

肿瘤免疫 RNA 的体外实验研究¹⁾

上海第一医学院

生物物理教研组

生物化学教研组

一、引言

机体的免疫状态,尤其是细胞免疫能力的强弱与肿瘤的发生发展有密切关系。采取各种措施增强机体的抗肿瘤免疫性,对提高肿瘤患者的治疗效果有着重要意义。大量研究表明,不仅给予肿瘤免疫动物的淋巴细胞可将特异移植免疫反应传递给未曾处理的动物^[1],而且输入从肿瘤免疫动物淋巴样组织中抽提的 RNA 或经该 RNA 孵育的脾细胞,也同样能使动物获得抗该肿瘤的免疫性^[2,3]。L. L. Veltman 报道,正常人的淋巴细胞如用入胃腺癌免疫动物的淋巴样组织中抽提的 RNA 处理,就获得杀伤胃癌细胞的能力。

我们的实验研究表明,通过小白鼠胆管型肝癌(腹水型)[HCA]免疫豚鼠的免疫 RNA 能将致敏豚鼠对 HCA 的免疫反应传递给正常豚鼠淋巴样细胞。

二、实验材料与方法

1. 动物的免疫

肿瘤 小白鼠胆管型肝癌(腹水型)[HCA]。取腹腔接种一周左右的小鼠,从腹水中分离瘤细胞,用生理盐水洗三次,混悬于生理盐水中,计数并调节至一定浓度。

动物 豚鼠,雌性,400 克左右。

致敏 HCA 细胞(10^8 个/毫升)与等体积完全 Freund 佐剂研匀呈乳剂状。豚鼠右侧大腿肌肉注射 0.4 毫升,腹壁皮下二处各 0.3 毫

升。

加敏 HCA 细胞的生理盐水悬液(10^7 个/毫升)腹腔 0.1 毫升,腹壁皮下二处各 0.1 毫升,胸部皮下 0.2 毫升。二周一次。

免疫过程三个月。免疫动物供提取免疫核酸及制备致敏动物腹腔渗出细胞用。

2. 免疫核酸之提取

RNA 提取方法按 K. Sherrer 和 J. Darnell 方法略作修改,具体操作如下:

经 HCA 免疫之豚鼠杀死后立即取出脾脏、肠系膜淋巴结和腹股沟、膝腘窝、腋下之淋巴结于干冰中冷冻,淋巴组织与缓冲液(0.01M 醋酸钠, pH 5.0, 含 0.5% 硫酸十二酯钠及 0.5 毫克/毫升皂土)、等体积酚(90% 酚, 0.1% 8-羟喹啉)一起捣碎制成匀浆,匀浆经 55℃ 加热 4 分钟,在干冰-乙醇混合物中迅速冷却到 10℃, 2,000 rpm 离心 20 分钟。吸出水相,合并两次所得之水相,水相重复用酚处理三次,用 2.5M NaAc 调节盐浓度到 0.3M, 加三体积冷乙醇,放置过夜,离心可得 RNA 沉淀,此沉淀溶于 0.01M 醋酸钠纯化 1—2 次,在乙醇中低温保存。使用时于 Earle 氏溶液中溶解。

此法提得之核酸在 260 毫微米附近有一特征吸收峰, $O.D. 260/O.D. 230 > 2$, $0.5 > O.D. 280/O.D. 260 > 0.45$ 。得率约为 2 毫克/克淋巴组织。

3. 移动抑制试验

1) 本工作得到本院病理生理教研组和肿瘤医院内科实验室的大力协助和支持,在此表示感谢。

实验前 3—4 天取雌性重 400 克的豚鼠于腹腔注入 20 毫升无菌石蜡油。实验时击毙动物,用 100 毫升 Hank 氏液将腹腔内石蜡油和渗出物(主要为巨噬细胞及淋巴细胞)一起洗出,1,500 rpm 离心 15 分钟,得细胞,此细胞用 Hank 氏液反复洗两次,稀释成 10% 细胞悬液。将此细胞悬液装于直径 1 毫米,长 7 毫米一端封闭的毛细管中,经 1,000 rpm 达速后 5 分钟离心,在细胞与介质交界处截断,取细胞端,用凡士林固定于移动抑制试验小室中,小室中加满培养液后在 37℃ 培养 20 小时,然后观察细胞向毛细管外移动的情况,记录毛细管外细胞移动的面积。致敏淋巴细胞遇到相应抗原时,释放移动抑制因子,抑制细胞移动使毛细管外细胞移动面积变小,抑制程度用移动指数表示。

移动指数 $MI = \frac{\text{在某一抗原介质中的移动面积}}{\text{在无抗原介质中的移动面积}} \times 100\%$

移动指数越小表示抑制程度越大。

4. 免疫核酸过继 HCA 抗原制备

过继 正常雌性成年豚鼠腹腔渗出细胞 10^8 个/毫升,免疫核酸 700—1,000 r/毫升,在 Earle 氏液中 37℃ 温育 20 分钟,并缓慢摇动,然后在 Hank 氏液和培养液中各洗一次配成 10% 细胞悬液作移动抑制试验。

抗原制备 取 HCA 细胞用生理盐水洗三次,制成 50% 细胞悬液,在干冰-乙醇混合物中冷冻,在 37℃ 水浴中融化,反复三次,离心,取上清液冰冻干燥储存。用 Folin-酚法测定蛋白量作抗原浓度指标。

培养 由 Hank 氏液中加 0.5% 水解乳蛋白及 20% 小牛血清组成,含青霉素 1 万 u%,链霉素 0.01 克 %。

三、实验结果

1. HCA 免疫豚鼠腹腔渗出细胞的免疫活性试验

正常豚鼠腹腔渗出细胞分为两组,一组在无抗原的培养液中培养,一组在加抗原的培养液中培养,每组有 4 根毛细管。HCA 免疫豚鼠

腹腔渗出细胞也分成同样的组进行试验。

实验结果见表 1,在第一、第二次实验中,比较正常动物渗出细胞在加抗原及不加抗原情况下的移动面积,可见变化不大,移动指数为 90%,100.4%, t 测验差异不显著,而免疫动物腹腔渗出细胞在加抗原及不加抗原情况下的移动面积变化较大,移动指数为 39.6%、68.3%, t 值分别为 2.77 和 3.93, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,差异显著或非常显著。

表 1 HCA 免疫豚鼠腹腔渗出细胞的免疫活性试验结果

实验	介质动物	培养液		培养液加抗原		移动指数 MI	显著性测验
		移动面积	平均	移动面积	平均		
1	正常	11,695	14,842	11,040	13,363 (50 r/毫升)	90.0%	$P > 0.05$
		15,800		13,560			
		17,500		15,590			
		14,375					
2	致敏	6,100	9,780	2,840	3,876 (50 r/毫升)	39.6%	$0.05 > P > 0.01$
		10,240		4,490			
		13,210		4,300			
2	正常	6,965	7,188	7,635	7,228 (40 r/毫升)	100.4%	$P > 0.05$
		7,765		7,320			
		6,490		6,950			
		7,530		7,385			
2	致敏	5,495	5,396	3,355	3,688 (40 r/毫升)	68.3%	$0.01 > P > 0.01$
		5,285		3,355			
		5,875		3,925			
		4,930		4,115			

注 1) 表中面积单位是平方毫米

2) 实验 1 移动面积是实际面积的 6,889 倍,实验 2 是实际面积的 1,156 倍

2. 经免疫 RNA 过继之腹腔渗出细胞的免疫活性试验

一只正常豚鼠腹腔渗出细胞分为二组:一组细胞经免疫核酸温育后作移动抑制试验称为过继组,另一组细胞在 Earle 氏液中温育后作移动抑制试验称为对照组。

三次实验结果见表 2。比较在一次实验中正常动物渗出细胞在加抗原或不加抗原情况下的移动面积,可见变化不大,移动指数为 102.2%,113.2%,92.9%, t 测验差异不显著,经免疫核酸温育的腹腔渗出细胞在无抗原的条

表 2 经免疫 RNA 过继的豚鼠腹腔渗出
细胞的免疫活性试验结果

实验	介质 细胞	培养液		培养液加 抗原		移动 面数 MI	显著性 测验
		移动 面积	平均	移动 面积	平均		
1	对照	2,910 2,355 2,915 3,135	2,829	2,095 2,985 3,225 3,265	2,893 (66r/ 毫升)	102.2%	$P > 0.05$
	过继	2,935 3,600 3,110 3,265	3,228	2,020 1,605 1,840 1,740	1,801 (66r/ 毫升)	55.8%	$P < 0.001$
2	对照	4,655 4,030 2,435 3,610	3,683	4,480 3,950 3,020 5,225	4,169 (62r/ 毫升)	113.2%	$P > 0.05$
	过继	3,565 3,530 3,215 3,095	3,351	845 1,230 1,930 2,465	1,618 (62r/ 毫升)	48.3%	$0.01 > P > 0.001$
3	对照	9,185 9,195 9,410 8,060	8,963	7,625 8,915 8,845 7,935	8,330 (103r/ 毫升)	93.1%	$P > 0.05$
	过继	9,520 8,425 9,985 10,075	9,501	8,145 8,445 7,795 7,410	7,948 (103r/ 毫升)	83.8%	$0.05 > P > 0.01$

注：面积单位是平方毫米，移动面积为实际面积的 1,156 倍。

件下移动面积与正常动物渗出细胞组差不多，一般稍大些，差异是不显著的，但在加抗原时移动面积明显变小。移动指数分别为 55.8%、48.3%、83.8% 相应 P 值为 $P < 0.001$ 、 $0.01 > P > 0.001$ 、 $0.05 > P > 0.01$ ，表现出显著差异或非常显著差异。

四、讨 论

肿瘤免疫核酸的体外移动抑制试验清楚地表明用上述方法提取的免疫核酸具有免疫学活性，能使正常非免疫动物的淋巴样细胞变成活性淋巴细胞。

免疫核酸免疫学作用的强弱与免疫所用的肿瘤的抗原性，免疫动物类型和免疫时间有关，还和免疫核酸的剂量有关。我们在实验中观察到最好用成年动物。幼年豚鼠易造成免疫耐受。免疫时间约 3 个月，免疫时间太短，转移免疫能力也弱。体外过继时所用免疫核酸的剂量有人用空斑形成试验测定斑形成细胞，发现非免疫脾细胞变成斑形成细胞数是免疫 RNA 量的函数，免疫核酸浓度为 500r/毫升时空斑形成细胞数最多，小于该浓度，作用不显著，大于该浓度，空斑形成细胞数并无明显增加。我们实验中所用免疫 RNA 浓度是 500—1,000r/毫升。

目前关于免疫核酸的免疫学作用有二种假设，一种假设为免疫 RNA 起佐剂作用，RNA 与抗原形成抗原-RNA 复合物，具有免疫原性，参与免疫反应；第二种假设认为肿瘤特异性抗原的信息储存于免疫淋巴细胞的 RNA 中，免疫 RNA 作为一个信使，将免疫信息转递给淋巴样细胞，使其变成活性细胞^[4]。“信使”的观点为多数学者所支持，RNA 提取物的活性可被 RNase 所抑制，如果免疫 RNA 事先用 RNase 处理，则免疫 RNA 失去其转移免疫的能力，而胰蛋白酶、蛋白水解酶、淀粉酶及 DNase 等均不影响免疫 RNA 免疫活性，这些都说明保持免疫 RNA 的完整性是其作用所必需的。

近年来免疫核酸在临床肿瘤治疗中的应用陆续有所报道，例如 L. L. Veltman 1974 年用人胃腺癌免疫动物的淋巴样组织的免疫核酸能使正常人淋巴细胞在体外具有杀伤胃癌细胞能力；T. Han^[5-7] 1973 年起每年都报道对非肿瘤抗原呈阳性皮肤反应的正常人和何杰金氏病患者外周血液淋巴细胞的免疫 RNA，能使一些对相应抗原皮试阴性的肿瘤患者转阳；Y. H. Pilch^[8] (1975) 用自身同种肿瘤免疫动物的淋巴样组织的免疫 RNA 治疗肿瘤患者，获得显著疗效。这些报道和我们自己的工作都为免疫核酸在肿瘤治疗中的应用提供了依据。

肿瘤的免疫核酸治疗可以通过输入经免疫核酸过继的活性淋巴细胞，又可以直接皮内给药。据报道，肿瘤免疫核酸对机体局部和全身

蜗牛酶的制备和对酵母细胞壁的作用

中国科学院生物物理研究所三室

1974年本刊第1期曾将蜗牛酶的制备方法做过简单介绍,几年来相继收到许多单位来信或来访索取详细资料,为此我们把有关蜗牛酶的制备方法及其酶对酵母细胞壁的溶解作用等方面的内容刊登出来,供有关科技人员参考。

——编者——

蜗牛酶是存在于蜗牛消化液中的一类混合酶。其中包括纤维素酶、蛋白水解酶、果胶酶等二、三十种。它能溶解酵母和植物的细胞壁。1922年J. Giaja首先从大蜗牛(*Helix pomatia*)中制备了这种混合酶。近十年来,蜗牛酶作为溶解细胞壁的工具越来越广泛地用于细胞生物学的研究。例如用蜗牛酶溶解酵母细胞壁从中提取线粒体,用它处理植物细胞,去其细胞壁以便使细胞间能相互融合,从而培育成一个新的完整的杂交植株^[1]。

近年来我们从海南岛采集的褐云玛瑙螺(*Achatina fulica* Férussac)和广西灵山采集的环口螺(*Cyclophorus pyrostoma* Moellendorff)的消化液中制备了一批蜗牛酶,并进行了初步实验,现将结果简述如下。

一、蜗牛酶的制备

制备过程基本按Fogel等方法^[2,3]。蜗牛饥饿二天后,用水冲洗干净,轻轻敲碎外壳并小心

剥去。然后顺消化道剪开体壁剥离出消化道,从素囊和胃里抽出红棕色的消化液,每只褐云玛瑙螺平均可抽得1—1.5毫升,在0—5℃下离心(10,000转/分)10分钟。上清液经四号细菌漏斗过滤,滤液预冷到-20℃后进行真空干燥。此时蜗牛酶呈棕褐色,磨成粉末后分装于安瓶中。抽气封管,并在低温下保存。一毫升褐云玛瑙螺消化液中平均可得到100—130毫克干重蜗牛酶。100毫克干重蜗牛酶平均含蛋白质80—90毫克。

将褐云玛瑙螺和环口螺制备的蜗牛酶进行比较。两者的活力基本相似。

二、蜗牛酶对酵母细胞壁的溶解作用

1. 酵母的培养

实验所用酵母菌株都来自中国科学院微生物研究所。

都未见到有毒性作用,而且可以突破种系界线,利用免疫动物,大量提取免疫核酸,也没有输入异体细胞在体内迅速被破坏的缺点。为了提高治疗效果,避免肿瘤组织中存在组织抗原的影响,是否可通过纯化肿瘤抗原来免疫动物,得到专一的肿瘤免疫核酸来实现,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Delorme, E. J. et al.: *Lancet*, 2, 117, 1964.

- [2] Alexander, P. et al.: *Nature*, 213, p. 569, 1967.
[3] Pilch, Y. H. et al.: *Cancer*, 26, 630, 1970.
[4] Peter, J. et al.: *Cancer*, 4—6, p. 1219, 1971.
[5] Han, T.: *Clin. Exp. Immunol.*, 14, p. 213, 1973.
[6] Han, T.: *Cancer*, 33, 493, 1974.
[7] Han, T. et al.: *Immunology*, 28, p. 127, 1975.
[8] Pilch, Y. H. et al.: *Proceedings Sixty-Sixth Annual Meeting of the Amer. Asso. Cancer Res.*, 10, March, p. 238, 1975.

[本文于1977年12月5日收到]