

宫颈癌细胞产生的 TDSF 对 IL-2 的免疫抑制作用

汪少娟 杨业金 周火明 皇甫永穆 陈兆聪 章汉旺

摘要 人宫颈癌细胞产的免疫抑制因子(TDSF)作用于人外周血单个核细胞(PBMC)6小时,即可抑制IL-2产生,与对照组相比 $P < 0.01$ 。当TDSF存在时,经激活的PBMC效应细胞对外源性IL-2反应显著减弱,表明TDSF能抑制IL-2的作用。PHA-P刺激PBMC增殖,但TDSF使其增殖抑制。表明TDSF能抑制IL-2产生及其作用。抗癌药对TDSF的分泌有部分阻抑作用。

关键词 宫颈癌细胞;肿瘤免疫抑制因子;白细胞介素2

近年来,应用IL-2/LAK细胞对肿瘤进行过继性免疫治疗初见端倪,日益受到人们的重视^[1]。而肿瘤细胞分泌肿瘤免疫抑制因子(tumor-derived immunosuppressive factor, TDSF)对淋巴细胞和IL-2的抑制作用是治疗中必须解决的问题之一。为此,我们对宫颈癌细胞培养上清液及宫颈癌患者血清的免疫抑制作用进行了实验研究。

1 材料与方方法

1.1 细胞株和血清标本 Hela人宫颈癌细胞、G-743人宫颈癌细胞、2BS正常人胚肺细胞;宫颈上皮内癌10例,宫颈腺癌4例,献血员血清标本9份。

1.2 活性上清液的收集 10%新生小牛血清RPMI1640培养液调细胞密度至 2×10^5 /ml,置37℃、5%CO₂孵箱培养细胞达 $(1 \sim 2) \times 10^6$ /ml时,1500rpm离心10分钟,收获上清液,0.22μm膜过滤后,分装保存-20℃待测。

1.3 IL-2的条件诱生 用1:10稀释的各种瘤细胞培养上清液与PBMC在37℃、5%CO₂中共同温育6小时,Hanks液洗3次以清除残存的上清液,再将此细胞与PHA在37℃、5%CO₂中培养48小时,同时设正常对照,诱生IL-2。

1.4 效应细胞的驯化 用淋巴细胞分层液梯度离心获取PBMC(peripheral blood mononuclear, PBMC) 1×10^6 ml培养于RPMI1640完全培养液中,加入PHA-P10μg/ml,置37℃、5%CO₂中激活96

小时,此时,大多数T细胞已转化成T淋巴母细胞,再用淋巴细胞分层液在100g离心20分钟,收取淋巴母细胞,即为IL-2的效应细胞。

1.5 IL-2反应性的检测 用2%人血清RPMI1640完全培养液调效应细胞为 2×10^5 /ml,每孔100μl种于96孔板中,再加1:10稀释的瘤细胞培养上清液及含有IL-2的条件培养液各50μl,同时设正常培养液及PHA对照,37℃、5%CO₂中培养64小时,分别加入³H-TdR 0.5μci/孔,继续培养至72小时,用多导细胞收集器将细胞收集于玻璃纤维滤纸上,烘干后,用液体闪烁计数器测定CPM值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{样品 CPM 值}}{\text{对照 CPM 值}}\right) \times 100\%$$

1.6 PHA对淋巴细胞激活作用的测定 1×10^6 /mlPBMC在RPMI1640完全培养液中种于96孔板中,每孔100μl,加入PHA-P10μg/ml,100μl1:10稀释的瘤细胞培养上清液(或宫颈癌病人血清),以正常2BS人胚肺细胞培养上清液(或正常人血清)作对照。培养72小时,同上进行³H-TdR掺入测定和计算抑制率。

1.7 抗癌药对Hela细胞分泌TDSF的影响 用RPMI1640完全培养液调细胞密度至 2×10^5 /ml,分别加入顺氯氨铂(CDDP)20μg/ml,5-氟脲嘧啶(5-Fu)50μg/ml,同时设正常对照,置37℃、5%CO₂中培养60分钟,Hanks液洗3次,RPMI1640完全培养液重悬细胞,调细胞至上述密度,置37℃、5%CO₂中培养24小时,收获上清液测定TDSF活性,方法按文献^[2]。

2 结果

2.1 宫颈癌细胞培养上清液对IL-2的分泌及反应性表现出强烈的抑制作用(表1);宫颈癌细胞培养

作者单位:430032 武汉市第一医院妇产科(汪少娟);同济医科大学医学分子生物学研究室(杨业金、周火明、皇甫永穆、陈兆聪);同济医院妇产科(章汉旺)

上清液和临床确诊未经治疗宫颈癌患者血清对淋巴细胞激活增殖无例外地表现出强烈的抑制作用(表 2)。宫颈癌细胞培养上清液和宫颈癌病人血清无细胞毒作用, TDSF 对 IL-2 的分泌及反应性, 对淋巴细胞激活增殖有剂量依赖关系, 本文结果与前文^[13]报道一致。

表 1 宫颈癌细胞培养上清液对 IL-2 分泌及反应性的抑制作用

细胞株	n	IL-2 分泌		IL-2 反应性	
		ΔCPM ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	抑制率 (%)	ΔCPM ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	抑制率 (%)
对照	9	54569 ± 4060	—	49161 ± 2048	—
2BS	9	48590 ± 6643	10.9	45847 ± 1253	6.7
Hela	9	3271 ± 352	94.0*	12668 ± 1697	74.2*
宫-743	9	9633 ± 608	82.3*	16335 ± 1025	66.2*

* 与对照比较, $P < 0.01$

$\Delta\text{CPM} = \text{测定管 CPM} - \text{空白管 CPM} - \text{本底 CPM}$ 值
示 PHA 对淋巴细胞或 IL-2 对效应细胞激活增殖的 ΔCPM 值

表 2 宫颈癌细胞培养上清液和宫颈癌病人血清对 PHA 激活淋巴细胞的抑制作用

组别	n	ΔCPM ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)	抑制率 (%)
对照	9	22740 ± 2204	—
2BS	9	22161 ± 961	2.8
Hela	9	2434 ± 537	89.3*
宫-743	9	8176 ± 239	64.0*
宫颈上皮内癌	10	12353 ± 1209	45.8*
宫颈腺癌	4	10494 ± 689	53.9*

* 与对照比较, $P < 0.01$

2.2 宫颈癌细胞培养上清液不同稀释度抑制淋巴细胞对 PHA 增殖反应的效应曲线: 用 PHA-P 刺激 T 淋巴细胞转化增殖时, 其它条件固定不变, 分别加入不同稀释度($10^{-1} \sim 10^{-6}$)Hela 细胞培养上清液, 用 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 掺入法测定淋巴细胞 DNA 合成情况。结果表明, 随着瘤细胞上清液浓度增高, 抑制作用增强, 而 2BS 人胚肺细胞培养上清液在各种稀释度未见有明显的抑制作用(图 1)。

2.3 抗癌药对 Hela 细胞分泌 TDSF 的阻抑作用: 结果显示, 抗癌药 CDDP 和 5-FU 对瘤细胞分泌 TDSF 都有阻抑作用(图 2)。

2.4 宫颈癌细胞培养上清液和宫颈癌患者血清对效应细胞无细胞毒作用: 用 PBMC $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 PHA-P $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 10% 瘤细胞培养上清液(或 10% 宫颈癌患者血清)培养 72 小时, 台盼蓝染色计数死细胞, 所有实验中 PBMC 存活率均达 98% 以上, 与对照组无明显差异, 可见各种瘤细胞上清液和宫颈癌患者血清无明显细胞毒作用。

3 讨论

T 细胞承担着抗微生物, 移植物排斥和肿瘤的免疫监视等一系列重要生理功能, 是细胞免疫的主要执行者, 在体内通过分泌 IL-2 而发挥一系列重要的免疫效应^[4]。目前国内外均大量投资, 通过基因工程生产 IL-2。但是迄今为止 IL-2 和 IL-2 诱导 LAK 细胞对肿瘤进行过继性免疫治疗的效果远不能令人满意。究其原因之一, 可能与 TDSF 抑制淋巴细胞增殖, 抑制 IL-2 的产生和反应性及其对 LAK 细胞的诱导有关。所以, 研究 TDSF 与 IL-2 的关系有十分重要的意义^[5]。将 PBMC 与瘤细胞共育

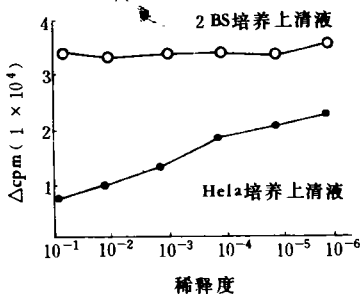


图 1 Hela 培养上清液抑制淋巴细胞对 PHA 增殖反应的效应曲线

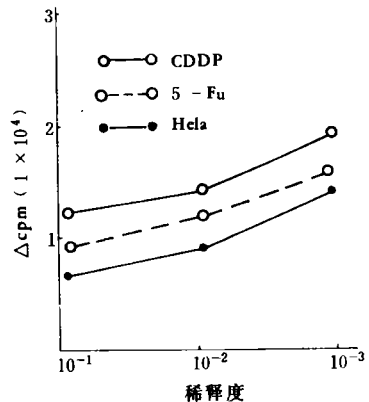


图 2 抗癌药物对 Hela 分泌 TDSF 的阻抑作用

6小时,即可观察到明显的抑制作用,说明TDSF主要影响T细胞活化早期。如何阻抑TDSF的抑制作用,本文用抗癌药与瘤细胞进行共育实验,结果两种抗癌药只能部分阻断TDSF的免疫抑制作用。有关原因及其详细机制仍在进行研究中。

本文结果为IL-2和IL-2诱导LAK细胞抗癌疗效不佳的原因提供了一定的证据,也为抗癌药与TDSF的关系提供了一定的信息。

参 考 文 献

1 张月桂,等. γ IL-2/LAK细胞治疗晚期恶性肿瘤. 肿瘤

防治研究, 1995,22(1): 12.
 2 冯新为,等. 某些抗生素和中药对健康人外周血中性粒细胞移动的影响. 病理生理学报,1985,1(14): 17.
 3 徐红霞,等. 癌症患者血清免疫抑制活性及其动态观察. 癌症, 1989,8(5): 342.
 4 Mertelman R, et al. Human interleukin 2: Molecular Biology and Clinical Possibility. Immunobiol, 1986,172: 93.
 5 Ebert EC, et al. A soluble factor produced by colon cancer inhibits the development of cytotoxic lymphocyte. Gastroentrol Clin Biol, 1986,90: 1403.

Effect of Immunosuppressive Factor Produced By Cervical Cancer Cell On IL-2 Responsiveness

Wang Shao-juan, et al

Department of Gynaecology and Obstetrics, The First Hospital of Wuhan City 430022

Cervical cancer cell lines produced a tumor-derived immunosuppressive factor (TDSF), which inhibited the production of IL-2 after 6h incubation with PBMC, the response of PBMC treated with PHA-p to exogenous IL-2 was significantly decreased in the presence of TDSF, suggesting that could inhibit the responsiveness of IL-2. The effect of PBMC after being stimulated with PHA-p was significantly suppressed by TDSF in dose-dependent manner. These findings suggest that the inhibitory action of TDSF on T cell activation and proliferation mediated with IL-2. The synthesis or secretion of TDSF in cervical were partially inhibited by anticancer drugs.

Key words: Cervical cancer cell line; Tumor-derived immunosuppressive factor; Interleukin-2.

第三届全国肝癌学术会议征稿启事

为促进我国抗癌事业的发展,总结交流肝癌防治研究的经验和推广科研成果,经中国抗癌协会总会防治研究部批准,由中国抗癌协会肝癌专业委员会主办上海医科大学肝癌研究所承办,将于1997年3月在上海召开第三届全国肝癌学术会议。现向全国各医疗、科研机构征集有关肝癌防治研究的基础和临床研究论文。论文请寄全文及500字左右的摘要各一份,要求体现先进性、科学性和具有理论实用价值。论文须由所在单位审查盖章同意。寄上海市医学院路136号(邮编200032)上海医科大学肝癌研究所收,请在信封上注明“肝癌学术会议征文”字样。截稿日期1996年12月31日。

中国抗癌协会肝癌专业委员会
上海医科大学肝癌研究所