

He-Ne 激光照射对 SP2/0 骨髓瘤小鼠 TNF 及 TNFR 水平的影响*

高美华 冯献启 宫照龙 王海燕 胡 涛

(滨州医学院免疫室 滨州 256603)

提要 采用 24 mW He-Ne 激光照射器照射荷瘤小鼠瘤区, 观察激光照射对瘤鼠瘤组织内肿瘤坏死因子(TNF)及肿瘤坏死因子受体(TNFR)的影响, 结果表明激光照射组小鼠瘤体内 TNF 活性明显增强, TNFR 表达量增多, 瘤细胞增殖率降低, 与非激光组相比, 有高度显著性差异 ($P < 0.01$)。表明 He-Ne 激光具有增强带瘤机体 TNF 活性并促进 TNFR 表达的作用。

关键词 TNF, TNFR, 骨髓瘤, 小鼠

TNF 的主要生物学活性就是对某些肿瘤细胞的细胞毒作用^[1]。近年来, 发现人和小鼠 TNF 基因与 MHC 基因紧密连锁, 暗示 TNF 基因可能参与免疫应答的调控^[2]。TNF 的生物效应是通过与细胞表面 TNF 受体相互作用而产生的。肿瘤患者常表现为 TNF 与 TNFR 的表达受阻, 因此寻找有效的 TNF 及 TNFR 诱导剂势在必行。本研究采用 He-Ne 激光照射荷瘤小鼠免疫器官区, 以探讨激光对 TNF 及 TNFR 的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物选择与分组

取 BALB/C 纯系小鼠 24 只, 体重为 18~22 g, 雌雄各半, 每只小鼠脾区皮下注射 SP2/0 骨髓瘤细胞 3×10^6 , 接种瘤细胞后将小鼠随机分为 3 组。Ⅰ组: 对照组, 仅植瘤但不进行激光照射; Ⅱ组: 隔日激光照射组。植瘤细胞后隔日照射激光; Ⅲ组: 连续激光照射组。植瘤细胞后 24 h 开始照射激光, 每日一次。

1.2 激光照射方法

采用上海医用激光仪器厂生产的 HNZSQ-Ⅰ型氦氛激光照射器, 输出功率为 24 mW, 能量密度为 76.43 J/cm^2 , 照射距离为 50 cm, 光斑直径为 0.5 cm, 原束照射, 照射部位脾区(瘤区), 照射时间每次 10 min。Ⅰ组小鼠隔日照射 1 次, Ⅱ组小鼠每日照射 1 次, 15 日为一疗程。实验第 16 日处死小鼠, 取瘤组织制成细胞悬液($5 \times 10^6/\text{mL}$), 加 ConA $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, 置 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。离心速率为 1500 r/min。分别取细胞及培养上清, 测瘤细胞膜 TNFR, 瘤细

* 山东省教委资助项目。

收稿日期: 1998-03-02; 收到修改稿日期: 1998-05-25

胞 TNF 活性、培养上清中可溶性 TNF 受体(sTNFR)及 TNF 活性。

1.3 免疫学检测方法

1.3.1 TNF 活性检测 采用双抗夹心 ELISA 法,试剂盒由第四军医大学提供。(1)包被 将 TNF 单克隆抗体加入酶标板孔中,每孔 100 μL ,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内放置 48 h,洗酶标板三次;(2)加待测样品 加入待测标本(瘤细胞及培养上清),标准品及阴性对照,每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 中置放 2 h,洗板三次;(3)加酶标抗体 加入酶标 TNF 单克隆抗体每孔 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 中置放 1 h,洗板三次;(4)显色 加入 ABTS 显色液,每孔 100 μL ,室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 中显色 15~30 min。用全自动酶标仪在 410 nm 处测 OD 值,绘制标准曲线,对照标准曲线求出待检样品 TNF 浓度(pg/mL)。

1.3.2 TNFR 及 sTNFR 检测法 采用受体吸收试验:取瘤细胞(5×10^6)或瘤细胞培养上清 1 mL,与已知定量 TNF 标准品(5 ng)混合,在室温下共育 1 h,离心 15 min,转速为 1500 r/min。然后取上清测上清中残留 TNF 活性,用吸收百分率表示 TNFR 相对数量或 sTNFR 相对值。

2 结 果

表 1 表明激光照射组(—, —)瘤组织内 TNF 活性明显高于非激光照射组,组间比较差异非常显著($P < 0.01$)。隔日激光组与连续激光组间比较,亦有显著差异性($P < 0.01$)。

表 1 He-Ne 激光照射对肿瘤组织 TNF 活性的影响

Table 1 Effect on TNF activation by He-Ne laser irradiation of tumour tissues

group	OD	<i>P</i>	TNF/pg/mL	<i>P</i>
—	0.082 \pm 0.003		68.742 \pm 5.896	
—	0.125 \pm 0.038	< 0.01	85.231 \pm 6.735	< 0.01
—	0.246 \pm 0.027	< 0.01	117.052 \pm 8.518	< 0.01

表 2 表明激光组与非激光组比较差异非常显著($P < 0.01$)。连续激光组与隔日激光组相比,亦有显著差异性($P < 0.01$)。

表 2 He-Ne 激光照射对瘤细胞培养上清 TNF 活性的影响

Table 2 Effect on TNF activation by He-Ne laser irradiation of the tumour culture liquid

group	OD	<i>P</i>	TNF/pg/mL	<i>P</i>
—	0.032 \pm 0.003		31.285 \pm 2.081	
—	0.038 \pm 0.002	< 0.01	39.746 \pm 3.980	< 0.01
—	0.042 \pm 0.005	< 0.01	45.782 \pm 2.974	< 0.01

表 3 He-Ne 激光照射对瘤细胞 TNF 受体的影响

Table 3 Effect on TNFR by He-Ne laser irradiation of tumour cells

group	OD($\bar{x} \pm s$)	<i>P</i>	TNFR/pg/mL	<i>P</i>	absorb/%	<i>P</i>
—	1.765 \pm 0.387		4109 \pm 321		17.82	
—	1.396 \pm 0.095	< 0.01	3045 \pm 261	< 0.01	39.10	< 0.01
—	0.846 \pm 0.168	< 0.01	2812 \pm 373	< 0.01	43.76	< 0.01

表 3 表明 —, — 组小鼠 TNF 受体含量明显高于非激光组,有高度显著差异性($P < 0.01$)。

激光照射组 TNF 吸收率分别为 39.10%, 43.76%, 而非激光照射组仅为 17.82%, 吸收率比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。连续激光组与隔日激光组间比较, TNFR 浓度 ($P < 0.01$) 和 TNF 吸收率 ($P < 0.05$) 均有显著差异性。

从表 4 可见激光照射对肿瘤培养上清中 sTNFR 无明显的作用。激光组与非激光组、连续激光组与隔日激光组间比较, 均无显著差异性 ($P > 0.05$)。

表 4 He-Ne 激光照射对瘤培养上清可溶性 TNFR 的影响

Table 4 Effect on sTNFR by He-Ne laser irradiation of the tumour culture liquid

group	OD(x±s)	P	concentration of sTNFR/pg/mL	P
-	1.872±0.072		4924±155	
-	1.908±0.124	> 0.05	4941±184	> 0.05
-	1.892±0.212	> 0.05	4905±198	> 0.05

表 5 表明激光照射组 TNF 活性及 TNFR 表达率明显高于对照组, 而瘤细胞增殖率激光组明显低于非激光组, 组间比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 隔日激光组与连续激光组系列指标比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 5 瘤培养上清中 TNF, sTNFR 与瘤细胞增殖的相关性

Table 5 Relativity of the tumour culture liquid TNF sTNFR and the tumour cell multiplication

group	TNF/pg/mL	TNFR/%	tumour multiplication/%
-	31.285±2.081	17.82±6.02	238.7±25.6
-	39.746±3.980*	39.10±4.83*	106.3±13.5*
-	45.782±2.947*	43.76±5.13*	91.4±11.3*

* $P < 0.01$

3 讨 论

TNF 是由活化的巨噬细胞产生的具有细胞毒性的细胞因子。TNF 诱导的抗肿瘤效应是通过与瘤细胞表面的 TNF 受体相互作用而产生的, 因此 TNF 的抗肿瘤活性受肿瘤细胞表面 TNF 受体数目的影响^[3]。肿瘤患者常表现为 TNF 活性及 TNFR 减少。因此治疗肿瘤应提高带瘤机体 TNF 活性, 促进 TNFR 表达。本研究的主要目的是采用对人无损伤、病人易接受的 He-Ne 激光照射法, 以促进瘤组织内 TNF 及 TNFR 的表达。研究结果证明 He-Ne 激光具有增强 TNF 活性及促进膜 TNFR 表达的作用, 激光组 TNF 及 TNFR 明显高于非激光组, 组间比较 $P < 0.01$ 。

He-Ne 激光增强 TNF 及 TNFR 表达的机制是: 由于激光具有光、热、磁、压效应, 瘤细胞及巨噬细胞具有应激反应能力^[4]。当激光作用瘤区(脾区)时, 激光的穿透力为 1 cm, 因此激光光子击中细胞受体, 使瘤细胞及巨噬细胞跨膜电位形成, 膜电特性改变。细胞内转录酶活性增强, TNF 基因及 TNFR 基因活化, 产生 TNF 及 TNFR 量增多, TNF 及 TNFR 的表达量与激光光子的能量及光子数目有关, 光子的能量由辐照度和照射次数、时间决定, 这是激光的累加效应^[5]。因此研究结果证明连续激光组 TNF 及 TNFR 表达量明显高于隔日激光组。当 TNF 与瘤细胞表面的 TNFR 结合后, 由受体介导的内摄作用, 使 TNF 进入瘤细胞, 激活溶酶体酶使瘤细胞自溶。本研究为肿瘤的治疗展现一条新途径。

参 考 文 献

- 1 L. A. Tartaglia, B. Portman. Study of TNF antitumor. *Immunol Today*, 1992, **13**(5): 151~ 153
- 2 Yang Guizheng edit. Outline and Technique of Immunobiology and Engineering. Jilin: Publishing House of Science and Technology in Jilin Province, 1991. 195~ 197 (in Chinese)
- 3 H. Y. Song, B. T. Gemlo, A. Chong *et al.*. Study of TNFR activity by tumor cell. *Biochem J.*, 1995, **309**: 825 ~ 829
- 4 C. Salet. Photosensitization of isolated mitochondria hematoporphrin derivative effects on bioenergetics. *Photochem. Photobiol.*, 1992, **53**(3): 391
- 5 Gao Li, Wang Weizheng. Action of TNFR association protein in signal conduct. *Immunology Volume Foreign Medical Sciences*, 1991, **20**(6): 301~ 304

Study of Effect of He-Ne Laser Irradiation on TNF and TNFR Express Function in Mice with SP2/0 Marrow Tumour

Gao Meihua Feng Xianqi Gong Zhaolong Wang Haiyan Hu Tao
(Department of Immunology, Binzhou Medical College, Binzhou 256603)

Abstract A 24 mW He-Ne laser irradiation was applied to the spleen region to observe the changes in levels of the tumour necrosis factor (TNF) and TNF receptor (TNFR) in mice with tumour. The results showed that TNF and TNFR were significantly higher in both of laser groups than control groups. It indicated that He-Ne laser not only enhances the level of TNF but also promotes the expression of TNFR.

Key words TNF, TNFR, marrow tumour, mice