

· 论 著 ·

# 吗啡和曲马多对 MADB-106 乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响

刘红军, 朱红梅, 程祝强, 金 毅, 徐建国

**[摘要]** **目的** 观察不同浓度吗啡和曲马多对 MADB-106 乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响, 并对其机制进行初步研究。**方法** 将不同浓度吗啡和曲马多与 MADB-106 乳腺癌细胞直接作用 24 h 后采用流式细胞法检测细胞凋亡, MTT 法检测细胞增殖。采用 Western blot 法检测细胞半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 和半胱氨酸蛋白酶-8 (caspase-8) 的表达。**结果** 吗啡和曲马多均可浓度依赖性促进 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡、抑制细胞生长与增殖; 等效镇痛浓度吗啡与曲马多对 MADB-106 乳腺癌细胞的增殖与凋亡的影响并无差异; 吗啡可促进 MADB-106 乳腺癌细胞 caspase-3 和 caspase-8 激活片段表达。而曲马多仅促进 caspase-3 激活片段表达, caspase-8 激活片段无显著变化。**结论** 吗啡和曲马多均可浓度依赖性促进 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的生长与增殖; 吗啡和曲马多均可激活 caspase-3 途径诱导 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡, 同时吗啡可激活 caspase-8 途径, 而曲马多无此作用。

**[关键词]** 吗啡; 曲马多; 细胞增殖与凋亡; 半胱氨酸蛋白酶-3; 半胱氨酸蛋白酶-8

**[中图分类号]** R614; R737.9 **[文献标志码]** A doi: 10.3969/j.issn.1672-271X.2014.05.001

## Effects of morphine and tramadol on MADB-106 breast cancer cells proliferation and apoptosis

LIU Hong-jun, ZHU Hong-mei, CHENG Zhu-qiang, JIN Yi, XU Jian-guo. Department of Anesthesiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of morphine and tramadol on tumor proliferation and apoptosis and the possible mechanism. **Methods** MADB-106 breast cancer cells were treated with different concentrations of morphine and tramadol for 24 h. The cell apoptosis was detected with flow cytometry, cell proliferation was detected with MTT, and the expressions of caspase-3 and caspase-8 were detected with Western blot. **Results** The apoptosis of MADB106 cells was significantly increased and the proliferation of MADB106 cells was significantly inhibited by morphine or tramadol in a concentration-dependent manner. There was no significant difference between morphine group and equivalent analgesic dose tramadol group, separately. When MADB-106 breast cancer cells were treated with morphine, expressions of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-8 were increased. However, when cancer cells were treated with tramadol, only the expression of cleaved caspase-3 was increased. There was no significant change in the expression of cleaved caspase-8. **Conclusion** The apoptosis of MADB106 cells was significantly increased and the proliferation was significantly inhibited by morphine or tramadol in a concentration-dependent manner. Both caspase-3 and caspase-8 pathways were involved in morphine induced apoptosis. But, only caspase-3 pathway was involved in tramadol induced apoptosis.

**[Key words]** morphine; tramadol; cell proliferation and apoptosis; caspase-3; caspase-8

吗啡是肿瘤患者术后镇痛和癌痛治疗常用药物, 研究表明吗啡在镇痛同时可对肿瘤细胞的生长和转移产生影响, 其机制可能与抑制自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 活性等有关<sup>[1-4]</sup>。鉴于吗啡具有免疫抑制作用, 许多其他药物亦被用于替代吗啡镇痛。其中曲马多由于镇痛效果好, 不良反应小而被广泛使用<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>认为, 等效镇痛剂量的曲马多和吗啡相比, 可有效减轻手术应激和疼痛所致的免疫抑制, 并且曲马多不会对细胞免疫功能产生抑制作用, 相反可增强 NK 细胞活性和促进白细胞介素-2 (IL-2) 的产生。但肿瘤的生长和转移除

了机体抗肿瘤免疫机制的间接作用外, 还与肿瘤细胞自身的生长增殖能力有关。既往研究表明吗啡可与细胞表面阿片受体结合, 调节细胞的生长, 但具体机制仍不清楚<sup>[7-8]</sup>; 关于曲马多对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响尚无研究。因此本研究拟通过离体实验, 研究等效镇痛剂量吗啡和曲马多对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响, 并对其机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 实验试剂与器材** 硫酸吗啡、 $\beta$ -Actin 鼠源单抗 (美国 Sigma 公司); 曲马多 (德国格兰泰有限公司); 大鼠乳腺癌细胞系 MADB106 (上海通派生物科技有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、RPMI-1640 (美国 GIBCO 公司); FBS (美国 ExCell

Biology 公司); MTT(美国 Amresco 公司); 96 孔、24 孔与 6 孔细胞培养板(美国 Corning Incorporated 公司); 半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)抗体、半胱氨酸蛋白酶-8(caspase-8)抗体、激活型 caspase-3 抗体、激活型 caspase-8 抗体(美国 Cellsignaling 公司)。图像分析软件 Image J(NIH 公司); 垂直电泳槽(Bio-Rad 公司); 超净工作台(中国苏州净化 SW-CJ-1FD); CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 SANYO 公司); EL-x800 酶标仪(美国 BioTek 公司); 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** MADB-106 乳腺癌细胞株经含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基在 37 ℃, 湿度为 95%, 体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。组别: 空白对照组, 溶剂对照组, 吗啡 I 组(1 nM), 吗啡 II 组(1 μM), 吗啡 III 组(1 mM), 曲马多 I 组(10 nM), 曲马多 II 组(10 μM), 曲马多 III 组(10 mM)。

**1.2.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡** 将浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL MADB-106 乳腺癌细胞消化接种到六孔板中, 待细胞贴壁后, 根据实验分组分别加入相应的含药培养基, 同时设立阴性对照组; 药物作用 24 h 后, 用 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化收集、洗涤细胞, 各组分别加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光、反应 5 ~ 15 min; 用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

**1.2.3 MTT 法检测细胞增殖** 将细胞消化、计数、配制成浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液, 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 培养 24 h

后洗涤细胞两次。用完全培养基稀释吗啡和曲马多至所需浓度, 每孔加入 200 μL 相应的含药培养基, 将 96 孔细胞培养板置于 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h; 将 96 孔板进行 MTT 染色, 采用酶标仪测定吸光度值(OD 值),  $\lambda = 490$  nm, 计算不同浓度吗啡和曲马多对肿瘤细胞的抑制率及药物半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)<sup>[9]</sup>。

抑制率(%) = (阴性对照组 - 实验组) / 阴性对照组 × 100%。

**1.2.4 Western blot 法检测 caspase-3 和 caspase-8 表达** 每  $1 \times 10^6$  细胞加入 50 μL 细胞溶解缓冲液, 充分裂解细胞, 离心取上清液, 按说明书操作, 加入各类相关试剂。内参为 β-Actin(1:1000), 测定条带灰度值, 以目的条带灰度值与内参灰度值的比值反映 caspase-3、caspase-8、激活型 caspase-3 和激活型 caspase-8 的表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。以机率单位加权回归法(Bliss 法)计算 IC<sub>50</sub>。

## 2 结果

**2.1 不同浓度吗啡和曲马多对肿瘤细胞凋亡的影响** Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测结果表明, 不同浓度的吗啡和曲马多与肿瘤细胞直接作用 24 h 后, 剂量依赖性诱导肿瘤细胞凋亡(图 1)。由表 1 可知, 等效镇痛浓度的吗啡与曲马多并无差异( $P > 0.05$ )。

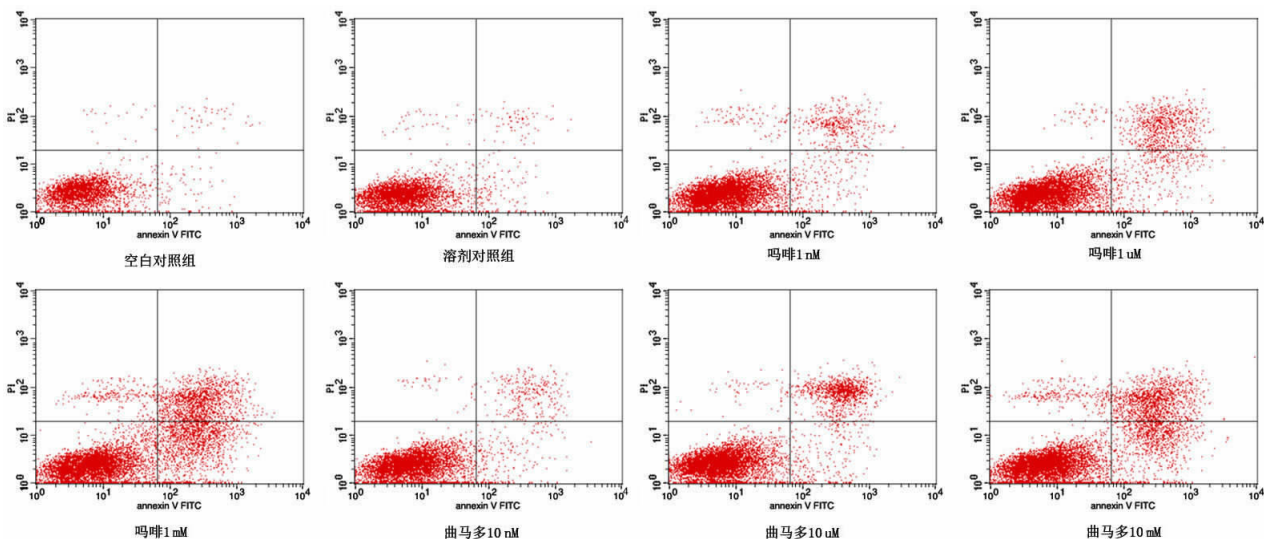


图 1 流式检测不同浓度吗啡和曲马多对肿瘤细胞凋亡的影响

表 1 各组细胞凋亡率

组别	凋亡率(%)
空白对照组	3.44
溶剂对照组	4.43
吗啡 I 组	9.60
吗啡 II 组	15.57
吗啡 III 组	31.44
曲马多 I 组	7.88*
曲马多 II 组	18.36*
曲马多 III 组	27.10*

注:与等效镇痛浓度的吗啡组比较,\**P*>0.05

**2.2 不同浓度吗啡和曲马多对肿瘤细胞增殖的影响** 见表 2。结果显示吗啡与曲马多均浓度依赖性抑制肿瘤细胞的增殖。吗啡抑制肿瘤细胞增殖的 IC50 为 11.3 mM,曲马多抑制肿瘤细胞增殖的 IC50 为 31.3 mM。

表 2 MTT 检测不同浓度吗啡和曲马多对肿瘤细胞增殖的影响

药物浓度	抑制率(%)
吗啡 1 nM	6.96
吗啡 10 nM	10.15
吗啡 100 nM	12.07
吗啡 1 μM	17.08
吗啡 10 μM	20.76
吗啡 100 μM	26.72
吗啡 1 mM	35.41
吗啡 10 mM	52.92
吗啡 100 mM	62.67
曲马多 1 nM	4.81
曲马多 10 nM	7.89
曲马多 100 nM	12.77
曲马多 1 μM	15.68
曲马多 10 μM	18.87
曲马多 100 μM	20.82
曲马多 1 mM	25.36
曲马多 10 mM	33.69
曲马多 100 mM	53.35

**2.3 各组 caspase-3 和 caspase-8 表达变化** 吗啡 1 mM 和曲马多 10 mM 分别与肿瘤细胞作用 24 h 后各组总的 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达无明显差异,而二者的激活片段则出现了显著的改变,吗啡组和曲马多组 caspase-3 激活片段表达均增加(表 3,*P*<0.05),但 caspase-8 激活片段仅吗啡组表达增高,曲马多组无明显变化。

表 3 各组 caspase-3 和 caspase-8 表达变化(%, $\bar{x} \pm s$ )

组别	激活型 caspase-3	激活型 caspase-8
空白对照组	0.33 ± 0.02	0.24 ± 0.02
溶剂对照组	0.36 ± 0.02	0.28 ± 0.01
吗啡 1 mM	0.68 ± 0.03*	0.49 ± 0.03*
曲马多 10 mM	0.67 ± 0.01*	0.27 ± 0.02

注:与空白对照组和溶剂对照组比较,\**P*<0.05

3 讨 论

肿瘤细胞的增殖和凋亡对肿瘤的发生、发展以及预后和复发具有重要意义。本研究体外细胞实验结果表明吗啡和曲马多均可浓度依赖性抑制肿瘤细胞的生长,促进细胞的凋亡,这与以前研究<sup>[12-15]</sup>相一致。但本研究结果与前研究<sup>[13-14]</sup>也有所不同,笔者发现 1 nM 吗啡即可促进 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡,等效镇痛浓度的曲马多同样可促进细胞凋亡。而 Tegeder 等<sup>[10]</sup>研究认为高浓度的吗啡(>10 μM)可显著抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 肿瘤细胞的生长。

尽管进行了大量的研究,但吗啡等阿片类药物调节肿瘤细胞增殖和凋亡的具体机制仍不清楚。阿片受体不仅在外周神经和中枢神经系统表达,在许多正常细胞和肿瘤细胞表面同样存在<sup>[1,11]</sup>。吗啡可与细胞表面阿片受体结合,从而调节细胞的生长。其机制包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)、C-Jun 氨基末端激酶的激活,活性氧、NO 的产生,促凋亡的 Bim 表达增加,抗凋亡的 Bcl-2 表达降低以及 p53、NF-κB 介导的细胞信号通路等<sup>[12-15]</sup>。曲马多则具有双重镇痛机制,一方面可与 μ 受体结合,另一方面可激活中枢单胺能系统,抑制 5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素的摄取。本研究结果表明曲马多和吗啡一样,同样可浓度依赖性抑制肿瘤细胞的增殖,促进细胞的凋亡,并且等效镇痛浓度的吗啡与曲马多并无差异。既往研究认为不仅仅是阿片受体还有其他受体系统参与肿瘤细胞增殖,如生长抑素受体、阿片与烟碱和雌激素信号途径的相互作用等<sup>[16-17]</sup>。因此笔者推测曲马多调节肿瘤细胞的增殖与凋亡的机制除了与 μ 受体作用以外,中枢单胺能系统同样在其中发挥重要作用。

吗啡与阿片受体结合后通过下游何种信号途径最终产生细胞凋亡尚不清楚。尽管目前对凋亡过程的详细机制尚不完全清楚,但是已经确定半胱氨酸蛋白酶(caspase)在凋亡过程中是起着至关重要作用<sup>[18]</sup>。目前主要的细胞凋亡通路均与 caspase 激活

有关。细胞凋亡的过程即是 caspase 不可逆水解底物的级联放大反应过程。参与诱导凋亡的 caspase 分成两大类:启动酶和效应酶,它们分别在凋亡信号转导的上游和下游发挥作用。启动 caspase 包括启动 caspase-8,9,10。启动 caspase 可发生同源活化,在细胞凋亡过程中最早发生。启动 caspase 活化后,即开启细胞内的死亡程序,通过异源活化方式水解下游 caspase 将凋亡信号放大,同时将死亡信号向下传递。被异源活化的 caspase 即效应 caspase,包括 caspase-3,6,7。本研究结果表明 caspase-3 和 caspase-8 信号通路参与了吗啡诱导的乳腺癌细胞的凋亡。这与既往研究结果相一致<sup>[12]</sup>,但本研究结果表明曲马多与吗啡诱导肿瘤细胞凋亡的机制并不完全相同,曲马多仅增加 caspase-3 激活片段的表达,而对 caspase-8 激活片段的表达并无明显影响。表明与吗啡促进肿瘤细胞凋亡过程不同,曲马多可能通过其他通路最终激活 caspase-3,中间并不通过 caspase-8 通路的激活。其具体通路尚有待研究。

总之,吗啡和曲马多均可浓度依赖性促进 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的生长与增殖。吗啡和曲马多诱导 MADB-106 乳腺癌细胞的凋亡均与 caspase-3 途径有关,吗啡可能通过激活 caspase-8 从而激活 caspase-3 途径,而曲马多激活 caspase-3 途径与 caspase-8 激活无关。

## 【参考文献】

- [1] Mathew B, Lennon FE, Siegler J, et al. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression; a laboratory investigation[J]. *Anesth Analg*, 2011, 112(3):558-567.
- [2] Maneckjee R, Minna JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(9):3294-3298.
- [3] Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Castanas E. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line is partially mediated through opioid receptors[J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, 296(2):199-207.
- [4] Kerros C, Cavey T, Sola B, et al. Somatostatin and opioid receptors do not regulate proliferation or apoptosis of the human multiple myeloma U266 cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28:77.
- [5] Sacerdote P, Bianchi M, Gaspani L, et al. The effects of tramadol and morphine on immune responses and pain after surgery in cancer patients[J]. *Anesth Analg*, 2000, 90(6):1411-1414.
- [6] Gaspani L, Bianchi M, Limiroli E, et al. The analgesic drug tramadol prevents the effect of surgery on natural killer cell activity and metastatic colonization in rats[J]. *J Neuroimmunol*, 2002, 129(1-2):18-24.
- [7] Harimaya Y, Koizumi K, Andoh T, et al. Potential ability of morphine to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of metastatic colon 26-L5 carcinoma cells[J]. *Cancer Letters*, 2002, 187(1-2):121-127.
- [8] Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioids and the apoptotic pathway in human cancer cells[J]. *Neuropeptides*, 2003, 37(2):79-88.
- [9] 刘德传, 郭以河, 周尚成. MTT 法测定乳腺癌对化疗药物敏感性的实验研究[J]. *东南国防医药*, 2007, 9(6):405-406.
- [10] Tegeder I, Grosch S, Schmidtke A, et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells; involvement of p53 phosphorylation[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:1846-1852.
- [11] Nyland G, Pettersson A, Bengtsson C, et al. Functional expression of mu-opioid receptors in the human colon cancer cell line, HT-29, and their localization in human colon[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(2):461-466.
- [12] Yin D, Woodruff M, Zhang Y, et al. Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/ NF-kappaB pathways[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 174(1-2):101-107.
- [13] Zhao M, Zhou G, Zhang Y, et al. Beta-arrestin2 inhibits opioid-induced breast cancer cell death through Akt and caspase-8 pathways[J]. *Neoplasia*, 2009, 56(2):108-113.
- [14] Lin X, Wang YJ, Li Q, et al. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway[J]. *FEBS J*, 2009, 276(7):2022-2036.
- [15] Cadet P, Rasmussen M, Zhu W, et al. Endogenous morphinergic signaling and tumor growth[J]. *Frontier in Bioscience*, 2004, 9:3176-3186.
- [16] Maneckjee R, Minna JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(9):3294-3298.
- [17] Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, et al. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23):5632-5636.
- [18] 王学文. 抗肿瘤治疗新药蛋白酶体抑制剂 Bortezomib 的临床应用[J]. *东南国防医药*, 2006, 8(6):473-478.

(收稿日期:2014-05-26;修回日期:2014-07-22)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)