

- 12 Baskin D G *et al.* *J Neurosci Meth*, 1986; 16: 119
13 Baskin D G *et al.* *Diabetes*, 1986; 35: 246
14 Boyd Jr F T *et al.* *J Biol Chem*, 1985; 260: 15880
15 Sherin Devaskar *et al.* In: Raizad M K *et al.* eds, *Insulin, insulin-like growth factors, and their receptors in the central nervous system*, New York: Plenum Pres, 1987: 131
16 Yip C C *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1980; 96: 1671
17 Rees-Jones R W *et al.* *J Biol Chem*, 1984; 259: 3470
18 Heidenreich K A, Brandenburg D. *Endocrinology*, 1986; 118: 1835
19 Kim A Heidenreich. *Receptor Biochem and Methodol.* 1988; 12A: 281
20 Ullrich A *et al.* *Nature* (London). 1985; 313: 756

一种新的淋巴因子——白细胞调节素

陆承荣* 丰美福

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

提 要

白细胞调节素能直接特异地防止细胞癌变, 抑制癌前细胞及癌细胞的生长, 溶解癌细胞, 增强癌细胞对自然杀伤 (NK) 细胞的敏感性, 在医学临床上具有重要意义。文章详细介绍了白细胞调节素不同于干扰素、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、和自然杀伤细胞毒因子, 及其近年来的研究进展。

关键词 白细胞调节素, 淋巴因子, 癌细胞

1 白细胞调节素的生化特性

人淋巴因子制剂能直接溶解或抑制人肿瘤细胞, 提高人肿瘤细胞对自然杀伤 (NK) 细胞的细胞毒作用的敏感性^[1]。从前这些抗肿瘤的活性皆归于淋巴毒素 (LT) 的作用。然而, Ransom 等 1985 年研究证明这些抗肿瘤活性主要是由一种新的淋巴因子所产生。因为它是由淋巴细胞产生, 并能调节靶细胞的生理和生长功能, 所以命名为白细胞调节素 (leukoregulin; LR)^[2]。经过高效液相层析, 等电聚焦分离出的 LR, 不含可测的 LT, 干扰素 (IFN), 白细胞介素 1 和 2 (interleukin 1, 2, IL1, IL2), 并且不含激活巨噬细胞的活性^[1,2]。用线性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶过滤测得 LR 的表现分子量为 135000, 有两个等电点, 分别为 pH5.7 和 pH7.3。经过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 LR 解离分子量为 32000^[3]。

用高效液相色谱 (HPLC) 和等电聚焦 (IEF) 分离人外周血淋巴细胞 (PBL) 的淋巴

因子制剂, LT 活性分布于高、中、低分子量的组分中, 活性富集在 pH6.0—6.8 范围内。而 LR 仅存在于高分子量组分中, 并且大部分 LR 的等电点在 pH5.0—5.8, 一小部分的等电点在 pH7.1—8.3。所有 IL1, IL2, 和 IFN 的活性则主要存在于低分子量组分中。所有分离组分中检测不出激活巨噬细胞的活性。

此外, 通过对淋巴因子溶解 α -L929 细胞的活性及抑制人肿瘤细胞 K562 生长活性的检测, 和通过对唾液酸苷酶和蛋白酶消化作用敏感性的检测进一步证明白细胞调节素是不同于 LT 的新淋巴因子。0.2 和 0.4 单位的唾液酸苷酶分别能使 LT 的活性减少 49% 和 92%, 但对纯化的 LR 活性无显著抑制作用^[4]。LR 和 LT 的活性均可受蛋白酶抑制, 但抑制程度不一样。6 单位链霉蛋白酶足以完全消化 LT 溶解 α -L929 细胞的活性, 但处理 LR 后, 仍保留该样品的 52% 的抑制 K562 细胞的活

* 现工作单位: 空军总医院基础实验室

收稿日期: 1991-01-18 修回日期: 1991-04-12

性^[1]。可见,链霉蛋白酶可消化除去 LR 样品中的 LT。

2 白细胞调节素独特性的证据

Michael V. Doyle 等对 Ransom 关于 LR 的报道曾持否定态度。他们认为 LR 不大可能是一种新的淋巴因子,相反,它的功能似乎是由于部分纯化的样品中存在低水平的 γ -IFN 与少量的 LT 或 TNF 相互协同作用的结果^[3]。但是,Michael V. Doyle 选用来检测的靶细胞是有限的,他们仅选用了 H2—29 和 WIDR,而这二种细胞株恰恰又对复合淋巴因子的协同作用高度敏感^[3]。另外一些细胞株,如 RPMI 2650, K562, CEM 和 MOLT-4 等则对 LT、IFN 及其协同作用就不敏感,而对 LR 的作用敏感^[2,4],这也间接证实了 LR 是确实存在的,这一点在抗体中和实验中也得到充分说明。

T. J. Sayers 和 J. H. Ransom 研究发现,来自淋巴细胞——肿瘤细胞的培养上清(TLS)对肿瘤细胞的生长有高度的抑制作用,并且这种作用的范围及其特征与 LR 十分相似,而与 LT、TNF、IFN 或自然杀伤细胞毒因子(NKCF)十分不同。重组 LT (γ -LT),重组 TNF (γ -TNF) 和重组 IFN (γ -IFN) 制品及其特异性抗体的产生,使得人们有可能研究释放在 TLS 中的一系列因子。研究结果表明: K562 对 TLS 和 LR 的生长抑制作用非常敏感,而对 γ -LT 和 γ -TNF 有抵制作用^[5]。相反 α -L929 对微量的 γ -LT 或 γ -TNF 十分敏感,而对 TLS 或 LR 有相应的抵制作用^[5]。为了扩展这些研究, Sayers 和 Ransom 用 TLS, γ -LT, γ -TNF 和 LR 对一系列肿瘤靶细胞: K562, α -L929, MOLT-4, MBL-2, YAC, RAJI 进行试验,结果发现大多数细胞株对 LTS 和 LR 的生长抑制作用敏感,而对 γ -LT, γ -TNF 有抵制作用^[5]。

TLS 中通常会含有一些 IFN,但量很少(约 10—50U/ml)。然而,即使含量很高,在生长抑制测定中,也未显示其作用。接下来的

问题是 IFN 能否与其它细胞因子(cytokins)发生相互协同作用,为了检查这种可能性,在 TLS 中加入抗 IFN- α 和抗 IFN- γ 的抗体,结果并不能抵消 TLS 的生长抑制活性,但确实抑制了一定的 IFN 的活性^[5]。用 LT(TNF- β) 或 TNF (TNF- α) 的单抗处理 TLS 或 LR,并不影响它们的生长抑制效应^[5],这表明 TLS 或 LR 的活性确非由于 LT 或 TNF 的存在,也不是由于低水平的 LT 或 TNF 与其它淋巴因子相互协同作用的结果。另外一个问题是 TLS 既能表现细胞抑制又能表现细胞毒效应,而 NKCF 也有此特性^[5]。已有报道 mannose-PO₄ 和粒细胞溶素抗体这两种试剂皆能抑制 NKCF 的活性^[5],但用这两种试剂处理 TLS 和 LR 均不能对之产生影响,这也排除了 TLS 和 LR 的生长抑制活性是由 NKCF 贡献的可能性。

LR 不仅能直接溶解或抑制人肿瘤细胞的生长,而且能增强人肿瘤细胞对 NK 细胞的敏感性^[5,6,7]。K562 与 LR 一起培养 5min 就可增强对 NK 细胞毒性的敏感性^[6],这种作用 2h 后达高峰,敏感性可提高 2 倍左右,且是短暂可逆的^[6]。LT 和 IFN 无此增强作用。并且 IFN 与 LR 相反,可使癌细胞对 NK 的敏感性降低,但它可激活 NK 细胞^[1,6]。

3 白细胞调节素的作用机理

Ransom 等用流式细胞仪检测了 LR 的作用机制^[8,9,10]。他们用 propidium iodide 和荧光素二乙酸盐(Fluorescein diacetate, FDA)测定了 K562 细胞膜通透性的变化。当 K562 暴露于 LR 时,在最初 6h 内,观察到胞内 FDA 减少,同时 propidium iodide 增加,这表明细胞膜的通透性增加了^[8,9,10]。若使用荧光标记的植物血凝素结合于癌细胞,LR 作用后会出荧光素的去极化现象^[9],这表明 LR 能改变癌细胞的表面构象,而 γ -IFN 不能引起细胞表面结构或质膜通透性的任何变化^[1]。LT, IL 或 IFN 对细胞表面结构或膜通透性均未观察到任何变化。

H. E. Charles 等实验表明^[11],当 K562 暴露于 LR 和抑瘤抗菌素 (doxorubicin) 中,LR 能使 K562 对抑瘤抗菌素的摄入量增加,在 15—16min 内增加 2—10 倍。可见 LR 使细胞膜通透性增加伴随着肿瘤细胞对肿瘤代谢抑制剂摄入量的增加。

另外肿瘤细胞膜通透性的增加还伴随着胞内 Ca^{2+} 浓度的增加。有趣的是 Ca^{2+} 通道阻断剂及 Ca^{2+} 转运抑制剂 (nifedipine 和 verapamil) 并不能抑制 LR 的作用^[11]。而且 LR 作用于靶细胞引起离子通道打开的机制也不同于由淋巴细胞产生的能增加膜导电性的细胞毒性因子^[9]。

有关 LR 增加胞内 Ca^{2+} 浓度和质膜通透性,引起靶细胞抑制作用,C. B. Susan 等设想^[12] LR 首先结合到靶细胞膜的受体上,导致胞内 Ca^{2+} 浓度的增加,并激活了与膜有关的蛋白激酶 C 与蛋白质磷酸化作用,再激活一系列的级联反应,导致质膜通透性增加,接着发生细胞生长的抑制。有关方面的研究正在进一步深入开展。

现在看来, Ca^{2+} 在淋巴因子和细胞毒 T 淋巴细胞 (Tc) 的作用机制方面担任重要角色^[13]。LT, NK 和 Tc 的细胞毒性作用,细胞溶素和穿孔蛋白 (perforin) 的细胞毒性作用,依赖 T 细胞的靶细胞溶解作用均依赖 Ca^{2+} 的存在。当缺少胞外 Ca^{2+} 时,LR 使膜通透性增加的能力降低,如果增加胞外 Ca^{2+} 到 1mmol/L,则又恢复到原来的水平。LR 增加膜通透性的作用方式不同于 PHA 和 Ca^{2+} 离子载体 A23187。膜

通透性的变化与细胞增殖的抑制作用有直接的关系。LR, PHA 和 A23187 均能增加 K562 细胞膜的通透性,抑制细胞增殖。PHA 及 A23187 对细胞增殖的抑制作用不可逆,LR 这一作用则是可逆的。PHA 的作用不依赖于胞外 Ca^{2+} 。A23187 则完全依赖于胞外 Ca^{2+} 。LR 不完全依赖胞外 Ca^{2+} ,如果 LR 浓度高,胞外 Ca^{2+} 的影响将减弱^[13]。

LR 作为一种分子实体确实存在,由于它能直接特异地防止细胞癌变,抑制癌前细胞及癌细胞的生长,溶解癌细胞,增加癌细胞对 NK 细胞的敏感性,所以在医学临床上具有重要意义^[14,15,16,17]。自 1985 年 Ransom 发现以来,这方面的研究进展较快,但是有关 LR 的作用机理等方面仍有许多问题需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Ransom J H *et al. Cancer Res*, 1985; 45: 851
- 2 Ransom J H *et al. Fed Proc*, 1986; 44: 3217
- 3 Michael V Doyle *et al. Cancer Res*, 1987; 47: 914
- 4 Ransom J H. *Cancer Res*, 1987; 47: 914.
- 5 Thomas J S *et al. J. Immunol*, 1986; 137(1): 385
- 6 倪建等. 国外医学——免疫学分册, 1987; 10(5): 225
- 7 Susan C B *et al. Cancer Immunol Immunother*, 1989; 30 (2): 86
- 8 Susan C B *et al. Cancer Res*, 1986; 46: 2686
- 9 Randall E M *et al. I. Neuroimmunol*, 1986; 13: 31
- 10 Charles H E. *Fed Proc*, 1986; 44: 3216.
- 11 Evans C. H *et al. J. Natl Cancer Inst*, 1988; 8(11) 861
- 12 Susan C B *et al. Clin Exp Immunol*, 1988; 73: 505
- 13 Susan C B *et al. J Cell Biochem*, 1990; 43: 89
- 14 Ransom J H *et al. Fed Proc*, 1985; 44: 1864
- 15 倪建. 中国免疫学杂志. 1988. 4(2): 77.
- 16 Evans C B *et al. UCLA Sym Mol Cell Bio, New Ser*, 1989; 100: 315
- 17 倪建等. 国外医学——免疫学分册, 1987; 10: 72—76