、侵袭数比较。n=6, 实验独立重复3次。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; & $P<0.05$, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; $\Delta P<0.05$, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: migration and invasion abilities of AGS cells; B: comparison of AGS cell migration rate, number of invaded cells. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with 50 nmol/L remifentanyl group; & $P<0.05$ compared with 100 nmol/L remifentanyl group; $\Delta P<0.05$ compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图2 瑞芬太尼抑制AGS细胞迁移和侵袭

Fig.2 Remifentanyl inhibits AGS cell migration and invasion

2.5 瑞芬太尼降低AGS细胞MAPK和ERK mRNA表达水平

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞MAPK和ERK mRNA表达水平下降($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞MAPK和ERK mRNA表达水平升高($P<0.05$), 且高约2倍。见图5。

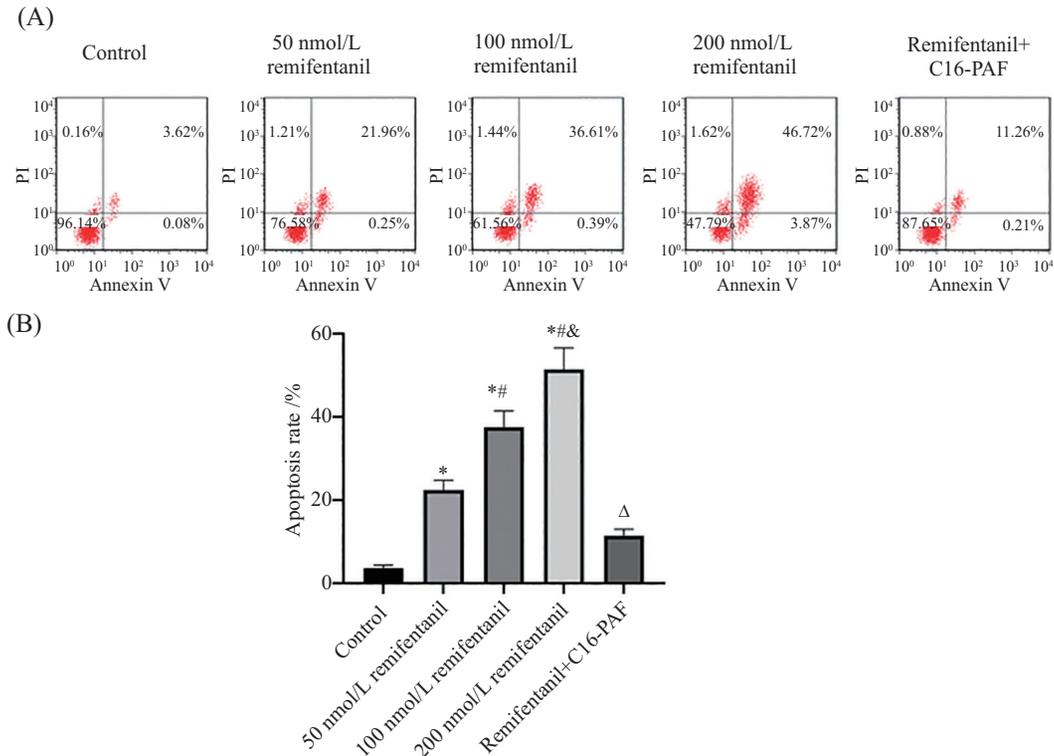
2.6 瑞芬太尼影响AGS细胞增殖、迁移和MAPK/ERK通路相关蛋白表达情况

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞PCNA、N-cadherin、p-MAPK/MAPK、

p-ERK1/2/ERK1/2水平降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白水平升高($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞PCNA、N-cadherin、p-MAPK/MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2水平降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白水平升高($P<0.05$)。见图6。

2.7 瑞芬太尼影响凋亡相关蛋白及MAPK/ERK通路下游信号c-Fos、c-Jun蛋白表达情况

与对照组相比, 50、100、200 nmol/L瑞芬太尼组AGS细胞c-Fos、c-Jun水平降低($P<0.05$), Cleaved-caspase9水平升高($P<0.05$); 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比, 瑞芬太尼+C16-PAF组AGS细胞c-Fos、c-Jun



A: AGS细胞凋亡流式检测图; B: AGS细胞凋亡流式检测图。n=6, 实验独立重复3次。*P<0.05, 与对照组相比; #P<0.05, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; &P<0.05, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; ^ΔP<0.05, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: flow cytometry images of AGS cell apoptosis; B: comparison of AGS cell apoptosis rate. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. *P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with 50 nmol/L remifentanyl group; &P<0.05 compared with 100 nmol/L remifentanyl group; ^ΔP<0.05 compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图3 瑞芬太尼促进AGS细胞凋亡
Fig.3 Remifentanyl promotes AGS cell apoptosis

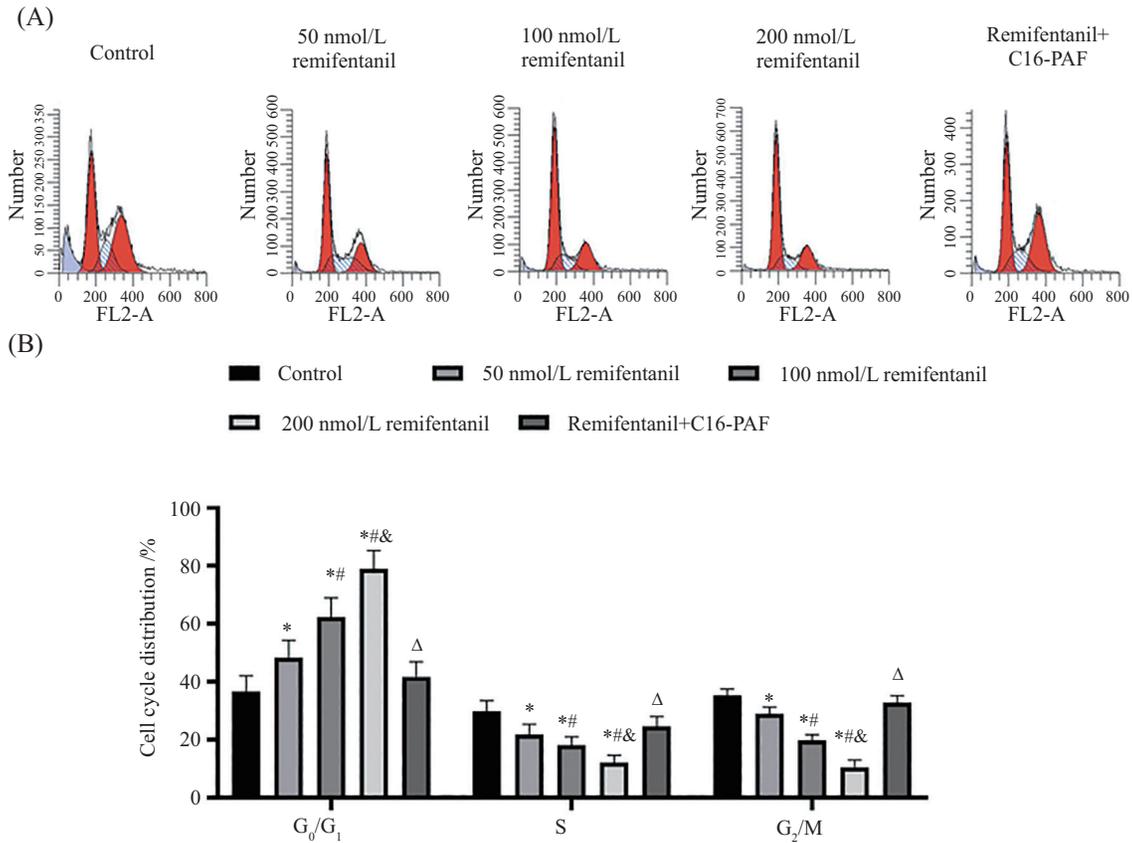
蛋白水平升高(P<0.05), Cleaved-caspase9水平降低(P<0.05)。见图7。

3 讨论

食管胃结合部腺癌可分为远端食管腺癌、贲门腺癌、贲门下腺癌三种病理类型, 严重威胁人类生命健康。瑞芬太尼作为一种超短效阿片类镇痛药, 可被非特异性血液和组织酯酶迅速代谢, 有效减少炎症反应, 激活抗凋亡信号通路, 并抑制氧化应激, 因此在临床麻醉中具有独特地位^[6]。细胞增殖是指细胞在周期调控因子的作用下, 通过DNA复制等完成细胞分裂的过程, PCNA是DNA复制和细胞周期调控的关键因素。肿瘤转移涉及细胞迁移, 普遍认为抑制肿瘤细胞迁移和侵袭是有效的肿瘤治疗手段。细胞凋亡通常称为细胞程序性死亡, 癌细胞具有连续增殖、抵抗细胞凋亡能力。本研究结果显示, 瑞芬太尼可浓度依赖性抑制AGS细胞增殖、迁移、侵袭, 促进其凋亡并上调凋亡相关蛋白Cleaved-

caspase9水平, 阻滞细胞周期, 使G₀/G₁期细胞占比升高), S期细胞占比降低, 提示瑞芬太尼可通过阻滞AGS细胞于G₁/S期转换发挥作用, 与瑞芬太尼调控miR-519d-3p抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的研究结果一致^[7]。然而, 其具体作用机制还有待进一步验证。

瑞芬太尼对μ-OPR具有高亲和力, 对δ和κ-OPR的亲和力相对较低。μ、κ、δ-OPR是七次跨膜螺旋结构域受体, 属于A类G蛋白偶联受体的γ亚家族, 在阿片类药物和其他激动剂刺激下, OPR影响一系列下游信号激酶, 包括ERK信号通路^[8-9]。MAPK/ERK级联主要通过诱导小G蛋白启动, 进而通过将MAP3K激酶传递到细胞膜并进一步激活其他激酶传递信号, 有助于ERK蛋白激活^[10]。MAPK/ERK信号的激活促进上皮-间充质转化(EMT)^[11], 研究显示, EMT标志物E-cadherin缺失与食管胃结合部腺癌临床病理分期和预后不良密切相关, 其在食管胃结合部腺癌侵袭和转移中起关键作用^[12]。基于此, 本研究展

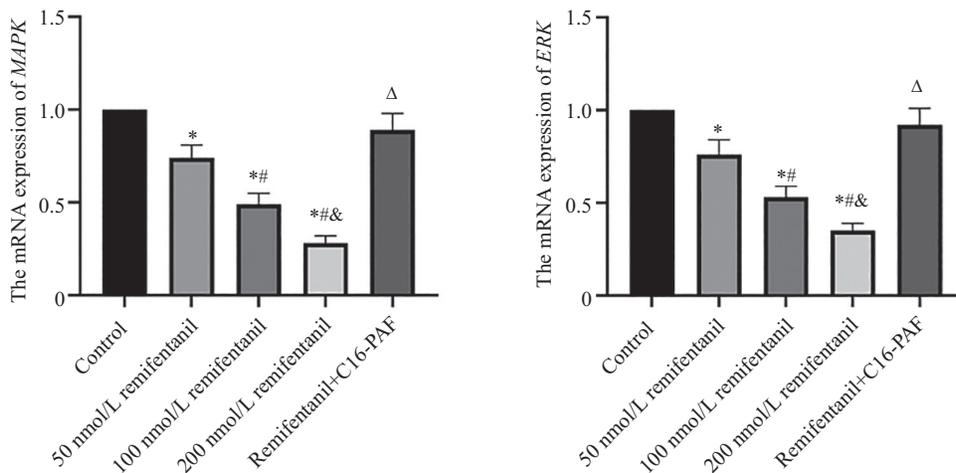


A: AGS细胞周期检测图; B: AGS细胞周期比较。n=6, 实验独立重复3次。*P<0.05, 与对照组相比; #P<0.05, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; &P<0.05, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; ΔP<0.05, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: comparison of AGS cell cycle; B: comparison of AGS cell cycle. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. *P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with 50 nmol/L remifentanyl group; &P<0.05 compared with 100 nmol/L remifentanyl group; ΔP<0.05 compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图4 瑞芬太尼诱导AGS细胞周期阻滞

Fig.4 Induction of AGS cell cycle arrest by remifentanyl

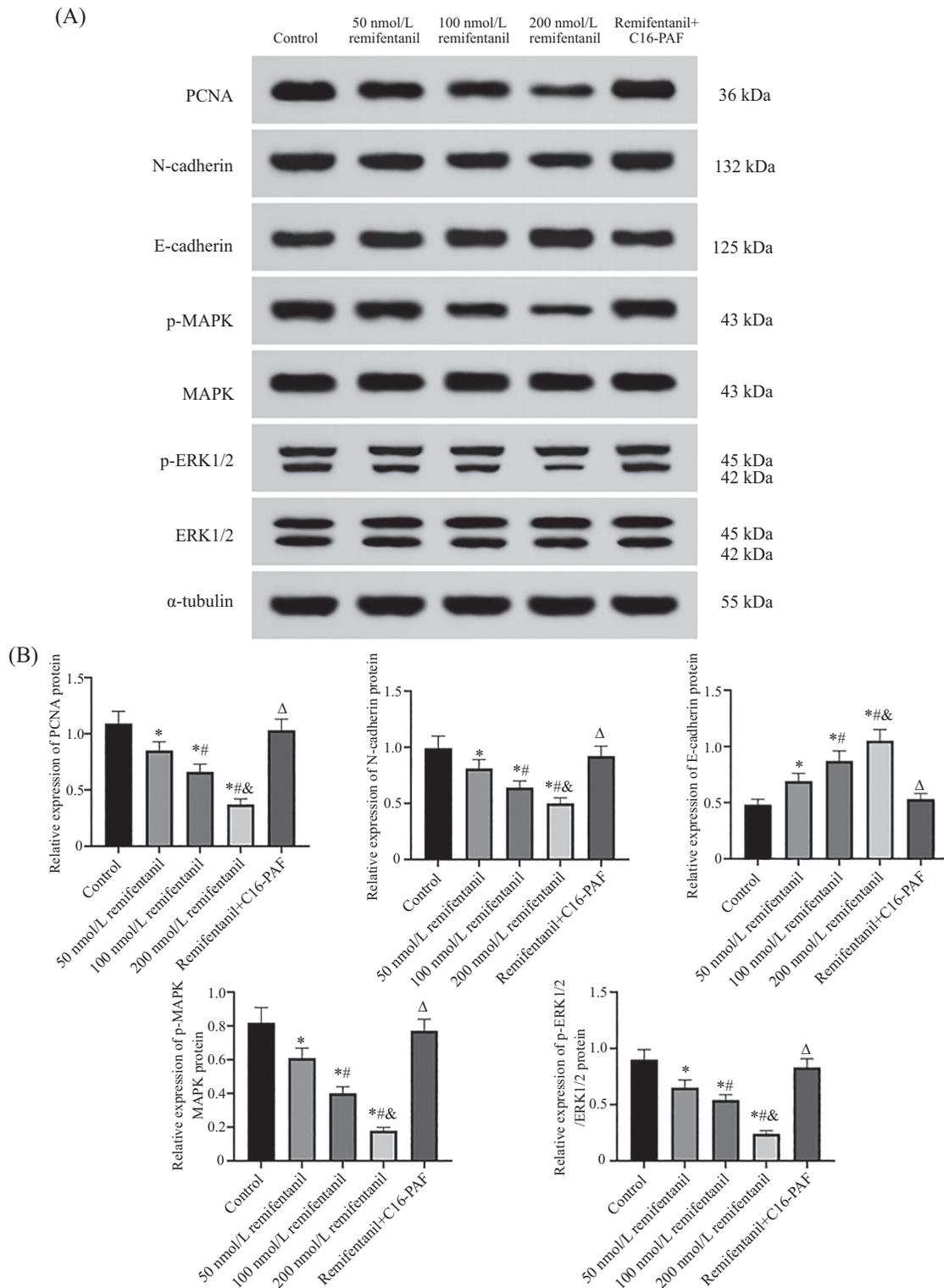


n=6, 实验独立重复3次。*P<0.05, 与对照组相比; #P<0.05, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; &P<0.05, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; ΔP<0.05, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

n=6, the experiment was independently repeated 3 times. *P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with 50 nmol/L remifentanyl group; &P<0.05 compared with 100 nmol/L remifentanyl group; ΔP<0.05 compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图5 AGS细胞MAPK和ERK mRNA表达比较

Fig.5 Comparison of MAPK and ERK mRNA expression in AGS cells



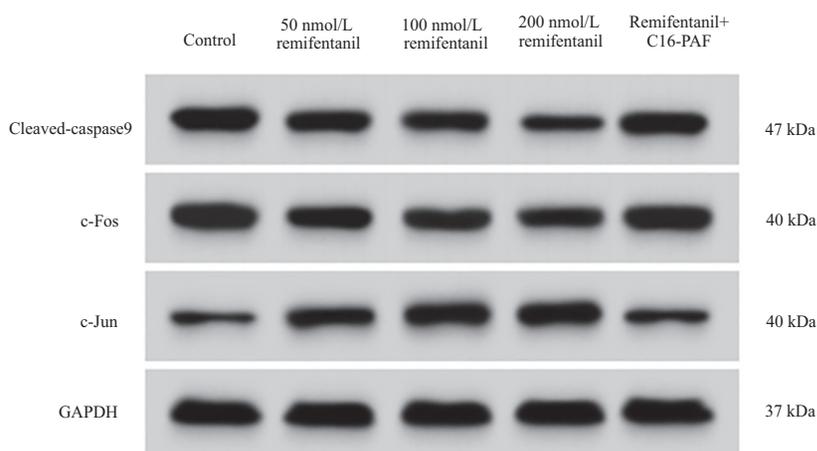
A: AGS细胞PCNA、N-cadherin、E-cadherin、p-MAPK、MAPK、p-ERK1/2和ERK1/2蛋白条带; B: AGS细胞PCNA、N-cadherin、E-cadherin、p-MAPK、MAPK、p-ERK1/2和ERK1/2蛋白表达比较。n=6, 实验独立重复3次。* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; & $P<0.05$, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; ^Δ $P<0.05$, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: Western blot bands for PCNA, N-cadherin, E-cadherin, p-MAPK, MAPK, p-ERK1/2, and ERK1/2 in AGS cells; B: expression levels of PCNA, N-cadherin, E-cadherin, p-MAPK, MAPK, p-ERK1/2, and ERK1/2 proteins in AGS cells. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with 50 nmol/L remifentanyl group; & $P<0.05$ compared with 100 nmol/L remifentanyl group; ^Δ $P<0.05$ compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

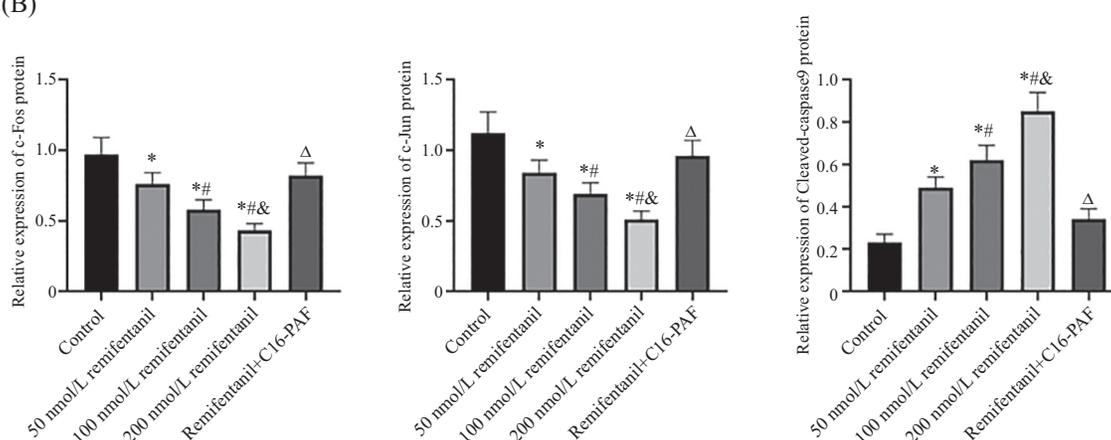
图6 瑞芬太尼影响AGS细胞增殖、迁移和MAPK/ERK通路相关蛋白表达情况

Fig.6 Effects of remifentanyl on AGS cell proliferation, migration, and expression of MAPK/ERK pathway related proteins

(A)



(B)



A: Western blot检测AGS细胞c-Fos、c-Jun、Cleaved-caspase9蛋白条带; B: AGS细胞c-Fos、c-Jun、Cleaved-caspase9蛋白表达比较。n=6, 实验独立重复3次。* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与50 nmol/L瑞芬太尼组相比; & $P < 0.05$, 与100 nmol/L瑞芬太尼组相比; Δ $P < 0.05$, 与200 nmol/L瑞芬太尼组相比。

A: Western blot bands for c-Fos, c-Jun, and Cleaved-caspase9 in AGS cells; B: expression levels of c-Fos, c-Jun, and Cleaved-caspase9 proteins in AGS cells. n=6, the experiment was independently repeated 3 times. * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with 50 nmol/L remifentanyl group; & $P < 0.05$ compared with 100 nmol/L remifentanyl group; Δ $P < 0.05$ compared with 200 nmol/L remifentanyl group.

图7 瑞芬太尼促进凋亡相关蛋白表达并抑制MAPK/ERK通路下游信号c-Fos、c-Jun蛋白表达

Fig.7 Remifentanyl promotes the expression of apoptosis related proteins and inhibits the expression of downstream signals c-Fos and c-Jun proteins in the MAPK/ERK pathway

开了相关探讨。结果发现, 瑞芬太尼可明显抑制细胞中MAPK、ERK mRNA及其磷酸化蛋白表达, 并上调E-cadherin表达, 下调N-cadherin蛋白表达, 且下调下游效应分子c-Fos、c-Jun蛋白表达水平。而联合MAPK/ERK激活剂C16-PAF处理后, 发现以上蛋白表达趋势均发生了逆转, 且瑞芬太尼对AGS细胞恶性生物学行为均受到削弱, 提示瑞芬太尼可通过阻断MAPK/ERK通路信号转导抑制AGS细胞恶性生物学行为。

综上所述, 瑞芬太尼抑制食管胃结合部腺癌细胞增殖、迁移、侵袭可能是通过抑制MAPK/ERK通

路发挥作用的。本研究对于食管胃结合部腺癌的治疗方法提出新可能。然而, 目前研究仅为体外细胞实验, 未验证体内效应。因此, 后续会优化实验方案, 开展动物模型验证, 在体内瑞芬太尼是否仍能通过调控MAPK/ERK通路抑制肿瘤生长, 并纳入临床样本分析, 以期临床提供更加详细的参考依据。

参考文献 (References)

- [1] WU W, WEI N, JIANG C N, et al. Effects of sufentanyl on human gastric cancer cell line SGC-7901 *in vitro* [J]. Cent Eur J Immunol, 2014, 39: 299-305.
- [2] 吕雪, 李雪薇, 杨婷, 等. 食管胃结合部腺癌生物信息学分析

- 及Involucrin基因突变位点筛选[J]. 基础医学与临床(LÜ X, LI X W, YANG T, et al. Bioinformatics analysis of esophagogastric junction adenocarcinoma and screening of involucrin gene mutation sites [J]. Journal of Basic Medical and Clinical), 2022, 42: 235-42.
- [3] LAN Y, ZHENG Y K, WU L Y, et al. Polygonum cuspidatum alcohol extract exerts analgesic effects via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 3151-67.
- [4] FU K, CHEUNG A K, WONG C C, et al. Streptococcus anginosus promotes gastric inflammation, atrophy, and tumorigenesis in mice [J]. Cell, 2024, 187: 882-96, e17.
- [5] 中国医师协会内镜医师分会腹腔镜外科专业组, 国际食管疾病学会中国分会, 中国食管胃结合部腺癌研究协作组, 等. 食管胃结合部腺癌外科治疗中国专家共识(2024年版)[J]. 中华胃肠外科杂志(CHINESE GASTROINTESTINAL ENDOSCOPY SOCIETY, LAPAROSCOPIC SURGERY PROFESSIONAL COMMITTEE OF THE ENDOSCOPY PHYSICIANS BRANCH OF THE CHINESE MEDICAL DOCTOR ASSOCIATION, INTERNATIONAL SOCIETY FOR DISEASES OF THE ESOPHAGUS CHINA CHAPTER; CHINA ESOPHAGOGASTRIC JUNCTION ADENOCARCINOMA RESEARCH COLLABORATION, et al. Esophagogastric junction adenocarcinoma: Chinese Expert Consensus on Surgical Treatment, 2024 Edition) [J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery), 2024, 27: 109-26.
- [6] LI J, ZHU H, WANG Y, et al. Remifentanyl is superior to propofol for treating emergence agitation in adults after general anesthesia [J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18:341-50.
- [7] 孙成成, 刘宇, 胡旭明. 瑞芬太尼通过miR-519d-3p/STAT3对胃癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. 世界华人消化杂志(SUN C C, LIU Y, HU X M. The effect of remifentanyl on gastric cancer cell proliferation and apoptosis via miR-519d-3p/STAT3 [J]. World Journal of Chinese Digestive Diseases), 2019, 27: 7-13.
- [8] SAKAMURU S, ZHAO J, XIA M, et al. Predictive models to identify small molecule activators and inhibitors of opioid receptors [J]. J Chem Inf Model, 2021, 61: 2675-85.
- [9] WANG Q, ZHOU J Y, LIU L, et al. Resveratrol activates MAPK/ERK pathway to regulate oestrogen metabolism in type I endometrial cancer [J]. BMC Complement Med Ther, 2024, 24(1): 227-41.
- [10] SAFA A, ABAK A, SHOOREI H, et al. MicroRNAs as regulators of ERK/MAPK pathway: A comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 1-12.
- [11] WU L, WANG Z, HE X, et al. GJA1 reverses arsenic-induced EMT via modulating MAPK/ERK signaling pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2022, 450: 116-23.
- [12] HU K, ZHENG Q M, WANG Y P, et al. Clinical and prognostic features of E-cadherin in adenocarcinoma of the esophagogastric junction patients [J]. Eur J Cancer Prev, 2023, 32: 119-25.