

阿司匹林对 HER-2 阳性乳腺癌细胞 SKBR3 侵袭和迁移能力的影响

马骥¹ 赵庆丽¹ 李静²

【摘要】 目的 探讨阿司匹林对乳腺癌细胞 SKBR3 侵袭和迁移能力的影响。方法 先采用 MTT 法检测不同浓度(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)阿司匹林及 DMSO(对照组)对 SKBR3 细胞生长抑制的影响。然后,将乳腺癌细胞 SKBR3 分为 3 组,即 2.5 mmol/L 阿司匹林组、10.0 mmol/L 阿司匹林组和对照组(DMSO 处理),采用 Transwell 实验、划痕实验分别检测细胞的侵袭和迁移能力,实验重复 3 次。Transwell 实验和划痕实验结果数据比较,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。**结果** MTT 结果显示,随着阿司匹林浓度的增大,SKBR3 细胞生长抑制明显增加,其半数抑制浓度(IC₅₀)为 7.91 mmol/L。Transwell 实验显示,对照组侵袭细胞染色 570 nm 吸光度值为 2.232±0.054, 2.5 mmol/L 组为 1.648±0.069, 10.0 mmol/L 组为 0.372±0.019, 3 组间相比,细胞侵袭能力的差异有统计学意义($F=338.1, P<0.001$);并且,与对照组相比,2.5 mmol/L 和 10.0 mmol/L 阿司匹林组细胞侵袭能力明显受到抑制(P 均 <0.001)。划痕实验显示,24 h 后对照组细胞迁移愈合率为(69.78±2.87)%, 2.5 mmol/L 阿司匹林组为(50.16±3.10)%, 10.0 mmol/L 阿司匹林组为(16.08±2.10)%, 3 组间相比,细胞迁移能力的差异也有统计学意义($F=100.8, P<0.001$);并且,与对照组相比,2.5 mmol/L 和 10.0 mmol/L 阿司匹林组细胞迁移能力均明显受到抑制(P 均 <0.050)。**结论** 阿司匹林能够抑制乳腺癌细胞 SKBR3 的侵袭和迁移能力。

【关键词】 阿司匹林; 乳腺肿瘤; 受体, erbB-2; 肿瘤浸润; 细胞迁移分析

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Effect of aspirin on invasion and migration of HER-2-positive breast cancer SKBR3 cells Ma Ji¹, Zhao Qingli¹, Li Jing². ¹Department of Breast Surgery, ²Department of Endocrinology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Li Jing, Email:499285956@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of aspirin on the invasion and migration of breast cancer SKBR3 cells. **Methods** MTT assay was used to measure the inhibitory effect of aspirin (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L) and DMSO (as control) on growth of SKBR3 cells. SKBR3 cells were cultured and divided into three groups, treated by 2.5 mmol/L, 10.0 mmol/L aspirin and DMSO (as control) respectively. Transwell migration assay and scratch assay were used to measure the invasion and migration ability of cells. All experiments were repeated three times. The results in the Transwell migration assay and scratch assay were analyzed by one-way ANOVA and pairwise comparison was conducted by LSD method. **Results** MTT results showed that with the increase of aspirin concentration, growth inhibition of SKBR3 cells was increased significantly, with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 7.91 mmol/L. Transwell migration assay showed that the optical density at the wavelength of 570 nm was 2.232±0.054 in control group, 1.648±0.069 in 2.5 mmol/L aspirin group and 0.372±0.019 in 10.0 mmol/L aspirin group, respectively, indicating a significant difference in the invasion ability among groups ($F=338.1, P<0.001$). Compared with control

group, the invasion ability was significantly inhibited in 2.5 mmol/L and 10.0 mmol/L aspirin groups (both $P < 0.001$). The scratch assay showed that the migration healing rate at 24 h was $(69.78 \pm 2.87)\%$ in control group, $(50.16 \pm 3.10)\%$ in 2.5 mmol/L aspirin group and $(16.08 \pm 2.10)\%$ in 10.0 mg/L aspirin group, suggesting a significant difference in migration ability among groups ($F = 100.8$, $P < 0.001$). Compared with control group, the migration ability of cells in 2.5 mmol/L and 10.0 mmol/L aspirin groups was significantly inhibited, respectively (both $P < 0.050$). **Conclusion** Aspirin can inhibit the invasion and migration ability of breast cancer SKBR3 cells.

【Key words】 Aspirin; Breast neoplasms; Receptor, erbB-2; Tumor-infiltrating; Cell migration assays

在乳腺癌患者中,HER-2 阳性乳腺癌占 20% ~ 30%,属于浸润性强的肿瘤,无瘤生存期短,预后差^[1]。与其他亚型乳腺癌患者相比,HER-2 阳性乳腺癌患者至远处转移时间和总生存时间均较短,并且,其 10 年局部复发风险是 HER-2 阴性者的 1.77 倍,淋巴结复发风险为 2.81 倍^[2-4]。因此,探讨 HER-2 阳性乳腺癌的治疗策略和分子机制是目前乳腺癌治疗的难点之一。

阿司匹林作为一种解热镇痛药,已应用于临床近百年,它以出色的抗凝和保护心脏作用成为心血管病一线和基础治疗用药。近年来,阿司匹林有一定的抗肿瘤效应,有关该药的抗肿瘤作用证据日益增多。目前对阿司匹林抗肿瘤机制的研究还较少,主要集中在其天然成分水杨酸对腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/mTOR 的影响方面,水杨酸与 AMPK 存在结合位点,结合后可以导致 AMPK 磷酸化位点活化,进而发挥抑癌作用。尽管如此,有关阿司匹林在乳腺癌中的作用一直存在争议。2015 年圣·安东尼奥乳腺癌研讨会上,有研究组报道阿司匹林并不会改善乳腺癌患者的临床预后^[5];然而,又有一项研究表明,阿司匹林实际上可以帮助降低乳腺组织的密度,或可帮助进行某些乳腺癌的早期诊断^[6]。因此,阿司匹林在乳腺癌中的确切作用仍是目前的研究热点之一。不仅如此,有关阿司匹林在 HER-2 阳性乳腺癌方面的抗癌作用还不完全清楚。本研究主要观察阿司匹林对 HER-2 阳性乳腺癌细胞侵袭和转移的影响,为阿司匹林在乳腺癌治疗方面的作用提供了一定的理论依据。

材料与方 法

一、细胞系和主要试剂

HER-2 阳性乳腺癌细胞 SKBR3 系源自于中国

科学院上海细胞库,由解放军兰州军区总医院实验中心保存。SKBR3 细胞使用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)在 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养。Transwell 小室购于美国康宁公司,阿司匹林、MTT、Giemsa 染液均购于美国 Sigma 公司。

二、MTT 检测

将正常生长的 SKBR3 细胞传代后接种于 96 孔细胞培养板,每孔 200 μl,含有 2×10^3 个细胞,培养过夜,待细胞贴壁生长后分别加入含有不同浓度(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L)阿司匹林的培养液继续培养,对照组每孔加入 DMSO,每组设置 3 个复孔,培养 2 d 后检测细胞增殖情况。于每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl 后继续培养 4 h,之后弃培养液,每孔再加入 150 μl DMSO,在酶标仪上振荡约 10 min,于 490 nm 处检测吸光度(D)值,计算不同浓度阿司匹林作用后的细胞生长抑制率 = $(1 - \text{阿司匹林实验组} / \text{对照组}) \times 100\%$ ^[7]。

三、Transwell 侵袭实验

将对数生长的 SKBR3 细胞数调整至 1×10^5 /ml,取细胞悬液 100 ~ 200 μl 加入 Transwell 小室上层常规培养,下层培养液中加入 0 (DMSO 处理,对照组)、2.5、10.0 mmol/L 的阿司匹林 2 d 后取出小室, PBS 淋洗,用棉签小心擦去微孔膜内层的细胞,使用结晶紫溶液染色后用 33% 醋酸脱色,将结晶紫完全洗脱下来,洗脱液在酶标仪上 570 nm 处测其 D 值,间接反映细胞侵袭情况。实验重复 3 次。

四、细胞划痕实验

将对数生长的 SKBR3 细胞接种于 6 孔细胞培养板,并于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养;次日采用细胞刮刀在孔中央对细胞作一宽度 0.8 mm 的划痕,用 PBS 洗 2 次,并在倒置相差显微镜下摄片;沿划痕边缘等距离间隔作 4 个标记作为数据测定点,测量时取平均值;分别在每孔中加入 0 (DMSO 处

理,对照组)、2.5、10.0 mmol/L 的阿司匹林后培养 24 h 后,在倒置相差显微镜下摄片,测量各个时间点的划痕两侧细胞间的距离;分析数据,细胞迁移愈合率=(0 h 细胞间距-24 h 细胞间距)/0 h 细胞间距×100%^[7]。实验重复 3 次。

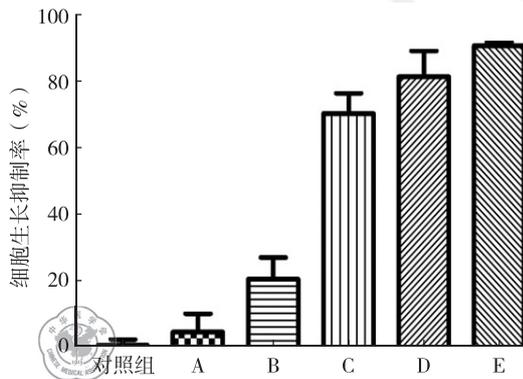
五、统计学分析

应用 SPSS17.0 软件对实验数据进行统计分析。细胞侵袭率和迁移率呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组细胞侵袭和迁移能力的比较,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、阿司匹林对 SKBR3 细胞生长的抑制作用

MTT 实验结果显示,与对照组相比,2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L 阿司匹林对 SKBR3 细胞生长抑制作用越来越显著(图 1),其半数抑制浓度(IC₅₀)为 7.91 mmol/L。为了更好地观察阿司匹林对 SKBR3 细胞的抑制效应,本研究选用 2.50 mmol/L 低浓度和 10.00 mmol/L 高浓度的阿司匹林进行后续实验。



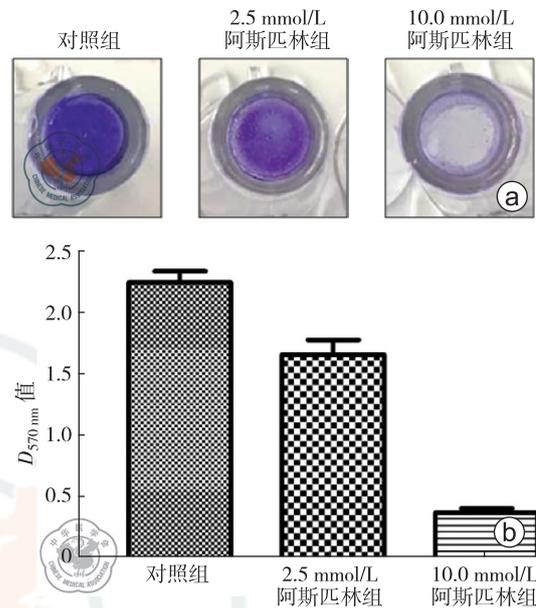
注: A、B、C、D、E 组分别代表 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mmol/L 阿司匹林组;实验重复 3 次

图 1 不同浓度阿司匹林及 DMSO (对照组) 对 SKBR3 细胞生长的抑制作用

二、阿司匹林对 SKBR3 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验显示,对照组侵袭细胞染色 D_{570 nm} 值为 2.232±0.053,2.5 mmol/L 阿司匹林组为 1.648±0.069,10.0 mmol/L 阿司匹林组为 0.373±0.019,3 组相比,细胞侵袭能力的差异有统计学意义($F = 338.1, P < 0.001$),并且,与对照组相比,

2.5 mmol/L 和 10.0 mmol/L 阿司匹林组细胞的侵袭能力均明显受到抑制(P 均 <0.001)(图 2)。



注:实验重复 3 次

图 2 不同浓度阿司匹林及 DMSO (对照组) 对 SKBR3 细胞侵袭能力的影响 a 图为 SKBR3 细胞侵袭实验 Transwell 小室光镜照片;b 图为 SKBR3 细胞侵袭实验吸光度(D_{570 nm})值定量分析图

三、阿司匹林对 SKBR3 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验显示,对照组 24 h 后细胞迁移愈合率为(69.78±2.87)%,2.5 mmol/L 阿司匹林组为(50.16±3.10)%,10.0 mmol/L 阿司匹林组为(16.08±2.10)%,3 组相比,细胞迁移能力的差异有统计学意义($F = 100.8, P < 0.001$),并且,与对照组相比,2.5 mmol/L 和 10.0 mmol/L 阿司匹林组细胞迁移能力均明显受到抑制(P 均 <0.050)。

讨 论

阿司匹林是一种非甾体类抗炎药,临床上主要用于解热镇痛、抗炎、抗风湿、抗血小板聚集等。近年来,有关该药的抗肿瘤作用证据日益增多。一项随访 18 年的研究发现,长期服用阿司匹林的妇女能够降低结直肠癌的发生率,阿司匹林组与安慰剂组相比,结直肠癌的发生率降低约 20%^[8]。2012 年牛津大学 Rothwell 等^[9]的研究表明,长期服用低剂量阿司匹林不但能够在 3 年后使癌症发生率降低 12%,还能使患者的病死率降低 15%。2012 年哈佛

大学 Liao 等^[10]在 *New England Journal of Medicine* 杂志上发表的研究结果为阿司匹林的抗癌作用再添有力证据。他们认为存在 PIK3CA 基因突变的结直肠癌患者长期服用阿司匹林后,5 年存活率达 97%, 而未服用阿司匹林的患者只有 74% 的存活率。另有国内一项 Meta 分析显示,长期服用阿司匹林能够降低女性乳腺癌发病风险^[11]。一些研究也发现,阿司匹林的剂量和服用频次对其抗肿瘤效应有影响。已有研究团队发现,每日服用阿司匹林 5 年以上才能降低肿瘤发生的风险,且服用时间越长,降低肿瘤发生风险的效果越明显^[9]。另外,有关阿司匹林服用剂量与抗肿瘤的关系还未有一致结论。有研究者认为,低剂量阿司匹林没有抗肿瘤作用,标准或高剂量阿司匹林才能发挥抗肿瘤作用^[12];但也有研究者认为,低剂量和标准剂量阿司匹林有着等效的抗肿瘤效应,随着剂量增加抗癌效应越强^[13]。由此可见,阿司匹林的抗肿瘤效应是明确的,目前还缺乏前瞻性的临床研究数据支持。

关于阿司匹林在乳腺癌中的作用研究也陆续有文献报道。2017 年一项临床研究发现,在 57 164 名女性中有 1 457 名罹患浸润性乳腺癌,与未服用阿司匹林组相比,每周服用 3 次以上低剂量阿司匹林的女性罹患乳腺癌的风险降低了 16%^[14]。该研究还发现,服用高剂量阿司匹林对乳腺癌的风险也没有影响,研究者认为这可能与高剂量阿司匹林的服用方式有关。因为高剂量阿司匹林通常用于短期治疗头痛或其他疼痛,而低剂量阿司匹林通常用于防治心血管疾病或其他疾病,因此人们养成了长期经常服用它们的习惯。在乳腺癌患者中,HER-2 阳性乳腺癌是一类特殊的乳腺癌。抗 HER-2 治疗是目前 HER-2 阳性乳腺癌有效的治疗手段之一,但是很多患者存在一定的药物耐受性。有关阿司匹林在 HER-2 阳性乳腺癌中的作用研究还较少;是否阿司匹林能够抑制 HER-2 阳性乳腺癌细胞的生长尚不完全清楚。

国内有学者研究发现,阿司匹林对 HER-2 阳性乳腺癌细胞 AU-565 的增殖和克隆形成能力有抑制作用,能够增加磷酸化的 AMPK,抑制磷酸化的 mTOR 表达,并且增加凋亡相关蛋白多聚 ADP 核糖聚合酶的表达^[15]。该研究明确了阿司匹林调控乳腺癌细胞 AU-565 增殖的作用和机制,但是没有涉及肿瘤的侵袭和迁移。本研究也是以 HER-2 阳性

乳腺癌细胞为研究对象,重点观察阿司匹林对肿瘤侵袭和迁移能力的影响。笔者通过 Transwell 小室侵袭实验发现,阿司匹林对 SKBR3 细胞的侵袭能力有一定程度的抑制,且随着浓度的增加抑制效果显著增加;细胞划痕愈合实验也显示,阿司匹林在一定程度上抑制细胞划痕的愈合,高浓度阿司匹林抑制效果更明显。以上结果证实了阿司匹林能够有效的抑制 HER-2 阳性乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力,这就说明阿司匹林有可能在 HER-2 阳性乳腺癌的治疗中发挥抑癌作用并控制远处转移发生。查阅文献发现,有关阿司匹林在 HER-2 阳性乳腺癌细胞中的基础研究寥寥无几。本研究为阿司匹林抑制 HER-2 阳性乳腺癌细胞侵袭和迁移能力提供了实验证据。

有关阿司匹林抗肿瘤效应的机制,目前也有相关文献报道。有研究发现,阿司匹林通过有效抑制 COX-2,导致由 COX-2 介导的前列腺素 E₂ 参与的多种肿瘤生长信号通路受到抑制,最终抑制肿瘤生长^[16-17]。另有研究发现,阿司匹林能够通过抑制 NF-κB 核转位,阻断 NF-κB 介导的信号通路,最终促进肿瘤细胞的凋亡^[18]。也有研究发现,阿司匹林通过激活 AMPK 抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,诱导肿瘤细胞自噬的发生^[19]。也有细胞实验发现,阿司匹林能够通过影响 β-catenin 的影响,持续抑制 Wnt/β-catenin 信号,导致肿瘤细胞增殖较弱,凋亡增加^[20]。有研究者指出,阿司匹林抑制乳腺癌的一种机制在于其是一种较弱的芳香化酶抑制剂,而临床上用更强力的芳香酶抑制剂来治疗激素受体阳性乳腺癌,既然阿司匹林可以抑制芳香化酶,那么它也应该可以降低乳腺癌发生的概率;阿司匹林同时可以降低炎症,这可能是经常服用阿司匹林能够降低乳腺癌风险的另一种机制^[21]。本研究已经在细胞学功能方面看到了阿司匹林能够显著抑制 SKBR3 细胞侵袭和迁移能力,有关的信号通路和分子机制尚未进一步研究。肿瘤侵袭和迁移对肿瘤细胞的远处转移至关重要,涉及到上皮-间质转化,而上皮-间质转化关键分子参与其中。笔者下一步也将重点探讨阿司匹林对上皮-间质转化关键分子表达的影响和调控机制,完善阿司匹林对乳腺癌细胞侵袭、转移的调控研究。

本研究以 HER-2 阳性乳腺癌细胞为研究对象,重点观察了阿司匹林对该型肿瘤细胞侵袭和迁移能力的影响,发现阿司匹林能够有效的抑制该型肿瘤

细胞的侵袭和迁移能力,且随着阿司匹林浓度的增加抑制效果更明显。本研究为阿司匹林的抗肿瘤效应增添了一定的基础实验证据,其可能成为治疗HER-2 阳性乳腺癌的新策略。

参 考 文 献

- [1] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182.
- [2] Kelsey JL. A review of the epidemiology of human breast cancer[J]. *Epidemiol Rev*, 1979, 1: 74-109.
- [3] Wright C, Angus B, Nicholson S, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(8): 2087-2090.
- [4] Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(10): 1684-1691.
- [5] Moris D, Kontos M, Spartalis E, et al. The role of NSAIDs in breast cancer prevention and relapse: current evidence and future perspectives [J]. *Breast Care (Basel)*, 2016, 11(5): 339-344.
- [6] Wood ME, Sprague BL, Oustimov A, et al. Aspirin use is associated with lower mammographic density in a large screening cohort [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 162(3): 419-425.
- [7] Burkhalter RJ, Symowicz J, Hudson LG, et al. Integrin regulation of beta-catenin signaling in ovarian carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(26): 23 467-23 475.
- [8] Cook NR, Lee IM, Zhang SM, et al. Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2013, 159(2): 77-85.
- [9] Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, et al. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials[J]. *Lancet*, 2012, 379(9826): 1602-1612.
- [10] Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(17): 1596-1606.
- [11] Luo T, Yan HM, He P, et al. Aspirin use and breast cancer risk: a meta-analysis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131(2): 581-57.
- [12] Cuzick J, Thorat MA, Bosetti C, et al. Estimates of benefits and harms of prophylactic use of aspirin in the general population[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(1): 47-57.
- [13] Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, et al. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(1): 21-28.
- [14] Clarke CA, Canchola AJ, Moy LM, et al. Regular and low-dose aspirin, other non-steroidal anti-inflammatory medications and prospective risk of HER2-defined breast cancer: the California Teachers Study[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 52.
- [15] 吴颖,王哲,孔静,张健,等. 阿司匹林对 HER-2 阳性乳腺癌 AU-565 细胞增殖能力的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2017, 11(1): 19-23.
- [16] Duan Y, Chen F, Zhang A, et al. Aspirin inhibits lipopolysaccharide-induced COX-2 expression and PGE2 production in porcine alveolar macrophages by modulating protein kinase C and protein tyrosine phosphatase activity[J]. *BMB Rep*, 2014, 47(1): 45-50.
- [17] Bezugla Y, Kolada A, Kamionka S, et al. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2006, 79(1/2): 93-100.
- [18] Yang CM, Chen YW, Chi PL, et al. Resveratrol inhibits BK-induced COX-2 transcription by suppressing acetylation of AP-1 and NF-kappaB in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 132: 77-91.
- [19] Yue W, Yang CS, DiPaola RS, et al. Repurposing of metformin and aspirin by targeting AMPK-mTOR and inflammation for pancreatic cancer prevention and treatment[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(4): 388-397.
- [20] Bos CL, Kodach LL, van den Brink GR, et al. Effect of aspirin on the Wnt/beta-catenin pathway is mediated via protein phosphatase 2A[J]. *Oncogene*, 2006, 25(49): 6447-6456.
- [21] Bardia A, Olson JE, Vachon CM, et al. Effect of aspirin and other NSAIDs on postmenopausal breast cancer incidence by hormone receptor status: results from a prospective cohort study[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 126(1): 149-155.

(收稿日期:2017-05-20)

(本文编辑:罗承丽)

马骥,赵庆丽,李静. 阿司匹林对 HER-2 阳性乳腺癌细胞 SKBR3 侵袭和迁移能力的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2018, 12(1): 22-26.