

S180 瘤苗和 BCG 抗癌作用及诱发肿瘤细胞凋亡

张艳林 葛兆和 张元杏 王亚平 贾存荣 李文镇

摘要 用 S180 瘤苗(可溶性抗原)及 BCG 皮内注射治疗荷瘤小鼠,显示肿瘤生长受抑,脾脏 CTL 活性增强,与对照组或单一治疗组(瘤苗组、BCG 组)相比 $P < 0.01$,而荷瘤前 6 天治疗更显著。治疗组的瘤组织作超微形态观察,有核质凝聚胞浆固缩等细胞凋亡的改变,作流式细胞术 DNA 直方图显示在 G_1 期前具凋亡特征的 AP 峰较对照明显升高 $P < 0.01$ 。实验显示,瘤苗 BCG 可能通过 CTL 启动细胞凋亡途径抑制肿瘤生长。

关键词 瘤苗; BCG; 细胞凋亡; CTL 细胞

多年来,用瘤苗加佐剂治疗恶性黑色素瘤等在临床取得一定疗效^[1],其价廉、安全及制作简易目前被再次扩大选用并加以改进^[2],但瘤苗 BCG 治疗抑制肿瘤生长与诱发瘤细胞凋亡关系尚未报道,我们从脾细胞检测 CTL 杀伤活性,瘤细胞超微形态和流式细胞仪(FCM)分析所出现的细胞凋亡现象,提示化疗可能启动细胞凋亡途径抑制肿瘤生长。

1 材料

1.1 主要试剂 RPMI1640(Gibco)³H-TdR(中国科学院原子能研究所) BCG(卫生部北京生物制品研究所)50mg/支,批号 59082,有效期内应用。

1.2 动物及细胞株 NCPC/4^[3]小鼠雌性,6~8 周龄(华北制药厂动物中心提供) S180 腹水型(北京药物研究所提供)。

1.3 瘤苗 参照文献^[1],细胞 3×10^8 /ml 经冻融等提取,用 Lowry 氏法测定蛋白为 1mg/ml。

1.4 瘤苗 BCG 的应用及治疗观察 S180 细胞腋部皮下注射 0.2ml(3×10^6 /只),实验分 5 组每组 8 只,分别给予皮内注射瘤苗 50 μ g/只,BCG100 μ g/只或荷瘤前 6 天注射瘤苗 BCG,对照注射 Hanks 液,瘤苗治疗:皮内注射瘤苗 50 μ g,BCG 治疗皮内注射 BCG100 μ g,13 天用卡尺测量肿瘤大小(用两垂直方向直径相乘积表示)同时取脾脏作 CTL 活性测定,取瘤组织作超微形态观察和流式细胞术分析

肿瘤抑制率 = $(1 - \frac{\text{治疗组平均瘤大}}{\text{荷瘤对照组平均瘤大}}) \times 100\%$

1.5 CTL 活性的诱导 取小鼠脾脏制成悬液,将

其与适量 S180 可溶性抗原(瘤苗)混合,置于含 10%FCS 的 RPMI1640 中,脾细胞浓度为 2×10^6 /ml,置 37℃ 5%CO₂ 中孵育 6 天后测 CTL 活性。

1.6 CTL 活性的测定 用³H-TdR 在实验室常规方法进行^[3],靶细胞为 S180E/T=100:1。

1.7 超微形态观察 剖取荷瘤小鼠瘤块边缘及其周围组织,投入 2.5%戊二醛中固定,按电镜常规制样方法作电镜检查。

1.8 流式细胞术分析 按文献报道的原理和方法,将瘤块研磨洗涤,4℃ 70%乙醇固定,经 EB 一步插入 DNA 染色法,用 BDFACS420 流式细胞仪,数据输入 DP300 Consort 计算应用软件处理作细胞周期分析,根据 DNA 组方图中出现的亚 G_1 峰,计算凋亡细胞百分数。

2 结果

2.1 瘤苗 BCG 对肿瘤生长的影响,皮下接种瘤细胞后 13 天,全部小鼠均出现肿瘤(表 1)治疗组肿瘤生长显著减慢,明显低于对照组或单一治疗组(瘤苗组或 BCG 组) $P < 0.01$,于荷瘤前 6 天治疗小鼠肿瘤抑制更显著,可见瘤苗 BCG 早期治疗可取得更佳疗效。

表 1 瘤苗 BCG 对肿瘤生长的抑制作用

组别	n	肿瘤大小 mm	抑瘤率 %
		$\bar{x} \pm s$	
A 瘤苗 + BCG 治疗组	8	155 ± 30 **	40.3
B 瘤苗 + BCG6 天前治疗组	8	85 ± 25	67.3
C 瘤苗治疗组	8	230 ± 30	11.5
D BCG 治疗组	8	195 ± 35	25.0
E Hanks' 对照组	8	260 ± 55	

* 与对照 Hanks 组比 $P < 0.01$ ** 与瘤苗治疗组比 $P < 0.01$

作者单位:050071 石家庄,河北省血液中心(张艳林、贾存荣);华北制药厂(葛兆和);河北医科大学(张元杏、李文镇、王亚平)

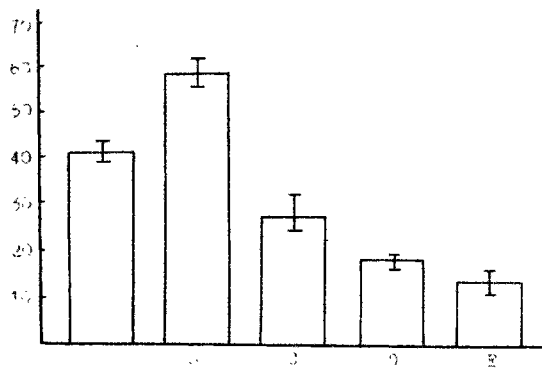


图 1 瘤苗 BCG 治疗后荷瘤小鼠脾细胞的 CTL 活性
A 瘤苗 BDG 治疗 B 瘤苗 BCG6 天前治疗
C BDG 治疗 D 瘤苗治疗 E 对照

2.2 瘤苗 BCG 治疗对 CTL 活性的影响 如图所示, 治疗组脾脏 CTL 细胞毒活性明显较对照组和单一治疗组(瘤苗组、BCG 组)高 $P<0.01$, 而荷瘤前 6

天治疗组升高更明显, 可见瘤苗 BCG 能有效激活 CTL 细胞杀瘤活性。

2.3 超微形态观察瘤苗 BCG 诱发瘤细胞凋亡 未经治疗瘤组织中瘤细胞核大且不规则, 核内散有染色质, 有核仁, 有的核呈有丝分裂状态, 治疗组瘤细胞体积缩小, 胞浆固缩, 核质凝聚边集或成团块状, 呈典型细胞凋亡的形状改变, 有的癌区可见到崩解的瘤细胞外, 微血管也严重破坏, 也可见淋巴样细胞与瘤细胞紧密接触, 提示瘤苗 BCG 治疗可以通过免疫效应 CTL 等攻击, 诱发瘤细胞凋亡。(图 2~4)。

2.4 流式细胞术分析瘤苗 BCG 诱发瘤细胞凋亡 C_2M 期细胞百分率明显降低, DNA 直方图显示在 G_1 期以前出现的 DNA 含量为凋亡细胞特有的 AP 峰, 计算出凋亡细胞百分比, 治疗组 AP 峰明显较对照组为高 $P<0.01$ (表 2 图 5), 各组 DNA 含量无显著差异提示, 瘤苗 BCG 治疗诱发细胞凋亡在抑制肿瘤中起重要作用。

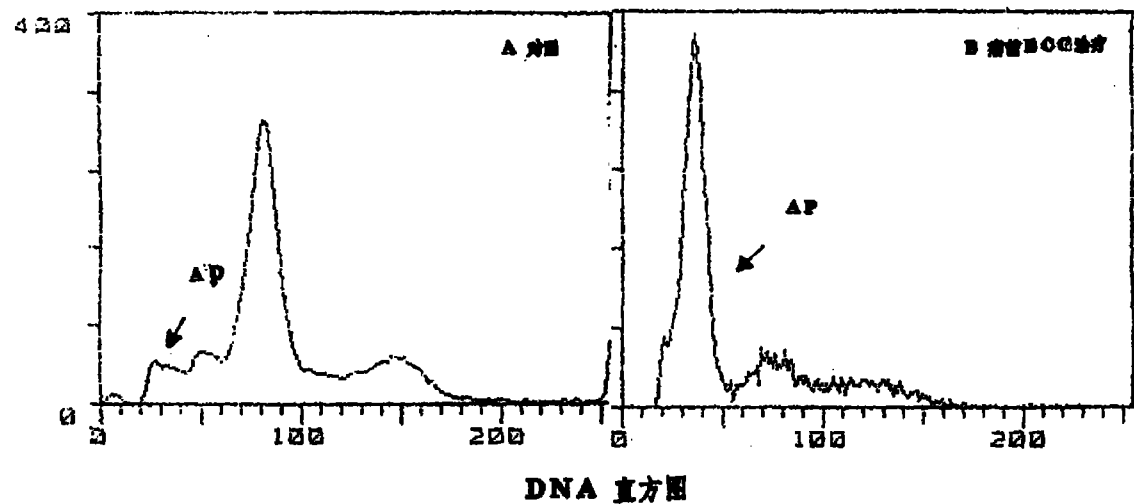


图 5 瘤苗 BCG 治疗 DNA 分布

表 2 瘤苗 BCG 对 S180 细胞周期的影响 (%)

组别	细胞周期的分布			AP 峰 细胞凋亡
	G_1	S	G_2M	
对照组	67.5	15.3	17.1	19.1
瘤苗 + BCG 治疗组	66.4	21.0	13.0	48.3*

* 与对照组相比 $P<0.01$

3 讨论

瘤苗作肿瘤主动特异性免疫治疗已有相当长历史^[1]。提高肿瘤抗原性及增强机体免疫反应性研究的关键, 已证明, 可溶性肿瘤表面多肽抗原可直接作

用宿主免疫系统, 使免疫细胞激活, 佐剂 BCG 可从多方面提高机体免疫功能, 但在单一治疗组(瘤苗组、BCG 组)其抗癌功能抑制, 将瘤苗与 BCG 合用才确实起到了激发机体全身和局部抗癌效应。

流式细胞术 DNA 直方图治疗组瘤细胞显示其凋亡细胞特征的 AP 峰明显升高 $P<0.01$, 而各组 DNA 含量无显著差异。提示肿瘤细胞凋亡减少导致细胞数相对的增多, 超微结构形态, 治疗组瘤细胞除死亡崩解外, 多数瘤细胞明显缩小, 核质凝聚边集, 胞浆固缩等细胞凋亡的改变, 这与瘤细胞坏死相

胞核肿胀(溶酶体溶解)不同。本实验结果与 Darzynkiewicz^[4]及 Kerr^[5]细胞凋亡在超微形态及流式细胞术分析报道一致。CTL 在抗肿瘤中发挥极重要作用^[6],本试验治疗组 CTL 活性较对照组和单一治疗组(瘤苗组、BCG 组)明显提高显示,可溶性肿瘤抗原具较强免疫原性,在 BCG 激活的 M ϕ 等细胞协助下更易被 T 细胞 TCR 识别诱导出特异杀伤性 T 细胞 CTL, Heusel^[1]最近报道 CTL 可诱导肿瘤细胞内 DNA 内切酶,与 CTL 穿孔素协同诱发瘤细胞凋亡。免疫佐剂 BCG 可提高 M ϕ 细胞递呈抗原,活化 CTL 及 M ϕ 细胞,增加细胞因子 TNF 等分泌,使瘤细胞 DNA 降解诱发瘤细胞凋亡^[8]。而瘤组织微血管破坏又可使瘤组织崩解。本试验支持 CTL^[7]、M ϕ 细胞及 TNF 等启动细胞凋亡过程,并认为这在瘤苗 BCG 诱导的抑制肿瘤生长中发挥重要作用,实验中瘤苗 BCG 于荷瘤前 6 天治疗其抑瘤作用、CTL 活性均较治疗组更显著。提示:及早应用瘤苗,治疗适合肿瘤早期患者可能起到较好的防治肿瘤功效,而瘤苗制作简易、价廉、安全可望推广应用。

(本文图 2~4 见封 4)。

参 考 文 献

- 1 Mitchell MS, Kan - Mitchell J, Kempf RA, et al. Active specific immunotherapy for melanoma: phase trial of allo-

genic lysates and a Novel adjuvant. Cancer Res, 1988, 48: 5388

- 2 Hanna MG, Ransom JH, Peters L, et al. Active specific immuno therapy of human colorectal carcinoma with an autologous tumor cell/BCG. New York Academy of Science, 1993, 12: 135
- 3 张元杏, 李振荣, 张艳林等复方何首乌对 IL-2、LAK 和巨噬细胞抗癌活性的增强作用. 中国癌症研究进展. 云南科技出版社, 1994: 188
- 4 Kerr JER, Winterford CM, Appl AD, et al. Apoptosis: Its significance in cancer and cancertherapy. Cancer, 1994, 73: 2013
- 5 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino GP, et al. Features of apoptotic cells measure by flow cytometry. Cytometry, 1992, 13: 795
- 6 Chang AE, Yoshizawa H, Sakai K, et al. Clinical observation on adoptive immunotherapy with vaccineprimed T-lymphocytes Secondarily sensitized to tumor in vitro. Cancer Res, 1933, 53: 1043
- 7 Heusel JN, Wesselschmidt RI, Shresta Set al. Cytotoxic lymphocytes require Granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. Cell, 1994, 76: 977
- 8 Urbab JL, Shepard HM, Rothstein JL, et al. Tumor necrosis factor: A potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 5233

Antitumor Activity of Tumor cell vaccine with BCG and Its Induction of Apoptosis in Tumor Cells

Zhang Yangling, et al

Hebei Blood Centre, Shijiazhuang 050071

The tumor bearing mice were injected id with S180 tumor cell vaccine (soluble tumor antigens) and BCG. The tumor growth was inhibited and the cytotoxicity of CTL was increased. Both showed significant ($P < 0.01$) difference than that of control group or alone treatment group (tumor cell vaccine or BCG). The angment was much more significant when treatment was used in 6 days previously. Ultrastructure and flow cytometry showed in treatment group tumor tissue cell, the morphological change of apoptosis are comprises nuclear and cytoplasmic condensation. Content frequency histograms all cycle analysis revealed that the feature of apoptotic cell were observed in treatment group $P < 0.01$. The results suggested the inducement of an apoptotic proceed in murine S180 tumor cells which were treated by tumor cell vaccine with BCG during tumor regression.

Key words: Tumor cell vaccine; BCG; CTL cell; Apoptosis

c-erbB-2、P53和PCNA蛋白在肺癌中的表达特点及其意义

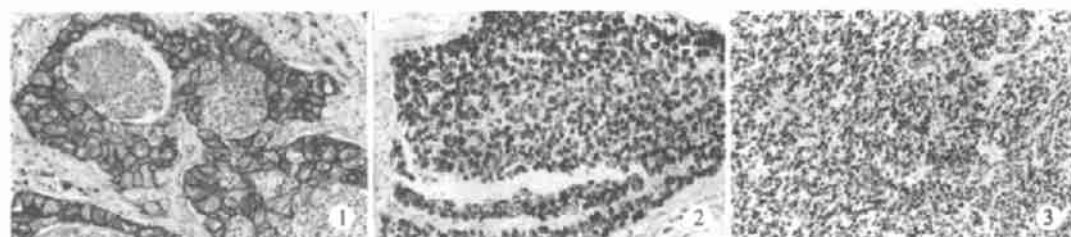


图1 肺腺癌C-erbB-2阳性 (+ + +). S-P法 × 200

图2 肺鳞癌P53阳性 (+ + +). S-P法 × 200

图3 肺小细胞癌 PCNA阳性 (+ + +). S-P法 × 200

S180瘤苗和BCG抗癌作用及诱发肿瘤细胞凋亡

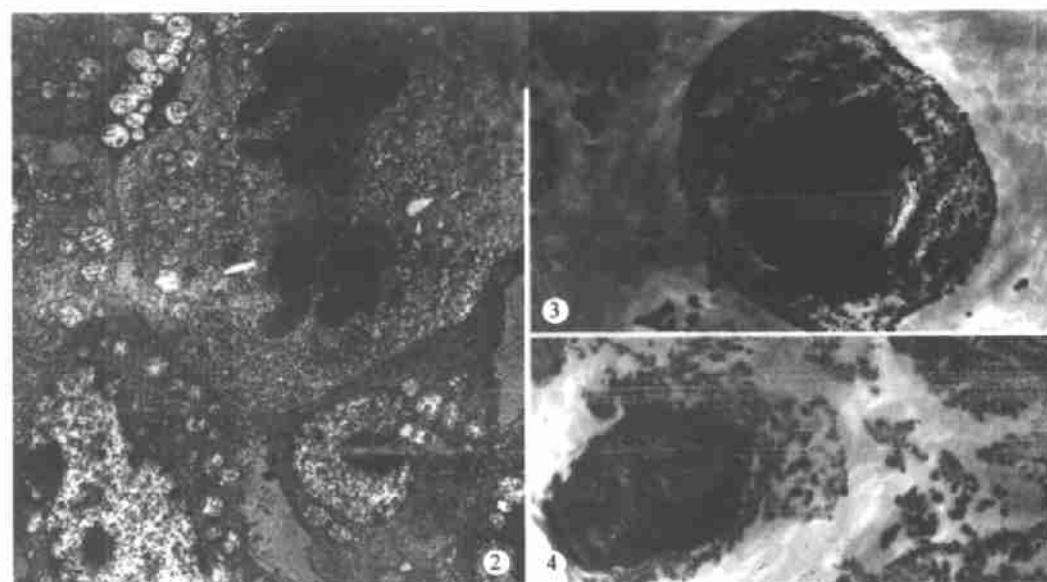


图2 对照 核质丰富呈有丝分裂 TEM × 3000

图3 4 瘤苗BCG治疗 细胞缩小 核质凝聚块状或边集胞浆固缩 TEM × 7000