

大肠癌细胞可产生趋化因子 IP - 10

杨春康, 陈道达, 田源, 张景辉

杨春康, 福建医科大学附属第一医院肿瘤外科, 福建省福州市 350005
陈道达, 田源, 张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院 湖北省武汉市 430022

杨春康, 男, 1966-01 出生, 福建周宁人, 汉族, 1990 年福建医科大学本科毕业, 2001 年华中科技大学同济医学院外科学博士毕业, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的临床和基础研究。

福建省教育厅科研基金, No. JA00205

项目负责人: 杨春康, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院肿瘤外科. chunkang@pub5.fz.fj.cn.

收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2003-01-01

Chemokine IP-10 produced by colorectal carcinoma

Chun-Kang Yang, Dao-Da Chen, Yuan Tian, Jing-Hui Zhang

Chun-Kang Yang, Department of Oncological Surgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Dao-Da Chen, Yuan Tian, Jing-Hui Zhang, Department of General Surgery, The Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by the Science Foundation of Education Bureau of Fujian Province, No. JA00205

Correspondence to: Dr. Chun-Kang Yang, Department of Oncological Surgery, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. chunkang@pub5.fz.fj.cn

Received: 2002-10-08 Accepted: 2003-01-01

Abstract

AIM: To study whether colorectal carcinoma cells can produce chemokines, the production condition and the kinetics of chemokine mRNA expression in colonic carcinoma cell line.

METHODS: Freshly isolated human colon adenocarcinomas from surgical specimens and the cell line - Colo320 were used for cell culture. α -TNF, γ -IFN and IL-1 were used as agonist stimulation of the cultured cells. The expression of IP-10 mRNA was assessed in cultured cells by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR).

RESULTS: The freshly isolated human colon adenocarcinoma cells and Colo320 could express IP-10 mRNA with the stimulation of α -TNF, γ -IFN and IL-1. The expression of IP-10 mRNA in Colo320 varied with different concentrations of the stimulating factors and at different time points of the stimulation.

CONCLUSION: Colorectal carcinoma cells can produce chemokines such as IP-10.

Yang CK, Chen DD, Tian Y, Zhang JH. Chemokine IP-10 produced by colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(11):1703-1705

摘要

目的: 通过大肠癌细胞的原始培养和大肠癌细胞株的培养,

探讨大肠癌细胞能否产生趋化因子, 产生趋化因子的条件及其产生的动力学情况。

方法: 分别用 α -TNF, γ -IFN 及 IL-1 刺激培养原代细胞及细胞株。采用 RT-PCR 方法检测培养细胞趋化因子 IP-10 mRNA 的表达。

结果: 大肠癌细胞在原代培养下经 α -TNF、 γ -IFN、IL-1 的刺激可表达 IP-10 mRNA。大肠癌细胞株 Colo320 经 α -TNF, γ -IFN 或 IL-1 的刺激可表达 IP-10 mRNA。Colo320 的 IP-10 mRNA 表达依刺激因子浓度和时间的改变而改变。

结论: 大肠癌细胞在一定的条件下能够表达趋化因子如 IP-10 mRNA 等。

杨春康, 陈道达, 田源, 张景辉. 大肠癌细胞可产生趋化因子 IP-10. *世界华人消化杂志* 2003;11(11):1703-1705

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1703.asp>

0 引言

趋化因子能选择性地引导白细胞亚群的定向游走和组织内集聚^[1]。根据趋化因子的氨基酸序列而将趋化因子分为 4 个亚家族, 即 CXC, CC, C 和 CX3C 亚家族^[2]。IP-10 即干扰素诱生蛋白 10, 他属于趋化因子家族中的 CXC 家族。许多不同的细胞包括白细胞, 内皮细胞, 纤维细胞, 上皮细胞及一些肿瘤细胞等均可表达趋化因子^[3,4]。大肠黏膜已被证明在炎症状态下能产生和分泌趋化因子^[5], 我们研究大肠癌细胞能否产生趋化因子 IP-10 及其产生的条件。

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自一乙状结肠肠管状腺癌患者。术中待肿瘤标本切除后, 即刻挑选活力较好的部位, 切取 1 cm³ 大小的肿瘤组织块, 尽量避免用退变组织或坏死组织。标本制成细胞悬液后, 分成 4 份接种于 6 孔培养板上, 按常规方法培养 3-5 d, 观察到细胞黏附于板壁后, 补加原培养液量 1/2 的新培养液, 继续培养 2-5 d 后观察细胞近完全长满板壁时, 于 3 份标本中分别加入 α -TNF (400KU/L), γ -IFN (1000KU/L) 及 IL-1 (20KU/L)。另一份标本不加任何东西作为对照组。继续培养 24 h 后中止培养。所培养的贴壁细胞进行趋化因子的 RT-PCR 检测。

1.2 方法 将 Colo320 细胞株(购自 ATCC)按 1:2 分装传代成功后, 分别接种于 3 个 6 孔培养板中的 13 个孔

内, 培养观察待细胞近长满整个孔壁时, 更换培养液, 按培养液同一体积 4 mL 内分别加入不同浓度的 γ -IFN (200 和 800KU/L), α -TNF (500 和 2000KU/L), IL-1 (10 和 40KU/L) 刺激培养 24 h 或分别同一浓度的 γ -IFN (800 KU/L), α -INF (12 000 KU/L), IL-1 (40 KU/L) 分别刺激 4、8、24 h, 其中一孔为空白对照. 将以上细胞培养至符合时段后, 吸尽上清, 培养细胞进行 RT-PCR 检测. 按常规方法进行, PCR 反应条件为: 先 90 °C 变性 5min, 后设置 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火及引物延伸 2.5 min, 循环 35 轮. 趋化因子 IP-10 的引物序列: 5' primer: 5' -AGT GGC ATT CAA GGA GTA CC-3'; 3' primer: 5' -ATC CTT GGA AGC ACT GCA TC-3'; Standard RNA: 388; Target RNA: 289.

2 结果

2.1 原代细胞培养检测结果 原代大肠癌细胞在非刺激条件下培养, RT-PCR 检测趋化因子 IP-10 mRNA 有弱表达(图 1). 在分别加入 α -TNF、 γ -IFN 或 IL-1 后, IP-10 的表达程度有较明显的升高(图 1, 2), 大肠癌细胞对 3 种刺激因子的刺激均可表达 IP-10 mRNA, 表达对 γ -IFN 和 IL-1 的刺激较敏感.

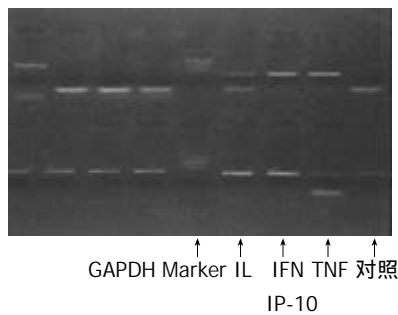


图 1 原代大肠癌肿瘤细胞的 IP-10 mRNA 表达.

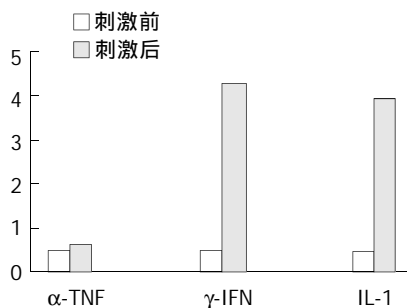


图 2 刺激大肠癌细胞产生的趋化因子 IP-10 mRNA.

2.2 细胞株培养检测结果 Colo320 经 α -TNF, γ -IFN, IL-1 在不同浓度和不同时间的刺激下可表达 IP-10 mRNA (图 3), 且其 mRNA 的表达随刺激的浓度和时间的不同而改变(图 5), 对照组 Colo320 在无任何刺激下, 不表达 IP-10 mRNA. 同一时间(24 h)不同浓度的刺激下, Colo320 细胞株都能随着刺激物 α -TNF, IL-1 及 γ -IFN 浓度的增加, IP-10 mRNA 的表达量也增加(图 4).

Colo320 细胞株经同一种刺激物在同一浓度不同时间的刺激下能随着刺激时间的延长, IP-10 mRNA 的表达量也增加(图 5).

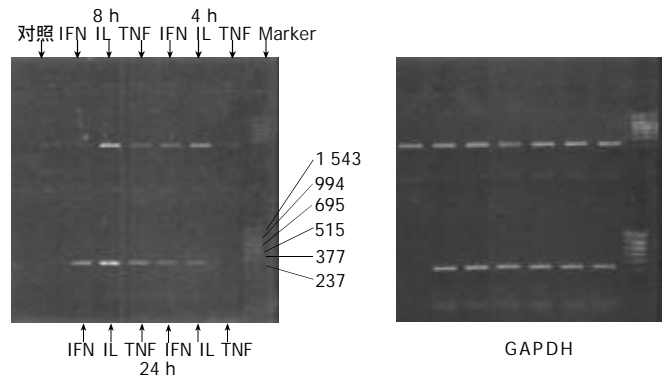


图 3 Colo320 在不同时间不同浓度的刺激下的 IP-10 mRNA 表达

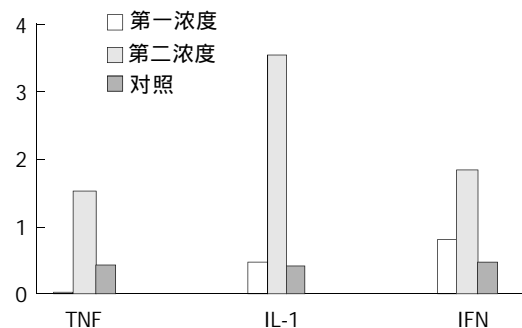


图 4 Colo320 在同一时间不同浓度的刺激物下产生 IP-10 mRNA.

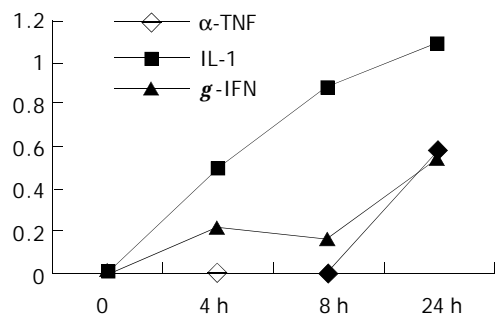


图 5 Colo320 IP-10 mRNA 的表达动力学.

3 讨论

肠道黏膜上皮不仅成为机体与外界的屏障, 而且是一免疫器官, 大肠黏膜细胞在炎症状态下可产生趋化因子如 IL-8, MCP-1 等^[5]. 本结果表明, 大肠癌细胞在一定的条件下可产生趋化因子 IP-10. 原代大肠癌细胞在无任何刺激下, 可自发微弱表达 IP-10 mRNA. 在刺激状态下, 从结果可以看出三种刺激因子对大肠癌细胞的刺激均可产生 IP-10 mRNA, IP-10 mRNA 的表达对 IL-1 和 γ -IFN 的刺激较敏感. 这种不同的刺激因素对大肠癌细胞趋化因子表达结果影响的不一样, 与其基因调节有关. Roebuck et al^[6]等研究认为: 趋化因子表达的调节主要是通过转录因子起作用的, 涉及此方面转录因子有: NF- κ B, NF-IL-6, AP-1 等, 由于不同转录因子的活化或转录因子在趋化因子(IL-8)基因启动

子位置上的不同, 其所起的调节结果就不一样, 因此刺激因素诱导趋化因子的产生表现出细胞类型的选择性或只有特定的刺激剂才能起作用, 故研究表明对于大肠癌细胞, α -TNF、IL-1, γ -IFN 均为其有效的刺激因子, 但产生的趋化因子的量是不同的。

由于原代细胞无法进行较长时间及稳定的研究, 也为了排除原代细胞准备过程中一些间质细胞的存在而影响结果. 本研究采用大肠癌细胞株 Colo320 进一步研究. 虽然在细胞株的传代过程中可能丢失一些特性, 但本研究显示在 γ -IFN 等的刺激下仍能表达 IP-10 mRNA, 表明其存在表达趋化因子的能力, 因此仍可用于趋化因子 IP-10 mRNA 表达调节的研究. 研究表明在一定刺激时间和刺激浓度内, 大肠癌细胞株 Colo320 可表达趋化因子 IP-10 mRNA. 表达 IP-10 mRNA 的能力随刺激时间的延长和刺激浓度的增加而增强, 从而进一步说明了大肠癌细胞存在表达趋化因子的能力并能随外界环境刺激因子的变化而变化。

肿瘤组织中存在着巨噬细胞, T 细胞及 NK 细胞等免疫细胞的浸润, 虽然其起始因素目前还不十分明朗, 但显而易见, 这些浸润的免疫细胞能分泌 γ -IFN, α -

TNF 及 IL-1 等等, 这些刺激因素的存在必然影响大肠癌细胞或其间质细胞的分泌活动. 即刺激了大肠癌细胞或间质细胞趋化因子的表达, 而趋化因子的表达又吸引了免疫细胞到肿瘤局部, 增加了局部 γ -IFN, α -TNF 或 IL-1 的浓度, 从而形成循环, 扩大了 γ -IFN 等刺激因子和趋化因子的表达, 增加其生物活性, 也增加了其对肿瘤生物学行为的影响。

4 参考文献

- 1 Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002;16:1-4
- 2 Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250:91-104
- 3 Pellegrino A, Vacca A, Scavelli C, Dammacco F. Chemokines and tumors. *Recenti Prog Med* 2002;93:642-654
- 4 Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2 Suppl):s460-475
- 5 Stadnyk AW. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002; 16:241-246
- 6 Roebuck KA, Carpenter LR, Lakshminarayanan V, Page SM, Moy JN, Thomas LL. Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 1999;65:291-298

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 读者来信 •

总编:

作为匈牙利胃肠协会的行政领导, 我已经将你发给我的信转发给我们的执行主席 Simon Lászó, 另外我告诉你从 2004-06, Lonovics János 将当选为新的主席. 借此机会, 预祝 WJG 取得更大的成功, WJG 在匈牙利非常受欢迎, 感谢你出版我们匈牙利的稿件。

Prof. Ferenc SZALAY M.D., Ph.D., 1st Department of Medicine, Semmelweis University, Koranyi S.u. 2A, Budapest, H-1083. Hungary. szalay@bell.sote.hu (Prof. Ferenc SZALAY M.D., Ph.D. 2003-10-08)