

期刊：

臨床研究期刊 (The Journal of Clinical Investigation) Volume 117 Number 5 May 2007

標題：

以中和抗體抑制腫瘤成長因子 β 可避免因放射治療引起的腫瘤加速轉移

(Inhibition of TGF- β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression)

作者

Swati Biswas,¹ Marta Guix,² Cammie Rinehart,² Teresa C. Dugger,² Anna Chytil,¹
Harold L. Moses,^{1,3,4} Michael L. Freeman,⁵ and Carlos L. Arteaga^{1,2,4}

單位

屬於美國田納西州 那什維爾 范德堡大學(Vanderbilt University)

1.癌症生物學系、2.醫學系、3.病理學系、4. Vanderbilt-Ingram 癌症中心乳癌研究計畫 以及 5. 放射腫瘤學系

摘要

我們探究了因癌症治療而產生的 TGF- β 究竟會不會加速腫瘤的發生。我們使用了 *MMTV/PyVmT* 此一轉移型乳癌基因的轉殖模型，指出了游離輻射（譯註 1）或 doxorubicin（譯註 2）都會增加循環中 TGF- β 1 與腫瘤細胞的量，並會增加肺部的癌症轉移。這些效應都因為我們使用了泛 TGF- β 抗體而受抵銷。我們在有 TGF- β 抗體的環境下，體外培養了這些在循環中會表現多瘤病毒中等 T 抗原（譯註 3）的腫瘤細胞，發現它們不會生長；這表示 TGF- β 在這些細胞中是一種生存的訊號。當老鼠的腫瘤不含有第二型 TGF- β 受器時，放射線就不會增加肺部的癌症轉移；這顯示至少在部分上，肺癌轉移是跟 TGF- β 在腫瘤細胞上的直接作用有關的。這些數據含示，癌症治療所產生的 TGF- β 是一種幫助癌症轉移的訊號，也提供了一個原理根據，讓我們得在癌症治療時同時使用 TGF- β 抑制劑。

譯註 1：此為放射性治療。

譯註 2：此為一癌症化學治療常用藥物，俗稱「小紅莓」。

譯註 3：此為感染此病毒之初期的產生的三種 T 抗原中其中一種。

介紹

腫瘤成長因子 TGF- β ，既是一個腫瘤抑制基因，也是一個腫瘤啟動子。當 TGF- β 配體 (ligands) 結合到與其對應的絲胺酸/酰胺酸 (Ser/Thr) 激酶跨胞膜受器後，這些受器接著就會磷酸化、活化 Smad 族的訊息傳遞者。被活化之後，Smad 2、Smad 3 會與 Smad 4 結合並遷移至細胞核內，在此處調控與細胞週期停止 (cell cycle arrest)、細胞凋亡 (apoptosis) 相關的基因之轉錄。TGF- β 之所以有腫瘤抑制基因之用，即係此項調控之功。的確，在內皮細胞與基質中的 TGF- β 訊息傳遞，若是喪失或減弱，都會讓內皮細胞的細胞惡性轉化 (transformation) 大行其道。另一方面，已有研究顯示，若將顯性且無效的 TGF- β 受器引入至移轉的癌症細胞中，從上皮細胞型態轉變為間葉細胞型態的轉分化 (epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation)、能動性 (motility)、侵略性 (invasiveness)、以及存活率 (survival) 均會受到

抑制。這證明在已經完全轉化的細胞中，TGF- β 扮演了一個腫瘤啟動子的角色（於參考文獻4中有回顧）。大部分的癌都保有TGF- β 受器，卻喪失或部分喪失了Smad依賴性的抗細胞分裂效應(Smad-dependent antimitogenic effect)；同時，在某些個案中，他們還會對TGF- β 有所反應，而獲得了幫助癌症轉移的能力。進而，不論癌症細胞過度生產TGF- β 、過度活化TGF- β ，或是兩者兼備，都會藉由旁泌(paracrine)的方式，改變腫瘤周圍的微小環境(microenvironment)，幫助腫瘤的發生。這些資料提供了支持根據，讓我們得以設法阻斷人類癌症中的自泌性(autocrine)或旁泌性(paracrine)之TGF- β 訊息傳遞，以達治療之目的。

除 Smad 族的蛋白質外，TGF- β 還可以刺激數種轉化的訊息傳遞路徑。之前 TGF- β 已被證實可保護轉化細胞(transformed cells)不受細胞凋亡之害。此類細胞反應有一種可能的機制，就是 TGF- β 誘發了 PI3K 和 PI3K 的標的物，也就是絲胺酸/酰胺酸激酶 Akt，此訊息傳遞程序和對於癌症藥物的抗藥性是相關連的。有些對傳統化學療法有抗藥性的腫瘤會過度表現 TGF- β ，而 TGF- β 的抑制劑經證明可逆轉此種抗藥性。還有，大部分的腫瘤都會過度表現 TGF- β 配體(ligands)。在腫瘤組織與在血清中的高量 TGF- β 配體，與腫瘤轉移的復發、患者較差的癒後，均有所相關。

在乳癌的基因轉殖模型中，TGF- β 之訊息傳遞可加強轉移既存的乳腺腫瘤。這是受例如 Neu/ErbB2 或多腺瘤病毒中央 T 抗原(polyomavirus middle T antigen, PyVmT)等的癌症基因之誘發所致。再者，在 MMTV/LTR 乳腺啟動子的控制下，表現 PyVmT 癌症基因的基因轉殖鼠，經過有條件的 TGF- β 1 誘導，只要兩個禮拜之短，轉移肺癌的機率便高了十倍。有些癌症治療已被證實會全面性地、或留在原處誘發 TGF- β 。所以我們推測，被癌症治療所誘發的 TGF- β ，會提供存活訊息給這些對化療有抗藥性的腫瘤裡的細胞，或者一部分此種腫瘤中的細胞，使它們可能在治療之後，立即加速腫瘤的擴展。在此，我們使用了乳癌轉移的 MMTV/PyVmT 基因轉殖模型來展示，游離輻射(ionizing radiation)和小紅莓(doxorubicin)提高了循環中的 TGF- β 1 濃度、循環中的腫瘤細胞數、以及肺部的癌症轉移。這些效應都藉由 TGF- β 中和抗體的施加，而得以抵銷。在缺乏第二型 TGF- β 受器(T β RII)的老鼠身上，放射線則沒有增加肺部的癌症轉移。這些資料暗示，癌症治療所產生的 TGF- β 是腫瘤中一個幫助癌症轉移的訊號，因此也提供了原理根據，使我們在使用這些療法時，得以同時搭配使用 TGF- β 的抑制劑。

結果

胸腔放射線處理與化學治療提高了循環中的 TGF- β 量。我們在八週大的未交配母鼠之胸腔與骨盆內，施加了 10 Gy 的放射線。在施加放射線之後隔 24 小時，進行血液採集。我們在受放射處理之老鼠的血漿裡，觀察到約為控制組 2 倍的 TGF- β 1 含量（胸腔，P=0.03；骨盆，P=0.02；圖一 A）；同時，TGF- β 2 的量沒有改變（資料未呈現）。在八週大的 MMTV/PyVmT 基因轉殖鼠中，或是在種下 MMTV/PyVmT 腫瘤細胞、穩定地轉染了 luciferase 表現載體的非基因轉殖鼠中，我們都得到類似的結果（分別為 P=0.015 與 P=0.007，相較於控制組，圖一 B）。在經過放射處理後，TGF- β 1 的濃度有持續七天比控制組高（資料未呈現）。為了將這些結果推廣到其他的癌症治療法，我們測試了 DNA 嵌入劑(DNA-intercalating agent)與 topoisomerase II 之抑制劑 doxorubicin (Adriamycin) 的效果如何。從第八週開始，基因轉殖鼠被施行三次腹腔注射 doxorubicin (5 mg/kg i.p.)，每次分別間隔 21 天。在第十五週收集到的血漿裡發現，相較於未處理的老鼠，TGF- β 1 濃度提高了兩倍(P = 0.009；圖一 C)，而 TGF- β 2 濃度則是持平不變。為了要測量在放射處理後五週所取得的肺臟組織中，被活化的 TGF- β 1 之濃度，我們使用了一種 TGF- β 1 生物檢驗來檢測，這檢測是使用一種會穩定表現 plasminogen activator inhibitor-1/luciferase reporter

(PAI-1/luciferase reporter) 的貂肺內皮細胞來運作的。相較於未受放射處理之老鼠肺組織裂解液，經過放射線處理的老鼠肺組織裂解液，誘導提升了有 2 倍多的 TGF- β 1 濃度 ($P=0.0008$ ；圖一 D)。

胸腔的放射線處理及化學治療，會增加循環中的腫瘤細胞量與增加肺部癌症轉移。 TGF- β 增強了會表現PyVmT腫瘤基因之腫瘤細胞的存活率，而且之前已被證實，TGF- β 有條件地被誘發後，會在MMTV/PyVmT基因轉殖鼠中加速乳腺腫瘤的轉移。因此，我們推測，因治療而提升的循環中TGF- β 1濃度，可能和這個乳癌轉移模型中的循環中腫瘤細胞增加、肺部癌症轉移增加，有所關連。帶有腫瘤的MMTV/PyVmT老鼠在第八週大時，被施行胸腔放射處理(thoracic irradiation)(10 Gy)直至第十三週為止。實驗終結時進行心臟穿刺以取得血液，而血液中的細胞部分，則拿去測試其在活體外生成細胞集落之能力。從未經放射處理之老鼠所取得之血液，產生了平均 1.6 ± 1.5 個細胞集落；而從經過放射處理之老鼠所取得之血液，於10-12天後所測量的結果是，產生了平均 28.3 ± 7.6 個細胞集落 ($P=0.02$ ；圖二A)。PyVmT抗體的免疫染色證實，這些生長的細胞集落有表現癌症基因 (圖二A)。循環中的活腫瘤細胞數有所增加；而和此相符合的是，我們在經放射處理的老鼠中，觀察到較未經處理之控制組17倍的肺部表面癌症轉移 ($P = 0.009$ ；圖二B)。在被用doxorubicin處理相較於未處理之老鼠中，也在肺部癌症轉移觀察到類似的上升情形 ($P = 0.032$ ；圖二C)。在施加doxorubicin 24小時之後，相較於未經處理之控制組老鼠所取得之血液，也觀察到在細胞群落數目的上升 (17.2 ± 3.7 與 7.2 ± 2 colonies; $n = 5$; $P = 0.007$)。從老鼠的體重及一系列的腫瘤直徑數據來看，受處理與未處理的老鼠在腫瘤負荷量上並無差異，這表示TGF- β 1濃度之差別，不能簡單地以腫瘤負荷量會隨時間增加來解釋。

接下來，我們檢驗了放射線所誘發之肺部癌症轉移，是否僅限於帶有腫瘤的MMTV/PyVmT基因轉殖鼠身上。為了測試這個可能性，我們從會表現PyVmT之基因轉殖的乳腺癌中，取得表現luciferase的腫瘤細胞，然後將其注射至非基因轉殖的同源FVB老鼠身上。這些老鼠中的腫瘤，生長在左側鼠蹊(inguinal) (四號)的乳腺脂肪墊，我們以生物發光法，觀察並估計了其轉移擴散至肺臟的情形 (圖三A)。當腫瘤長到了 200mm^3 或更大時，老鼠在胸腔施加了10 Gy的放射線並在其餘部分施加屏障，兩週後將老鼠犧牲。相較於控制組，接受放射處理的老鼠增加了三倍的表面肺部癌症轉移($P = 0.005$ ；圖三，B和C)。再者，在放射處理後24小時與兩週之後，分別有相較於控制組多8倍與5倍的循環中腫瘤細胞量(表一)。在實驗組與控制組間，原發腫瘤的生長率並無不同 (資料未呈現)。

將培養中的PyVmT細胞暴露在1.25 - 7.50 Gy下，會增加其產生TGF- β 的量 (圖四A)。在以上所述之研究過程中，有既成之腫瘤的老鼠才會施加放射線處理；循環中TGF- β 濃度的增加，有可能是因為放射線在癌症細胞上的作用，因此我們想排除掉這個可能。我們對未交配的FVB母鼠施加了10 Gy的胸腔放射。在放射處理後一個小時，我們從尾部靜脈注入了表現PyVmT且受luciferase穩定轉染(stably transfected)的腫瘤細胞。肺臟中的腫瘤細胞負荷量(tumor cell burden)，是在腫瘤細胞的注入之後，使用活體內(in vivo)與活體外(ex vivo)的生物發光來監測的。經放射線處理的老鼠肺臟，表現了較控制組為高的生物發光訊號 (圖四B)，此訊號與人工計數之表面肺癌轉移數量是相關連的，亦與肺臟重量相關 (圖四，C與D)。

TGF- β 中和抗體阻斷了受放射線誘導增加之肺部癌症轉移。 我們使用了2G7中和泛TGF- β IgG2抗體 (2G7 neutralizing pan-TGF- β IgG2)來驗證，放射線所誘導增加的循環中TGF- β 濃度，是否在肺癌轉移中扮演一個成因的角色。這個單株抗體阻斷了所有三種哺乳類所具有的TGF- β 異構物，並且在活體中有活性。八週大的MMTV/PyVmT基因轉殖鼠，在胸腔放射處理的2小時之前，以15mg/kg之2G7或PBS注射至腹腔中。這些處理持續每週兩次，

到第十三週為止，此時將老鼠犧牲並測量是否肺部有癌症轉移。然而有趣的是，施打2G7到未經放射線處理的老鼠中，少許增加了肺癌轉移，但在統計上並不顯著（圖五A和B）。在兩種實驗組別之間，並未存在原發腫瘤細胞負荷量的差異（資料未呈現）。

我們收集了血液並體外培養其細胞懸浮液，以估計在循環中的腫瘤細胞量。從未經放射處理與經過放射處理的老鼠身上，血液中取得而培養的細胞群落數，均因施加2G7而顯著地減少（圖五C）。最後，我們檢驗了在體外添加2G7以抑制TGF- β ，是否會阻止老鼠血液中取得之腫瘤細胞群落生長。將帶有腫瘤、經過放射處理的老鼠所取得之血液，接種於含有2G7與不含有2G7的環境下，而在十天之後評估其集落生長情形。將細胞培養在存有2G7的環境下，發現會降低70%的細胞群落數（圖五D），這表示自泌性的(autocrine) TGF- β 對於表現PyVmT的循環中癌症細胞，是一種存活因子。

放射線誘導增加肺部癌症轉移，需要腫瘤細胞內的TGF- β 受器。以上描述的結果顯示，因放射線誘導之循環中TGF- β 濃度提升，是對於循環中腫瘤細胞的存活信號，讓細胞可以移居至肺臟、在肺臟裡生長。因此我們推論，藉由移除細胞對循環中TGF- β 的反應，以使得T β RII不存在於MMTV/PyVmT腫瘤中，就可以抵銷放射處理在癌症轉移上的效應。為檢驗此推論之可能，我們使用了表現PyVmT的腫瘤細胞，並且用Cre-Lox技術將T β RII有條件地於細胞中移除。含有或未含TGFB2的PyVmT表現型腫瘤細胞株（在此之後將稱為PyVmT/TGFB2^{flox/flox} or PyVmT/TGFB2^{KO}）是分別從PyVmT/TGFB2^{flox/flox}及PyVmT/TGFB2^{KO}老鼠身上的乳腺癌所產生。PyVmT/TGFB2^{flox/flox}及PyVmT/TGFB2^{KO}細胞株均以luciferase之載體穩定轉染，且經由尾部靜脈注射入八週大、未交配的FVB母鼠，這些母鼠有些沒有經過放射線處理，有些則是在注射腫瘤細胞之前1小時，施加了10 Gy的胸腔放射。兩週後估計肺部癌症轉移情形。在被注射PyVmT/TGFB2^{flox/flox}細胞的老鼠裡，經放射處理之老鼠相較於控制組老鼠，發現生物發光訊號有所增加、肺部癌症轉移增加6倍；但如果老鼠之前是被注射不含有T β RII的細胞，在施加與未施加放射處理的兩組中，便沒有差別（圖六，A-C）。PyVmT/TGFB2^{KO}的腫瘤結節比PyVmT/TGFB2^{flox/flox}的腫瘤結節還大，此結果與之前的一項報告是相符合的，也就是說，PyVmT表現型乳癌細胞之T β RII喪失，會增進肺部癌症轉移的生長。經PCR擴增腫瘤組織中取得之DNA證實了在PyVmT/TGFB2^{KO}細胞中，是存在基因重組的（圖六D）。

討論

我們在基因轉殖老鼠的乳癌轉移模型中，研究了癌症治療所誘發的TGF- β 是否會加速腫瘤的發生。在MMTV/PyVmT基因轉殖鼠中，在肺部施加游離輻射或是以doxorubicin處理，都增加了循環中的TGF- β 1量、循環中腫瘤細胞數以及肺部癌症轉移。循環中TGF- β 1濃度增加、之後的癌症轉移增加，並不需要老鼠在施加處理時就擁有腫瘤，就如同我們也在放射處理後才施打腫瘤細胞的老鼠中所觀察到的。TGF- β 1會增加，並不僅限於受到胸腔放射處理的誘導，因為我們在骨盆的放射處理、以及全面性施加doxorubicin下，也都觀察到了TGF- β 1的受誘導增加。在放射處理後，循環中腫瘤細胞的增加以及腫瘤轉移的增加，都因到2G7的施加而抵銷。重要的是，循環中PyVmT表現型腫瘤細胞無法在有2G7的環境下進行體外培養，這也就表示了自泌性(autocrine)TGF- β 對這些細胞是一種存活的訊號。這些結果與之前兩項研究是相吻合的；在這些研究中，以可溶性T β RII:Fc融合蛋白、或用反義TGF- β 1(antisense TGF- β 1)穩定性轉染加以阻斷TGF- β ，都抑制了腫瘤細胞的能動性、存活率、滲入(intravasation)以及肺部癌症轉移。

老鼠身上的腫瘤不含T β RII，放射線便無法在這些老鼠身上加強肺部癌症轉移。為了展

示此點，我們從PyVmT/TGFBR2^{flox/flox} 與 PyVmT/TGFBR2^{KO}之老鼠身上既成之乳腺腫瘤，取得細胞株來使用。Forrester等人曾經提出報告，以MMTV/Cre表現有條件地使TGFBR2缺失時，這些knockout PyVmT表現型的腫瘤發生潛伏期就變短了許多，並且表現出明顯增加的肺部癌症轉移，這是相較於PyVmT/TGFBR2^{flox/flox}型的腫瘤。因為我們使用了靜脈注射法，並且，我們所注入細胞株是從既成之含有TβRII與未含TβRII的腫瘤而來，所以我們的結果無法解釋Forrester等人所報導之癌症潛伏與轉移的表現。儘管我們在經放射處理的老鼠中無法排除TGF-β之增加，是否會影響宿主的微環境(microenvironment)與/或免疫系統，並進而幫助了腫瘤轉移之進行，我們不含有TβRII之腫瘤的結果卻強烈地顯示，癌症轉移之增加至少在部分上，是肇因於TGF-β在癌症細胞的直接作用。

在腫瘤細胞中，這些潛在受循環中TGF-β濃度調控的訊號反應，目前仍屬未明。然而，TGF-β的助癌轉移效應並不僅限於此基因轉殖模型。舉例說明，在MMTV/LTR啟動子控制下表現有活性的TGF-β1與Neu的雙基因型(bigenic)的老鼠，也表現出比MMTV/Neu更多的循環中腫瘤細胞與肺部癌症轉移。會表現Neu和具活性的TGF-β1之乳腺腫瘤細胞，能侵入Matrigel並且能在transwells上移動，但卻受可溶性的TβRII:Fc給阻斷，表示單單Neu不足以誘導出一種侵略性的表現型。再者，在會表現具活性Neu的基因轉殖腫瘤裡，若共同表現具活性的突變種Alk5和TβRI，會增加肺部血管外的癌症移轉(extravascular lung metastasis)，這與TGF-β之效應相符：也就是腫瘤周圍蛋白酶、癌症細胞的附著和侵略。PyVmT是一個強而有力的癌症基因，我們也已經知道它會活化ErK和PI3K；但2G7竟然能對如此的腫瘤細胞具備有效的抗腫瘤移轉效果，有點不符合直覺。但是，這表示TGF-β可以放大癌症基因的訊號，而只要這訊號大於某一閾值，可以完全地使腫瘤移轉被觀察到；並且，相反地，在腫瘤基因已惡性轉化的細胞(oncogene-transformed cells)內阻斷TGF-β訊號時，會把這些訊號降低至比閾值更低的程度，使其無法到達癌症基因誘導癌症進行。確實如此，在鱗狀細胞癌(squamous cancers)中被逼著表現的顯性-具活性Smad2，已經被證實會和有活性的Ras共同作用，使不具侵略性的腫瘤轉變成會轉移的腫瘤；但Smad突變型不與TβRI結合，並會抑制乳癌細胞的轉移。最後，在Ras經惡性轉化的細胞中，顯性-不具活性且被截短的TβRI表現之後，則是會抑制腫瘤的產生能力(tumorigenicity)以及癌症移轉。

癌症治療後的腫瘤再增殖(repopulation)與發展，是一眾所皆知的現象。它已被證實會在放射治療、化學治療以及手術摘除後發生。(在參考文獻37中有回顧)。TGF-β的濃度會對放射線有所反應而增加，也被發現與放射治療後之肺臟受傷有關，這是由膠原蛋白沉積、肺泡壁的增厚以及內皮細胞受傷所致。放射線引起的肺臟組織傷害，會因為施以抗TGF-β抗體而顯著地減少。在手術方面，已經有人提出，因為組織操作以及傷口復原而產生的生長激素過量釋放，包括TGF-β的過量釋放，會緊接著手術之後促進癌症移轉。確實如此，手術之後，循環中隨即發現了腫瘤細胞的存在，也發現腫瘤細胞數量的增加；而且在治療性切除直腸癌兩週之後，若循環中的TGF-β濃度居高不下，就表示癌症會很快地轉移至肝臟。相反地，在手術剛切除直腸腫瘤後，血清中的TGF-β濃度卻是顯著地降低的。最後，以化學-放射治療處理後期的頭頸部癌症，以及以化學治療處理非小型細胞肺癌(non-small-cell lung cancers)的情形下，循環中的TGF-β濃度已被證實和對治療的反應相關。

在本研究中，我們展示了放射治療與化學治療會提升循環中的TGF-β濃度、循環中的癌症細胞數、以及癌症的移轉。這些效應會因為系統性地施加2G7而被阻斷，因此支持TGF-β為癌症轉移進展之肇因的說法。這些數據有數個臨床上的含意。第一，因癌症治療而增加的循環中TGF-β濃度，應該要預前地探討與監控，因為它可能是一種標記，代表腫瘤注定要在治療之後快速地增長。第二，在循環中TGF-β濃度已被觀察到增加的病人，其身上帶有的腫瘤，可能會因我們施加TGF-β抑制劑而加強基本療程的效果，也可能可以抵銷與療程相關的毒性效應，例如放射線引起的組織傷害以及纖維化。我們預期，以我們現存的方法以及

尚在臨床研發中的治療用TGF- β 抑制劑，這些假說在不久的將來可以被證實。

方法

藥劑與細胞株。2G7融合瘤是B. Fendly (Genentech)所贈。它是在Vanderbilt University Molecular Recognition Core facility被製出以及用親和純化法所得到的。重組的人類TGF- β 1以及為TGF- β 1用的Quantikine Elisa kit是從 R&D Systems取得。表現PyVmT的細胞株是從MMTV/PyVmT基因轉殖鼠的乳腺腫瘤中取得。PyVmT/TGFBR2^{flox/flox}及PyVmT/TGFBR2^{KO}細胞株是分別從PyVmT/TGFBR2^{flox/flox}及PyVmT/TGFBR2^{KO}老鼠的乳腺癌中取得。我們在這些老鼠中使用Cre/Lox技術，有條件地從乳腺中刪除了TGF- β II。細胞被培養在一個37°C、濕化5%的溫箱中，並且培養於添加了10% FBS(HyClone)的DMEM(Cellgro; Mediatech Inc.)中。

TGF- β 1的生物檢測。貂肺臟內皮報告細胞(mink lung epithelial reporter cell)在PAI-1啟動子控制下，穩定地表現螢火蟲luciferase。這些細胞接種於12-well 培養皿上 (2×10^5 /well)並且留置過夜供其貼附。已知濃度的可溶性TGF- β 1或肺臟組織的細胞裂解液(250 μ g/well)加入了三次，而這些細胞被留在5%二氧化碳、37°C的環境下培養了另外24小時。在清洗之後，這些細胞被收取至200 μ g/well的裂解緩衝液中(Dual Luciferase Kit; Promega)，luciferase的活性則是在依據廠商提供的實驗步驟下進行了測量。

DNA萃取與聚合酶連鎖反應(PCR)。以石蠟固定的腫瘤切片被取出和重新添加水分。趁著還潮濕的時候，腫瘤部分以經消毒之刀片刮取至經消毒的ependorf管中。DNA萃取是使用Instagene (Bio-Rad)並依廠商提供的實驗步驟所完成。DNA樣本儲存在-20°C，除非要另外使用。Cre誘導的PyVmT/TGFBR2^{KO}腫瘤重組，是用PCR引子以及前述之反應條件下所驗證的。

眼窩後(retroorbital)血液收集以及TGF- β 1之定量。老鼠以1%-2% isoflurane麻醉。血液(約250 μ l/老鼠)採集於眼睛裡的結膜靜脈，作法是使用肝素化之Natlson tube (Fisher Scientific)然後再移轉到肝素化的(heparinized)玻璃管中。血漿的製備是使用Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)並依照廠商之使用說明進行，且增加了一個步驟，即在4°C下以10000g離心十分鐘以除去血小板。為測量PyVmT表現型細胞之培養基中的TGF- β 1， 1×10^6 的細胞被塗佈在含在完全培養基的10 mm盤上，並且供其貼附。該培養基在隔天被更換成無血清之培養基。隔夜培養後，細胞被施以1.25-7.5 Gy。過72小時後，培養基經收集並以快速真空法濃縮(3 ml to 500 μ l)。老鼠的血漿和受細胞條件培養基 (cell-conditioned medium)，均在下一步的TGF- β 1的Quantikine Elisa kit (R&D Systems)中接受測試，依照的是廠商提供的實驗步驟。標準曲線以31.5–2,000 pg/ml的人類重組TGF- β 1繪出後，被用來計算TGF- β 在老鼠血漿與細胞培養基中的等量。每項標本都在另外的重製實驗中重複檢驗了三次。

TGF- β 2之定量。依照廠商提供之實驗步驟，在酸活化之後，血漿標本以TGF- β 2 Quantikine Elisa kit (R&D Systems)測試。標準曲線以31.5–2,000 pg/ml的人類重組TGF- β 2繪出後，被用來計算TGF- β 2在老鼠血漿的等量。每項標本都在另外的重製實驗中重複檢驗了三次。

老鼠的放射處理。MMTV/PyVmT基因轉殖老鼠或正常的FVB母老鼠(Harlan)，在麻醉後把背部固定在鏡臺上。我們使用了單一的胸前輻射場，並使用了鉛塊掩護老鼠身體的其他部分。在某些實驗中則是使用了一個單一腹部輻射場。老鼠被施加300 kVp 的X光，其劑量為 2.05 Gy/min。所有的老鼠都依照此法規Institutional Animal Care and Use Committee of

Vanderbilt University Medical Center，被留在一個專門的無病原空間中。在動物暴露在放射線或其他處理後，餵食正常食物，並且詳細觀察是否有任何情緒不穩的跡象。

小紅莓(doxorubicin)的處理。53天大的MMTV/PyVmT老鼠，經腹腔注射三次溶解於食鹽水液中的doxorubicin (Adriamycin; 5 mg/kg; Sigma-Aldrich)，每次間隔21天，直到第95天止。經無效空白試劑或小紅莓處理之老鼠，其血液樣本和肺臟組織，都於第107天解剖取得。為了要檢查小紅莓處理之後的循環中腫瘤細胞，經無效空白試劑或小紅莓處理之老鼠，其血液在取得24小時後，又加入了單一劑量(5 mg/kg)。

偵測循環中腫瘤細胞。循環中腫瘤細胞之培養方法如前述，僅有少部分之修改。扼要地說，血液取得於心臟穿刺。細胞懸浮液（包括buffy coat以及紅血球）從血漿中分離出後，接種在6-well盤上，這些盤上佈有了生長激素減量之Matrigel (BD Biosciences)，並添加有DMEM、10%FBS，之後便於37°C、5%二氧化碳之溫箱中培養。隔天，在每個well使用了紅血球移除緩衝液(4.15 g NH₄Cl, 0.5 g NaHCO₃, 0.0186 g disodium EDTA in 200 ml water)以及PBS，數次緩和的沖洗。DMEM與10%FBS(3ml/well)添加後，新鮮的培養基每三天將會補充一次。過了10-12天後，以人工計數大小為50μm以上之細胞集落。PyVmT表現是用免疫細胞化學方法來偵測的。扼要地說，吸出培養基、以PBS清洗wells，然後細胞集落以10%中性緩衝的福馬林(formalin)，在室溫下固定30分鐘，再用PBS清洗2次，再於室溫下與PBS中之3%BSA共存1小時。培養盤接著培養隔夜，於4°C置放於含有生物素標記的抗PyVmT的老鼠單株抗體(diluted 1:500, BIOT-115L; Covance)。然後，加入與streptavidin結合之螢光二級抗體(Oregon Green 488; Invitrogen) 室溫下1小時，之後使用Hoechst 細胞核染色法(1 μg/ml 十使用分鐘)。免疫螢光是以Leica DM IRB 倒置顯微鏡所觀察的。

生產反轉錄病毒載體以及細胞轉導。MMTV/PyVmT細胞，是以luciferase之載體穩定轉染的。一個luciferase cassette從pGL3-Basic (Promega)裁切下來，並嵌入pMSCV-puro (Clontech)之多重複製位上。amphotropic packaging Phoenix cells 轉染後，產生感染性病毒顆粒，如前述。培養生長中(subconfluent)之癌症基因表現細胞，在4 μg/ml Polybrene (Sigma-Aldrich)中，以病毒上清液轉導6小時，而含有病毒顆粒的培養基在6小時之後更換；在48小時後，再添加含有10%已經加熱變性之FCS的DMEM，並於7-10天後將抗藥的細胞集落合併。

腫瘤產生能力以及腫瘤轉移之研究。在1%–2% isoflurane 之麻醉下，MMTV/PyVmT/Luc細胞(2×10^6 cells in 200 μl PBS) 被注射於FVB母鼠的左側四號乳腺脂肪墊。扼要地說，在注入腫瘤細胞之前，脂肪墊便已經以手術使其暴露在外，而傷口以乾淨夾子密合，並於10天之後取走。每週以生物發光法檢查腫瘤兩次，並系列地以測徑器測量之。這些腫瘤的以立方公釐(mm³)計算之體積，是以此數學式計算： $v = (w^2 \times l) / 2$ ，v代表體積，w代表寬度，l代表長度。當腫瘤達到了200 mm³或更大的體積（約兩週時間），老鼠就被施以放射線處理，或是不作任何處理。老鼠繼續每週兩次接受生物發光法的監控觀察，直到實驗終結。兩週之後，將老鼠犧牲並取得基本的腫瘤與肺臟。以解剖顯微鏡計算肺臟表面之癌症轉移數，之後這些肺臟以10%中性緩衝之福馬林(formalin)固定之。固定好的腫瘤切片，以H&E染色之，並以顯微鏡檢查是否有肺癌之轉移。血液是由心臟穿刺取得以如前述，測量TGF-β之濃度以及循環中之腫瘤細胞數。

在其他的情形裡，我們使用了MMTV/PyVmT、PyVmT/TGFBR2^{flox/flox}或PyVmT/TGFBR2^{KO}細胞來表現luciferase。 2.5×10^6 之單一細胞懸浮液製備後，重新溶於無菌之PBS液中。 0.5×10^6 (in 200 μl)的細胞被注射入FVB母鼠之側面尾部靜脈中。靜脈注射24小時後，腫瘤細胞於老鼠肺部之位置，以生物發光法確定之，並且自此之後每週追蹤兩次。為了要在活體內阻斷TGF-β，在把10 Gy注入老鼠胸腔的前24小時，將15 mg/kg的2G7注入老鼠腹腔內，每週兩

次，持續進行，直到老鼠死亡。

生物發光法顯影技術。要將生物發光之訊號與腫瘤負載量建立定量的對應關係，先以溶解於去離子水的 luciferin substrate (d-luciferin potassium salt; Promega)進行腹腔注射(0.15 mg/g body weight)，在注射之後12分鐘內取得影像。根據我們之前的時間記錄之實驗，在此時間記錄訊號高峰處之強度（資料未呈現）。在取得影像時，將老鼠以isoflurane麻醉。生物發光顯影是以Vanderbilt University Small Animal Imaging Center的 IVIS-200 顯影系統 (Xenogen)完成的。我們採用了3-5分鐘的整合計算時間，並使用on-chip binning of 8，以增加訊號-雜訊比。生物發光顯影之定量分析是以Living Image software (Xenogen)完成，我們在此定義了感興趣區域（regions of interest, ROI）並測量了integrated photon counts。

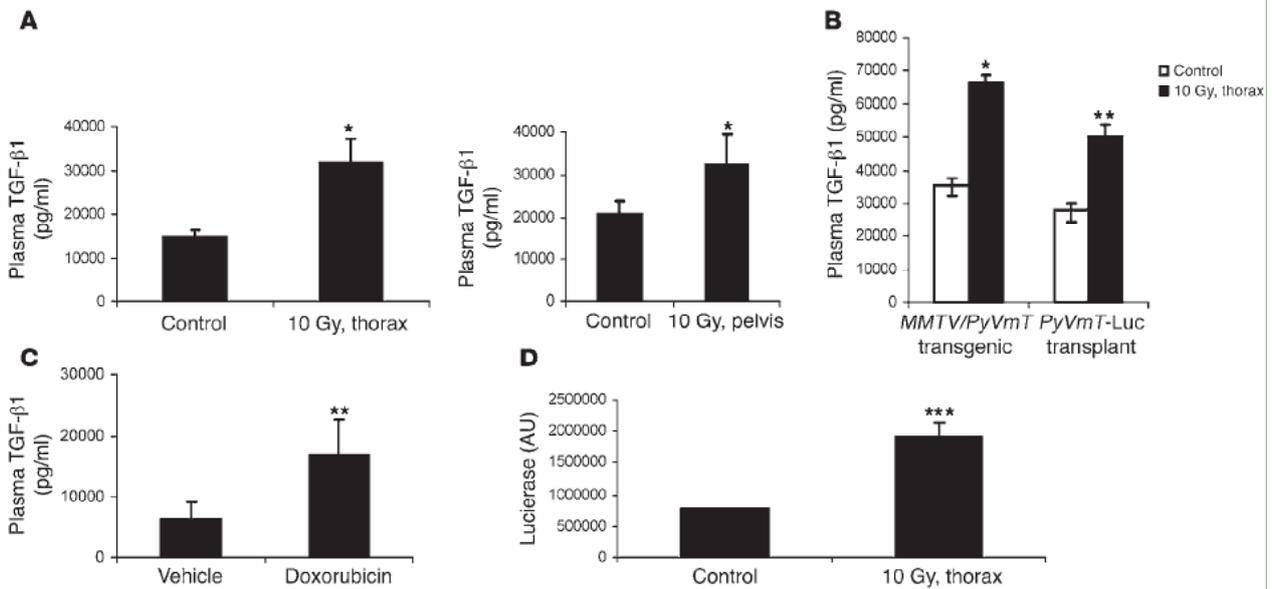
統計。所有的實驗數據均以雙尾Student's *t* test分析。P值小於0.05被視為顯著。

Table 1
Lung radiation contributes to circulating tumor cells' survival

Time after RT	Dose	Circulating tumor cells
24 hours	0 Gy	2 ± 2
24 hours	10 Gy	17.3 ± 6.2 ^A
2 weeks	0 Gy	4.5 ± 0.7
2 weeks	10 Gy	50 ± 15 ^A

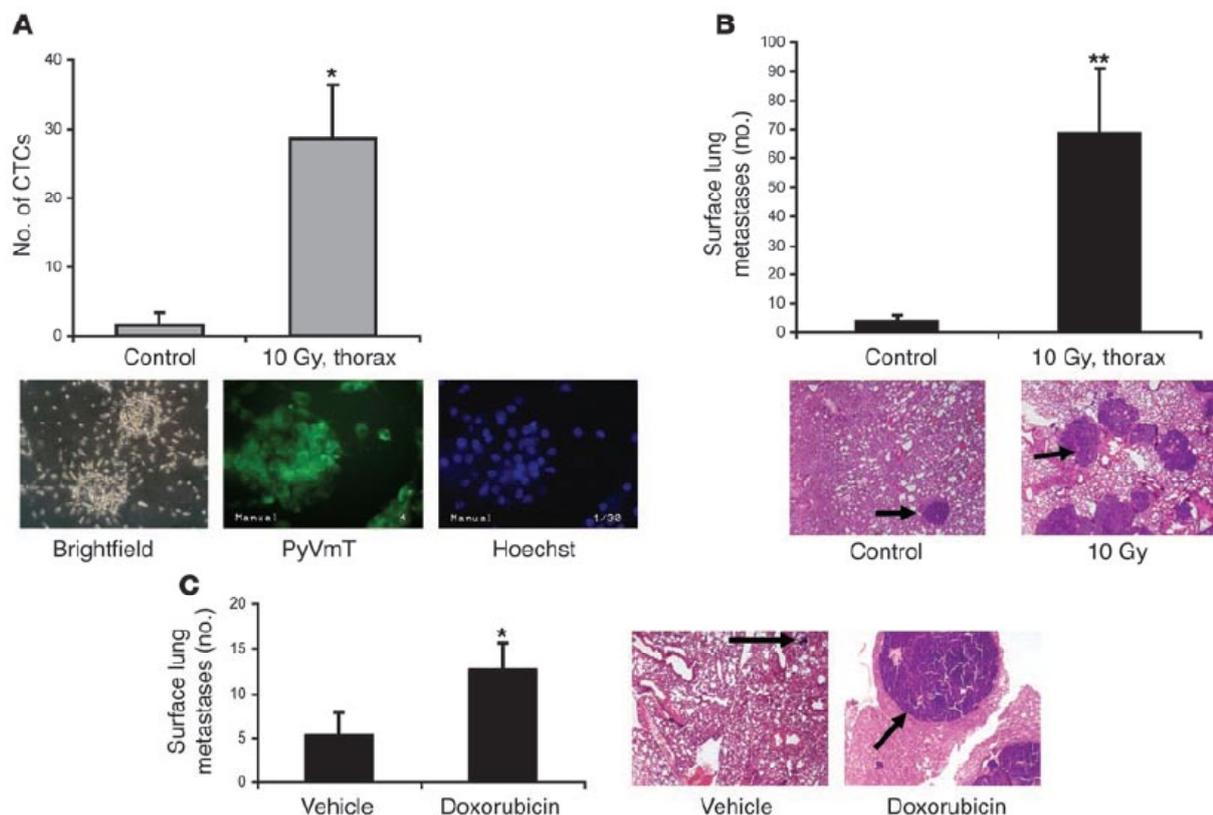
表一

穩定表現luciferase的MMTV/PyVmT細胞，被注射入FVB老鼠的右側鼠蹊乳腺脂肪墊中。擁有200mm³以上腫瘤的老鼠，不加以放射處理，或是在胸腔施加10 Gy的放射處理。在24小時及2週後，以心臟穿刺取得血液，並測量細胞懸浮液在活體外形成細胞集落的能力，如「方法」文中所示。數據為兩個分別的實驗中，每組五隻老鼠的平均值±標準差。RT是指放射治療（radiation therapy）。在同一時間點下， $AP = 0.016$ versus 0 Gy。



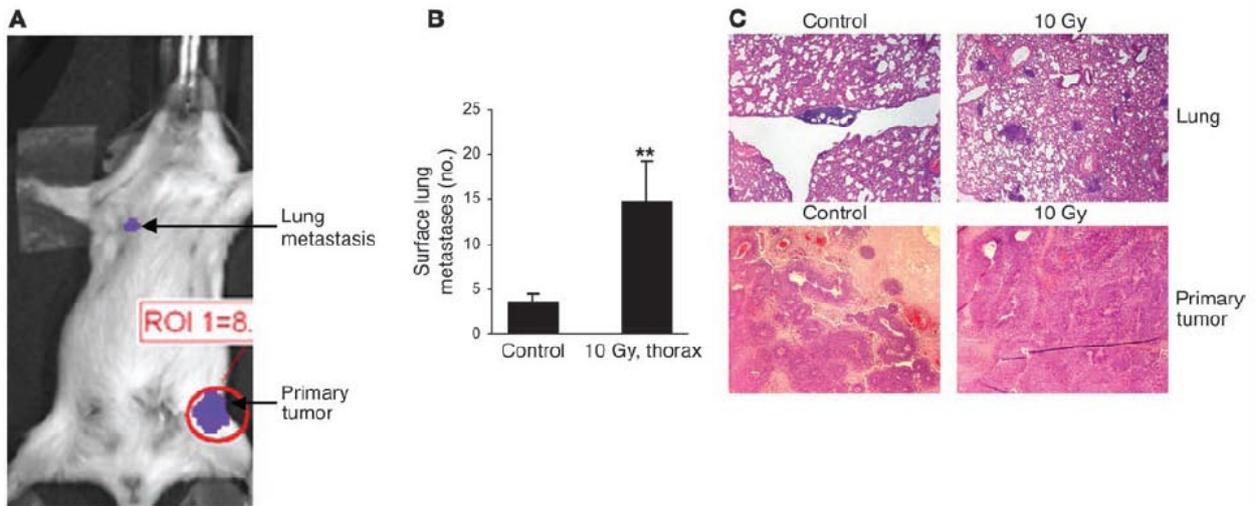
圖一

放射線與化學治療增加循環中TGF-β1濃度。(A) 10 Gy 的放射線被施加於FVB老鼠之胸腔(thorax) (左)或骨盆腔(pelvis) (右)。24小時之後取得血液，血漿中之TGF-β1濃度以在「方法」中所述測量。(B) 八週大、帶有腫瘤之MMTV/PyVmt 老鼠，或非基因轉殖之FVB 老鼠，在四號乳腺脂肪墊帶有200mm³以上大小之腫瘤，不作任何處理或施加10 Gy 於胸腔。血漿中TGF-β1 濃度，24小時後測量之。(C) 在第八週起，每隔21天，以空白試劑或腹腔注射小紅莓 (5 mg/kg i.p.)，處理基因轉殖老鼠三次。血漿中TGF-β1濃度在第十五週測量之。A-C 之數據代表三個不同的獨立實驗，每組使用三個實驗對象。(D) FVB老鼠胸腔被施加10 Gy。五週後，取得經放射線處理、控制組老鼠之肺臟，及其細胞裂解液(250 μg/ml)，加到含有貂肺上皮細胞的 triplicate wells，這些細胞會穩定地表現 plasminogen activator inhibitor-1/luciferase reporter (PAI-1/luciferase reporter)。二十四小時後，測量luciferase之表現，方法如「方法」部分中所述。圖示：*表示P < 0.05，**表示P < 0.01，***表示P < 0.001 相對於控制組。



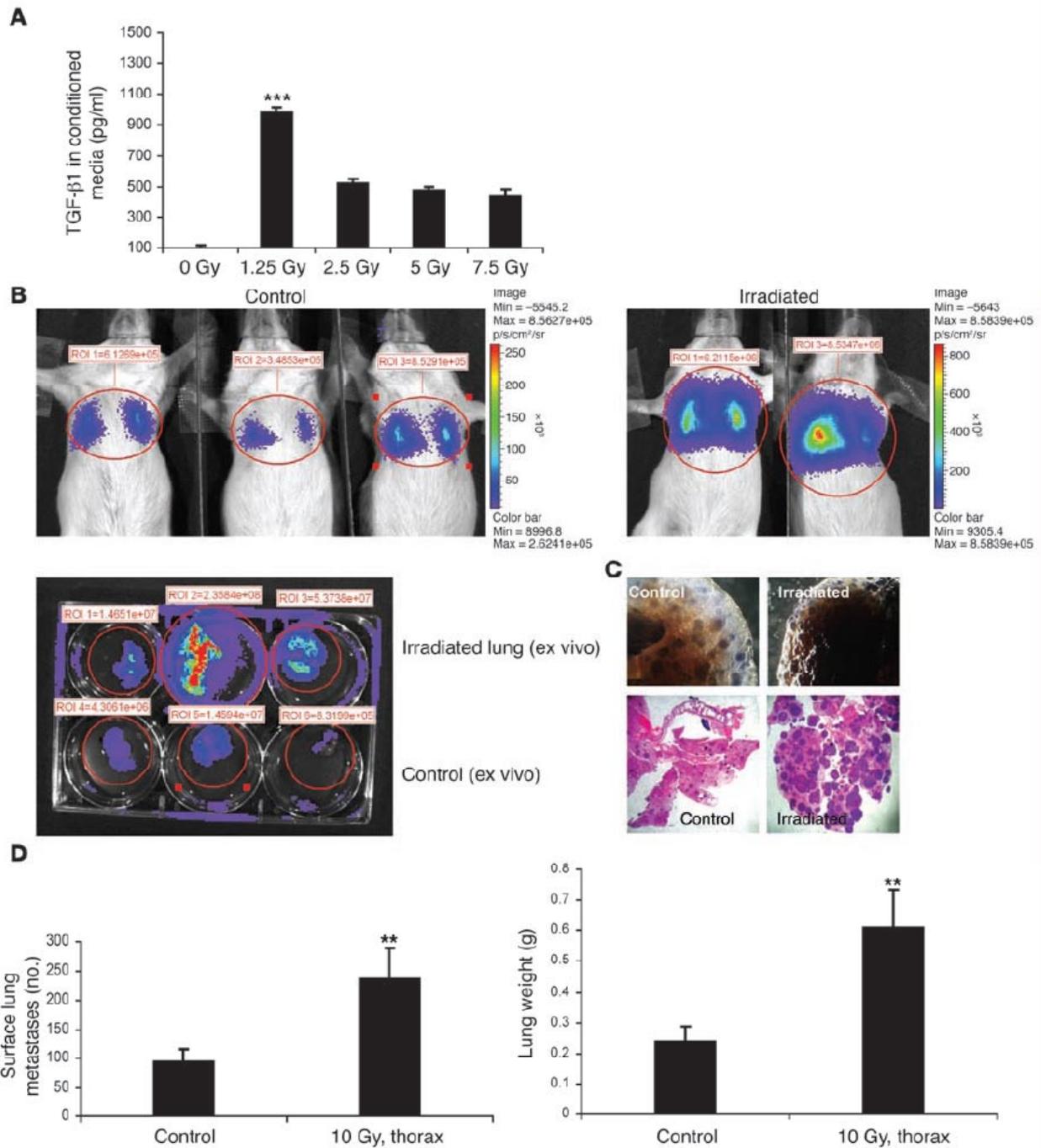
圖二

放射線與化學治療增加循環中腫瘤細胞量以及肺部之腫瘤轉移。(A) MMTV/PyVmT母鼠在八週大時，接受胸腔放射線處理。在第十三週時，當實驗終結，以心臟穿刺取得血液，並量取其細胞懸浮液在體外產生細胞集落之能力，如「方法」中所述。CTCs代表循環中腫瘤細胞 (circulating tumor cells)。在下面為一些具有代表性的影像，是由血液中取得、循環中單一個腫瘤細胞形成的細胞集落。基因轉殖成功的細胞集落，用PyVmT抗體和螢光之次級抗體處理，並以螢光顯微鏡觀察並估計之。(B) 與A同樣之老鼠，在第十三週大時計算肺部表面癌症之轉移數目。A和B中之數據是代表三個獨立的實驗，每組中有四隻老鼠。從控制組以及經放射線處理之基因轉殖老鼠上，取得具代表性之 H&E 染色的肺部組織切片。這些切片是胸腔放射處理後五週所取得，如下方所示。黑色箭頭所指為肺部癌症轉移。(C) 八週大、帶有腫瘤的 MMTV/PyVmT 基因轉殖老鼠，每隔21天以空白試劑或腹腔注射小紅莓(5 mg/kg i.p.)處理共三次。此實驗於第十五週時終結，並計算肺部表面之癌症轉移數量。具代表性之H&E染色肺部切片，其含有癌症轉移部分的中心如右方圖示。原始放大倍率為100倍。*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，相較於控制組。



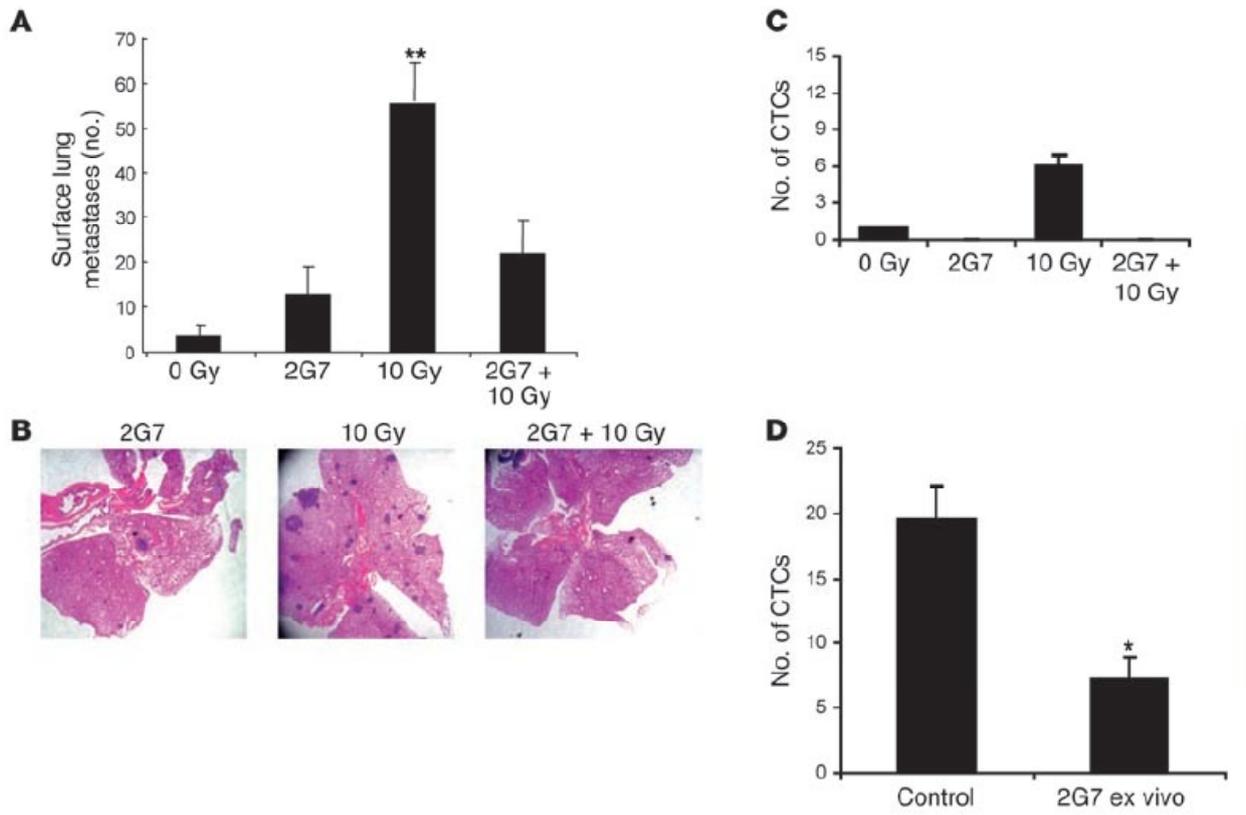
圖三

胸腔放射線會增加殖入腫瘤至肺部的癌症轉移。(A) 穩定表現luciferase的MMTV/PyVmT 細胞，被注入同源FVB老鼠之乳腺脂肪墊中。之後，兩週一次，以生物發光顯影法監測腫瘤生長以及肺部癌症轉移。圖示為一具代表性之老鼠，圖為細胞注入兩週之後所攝(B與C)。帶有至少200 mm³ PyVmT/Luc腫瘤的老鼠，以胸腔放射線(10 Gy)處理之或不施加任何處理。(B) 肺部癌症轉移在兩週之後定量。數據為每兩次實驗中之一次，每組五隻老鼠之平均值 ± 標準差。**表示P < 0.01 相較於控制組 (C) 肺部與原發腫瘤之H&E 切片。原始放大倍率為100倍。



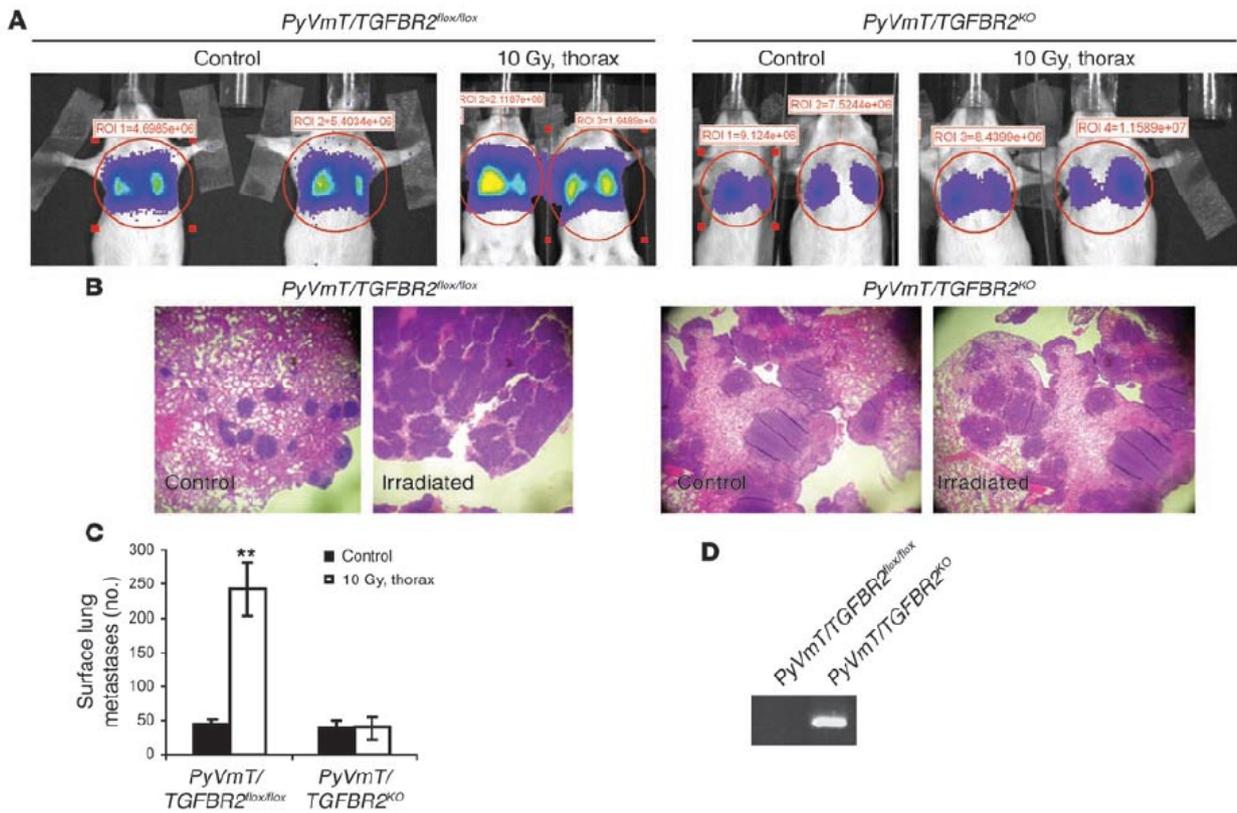
圖四

放射線的先行處理，會使移轉的肺癌細胞更能夠拓展在原本無腫瘤的老鼠身上。(A) *MMTV/PyVmT* 細胞，在加有不含血清之培養基之100-mm 培養皿裡，以1.25–7.5 Gy處理。受細胞所影響之培養基在72小時後進行收集，並以如「方法」中所述之ELISA得知TGF-β1之濃度。(B) 穩定表現luciferase之*MMTV/PyVmT* 細胞，由尾部靜脈注入未交配之FVB母鼠。在接受細胞注射1小時之前，老鼠在圖中所標部分之胸部，以10 Gy處理之。在注射之後2週，肺部之癌症細胞以老鼠的生物發光法進行視覺觀察(頂圖)。某些情形中，肺臟在添加d-luciferin之後被手術移除，並於體外進行顯影(底圖)。控制組如左圖所示，受放射線處理之老鼠如右圖所示。(C) 具代表性的整體肺部載片(頂圖)以及控制組與放射線處理組之H&E肺部切片(底圖；原放大倍率為100)。(D) 在控制組與放射線處理老鼠中，肺部表面癌症轉移之定量(左圖)與肺部重量(右圖)。數據為兩個獨立實驗中，每組的五隻老鼠的平均值±標準差。圖示：**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ ，相較於控制組。



圖五

TGF- β 中和抗體2G7，阻斷了放射線誘導增加的肺部癌症轉移。(A和B) 八週大、帶有腫瘤的MMTV/PyVmT老鼠於胸腔接受10 Gy處理。在圖中標出之部分，老鼠被每週兩次施以15 mg/kg 的2G7，直到第十三週。此時進行肺部表面之癌症轉移計數。(A) 數據為每組中五隻老鼠的平均值 \pm 標準差。(B) 代表性的H&E 染色肺部切片。此實驗重複一次取得了類似的結果。(C) 當實驗終結，以心臟穿刺取得血液，並量取其細胞懸浮液在體外產生細胞集落之能力，如「方法」部分中所述。(D) 在第十三週，經過胸腔放射處理、帶有腫瘤的基因轉殖鼠，收集血液。細胞懸浮液如C圖中情形，在20 μ g/ml 2G7或PBS環境下，塗佈於培養盤上。10-12天後，人工計數等於或大於50 μ m的細胞集落。數據為每組五隻老鼠的平均值 \pm 標準差。*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ 相較於控制組。



圖六

腫瘤細胞中不存在TGFβRII，能抵銷受放射線誘發的肺部癌症轉移之增加。(A–C) 未交配的、八週大的FVB母鼠，從尾部靜脈注入穩定表現 luciferase的*PyVmT/TGFBR2^{flax/flax}* 與 *PyVmT/TGFBR2^{KO}* 細胞。這些老鼠在注射腫瘤細胞之前，一組接受、一組未接受胸腔的10 Gy處理。兩週後，以生物發光(A)、組織染色(B)、以及人工計數肺部表面癌症轉移(C)的方法，來測定肺部表面癌症轉移，如「方法」中所述。資料為每組中四隻老鼠的平均值±標準差。(D) 兩組細胞株的基因體DNA之PCR結果，顯示重組片段的僅存在於*PyVmT/TGFBR2^{KO}* 細胞中。**表示 $P < 0.01$ 相較於控制組。

譯者：Jeffrey Chu at Hsinchu, Taiwan. 2009/4/4

不免有所遺漏、錯誤，敬請參考與指正，謝謝。