

• 实验研究 •

黄芪成分 F3 增强低剂量白介素 II 诱导 LAK 细胞的细胞毒效应

中国医学科学院肿瘤研究所 肿瘤医院 (100021)

储大同 孙 燕 林娟如 Wong Wendy* Mavlight G*

内容提要 在对黄芪免疫调节有效成分 F3 的研究过程中发现: (1) F3 加入 100u/ml 白介素 II (rIL-2), 其所诱导的 LAK 细胞对人类黑色素瘤 A375P 的杀伤率可达 80%, 与 1000u/ml rIL-2 单独使用时的效果 (76%) 相似, 减少 rIL-2 用量的 90%。(2) 使用 F3 后, 所需 LAK 细胞数量减少 50%。提示运用其他生物反应调节剂 (BRMs) 来增强 rIL-2 所诱导的 LAK 细胞杀伤活性是一个值得探索的方向。

关键词 黄芪 白介素 II LAK 细胞。

近年来, 由于高剂量白介素 II (rIL-2) 及其在体外诱导的 LAK (Lymphokine Activated Killer) 细胞的应用带来了令人鼓舞的初步临床结果, 白介素 II 的免疫治疗已引起广泛兴趣^①。不幸的是, 大剂量 rIL-2 所造成的副作用也是患者所难以忍受的, 如体液滞留、毛细血管渗漏综合征、心肌梗塞和心律失常等^②。因此, 寻找一种无毒的生物反应调节剂 (BRMs) 以协同或增强 LAK 细胞杀伤从而减少 rIL-2 的用量和毒性是一个值得探讨的问题。黄芪成分 F3 无论在体外或是在体内实验中均是一个极好的免疫调节剂, 故而我们对其作了进一步研究。

材料与方法

一、瘤细胞系: 实验采用人类黑色素瘤细胞系 A 375P 和 HS294T, 系体外细胞毒测定的理想瘤株^(3~5), 由 M.D. Anderson 肿瘤中心提供。其生长所需条件为含 10% 小牛血清、2mM L-谷氨酸和 50μg/ml 庆大霉素的 MEM 培养液。将它们置于 37°C 的 5% CO₂ 孵箱中培养, 每 3~5 天传代 1 次以维持适当的细胞密度 (< 10⁵/ml)。每次实验用 10ml 含胰酶—EDTA (100μg/ml) 的 PBS 洗脱, 再用 MEM 培养液洗一遍。计数后加入 96 孔培养板, 每孔 5 × 10³ 细胞数。将板置于 37°C 5% CO₂ 孵箱中培养 3 天后即可加入 LAK 细胞以观察杀伤情况。

二、LAK 细胞制备: 将健康献血员肝素抗凝的外周血用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离, 取得淋巴细胞。所得细胞用 RPMI 1640 培养液洗 3 次后再用完全 RPMI 1640 培养液 (含有 10% 小牛血清、2mM L-谷氨酸和 50μg/ml 庆大霉素) 调成 1 × 10⁶/ml 浓度的悬液。将它们分置于 25mm² 的培养瓶 (Corning) 中并向瓶中分别加入不同浓度 (5~2 000u/ml) 的 rIL-2 (Cetus 公司, Emoryville, CA)。与此平行的另一半瓶中除了 rIL-2 外再加固定浓度 (55μg/ml) 的 F3 以进行对比研究。将这些培养瓶置于 37°C 的 5% CO₂ 孵箱中 3 天以诱导 LAK 细胞的产生。在进行细胞毒测定前用 MEM 洗涤细胞 3 次以除去任何可能残留的药液。

三、LAK 细胞细胞毒测定: 将 LAK 细胞按适当的效应细胞/瘤细胞比例 (E/T 比) 加到 96 孔瘤细胞培养盘上, 并在 37°C、5% CO₂ 孵箱中放置过夜。除了瘤细胞和效应细胞在一起的各组外, 对照组还包括: (1) 仅含肿瘤细胞组。(2) 肿瘤细胞 + F3 组。(3) 肿瘤细胞 + F3 处理过的淋巴细胞组。(4) 肿瘤细胞 + 未处理的淋巴细胞组。(5) 仅含 LAK 细胞组 (无肿瘤细胞)。(6) 仅含经 F3 处理过的 LAK 细胞组 (无肿瘤细胞)。隔夜培养后移去上清并用 PBS 洗 2 次。评价细胞毒采用定量的 Bio-Rad 蛋白测定比色计法⁽⁶⁾。该法已被证明在估价瘤细胞对各种 BRMs 或药物反应上是既简单又可靠的⁽⁷⁾。所测的值直接反应了粘附在盘底的残留肿瘤细胞蛋白量。简单程序如下: 将 50μl 10% 的乙醇加入各孔后置震荡平台上 10 分钟。然后放入 -80°C 冰

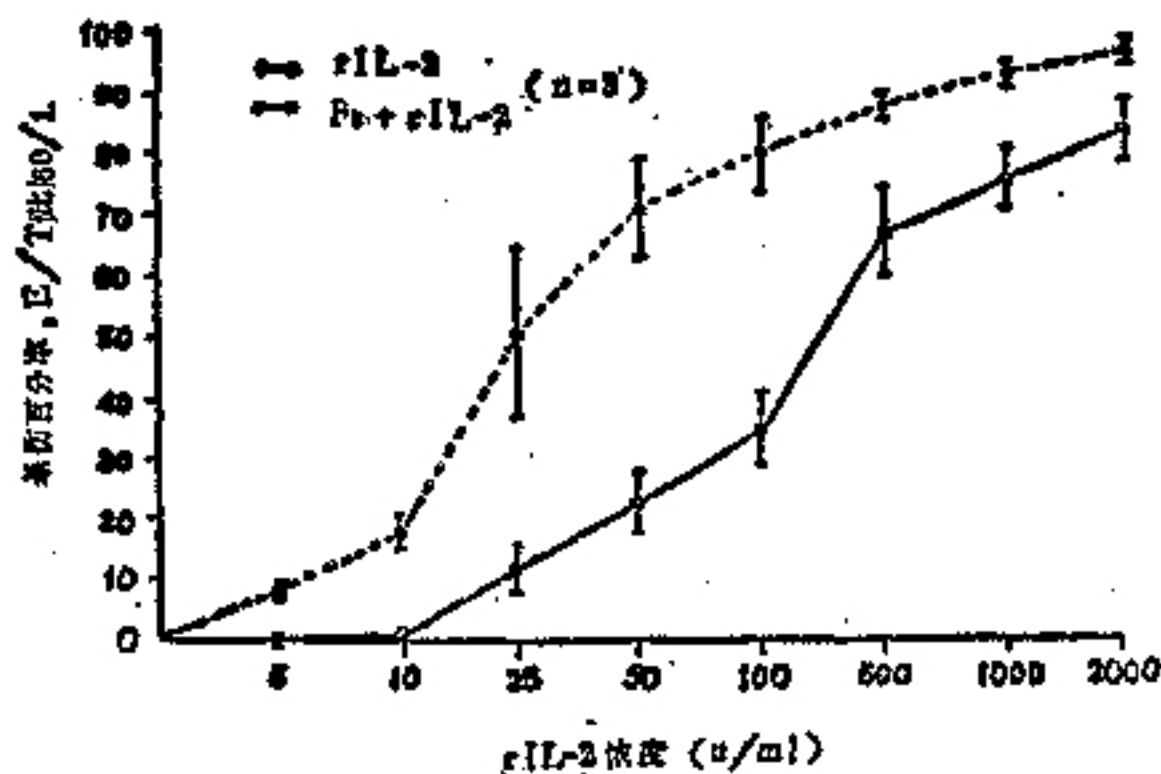
*美国德克萨斯州大学 M.D. Anderson 肿瘤中心

箱冷冻 30 分钟,取出后再置 37°C 化冻 15 分钟。此过程重复 2 次后,将 1:5 稀释的 Bio-Rad 染色剂 200 μ l 加入各孔并立即在多孔扫描分光光度计上读数 (Dynatech MR600 Micro ELISA Reader)。

统计学分析用 student t 检验。

结 果

一、F3 对所需 rIL-2 剂量的影响:不同浓度 rIL-2 所诱导的 LAK 细胞对 A375P 肿瘤细胞的杀伤见附图。在该实验中,所用效应细胞/瘤细胞 (E/T) 比为 60:1。在无 F3 存在时, rIL-2 最低浓度需 25u/ml 才能诱导出 13% 的肿瘤杀伤活性。随着浓度的增加,杀伤活性也增加,如 500u/ml 诱导 67% 的杀伤,2000u/ml 诱导 84% 杀伤。然而,随着 F3 的加入,几乎在所有 rIL-2 浓度的各点都诱导出增强的溶细胞活性。最显著各浓度点为 25、50 和 100u/ml rIL-2。与单纯使用 rIL-2 组比时,分别达到 3.9、3.1 和 2.3 倍的增强效果。当 rIL-2 浓度超过 100u/ml 时,这一杀伤活性增加的曲线趋于平顶状态。特别值得注意的是, F3 加入 100u/ml rIL-2 所诱导的杀伤水平为 80%, 完全相似于单独使用 1000u/ml rIL-2 所诱导的杀伤水平 (76%)。



附图 F3 增强 rIL-2 诱导的 LAK 细胞抗 A375P 黑色素瘤的细胞毒活性

二、F3 对所需 LAK 细胞数量的影响:在不同 E/T 比例时, F3 对诱发 LAK 细胞杀伤活性的影响见附表。本实验用 2 个黑色素瘤系和一个固定的 rIL-2 浓度 (100u/ml)。在 7 例健康人的实验中, LAK 细胞的活性与 E/T 比例有明显关系。如在仅用 rIL-2 的一组, 当 E/T 比为 60/1 时, 2 个细胞系的杀伤均值分别为 28 $\pm$ 17% 和 37 $\pm$ 14%, 而 E/T 比为 30/1 时, 分别为 16 $\pm$ 8%

和 20 $\pm$ 11%; 两者比较, P 值分别为 $P < 0.025$ 和 $P < 0.005$ 。

附表 F3 增强 rIL-2 诱导 LAK 细胞的杀伤活性对靶细胞和 E/T 比值影响 (% , M $\pm$ SD)

诱导剂	A375P		Hs294T	
	T:E=1:60	T:E=1:30	T:E=1:60	T:E=1:30
rIL-2	28 $\pm$ 17 ^{*Δ}	16 $\pm$ 8 ^{**}	37 $\pm$ 14 ^{*ΔΔ}	20 $\pm$ 11 ^{**}
rIL-2+F3	56 $\pm$ 20 ^{ΔΔΔ}	33 $\pm$ 15	66 $\pm$ 19 ^{ΔΔΔ}	45 $\pm$ 22

注:表中数据为 7 次实验的平均数,每次实验 rIL-2 及 F3 浓度均固定,分别为 100u/ml 及 55 μ g/ml。与 rIL-2+F3 比, * $P < 0.001$, ** $P < 0.005$; T:E=1:60 与 T:E=1:30 比, $\Delta P < 0.025$, $\Delta\Delta P < 0.005$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

当 F3 加入后,无论是在 E/T 比为 60/1 还是 30/1, 肿瘤杀伤活性的百分率均明显增加。值得注意的是,加用 F3 后,在低 E/T 比值组的杀伤百分率 (A375P 为 33 $\pm$ 15%, Hs294T 为 45 $\pm$ 22% (完全达到或略超过高 E/T 比值组的水平 (A375P 为 28 $\pm$ 17% 和 Hs294T 为 37 $\pm$ 14%))。统计学处理两者无显著差异。这意味着效应细胞可以减少 1 倍。此外,个别对 rIL-2 诱导不敏感者经 F3 处理后,这种诱导无力状态也可被完全克服。

讨 论

我们的初步工作证实了 F3——黄芩的一种成份可以在体外大大增强 rIL-2 所诱导的 LAK 细胞的活性。这一增强表现为要达到相同水平的肿瘤杀伤效应可以减少 90% rIL-2 的用量或减少 50% 的 LAK 细胞数量。

迄今为止,无论是动物实验还是初步的临床试用均表明,随着高剂量 rIL-2 的体内给药,有效的肿瘤杀伤与 LAK 细胞诱导程度是密切相关的^[6,9]。而在人类肿瘤的治疗中,高剂量 rIL-2 加大量 LAK 细胞的全身灌注必然导致严重的毒副作用^[6,2,10]。当然,这一毒副作用可以随着 rIL-2 剂量的减少或所给 LAK 细胞数量的减少而有所缓和,但也因此而降低了有效的抗癌活性。因此,同时使用有效的 BRMs 如 F3 在体外参与诱导 LAK 细胞或体内给药有可能大大减少 rIL-2 或 LAK 细胞的需求量而不影响抗癌活性。

F3 可增强 rIL-2 所诱导的 LAK 细胞活性的确切作用机理尚不清楚。是否为增加 rIL-2 受体在淋巴细胞上的表达,或增加 rIL-2 与淋巴细胞的结合,或增强 LAK 细胞与靶细胞的接触,还当进一步研究。我们以前的工作反复证明了无论在体外^[11]还是在动物体

内^{①②}，黄芪都是一种非有丝分裂原、非内毒素性质的物质，并且具有很强的免疫调节作用。

通过使用另一种BRMs，既能保留效应细胞的生物学活性又能达到免疫药理学上减毒的要求是很值得进一步探讨的新课题。我们对黄芪成份F3的探讨，只是在这一领域中所跨出的第一步。

参考文献

1. Rosenberg SA, et al. Special report: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New Engl J Med* 1985; 313:1485.
2. Moertel CG. On lymphokines, cytokines, and breakthroughs. *JAMA* 1986; 256:3141.
3. Kleinerman ES, et al. Tumoricidal activity of human monocytes activated in vitro by free and liposome-encapsulated human lymphokines. *J Clin Invest* 1984; 72:304.
4. Kleinerman ES, et al. Lysis of tumor cells by human blood monocytes by a mechanism independent of activation of the oxidative burst. *Cancer Research* 1985; 45:2058.
5. Creasey AA, et al. Growth regulation of melanoma cells by interferon and (2'-5')oligoadenylate synthetase. *Mol Cell Biol* 1983; 3:780.
6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

utilizing the principles of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248.

7. Laughton C. Quantification of attached cells in microtiter plates based on coomassie brilliant blue G-250 staining of total cellular protein. *Anal Biochem* 1984; 140:417.
8. Rosenberg SA, et al. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin -2. *J Exp Med* 1985; 161:1168.
9. Mule JJ, et al. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin -2. *Science* 1984; 225:1487.
10. Rosenberg SA, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *New Engl J Med* 1987; 316:889.
11. Chu DT, et al. Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. I. Immune restoration of local xenogeneic graft-versus-host reaction in cancer patients by fractionated *Astragalus membranaceus* in vitro. *J Clin Lab Immunol* 1988; 25:119.
12. Chu DT, et al. Immunotherapy with Chinese medicinal herbs. II. Reversal of cyclophosphamide-induced immune suppression by administration of fractionated *Astragalus membranaceus* in vivo. *J Clin Lab Immunol* 1988; 25:125.

• 简讯 •

▲首届全国青年中西医结合学术研讨会于1989年11月1~5日在安徽省黄山市召开，来自全国各省市的140名代表出席了会议。中国中西医结合研究会副秘书长陈士奎主持了开幕式，副理事长陈可冀致开幕词，常务理事尚天裕到会并讲了话。中国中西医结合研究会安徽分会及黄山市领导到会表示祝贺。会议共收到学术论文268篇，从中进行了优秀论文评选，选出一等奖1篇，二等奖7篇，三等奖24篇。大部论文思路新颖，科学性强。参会青年学者们畅所欲言地交流了经验。这次大会是对我国中、青年中西医结合工作队伍的一次检阅，从中发现了较多的人才，展示了中西医结合事业的广阔前景。

(赵 玫)

▲中国中西医结合研究会消化系统疾病专业委员会成立暨学术交流会于1989年11月8~14日在江西省南昌市召开。来自全国22个省、市、自治区的204

名代表参加了会议。会议共收到学术论文177篇，其中86篇参加了会议交流。这些论文内容丰富，实用性较强，集中反映了近5年来中西医结合在消化系统诸多疾病的病因病机研究、辨病和辨证以及中西医结合治疗的现有水平及重大进展。大会期间成立了中国中西医结合研究会消化系统疾病专业委员会，由危北海任主任委员，陈泽民、林宗广、龚琼模、张育轩为副主任委员，金敬善任秘书。会议制定了今后开展全国中西医结合消化系统疾病的科研协作计划。

(龚琼模 甘 淳 金敬善)

▲《中西医结合杂志》日文版首发仪式于1989年10月21日在东京举行。中西医结合杂志社陈维养、陈文绮、陈贵廷三位同志出席了仪式。同时，还应邀参加了10月21~22日于东京召开的日本东方医学会第七届学术年会，陈维养同志在会上作了《中国中西医结合概况》的特别讲演。会后，合作双方就日文版杂志的有关编辑事项进行了讨论。

(陈 佳)

Effect in Nutritional Support for the Extensive Burned Patients with Splenico-Stomachictonic

Luo Chengqun(罗成群), Ma Enqing(马恩庆), et al

Dept. of Burns and Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of
Hunan Medical University, Changsha (410008)

From 1983~1988, 20 cases of extensive burns were administered Splenico-Stomachictonic to regulate gastrointestinal function. The burns were above 80% total body surface area and/or third degree burn area above 50%. 18 cases of the same conditions in the same period served as the control. After 10 days, the therapeutic group had a total effective rate of 95%, and the control group had a total effective rate of 67% ($P < 0.05$). The marked efficiency of the therapeutic group was 75% and the control group was 38% ($P < 0.05$). The survival rate of the therapeutic group was 65% and the control group was 33%.

These results suggested that the traditional Chinese Splenico-Stomachictonic medicine could bring to the extensive burn patients good gastrointestinal function, which helps improve nutritional status.

(Original article on page 30)

F3, A Fractionated Extract of *Astragalus membranaceus*, Potentiates LAK Cell Cytotoxicity Generated by a Low Dose Recombinant Interleukin-2

Chu Datong(储大同), Sun Yan(孙燕), Lin Juanru(林娟如),

Wendy Wong(李秀如)*, Giora M. Mavligit

Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100021)

*University of Texas, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, U. S. A.

Success with rIL-2 immunotherapy of human cancer appears to depend on the administration of high doses which are frequently associated with excessive toxicity. Future use of rIL-2 will require certain modifications based on the use of lower doses of rIL-2 without significant loss of antitumor efficacy. The authors tested in vitro the possibility of potentiating the activity of rIL-2 in terms of LAK cell generation. The authors hypothesized that co-incubation of LAK cell precursors with a Chinese herbal extract (F3) of *Astragalus membranaceus* (an immune modulator currently under study in the authors' laboratory), along with a low concentration of rIL-2 would generate levels of LAK cell activity equivalent to those generated by high concentrations of rIL-2 alone.

The authors found: (1) a 10-fold potentiation of rIL-2 activity manifested by tumor cell killing activity of 80% resulting from LAK cell generation with F3 plus 100 u/ml of rIL-2 versus 76% generated by 1000 u/ml of rIL-2 alone; (2) a significant reduction in the number of effector LAK cells required for equicytotoxic reaction following LAK cell generation with F3 plus rIL-2 compared to rIL-2 alone.

The authors conclude that potentiation of antitumor activity mediated by rIL-2 in low concentrations is possible by the concomitant use of another immune modulator such as *Astragalus membranaceus*.

(Original article on page 34)