

# 热疗联合人肿瘤坏死因子对 TNFR1 高表达胶质瘤的细胞周期、F-肌动蛋白及其侵袭性的影响

秦丽娟<sup>1</sup>, 张军伟<sup>2</sup>, 张田<sup>1</sup>, 王艳蕾<sup>1</sup>, 张一兵<sup>1</sup>, 周洪霞<sup>1</sup>, 贾永森<sup>3</sup>, 王树华<sup>1</sup>

**Effect of Hyperthermia Combined with rhTNF on Cell Cycle, F-actin and Invasiveness to Over-expressed TNFR1 Glioma Cells**

QIN Lijuan<sup>1</sup>, ZHANG Junwei<sup>2</sup>, ZHANG Tian<sup>1</sup>, WANG Yanlei<sup>1</sup>, ZHANG Yibing<sup>1</sup>, ZHOU Hongxia<sup>1</sup>, JIA Yongsen<sup>3</sup>, WANG Shuhua<sup>1</sup>

1. College of Basic Medical Sciences, Hebei United University, Tangshan 063000, China; 2. Hebei United University Affiliated Hospital; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University

**Abstract: Objective** The study objective was to investigate the effect of hyperthermia combined with rhTNF on cell cycle and F-actin of TNFR1 in over-expressed glioma, as well as invasiveness in vitro.

**Methods** C6 cell Line of over-expressed TNFR1 (C6/TNFR1) was constructed. The mRNA and protein of TNFR1 were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively, and the cell cycle and cell proliferation were determined by flow cytometry (stained by propidium iodide) and WST-8 respectively. The invasiveness was measured by transwell assay and immunofluorescence technique was used to measure F-actin protein expression. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein levels of TNFR1 in c6/TNFR1 cell was increased, by 78.5% and 89.7% ( $P < 0.05$ ), respectively. The cell proliferation was inhibited and most of c6/TNFR1 cells were arrested in S+G<sub>2</sub>/M phase compared with the control group cells after hyperthermia combined with rhTNF treatment ( $P < 0.05$ ). The fluorescence intensity of F-actin and the average number of C6/TNFR1 cells passing through the inserted filter were decreased by 72.3% and 83.10% respectively, compared to the control group cells after hyperthermia combined with rhTNF treatment ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Hyperthermia combined with rhTNF might reduce glioma of C6/TNFR1 invasiveness through blocking cell cycle and reducing the expression of F-actin.

**Key words:** Hyperthermia; Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1); F-actin; Glioma; Tumor invasiveness

**摘要:目的** 探讨热疗联合重组人肿瘤坏死因子(recombinant human tumor necrosis factor, rhTNF)对肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)高表达的胶质瘤细胞的细胞周期和F-肌动蛋白(F-actin)的影响及其与胶质瘤侵袭性的关系。**方法** 建立 TNFR1 高表达胶质瘤细胞株, RT-PCR 和 Western blot 法检测胶质瘤细胞 TNFR1 的表达水平; 碘化丙啶染色后用流式细胞术检测胶质瘤细胞细胞周期的变化; WST-8 法检测细胞增殖; 免疫荧光技术检测胶质瘤细胞内 F-actin 的表达水平; Transwell 小室法检测胶质瘤细胞侵袭性改变。**结果** 与对照组相比, TNFR1 高表达胶质瘤细胞株的 TNFR1 mRNA 水平增加了 78.5%, 其蛋白质的表达水平增加了 89.7% ( $P < 0.05$ ); 经热疗联合 rhTNF 处理后细胞增殖受抑制, S 和 G<sub>2</sub>/M 期的 TNFR1 高表达胶质瘤细胞数之和明显增多, 而 F-actin 的

荧光强度和胶质瘤侵袭性分别降低了 72.3% 和 83.10%。**结论** 热疗联合 rhTNF 可能是通过阻滞 TNFR1 高表达胶质瘤细胞的细胞周期和降低 F-actin 的表达来实现降低胶质瘤侵袭性的作用。

**关键词:** 热疗; 肿瘤坏死因子受体 1; F-肌动蛋白; 胶质瘤; 肿瘤侵袭性

中图分类号: R739.41 文献标识码: A

收稿日期: 2012-08-02; 修回日期: 2012-12-17

基金项目: 河北省卫生厅科学研究基金项目 (20120144)

作者单位: 1. 063000 河北唐山, 河北联合大学基础医学院; 2. 河北联合大学附属医院; 3. 河北联合大学中医学

作者简介: 秦丽娟(1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事脑肿瘤的相关研究

## 0 引言

胶质瘤的治疗往往因为其高侵袭性的特点而失败<sup>[1]</sup>。我们前期初步研究<sup>[2]</sup>发现,肿瘤坏死因子受体 1(tumor necrosis factor receptor-1, TNFR1)表达较多的胶质瘤细胞,热疗降低其侵袭性的作用也明显。重组人肿瘤坏死因子(recombinant human tumor necrosis factor, rhTNF)本身对肿瘤亦有杀伤作用。本研究旨在探讨热疗联合 rhTNF 对 TNFR1 高表达胶质瘤细胞侵袭性的影响及其可能机制,进而更深入地了解 TNFR1 与胶质瘤侵袭性的关系,为胶质瘤热疗的临床应用及制定更合理的治疗方案提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 TNFR1 高表达的 C6 胶质瘤细胞株的构建

C6 细胞株和培养液均由中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心提供。载体 PBK-RSV-TNFR1 购自武汉晶赛公司。用脂质体基因转染法将带有 TNFR1 基因的载体 PBK-RSV-TNFR1 转染至 C6 细胞,经 500 mg/L 的 G418 进行筛选, TNFR1 高表达的 C6 胶质瘤细胞记为(C6/TNFR1)。

### 1.2 C6/TNFR1 细胞的 TNFR1 mRNA 和蛋白表达水平的检测

用 RT-PCR 法检测 C6 细胞和基因转染细胞 TNFR1 mRNA 的表达, TNFR1 基因引物序列为:上游引物:5'-CGC TAC CAA CGG TGG AAGT C-3';下游引物:5'-TCC TTC AAG CTC CCC CTC TT-3'。同时扩增 18s 作为内参。采用 Western blot 法检测 C6 细胞和 C6/TNFR1 细胞内 TNFR1 的蛋白表达水平, Rat Monoclonal Anti-TNFR1 购自 Neomarkers 公司, RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 细胞分组

将 C6/TNFR1 细胞分为热疗组(42℃ 热处理 120 min)、肿瘤坏死因子处理组(rhTNF 处理 120 min)、热疗联合肿瘤坏死因子处理组(加入 rhTNF 后 42℃ 热处理 120 min)和空白对照组(不进行任何处理)。

### 1.4 胶质瘤细胞周期的测定

碘化丙啶染色后采用流式细胞术检测各组 C6/TNFR1 细胞的细胞周期变化。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞所占百分比经 FACS Calibur 流式细胞分析仪(BD Biosciences, USA)分析<sup>[3-4]</sup>。

### 1.5 WST-8 法检测细胞增殖

将 C6/TNFR1 细胞稀释为每毫升 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞的浓度,接种 100 μl 在 96 孔板内培养 6 h,在每组细胞的每个孔内加入 10 μl 的 CCK-8 试剂孵育 2 h,

酶标仪检测各孔吸光度值(波长 450 nm)的变化。

### 1.6 胶质瘤细胞内 F-actin 的表达水平测定

将 C6/TNFR1 细胞接种于共聚焦小皿上,待细胞均匀铺满共聚焦小皿后进行分组处理,将各组小皿用 PBS 漂洗 3 次(每次 10 min)后,用 37 g/L 甲醛固定 15 min, PBS 漂洗,加入 0.5% Triton X-100 处理 10 min,再用 PBS 漂洗,用 50 g/L 小牛血清白蛋白封闭 1 h,加入浓度为 1:50 的 F-actin 抗体,4℃ 过夜, PBS 漂洗后加入用 Cy3 标记的免疫荧光抗体,37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗后用甘油封片。采用共聚焦激光扫描显微镜观察 F-actin 蛋白的变化。

### 1.7 体外肿瘤侵袭模型的构建及结晶紫染色法检测胶质瘤侵袭性的改变

将 C6/TNFR1 细胞接种于 Transwell 膜上室(12.0 μm 孔径的 Transwell 购自美国 Millipore 公司),培养 24 h 后再进行分组处理,棉签擦去基质胶和上室内的细胞,用结晶紫染色法测定膜下室面贴壁细胞数来反映肿瘤侵袭性。

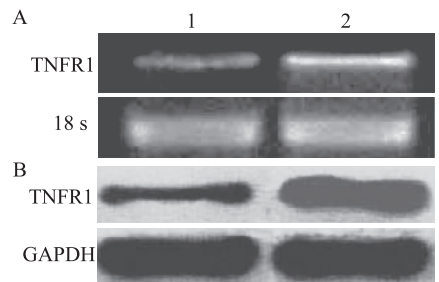
### 1.8 统计学方法

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析, *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 C6/TNFR1 细胞的 TNFR1 表达水平

C6/TNFR1 细胞内 TNFR1 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于 C6 细胞,说明 TNFR1 高表达细胞株建立成功,见图 1。



1. C6 cells; 2. C6/TNFR1 cells

A: expression of TNFR1 mRNA; B: expression of TNFR1 protein

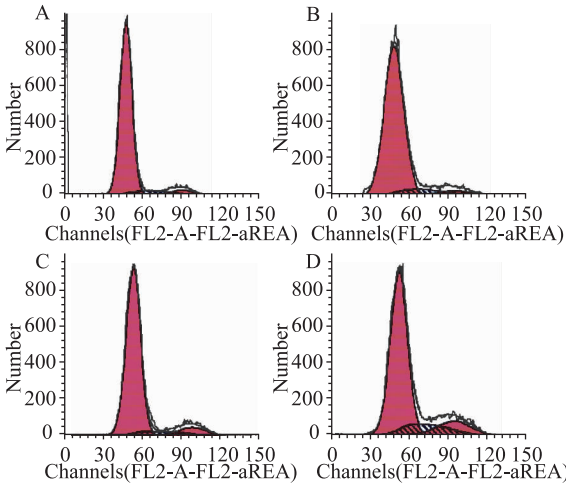
图 1 C6/TNFR1 细胞的 TNFR1 表达水平 (n = 15)

Figure 1 Expression of TNFR1 in C6/TNFR1 cells (n = 15)

### 2.2 热疗联合 rhTNF 对 C6/TNFR1 细胞周期的影响

各处理组 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞均较对照组升高,其中热疗组和 rhTNF 组的(S + G<sub>2</sub>/M)期细胞数占总细胞数的百分比分别为 (16.55 ± 0.59)% 和 (18.83 ± 0.83)%,与对照组的差异有统计学意

义( $P < 0.05$ )。而热疗联合 rhTNF 处理后的 C6/TNFR1 细胞中 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数之和明显高于对照组, 占总细胞数的百分比为 ( $26.27 \pm 0.49$ )%, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见图 2、表 1。说明处理后的 C6/TNFR1 细胞的 S 期 + G<sub>2</sub>/M 期被阻滞, 尤以热疗联合 rhTNF 的处理效果最明显, 见图 2。



A: control group; B: hyperthermia group; C: rhTNF group; D: HT + rhTNF group

图 2 热疗联合 rhTNF 对 C6/TNFR1 细胞周期的影响( $n = 15$ )  
Figure 2 Changes of C6/TNFR1 cell cycle after hyperthermia (HT) combined with rhTNF( $n = 15$ )

表 1 热疗联合 rhTNF 对 C6/TNFR1 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 1 Changes of C6/TNFR1 cell cycle after hyperthermia (HT) combined with rhTNF( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Groups	Percentage of each cell cycle (%)			
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	S+G <sub>2</sub> /M
Control	86.38 ± 2.25	7.65 ± 0.38	5.97 ± 0.46	13.62 ± 0.84
HT	83.45 ± 1.78	9.93 ± 0.42	6.62 ± 0.73	16.55 ± 0.59
rhTNF	83.17 ± 1.92	9.57 ± 0.63	9.26 ± 0.47	18.83 ± 0.83
HT + rhTNF	73.73 ± 2.35	13.12 ± 0.85	13.15 ± 0.68	26.27 ± 0.49*

Note: \*:  $P < 0.05$  compared with control group

### 2.3 细胞增殖变化

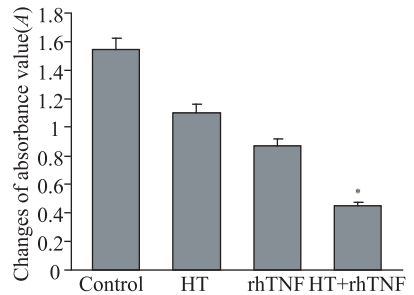
细胞经处理后, C6/TNFR1 细胞增殖程度减弱, 尤以热疗联合 rhTNF 组最显著, 见图 3。

### 2.4 胶质瘤细胞内 F-actin 的表达水平

细胞经处理后, C6/TNFR1 细胞 F-actin 的荧光强度明显弱于其他组的荧光强度, 以热疗联合 rhTNF 组最显著, 见图 4。

### 2.5 热疗对胶质瘤侵袭性的影响

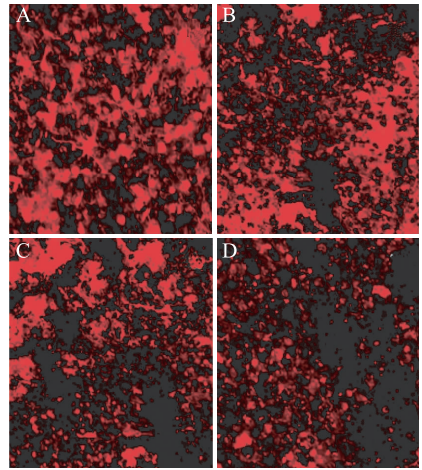
经处理后, 侵入 transwell 下室的细胞数量减少, 且热疗联合 rhTNF 组侵入下室的 C6/TNFR1 细胞数明显少于其他组, 见图 5。



\*:  $P < 0.05$  compared with control group

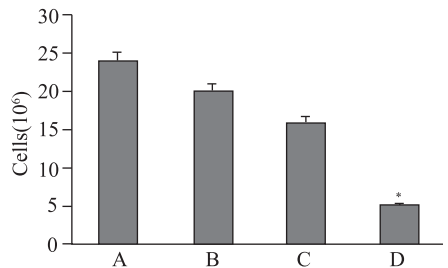
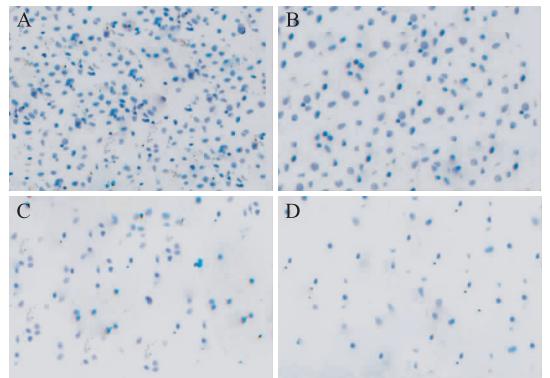
图 3 不同处理组细胞增殖的改变( $n = 15$ )

Figure 3 Changes of cell proliferation in different groups( $n = 15$ )



A: control group; B: hyperthermia group; C: rhTNF group; D: HT + rhTNF group

图 4 C6/TNFR1 细胞内 F-actin 表达水平的变化 ( $n = 15$ )  
Figure 4 Changes of F-actin protein expression in C6/TNFR1 cells( $n = 15$ )



\*:  $P < 0.05$  compared with control group

A: control group; B: hyperthermia group; C: rhTNF group; D: HT + rhTNF group

图 5 热处理后的膜下室面贴壁细胞数( $n = 15$ )

Figure 5 Cells attached on the membrane downside after heat treatment( $n = 15$ )

### 3 讨论

胶质瘤的高侵袭性是导致胶质瘤患者治疗效果不理想的最主要因素之一<sup>[1]</sup>。胶质瘤患者在首选手术治疗之后,一定要配合放疗、化疗等辅助疗法,以延长患者复发时间,降低胶质瘤增殖和侵袭速度进而延长生命,但这些疗法均收效甚微<sup>[5-7]</sup>。热疗因其不良反应小等优点已逐渐被临床工作者所重视,并且已经逐步在临床中得到应用,并取得了一定的成效<sup>[8-10]</sup>。热疗如何能结合胶质瘤自身的特点来制定适合不同患者的辅助治疗方案,这就需要进一步明确热疗降低胶质瘤侵袭性的机制。

我们前期初步研究发现,热疗降低胶质瘤侵袭性的效果与胶质瘤细胞上的 TNFR1 关系密切,但其具体机制尚不十分清楚。因为 rhTNF 本身具有杀伤肿瘤细胞的作用,所以本研究中建立了 TNFR1 高表达的胶质瘤细胞,并进一步研究热疗联合 rhTNF 对胶质瘤细胞侵袭性的影响及其机制。实验研究结果表明,热疗联合 rhTNF 作用于 TNFR1 高表达的胶质瘤细胞时,可以明显降低该胶质瘤的侵袭性,可使 C6/TNFR1 细胞的 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期被阻滞及细胞增殖减弱,且可以使胶质瘤细胞的 F-肌动蛋白表达减少。肿瘤细胞要实现增殖并进而向远处侵袭,必定要完成整个细胞周期过程才能实现,而在本实验中细胞经热疗联合 rhTNF 处理后,细胞周期被阻滞,这就使得细胞不能进行正常的分裂增殖过程,也就控制了细胞的侵袭性。另一方面,F-肌动蛋白是细胞骨架中微丝的主要成分,它参与细胞的黏附、迁移等功能,促进细胞的侵袭性生长<sup>[11-13]</sup>。经热疗联合 rhTNF 处理后,胶质瘤细胞的 F-肌动蛋白表达明显减少,这可造成细胞骨架结构不完整等,从而使细胞向远处迁移的途径被阻断,也可以一定程度的降低胶质瘤细胞的侵袭性。由此推测热疗联合 rhTNF 可能是通过阻滞 C6TNFR1 细胞的细胞周期和减少 F-肌动蛋白的表达导致细胞骨架不完整来实现的。

我们知道,由于胶质瘤的病理分型不同,导致临床胶质瘤的治疗效果和预后亦有很大区别<sup>[14]</sup>。因此,如果明确胶质瘤细胞上 TNFR1 的表达对胶质瘤细胞侵袭性的影响机制,就可以在临床胶质瘤的治疗中,根据不同的病理分型并结合病理组织检查得到的 TNFR1 表达差异,制定不同的化疗方案,以期更好地实现对胶质瘤的彻底治愈。

在临床应用中,如何掌控胶质瘤细胞上 TNFR1 高表达的时期或者通过某种技术方法提高胶质瘤细胞上 TNFR1 的表达水平,以及如何使胶质

瘤细胞更多更长时间地维持在细胞周期阻滞状态,从而达到更好的热疗效果,是我们需要进一步研究的内容。

#### 参考文献:

- [1] Fiveash JB, Gillespie GY, Oliver PG, *et al.* Enhancement of glioma radiotherapy and chemotherapy response with targeted antibody therapy against death receptor 5 [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 71(2): 507-16.
- [2] Qin LJ, Wang DC, Zhang T, *et al.* Relation between hyperthermia reduce glioma invasiveness and TNFR affinity [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2012, 39(4): 367-70. [秦丽娟, 王东春, 张田, 等. 热疗降低胶质瘤侵袭性的作用与肿瘤坏死因子受体亲和力的关系 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(4): 367-70.]
- [3] McGinn CJ, Miller EM, Lindstrom MJ, *et al.* The role of cell cycle redistribution in radiosensitization: implications regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine radiosensitization [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994, 30(4): 851-9.
- [4] Kawamoto K. Flow cytometric analysis of cell cycle for the action mechanism of antineoplastic agents [J]. *Hum Cell*, 1995, 8(3): 85-8.
- [5] Zhang XM, Shi YS, Chen M, *et al.* Effect of EGFRvIII siRNA on Apoptosis and Growth of Glioma Cell Line [J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2011, 38(9): 975-8. [张兴梅, 石玉生, 陈明, 等. EGFRvIII 的 siRNA 对胶质瘤细胞凋亡和增殖的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(9): 975-8.]
- [6] Skardelly M, Armbruster FP, Meixensberger J, *et al.* Expression of Zonulin, c-kit, and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Gliomas [J]. *Transl Oncol*, 2009, 2(3): 117-20.
- [7] Narayana A, Kelly P, Golfinos J, *et al.* Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival [J]. *J Neurosurg*, 2009, 110(1): 173-80.
- [8] Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, *et al.* Gap junctions play a role in the bystander effect of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro [J]. *Gene Ther*, 1996, 3(1): 85-92.
- [9] Togni P, Vrba J, Vannucci L. Microwave applicator for hyperthermia treatment on in vivo melanoma model [J]. *Med Biol Eng Comput*, 2010, 48(3): 285-92.
- [10] Schwerdt A, Zintchenko A, Concia M, *et al.* Hyperthermia-induced targeting of hermosensitive gene carriers to tumors [J]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19(11): 1283-92.
- [11] Maidment SL. The cytoskeleton and brain tumour cell migration [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(6B): 4145-9.
- [12] Zhou D, Jiang X, Xu R, *et al.* Assessing the cytoskeletal system and its elements in C6 glioma cells and astrocytes by atomic force microscopy [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(6): 895-905.
- [13] Starinsky-Elbaz S, Faigenbloom L, Friedman E, *et al.* The pre-GAP-related domain of neurofibromin regulates cell migration through the LIM kinase/cofilin pathway [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 42(4): 278-87.
- [14] Yang J, Liao D, Wang Z, *et al.* Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis [J]. *J Surg Res*, 2011, 168(1): 97-102.