

卡介苗提取物体外诱导小鼠脾淋巴细胞对人膀胱癌细胞的杀伤作用

蒋翡翎¹,单保恩²,姚敏¹,魏小斌¹,伍燕¹,邓碧兰¹

(1.海口市人民医院检验科,海南 海口 570208

2.河北医科大学第四医院科研中心,河北 石家庄 050011)

【摘要】 目的 分离活卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)的有效组分,分析其有效组分诱导的小鼠脾淋巴细胞体外对人膀胱癌细胞株 T₂₄细胞的杀伤作用。**方法** 采用酶裂解法和超声波破碎法对活 BCG 进行裂解,通过 Sephadex G100 凝胶层析对其有效组分进行分离及分子量的测定,用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行纯度鉴定;采用四氮唑盐(MTT)法测定 BCG 有效组分 BCGE₂ 诱导的小鼠脾淋巴细胞对人膀胱癌细胞株 T₂₄细胞的杀伤活性。**结果** BCGE₂ 可体外诱导小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌细胞株 T₂₄细胞的杀伤作用,在效靶比为 20:1 时对 T₂₄细胞的抑制率为 42.31%,而对照组仅为 13.32%,两者比较差异有统计学意义(P<0.01)。**结论** BCGE₂ 诱导的小鼠脾淋巴细胞对人膀胱癌细胞株 T₂₄的杀伤作用很显著,且随着效靶比的增加而增强。

【关键词】 BCG 提取物;脾淋巴细胞;膀胱癌细胞株 T₂₄细胞;杀伤作用

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)01-018-03

Killing effect of mouse spleen lymphocytes induced by active BCG extracts to human bladder cancer cell in vitro. JIANG Fei-ling¹, SHAN Bao-en², YAO Ming¹, WEI Xiao-bing¹, WU Yan¹, DENG Bi-lang¹. 1. Department of Clinical Laboratory, Haikou Municipal People's Hospital, Haikou 570208, Hainan, CHINA; 2. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, CHINA

【Abstract】 Objective To extract, isolate, purify and identify the active components of Bacille Calmette-Guérin (BCG), and to analyze the killing effect of mouse spleen lymphocytes induced by active BCG extracts to human bladder cancer cell line T₂₄ in vitro. **Methods** Live BCG was divided by the enzyme and ultrasonic method to extract the active protein. The components of BCG extracts was isolated, and analyzed for the molecular weight by Sephadex gel filtration chromatography, then further studied to identify the purity and the molecular weight by the SDS-PAGE gelatin electrophoresis. The killing activity of mouse spleen lymphocytes induced by the active component BCGE₂ to the human bladder cancer cell line T₂₄ was analyzed by MTT method. **Results** The mouse spleen lymphocytes induced by BCGE₂ could kill the bladder cancer cell line T₂₄ in vitro. When the effect cells to the target cells was 20:1, the inhibit rate was 42.31%, which was significantly higher than 13.32% in the control group (P<0.01). **Conclusion** The mouse spleen lymphocytes induced by BCGE₂ have obvious killing effect on the bladder cancer cell T₂₄ in dose-dependent manner.

【Key words】 BCG extracts; Spleen lymphocytes; Bladder cancer cell T₂₄; Killing effect

我们前面已有实验证明活卡介苗(BCG)的有效组分 BCGE₂ 和 BCGE₃ 在体外可以诱导小鼠脾淋巴细胞增殖及产生细胞因子^[1], 并且 BCGE₂ 和 BCGE₃ 还可以诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO^[2], 因此 BCGE₂ 和 BCGE₃ 可以作为免疫调节剂来诱导小鼠脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞。那么这些经诱导激活的小鼠脾淋巴细胞对肿瘤细胞是否具有杀伤或抑制作用呢? 本研究旨在将人膀胱癌细胞株 T₂₄ 作为靶细胞对 BCGE₂ 的体外抗肿瘤活性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6-8 周龄的昆明小鼠、体重 18~22 g,

购于河北医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 BCG 购于北京生物制品研究所,胎牛血清为杭州四季青生物工程材料公司生产, Sephadex G100 凝胶层析柱购自 Sigma 公司, RPMI1640 为 GIBCO 公司产品, Gress 试剂购自华美生物公司, 肿瘤细胞株 T₂₄ 由河北医科大学附属第四医院科研中心提供。

1.3 BCG 蛋白提取液的制备及蛋白含量测定 用酶裂解法和超声波破碎法对活 BCG 进行裂解,用紫外吸收法测定其上清液中蛋白质(BCGE)的纯度;用考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白含量。

作者简介:蒋翡翎(1973—),女,海南省乐东市人,副主任技师,本科。

1.4 BCGE蛋白活性组分的分离 将BCGE上样于Sephadex G100凝胶层析柱,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗脱,每管收集2 ml层析液,分离后得到3个组分,分别命名为BCGE₁、BCGE₂和BCGE₃,其相对分子质量分别为42 500 D、36 300 D和28 600 D。

1.5 肿瘤细胞株悬液制备 肿瘤细胞株T₂₄细胞培养在RPMI1640完全培养液中,置于37℃,饱和湿度,5% CO₂的培养箱中培养,待细胞进入对数生长期后收集细胞,用RPMI1640完全培养基调整成浓度为1×10⁵个/ml的细胞悬液备用。

1.6 脾效应细胞悬液制备 无菌取小鼠脾脏,在200目钢筛上研磨,制备成单个细胞悬液,离心,弃上清,裂解红细胞后用Hank's液洗两次,加入含10%胎牛血清的RPMI1640培养液,调整细胞浓度为3.5×10⁶个/ml。然后接种于24孔板,加入RPMI1640配制的BCGE₂并调节使其终浓度为600 μg/ml,作用48 h后收集细胞(对照组加RPMI1640培养液),用台酚兰染色计算存活率为90%,后用D-Hank's液洗涤后调整细胞浓度为1×10⁶个/ml。

1.7 淋巴细胞杀伤功能测定 参照改良四甲基偶氮唑盐比色法MTT法^[3],实验孔加待测的经BCGE₂作用后的小鼠脾效应细胞悬液与T₂₄细胞悬液各100 μl,调节效靶比为5:1、10:1、20:1(阴性对照组加入未经BCGE₂作用的小鼠脾淋巴细胞悬液与T₂₄细胞悬液,各100 μl,并调节效靶比为5:1、10:1、20:1),另设单纯淋巴细胞(效应细胞)及T₂₄细胞(靶细胞)对照,均设6个复孔。常规培养24 h后,加入MTT 100 μl继续培养4 h,离心弃上清,每孔加入15% 十二烷基磺酸钠(SDS) 100 μl,过夜。次日用酶标仪检测各孔吸光度(OD)值,测定波长为570 nm,参考波长为630 nm。计算淋巴细胞的杀伤活性。其计算公式为:淋巴细胞活性(%)=[靶细胞对照组OD值-(实验组OD值-效应细胞OD值)]/靶细胞对照组OD值×100%。

1.8 统计学处理 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间数据用单因素方差分析的q检验和Dunnnett t检验(应用SPSS10.0统计软件计算,所有实验均重复3次)。

2 结果

镜下可见,对照组的膀胱癌细胞布满整个视野,加入效靶比为20:1的实验组,膀胱癌细胞显著减少,见图1。BCGE₂体外可诱导和促进小鼠脾淋巴细胞对T₂₄的杀伤作用。由表1结果可见,未经BCGE₂诱导的小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌细胞株仅具有较轻的杀伤作用,在效靶比为20:1时其抑制率才达到

13.32%。而经BCGE₂诱导后的小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌细胞株T₂₄的杀伤作用显著增强(P<0.01),在效靶比为10:1时其抑制率为31.49%,当效靶比为20:1时其抑制率可高达42.31%。

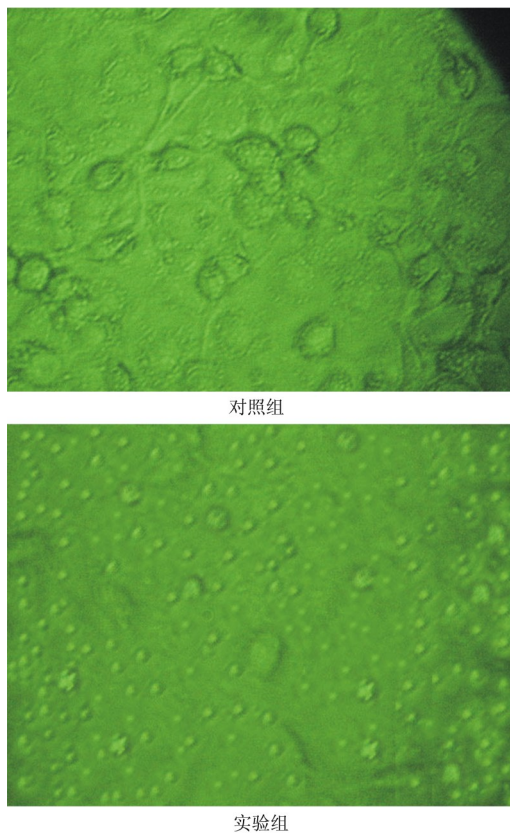


图1 膀胱癌T₂₄细胞的镜下形态(×200)

表1 BCGE₂体外诱导的小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌T₂₄细胞的杀伤作用

组别	效靶比	OD ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)	杀伤活性(%)
脾细胞对照组		0.669±0.005	
癌细胞对照组		3.649±0.008	
阴性对照组	5:1	2.839±0.002	3.86
	10:1	2.698±0.004	7.73
	20:1	2.494±0.006	13.32
实验组(脾细胞+癌细胞)	5:1	2.508±0.003*	12.94
	10:1	1.831±0.003*	31.49
	20:1	1.436±0.005*	42.31

注:与对照组比较,*P<0.01。

3 讨论

卡介苗是一种免疫调节剂,它可通过调节外周血CD₄⁺/CD₈⁺比例及自然杀伤细胞(NK细胞)活性来发挥其免疫调节作用,进一步维持和提高机体的免疫功能^[4]。而NK细胞主要发挥非特异性杀伤活性,无需抗原预先致敏即能自发杀伤靶细胞且不受主要组织相容性复合体(MHC)限制,因此NK细胞是机体抗肿瘤的第一道防线。NK细胞释放的杀伤介质穿

稳定性碘对大鼠吸¹³¹I率及有效半衰期的影响

高光东,肖欢,李诗运,姚爱珠,白殿卿

(海南省人民医院核医学科,海南 海口 570311)

【摘要】 目的 了解稳定性碘对大鼠吸¹³¹I率及有效半衰期的影响。方法 将20只普通Wistar大鼠均分成A、B两组。A组给予单纯¹³¹I处理,B组给予¹³¹I同时给予稳定性碘处理,通过吸碘率来计算¹³¹I的有效半衰期。结果 A组吸¹³¹I率为(23.9±1.7)%;B组吸¹³¹I率为(26.5±2.1)%;采用t检验,P<0.05,差异有统计学意义。A组有效半衰期为(4.65±0.18)d,B组有效半衰期为(6.01±0.14)d,A、B两组(有效半衰期)Teff比较差异有统计学意义,B组Teff显著延长。结论 稳定性碘可延长¹³¹I在甲状腺中的滞留时间,即延长¹³¹I的Teff,从而加重了对甲状腺的辐射损伤。

【关键词】 稳定性碘;¹³¹I;吸¹³¹I率;大鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)01-020-02

临床上有少数甲亢患者接受¹³¹I治疗后短时间内误进食富碘食物(如海带、紫菜等),该情形是否影响¹³¹I在甲状腺内的代谢?有学者报道^[1]射线后,同时给予一定量的稳定性碘,临床观察到此方法具有保护甲

状腺的作用。本实验是试图从动物实验的角度来探讨稳定性碘对吸碘率及有效半衰期的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 3个月龄普通Wister大鼠(由海

作者简介:高光东(1972—),男,海南省东方市人,技师。

孔素、NK细胞毒因子等可使靶细胞溶解破裂。NK细胞还可通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)效应,杀伤被特异性抗体包被的瘤细胞,其机理为通过IgG₁和IgG₂抗体作桥梁,其Fab端特异性识别肿瘤,Fc段与NK细胞FcRg III a结合,产生抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用。NK细胞也可以将颗粒酶经穿孔素在靶细胞上形成的“孔洞”注入靶细胞从而使靶细胞DNA断裂而导致细胞凋亡^[5],因此NK细胞在抗肿瘤免疫中起重要作用。而肿瘤患者中的NK细胞的百分率往往是降低的,预示机体NK细胞作用受抑制,不能有效发挥杀伤肿瘤细胞的作用^[6]。有研究表明BCG可以直接通过TLRs激活NK细胞^[7],使其直接对肿瘤细胞进行杀伤。NK细胞通过识别肿瘤抗原与靶细胞结合,结合后微管插入细胞膜,释放NK细胞溶瘤因子(NKCF),NK细胞还可通过多次接触多个肿瘤细胞放大杀伤效应^[8-9]。本研究结果也证实,经BCGE₂体外诱导的小鼠脾淋巴细胞对肿瘤细胞株T₂₄的杀伤活性显著增强(由于未预先采用抗原致敏,其活性细胞大多数为NK细胞)。未经BCGE₂诱导的小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌细胞株仅具有较轻的杀伤作用,在效靶比为20:1时其抑制率才达到13.32%。而经BCGE₂诱导后的小鼠脾淋巴细胞对膀胱癌细胞株T₂₄的杀伤作用显著增强(P<0.01),并随着效靶比的增加而更为显

著,提示BCGE₂具有间接的抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 蒋翥翎,单保恩,张淑芳,等.卡介苗提取物对小鼠脾淋巴细胞免疫调节作用的体外实验研究[J].中华肿瘤防治杂志,2007,14(11):827-829.
- [2] 蒋翥翎,单保恩,姚敏,等.卡介苗蛋白提取物体外对小鼠腹腔巨噬细胞产生NO的影响[J].郑州大学学报:医学版,2010,45(4):621-623.
- [3] Tada H, Shiho OK, Kuroshima K, et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2 [J]. J Immunol Meth, 1986, 93:157
- [4] 黄捷,赖伟珍,韩红星,等.卡介苗多糖核酸对梅毒血清固定患者外周血T淋巴细胞亚群的影响[J].海南医学,2007,18(7):17-18.
- [5] Pardo J, Balkow S, Anel A, et al. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(10):2881-2887.
- [6] 苏杭,吴晓蔓.肝癌患者外周血淋巴细胞亚群及活化状态的临床意义[J].海南医学,2004,15(10):105-106.
- [7] Suttman H, Jacobsen M, Reissk, et al. Mechanisms of bacillus calmette-Guérin mediated natural killer cell activation [J]. 2004, 172:1490-1495.
- [8] Berzofsky JA, Terabe M. The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity [J]. Curr Mol Med, 2009, 9(6):667-672.
- [9] Uemura A, Takehara T, Miyaqi T, et al. Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice [J]. Cancer Immunology immunotherapy, 2010, 59(3):453-463.

(收稿日期:2011-08-01)