

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.013

内毒素诱导非小细胞肺癌细胞增殖及其机制

李振宇¹ 李月旺² 王廷杰¹ 金巴特尔¹ 张志刚¹

(1 武警内蒙古总队医院外三科 内蒙古 呼和浩特 010020; 2 内蒙古托克托县医院 内蒙古 托县 010200)

摘要 目的:研究内毒素对体外培养非小细胞肺癌(NSCLC)细胞株 A549 细胞增殖的影响及其机制。**方法:**不同浓度脂多糖(LPS)进行 8-48h 干预,MTT 及细胞计数法检测其对 A549 细胞增殖的影响;EGFR 中和抗体或 COX-2 抑制剂与 LPS 联合干预,检测其对 A549 细胞增殖及 PGE2 的影响。**结果:**LPS 可引发 A549 细胞 MTT 活性和细胞计数显著增加,且呈现时间和剂量依赖性。LPS 还可诱发 PGE2 水平显著升高。药物干预结果显示,抑制 COX-2 或 EGFR 可明显逆转 LPS 所引发的细胞增殖和 PGE2 水平升高趋势。**结论:**LPS 可能通过激活 EGFR 和 COX-2 信号途径,诱导体外培养的非小细胞肺癌细胞增殖分化。肺部感染可能会加速非小细胞肺癌进展,并可能造成不良预后。

关键词:肺癌;内毒素;肿瘤增殖

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1449-03

Effects of Endotoxin on Tumor Proliferation in the Non-Small Cell Lung Cancer and Underlying Mechanisms

LI Zhen-yu¹, LI Yue-wang², WANG Ting-jie¹, JIN Ba-ter¹, ZHANG Zhi-gang¹

(1 The department of No.3 of surgery, The general hospital of Inner mongolia armed police, Huhhot, Inner mongolia, 010020, China;

2 Tuo-ke-tuo hospital, Tuoketuo, Inner mongolia, 010020, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of endotoxin on tumor proliferation in the non-small cell lung cancer and the underlying mechanisms. **Methods:** Different concentrations of Lipopolysaccharide (LPS) were intervened from 8 to 48 h. The effect of LPS on the proliferation of A549 cells with MTT and cell counting were tested. The intervention effect of the combination of EGFR neutralizing antibody or COX-2 inhibitors with LPS on the proliferation of A549 cells and PGE2 were tested. **Results:** LPS induced a time- and dose-dependent increase in proliferation of A549 cells as quantified by MTS activity and cell counting. Large amounts of COX-2-derived prostaglandin (PG) E2 were secreted from LPS-stimulated A549 cells. Pharmacological interventions revealed that inhibition of COX-2 and EGFR activity in A549 cells severely attenuated both PGE2 release and proliferation in response to LPS. **Conclusion:** LPS induces proliferation of NSCLC cells *in vitro* in human NSCLC specimen via EGFR- or COX-2-signaling. Pulmonary infection may thus directly induce tumor progression in NSCLC.

Key words: Lung cancer ; Endotoxin; Tumor proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1449-03

前言

感染被认为是加速癌症发展的因素之一。粗略估计,15%左右恶性肿瘤可归因于传染性病原体^[1]。一些慢性细菌感染也与肿瘤的形成密切相关^[2]。肺癌是最主要的致死性癌症之一。肺癌患者常会感染流感嗜血杆菌和大肠杆菌等革兰阴性菌^[3,4],肺部感染与肺癌患者的中位生存期下降相关^[5],但细菌感染是否加速肺癌肿瘤的生长和转移,进而形成不良预后尚不清楚。然研究证实,持续炎性刺激可加速癌组织生长^[6,7]。COX-2 与肺癌的不良预后密切相关^[8,9],前列腺素 E2(PGE2)是主要的 COX-2 衍生物,在人类肺癌组织表达上调^[10,11]。PGE2 可通过抑制肿瘤细胞凋亡并激活表皮生长因子受体(EGFR)相关的信号通

路,促进肿瘤发展^[12]。基于此,本研究拟以非小细胞肺癌 A549 细胞株为研究对象,探讨内毒素对非小细胞肺癌细胞增殖的影响及其机制,以期明确细菌感染在肺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及分组

人肺腺癌 A549 细胞株购自美国标准菌库(ATCC, Rockville, MD, USA),培养条件:饱和湿度,95%空气,5%CO₂。所有的单元格培养基均购自 Gibco 公司。该细胞培养于达尔伯克改良伊格培养基(DMEM/F12),内含 10%胎牛血清,2mM L-谷氨酰胺,105 U/L 青霉素和 100 mg/L 的链霉素。细胞生长至融合,2-3 天传代一次。研究分为两步,实验一:研究不同浓度脂多糖(LPS, E.coli 0111: B4, Sigma 公司)对 A549 细胞增殖影响,根据 LPS 浓度分为对照组,0.1 μg/ml,1 μg/ml,10 μg/ml LPS 组;实验二:研究 LPS 可能的作用机制,分为对照组,10 μg/ml LPS 组,10 μg/ml LPS+anti-EGFR,10 μg/ml LPS+COX 抑制剂组主要试剂应用浓度及来源:EGFR (1:5000, Cetuximab,

作者简介:李振宇,(1980-),男,硕士,主治医师,肺癌相关临床与基础,E-mail:798242742@qq.com,电话:18247135005

(收稿日期:2013-09-11 接受日期:2013-09-30)

MerckSerono, Germany), COX inhibitors (1:500, NS-398, Calbiochem, LaJolla, CA, USA).

1.2 细胞增殖能力检测

将受试 A549 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞, 用 10% IMDM 完全培养基配成单个细胞悬液。进行细胞计数后, 按照 5×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μ L。将培养板移入 CO₂ 培养箱中, 在 37°C 5% CO₂ 饱和湿度的条件下培养 24 h, 细胞完全贴壁生长后, 将培养液吸弃, 根据不同分组换上相应工作液继续培养不同时间(第一阶段实验培养时间 8 h、24 h、48 h; 第二阶段实验培养 24 h), 培养周期结束后, 细胞洗涤两次, 含 1% 胎牛血清 RPMI 培养基继续孵育 8 小时, CasyModel ITT (Innovatis AG, Reutlingen, Germany) 再进行细胞计数。之后, 加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 于 37°C 孵育 4 h 后离心 (2000 rpm, 10 min), 小心吸去上清, 加入 150 μ L DMSO, 振荡 3 min ~ 5 min, 置酶标仪上用 490 nm 测吸光度值 A, 实验重复 3 次。细胞计数和吸光度均以对照组吸光度值设为基准值 100%, 其余各组计与对照组相比的相对值。

1.3 ELISA 检测前列腺素 E2

对于这些实验中, A549 细胞按照 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔培养板中, 每孔体积 500 μ L。按照上述实验分组加

入不同工作液。所有样品进行复制。培养周期结束后, 细胞洗涤两次, 含 1% 胎牛血清和 5 mM 花生四烯酸的 RPMI 培养基继续孵育 8 小时, (Sigma 公司, Deisenhofen, 德国)。然后 13,000 $\times$ g 离心, 收集细胞上清液。采取这项措施, ELISA 法检测前列腺素 E2 (PGE₂), 所有的样品都重复 2 次。

1.4 统计分析

实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件 (SPSS Inc, USA) 进行单因素 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 对比组间有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对 A549 细胞增殖的影响

细胞计数和 MTT 活性是反映癌细胞增殖的指标。由图 1 和 2 可以看出, 不同浓度 LPS 均可明显增加 A549 细胞数量级 MTT 活性, 其中以 10 μ g/mL LPS 对细胞增殖能力的促进作用最为显著。10 μ g/mL LPS 作用 24 h 后, 细胞计数升高至对照组的 201% ($P < 0.01$, 图 1), MTT 活性升高至对照组的 122% ($P < 0.01$, 图 2); 10 μ g/mL LPS 作用 48 h 后, 细胞计数升高至对照组的 138% ($P < 0.01$, 图 1), MTT 活性升高至对照组的 151% ($P < 0.01$, 图 2)。

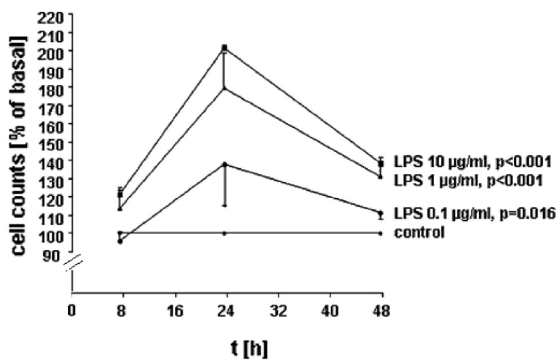


图 1 不同浓度 LPS 作用不同时间对 A549 细胞计数的影响 (与对照组相比, $n=6$)

Fig.1 Time-and dose-dependent induction of A549 cell counting by LPS

2.2 抑制 EGFR 和 COX-2 对 LPS 所致 A549 细胞增殖及 PGE₂ 水平的影响

10 μ g/mL LPS 作用 24 h 后, MTT 活性升高至对照组的 122% ($P < 0.01$, 图 3); 而采用 EGFR 和 COX-2 抑制剂干预后, MTT 活性分别下降至对照组的 91% 和 87%, 显著低于单纯 10

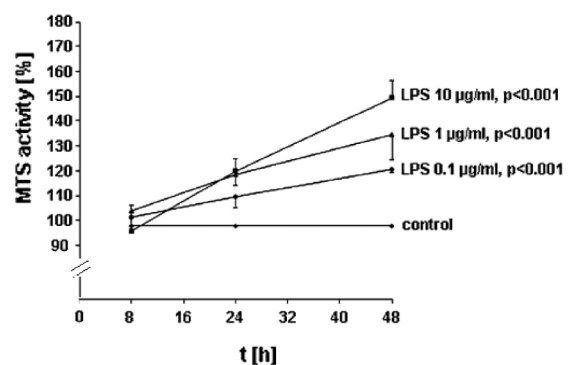


图 2 不同浓度 LPS 作用不同时间对 A549 细胞增殖的影响 (与对照组相比, $n=6$)

Fig.2 Time-and dose-dependent induction of A549 proliferation by LPS

μ g/mL LPS 干预组 ($P < 0.01$, 图 3)。10 μ g/mL LPS 作用 24 h 后, PGE₂ 水平为 473 ng/mL, 显著高于对照组的 122% ($P < 0.01$, 图 4); 而采用 EGFR 和 COX-2 抑制剂干预后, PGE₂ 水平分别下降至 151 ng/mL 和 139 ng/mL, 显著低于单纯 10 μ g/mL LPS 干预组 ($P < 0.01$, 图 4)。

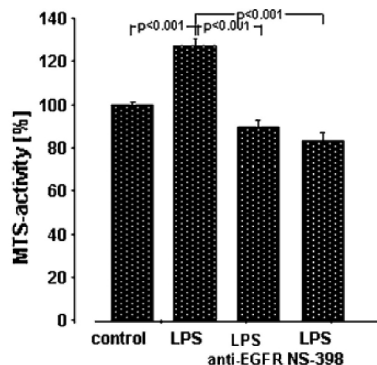


图 3 抑制 EGFR 和 COX-2 对 LPS 所致 A549 细胞增殖的影响 ($n=6$)

Fig.3 The effects of anti-EGFR and COX-2 inhibitor on induction of A549 proliferation by LPS

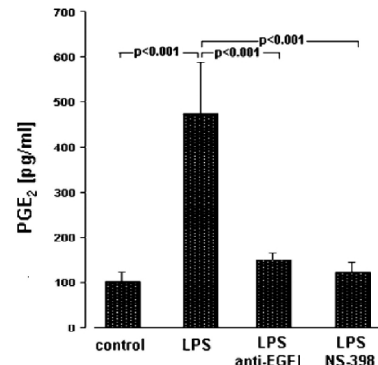


图 4 抑制 EGFR 和 COX-2 对 LPS 所致 A549 细胞 PGE₂ 改变的影响 ($n=6$)

Fig.4 The effects of anti-EGFR and COX-2 inhibitor on induction of PGE₂ by LPS

3 讨论

肺癌为常见的呼吸系统恶性肿瘤,因局部阻塞、出血、化疗及全身免疫力低下等原因,常伴发肺部感染,并以细菌性感染为主,有时可有混合感染。肺癌患者在确诊时,约 50%在下呼吸道出现感染前已有细菌定植,主要以条件致病菌为主^[13],随着病情的进展或机体免疫力的进一步下降,定植的细菌将成为患者的主要细菌来源。研究显示,肺癌患者呼吸道感染的致病菌中以革兰阴性杆菌常见^[14,15]。肺癌患者的肺部感染可能与晚期肺癌的不良预后密切相关。但肺癌与肺部感染相互关系如何,特别是继发肺部感染是否进一步促进恶性肿瘤的发展,现尚不明确。近期研究证实,作为革兰阴性菌的主要的致病因子,LPS可促进人类卵巢癌^[16]和乳腺癌^[17]的生长,并可增强非小细胞肺癌细胞对凋亡的耐受性^[18]。本研究表明,LPS可促进人肺腺癌 A549 肿瘤细胞体外增殖,且呈现剂量效应关系和时间效应关系,提示肺癌继发肺部感染可能进一步促进恶性肿瘤的发展及不良预后,且可能与感染严重程度和时间正相关。

COX-2 在包括肺癌在内的多种肿瘤组织中表达增加^[19,20],通过多种致癌机制参与 NSCLC 的发生发展,包括能促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤血管形成、抑制机体的抗肿瘤免疫反应、增加肿瘤的侵袭转移能力。COX 是 PG 合成过程中的一个重要限速酶。COX-2 催化产生 PGE2,与细胞膜上或核内的受体结合,促进细胞生长增殖,增强肿瘤细胞的侵袭力。本研究表明,COX-2 抑制剂干预可有效降低 LPS 对 A549 肿瘤细胞的促增殖作用,并可显著逆转 LPS 所致的 PGE2 水平增加,提示 LPS 可能通过激活 COX-2 途径,进而增加 PGE2 水平,发挥对 A549 肿瘤细胞的促增殖作用。

EGFR 介导的信号转导通路在肿瘤发生、发展中发挥着关键的作用,EGF 与其配体结合后形成二聚体,并进一步激活 PI3K/Akt、MAPK 等细胞分化和增殖的重要信号通路,促进肿瘤细胞的增殖分化^[21,22]。本研究表明,EGFR 抑制剂干预可有效降低 LPS 对 A549 肿瘤细胞的促增殖作用,并可显著逆转 LPS 所致的 PGE2 水平增加,提示 LPS 可能通过激活 EGFR 途径,发挥对 A549 肿瘤细胞的促增殖作用。

总之,本研究表明 LPS 可能通过激活 EGFR 和 COX-2 信号途径,诱导体外培养的非小细胞肺癌细胞增殖分化。本研究结果提示,肺部感染可能会加速非小细胞肺癌进展,并可能造成不良预后。

参考文献(References)

- [1] Pisani P, Parkin DM, Munoz N, et al. Cancer and infection: estimated of the attributable fraction in 1990 [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 6(1): 387-400
- [2] Vogelmann R, Amieva MR. The role of bacterial patho-gens in cancer [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(1):76-81
- [3] Putinati S, Trevisani L, Gualandi M, et al. Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis[J]. *Lung Cancer*, 1994, 11(1): 342-349
- [4] Berghmans T, Sculier JP, Klastersky J. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hos-pital[J]. *Chest*, 2003, 124(1): 114-120
- [5] Perlin E, Bang KM, Shah A, et al. The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients[J]. *Cancer*, 2009, 66(3): 593-5

- 96
- [6] Coussens LW, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420 (1): 860-867
- [7] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(1): 436-444
- [8] Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 58(10): 4997-5001
- [9] Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 5(2): 1001-1005
- [10] McLemore TL, Hubbard WC, Litterst CL, et al. Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(12): 3140-3147
- [11] Hubbard WC, Alley MC, McLemore TL, et al. Profiles of prostaglandin biosynthesis in sixteen established cell lines derived from human lung, colon, prostate, and ovarian tumors[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(10): 4770-4775
- [12] Pai R, Soreghan B, Szabo IL, et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2002, 8(1): 289-293
- [13] 文细毛,任南,徐秀华,等.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12(4): 241-244
Wen Xi-mao, Ren Nan, Xu Xiu-hua, et al. Distribution and Antibacterial Resistance of Nosocomial Infection Pathogens from National Nosocomial Infection Surveillance System [J]. *Journal of chinese hospital infection*, 2002, 12(4): 241-244
- [14] 张勤,黄迪泽.晚期肺癌化疗后下呼吸道感染 31 例临床分析[J]. *临床内科杂志*, 2000, (30): 171-172
Zhang Qin, Huang Di-ze. Clinical analysis of 31 cases of lower respiratory tract infection after chemotherapy for advanced lung cancer[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*, 2000, (30): 171-172
- [15] 邵世峰,宁晖,杜佰凤.肺癌并发下呼吸道感染的痰菌及药敏分析[J]. *临床肺科杂志*, 2004, 9(4): 334-336
Shao Shi-feng, Ning Hui, Du Bai-feng. Sputum bacteria and drug sensitivity of lower respiratory infection with lung cancer analysis [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2004, 9(4): 334-336
- [16] Kelly MG, Alvero AB, Chen R, et al. TLR-4 signaling pro-motes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10): 3859-3868
- [17] Harmey JH, Bucana CD, Lu W, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angio-genesis, vascular permeability and tumor cell invasion [J]. *Int J Cancer*, 2012, 101(1): 415-422
- [18] He W, Liu Q, Wang L, et al. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance [J]. *Mol Immunol*, 2007, 11(10): 2850-2859
- [19] Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclooxygenase2: a pharmacological target for the prevention of cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 12(9): 544-549
- [20] Lababede O, Meziane MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart[J]. *Chest*, 2009, 115(1): 233-245
- [21] Mendelsohn J. EGF receptors as a target for cancer therapy [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2004, 115(1):249-253
- [22] Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer[J]. *Semin Oncol*, 2006, 33(4): 369-385