

LPS 对肝癌细胞株 HepG2 增殖、凋亡及分泌炎症因子的影响

刘亚婷¹ 李 涛¹ 徐恩君¹ 周 敏² 徐元宏¹ 沈继龙³

摘要 目的 体外观察不同浓度细菌内毒素脂多糖(LPS)对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡以及分泌炎症因子的影响,并探讨可能的机制。方法 按照随机数字法将细胞分为对照组及 1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组。用 MTT 检测刺激 24、48、72 和 96 h 后细胞的增殖能力;用流式细胞术检测刺激 24 h 后细胞的凋亡情况;用 RT-PCR 法检测刺激 24 h 后白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8) mRNA 的表达含量;用化学发光法检测刺激 24 h 后 IL-6 和 IL-8 的表达量,最后用 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析。结果 与对照组比较,各处理组刺激 24 h 和 48 h 后细胞增殖活性明显升高($P < 0.05$),而在 72、96 h 差异无统计学意义($P > 0.05$);刺激 24 h 后,1、10、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组以及对对照组之间的细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);刺激 24 h 后,与对照组比较,随着刺激浓度的升高,IL-6 和 IL-8 的表达量明显升高($P < 0.05$)。结论 LPS 可以在 48 h 内促进 HepG2 的增殖,对 HepG2 细胞的凋亡没有影响,并且 LPS 作用可以上调 IL-6 和 IL-8 水平。

关键词 脂多糖; HepG2 细胞; 增殖; 凋亡; 炎症因子

中图分类号 R 73-3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0604-04

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,在中国城乡居民的发病率和死亡率都很高^[1]。细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可以诱导免疫细胞和炎症相关细胞表达分泌大量的细胞因子和炎症介质,参与脓毒症的发生发展。临床研究^[2]表明,肝炎患者的血清 LPS 浓度明显高于正常人,说明 LPS 对肝脏疾病的发生、发展产生重要的影响。该研究探讨不同浓度 LPS 体外刺激肝癌 HepG2 细胞后,对细胞的增殖、凋亡以及分泌炎症因子的影响。

2015-03-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30801088、81201488);卫生部应用研究项目“高通量 ELISA 检测系统化、标准化系列研究”(编号:28-1-50)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹检验科,²ICU,³安徽人兽共患病重点实验室,合肥 230032

作者简介:刘亚婷,女,硕士研究生;

李 涛,男,副教授,副主任技师,硕士生导师,责任作者,
E-mail: limedical1974@126.com

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2 细胞株来自安徽医科大学第一附属医院科研中心细胞库;DMEM 高糖培养基购自美国 Thermo 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;MTT 试剂购自美国 Sigma 公司;凋亡试剂盒购自上海贝博公司;脂质体 Lipofectamine2000、总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;引物由上海生工技术有限公司设计合成;逆转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司;2 000 bp DNA Ladder Marker 购自日本 TaKaRa 公司;白介素-6(interleukin-6, IL-6)和白介素-8(interleukin-8, IL-8)试剂盒购自德国西门子公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞培养 应用 DMEM 高糖培养基(添加 10% 的胎牛血清,1% 的青霉素和链霉素)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养,细胞贴壁率达 80%~90% 时用胰酶消化,细胞活率在 90% 以上进行传代。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖能力 在实验前 1 d,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液制成单细胞悬液接种于 96 孔培养板中,按照随机数字表法将其分为对照组以及 1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组,使每孔细胞数为 5×10^3 个,每组 5 个复孔。待细胞完全贴壁后,在各组细胞中分别添加 0、1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 继续培养。刺激 24、48、72、96 h,各孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl ,培养 4 h 后,吸弃孔内培养液,加入 DMSO 150 μl ,震荡 10 min。使结晶充分溶解,用酶联免疫标记分析仪测定 490 nm 波长的光密度(optical density, OD) 值。测各孔的吸光度值,取各组值的均数表示细胞的增殖情况。以时间为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 在实验前 1 d,将细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,分组培养同 1.2.2 (每组 3 个复孔)。将各组细胞培养 24 h,胰酶消化后 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说

说明书步骤操作,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 RT-PCR 检测 IL-6、IL-8 mRNA 表达 在实验前 1 d 将细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,分组培养同 1.2.2 (每组 3 个复孔)。将各组细胞培养 24 h,收集各组细胞上清液,TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,cDNA 合成按照逆转录试剂盒说明书进行。PCR 扩增:从基因库中查出 IL-6、IL-8 的全基因序列,采用 Prime Premier 5 软件进行引物设计,IL-6 上游引物:5'-GTCCAGTTGCCTTCTCCC-3',下游引物:5'-GCCTCTTTGCTGCTTTCA-3',产物为 223 bp,退火温度 56 °C;IL-8 上游引物:5'-CTTT-GTCCATTCCCCTTCTGA-3',下游引物:5'-TC-CCTAACGGTTGCCTTTCTAT-3',产物为 267 bp,退火温度为 56 °C;采用 β -actin 作为内参照,反应条件为 95 °C 预变性 3 min 后 95 °C 变性 30 s 56.4 °C 退火 30 s 72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。TLR4 的反应条件为 95 °C 预变性 3 min 后 95 °C 变性 30 s 52.9 °C 退火 30 s 72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。产物置于 2% 的琼脂糖凝胶电泳(100 V 25 min)采用凝胶成像分析系统对条带进行扫描分析。

1.2.5 化学发光法 -80 °C 冰箱取出已收集的各组上清液,室温溶解。按照西门子公司 IL-6 与 IL-8 检测试剂盒说明书步骤操作,利用 IMMULITE 1000 化学发光免疫分析仪检测各组上清液中 IL-6 与 IL-8 的含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,定量资料多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验,定性资料比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 LPS 处理 HepG2 细胞后在不同时间点对其增殖的影响 刺激 24、48 h 后,1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组细胞增殖活性均高于对照组 ($F = 78.7、121.4$, $P < 0.05$) 且随着浓度的上升,增殖活性也不断的升高;随着时间的延长,刺激 72、96 h 后,各组细胞增殖活性没有明显的差异 ($P > 0.05$) ,见图 1。

2.2 不同浓度 LPS 处理后对 HepG2 细胞凋亡能力的影响 刺激 24 h 后,1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组以及对照组的细胞凋亡率分别为 ($2.53 \pm$

0.24) %、(2.72 ± 0.32) %、(2.64 ± 0.25) %、(2.89 ± 0.42) %、(2.41 ± 0.31) %。组间比较差异无统计学意义 ($F = 3.154$, $P > 0.05$)。即不同浓度 LPS 处理 HepG2 对其凋亡能力没有影响,见图 2。

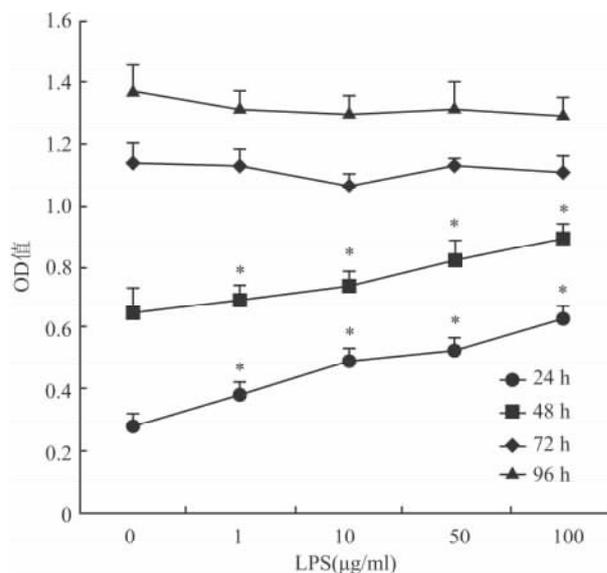


图1 MTT法检测不同浓度LPS处理后在不同时间点HepG2细胞的增殖能力
与对照组(LPS 0 $\mu\text{g/ml}$)比较: * $P < 0.05$

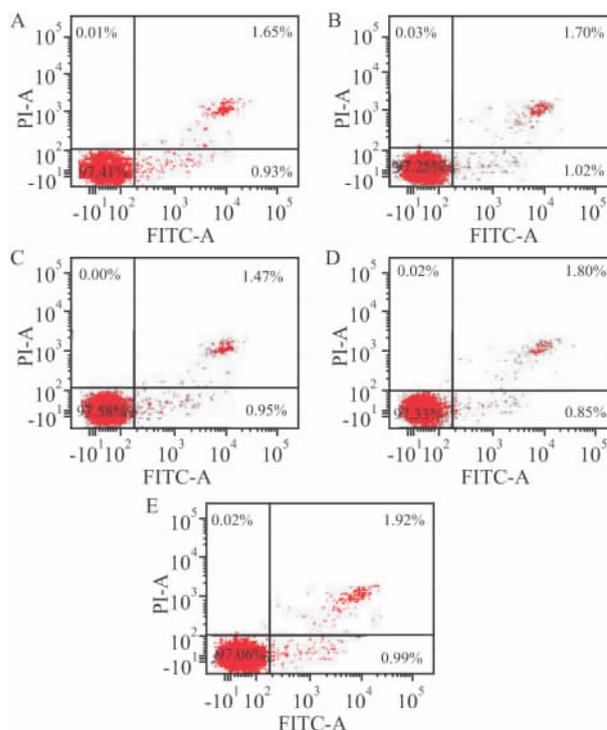


图2 流式细胞仪检测刺激24h各LPS处理组及对照组HepG2细胞的凋亡情况

A: 对照组; B~E: 分别为 1、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ LPS 处理组; 图中左下象限为活细胞; 右下象限为早期凋亡细胞; 右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞; 左上象限为死亡细胞

2.3 不同浓度 LPS 处理 HepG2 细胞后 IL-6、IL-8 mRNA 表达 刺激 24 h 后,以目的基因的灰度值/内参的灰度值来表示目的基因的相对表达含量,进行统计学分析后发现,与对照组比较,随着刺激浓度的升高,IL-6、IL-8 mRNA 的相对表达含量有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

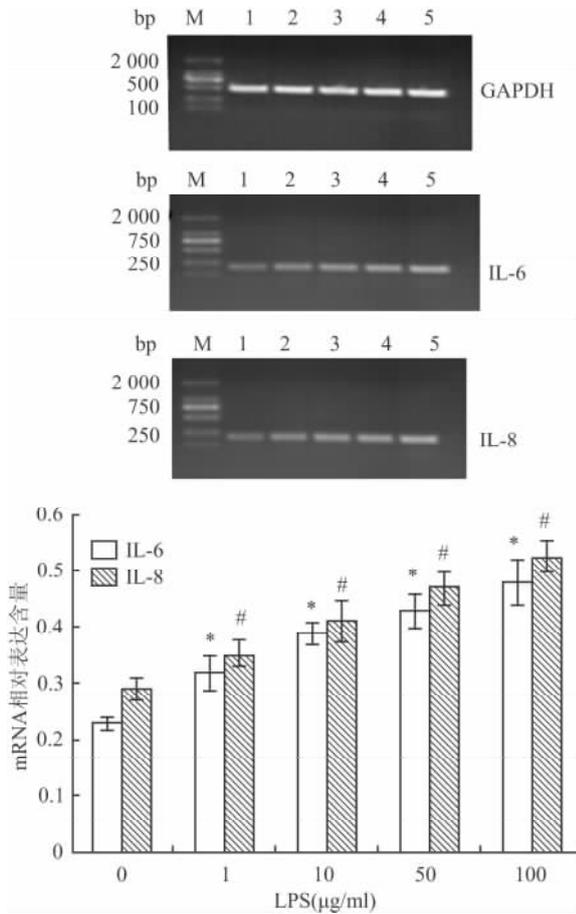


图3 RT-PCR 检测刺激 24 h 后各组 IL-6、IL-8 mRNA 表达的情况
M: Marker; 1: 对照组; 2~5: 分别为 1、10、50、100 µg/ml LPS 处理组; 与对照组 IL-6 比较: * $P < 0.05$; 与对照组 IL-8 比较: # $P < 0.05$

2.4 不同浓度 LPS 对 HepG2 释放细胞因子 IL-6 和 IL-8 的影响 不同浓度 LPS 在刺激 HepG2 细胞 24 h 后,细胞释放的 IL-6 和 IL-8 的量与对照组相比显著升高($P < 0.05$),并且随着浓度的增大,IL-6 和 IL-8 的量也逐渐升高,见表 1。

表 1 化学发光法检测不同浓度 LPS 刺激 HepG2 后 IL-6 和 IL-8 的表达量 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

细胞因子	LPS 的浓度(µg/ml)					F 值	P 值
	0	1	10	50	100		
IL-6	11.3 ± 2.7	21.4 ± 2.9	30.2 ± 1.8	40.7 ± 3.2	48.5 ± 2.1	419.44	0.00
IL-8	14.2 ± 1.3	29.3 ± 3.4	41.5 ± 1.9	47.8 ± 2.9	54.2 ± 1.6	357.71	0.00

3 讨论

慢性炎症在不同器官如肺、结肠和肝脏肿瘤的发生过程中起着至关重要的作用^[3]。在慢性乙型肝炎患者中 LPS 往往有较高表达。LPS 是革兰阴性细菌细胞壁的主要组成成分,对 LPS 的识别与信号转导是机体自身防御反应的一个重要环节,也是导致内毒素性休克、全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭等疾病的重要机制。研究^[4]已经证实 LPS 主要是通过 TLR4 信号转导途径激活胞内信号分子,影响其生物学特性。由于 TLR4 在 HepG2 细胞上也有表达,所以本研究可以直接用 LPS 处理来观察其对 HepG2 细胞的一些作用。

已有报道^[5]指出,LPS 可以诱导肿瘤细胞 TLR4 信号系统的激活,促进肝癌细胞的细胞生存和增殖。本研究用 MTT 法检测不同时间及浓度下 LPS 刺激后细胞的增殖能力,结果显示,在培养 24 h 和 48 h 后,随着 LPS 浓度的增高,细胞的增殖能力也不断提高,且呈剂量依赖性。而随着细胞培养时间继续延长,细胞增殖能力没有太大的影响,而在培养 96 h 时,LPS 的刺激反而对 HepG2 细胞的增殖有一定抑制作用。可能的原因是在不同的时间节点和不同的 LPS 刺激浓度下,LPS 激活的主要信号途径可能并不相同,诱导的相关因子表达也不一样,以至于对细胞增殖的效应出现变化。对此,本研究又分别通过 RT-PCR 及化学发光法检测了两种重要炎症因子 IL-6、IL-8 的表达情况,发现不同浓度 LPS 在刺激 HepG2 细胞 24 h 后,细胞释放的 IL-6 和 IL-8 的量与对照组相比显著升高,并且随着浓度的增大,IL-6 和 IL-8 的量也逐渐升高。由于 IL-6 和 IL-8 不仅可以作为重要炎症因子调节机体的免疫反应,还能够提高多种细胞的增殖能力。可能是 IL-6 和 IL-8 在 LPS 对肝癌细胞的增殖调节过程中扮演了一定的角色。LPS 还能够刺激巨噬细胞等炎性细胞分泌一些因子,激活先天免疫反应,同时它还能够诱导神经细胞、皮细胞等多种细胞发生凋亡。本研究用流式细胞术检测了各 LPS 处理组及对照组 24 h HepG2 细

胞的凋亡情况,显示不同浓度 LPS 处理 HepG2 对其凋亡能力没有影响,这与金生等^[6]的研究一致。可能是由于各组 LPS 的浓度还未达到能够使 HepG2 细胞凋亡的程度,也可能是由于不同浓度的 LPS 激活了不同的增殖、凋亡信号途径,最终使得各个处理组及对照组的凋亡率没有明显差异。

LPS 可以通过刺激炎症细胞来调节肿瘤微环境中细胞因子水平,诱导肿瘤细胞增殖,促进血管生成、肿瘤入侵及转移^[7]。本研究以 LPS 刺激对人肝癌细胞株 HepG2 增殖、凋亡及释放细胞因子的影响展开研究,为明确 LPS 在肝癌中发挥的作用及发挥作用的可能机制提供了实验和理论依据。

参考文献

[1] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(3): 106-12.

- [2] 程晓宇,张伦理. CD14 和 Toll 样受体 4 的表达在内毒素致肝炎重型化中的意义 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(6): 428-32.
- [3] Grivennikov S I, Greten F R, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-99.
- [4] Sender V, Stämme C. Lung cell-specific modulation of LPS-induced TLR4 receptor and adaptor localization [J]. *Commun Integr Biol* 2014, 7: e29053.
- [5] 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): 2223-36.
- [6] 金生,张大志,陈压西,等. 乙型肝炎病毒转染及脂多糖刺激对 HepG2 细胞 Toll 样受体 2 和 4 表达的影响 [J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(4): 230-4.
- [7] Pollard J W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis [J]. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(1): 71-8.

Effects of LPS on proliferation, apoptosis and secretion of cytokines of hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Liu Yating, Li Tao, Xu Enjun, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effects of different concentrations of LPS on proliferation, apoptosis and secretion of cytokines of liver cancer cell line HepG2 *in vitro*, and to explore their possible mechanism. **Methods** The cells were divided into control group and 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS treatment groups according to the method of random number. The proliferation of HepG2 cells at post treatment hour (PTH) 24, 48, 72 and 96 (denoted as absorption value) was detected by MTT and the apoptosis of HepG2 cells at PTH 24 was detected by flow cytometer. The level of IL-6 and IL-8 mRNA was detected by RT-PCR at PTH 24 and the concentration of IL-6 and IL-8 was detected at PTH 24 by chemiluminescence immunoassay. The data were analyzed with SPSS19.0. **Results** Compared with the control group, proliferation of HepG2 cells was significantly increased ($P < 0.05$) in the treatment groups at PTH 24 and 48, but there was no statistically significant difference in proliferation of HepG2 cells at PTH 72 and 96 ($P > 0.05$). There was no statistically significant difference in apoptosis rate of HepG2 cells at PTH 24 between the groups. Compared with the control group, the expression of IL-6 and IL-8 was significantly increased with the increase in concentration of LPS at PTH 24. **Conclusion** LPS can promote the proliferation of HepG2 cells in 48 hours and has no effect on apoptosis of HepG2 cells. LPS can also up-regulate the expression of IL-6 and IL-8 in HepG2 cells.

Key words lipopolysaccharide; HepG2 cells; proliferation; apoptosis; inflammatory cytokines