

X 线照射增加肺癌细胞 A549 产生 IL-8 的研究

宋颖辉¹ 王妮拉² 胡锦跃² 柴琴² 阳帆帆² 王桂华²

¹湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)肝胆外科,长沙 410005;²湖南省长沙市中心医院肿瘤科 410004

【摘要】 目的 观察照射对肺癌细胞 A549 产生 IL-8 的影响及探索其可能机制。**方法** 采用不同剂量 X 线照射 A549 细胞,于照射后不同时间收集细胞上清,细胞 RNA 以及蛋白质,采用 RT-PCR 检测照射后 A549 细胞 IL-8 mRNA 表达水平,并进一步行实时定量 PCR 验证照射后 A549 细胞 IL-8 mRNA 表达水平,行 ELISA 检测照射后上清中 IL-8 表达水平,Western Blot 检测照射后 A549 细胞信号通路分子表达情况,采用 p38 MAPK 抑制剂、NF- κ B 抑制剂及 ROS 清除剂预处理细胞,ELISA 验证抑制剂对照射诱导 A549 细胞产生 IL-8 表达水平的影响。**结果** 照射增加 A549 细胞的 IL-8 的表达水平,并具有剂量、时间效应。照射激活 A549 细胞中 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路分子。抑制 p38 MAPK 和抑制 NF- κ B 能够阻断照射诱导 A549 细胞产生的 IL-8。抑制 ROS 后并不能抑制照射诱导 A549 细胞产生的 IL-8。**结论** X 线照射能增加 A549 细胞 IL-8 的产生,可能与通过激活 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路相关,并呈 ROS 非依赖性模式。

【关键词】 肺癌细胞系; 白介素 8; p38 MAPK 抑制剂; NF- κ B 抑制剂; ROS 清除剂

DOI: 10. 3760/cma. j. cn113030-20190529-00202

X-ray irradiation increases production of IL-8 in lung cancer cell line A549

Song Yinghui¹, Wang Nila², Hu Jinyue², Chai Qin², Yang Fanfan², Wang Guihua²

¹Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410005, China; ²Department of Oncology, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of irradiation on the production of IL-8 in lung cancer cell line A549 and explore its possible mechanism. **Methods** A549 cells irradiated with different doses of X-rays were used to collect cell supernatant, cellular RNA and protein at different time points after irradiation. The expression level of IL-8 mRNA in A549 cells after irradiation was detected by RT-PCR, which was further validated by real-time quantitative PCR. The expression level of IL-8 in the cell supernatant was quantitatively measured by ELISA. The expression levels of cellular signaling pathway molecules in A549 cells after irradiation were detected by Western Blot. The A549 cells were pretreated with p38 MAPK inhibitor, NF- κ B inhibitor and ROS scavenger. The effect of these inhibitors on the expression of IL-8 in A549 cells induced by irradiation was evaluated by ELISA. **Results** Irradiation up-regulated the expression of IL-8 in A549 cells in a dose-and time-dependent manner. Irradiation activated the p38 MAPK and NF- κ B signaling pathway in A549 cells. p38 MAPK and NF- κ B inhibitors blocked the induction of IL-8 of A549 cells by irradiation. Inhibition of ROS failed to inhibit the induction of IL-8 of A549 cells by irradiation. **Conclusion** Irradiation can increase the production of IL-8 in lung cancer cells A549, possibly through the activation of p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways in a ROS-independent pattern.

【Key words】 Lung cancer cell line; IL-8; p38 MAPK inhibitor; NF- κ B inhibitor; ROS scavenger

DOI: 10. 3760/cma. j. cn113030-20190529-00202

目前认为放射性肺损伤是由于射线照射引起血管内皮损伤引起无菌性炎症反应,以及肺泡 II 型细胞损伤后分泌活性物质减少引起的肺功能障碍^[1]。研究发现照射正常肺组织能引起 IL-6、IL-8、MCP1、TGF- β 等细胞因子升高,认为是局部细胞损伤引起炎症反应,而肺泡 II 型细胞损伤是修复的产物^[2]。

在胶质瘤中发现照射能够诱导 IL-8 的上调,在皮肤细胞以及皮肤疾病模型中也发现照射能诱导 IL-8 的上调^[3-4]。可是,有趣的是在临床观察中发现低水平的基线 IL-8 的表达与放射性肺损伤的高发生相关^[5]。那么,照射对肺癌本身的 IL-8 的影响暂不明确,本研究拟以肺癌细胞系为研究对象,采用不同剂

量照射细胞后于不同时间收集细胞上清,观察 IL-8 的上升水平和探索其可能的机制,为进一步阐明放射对肿瘤微环境的影响提供理论依据。

材料与方 法

1. 细胞与培养:人肺腺癌 A549 细胞购自中国科学院细胞库,由本实验室保存。A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液,置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养,取指数生长期细胞进行实验。

2. 细胞照射:6 MV X 直线加速器照射,剂量率 400 cGy/min,射野大小 40 cm × 40 cm,源皮距 100 cm,分别予 0、2、4、8 Gy 照射。

3. 药品及试剂:p38 MAPK 抑制剂(SB202190)、NF-κB 抑制剂(Bay117082)、ROS 清除剂(N-acetyl-L-cysteine)购自 Sigma 公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司。PCR 引物由上海生工生物技术公司合成。实时荧光定量 PCR 试剂盒购自上海罗氏公司。IL-8 ELISA 试剂盒购自北京宝赛公司。Western Blot 蛋白提取、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、活性氧检测试剂盒(S0033)购自碧云天生物公司,Western Blot 抗体购自 CST 公司。

4. RT-PCR:A549 细胞均匀铺版,予以 0、2、4、8 Gy 照射后第 4 天收集细胞,或予以 8 Gy 单次照射后第 0、1、2、3、4 天收集细胞。采用 TRIZOL 法提取总 RNA,总 RNA (1 μg)用 RT 反转录试剂盒(Thermo Fisher)进行 RNA 的反转录,合成 cDNA 后进行 Q-RT-PCR。应用 Light Cycle 96 Real Time PCR System 进行操作,采用 Universal SYBR Green PCR master mix 进行检测。PCR 反应为 95℃ 预变 600 s,95℃ 10 s、60℃ 10 s、72℃ 10 s,即 45 次循环扩增,95℃ 10 s、65℃ 60 s、97℃ 1 s,即 1 个循环溶解曲线。实时荧光定量 PCR 检测采用 2^{-ΔΔCt} 方法分析相对基因表达的差异,以 GAPDH 为内参。正向引物序列 IL-8-F 为 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTT-3',反向引物序列 IL-8-R 为 5'-TCAAAAACCTTCTCCACAAC-CC-3',正向 GAPDH-F 为 5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC-3',反向 GAPDH-R 为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3'。

5. ELISA:A549 细胞均匀铺板,予以 8 Gy 单次照射后第 0、1、2、3、4 天收集细胞上清,抑制剂组于照射前分别加入 10 μmol/L p38 MAPK 抑制剂(SB202190,简称 SB),10 μmol/L NF-κB 抑制剂(Bay117082,简称 Bay)和 2 mmol/L ROS 清除剂(N-

acetyl-L-cysteine, NAC),并一直保持含药培养基培养。根据 ELISA 试剂盒操作说明检测各组 IL-8 的表达水平。

6. Western Blot 法检测信号通路分子相关蛋白改变:检测空白组、照射组(照射后不同时间收集细胞)中 NF-κB/P-NF-κB、JNK/P-JNK、ERK/P-ERK、p38/P-p38 的表达情况。

7. 统计方法:采用 SPSS 13.0 软件对组间表达水平行成组 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. X 线照射 A549 细胞 IL-8 mRNA 的表达水平:随着照射剂量增加和照射后时间延长,A549 细胞 IL-8 表达均上调,见图 1。图 1A 表明采用不同照射剂量照射后第 4 天收集细胞行 RT-PCR 检测,A549 细胞中 IL-8 mRNA 表达上调;图 1B 表明采用 8 Gy 照射后不同时间收集细胞行 RT-PCR 检测,A549 细胞中 IL-8 mRNA 表达上调。

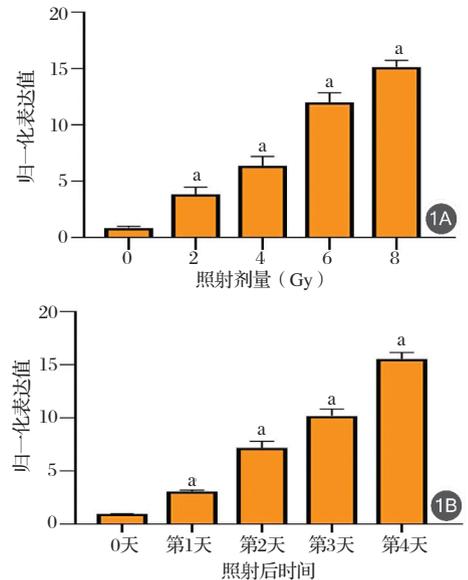


图 1 X 线照射增加 A549 细胞 IL-8 mRNA 表达(^a 为与第 0 天比较 *P* < 0.05)

2. X 线照射 A549 细胞后上清液中 IL-8 的表达水平:随着照射剂量增加和照射后时间延长,IL-8 表达均上调,见图 2。图 2A 表明采用不同照射剂量照射细胞后第 4 天收集细胞上清行 ELISA 检测,A549 细胞上清中 IL-8 表达上调;图 2B 表明采用 8 Gy 照射后不同时间收集细胞上清行 ELISA 检测,A549 细胞上清中 IL-8 表达上调,并发现 8 Gy 照射后第 4 天收集细胞上清,IL-8 表达上调最显著。

3. Western Blot 检测 MAPKs 及 NF-κB 活化情况:X 线照射 A549 细胞后可激活 p38 MAPK 及 NF-κB,见图 3。

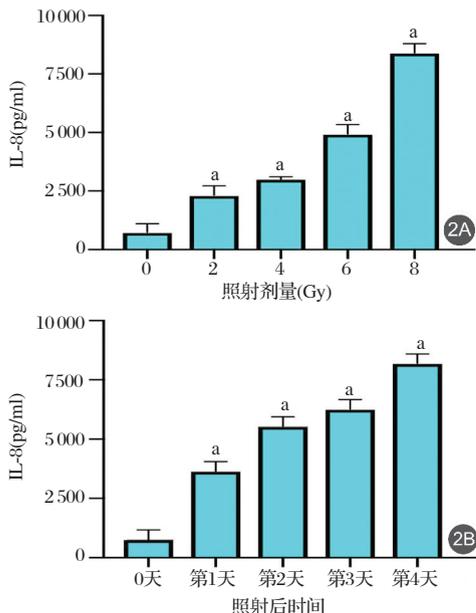


图 2 X 线照射增加 A549 细胞上清 IL-8 水平 (a 为与第 0 天比较 $P < 0.05$)

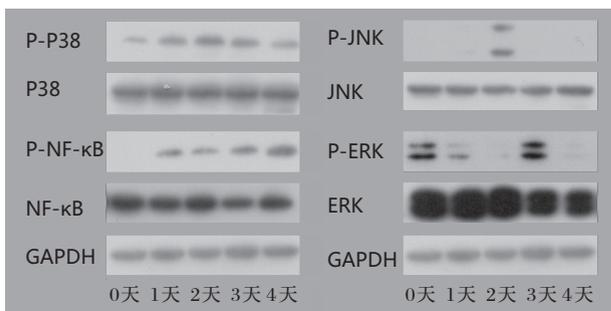


图 3 X 线照射对 A549 细胞信号通路分子的影响

4. 抑制剂对 X 线照射诱导 A549 细胞产生 IL-8 的影响: 研究发现照射诱导细胞产生 IL-8 与 ROS 活化有关^[6], 因此进一步采用 SB、Bay、NAC 预处理细胞后 8 Gy 照射后第 4 天收集细胞上清, 检测 IL-8 的表达情况。结果显示抑制 p38 MAPK 活性、NF-κB 活性后均能抑制照射诱导的 IL-8 的表达, 而采用 NAC 组并不能抑制照射诱导的 IL-8 的上调, 见图 4。

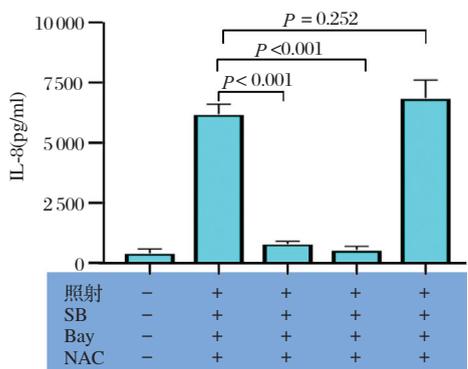


图 4 抑制剂处理细胞后 X 线照射对 A549 细胞产生 IL-8 的影响

讨 论

放射性肺损伤根据接受照射的时间及其病理变

化可延续几个时期, 最先开始的是以白细胞浸润为主要表现的急性炎症期, 导致肺泡内水肿和血管出血^[7]。IL-8 是放射性肺炎中重要的早期始动细胞因子之一, 因为 IL-8 是一种促炎性趋化因子, 可促进中性粒细胞趋化性和脱粒, 并通过与 IL-8Rα 或 IL-8Rβ 结合发出信号, 同时还可刺激胶原生成和血管生成^[8]。

目前对于放射性肺炎的具体机制尚不清楚, 认为是放射引起的内皮细胞、肺上皮细胞、巨噬细胞和其他细胞参与的复杂过程。放射后不仅正常肺组织能产生多种细胞因子参与炎症发生发展, 非小细胞肺癌肿瘤组织中也存在细胞因子的过表达。研究证实 IL-6 可以由淋巴细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、细支气管上皮细胞和一些肿瘤细胞产生^[9]。最近的一项研究表明接受过放射治疗的肿瘤患者, 肿瘤细胞是其循环细胞因子的主要来源, 更加支持肿瘤细胞在放射性肺炎过程中发挥更重要的观点^[10]。

本研究发现, X 线照射肺癌细胞后能够诱导 IL-8 的明显上调, 并呈剂量和时间依赖性, 如果认为 IL-8 的水平部分代表了放射性肺炎的程度, 这一结果与放射性肺炎发生与照射剂量和暴露照射后时间有关是一致的。

本研究发现细胞模型在放射后第 3-4 天显著升高。临床研究中, 研究人员发现基线水平 IL-8 的低表达与放射性肺损伤的高发生相关, 但在放疗期间 2 周水平的 IL-8 的动态改变不能预测 ≥2 级的放射性肺炎的发生^[5]。我们推测放疗期间 2 周的 IL-8 不是照射后的峰值, 导致它失去预测值。并且我们正在收集胸部放疗患者的血标本检测基线水平 IL-8 和照射后 4 天的 IL-8 水平以分析 IL-8 的动态变化与 ≥2 级的放射性肺炎之间的关系。

文献报道照射能诱导皮肤细胞、血管内皮细胞、角膜细胞等产生 IL-8 与激活 MAPKs 以及与 ROS 相关^[6, 11-12]。本课题组前期研究 A549 细胞放射敏感性时发现照射能够活化 NF-κB 和 STAT3^[13], 此次研究发现照射能活化 p38 MAPK 和 NF-κB, 而对 JNK、ERK 影响不大。虽然 JNK 于照射后第 2 天, ERK 于照射后第 3 天似乎有活化的趋势, 采用 JNK 抑制剂和 ERK 抑制剂对照射诱导的 IL-8 上调并无影响, 我们认为在 A549 细胞中照射并不能活化 JNK 和 ERK, 这个结果与前人研究部分一致^[14-15]。并且我们采用 p38 MAPK 和 NF-κB 的抑制剂抑制其活化后能够抑制照射诱导的 A549 细胞产生 IL-8, 进一步

验证了照射产生的 IL-8 与该信号通路分子密切相关。而其他研究认为照射诱导细胞因子的产生与 ROS 相关^[6],我们采用 NAC 处理细胞后并未能阻断照射诱导 IL-8 的产生,可能与其细胞模型为正常细胞,而本研究为肿瘤细胞模型有关。并且在临床中采用抗氧化剂对放射性肺炎的缓解程度并不理想,验证了这一过程可能为 ROS 非依赖性^[16]。抑制细胞因子是放射性肺损伤的一个重要治疗靶点,IL-8 的中和抗体应用于炎症性疾病掌跖脓疱病已获得临床获益^[17]。鉴于 IL-8 在肿瘤微环境中发挥重要的促肿瘤作用,目前已开展 IL-8 中和抗体治疗晚期恶性肿瘤的临床试验(NCT02536469)。本课题为 IL-8 的中和抗体治疗放射性肺炎提供了更多的理论依据。

总之,X 射线能诱导肺癌细胞产生 IL-8,可能与激活 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路分子相关,并呈 ROS 非依赖性模式,为阐述放射性肺炎的发生机制提供了一个新的思路。

利益冲突 本人与其他作者声明没有任何利益冲突

作者贡献声明 宋颖辉负责撰写文章;其他人参与实验工作

参 考 文 献

- [1] Jain V, Berman AT. Radiation pneumonitis: old problem, new tricks [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(7): 222. DOI: 10.3390/cancers10070222.
- [2] Zhang XJ, Sun JG, Sun J, et al. Prediction of radiation pneumonitis in lung cancer patients: a systematic review [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(12): 2103-2016. DOI: 10.1007/s00432-012-1284-1.
- [3] Pasi F, Facoetti A, Nano R. IL-8 and IL-6 bystander signalling in human glioblastoma cells exposed to gamma radiation [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2769-2772.
- [4] Tang SC, Liao PY, Hung SJ, et al. Topical application of glycolic acid suppresses the UVB induced IL-6, IL-8, MCP-1 and *Cox-2* inflammation by modulating NF- κ B signaling pathway in keratinocytes and mice skin [J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 86(3): 238-248. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.03.004.
- [5] Wang S, Campbell J, Stenmark MH, et al. A model combining age, equivalent uniform dose and IL-8 may predict radiation esophagitis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Radiother Oncol*, 2018, 126(3): 506-510. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.12.026.
- [6] Werner E, Wang H, Doetsch PW. Opposite roles for p38 MAPK/

MAPK-driven responses and reactive oxygen species in the persistence and resolution of radiation-induced genomic instability [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108234. DOI: 10.1371/journal.pone.0108234.

- [7] Bledsoe TJ, Nath SK, Decker RH. Radiation pneumonitis [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38(2): 201-208. DOI: 10.1016/j.ccm.2016.12.004.
- [8] Baggolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84(4): 1045-1049. DOI: 10.1172/JCI114265.
- [9] Rube CE, Uthe D, Wilfert F, et al. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 61(5): 1482-1492. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2004.12.072.
- [10] Rube CE, Palm J, Erren M, et al. Cytokine plasma levels: reliable predictors for radiation pneumonitis? [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2898. DOI: 10.1371/journal.pone.0002898.
- [11] Lafargue A, Degorre C, Corre I, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 750-759. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019.
- [12] Abengózar-Vela A, Calonge M, Stern ME, et al. Quercetin and resveratrol decrease the inflammatory and oxidative responses in human ocular surface epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(4): 2709-2719. DOI: 10.1167/iops.15-16595.
- [13] 宋颖辉,王桂华,柴琴,等. ALDH1A1 抑制剂增加肺癌细胞 A549 的放射敏感性[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2017, 26(11): 1336-1337. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4221.2017.11.020.
- [14] Song YH, Wang GH, Chai Q, et al. ALDH1A1 inhibitor increases radiosensitivity of lung cancer cell line A549 [J]. *Chin J Radiat Oncol*, 2017, 26(11): 1336-1337. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4221.2017.11.020.
- [15] Ohsaki A, Tanuma SI, Tsukimoto M. TRPV4 channel-regulated ATP release contributes to γ -irradiation-induced production of IL-6 and IL-8 in epidermal keratinocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(10): 1620-1626. DOI: 10.1248/bpb.b18-00361.
- [16] Galván-Morales MÁ, Cabello-Gutiérrez C, Mejía-Nepomuceno F. Parainfluenza virus type 1 induces epithelial IL-8 production via p38 MAPK-MAPK signalling [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 515984. DOI: 10.1155/2014/515984.
- [17] Kim JY, An YM, Yoo BR, et al. HSP27 inhibitor attenuates radiation-induced pulmonary inflammation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4189. DOI: 10.1038/s41598-018-22635-9.
- [17] Skov L, Beurskens FJ, Zachariae CO, et al. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis [J]. *J Immunol*, 2008, 181(1): 669-679. DOI: 10.4049/jimmunol.181.1.669.

(收稿日期: 2019-05-29)