

旧结核菌素抗癌效应的实验研究

张家华 王宇 陈剑¹ 刘德岷² 田全²

(附院肿瘤科)

提要 报告了旧结核菌素具有抗癌活性的实验资料。给荷肝癌(腹水型)昆明小白鼠腹腔注射5%旧结核菌素0.5ml/日共9天,其生命延长率达76%($P < 0.05$),采用死活细胞计数法及克隆形成法对小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)及鼠肝癌细胞进行体外抑癌试验,其结果表明对上述瘤株具有杀伤效应,五万分之一浓度的旧结核菌素的SP2/0即有明显的抑制效果,从而解释了活动性结核罕见合并肺癌及白血病并存活动性结核时白血病可发生自发性缓解的临床现象。

关键词 旧结核菌素; 抗癌作用; 鼠

结核病与癌瘤的关系多年来一直存在争议,尤其表现在结核与肺癌或白血病方面。有些学者观察到活动期结核罕见并发肺癌或与肺结核紧密衔接的肺区不易发生癌肿,结核病变可阻止癌性早期淋巴转移、结核病变将推迟癌向胸膜波及等。但当结核趋向治愈时,肺癌的发生率增加,钙化的淋巴结、结核灶瘢痕、陈旧性病灶、局部支气管扩张、空洞等可为癌的先驱病变⁽¹⁾。在白血病方面,有些学者提出白血病并存活动性结核时,由于结核的作用,可使白血病发生“自发性缓解”,白血病浸润可以消失,白血病性骨髓增生可转变为再生障碍以致缺乏白血病相应的病理改变,使诊断(包括病理诊断)变为困难⁽²⁾。

我们采用旧结核菌素对荷肝癌小鼠进行治疗试验,并对鼠肝癌细胞、小鼠骨髓瘤细胞进行体外培养试验,取得了令人乐观的结果,现报告如下。

1. 徐州云龙医院
2. 徐州医学科学研究所

材料与方法

一、材料

1. 昆明种小白鼠(18~22g)雌雄各半,徐州医学院动物房提供。
2. 癌肿:鼠肝癌(腹水型)。江苏省肿瘤防治研究所提供;小鼠骨髓瘤SP2/0。由徐州市医科所细胞室提供。
3. 旧结核菌素:上海生物制品研究所提供。
4. RPMI1640:法玛西亚进口;
5. HEPES:Merck co进口。
6. 谷氨酰胺:上海化学试剂采购供应站进口分装。
7. 琼脂粉:上海化学试剂采购供应站进口分装。
8. 小牛血清:徐州马场湖奶牛场提供。

二、方法

1. 动物体内实验:选用健壮的18~22g昆明小鼠,随机分为4组:注射对照组10只,注射用药组10只;灌胃对照组10只,灌

胃用药组16只。均按1978年全国抗癌药物会议制定的《抗肿瘤药物体内筛选规程》进行。接种肿瘤后,于次日进行注射、灌胃治疗,注射治疗组每日腹腔注射5%旧结核菌素0.5ml,灌胃治疗组每日以10%旧结核菌素0.5ml灌胃;各对照组以等体积生理盐水注射,灌胃,连续9天,从开始用药的当天计算各组动物的生长天数。并计算各组动物的平均生存天数、统计学处理。

2. 体外抑瘤试验:将冻存于液氮中的SP2/0细胞复苏,从荷肝癌小鼠腹腔中抽取腹水,按常规培养细胞至对数增殖期,以完全RPMI1640培养液调整细胞至 2×10^5 个/ml(称调整细胞)备用。

死活细胞计数试验:将调整好的鼠肝癌细胞分装8个培养瓶中,每瓶3ml,随机分为二组;用药组:将10%旧结核菌素40ml/L、80ml/L、160ml/L、320ml/L四种剂量分别加入本组4瓶中,并编以1~4号;对照组各加入等量生理盐水,并编5~8号。各瓶每24小时换液一次,每次换液所加药物量不变;各瓶每隔24小时取样50 μ l,以台盼兰染色法计死活细胞百分率,共3次,取其均数。

克隆形成试验(单层琼脂培养法):

“双倍RPMI1640”培养液配制:按RPMI1640培养液配制方法配制,但各试剂用量均按常规用量加倍即可。将琼脂粉用三蒸水配成0.6%,沸水浴30分钟,溶化消毒、置39~40℃保温备用,取其10份与8份双倍RPMI1640液混匀,仍置39~40℃保温备用;将培养至对数增殖期的鼠肝癌细胞,SP2/0

细胞用双倍RPMI1640培养液调整到 10^6 个/ml,取2份与上述琼脂-双倍RPMI1640混合液混匀,于96孔板中每孔加入混合液0.1ml,将旧结核菌素用RPMI1640完全培养液配成2.5%、5%、10%三种浓度,每浓度各加入12孔,每孔0.1ml;另外于12孔中各加0.1RPMI1640培养液,作为对照组。置37℃、5%CO₂环境下培养,5天后观察结果,以30~50个细胞为一个集落(克隆)。

结 果

一、旧结核菌素对鼠肝癌(腹水型)的治疗结果见表1。

表1显示:在用药治疗期间,各组动物都有死亡,在计算生存天数时,都以用药当天开始计算。注射治疗组和对照组经t检验($P < 0.05$),差异显著,而灌胃治疗组与对照组($P > 0.05$)差异不显著。

二、体外抑制试验结果见表2,表3。

1. 从表2、表3可以看出,旧结核菌素对SP2/0细胞的生长具有明显地抑制作用。

2. 旧结核菌素对鼠肝癌(腹水型)细胞体外培养抑制结果见表4。从表4可以看出鼠肝癌细胞生长较SP2/0迅速,故所需旧结核菌素的抑制浓度也大。

讨 论

有文献报告:1. 活动性肺结核患者很少合并肺癌。2. 肺癌或白血病患者合并活动性肺结核时,肺癌病情变得缓和或白血病可“自发性缓解”。3. 结核合并肺癌用利

表1. 旧结核菌素对鼠肝癌(腹水型)疗效观察

		接种癌细胞动物数 (只)	用药结束时动物数 (只)	平均生存天数 $\bar{X} \pm SD$	P值
注射	对照组	10	9	12.9 ± 3.14	<0.05
	治疗组	10	7	22.8 ± 10.55	
灌胃	对照组	10	9	12.09 ± 3.14	>0.05
	治疗组	16	11	11.4 ± 4.69	

表 2. 旧结核菌素对 SP 2/0 细胞的杀伤作用

	40ml/L组死亡率(%)			80ml/L组死亡率(%)			160ml/L组死亡率(%)			320ml/L组死亡率(%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
用药组	0	25	25	0	30	30	10	50	50	30	65	70

表 3. 旧结核菌素对 SP 2/0 细胞克隆形成的影响

	孔号及克隆形成数												X±SD	P值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
对照组	40	41	51	71	20	52	32	25	61	67	65	68	49.4±17.7	
0.2%组	7	11	2	6	7	2	3	5	7	3	2	2	4.8±3	<0.01
0.4%组	1	2	1	1	0	1	0	3	4	0	8	12	2.8±3.7	<0.01
0.8%组	1	1	1	0	0	0	0	7	3	2	0	0	1.3±2.1	<0.01

表 4. 旧结核菌素对鼠肝癌细胞克隆形成的影响

	孔号及克隆形成数												X±SD	P值
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
对照组	267	271	275	263	287	255	265	312	317	268	311	321	284±24	
2.5%组	261	272	252	261	217	160	215	252	261	232	241	253	226±70	<0.01
5%组	181	170	203	187	125	113	215	105	112	288	117	113	161±56	<0.01
10%组	10	9	16	5	8	13	22	9	11	13	17	15	12±5	<0.01

福平等联合化疗后、结核好转肺癌加速增殖,而停利福平等药后肿瘤可自行缩小⁽³⁾。也有报告于肺癌切除后,将BCG接种于胸腔内,有抗复发的作用⁽⁴⁾。对于这些现象,一般多用结核杆菌促进细胞免疫来解释。在严重活动性肺结核时,细胞免疫常呈“瘫痪状态”,结核菌素皮内试验可为阴性,而结核趋向治愈时,结核菌素皮内试验呈强阳性,而这种阳性反应常持续终生,这就难以解释肺结核硬结钙化期肺癌发病率增加,为此我们进行了旧结核菌素抑瘤的实验室研究。

旧结核菌素是结核杆菌于液体培养基中培养4~8周后,加热灭活及浓缩而成,其中含结核菌的代谢产物、细胞壁、菌体以及培养成份。也就是说除加热所能破坏的成分外,还包括结核菌及代谢产物的全部成分。为了避免由于给动物注射旧结核菌素,所造成体内变化因素,包括免疫反应因素的影响,我

们还做了体外抑制试验,获得了和体内试验的一致结果,进而说明:结核杆菌及其代谢产物有抑制或杀伤肿瘤细胞作用,腹腔注射组中有4只小鼠用药后腹水完全消退,但停药后腹壁有多处种植瘤生长,可能是皮下浓度低于腹腔,有部分瘤细胞未被杀死所致。灌胃组无效可能与旧结核菌素被消化液破坏或其抗癌活性物质不能被消化道吸收有关。在体外抑瘤试验中,杀灭骨髓瘤细胞远较肝癌细胞所需浓度为低,这也与临床观察相符。当然,在活动性肺结核患者中,肺癌的发病率低,免疫反应也可能是其中一个因素。

早在1854年,Rokintanky就首先提出肺结核与肺癌有对抗性,他认为历患结核之处、几乎不易患癌,反之癌多发生在结核少其的食管、胃、子宫、直肠等。看来这种观点是不无道理的。

(下转第276页)

强,头节外伸时还可见到吸盘。本文病例体征典型,诊断明确。但在对本病缺乏认识、或虫体位置特殊、色素膜反应而又缺乏典型体征时,常可误诊为视网膜脱离、视神经乳头水肿、色素膜炎,甚或误为恶性肿瘤而误摘眼球者。故强调提高对本病的认识,加强对全身和眼部的详细检查,必要时可用囊尾蚴液作皮内反应和补体结合试验,以作出正确诊断,及时处理。

治疗上应早期手术取出包囊。本病采用虫栖居相应处之巩膜“∩”形切口,巩膜内

脉络膜斜形直线切口,可在最小切口范围内获得相应较大之术野,既有利于虫体的准确摘除,且可错开巩膜与脉络膜的切口,因而具有保护脉络膜等眼内组织的优点。囊尾蚴在眼内是可以移动的⁽⁸⁾,故术时,在切开脉络膜前,应再次检查眼底,观察虫体是否仍在原位,如是,则按计划进行手术。如虫体移动,则另取切口,如已切开脉络膜,虫体移动,可用斜视钩将虫体驱赶至切口取出。

参 考 文 献

1. 郭秉宽,等。中国医学百科全书眼科学。上海:上海科学技术出版社,1985:163。
2. 袁华音。视网膜下猪囊尾蚴二例。眼底病 1989; 3(2):116。
3. 冯化德,等。视乳头、黄斑部猪囊尾蚴各一例。眼底病 1989; 5(2):111。
4. 王延华,等。眼与全身病。天津:天津人民出版社,1975:171。
5. 丁一心。脑眼猪囊尾蚴眼部改变一例 1989; 5(1):54。

(1991-08-11 收稿)

(上接第273页)

参 考 文 献

1. 陆生钧。肺结核与肺癌的关系及其并存的诊断(综述)。中华结核和呼吸系统杂志 1982; 5(4):125。
2. 陈泊。结核病与白血病。中华内科杂志 1965; 13(3):265。
3. 王君寿。肺结核病人利福平治疗后肺癌增殖加速。实用内科杂志 1988; 8(11):581。
4. Mckneally MF, et al. Regional immunotherapy of lung cancer with intrapleural LCG. Lancet 1976; 1:377。

(1991-03-02 收稿)