

胰 RNA 对瘤细胞作用的研究 ——抑制动物体内实体瘤及提高细胞免疫的机能

韩明爱

郑益星

崔京予 宋顺根

(延边肿瘤医院肿瘤研究室)

(延边医学院生化教研室)

(图们生化药厂)

提 要

^{125}I -胰 RNA 能参入体外培养的瘤细胞中抑制 DNA 合成而导致瘤细胞死亡。在以上实验基础上,我们又在动物体内注射胰 RNA,观察对三种 (S_{180} 、EC、 P_{388}) 带瘤小鼠的影响,其结果: (1) 抑瘤率为 68.3%。(2) 连续观察 90 天,给药组与对照组比较,两组的平均存活日数差异非常显著 ($P < 0.01$), 生命延长率为 372%。(3) T、B 淋巴细胞百分率及病理组织学变化,给药组与对照组比较都有明显差异。

在体外培养瘤细胞中进行 ^{125}I -胰 RNA 示踪实验,结果表明胰 RNA 能参入体外培养的瘤细胞核和胞质中,抑制 ^3H -TdR 参入率,导致瘤细胞死亡^[1]。根据上述,我们进一步探讨体内注射胰 RNA 对小鼠实体瘤的影响,观察了抑瘤率、生命延长率、T、B 淋巴细胞百分率以及病理组织学变化。

材 料 与 方 法

(1) 胰 RNA 注射液 系我室研制,用动物胰脏为原料,用 BDS-热酚法^[2,3]提取的一种低分子 RNA。

(2) 瘤细胞株 S_{180} 、 P_{388} 、艾氏腹水瘤细胞 (EC) 等瘤细胞株由北京中国医学科学院药物研究所、肿瘤药理研究室提供。将各瘤细胞培养 7 天接种于小鼠右侧胸皮下,形成实体瘤。

(3) 实验动物 NIH 与 DBA/2 纯系小鼠,由北京中国医学科学院实验动物中心提供。

(4) 分组与处理 选用 18—22 g 体重的 NIH、DBA/2 雄小鼠,用小鼠腹腔内接种第 7

天的三种瘤细胞 (S_{180} 、 P_{388} 、EC) 悬液即 S_{180} 与 EC 瘤细胞悬液接种于 NIH 小鼠右侧胸皮下,而把 P_{388} 瘤细胞悬液接种在 DBA/2 小鼠右侧胸皮下。第二天随机分三个观察组。每组都有对照与给药,两组各 10 只。给药组每天一次腹部皮下注射胰 RNA,连续注射 18 天,每次剂量为 100 mg/kg 体重,其体积为 0.2 ml。第一、二组的对照组注射 0.2 ml 生理盐水。第一、二组用于观察抑瘤率、生命延长率以及病理组织学变化。在第三组,用胰 RNA 注射第 7 天者作为对照组,与注射 18 天的给药组比较用于观察 T、B 淋巴细胞百分率变化。

(a) 抑瘤率 第一组接种瘤细胞后,用胰 RNA 注射 18 天,脱颈椎处死,解剖小鼠摘出实体瘤,称重量,求抑瘤率

$$\left(\frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{给药组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100 \right)。$$

对 18 天以前死者,立即摘出实体瘤,称重量,浸泡 10% 福尔马林溶液,固定实体瘤瘤块,做病理组织切片,观察病理组织学变化。

(b) 生命延长率 第二组接种瘤细胞后,用胰 RNA 注射 18 天,停药观察 90 天,求带瘤

小鼠的生命延长率 ($= [\text{给药组平均存活日数} - \text{对照组平均存活日数} / \text{对照组平均存活日数}] \times 100$)。

(c) T、B 淋巴细胞百分率 第三组,接种瘤细胞后,对照组注射胰 RNA 7 天,而给药组注射 18 天胰 RNA,以便了解胰 RNA 注射过程中的细胞免疫情况。第 8 天从对照组小鼠尾端取血做涂片,甲醛蒸气固定, α -醋酸萘酯酶染色^[4],分类和计数 T、B 淋巴细胞并求其百分率^[5]。

(d) 观察实体瘤组织的病理组织学变化。

结 果

(1) 抑瘤率 注射 18 天胰 RNA 的给药组平均实体瘤重 (0.763 ± 0.429 g), 与只注射生理盐水的对照组实体瘤重 (2.41 ± 0.397 g) 相比减少非常显著 ($P < 0.01$), 其抑瘤率为 68.3%。

(2) 生命延长率 对照组小鼠一般在 12—24 天内全部死亡。在给药组,注射胰 RNA 一周内与对照组一样其实体瘤仍然生长,注射胰 RNA 第二周后实体瘤体积开始缩小,到第三周时实体瘤逐渐消失。小鼠的皮毛有光泽而紧贴在身上,运动活泼,90 天生存者达 76.7%。连续观察 90 天的给药组平均存活日数为 72.8 ± 3.1 天,对照组的平均存活日数为 15.4 ± 4.1 天,两组的差异非常显著 ($P < 0.01$)。其生命延长率为 372%。

表 1 带瘤小鼠的 T、B 淋巴细胞百分率之比 (T/B) 的比较

小鼠编号	对 照 组	给 药 组
1	12/88	67/33
2	7/93	死亡
3	15/85	76/24
4	23/77	80/20
5	16/84	79/21
6	14/86	75/25
7	11/89	63/37
8	20/80	72/28
9	2/98	死亡
10	18/82	63/37
均 值	13.8/86.2	72.6/27.4

(3) 带瘤小鼠的 T、B 淋巴细胞百分率变化 列于表 1。

用胰 RNA 注射带瘤小鼠,第一周内,带瘤小鼠的末梢血内 T、B 淋巴细胞百分率的比变为倒值 [T/B 淋巴细胞为 13.8/86.2(%)],但注射胰 RNA 18 天后的带瘤小鼠 T/B 淋巴细胞百分率为 72.6/27.4(%),即注射胰 RNA 三周以上生存者的细胞免疫功能基本恢复正常。

(4) 把抑瘤实验后的两组瘤组织块做成病理切片,观察比较其病理组织学上的变化 (图 1—4, 见封二)。从图中可看到,给药组瘤组织细胞呈空泡样变性和液化性坏死,周围有大量的成纤维细胞、巨噬细胞和淋巴细胞增生,甚至以结缔组织代替瘤组织。

讨 论

我们曾经做过不同脏器 RNA 对瘤细胞作用的实验,结果发现制备胰 RNA 不仅回收量多,而且比其他脏器 RNA 对瘤细胞的直接杀伤效果大。也观察到胰 RNA 对 EC、S₁₈₀、P₃₈₈ 和 H₂₂ 等瘤细胞具有相同的杀伤作用,表现活性物质是具有一定二级结构的低分子 RNA。我们的实验结果表明,注射胰 RNA 对三种带瘤小鼠实体瘤的抑瘤率为 68.3%,其生命延长率为 372%。此结果表明胰 RNA 具有一定的抗肿瘤作用。有人报道外源性胸腺 RNA 能使正常细胞 (白细胞、淋巴细胞、成纤维细胞) 3H-TdR 参入率增加 3—8 倍^[6]。还有人报道核酸具有防老化作用^[7]以及干扰素诱导剂作用等。在我们的实验中,胰 RNA 除了引起带瘤小鼠瘤组织细胞的空泡样变性和液化性坏死之外,还能提高动物的细胞免疫机能。是否有可能,1) 参入体内瘤细胞的胰 RNA 参加基因重组过程,2) 胰 RNA 做为 BRM (Biological Response Modifier) 在增强机体免疫功能同时起到抗肿瘤作用,这些问题需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 韩明爱等:《生物化学与生物物理进展》, 1985, (3),

(下转第 156 页)

逆转录酶的用量。

在 50 μl 的上述体系中, 以 2 μg poly A⁺ RNA 为底物, 第一链 cDNA 产量约为 0.1 μg (产率 5%), 比放射性平均为 $2.5 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ 。cDNA 片段大小在 0.1—1 kb 之间, 大部分在 0.5 kb 左右。与以往结果比较, 产率和片段大小都明显降低, 这主要是因为 [dNTP] 用量由 1000 $\mu\text{mol/L}$ ^{[2]*} 降至 500 甚至 50 $\mu\text{mol/L}$ 所致。考虑到本实验中 cDNA 拷贝数和比放射性较片段完整性更为重要, 因此, 用这一体系制备 cDNA 探针仍然是可行的。

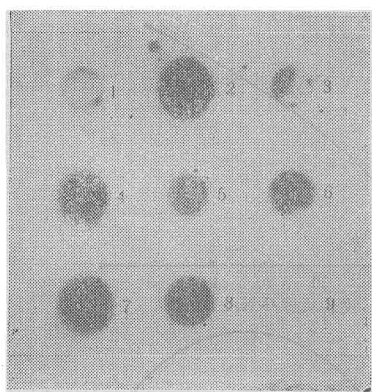


图 2 斑点杂交放射自显影图谱

cDNA 杂交探针: 热休克 T 细胞 (PHA 活化)

DNA 斑点: 1. IL2R 2. TcR- β 3. v-abl 4. v-myc
5. c-myc 6. v-fos 7. Ki-ras 8. IL2 9. Tfr

为将模板 RNA 与标记的 cDNA 探针分离, 我们分别尝试了碱处理、热变性和 RNA 酶解三种方法。结果表明 RNA 酶解最简便而有效。碱处理所得到的 cDNA 虽较纯但需中和, 手续较繁琐。加热变性后虽可获得游离的 cDNA, 但体系中大量 poly A⁺ RNA 仍可干扰杂交结果, 因此需与 RNA 酶解法联用。

用本研究体系可测得大约 10^7 细胞中基因转录本丰度的变化。根据本实验室以往的经

验^[6], 用 GITC/CsCl 超离心法制备 poly A⁺ RNA 的效率, 我们至少以 10^8 细胞作为起始材料制备探针。

本方法的局限性主要为下列两方面:

1. 只反映基因转录本数量的差别, 不能显示出基因突变或转录本长度的改变;

2. 不能准确定量: 在探针标记过程中, 除 poly A⁺ RNA 丰度外, 各种 cDNA 所含 dA 组成不同, 转录效率不同, cDNA 长度也不同, 此时含有较多 dA、cDNA 较长的探针必然带有较高的放射性使杂交自显影结果偏强。其次, 在进行放射自显影时, 未经预曝光 (pre-flash) 的 X-光胶片感光程度不完全与放射性强度成正比^[7], 而国产 X-光胶片自身本底较深难以获得良好的预曝光效果。

鉴于上述特点, 我们仅将此方法用于比较研究各类型细胞间、同一细胞经不同条件处理以及具有同类性质的基因表达的消长, 获得较满意的结果 (图 2)。

参 考 文 献

- [1] 沈翔非等:《生物化学杂志》1987, 3(2), 131。
- [2] 沈翔非等:《生物化学与生物物理进展》1986, (6), 62。
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982, 447—448。
- [4] Berent, S. T. et. al.: *Biotechnology*, 1985, May/June, 208。
- [5] Cannistaro, V. J. and Kennell, D.: *Focus* 1987, 9 (2), 11。
- [6] 沈翔非: *J. Cell. Physiol.* 1986, Suppl. 4, 35。
- [7] Laskey, R. A.: *Radioisotope Detection by Fluorography and Intensifying Screens*, Amersham International Plc., Amersham, 1984, 16—21。

[本文于 1988 年 2 月 12 日收到]

* 参考文献 [2] 第一链 cDNA 合成时 dNTP 终浓度各 1 mmol/L, 文中误为 20 $\mu\text{mol/L}$, 特此更正。

(上接第 141 页)

- 44。
- [2] Girad, M.: *Methods in Enzymology*, 1967, 12, 581。
- [3] Kirby, K.S.: *Biochem. J.*, 1956, 64, 405。
- [4] Mueller, J. et al.: *Eur. J. Immunol.* 1975, 5, 270。
- [5] Manconi, P.E. et al.: *Scand. J. Immunol.* 1979,

9, 99。

- [6] 郭焯等:《肿瘤》, 1983, 3(1), 18。
- [7] Rinse, J.: *Am. Laboratory*, 1982, 14(10), 92。

[本文于 1988 年 2 月 2 日收到]

“胰 RNA 对癌细胞作用的研究——抑制动物
体内实体瘤及提高细胞免疫的机能”一文的附图

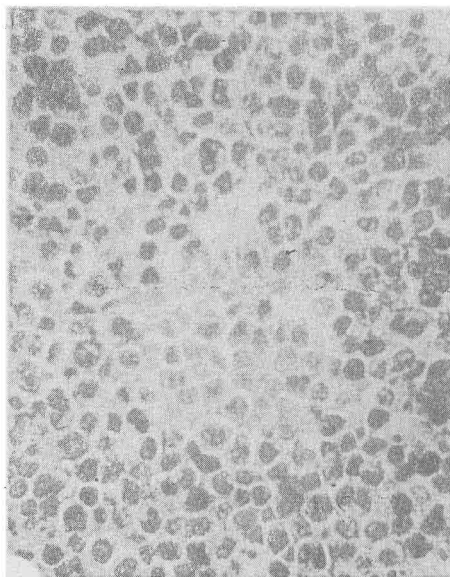


图 1 对照组
(7×40 倍)

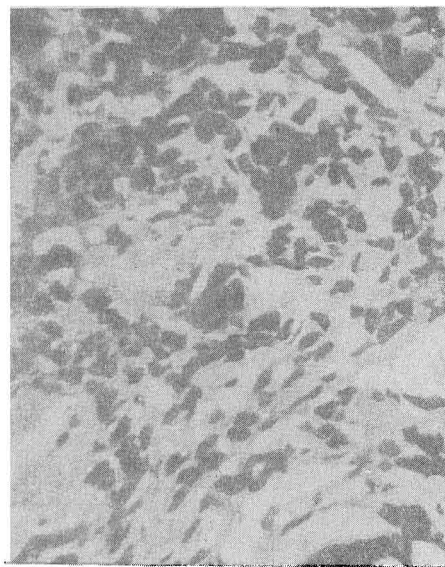


图 2 给药组
(7×40 倍)

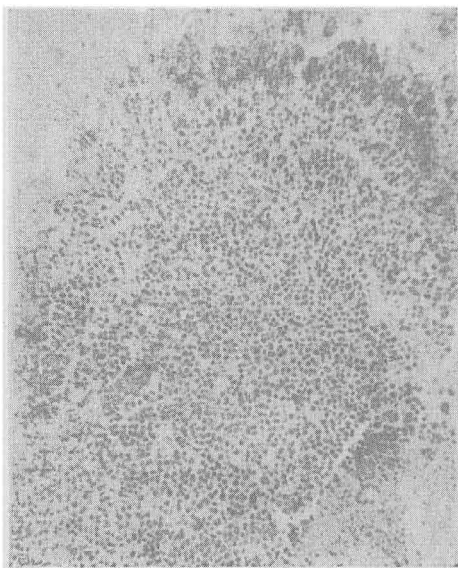


图 3 对照组
(7×10 倍)

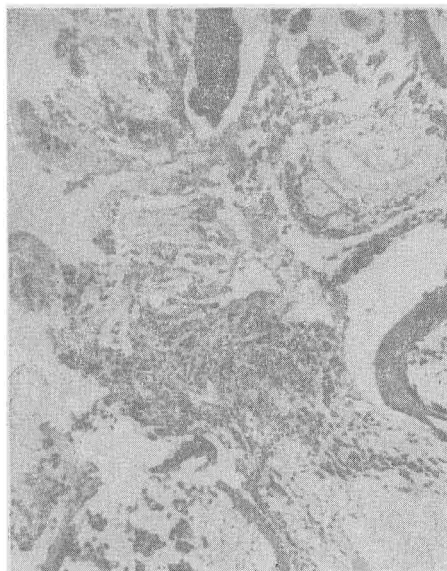


图 4 给药组
(7×10 倍)