

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.03.005
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191106.1644.008.html(2019-11-07)

脂多糖对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、 迁移及侵袭的促进作用*

陈州华¹,王容容²,冯磊²,肖玉洁³,黄立中^{3△}
(1.湖南省湘潭市第二人民医院肿瘤科411100;2.湖南省中医药研究院附属医院肿瘤科,长沙410006;3.湖南中医药大学中西医结合学院,长沙410208)

[摘要] **目的** 探讨脂多糖(LPS)对人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**方法** 将人乳腺癌MDA-MB-231细胞分为空白对照组和不同浓度(5、10、20、40 μg/mL) LPS组,分别培养24、48、72 h取样本,CCK8法检测各组MDA-MB-231细胞增殖率,划痕实验检测各组MDA-MB-231细胞迁移率,Transwell小室实验检测各组MDA-MB-231细胞侵袭能力。**结果** 与空白对照组比较,LPS能促进MDA-MB-231细胞的增殖和迁移($P<0.05$),且具有浓度和时间的依赖性,48 h、20 μg/mL为最佳时间及浓度,细胞增殖率和迁移率分别为 $(83.19\pm3.22)\%$ 、 $(91.59\pm3.22)\%$,与空白对照组及LPS 5、10 μg/mL组比较差异有统计学意义($P<0.05$);空白对照组及LPS 5、10、20、40 μg/mL组的细胞侵袭分别为 (95.64 ± 4.21) 、 (119.44 ± 5.44) 、 (138.99 ± 8.64) 、 (159.41 ± 9.21) 、 (143.80 ± 11.45) 个,与空白对照组比较,LPS能提高MDA-MB-231细胞的侵袭,以20 μg/mL组细胞侵袭个数最多($P<0.05$)。**结论** 在体外LPS可促进MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭,最佳浓度为20 μg/mL。

[关键词] 乳腺肿瘤;脂多糖类;细胞增殖;细胞运动;肿瘤浸润
[中图法分类号] R737.9 **[文献标识码]** A
[文章编号] 1671-8348(2020)03-0365-05 开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Promoting effect of LPS on proliferation, migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells*

CHEN Zhouhua¹, WANG Rongrong², FENG Lei², XIAO Yujie³, HUANG Lizhong^{3△}
(1. Department of Oncology, Xiangtan Municipal Second People's Hospital, Xiangtan, Hunan 411100, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital, Hunan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of lipopolysaccharide(LPS) on the proliferation, migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** The human breast cancer MDA-MB-231 cells were divided into the blank control group and different concentrations LPS groups (0, 5, 10, 20, 40 μg/mL) and cultured for 24, 48, 72 h respectively. Then the samples were taken. The proliferation rate of MDA-MB-231 cells in each group was detected by using the CCK8 method. The migration rate and invasion ability of MDA-MB-231 cells in each group were detected by using the scratch test and Transwell chamber assay. **Results** Compared with the blank control group, LPS could promote the proliferation and migration of MDA-MB-231 cells in a concentration- and time-dependent manner. The optimal time and concentration were 48 h and 20 μg/mL. The cell proliferation rate and migration rate were $(83.19\pm3.22)\%$ and $(91.59\pm3.22)\%$, and the difference was statistically significant compared with the blank control group and the 5, 10 μg/mL LPS groups ($P<0.05$). The cell invasion abilities in the blank control group, and 5, 10, 20, 40 μg/mL LPS groups

* 基金项目:湖南省教育厅重点项目(15A139);湖南省教育厅一般项目(17C1205)。 作者简介:陈州华(1980-),副主任医师,博士,主要从事恶性肿瘤中西医结合防治研究。 △ 通信作者, E-mail: hlz992002@163.com。

were (95.64 ± 4.21) , (119.44 ± 5.44) , (138.99 ± 8.64) , (159.41 ± 9.21) , (143.80 ± 11.45) cells respectively, compared with the blank control group, LPS could elevate the invasion ability of MDA-MB-231 cells, the cell invasion numbers was maximal in the 20 $\mu\text{g/mL}$ group ($P < 0.05$). **Conclusion** LPS can promote the proliferation, migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro, and the optimal concentration is 20 $\mu\text{g/mL}$.

[Key words] breast neoplasms; lipopolysaccharides; cell proliferation; cell movement; neoplasm invasiveness

乳腺癌(breast cancer)在女性发病中位居恶性肿瘤第 1 位,2014 年我国女性乳腺癌新发病例约 27.89 万例,死亡病例约 6.60 万例^[1]。其中,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)没有靶向药物及内分泌药物治疗,约占乳腺癌的 15%,复发转移风险高,预后差。目前认为导致乳腺癌的原因是多方面的,病理发展是多个癌基因激活和抑癌基因失活多步骤过程。普遍认为乳腺癌是一类可防可控的疾病,但世界每年约有 120 万新发,50 余万死于此病,其原因与复发和转移有关。所以,乳腺癌的复发和转移是导致患者预后不良的重要原因。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)不仅是重要的致炎因子^[2],又可促进恶性肿瘤细胞的侵袭转移^[3]。有研究发现,通过 LPS 诱导能增加多种恶性肿瘤(如前列腺癌^[4]、乳腺癌^[5]、肠癌^[6]、肝癌^[7]等)细胞的迁移和侵袭。本研究探讨 LPS 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及迁移侵袭能力的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自中南大学湘雅医学院中心实验室;医用超净工作台购自苏州博立斯净化科技有限公司;CO₂ 培养箱购自德国 Heraeus 公司;恒温水浴箱购自上海医疗器械厂;胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、LPS、含双抗的青霉素购自中国 Solarbio 公司;6 孔板、24 孔板、96 孔板、25 cm² 培养瓶购自美国 Corning 公司;荧光倒置显微镜购自德国莱卡公司;Transwell insert、Matrigel 基质胶购自美国 Costar 公司;CCK8 购自美国 Sigma 公司;DMSO 购自美国 Amresco 公司;iMark 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;-80℃超低温冰箱购自日本 Sanyo 公司;光学显微镜购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 乳腺癌细胞株的培养

取人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,用含 10% 灭活的胎牛血清、1% 青霉素链霉素的 DMEM 培养基培

养,将细胞放置在 37℃,95% 湿度和 5% CO₂ 浓度的恒温培养箱中培养,隔天换液,细胞为单层贴壁,等待 MDA-MB-231 细胞生长至 80%~90% 时,予以 0.25% 胰蛋白酶消化,3~4 d 传代 1 次,采用对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 配制 LPS

将 PBS 10 mL 溶解 LPS 10 mg,用直径 0.22 μm 微孔除菌过滤膜过滤,分装于 20 mL 离心管,置于 4℃ 冰箱冷藏保存,使用时予以培养液稀释成各组不同浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)。

1.2.3 细胞增殖实验

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板(5×10^3 个/孔),每孔接种 100 μL 细胞悬液,4 h 细胞贴壁生长后移去培养液,分别在 96 孔中加入含不同浓度的 LPS,按终浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)分组,空白对照组不加 LPS,每组 5 个复孔,4 h 细胞贴壁后称之为 0 d,从 0 d 后依时间顺序计为 24、48、72 h,将终浓度比例为 10 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ 的 CCK8 试剂加入,继续将细胞置于培养箱内培养 1 h。使用酶标仪在 490 nm 波长处测其每孔吸光值(A)。计算细胞生长增殖率。

细胞生长增殖率(%) = $[(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$

其中, $A_{\text{实验}}$: 包含细胞的试剂、培养基和脂多糖; $A_{\text{空白}}$: 只加试剂和培养基,不加脂多糖和细胞; $A_{\text{对照}}$: 含有细胞的试剂和培养基,不含脂多糖

1.2.4 细胞划痕实验

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞进行培养,接种于 6 孔板(6×10^5 个/孔),每孔接种 1 mL 细胞悬液,培养 24 h 后,待细胞生长至 80%~90% 进行下一步,将直尺垫在 6 孔板下,用无菌移液枪头(20 μL) 在 6 孔板内沿培养孔正中垂直划痕,每相距 0.5 cm 距离划直线,确保每组划痕宽度一致,每孔至少均匀划 5 条直线,后用 PBS 轻柔吹打洗细胞 3 次,用以去除划线而刮起的漂浮细胞,除空白对照组不加 LPS 外,其余的分别向对应孔中加入含相应浓度 LPS(5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 的培养液,继续培养。分别于 0、24、48 h 在倒置显微镜下拍照。用 Image J 软件测量乳腺癌

MDA-MB-231 细胞的迁移距离,根据公式计算划痕迁移率。实验重复 3 次。

细胞划痕迁移率(%)=[(0 h 划痕宽度-相应时间划痕宽度)÷0 h 划痕宽度]×100%

1.2.5 细胞侵袭实验

实验前 1 d 先配置基质胶,将 50 mg/L 的 Matrigel 基质胶加入至 24 孔 Transwell 小室的上室,置于 37 ℃细胞培养箱中过夜使基质胶充分干燥。取对数生长期 MDA-MB-231 细胞进行培养,接种于 24 孔板 Transwell 小室(3×10⁵ 个细胞/上室),每孔接种 200 μL 细胞悬液培养 10 h,细胞贴壁生长后,弃上室培养液,分别向对应孔中加入含相应浓度(5、10、20、40 μg/mL)LPS 的培养液;下室加入 600 μL 无血清培养基,继续培养 36 h 后,弃去上、下室培养液,先用 PBS 清洗,无菌棉签轻轻拭去小室滤膜上层的细胞;然后用 PBS 清洗,晾干,取出小室用 4% 多聚甲醛固定 15~20 min,用 PBS 清洗 3 次,晾干,结晶紫染色 10~20 min;再用 PBS 清洗 3 次,晾干,将 Transwell 小室倒置,高倍镜下(×100)观察。每组样本随机选取 5 个视野,计算每个视野染色的细胞数量,即从上室侵袭到细胞小室滤膜下方的细胞数,计算平均值,每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

数据应用 SPSS20.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两均数的比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

与空白对照组比较,LPS 能促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖,且促进增殖的效应与 LPS 的浓度有关,浓度越高,促进增殖效果越强,当浓度在 20 μg/mL 时促进增殖效果作用明显(*P* < 0.05),浓度继续增加至 40 μg/mL 时乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖效果达到平台期,未继续增加。当固定 LPS 浓度在 20 μg/mL 时,随着时间的延长,也能促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖,在 48 h 时促进增殖效果作用明显(*P* < 0.05),72 h 时细胞增殖效果达到平台期,未继续增加。LPS 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖能力具有浓度和时间的依赖性,见表 1。

2.2 LPS 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

与空白对照组比较,LPS 处理后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移能力提高,且迁移的能力与 LPS 的浓度有关,浓度越高,促进迁移的能力越强,浓度在 20 μg/mL 时促进迁移作用明显(*P* < 0.05)。同时,LPS 浓度在 20 μg/mL 的情况下,随着时间的增加,促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移能力增强,48 h 时较 24 h 明显提高(*P* < 0.05),见图 1、表 2。

2.3 LPS 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

各组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞均能够穿透 Matrigel 基质胶,空白对照组及 5、10、20、40 μg/mL 组的细胞侵袭分别为(95.64±4.21)、(119.44±5.44)、

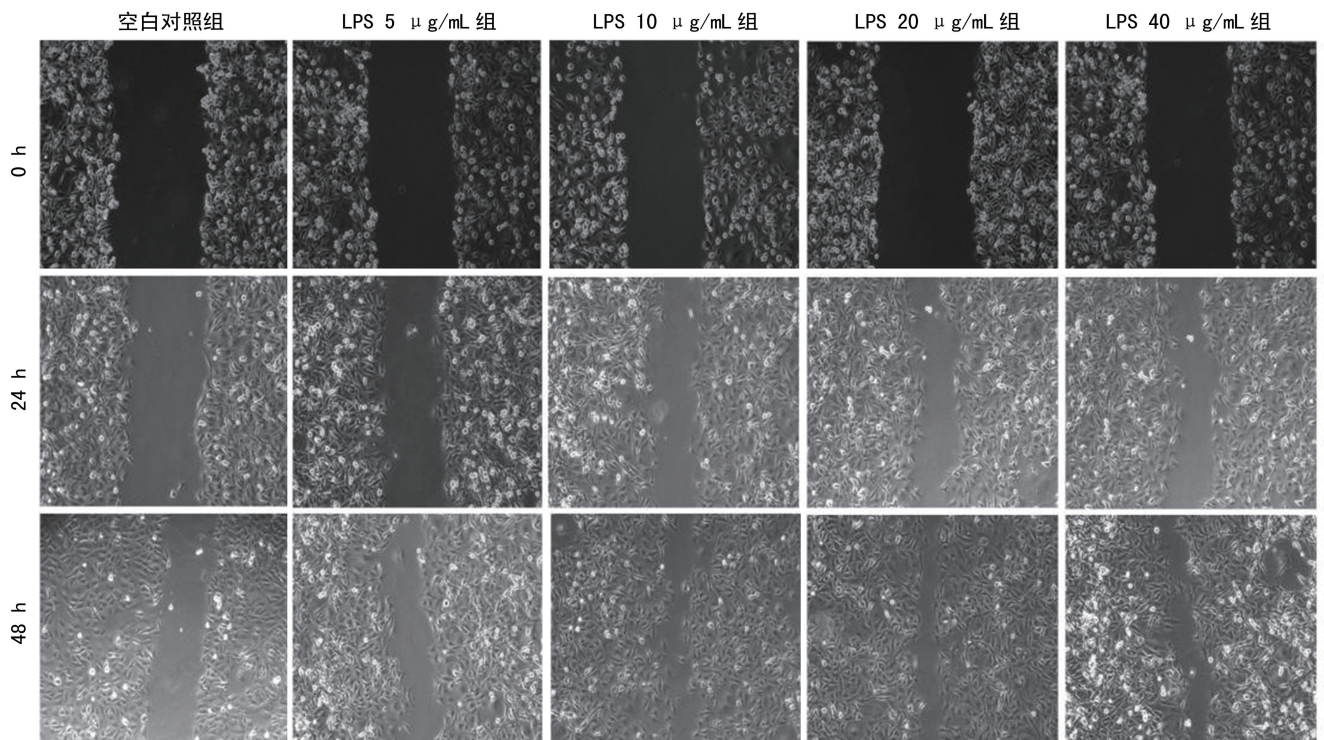


图 1 各组乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外迁移高倍镜下观察(×200)

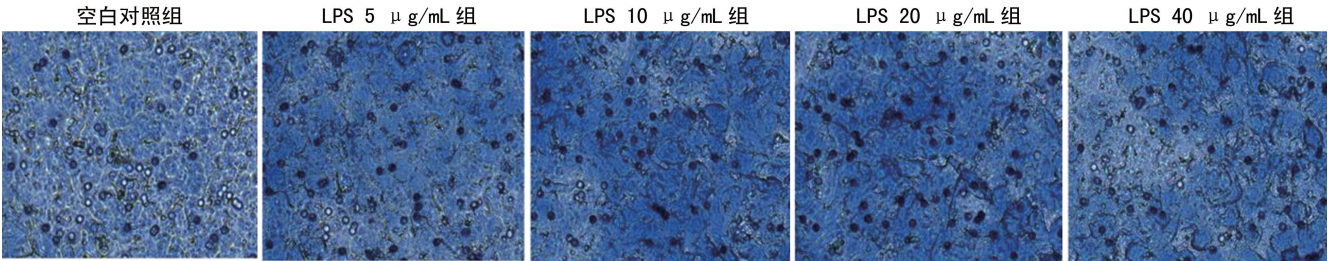


图2 各组乳腺癌MDA-MB-231细胞体外侵袭高倍镜下观察(×100)

(138.99±8.64)、(159.41±9.21)、(143.80±11.45)个。与空白对照组比较,不同浓度LPS组穿透Matrigel基质胶的乳腺癌MDA-MB-231细胞数目明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),且有一定的浓度依赖性,其中LPS浓度在20 μg/mL最明显($P<0.05$),见图2、3。

表1 各组乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖水平比较($\bar{x}\pm s$,%, $n=5$)

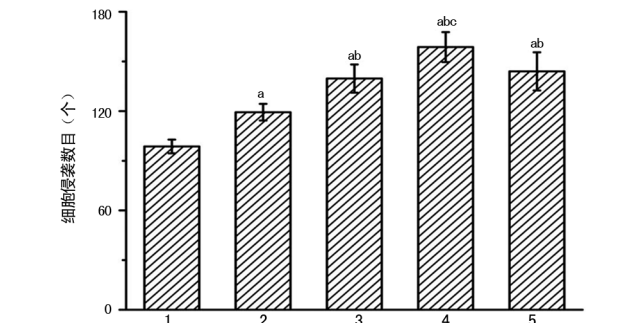
组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	25.45±2.86	43.28±4.65	47.55±4.36
LPS 5 μg/mL 组	35.32±4.63 ^a	53.45±4.32 ^{ac}	57.74±5.22 ^{ac}
LPS 10 μg/mL 组	47.79±2.72 ^{ab}	63.79±4.52 ^{abc}	68.45±2.41 ^{abc}
LPS 20 μg/mL 组	57.59±2.41 ^{abc}	83.19±3.22 ^{abc}	84.19±3.25 ^{abc}
LPS 40 μg/mL 组	68.51±4.33 ^{abcd}	80.12±3.61 ^{abc}	79.57±4.17 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与LPS 5 μg/mL组比较;^c: $P<0.05$,与LPS 10 μg/mL组比较;^d: $P<0.05$,与LPS 20 μg/mL组比较;^e: $P<0.05$,与同组24 h比较。

表2 各组乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移率比较($\bar{x}\pm s$,%, $n=3$)

组别	24 h	48 h
空白对照组	39.61±4.21	66.55±2.22
LPS 5 μg/mL 组	56.88±4.26 ^a	78.14±3.45 ^a
LPS 10 μg/mL 组	68.14±3.69 ^{ab}	86.78±3.77 ^{ab}
LPS 20 μg/mL 组	79.07±2.58 ^{abc}	91.59±3.22 ^{abc}
LPS 40 μg/mL 组	77.11±3.52 ^{abc}	85.71±2.47 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与LPS 5 μg/mL组比较;^c: $P<0.05$,与LPS 10 μg/mL组比较。



1:空白对照组;2:LPS 5 μg/mL组;3:LPS 10 μg/mL组;4:LPS 20 μg/mL组;5:LPS 40 μg/mL组;^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与LPS 5 μg/mL组比较;^c: $P<0.05$,与LPS 10 μg/mL组比较;^d: $P<0.05$,与LPS 20 μg/mL组比较。

图3 各组乳腺癌MDA-MB-231细胞侵袭能力比较($\bar{x}\pm s$,个, $n=3$)

3 讨论

乳腺癌是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,是威胁女性身心健康的常见恶性肿瘤之一,在我国主要城市,近10年来乳腺癌的发病率增长了37.00%,病死率增长了38.91%。其中,三阴性乳腺癌恶性程度高、生长快、复发转移能力强,严重威胁着女性的生命健康。因此,研究三阴性乳腺癌侵袭和转移相关机制,探讨三阴性乳腺癌发生、发展的分子机制,探索积极有效的防治措施,对于降低患者病死率及改善患者预后具有重要意义。

目前认为乳腺癌是一种全身性疾病,导致乳腺癌的原因是多方面的,病理发展是多个癌基因激活和抑癌基因失活多步骤过程,与机体内在因素有关,比如年龄、遗传、免疫状态、内分泌等有关。随着细胞生物和分子生物学技术的发展,对其研究的不断深入,逐渐认识到局部免疫炎性微环境与乳腺癌的发生、发展密切相关,因此,局部免疫炎性微环境与乳腺癌的复发转移的关系成为研究的热点。

LPS即内毒素(endotoxin),是革兰阴性菌(G^-)的细胞壁成分^[8],属外源性介质,具有广泛的生物学活性。已有研究发现,LPS作为重要的致炎因子^[9],可诱导细胞产生炎症模型^[10];LPS刺激乳腺癌细胞产生大量炎症因子,释放大量的炎症介质,在肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移过程中起着重要作用^[11]。LPS能增加胃癌细胞^[12]、膀胱癌细胞^[13]的增殖,能增加肝癌细胞^[7]、乳腺癌细胞^[5]、前列腺癌细胞^[4]、胶质瘤细胞^[14]、肠癌细胞^[6]迁移和侵袭。

有实验证明,LPS能刺激小鼠黑色素瘤细胞系(B16F10)增殖,有时间和剂量的依赖性^[15]。本研究通过LPS建立炎性微环境的细胞模型,探讨炎症刺激在乳腺癌的浸润转移过程中的作用。实验结果表明不同浓度LPS都可促进乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭能力,浓度在20 μg/mL时细胞增殖、迁移及侵袭作用明显($P<0.05$),因此,进行后续的实验研究,本研究对乳腺癌MDA-MB-231细胞炎性微环境造模选用LPS浓度为20 μg/mL。总之,LPS在三阴性乳腺癌的发生、发展和迁移侵袭过程中起着重

要作用,可能成为新的抗肿瘤侵袭转移的治疗靶点。然而,LPS 促进三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的具体分子机制尚待后续研究,但也为下一步的研究提供了新的思考。

恶性肿瘤的发生、发展是一个非常复杂的过程,本研究仅通过细胞功能学实验验证了 LPS 能增强乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外增殖、迁移和侵袭,LPS 是如何引起乳腺癌细胞发生此过程,以及 LPS 导致乳腺癌细胞发生浸润转移的具体机制有待于细胞分子生物学和动物移植瘤实验进一步验证。

参考文献

- [1] HE L, RONGSHOU Z, SIWEI Z, et al. Incidence and mortality of female breast cancer in China, 2014[J]. *Chin J Oncol*, 2018, 40(3):166-171.
- [2] KARTINI, PIYAVIRIYAKUL S, THONGPRAD-IC HOTE S, et al. Effects of plantago major extracts and its chemical compounds on proliferation of cancer cells and cytokines production of lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(51):393-399.
- [3] TAN Z H, ZHANG Y, TIAN Y, et al. I κ B kinase b mediating the downregulation of p53 and p21 by lipopolysaccharide in human papillomavirus 16 + cervical cancer cells[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(22):2703-2707.
- [4] ZHANG Z H, XIE D D, XU S, et al. Total glucosides of paeony inhibits lipopolysaccharide-induced proliferation, migration and invasion in androgen insensitive prostate cancer cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8):e0182584.
- [5] SEOL M A, PARK J H, JEONG J H, et al. Role of TOPK in lipopolysaccharide-induced breast cancer cell migration and invasion[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40190-40203.
- [6] CHENG G, YANG S, ZHANG G, et al. Lipopolysaccharide-induced α -catenin downregulation enhances the motility of human colorectal cancer cells in an NF- κ B signaling-dependent manner[J]. *Oncol Targets Ther*, 2016, 9:7563-7571.
- [7] WANG L, ZHU R, HUANG Z, et al. Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling in cancer cells promotes cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(8):2223-2236.
- [8] WONG J H, HO K H, NAM S, et al. Store-operated Ca²⁺ entry facilitates the lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12813.
- [9] HE M, LIU Y, SHEN J, et al. Upregulation of PLZF is associated with neuronal injury in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(11):3063-3073.
- [10] 雷莉妍, 王瑞成, 周瑞, 等. 基于 NF- κ B 通路的芒果苷干预脂多糖诱导的细胞炎症作用机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(5):597-602.
- [11] PARK G S, KIM J H. LPS up-regulates ICAM-1 expression in breast cancer cells by stimulating a MyD88-BLT2-ERK-linked cascade, which promotes adhesion to monocytes[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(9):821-828.
- [12] LIU W, FAN Y, SHI Y, et al. Knockdown of TIPE2 increases the proliferation in lipopolysaccharide-stimulated gastric cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):857.
- [13] 迟强, 艾晓林, 王志勇, 等. 脂多糖经 TLR4 介导 Cx43 的表达对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(5):701-705.
- [14] CHE F, XIE X, WANG L, et al. B7-H6 expression is induced by lipopolysaccharide and facilitates cancer invasion and metastasis in human gliomas[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59:318-327.
- [15] DANA N, JAVANMARD S H, VASEGHI G. Effect of lipopolysaccharide on toll-like receptor-4 signals in mouse cancer cells[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(10):598-601.

(收稿日期:2019-04-18 修回日期:2019-10-22)