DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.036
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1454 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1454-03

TGF-β_1 对 INF-γ 诱导肺鳞癌细胞 β_2-M 表达的影响

张晓军[1], 路作新[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院急救部,重庆 400038;[2]附属新桥医院胸外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨 TGF-β_1 对肺鳞癌细胞 MHC Ⅰ 类抗原表达的影响。方法 以原代培养的人肺鳞癌细胞为对象,采用免疫荧光法,通过流式细胞仪分别检测加入 rhINF-γ 及 rhTGF-β_1+rhINF-γ 肺鳞癌细胞 β_2-M 的表达状况。结果 rhINF-γ 能显著诱导肺鳞癌细胞 β_2-M 的表达($P<0.01$),但这种诱导作用在各组癌细胞中均能被 rhTGF-β_1 显著抑制($P<0.01$),且与其分化程度无关。结论 TGF-β_1 对 INF-γ 诱导人肺鳞癌细胞 MHC Ⅰ 类抗原表达有明显抑制作用。

关键词:转化生长因子 β_1;γ-干扰素;β_2-微球蛋白;流式细胞仪;肺鳞癌;原代培养
中图法分类号:R392.11;R734.202 中图法分类号:A

Effect of TGF-β1 on expression of INF-γ-induced β_2 M-in human pulmonary squamous cell carcinoma

ZHANG Xiao-jun, LU Zuo-xin (Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of TGFβ_1 on expression of MHC Ⅰ type antigen in human pulmonary squamous cell carcinoma. **Methods** Expressions of β_2-M in primary culture cells with rhINFγ and rhTGFβ_1+rhINFγ from human pulmonary squamous cell carcinoma were detected by FCM(Flow Cytometry Method), respectively. **Results** Expression of β_2-M in all tumor cell groups was induced significantly by rhINFγ ($P<0.01$). The expression of rhINFγ-induced β_2-M could be significantly inhibited by rhTGFβ_1. The change of β_2-M expression in tumor cells is not associated with differentiation degree of carcinoma cells ($P>0.05$). **Conclusion** Expression of INFγ-induced MHC Ⅰ type antigen in human pulmonary squamous cell carcinoma can be inhibited by TGFβ_1.

Key words: TGFβ_1; INFγ; β_2M; FCM; pulmonary squamous cell carcinoma; primary cell culture

近年的研究发现,作为一种具有多种生物学功能的细胞生长因子,转化生长因子 β_1(TGF-β_1)在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用。有关 TGF-β_1 对肺鳞癌细胞 MHC Ⅰ类抗原表达的影响尚有待研究。本实验以人肺鳞癌原代培养细胞为研究对象,通过流式细胞仪分别检测加入 rhINF-γ(γ-干扰素)及 rhTGF-β_1+rhINF-γ 后肺鳞癌细胞 β_2-M (β_2-微球蛋白)的表达状况,旨在了解 TGF-β_1 对人肺鳞癌细胞(MHCⅠ)类抗原表达的影响,初步探求 TGF-β_1 在其生长过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 本实验原代培养的肺鳞癌细胞均取自肺鳞癌患者手术切除的癌组织,共 18 例,男性 14 例,女性 4 例。年龄 33~71 岁,平均为 52.4 岁。其中低分化鳞癌 7 例,中分化鳞癌 6 例,高分化鳞癌 5 例。所有病例均经术后病理组织切片证实。

1.1.2 主要试剂 Ⅳ 型胶原酶(Sigma 北京邦定公司分装),胰蛋白酶(北京中山公司 进口分装),RPMI-1640 培养基(GIBCO 美国),rhTGF-β_1(BM 公司 德国),rhINF-γ(珠海丽珠生物工程制药厂),鼠抗人 β_2-M 抗体(北京中山公司 进口分装),羊抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体(北京中山公司 进口分装)。

1.2 方法

1.2.1 肺鳞癌细胞的分离及培养[1~3] 无菌条件下切取新鲜无坏死的肺癌组织块,立即浸入含 5% 小牛血清的 1640 培养液,室温下 2 h 内进行如下处理:将肿瘤组织剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的组织块,加入 0.1% Ⅳ 胶原酶溶液,置 37℃,5% CO_2 的培养箱中消化 2~4 h。消化后的单细胞悬液经 100 目钢网过滤、不连接密度梯度离心后,重悬于含 20% 小牛血清的 1640 培养液,调整细胞浓度 10^5~10^6/ml,移入预先用 1% 醋酸鼠尾胶原被覆后的无菌培养瓶中,置 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养 6~10 d 后,将培养细胞制成涂片,MGG(may-Griunwald-Giemsa)染色,显微镜下观察杂细胞<5% 时,培养的原代细胞为纯化的肺鳞癌细胞。肺鳞癌培养细胞的鉴定:所培养细胞均送样本 HE 染色,并与手术标本的病理切片对照,根据肿瘤组织学及形态特征进行细胞鉴定及分级。

1.2.2 rhTGF-β_1 对 rhINF-γ 诱导人肺鳞癌细胞 β_2-M 表达的影响[4] 采用间接免疫荧光法,流式细胞仪检测。取贴壁生长良好的肺鳞癌原代培养细胞,经 0.25% 胰酶溶液消化、离心后,重悬于含 5% 小牛血清 1640 培养液,0.2% 台盼蓝染色,镜下观察细胞活力>90%,调整细胞数为 5×10^6/ml。取 96 孔板,每份样品按表 1 加样,见表 1。

表 1 实验加样

Tab 1 Sample composition

	Control	rhTGF-β_1+rhINF-γ	rhINF-γ
Cellular suspension	100 μl	100 μl	100 μl
1640 solution	100 μl	/	/
rhINF-γ	/	/	100 μl
rhTGF-β_1+rhINF-γ	/	100 μl	/

Final concentration: rhTGF-β_1: 1 ng/ml; rhINF-γ: 100 U/ml

作者简介:张晓军(1966—),男,四川省南充市人,硕士,主治医师,主要从事肺癌的免疫治疗方面的研究。电话:(023)68752930

收稿日期:2002-03-27;修回日期:2002-08-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

加样后置培养箱培养 72 h, 0.25%胰酶溶液消化、离心后, 加入 70%酒精吹打固定后, 4℃保存(不超过两周)。固定细胞 PBS 洗两遍, 分别加入鼠抗人 β_2-M 抗体工作液(1∶100) 100 μl, 吹打散开, 置 4℃冰箱, 30 min 后, 弃上清, PBS 洗两遍, 吸尽残留液体后, 向其中加入羊抗鼠 IgG-FITC 荧光二抗工作液(1∶20), 置 4℃冰箱, 1 h 后, 弃上清, PBS 洗两遍立即上流式细胞仪检测。流式细胞仪测定每 10^4 个细胞中荧光阳性细胞标记率及平均荧光强度, 结果以频道数分布组方图表示。

1.3　统计学处理

所测数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPLM 软件进行 χ^2 分析。

2　结果

rhTGF-β_1 对 rhINF-γ 诱导肺鳞癌细胞 β_2-M 表达的影响, 见表 2。

表 2　FCM 检测各组细胞荧光阳性率和平均荧光强度($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　FITC positive rate and mean intensity($\bar{x}\pm s$)

	Well-differentiated		Moderately-differentiated		Poorly-differentiated	
	Positive rate(%)	Mean intensity(%)	Positive rate(%)	Mean intensity(%)	Positive rate(%)	Mean intensity(%)
Control	21.84±1.65	55.33±3.29	17.92±2.51	58.54±2.75	14.32±2.07	55.16±2.19
rhINF-γ	25.97±1.88 *	66.54±2.81 *	23.83±2.95 *	64.47±3.07 *	18.08±1.97 *	60.73±3.04 *
rhTGF-β_1+rhINF-γ	20.30±1.99△	54.73±3.05△	17.39±3.14△	57.06±1.95△	13.89±1.96△	54.14±3.14△
P value	>0.05		>0.05		>0.05	

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* rhINF-γ

从表 2 可以看出, rhINF-γ 可显著诱导各组癌细胞 β_2-M 表达增加, 而 rhTGF-β_1 可显著抑制 rhINF-γ 对各组癌细胞 β_2-M 的诱导表达, 这种变化与肿瘤分化程度无关。

3　讨论

Czarniecki 等[5] 首先发现, TGF-β_1 可抑制 INF-γ 诱导 Hs294T 细胞株细胞 HLA-DR(MHC Ⅱ类抗原)和 β_2-M(MHCⅠ类抗原)的表达。Ma 等[6] 在对葡萄膜黑色素瘤细胞的研究中也有相同结果。我们的实验结果也显示: TGF-β_1 能够显著抑制 INF-γ 诱导人肺鳞癌 MHC Ⅰ类抗原的表达, 这种抑制作用与其分化程度无关。Pison 等[7] 认为, TGF-β_1 能够减少靶细胞 INF-γ 受体表达, 从而抑制了 INF-γ 的诱导作用, 因此单独使用 TGF-β_1 对肿瘤细胞 MHC 抗原的表达没有影响。

主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是一组编码主要组织相容性抗原的基因, 其蛋白质产物则为 MHC 抗原, 分为Ⅰ类、Ⅱ类、Ⅲ类, 均表达于细胞膜表面, 其中Ⅰ类抗原分布最为广泛, 存在于所有有核细胞的表面, β_2-M(β_2-微球蛋白)是Ⅰ类抗原的轻链, 因此检测 β_2-M 即可反映 MHCⅠ类抗原表达状况[8]。在免疫系统识别和杀伤肿瘤细胞的过程中, 发挥主要作用的 CTL(Cytotoxic T lymphocyte, 细胞毒性 T 淋巴细胞)除识别肿瘤特异性抗原外, 必须同时识别肿瘤细胞表面的 MHCⅠ类抗原分子, 否则免疫反应不会发生, 肿瘤细胞也不会被淋巴细胞识别和杀伤, 这就是 MHC 限制(MHC restriction)。因此肿瘤细胞 MHCⅠ类抗原表达的强弱, 直接影响 CTL 对肿瘤细胞的识别和杀伤[9]。INF-γ(γ-干扰素)主要由激活的淋巴细胞(CTL、NK 细胞等)产生和释放, 是免疫反应重要的参与者和调节者。INF-γ 可诱导肿瘤细胞的 MHCⅠ类抗原表达, 使 CTL 与肿瘤细胞的特异性抗原和 MHCⅠ类抗原结合, 并对肿瘤细胞进行识别和杀伤; 同时, INF-γ 还可增强 CTL、NK 细胞、巨噬细胞等免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤活性[10]。

TGF-β_1 是一种多功能细胞因子, 广泛参与胚胎的形成和发育、免疫系统的调节、组织的损伤与修复等多种生理病理过程[11]。近年的研究发现, 在许多肿瘤组织和细胞中, TGF-β_1 表达高于正常组织和细胞[12,13]。

由于肿瘤细胞大量分泌 TGF-β_1, 不仅不能抑制肿瘤细胞自身生长, 同时还以旁分泌的形式, 影响肿瘤细胞局部的生长环境: ①抑制 INF-γ 诱导肿瘤细胞 MHC 抗原的表达, 逃避淋巴细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤。②抑制 CTL、LAK、NK 细胞等免疫细胞的增殖及杀瘤活性[14]。③抑制 IL-2、IL-1 等免疫因子的表达, 并拮抗其抗肿瘤免疫的活性[15]。通过以上途径, 肿瘤细胞得以逃避机体的免疫监视。由此可见, TGF-β_1 为肿瘤细胞不断生长营造了良好的局部环境和有利的生存空间。因此, 在肿瘤的生长过程中, TGF-β_1 间接地发挥了促进肿瘤细胞生长的作用。

参考文献:

[1] 王蘅文. 实验肿瘤学基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 123—160.

[2] 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 sedinentation and discontinuous density gradients. [J]. J Immunol Med, 1986, 90(2): 221—233.

[3] 大星章一, 菅野睛夫. 人癌细胞培养[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 37—69.

[4] 蔡文琴, 王伯弋云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 194—222.

[5] Czarniecki C W, Chiu H H, Wong G H W, *et al*. Transforming growth factor-β_1 modulates the expression of class Ⅱ histocompatibility antigens on human cells[J]. J Immunol, 1988, 140(12): 4 217—4 223.

[6] Ma D, Niederkorn Y. Transforming growth factor-β down-regulates MHC

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

class I antigen expression and increases the susceptibility of uveal melanma cells to NK cell-mediated cytolysis[J]. Immunology, 1995, 86(2): 263—269.

[7] Pison D M, LeClaire R D, Lersbach R B, *et al*. Regulation by transforming growth factor-β_1 of expression and function of the receptor for INF—γ on mouse macrophages[J]. J Immunol, 1992, 149(6): 2 028—2 034.

[8] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 281—335.

[9] Tannock I F, Hill R P. The basic science of oncology[M]. New York: McGraw-Hill Companies. Inc, 1998. 249—265.

[10] Vokes E E, Golomb H M. Oncologic Therapies[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999. 111—136.

[11] Sporn M D, Roberts A B. TGF-β_1 recent progress and new challenges[J]. J Cell Biol, 1992, 119(5): 1 017—1 021.

[12] Shim K S, Kim K H, Han W S, *et al*. Elevanted serum levels of transforming growth factor-β_1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection[J]. Cancer, 1999, 85(3): 554—561.

[13] Asakura S, Kato H, Fujino S, *et al*. Immunohistochemical study of transforming growth factor-beta and central fibrosis in T1 adenocarcinoma of the lung [J]. Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi, 1995, 43(15): 1 924—1 928.

[14] Morisaki T, Katano M, Rxiko A, *et al*. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) hgenes expression in human gastric carcinoma tissues [J]. J Surg Oncol, 1996, 63(5): 234—239.

[15] Paturel C A, Echchakir H, Carayol G, *et al*. Quantitative analysis of Th1、Th2 and TGF-β_1 cytokine expression in tumor、TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients[J]. Int J Cancer, 1998, 77(1): 7—12.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)12-1456-01

24 h 动态脑电图对癫痫的诊断价值

Diagnostic value of 24 hour dynamic electroencephalogram on epilepsia

王惠玉, 朱德辉, 陈 莉 （第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆 400038）

普通脑电图(EEG)对脑部疾病能够提供有价值的资料已为人所共识, 特别是对于癫痫的诊断, 其作用几乎是不可缺的。但是普通 EEG 在临床应用中由于受到常规检查时间的限制和在发作间期检查常难有阳性所见[1]。为了提高 EEG 的辅助诊断能力, 近年来动态脑电图(AEEG)24h 连续监测已逐渐推广应用, 提高了癫痫病人脑电检查的阳性率和痫样放电的检出率。本研究通过对 84 例癫痫病人 24 h 的 AEEG 监测, 分析其对癫痫间的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

所选 84 例患者中, 男 51 例, 女 33 例。年龄 7 个月至 53 岁, 平均 31 岁。病程≤1 年 35 例, 2~5 年 24 例, 6~9 年 15 例, ≥10 年 9 例。其中脑伤史及产伤史 11 例, 脑梗塞史 12 例, 脑炎史 4 例, 脑先天发育不良史 8 例, 癫痫家族史 21 例, 脑肿瘤 6 例, 动静脉畸形 3 例。发作类型: 强直阵挛发作 33 例(39%), 单纯部分性发作 27 例(32%), 复杂部分性发作 2 例(2%), 头痛性发作 9 例(11%), 失神发作 5 例(6%), 颞叶癫痫 5 例(6%), 非典型发作 3 例(4%)。84 例患者均查 EEG 1~3 次。

1.2 方法

应用丹麦 SYNCMASTER 750 型 8 道动态脑电图记录仪作连续 24 h 的脑电活动监测, 按国际 10/20 系统放置头皮电极, 检查开始时向患者解释检查方法和意义, 其间嘱病人闭目清醒状态下休息 10 min 并做 5 min 过度换气。请病人或家属详细记录监测 24 h 内各项活动及不适感觉, 睡眠时间及发作时间等, 以便回放分析时参考。24 h 监测结束后, 取回闪光卡放置 AEEG 主机回放系统, 选择时间常数 0.3 s, 滤波 30 Hz。分析清醒、安静、闭目状态下的常规记录, 过度换气后的脑电活动情况及睡眠中的 EEG 表现, 睡眠脑电图的时相分析按照睡眠周期分为非眼球快速运动睡眠(MREM) Ⅰ Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期及快速眼球运动睡眠(REM)期, 分析按照黄远桂等的标准进行诊断[2]。

2 结果与分析

2.1 AEEG 与 EEG 比较

常规 EEG 记录到, 痫样放电 17 例(20%)。AEEG 记录到 66 例(79%), χ^2 检验两者比较有显著差异($P<0.02$, $P<0.01$), 且 AEEG 监测中 18 例(21%)有临床发作。

2.2 临床发作出现率

84 例癫痫患者中, 69 例 EEG 检查, 除 2 名(3%)出现临床发作, 其余均未发现临床发作; AEEG 监测中 18 例(21%)出现临床发作, 其中单纯部分性发作 7 例, 复杂部分性发作 4 例, 肌阵挛 1 例, 失神发作 4 例, 混合型 2 例。

2.3 痫样放电的部位

检出 66 例痫样放电患者中, 前颞区 17 例、前至中颞区 13 例、额区 8 例、额中央区 7 例、中央顶区 3 例、顶枕区 6 例、一侧半球 5 例、两半球 3 例、枕区 4 例, 涉及额、前颞区 53 例(80%)。

2.4 癫痫放电出现的时间

66 例痫样放电者中, 出现在清醒期者 11 例(17%), 出现于睡眠中 31 例(47%), 出现于清醒及睡眠中 24 例(36%)。于睡眠中出现者 55 例次(83%), 清醒时出现者 35 例次(53%)。

55 例睡眠中出现癫痫样放电: 出现于 NREM Ⅰ、Ⅱ期者 32 例

（下转 1459 页）

作者简介: 王惠玉(1955—), 女, 云南省昆明市人, 副主任技师, 主要从事神经电生理的临床应用方面的研究, 发表论文 20 余篇。电话: (023) 65318301—73072

收稿日期: 2002-07-13; 修回日期: 2002-10-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net