

瑞芬太尼对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 通路的影响

张 杨¹, 刘文文², 苗欢欢³, 杨 光¹

(河北大学附属医院¹麻醉科、²乳腺外科、³中西医结合科, 保定 071000)

摘要 **目的** 探讨瑞芬太尼对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin) 通路的影响。**方法** 用不同浓度瑞芬太尼(0.0、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理人正常乳腺 MCF-10A 细胞和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞筛选瑞芬太尼的实验浓度。将 MDA-MB-231 细胞分为对照组、瑞芬太尼低(5.0 $\mu\text{g/mL}$)、中(10.0 $\mu\text{g/mL}$)、高(20.0 $\mu\text{g/mL}$) 浓度组、瑞芬太尼 + SKL2001(Wnt/ β -catenin 通路激动剂) 组; MTT 实验和集落形成实验检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期变化; Western blot 检测细胞增殖、凋亡和 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达。**结果** 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼可降低 MDA-MB-231 细胞活力, 并对 MCF-10A 细胞无明显毒性。与对照组相比, 瑞芬太尼低、中、高浓度组细胞增殖的光密度值、集落形成数、S 期细胞比例、细胞髓细胞瘤病基因(c-Myc)、细胞周期素 D1、B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 前体(pro-caspase-3)、 β -catenin 蛋白水平降低($P < 0.05$), G_0/G_1 期细胞比例、细胞凋亡率、早期凋亡率、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 和激活型半胱天冬氨酸蛋白酶 3(Cleaved caspase-3)、糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β) 蛋白水平增加($P < 0.05$); SKL2001 可削弱瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响。**结论** 瑞芬太尼可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 诱导细胞凋亡和细胞周期停滞, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。

关键词 瑞芬太尼; 乳腺癌; 增殖; 凋亡; 细胞周期; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1606-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.006

乳腺癌是全球女性癌症相关死亡的主要原因, 目前乳腺癌的治疗主要包括手术、化疗、激素治疗、靶向治疗和免疫治疗, 但患者预后效果仍不够理想^[1]。药物不良反应(如呕吐、腹泻)、疾病复发、转移和耐药性是长期存在的临床问题^[2]。因此, 开发低成本、低毒的新型药物来治疗或预防乳腺癌势在必行。瑞芬太尼是一种超短效的纯 μ 阿片类受体激动剂, 在乳腺癌手术中, 其可减轻患者疼痛和不适感, 并有助于患者术后恢复^[3]。研究显示, 瑞芬太尼可抑制卵巢癌^[4]、子宫内膜癌^[5] 等癌细胞的增殖、迁移。但瑞芬太尼对乳腺癌细胞的影响尚未可知。Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin) 信号通路在癌症的发展、血管生成等过程中发挥重要作用, 在乳腺癌细胞中, 糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 活性下调, 会导致 Wnt/ β -catenin 信号通路过度激活, 促进癌细胞的增殖和侵袭能力^[6]。

且瑞芬太尼通过增加 GSK-3 β 表达诱导恶性胶质瘤细胞凋亡^[7]。因此, 本研究旨在探讨瑞芬太尼对乳腺癌细胞的抗肿瘤作用及潜在分子机制, 以期乳腺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞来源与培养 人正常乳腺 MCF-10A 细胞(货号: CL-0525)、乳腺癌细胞 MDA-MB-231(货号: CL-0150)、MCF-10A 细胞专用培养基(货号: CM-0525) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。MCF-10A 细胞在其专用培养基中进行培养; MDA-MB-231 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 Leibovitz's L-15 培养基中培养。

1.2 主要试剂与仪器 瑞芬太尼(国药准字 H20123423) 购自国药集团工业有限公司; Wnt/ β -catenin 通路激动剂 SKL2001(纯度: 99.68%, 货号: HY-101085) 购自美国 MCE 公司; MTT 试剂盒(货号: M1020) 购自北京 Solarbio 公司; 膜联蛋白 V(Annexin V)-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒(货号: E-CK-A211)、细胞周期检测试剂盒(货号: E-CK-A351) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 细胞髓细胞瘤病基因(cel-

2025-06-03 接收

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目(编号: 20231512)

作者简介: 张 杨, 男, 本科;

杨 光, 男, 本科, 主治医师, 通信作者, E-mail: 329980877

@qq.com

myelocytomatosis, c-Myc) (货号: ab32072)、细胞周期素 D1 (Cyclin D1) (货号: ab134175)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3 前体 (precursor of cysteine aspartate protease-3, pro-caspase-3) (货号: ab32150)、激活型半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved cysteine aspartate protease-3, Cleaved caspase-3) (货号: ab2302)、B 淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) (货号: ab182858)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (bcl-2 related X protein, Bax) (货号: ab32503)、GSK-3 β (货号: ab32391)、 β -catenin (货号: ab32572)、 β -actin (货号: ab8227) 购自英国 Abcam 公司; BCA 试剂盒 (货号: KTD3001) 购自武汉亚科因生物技术有限公司。酶标仪 (型号: Elx 800, 美国 Bio-Tek 公司); 流式细胞仪 (型号: BD FACSCanto II, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 瑞芬太尼的实验浓度筛选 将 MCF-10A 细胞和 MDA-MB-231 细胞以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中,待细胞铺满孔底后,弃去原培养基,用含终浓度分别为 0.0、0.5、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼的培养基继续培养。孵育 24 h 后,每孔加 20 μL MTT 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。然后除去培养基,加入 150 μL DMSO 与细胞充分混合,直至晶体完全溶解。采用酶标仪测定各孔的 OD 值,波长为 570 nm。将不含细胞的培养基作为空白对照组。细胞活力以对照组活力的百分比表示。细胞活力 = (药物处理组 OD - 空白对照组 OD) / (无药物处理组 OD - 空白对照组 OD) $\times 100\%$ 。

1.4 细胞分组与处理 将 MDA-MB-231 细胞分为对照组、瑞芬太尼低、中、高浓度组、瑞芬太尼 + SKL2001 组。瑞芬太尼低、中、高浓度组细胞分别用终浓度为 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼的培养基处理 24 h; 瑞芬太尼 + SKL2001 组使用含 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼和 1 $\mu\text{mol/L}$ SKL2001^[8] 处理细胞 24 h,对照组正常培养,不进行药物处理。

1.5 MTT 实验检测细胞增殖活力 将 MDA-MB-231 以 5×10^3 个细胞/孔的密度置于 96 孔板中,按照 1.4 项下步骤处理后,采用 MTT 法检测细胞增殖活力。

1.6 集落形成实验检测细胞克隆能力 将 1.4 项下各组 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔板中 (5×10^2 个细胞/孔) 并置于培养箱中进一步培养,14 d 后,将集落用 4% 多聚甲醛固定并用 1% 结晶紫染色,随后进行图像采集和计数。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期变化 将 MDA-MB-231 细胞接种到 6 孔板上,孵育过夜后,

按照 1.4 项下分组处理细胞 24 h。细胞周期分析: 收集细胞,用预冷的 70% 乙醇在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜。丢弃乙醇溶液,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤细胞 2 次,加入 PI 工作液室温避光孵育 30 min。在流式细胞仪上采集数据,并使用 ModFit LT 3.2 软件进行分析。

细胞凋亡检测: 收集细胞并用冷 PBS 洗涤 2 次。随后,将细胞重悬于 100 μL 的 1 倍结合缓冲液中,与 5 μL annexin V 和 5 μL PI 溶液在室温下避光孵育 15 min。流式细胞术检测细胞凋亡百分率。

1.8 Western blot 检测细胞增殖、凋亡和 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达 收集 1.4 项下处理后的各组细胞,通过 RIPA 裂解液提取细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。然后用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并将其转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h 后,用抗 c-Myc (1 : 1 000)、Cyclin D1 (1 : 10 000)、Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、pro-caspase-3 (1 : 1 000)、Cleaved caspase-3 (1 : 1 000)、GSK-3 β (1 : 5 000)、 β -catenin (1 : 5 000) 和抗 β -actin (1 : 5 000) 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。洗涤膜后,蛋白样品与羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (1 : 6 000) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。最后,用电化学发光试剂显影检测印迹信号。使用 ImageJ 软件定量目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。所有结果均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验来评估组间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度瑞芬太尼对 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞活力的影响 MTT 结果显示,0.5、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼对 MCF-10A 细胞活力无显著影响 (均 $P > 0.05$), 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼可降低 MCF-10A 细胞活力 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼均可降低 MDA-MB-231 细胞活力 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 见图 1。由于 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼对 MCF-10A 细胞有明显毒性,因此,选择 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 瑞芬太尼处理 MDA-MB-231 细胞。

2.2 瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 MTT 和集落形成实验结果显示,5 组细胞 OD 值、

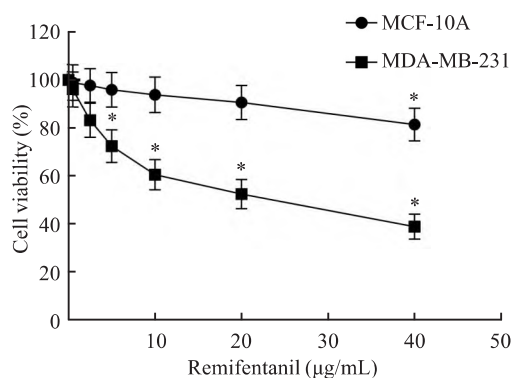


图1 不同浓度瑞芬太尼对 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of remifentanyl at different concentrations on MCF-10A and MDA-MB-231 cell viability

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/mL}$ remifentanyl.

集落形成数差异均有统计学意义 ($F = 26.744$ 、 57.678 , $P < 0.05$); 随着瑞芬太尼浓度的增高, 细胞增殖的 OD 值、集落形成数降低 (两两比较均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 与瑞芬太尼高浓度组相比, 瑞芬太尼 + SKL2001 组细胞增殖的 OD 值、集落形成数升高 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 见图 2。结果表明, 瑞芬太尼可以抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 而 SKL2001 可逆转这种变化。

2.3 瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

流式细胞术结果显示, 5 组 G_0/G_1 和 S 期细胞比例差异均有统计学意义 ($F = 29.510$ 、 62.332 , $P < 0.05$), 而 G_2/M 期细胞比例差异无统计学意义 ($F = 1.004$, $P > 0.05$); 与对照组相比, 瑞芬太尼低、中、高浓度组 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 期细胞比例

降低 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 与瑞芬太尼高浓度组相比, 瑞芬太尼 + SKL2001 组 G_0/G_1 期细胞比例降低, S 期细胞比例增加 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$)。见图 3。结果表明, 瑞芬太尼可诱导 MDA-MB-231 细胞周期停滞, 而 SKL2001 可逆转这种变化。

2.4 瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

流式细胞术结合 annexin V/PI 双染结果显示, 5 组细胞凋亡率和早期凋亡率差异均有统计学意义 ($F = 148.982$ 、 98.432 , $P < 0.05$); 与对照组相比, 瑞芬太尼低、中、高浓度组细胞凋亡率和早期凋亡率升高 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 与瑞芬太尼高浓度组相比, 瑞芬太尼 + SKL2001 组细胞凋亡率和早期凋亡率降低 ($P_{\text{Tukey}} < 0.05$)。见图 4。结果表明, 瑞芬太尼可诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡, 而 SKL2001 可逆转这种变化。

2.5 瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡标志蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 5 组细胞 c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、Bax、pro-caspase-3、cleaved caspase-3 表达差异均有统计学意义 ($F = 40.722$ 、 40.435 、 31.761 、 59.073 、 35.613 、 78.995 , $P < 0.05$); 与对照组相比, 瑞芬太尼低、中、高浓度组 c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、pro-caspase-3 蛋白水平降低, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白水平升高 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$); 与瑞芬太尼高浓度组相比, 瑞芬太尼 + SKL2001 组 c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2、pro-caspase-3 蛋白水平升高, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白水平降低 (均 $P_{\text{Tukey}} < 0.05$)。见图 5。结果表明, 瑞芬太尼可调节 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡标志蛋白表达, 而 SKL2001 可逆转这种变化。

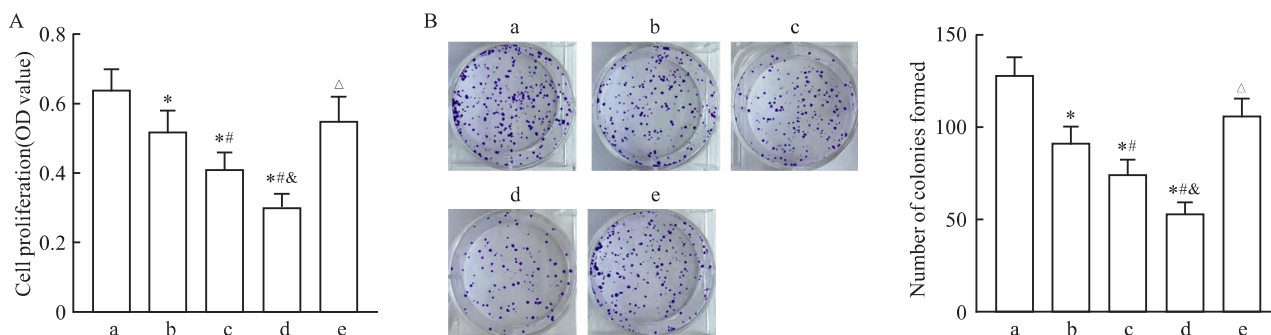


图2 各组 MDA-MB-231 细胞增殖活力和集落形成数比较

Fig. 2 Comparison of proliferation activity and colony formation number of MDA-MB-231 cells in each group

A: Comparison of OD values of cell proliferation in each group; B: Comparison of cell colony formation number in each group (crystal violet staining); a: Control group; b: Romifentanyl low concentration group; c: Romifentanyl medium concentration group; d: Romifentanyl High concentration group; e: Romifentanyl + SKL2001 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs remifentanyl low concentration group; & $P < 0.05$ vs remifentanyl medium concentration group; Δ $P < 0.05$ vs remifentanyl high concentration group.

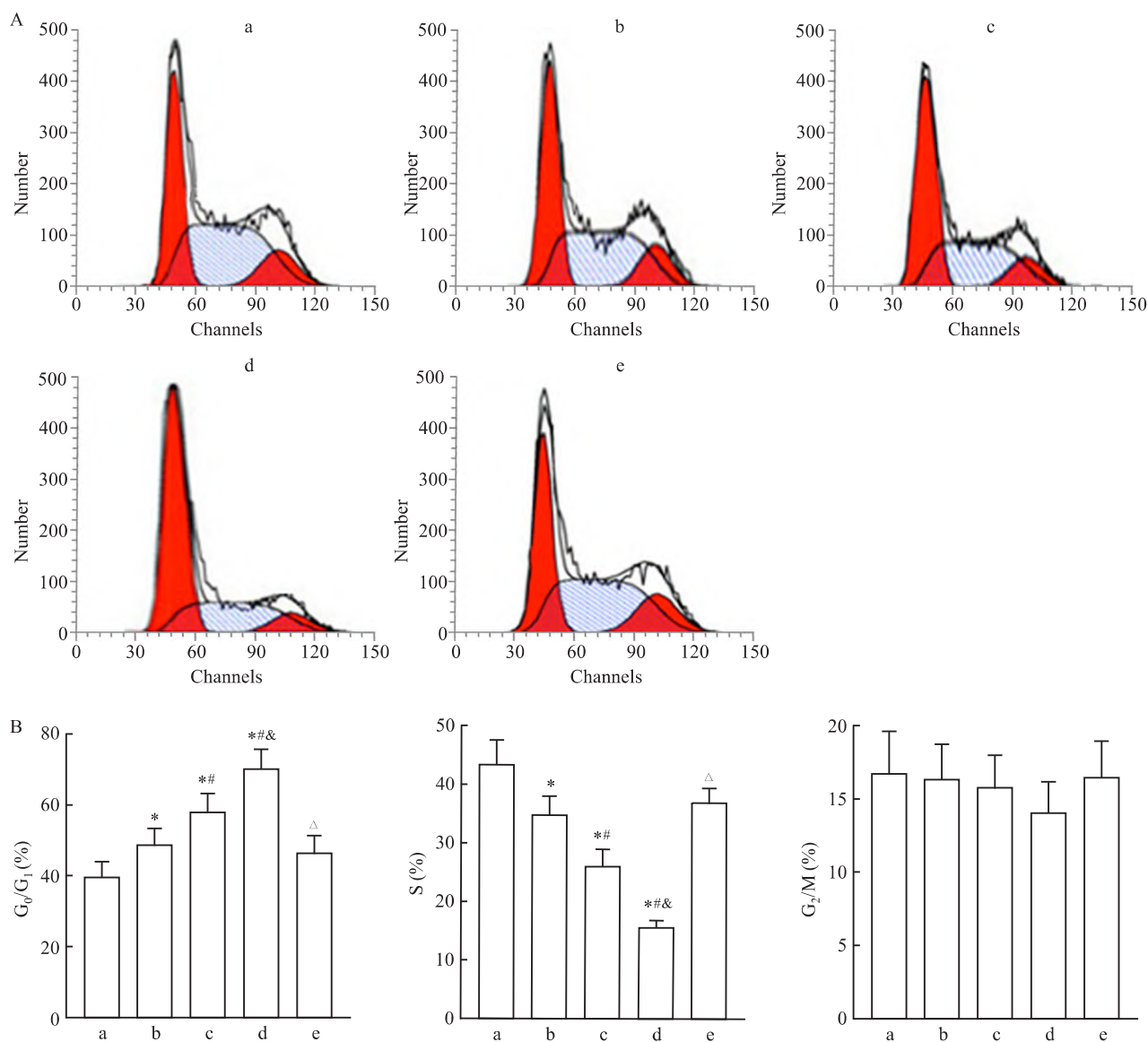


图3 各组 MDA-MB-231 细胞周期分布情况

Fig.3 Cell cycle distribution of MDA-MB-231 in each group

A: Cell cycle distribution was detected by flow cytometry; B: The proportion of cells at different stages in each group; a: Control group; b: Romifentanil low concentration group; c: Romifentanil medium concentration group; d: Romifentanil High concentration group; e: Romifentanil + SKI2001 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs romifentanil low concentration group; & $P < 0.05$ vs romifentanil medium concentration group; [△] $P < 0.05$ vs romifentanil high concentration group.

2.6 瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 5 组细胞 GSK-3 β 、 β -catenin 表达差异均有统计学意义 ($F = 39.578, 34.539, P < 0.05$); 对照组相比, 瑞芬太尼低、中、高浓度组 β -catenin 蛋白水平降低, GSK-3 β 蛋白水平升高 (均 $P_{Tukey} < 0.05$); 与瑞芬太尼高浓度组相比, 瑞芬太尼 + SKI2001 组 β -catenin 蛋白水平升高, GSK-3 β 蛋白水平降低 (均 $P_{Tukey} < 0.05$)。见图 6。结果表明, 瑞

芬太尼可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达, 而 SKI2001 可逆转这种变化。

3 讨论

阿片类镇痛药广泛用于临床麻醉。最近, 越来越多的证据表明阿片类药物可以抑制肿瘤生长。例如, 舒芬太尼可抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭、上皮间质转化, 并诱导乳腺癌细胞凋亡, 减缓乳腺癌的进展^[9]。作为阿片受体激动剂, 瑞芬太尼可减少肝癌

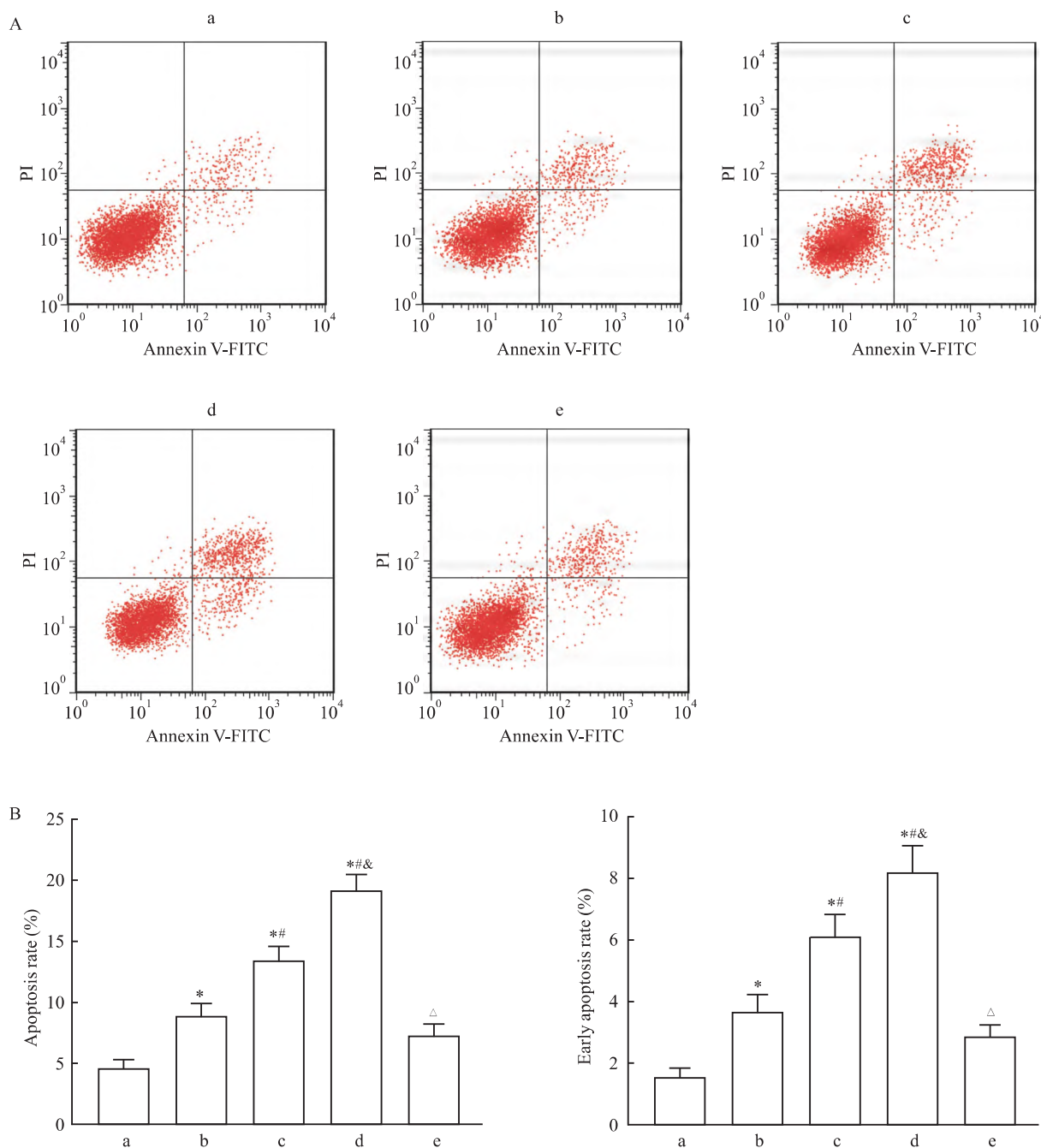


图4 各组MDA-MB-231细胞凋亡情况

Fig.4 Apoptosis of MDA-MB-231 cells in each group

A: Apoptosis was detected by flow cytometry; B: Comparison of apoptosis rate and early apoptosis rate in each group of cells; a: Control group; b: Romifentanil low concentration group; c: Romifentanil medium concentration group; d: Romifentanil High concentration group; e: Romifentanil + SKI2001 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs romifentanil low concentration group; & $P < 0.05$ vs romifentanil medium concentration group; [△] $P < 0.05$ vs romifentanil high concentration group.

细胞的增殖、迁移和侵袭^[10];且瑞芬太尼可诱导神经胶质瘤细胞凋亡^[7]。然而,关于瑞芬太尼对乳腺癌进展影响的研究较少。因此,本研究探讨了瑞芬太尼对乳腺癌细胞的影响,结果显示,不同浓度瑞芬太尼均降低了MDA-MB-231细胞的增殖活力,并诱

导了细胞周期停滞和凋亡,呈浓度依赖性,这表明瑞芬太尼可能在乳腺癌中发挥抗癌作用。

癌细胞过度增殖是癌症相关死亡的主要原因,癌细胞凋亡的异常和抑制是癌症发生和发展的重要原因之一,细胞周期停滞可诱导细胞凋亡。c-Myc

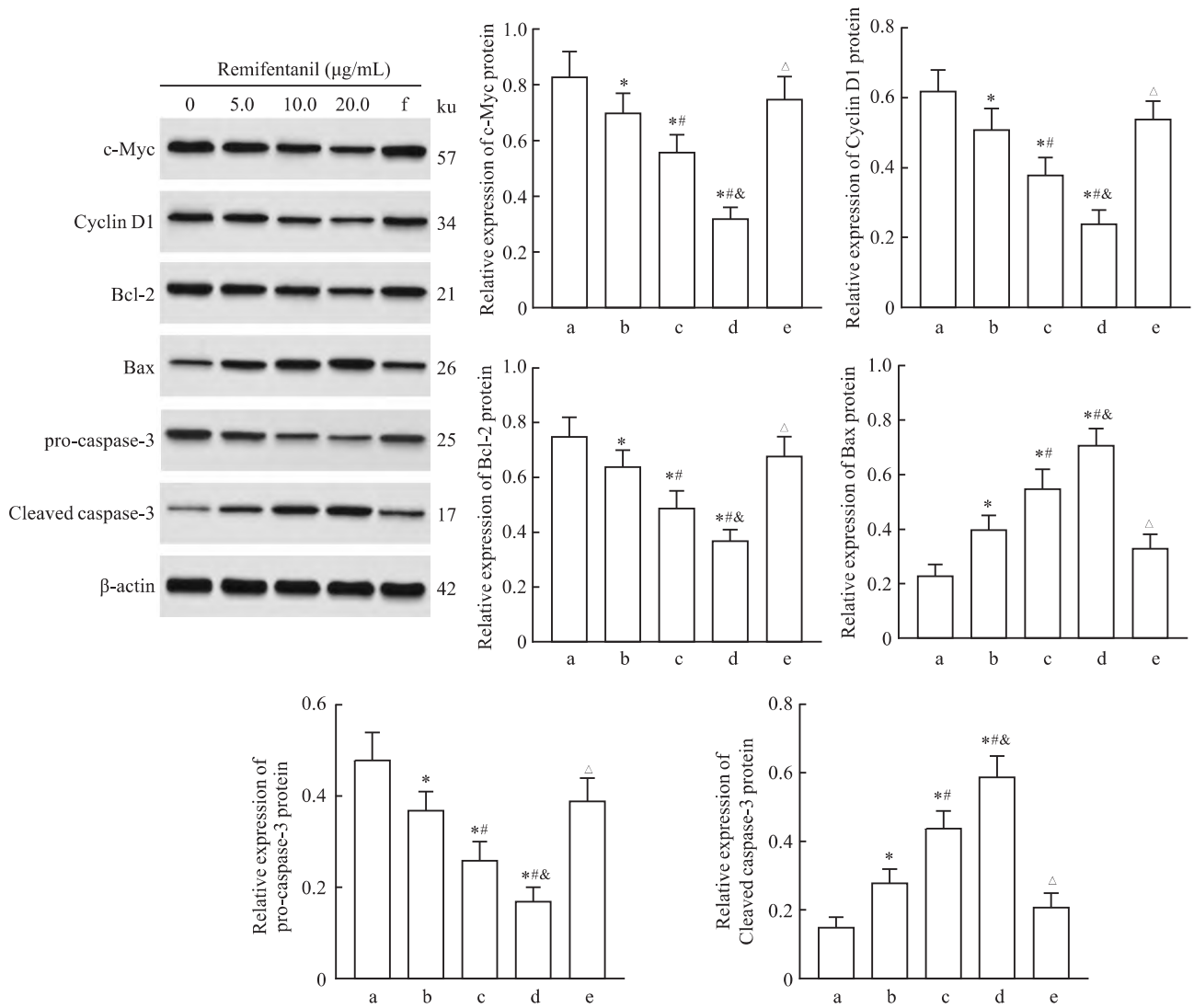


图5 各组MDA-MB-231细胞中增殖和凋亡标志蛋白表达

Fig. 5 The expression of markers of proliferation and apoptosis in MDA-MB-231 cells in each group

a: Control group; b: Romifentanol low concentration group; c: Romifentanol medium concentration group; d: Romifentanol High concentration group; e: Romifentanol + SKL2001 group; f: Romifentanol + SKL2001 (20.0 μ g/mL + 1 μ mol/L); * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs romifentanol low concentration group; & $P < 0.05$ vs romifentanol medium concentration group; Δ $P < 0.05$ vs romifentanol high concentration group.

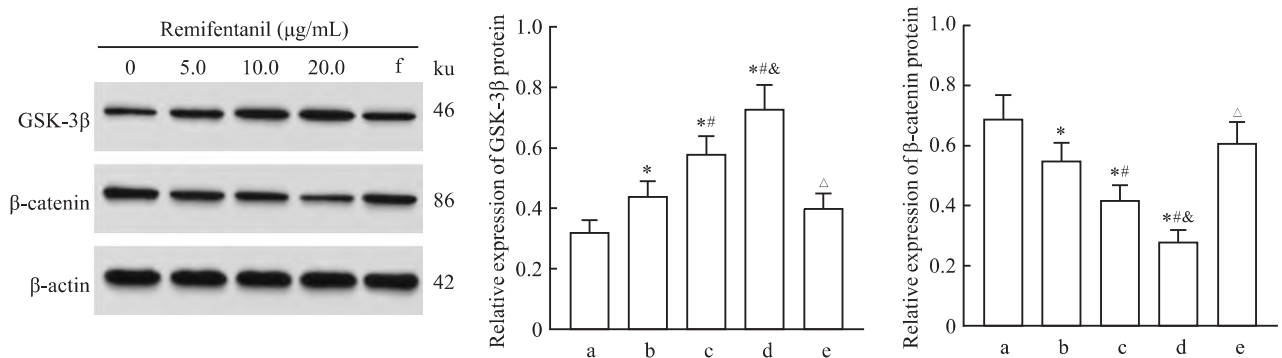


图6 各组MDA-MB-231细胞中GSK-3 β 、 β -catenin蛋白表达

Fig. 6 The expression of GSK-3 β and β -catenin in MDA-MB-231 cells of each group

a: Control group; b: Romifentanol low concentration group; c: Romifentanol medium concentration group; d: Romifentanol High concentration group; e: Romifentanol + SKL2001 group; f: Romifentanol + SKL2001 (20.0 μ g/mL + 1 μ mol/L); * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs romifentanol low concentration group; & $P < 0.05$ vs romifentanol medium concentration group; Δ $P < 0.05$ vs romifentanol high concentration group.

是细胞增殖的主要转录因子,在多种癌症中高表达,包括乳腺癌^[11]; *Cyclin D1* 在细胞周期 G_1 期的细胞进程中起着重要的调节作用,作为一种致癌基因,其高表达可加速细胞从 G_0/G_1 向 S 期的进展,在乳腺癌和其他人类癌症中具有重要的致病作用^[12]。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的关键调控因子,抗凋亡蛋白 Bcl-2 可以通过蛋白-蛋白相互作用抑制促凋亡蛋白来阻止细胞凋亡,而促凋亡蛋白 Bax 通过促进线粒体释放细胞色素 c 来促进这一过程。Cleaved-caspase-3 是 Caspase-3 的活化形式,是细胞凋亡的关键介质^[13]。本研究发现,在瑞芬太尼处理的 MDA-MB-231 细胞中, c-Myc 和 *Cyclin D1*、Bcl-2 及 pro-caspase-3 蛋白的表达显著降低, Bax 和 Cleaved caspase-3 的蛋白水平显著升高,并且 G_0/G_1 期细胞比例增加, S 期细胞比例降低; 这些结果表明,瑞芬太尼可抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期停滞。

Wnt/ β -catenin 通路是调节乳腺癌发生发展的重要通路之一^[14-15]。 β -catenin 是 Wnt 通路的关键调节因子,该通路在正常的细胞中不活跃。GSK-3 β 是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶,是 β -catenin 降解复合体的关键组成部分。当 Wnt 通路被激活时, GSK-3 β 从 β -catenin 降解复合体中解离,导致 β -catenin 在细胞质中不断积累并易位至细胞核, β -catenin 进入细胞核与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 结合,从而启动下游 *c-Myc*、*Cyclin D1* 等靶基因的转录,这有助于细胞从 G_1 期进入 S 期,促进细胞增殖^[16]。既往研究显示,抑制 Wnt/ β -catenin 通路可诱导乳腺癌细胞细胞周期停滞和细胞凋亡^[17]; 瑞芬太尼可通过增加 GSK-3 β 的表达诱导胶质瘤细胞凋亡^[7]。本研究通过 Western blot 探讨了瑞芬太尼对乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路的影响,发现在瑞芬太尼处理的 MDA-MB-231 细胞中 GSK-3 β 蛋白表达升高, β -catenin 蛋白显著下调,表明瑞芬太尼可促使 Wnt/ β -catenin 信号通路失活。此外, SKI2001 (Wnt/ β -catenin 通路激动剂) 可削弱瑞芬太尼对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响,并升高 β -catenin 蛋白的表达和降低 GSK-3 β 蛋白的表达,提示瑞芬太尼可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活发挥抗乳腺癌作用。

参考文献

[1] Gradishar W J, Moran M S, Abraham J, et al. Breast cancer,

version 3. 2024, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2024, 22(5): 331 - 57. doi: 10.6004/jncn.2024.0035.

[2] Khan M M, Yalamarty S S K, Rajmalani B A, et al. Recent strategies to overcome breast cancer resistance [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2024, 197: 104351. doi: 10.1016/j.critrevonc.2024.104351.

[3] Zhang Y, Jiang W, Luo X. Remifentanyl combined with dexmedetomidine on the analgesic effect of breast cancer patients undergoing modified radical mastectomy and the influence of perioperative T lymphocyte subsets [J]. Front Surg, 2022, 9: 1016690. doi: 10.3389/fsurg.2022.1016690.

[4] 邱卫华, 郭晴晴, 罗建喜. 瑞芬太尼通过上调 lncRNA DGCR5 表达影响卵巢癌细胞增殖和转移的机制研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(16): 43 - 9, 62. doi: 10.7619/jcmp.20231854.

[4] Qiu W H, Guo Q Q, Luo J X. Mechanism of remifentanyl affects proliferation and metastasis of ovarian cancer cells by up-regulating expression of lncRNA DGCR5 [J]. J Clin Med Pract, 2023, 27(16): 43 - 9, 62. doi: 10.7619/jcmp.20231854.

[5] 唐婧英, 李选发, 邓小华, 等. 瑞芬太尼通过调控 miR-212-3p/LIN28B 表达影响子宫内膜癌细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5370 - 5. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.23.049.

[5] Tang J Y, Li X F, Deng X H, et al. Remifentanyl affects the proliferation, migration and invasion of endometrial cancer cells by regulating the expression of miR-212-3p/LIN28B [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(23): 5370 - 5. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.23.049.

[6] Zhang C H, Liu H, Zhao W L, et al. G3BP1 promotes human breast cancer cell proliferation through coordinating with GSK-3 β and stabilizing β -catenin [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(11): 1900 - 12. doi: 10.1038/s41401-020-00598-w.

[7] Xu J, Xu P, Li Z, et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β in glioma cell apoptosis induced by remifentanyl [J]. Cell Mol Biol Lett, 2013, 18(4): 494 - 506. doi: 10.2478/s11658-013-0102-3.

[8] 史国强, 谷甫艳, 牛卫康, 等. 利多卡因调控 Wnt/ β -连环蛋白轴对胃癌细胞化疗敏感性的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2024, 28(1): 28 - 36. doi: 10.7619/jcmp.20233272.

[8] Shi G Q, Gu F Y, Niu W K, et al. Impact of lidocaine on the chemotherapy sensitivity of gastric cancer cells via regulating Wnt/ β -catenin axis [J]. J Clin Med Pract, 2024, 28(1): 28 - 36. doi: 10.7619/jcmp.20233272.

[9] Li M, Gu K, Kong Q, et al. Sufentanil inhibits the metastasis and immune response of breast cancer via mediating the NF- κ B pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2023, 45(6): 663 - 71. doi: 10.1080/08923973.2023.2228476.

[10] Liang W, Ke J. Remifentanyl reduces the proliferation, migration and invasion of HCC cells via lncRNA NBR2/miR-650/TIMP3 axis [J]. Int J Exp Pathol, 2022, 103(2): 44 - 53. doi: 10.1111/iep.12429.

- [11] Pandkar M R, Sinha S, Samaiya A, et al. Oncometabolite lactate enhances breast cancer progression by orchestrating histone lactylation-dependent c-Myc expression [J]. *Transl Oncol*, 2023, 37: 101758. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101758.
- [12] Zhao J, Wu Y, Xiao T, et al. A specific anti-cyclin D1 intrabody represses breast cancer cell proliferation by interrupting the cyclin D1-CDK4 interaction [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2023, 198 (3): 555–68. doi: 10.1007/s10549-023-06866-7.
- [13] Dariushnejad H, Roshanravan N, Wasman H M, et al. Silibinin, synergistically enhances vinblastine-mediated apoptosis in triple negative breast cancer cell line: involvement of Bcl2/Bax and Caspase-3 pathway [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2024, 18(2): 174–82. doi: 10.18502/ijhosc.v18i2.15375.
- [14] Hashemi M, Hasani S, Hajimazdarany S, et al. Biological functions and molecular interactions of Wnt/ β -catenin in breast cancer: revisiting signaling networks [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 232: 123377. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123377.
- [15] 程 政, 张曼曼, 周静妮, 等. KRT14 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进基底细胞样乳腺癌侵袭和迁移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(5): 805–15. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.006.
- [15] Cheng Z, Zhang M M, Zhou J N, et al. KRT14 promotes the invasion and migration of basal-like breast cancer through activating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60 (5): 805–15. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.006.
- [16] Xue W, Yang L, Chen C, et al. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 79. doi: 10.1007/s00018-023-05099-7.
- [17] Chen Z H, Tian Y, Zhou G L, et al. CMTM7 inhibits breast cancer progression by regulating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Breast Cancer Res*, 2023, 25(1): 22. doi: 10.1186/s13058-023-01620-9.

Impacts of remifentanil on proliferation, apoptosis and Wnt/ β -catenin pathway of breast cancer MDA-MB-231 cells

Zhang Yang¹, Liu Wenwen², Miao Huanhuan³, Yang Guang¹

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of breast surgery, ³Dept of Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

Abstract *Objective* To investigate the impacts of remifentanil on the proliferation, apoptosis and Wnt/ β -catenin pathway of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Methods* Different concentrations of remifentanil (0, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 $\mu\text{g/mL}$) were used to treat human normal breast MCF-10A cells and breast cancer MDA-MB-231 cells to screen for experimental concentrations of remifentanil. MDA-MB-231 cells were divided into control group, remifentanil low (5.0 $\mu\text{g/mL}$), medium (10.0 $\mu\text{g/mL}$), and high (20.0 $\mu\text{g/mL}$) concentration groups, and remifentanil + SKL2001 (Wnt/ β -catenin pathway agonist) group. MTT assay and colony formation assay were applied to detect cell proliferation ability. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis and cell cycle changes. Western blot was applied to detect protein expression related to cell proliferation, apoptosis, and the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Results* Remifentanil at concentrations of 5.0, 10.0, and 20.0 $\mu\text{g/mL}$ could reduce the viability of MDA-MB-231 cells and had no prominent toxicity to MCF-10A cells. Compared with the control group, the optical density value of cell proliferation, colony formation number, proportion of S-phase cells, and the protein levels of cellular myelocytomatosis (c-Myc), Cyclin D1, B lymphoblastoma 2 (Bcl-2), precursor of cysteine aspartate protease-3 (pro-caspase-3) and β -catenin were lower in the low, medium, and high concentration remifentanil groups ($P < 0.05$), while the proportion of G_0/G_1 phase cells, apoptosis rate, early apoptosis rate, the protein levels of Bcl-2 associated X protein (Bax) and cleaved cysteine aspartate protease-3 (Cleaved caspase-3), and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) were higher ($P < 0.05$). SKL2001 could weaken the effects of remifentanil on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells. *Conclusion* Remifentanil inhibits the proliferation of MDA-MB-231 cells, induces apoptosis and cell cycle arrest, and its mechanism may be related to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway activation.

Key words remifentanil; breast cancer; proliferation; apoptosis; cell cycle; Wnt/ β -catenin signaling pathway

Fund program Medical Science Research Project of Hebei Provincial Health Commission (No. 20231512)

Corresponding author Yang Guang, E-mail: 329980877@qq.com