

^{60}Co 射线照射后血管内皮细胞 CD54 表达变化及 PDTC 的干预作用

钟敏¹, 张广斌¹, 余争平¹, 罗成基²

Expression of CD 54 in the Blood Vessel Endothelial Cells Post ^{60}Co Ray Irradiation and Intervention Effect of PDTC

ZHONG Min¹, ZHANG Guan-g-bin¹, YU Zhen-g-ping¹, LUO Chen-ji²

1. Department of Military Occupational Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Institute of Combined Injury, Third Military Medical University

Abstract: Objective To elucidate the correlation between CD54 expressions in the blood vessel endothelial cells irradiated with ^{60}Co ray and adhesion of monocyte, such as HL-60, on their irradiated cells, and to study the effect of antioxidant PDTC on this process. **Methods** At 2h, 4h, 8h and 24h after ECV304 cells were exposed to ^{60}Co ray, the RA-induced HL-60 cells adhered to their irradiated endothelial cells were counted, expressions of CD54 mRNA and protein were measured by RT-PCR and FCM, respectively, the binding activity of NF- κ B-DNA was measured by EMSA. ECV304 cells were also pretreated with antioxidant PDTC and the parameters above were measured with the same methods. **Results** After 8 hours of irradiation, the number of HL-60 cells adhered to their irradiated endothelial cells increased significantly, and increased by 77% after 24 hours of irradiation compared with the control. The level of CD54 mRNA was enhanced by 36% and 182% respectively, after 2h and 24h of irradiation. CD54 protein expression improved by 66% ~ 268% after 4h ~ 32h of irradiation, compared with the control. The binding activity of NF- κ B-DNA reached the peak value after 2 hours of irradiation, and increased by 97% compared with the control. The binding activity of NF- κ B-DNA was suppressed by PDTC pretreatment and decreased by 44% after irradiated for 2 hours, compared with the group without PDTC pretreatment. The CD54 mRNA expression declined by 35%, and the adhered HL-60 cells reduced by 26% at 4h after their irradiation. **Conclusion** The increased CD54 expression is the molecular basis for the adhesion of HL-60 cells to the blood vessel endothelial cells irradiated with ^{60}Co ray. The antioxidant PDTC can inhibit CD54 expression. This can be used to control the leukocyte infiltration and inflammation induced by ionizing irradiation.

Keywords: ray; CD54; PDTC; NF- κ B

摘要:目的 研究血管内皮细胞在受 ^{60}Co 射线照射后粘附分子 CD54 的表达与单核样细胞在血管内皮细胞上粘附变化的关系,观测抗氧化剂 PDTC 预处理对 CD54 表达及白细胞粘附的影响。方法 培养的 ECV304 细胞接受 16Gy ^{60}Co 放射线照射后不同时间点,检测视黄酸诱导的单核样 HL-60 细胞在内皮细胞上的粘附数量,内皮细胞 CD54mRNA 及蛋白表达,核转录因子 κ B-DNA 结合活性以及抗氧化剂 PDTC 预处理对上述指标的影响。结果 照射后 8h,HL-60 细胞粘附数较对照显著上升,24h 时较对照增加 77%。受照后 2h,CD54mRNA 水平较对照增加 36%,24h 增加 182%。照射后 4~32h,CD54 蛋白表达较对照增加 66%~268%。NF- κ B-DNA 结合活性在照射后 2h 达峰值,较对照增高 97%。PDTC 预处理后 2h,NF- κ B-DNA 结合活性较未处理组下降了 44%,作用后 4h,CD54mRNA 表达量下降 35%,同时 HL-60 细胞粘附数减少 26%。结论 CD54 表达上调是 ^{60}Co 射线照射引起单核细胞在内皮细胞上粘附的分子基础,抗氧化剂 PDTC 可干预 CD54 表达,有利于控制放射线引起的炎性细胞粘附迁移及炎症反应。

关键词: 放射线;CD54;PDTC;NF- κ B

中图分类号:R818.74 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)03-0129-04

收稿日期:2003-04-18;修回日期:2003-07-25

作者单位:1.400038 重庆,第三军医大学劳动卫生学教研室,2.第三军医大学全军复合伤研究所

0 引言

肿瘤放射治疗时,放射线照射可引起周围正常组织血管损伤,其导致的白细胞渗出是受照组织普

遍表现的病变,可引发或/和加剧周围正常组织萎缩、纤维化甚至坏死,严重影响肿瘤放射治疗的安全性^[1]。细胞粘附分子在介导白细胞渗出过程中起了重要作用。CD54(细胞间粘附分子 ICAM-1)是炎症反应时介导白细胞在血管内皮细胞上粘附的关键分子,是白细胞进一步跨内皮细胞迁移的前提。探讨放射线照射对 CD54 表达是否有诱导作用及应用干预剂进行干预,可深入认识放疗后期正常组织炎细胞浸润的分子机制,为提高放疗安全性防治措施研究提供实验依据。本实验体外观测了血管内皮细胞在受 16Gy ⁶⁰Co 放射线照射后,CD54 的表达变化与单核样细胞在血管内皮细胞上粘附变化的关系,观测了抗氧化剂 PDTc 预处理对 CD54 表达及白细胞粘附的影响,以探讨放射线照射后组织炎细胞浸润的分子机制与干预措施。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与照射 (1) HL-60 细胞的诱导:细胞于含 10% 小牛血清的 RPMi1640 培养液中,37 °C,0.5% CO₂ 条件下培养至 1 × 10⁵ 个/ml,加入视黄酸,使终浓度达 5 × 10⁻³ mmol/L,继续培养 3 天,用于实验。(2) ECV₃₀₄ 细胞培养:将培养小室(Transwell 培养小室,孔径 3μm,Millipore 公司)置于 24 孔培养板中,室外加 600μl 培养液,小室内接种细胞 400μl(2 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 个/ml),在含 10% 小牛血清的 DMEM 中,37 °C,0.5% CO₂ 条件下培养,细胞生长至融合状态时接受 16Gy ⁶⁰Co 放射线照射。吸收剂量率为 0.521 Gy/min。

1.2 细胞粘附实验 于照射后 2h、4h、8h、24h,在培养小室中加入 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 个诱导的 HL-60 细胞,继续在培养条件下孵育 2h 后,培养小室用培养液冲洗两次,以 0.2% 台盼兰染色,计数膜上粘附的细胞。

1.3 CD54 蛋白表达量测定 于照射后 2h、4h、8h、24h、32h,胰酶消化细胞,70% 乙醇固定,进行流式细胞测定:用冷 PBA 洗涤细胞两次,以 PBA 封闭 20min,加 PBA 稀释的 CD54 单抗(1:100 Pharmin - gen)于 4 °C 作用 1h,冷 PBA 洗涤,加 PBA 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1:50)4 °C 避光作用 0.5 h,冷 PBS 洗涤后重悬于 PBS 中,置 FCM 测试管待测。正常细胞作相同处理。对照管不加单抗,其他步骤同测试管。CD54 蛋白表达量以平均荧光强度表示。

1.4 CD54mRNA 表达测定 生长至融合状态的 ECV₃₀₄ 细胞于照射后 2h、4h、8h、24h 常规法提取 RNA,经过 RNA 纯度鉴定和浓度测定,进行逆转录

RNA,PCR。CD54 引物:上游 5' AAAGTCATC CTGCCCCGGGG -3',下游 5' AGGGCAGTT TGAATAGCACA -3',扩增片断为 189bp。-actin (内参)引物:上游:5' ACCACAGCTGAGAGG GAAATCG -3',下游:5' AGAGGTCTTTAC GGATGTCAACG -3',扩增片段为 281bp。引物由 Sangon 公司合成,经 PAGE 纯化。循环参数:94 °C 1min,63 °C 1min,72 °C 1min,40 cycles,72 °C 12 min。

1.5 凝胶电泳迁移率分析(EMSA)测 NF- B-DNA 活性 (1)核蛋白提取:内皮细胞接受 16Gy 放射线照射后 2h、4h、8h、24h,刮取细胞提取核蛋白。用紫外吸收法对蛋白定量。(2)EMSA 分析:经 r-³²P-ATP 标记、乙醇沉淀纯化的 NF- B 寡核苷酸探针(Promega),在含 PolydIdC 的反应体系中与核蛋白在 37 °C 作用 30min 后,行 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶在 -70 °C 下放射自显影。用凝胶扫描仪对 X 光片条带灰度进行扫描,NF- B-DNA 结合活性大小由条带光密度(INT) × 面积(mm²)值表示。

1.6 PDTc 的干预作用 于照射前在 Transwell 培养小室中加入 PDTc(终浓度为 100μmol/L)干预剂作用 45min 后,细胞接受放射线照射及上述指标测定。

2 结果

2.1 ⁶⁰Co 放射线照射对诱导的单核样 HL-60 细胞在内皮细胞上粘附的影响 表 1 所示,照射后 8h,粘附细胞数较对照有显著意义上升,24h 照射组细胞粘附数较对照增加 77%。

表 1 照射对单核样 HL-60 细胞粘附的影响(细胞数 $\bar{x} \pm s$)

	对照组	16Gy
2h	159.3 ± 16.21	162.0 ± 20.12
4h	165.2 ± 20.63	211.0 ± 28.60
8h	175.6 ± 19.25	284.7 ± 22.29
24h	172.3 ± 7.039	305.0 ± 17.66

与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 ⁶⁰Co 放射线照射对内皮细胞 CD54mRNA 和蛋白表达的影响 CD54PCR 产物条带灰度扫描值 INT × mm² 与 -actinPCR 产物灰度扫描值 INT × mm² 比值结果见表 2。16Gy 射线照射引起 CD54 mRNA 表达上调,照射后 4h,CD54mRNA 表达较对照增加 1.36 倍,8h、24h 分别较对照增加 1.42 和 1.82 倍。

表 2 16 Gy ⁶⁰Co 射线照射 ECV₃₀₄ 细胞后不同
时点上 CD54 mRNA 表达变化

	16 Gy	
	A	B
对照	0.838 ±0.041	100
2h	1.138 ±0.054	136
4h	1.980 ±0.097	236
8h	2.031 ±0.104	242
24h	2.360 ±0.131	282

$$A = \text{INT} \times \text{mm}^2_{\text{CD54}} / \text{INT} \times \text{mm}^2_{\text{actin}}, B = \frac{V_A - V_{\text{对照}}}{V_{\text{对照}}} \times$$

100%+100

与对照比较, $P < 0.05$

采用流式细胞技术测定 CD54 蛋白表达, 结果见图 1。16Gy 射线照射后 2h, 内皮细胞 CD54 表达量较对照增加 35%, 4h、8h、24h 分别增加 66%、127% 和 248%, 照射后 32h, CD54 表达量仍保持在较对照增加 268% 的水平。

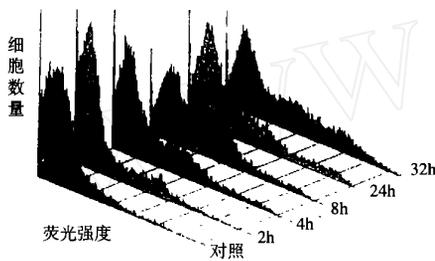


图 1 16 Gy ⁶⁰Co 射线照射内皮细胞后
不同时间点上 CD54 表达变化

2.3 ⁶⁰Co 放射线照射对内皮细胞 NF- κ B DNA 结合活性的影响及 PDTC 的干预作用 ⁶⁰Co 放射线照射可诱导内皮细胞 NF- κ B DNA 结合活性增强, 结果见图 2。放射线对内皮细胞 NF- κ B 的激活峰值发生在照射后 2h, 较对照增高 97%, 随后 NF- κ B DNA 结合活性有下降, 在 24h 较对照增高 30%。

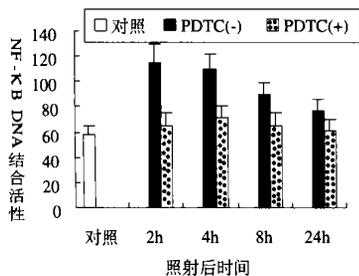


图 2 放射线照射后内皮细胞 NF- κ B DNA 结合
活性的变化及 PDTC 的干预作用

实验用抗氧化剂 PDTC 预处理受照细胞, 结果见图 2。照射后 2h、4h、8h、24h, 处理组 NF- κ B DNA 结合活性分别较未处理组下降了 44%、35%、27%、

20%。

2.4 PDTC 对 CD54 mRNA 表达的干预 CD54 基因的启动子上, 有 B 样序列, NF- κ B 可调控 CD54 的表达。因此理论上推测, PDTC 对 NF- κ B 活性抑制可能进一步影响 CD54 的表达。实验观测了 PDTC 预处理后受照细胞 CD54 mRNA 的表达, RT-PCR 扫描结果见图 3, 可见经 PDTC 预处理的细胞受照后 4h, CD54 mRNA 表达量较未处理细胞下降 35%, 8h 和 24h 降幅也分别达 31% 和 30%。

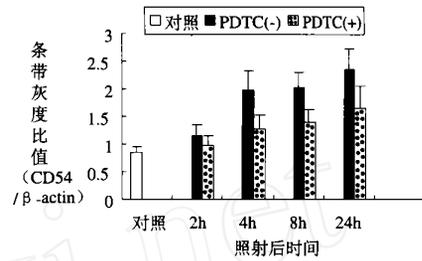


图 3 PDTC 预处理对放射线照射引起 ECV₃₀₄ 细胞
CD54 mRNA 表达增高的干预作用

2.5 PDTC 预处理对单核样 HL-60 细胞在受照内皮细胞上粘附的影响 16Gy ⁶⁰Co 射线照射后单核样 HL-60 细胞在受照血管内皮细胞上的粘附数增多, 经 PDTC 预处理, 受照后 2h、4h、8h、24h 时点上, HL-60 细胞的粘附数分别较同期未处理组下降 6.8%、26%、20%、20%, 见图 4, 说明 PDTC 可干预单核样细胞在血管内皮细胞上的粘附。

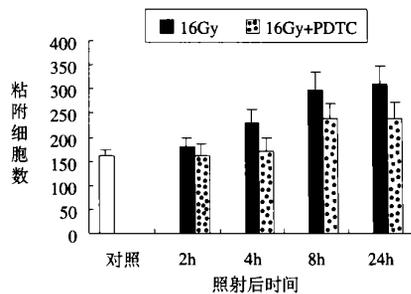


图 4 放射线照射后单核样 HL-60 细胞在内皮
细胞上的粘附及 PDTC 的干预作用

3 讨论

在肿瘤放疗后常出现受照肿瘤周围的正常组织纤维化、变性萎缩、坏死的并发症, 严重影响了肿瘤放疗的安全性。炎细胞浸润被认为是与该效应产生密切相关的重要因素之一^[1]。研究照射后炎细胞浸润的分子机制, 对病变发生发展过程的认识及防护措施研究无疑是非常有必要的^[2,3]。CD54 是炎症反应时介导白细胞在血管内皮细胞上粘附的关键分子。内皮细胞分泌的 CD54 的胞外第 1 和第 3 结构区, 可分别与白细胞上的 α_2 整合素 LFA-1 和

Mac-1 结合而实现内皮细胞对白细胞的扣押,是白细胞进一步跨内皮细胞迁移的前提。

本实验观察到,16Gy ^{60}Co 放射线照射血管内皮细胞后 4h,CD54 基因、蛋白表达水平明显上调,在粘附实验中也相应观察到放射线照射后 8h,粘附细胞数较对照有显著意义上升,24h 照射组细胞粘附数较对照增加 77%。Hallahan,Gaugler 等^[4,5],也观察到放射线照射对细胞或组织 CD54 的上调作用,并认为该效应与放射线引起的白细胞在组织的浸润相关。CD54 基因敲除小鼠肺组织中由照射引起的炎细胞浸润明显减少,用 mAb-CD54 预处理,可明显减少放射线辐照后白细胞在肠系膜血管内的迁移。这些实验均说明放射线引起 CD54 上调是受照后炎细胞粘附浸润的重要分子基础。NF- κ B 是调控“即早反应基因”的重要转录因子,诸多炎症相关分子基因的增强子或启动子上,都有 B 序列。CD54 基因启动子上,也有 B 样序列。放射线照射干扰了机体正常的活性氧清除系统,使活性氧堆积,进而诱导 NF- κ B 活化。实验观察到 ^{60}Co 放射线照射对 NF- κ B 的激活峰值发生在照射后 2h,但在受照后 4~24h,NF- κ B DNA 结合活性仍高于对照。NF- κ B 激活是 CD54 表达上调的基础,因此抑制 NF- κ B 激活可干扰包括 CD54 在内的炎症反应相关分子的表达,进而控制炎细胞浸润^[6]。实验用抗氧化剂 PDTC 预处理受照细胞,结果 PDTC 可使照射后 2~24h 各时点 NF- κ B 活性分别较未处理组下降

44%,35%,27%,20%; 受照后 4h、8h 和 24h CD54 mRNA 表达量较未处理细胞分别下降 35%、31% 和 30%;HL-60 细胞的粘附数分别较同期(2h,4h,8h,24h)未处理组下降 6.8%、26%、20%、20%。结果说明用抗氧化剂处理,可干预单核样细胞在内皮细胞上的粘附,是预防放疗后期组织炎细胞浸润的治疗途径之一。

参考文献:

- [1] Steven Quarmby, Pat Kumar and Shant Kumar. Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interaction[J]. Int J Cancer, 1999, 82 (3): 385-395.
- [2] Hildebrandt G, Maggiora L, Rodolf F, et al. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro[J]. Int J Radiat Biol, 2002, 78 (4): 315-325.
- [3] Hallahan DE, Kuchibhotla J and Wylie C, et al. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium[J]. Cancer Res, 1996, 56 (22): 5150-5155.
- [4] Gaugler MH, Siquiban C, Meeren VD, et al. Late and persistent upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival radiation in human endothelial cells in vitro. Int J Radiat Biol[J]. 1997, 72 (2): 201-209.
- [5] Hallahan DE and Viradachalam S. Intercellular adhesion molecule-1 knockout abrogates radiation-induced pulmonary inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (12): 6432-6437.
- [6] Meineke V, Moede T, Gilbertz K, et al. Protein kinase inhibitors modulate time-dependent effects of UV and ionizing irradiation on ICAM-1 expression on human hematoma cells[J]. Int J Radiat Biol, 2002, 78 (7): 577-583.

[编辑:周永红;校对:刘红武]

第三届中国肿瘤学术大会将在广州召开

为进一步促进国内外学术交流,提高医疗科研水平并加强继续教育,中国抗癌协会及中华医学会肿瘤学会决定于今年 11 月 11~14 日召开第三届中国肿瘤学术大会。此次大会由中山大学肿瘤防治中心承办,会议地点定于广州最具现代性的会展中心——琶洲国际会议展览中心。

本次会议将邀请国内外知名学者与会,包括诺贝尔医学奖获得者及美国临床肿瘤学会(ASCO)专家,传播肿瘤学最前沿的发展动态;大会报告面向广大医学科技工作者,安排了丰富的继续教育内容;会议还安排了 30 个分会场,供各个肿瘤专业委员会充分交流探讨。

欢迎广大医学科技工作者踊跃投稿、与会,详情请登陆我们的网站: <http://www.cco.org.cn>; 联系电话: 020-87343268。

第三届中国肿瘤学术大会组委会