·基础研究·

胶质瘤抗原联合超抗原SEC诱导杀瘤性免疫细胞的实验研究*

刘洪梅 张晓群① 刘亚楠 马志红 张庆波

摘要 **目的**:使用胶质瘤可溶性抗原(GSA)联合超抗原SEC刺激外周血淋巴细胞,诱导产生杀瘤性免疫细胞,对胶质瘤细胞进行杀伤,探讨肿瘤免疫治疗新方法。**方法**:提取健康人外周血淋巴细胞,体外培养,并经GSA、超抗原SEC联合处理。流式细胞术(FCM)和细胞毒试验测定效应细胞表型和杀伤活性。**结果**:经GSA、超抗原SEC联合刺激的淋巴细胞组增殖活性最强,于72h达到高峰,并且上调CD8+T细胞群,联合刺激诱导的效应细胞对靶细胞杀伤活性显著高于单纯淋巴细胞组($P<0.05$)。**结论**:GSA与SEC联合应用诱导的效应细胞增殖快,细胞毒活性高,对抗原来源肿瘤细胞具有选择性杀伤作用。该实验研究为肿瘤免疫治疗提供了新的思路。

关键词 淋巴细胞 肿瘤可溶性抗原 超抗原 细胞表型

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.06.001

Induction of Tumor-killing Immune Cells by Glioma Antigen and Superantigen SEC

Hongmei LIU[1], Xiaoqun ZHANG[2], Yanan LIU[1], Zhihong MA[1], Qingbo ZHANG[1]

Correspondence to: Qingbo ZHANG, E-mail: zqb1955@yahoo.com

[1]Department of Biology, North China Coal Medical University, Tangshan 063009, China

[2]Department of ICU, Fengnan Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China

This work was supported by a grant from Science and Technology Support Program of Hebei Province (No. 09276418D-18)

Abstract **Objective:** To develop tumor-killing immune cells from peripheral blood lymphocytes using glioma associated Ag (GSA) and superantigen SEC and to explore a new method for immunotherapy. **Methods:** Lymphocytes were isolated from peripheral blood of healthy people and were then treated with GSA and superantigen SEC *in vitro*. Phenotypes and cytotoxic activity of the effector cells were measured by flow cytometry and cytotoxic assay. **Results:** The lymphocytes stimulated by GSA and SEC showed more proliferative activity than the control groups, with a peak effect at 72 h, and showed an increased proportion of CD8 + T cells. Co-stimulated effector cells had higher cytotoxic activity against target cells than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The effector cells induced by GSA and SEC have more rapid proliferation, higher cytotoxicity, and selective cytotoxicity against the tumor cells that initially produced the GSA. This study provides a new way of thinking for the development of immunotherapy treatment.

Keywords Lymphocyte; Glioma-associated antigen; Superantigen; Phenotype

恶性肿瘤已成为威胁人类生命和健康的主要疾病之一,其发病率仅次于心脑血管疾病,部分肿瘤患者在就诊时就已失去了手术机会,而放疗、化疗毒性反应大,无特异性。随着免疫学理论和分子生物学的不断发展,大量肿瘤抗原不断被发现[1-2],为肿瘤生物免疫疗法应用奠定了理论基础。本研究通过体外实验,应用胶质瘤可溶性抗原(glioma-associated Ag, GSA)联合超抗原金葡素C (staphlococcal enterotoxin C, SEC)刺激外周血淋巴细胞,诱导产生杀瘤性免疫细胞,对肿瘤细胞进行杀伤作用研究,探讨肿瘤免疫治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 SEC(药品名:金葡液,沈阳协和集团),CCK-8(武汉碧云天公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD19/CD3/CD4/CD8(美国BD公司),淋巴细胞分离液(天津TBD公司),RPMI-1640(Gibco公司)。

1.1.2 肿瘤细胞系 人胶质瘤U251细胞株、宫颈癌Hela细胞株由本校免疫学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的分离 采集健康献血者外周血,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,常规分离PBMC。37 ℃、5% CO_2孵箱培养90 min,收集

作者单位:华北煤炭医学院生物系(河北省唐山市063000);①唐山市丰南区医院ICU

* 本文课题受河北省科技支撑计划项目基金资助(编号:09276418D-18)

通信作者:张庆波 zqb1955@yahoo.com

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

未粘附细胞，即为淋巴细胞(L)。

1.2.2 肿瘤可溶性抗原制备 取处于对数生长期的胶质瘤U251细胞，0.25%胰蛋白酶消化，PBS洗2次，调整细胞浓度为10^8/mL，-80 ℃和37℃条件下反复冻融4次后，5 000 r/min，离心40 min，收集上清即为胶质瘤可溶性抗原。考马斯亮蓝法(Bradford法)测定蛋白含量，0.22 μm滤膜过滤，-20 ℃保存备用。

1.2.3 淋巴细胞增殖的测定 实验分四组：A:L；B:L+SEC；C:L+GSA；D:L+SEC+GSA；A作为对照组，B、C、D作为实验组。SEC浓度0.1 ng/mL，TSA浓度50 μg/mL。完全RPMI-1640培养液调整淋巴细胞浓度为10^6/mL，接种于96孔板，每孔100 μL，每孔加入含SEC(0.1 ng/mL)和/或GSA(50 μg/mL)的等体积的完全RPMI-1640培养液100 μL，各组设5复孔。分别于培养24、48、72、96 h使用CCK-8显色法测定细胞增殖能力，以刺激指数(SI)表示：SI=试验组OD值/对照组OD值。

1.2.4 细胞表型分析 完全RPMI-1640培养液调整淋巴细胞浓度为10^6/mL，接种于6孔板，每孔2 mL。实验分2组，对照组：L；实验组：L+SEC+GSA。每组4孔，培养第3天，收集细胞样品，每组各孔分别加入FITC标记的CD19/CD3/CD4/CD8，流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞毒活性检测 胶质瘤U251细胞和宫颈癌Hela细胞作为靶细胞，调其细胞浓度为10^5/mL。单独淋巴细胞组和经GSA、SEC联合刺激淋巴细胞组培养诱导的细胞作为效应细胞，调其细胞浓度为2×10^6/mL。两组效应细胞分别与U251，Hela细胞共同加于96孔板中，效/靶=20:1，另设单独效应细胞对照组和靶细胞对照组，每组3复孔。培养24 h后，CCK-8法测效应细胞对肿瘤细胞的杀伤率。肿瘤细胞杀伤率(%)=[1-(实验组OD值-效应细胞组OD值)/靶细胞组OD值]×100%。

1.3 统计学方法

实验结果以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 16.0软件包对数据进行统计学处理，多组间数据比较采用方差分析，显著性检验标准为$P<0.05$。

2 结果

2.1 不同刺激物对淋巴细胞增殖的影响

在96 h内，不同时间点各组体外培养的淋巴细胞增殖能力不同(图1)，在24～72 h之间时，每组淋巴细胞增殖能力随时间的增加而增强，各实验组均于72 h时细胞增殖最显著；但到96 h时，细胞增殖趋势开始下降。同一时间点，每组淋巴细胞增殖能力也不同，经GSA、SEC联合刺激的D组与A、B、C组比较，细胞增殖活性最高，于72 h达到高峰。

2.2 细胞表型分析

不同刺激条件下细胞培养3 d后诱导的效应细胞表型分析见表1；2组CD3均为阳性表达，表明所诱导的细胞为T细胞。对照组的CD8+T细胞只有27.32%，而实验组明显升高，为39.57%($P<0.05$)，说明所诱导的细胞为CD8+T细胞。实验组的CD4+T细胞与对照组比较，升高不显著。

2.3 效应细胞对靶细胞的杀伤效应

结果见表2，经胶质瘤TSA、超抗原SEC联合刺激的淋巴细胞组诱导的效应细胞对靶细胞杀伤活性为96.08%，显著高于单纯淋巴细胞组63.81%，对U251的杀伤活性高于Hela，差异有显著性意义($P<0.05$)。

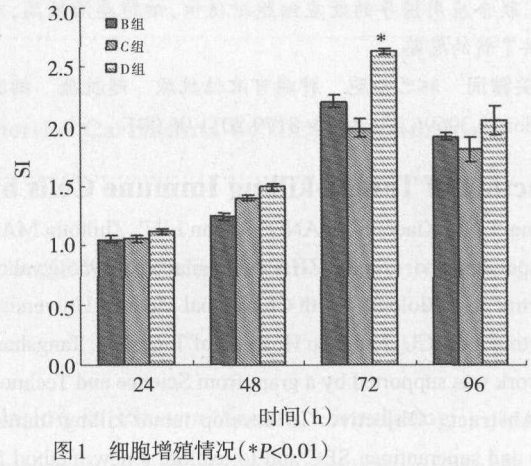


图1 细胞增殖情况(*$P<0.01$)

Figure 1 Detection of cell proliferation at different time points (*$P<0.01$)

表1 效应细胞表型的检测 ($\bar{x}\pm s$,%)

Table 1 Test of phenotype of effector cells ($\bar{x}\pm s$,%)

分组	CD3+	CD4+	CD8+
L	73.04±3.70	40.71±4.60	27.32±2.90
SEC+GSA	79.41±3.20	45.13±2.50	39.57±1.94*

*与对照组相比，$P<0.05$

表2 效应细胞对不同肿瘤细胞的杀伤作用 ($\bar{x}\pm s$,%)

Table 2 Comparison of cytotoxicities of effector cells to different tumor cells ($\bar{x}\pm s$,%)

分组	E:T	杀伤率	
		U251	Hela
L	20:1	63.81±3.51	65.56±3.41
L+SEC+GSA	20:1	96.08±2.11*	75.61±3.54**

**与Hela细胞组比较，$P<0.05$；*与对照组相比，$P<0.05$

3 讨论

金葡菌肠毒素(staphlococcal enterotoxin，SE)是一种具有高度生物活性的蛋白质，目前研究较多的细菌性超抗原，无需抗原提呈细胞(APC)加工处理，即可直接与APC膜上的MHC-Ⅱ类分子的抗原结合槽外侧非限定性的结合，以完整的蛋白质分子形式被提呈给T细胞，以TCRVβ特异性的方式激活T细

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

胞，促进细胞因子大量分泌，如：白细胞介素2，干扰素，肿瘤坏死因子，乃至集落刺激因子，对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤作用[3-6]，但超抗原没有抗肿瘤的特异性。肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发肿瘤免疫应答的关键，但大多数肿瘤细胞缺乏一种或多种成分，导致肿瘤抗原免疫原性弱或递呈缺陷，机体无法对肿瘤细胞进行有效的识别和杀伤，不能有效刺激机体免疫应答，使肿瘤处于免疫逃逸状态[7-8]。基于提高肿瘤抗原免疫原性，超抗原的靶向作用，本研究将胶质瘤可溶性抗原与超抗原SEC联合作用T细胞，保证了肿瘤抗原被有效摄取提呈，且可提高共刺激信号，诱导针对肿瘤抗原的免疫应答。本实验结果发现，胶质瘤可溶性抗原与超抗原SEC联合应用具有强大的活化效应细胞的能力，细胞毒活性高，对来源于抗原的肿瘤细胞具有选择性杀伤作用，显示出一定的肿瘤免疫治疗应用前景。但是，微量的SE就可激活大量的T细胞并分泌多种细胞因子，应用剂量不精确，就有可能引起机体免疫调节功能紊乱和导致发生一系列急慢性疾病等不良反应[9-10]，这就需要我们对SE的最佳剂量、肿瘤可溶性抗原与超抗原SEC诱发免疫反应机制及体内实验等方面做进一步的研究。

参考文献

1 Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy[J]. Nature, 2001, 411(6835): 380–384.

2 Monzavi–Karbassi B, Kieber–Emmons T. Behiatolah MK,Thomas KE. Current concepts in cancer vaccine straregies[J]. Bio Tech, 2001, 30(1): 170–172.

3 Matsushita K, Takenouchi T, Kobayashi S, et al. HLA–DR antigen expression in colorectal carcinomas: influence of expression by IFN–gamma in situ and its association with tumour progression[J]. Br J Cancer, 1996, 73(5): 644–648.

4 Pumphrey N, Vuidepot A, Jakobsen B, et al. Cutting edge: Evidence of direct TCR alpha–chain interaction with superantigen[J]. J Immunol. 2007, 79(5): 2700–2704.

5 D'Orazion JA, Burke GW, Stein–streilein J, et al. Staphylococcal enterotoxin B activated purified NK cells to secrete IFN–γ but requires T lymphocytes to augment NK cytotoxicity[J]. J Immunol, 1995, 154(3): 1014–1023.

6 韩从辉,郑宝钟,田　军,等.超抗原诱导杀伤T细胞体内外对膀胱肿瘤的杀伤作用研究[J].中华肿瘤杂志,2000,22(5):392.

7 Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy[J]. Nat Immunol, 2001, 2(4): 293–299.

8 Hahnel PS, Thaler S, Antunes E, et al. Targeting AKT signaling sensitizes cancer to cellular immunotherapy[J]. Cancer Res, 2008, 68 (10): 3899–3906.

9 黄常新,王青青.超抗原的免疫功能及其作用机制研究现状[J].国外医学免疫学分册,2003,26(6):287–292.

10 黄　杨,尹　文,张秀敏,等.葡萄球菌肠毒素A体内诱导小鼠T细胞增殖的实验研究[J].现代肿瘤医学,2009,17(1):28–31.

（2010–08–27收稿）
（2010–12–23修回）
（贾树明校对）

读者·作者·编者

参考文献的科学性审查

参考文献在科技期刊中具有标志、查验、检索、评价和保护功能。

按参考文献著录规定，凡是引用前人或他人的观点、数据和材料等情况，均须对其出处予以标明，并在文末列出参考文献表。顺序编码制较多见，按照引文先后顺序，用阿拉伯数字连续编号，在正文引用处加方括号标注在右上角。参考文献应为作者亲自阅读过的主要文献，近5年的文献应占70%以上。

为提高参考文献著录质量，除了严格遵守参考文献著录规定外，还要避免对"结论错误"文献的引用，这就要求作者须加强对参考文献的科学性审查，作者须仔细核对所引参考文献以确保各项内容准确无误，真正起到参考文献的功能作用。

我刊对投稿文章所引用的参考文献逐一进行严格的科学审查，如发现引用文献错误及格式不规范者，将予退稿处理。

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