肝癌病人淋巴细胞对 5-¹²⁵ 碘-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (¹²⁵IUdR) 标记人体肝癌靶细胞的微量细胞毒性试验

张宗梁 王球达 杨松榆 王珏

(中国科学院上海实验生物研究所)

大量事实表明,机体的细胞免疫在抗肿瘤中起重要作用。但是,原发性肝癌病人特异的细胞毒性测定,在国内外尚未见有报道。鉴于放射性同位素测定肿瘤免疫反应具有灵敏、客观、省时等优点。我们应用 ¹²⁵IUdR 同位素技术,建立了研究肝癌病人特异细胞免疫反应的方法,对于肝癌临床与实验研究有一定的意义。根据 ¹²⁵IUdR 分子上的碘原子与胸腺嘧啶核苷上的甲基在空间构型上的类似,非天然的 ¹²⁵IUdR 分子就参入到细胞核 DNA 链上的胸腺嘧啶位置,标记了肿瘤靶细胞。

¹²⁵IUdR 同位素的释放仅在标记细胞死亡或溶解后出现。与 ³H 胸腺嘧啶核苷有所不同,释放的 ¹²⁵IUdR 几乎不被活细胞再利用。

用 ¹²⁵IUdR 标记体外培养的人体肝癌细胞(7402)(陈瑞铭等,1975)作靶细胞,测定了 33 例肝癌病人外周血淋巴细胞的微量细胞毒性反应。现将初步结果简介于后。

一、¹²⁵IUdR 的合成与对人体肝癌细胞的参入动力学

(一) ¹²⁵IUdR 的合成 国产 2'-脱氧尿嘧啶核苷(UdR,层析纯)与 Na¹²⁵I (30—40 mci/毫升,放射性纯度>99%)于 80℃ 反应 1 小时,经醋酸型阴离子交换树脂分离纯化。层析证明,合成的 ¹²⁵IUdR 是层析纯的,与 IUdR (英国 Koch-Light)样品的 R_f 值完全一致(层析系统:乙酸乙酯:异丙醇:水 = 8:1:4),紫外光谱分析也证明合成的 ¹²⁵IUdR 与 IUdR 一致。将上述较高纯度无载体的 ¹²⁵IUdR 分子浓缩为 1mc/毫升的浓度,冷藏备用。

(二) ¹²⁵IUdR 标记 7402 细胞的时间与剂量效应 7402 细胞培养于中北京瓶,培养液为 RPMI-1640,内含 20% 小牛血清,100IU 青霉素/毫升、100μg 链霉素/毫升,每周传代一次。将 7402 细胞接种于内盛 1/3 盖片的静置管内,每瓶接种 1 毫升 10⁵ 细胞。37℃ 培养 36—38 小时,分组分别加入 0.1 毫升 20μCi、10μCi、1μCi 的 ¹²⁵IUdR 温育 6、12、24、48 小时后,用内含 IUdR 载体的温热 Hank's 溶液多次洗涤,洗去细胞外同位素的污染,用甲醇-冰醋酸(9:1)固定,甲基绿-派喏啉染色,作形态观察。用 WH₄ 或核 4 乳胶感光 10 天,作放射自显影。因为 ¹²⁵IUdR 衰变发射的短射程俄歇电子(Auger)及内转换电子与 ³H-胸腺嘧啶核苷 β 电子的电位势(Mev)

本文 1977 年 3 月 4 日收到。

接近,能获得较满意的放射自显影图象(图1、2)。7402细胞放射自显影结果证明,大量的 $^{125}\text{IUdR}$ 参入了肝癌的细胞核。 $^{125}\text{IUdR}$ 参入人体7402细胞的剂量与时间效应结果指出,选用 10^5 细胞(毫升), $10\mu\text{Ci}$ 的 $^{125}\text{IUdR}$ 参入6小时或12小时,既能有较多的同位素参入,又使 $^{125}\text{IUdR}$ 对靶细胞的放射与化学毒性降到较低程度(图3)。

图1 $^{125}\text{IUdR}$ 参入7402细胞核内的放射自显影图象 $\times 85$

图2 上图的放大 $\times 299$

图3 $^{125}\text{IUdR}$ 参入7402细胞的时间与剂量效应

形态学观察也显示, 10^5 细胞用1或 $10\mu\text{Ci}$ $^{125}\text{IUdR}$ 标记6或12小时,细胞核内有较大量的 $^{125}\text{IUdR}$ 参入,细胞形态也与不加同位素的对照类同。反之,长时间,高剂量标记,核内 $^{125}\text{IUdR}$ 丢失,细胞形态异常。

5-氟脱氧尿嘧啶核苷(FUdR)是胸腺嘧啶核苷合成酶的抑制剂。 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 的FUdR加入培养液,使 $^{125}\text{IUdR}$ 参入7402细胞的量比不加的对照高数倍以上。

二、肝癌病人淋巴细胞对 $^{125}\text{IUdR}$ 标记肝癌靶细胞的微量细胞毒性试验

(一) $^{125}\text{IUdR}$ 的标记 将生长良好,细胞间未汇合成片的7402细胞(最近用免疫间接荧光抗体法证明,7402细胞仍在合成AFP),用0.15%胰酶消化2分钟,洗涤后作成 10^5 /毫升

的细胞悬液。每培养瓶内加入 6 毫升细胞悬液, 37℃ 培育 36—38 小时。随即加入 $60\mu\text{Ci } ^{125}\text{IUdR}$ 反应 6 小时。除去上清液, 消化成单细胞悬液, 并充分洗去细胞外同位素, 使每个 7402 细胞通常有相当于 0.5—1.0CPM 的 $^{125}\text{IUdR}$ 参入细胞核。

(二) 贴壁 以 0.2 毫升 4×10^3 标记细胞分别加入微量试验小板的小井内。置于 37℃ 5% CO_2 和 95% 空气的湿润大气中温育过夜, 标记细胞在小井内的贴壁率约为 70%。

(三) 淋巴细胞分离 肝素抗凝人外周血 4—5 毫升, 用 Ficoll 泛影酸、葡甲胺、EDTA 组成的比重为 1.073 的分离液分离, 400g 离心 20 分钟, 小心吸取 Ficoll 液界面上的白色细胞层细胞, 洗涤后用 Wright-Giemsa 染液显示, 95% 以上的细胞为单核型细胞(主要为小淋巴细胞)。少数化疗、放疗病人, 在停药和放疗后两周以上方取血作淋巴细胞毒性试验。

(四) 微量细胞毒性试验 0.2 毫升所需浓度的淋巴细胞悬液, 分别加入经洗涤后内含贴壁标记靶细胞的小井里, 每一样品重复五份。在上述细胞培养条件下, 作用 42 小时, 吸去上清液, 再小心而充分地洗涤一次, 吸净洗涤液后, 分别锯下小井, 在 NE8312 自动测试仪上记数一分钟。实验指出, 淋巴细胞与靶细胞的比例采用 200:1, 100:1, 50:1 时, 通常在细胞毒性指数间没有统计学上的显著差别, 因而在实验中采用 100:1 的比例, 以减少病员的采血量。

(五) 计算 我们把 Oldham 等(1975)应用的基线法稍作了改良。将正常人淋巴细胞(通常 4 人以上, 性别、年龄与肝癌患者相对应)与肝癌靶细胞作用后的小井内残存脉冲数取其平均值为 1 和同批实验中每一个正常人或肝癌病人的值相比, 得出细胞毒性指数, 按 t 试验作统计学处理。将正常人的值平均后再分别与正常人和肝癌患者相比, 可减少基线法中个别正常人值之高低造成对整个实验的影响。本实验提示, 细胞毒性指数为 0.75 或 0.75 以下时, 通常有显著细胞毒性。细胞毒性指数大于 1, 指淋巴细胞促进了靶细胞生长, 有人认为是“喂食效应”或营养因素所致。据称, 对照淋巴细胞毒性的出现可能与靶细胞的组织相合性抗原、小牛血清、病毒抗原、癌抗原等因素引起的致敏作用有关。

(六) 结果 33 例临床确诊原发性肝癌 II、III 期病人(按上海肝癌分期标准)与 19 例正常人(本所工作人员)的细胞毒性相比, 肝癌患者有显著细胞毒性的为 13/33(40%), 而正常人中仅有 2/19(10%), 其差别是显著的(图 4)。在上述有显著细胞毒性的病人中, 往往多数是 II 期(11/13)或经手术切除(6/13)的患者, 其中有的 AFP 下降, 病情好转和稳定。例如:

病例 1 戚××, 女, 27 岁(市二 751508), 1975 年 6 月 13 日 AFP 血凝检测 1:6000。6 月 16 日, 手术左肝外侧缘有一 $7 \times 5 \times 3\text{cm}$ 大小的肿瘤, 余肝中等硬化, 呈散在结节行左半肝切除兼作脾切除。病理诊断: 原发性肝细胞肝癌, 伴肝硬化。术后行胚肝细胞疫苗、BCG、中草药、I-RNA, 治疗。10.9 $^{125}\text{IUdR}$ 细胞毒性指数为 0.60 ± 0.086 ($P < 0.01$), 现术后 18 月, 体检肝(-), AFP 对流(+), 无

图 4 肝癌病人淋巴细胞对 $^{125}\text{IUdR}$ 标记 7402 靶细胞的毒性
● $P < 0.05$ (有显著细胞毒性)
○ $P > 0.05$ (无显著细胞毒性)

腹水,情况较好。

病例2 何××,女,51岁(瑞金200697),因发现右上腹肿块于1976年3月20日入院,AFP放射免疫测定1280ng/毫升血清,1976年3月29日手术发现左肝有5×5cm大小肿瘤,其外缘有3cm大小的肿瘤伴卫星结节二个,行左半肝切除。病理诊断:原发性肝细胞肝癌,术后6个月,AFP在30ng/毫升血清水平。11月19日,¹²⁵IUdR细胞毒性指数为 0.41 ± 0.15 ($P < 0.01$),11.24,AFP100ng/毫升血清,11.23。¹²⁵IUdR细胞毒性指数为 0.60 ± 0.081 ($P < 0.05$),一般情况较好。¹²⁵IUdR的两次试验重复证明:此病人的细胞毒性指数是显著的。

病例3 张××,男,61岁(杨浦189031),1974年4月24日普查AFP对流(+)入院,4月27日手术发现左内叶有3×3cm大小肿瘤伴卫星结节,行左半肝切除。病理诊断:原发性肝细胞肝癌,术后AFP转阴。1975年4月AFP对流(+),1976年5月AFP扩散(+),重新入院。用免疫核酸,羟基喜树碱治疗,目前一般情况好。11月9日,¹²⁵IUdR细胞毒性指数为 0.56 ± 0.14 ($P < 0.05$)。

在21例细胞毒性指数无显著意义的阴性病人中,15例(70%)为肝癌III期,有肝大、腹水、黄疸等体征,一般AFP > 1280ng/毫升血清。

尽管对于人体淋巴细胞毒性的测定目前尚有不少争论(Oldham等,1975)。但是,自应用集落抑制试验与其它微量细胞毒性试验以来,已有一些工作者证明,大部分肿瘤患者的淋巴细胞不仅能破坏自体的肿瘤细胞,也能破坏相同组织学类型的异体肿瘤细胞。从而认为,同类型的肿瘤细胞之间具有共同的肿瘤相关抗原(TAA)。他们指出,神经母细胞瘤、结肠腺癌、尿道膀胱癌、肾癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌与黑色素瘤、肾母细胞瘤和各种肉瘤,都具有肿瘤的相关抗原。并指出,体外检测TAA的免疫反应与病人的临床状态有较大的关系(Hellström等,1974)。我们的初步结果提示,肝癌病人淋巴细胞对7402细胞的细胞毒性较明显地大于正常对照,其中经手术治疗及病情有好转者的细胞毒性效应较病情恶化及状态差者为强。此结果似乎启示,肝癌的TAA或许也是存在的。

三、小 结

(一) 本文首次报告了¹²⁵IUdR标记人体肝癌靶细胞,检测肝癌病人淋巴细胞对这类靶细胞的微量细胞毒性方法。此试验采血量少,具有同位素法灵敏、客观等优点,适用于临床和实验研究。

(二) 33例肝癌病人中,40%的病人淋巴细胞对肝癌靶细胞有较显著的毒性作用,提示了肝癌有TAA存在的可能性。为了证明TAA的存在与否,尚需对人体肝癌细胞攻击的特异性等问题作进一步研究。

(三) 自Cohen(1971)报道¹²⁵IUdR技术以来,¹²⁵IUdR在肿瘤免疫研究中的应用日趋增多,除在人体细胞毒性研究外,已在肿瘤免疫核糖核酸(Brower等,1976; Kern等,1976; Skinner等,1976),体液抑制因子(Ting,1976),巨噬细胞(Boyle等,1976),免疫佐剂(Geffard等,1976)等研究方面普遍应用,说明¹²⁵IUdR技术在肿瘤免疫研究中是颇有价值的。

本文承姚鑫、黄永安等同志指导和审阅,报告的病例是由上海市第二人民医院、浦江医院、肿瘤医院、中山医院、杨浦区中心医院、瑞金医院、静安区中心医院等所提供,谨致谢意。

[下转184页]