论著

文章编号:1000-5404(2006)01-0056-03

肺癌原代细胞和细胞系A549对肿瘤浸润性淋巴细胞体外增殖的抑制作用

张国强[1]，蒋耀光[2]，王如文[2]，林一丹[2]　(第三军医大学：[1]新桥医院胸外科，重庆 400037，[2]大坪医院全军胸外科中心，重庆 400042)

提　要：目的　研究肺癌原代细胞和细胞系A549对肿瘤浸润性淋巴细胞的抑制作用及其临床意义。**方法**　分离和培养肺癌细胞及TIL细胞，用MTT法检测原代肺腺癌细胞及腺癌细胞株A_{549}对TIL体外增殖的抑制作用及FasL抗体对TIL的保护作用。**结果**　原代肺癌细胞及A_{549}细胞株对TIL均有不同程度的抑制作用。**结论**　肺癌细胞对TIL细胞的抑制作用可能是机体逃避免疫攻击的机制之一。

关键词：肺癌原代细胞；A549细胞；TIL；抑制作用

中图法分类号：R329.28；R730.23；R734.2　　**文献标识码**：A

Inhibition of lung cancer cells of primary culture and A549 cell line on the proliferation of tumor-infiltrating lymphocytes *in vitro*

ZHANG Guo-qiang[1], JIANG Yao-guang[2], WANG Ru-wen[2], LIN Yi-dan[2] ([1]Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective**　To study the inhibition of lung cancer cells of primary culture and A549 cell line on the proliferation of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) *in vitro* and its clinical implications. **Methods**　Human lung cancer cells and TILs were isolated from 8 cases of primary lung cancer and cultured. The inhibition of isolated human cancer cells and A549 cells to TILs was detected by MTT method. **Results**　Lung cancer cells of primary culture and A549 cells can kill TILs to various degrees. **Conclusion**　Inhibition of lung cancer cells to TIL may be one of the mechanisms of immune escapes.

Key words: lung cancer cell; A549 cell; tumor infiltrating lymphocyte; inhibition

肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)是继LAK细胞之后发现的一种新的免疫活性细胞。TIL细胞的研究，开辟了治疗晚期恶性肿瘤的重要领域。但近年来的研究表明非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)癌旁组织中存在TIL，但肿瘤周围TIL的活性状态是一个有争议的问题，不同研究者经不同研究方法得到的结论并不完全一致。肿瘤细胞表达FasL的生物学意义也有诸多争议，有研究者认为肿瘤细胞表达FasL是激发免疫反应的前提条件之一，另一方面，也有研究表明肿瘤细胞可以借助其表达的FasL蛋白反杀伤淋巴细胞。为研究NSCLC中FasL表达的情况及其生物学功能，我们进行了一系列的研究 。现将结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试剂和细胞株　　胶原酶Ⅰ、胶原酶Ⅳ、透明质酸酶、DNA酶均购于Sigma公司。细胞培养液RPMI1640、白细胞介素-2(IL-2)及淋巴细胞分离液购自华美公司。肺腺癌细胞株A549由第三军医大学全军呼吸内科研究所提供。

1.1.2　Ficoll-Hypaque细胞分层液的制备　　用76%泛影葡胺(上海第一药业生物有限公司，中国)代替泛影酸钠(Hypaque)。用双蒸水将76%泛影葡胺配成34%的溶液，用双蒸水将聚蔗糖(Ficoll)(Pharmacia公司，USA)配成9%的溶液，将10份34%的泛影葡胺和24份9%聚蔗糖混合，用液体比重计测定其比重，使比重为1.077±0.001。用68.95 kPa高压蒸气灭菌15 min，无菌分装，4 ℃保存备用。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30400440)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400440)

作者简介：张国强(1965－)，男，湖北省浠水县人，博士，副主任医师，副教授，主要从事胸部肿瘤的基础及外科临床方面的研究，发表论文40余篇。电话：(023)68774516，E-mail：zhang006006@163.com

收稿日期：2005-06-15；**修回日期**：2005-10-26

1.1.3　临床标本来源　　8 例病人均为我院住院并作手术切除的肺癌患者，病理学检查均为肺腺癌。新鲜肿瘤组织标本在无菌条件下在手术室采取。

1.2　方法

1.2.1　肺癌原代细胞及 TIL 的分离　　参照 Whiteside[1] 的方法，无菌取手术切除的肺癌组织，经 Hanks 液冲洗，机械剪碎至 1～2 mm^3 大小，加入 0.05% 的胶原酶，室温下缓慢磁力搅拌消化 3 h。消化的细胞悬液经尼龙网过滤得单细胞悬液，瑞氏染色判断单细胞悬液中淋巴细胞百分比。随后经不连续密度梯度（上层为 75% 的 Ficoll-Hypaque，比重为 1.055；下层为 100% 的 Ficoll-Hypaque，比重为 1.077）400 × g 离心 20 min，分别收集界面细胞。表层为富含肿瘤细胞层，用作肺癌原代细胞的培养。100% 与 75% 分离液之间为富含淋巴细胞层，用作 TIL 培养。

1.2.2　肺癌原代细胞、A549 细胞及 TIL 的培养　　将所得的肺癌原代细胞、A549 细胞及 TIL 以 5×10^5/ml 加入 24 孔平底板（日本住友塑料株式会社），2 ml/孔。培养基中 IL-2 的浓度为 1 000 U/ml，传代时维持在 500 U/ml，细胞培养在 37 ℃、5% CO_2 条件下进行。每 3～5 d 观察细胞 1 次。根据细胞生长情况计数、更换培养液。

原代细胞初步鉴定：原代肺癌细胞涂片行角蛋白 ABC 法组化分析及 HE 染色。细胞离心涂片、角蛋白免疫组化反应均示强阳性，细胞涂片 HE 染色确定为各类型肺癌细胞。角蛋白 ABC 法组化分析，培养细胞之细胞浆均染成棕褐色，计为强阳性，表明所培养细胞来源于上皮组织。HE 染色确定为各类型肺癌细胞，肺癌细胞提取率在 90% 以上。取 0.1 ml 用血细胞自动分析仪计数，淋巴细胞提取率为 80%～95%。并分别取上述细胞少许用台盼蓝染色，记数活细胞不低于 95%。

1.2.3　肺癌原代细胞表达 FasL 检测（免疫组化 SABC 法）

兔抗人 FasL 多克隆抗体及 SABC 复合物均购自武汉博士德生物工程有限公司。按常规 SABC 法进行免疫组化检测，具体方法参照说明书进行。每批染色设立阴性空白对照（以 PBS 代替一抗），并用每一批染色中 FasL 阳性表达的肿瘤浸润性淋巴细胞做为阳性对照。结果判定：FasL 蛋白主要定位于细胞浆和细胞膜，凡细胞浆和/或细胞膜显示棕黄色颗粒者为阳性。结果判定时，每张玻片在 400 倍光镜下按顺序找 5～10 个视野，每个视野数 100～200 个细胞，共计 1 000 个细胞，计算出每张玻片上 FasL 蛋白阳性表达的百分数。按染色强度判断阳性程度又可分化：阴性（－）：无色；弱阳性（＋）：浅黄色；阳性（＋＋）：棕黄色；强阳性（＋＋＋）：棕褐色。肿瘤组织表达 FasL 检测参照上述方法进行。

1.2.4　原代肺癌细胞和 A549 细胞对 TIL 抑制活性的检测

采用 MTT 法测定。甲组按效靶比例 10∶1 分别取 100 μl 接种于 96 孔平底培养板内共同培养，每个试验做 3 个复孔。乙组先用 FasL 抗体封闭原代肺癌细胞或细胞株 A549 后再与 TIL 共同培养。同时设对照组两个，分别观察淋巴细胞、原代肺癌细胞或细胞株与培养液共同培养。用酶标仪 570 nm 测定 OD 值，计算 TIL 抑制活性百分率。

1.3　统计学处理

FasL 抗体（NOK-1）封闭原代培养的肺癌细胞及 A549 细胞株前后原代肺癌细胞及 A549 细胞株对 TIL 的抑制活性以（$\bar{x} \pm s$）% 表示，采用 t 检验。

2　结果

2.1　临床资料

8 例患者均行手术根治切除，其中 I_{B} 期 3 例，II_{A} 期 1 例，II_{B} 期 3 例，$\mathrm{III}_{\mathrm{B}}$ 期 1 例。术后病理均证实为腺癌，其中低分化腺癌 5 例，中分化腺癌 1 例，中-低分化腺癌 1 例，高分化腺癌 1 例。术后随访最长 2.5 年，最短 2 年，其中 2 例出现骨转移（$\mathrm{III}_{\mathrm{B}}$、$\mathrm{II}_{\mathrm{B}}$ 期各 1 例），1 例出现胸腔积液，证实为胸膜转移。

2.2　8 例肺腺癌 FasL 的表达情况

FasL 在 8 例切除组织标本均呈阳性表达。其培养后的原代肺癌细胞中的阳性表达百分数为 66.5%～94.5%（分别为 66.5%，68.2%，76.5%，88.4%，88.2%，94.5%，91.6% 和 67.8%），平均为 80.2%。见图 1、2。

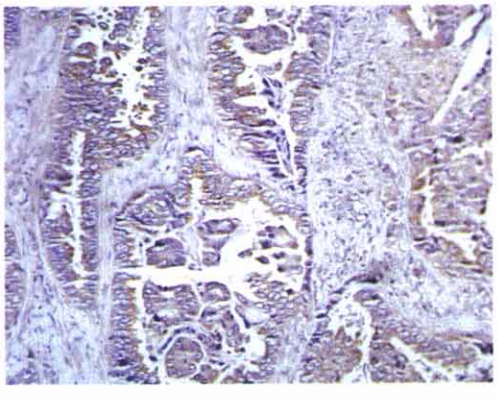


图 1　人肺腺癌组织 FasL 阳性表达　（SABC × 200）

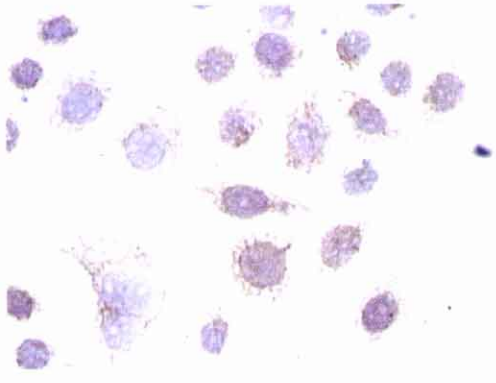


图 2　人肺腺癌细胞 FasL 阳性表达　（SABC × 400）

2.3　肺腺癌细胞株 A549 中 FasL 的表达情况

本组 A549 细胞株经免疫组化检测 FasL 的阳性表达百分数平均为 68.4%。

2.4　抑制活性检测

8 例经与 IL-2 共培养的原代肺癌细胞及传代培养的

A549 细胞均对 TIL 细胞具有不同程度的抑制活性[分别为(48 ±22)%和(57 ±8)%]。经 FasL 抗体封闭后的原代肺癌细胞和 A549 细胞对 TIL 的抑制活性均有所下降[分别为(26 ±9)%和(31 ±11)%],封闭前后比较其差异均具有显著意义($P<0.05$)。

3 讨论

目前从实体瘤中分离 TIL 及肺癌细胞的方法主要有 Rosenberg 和 Whiteside 实验室为代表的两种方法[1]。采用 Rosenberg 法分离肺癌细胞往往因为组织消化不彻底,悬液含有较多丝状物,难于通过 200 目滤网获得单细胞悬液而失败。而 Whiteside 法方法稳定,分离的 TIL 和肺癌细胞纯度高,对细胞活性影响较小。我们即参照此法。TIL 研究常规采用 rIL-2 浓度为 1 000 IU/ml,在此条件下 TIL 具有一定的扩增能力。

关于人类 TIL 的研究已开展多年,一般认为淋巴细胞与癌细胞接触后分泌出穿孔素使癌细胞膜穿孔,导致细胞液泄漏从而杀伤癌细胞造成癌细胞死亡。然而临床用于过继传输以治疗恶性肿瘤的效果并不能令人满意。肺癌 TIL 不能有效杀伤自体癌细胞的机制目前还不清楚。

新近研究表明,肿瘤细胞可通过表达 FasL,杀伤活化的淋巴细胞。FasL(Fas 配体)及 Fas(也称 APO-I,CD95),分别属于 TNF 及 TNFR 家族,FasL 识别并结合细胞表面的 Fas,激活细胞内的凋亡信号,从而介导 Fas^+ 细胞的凋亡。肿瘤细胞表达 FasL 是肿瘤细胞进行免疫反攻击从而逃避免疫监视的重要机制。本研究中 FasL 在原代肺腺癌细胞的平均阳性表达百分数为 80.2%,我们认为 FasL 在肺腺癌中的高表达可能是肺癌逃避机体免疫监视的机制之一。FasL 能与 TIL 的 Fas 结合,启动 T 细胞内凋亡信号,通过凋亡消除 T 细胞,而肿瘤细胞膜的 Fas 对 T 淋巴细胞的 FasL 的敏感性降低,即不能启动瘤细胞内凋亡,此外,肿瘤细胞还可以主动减少 Fas 受体的表达或通过 Fas 突变,避免 T 淋巴细胞 FasL 的攻击作用,从而使癌细胞逃避机体免疫监视的控制,促进肿瘤的生长和转移。本实验研究了 8 例肺癌标本及人肺腺癌细胞株 A549,结果表明,原代肺腺癌细胞及肺腺癌细胞株 A549 均有较高 FasL 表达并可不同程度的抑制 TIL 细胞体外增殖。肿瘤细胞与 TIL 的相互作用,其结果主要取决于它们对 Fas 介导凋亡的相对敏感性。许多肿瘤细胞 Fas 抗原表达下调或完全缺失[2],而 FasL 表达增高[3-6],即使部分 Fas 阳性肿瘤细胞也能对 FasL 介导的凋亡有抵抗性,其原因可能为:①FAP-Ⅰ蛋白的表达,干扰了 Fas 凋亡信号的传导;②sFas 与 FasL 的结合以及有些原癌基因如 bcl-2、bcr-abl 等的活化可部分或完全阻断 Fas 凋亡的下游瀑布,而绝大多数激活的淋巴细胞均表达 Fas 抗原,而且对 Fas 介导的凋亡有一个易感窗口期[6],所以肿瘤细胞可以通过其 Fas 抗原的下调表达而 FasL 表达增高和(或)对 FasL 介导凋亡的抵抗性而对活化的 TIL 细胞发生免疫攻击从而逃避机体的免疫监视,由此,肿瘤细胞得以在体内扩增并最终形成肿瘤。如何阻断肿瘤细胞对 TIL 的反杀伤还有待于对淋巴细胞激活机制及其刺激分子充分活化并抵抗 Fas 介导的凋亡作用的深入研究。本实验为此进行了有限的探索。实验结果表明,FasL 抗体封闭后的原代肺腺癌细胞及肺腺癌细胞株 A549 对 TIL 体外增殖的抑制作用均有所下降,同时亦表明 FasL-Fas 在介导 TIL 的凋亡中具有重要的作用,从而为肺癌免疫逃避提供了一定的理论基础。其具体环节及机制及其他途径还有待于进一步研究与探索。

参考文献:

[1] WHITESIDE T L, MIESCHER S, MACDONALD H R, *et al*. Separation of tumor-infiltrating lymphocytes from tumor cells in human solid tumors. A comparison between velocity sedimentation and discontinuous density gradients[J]. J Immunol Method, 1986, 90(2): 221 - 233.

[2] KANAUCHI H, WADA N, GINZINGER D G, *et al*. Diagnostic and prognostic value of fas and telomeric-repeat binding factor-1 genes in adrenal tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(8): 3690 - 3693.

[3] MICHAEL ROBINSON J M, PANDEYA N, CUMMINGS M C, *et al*. Fas ligand and tumour counter-attack in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status[J]. J Pathol, 2003, 201(1): 46 - 54.

[4] LI J H, SHI W, SANCHEZ SWEATMAN O, *et al*. Efficacy of targeted FasL in nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Ther, 2003, 8(6): 964 - 973.

[5] IGNEY F H, BEHRENS C K, KRAMMER P H. The influence of CD95L expression on tumor rejection in mice[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(10): 2811 - 2821.

[6] VIARD LEVEUGLE I, VEYRENC S, FRENCH L E, *et al*. Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma[J]. J Pathol, 2003, 201(2): 268 - 277.

(编辑 栾 嘉)