

# ConA诱导鼻咽癌病人抑制性 细胞活性的研究

潘丽珍 简志瀚 李丽 王园 李端

(肿瘤研究所 病理免疫室)

鼻咽癌病人细胞免疫功能有不同程度的降低,已见于国内外的报道。唯其功能降低的机制,尚待进一步探讨。自Gershon等(1977)<sup>(1)</sup>发现抑制性细胞后,对其抑制性细胞的认识取得了很大进展,不少报道证实抑制性细胞在肿瘤免疫中起重要作用<sup>(2-6)</sup>,本文就ConA诱导鼻咽癌病人抑制性细胞进行初步研究,了解病人的抑制性细胞的活性与免疫功能的相互关系,以探讨病人的细胞免疫功能低下的抑制。

## 材 料 和 方 法

### 一. 检测对象:

- (一) 确诊未经治疗鼻咽癌病人38例,病理活检大多数属低分化型鳞癌Ⅲ级。
- (二) 血库献血员21例作正常对照组。

二. 植物血凝素(PHA)及刀豆球蛋白(ConA)(广州医药工业研究所)于实验前生盐水新鲜配制。

三. 培养液: RPMI 1640, 加青霉素(100单位/毫升), 链霉素(100微克/毫升), 及10%灭活小牛血清。

四. 淋巴细胞悬液的制备: 肝素抗凝, 抽取外周血, 加入1~2倍量Hanks液, 用比重1.077分离液(上海试剂二厂), 分离淋巴细胞, 经Hanks液洗涤三次, 再悬浮于培养液中, 制备成每毫升含 $4 \times 10^5$ 淋巴细胞悬液备用, 此淋巴细胞悬液经台盼兰排除实验, 检测活细胞率 $\geq 95\%$ 。

五. PHA刺激淋巴细胞转化: 取上述淋巴细胞悬液分装于6支培养管(13×150mm), 每管加入0.5毫升细胞悬液即含 $2 \times 10^5$ 淋巴细胞, 3支管为对照组, 另三支管为试验组, 试验组每管加入PHA稀积液, 使每毫升培养液含PHA50微克。置37°C温箱培养72小时。

六. ConA刺激淋巴细胞转化: 为选取ConA的最适剂量, 另选取10例健康人外周血分离淋巴细胞, 制成淋巴细胞悬液, 分置于培养管中, 每管0.5毫升含 $2 \times 10^5 \pm 0.28$ 淋巴细胞, 分别加入ConA稀积液, 使每管含ConA的最终浓度分别为每毫升1.25微克、5微克、10微克、20微克、40微克、60微克、80微克、及100微克, 每种浓度做3支复管。置37°C温箱培养72小时。

七. ConA 诱导抑制性细胞的活性: 取淋巴细胞悬液分装于 12 支培养管, 每管加入 0.5 毫升细胞悬液含  $2 \times 10^5$  淋巴细胞, 分成四组。

第一组 0 时对照;

第二组 0 时加 ConA, 即分离淋巴细胞时加 ConA, 使每毫升淋巴细胞悬液含 ConA 5 微克。

第三组 24 小时对照;

第四组 24 小时加 ConA, 即分离淋巴细胞后先将细胞置于  $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时, 然后才加 ConA, 量同上。

四组培养管皆置于  $37^\circ\text{C}$  温箱, 第一、二组培养 72 小时, 第三、四组培养 96 小时。

八. 同位素掺入和 DNA 的测定, 培养终止前 18 小时加入氘化胸腺嘧啶核苷 ( $^3\text{H}$ -TdR), 每管 1 微居里, 比活性每毫克分子 18 居里, 样品经玻璃纤维滤纸 (49 型上海红光造纸厂) 过滤, 5% 三氯醋酸和无水乙醇处理后, 将滤纸片烘干, 置于 5 毫升闪烁液中, 用国产 EJ-353 型液体闪烁计数器测定每个样品每分钟脉冲数 (cpm)。

九. 数据处理:

实验结果以 3 支复管 cpm 平均值计数

$$\text{PHA 刺激指数} = \frac{\text{加 PHA 培养管 cpm}}{\text{未加 PHA 培养管 cpm}}$$

PHA 刺激指数高, 提示淋巴细胞转化能力高, 免疫功能高, 反之, 刺激指数低, 则淋巴细胞转化能力低, 免疫功能低。

$$\text{ConA 诱导抑制性细胞抑制指数} = \frac{24\text{时加 ConA 管 cpm} - 24\text{时对照管 cpm}}{0\text{时加 ConA 管 cpm} - 0\text{时对照管 cpm}}$$

抑制指数愈大, 提示抑制性细胞活性高, 抑制指数小则抑制活性低。

## 实 验 结 果

一. PHA 刺激淋巴细胞转化, 见表 1

表 1 PHA 刺激鼻咽癌病人及正常人淋转 cpm 及刺激指数

对 象	例 数	对照组均数 cpm ± 标准差	加 PHA 组均数 cpm ± 标准差	刺激指数均数 cpm ± 标准差	P 值
献 血 员	21	334.30 ± 110.23	32117.30 ± 15776.31	97.49 ± 51.69	
鼻咽癌病人	38	325.28 ± 172.04	19607.90 ± 10971.10	66.93 ± 38.39	<0.05

两组结果差异显著。

21 例正常人 PHA 刺激指数最高为 237.85, 最低值为 44.45。38 例鼻咽癌病人 PHA 刺激指数最高值为 184.87, 最低值为 15.81, 两组比较见图 1。

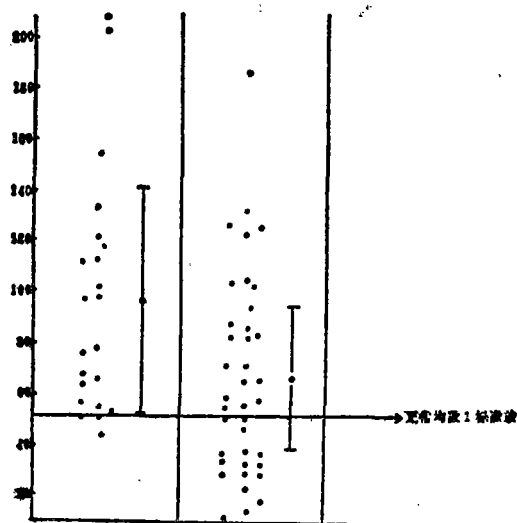


图1 鼻咽癌病人和正常人PHA刺激指数比较

二、ConA刺激淋巴细胞转化：见图2。

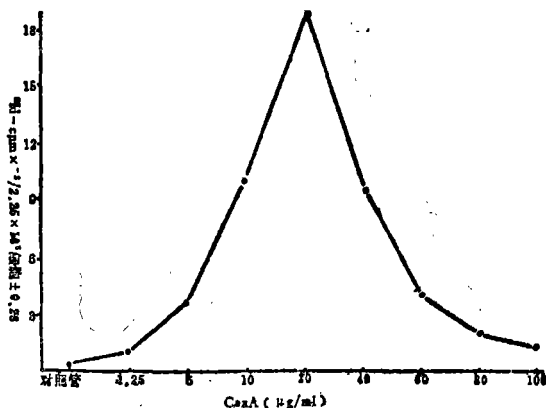


图2 不同浓度ConA刺激淋巴细胞的反应

自结果表明加入ConA20微克/毫升时脉冲数最高，意即ConA20微克/毫升是刺激淋巴细胞转化的最适剂量，在本实验中我们选取了亚适量即5微克/毫升。

三、ConA诱导抑制性细胞的活性：

21例正常人及38例鼻咽癌病人外周淋巴细胞经ConA诱导后，0时及24时加ConA后的 $^3\text{H}$ -TdR 脉冲数（均值±标准差）及根据抑制指数公式计算其抑制指数（均值±标准差），见表2。

表2 ConA 诱导鼻咽癌病人与正常人抑制性细胞的抑制指数

对象	例数	0时对照cpm 均值±标准差	0时加ConA cpm均值±标准差	24时对照cpm 均值±标准差	24时加ConA cpm均值±标准差	抑制指数 均值±标准差	P值
献血员	21	343.30 ±110.23	1780.35 ±1479.47	384.76 ±258.64	4363.27 ±4504.67	2.91 ±1.48	
鼻咽癌病人	38	325.38 ±172.04	903.58 ±718.88	327.60 ±171.80	2754.82 ±2638.96	4.81 ±2.41	<0.01

两组差异非常显著,提示鼻咽癌病人外周淋巴细胞的抑制性细胞活性增高。

38例鼻咽癌病人中PHA刺激指数低于正常均值1个标准差的16例中,有13例其抑制指数高达正常抑制指数2个标准差,有2例PHA刺激指数分别为28.54及12.53,其抑制指数竟分别达10.65及10.53,为正常最大抑制指数的2.44及2.39倍。但有3例刺激指数低,抑制指数也低,而且PHA或ConA刺激后<sup>3</sup>H-TdR掺入的脉冲数皆很低,见表3。

表3 3例鼻咽癌病人的抑制指数及PHA刺激指数

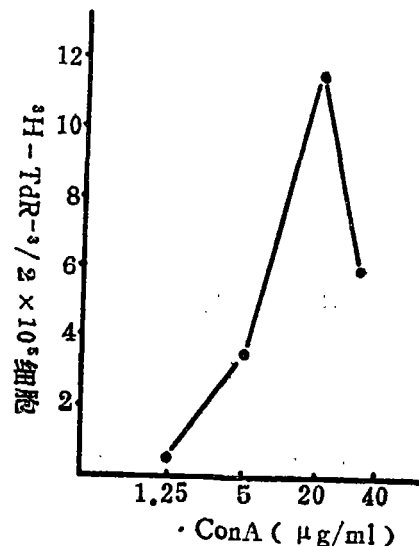
	0时对照 cpm	0时加ConA cpm	24时对照 cpm	24时加ConA cpm	抑制指数	PHA刺激 指数
例1	442	639.33	243.5	598.5	1.80	39.07
例2	153	288.33	164	400.33	1.75	18.85
例3	297.5	324.33	299.23	328	1.84	15.81

关于这些病人抑制指数低的原因,将在本文中讨论。

## 讨 论

一、ConA刺激淋巴细胞转化,以ConA 20微克/毫升刺激淋巴细胞时,脉冲数最高,即淋巴细胞反应最大,故此剂量是刺激淋巴细胞转化的最适剂量,高于或低于此剂量,转化反而降低。这与F Tremolada(1980)<sup>[6]</sup>所测结果(图3)相近,也是20微克/毫升为最适剂量,因此,本试验也采用F Tremolada所采用的亚适量5微克/毫升为本试验使用的剂量。因为在本实验中使用亚适量则抑制性细胞的抑制效应才显著地显示出来。

二、本文38例未经治疗鼻咽癌病人PHA刺激淋巴细胞转化的测定,其刺激指数为



F. Tremolada et al (1980)

图3 不同浓度ConA刺激淋巴细胞的反应

66.93 ± 38.49, 与正常人 97.49 ± 51.69 比较, 两组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 证实这 38 例鼻咽癌病人的刺激指数是明显降低, 即其细胞免疫功能低下, 这与以往我们<sup>[7,8]</sup>的工作鼻咽癌病人细胞免疫功能低于正常人是一致的。38 例病人中 42.1% 其刺激指数低于正常平均值。

三、为探讨鼻咽癌病人细胞免疫功能低下的原因, 检测了鼻咽癌病人抑制性细胞的活性。38 例鼻咽癌病人的抑制指数为 4.81 ± 2.41, 正常人为 2.91 ± 1.48,  $P < 0.01$ , 二组差异非常显著, 显示鼻咽癌病人抑制性细胞的活性高于正常人, 这可能是鼻咽癌病人细胞免疫功能低下的原因。而且在 38 例病人中 PHA 刺激指数低于正常 1 个标准差的 16 例, 其抑制指数超过正常抑制指数 2 个标准差的占 81.25% (13/16), 其中有 2 例其刺激指数分别为 28.54 及 12.53, 而抑制指数分别达 10.65 及 10.53, 推测这些病人细胞免疫功能低下可能与抑制性细胞活性增高是相关的。但有 3 例病人刺激指数低, 而抑制指数也低, 可能其免疫功能低下并非抑制性细胞的抑制作用, 根据这 3 例病人的淋巴细胞对 PHA 及 ConA 刺激后, <sup>3</sup>H-TdR 掺入的脉冲数很低, 分析其原因可能是淋巴细胞本身的缺陷, 或由于血清抑制因子使淋巴细胞反应受抑制, 这有待进一步研究。

四、本文测定抑制性细胞活性采用了 Bresnahan 等 (1977)<sup>[9]</sup> 提出的方法, 外周血淋巴细胞经 37°C 培养 24 小时之后, 加入 ConA 培养显示促进增生的反应, DNA 的合成比未经 37°C 培养即加入 ConA 培养的淋巴细胞要高, 虽经洗涤并换上新鲜培养液仍出现促进增生的反应, 但加入少量经 ConA 培养的淋巴细胞可抑制这种促进增生的反应, 这意味着促进增生的反应是因为丧失了抑制性细胞所致。Feighery (1978)<sup>[10]</sup> 及 F Tremolada (1980)<sup>[6]</sup> 亦证实了这种促进增生的反应, 且淋巴细胞预先加入 ConA 培养可抑制淋巴细胞对致裂原的反应, 但预先培养 48 小时之后, 才加入 ConA 培养就不能激活这种抑制活性, 这支持了这种抑制性细胞和抑制活性存在的观点, 而且在体外培养中它是短命的细胞。此方法简便, 易操作, 可做临床探讨病人的免疫功能低下与抑制性细胞的关系的简易方法。

## 小 结

一、38 例鼻咽癌病人 ConA 诱导抑制性细胞的抑制指数的平均值为 4.81 ± 2.41, 比正常人的抑制指数的平均值 2.91 ± 1.48 为高, 提示鼻咽癌病人的抑制性细胞的活性显著增高。

二、38 例鼻咽癌病人中 PHA 刺激指数的平均值为 66.93 ± 38.49, 比正常人的平均值 97.49 ± 51.69 为低, 提示鼻咽癌病人的细胞免疫功能明显低下。

三、38 例鼻咽癌病人中 PHA 刺激指数低于正常人 1 标准差的占 42.1% (16/38), 其中抑制指数高于正常人 2 标准差的占 81.25% (13/16), 提示其细胞免疫功能低下与抑制细胞增殖活性高相关, 但有 18.7% (3/16) PHA 刺激指数低于正常人, 而抑制指数也低, 提示其抑制性细胞活性没有增高, 故这一部分病人免疫功能低下可能与非抑制性细胞活性增高的其他因素所致。

(本文承中山医学院同位素桂治宁副教授指导, 和胡秀贞同志技术协助, 并得到中山医学院张锦明及钟会坤大夫协助提供病例, 谨此致谢)

## 参 考 文 献

- [1] Gershon K K & Kondo K; Infections immunological tolerance, *Immunology* 21 : 903, 1971
- [2] Treves A, et al; Enhancing T lymphocytes from tumor-bearing mice suppress host resistance to A syngeneic tumor, *Eur J Immunol* 4 (11) : 722, 1974
- [3] Fujimoto S, et al; Regulation of immune response to tumor antigens, *J Immunol* 116 : 791, 1976
- [4] Greene M I, et al; Reduction of syngeneic tumor growth by an anti-I-J allo-antiserum, *Proc Nat Acad Sci (USA)* 74 : 5118, 1977
- [5] Zembela M, et al; Depressed in vitro peripheral blood lymphocyte response to mitogens in cancer patients; The role of suppressor cells, *Int J Concer* 19 : 605, 1977
- [6] F Tremolada, et al; Suppressor cell activity in viral and Non-viral chronic active hepatitis, *Clin Exp Immunol* 40 : 89, 1980
- [7] 中山医学院病理教研组肿瘤免疫组等: 鼻咽癌病人的细胞免疫功能——62例淋巴细胞转化试验结果报告, 中山医学院肿瘤所学术资料汇编(三)1, 1978
- [8] 中山医学院肿瘤研究所病理免疫研究室等: 鼻咽癌病人61例同时检测淋巴细胞转化及玫瑰花结形成试验的结果, 中山医学院肿瘤所学术资料汇编(三)8, 1978
- [9] Bresnihan B, et al; Suppressor function of peripheral blood mononuclear cells in normal individuals and patients with systemic lupus erythematosus, *J Clin Invest* 59 : 106, 1977
- [10] Feighery C, et al; Invitro studies of suppressor cell function in human peripheral blood mononuclear cells, *Clin Exp Immunol* 32 : 459, 1978

## A Study on the ConA-Induced Uppresor Cell Ctivity in Naso Pharyngeal Carcinoma ( NPC ) Patients

Pan Liezhen Jian zhihan Li Lie Huang yuan Li Duan  
(Department of pathology and Immunology, Cancer Institute,  
Zhongshan Medical College)

### Abstract

The suppressor cell activity of peripheral blood leukocytes(PBL) was measured by ConA-induced blastogenesis method augmentating in 24-hour precultured cells in 38 NPC patients and 21 normal individuals. The results showed that the mean

suppressor index of NPC patients was  $4.81 \pm 2.41$ , which was higher than that of the control group ( $2.91 \pm 1.48$ ). There is significant difference between the two data ( $P < 0.01$ ).

In the mean time, the activity of PBL was also assessed by PHA-induced protein synthesis stimulation method using  $[^3H]$ . The stimulation index of NPC patients was  $66.93 \pm 38.49$ . It was lower than that of the normal individuals ( $97.49 \pm 51.69$ ). The P value is less than 0.05. This fact once again assumed that the cell mediated immunity (CMI) of NPC patients was depressed.

Thirteen out of 16 NPC patients with depressed CMI had higher suppressor index than normal. It showed that the decreased activity of PBL in NPC patients was always associated with increased activity of suppressor cells. Therefore, it is reasonable to suggest that one of the mechanisms which depress the CMI in NPC patients might be the heightened level of suppressor cell activity.