

研究论文

乳腺癌微环境中脂肪细胞可通过瘦素促进乳腺癌 MDA-MB-231细胞的增殖与迁移

王 婷 王晋蜀 张志慧 姜亚运 夏 菁 苟理尧 刘梦瑶 张 彦*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为研究乳腺癌微环境中前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖和迁移能力的影响, 该研究将前脂肪细胞3T3-L1诱导为成熟脂肪细胞, 再将前脂肪细胞和成熟脂肪细胞分别与乳腺癌MDA-MB-231细胞共培养, 通过显微镜成像、油红O染色实验、MTT实验、Transwell实验分别观察肿瘤细胞形态、增殖及迁移能力的改变。Western blot和ELISA检测前脂肪细胞和成熟脂肪细胞瘦素(leptin)的表达水平。细胞免疫荧光法和Western blot分别检测肿瘤细胞中瘦素受体(leptin receptor, Ob-R)、瘦素信号通路关键分子及下游靶因子的表达水平变化。结果显示, 共培养后, 肿瘤细胞形态变得更加纤长, 增殖能力增加($P<0.05$), 穿过小室的细胞数明显增多($P<0.05$)。在成熟脂肪细胞共培养组的肿瘤细胞中还出现了明显的脂质累积。Western blot和ELISA检测发现, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均有瘦素的表达。与空白对照组相比, 两个共培养组中肿瘤细胞的p-Akt、p-STAT3、cyclin D1和MMP9蛋白质水平均明显上调($P<0.05$), 而p-ERK1/2仅在前脂肪细胞共培养组中上调($P<0.001$), 在成熟脂肪细胞共培养组中没有明显变化。和共培养组相比, 瘦素中和抗体处理后可以抑制肿瘤细胞中瘦素下游信号通路的激活。该研究表明, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖和迁移, 且这一促进作用和瘦素信号通路有关。

关键词 瘦素; 脂肪细胞; 乳腺癌; 细胞增殖; 细胞迁移

Adipocytes in Breast Cancer Microenvironment Can Promote the Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells MDA-MB-231 by Leptin

Wang Ting, Wang Jinshu, Zhang Zhihui, Jiang Yayun, Xia Jing, Gou Liyao, Liu Mengyao, Zhang Yan*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effect of pre-adipocytes and adipocytes on the proliferation and migration of breast cancer cells MDA-MB-231, we set up a transwell system. Pre-adipocytes or adipocytes were co-cultured with MDA-MB-231 cells in this system. As for MDA-MB-231 cells in different groups, morphological changes were observed by microscope, lipids accumulation were stained by Oil red O, the ability of proliferation was detected by MTT assay, and the ability of migration was estimated by Transwell assay. Western blot and ELISA assay were used to detect the expression of leptin in pre-adipocytes and adipocytes. Immunofluorescence staining was used to

收稿日期: 2015-12-09 接受日期: 2016-01-27

国家自然科学基金(批准号: 81172017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: zy2753@hotmail.com

Received: December 9, 2015 Accepted: January 27, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172017)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: zy2753@hotmail.com

网络出版时间: 2016-03-10 15:41:32 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160310.1541.002.html>

identified the expression of leptin receptor (Ob-R) in MDA-MB-231 cells. The key molecules of leptin signaling pathway in MDA-MB-231 cells were detected by Western blot. The expression levels of key molecules in leptin signaling pathway after using leptin neutralization were detected by Western blot. The results showed that compared with control group, MDA-MB-231 cells in the two co-culture groups became more spindly, the proliferation and migration ability of them were significantly enhanced ($P < 0.05$). And lipids accumulation in MDA-MB-231 cells in adipocytes group can be observed. The levels of leptin could be detected in pre-adipocytes and adipocytes and their medium. Compared with control group, the expression of p-Akt, p-STAT3, cyclin D1 and MMP9 in MDA-MB-231 cells increased in the two co-culture groups ($P < 0.05$). But the expression of p-ERK in MDA-MB-231 cells only increased in pre-adipocytes group ($P < 0.001$). Compared with co-culture groups, the expression of key molecules in leptin signaling decreased after treatment with leptin neutralization. Our results suggested that either pre-adipocytes or adipocytes could promote the proliferation and migration of breast cancer cells MDA-MB-231, and leptin signaling pathway might be involved in this process.

Keywords leptin; adipocytes; breast cancer; cell proliferation; cell migration

近年来的研究发现, 肿瘤微环境在乳腺肿瘤的发生、发展过程中起到了重要作用^[1-2]。乳腺癌细胞和微环境中的基质细胞相互作用可能会促进乳腺癌的发展和转移^[3]。乳房富含大量的脂肪组织, 脂肪细胞占到总体积的一半以上, 除此之外, 还有大量的前脂肪细胞和少量血管内皮细胞等基质细胞, 这些细胞可以分泌大量的细胞因子, 影响乳腺癌细胞的生长和转移^[4]。近年来, 乳腺癌细胞和脂肪组织的相互作用是一个研究热点, 然而, 对于前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对乳腺癌细胞的影响机制却尚不明确。

3T3-L1前脂肪细胞来源于3T3成纤维细胞系, 其本身并不具有脂肪细胞的特征, 但可诱导分化为成熟脂肪细胞。近年来, 3T3-L1广泛应用于脂肪细胞的分化研究。Yasushi等^[5]发现, 3T3-L1分化后的成熟脂肪细胞可以促进ER阳性乳腺癌MCF-7细胞的增殖, 未分化的3T3-L1细胞却能抑制其增殖; 而Enrique等^[6]则发现, 3T3-L1前脂肪细胞和分化后的成熟脂肪细胞均能促进ER阳性乳腺癌细胞的增殖。然而, 3T3-L1前脂肪细胞和分化后的成熟脂肪细胞对三阴性乳腺癌细胞的影响究竟如何、有何异同, 目前报道较少。本研究在体外条件下将前脂肪细胞和成熟脂肪细胞分别与乳腺癌MDA-MB-231细胞进行共培养, 观察二者对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移能力的影响, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231和小鼠前脂肪

细胞3T3-L1由本室保存。DMEM高糖培养基购自美国HyClone公司; 新生小牛血清(newborn calf serum, NBCS)购自美国Gibco公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; 油红O染料购自生工生物工程(上海)股份有限公司(进口分装); 瘦素(leptin)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国Cloud-Clone公司; 兔瘦素多克隆抗体、兔基质金属蛋白酶9(matrix metalloprotein 9, MMP9)单克隆抗体购自美国Abcam公司; 兔瘦素受体(leptin receptor, Ob-R)多克隆抗体、鼠 β -actin单克隆抗体、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 兔细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、Akt、STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)和磷酸化ERK1/2(phosphorylated ERK1/2, p-ERK1/2)、p-Akt(phosphorylated Akt)、p-STAT3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3)单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG(二抗)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔IgG和蛋白质印迹及蛋白质提取相关试剂均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌MDA-MB-231细胞用含有10% FBS的DMEM高糖完全培养基, 前脂肪细胞3T3-L1用含10% NBCS的DMEM高糖完全培养基于

37 °C、5% CO₂的温育箱中培养。两种细胞均为贴壁生长的细胞。

1.2.2 前脂肪细胞3T3-L1诱导分化为成熟脂肪细胞 用含10% NBCS的DMEM完全培养基培养细胞至接触抑制,待细胞接触抑制48 h后开始诱导分化:在含10% FBS的DMEM完全培养基中加入0.5 mmol/L IBMX、1 μmol/mL地塞米松及1 μg/mL胰岛素,培养2 d,继而更换为2 μg/mL胰岛素的培养基,再培养2 d。然后用含10% FBS的DMEM完全培养基继续培养,隔天换液,培养至第8 d。大约40%的细胞在诱导第5 d时分化成熟;大约80%的细胞在诱导第8 d时分化成熟。

1.2.3 共培养及实验分组 取对数期MDA-MB-231细胞(1.5×10^5 /孔)铺于6孔板中,前脂肪细胞(2×10^4 /孔)和成熟脂肪细胞(2×10^4 /孔)铺于Transwell小室中,单独培养。待MDA-MB-231细胞汇合度达到60%时,将小室置于6孔板上,并将共培养体系培养基更换为1% FBS的DMEM高糖培养基,开始进行共培养。共培养上下室能相互通透,但细胞不会穿透Transwell小室的膜(膜孔径为0.4 μm)。实验分组如下:空白对照组(单独MDA-MB-231细胞,即control组);前脂肪细胞共培养组(MDA-MB-231+3T3-L1前脂肪细胞,即Pre-adipocytes组);成熟脂肪细胞共培养组(MDA-MB-231+成熟脂肪细胞,即Adipocytes组)。

1.2.4 油红O染色 共培养3 d后,取出小室,将6孔板中MDA-MB-231细胞进行油红O染色:弃去培养基,PBS清洗2遍,用4%多聚甲醛固定30 min,再用PBS清洗2遍,加入1.5 mL/孔油红O染液染色30 min,弃去染液,PBS清洗2遍,在显微镜下观察成像。

1.2.5 MTT法检测细胞的增殖能力 实验分组如1.2.3,每组设5个平行孔。用无血清的DMEM培养基将MDA-MB-231细胞密度调整为 4×10^4 /mL,取500 μL细胞悬液置于24孔板中,分别与前脂肪细胞和成熟脂肪细胞共培养1~4 d后,检测共培养体系中MDA-MB-231细胞的增殖情况。将小室取出,在铺有MDA-MB-231细胞的24孔板中避光加入MTT(5 mg/mL),40 μL/孔,继续培养4 h后终止培养;弃去孔内的培养基,每孔加入600 μL二甲亚砜,摇床上振荡混匀15 min,使甲瓚结晶充分溶解;分别吸取150 μL/孔溶解物至96孔板,用酶标仪检测波长492 nm处各孔的吸光度(D)值,以D值来表示细胞的增殖活力。

1.2.6 Transwell小室法检测MDA-MB-231细胞的迁移

能力 共培养2 d后收集各组培养基,MDA-MB-231细胞经胰蛋白酶消化、离心后,分别用各组收集培养基重悬(实验分组见1.2.3),调整密度为 1.25×10^5 /mL,取400 μL加入上室;下室加入700 μL含20%胎牛血清的各组培养液,继续培养24 h。取出Transwell小室,用4%多聚甲醛固定后,再用结晶紫染色,统计穿膜细胞数,以此来反映MDA-MB-231迁移能力的改变。

1.2.7 细胞免疫荧光法检测MDA-MB-231细胞中Ob-R的表达水平 取MDA-MB-231细胞,在24孔板内制备细胞爬片,待细胞融合度达80%时吸弃孔内培养基,加入1 mL预冷的PBS,漂洗3次,然后加入500 μL/孔4%多聚甲醛,室温下固定30 min;吸弃多聚甲醛,PBS漂洗2次,用与二抗同宿主的山羊血清于37 °C封闭1 h;加入Ob-R一抗(稀释比例为1:100),于4 °C过夜;预冷的PBS漂洗2次,避光加入FITC标记的山羊抗兔IgG(稀释比例为1:100),37 °C反应1 h;然后加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI),室温下避光反应15 min,对细胞核进行染色;避光PBS漂洗2次后封片,荧光显微镜下观察Ob-R的表达情况。

1.2.8 ELISA检测前脂肪细胞和成熟脂肪细胞培养基中瘦素的蛋白水平 收集共培养3 d后前脂肪细胞组和成熟脂肪细胞组的培养基,混匀,1 000 ×g离心20 min,取上清检测瘦素的表达水平(操作方法按照试剂盒说明书进行)。

1.2.9 Western blot检测瘦素信号通路关键分子及下游靶因子的蛋白质表达水平 收集共培养3 d后6孔板中的MDA-MB-231细胞、3T3-L1前脂肪细胞和成熟脂肪细胞,提取细胞总蛋白,上样,行10% SDS-PAGE分离蛋白,将分离后的蛋白转移至PVDF膜上;用含5%小牛血清的封闭液封闭2 h后,4 °C条件下分别加入一抗过夜(瘦素抗体1:250稀释,β-actin、Akt、ERK1/2、STAT3、p-Akt、p-ERK1/2、p-STAT3抗体1:1 000稀释);TBST洗膜后,分别加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5 000稀释)或HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5 000稀释),37 °C反应1 h;洗膜后,用HRP化学发光液显色。用Quantity One 4.6.2软件分析条带灰度值,蛋白质相对表达水平=目的蛋白质灰度值/内参照蛋白质灰度值。

1.2.10 Western blot检测瘦素中和抗体处理后下游信号通路的变化 在共培养体系中加入瘦素中和抗体(1 μg/mL),每24 h补加1次,连续作用3 d,共培养

结束后提取各组乳腺癌细胞蛋白质, Western blot法检测瘦素下游信号通路变化。

1.3 统计学方法

实验结果的统计分析均用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5进行。所有实验均独立重复3次, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用Tukey检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 前脂肪细胞3T3-L1诱导分化为成熟脂肪细胞

3T3-L1前脂肪细胞呈梭形或不规则三角形, 贴壁生长, 胞内无脂滴(图1A)。诱导分化后, 细胞逐渐变圆, 胞内开始出现小脂滴, 随着诱导时间的延长, 小脂滴逐渐融合成大脂滴, 具备典型成熟脂肪细胞的特征, 表明3T3-L1前脂肪细胞已经诱导分化为成熟脂肪细胞(图1B)。分化后, 3T3-L1细胞中的脂滴能被油红O染料染成红色, 进一步证明成熟脂肪细胞诱导成功(图1C)。

2.2 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对MDA-MB-231细胞形态的影响

将乳腺癌MDA-MB-231细胞分别与前脂肪细

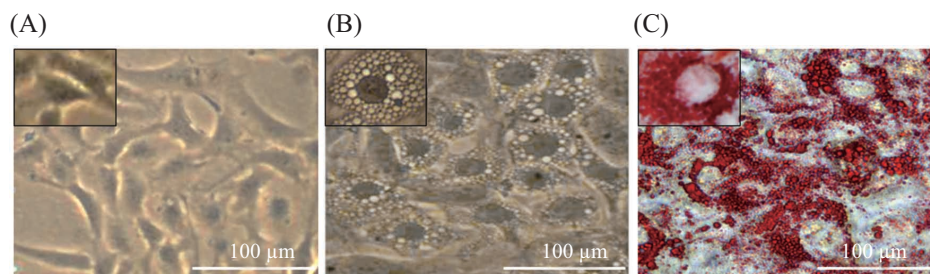
胞和成熟脂肪细胞共培养3 d以后, 在倒置显微镜下观察细胞形态: 空白对照组MDA-MB-231细胞呈菱形、三角形, 而与前脂肪细胞和成熟脂肪细胞共培养后, 细胞变得更加纤长(图2)。用油红O对各组细胞进行染色, 结果发现, 空白对照组MDA-MB-231细胞内仅存在极少量的脂质, 与前脂肪细胞共培养后, 细胞内脂质略有增多; 而与成熟脂肪细胞共培养后, MDA-MB-231细胞内出现明显的脂质累积(图3)。

2.3 MTT法检测细胞增殖能力

MTT法检测结果(图4)显示, 在共培养1 d后, 成熟脂肪细胞即可明显促进MDA-MB-231细胞的增殖($P<0.05$), 而前脂肪细胞共培养组和空白对照组差异无统计学意义; 从共培养2 d后开始, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进MDA-MB-231细胞的增殖($P<0.05$), 并且成熟脂肪细胞的促进作用比前脂肪细胞更加明显($P<0.05$)。

2.4 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对MDA-MB-231细胞迁移的影响

用Transwell小室迁移实验来检测细胞的迁移能力。结果显示, 空白对照组乳腺癌MDA-MB-231细胞穿膜细胞数为(123±14)个, 前脂肪细胞共培养

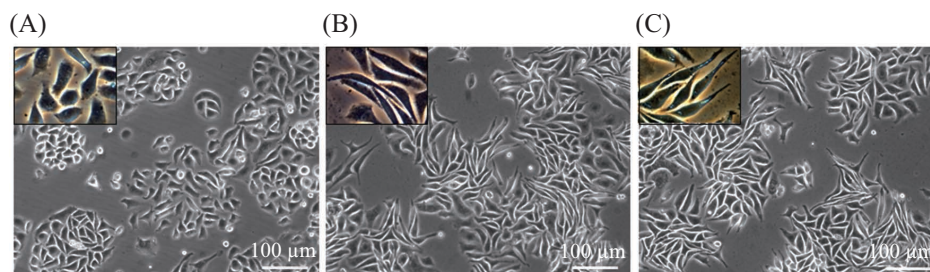


A: 前脂肪细胞; B: 分化的3T3-L1细胞; C: 分化的3T3-L1细胞油红O染色。A、B、C图左上角小图为大图放大后细胞内结构。

A: the pre-adipocyte; B: the differentiated 3T3-L1; C: the differentiated 3T3-L1 stained by Oil red O. The smaller pictures in the top left corner of A, B and C were used to observe intracellular structure of cells.

图1 3T3-L1前脂肪细胞的诱导分化及鉴定

Fig.1 3T3-L1 cells before and after differentiation into adipocytes

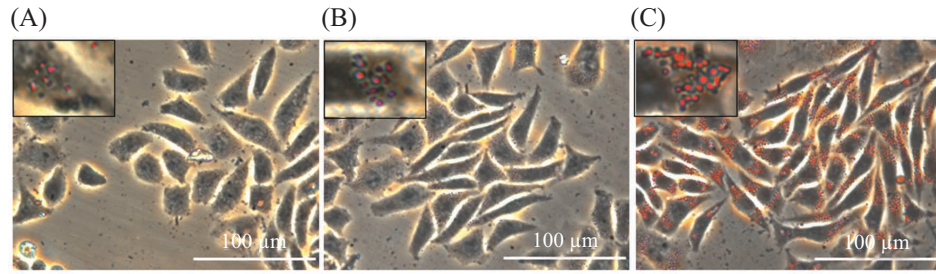


A: 空白对照组; B: 前脂肪细胞共培养组; C: 脂肪细胞共培养组。A、B、C图左上角小图为大图放大后细胞形态。

A: control group; B: pre-adipocytes group; C: adipocytes group. The smaller pictures in the top left corner of A, B and C were used to observe morphology of MDA-MB-231.

图2 显微镜下观察共培养后各组MDA-MB-231细胞形态的改变

Fig.2 Morphological changes of MDA-MB-231 cells in different groups observed by microscope

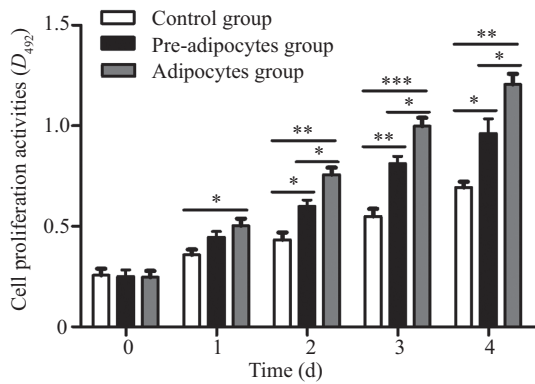


A: 空白对照组; B: 前脂肪细胞共培养组; C: 脂肪细胞共培养组。A、B、C图左上角小图为大图放大后细胞内脂质累积情况。

A: control group; B: pre-adipocytes group; C: adipocytes group. The smaller pictures in the top left corner of A, B and C were used to observe lipids accumulation.

图3 油红O染色观察各组MDA-MB-231细胞内脂质累积

Fig.3 Lipids accumulation in MDA-MB-231 cells were stained by Oil red O



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

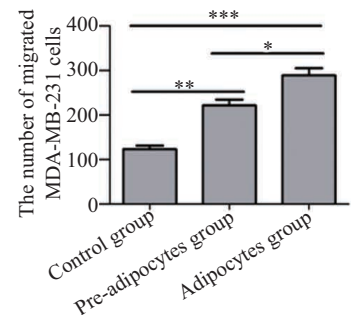
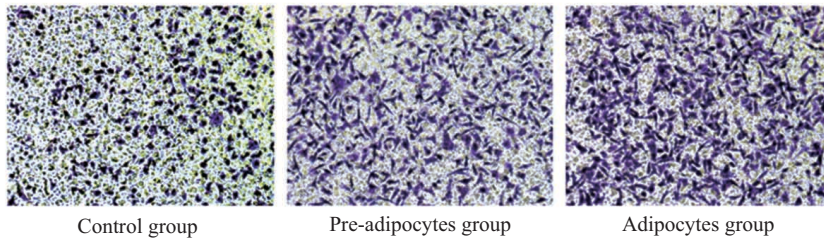
图4 MTT法检测MDA-MB-231细胞增殖能力

Fig.4 The proliferation of MDA-MB-231 cells were detected by MTT assay

组为(221±23)个, 成熟脂肪细胞共培养组为(289±29)个。统计分析结果显示, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进乳腺癌MDA-MB-231细胞的迁移能力($P < 0.05$); 与前脂肪细胞相比, 成熟脂肪细胞的促进作用更加明显($P < 0.05$)(图5)。

2.5 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞影响乳腺癌MDA-MB-231细胞的机制探讨

前脂肪细胞和成熟脂肪细胞可以分泌大量的炎症因子和脂肪因子, 瘦素就是其中之一。细胞免疫荧光法检测结果显示, MDA-MB-231细胞自身的细胞膜和细胞质中均有Ob-R表达(图6)。蛋白质印



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 Transwell实验观察各组MDA-MB-231细胞迁移能力的改变(100×)

Fig.5 The migration ability of MDA-MB-231 cells were detected by Transwell assay (100×)

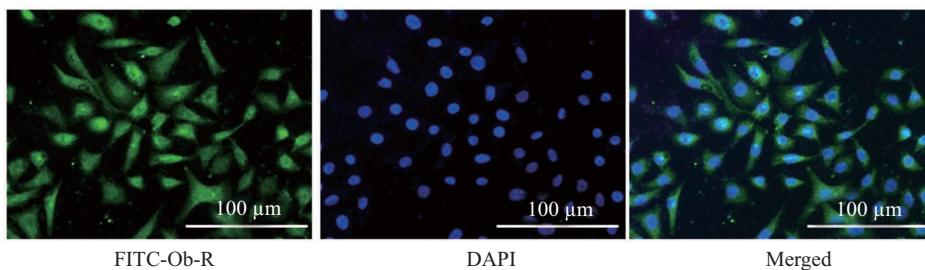
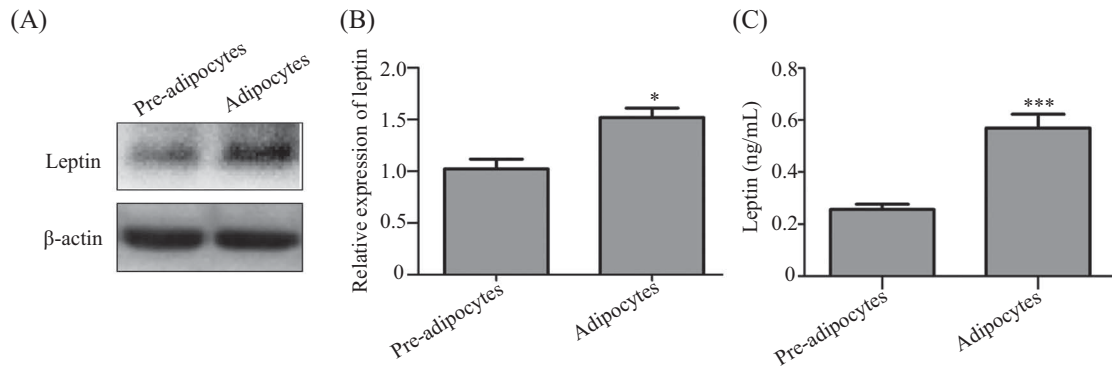


图6 细胞免疫荧光染色法检测乳腺癌MDA-MB-231细胞自身瘦素受体(Ob-R)的水平

Fig.6 The levels of leptin receptor (Ob-R) on the membrane and in the cytoplasm of breast cancer MDA-MB-231 cells were detected by immunofluorescence

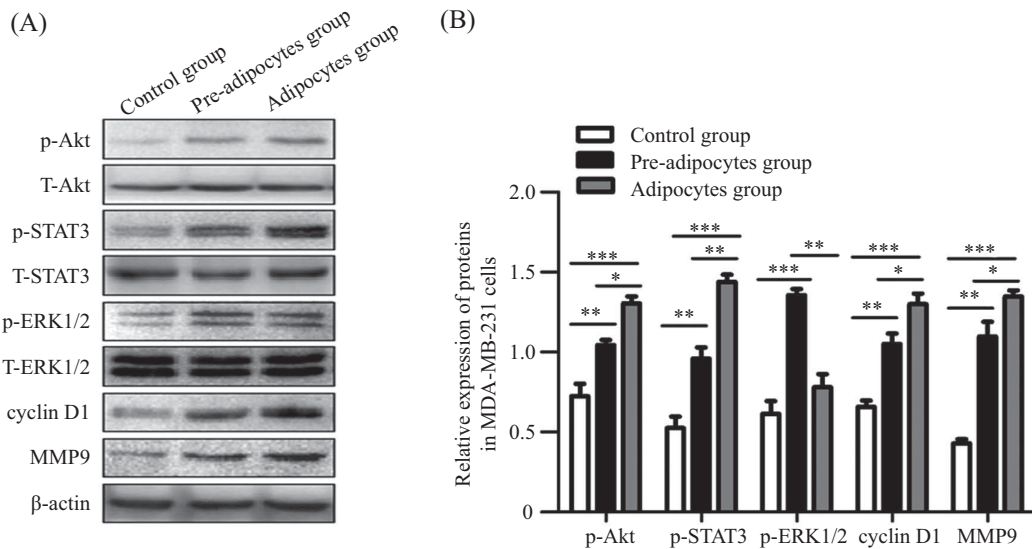


A: 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞瘦素蛋白质的水平。B: 瘦素蛋白相对表达量; * $P < 0.05$, 与前脂肪细胞比较。C: 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞培养基中瘦素蛋白质的含量; *** $P < 0.001$, 与前脂肪细胞比较。

A: the levels of leptin in pre-adipocytes and adipocytes were detected by Western blot. B: relative levels of leptin; * $P < 0.05$ compared with pre-adipocytes. C: the levels of leptin in medium of pre-adipocytes and adipocytes were detected by ELISA; *** $P < 0.001$ compared with pre-adipocytes.

图7 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞瘦素的表达情况

Fig.7 The levels of leptin in pre-adipocytes and adipocytes were detected by Western blot and ELISA



A: 各组MDA-MB-231细胞中瘦素信号通路相关分子蛋白质表达情况; B: 各蛋白质相对表达量, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

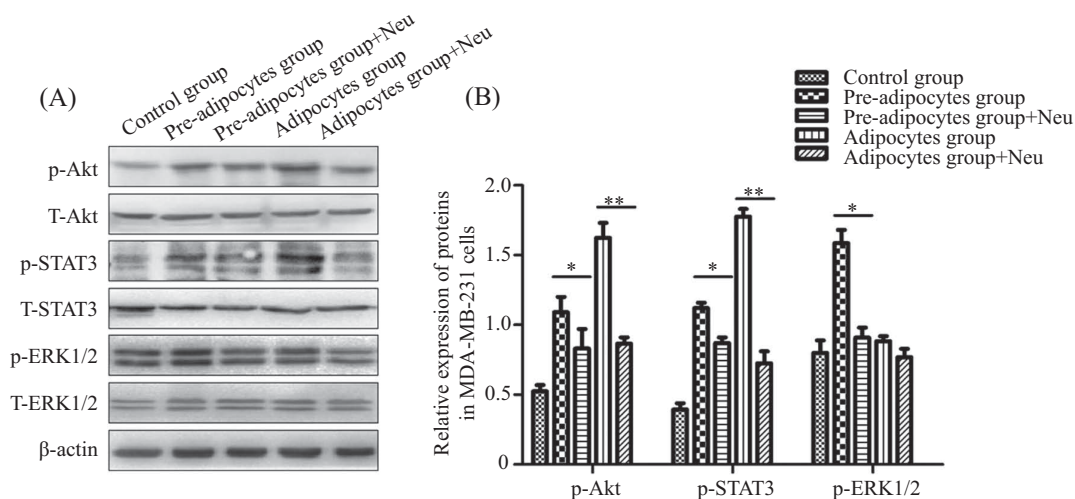
A: the expression levels of key molecules in leptin signaling pathway were detected by Western blot; B: relative expression of proteins; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图8 Western blot检测各组MDA-MB-231细胞中瘦素信号通路相关分子表达情况

Fig.8 The levels of key molecules in leptin signaling pathway were detected by Western blot

迹法检测结果则显示, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均有瘦素的表达, 且成熟脂肪细胞瘦素水平明显高于前脂肪细胞($P < 0.05$)(图7A和图7B); ELISA方法检测前脂肪细胞和成熟脂肪细胞培养基中瘦素的表达情况, 结果显示, 前脂肪细胞培养基中瘦素水平为(0.256 3±0.020 0) ng/mL, 成熟脂肪细胞培养基中瘦素水平为(0.570 0±0.052 3) ng/mL, 成熟脂肪细胞培养基中瘦素水平明显高于前脂肪细胞($P < 0.001$)(图7C)。检测MDA-MB-231细胞中瘦素下游p-Akt、p-ERK1/2、p-STAT3、cyclin D1、MMP9的表达情

况, 结果显示, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能使乳腺癌MDA-MB-231细胞中Akt、STAT3磷酸化水平, cyclin D1、MMP9的水平增加($P < 0.05$), 且成熟脂肪细胞组的增加幅度明显高于前脂肪细胞组($P < 0.05$); 而p-ERK1/2仅能被前脂肪细胞明显激活($P < 0.001$), 成熟脂肪细胞共培养组和空白对照组没有统计学意义($P > 0.05$)(图8)。加入瘦素中和抗体处理后, 乳腺癌MDA-MB-231细胞中p-Akt、p-STAT3水平较共培养组均有降低, 前脂肪细胞组p-ERK1/2水平也明显降低($P < 0.05$)(图9)。这些结果说明, 前脂肪细胞和



A: 加入瘦素中和抗体后各组MDA-MB-231细胞中瘦素信号通路相关分子蛋白质表达情况; B: 各蛋白质相对水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the expression levels of key molecules in leptin signaling pathway after using leptin neutralization were detected by Western blot; B: relative expression of proteins; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图9 Western blot检测加入瘦素中和抗体后各组MDA-MB-231细胞中瘦素信号通路相关分子表达情况

Fig.9 The levels of key molecules in leptin signaling pathway after using leptin neutralization were detected by Western blot

成熟脂肪细胞对乳腺癌MDA-MB-231细胞生物学行为的影响和瘦素信号通路相关。

3 讨论

三阴性乳腺癌占乳腺癌发病率的10%~20%，由于缺乏内分泌和抗人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)的治疗靶点，临床上没有针对性的治疗方案，而且癌细胞容易发生转移，所以往往预后不良^[7]。近年来的研究发现，肿瘤微环境和乳腺癌的发生、发展密切相关。作为乳房中体积最多的组织，脂肪和乳腺癌的关系也越来越受到大家的重视。以前大家认为，脂肪组织仅仅具有储备能量的功能，直到1994年瘦素被发现，人们才逐渐认识到，脂肪组织不仅仅只是一个能量储备器，更是一个内分泌器官，它能调节全身能量和代谢平衡^[4,8]。近年来，脂肪和各种肿瘤的关系已成为研究的热点^[2]。乳腺微环境中富含大量的脂肪组织，而前脂肪细胞和脂肪细胞是其中的主要细胞。3T3-L1前脂肪细胞具有向脂肪细胞分化的单一分化潜能，但其本身并没有脂肪细胞的特征。成熟脂肪细胞胞内含有丰富的脂滴，它的增多则是脂肪累积的直接原因。

前脂肪细胞和成熟脂肪细胞具有不同的特征，其对乳腺癌细胞的影响也不尽相同。有研究表明，成熟脂肪细胞促进乳腺癌细胞增殖，而前脂肪

细胞则抑制乳腺癌细胞增殖^[5]。而最近一项研究表明，前脂肪细胞和脂肪细胞均能促进ER阳性乳腺癌MCF-7细胞的增殖，并且成熟脂肪细胞的促进作用明显强于前脂肪细胞^[6]。关于前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响有何异同，其具体机制如何却未见报道。

本研究采用体外共培养的模式，探讨前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对乳腺癌MDA-MB-231细胞生物学行为的影响及其机制。首先观察细胞形态，发现共培养后的MDA-MB-231细胞变得更加纤长，并且在成熟脂肪细胞共培养组的乳腺癌细胞内出现明显的脂滴累积。采用MTT实验检测MDA-MB-231细胞增殖能力的改变，结果发现，前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进其增殖，且成熟脂肪细胞促进作用更加明显。通过Transwell迁移实验发现，前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进MDA-MB-231细胞的迁移能力，且与成熟脂肪细胞共培养的乳腺癌细胞迁移能力更强。为了进一步探讨前脂肪细胞和成熟脂肪细胞影响乳腺癌MDA-MB-231细胞生物学行为的机制，结合以往文献^[9-12]报道，本研究选取了增殖、转移相关因子瘦素进行检测。结果发现，前脂肪细胞和成熟脂肪细胞中均存在瘦素的表达，且成熟脂肪细胞中瘦素表达量更高。检测MDA-MB-231细胞中瘦素下游三条经典信号通路MAPK/ERK、JAK/STAT3、PI3K/Akt的激活情况，结果发现，前脂肪细

胞和成熟脂肪细胞均能使p-Akt和p-STAT3水平上调, 而前脂肪细胞还能使p-ERK1/2水平上调。为了进一步研究瘦素在共培养体系中发挥的作用, 我们在共培养体系中加入了瘦素的中和抗体, 再来检测MAPK/ERK、JAK/STAT3、PI3K/Akt三条信号通路的激活情况, 结果发现, 中和抗体组这三条信号通路的激活都受到不同程度的抑制。这说明, 瘦素确实参与了前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响过程。因此推测, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞对乳腺癌生物学行为的影响可能是通过瘦素来发挥作用的。

肿瘤细胞不同于正常细胞, 其糖、脂代谢异常活跃^[13-14]。20世纪早期, Warburg等^[15-16]观察到肿瘤细胞对葡萄糖摄取异常活跃, 并通过糖酵解途径将之转化为乳酸, 称为Warburg效应, 此为肿瘤细胞代谢特征之一; 脂肪酸从头合成增强, 则是肿瘤细胞的另一个重要的代谢改变^[17]。我们对MDA-MB-231细胞进行油红O染色发现, 成熟脂肪细胞共培养组乳腺癌细胞内出现明显的脂滴累积, 这说明成熟脂肪细胞对MDA-MB-231的影响可能还和脂质代谢相关。有研究表明, 脂肪细胞可以通过向卵巢癌细胞转移脂滴, 为卵巢癌细胞提供能量, 从而促进卵巢癌的生长、转移^[18]。而本研究中, 乳腺癌细胞内累积的脂滴是否也是由脂肪细胞转移而来的、对乳腺癌细胞的能量代谢有何影响, 还有待进一步的研究。

综上所述, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞均能促进乳腺癌细胞的增殖、迁移, 且成熟脂肪细胞的促进作用更加明显, 它们对乳腺癌细胞的促进作用和瘦素信号相关。此外, 成熟脂肪细胞还可能通过影响乳腺癌细胞的脂质代谢来影响乳腺癌细胞的生物学行为。这提示, 乳腺癌的预防和治疗不应该只关注肿瘤细胞本身, 还应关注乳腺微环境中的脂肪细胞。

参考文献 (References)

- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141(1): 52-67.
- Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer-mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(8): 455-65.
- Barone I, Catalano S, Gelsomino L, Marsico S, Giordano C, Panza S, *et al.* Leptin as a novel mediator of tumor/stroma interaction promotes the invasive growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2012; 72(6): 1416-27.
- Nieman KM, Romero IL, van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(10): 1533-41.
- Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol* 2003; 201(2): 221-8.
- Fuentes-Mattei E, Velazquez-Torres G, Phan L, Zhang F, Chou PC, Shin JH, *et al.* Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(7). pii: dju158. doi: 10.1093/jnci/dju158.
- Swede H, Gregorio DI, Tannenbaum SH, Brockmeyer JA, Ambrosone C, Wilson LL, *et al.* Prevalence and prognostic role of triple-negative breast cancer by race: A surveillance study. *Clin Breast Cancer* 2011; 11(5): 332-41.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 316(2): 129-39.
- Delort L, Rossary A, Farges MC, Vasson MP, Caldefie-Chézet F. Leptin, adipocytes and breast cancer: Focus on inflammation and anti-tumor immunity. *Life Sci* 2015; 140: 37-48.
- Yan D, Avtanski D, Saxena NK, Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. *J Biol Chem* 2012; 287(11): 8598-612.
- Avtanski DB, Nagalingam A, Bonner MY, Arbiser JL, Saxena NK, Sharma D. Honokiol activates LKB1-miR-34a axis and antagonizes the oncogenic actions of leptin in breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6(30): 29947-62.
- Strong AL, Ohlstein JF, Biagas BA, Rhodes LV, Pei DT, Tucker HA, *et al.* Leptin produced by obese adipose stromal/stem cells enhances proliferation and metastasis of estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 112.
- Cazzaniga M1, Bonanni B1. Breast cancer metabolism and mitochondrial activity: the possibility of chemoprevention with metformin. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 972193.
- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(10): 763-77.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8(6): 519-30.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(319): 309-14.
- Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* 2013; 18(2): 153-61.
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 2011; 17(11): 1498-503.