

specificity.

Key words, Colorectal carcinoma Hybridoma Single-chain antibody

## 淋巴抑瘤素对五株肿瘤细胞株的体外抑瘤效应的分析研究

陈佩丽 王洪海 周金良\* 乔 雯

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

1981年Brown<sup>[1]</sup>曾报道T淋巴细胞经刺激能分泌一种抑制瘤生长的多肽类物质,并把它称为抑瘤素“M”。1986年Zarling<sup>[2]</sup>等人已分离纯化到这种细胞因子。本实验室用ConA刺激外周血淋巴细胞,温育后从培养上清液中获得粗制的淋巴抑瘤素。用它在体外对五株肿瘤细胞株进行体外抑瘤效应的测定,并用显微照像技术对经淋巴抑瘤素作用过的肿瘤细胞进行活体显微观察照像,以此对淋巴抑瘤素的体外抑瘤效应进行分析研究。

### 材料和方法

#### 1. 细胞株

卵巢癌细胞株3ao;宫颈癌细胞株HeLa;白血病细胞株K562;黑色素瘤细胞株MM960;羊膜上皮细胞株Wish。上述细胞株购于上海细胞所。

#### 2. 淋巴抑瘤素制备和验证

5ml正常人的外周血,用淋巴细胞分离液分离获淋巴细胞经培养液洗两次后,以 $1 \times 10^5$ /ml细胞密度培养在20ml含20%小牛血清,0.025% ConA的1640培养液中,37℃温育72小时,无菌条件下离心取上清液即为粗制淋巴抑瘤素,存放4℃冰箱备用。同时取4ml上清液用硫酸铵沉淀离心,脱盐后进行常规的15%SDS-PAGE电泳验证淋巴抑瘤素。

#### 3. 抑制率的测定<sup>[3,4]</sup>

无菌条件下取含淋巴抑瘤素的上清液20ml加入等量的含20%小牛血清的1640培养液,调pH为7.2,以每培养瓶(小号)3ml量培养肿瘤细胞。细胞接种量在 $10^4$ — $10^5$ /瓶,37℃培养48小时传代一次,同时进行细胞计数。五株细胞用同一个浓度的淋巴抑瘤素,每次以同样条件重复接种三瓶,并以不含淋巴抑瘤素的同样培养作无药对照培养。

计算抑制率的公式:

$$\left(1 - \frac{\text{实验组平均每瓶细胞总数}}{\text{对照组平均每瓶细胞总数}}\right) \times 100\%$$

#### 4. 显微观察和照像

每次传代前,在倒置显微镜下对活体肿瘤细胞进

行形态、胞质和细胞核的结构变化的观察,并进行显微照像以便分析。

### 结 果

#### 1. 淋巴抑瘤素验证结果

在SDS-PAGE电泳分析图(图1)中,分子量26000位置上呈现出一条明显的蛋白带,而不含ConA刺激物的对照培养上清液沉淀后的电泳条带中无这条明显蛋白带。

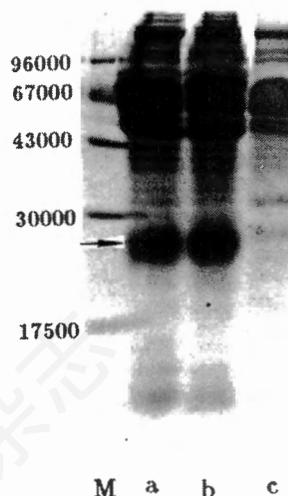


图1 淋巴抑瘤素SDS-PAGE电泳分析图  
M. 标准分子量 a. 培养上清液 b. 培养上清液  
c. 无药对照培养上清液。

#### 2. 淋巴抑瘤素体外抑瘤效应的测定结果

从图2看出,3ao和Wish细胞株对淋巴抑瘤素的反应强烈,传至第五代抑制率在95%以上,HeLa细胞株表现为中等抑瘤效应,抑制率达76%。K562和MM960两株细胞刚一接触淋巴抑瘤素时出现了一个短暂的抑瘤效应,第一代K562细胞株抑制率为25%;MM960细胞株为59%。但第二代就很快适应了并出现了反效应,淋巴抑瘤素不但不能抑制细胞生长,反而

\* 上海市静安区中心医院病理科。

助长了细胞生长,K562细胞株的有药实验组反而比无药对照组多增长了7倍,MM960细胞长了1.7倍,传至第三代K562增长了24倍,MM960增长了4.7倍。

3. 显微观察结果

倒置显微镜下对活体细胞观察发现,淋巴抑瘤素对有抑制作用的3ao,HeLa和Wish细胞株,传至第二代时镜下可见到细胞变形呈不规则多边形,胞体肿胀,胞浆内出现空泡和颗粒,核膜模糊,核仁消失。传至第四代镜下可见大量崩解死亡的细胞残骸,细胞内容物外溢粘连成片,胰酶消化时呈片状脱落。但在大量破损死亡细胞中间还是能见到少量完整的圆形细胞活着。详见图3。

4. 肿瘤细胞的抵抗力

从表1看出肿瘤细胞在淋巴抑瘤素的作用下,仍有一部分抵抗力强的细胞在继续分裂增殖,从实验组的细胞总数来看,传至第五代时已是比接种时有所增加,HeLa细胞株增加了4.5倍,3ao细胞株增加了4.3倍,而Wish细胞株没有增加,从数量上看它比接种时

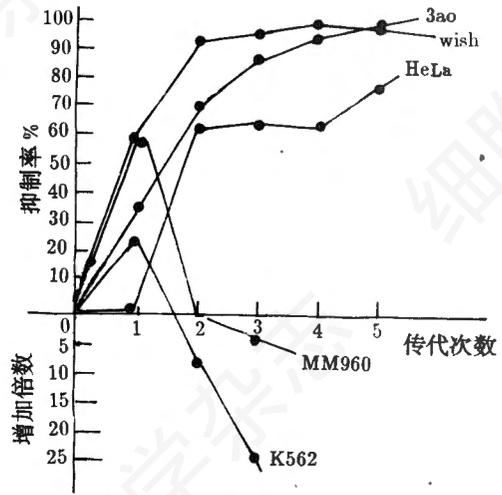


图2 淋巴抑瘤素对五株细胞株抑瘤效应的测定结果

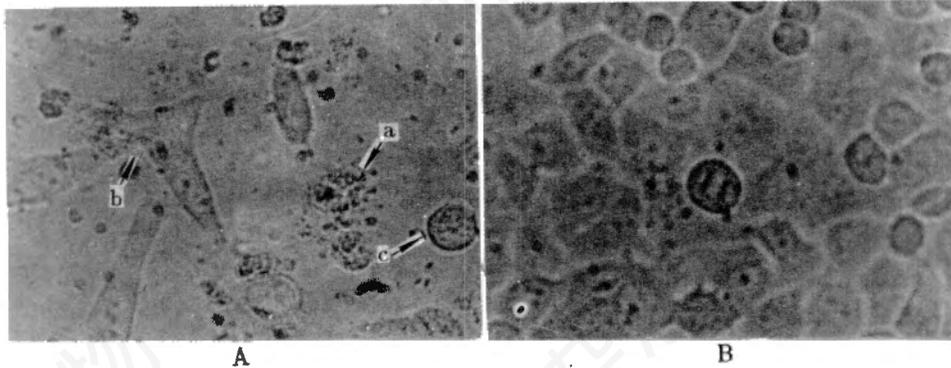


图3 淋巴抑瘤素作用下3ao细胞的形态学变化(X40) A. 被淋巴抑瘤素破坏的细胞 a. 崩解死亡的细胞 b. 变形细胞 c. 完整的圆形细胞 B. 对照培养液中生长良好的细胞。

表1 肿瘤细胞株在淋巴抑瘤素作用下细胞数量的变化情况

细胞株		细胞总数/瓶					传5代后细胞增长培数	
		接种量	1代	2代	3代	4代		5代
HeLa	实验组	$2 \times 10^5$	$6.6 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$	$9 \times 10^5$	4.5
	对照组	$2 \times 10^5$	$6.3 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$3 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	19.0
3ao	实验组	$3.2 \times 10^4$	$9.9 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	4.3
	对照组	$3.2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	$8.4 \times 10^6$	262.5
Wish	实验组	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$8.4 \times 10^4$	$6.9 \times 10^4$	$9.9 \times 10^4$	0
	对照组	$1 \times 10^5$	$4.8 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	38.0

减少了  $1 \times 10^3$ /瓶。

## 讨 论

淋巴抑瘤素对不同的肿瘤细胞株其抑瘤效应是不相一致的,3ao 细胞株和 Wish 细胞株对淋巴抑瘤素非常敏感,有强反应性,传至第五代抑制率达 90%以上,HeLa 细胞株为中等敏感,反应性要比上两株差一些,传至第五代抑制率为 76%,而 K562 和 MM960 两株细胞株对淋巴抑瘤素一点也不敏感,不但没有抑制作用,反而出现促进细胞生长的作用,传至第三代有药实验组的生长就比无药对照组增加了好几倍。在另一类细胞因子——肿瘤坏死因子的体外肿瘤细胞的抗瘤效应测定中也发现有这类现象,日本渡边等人采用直接从肿瘤患者分离的活体肿瘤细胞,如胃癌、胰腺癌、白血病等通过细胞毒试验大多数亦表现敏感,但程度不同。白血病细胞最敏感,胃癌有部分敏感。同一组类型的不同人的肿瘤或不同细胞株对肿瘤坏死因子的敏感性也各不相同<sup>[5]</sup>。

细胞因子在抗肿瘤中之所以会出现这类现象,可能是由于肿瘤细胞的异质性造成的,这和肿瘤本身的来源、遗传因素、分化程度有关,也就是通常说的肿瘤的恶性程度有关。恶性程度高的肿瘤细胞对细胞因子的抵抗力也就强。从本实验看 K562 和 MM960 两株细胞对淋巴抑瘤素抵抗力最强,淋巴抑瘤素不但不能抑制它们,反而有助生长的作用,而 HeLa 和 3ao 两个细胞株有部分抵抗力,淋巴抑瘤素虽然能使它们的细胞变性坏死,使生长速度受到抑制传至第五代抑制率达 76%左右,但从每瓶的细胞总数看还是比接种时增长了 4 倍左右,而 Wish 细胞株在第五代时抑制率达 90%以上,每瓶的细胞总数比接种时没有增加,反而减少了  $1 \times 10^3$ /瓶。这是因为 Wish 细胞是一种来源于羊膜上皮细胞的细胞株,较接近于正常细胞,恶性程度低,所以它对淋巴抑瘤素抵抗力最小<sup>[6]</sup>。这更证

明肿瘤细胞的抵抗力和它的细胞来源、遗传因素、恶性程度有关。

上述的实验和报道提示我们,在应用各种细胞因子进行抗肿瘤治疗时,一定要注意病例的选择,最好也像抗菌素测定抗菌谱一样先进行抗瘤谱的测定,对敏感的肿瘤可应用;不敏感的肿瘤不要用,以免产生不良后果。

## 摘 要

淋巴细胞经刺激后分泌一种多肽类物质,这种细胞因子被称为淋巴抑瘤素。在体外培养中发现不同来源的肿瘤细胞对淋巴抑瘤素的敏感性是不同的,表现为三种类型:强反应株,此类细胞对其抑瘤效应反应强烈,抑制率达 90%以上;弱反应株,此类细胞的抑制率在 70%左右;另一类为负反应株,此类细胞对淋巴抑瘤素不但不表现出抑瘤效应,反而出现助长肿瘤细胞生长的效应。由于体外测定中有上述现象,所以建议在体内应用这类细胞因子时,应像抗菌素测抗菌谱一样测定其抗瘤谱,以利于对症用药。

关键词: 淋巴抑瘤素 细胞因子 肿瘤抑制效应  
抗肿瘤谱

## 参 考 文 献

- [1] 段海清等,1994,国外医学免疫学分册,4:185-186.
- [2] Zarling J M, et al., 1986, *Proc Natl Acad Sci USA*, 33(24), 9739-9743.
- [3] 王洪海等,1995,复且学报(自然科学版),34(4):404.
- [4] Foa P, et al., 1987, *Eur J Haematol*, 39:399-403.
- [5] Brandt R, et al., 1988, *Biochemistry*, 27:1420-1425.
- [6] 周廷冲主编,1992年10月第一版,多肽生长因子基础与临床,中国科学技术出版社.

## STUDIES OF ONCO-INHIBITORY EFFECTS OF LYMPHOCYTIC ONCOSTATIN ON 5 TUMOR CELL LINES IN VITRO

CHEN Pei Li WANG Hong Hai ZHOU Jin Liang QIAO Wen  
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

### ABSTRACT

The onco-inhibitory effects of lymphocytic oncostatin on tumor cell in vitro serve clinical trial was studied. Oncostatin, a kind of polypeptide, is secreted from lymphocytes stimulated by mitogen. Different tumor cells have different sensibilities to oncostatin. There are three types of results, (1) Cell lines of strong reacting, inhibited rate is over 90%. (2) Cell lines of weak reaction, inhibited rate is about 70%. (3) Cell lines of negative reaction, oncostatin is not able to inhibit but help cell growth. It is concluded that the results demonstrated anti-tumor spectrums of cytokines must be test when the cytokines were applied to patients as well as antibiosis spectrums of antibiotic.

Key words: Lymphocytic oncostatin Cytokine Onco-inhibitory effect Anti-tumor spectrum