网络出版时间:2022-7-28 15:42 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220728.0859.001.html

苯噻啶对人肺腺癌细胞增殖、迁移与侵袭能力的影响

郑江霞1,束 军1,汪 新1,杨彩梅1,沈继龙2

摘要 目的 观察不同浓度苯噻啶(Pizotifen)对人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞增殖、迁移与侵袭能力的影响,并初步探究 其机制。方法 取对数生长期的 A549 和 PC9 细胞,分为对 照组(细胞对照组为培养基直接作用于细胞,溶剂对照组为 含有 0.1% DMSO 的培养基作用于细胞) 和实验组(浓度分 别为 10、20、30、40 μmol/L 的苯噻啶作用于细胞)。 CCK-8 法检测人肺腺癌细胞的增殖能力,划痕实验和 Transwell 迁 移实验检测其迁移能力, Transwell 侵袭实验检测其侵袭能 力, ELISA 法检测 Wnt3a/β-catenin 信号通路蛋白、上皮 - 间 质转化(EMT)相关蛋白 E-钙黏蛋白(E-cad)和基质金属蛋 白酶-9(MMP-9)的表达水平。结果 与溶剂对照组相比: CCK-8 结果显示,实验组 A549 和 PC9 细胞活力降低,出现不 同程度的增殖抑制现象,在20、30、40 µmol/L浓度组有一定 的时间依赖性(P<0.05);划痕实验结果表明,实验组划痕 愈合率小于对照组,苯噻啶浓度越高,划痕愈合率越低(P< 0.05);Transwell 迁移和侵袭实验结果显示,实验组穿过小室 的肺腺癌细胞数量明显低于对照组,具有浓度依赖性(P< 0.05);ELISA 结果显示,实验组细胞中 Wnt3a、β-catenin、 MMP-9 蛋白浓度与对照组相比均显著降低,并且随着苯噻 啶浓度增加, Wnt3a、β-catenin、MMP-9蛋白浓度逐渐降低(P <0.05);实验组细胞中 E-cad 蛋白浓度与对照组相比显著 增高,并且随着苯噻啶浓度增加,E-cad 浓度逐渐增高(P< 0.05)。结论 在体外细胞实验中,苯噻啶对人肺腺癌 A549、PC9 细胞的增殖、迁移和侵袭能力具有抑制作用,抑制 作用的强弱依赖于苯噻啶的浓度和作用时间。其作用机制, 可能包括 Wnt3a/β-catenin-EMT 通路的阻断。

关键词 苯噻啶;人肺腺癌;信号通路;上皮 – 间质转化中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)08-1294-07 doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.022

肺癌是中国乃至全世界发病率和病死率均居首 位的恶性肿瘤^[1],其最常见的病理类型是肺腺癌。

2022 - 04 - 21 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2018A0204) 作者单位: ¹ 安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230011

² 病原生物学安徽省重点实验室,人畜共患病安徽高校省级重点实验室,合肥 230032

作者简介:郑江霞,女,硕士研究生;

束 军,男,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail:J. Shu@ 126. com

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT), 是由色氨酸 经过羟化和脱羧催化合成的单胺类神经递质,已被 证明是多种正常细胞和肿瘤细胞培养的促有丝分裂 因子,且特定的受体亚型与肿瘤的进展有关[2]。而 苯噻啶是一种非选择性 5-HT1、5-HT2A 和 5-HT2C 受体拮抗剂[3],常用于预防和治疗复发性血管性头 痛。近年研究发现苯噻啶对结肠癌[4]、胃癌[5]和肉 瘤[6]等有直接抑制作用,而苯噻啶对肺癌治疗的研 究未见报道。上皮 - 间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肺腺癌侵袭和转移的关键过 程^[7]。Wnt/β-catenin 信号通路是调节肺癌细胞增 殖、侵袭和迁移以及耐药的重要途径,可调节 EMT 进程[8]。该研究从增殖、迁移与侵袭三方面观察不 同浓度苯噻啶对人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞的影 响,并初步探究其可能的作用机制是否与 Wnt3a/βcatenin-EMT 通路有关,以期为肺癌治疗研究的老药 新用提供新的思路。

1 材料与方法

- 1.1 细胞株与药物 人肺腺癌 PC9 细胞(货号: CL-0668)购自武汉普诺赛公司;人肺腺癌 A549 细胞株由安徽医科大学第一附属医院中心实验室惠赠。苯噻啶(货号: HY-B1005)购自美国 MCE 公司,纯度为 99.73%,规格为 100 mg,精密称取 29.544 mg 溶于1 ml DMSO,配制成 0.1 mol/L 浓度储备液,于-20 ℃保存,使用前室温溶解,稀释到所需浓度即可,实验组混合溶液中 DMSO 浓度均不超过 0.1%。
- 1.2 主要试剂与仪器 RPMI-1640 培养基和 DMEM 高糖培养基均购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(DM-SO)购自北京索莱宝公司;CCK-8 试剂盒(C0039)购自上海碧云天公司;青霉素/链霉素/两性霉素 B溶液(100 ×)、0.25%胰酶、RIPA 裂解液均购自山东思科捷公司;Transwell 小室(3422)购自美国 Corning 公司;Matrigel 基质胶购自购自美国 BD 公司;人 Wnt-3a 蛋白(Wnt3a) ELISA 试剂盒(JL14159)、人 β-蛋白(β-catenin) ELISA 试剂盒(JL19217)、人

E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad) ELISA 试剂盒(JL13185)、人基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9) ELISA 试剂盒(JL29650)均购自上海江莱生物公司;酶标仪购自美国 Biotek 公司。

1.3 方法

- 1.3.1 细胞培养 取出冷冻保存的 A549 和 PC9 细胞,于 37 \mathbb{C} 水浴锅融化,用配好的 A549 细胞培养基(DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 1% 青链两性霉素 B 混合液)和 PC9 细胞培养基(RPMI-1640 培养基 + 10% FBS + 1% 青链两性霉素 B 混合液)分别复苏于细胞瓶中,在 5% $\mathrm{CO_2}$ 、37 \mathbb{C} 的细胞培养箱中培养。视贴壁细胞的生长状态用 0.25% 胰酶进行消化传代,选取对数生长期的细胞进行实验。
- 1.3.2 CCK-8 增殖实验 制备单细胞悬液并计数, 配成 1×10⁴/ml 细胞悬液并混匀,每孔取 100 μl 细胞悬液,铺 2 块 96 孔板。细胞培养箱中过夜贴壁, 实验组分别用细胞培养基配制的不同浓度苯噻啶(10、20、30、40 μmol/L)溶液进行换液,细胞对照组和溶剂对照组分别用等量细胞培养基、含 0.1% DMSO 的细胞培养基进行换液,培养 24、48 h 后每孔加人 10 μl CCK-8 试剂,继续在培养箱中孵育 1 h,用酶标仪在波长 450 nm 处进行吸光度(optical density, OD)值检测并计算各组细胞活力,实验重复 3 次。
- 1.3.3 细胞划痕实验 在6孔板背面划6条水平直线(每孔均匀分布3条直线),将细胞均匀接种于6孔板中。待细胞融合度达90%以上时,用移液枪枪头在每孔中均匀划出与背面直线相垂直的两条划痕,PBS清洗干净后,实验组分别加入等量含有不同浓度苯噻啶(10、20、30、40 μmol/L)的无 FBS 细胞基础培养基,细胞对照组和溶剂对照组分别加入等量无 FBS 细胞培养基、含 0.1% DMSO 的无 FBS 细胞培养基。0 h 和 24 h 后在显微镜下观察和拍照,用 Image J 软件测定划痕面积并计算划痕愈合率,实验重复 3 次。
- 1.3.4 Transwell 迁移实验 将细胞均匀接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 80% 时,实验组分别用细胞培养基配制的不同浓度苯噻啶(10、20、30、40 μmol/L)溶液进行换液,溶剂对照组用含 0.1% DMSO 的细胞培养基进行换液。置于培养箱中 24 h后分别收集每孔细胞并计数,用无 FBS 细胞培养基重悬为 5 × 10³/ml 的细胞悬液。取出 24 孔板中的小室,在下室加入 500 μl 含 15% FBS 的细胞培养基,上室放回 6 孔再各接种 200 μl 细胞悬液,置于培养

- 箱 24 h 后取出小室,经 PBS 洗涤、4% 多聚甲醛溶液 固定和 0.1% 结晶紫溶液染色后,用棉签拭去上室 残留的细胞,在显微镜下随机选取 5 个视野拍照并 计算穿过小室的细胞数量,实验重复 3 次。
- 1.3.5 Transwell 侵袭实验 在冰上将 Matrigel 基质胶和无 FBS 细胞培养基按 1:8 稀释,取 50 μl 稀释液加入小室并均匀铺满,置于细胞培养箱凝固后再用无 FBS 细胞培养基水化备用,其余方法同1.3.4,实验重复 3 次。
- 1.3.6 ELISA 检测相关蛋白表达水平 将细胞均匀接种于6 孔板中(3×10⁵/孔),待细胞融合度达80%时,实验组分别用细胞培养基配制的不同浓度苯噻啶(10、20、30、40 μmol/L)溶液进行换液,溶剂对照组用含0.1% DMSO 的细胞培养基进行换液。置于培养箱中24 h 后分开收集每孔细胞并计数,用无FBS 细胞培养基混匀稀释各管细胞含量为1×10°个,经PBS 重悬后加入100 μl 细胞裂解液(RI-PA: PMSF = 100:1),4 ℃裂解30 min,12 000 r/min 离心20 min 后吸取上清液,分装冻于-80℃ 冰箱备用。按照 ELISA 试剂盒说明书对空白组、标准组和待测组(溶剂对照组和实验组)加样和处理,用酶标仪在波长450 nm 处进行 OD 值检测。采用ELISA 法检测并计算细胞中 Wnt3a、β-catenin、MMP-9和 E-cad 蛋白表达量,实验重复3次。
- **1.4** 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用t 检验,多组间比较采用方差分析,以P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

- 2.1 苯噻啶抑制肺腺癌 A549、PC9 细胞的增殖能力 与溶剂对照组相比,实验组细胞活力均下降,出现不同程度的增殖抑制现象。检测结果显示,苯噻啶作用 24 h(A549:F = 210.7;PC9:F = 177.2)、48 h(A549:F = 132.3;PC9:F = 631.3)对 A549 和 PC9细胞增殖均具有抑制作用,差异有统计学意义(P < 0.05)。与 24 h 相比,20、30、40 μ mol/L 浓度组处理48 h 的抑制作用更显著,差异有统计学意义(P < 0.05);与细胞对照组相比,溶剂对照组未出现增殖抑制现象,差异无统计学意义。见图 1。
- 2.2 苯噻啶抑制肺腺癌 A549、PC9 细胞的迁移能力 与溶剂对照组相比,划痕实验组中不同浓度苯噻啶处理肺腺癌细胞 24 h(A549:F = 868.9;PC9:F = 921.0)后,划痕愈合率下降,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义(P < 0.05);与细胞对照组相比,溶

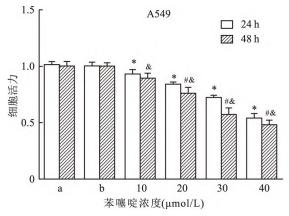
剂对照组对划痕愈合率影响的组间差异无统计学意义;与溶剂对照组相比, Transwell 实验组中不同浓度苯噻啶处理肺腺癌细胞 24 h(A549:F = 474. 2; PC9:F = 784. 6)后,迁移至下室的细胞减少,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义(P < 0. 05)。见图 2。

- 2.3 苯噻啶抑制肺腺癌 A549、PC9 细胞的侵袭能力 与溶剂对照组相比,实验组中不同浓度苯噻啶处理肺腺癌细胞 24 h(A549:F = 354.0; PC9:F = 193.2)后,侵袭至下室的细胞减少,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义(P < 0.05)。见图 3。
- 2.4 苯噻啶对肺腺癌 A549、PC9 细胞中 Wnt3a/β-catenin-EMT 通路相关蛋白含量的影响 ELISA 法检测结果显示,苯噻啶显著降低 A549 和 PC9 细胞中 Wnt3a (A549 : F = 534.62, P < 0.05; PC9 : F = 534.08, P < 0.05) 和 β-catenin (A549 : F = 124.51, P < 0.05; PC9 : F = 212.22, P < 0.05) 的表达。苯噻啶作用于 A549 和 PC9 细胞 24 h 后,上皮标志物 E-cad

(A549: F = 224.98, P < 0.05; PC9: F = 534.08, P < 0.05) 蛋白表达显著上调, 而金属基质酶 MMP-9 (A549: F = 215.96, P < 0.05; PC9: F = 355.48, P < 0.05) 表达显著下调, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。表明苯噻啶可以抑制 A549 和 PC9 细胞中的 Wnt/β-catenin-EMT 信号通路。见表 1、2。

3 讨论

肺腺癌约占肺癌的 40%,起源于小气道上皮细胞,患者被诊断时已多为晚期、发生多处转移,表现为咳嗽、咯血、胸痛和呼吸困难等症状,其治疗手段包括早期的肺叶切除术、化疗、免疫治疗和靶向治疗等。苯噻啶作为镇痛药,价格低廉且毒性小,是 5-HT 受体拮抗剂,且有抗组胺、抗色胺和抗毒蕈碱作用,可用于呕吐、焦虑、荨麻疹、早搏等多种病症。近两年研究发现苯噻啶对肿瘤细胞具有抑制作用:Piao et al^[4]研究表明苯噻啶可通过下调 Wnt 信号通



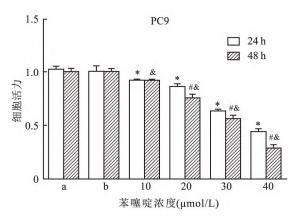


图 1 不同浓度苯噻啶对人肺腺癌 A549 和 PC9 细胞增殖能力的影响

a;细胞对照组;b;溶剂对照组;与24 h 溶剂对照组比较;*P<0.05;与48 h 溶剂对照组比较;*P<0.05;与同一浓度24 h 比较;*P<0.05

表 1 不同浓度苯噻啶对肺腺癌 A549 细胞 Wnt3a、β-Catenin、E-cad、MMP-9 表达量的影响 $(n=3,x\pm s)$

A549	浓度(μmol/L)						
	0	10	20	30	40		
Wnt3a(ng/ml)	6.40 ± 0.12	5.31 ±0.09 *	4.72 ± 0.09 *	4.00 ± 0.08 *	2.98 ± 0.10 *		
β-Catenin(pg/ml)	810.29 ± 24.49	779.60 \pm 16.91 *	681.33 ± 19.72 *	600.30 ± 19.60 *	463.41 ± 27.02 *		
E-cad(ng/ml)	333.34 ± 15.83	456.06 ± 22.91 *	522.56 ± 21.08 *	610.16 \pm 18.06 *	786.08 ± 19.48 *		
MMP-9(ng/ml)	37.07 ± 0.85	31.52 ± 1.19 *	27.53 ± 0.73 *	24.88 \pm 0.79 *	17.73 \pm 0.67 *		

苯噻啶作用 24h 与溶剂对照组比较: *P<0.05

表 2 不同浓度苯噻啶对肺腺癌 PC9 细胞 Wnt3a、β-Catenin、E-cad、MMP-9 表达量的影响 $(n=3,\bar{x}\pm s)$

PC9	浓度(μmol/L)					
	0	10	20	30	40	
Wnt3a(ng/ml)	6.79 ±0.08	5.70 ±0.09 *	5.13 ±0.09 *	4.41 ± 0.14 *	2.96 ± 0.12 *	
β-Catenin(pg/ml)	845.69 ± 22.06	761.44 ± 21.02 *	580.94 ± 18.25 *	523.14 ± 25.33 *	409.67 ± 17.98 *	
E-cad(ng/ml)	242.01 ± 15.21	362.51 ±9.75 *	446.75 ± 14.48 *	577.71 ± 16.93 *	688.90 ± 14.74 *	
MMP-9 (ng/ml)	42.95 ± 0.64	36.35 ± 0.98 *	29.30 ± 1.10 *	26.30 \pm 0.840 *	15.77 \pm 1.10 *	

苯噻啶作用 24h 与溶剂对照组比较: *P<0.05

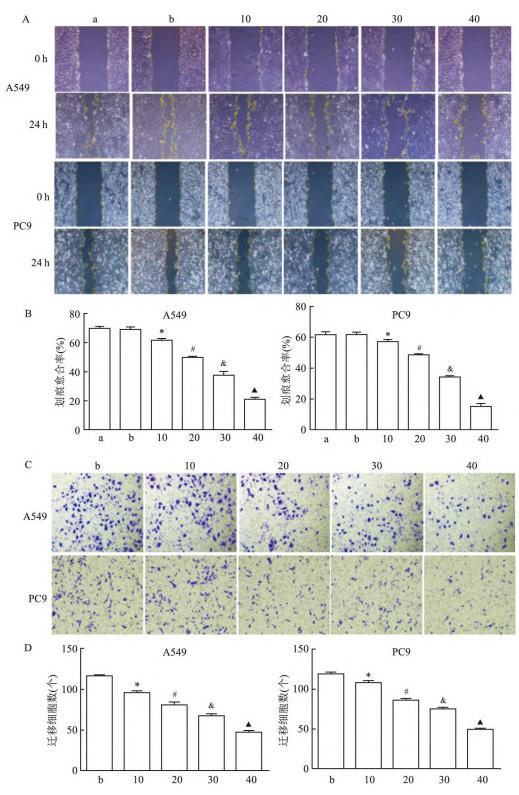


图 2 不同浓度苯噻啶对肺腺癌 A549 和 PC9 细胞迁移能力的影响

A:A549 和 PC9 细胞划痕实验 ×200;B:A549 和 PC9 细胞划痕愈合率柱;C:A549 和 PC9 细胞 Transwell 迁移实验 结晶紫染色 ×200;D: A549 和 PC9 迁移细胞数;a:细胞对照组;b:溶剂对照组;10 ~40:实验组苯噻啶浓度为 10、20、30、40 μmol/L;与溶剂对照组比较: *P <0.05;与 10 μmol/L 组比较: *P <0.05;与 20 μmol/L 组比较: *P <0.05;与 20 μmol/L 组比较: *P <0.05;

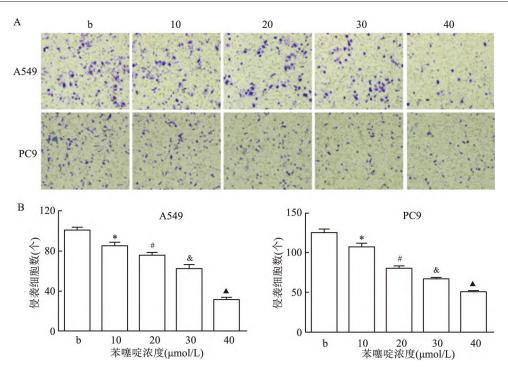


图 3 不同浓度苯噻啶对肺腺癌 A549 和 PC9 细胞侵袭能力的影响

A:A549 和 PC9 细胞 Transwell 侵袭实验 结晶紫染色 ×200;B:A549 和 PC9 侵袭细胞数;b:溶剂对照组;10 ~40:实验组苯噻啶浓度为 10、20、30、40 μmol/L;与溶剂对照组比较: *P <0.05;与 10 μmol/L 组比较: *P <0.05;与 10 μmol/L 组比较: *P <0.05;与 10 μmol/L 组比较: *P <0.05;

路来抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖和迁移能力; Jiang et al^[5] 研究表明苯噻啶可通过阻断 Wnt/β-catenin-EMT 信号通路来抑制胃癌 MNK45 和 AGS 细胞的生长、迁移和侵袭能力,诱导细胞凋亡; Liu et al^[6] 发现苯噻啶可通过 5-羟色胺受体 1A (5-HTR1A)基因在肉瘤中发挥药物作用。综上,苯噻啶作为毒副反应明确、成本低、可及性高的临床常用药,在肿瘤治疗上的新应用具有较大的潜在价值。

苯噻啶对肿瘤细胞的抑制作用,可能源于它是一种 5-HT 受体拮抗剂。5-HT 作为能影响情绪、认知和行为的单胺类神经递质可以发挥多种生物学作用,包括细胞分化和血小板聚集,其中信息传递是最重要的功能,且 5-HT 作为多种肿瘤细胞的生长因子,可促进多种癌细胞的增殖^[9]。多项研究发现 5-HT 及受体对肺腺癌细胞生长发挥作用:5-HT3 受体拮抗剂作为肺癌围手术期的常用止吐药对患者预后有正面作用,5-HT3 受体拮抗剂还可以抑制 A549 细胞增殖、迁移和集落形成,其作用机制与 ERK 激酶途径介导的细胞自噬死亡有关,故可将其作为肺癌手术患者的首选止吐药^[10];5-HT7 受体对肺腺癌 A549 细胞的迁移和侵袭能力具有正向调节作用,其机制与上调 P38/MMP-9 轴通路有关,促进肺腺癌 H1299 细胞的迁移和侵袭则与 SRC/MMP-9 轴通路

有关^[11]; Tone et al^[12]研究表明肺腺癌中 5-HTR3A 高表达,且与增殖标志物 Ki-67 表达阳性密切相关,与血清素结合介导肺腺癌细胞的促增殖作用,敲除5-HTR3A 和使用 5-HT3 受体拮抗剂托吡司琼可抑制肺腺癌细胞的增殖。

Wnt/β-catenin 信号通路是调节细胞增殖、侵袭和迁移以及肿瘤耐药的重要途径,是肺癌生长的重要调控通路,Wnt 和β-catenin 主要都在肺癌细胞胞质中表达^[13],除调控细胞增殖、迁移和侵袭外,β-catenin 还诱导人肺腺癌的 EMT 进程^[8]。 E-cad 是Wnt/β-catenin 通路的下游分子,与β-catenin 结合形成复合物,维持细胞极性和黏附,下调 E-cad 表达与肿瘤转移有关^[14]。 E-cad 不仅是 Wnt 信号通路的重要成员,也是 EMT 关键的上皮标志物。 EMT 进程中,E-cad 丢失导致β-catenin 的核易位,细胞进行肌动蛋白重组,并通过分泌基质金属蛋白酶去除基底膜附着,β-catenin 再诱导 MMP-9 合成,然后MMP-9 完成间质胶原的切割,促使癌细胞扩散^[15]。

本研究以细胞培养基稀释苯噻啶再作用于肺腺癌 549 和 PC9 细胞,实验结果揭示,苯噻啶能明显抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭行为,这种抑制效应与苯噻啶的作用浓度和作用时间有关;进一步研究显示苯噻啶给药可增加 E-cad 蛋白的表达,降

低 Wnt3a、β-catenin、MMP-9 蛋白的表达: β-catenin、Wnt3a 是 Wnt/β-catenin 信号通路中的主要蛋白表达,二者均下降表明苯噻啶可以下调 Wnt/β-catenin 信号通路;而 E-cad 蛋白和 MMP-9 蛋白是 EMT 的标志蛋白,E-cad 高表达而 MMP-9 低表达表明苯噻啶可以抑制肺腺癌细胞的 EMT 进程; Wnt/β-catenin 信号通路可以介导 EMT 进程,EMT 进程是迁移和侵袭必需的细胞学形态转变,所以苯噻啶可能是通过阻断 Wnt/β-catenin-EMT 通路来抑制肺腺癌细胞的恶性生物学行为。

综上,在体外实验中,苯噻啶对人肺腺癌 A549、PC9 细胞的增殖、迁移和侵袭能力具有抑制作用,抑制作用的强弱依赖于苯噻啶的浓度和作用时间。其作用机制,可能包括 Wnt3a/β-catenin-EMT 通路的阻断。本研究仅为体外细胞实验和作用机制的初步探讨,其具体机制和靶向蛋白及交互作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J].CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):7 30.
- [2] Karmakar S, Lal G. Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity[J]. Theranostics, 2021, 11(11): 5296-312.
- [3] Hu'cT, Nowinski A, Drapala A, et al. Indole and indoxyl sulfate, gut bacteria metabolites of tryptophan, change arterial blood pressure via peripheral and central mechanisms in rats[J]. Pharmacol Res, 2018, 130: 172 – 9.
- [4] Piao S S, Shang B. Pizotifen inhibits the proliferation and migration of colon cancer HCT116 cells by down-regulating Wnt signaling pathway[J]. Ann Clin Lab Sci, 2019, 49(2): 183-8.
- [5] Jiang Y, Wang W, Wu X, et al. Pizotifen inhibits the prolifera-

- tion and invasion of gastric cancer cells [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(2); 817-24.
- [6] Liu J, Liao X, Zhu X, et al. Identification of potential prognostic small nucleolar RNA biomarkers for predicting overall survival in patients with sarcoma[J]. Cancer Med, 2020, 9(19): 7018 – 33.
- [7] 汪 新, 東 军, 代丽丽, 等. 高良姜素对于肺腺癌细胞增殖、迁移能力的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(8): 1212-7.
- [8] Zhou S, Qian K, Yu S, et al. MiR-4429 alleviates malignant behaviors of lung adenocarcioma through Wnt/β-catenin pathway
 [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 9(2):154.
- [9] Yessenia B, Alexandria R, Andres B, et al. 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability[J]. Mol Clin Oncol, 2018, 9(3): 243-54.
- [10] Lee J S, Park S Y, Kim N Y, et al. Anti-tumor potential of a 5-HT3 receptor antagonist as a novel autophagy inducer in lung cancer: A retrospective clinical study with *in vitro* confirmation [J]. J Clin Med, 2019, 8(9):1380.
- [11] 杜晓晖. 5-HT7 受体在非小细胞肺癌中生物学作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [12] Tone M, Tahara S, Nojima S, et al. HTR3A is correlated with unfavorable histology and promotes proliferation through ERK phosphorylation in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Sci, 2020, 111 (10): 3953-61.
- [13] Gautam J, Bae Y K, Kim J. Up-regulation of cathepsin S expression by HSP90 and 5-HT7 receptor-dependent serotonin signaling correlates with triple negativity of human breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 161(1): 29-40.
- [14] Tang Z, Cai H, Wang R, et al. Overexpression of CD300A inhibits progression of NSCLC through downregulating Wnt/ β -catenin pathway[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 8875 83.
- [15] Barillari G. The impact of matrix metalloproteinase-9 on the sequential steps of the metastatic process[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4526.

Effects of pizotifen on proliferation, migration and invasion of human lung adenocarcinoma cells

Zheng Jiangxia¹, Shu Jun¹, Wang Xin¹, Yang Caimei¹, Shen Jilong²

(¹Dept of Respiratory Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011; ²The Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Anhui Province,

The Key Laboratory of Zoonoses of High Institutions in Anhui, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To investigate the effects of Pizotifen on proliferation, migration and invasion of A549 and PC9 cells of human lung adenocarcinoma and its possible mechanisms. *Methods* The logarithmic phase of A549 and PC9 cells were used for experiments, which were divided into control groups (cell control group and DMSO solvent control group) and experimental groups (including 10,20,30 and 40 µmol/L Pizotifen, respectively). CCK-8 assay was used to evaluate the effects of Pizotifen on A549 and PC9 cells proliferation. Wound-healing assay and (下转第 1304 页)

- Child-Pugh C 级合并侵袭性真菌感染患者的临床观察[J]. 中华肝脏病杂志, 2021, 29(2): 137 42.
- [15] Patterson T F, Thompson G R 3rd, Denning D W, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America [J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(4): el - e60.
- [16] Luong M L, Al-Dabbagh M, Groll A H, et al. Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring: a meta-analysis [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(7): 1786-99.
- [17] Chu H Y, Jain R, Xie H, et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring: retrospective cohort study of the relationship to clinical outcomes and adverse events [J]. BMC Infect Dis, 2013,13:105.

Clinical analysis of artificial liver in the treatment of severe liver disease complicated with invasive fungal infection

Su Qian, Zhang Li, Xia Lingling, Gao Yufeng, Li Jiabin

(Dept of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract *Objective* To study the incidence, clinical characteristics and treatment plans of artificial liver in the treatment of severe liver disease complicated with invasive fungal infection (IFI). *Methods* The clinical data of patients with severe liver disease were retrospectively analyzed, and they were divided into observation group and control group according to whether they were complicated with IFI. The observation group was divided into clinical diagnosis group and proposed diagnosis group according to diagnostic criteria, and the clinical characteristics of each group were compared. *Results* 228 patients were enrolled in the study, 22 in the observation group and 206 in the control group. The hospitalization days, use of glucocorticoid for more than 7 days and WBC count between the two groups were statistically significant (P < 0.05). The incidence of IFI was 9.65% (22/228), including 12 cases in the clinical diagnosis group and 10 cases in the proposed diagnosis group. The common infection site was respiratory tract (22, 100%). *Conclusion* Voriconazole is safe and effective in the treatment of severe liver disease complicated with IFI. Patients with high-risk factors of IFI should be alert to concurrent IFI if TBil rebound that cannot be explained by basic diseases.

Key words artificial liver; severe liver disease; invasive fungal infection

(上接第1299页)

Transwell assay were then performed to investigate whether Pizotifen affected the migration and invasion properties of A549 and PC9 cells. Finally, ELISA was used to determine the expression levels of Wnt3a/β-catenin signaling pathway related proteins and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins such as E-cadherin (Ecad) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in A549 and PC9 cells after Pizotifen treatment. Results Compared with the solvent control group, the assay of CCK-8 in experimental groups showed that the cell vitality gradually decreased after Pizotifen treatment for 24 h and 48 h, and the inhibition rate of cell vitality was directly proportional to the action time of Pizotifen (P < 0.05). At the same treatment time, the cell viability of A549 and PC9 in the experimental groups decreased with the increase of Pizotifen concentrations (20, 30 and 40 µmol/L). The test of Wound - healing showed that Pizotifen had an inhibitory effect on the migration of A549 and PC9 cells, and the higher the concentration of Pizotifen was, the lower the cell migration rate was (P < 0.05). The experiment of Transwell showed that Pizotifen had an inhibitory effect on the migration and invasion of A549 and PC9 cells in a concentration – dependent manner (P < 0.05). ELISA showed a decrease in the level of Wnt3a, \(\beta\)-catenin and MMP-9 protein and an increase in E-cad protein in the experimental groups compared with the solvent control group. **Conclusion** Pizotifen may inhibit the proliferation, migration and invasion of human lung adenocarcinoma A549 and PC9 cells in vitro, with the inhibition strength dependent of the concentration and action time of Pizotifen. Its potential mechanisms may include block of the Wnt3a/β-catenin-EMT pathway in cells.

Key words pizotifen; human lung adenocarcinoma; signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition