

## INDUCTION ON THE MALIGNANT PHENOTYPICAL RE- VERSION OF HUMAN HEPATOCELLULAR CAN- CER CELL LINE (GHC-3) BY RLF IN VITRO

Ge Yue-ping Chen Wei-jie et al

(Cancer Research Institute, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182)

### ABSTRACT

The changes of human hepatocellular cancer cell line (GHC-3) induced by Chinese herbal medicine Flavones from *Rabdosia* (RLF) was studied in vitro. The malignant phenotypical reversion of GHC-3 cells was observed such as the properties of cell growth, cancer cell membrane receptor, tumor marker, oncogene products and inheritable character and so on. It was found that the treated cell with RLF for 10 weeks not only gradually changed morphogenesis from the polygonal epithelial-like cells into the spindle cells, but also remarkably decreased in so far as their growth speed rate, mitotic index, colong formation, Con A agglutination and Con A receptor, DNA amount as well as total incorporation of  $^3\text{H-TdR}$  into cells and the treated cells which have the chromosomes seemed to be collectively and some diploid cells were counted.

Furthermore, the treated cells were assayed with  $\text{G}_3\text{M-McAb}$ ,  $\text{AFP-McAb}$  and  $\text{ras p21-McAb}$ . The results show that AFP or ras p21 synthesis decreased gradually and the antigen of GHC-3 on the cell membrane by the fluorescence label of antibody became weaker.

After transferred to standerd medium more than one month, the induced biological properties of the treated cells were continued. These results mentional above suggest that RLF was able to change GHC-3 cell's malignant phenotypic characteristics and produce a reversed alteration.

**Key words:** RLF Induced reversion Human hepatocellular cancer cell

## 创伤后巨噬细胞对 T 细胞白介素 2 及白介素 2 受体 $\alpha$ 基因表达的直接接触抑制作用\*

梁华平 王正国 耿波 田丰群

(第三军医大学野战外科研究所 重庆 630042)

创伤后巨噬细胞的抑制作用是导致伤后免疫功能低下的重要原因。已有证据表明<sup>[1]</sup>, 创伤后巨噬细胞抑制作用的发挥有赖于其分泌一系列免疫抑制成份如前列腺素  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) 等。我们以往研究证实, 创伤后巨噬细胞在其分泌细胞因子的能力被阻断后, 仍可通过直接的细胞-细胞接触方式抑制 T 淋巴细胞的功能<sup>[2]</sup>。但其作用环节尚不清楚。本研究对此进行了探

讨。

### 材 料 和 方 法

#### 一、动物模型及分组

Balb/c 小鼠, 雌雄各半, 6—8 周龄, 体重 18—22 g。随机分为正常对照、伤后 1、2、4、7、10 天共 6 组, 每组 10 只。小鼠致伤参照文献<sup>[2]</sup>进行。即利

\* 国家自然科学基金资助项目。

用35g重的砝码从30cm高处垂直下落冲撞清醒状态小鼠的双侧股骨部,各侧接受撞击15次,使之累积接受能量为3.0J。致伤部位皮下及肌肉严重变性坏死(组织切片证实)。

## 二、巨噬细胞的处理

各组动物于相应时间处死,按常规获取腹腔贴壁的巨噬细胞,调整细胞浓度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入不同浓度的丝裂霉素C,于 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中温育30min。以Hank's液洗涤贴壁的巨噬细胞两次后测定下述指标。

## 三、T细胞的分离

按常规制备脾细胞悬液,参照文献<sup>[3]</sup>以国产尼龙毛分离脾细胞中的T细胞。ANAE染色法鉴定T细胞纯度为92%,台盼蓝染色证明分离出的T细胞存活率大于95%。

## 四、检测指标和方法

1. 白介素1(IL-1)、白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、 $\text{PGE}_2$ 的测定 将巨噬细胞置于 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中温育24h,收集培养上清液,参照文献<sup>[4]</sup>检测上清中IL-1、IL-6、TNF及 $\text{PGE}_2$ 含量。

2. 白介素2(IL-2)mRNA、IL-2受体(IL-2R) $\alpha$ mRNA的测定 于T细胞悬液( $5 \times 10^6/\text{ml}$ )中,加入ConA( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ),于 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养10h后收集细胞。细胞总RNA的提取参照文献<sup>[5]</sup>进行,探针制备、斑点杂交及显色强度测定参照文献<sup>[6]</sup>进行。用于检测IL-2 mRNA、IL-2R $\alpha$  mRNA的cDNA探针包括:经BamHI酶切获取的IL-2 cDNA 1.0 kb片段和经EcoRI酶切获取的IL-2R $\alpha$  cDNA 0.92 kb片段(ATCC公司)。结果以正常对照显色强度的百分比(%)表示。

3. 抑制性T细胞(Ts)活性测定 参照文献<sup>[7]</sup>

进行,结果以抑制指数(suppressive index, SI)表示。

4. 巨噬细胞直接接触抑制作用测定 在上述T细胞培养系统中,加入经丝裂霉素C( $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ )处理的巨噬细胞,使其细胞数占10%,观察其对各指标的影响。计算抑制率(%)。

$$\text{抑制率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{创伤巨噬细胞组值}}{\text{正常巨噬细胞组值}} \right) \times 100\%$$

5. 去除T细胞中Ts细胞对巨噬细胞直接接触抑制作用的影响 参照文献<sup>[8]</sup>将T细胞用适量的抗Lyt 2单克隆抗体(北京医科大学免疫教研室提供)加豚鼠补体处理,以去除Ts细胞,观察巨噬细胞对此种处理后的T细胞的直接接触抑制作用变化。

## 五、数据处理

结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )表示,以t检验进行显著性分析。

# 结 果

## 一、丝裂霉素C对巨噬细胞培养上清中细胞因子含量的影响

于正常及创伤4天小鼠巨噬细胞培养24h的上清中,均可检测到高水平的IL-1、IL-6、TNF及 $\text{PGE}_2$ 。于细胞培养开始时,加入 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素C,则可明显降低各细胞因子水平,加入10、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的丝裂霉素C,则可使各细胞因子降低至难以检测的水平。说明一定浓度的丝裂霉素C(如 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ )可基本阻断巨噬细胞合成并分泌细胞因子(见表1)。

## 二、创伤后巨噬细胞对正常小鼠T细胞

表1 丝裂霉素C对巨噬细胞培养上清中细胞因子含量的影响( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n=10$ )

巨噬细胞组别	丝裂霉素C( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IL-1(cpm)	IL-6(U/ml)	TNF(%)	$\text{PGE}_2$ (ng/ml)
正常对照组	0	$7155 \pm 242$	$120 \pm 11$	$5 \pm 1.0$	$1.21 \pm 0.37$
	5	$632 \pm 71^*$	$21 \pm 7^*$	<1	$0.13 \pm 0.01$
	10	<10	<3	<1	<0.03
	25	<5	<1	<0.5	<0.01
创伤4天组	0	$7536 \pm 318$	$452 \pm 33$	$37 \pm 4.8$	$5.84 \pm 1.32$
	5	$589 \pm 63^*$	$42 \pm 13^*$	$4 \pm 0.5^*$	$0.44 \pm 0.07^*$
	10	<10	<4	<1	<0.04
	25	<5	<1	<0.5	<0.01

和各自未加丝裂霉素C组相比: \* $P < 0.01$

表2 创伤后巨噬细胞对正常T细胞IL-2 mRNA及IL-2 R $\alpha$  mRNA的直接接触抑制作用( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n=10$ )

巨噬细胞组别	正常T细胞			
	IL-2mRNA(%)	抑制率(%)	IL-2 R $\alpha$ mRNA(%)	抑制率(%)
正常对照	100 $\pm$ 12	0	100 $\pm$ 11	0
伤后1天	87 $\pm$ 8.5	13 $\pm$ 1.3	84 $\pm$ 6.6	16 $\pm$ 1.4
伤后2天	77 $\pm$ 6.8*	23 $\pm$ 2.0*	73 $\pm$ 5.8*	27 $\pm$ 2.1*
伤后4天	68 $\pm$ 8.4*	32 $\pm$ 3.9*	66 $\pm$ 7.2*	34 $\pm$ 3.7*
伤后7天	89 $\pm$ 6.3	11 $\pm$ 0.8	91 $\pm$ 8.3	9 $\pm$ 0.8
伤后10天	96 $\pm$ 9.2	4 $\pm$ 0.4	95 $\pm$ 9.0	5 $\pm$ 0.5

和正常对照组相比: \*  $P < 0.05$

表3 去除Ts细胞对创伤后巨噬细胞直接接触抑制作用的影响( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n=10$ )

指标	T细胞处理	巨噬细胞组别		抑制率(%)
		正常对照组	创伤4天组	
IL-2 mRNA (%)	总T	100 $\pm$ 12	68 $\pm$ 8.4*	32 $\pm$ 3.9
	去除Ts	121 $\pm$ 16	119 $\pm$ 13 <sup>A</sup>	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>
IL-2 R $\alpha$ mRNA (%)	总T	100 $\pm$ 11	66 $\pm$ 7.2*	34 $\pm$ 3.7
	去除Ts	124 $\pm$ 13	127 $\pm$ 10 <sup>A</sup>	-2.4 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>

和正常对照组相比: \*  $P < 0.05$ , 和总T细胞组相比: <sup>A</sup>  $P < 0.05$

### IL-2 mRNA及IL-2R $\alpha$ mRNA的直接接触抑制作用变化

和正常对照相比, 创伤后巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制正常T细胞IL-2 mRNA及IL-2 R $\alpha$  mRNA水平。以伤后2—4天的作用最为明显, 伤后10天基本恢复正常(见表2)。

### 三、创伤后巨噬细胞对正常小鼠T细胞Ts活性的直接接触调节作用的变化

和正常对照相比, 创伤4天小鼠的巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式增加Ts活性。使Ts的抑制指数(SI)由1.5 $\pm$ 0.2上升到2.4 $\pm$ 0.4, 相差非常显著( $P < 0.01$ )。

### 四、去除正常T细胞中Ts细胞对创伤后巨噬细胞直接接触抑制作用的影响

去除正常T细胞中Ts细胞, 可使创伤4天小鼠的巨噬细胞对T细胞IL-2 mRNA及IL-2 R $\alpha$  mRNA的接触抑制作用消失(见表3)。

## 讨 论

已知巨噬细胞可通过合成与分泌一系列细胞因子调节T细胞的功能。为了观察巨噬细胞对T细胞的直接接触抑制作用, 必须阻断巨噬细胞DNA及蛋白质的合成。本研究发 现, 25  $\mu$ g/ml的丝裂霉素C处理巨噬细胞30 min, 可使正常及创伤小鼠巨噬细胞培养上清中IL-1、IL-6、TNF及PGE<sub>2</sub>的含量低至难以检测的水平。故可认为此时巨噬细胞对T细胞功能的调节作用主要是通过细胞接触方式而实现的。

结果表明, 创伤后巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制正常小鼠T细胞IL-2及IL-2 R $\alpha$ 的基因转录表达, 以伤后4天的巨噬细胞抑制作用最强。这同以往观察到的创伤小鼠巨噬细胞抑制T细胞IL-2的生成, IL-2 R的表达以及T细胞增殖反应的情形相一致<sup>[2]</sup>。推测前者可能是导致后者变化的分子生物学机

制之一。

已有大量文献报道<sup>[9]</sup>, 创伤后增强的 Ts 细胞活性是导致 T 细胞功能受抑的重要原因之一。而 Ts 细胞活性的增加则同创伤后巨噬细胞分泌大量的 PGE<sub>2</sub> 进而刺激 Ts 细胞的活性有关。本研究发现, 创伤后巨噬细胞在其丧失合成与分泌 PGE<sub>2</sub> 能力的情况下, 仍可显著增强 Ts 细胞活性。这一发现不仅提示创伤后巨噬细胞与 Ts 细胞可直接传递抑制信号, 且这一作用环节可能是创伤后巨噬细胞发挥其对 T 细胞直接接触抑制的机制之一。我们还观察到, 巨噬细胞直接接触抑制作用有赖于 Ts 细胞的存在。这进一步说明巨噬细胞接触抑制作用的发挥可能是 Ts 细胞介导的。本研究结果迄今尚未见类似报道, 相信这对揭示创伤后巨噬细胞的免疫抑制作用机理具有重要指导意义。

### 摘 要

以 25 μg/ml 的丝裂霉素 C 处理巨噬细胞 30 min, 可阻断巨噬细胞白介素 1(IL-1)、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF) 及前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 的合成与分泌。创伤小鼠巨噬细胞经丝裂霉素 C 处理后, 可明显抑制正常 T

细胞白介素 2(IL-2)mRNA 及 IL-2 受体 (IL-2 R)α mRNA 水平, 并增强 Ts 细胞的抑制活性。去除 T 细胞中 Ts 细胞可使巨噬细胞的抑制作用消失。表明创伤后巨噬细胞可通过直接的细胞接触方式抑制 T 细胞 IL-2 及 IL-2 Rα 的基因表达, 且这一作用是通过增加 Ts 细胞活性而实现的。

**关键词:** 创伤 巨噬细胞 T 细胞 白介素 2 白介素 2受体 信使 RNA

### 参 考 文 献

- [1] Grbic, J. T. et al., 1991, *Ann. Surg.*, 214: 253—259.
- [2] 梁华平等, 1993, 第三军医大学学报, 15: 405—408.
- [3] 李绍康等, 1981, 上海免疫学杂志, 1: 10—12.
- [4] Miller-Graziano, C. L. et al., 1990, *J. Trauma*, 30: s 86—s 92.
- [5] Chomczynski, P. et al., 1987, *Anal. Biochem.*, 162: 156—159.
- [6] Anastassiou, E. D. et al., 1992, *J. Immunol.*, 148: 2845—2851.
- [7] 吕屏等, 1986, 上海免疫学杂志, 6: 231—234.
- [8] 梁华平等, 1993, 解放军医学杂志, 18: 271—274.
- [9] Gough, D. B. et al., 1992, *J. Trauma*, 32: 677—682.

## INHIBITION OF T CELLS INTERLEUKIN 2 AND INTERLEUKIN 2 RECEPTOR α GENE EXPRESSION BY DIRECT CONTACT WITH MACROPHAGES AFTER TRAUMA

Liang Huaping, Wang Zhengguo, Gen Bo, Tian Fengqun

(Research Institute of Surgery, Third Military Medical College, Chongqing 630042)

### ABSTRACT

Treating macrophages with 25 μg/ml mitomycin-C for 30 min could abrogate the production and secretion of interleukin 1(IL-1), interleukin 6(IL-6), tumour necrosis factor (TNF) and prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>). Macrophages from traumatized mice treated with mitomycin-C could suppress obviously IL-2 mRNA and IL-2Rα mRNA levels of normal T cells, while elevate suppressive action of Ts cells. Removal of Ts cells from T cells could abolish the inhibition of macrophages. It is suggested that macrophages post trauma can depress IL-2 and IL-2 Rα gene expression in T cells by direct cell to cell contact, and this effect is mediated by increasing the action of Ts cells.

**Key words:** Trauma Macrophages T cells Interleukin 2 Interleukin 2 receptor mRNA