

正常牛胰 RNA 对 Ehrlich 腹水癌细胞的抑制和杀伤作用

芮钟福 韩明爱

郑益星

(延边卫生学校生理病理室)

(延边医学院生化教研室)

近年来,人们已开始把各种外源性核酸用于生物体,例如,免疫核糖核酸^[1]以 mRNA 的作用来增加淋巴细胞的免疫活性,释放淋巴毒素,杀伤瘤细胞;淋巴组织的双股 RNA^[2,3]对瘤细胞有一定毒性并抑制其生长,还有淋巴组织 RNA^[4]不介导淋巴细胞而直接杀伤瘤细胞等。

我们曾在外源性 RNA 对 EATC 形态变化的影响实验中发现,与脑、胸腺、脾淋巴结等组织 RNA 相比,胰脏 RNA 更显著地抑制 EATC 的生长,并有改变其形态的作用。不仅如此,胰 RNA 的收获量也比其他任何组织多。在此基础上,本文进一步观察了¹²⁵I-标记的牛胰 RNA 在瘤细胞中的分布、牛胰 RNA 对³H-TdR 掺入瘤细胞核内即 DNA 合成率的影响以及对瘤细胞的染液排斥能力。

一、材料与方 法

1. 瘤细胞株 以小鼠 Ehrlich's 腹水癌细胞腹腔接种后第七天的为实验材料。

2. ¹²⁵I-牛胰 RNA 中国科学院北京原子能研究所标记。比度 8.6 μ Ci/ μ gRNA, 浓度 3.0 μ Ci/ μ l。

3. ³H-TdR 中国科学院北京原子能研究所产品。比度 17—25Ci/m mole, 浓度 1 μ Ci/ μ l。

4. 牛胰 RNA 提取物 用 pH 5 热酚法^[5]由正常新鲜牛胰中提取 RNA, A260/A280。A260/A230 比值均大于 2.2。3% 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明提取物含有 4S、5S、18S、28S 的混合物;在 6—18S 之间有多条微量带(图 1)。蛋白质含量 <2% (Lowry 法), DNA 含量 <4% (二苯胺法), 需气菌、厌气菌、霉菌培养均呈阴性。过敏实验后豚鼠的体征均未发现任何异常反应。

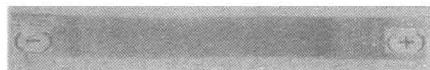


图 1 正常牛胰 RNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带

5. ¹²⁵I-牛胰 RNA 透入检查(放射自显影) 在含有 4.5×10^6 /ml EATC 的 Eagle 培养液(含 10% 小牛血清、0.1% 双抗菌素)中,加 ¹²⁵I-牛胰 RNA 至 2 μ Ci/ml,最终体积为 2ml。37℃ 温育 24 小时,离心(1500rpm 5 分钟)收集,用生理盐水洗三次后,将细胞制成涂片,晾干、Carnoy 液固定、干燥。将核-4 乳胶用去离子水 1:1 稀释,加温 40℃ 融化,调匀,以浸膜法涂布各片,干后在 4℃ 曝光 8 天。用 D-19b 在 19℃ 显影 2 分钟、用 F-5 定影 7 分钟,洗净及干燥后经 H、E 染色,镜下观察细胞 200 个,以含有 10 颗以上银粒的细胞作为受标记者。

6. ³H-TdR 掺入实验[放射自显影] 分实验组和对照组。在两组培养瓶内各加 Eagle 培养液和 EATC,细胞最终浓度为 4.5×10^6 /ml。在对照组内加生理盐水,在实验组中加牛胰 RNA 至 200 μ g/ml。各培养液体积为 2ml。经过不同时间(3、6、12、24 小时)的温育后,向两组培养瓶内各加 ³H-TdR,使最终放射性浓度为 2 μ Ci/ml。继续温育 1 小时,经离心后将细胞制成涂片、干燥、固定,在暗室中涂布核乳胶、过夜干燥、曝光 15 天、显影、定影、水洗、H、E 染色,在镜下观察细胞 200 个,以含有核内 5 颗以上银粒的细胞作为 ³H-TdR 掺入者,求 ³H-TdR 掺入率。

7. 台盼蓝染液排斥实验 分实验组和对照组。各实验组在不同 RNA 浓度(3500 μ g/ml、350 μ g/ml、200 μ g/ml、100 μ g/ml、10 μ g/ml)和不同作用时间(3、6、12、18、24 小时)下,将牛胰

RNA 与 EATC ($4.5 \times 10^6/\text{ml}$ -Eagle 培养液) 共温育。把瘤细胞制成悬液, 置于血球计算盘上, 加入 0.04% 台盼蓝-0.05 M Tris-HCl (pH 7.4) 的生理盐水稀释, 在镜下观察瘤细胞具有排斥台盼蓝染液的能力作为细胞存活或死亡的指标, 并算出瘤细胞存活数目和存活率。瘤细胞的形态也作了观察。

二、结 果

1. ^{125}I -牛胰 RNA 在 EATC 内分布 从自显影像上可见牛胰 RNA 主要分布在瘤细胞的核和胞浆内(图 2), 标记率为 $56.8 \pm 6.72\%$ 。

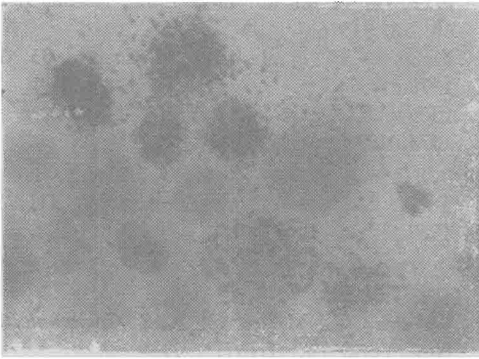


图 2 ^{125}I -牛胰 RNA 在 EATC 内的分布

2. 瘤细胞核内 ^3H -TdR 的掺入 随着牛胰 RNA 作用时间的延长实验组瘤细胞 ^3H -TdR 掺入率比对照组显著降低。

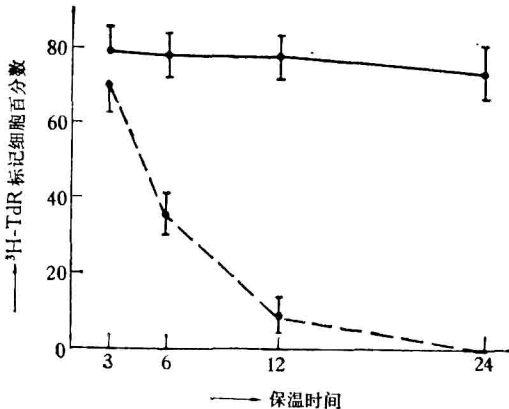


图 3 牛胰 RNA 对 EATC ^3H -TdR 掺入的影响曲线
(保温液含牛胰 RNA $200\mu\text{g}/\text{ml}$)
对照组—— 实验组-----

如图 3 所示, 在牛胰 RNA 作用下, 瘤细胞的 DNA 合成率降低。保温 6 小时, ^3H -TdR 掺入率比对照显著降低, 实验组和对照组标记率的比值为 0.46, 有非常显著差异 ($p < 0.001$)。到 24 小时见不到 ^3H -TdR 掺入瘤细胞的现象, 与对照相比有非常显著差异 ($p < 0.001$)(图 4)。这种结果表明, 牛胰 RNA 抑制 EATC 的 DNA 合成、复制及生长。

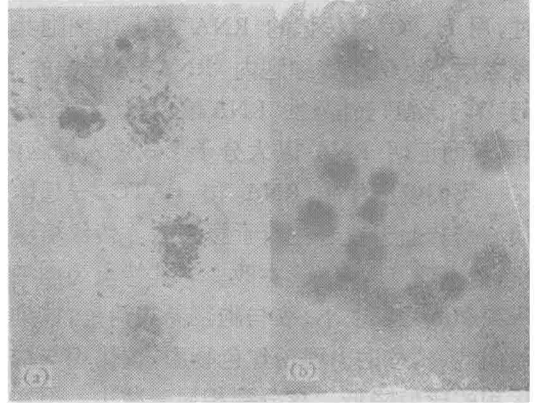


图 4 EATC 内 ^3H -TdR 掺入后的形态($\times 700$)

a. 对照组 b. 实验组

3. 台盼蓝染液排斥实验 不同浓度的牛胰 RNA 作用于瘤细胞, 经不同时间后, 在 $100-3500\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内瘤细胞的存活数和存活率都比对照组低。而且, 随着作用时间的延长和浓度的加大, 差异更加明显。其中在 24 小时后的存活率为零(图 5)。表明牛胰 RNA 具有对瘤细胞的杀伤作用。

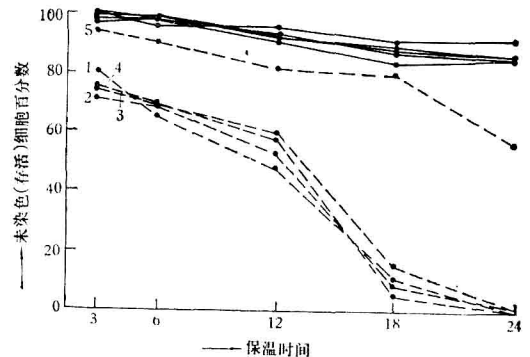


图 5 不同浓度牛胰 RNA 对 EATC 存活率的影响
对照组——, 实验组-----, $3500\mu\text{g}/\text{ml}$ (1); $350\mu\text{g}/\text{ml}$ (2); $200\mu\text{g}/\text{ml}$ (3); $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (4); $10\mu\text{g}/\text{ml}$ (5)

三、讨 论

在放射自显影像中,可见 ^{125}I -牛胰 RNA 进入瘤细胞而集中在核内。这是 ^{125}I -牛胰 RNA 以大分子形式进入瘤细胞内的结果。因为以 ^{125}I -核苷酸试验在同样的条件下,瘤细胞中未见到银颗粒的积聚^[6]。

Kolodny^[7]等当观察外源性 RNA 进入生长活跃的哺乳动物的淋巴、脾脏、骨髓、肿瘤细胞时,用 ^3H 、 ^{14}C 双标记的 RNA 与上述细胞共温育之后,发现这些细胞内 RNA 分子中的 ^3H 与 ^{14}C 比值与外源性 RNA 的 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值相同,从而证明 RNA 以大分子形式进入细胞内。

我们曾把牛胰 RNA 和 EATC 一起体外换液培养七天或者注射于腹腔内,传代培养三次,就发现 EATC 形态改变,其特点为瘤细胞体积和核体积变小、核与胞浆界线清楚,核染色淡而均一,核内出现粉红色物质,核体积与细胞体积的比值降低,核分裂相显著减少。但在以生理盐水代替牛胰 RNA 的对照组内未见此种变化。又作过 RNase 处理实验,在 0.01 M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)-1mM MgCl_2 溶液中,加牛胰 RNA 至 1mg/ml,再加 25 μg 牛胰 RNase 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 分。然后将其加入含有 4.5×10^6 /ml EATC 的培养液中,或者注射于 EAT 小鼠腹腔内,则未见上述的形态改变。这说明,牛胰 RNA 在体内外,以大分子形式进入瘤细胞内之后,才发挥其对瘤细胞的抑制和杀伤作用。

^{125}I -牛胰 RNA 放射自显影片子中,可见有的瘤细胞标记了,有的未标记,这种现象可能与

瘤细胞所处的细胞周期不同有关。在瘤细胞 S 期时, RNA 的进入量多,故 S 期瘤细胞愈多,其标记率愈高(当然也与 RNA 作用时间、浓度、放射性浓度、瘤细胞的恶性度有关)。

如此,外源性 RNA 对瘤细胞起抑制杀伤作用,但另一方面使正常细胞如白细胞与淋巴细胞^[8]以及成纤维细胞^[9]的 ^3H -TdR 掺入率增加至 3—8 倍。这样看来外源性 RNA 只对瘤细胞选择性地抑制其 DNA 合成,并杀伤瘤细胞。这些特点表明牛胰 RNA 优于化学抗癌药物,具有临床应用的可能性。

参 考 文 献

- [1] Pilch, Y. H. et al.: *Med. Clin. North. Amer.*, **60**, 567, 1976.
- [2] Pimm, M. V. et al.: *Brit. J. Cancer*, **33**, 154, 1976.
- [3] Clercq, E. De. et al.: *Europ. J. Cancer*, **14**, 1273, 1978.
- [4] 陈苏民:《肿瘤防治研究》**10**, 1, 1983.
- [5] Girad, M.: *Methods in Enzymology*, **XII**, 581, 1967.
- [6] 上海肿瘤防治研究所生化组:《生物化学与生物物理学报》, **9**, 237, 1977.
- [7] Kolodny, G. M. et al.: *Cell Communication*, New York, Part II 97, 1977.
- [8] 施佩璋等:《生理科学》**3**, 41, 1983.
- [9] 郭焯等:《肿瘤》, **3**, 18, 1983.

[本文于1984年2月13日收到]

本实验的放射自显影在北京医学院细胞研究室进行,并得到刘鼎新教授的指导和该室全体成员的支持。 ^{125}I -牛胰 RNA 是中国科学院北京原子能研究所张佩璋同志标记的,谨此致谢。

人体内 cAMP 与 cGMP 动态平衡机理的探讨

张 鹏 洪宝源

(哈尔滨医科大学)

cAMP (环磷酸腺苷)与 cGMP (环磷酸鸟苷)作为“第二信使”参与激素的作用。

Goldberg 等^[1]根据在一些分化的细胞(心

肌、平滑肌、血小板和中枢神经细胞)中观察到 cAMP 和 cGMP 对细胞代谢反应和生理功能的调节作用是相反的,浓度的变化是相反而相