

鼻咽癌组织提取液, 前列腺素E₂, 干扰素 对人自然杀伤细胞功能影响的研究

区大卫 蔡体育 李 端 陈爱珍 简志瀚

(肿瘤研究所病理免疫室)

1973年Takasngi和Herberman分别发现人和小鼠的淋巴细胞在没经过特异性免疫, 也无需抗体参与下就能在体外杀伤某些肿瘤细胞, 因而称为自然杀伤(NK)细胞, 各国学者对这种细胞的性质进行了大量深入的研究, 认为NK细胞在体内可以抑制肿瘤的发生, 发展和转移, 是机体执行免疫监视功能的重要效应细胞^[1]。NK细胞对肿瘤细胞的杀伤, 可以受很多因素(包括来自肿瘤的因素)调节和影响, 研究这些因素的作用特点和条件, 对肿瘤预防, 治疗及预后均有重要意义^[1, 2]。为此, 我们进行了鼻咽癌组织提取液, 前列腺素(PG)E₂, 及干扰素对NK细胞功能影响的初步研究。

材 料 和 方 法

肿瘤细胞: 体外培养的人慢性髓性白血病K562细胞系。

培养液: 含10%小牛血清的1640培养液。

鼻咽癌组织提取液(NPCE)和正常人扁桃腺提取液液(NTE)的制备^[3]: 取人鼻咽癌淋巴结转移瘤和正常人扁桃腺组织, 分别放在3M KCl溶液中, 制成匀浆。经冻融, 高速离心, 取上清置半透膜袋内透析, 浓缩, 测定蛋白含量。本研究提取液蛋白含量为0.5毫克/毫升。

干扰素: (广州医药卫生研究所, 25毫克/毫升)

PGE₂: (贵阳制药厂, 2毫克/毫升)。

淋巴细胞的制备: 取肝素抗凝的正常人静脉血, 用常规的Ficoll-Hypaque密度梯度离心法分离到人外周血单核白细胞, 置培养液中37°C孵育小时, 用贴壁玻璃的方法除去单核巨噬细胞得效应淋巴细胞。

效应淋巴细胞的处理: 用培养液将细胞浓度调至 $1-2 \times 10^6$ /毫升, 分别加入不同浓度的NPCE, NTE, PGE₂或干扰素。37°C孵育1小时后, 将干扰素处理组织细胞用培养液洗一次, 浓度调至 5×10^6 /毫升。其余各组加入物浓度不变, 细胞浓度至 1×10^7 /毫升。

⁵¹Cr释放试验^[4, 5] 测定效应淋巴细胞对靶细胞的裂解率。

(1) 标记靶细胞。取需要量的K₅₆₂细胞, 洗一次, 每 1×10^6 瘤细胞加入100 μ ci Na₂Cr⁵¹O₄溶液(中国科学院原子能研究所, 4.8mci/毫升), 再加入含5%小牛血清的培养液0.5毫升置37°C温箱1小时, 每15分钟摇动一次, 然后洗3次, 用培养液调至 $1 \times$

10⁵/毫升。

(2) 试验方法: 取不同处理的效应细胞和标记的靶细胞各0.1毫升于40孔U型底培养板中作实验组, 加入培养液和标记靶细胞各0.1毫升为自发释放组, 加入6%聚乙二醇辛基苯基醚和标记的靶细胞各0.1毫升为最大释放组, 经30×g离心5分钟后置含5%CO₂的潮湿空气中, 37℃温箱孵育4小时, 再经60×g离心10分钟后, 每孔吸上清0.1毫升, 置10×40微米塑料试管中用r计数器测定释放到上清的⁵¹CrCPm值。每孔⁵¹Cr释放实际值为(\bar{X} 实验组CPm - \bar{X} 本底CPm) × 2)。0.1毫升标记靶细胞的CPm为总掺入值。上述每组均作三个平行孔试验。

靶细胞裂解率计算公式:

$$\text{靶细胞裂解率} = \frac{\text{CPm实验组} - \text{CPm自发释放组}}{\text{CPm最大释放组} - \text{CPm自发释放组}} \times 100\%$$

三种不同处理的实验, 均重复10次, 每次试验的效应细胞来自同一正常人。NPCE, NTE和PGE₂处理的实验, 均设含同浓度处理物培养液加标记靶细胞组对照。因对自发释放无明显影响, 公式仍按上述自发释放值计算。

结 果

1. NPCE, NTE对NK功能的影响。

用不同浓度的NPCE或NTE与效应淋巴细胞预孵育1小时并进行⁵¹Cr释放试验。结果NPCE的稀释度为1:10时, 靶细胞裂解率为12.6±5.8, 无处理对照为6.87±13.3。加入物稀释度为1:30时, NPCE处理组靶细胞裂解率为18.3±8.6, NTE处理组为54.0±11.1, 无处理对照为55.8±12.5。表明NPCE处理明显抑制了NK细胞对靶细胞的裂解率(P<0.001), 而NTE则无明显的影响作用(图1, 2)。

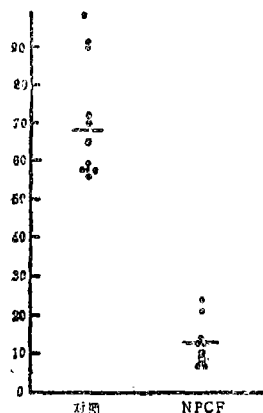


图1 NPCE对NK细胞功能的影响 ⁵¹Cr释放试验E:T=100:1, NPCE稀释度为1:10

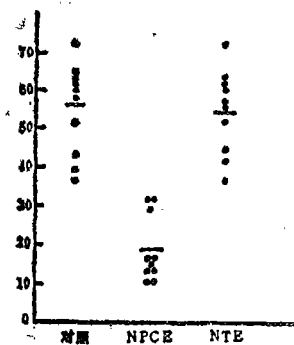


图2 NPCE, NTE对NK细胞功能的影响 ⁵¹Cr释放试验E:T=100:1, NPCE和NTE稀释度为1:30

2. PGE₂对NK细胞功能的影响。

用 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} 克分子/升的PGE₂与效应淋巴细胞孵育1小时并进行⁵¹Cr释放试验。结果靶细胞裂解率分别为 44.0 ± 9.9 , 31.5 ± 13.8 , 19.6 ± 14.5 , 4.3 ± 13.5 , 无处理对照为 51.4 ± 9.3 , 表明PGE₂浓度为 10^{-8} M以上时, 明显抑制了NK细胞对靶细胞的裂解率($P < 0.002$)。这种作用随着所加PGE₂的浓度升高而增强(图3)。

3. 干扰素对NK细胞功能的影响。

用活性浓度 10 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 2×10^3 (μ /ml)干扰素与效应淋巴细胞预孵育1小时, 结果靶细胞裂解率分别为 46.2 ± 12.4 , 51.5 ± 10.7 , 61.0 ± 7.3 , 65.0 ± 7.8 , 75.2 ± 12.6 , 无处理对照为 45.9 ± 9.3 。表明干扰素活性为 500μ /ml以上时, 可以明显提高NK细胞对K562靶细胞的裂解率, ($P < 0.02$)。这种作用随着所加干扰素的活性浓度升高而增强(图4)。

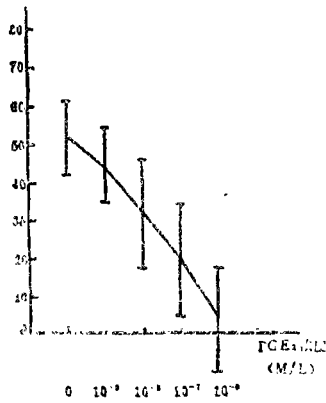


图3 前列腺E₂对自然杀伤细胞功能的影响 ⁵¹Cr释放试验的E:T = 100:1

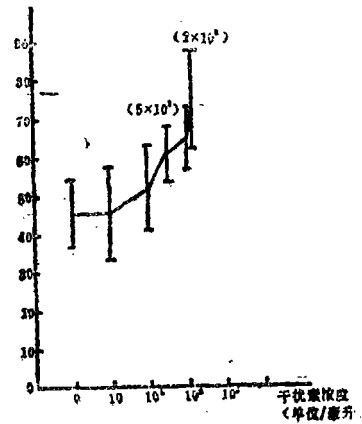


图4 干扰素对人自然杀伤细胞功能的影响 ⁵¹Cr释放试验的E:T = 50:1

讨 论

随着NK细胞研究的进展, 有关肿瘤病人NK细胞功能的研究, 逐渐受到注意。近年, 不少作者已陆续报告卵巢, 乳腺, 肝、肺、食道癌、白血病, 黑色素瘤, 恶性淋巴瘤等病人外周血NK细胞功能降低^[6~8]。这种降低主要见于晚期肿瘤病人, 一些肿瘤病人, 如早期较局限者, 可有正常的NK活性;^[9]某些肿瘤病人的NK细胞活性甚至高于正常人的水平^[10, 11]。从现有资料看来, 除恶性淋巴瘤, 黑色素瘤病人的NK细胞功能缺陷可能为肿瘤出现前已存在外, 对于大多数肿瘤病人NK细胞功能改变的主要原因还没有满意的解释^[12, 13]。看来, 这和肿瘤病人体内对NK细胞功能影响的因素不无关系, 研究这些因素的作用和机理, 将有助于这一问题的解决。

Steinhaner等人报告晚期肿瘤病人外周血淋巴细胞中NK细胞的数目及其对单个靶细

胞的杀伤与正常人并无明显差异,认为肿瘤病人NK细胞活性降低可能是因为受到某些抑制细胞或因子影响,周转作用力受到抑制所造成。^[14]我们曾用体外培养的高分化鼻咽癌细胞系CNE₁,和低分化鼻咽癌细胞系CNE₂加入以K562为靶细胞的⁵¹Cr释放试验,结果NK细胞功能有抑制作用。本文进一步用鼻咽癌淋巴结转移瘤组织提取液与效应淋巴细胞孵育并进行⁵¹Cr释放试验,可见对NK细胞有明显的抑制作用,而对照的正常人扁桃腺组织提取液则无此影响,表明肿瘤组织中存在一种“免疫抑制因子”可以抑制NK细胞的功能。我们曾发现,这种鼻咽癌组织提取液可以抑制PHA刺激的外周淋巴细胞转化功能^[3]可见是一种作用较广泛的免疫抑制物。如能证实其他肿瘤组织或病人血中也有类似因子,那末,有大量肿瘤产物或抗原释放的病人,如某些晚期肿瘤病人,接受放疗的病人,其NK功能的降低与此不无关系。

据目前所知,肿瘤细胞与淋巴细胞培养接触时可以分泌PGE₂。肿瘤组织中的巨噬细胞也有这种作用^[10, 15]。PGE₂是调节和影响免疫系统功能的重要激素,Kendall等人报告PGE₂对NK细胞活性有激活和抑制双重效应,其结果取决于所用的浓度及作用的时机^[16]。本文在效应细胞与靶细胞结合前后均用PGE₂处理,浓度10⁻⁸M以上时,可明显抑制NK细胞功能,与国内外实验的结果接近。PGE₂抑制NK细胞的功能主要作用在效应细胞及靶细胞结合后的不依赖杀伤细胞的溶解阶段,其机制可能是通过调节杀伤过程中有关的腺苷酸环化酶系统,改变靶细胞膜的性质而起作用^[17, 18]。

肿瘤细胞与淋巴细胞接触培养时,还可以刺激淋巴细胞分泌干扰素^[10, 15]。本文所用的干扰素活性浓度为500μ/毫升以上时,明显提高NK细胞功能与国外同类实验结果一致^[2, 19]。干扰素在体内外对NK细胞功能均有明显的激活作用,许多激活NK细胞功能因素的作用都是通过干扰素介导的。其机制可能是:①促进前NK细胞分化为成熟的NK细胞,增加NK效应细胞的数目。②激活NK细胞,增强其对靶细胞的裂解作用。③提高NK细胞的周转作用力^[20]。

在机体和肿瘤的斗争过程中,既可产生提高NK活性的干扰素;又可产生抑制NK活性的PGE,肿瘤免疫抑制因子等。因此,可以理解,在肿瘤发展的不同阶段,由于这几类物质的比势有差别,就决定了NK活性是下降、不变或者升高。因此,进一步研究除干扰素,PGE以外的其它影响因素,对深入了解肿瘤病人NK活性变化机理是非常必要的。

参 考 文 献

- [1] Herberman RB et al, Natural killer cells, Their role in defenses against disease. Science 214: 24, 1981
- [2] Herberman RB et al, Natural killer cells, Characteristics and regulation of activity. Immunol Rev 44: 43, 1979
- [3] 蔡体育等,鼻咽癌免疫抑制因子的研究.中华医学杂志 61: 517, 1981
- [4] Brunner KT et al, The ⁵¹Cr release assay as used for the quantitation measurement of cell-mediated cytotoxicity in vitro. In Barry R Bloom (ed) "In vitro methods in cell mediated and tumour immunity". p423, 1976
- [5] West WH et al, Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against

- a myeloid cell line, Characterization of effector cells. *J Immunol* 118 : 355, 1977
- [6] Susanna CR et al, Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymphnode cells in breast cancer in woman. *J Natl Cancer Inst* 67 : 585, 1981
- [7] Son K et al, Depressed natural killer cell activity in patients with hepato-cellular carcinoma, In vitro effects of interferon and levamisole. *Cancer* 50 : 2821, 1982
- [8] 黄耀章等, 肺癌和食管癌外周血NK, ADCC活性的变化. *肿瘤* 3 : 103, 1983
- [9] Eremin Q et al, Human natural cytotoxicity in the blood and lymphoid organs of healthy donors and patients with malignant disease. *Int J Cancer* 21 : 35, 1978
- [10] Kadish AS et al, Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer, Deficient natural killer activity and normal interferon production in patient with advanced disease. *J Immunol* 127 : 1817, 1981
- [11] Herberman RB et al, Natural cell-mediated immunity. In George Klein (ed) "Advances in Cancer Research" . p 305, 1978
- [12] Tursn T et al, Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Cancer* 50 : 2333, 1982
- [13] Marx JL et al, Natural killer cells help defend the body. *Science* 210 : 624, 1980
- [14] Steinhauer EH et al, Defective natural cytotoxicity in patients with cancer, Normal number of effector cell but decreased recycling capacity in patients with advanced disease. *J Immunol* 129 : 2255, 1982
- [15] Koren HS et al, Regulation of human natural killing, I. The role of monocytes, interferon and prostaglandins. *J Immunol* 127 : 2007, 1981
- [16] Kendall RA et al, The dual effect of prostaglandin (PGE₂) and ethanol on the natural killer cytotoxic process, Effector activation and NK-cell target cell conjugate lytic inhibition. *J Immunol* 125 : 2770, 1980
- [17] 陈绍先, 细胞介导细胞毒. *中华医学杂志* 62 : 747, 1982
- [18] Hiserodt JC et al, Differential effects of various pharmacologic agents on the cytolytic reaction mechanism of the human natural killer lymphocyte. *J Immunol* 129 : 2266, 1982
- [19] Oraldo TR et al, Effect of several species of human leukocyte interferon on the cytotoxic activity of NK cell and monocytes. *Int J Cancer* 31 : 285, 1983
- [20] Targan SR et al, The dual interaction of prostaglandin E₂ (PGE₂) and interferon (IFN) on NK lytic activation. *J Immunol* 127 : 1424, 1981

The Effects of the Extraction of Nasopharyngeal Carcinoma Tissue, Prostaglandin E₂ Inteferon on Human Natural Killer Activity

Ou Dawei Cai Tiyu Li Duan

Chen Aizhen Jian Zhihan

(Cancer Institute, Zhongshan Medical College)

Abstract

The effects of the extraction of nasopharyngeal carcinoma tissue (NPCE), prostaglandin (PG) E₂, interferon (IFN) on human natural killer (NK) activity were studied by ⁵¹Cr release assay. The treatment of NPCE reduced significantly the NK activity, but similar effect was not seen in the treatment with the extraction of the tonsil from normal donor. The results indicated that there is a factor which can inhibit NK activity in tumour tissue. The treatment of PGE₂ at a concentration range of 10⁻⁸ to 10⁻⁶ M inhibited NK activity. The treatment of IFN at a active concentration range of 5 × 10² to 2 × 10³ u/ml enhanced NK activity. The probable influences of these functions on the NK activity of the patient with tumour were discussed.