SEC 治疗胶质瘤的体外实验

王 凡 黄 强 周丽英

[摘 要] **目的** 观察 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤的杀伤作用。**方法** 分离并培养外周血淋巴细胞，培养液中加入不同浓度的 SEC，将淋巴细胞与胶质瘤细胞(SHG－44、MGR_2、MGR_3、SF_{767}、SF_{295}、SKMG－1、T98G 及 UW_{28})混合培养，按 MTT 法测定淋巴细胞对瘤细胞的杀伤作用。**结果** 经 SEC 活化的淋巴细胞对 8 株胶质瘤均产生强大的杀伤，其中以 10 μ/ml 剂量组作用最明显。SEC 作用的第一天，淋巴细胞就被激活并对胶质瘤细胞产生杀伤，第三天杀伤率达到峰值。**结论** SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤细胞有明显的抗瘤活性。

[关键词] 超抗原；胶质瘤；金葡菌肠毒素 C 型；免疫治疗

Experiment study on SEC against glioma in vitro

Wang Fan, Huang Qiang, Zhou Liying

Department of Radiation Oncology, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022

[Abstract] **Purpose** To observe the anti－glioma effects of lymphocyte activated by SEC. **Methods** Phripheral blood and lymphocytes were separated from human blood cultured. SEC was added into medium in different concentration, then , lymphocyte and glioma cells(SHG－44、MGR_2、MGR_3、SF_{767}、SF_{295}、SKMG－1、T98G and UW_{28}) were cultured mixly in proportion as 10:1. The cytotoxicity effects of lymphocyte against glioma were evaluated by MTT method. **Results** Lymphocyte activated by SEC has killing activity against 8 glioma cells and the group of 10 μ/ml has showm the stronger killing activity in 4 groups, the lymphocytes were activated fast at the first day of using SEC and it produced killing effect against 8 glioma strains, this killing effect reached peak at the third day. **Conclusion** Human lymphocyte activated by SEC have obviously anti－tumor activity on 8 glioma strains.

[Key words] Superantigen; Glioma; Staphylococcal enterotoxins C; Immmunotherapy

金葡菌肠毒素 C 型(staphylococcal enterotoxin C，SEC)属外源性超抗原，可不通过抗原呈递细胞(antigen presenting cell，APC)加工而直接与 MHC－II 类分子非限制性结合[1]，随后同 TCRVβ 片断结合而激活 T 淋巴细胞[2]，进而将其分化成杀伤力很强的细胞毒 T 淋巴细胞[3]及分泌多种足量的细胞因子，从而对肿瘤细胞进行杀伤[4,5]。但关于超抗原活化淋巴细胞对胶质瘤的杀伤实验尚未见报道。我们共应用 SHG－44、MGR_2、MGR_3、SF_{767}、SF_{295}、SKMG－1、T98G 及 UW_{28} 等 8 株胶质瘤细胞，用 MTT 法观察 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤细胞的体外杀伤效果。

材料和方法

一、实验材料

1. 仪器：相差显微镜：NIKON，日本。二氧化碳培养箱 ESOE－BAN－311，日本。离心机：LD4－2A 北京医用离心机厂。全自动酶联免疫检测仪：HYPERION，USA

2. 主要试剂：SEC：沈阳协合制药厂。FICOLL－HYPAGUE 淋巴细胞分离液：比重 1.077±0.020，上海试剂二厂。MTT(3－(4,5－Dimethyl thiazoly1－2)－2,5－diphenyl tetrazolium bromide，噻唑蓝)：华美生物工程公司。RPMI1640 培养液，SIGMA 公司。小牛血清：杭州四季青生物工程材料研究所。

3. 细胞株：人脑胶质瘤 SHG－44 由苏州大学附二院黄强教授惠赠。人脑胶质瘤 MGR_2、MGR_3、SF_{767}、SF_{295}、SKMG－1、T98G、UW_{28} 由加拿大麦吉尔大学 PANASCI 教授惠赠。

二、实验方法

1. 淋巴细胞的分离培养及活化：取健康志愿者静脉血 50 ml(肝素 1 250 单位)，100 mlPBS 稀释，小心加入等体积的淋巴细胞分离液上层，2 000 转/分离心 20 分钟，小心吸出中层的外周血单个核细胞层，加 5 倍 PBS 稀释，1 000 转/分离心 5 分钟，弃上清，将沉淀置于 RPMI1640 完全培养基(含 20% 小牛血清，青链霉素各 100 μ/ml)，37℃5%CO_2 饱和湿度下培养，在

作者单位：230022 合肥 安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科
苏州大学附二院脑肿瘤研究室(黄 强，周丽英)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上述培养基中加入 SEC，使其液浓度分别为 20 μ/ml、10 μ/ml、5 μ/ml 及 2.5 μ/ml。

2. 靶细胞的制备：以 SHG－44、MGR_2、MGR_3、SF_{767}、SF_{295}、SKMG－1、T98G 及 UW_{28} 为靶细胞，常规解冻复苏，用 RPMI1640 完全培养基（含 20% 小牛血清，青链霉素各 100 μ/ml）传代培养。胰酶消化，PBS 洗涤二遍，用无色 RPMI1640 完全培养基调整靶细胞的浓度至 2×10^5 ml 待用。

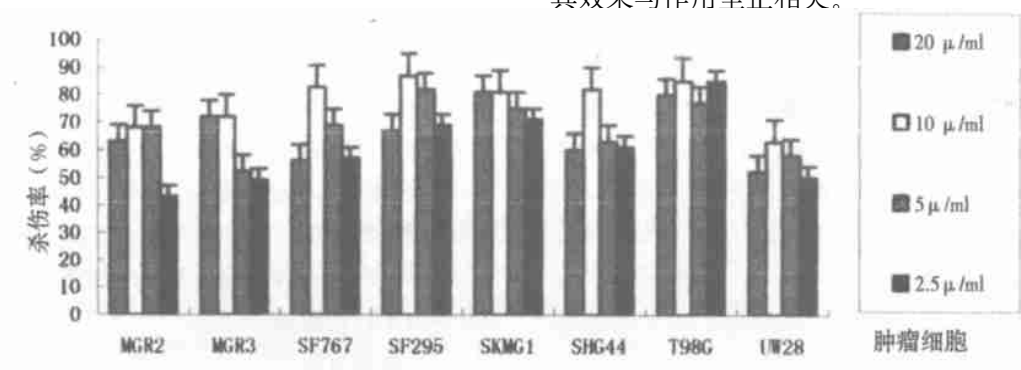
3. 体外细胞毒性实验与 SEC 的剂量关系：在 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μl 靶细胞培养液，约 1×10^4 个胶质瘤细胞。效应细胞为 1.4 中不同浓度 SEC 活化之淋巴细胞（作用时间为 72 小时），离心收集细胞，PBS 洗涤二遍，用无色 RPMI1640 完全培养基调整效应细胞的浓度 2×10^6/ml，取 50 μl（1×10^5 个效应细胞）加入相应的靶细胞孔内，使效应细胞与靶细胞的比例 10∶1，37℃5%CO_2 饱和湿度下孵育 24 小时。加入 10 μl（5 mg/ml）的 MTT，再置于 37℃5%CO_2 饱和湿度下继续孵育 4 小时。加入 100 ml 终止液异丙醇，适温 30 分钟，于酶联仪上，波长 570 nm 处测定 OD（Optical density，光密度）值。每组设置 4 个平行复孔，此外设置单独效应细胞对照孔，靶细胞对照孔及单独效应细胞液对照孔，根据下列公式计算杀伤率。

$$\text{杀伤率}=\frac{\text{靶细胞对照孔 OD 值}-(\text{实验孔 OD 值}-\text{效应细胞对照孔 OD 值})}{\text{靶细胞对照孔 OD 值}}$$

4. 体外细胞毒性实验与 SEC 作用时间关系：在 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μl 靶细胞，约 1×10^4 个胶质瘤细胞，效应细胞为 SEC（10 μ/ml）活化的淋巴细胞，分 6 个活化时间组，其活化时间分别为（0、1、2、3、4、5 日）离心收集细胞，PBS 洗涤二遍，用无色 RPMI1640 完全培养基调整效应细胞浓度至 2×10^6 ml，取 50 μl 淋巴细胞悬液（约 1×10^5 个淋巴细胞）加入至相应孔中，使效应细胞与靶细胞的比例 10∶1，混合培养 24 小时，采用 MTT 法计算杀伤率。

三、结果

1. 不同剂量 SEC 激活的淋巴细胞毒性实验比较：用 MTT 法检测淋巴细胞的细胞毒作用时，不同的 E/T 比对结果影响很大，E/T 过高或过低都不能真正反应淋巴细胞的功能，即杀伤率和 E/T 不能形成良好的线性关系。在实验过程中我们发现 E/T 比为 10 比 1 时，能较准确地反映淋巴细胞的杀伤功能。用 20 μ/ml、10 μ/ml、5 μ/ml 及 2.5 μ/ml 4 个剂量组的 SEC 对淋巴细胞进行诱导活化，将活化的淋巴细胞同胶质瘤细胞混合培养，应用 MTT 法观察杀伤率效应（附图），从中可看出，由 SEC 活化的淋巴细胞对八株胶质瘤细胞均产生较强大的杀伤作用。同时还可看出，随 SEC 剂量的不同，由其所激活的淋巴细胞对胶质瘤细胞所产生的杀伤效果亦不一样，其中以 10 μ/ml 剂量组的杀伤效果最强。在相差显微镜下可见：随 10 倍于靶细胞数量的淋巴细胞加入，肿瘤细胞迅速崩解呈碎片状，其效果与作用呈正相关。



附图 不同剂量的 SEC 的体外细胞毒效应

2. 不同作用时间的 SEC 激活的淋巴细胞毒性实验比较：用 10 μ/ml 的 SEC 对淋巴细胞进行诱导活化，设置不同的作用时间（0、1、2、3、4、5 日）。在 8 株胶质瘤中均发现：与未用药组（0 天）相比较，应用 SEC 的第一天，淋巴细胞迅速被激活并对胶质瘤产生较强的杀伤效应，随着时间的延长，杀伤效果持续上升，约第三天杀伤率达到峰值，随后，杀伤效果缓慢下降。我们还观察到：由于胶质瘤细胞株的不同，这种杀伤效果亦有差异。

讨 论

就体外细胞毒性实验与 SEC 的剂量关系结果而言，SEC 在一定作用时间内所激活的淋巴细胞对胶质瘤细胞产生的杀伤作用随 SEC 的剂量不同而不同，很

(C)1994-2025 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显然，不同剂量的 SEC 所激活的淋巴细胞数量、亚群类型及功能状态亦不一样。就体外细胞毒性实验与 SEC 作用时间的关系来看，其诱导的杀伤肿瘤细胞作用在其刺激淋巴细胞的第一天就迅速出现，最大杀伤活性在第 3～4 天，这与 Belfrage 的结果相一致[6]。超抗原依赖的细胞介导的细胞毒作用(Superantigen dependent cell mediated cytotoxicity SDCC)是一种非常迅速的 T 细胞介导的细胞毒作用，用皮克水平的超抗原可在数分钟内致敏 T 淋巴细胞并杀伤靶细胞[7]。有人在做超抗原的体内导向治疗的研究中发现，每日注射抗体——超抗原的抑瘤效果明显优于每 4 天注射一次者。在注射后 24～48 小时，血清中可检测到高水平和 IL－2、TNF－α、IFN－γ、和 CTL，再过 3 天机体进入弱反应期，产生细胞因子和 CTL 的能力开始下降，1～2 周后机体产生上述细胞因子和 CTL 的能力又恢复到起始水平，说明在注射超抗原 4～5 天以后，机体需要“休息”1～2 周才能接受下一阶段的治疗[8]。在本实验中，我们共选用 8 种不同的胶质瘤细胞系(株)，实验结果显示：经 SEC 活化的淋巴细胞对八株不同的胶质瘤细胞均产生强大的杀伤力，证实了 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤细胞攻击的可靠性和有效性。应用免疫效应细胞对相应靶细胞进行杀伤是肿瘤免疫学中的一项重要内容。在体外细胞实验过程中，淋巴细胞和瘤细胞共同孵育后，常需要分离并去除淋巴细胞和死亡的瘤细胞，仅保留存活的瘤细胞，以防止淋巴细胞的残存而使被还原的 MTT 增加，但由于淋巴细胞是半贴壁生长，难以有效、准确地与瘤细胞分离，因此，我们在进行淋巴细胞和瘤细胞共同孵育时，不进行分离处理，而是通过设定单独的淋巴细胞对照孔来消除淋巴细胞带来的影响。

参 考 文 献

1 Mollick JA. Class II MHC molecules are specific receptors for staphylococcus enterotoxin A. Science, 1989; 244: 817

2 Ogata M. Stimulation of leukaemia cell from T－cell leukaemia patients with bacterial superantigen. Br J Haematol, 1998; 3: 493

3 Litton MJ. Tumor therapy with antibody－targeted superantigen generates a dichotomy between local and system immune responses. Am J Pathol, 1997; 150: 1607

4 Langford MP. Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. Infect Immunol, 1978; 22: 62

5 Akatsuka H. Production of tumor necrosis factor by human T cells stimulated by a superantigen, toxin shock syndrome toxin －1. Clin Exp Immunol, 1994; 96: 422

6 Belfrage H. Combined activation of murine lymphocyte with staphylococcal enterotoxin and interleukin－2 results in addictive cytotoxin activity. Cancer Immunol Immuother, 1994; 265: 3

7 Lando M. Superantigen－induce cytokines suppress growth of human colon－carcinoma cells. Int J Cancer, 1993; 54: 482

8 Vehiyama Y. Mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infection disease. Microbiol Immunol, 1994; 91: 8945

(2004-8-10 收稿 2004-11-01 修回)

(上接 205 页)

尿中白蛋白、脂蛋白、转铁蛋白、补体和本周氏蛋白等对肾具有毒性作用，白蛋白可通过它携带的分子刺激间质炎症的发展，转铁蛋白被认为是肾小管毒性的一种介质，尿蛋白含量升高或尿蛋白比例改变，是肾小球损伤最早的临床表现，若已累及肾小管则预后更差[2]。为此，准确地了解尿液内各蛋白组分的含量及变化对肾脏疾病的诊断，鉴别诊断，指导治疗和判断预后颇具价值。采用 SDS－AGE 进行尿蛋白电泳具有敏感性高，通过 EDC 扫描可半定量分析，便于保存胶片资料，且不需预浓缩尿液，便捷易行等优点，值得推广。

参 考 文 献

1 吴惠毅、孙召东、刘安定，等. 尿蛋白 SDS－琼脂糖凝胶电泳实验方法建立及临床应用。浙江检验医学，2004；2(4)：5

2 Le Bricon T, Erilich D, Bengoufa D, et al. Sodium dodecyl sulfateagarose gel electrophoresis of urinary proteins: application to mulication myeloam [J]. Clinical Chemistry, 1998, 44(6): 1191～1197

3 沈 霞、张敏华、汪 萍，等. 非浓缩尿蛋白的临床应用。中华检验医学杂志，2001；24(5)：266

4 陈 晋、吴惠毅、沈来龙，等. 尿蛋白超薄琼脂糖凝胶电泳[J]. 临床检验杂志，1994；12(3)：158

(2005-02-10 收稿 2005-04-10 修回)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net