

Ewing's 肉瘤细胞 X-射线照射后 TNF- 和 TGF- mRNA 表达的研究

刘莉¹, 陆海², RuebeCE³, RuebeCH³

Tumor Necrosis Factor -alpha (TNF-) and Transforming Growth Factor -beta (TGF-) Expression in Ewing's Sarcoma Cell Line after Irradiation

LIULi¹, LUHai², RuebeCE³, RuebeCH³

1. Union Tumor Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430023, China; 2. Han-kou Air Force Hospital of PLA; 3. Saarland University Hospital, Homburg, Germany

Abstract: Objective To study the release of TNF- and TGF- mRNA in Ewing's sarcoma cell line (RM-82) in vitro and the regulation of TNF- and TGF- mRNA expression by ionizing radiation. Radiation-induced tumor cell production of TNF- and TGF- may enhance irradiation efficacy and improve the effect of tumor irradiation. On the other hand, endogenous tumor cell production of TNF- and TGF- may adversely affect normal tissue. **Methods** Ewing's sarcoma cell line (RM-82) were investigated for their TNF- and TGF- mRNA expression before and after exposure to different irradiation doses (2, 5, 10, 20, 30, 40 Gy) and after different time intervals (1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 hours after irradiation). **Results** The Ewing's sarcoma cell line RM-82 produce constitutively significant quantities of TNF- mRNA. The TNF- mRNA level of it were up-regulated following irradiation exposure in a time- and dose-dependent manner. Irradiation-mediated stimulation of the TNF- mRNA release was appreciable between 1 and 24 hours post-irradiation. Dependent on the dose given, irradiation was found to cause an increase in induction of TNF- mRNA expression, with the maximal release after irradiation with 40 Gy. In contrast, RM-82 cells constitutively produce significant level of TGF- mRNA, but this TGF- mRNA release was not modulated by irradiation. **Conclusion** The Ewing's sarcoma cell line RM-82 produce extremely large quantities of TNF- following irradiation exposure in a time and irradiation-dose dependent manner. Radiation-induced TNF- production of tumor cells may be of paramount importance not only for tumor behaviour but also in respect to potential damage to normal tissue and the clinical status of the host.

Keywords: The Ewing's sarcoma cell line (RM-82); Tumor necrosis factor (TNF-); Transforming growth factor beta (TGF-); Ionizing radiation

摘要:目的 研究 Ewing's 肉瘤细胞系 (RM-82) X-射线外照射后肿瘤坏死因子 (TNF-) 和转化生长因子 (TGF-) mRNA 表达水平的变化, 探讨 X-射线诱导内源性 TNF- 和 TGF- 产生的可能性及意义。方法 应用实时荧光 RT-PCR, 检测接受不同剂量 X-射线照射 (2Gy, 5Gy, 10Gy, 20Gy, 30Gy, 40Gy) 和受照后不同时间 (1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h)。TNF- 和 TGF- mRNA 表达水平的变化。结果 RM-82 细胞 TNF- mRNA 表达水平较外照射前显著升高。一方面受照后 TNF- mRNA 表达逐渐升高, 照射剂量达 40Gy 时 TNF- mRNA 表达水平达高峰, 为正常对照组的 108 倍; 另一方面, 照射后 3h 后 TNF- mRNA 表达逐渐升高, 6h 达高峰, 为正常对照组的 18 倍。相反, TGF- mRNA 表达水平 X-射线照射前后无显著变化。结论 Ewing's 肉瘤细胞系 (RM-82) 接受 X-射线照射后 TNF- mRNA 表达明显升高, 且呈现时间、剂量依赖性。放射治疗可诱导 Ewing's 肉瘤细胞系 (RM-82) 产生 TNF-, 既可能提高放疗的敏感性, 也可能对机体产生不利影响。

关键词: 尤文氏肉瘤细胞系; 肿瘤坏死因子; 转化生长因子; 放射治疗

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 09-0550-03

0 引言

最近研究显示许多组织放疗后的病理生理反应涉及许多细胞因子, 这些细胞因子构成放射损伤炎症反应及纤维化过程中多细胞间网络反应的基础^[1,2]。细胞因子不但在正常组织放射损伤过程中, 而且在肿瘤细胞的杀伤过程中发挥重要作用。

收稿日期: 2003-09-30; 修回日期: 2004-03-31
基金项目: 国家留学基金资助项目 (20842007)
作者单位: 1. 430023 武汉, 华中科技大学附属协和医院
肿瘤诊疗研究中心; 2. 汉口空军医院; 3. 德国萨尔大学

肿瘤坏死因子(TNF-)是一个多功能细胞因子,由于其具有直接杀伤肿瘤细胞和引起肿瘤出血坏死而用于恶性肿瘤的治疗。TGF- 是一个多功能生长因子家族,许多正常组织和肿瘤细胞能合成 TGF- ,它与细胞的增殖、分化、胚胎发育、血管生成、伤口愈合及细胞凋亡有关;而且 TGF- 能提高放疗敏感性^[3]。另一方面,TNF- 和 TGF- mRNA 与正常组织的放射性损伤密切相关^[1-3]。该文讨论尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)细胞系 RM-82 接受 X-线照射后内源性 TNF- 和 TGF- 产生的可能性及其意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 Ewing's 肉瘤细胞系(RM-82)由德国明斯特大学医学院 Dr.vanValen 友好赠送。RM-82 细胞生长于 RPMI-1640 培养液中(德国 Biochrom 公司)。其中含有 10% 热灭活小牛血清和抗生素(青霉素 100U/ml, 链霉素 50μg/ml)(德国 Biochrom 公司)。RM-82 细胞传代入贴壁面覆有胶元蛋白(5μg/cm²; 德国 Boehringer 公司)的 25cm² 培养瓶(德国 Greiner 公司)中传代培养。培养条件为 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度。

1.2 细胞照射 1 × 10⁶ 细胞传代培养 72h 后细胞松散贴壁生长。弃去陈旧培养液用 PBS 液小心清洗后换入 4ml 新鲜培养液。随后用 4MV 直线加速器照射(西门子公司,德国),剂量率:2.5 Gy/min, 剂量关系组 6 瓶分别给以 2Gy,5Gy,10Gy,20Gy,30Gy,40Gy 剂量照射。6h 后提取细胞总 RNA。时间关系组 7 瓶:给予 30Gy 照射后 1h,3h,6h,12h,48h,72h 分别提取 RNA。两组对照细胞在相同实验条件下未予照射。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成 提取细胞总 RNA,取 2μg 逆转录成 cDNA,用于 PCR 扩增。RNA 提取试剂盒,cDNA 合成试剂盒均购自德国 Qiagen 公司。实验按试剂盒说明书进行。

1.4 实时荧光 PT-PCR 应用 Lightcycler 仪采用 TaqMan 法^[4]。内参照采用人看家基因 GAPDH。其序列为:TNF- (167bp):TNF- :5'-AGGCGG TGCTTGTTCTCA -3 ;5'-GTTTCGAGAA GATGATCTGACTGCC -3 ;TNF- 探针:5'-CCAGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGAC -3 。 TGF- (114bp):TGF- :5'-GGCTGGAAGTGG ATCCACGA -3 ;5'-GTTGTACAGGGCCAGGACCT -3 ;TGF- 探针:5'-ATGCCAACTTCTGCCTC GGGCC-3 。 GAPDH(226bp):GAPDH:5'-GAA GGTGAAGGTCGGAGTC -3 ;5'-GAAGAT GGTGATGGGATTTC -3 ;GAPDH 探针:5'-

CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC -3。PCR 扩增的同时 Lightcycler 仪于 PCR 扩增指数增长期自动定量检测。样本 mRNA 定量表达:超过基础(照射前)TNF- mRNA 多少倍:[TNF- /GAPDH] (照射)/[TNF- /GAPDH] (未照射)。

2 结果

2.1 TNF- mRNA 表达与放射剂量的关系 未照射细胞显示有低水平的 TNF- mRNA 的基础表达,X-线照射 2Gy 以后即可见 TNF- mRNA 的表达随照射剂量的增高而逐渐升高,达 40Gy 时 TNF- mRNA 达高峰是未照射对照组的 108 倍,见图 1。

2.2 TNF- mRNA 表达时间依赖关系 未照射细胞显示有低水平的 TNF- mRNA 的基础表达,照射后 3h 即可见 TNF- mRNA 表达逐渐升高,照射后 6h 达高峰,为未照射对照组的 18 倍,于 24h 后降至基础水平,见图 2。

2.3 TGF- mRNA 的表达 Ewing's 肉瘤细胞系(RM-82)受照前均有重要的基础 TGF- mRNA,但是受照后其 TGF- mRNA 的表达未见明显增高。

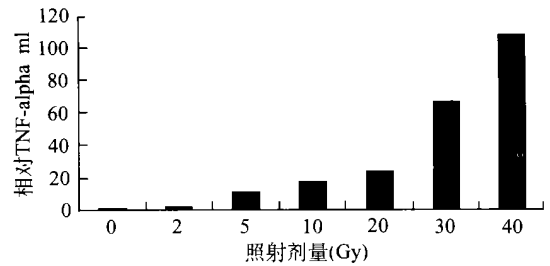


图 1 RM-82 细胞系 TNF mRNA,表达与放射剂量的关系:相对 TNF mRNA 表达水平

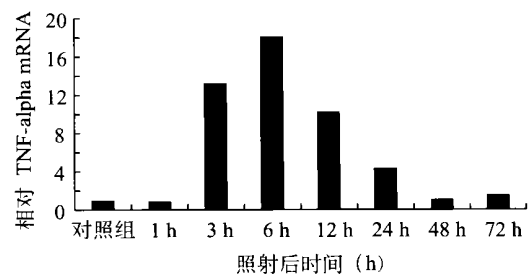


图 2 RM-82 细胞系 TNF mRNA,表达与时间的关系:相对 TNF mRNA 表达

3 讨论

实时荧光 RT-PCR 是近几年发展的在 PCR 指数增长期精确定量检测 PCR 产物的新方法。它可将 PCR 扩增与 PCR 产物检测同时完成。与传统的 RT-PCR 法比较,此法因不需要 PCR 扩增后电泳等步骤,检测快速、灵敏、易于操作,而且由于系统内荧光探针

的应用,从而保证 PCR 产物检测的特异性^[4]。

本文用该法检测 Ewing's 肉瘤细胞系 (RM-82) X-线照射前后 TNF- mRNA 表达水平的变化,由于照射后细胞的亚致死性损伤修复开始与受照后 1h^[4]。因此在进行不同受照剂量对 TNF- mRNA 表达影响的实验时选择受照后 6h 进行分析。结果显示,X-线照射可诱导 RM-82 细胞系产生 TNF-。而且随着照射剂量的增加 RM-82 细胞 TNF- mRNA 表达逐渐增高,照射剂量达 40Gy 时 TNF- mRNA 表达达高峰;另一方面,照射后 3h 后 TNF- mRNA 表达逐渐升高,6h 达高峰。以上结果显示 X-线照射可诱导某些肿瘤细胞产生 TNF-。

TNF- 是一个多功能细胞因子,主要参与炎症反应和免疫反应。它对肿瘤细胞有直接杀伤作用并可引起肿瘤出血坏死。新近研究证实 TNF- 可抑制某些肿瘤细胞的增殖及诱导肿瘤细胞凋亡。体内体外实验已证实 TNF- 与放疗有协同作用^[1,2]。另一方面,TNF- 也参与放射性肺损伤的发生和发展过程^[4]。

RM-82 细胞受照后产生释放 TNF- 的分子机理不明。有学者认为 Ewing's 肉瘤 TNF- 产生增多与丝氨酸磷酸化有关。另外,由于 Ewing's 肉瘤细胞(包括 RM-82)表面存在对 TNF- 高亲和力的结合位点^[5],因此,这个细胞因子可能作为 RM-82 细胞的自分泌调节因子调节其功能,如:上调 ICAM-1 和 类 MHC 抗原的表达;抑制细胞增殖;刺激结合素介导的细胞与细胞基质间的反应。肿瘤细胞与细胞外基质黏附性糖蛋白之间的相互反应在肿瘤侵蚀和转移的复杂过程中发挥十分重要的作用^[4]。这种黏附反应主要由细胞表面受体的 α_1 -结合素家族介导。

肿瘤细胞受照后产生 TNF- 的生物学意义目前还不明。一方面 TNF- 有直接抗肿瘤及放射增敏作用。另一方面,某些肿瘤细胞(如纤维肉瘤转移模型)产生的 TNF- 不但对正常组织产生损伤,而且可能促进肿瘤转移。TNF- 还与肿瘤恶液质有关^[2,4],因此可影响肿瘤患者的一般状态。

放射治疗是治疗 Ewing's 肉瘤的主要局部治疗手段之一,如果肉瘤发生在胸壁,其周围有重要器官如肺和脊髓,在某些情况下放疗照射野中不可避免有部分正常肺组织;当对肺转移灶进行放疗时;当胸壁病灶累及胸膜需行半边胸腔照射时等等,都将可能造成正常肺组织的放射性损伤。由于 TNF- 在放射性肺损伤发生及发展过程中发挥极其重要的作用,Ewing's 肉瘤细胞受照后可加重炎症反应,因此对发生于胸壁者,需注意对正常肺组织的保护。

转化生长因子(TNF-)对细胞的生长具有有效而独特的调节作用,它与肿瘤的发生和发展密切相关^[7]。

新近研究显示 TGF- 在放射性肺损伤中,发挥极其重要的作用^[9]。目前仅有不多的研究报道体外培养肿瘤细胞如乳腺癌细胞系,直肠癌细胞系受 X-射线照射后诱导 TGF- 的产生^[8]。本研究结果在 RM-82 细胞未见 X-射线照射后诱导的 TGF- 产生增多,而另有报道在三维重建皮肤组织 X-射线照射后,可见 TGF- 产生增多,而在单层培养皮肤细胞却未见 TGF- 产生增多。可能三维组织结构、细胞与周围结缔组织的相互反应以及不同的细胞类别在调控 TGF- 中具有十分重要作用^[8]。因此需进一步进行动物实验。

细胞因子的自分泌和旁分泌作用与肿瘤的形成和发展密切相关。肿瘤周围细胞如成纤维细胞和血管平滑肌细胞等产生的细胞因子的自分泌作用可导致肿瘤基质形成,为肿瘤细胞的侵袭创造了有利的微环境。因此需进一步研究探讨 TNF- 和 TNF- 蛋白的活性,以及体内实验研究肿瘤组织和周围正常组织受 X-线照射后所产生的细胞因子的相互作用。

参考文献:

- [1] Gridley DS, Li J, Ka jioka EH, et al. Combination of pGL1-TNF- α gene and radiation (proton and gamma ray) therapy against brain tumor [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (6B): 4195-4203.
- [2] Fedorocko P, E gyed A, Vacek A. Irradiation induces increased production of haemopoietic and proinflammatory cytokines in the mouse lung [J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78 (4): 305-313.
- [3] Vodovotz Y, Lucia M, De Lucca AM, et al. Reduced hematopoietic function and enhanced radiosensitivity of transforming growth factor- β transgenic mice [J]. *Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)*, 2000, 90 (1): 13-21.
- [4] Rube CE, Wifert F, Uthe D, et al. Modulation of irradiation-induced tumor necrosis factor (TNF-) expression in the lung tissue by pentoxifylline [J]. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 2003, 56 (6): 1414-1425.
- [5] Van Valen F, Winkelmann W, Burdach S, et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor induces synergistic anti-proliferation response in human Ewing's sarcoma cells in vitro [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1993, 119 (10): 615-621.
- [6] Rube CE, Uthe D, Schmid KW, et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor (TGF-) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation [J]. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 2000, 47 (4): 1033-1042.
- [7] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish AF. Role of transforming growth factor in human disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342 (18): 1350-1358.
- [8] Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF- β and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000, 47 (2): 277-290.

[编辑:安凤;校对:杨卉]