

ConA 和 PHA 对急性白血病细胞系细胞生长的影响

张澜生 王思泽 田德华 徐鸿贞 林发榕 刘静山

(苏州医学院微生物学教研室)

植物种子中的有丝分裂原如 ConA 和 PHA 等对动物细胞的作用是目前生物学领域中较为重要的课题。以往的大部分研究集中在 ConA 和 PHA 等活化正常淋巴细胞的作用(即淋巴细胞转化等)等方面,对人类恶性瘤细胞系或正常细胞系的生长抑制作用研究得很少^[1]。本文报道不同剂量的 ConA 或 PHA 对于 S₇₈₁₁ 细胞系(1978 年 11 月从一急粒型白血病人外周血建立的细胞系)生长的影响,同时以正常人外周血淋巴细胞作为平行样本对照。

材 料 和 方 法

一、材 料

ConA 和 PHA 为广州市医药工业研究所制品。

³H-TdR 和核乳胶是中国原子能研究所供给,

³H-TdR 的放射性比强度为 34Ci/mM。

细胞为我室传代(35—40代)培养的白血病细胞系 S₇₈₁₁。

培养液含 20% 灭能的新生小牛血清,青、链霉素各 100u/ml 和谷氨酰胺 0.3mg/ml 的 RPMI 1640, pH 为 7.2~7.4。

二、方 法^[2,3,4]

1. **细胞培养与同位素标记** 取培养三天、在指数生长期的细胞,用台盼蓝排除法计算活细胞数后,调整细胞数为 2×10^5 /ml, 分装于培养小瓶中,每瓶 3ml。然后每瓶分别加入不同剂量(250 μ g、125 μ g、62.5 μ g)ConA 或 PHA, 每一剂量组作 3 个复瓶;并且以 3 瓶不加丝裂原的培养物作对照。取正常人外周血淋巴细胞,以同样条件,作平行样本观察。将培养物置 37 $^{\circ}$ C 温箱中,48 小时后每瓶加入 ³H-TdR 0.6 μ Ci/20 μ l, 再置 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时(连续标记)后,测定掺入细胞的 ³H-TdR 的量或作显微放射自显影。

2. **液体闪烁测定法** 采用玻璃纤维滤纸法,将玻璃纤维滤纸剪成直径为 2.5cm 的圆片,放在滤器

上,先用生理盐水润湿滤纸片,随即用滴管滴加已标记的培养物于滤纸片上,边滴加边抽滤,然后用生理盐水 6 ml 洗涤,除去游离的 ³H-TdR; 再滴加 5% 三氯醋酸 3 ml 进行固定。最后滴加无水酒精 3 ml 脱色。抽干后,取出滤纸片,置 70~80 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干;待冷却后,放置含有 5 ml 闪烁液的测量杯底部,细胞面向上,用 FJ-353 型双道液体闪烁计数器进行放射强度测定。记录每瓶样品的每分钟脉冲数。丝裂原的每一剂量以 3 个复瓶的平均每分钟脉冲数(cpm)表示。

根据每一剂量 3 个复瓶的平均 cpm, 计算其抑制百分率:

$$\text{抑制百分率} = \frac{\text{对照 cpm} - \text{实验 cpm}}{\text{对照 cpm}}$$

3. **显微放射自显术** 取连续标记 ³H-TdR 24 小时的培养物,用滴管混匀后,移入刻度离心管,用生理盐水洗细胞三次,压积的细胞加 37 $^{\circ}$ C 预热的 0.075 M KCl 3ml, 于室温放置 1 分钟,使细胞膨胀、分散。然后离心、去上清,沉淀物加甲醇冰醋酸固定液(甲醇:冰醋酸 = 3:1), 15 分钟后,离心沉淀,去上清,沉淀物用气干法制片;然后在暗室中将核乳胶置 37 $^{\circ}$ C 水浴中融化后,随即加入 1/10 体积的硬化剂,再加等体积的蒸馏水稀释之,搅匀后即可涂敷于细胞制片上。待干后,保存于暗盒中,在 4 $^{\circ}$ C 曝光 5 天,然后在暗室中取出细胞制片,进行显影、定影处理。待干后,用 Wright-Giemsa 染色,然后镜检并计数 1000 个细胞,含 5 个以上银盐颗粒的细胞为 ³H-TdR 标记阳性细胞,从而计算细胞标记百分率:

$$\text{标记百分率} = \frac{\text{标记阳性细胞数}}{\text{标记阳性细胞数} + \text{未标记细胞数}} \times 100$$

在实验前测定正常人外周血淋巴细胞对 PHA 和 ConA 刺激反应的最适浓度和最佳反应细胞数。实验确定其最适浓度为 125 μ g/3ml 培养物, 反应最佳细胞数为 2×10^5 /ml 培养液。

实验结果

由表1可看到, S_{7811} 细胞系对 ConA 和 PHA 的刺激反应, 与正常人淋巴细胞对这两种丝裂原的反应明显不同。分别接受 ConA 和 PHA 刺激的正常人淋巴细胞与不加丝裂原的对照比较, 其 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的 cpm 明显增

高, 在最适剂量(125 μg)时, 其 cpm 最高, 且反应呈现出剂量依赖现象^[5]。相反 S_{7811} 细胞系, 在不同剂量丝裂原刺激下, 与不加丝裂原的对照相比, 其 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的 cpm 则明显降低。ConA 引起的抑制百分率分别为: 62.5 μg 是 57.08%; 125 μg 是 74.34%; 250 μg 是 78.61%; PHA 有类似的抑制作用。

表 1 丝裂原对 S_{7811} 细胞生长的抑制效应

细胞种类	丝裂原剂量 ($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 (cpm \pm SE)	抑制率 (%)
S_{7811} 细胞系	ConA 250	2829.3 \pm 220.5	78.61
	125	3393.7 \pm 238.0	74.34
	62.5	5677.3 \pm 112.3	57.08
	0(对照)	13226.3 \pm 491.7	
	PHA 250	2325.0 \pm 172.6	82.42
	125	2326.7 \pm 146.6	82.41
	62.5	3659.3 \pm 336.4	72.33
	0(对照)	13226.3 \pm 491.7	
正常淋巴细胞	ConA 250	1598.0 \pm 461.8	
	125	3818.3 \pm 74.2	
	62.5	2725.7 \pm 489.3	
	0(对照)	113.0 \pm 18.1	
	PHA 250	5451.9 \pm 352	
	125	5761.7 \pm 505.1	
	62.5	4456.0 \pm 95.3	
	0(对照)	113.0 \pm 18.1	

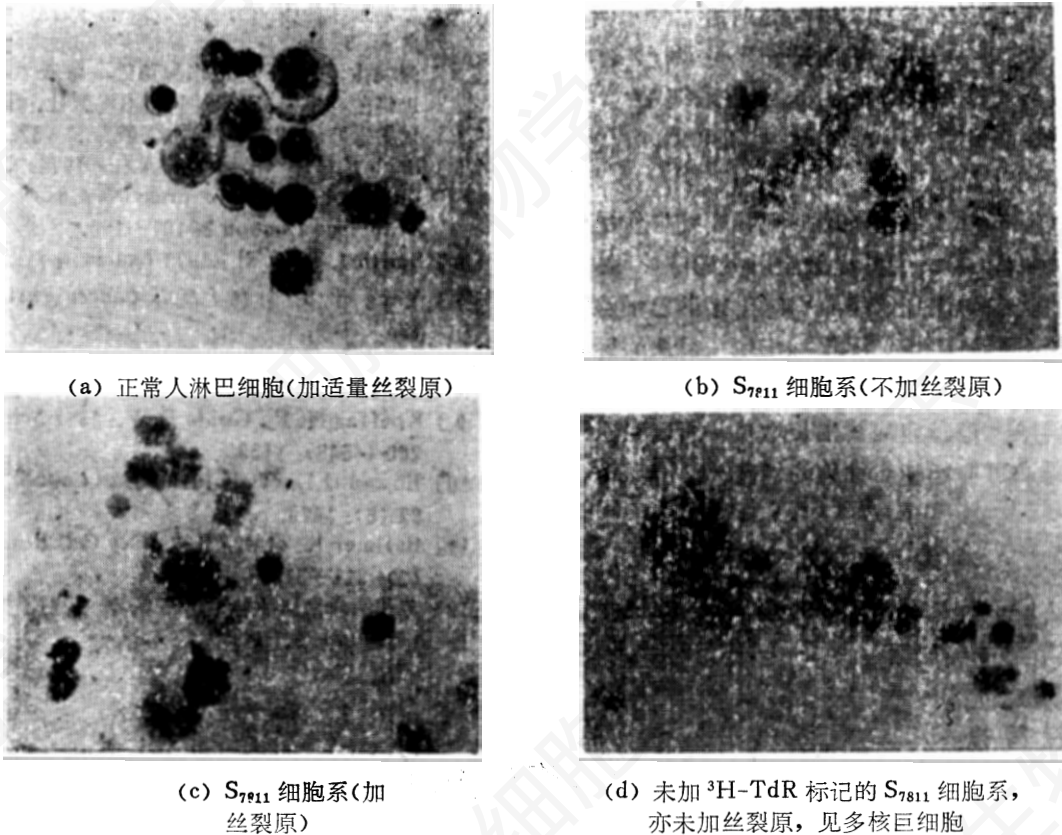
表 2 所列是用显微放射自显影术得到的在丝裂原影响下标记细胞百分率的变化结果, 不加丝裂原的 S_{7811} 细胞系, 阳性标记百分率为 30%, 且随 ConA 或 PHA 的剂量递增而标记百分率明显降低, 加 125 μg ConA 时可降低到 23%, 加 400 μg ConA 时只有 9.6%; PHA 亦同。这和液体闪烁法的结果是一致的。

从图(a)可见, 加丝裂原的正常人淋巴细胞, 核规则, 边缘整齐, $^3\text{H-TdR}$ 标记的阳性细胞较多; 图(b)不加丝裂原的 S_{7811} 细胞, 细胞核不规则, $^3\text{H-TdR}$ 标记的阳性细胞亦较多; 图(c)加丝裂原的 S_{7811} 细胞, 生长受到抑制, 标记阳性细胞较少; 在图(d)中亦可看到未加 $^3\text{H-TdR}$ 亦未加丝裂原的 S_{7811} 细胞系

表 2 丝裂原对 $^3\text{H-TdR}$ 标记细胞的标记百分率的影响

细胞种类	丝裂原剂量 ($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	$^3\text{H-TdR}$ 标记率 (%)
S_{7811} 细胞系	ConA 400	9.6
	250	17
	125	23
	0(对照)	30
	PHA 400	9
	250	20
正常淋巴细胞	125	26
	0(对照)	30
	PHA 125	58.54 \pm 1.887*

* = 20 个健康人的均值 \pm SE



(a) 正常人淋巴细胞(加适量丝裂原)

(b) S_{7811} 细胞系(不加丝裂原)(c) S_{7811} 细胞系(加丝裂原)(d) 未加 $^3\text{H-TdR}$ 标记的 S_{7811} 细胞系, 亦未加丝裂原, 见多核巨细胞图 $^3\text{H-TdR}$ 标记显微放射自显影术所显示的两细胞图象

的多核巨细胞。

讨 论

正常人外周血淋巴细胞受丝裂原 ConA 或 PHA 刺激后, 可进入细胞周期, 合成 DNA, 转化为母细胞并分裂增殖。在此过程中, $^3\text{H-TdR}$ 掺入 DNA, 故其脉冲数的增高可反映出 DNA 合成的增加和细胞的增殖。这种反应是有规律性的、可重复的。从我们的实验结果可看出, 引起正常淋巴细胞转化的丝裂原的最适剂量是 $125\mu\text{g/ml}$ 和 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的最高值与我们以前的工作是一致的^[4]。

肿瘤细胞和体外培养的细胞系与正常淋巴细胞相反, 对丝裂原的反应出现完全不同的结果。慢性淋巴白血病人淋巴细胞与 PHA 一起培育, 表现为细胞量的减少和延缓反应^[6]。过去, PHA 对实验性动物肿瘤的影响的报道较多。大都呈现对肿瘤的抑制作用。Yang

(1975) 证实 PHA 能抑制体外培养的小鼠淋巴瘤细胞白血病 L_{5178} 株细胞的生长, 在 PHA 的作用下 DNA、RNA 和蛋白质的合成减少^[7]。Dent 的实验表明 PHA 能抑制体外培养的小鼠淋巴瘤细胞合成 DNA^[8]。但以往对人类肿瘤细胞的报道, 丝裂原仅有激活作用或无作用, 对其抑制作用的报道更少^[9,12]。近来 Egorin 等将 PHA 提纯并分解为五种成分, 发现 L_4 和 E_4 成分有抑制小白鼠白血病细胞 L_{1210} 细胞株的生长和增殖。将 L_4 加入到培养的细胞中 2~3 小时就出现抑制现象, 表现在 DNA 合成减少, 氧耗量降低, 而对蛋白合成的影响较少。其抑制作用大都是依赖剂量的, 即丝裂原的剂量愈大放射活性物质掺入率愈低。最近 Bowen 观察到琥珀酰 ConA 可抑制正常和 SV_{40} 转化的细胞生长, 其 DNA 合成降低, 并呈现剂量依赖效应。

本文报道与我们以前的实验结果相比较,

尽管丝裂原 ConA 和 PHA 的剂量范围不同,但其结果是一致的,从而进一步说明丝裂原 ConA 和 PHA 有抑制 S₇₈₁₁ 细胞系细胞增殖的效应,此结果与 Ballmer^[11] 等和 Egorin^[1] 等的报道也是一致的。

关于 ConA 和 PHA 抑制肿瘤细胞作用机制, Egorin 等认为肿瘤细胞所处的旺盛生长增殖的状态与适量丝裂原引起正常淋巴细胞增殖的状态可能相当,因此,在生长很快的肿瘤细胞中加入 ConA 和 PHA,就等于加入超量的丝裂原,势必抑制其生长增殖。所以微量的丝裂原即可抑制肿瘤细胞的增殖。

参 考 文 献

[1] Egorin M.J. et al: 1978 *Cancer Res* 38: 1677.

- [2] 苏州医学院微生物学教研室等。1978。江苏医药, 9: 16。
 [3] 张澜生。1980。淋巴细胞转化, 血液学——进修医师讲座。江苏科学技术出版社, p.404。
 [4] 张澜生等, 1981, 中华肿瘤杂志, 1 (3): 45。
 [5] Bach F. H. Good R. A.: 1976 *Clin Immunol Academic press New York San Francisco London* 3: 167—170。
 [6] Smith J. L. et al.: 1972 *Lancet* 1: 229。
 [7] Yang T. J.: 1975 *J Natl Cancer Inst* 55: 323。
 [8] Dent P. B., 1971 *J Natl Cancer Inst* 46: 763。
 [9] Koeffler H. P., Goble D.W.: 1978 *Science* 200 (4346): 1153。
 [10] Bowen D.L. et al: 1979 *J Natl Cancer Inst* 62 (6): 1479。
 [11] Ballmer K. et al.: 1980 *Exp Cell Res* 126 (2): 311—319。
 [12] 苏州医学院微生物学教研室等。1981。江苏医药, 2(7): 2。

研究简报

体外观察汉防己甲素对成纤维细胞的作用(摘要)

蔡静妍 徐秀宝 丁训城

(上海市劳动卫生职业病研究所)

汉防己甲素(简称汉甲素)是双苄基异喹啉类生物碱,具有广泛的药理作用。经临床和实验研究证明,治疗矽肺有显著的效果,但其作用机理至今不明。本文观察汉甲素对体外培养的成纤维细胞的影响,并初步探讨了汉甲素的作用机理。

采用人胚肺成纤维细胞株(SL₇),染色体为二倍体值。观察内容有三:(1)形态,(2)细胞存活率,(3)对 DNA 合成的影响。

结果:

1. 汉甲素对成纤维细胞生长的抑制作用 SL₇ 细胞经汉甲素作用 2 天后,呈不同程度的病变,与汉甲素浓度相关。病变细胞从玻面脱落,残存的细胞质圆缩或部分收缩,部分细胞核形不规则出现凹陷或核体积增大,核仁不清楚,核内染色质有颗粒化现象。以汉甲素 10

微克组病变最严重,培养 2 天细胞全部死亡。汉甲素 2、4、6 和 10 微克组细胞存活率分别为 76.9%、58.3%、42.8% 和 7%,与形态观察结果相符,说明汉甲素对成纤维细胞的生长有明显的抑制作用。

2. 汉甲素对成纤维细胞 DNA 合成的抑制 ³H-TdR 参入到 SL₇ 细胞,探讨汉甲素的作用机理,结果见表。

表 汉甲素对成纤维细胞 DNA 合成的影响

汉甲素 (微克/毫升)	cpm/mgDNA 均数±标准误	抑 制 %
正常对照	5037.7±30.3	
2	4703.1±531.6	6.6
4	3115.8±380.1	38.1
6	2540.0±246.9	49.5
10	618.1±160.4	85.7