

· 实验研究 ·

血小板增高对肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭的影响及意义

李聪, 莫冬萍

江苏省肿瘤医院 江苏省肿瘤防治研究所 南京医科大学附属肿瘤医院检验科, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 探讨外周血小板增高对肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭的影响及其意义。**方法** 将健康人外周血小板分离后与 A549 细胞共培养, 同时进行 A549 细胞的单独培养。采用 Cell counting kit 8 (CCK-8) 实验检测 A549 细胞的增殖情况, Transwell 实验检测细胞的侵袭能力。实时定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和 Western blot 检测血小板与 A549 细胞共培养后基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 的表达。**结果** CCK-8 法检测细胞增殖结果显示, 在共培养 48、72、96 h, 共培养体系 (A549 + 血小板) 的细胞增殖能力较 A549 细胞单独培养组明显增强, 差异有统计学意义 ($P=0.000, 0.007, 0.000$)。Transwell 结果表明, 共培养体系 (A549 + 血小板) 中穿透 Transwell 小室基底膜和 ECM 胶的 A549 细胞数 (372.5 ± 10.3) 明显多于 A549 细胞单独培养组 (148.6 ± 6.8), 差异有统计学意义 ($t=31.421, P=0.000$)。CCK-8 和 Transwell 结果表明, 血小板显著增强肺腺癌 A549 细胞增殖能力和侵袭能力。实时定量 qRT-PCR 及 Western blot 检测结果显示, 在共培养体系 (A549 + 血小板) 中, MMP-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于 A549 细胞单独培养组 ($P=0.000, 0.007$)。**结论** 肺腺癌细胞与血小板共同作用可能诱导 MMP-2 的分泌从而促进肿瘤的进展。检测血小板计数的变化, 对肺癌患者预后评估可能有一定的指导意义。

关键词: 肺腺癌; A549 细胞; 血小板; 基质金属蛋白酶-2; 增殖; 侵袭

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)07-0911-04

Influences of thrombocytosis on proliferation and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells and its clinical significance

LI Cong, MO Dong-ping

Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research,

The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210009, China

Corresponding author: MO Dong-ping, E-mail: modongping1223@163.com

Abstract: Objective To explore the impacts of peripheral blood thrombocytosis on proliferation and invasion of lung adenocarcinoma A549 cells through in-vitro experiments and the clinical significance. **Methods** After the platelets isolated from healthy human peripheral blood were co-cultured with A549 cells, at the same time, A549 cells were cultured alone. The proliferation and the invasive ability of A549 cells were respectively detected by cell counting kit 8 (CCK-8) and Transwell test. Real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to determine the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). **Results** CCK-8 assay showed that the cell proliferation ability of co-culture system (A549 + platelet) was significantly higher than those of A549 cell alone culture group at 48-, 72- and 96- hour after co-culture ($P=0.000, 0.007, 0.000$). Transwell results showed that the number of A549 cells penetrating Transwell's ventricular basement membrane and coalescence of extracellular matrix (ECM) glue in co-culture system (A549 + platelets) was significantly higher than those in A549 cells alone culture group (372.5 ± 10.3 vs $148.6 \pm 6.8, t=31.421, P=0.000$). qRT-PCR and Western blot results showed that the relative expressions of MMP-2 mRNA and protein in co-culture system (A549 + platelets) were significantly higher than those in A549 cells alone culture group ($P=0.000, 0.007$). **Conclusions** The combined action of lung adenocarcinoma cells and platelets may induce the secretion of MMP-2 and promote the progression of lung cancer. Detection of platelet count may have a significant prognostic evaluation of lung cancer patients.

Key words: Lung adenocarcinoma; A549 cell; Platelet; Matrix metalloproteinase-2; Proliferation; Invasion

肺癌是最常见的原发性恶性肿瘤之一, 其发病率 及死亡率居各种恶性肿瘤首位, 严重危害人类健

康^[1]。其中约 85% 的肺癌为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), NSCLC 中最多见的是腺癌和鳞癌^[2]。早期肺癌的检出率低, 75% 以上的患者确诊为肺癌时已为中晚期或者发生肿瘤的转移失去手术机会, 5 年生存率不足 15%, 而发生转移的患者 5 年生存率则低于 2%^[3]。因此, 探明肺癌发生侵袭转移的机制对于肺癌诊断、治疗和预后具有重要意义。自 1999 年开始, 恶性肿瘤与血小板的关系日益受到关注, 越来越多的研究揭示在未进行相关治疗的肿瘤患者中, 大约有 12% ~ 61% 的患者伴随着血小板数目的增加, 表明血小板可能参与了肿瘤的发生发展过程, 血小板增高是一些恶性实体肿瘤预后不良的独立危险因素^[4-5]。但目前, NSCLC 与血小板相互作用的分子机制仍然不清楚。本研究旨在通过体外实验分析外周血血小板计数对肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料试剂及仪器 肺腺癌细胞株 A549 购自中国科学院细胞库。DMEM 培养液、胎牛血清 (Gibco 公司); miRNeasy Kit (Qiagen 公司); 人外周血小板分离液 (天津灏洋); CCK-8 (碧云天公司); Transwell 小室 (Corning 公司); MaxGel™ ECM mixture (Sigma 公司); 兔抗人 MMP-2 单克隆抗体 (Abcam 公司); 实时定量 PCR 仪 (ABI QuantStudio 6)。全自动模块式血液体液分析仪 (希森美康 XN-1000)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A549 细胞在含有 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

1.2.2 人外周血小板分离 取正常健康人抗凝血按体积比 1:1 的比例加入样本稀释液混匀, 稀释后的血液样本加于分离液之液面上, 400 ~ 500 g, 离心 25 min。吸取第一层血小板血浆层至新的 15 ml 离心管, 加入 10 ml 清洗液混匀, 250 g 离心 10 min, 弃上清后以 0.5 ml 后续实验所需相应液体重量悬目的细胞。

1.2.3 血小板共培养体系 将 2×10^5 /孔的 A549 细胞铺入 6 孔板中, 孵育过夜, 即更换新鲜的无血清培养基。加入血小板, 培养 48 h。

1.2.4 细胞增殖实验 将细胞分为: 对照组 (单独培养的 A549 细胞)、实验组 (血小板共培养细胞 A549 + PLT)。接种 5×10^3 /孔至 96 孔培养板, 设置 5 个复孔, 3 次重复试验, 细胞贴壁后各孔加入血小板 (500×10^9 /L), 在细胞培养 24、48、72、96 h 后加入 CCK-8 试剂 (培养液: CCK-8 试剂 = 10: 1), 酶标仪

(450 nm 处) 检测各组 OD 值。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 ECM 胶与无双抗无血清培养液按 1:9 稀释混匀铺于培养小室上 (70 μl/孔), 放入 37 °C 培养箱 4 h 待胶凝固。调至细胞数为 6.0×10^5 个/ml, 每孔加入 0.1 ml 无血清细胞混悬液即 6.0×10^4 个/孔, 下室加入 500 μl 含有 10% FBS 的 DMEM 培养液。将细胞放入培养箱孵育 48 h 后, 用棉棒将上室的 ECM 胶和细胞擦掉, 弃去外室培养液, 用 PBS 洗去残留培养液, 随即用 0.1% 结晶紫染色 15 ~ 20 min。显微镜下随机选取 10 个高倍视野计数穿过膜的细胞数。实验重复 3 次。

1.2.6 基质金属蛋白酶 (MMP)-2 的 mRNA 和蛋白水平检测 按照 miRNeasy Kit 说明书提取总 RNA, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with DNA Eraser (Takara) 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 β-actin 为内参 (MMP-2 引物: 正向, 5'-CTC ATC GCA GAT GCC TGG AA-3'; 反向, 5'-TTC AGG TAA TAG GCA CCC TTG AAG A-3'。β-actin 引物: 正向, 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3'; 反向, 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'), 实时荧光定量 PCR 检测 MMP-2 mRNA 水平的表达。所有样本设置 3 复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 的相对表达量。收集细胞裂解后, 离心取上清并采用 BCA 试剂定量。蛋白上样后, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、抗体孵育、ECL 发光和成像等步骤后获得 Western blot 图像结果。以 GAPDH 为内参, 以 MMP-2 蛋白条带与 GAPDH 的比值计算蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析 实验数据采用 GraphPad Prism v5 进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用成组 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板对 A549 细胞增殖能力的影响 向对数期生长的 A549 细胞中加入 500×10^9 /L 的血小板, 构成血小板共培养体系。共培养 24、48、72、96 h 后检测细胞的增殖能力, 共培养 48、72、96 h 时, 共培养体系 (A549 + PLT) 的细胞增殖能力较 A549 细胞单独培养组明显增强, 差异有统计学意义 (P = 0.000, 0.007, 0.000)。见表 1、图 1。

2.2 血小板对肺腺癌 A549 细胞侵袭的影响 向对数期生长的 A549 细胞中加入 500×10^9 /L 的血小板, 构成血小板共培养体系。共培养 48 h 进行 Transwell 侵袭实验, 结果显示, 共培养体系 (A549 + PLT) 穿透 Transwell 小室基底膜和 ECM 胶的 A549 细胞数 (372.5 ± 10.3) 明显多于单独培养组 (148.6 ± 6.8),

差异有统计学意义 ($t = 31.421, P = 0.000$)。见图 2。

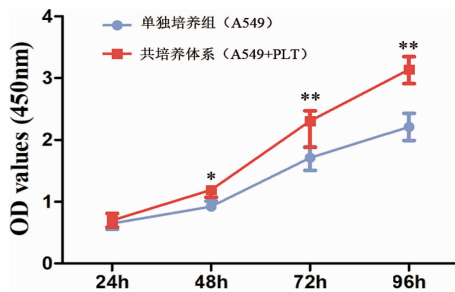
2.3 两组细胞中 MMP-2 的表达比较 向对数期生长的 A549 细胞中加入 $500 \times 10^9/L$ 的血小板, 构成血小板共培养体系。收集细胞后, 分别采用 qRT-PCR 以及 Western blot 检测细胞中 MMP-2 的表达水平。结果显示, 与单独培养的 A549 细胞相比, 在共培养体系 (A549 + PLT) 中, MMP-2 的 mRNA 和蛋白的相对表达量明显升高 ($P = 0.000, 0.007$)。见表 2、图 3。

表 1 两组细胞各时间点的细胞增殖能力 ($n = 5, OD$ 值, $\bar{x} \pm s$)

时间	单独培养组 (A549)	共培养体系 (A549 + PLT)	t 值	P 值
24 h	0.648 ± 0.031	0.690 ± 0.038	0.847	0.421
48 h	0.920 ± 0.025	1.168 ± 0.027	6.690	0.000
72 h	1.722 ± 0.067	2.220 ± 0.121	3.598	0.007
96 h	2.206 ± 0.077	3.114 ± 0.767	8.309	0.000

表 2 两组细胞中 MMP-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

项目	单独培养组 (A549)	共培养体系 (A549 + PLT)	t 值	P 值
mRNA 相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	1	2.213 ± 0.136	8.746	0.000
蛋白相对表达量 (MMP-2/GAPDH)	0.323 ± 0.063	0.673 ± 0.272	5.040	0.007



注: 与单独培养组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 血小板对肺腺癌细胞增殖的影响

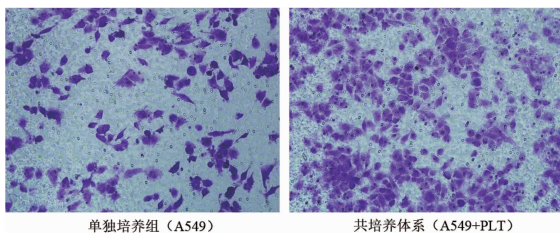
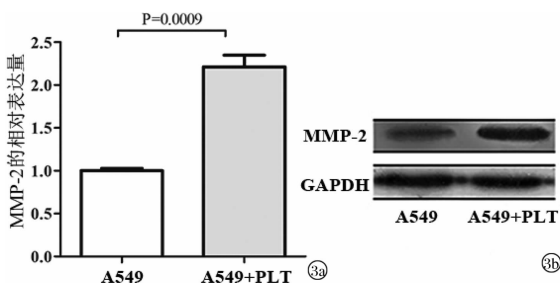


图 2 血小板对肺腺癌细胞侵袭能力的影响 (结晶紫染色, $\times 200$)



注: 3a: 两组 mRNA 表达比较; 3b: 两组蛋白表达电泳图。

图 3 两组细胞 MMP-2 的 mRNA 和蛋白表达水平

3 讨论

近年来, 肿瘤细胞与肿瘤微环境间的相互作用作为影响肿瘤恶性进展的一个重要因素备受关注。进入血液的肿瘤细胞能够激活血小板, 而活化的血小板对人体血管的生成有着极大的促进作用, 活化的血小板可以在肿瘤细胞和人体血管之间充当桥梁, 使得肿瘤细胞在黏附侵犯和远处转移方面变得更加的便利和游刃有余^[4,6]。Kim 等^[7]研究提示 NSCLC 患者有较高的可能性出现血小板增多症, 并随着疾病的进展, 血小板数量存在增高的趋势, 晚期血小板增多是预后不良的独立危险因素, 有着相对短的中位生存期和五年存活率。本研究经体外实验, 将肺腺癌细胞 A549 与健康人外周血分离的血小板共培养, 结果显示活化的血小板明显增强 A549 细胞的增殖和侵袭能力。未来应进一步进行相关的临床研究。

肿瘤细胞可以分泌一些生长因子和细胞因子激活细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 反过来, 微环境提供的信号又促进肿瘤细胞的侵袭和转移。ECM 是肿瘤转移的主要屏障, 对细胞的生长、黏附、修复起重要作用。恶性肿瘤侵袭和转移必须突破 ECM, 尤其是基底膜^[8]。MMPs 是由间质细胞或肿瘤细胞向外分泌产生的一类蛋白酶, 其主要功能是降解 ECM 中的 IV 型胶原, 促进细胞生长因子释放, 加强基底膜的分解, 诱导新生毛细血管形成, 并抑制肿瘤细胞的凋亡, 在肿瘤细胞突破基底膜发生浸润和转移中发挥作用^[9-10]。MMPs 是间质细胞的特有标志蛋白之一, 同时也可指示 EMT 过程的发生, EMT 过程发生在许多肿瘤的进展过程中, 可使肿瘤细胞自身的生物学性状发生改变, 进而增强其侵袭、转移的能力, 导致肿瘤的转移及复发, 影响患者的预后^[11-12]。有研究显示, MMP-2 在 IV 型胶原降解过程中发挥特异性作用, 将其作为肿瘤侵袭程度以及转移的评价指标有重要价值^[13]。有文献报道, 在乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤中, MMP-2 表达异常, 同时参与了病变部位肿瘤细胞的转移、浸润等, 其表达水平变化与临床上肿瘤的转移、复发等过程有关^[14-15]。本研究通过体外细胞实验, 将肺腺癌细胞 A549 与血小板共培养, 发现 MMP-2 在共培养体系中的 mRNA 和蛋白水平都明显增加。提示肺腺癌细胞与血小板共同作用可能诱导 MMP-2 的分泌从而促进肺腺癌的进展。

综上所述, 血小板在肿瘤发生发展中具有重要的作用, 因此, 在临床上检测血小板计数的变化, 对肺癌患者预后评估可能有一定的指导意义。对血小板促进肿瘤生长和发展的机制进一步探索有望为肿瘤治

疗提供新的途径。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
 - [2] Han RQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Trend analyses on the differences of lung cancer incidence between gender, area and average age in China during 1989-2008 [J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2013, 16(9):445-451.
 - [3] Field JK, Oudkerk M, Pedersen JH, et al. Prospects for population screening and diagnosis of lung cancer [J]. *Lancet*, 2013, 382(9893):732-741.
 - [4] Erpenbeck L, Schön MP. Deadly allies; the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells [J]. *Blood*, 2010, 115(17):3427-3436.
 - [5] Tomita M, Shimizu T, Hara M, et al. Prognostic impact of thrombocytosis in resectable non-small cell lung cancer [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2008, 7(4):613-615.
 - [6] Fuentes E, Palomo I, Rojas A. Cross-talk between platelet and tumor microenvironment; role of multiligand/RAGE axis in platelet activation [J]. *Blood Rev*, 2016, 30(3):213-221.
 - [7] Kim KH, Park TY, Lee JY, et al. Prognostic significance of initial platelet counts and fibrinogen level in advanced non-small cell lung cancer [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(4):507-511.
 - [8] Romero-López M, Trinh AL, Sobrino A, et al. Recapitulating the human tumor microenvironment; colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth [J]. *Biomaterials*, 2017, 116:118-129.
 - [9] Zhang Q, Deng S, Sun K, et al. MMP-2 and Notch signal pathway regulate migration of adipose-derived stem cells and chondrocytes in co-culture systems [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50:e12385.
 - [10] Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets; Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis [J]. *Matrix Biol*, 2015(44/46):200-206.
 - [11] Ji H, Liu N, Yin Y, et al. Oxytocin inhibits ovarian cancer metastasis by repressing the expression of MMP-2 and VEGF [J]. *J Cancer*, 2018, 9(8):1379-1384.
 - [12] Shi Y, Su C, Hu H, et al. Serum MMP-2 as a potential predictive marker for papillary thyroid carcinoma [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6):e0198896.
 - [13] Aroner SA, Rosner BA, Tamimi RM, et al. Plasma matrix metalloproteinase 2 levels and breast cancer risk [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(3):321-327.
 - [14] 裴惠临. 胃癌组织 Twist 与 MMP-2 的表达及临床病理意义 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2017, 38(1):31-35.
 - [15] Radenkovic S, Konjevic G, Jurisic V, et al. Values of MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue of basal-like breast cancer patients [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(1):143-152.
- 收稿日期:2018-11-05 修回日期:2018-12-16 编辑:周永彬
-
- (上接第 910 页)
- [4] 崔海鹏, 董建一, 李慧玲, 等. Ras/MAPK/ERK 通过协同 NF-κB 促进肝癌细胞中 cyclinD1 的表达 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(6):1-6, 10.
 - [5] 徐峥, 陈武柱, 孙靖, 等. 低氧抑制乳腺癌细胞中信号素 3A 表达并调控成骨前体细胞分化 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(12):1298-1306.
 - [6] 秦承东, 任正刚, 汤钊猷. 缺氧微环境在肿瘤进展中的作用 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(1):96-102.
 - [7] 刘晓玲, 包韩乌云, 赵华路, 等. 在 CoCl₂ 模拟低氧条件下 HIF-1α 直接调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ2 (PPARγ2) 的表达 [J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(5):585-589.
 - [8] 张慧, 刘理礼, 王亚芳, 等. 缺氧在诱导胃癌细胞上皮间质转化及侵袭中的作用 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(4):679-681.
 - [9] 杨琳红, 张爱华, 范宗宪, 等. HIF-1α 基因干扰对低氧环境下人鼻黏膜上皮细胞 TGF-β1、VEGF、bFGF 表达的影响及其机制 [J]. *山东医药*, 2017, 57(44):42-45.
 - [10] 景绍武, 王雅棣, 郑明民, 等. HIF-1α 对食管癌 Eca109 细胞体内内外侵袭转移的影响及其分子机制 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(1):67-71.
 - [11] 朱爱林. COPD 微环境对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [D]. 西安:第四军医大学, 2015.
 - [12] 唐金明, 王文祥. 缺氧对肺癌细胞 BMPR-1A 的表达及其运动侵袭能力的影响 [J]. *浙江临床医学*, 2016, 18(10):1784-1786.
 - [13] Zhao K, Wei LB, Hui H, et al. Wogonin suppresses melanoma cell B16-F10 invasion and migration by inhibiting Ras-mediated pathways [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106458.
 - [14] Afshordel S, Kern B, Clasohm J, et al. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation-impact of Ras-/Rho-prenylation [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 91:69-77.
 - [15] Xian JR, Shao HY, Chen XC, et al. Nucleophosmin mutants promote adhesion, migration and invasion of human leukemia THP-1 cells through MMPs up-regulation via Ras/ERK MAPK signaling [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(2):144-155.
 - [16] 李文军, 康红兵, 杨立, 等. 延龄草皂苷通过 NF-κB/MAPK 信号通路调控 MMPs 表达并抑制骨肉瘤 Saos-2 细胞的迁移和侵袭 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(9):968-976.
 - [17] 郑小丹. TNF-α 通过激活 NF-κB 和 MAPK 途径上调表达 Snai2 诱导 MCF-7 细胞发生 EMT 和侵袭迁移 [D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
 - [18] 符智慧, 徐凌, 黄姣, 等. LPS 通过 p38/MAPK 通路和 NF-κB 的活化诱导 RAW264.7 细胞 HIF-1α 的表达 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(10):1033-1039.
- 收稿日期:2018-11-14 修回日期:2018-12-10 编辑:王海琴