

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.1999.01.03

# TNF- 和 IFN- 抑制肺腺癌 A549 细胞系生长的研究

姜正华 俞婉珍

**【摘要】** 目的 探讨肿瘤坏死因子(TNF-)和干扰素(IFN-)联合应用对人肺腺癌 A549 细胞系的细胞毒性作用。方法 实验分为空白组、对照组、TNF-组、IFN-组及 TNF- + IFN-组,应用 MTT 比色法检测各组的 OD 值,计算其抑制率。结果 TNF- 和 IFN- 对人肺腺癌 A549 细胞系均有直接抑制作用,联合用药能明显提高 TNF- 对 A549 细胞系的抑制效应。结论 TNF- 和 IFN- 对人肺腺癌 A549 细胞系有明显的协同抑制效应,这些结果将为临床上肺癌等肿瘤的综合治疗提供实验依据。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子 干扰素 协同效应 肺腺癌

## Antitumor effect of tumor necrosis factor and interferon on human lung adenocarcinoma A549 cell line

Jiang Zhenghua, Yu Wanzhen. Department of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To explore the synergistic antitumor effect of tumor necrosis factor (TNF-) and interferon (IFN-) on human lung adenocarcinoma A549 cell line. **Methods** Cell growth inhibition was determined by MTT colorimetry assay. **Results** Both TNF- and IFN- showed directly growth inhibition on human lung carcinoma A549 cell line. IFN- could enhance cell growth inhibition effect of TNF- when used together. **Conclusion** TNF- and IFN- displayed significant synergistic antitumor effect on human lung adenocarcinoma A549 cell line. These results give experimental evidence for the multimodality therapy of human lung cancer and other tumors.

**【Key words】** Tumor necrosis factor Interferon Synergistic effect Lung adenocarcinoma

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和干扰素(interferon, IFN)是细胞因子网络中的重要组成部分,具有强大的抗肿瘤作用和协同效应。本研究观察了重组人肿瘤坏死因子(rhTNF-,简称 TNF-)和重组人干扰素(rhIFN-,简称 IFN-)对人肺腺癌 A549 细胞系的生长抑制作用,现报告如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人肺腺癌 A549 细胞系,购于上海细胞生物研究所;RPMI1640 培养基,为日本生产,实验时配制(含 15%小牛血清、青链霉素各 100U/ml,L-谷氨酰胺 200mg/L),pH 为 7.2~7.6;MTT 由 Fluka 提供;TNF- 由南京大学生化系提供;IFN- 由上海克隆生物高技术有限公司提供。TNF- 和 IFN- 分别用除菌培养基配成 50 000U/ml 高浓度母液,-20℃ 冰箱保存,工作液再用培养基稀释至相应浓度。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 A549 细胞培养于 RPMI1640 培养液中,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,2~3 天后用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

**1.2.2 实验分组** 整个实验设空白调零组(加培养基 200μl)、细胞对照组(单细胞悬液 100μl + 培养基 100μl)、实验组(单细胞悬液 100μl + 各处理因素 100μl)。实验组又分为 TNF- 组、IFN- 组及联合用药组。

**1.2.3 生长抑制率测定** 采用 Mossman<sup>[1]</sup>的 MTT 比色法,略加改进。将消化计数的单细胞悬液调至 4 × 10<sup>5</sup>/ml 加入 96 孔培养板中,每孔 100μl,实验组加药物 100μl,每组设三个复孔,在培养箱中培养 72 小时后,每孔加入 40μl MTT 液(5mg/ml)继续培养 4 小时后,弃上清液。每孔加入二甲基亚砷 100μl,振荡 5 分钟,使 MTT 还原产物完全溶解,用 DG-3200A 型酶联免疫检测仪测定各孔 OD 值,波长 570nm,抑制率 % = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

**1.3 统计学处理** 结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,实验组与对照组比较采用 t 检验,各观察组之间比

## 2 结果

2.1 TNF- 及 IFN- 对 A549 细胞系的毒性作用 各浓度组的 TNF- 及 IFN- 对 A549 细胞均有直接抑制效应 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。TNF- 在 500、1 000U/ml 浓度时抑制率最高,分别为 23.26%、22.70%。IFN- 在 500、1 000U/ml 浓度组时,抑制率高于相应浓度组 TNF- 的抑制率(组间比较  $q$  值分别为 3.89 和 6.44,  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 TNF- 及 IFN- 对人肺腺癌 A549 细胞系的毒性作用

Tab 1 Growth inhibition effect of tumor necrosis factor and interferon on human lung adenocarcinoma A549 cell line

Groups	OD value	Growth inhibition rate (%)	P value
Control	0.903 ± 0.037		
TNF- (1 000U/ml)	0.698 ± 0.077	22.70	< 0.01
TNF- (500U/ml)	0.693 ± 0.079	23.26	< 0.01
TNF- (100U/ml)	0.785 ± 0.065	13.07	< 0.01
TNF- (50U/ml)	0.806 ± 0.045	10.74	< 0.01
IFN- (1 000U/ml)	0.538 ± 0.072	40.42	< 0.01
IFN- (500U/ml)	0.563 ± 0.132	37.65	< 0.01
IFN- (100U/ml)	0.727 ± 0.156	19.49	< 0.05
IFN- (50U/ml)	0.819 ± 0.080	9.30	< 0.05
TNF + IFN (1 000U/ml)	0.365 ± 0.045	59.58	< 0.01
TNF + IFN (500U/ml)	0.430 ± 0.041	52.38	< 0.01
TNF + IFN (100U/ml)	0.536 ± 0.100	40.64	< 0.01
TNF + IFN (50U/ml)	0.725 ± 0.161	19.71	< 0.05

2.2 联合用药与单独用药细胞毒性的比较 除 50U/ml 浓度组外,联合用药组与单独用药组的抑制率差别均有显著性 ( $P < 0.01$ ),联合用药组抑制率较高,这表明 TNF- 与 IFN- 有协同抗肿瘤效应。其中在 1 000U/ml 浓度组中,联合用药组的抑制率为 59.58%,高于单独用 TNF- 的 22.70% 和单独用 IFN- 的 40.42%。

## 3 讨论

TNF 和 IFN 是免疫细胞产生的多功能的细胞因子,它们对多数肿瘤具有抑制作用,两者之间还有协同抗肿瘤作用,因此它们与肿瘤的关系密切。

国内外研究表明:TNF 对许多肿瘤细胞如前列腺癌细胞系 PC3、DU145、LNCAP 及某些白血病细胞系 U937、Raji 等具有明显的抑制生长作用,而对正常细胞无细胞毒性作用<sup>[2]</sup>。贾庆兰等<sup>[3]</sup>研究了 TNF 对 13 种肿瘤细胞的抑制作用,发现 BT20、HT144、HEP 等肿瘤细胞系在 1 000U/ml 以下浓度的 TNF 作用下,就显示出明显的抑制细胞生长作用,而某些细胞系如 SK-CO-1 等在 50 000U/ml 以上也未显示出抑制效应。我们的

研究显示:各浓度的 TNF- 对 A549 细胞均有毒性作用,其最高抑制率为 23.26%,肺腺癌 A549 细胞系对 TNF- 属低敏感,这与贾庆兰<sup>[3]</sup>的报道是一致的。IFN- 是第一个用于癌症治疗的细胞因子,IFN- 可使多种肿瘤细胞溶解,能直接抑制或杀死癌细胞。本实验表明 IFN- 对人肺腺癌 A549 细胞系具有直接抑制作用,且抑制作用较 TNF- 强。

Suarez 等<sup>[4]</sup>研究了 13 种肺癌细胞系对 TNF- 及 IFN 的敏感性,结果显示 TNF- 能明显抑制大细胞肺腺癌 H157 细胞系的增殖,而对所有的 SCLC 系不敏感;IFN 对某些 SCLC 细胞系如 H82 敏感,但长期使用会引起癌细胞的耐药性。这些均提示不同种类肿瘤或相同种类肿瘤的不同克隆群对 TNF、IFN 的敏感性有一定差异,长期单独应用会产生肿瘤细胞对它们的耐受,细胞抑制效应可能是其主要机理。动物实验也表明:TNF 及 IFN 对部分小鼠移植瘤有抑制生长作用,并可抑制肿瘤的肺转移,延长其寿命。

IFN 能显著提高 TNF 的抗肿瘤活性已为大量研究结果所证实,联合应用低剂量的 IFN 和 TNF 作用于体外培养的人结肠癌细胞系 HT-29、人 HeLa 等肿瘤细胞系,可表现出显著的细胞增殖抑制和溶解杀伤效应<sup>[5,6]</sup>。本研究结果表明:联合应用 IFN- 和 TNF- 能显著提高对 TNF- 不敏感的人肺腺癌 A549 细胞系对 TNF- 的敏感性,其抑制率均明显高于单独使用任何一种细胞因子的抑制率,并可在不减低杀伤效应的前提下,减少 TNF- 的用量。这种协同效应的机理尚不完全清楚。有研究表明 TNF 和 IFN 是通过不同作用环节协同增强抗肿瘤作用:通过增强肿瘤细胞 TNF 受体表达而增强抗肿瘤作用;IFN 协同 TNF 减少蛋白质合成,使细胞损伤修复减少,细胞毒性作用增强;TNF 和 IFN 的协同性还与这两种细胞因子的作用时期与环节有关,TNF 作用在 G<sub>2</sub> 或 M 期,而 IFN 作用于 S 期,两者联用可增强抗肿瘤作用。Mcintosh 等<sup>[7]</sup>研究发现,联合应用 TNF- 和 IFN- 可使小鼠的肿瘤消退,寿命延长及生存率提高,其作用优于单独使用任何一种细胞因子。鉴于 TNF、IFN 在体外实验和动物实验中均有一定抗肿瘤作用,人们在临床中试验性应用 TNF 和 IFN 治疗肿瘤,但效果并不使人满意,因而有待于进一步地研究其作用机理。

本研究结果显示 TNF- 和 IFN- 对人肺腺癌 A549 细胞系具有直接抑制增殖作用,但敏感性不高;两者联合应用具有显著协同抗肿瘤作用。TNF- 与 IFN- 可考虑作为临床上肺癌等肿瘤治疗的重要或辅助手段。

### 参 考 文 献

1 Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65 (1) 55-75.

2 伏爽. 肿瘤坏死因子的研究进展(综述). *国外医学免疫学分册*, 1993, 16(5) 252-257.

3 贾庆兰, Pichyangkl S, Khan A. 肿瘤坏死因子(TNF)的细胞毒作用. *中华微生物及免疫学杂志*, 1988, 8(1) 25-28.

4 Suarez PE, Bjorklund G, Larsson R, et al. Effects of interferons and tumor necrosis factor alpha on human lung cancer cell lines and the development of an interferon resistant lung cancer cell line. *Acta Oncol*, 1996, 35(3) 473-

478.

5 肖成祖主编. 干扰素研究进展和技术. 第1版. 北京:人民军医出版社, 1991. 12-14.

6 曹蕾主编. 癌症新疗法——细胞因子疗法. 第1版. 北京:北京科学技术出版社, 1993. 150-160.

7 McIntosh JK, Mule JJ, Kosmick JA, et al. Combination cytokine immunotherapy with tumor necrosis factor, interleukin-2 and -interferon and its synergistic antitumor effects in mice. *Cancer Res*, 1989, 49(6) 1408-1416.

(收稿:1998-09-15 修回:1998-11-27)  
(本文编辑 张世雯)

## 病例报告

# 应用血管内支架治疗晚期肺癌伴上腔静脉综合征一例

刘宝江 单学键 冯海华

上腔静脉综合征(superior vena cava syndrome, SVCS)是中心型肺癌的严重并发症,起病急,发展快,短期内危及生命。我院采用血管内支架治疗晚期右侧中心型肺癌伴SVCS 1例,取得较好疗效,现报告如下。

### 1 临床资料

1.1 病例 女,73岁,因胸闷气短、咳痰带血并双上肢肿胀半个月入院。体格检查,一般状况差,端坐位,头面部及双上肢肿胀,颈静脉及胸壁静脉怒张,上腔静脉压33 cmH<sub>2</sub>O,胸部X线片及彩色多普勒超声检查:右侧肺门高密度灶,右侧胸腔积液,心包积液,右肾转移癌。病理诊断为腺癌。入院后经利尿、消炎等治疗,SVCS症状无缓解,头面部肿胀加重,按KPS计分<50分,不能耐受冲击化疗及放疗,并出现口唇紫绀、嗜睡,静脉压高达40 cmH<sub>2</sub>O。为延长生命,决定进行上腔静脉支架放置术。

1.2 方法 右侧股静脉穿刺,送入5F导管行上腔静脉造影,见上腔静脉受压呈线状。在导丝引导下,用10F导管将上

腔静脉扩张,使其能顺利通过。通过发送器将国产Z型自扩式不锈钢支架放置于上腔静脉狭窄部位。术后抗炎及抗凝治疗1周。

1.3 治疗结果 支架放置术后,当天患者SVCS症状缓解,呼吸困难消失,3天后头面部肿胀消失,胸壁静脉怒张消失,1周测上腔静脉压正常,取得较好疗效。

### 2 讨论

SVCS是肺癌晚期严重的并发症。冲击化疗及放疗有效率均较低,且有部分患者因身体条件差,不能耐受治疗而死亡。血管内支架治疗SVCS是一种安全、有效、可靠的方法,可以在短时间内缓解症状。国外学者报告有效率可达98%<sup>[1,2]</sup>,近年来倍受重视。文献报告<sup>[3,4]</sup>,上腔静脉支架置入术是先行静脉造影,确定狭窄部位,再在狭窄部位行球囊扩张(PTA),然后将支架放置于所需部位。此种方法可能出现血栓脱落、肺栓塞、肺水肿、上腔静脉撕裂及支架移位等并发症,其发生率为1%~4%。本例患者年龄大,心功能差,为防止并发症,我们在造影后直接放置血管支架,不做PTA,依靠支架的扩张力而逐渐扩张,1周后达到完全扩张。此方法与常规PTA后再行支架治疗相比,无PTA造成

的瞬时血管张力突然增加,减少了上腔静脉撕裂的可能。支架依靠自身张力逐渐扩张,避免了PTA后回心血量突然增加而造成心功能不全和引起急性肺水肿的危险。可以避免因PTA扩张不合适而造成支架的移位。故此种方法更为安全、可靠,是一种延长患者生命,减轻患者痛苦,提高生存质量的较好方法,并为下一步的抗肿瘤治疗创造时机。

### 参 考 文 献

1 Rosch J, Uchida BT, Hall LD, et al. Gianturco-Rosch expandable Z-stents in the treatment of superior vena cava syndrome. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 1992, 15(5) 319-327.

2 Kishi K, Sonomara T, Mitsuzane K, et al. Self-expandable metallic stent therapy for superior vena cava syndrome: Clinical observations. *Radiology*, 1993, 189(2) 531-535.

3 王茂强,张金山,邢冲冲,等. 上腔静脉狭窄及阻塞的介入性开通治疗. *中华放射杂志*, 1995, 29(7) 452-456.

4 常钢,郭启勇,刘兆玉,等. 经皮血管内支架置入术治疗腔静脉狭窄. *中华放射杂志*, 1995, 29(7) 457-460.

(收稿:1998-09-10 修回:1998-10-27)  
(本文编辑 李蓓兰)

作者单位:110003 沈阳军区解放军202医院肿瘤科