

2 结 果

2.1 未穿孔组与穿孔组临床资料对比 两组 CRP、Hb、ALB 水平比较, 差异均无统计学意义 ($P>$

0.05)。与未穿孔组相比, 穿孔组 WBC、NEUT、PLT 明显升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 未穿孔组与穿孔组临床资料对比 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	WBC($\times 10^9$ /L)	NEUT($\times 10^9$ /L)	PLT($\times 10^9$ /L)	CRP(mg/L)	Hb(g/L)	ALB(g/L)
未穿孔组	89	14.16 \pm 4.23	12.05 \pm 3.64	251.46 \pm 65.52	25.46 \pm 3.47	134.05 \pm 10.24	43.52 \pm 4.41
穿孔组	43	19.31 \pm 5.41	15.64 \pm 4.17	278.15 \pm 70.68	26.62 \pm 3.65	133.84 \pm 10.63	43.12 \pm 4.39
<i>t</i> / χ^2		-5.971	-5.061	-2.138	-1.770	0.109	0.489
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.034	0.079	0.913	0.626

2.2 未穿孔组和穿孔组血清 RANTES、IL-35 水平比较 与未穿孔组相比, 穿孔组的 RANTES 水平明显升高, IL-35 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 未穿孔组和穿孔组急性阑尾炎患儿血清 RANTES、IL-35 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	RANTES(μ g/L)	IL-35(pg/mL)
未穿孔组	89	1.62 \pm 0.47	15.85 \pm 5.13
穿孔组	43	2.41 \pm 0.55	8.93 \pm 1.45
<i>t</i>		-8.554	8.664
<i>P</i>		<0.001	<0.001

2.3 急性阑尾炎患儿血清 RANTES、IL-35 水平之间的相关性 Pearson 相关分析结果显示, 血清 RANTES 水平与 IL-35 水平呈负相关性 ($r=-0.474, P<0.05$)。

2.4 多因素 Logistic 回归分析急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的影响因素 以急性阑尾炎患儿是否发生阑尾穿孔作为因变量(0=未发生, 1=发生), 以血清 RANTES、IL-35、WBC、NEUT、PLT 为自变量(均为连续性变量, 原值代入), 进行多因素 Logistic 回归分析。结果显示, 血清 RANTES 水平、WBC、NEUT、

PLT 升高是急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的危险因素 ($P<0.05$), IL-35 水平升高是急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的保护因素 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 多因素 Logistic 回归分析急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的影响因素

影响因素	<i>B</i>	<i>SE</i>	Wald χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>OR</i> 的 95% <i>CI</i>
RANTES	0.933	0.364	6.569	0.010	2.542	1.245~5.188
IL-35	-0.772	0.332	5.410	0.020	0.462	0.241~0.886
WBC	1.293	0.545	5.632	0.018	3.645	1.253~10.607
NEUT	0.969	0.398	5.931	0.015	2.636	1.208~5.751
PLT	0.498	0.146	11.651	0.001	1.646	1.236~2.191

2.5 血清 RANTES、IL-35 对急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的诊断价值分析 以急性阑尾炎患儿是否发生阑尾穿孔为状态变量(0=未发生, 1=发生), 以 RANTES、IL-35 为检验变量, 绘制 ROC 曲线。结果显示, 血清 RANTES、IL-35 单独及联合诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的曲线下面积(AUC)分别为 0.852、0.870、0.937。血清 RANTES、IL-35 联合诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的 AUC 优于 RANTES、IL-35 单独诊断的 AUC ($Z_{二者联合-RANTES}=2.948, P=0.003; Z_{二者联合-IL-35}=2.087, P=0.037$)。见表 4。

表 4 血清 RANTES、IL-35 对急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的诊断价值

项目	AUC	最佳截断值	AUC 的 95% <i>CI</i>	灵敏度(%)	特异性(%)	约登指数
RANTES	0.852	1.719 μ g/L	0.779~0.907	95.30	65.20	0.605
IL-35	0.870	13.178 pg/mL	0.800~0.922	93.00	70.80	0.638
二者联合	0.937	—	0.898~0.980	88.37	93.26	0.816

注:—表示无数据。

3 讨 论

急性阑尾炎是小儿腹部手术的最常见原因, 尽管医疗技术已经取得了进步, 但对该病的诊断仍然较为困难, 延误诊断和治疗会增加患儿阑尾穿孔的风险^[13-14]。阑尾穿孔会提高患者术后病死率和住院率^[15-16]。因此, 需要特异的生物标志物对急性阑尾炎患儿是否发生阑尾穿孔进行诊断, 这有助于提高儿童

急性阑尾炎伴穿孔的诊断准确性, 为临床提供新的诊断方法, 从而改善患儿的治疗效果和预后。

RANTES 属 CC 亚族成员中的一员, 是由激活的 T 淋巴细胞分泌的一种趋化因子, 可结合趋化因子受体, 诱导白细胞向病变处迁移, 分泌炎症递质, 促进炎症反应^[17-18]。桑云华等^[19]研究表明, 减少结肠黏膜趋化因子 RANTES 的表达, 对急性期结肠炎小鼠有治

疗作用。在本研究中,与未穿孔组相比,穿孔组的 RANTES 水平明显升高,提示了 RANTES 与急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔有关,且其高表达会对患儿产生不利的影响。分析原因为急性阑尾炎发生阑尾穿孔后会促进炎症反应,使巨噬细胞穿过血管内皮,激活 T 淋巴细胞进而分泌 RANTES^[20-21]。此外,本研究中血清 RANTES 诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的 AUC 为 0.852,提示血清 RANTES 可能是诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的潜在生物标志物,当血清 RANTES 水平 $>1.719\text{ }\mu\text{g/L}$ 时,应重点关注并及时治疗。

IL-35 主要由调节性 T 淋巴细胞分泌,具有抗炎的作用,对机体起一定的保护作用^[22-23]。WANG 等^[24]研究发现,在结肠炎小鼠模型中,IL-35 具有多种抗炎作用,可以通过减少巨噬细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞的浸润,增加调节性 T 淋巴细胞的浸润,调节炎症反应,进而减慢结肠炎小鼠的病情进展。唐文静等^[25]的研究表明,与健康对照组比较,溃疡性结肠炎组血清 IL-35 水平降低。在本研究中,与未穿孔组相比,穿孔组 IL-35 水平降低,提示了血清 IL-35 与急性阑尾炎患儿是否阑尾穿孔有关,且其低表达会增加急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的风险。另外,本研究中血清 IL-35 诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔发生的 AUC 为 0.870,提示血清 IL-35 可能是诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的辅助指标,当血清 IL-35 水平 $<13.178\text{ pg/mL}$ 时,应及时制订诊疗方案,防止急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的发生及病情进一步恶化。

本研究 Pearson 相关分析结果可知,血清 RANTES 水平与 IL-35 水平呈负相关,说明二者共同参与急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的发生。多因素 Logistic 回归分析结果显示,血清 RANTES 水平、WBC、NEUT、PLT 升高是急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的危险因素,血清 IL-35 水平升高是急性阑尾炎患儿发生阑尾穿孔的保护因素。这说明血清 RANTES 高表达与 IL-35 低表达可能增加急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的发生风险。血清 RANTES、IL-35 联合诊断急性阑尾炎患儿阑尾穿孔的 AUC 最高,优于血清 RANTES、IL-35 单独诊断,提示了 RANTES、IL-35 联合检测对急性阑尾炎患儿阑尾穿孔有一定的辅助诊断价值,为患儿的早期诊断和及时治疗带来了契机。

综上所述,急性阑尾炎患儿血清 RANTES 水平升高及 IL-35 水平降低与阑尾穿孔的发生有关,二者联合诊断阑尾穿孔的效能更好,可作为临床辅助诊断阑尾穿孔的潜在标志物。但 RANTES、IL-35 在急性阑尾炎患儿阑尾穿孔中的影响机制还尚未明确,后期将设计实验进行论证。

参考文献

[1] BECKER C, KHARBANDA A. Acute appendicitis in pe-

- diatric patients: an evidence-based review [J]. *Pediatr Emerg Med Pract*, 2019, 16(9): 1-20.
- [2] 王一心, 李革. 小儿急性阑尾炎诊断与治疗的研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2023, 61(9): 96-98.
- [3] TÉOULE P, LAFFOLIE J D, ROLLE U, et al. Acute appendicitis in childhood and adulthood [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(45): 764-774.
- [4] AMANOLLAHI O, TAT S. The study of diagnostic value of elevation of serum amylase as a predictive factor for appendiceal perforation in children with acute appendicitis [J]. *Int J Pediatr*, 2018, 6(2): 7213-7217.
- [5] 张林, 张聪, 李勇, 等. 白介素-6、降钙素原及 C-反应蛋白对儿童急性阑尾炎伴穿孔的预测价值研究 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2021, 20(8): 749-753.
- [6] AKTURK O M, YILDIRIM D, ÇAKIR M, et al. Elevated serum bilirubin levels may predict perforation of the appendix [J]. *Ann Ital Chir*, 2019, 90: 427-431.
- [7] 赵旭峰, 毕乐薇, 闫蓓蕾, 等. 纤维蛋白原在儿童急性阑尾炎穿孔中的预测价值 [J]. *广东医学*, 2021, 42(11): 1320-1323.
- [8] KONG Q, MA X, LYU J X, et al. Plasma RANTES level is correlated with cardio-cerebral atherosclerosis burden in patients with ischemic cerebrovascular disease [J]. *Chronic Dis Transl Med*, 2020, 6(1): 46-54.
- [9] 郭清保, 杨彦龙, 史正华, 等. 重度颅脑外伤患者血清 T 细胞激活性低分泌因子、 γ -干扰素诱导蛋白 10 表达及其预后相关性 [J]. *安徽医药*, 2023, 27(1): 140-144.
- [10] 王月明, 田军艳. 强直性脊柱炎患者血清 IL-35、IL-17 的临床意义 [J]. *河北医药*, 2022, 44(18): 2764-2767.
- [11] 马琴, 向瑜, 邹麟, 等. 原发性胆汁性胆管炎患者血清 IL-35 和 PGRN 表达水平及其临床意义 [J]. *重庆医学*, 2023, 52(17): 2586-2591.
- [12] 陈孝平, 汪建平, 赵继宗. 外科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 385-388.
- [13] DOĞAN M, GÜRLEYEN B. The role of immature granulocyte in the early prediction of acute perforated and nonperforated appendicitis in children [J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2022, 28(3): 375-381.
- [14] ASHJAEI B, MEHDIZADEH M, ALIZADEH H, et al. Evaluating the value of different sonographic findings in diagnosis of acute appendicitis in children [J]. *Afr J Paediatr Surg*, 2022, 19(1): 13-17.
- [15] HEYMOWSKI A, BOSTRÖM L, DAHLBERG M. Plasma sodium and age are important markers of risk of perforation in acute appendicitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2021, 25(1): 287-289.
- [16] BOSTANCI S A, ŞENEL E. The importance of physician speciality on the diagnosis of acute appendicitis and its effect on morbidity in children [J]. *J Paediatr Child Health*, 2022, 58(11): 2003-2007.
- [17] 郑迎辉, 程光存, 徐琪, 等. 血清 T 细胞激活性低分泌因子、补体 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 1、人中性粒细胞防御素 1-3 在冠状动脉粥样硬化性心脏病中表达及意义 [J]. *临床军医杂志*, 2021, 49(10): 1157-1159. (下转第 3200 页)

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.21.019

罗哌卡因抑制膀胱癌 J82 细胞增殖、迁移及侵袭的分子机制研究*

杨欣宇¹, 杨 阳², 王立娟³

1. 河北省保定市第二医院麻醉科, 河北保定 071000; 2. 北京优联眼耳鼻喉医院麻醉科, 北京 100000;

3. 河北省保定市第二医院耳鼻咽喉科, 河北保定 071000

摘要:目的 探讨罗哌卡因对人膀胱癌 J82 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及对 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路的调控作用。方法 体外培养人膀胱癌 J82 细胞, 该研究分为预实验和正式实验两个部分。预实验分组: 对照组 (不进行干预), 低、中、高浓度罗哌卡因组 (200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 罗哌卡因); 正式实验分组: 对照组、罗哌卡因组 (有显著作用浓度的罗哌卡因)、阳性药物组 (100 nmol/L 紫杉醇)、抑制剂组 (罗哌卡因 + 20 $\mu\text{mol/L}$ JNK 信号通路抑制剂 SP600125) 和激活剂组 (罗哌卡因 + 1 $\mu\text{g/mL}$ JNK 信号通路激活剂茴香霉素), 干预 24 h。分别采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU)、划痕法、Transwell 小室法、蛋白免疫印迹法检测细胞活力、增殖率、迁移率、侵袭细胞数、上皮间质转化 (EMT) 及 JNK 通路相关蛋白水平。结果 预实验中, 与对照组比较, 高浓度罗哌卡因组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$), 以高浓度罗哌卡因 (800 $\mu\text{mol/L}$) 进行正式实验。正式实验中, 罗哌卡因组和阳性药物组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数, 以及 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、纤维粘连蛋白 (FN) 和磷酸化 (p)-JNK 表达水平较对照组降低 ($P < 0.05$), E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达水平较对照组升高 ($P < 0.05$)。与罗哌卡因组相比, 抑制剂组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数, 以及 N-cadherin、Vimentin、FN 和 p-JNK 表达水平降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而激活剂组上述指标趋势则正好相反 ($P < 0.05$)。结论 罗哌卡因可能通过阻断 JNK 信号通路活化抑制人膀胱癌 J82 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程。

关键词: 膀胱癌; 罗哌卡因; 人膀胱癌 J82 细胞; c-Jun 氨基末端激酶信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

中图法分类号: R737.14; R318.16

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)21-3195-06

Molecular mechanisms of ropivacaine in inhibiting the proliferation, migration and invasion of bladder cancer J82 cells*

YANG Xinyu¹, YANG Yang², WANG Lijuan³

1. Department of Anesthesiology, Second Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Department of Anesthesiology, Beijing Youlian Eye, Ear, Nose and Throat Hospital,

Beijing 100000, China; 3. Department of Otolaryngology, Second Hospital

of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ropivacaine on the proliferation, migration and invasion of human bladder cancer J82 cells, as well as its regulatory effects on the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway. **Methods** Human bladder cancer J82 cells were cultured in vitro and the experiment of this study was divided into two parts: the preliminary experiment and the formal experiment. In the preliminary experiment, the groups were as follows: control group (without intervention), and low, medium, high concentrations of ropivacaine groups (200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$ ropivacaine). In the formal experiment, the groups included: control group, ropivacaine group (ropivacaine at the concentration with significant effects), positive drug group (100 nmol/L paclitaxel), inhibitor group (ropivacaine + 20 $\mu\text{mol/L}$ JNK signaling pathway inhibitor SP600125), and activator group (ropivacaine + 1 $\mu\text{g/mL}$ JNK signaling pathway activator fennel mycotoxin), with interventions lasting 24 h. Cell viability, proliferation rate, migration rate, number of invasive cells, levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) proteins and JNK signaling pathway-related proteins were detected by cell counting Kit-8 (CCK-8) assay, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay, wound healing assay, Transwell chamber assay and Western blot. **Results** In the preliminary experiment, compared with the

* 基金项目: 河北省卫生健康委员会科研基金项目 (20242031); 河北省保定市科学技术研究与发展指导计划 (17ZF011)。

作者简介: 杨欣宇, 男, 主治医师, 主要从事临床麻醉相关研究。

control group, the cell viability was significantly reduced in the high concentration of ropivacaine group ($P < 0.05$). Therefore, the formal experiment was conducted with high concentration ropivacaine ($800 \mu\text{mol/L}$). In the formal experiment, the cell proliferation rate, migration rate, invasion cell number and N-cadherin, Vimentin, fibronectin (FN), phosphorylated (p)-JNK expression levels in ropivacaine group and positive drug group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), while the expression level of E-cadherin protein was higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the ropivacaine group, the inhibitor group showed decreased cell proliferation rates, migration rate, invasion cell counts, and lower expression levels of N-cadherin, vimentin, FN and p-JNK ($P < 0.05$), with an increased expression level of E-cadherin ($P < 0.05$). In contrast, the activator group showed the opposite trends in these indicators ($P < 0.05$). **Conclusion** Ropivacaine may inhibit the proliferation, migration, invasion and EMT process of human bladder cancer J82 cells by blocking the activation of JNK signaling pathway.

Key words: bladder cancer; ropivacaine; human bladder cancer J82 cell; c-Jun N-terminal kinase signaling pathway; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

膀胱癌是发生于泌尿系统的常见恶性肿瘤,受遗传、环境、饮食、基因等多种因素的影响。目前,膀胱癌的治疗仍以手术切除和放化疗为主。由于膀胱癌细胞具有生物侵袭性和特异性放化疗耐药性,治疗后易转移和复发^[1-2]。因此,寻找新的治疗方案和开发新型药物来改善膀胱癌患者的治疗效果意义重大。罗哌卡因为临床麻醉药,研究发现它也参与肿瘤的发生、发展^[3]。ZHANG 等^[4]报道罗哌卡因通过抑制胰岛素样生长因子 1 受体/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR) 信号通路活性抑制肝癌细胞的恶性生物学行为。QIAO 等^[5]报道罗哌卡因可抑制膀胱癌细胞增殖、诱导其自噬和凋亡,但罗哌卡因对人膀胱癌细胞的作用机制尚不清楚。c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 在细胞增殖、转移、上皮间质转化 (EMT) 等生物过程中起着至关重要的调控作用^[6]。ZHU 等^[7]研究发现重组人半乳糖凝集素 1 (Galectin-1) 通过激活丝裂原活化蛋白激酶/JNK/应激激活的蛋白激酶 p38 信号通路诱导人卵巢癌细胞的转移及 EMT 进程。夏夏等^[8]报道罗哌卡因可通过抑制 JNK 信号通路活性对细胞生长、迁移与侵袭起抑制作用。罗哌卡因通过 JNK 信号通路是否能对人膀胱癌 J82 细胞的生物学行为产生影响目前尚不清楚。基于此,本研究探讨罗哌卡因通过 JNK 信号通路对人膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭以及 EMT 的影响,以期对膀胱癌的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料 人膀胱癌 J82 细胞株购自通派(上海)生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括二氧化碳培养箱(上海慕斯实验设备有限公司,型号 160L)、倒置荧光显微镜(上海豫光仪器有限公司,型号:WMF-3690)、凝胶成像系统(广州科适特科学仪器有限公司,型号:GD-1000)。主要药品与试剂包括紫杉醇、罗哌卡因(上海致备生物有限公司)、JNK 通路抑制剂

SP600125、JNK 通路激活剂茴香霉素(上海源叶生物有限公司)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8,上海致备生物有限公司)、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 细胞增殖检测试剂盒(北京索莱宝生物有限公司)、鼠抗人一抗[包括波形蛋白 (Vimentin)、纤维粘连蛋白 (FN)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、JNK、磷酸化 (p)-JNK、 β -actin]、山羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG, 辣根过氧化物酶标记二抗,美国 CST 公司)。

1.3 方法

1.3.1 人膀胱癌 J82 细胞培养 人膀胱癌 J82 细胞接种于 DMEM 培养液[含 10% 胎牛血清 (FBS)] 中培养 (37°C , 5% CO_2), 70%~80% 湿度培养箱中培养, 换液间隔天数: 2~3 d。传代(密度达 80%) 后用于研究(对数期细胞)。

1.3.2 分组及给药 本研究分为预实验和正式实验。预实验分组包括对照组和低、中、高浓度罗哌卡因组。对照组不进行干预,低、中、高浓度罗哌卡因组依次加入 200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 罗哌卡因,干预 24 h。设置空白组(只添加培养液)。根据预实验结果选择有显著作用浓度的罗哌卡因进行正式实验。正式实验:对照组、罗哌卡因组、阳性药物组、抑制剂组和激活剂组;对照组不进行干预,罗哌卡因组根据预实验结果添加有显著作用浓度的罗哌卡因,阳性药物组加入 100 nmol/L 紫杉醇^[9],抑制剂组在罗哌卡因基础上加入 20 $\mu\text{mol/L}$ JNK 信号通路抑制剂 SP600125^[10],激活剂组在罗哌卡因基础上加 1 $\mu\text{g/mL}$ JNK 信号通路激活剂茴香霉素^[11],干预 24 h。每组设 3 次重复,置于培养箱中, 37°C , 5% CO_2 条件下培养 24 h 后进行各项指标测定。

1.3.3 J82 细胞活力 取培养 24 h 的细胞,参照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作,反应完成后,检测各孔吸光度 (A) 值 (450 nm 处), 计算细胞活力。细胞活力 (%) = (低、中、高浓度罗哌卡因组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。