

免疫活性细胞的实验抗癌研究*

王球达 叶庆炜

(上海实验生物研究所)

肿瘤免疫研究表明,机体对肿瘤的免疫作用主要是细胞免疫。Klein等(1960)将肿瘤细胞与免疫动物的淋巴细胞一起在体外处理以后,就减弱了瘤细胞在宿主中生长的能力。Alexander和Delorme等(1964, 1966)注射同种或异种的免疫淋巴细胞,使化学物质诱发的大鼠原发性纤维肉瘤得到缓解或消退。近年来,许多实验证明,脾脏细胞、局部淋巴结细胞、胸导管淋巴细胞和腹膜表面的淋巴细胞都是能够传递肿瘤特异性移植免疫性的免疫活性细胞。

我们采用免疫小鼠脾脏细胞的实验抗癌研究,是为了证实其在宿主对抗移植性腹水型肝癌和实体型S-180肉瘤中所起的免疫作用,为以后所进行的免疫信息RNA的实验抗癌研究提供必要的基础。

材 料 和 方 法

1. 动 物

(1)在腹水型肝癌实验和S-180肉瘤实验1中,采用体重18—20克的瑞士品系杂种小白鼠。

(2)在S-180肉瘤实验2—6中,采用体重18—20克的纯种“津白”小白鼠。

2. 肿瘤模型

小鼠移植性腹水型肝癌和实体型S-180肉瘤。

3. 小鼠的免疫

(1)腹水型肝癌细胞悬液的制备 接种一周左右的腹水型肝癌小鼠,剖腹取出腹水,经1000转/分离心1分钟,弃去上清液,用生理盐水洗涤沉淀3次,最后将离心所得细胞沉淀用生理盐水稀释成为 10×10^6 细胞/毫升的细胞悬液。

(2)S-180肉瘤细胞悬液的制备 取接种10天左右的S-180肉瘤,弃去坏死部分,将瘤块剪碎成糊状,加入适量生理盐水搅匀后,经四层40目不锈钢网过滤,滤液经1500转/分离心2分钟,弃去上清液,用生理盐水洗涤沉淀3次,最后离心所得细胞沉淀(除完整细胞外还包括细胞碎片),用生理盐水稀释成细胞悬液,完整细胞计数为 10×10^6 /毫升。

按上述方法制备的两种瘤细胞悬液于免疫或动物接种前,经锥虫蓝染色在显微镜下检查,以活细胞数计算免疫或接种的剂量。

(3)动物的免疫 腹水型肝癌和S-180肉瘤细胞

悬液各经尾静脉免疫实验小鼠,每隔3天免疫一次,每次注射0.2毫升(2×10^6 瘤细胞),第四次免疫后间隔3天即剖腹取脾脏进行抗癌实验。

4. 实验步骤

(1)脾脏细胞悬液的制备 上述两种已经免疫的小鼠脾脏和未经免疫的正常小鼠脾脏均分别制备成脾细胞悬液,作抗癌实验注射用。方法如下:剖取脾脏于表玻璃中剪碎成糊状,加适量生理盐水洗数次,经不锈钢网过滤,滤液于1000转/分离心3分钟,细胞沉淀用生理盐水洗涤3次,再混悬于2毫升生理盐水中,加入6毫升冷蒸馏水以破坏红血球,然后立即加2毫升3.5% NaCl溶液,使NaCl浓度回复为0.85%,1000转/分离心3分钟后,沉淀的脾细胞用生理盐水稀释成实验需用的脾细胞悬液。

(2)腹水型肝癌及S-180肉瘤接种抑制实验 将实验小鼠随机分为三组,即:免疫脾细胞实验组、正常脾细胞实验组和对照组。

在对腹水型肝癌抑制实验中,免疫的或正常的脾细胞均以100:1的比例与腹水肝癌细胞混合后接种于实验组小鼠腹腔内,每只实验小鼠腹腔接种 5×10^5 腹水肝癌细胞和 5×10^7 免疫(或正常)脾细胞,总体积约0.25毫升。对照组则每只小鼠腹腔接种等量、等体积的瘤细胞和生理盐水。

然后,于接种日起,观察各组小鼠腹水瘤生长与否,以及长瘤小鼠的平均存活天数作为实验结果进行比较。

在对S-180肉瘤抑制实验中,免疫或正常脾细胞均以20:1的比例与瘤细胞混合后接种于实验组小鼠皮下,每只实验小鼠皮下接种 25×10^5 瘤细胞和 5×10^7 免疫(或正常)脾细胞,总体积约0.25毫升,对照组每只小鼠皮下接种等量、等体积的瘤细胞和生理盐水。

S-180肉瘤抑制实验是于接种日后两周杀鼠,取瘤称重,比较实验结果。

实 验 结 果

1. 免疫小鼠脾脏细胞抑制腹水型肝癌

从表1的实验结果可见,两次实验的对照组生瘤

* 本文于1972年写成

表1 腹水型肝癌抑制实验结果

组别 实验项目 次数	对 照 组			正 常 脾 细 胞 组				免 疫 脾 细 胞 组			
	实验动物数	生瘤动物数	生瘤动物平均存活天数 (S. E.)	实验动物数	生瘤动物数	生瘤动物平均存活天数 (S. E.)	抑制生瘤率 (%)	实验动物数	生瘤动物数	生瘤动物平均存活天数 (S. F.)	抑制生瘤率 (%)
1	10	10	22.4 (± 1.1)	9	5	24.0 (± 0.7)	44.0	9	1	34.0 ± 0	89.0
2	14	14	20.5 (± 0.5)	9	8	20.3 (± 0.8)	11.0	20	1	22.0 ± 0	95.0

说明: (1) 接种后存活期超过 60 天且剖腹检查未见腹水瘤者为抑制生瘤标准; (2) 实验 2 中, 免疫脾细胞组于 60 天后剖腹检查时见 2 只小鼠腹腔内长有 0.5~1.0 厘米大小实体瘤; (3) 实验动物为杂种小鼠

率均为 100%, 而免疫脾细胞组生瘤动物的比例仅为 1/9 和 1/20, 抑制生瘤率达 89.0—95.0%。所以, 免疫脾细胞对腹水型肝癌具有显著的抑制作用。但是, 正常脾细胞组也有 11.0—44.0% 的抑制生瘤率, 表明正常脾细胞对腹水型肝癌也具有一定抑制作用, 但其效力远差于免疫脾细胞。

2. 免疫小鼠脾脏细胞抑制实体型 S-180 肉瘤

表 2 的实验结果表明, 当免疫脾细胞以 20:1 的比例与 S-180 肉瘤细胞混合后接种时, 也可表现出相当显著的抑制作用。

在实验 1 采用杂种小鼠的实验中, 正常脾细胞组也出现 58.5% 的瘤重抑制率, 但是远不如免疫脾细胞组显著。正常脾细胞组的平均瘤重为 1.50 克, 免疫脾细胞组平均瘤重为 0.40 克, 所以, 免疫脾细胞组与正常脾细胞组比较时其瘤重抑制率也达 73%。而且, 经显著性测验, 这两组的平均瘤重之间有着显著性差异。

在实验 2—6 的纯种小鼠实验中, 正常脾细胞组虽出现 18.0—41.1% 的瘤重抑制率, 但是经显著性测验其平均瘤重与对照组平均瘤重之间无显著性差异。这 5 次实验表明, 正常脾细胞对 S-180 肉瘤并未出现抑制作用。相反, 免疫脾细胞组均表现了 30—100% 的抑制生瘤率和 74.9—100% 的瘤重抑制率。实验

2, 5, 6 中免疫脾细胞组动物均未长瘤, 实验 3, 4 中免疫脾细胞组动物长瘤的比例为 7/10 和 1/8, 其平均瘤重与正常脾细胞组或对照组的平均瘤重之间都有非常显著性差异。图 1 表示实验 3 中各组动物的长瘤情况。

从 5 次纯种动物实验可见, 免疫脾脏细胞对 S-180 肉瘤的特异性抑制作用是十分明显的。

讨 论

本实验表明, 用移植性小鼠腹水型肝癌和实体型 S-180 肉瘤免疫的小鼠脾脏细胞, 对此两种瘤细胞在宿主中的生长有较大的抑制作用。但其作用原理尚未了解。Alexander 和 Deforme 等 (1964, 1966) 认为, 免疫淋巴细胞进入宿主体内后, 除了对宿主的肿瘤细胞可能具有直接的抵抗作用外, 还可能因其传递某种抗癌信息而激发或增强宿主对抗肿瘤的免疫反应, 从而达到抑制肿瘤在宿主体内生长的效果。Bard 和 Pilch 等 (1969, 1971) 进一步指出了免疫的脾脏或淋巴结细胞, 能够继承转移对抗肿瘤移植的肿瘤特异性移植免疫性 (Tumor-specific transplantation immunity, 简称 TSTI) 的可能性。然而, 我们的实验是将肿瘤细胞和免疫脾脏细胞混合后一起接种入宿主体内的, 所以究竟是免疫活性脾脏细胞对瘤细胞的直接杀伤, 还是间接的作用, 即在进入宿主后激发或增强了机体内在的抗癌能力, 尚应进一步探讨。

在实验中, 我们将已与免疫脾细胞混合后的瘤细胞在接种之前, 经锥虫蓝染色后于显微镜下检查, 见存活的瘤细胞尚达 95% 左右, 因此可以认为, 接种至宿主的瘤细胞并未因体外与免疫脾细胞接触而已被杀死。然而, 瘤细胞在体外与免疫脾细胞接触时有可能改变了其原有的某些生物学特性, 以致减弱了它在宿主体内生长的能力。或者, 也有可能, 免疫动物的脾脏细胞已具有潜在的抗癌免疫能力或毒性作用, 虽在体外与瘤细胞的短间接接触中未表现出明显的杀伤能力, 当其进入宿主体内后, 在括合的环境和条件下, 就发挥了对瘤细胞特异性的破坏或抑制作用。

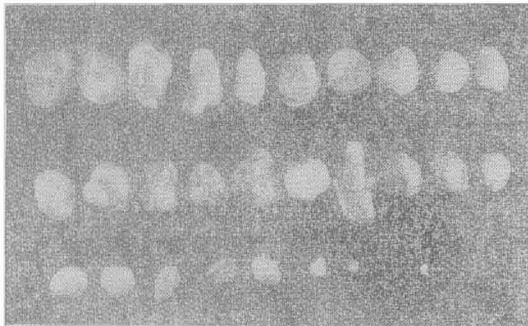


图1 免疫脾细胞抑制 S-180 肉瘤实验 3 结果
瘤大小比例为 1:2.5; 上: 对照组, 中: 正常脾细胞组, 下: 免疫脾细胞组

表 2 S-180 肉瘤抑制实验结果

组别 项 目 动物品种 实验次数		对 照 组 (C组)				正 常 脾 细 胞 组 (N组)						免 疫 脾 细 胞 组 (I组)						平均瘤重显著性测验
		实验动物数	平均体重 (克) (S. E.)	生瘤动物数	平均瘤重 (克) (S. E.)	实验动物数	平均体重 (克) (S. E.)	生瘤动物数	抑制生瘤率 (%)	平均瘤重 (克) (S. E.)	瘤重抑制率 (%)	实验动物数	平均体重 (克) (S. E.)	生瘤动物数	抑制生瘤率 (%)	平均瘤重 (克) (S. E.)	瘤重抑制率 (%)	
1	杂种	10	24.9 (±0.5)	10	3.61 (±0.54)	10	25.5 (±1.0)	9	10	1.50 (±0.54)	58.5	24.2 (±0.7)	8	20	0.40 (±0.18)	89.0	I组对C组: $t>0.01$ N组对C组: $t>0.05$ I组对N组: $t>0.05$	
2	纯种 (津白)	9	24.5 (±0.89)	9	2.16 (±0.24)	9	23.9 (±0.39)	9	0	2.32 (±0.29)	-7.4	23.5 (±0.58)	0	100	0	100	N组对C组: $t<0.05$	
3	纯种 (津白)	10	23.2 (±0.61)	10	1.35 (±0.09)	10	20.1 (±0.61)	10	0	1.14 (±0.15)	15.6	22.9 (±0.48)	7	30	0.34 (±0.22)	74.9	I组对C组: $t>0.01$ N组对C组: $t<0.05$ I组对N组: $t>0.01$	
4	纯种 (津白)	8	20.7 (±1.1)	8	1.46 (±0.19)	8	21.2 (±0.47)	8	0	2.06 (±0.22)	-41.1	20.6 (±1.1)	1	87.5	0.05 (±0)	96.6	I组对C组: $t>0.01$ N组对C组: $t<0.05$ I组对N组: $t>0.01$	
5	纯种 (津白)	16	20.5 (±0.33)	16	2.68 (±0.2)	15	18.9 (±0.53)	15	0	2.39 (±0.26)	10.8	19.3 (±0.29)	0	100	0	100	N组对C组: $t<0.05$	
6	纯种 (津白)	17	19.6 (±0.34)	17	1.72 (±0.17)	16	20.8 (±0.35)	16	0	1.41 (±0.17)	18.0	20.2 (±0.28)	0	100	0	100	N组对C组: $t<0.05$	

说明: (1) 平均体重即接种后两周取瘤时动物的平均体重; (2) 接种后两周经解剖未见长瘤者为抑制生瘤标准; (3) 瘤重抑制率 = $1 - \frac{\text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$

酶的超滤浓缩装置

中国科学院北京植物研究所 七室生化组
修 配 组

常用的“沉淀法”和“去除溶剂法 (solvent removal)”浓缩酶蛋白,由于有“相态”的变化而容易使酶变性,对于大体积酶溶液的浓缩也较困难。用各向异性膜加压超滤法 (简称超滤法),在其可筛分的范围内可进行分离并且没有“相态”的变化,这样可避免酶的变性,还可在较短时间内进行大体积稀溶液的浓缩。超滤法还具有设备简单、经济和操作方便等特点。超滤的应用范围很广,可用于蛋白质、核酸和酶的脱盐、大分子稀溶液的浓缩、分离、纯化和无蛋白培养基的制备等方面。应用在工业方面,如处理发酵液回收酶,回收干酪乳浆蛋白和大豆乳浆蛋白等,国外已处在中间试验或进入实用阶段。实验室用的超滤器及各种孔径的超滤膜已有商品出售。

遵照毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,我们自行设计、制作了超滤器和醋酸纤维素超滤膜,用于固氮酶 Mo-Fe 蛋白溶液的浓缩脱盐,效果良好。这种超滤器和超滤膜制作简单,造价低廉,在一般实验室条件下都能制作,现介绍如下。

超滤器的构造

超滤器的类型很多。我们设计的这种超滤装置 (图1)适用于实验室规模浓缩蛋白溶液,通过连续加样达到稀溶液浓缩和脱盐的目的。

超滤器由盖、筒身、筒底三部分组成 (图2,3)。为了便于焊接,盖用金属制成,盖上有加样口和连接压缩气钢瓶的进气口,通过螺旋结构和橡胶垫圈使盖和筒身之间保持密封。筒身和筒底由有机玻璃制成,筒身

管壁厚度为4毫米。筒身底部装有一硬塑料环,密封在玻璃毛细管中的铁棒 (磁搅棒) 位于此环上。滤膜、



图1 全套超滤装置

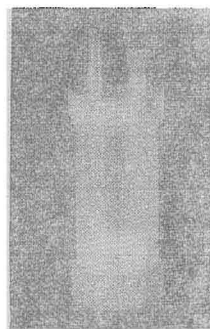


图2 超滤器

另外一个可能,瘤细胞与免疫脾细胞接种于宿主体内后,宿主有可能对此产生反应,释放出大量的巨噬细胞,后者再从免疫脾脏细胞获得某些免疫因子,使巨噬细胞有力地杀伤瘤细胞,从而达到了对瘤细胞的部分或全部的抑制。

此外,在腹水型肝癌抑制实验和 S-180 肉瘤抑制实验1中,均用杂种动物,在这些实验中,未经免疫的正常小鼠脾脏细胞也对瘤细胞的生长具有一定的抑制作用。然而,在 S-180 肉瘤抑制实验2—6的纯种动物5次实验中,其未经免疫的正常小鼠脾脏细胞却没有

抑制瘤细胞生长的能力。可能,杂种动物实验中免疫脾细胞组对瘤细胞生长的抑制,除了上述专一性作用外,还包括一部分非专一性的作用。杂种动物个体之间存在着同种异体组织抗原差异性,所以,未经免疫的正常脾脏细胞可能起着非特异性地刺激宿主免疫机构的作用。当然,由于在 S-180 肉瘤抑制实验2—6中采用的是纯种动物,它排除了同种异体组织抗原差异性的干扰作用,所以,免疫脾脏细胞对瘤细胞生长的特异性抑制作用就更加明显了。

【本文于1974年10月7日收到】