

猪苓多糖、香菇多糖和分枝杆菌多糖对淋巴因子活化杀伤细胞活性增强作用的研究

李金锋¹ 郭静文¹ 黄信孚² 林本耀²

内容提要 本实验对猪苓多糖(PPS)、香菇多糖(Len)和分枝杆菌多糖(MPS)在体外对淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞活性的影响进行了研究,将三种不同浓度的多糖与不同浓度的重组白细胞介素 2(rIL-2)一起共同培养健康人外周血单个核细胞(PBMC),96 小时后以氘-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)掺入法细胞毒试验检测 LAK 细胞对不同靶细胞(包括 NK 敏感和 NK 抵抗)的体外杀伤活性。结果发现:三种多糖在一定浓度范围内与 rIL-2 合用能增加 LAK 细胞活性 42%~56.9%,降低 rIL-2 用量 50%($P < 0.05 \sim 0.01$)。结果提示:三种多糖均可作为细胞活性上向调节剂(LURA)用于 LAK 细胞疗法。

关键词 淋巴因子活化的杀伤细胞 白细胞介素-2 多糖

Study on the Enhancing Effect of Polyporus Polysaccharide, Mycobacterium Polysaccharide and Lentinan on Lymphokine-Activated Killer Cell Activity in vitro LI Jin-feng, GUO Jing-wen, HUANG Xin-fu, et al *Tangshan People's Hospital, Hebei (063001)*

The actions of Polyporus polysaccharide (PPS), mycobacterium polysaccharide (MPS) and lentinan (LEN) on lymphokine-activated killer (LAK) cell activity in vitro were investigated in this study. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured for 96 hours with medium containing different concentrations of the above-mentioned drugs in combination with recombinant interleukin 2 (rIL-2). Then cell-mediated lysis was determined by ³H-TdR release assay including NK sensitive and NK resistant target cells. The results demonstrated that, when combined with rIL-2 in a certain concentration, all three kinds of polysaccharides could enhance the LAK activity by 42%~56.9%, and reduce the dose of rIL-2 by 50% ($P < 0.05 \sim 0.01$). It suggested that the PPS, MPS and LEN could be used as bioactivity regulators in LAK cell therapy in tumor treatment.

Key words lymphokine-activated killer cell, interleukin-2, polysaccharide

以淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞为主的过继性细胞免疫疗法临床应用渐多。但是重组白细胞介素 2(rIL-2)容易出现剂量限制性毒副反应,影响其疗效的发挥。迫切需要寻找高效低毒的 LAK 细胞活性上向调节剂(LURA)。本研究选用两种中药多糖及一种细菌多糖为研究对象,观察其对 LAK 细胞活性的影响,为临床应用多糖类辅助 LAK 细胞疗法提供实验依据。

材料与方法

1 材料 细胞系:人红白血病细胞系(K 562)、自然杀伤(NK)细胞敏感,本研究室提供;人淋巴瘤细胞系(Raji),NK 细胞抵抗,北京医科大学第一临

床学院传染科惠赠。细胞培养基(RPMI1640)为美国 GIBCO 公司产品。rIL-2 为长春生物制品所提供。猪苓多糖(PPS)由中国中医研究院提供;香菇多糖(Len)为日本味之素株式会社产品;分枝杆菌多糖(MPS)由首都医科大学提供。鼠抗人单克隆抗体购自北京医科大学基础医学院免疫室;羊抗鼠单克隆抗体购自北京肿瘤所免疫室。氘标记胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)为中国科学院上海原子能所产品。

2 方法

2.1 外周血单个核细胞(PBMC)的制备与 LAK 细胞的诱导 取健康人静脉抗凝血,适当稀释后置于比重 1.077 的淋巴细胞分层液离心分层,2000 r/min 离心 20 min,吸出界面细胞,洗涤后按 1×10^6 /ml 细胞加入不同浓度 rIL-2 和多糖,培养 96 h 诱导 LAK 细胞。

1.唐山市人民医院(河北 063001); 2.指导,北京市肿瘤防治研究所

2.2 细胞毒测定 参照冯作化等方法^①加以改进, 并以下列公式计算释放率:

$$\text{特异性释放率} = (1 - \frac{\text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}}) \times 100\%$$

2.3 细胞表型分析 参照赵怀宇等方法^②。

2.4 LAK 细胞的培养扩增 取分离好的 PBMC, 调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 加入 24 孔培养板中, 1 ml/孔, 分成单用多糖组、单用 rIL-2 组、不同多

糖加 rIL-2 组及对照组(不加任何药物), 共 6 组, 每组设 3 个复孔, 4 天换液 1 次, 隔日行细胞计数。

2.5 统计分析 采用 t 和 q 检验。

结 果

1 PPS 对 LAK 细胞活性的影响 见附表。单纯 PPS 不能增强健康人 PBMC 的杀伤活性。rIL-2 (500 u/ml) 存在时, PPS 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 杀伤活性最强,

附表 不同浓度 rIL-2 与多糖共同诱导 LAK 细胞对 Raji 细胞和 K₅₆₂ 细胞的杀伤率结果比较 (% , $\bar{x} \pm S$)

组别	对 Raji 细胞杀伤率			对 K ₅₆₂ 细胞杀伤率		
	1000	500	250	1000	500	250
PPS(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	57.9 $\pm$ 9.0	46.1 $\pm$ 15.3**	31.6 $\pm$ 11.2	62.6 $\pm$ 7.3*	49.3 $\pm$ 8.3**	32.1 $\pm$ 10.9
MPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	57.8 $\pm$ 9.1	48.8 $\pm$ 8.1**	32.1 $\pm$ 10.9	61.8 $\pm$ 9.9*	48.7 $\pm$ 9.4**	36.1 $\pm$ 7.5*
LEN(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	56.7 $\pm$ 9.0	45.9 $\pm$ 9.8**	30.3 $\pm$ 8.8	63.4 $\pm$ 8.5*	50.3 $\pm$ 9.5**	32.9 $\pm$ 9.6
PPS+MPS	57.0 $\pm$ 10.4	46.4 $\pm$ 11.4**	31.9 $\pm$ 13.0	60.1 $\pm$ 10.5	48.7 $\pm$ 11.0**	31.9 $\pm$ 12.1
PPS+LEN	57.4 $\pm$ 9.8	46.1 $\pm$ 9.3**	29.9 $\pm$ 10.1	59.8 $\pm$ 10.1	49.5 $\pm$ 10.4**	30.1 $\pm$ 12.8
MPS+LEN	56.1 $\pm$ 9.5	47.4 $\pm$ 8.7**	31.1 $\pm$ 11.6	59.1 $\pm$ 9.5	45.0 $\pm$ 8.4**	33.1 $\pm$ 9.9
对 照	47.7 $\pm$ 8.3	31.1 $\pm$ 11.6	19.7 $\pm$ 10.7	50.9 $\pm$ 11.0	33.1 $\pm$ 9.9	21.6 $\pm$ 11.6

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; rIL-2 浓度单位(u/ml)

对 K₅₆₂ 细胞杀伤率比无 PPS 组提高 48.9% ($P < 0.01$); 对 Raji 细胞杀伤率比无 PPS 组提高 48.2% ($P < 0.01$)。当 PPS 浓度超过 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后, LAK 细胞活性开始下降。PPS 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和不同浓度的 rIL-2 共育, 结果显示: PPS+rIL-2 250 u/ml 培养的 LAK 细胞与单用 rIL-2 500 u/ml 培养的 LAK 细胞对 K₅₆₂ 和 Raji 细胞的杀伤率比较, 两组无显著性差异 ($P > 0.05$); 同样, PPS+rIL-2 500 u/ml 培养的 LAK 细胞与单用 rIL-2 1000 u/ml 组比较, 二者对两种瘤细胞的杀伤率比较亦无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示 PPS 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可降低 rIL-2 用量 50%。

2 MPS 对 LAK 细胞活性的影响 见附表。单用 MPS 无效。用 rIL-2 500 u/ml 诱导 LAK 细胞时, 加入 MPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下的杀伤活性最佳, 超过此浓度, LAK 活性反而降低。MPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和不同浓度 rIL-2 共同培养人 PBMC, 结果表明 MPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 能降低 rIL-2 用量 50%。

3 LEN 对 LAK 细胞活性的影响 LEN 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 rIL-2 500 u/ml 共育人 PBMC, 其 LAK 细胞对 K₅₆₂ 杀伤率为 50.3% $\pm$ 9.5%, 较对照组的 33.1% $\pm$ 9.9% 提高 51.9% ($P < 0.01$), 对 Raji 的杀伤率比对照组提高 47.5% ($P < 0.01$)。增加 LEN 浓度, LAK 活性反而下降, 当浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时对 LAK 活性有抑制作用。另外, LEN 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 也

能降低诱导 LAK 细胞所需 rIL-2 用量的一半。

4 两种多糖组合对 LAK 细胞活性的影响 见附表。与单一多糖相比, 不同多糖组合并不能提高 LAK 细胞活性, 某些组合对 LAK 细胞活性的影响尚不如单一多糖。

5 多糖对 LAK 细胞表型的影响 单用 rIL-2 500 u/ml 组与 rIL-2 500 u/ml 分别加多糖各组诱导的 LAK 细胞表型比较几乎无差异。

6 多糖对 LAK 细胞扩增的影响 多糖单独培养 PBMC 至第 10 天左右细胞多数死亡。加入 rIL-2 (500 u/ml) 组, 培养 6 天左右细胞略有减少, 以后开始扩增, 至第 20 天, 细胞数量可达初始培养的 2.5 倍, 但加入多糖并未发现进一步扩增作用, 表明多糖对 LAK 细胞的扩增作用不明显。

讨 论

三种多糖在一定浓度范围内可增加 LAK 细胞活性 42%~56.9%, 降低 rIL-2 用量 50%, 与文献报道相似^③。三种多糖对 LAK 细胞活性影响的量效关系并不明显。每种多糖均有其最佳作用浓度, 提示临床应用某些多糖时, 并非剂量愈大疗效愈佳。本实验将两种多糖组合, 其结果并不比单一多糖效果好, 说明不同多糖在激活 LAK 细胞功能上可能途径一致, 而 LAK 细胞功能的表达可能有一定限度, 刺激浓度达一定水平, 使其表达能力饱和, 再增加同类刺激物

亦不能提高 LAK 细胞的应答能力,提示临床联合应用多糖增加 LAK 细胞活性尚缺乏根据。

实验表明,应用多糖对 LAK 细胞表型变化作用不大,也未发现多糖对 LAK 细胞的增殖有影响,说明多糖造成的 LAK 细胞活性增加并非细胞数量增加引起,而是使活化的 LAK 细胞分化更加成熟、功能提高所致。这一结论与 Hubbell^[4]所进行的错配双链 RNA(mds RNA)能够提高 LAK 活性,但细胞表型(CD₃、CD₄、CD₈、CD₅₇、CD₁₅)与单纯应用 rIL-2 比较无差异的实验结果相一致。

淋巴细胞分泌 IL-2 和 IL-2 受体(IL-2R)的表达是 LAK 细胞活化的标志, Tvede 检测接种肺炎球菌多糖的小鼠,其 PBMC 的 75 KD 高亲和力 IL-2R 表达明显增加^[5]。本实验所用三种多糖,单独应用无效,说明需要 IL-2 做为第一信号激活 PBMC 后,多糖才能发挥作用,推测也是通过使 PBMC 高表达 IL-2R 和(或)IL-2 及其它细胞因子分泌增加以致提高 LAK 细胞杀伤活性。

作为 BRM, PPS、LEN 为传统中药提取物,副作用轻微,易被患者接受,不但对 LAK 细胞活性

有增强作用,而且可以减轻化疗药所致的毒副反应,改善机体免疫功能,具有一定临床实用价值。

参 考 文 献

1. 冯作化,陈兆聪. 用³H-TdR 标记的靶细胞检测细胞介导的细胞毒作用. 中国免疫学杂志 1989; 5(4): 73-76.
2. 赵怀宇,徐华林,杨苏河,等. OKT 单克隆抗体检测人 T 淋巴细胞的免疫酶法. 中国免疫学杂志 1989; 5(3): 165-167.
3. 曹广文,杜 平,焦炳华,等. 枸杞子多糖、刺五加多糖和鼠伤寒杆菌内毒素多糖对 LAK 活性的调节作用. 第二军医大学学报 1992; 13(2): 206-209.
4. Hubbell HR, Gibson GD, Bigler RD. Potentiated lymphokine-activated killer cell activity generated by low-dose interleukin-2 and mismatched double-stranded RNA. Cancer Immunol Immunother 1992; 34: 259-264.
5. Tvede N, Heilmann C, Christensen LD, et al. Interleukin-2 receptor expression by human blood lymphocytes after vaccination with pneumococcal polysaccharide. Clin Exp Immunol 1989; 76: 404-411.

(收稿: 1994-06-02 修回: 1995-11-28)

湿润烧伤膏配合手术治疗肛瘘

李文杰 许淑清 韦亚刚

湿润烧伤膏(MEBO, 主要由麻油、蜂蜡及二十几种中草药组成, 北京光明中医烧伤创疡研究所独家研制生产, 是一种烧烫伤创面的外用药物, 已广泛用于烧烫伤创面的治疗, 1993 年 8 月~1994 年 10 月我们将其应用于肛瘘术后创面的治疗, 并与常规术后雷弗奴尔纱条填塞创面作对照, 以评价其配合手术治疗肛瘘的效果。

临床资料 肛瘘患者 98 例, 均行手术治疗, 分成两组, MEBO 组 48 例(1993 年 8 月~1994 年 5 月入院), 男 38 例, 女 10 例, 年龄 19~71 岁, 平均 37±6 岁; 其中高位及复杂瘘 19 例。雷弗奴尔组 50 例(1992 年 11 月~1994 年 1 月入院), 男 41 例, 女 9 例; 年龄 20~69 岁, 平均 35±17 岁; 其中高位及复杂瘘 20 例。两组患者性别、年龄、肛瘘高低复杂性所占比例等无显著性差异($P>0.05$)。

治疗方法 雷弗奴尔组: 术后排便后每日以雷弗奴尔纱条填塞创口直至愈合; MEBO 组: 术后排便

后每日以 MEBO 浸过的纱条填塞创口直至创口愈合。治疗期间每日观察及记录创面有无分泌物及水肿, 换药 2 次以后术区有无明显疼痛及疼痛轻重。

结 果 雷弗奴尔组创面出现脓性分泌物及水肿者 28 例, MEBO 组创面出现脓性分泌物及水肿者 3 例; 术后换药 2 次后主诉疼痛明显者雷弗奴尔组 31 例, MEBO 组 8 例; 创口愈合时间, 雷弗奴尔组 29±11 天(19~96 天), MEBO 组 20±9 天(14~37 天); 高位及复杂瘘创口愈合时间, 雷弗奴尔组 35±14 天(25~96 天), MEBO 组 26±8 天(21~37 天)。上述 4 项两组比较均有显著性差异($P<0.01$)。

讨 论 肛瘘术后创面感染及水肿较常出现, 应用 MEBO 配合手术用于肛瘘术后创面的治疗结果表明与常规应用雷弗奴尔纱条填塞比较, 确有创口愈合时间缩短, 预防和减少创口感染及水肿, 减轻创口疼痛。因此, 可作为肛瘘术后创面应用的有效药物。

(收稿: 1995-10-13 修回: 1995-12-25)