

B16 黑色素瘤细胞对血管内皮细胞辐射损伤后侵袭作用机理的研究

朱涵能 盛民立

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 通过体外培养血管内皮细胞,运用 ^3H -TdR 标记示踪方法建立体外 B16 黑色素瘤侵袭模型,对 15 Gy ^{60}Co γ 射线照射血管内皮细胞前后侵袭率的时相变化进行研究,而且运用放免及酶标技术检测辐射前后血管内皮细胞分泌 PGI_2 、 TXB_2 、TPA、PAI 的时相性变化,以探讨辐射在肿瘤转移中的作用机理。结果表明:血管内皮细胞电离辐射后, B16 黑色素瘤对内皮细胞单层的侵袭率显著高于对照组; B16 黑色素瘤侵袭过程中, PGI_2 、 TXB_2 和 TPA、PAI 这两对平衡因子失去平衡;电离辐射后,血管内皮细胞 PGI_2 分泌减少, TXB_2 和 TPA 分泌增加,其时相性变化与侵袭率变化相对应。提示:电离辐射对血管内皮细胞功能损伤在肿瘤侵袭和进一步转移过程中起着重要作用。

关键词 γ 辐射损伤,血管内皮细胞, B16 黑色素肿瘤侵袭

辐射对正常细胞的致癌、致畸机理研究一直受到人们的关注,早在 70 年前,人们就注意到局部或全身性电离辐射可导致正常组织细胞的恶变,以使癌的发病率增加,也可作为诱导因素在肿瘤的生成以及随后的扩散过程中起作用,最终导致肿瘤病人的发病率和死亡率上升。肿瘤转移在临床上为绝大多数恶性肿瘤病人的致死性问题^[1]。血管内皮细胞组成了血管内膜层,在整个肿瘤转移过程中,内皮细胞的形态和功能以及与肿瘤细胞的相互关系有着重要作用。血管壁成分中内皮细胞对辐射最为敏感,血管内皮层的辐射损伤,在自然发生及辐射诱导的肿瘤组织进一步扩散中有一定的作用。本文通过体外培养血管内皮细胞,运用同位素标记示踪方法建立体外肿瘤细胞侵袭模型,观察辐射前后肿瘤侵袭率的时相变化,同时,运用放免及酶标技术检测电离辐射前后内皮细胞分泌 PGI_2 、 TXB_2 、TPA 和 PAI 的时相变化,以探讨内皮细胞辐射损伤在肿瘤侵袭过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 小牛主动脉内皮细胞的培养及鉴定

按上海医科大学放射医学研究所第四研究室已成熟的小牛内皮细胞培养方法进行,内皮细胞特异性含有第 VIII 因子相关抗原 (VIII-Ag),通过免疫酶联组织化学 PAP 法鉴定细胞胞浆中有棕色颗粒,即为内皮细胞。

国家自然科学基金资助课题

收稿日期:初稿 1996-10-24,修回 1997-03-20

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 B16 黑色素瘤细胞内皮细胞层侵袭模型建立

第 2~3 代体外培养的小牛主动脉内皮细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化后，定量接种于 24 孔培养板中，每孔以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种，用含 20%小牛血清的 199 培养液培养至细胞汇合。

在对数生长期的 B16 黑色素瘤细胞培养瓶中，加入 2~3ml 37×10^3 Bq/ml 的 $^3\text{H-TdR}$ ，孵育 3 h 用胰酶消化形成悬液，用 D-hanks 液洗 3 次，离心去除上清液，去除游离的 $^3\text{H-TdR}$ ，以 3×10^4 个细胞/孔浓度加入培养孔中，24h 后，去除培养孔中的培养液，用 D-hanks 液冲洗 3 次，弃去上清液后，将培养孔中细胞用胰酶消化后加入闪烁瓶中，检测放射性 cpm 数，cpm 数与总 cpm 数值之比的百分率为侵袭率，分别检测正常情况及辐射后 24h 内侵袭率的时相变化。

1.3 TPA、PAI、PGI₂ 和 TXB₂ 检测

PGI₂ 和 TXB₂ 药盒购自苏州医学院血栓与止血研究室；TPA 和 PAI 药盒购自上海医科大学分子遗传实验室；收集细胞培养液，-20℃ 下贮存，用上述药盒按照说明书要求进行测试。

1.4 电离辐射

^{60}Co 辐射源 γ 射线照射，剂量为 15 Gy，照射量率为 249. 2Gy/min，照射距离为 60 cm，在第二军医大学 ^{60}Co 源室进行。用相差显微镜形态观察；实验结果采用 t 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 血管内皮细胞辐射前后肿瘤侵袭率的时相变化

由表 1 可见，15Gy ^{60}Co γ 射线照射后，B16 黑色素瘤细胞对内皮细胞单层的侵袭率显著高于正常对照组，但在 6~12h 时，两者侵袭率基本相同。辐射后 3h 时，肿瘤细胞侵袭率上升非常显著。

Tab.1 Invasive degree of B16 Melanoma on vascular endothelial cells after exposure 15 Gy γ -ray $\bar{x}\pm s$ (n=6)

Time/h	Unirradiated group		Irradiated group	
	cpm	rate/%	cpm	rate/%
Control	122.17±40.21	—	133.85±4.31	—
3	21.99±5.34	18.00	53.55±7.10	40.01 ⁽¹⁾
6	59.00±17.55	48.29	60.24±8.34	46.50
12	69.33±25.76	56.75	77.58±7.49	57.96
18	73.10±17.74	59. 84	101.64±7.51	75.94 ⁽¹⁾
24	91.83±3.56	75.17	123.94±5.33	92.60 ⁽¹⁾

⁽¹⁾p<0.01 vs unirradiated group

2.2 15Gy γ 照射后，内皮细胞 PGI₂、TXB₂ 分泌情况

表 2 所示，15Gy 照射后，在最初的 0~4 h，TXB₂ 分泌急剧上升，然后一直保持较高水平。PGI₂ 急剧下降，在 4~12 h 之间有一反弹上升趋势，然后呈下降趋势。

Tab.2 The secretion degree of PGI₂ and TXB₂ from vascular endothelial cell after exposure 15Gy γ-ray (x±s/cpm)

Time/h	n	PGI ₂	n	TXB ₂
Control	12	1850.20±534.87	10	292.97±129.46
4	8	812.38±776.90 ⁽²⁾	12	595.63±95.71 ⁽²⁾
8	8	1669.41±915.94	10	707.19±112.01 ⁽²⁾
12	11	2329.71±1234.68	12	580.97±112.01 ⁽²⁾
16	9	999.61±671.71 ⁽²⁾	12	587.96±142.16 ⁽²⁾
20	10	1226.72±726.40	8	552.63±73.67 ⁽¹⁾
24	12	990.38±493.44 ⁽¹⁾	9	609.09±115.30 ⁽¹⁾

⁽¹⁾p<0.05 ⁽²⁾p<0.01 vs control

2.3 15Gy γ 照射后，内皮细胞 TPA、PAI 分泌时相性变化

表 3 所示，电离辐射后，TPA 在 0~8 h 显著增大，随后持续下降，但仍高于对照组，PAI 变化不显著。

2.4 15Gy γ 照射后，内皮细胞形态变化

相差显微镜观察发现，电离辐射后 24h 内内皮细胞形态无显著性变化，24 h 后，有部分细胞肿胀、脱落和坏死。

Tab.3 The secretion degree of TPA and PAI from vascular endothelial cell after exposure 15Gy γ-ray (x±s/cpm n=6)

Time/h	TPA	PAI
Control	5.63±1.81	3.99±0.26
4	10.56±2.54 ⁽²⁾	3.91±0.55
8	12.58±1.97 ⁽²⁾	4.14±0.55
12	7.42±1.27 ⁽¹⁾	4.08±1.08
16	8.09±1.81 ⁽¹⁾	4.05±0.71
20	7.64±1.28 ⁽¹⁾	4.18±0.76
24	6.74±1.44	3.93±0.39

⁽¹⁾p<0.05 ⁽²⁾p<0.01 vs control

3 讨论

肿瘤转移已成为人们越来越关注和研究的焦点。肿瘤细胞的转移过程极为复杂，不仅与肿瘤细胞本身的遗传特性、表面受体及其分泌物物质有关，而且与宿主组织特性、免疫系统、血液凝结、纤溶系统紧密相连。肿瘤细胞穿过血管内壁进入血液循环及从血液循环中脱出，形成转移灶，最后增殖成转移瘤，都与内皮细胞有着紧密联系。与此同时，血液凝结系统、纤溶系统也参与了肿瘤转移和抗肿瘤转移过程，使对肿瘤转移机理的研究更为复杂^[3,4]。

内皮细胞组成血管的内层，不仅是内皮下层和血液之间的屏障，而且还通过本身的多种物理和生化功能维护正常生理状况。曾有人作过以下实验：体外培养内皮细胞，待汇合后用酶将内皮细胞消化脱落而不破坏内皮下基质后，用同位素标记的方法定量检测肿瘤细胞侵袭率，以正常内皮细胞单层作对照，结果发现肿瘤细胞对基质的侵袭率显著高于内皮细胞单层。保持内皮细胞单层的形态和功能完整性是抗肿瘤转移的一个主要屏障。在肿瘤转移过程中，肿瘤细胞释放出前凝结因子，合成凝血酶和纤维蛋白，激活血小板及凝血系统，在肿瘤细胞周围形成凝结团块，保护肿瘤细胞躲避免疫系统的攻击，使肿瘤细胞易于对内皮层的粘

附和浸润。肿瘤细胞还能分泌纤维蛋白溶解酶原激活 (PAI), 激活纤溶酶原, 形成纤溶酶, 溶解内皮细胞间质及基底膜, 有助于肿瘤细胞的侵袭。血管内皮细胞能够分泌 PGI_2 、 TXB_2 、TPA、PAI, 前列腺环素 (PGI_2) 具舒张血管的作用, 正常情况下内皮细胞分泌的 PGI_2 和其拮抗物 TXB_2 之比为 5~10:1, 在血管内壁保持非血栓状态, 抑制肿瘤细胞血栓团块的粘附。内皮细胞还可分泌 TPA 和 PAI, 通过调控纤维蛋白的溶解, 保持平衡以防止肿瘤的侵袭。表明内皮细胞的生化特性对肿瘤转移具有天然屏障作用^[5,6]。

对血管内皮细胞的辐射损伤机理研究表明, 内皮细胞具有较高的辐射敏感性, 后期的辐射损伤可引起内皮细胞肿胀、脱落和坏死、血栓形成、血管缩小和小血管周围压力增大, 这些都与血流阻断和血管栓壁迅速发生的机制有关, 为肿瘤转移提供有利的“土壤”条件。实验结果表明, 15Gy γ 照射后, 血管内皮细胞 PGI_2 分泌减少, TXB_2 合成增加, TPA 分泌增加; B16 黑色素瘤对内皮细胞单层侵袭率显著上升。提示血管内皮细胞的辐射损伤有利于肿瘤细胞的侵袭和进一步转移, 而且内皮细胞的辐射损伤表现在其凝结系统和纤溶系统平衡的破坏, 为肿瘤细胞的侵袭和转移提供条件。还可发现电离辐射后, 血管内皮细胞 PGI_2 、 TXB_2 、TPA 分泌的时相性变化与肿瘤侵袭率变化基本吻合, 在最初的 0~6 h, PGI_2 急剧下降, TXB_2 急剧上升、TPA 上升显著, 此时辐射后肿瘤侵袭率显著增高。而 8~12h PGI_2 有一反弹趋势, TPA 分泌下降, 此时辐射后肿瘤侵袭率与正常对照侵袭率无显著差异。形态观察表明, 电离辐射后 24h 内, 内皮细胞的形态完整性未发生变化, 但其生化功能受到损伤, 继而发生肿瘤肿胀和坏死。由此产生的内皮层间隙增大和细胞下基膜暴露是肿瘤细胞侵袭和粘附的诱导因素之一。根据上述实验结果说明, 血管内皮细胞电离辐射损伤后提高肿瘤侵袭率, 主要是通过辐射对血管内皮细胞凝结系统和纤溶系统的破坏, 使 PGI_2 、 TXB_2 和 TPA、PAI 两对平衡因子失调, 进一步对内皮细胞形态完整性造成破坏, 为肿瘤转移提供了适宜的“土壤”。

参 考 文 献

- 1 Boice *et al.* Biological Aspects of Radiation Carcinogenesis, Progress in Cancer Research and Therapy, New York: Raven Publishing, 1984, 9
- 2 盛民立主编. 血管内皮细胞与疾病, 上海医科大学出版社, 1993; 170
- 3 Kenneth V. Honn. Cancer and Metastasis Reviews, 1992, 11; 223
- 4 Han C. Kwann. Cancer and Metastasis Reviews, 1992, 11; 291
- 5 Markus G. Enzyme, 1988, 40; 150
- 6 Santosh Nigam *et al.* Cancer and Metastasis Reviews, 1992, 11; 411
- 7 Fantone J C. Oncology, 1993, 40; 421
- 8 潘文青等. 国外医学肿瘤分册, 1987, 4; 201

(下转第 241 页 Continued to p241)

DYNAMIC CHANGES OF THE EARLY PROTEIN SYNTHESIS IN MURINE IMMUNE CELLS AFTER LOW DOSE RADIATION

Chen Shali Liu Shuzheng

(MPH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences,
Changchun 130021)

ABSTRACT It was shown that there was a marked increase in protein synthesis of thymocytes that were metabolically labelled with ^3H -Leu for 4, 6, 8 and 12 hours in low dose irradiated mice showing 33.26%, 51.48%, 51.54% and 34.98% increase respectively at different time intervals of incubation when the thymic and splenic cells were sampled 4 hours after whole body irradiation (WBI) with 75 mGy X-rays. The results suggest that there is an increase in protein synthesis with its peak at 6~8 hours after radiation. Changes in protein synthesis of immune cells in mice 4 hours after radiation and incubated for 4~12 h were observed with SDS-PAGE followed by densitometrical scanning. It is revealed that 28 kD protein synthesis was increased gradually within 12 hours of incubation and 43 kD protein synthesis was increased in the thymocytes rapidly reaching a maximum 2 hours after incubation. It was also exhibited that the synthesis of 43 kD protein and 32 kD protein was increased in the splenocytes 2 hours after incubation. These findings may have implications in the mechanism of immunoenhancement and adaptive response induced by low dose radiation.

KEYWORDS Low dose radiation, Immune cell, Protein, Synthesis

(上接第 245 页 Continued from p245)

MECHANISM STUDY OF VASCULAR ENDOTHELIAL CELL RADIATIVE INJURY INFLUENCING B¹⁶ MELANOMA INVASION

Zhu Hanneng Shen Mingli

(Shanghai Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT In order to test the influence of endothelial cell radiative injury on the tumor invasion rate at different time after exposure to $^{15}\text{Gy } ^{60}\text{Co } \gamma$ -ray, we cultured vascular endothelial cell in vitro and set up B¹⁶ melanoma invasion model. Meanwhile, the secretion of PGI₂, TXB₂, TPA and PAI from endothelial cells after irradiation were measured by radioimmunologic and enzyme labeling techniques. The results showed that for endothelial cells exposed to radiation the invasion rate of tumor cell were considerably larger than that of control, the secretion of PGI₂ was decreased significantly, the secretion of both TXB₂ and TPA were increased obviously. The phase change of invasion rate corresponds with the changes of TXB₂, PGI₂ and TPA. The results suggested that endothelial cells play an important role in tumor invasion and metastasis, the disorder of endothelial cell anticoagulation and fibrin lysis function caused by radiation might be the main reason for endothelial cell radiative injury accelerating the B¹⁶ melanoma invasion.

KEYWORDS Radiation injury, Vascular endothelial cell, B¹⁶ melanoma cell invasion