Clinical Research · 临床研究

葡萄球菌肠毒素C 对胶质瘤的作用

王　凡[1*]，黄　强[2]，周丽英[2]
(1.安徽医科大学附一院肿瘤放射科，合肥　230022；2.苏州大学附二院脑肿瘤研究室，苏州　215000)

[摘要]　目的：观察经葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin C，SEC)活化的淋巴细胞对胶质瘤的体外杀伤作用，并观察SEC 联合手术、放疗、化疗对胶质瘤的治疗效果及SEC 诱导生成细胞因子作用。方法：常规分离并培养外周血淋巴细胞，其中加入不同浓度的SEC(2.5、5、10、20 U/mL)，将淋巴细胞和胶质瘤细胞(SHG-44、MGR2、MGR3、SF767、SF295、SKMG-1、T98G 及UW28)混合培养，按MTT 法测定淋巴细胞对瘤细胞的杀伤作用。37 例胶质瘤患者，均经手术切除，结合放疗、化疗，随机分为对照组、处理A 组(全身应用SEC)及处理B 组(局部应用经SEC 活化的淋巴细胞)，结合颅脑CT 片观察疗效。采用ELISA 法测定SEC 促淋巴细胞分泌IL-6、IL-12、TNF-α及IFN-γ作用。结果：经SEC 活化的淋巴细胞对8 株胶质瘤细胞均产生强大的杀伤作用，其中以10 U/mL 剂量组作用最明显。临床资料显示对照组有效率为40%，处理A 组及处理B 组有效率分别为50%及62.5%。经SEC 活化的淋巴细胞在作用的第1 天就分泌多种细胞因子，第3～5 天达峰值。结论：SEC 作为一种超抗原，体外实验证实被其活化的淋巴细胞对胶质瘤有明显的抗瘤活性，并能大量分泌IL-6、IL-12、TNF-α及IFN-γ等多种细胞因子。SEC 与手术、放疗、化疗结合能明显提高临床疗效。

[关键词]　超抗原；胶质瘤；综合疗法；葡萄球菌肠毒素C 型
[中图分类号]　R730.264　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1000-7431(2006)01-0078-04

Effects of *Staphylococcus* enterotoxin type C on glioma *in vitro*

WANG Fan[1*]，HUANG Qiang[2]，ZHOU Li-Ying[2]　(1.Department of Radiation Oncology，First Affiliated Hospital，Anhui Medical University，Hefei　230022，China；2.The Second Hospital Affiliated to Suzhou University，Suzhou　215000，China)

[ABSTRACT]　**Objective**：To observe the anti-glioma effects of lymphocytes activated by type C of staphylococcal enterotoxin (SEC) *in vitro*. To study the anti-glioma efficacy of combination of SEC with operation，radiotherapy，and chemotherapy and the effect of SEC on cytokine release. **Methods**：Lymphocytes separated from human blood were cultured with glioma cells (SHG-44，MGR2，MGR3，SF767，SF295，SKMG-1，T98G and UW28) in the presence of SEC at different concentrations (2.5，5，10，20 U/mL). The cell viability was evaluated by MTT method. After operation，radiotherapy，and chemotherapy，all 37 glioma patients were divided into three groups randomly：control group，treatment A group (SEC applying to whole body)，and treatment B group (SEC applying locally). The therapeutic results were analyzed by brain CT scan. Cytokine levels such as IL-6，IL-12，TNF-α，and IFN-γ in patient blood after injection of SEC were measured by ELISA method. **Results**：SEC-activated lymphocytes had strong tumor-killing activity against 8 different glioma cells *in vitro*. The antitumor effect was maximal at SEC 10 U/mL. Clinical data showed that the response rates (CR and PR) were 40%，50%，and 62.5% in control group，treatment A group，and treatment B group，respectively. SEC-activated lymphocytes secreted many kinds of cytokines at d 1 and the cytokine-secreting activity reached the peak at d 3. **Conclusion**：SEC is a superantigen. SEC-activated lymphocytes have obviously antitumor activity *in vitro* and release a lot of cytokines including IL-6，IL-12，TNF-α，and IFN-γ. SEC combined with operation，radiotherapy，and chemotherapy can greatly increase antitumor efficacy in clinic.

[KEY WORDS]　Superantigen；Glioma；Combined modality therapy；Staphylococcal enterotoxin C
[Tumor，2006，26(1)：78-81]

胶质瘤是人类最常见的中枢神经系统原发性肿瘤，尽管医疗人员采用了包括外科手术、放疗、化疗在内的综合治疗，但自1985 年以来，患者的存活率尚无提高。疗效不佳的原因，除手术的彻底程度，化疗及放疗的敏感性等因素外，胶质瘤细胞的低免疫原性，患者免疫功能低下等免疫生物学性质亦起着决定性作用。金色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxin，SE)作为一种超抗原，可以激活比普通抗原多达数千倍的淋巴细胞。国内外学者多应用SEA 和SEB 2 型进行抗肿瘤实验，SEC 则少见报道，其杀伤肿瘤细胞的机制尚未完全阐明。本研究

[作者简介]　王　凡(1965-)，男(汉族)，医学博士，副教授，副主任医师
*Corresponding author，Tel：0551-2922258
E-mail：wangfan1965@sina.com

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

观察SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤的杀伤作用,并对其作用机制进行探讨。

1　材料与方法

1.1　体外杀伤作用

1.1.1　仪器　相差显微镜(NIKON,日本),CO_2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)。

1.1.2　主要试剂　SEC(沈阳协合制药厂);FICOLL-HYQUE 淋巴细胞分离液,相对体积质量 1.077±0.020(上海试剂二厂);MTT(华美生物工程公司);RPMI 1640 培养液(Sigma 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);IL-6、IL-12、TNF-α、IFN-γ 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.1.3　细胞株　人脑胶质瘤SHG-44 由苏州大学附属二院黄强教授惠赠。人脑胶质瘤 MGR2、MGR3、SF767、SF295、SKMG-1、T98G、UW28 由加拿大麦吉尔大学Panasci 教授惠赠。

1.1.4　淋巴细胞的分离培养及活化　取健康志愿者静脉血 50 mL(加肝素 1 250 U),100 mL PBS 稀释,小心加入等体积的淋巴细胞分离液上层,2 000 r/min,离心 20 min,小心吸出中层的外周血单个核细胞层,加 5 倍PBS 稀释,1 000r/min,离心 5 min,弃上清液,将沉淀置于RPMI 1640 完全培养基(含 20%小牛血清,青霉素、链霉素各 100 U/mL,37℃ 5%CO_2饱和湿度下培养,在上述培养基中加入SEC,使其浓度分别为 20、10、5、2.5 U/mL。

1.1.5　靶细胞的制备　以SHG-44、MGR2、MGR3、SF767、SF295、SKMG-1、T98G 及UW28 为靶细胞,常规解冻复苏,用RPMI 1640 完全培养基(含 20%小牛血清,青霉素、链霉素各 100 U/mL)传代培养。胰酶消化,PBS 洗涤 2 次,用无色 RPMI 1640 完全培养基调整靶细胞的浓度至 2×10^5/mL 待用。

1.1.6　体外杀伤实验步骤及杀伤率　在 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μL 靶细胞悬液,约 1×10^4个胶质瘤细胞。效应细胞为不同浓度SEC 活化之淋巴细胞(作用时间为 72h),离心收集细胞,PBS 洗涤 2 次,用无色RPMI 1640 完全培养基调整效应细胞的浓度 2×10^6/ml,取 50 μL(约 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为 10∶1,37℃ 5% CO_2饱和湿度下孵育 24 h。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 h。加入 100 mL 终止液异丙醇,适温 30 min,于酶联仪上,波长 570nm 处测定 D 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。

$$\text{杀伤率}(\%)=\left(1-\frac{\text{实验孔 } D \text{ 值}-\text{效应细胞孔 } D \text{ 值}}{\text{靶细胞对照孔 } D \text{ 值}}\right)\times100\%$$

1.2　临床资料

1.2.1　一般资料　本组 37 例,均为苏州大学附属二院神经外科 1998 年 4 月～1999 年 12 月的住院患者,均经手术和病理切片证实为胶质瘤,为胶质瘤Ⅱ～Ⅲ级,均位于幕上,CT 扫描病灶直径≤5 cm。详细资料见表 1。

表 1　2 组病例临床资料

Table 1　Clinical data of two groups

Items	Treatment group		Control group
	A	B	
Number	12	8	17
Male	5	5	8
Female	7	3	9
Age (yr)			
Mean	45.7	46.8	39.5
Range	24-67	22-72	14-62
Kind and grade of glioma			
Astrocytic glioma (Ⅱ+Ⅲ)	5(1+4)	4(1+3)	8(2+6)
Glioblastoma (Ⅱ+Ⅲ)	3(1+2)	2(0+2)	5(1+4)
Oligodendroglioma (Ⅱ+Ⅲ)	2(1+1)	2(0+2)	3(2+1)
Ependymoma (Ⅱ+Ⅲ)	2(1+1)	0(0+0)	1(0+1)

1.2.2　分组及治疗　37 例,按单纯随机抽样法,查随机数字表分为对照组和治疗组。对照组采取传统综合治疗方法,即首先进行手术切除,肉眼范围内全切,术后 10d 予替尼泊甙 100 mg 静脉滴注,1 次/d,共 3d,洛莫司汀 100 mg 顿服,术后 1 个月全脑照射 DT 40 Gy/20 次,缩野继续照射至DT 60 Gy/10 次。处理组分 A、B 2 组。A 组,手术＋化疗＋放疗同对照组,但在手术同期加用SEC 1 000 U 静滴,隔天 1 次,共 7 次;B 组,手术＋化疗＋放疗同对照组,同时按1.1.4方法分离患者淋巴细胞,将其置于含SEC 10 U/mL 的 RPMI 1640 完全培养基中活化扩增,取 2×10^7个已激活的淋巴细胞,术后 2 周 10～14 d 经 Ommya 管向瘤床注入,隔天 1 次,共 7 次。

1.2.3　细胞因子测定　分别于应用SEC 前及用药后第 1、3、5、7 天抽取患者外周静脉血血清,置－20℃保存备用。ELISA 检测血清中TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-12。采用双抗体夹心法,取出已平衡至

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

室温的板条，加入标准品稀释液 100 μL 至空白孔和零孔，加入标本和已稀释的不同浓度的标准品各 100 μL 至相应孔中，用封胶纸封住反应孔，37℃ 90 min，洗涤液洗板 4 次，除空白孔外，每孔加入已稀释好的生物素标记二抗 100 μL，封住板孔，37℃ 60 min，洗涤液洗板 4 次，除空白孔外，每孔加入已稀释好的酶联物 100 μL，封住板孔，37℃ 30 min，洗涤液洗板 4 次，每孔加底物 A、B 各 1 滴，避光 37℃ 15 min，每孔加终液 1 滴，混匀，即刻在 450 nm 处读数。

2　结　果

2.1　体外杀伤试验　用 MTT 法检测淋巴细胞的细胞毒作用时，不同的效靶比(E/T)对结果影响很大，E/T 过高或过低都不能真正反映淋巴细胞的功能，即杀伤率和 E/T 不能形成良好的线性关系。在本实验过程中发现 E/T 比为 10∶1 时，能较准确地反映淋巴细胞的杀伤功能。用 20、10、5、2.5 U/mL 等 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 法观察杀伤效应(见图 1)。从图 1 可看出，由 SEC 活化的淋巴细胞对 8 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 U/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，其效果与作用时间呈正相关。

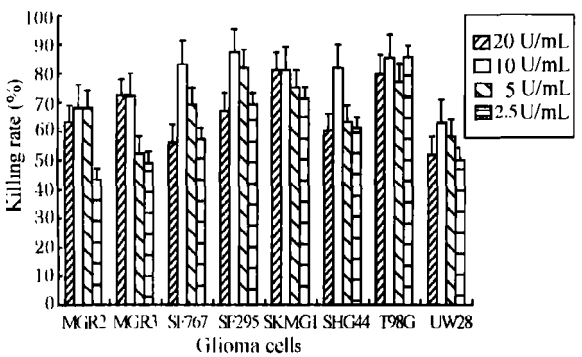


图 1　SEC 的体外细胞毒效应

Fig. 1　Cytotoxicty of SEC *in vitro*

2.2　临床疗效

2.2.1　疗效评定标准　参照 WHO 实体瘤评定标准分为：完全缓解(CR)，肿瘤完全消失≥4 周；部分缓解(PR)：肿瘤缩小≥50%，持续时间≥4 周；微效(MR)：肿瘤缩小＜50%，但≥25%，持续时间≥4 周；稳定(NC)：肿瘤缩小＜25%或增大≤25%，持续时间≥4 周；恶化(PD)：出现新病灶或原有病灶估计增大≥25%。有效率为 CR＋PR。

2.2.2　治疗结果　所有 37 例病例均于放疗结束时复查颅脑 CT，观察疗效，并于 1 个月后复诊，再次复查颅脑 CT，与术前 CT 片进行对比，根据 WHO 实体瘤评分标准确定疗效。对照组即传统手术＋化疗＋放疗治疗组，有效率为 40%；而处理组 A，在传统手术＋化疗＋放疗的基础上，加用 SEC，有效率为 55%($\chi^2=5.08$, $P<0.05$)，对照组与处理组间存有差异。其中，即在瘤床局部注入经 SEC 活化淋巴细胞的处理 B 组，有效率高达 62.5%，无 1 例出现恶化(见表 2)。处理 A 组有 2 例在应用 SEC 过程中出现发热反应，但体温低于 38℃，而且出现在用药的前 3d，继续用药，发热反应自行消退；1 例在静脉注射局部出现红肿，经对症处理局部红肿消退。处理 B 组通过 Ommya 管向瘤床注入由 SEC 活化的淋巴细胞，未见不适症状。

表 2　处理组与对照组之间疗效比较

Table 2　Comparison of efficacy between treatment and control groups

Group	*n*	Curative effect					Response rate (%)
		CR	PR	MR	NC	PD	
Control	17	0	7	6	2	2	40.0
Treatment A	12	1	5	3	2	1	50.0
Treatment B	8	1	4	2	1	0	62.5

2.2.3　细胞因子变化　从图 2 可看出胶质瘤患者应用 SEC 前，血清中 TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-12 浓度均较低，应用 SEC 后，细胞因子迅速上升，至第 3 天，细胞因子的分泌量达到峰值，但 IL-6 的峰值滞后，出现于第 5 天。从激活的效果看，以 TNF-α 的效果最为明显，IFN-γ 的效果最弱。

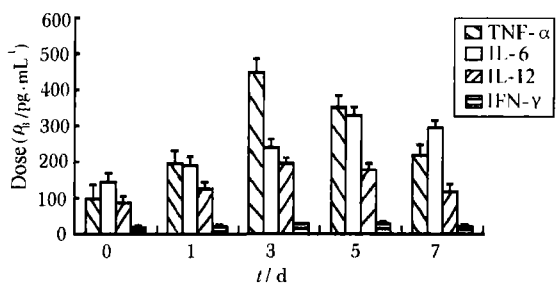


图 2　胶质瘤患者应用 SEC 后外周血细胞因子变化

Fig. 2　Cytokine levels in patients with glioma after using SEC

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

3　讨　论

自从超抗原概念提出以来,围绕超抗原的研究大多与细菌外毒素的致病性有关,这些毒素可引起食物中毒、中毒性休克等症状[1]。但另一方面,超抗原作为一种极好的免疫调节剂和高效的细胞因子诱生剂,为人类抗肿瘤治疗开辟了一条新的道路。超抗原通过下列机制参与抗肿瘤免疫反应:①金色葡萄球菌肠毒素(SE)依赖性细胞介导的细胞毒作用(SDCC),其已在 5 型(A、B、C、D、E)SE 中发现[2]。SE 是潜在、高效的 T 细胞激动剂,其作用先通过与 MHC-Ⅱ类靶细胞结合,然后激活细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)来杀伤靶细胞,用每毫升pg 水平的SE 可在数分钟内致敏 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞[3];②由超抗原激活的 T 淋巴细胞释放多种细胞因子。通过ELISA 可发现超抗原活化的淋巴细胞可分泌多种细胞因子,包括IL-1、IL-2、IL-6、IL-16、TNF-α、β和IFN-γ[4,5];③LAK 细胞样细胞毒活性。有人发现单独应用SE 也对 MHC-Ⅱ阴性的靶细胞产生杀伤,排除SDCC 作用,发现这种作用由 NK 细胞引起,NK 细胞并不能直接由SE 激活,而是由SE 诱导 T 淋巴细胞释放多种细胞因子进而激活 NK 细胞[6]。

本实验共选用 8 株不同的胶质瘤细胞系(株)。结果显示:经SEC 活化的淋巴细胞对 8 株不同的胶质瘤细胞均产生强大的杀伤,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。就体外杀伤实验而言,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 剂量的不同而变化,这还可能与SEC 活化的 T 淋巴细胞在增生过后对SEC 产生免疫耐受有关,这些显然与SEC 的剂量、用药次数及作用时间有关。

SEC 对细胞因子的最大诱生作用出现于第 3、5 天,这与Belfrag 等[7]的结果一致。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 4d 注射 1 次者。在注射后 24～48h,血清中可检测到高水平的IL-2、TNF-α、IFN-γ 和CTL,再过 3d 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 4～5d 以后,机体需要"休息"1～2周才能接受下一阶段的治疗[8]。从本研究临床资料看,单纯采用传统的手术、放疗、化疗,有效率为 40%;而结合SEC 的生物治疗,有效率则上升 10%～12.5%,达 50%和 62.5%。其中实验 B 组(局部)应用效果更好一些。超抗原作为免疫调节剂和细胞诱生剂,只需极微量的超抗原就可激活大量 T 淋巴细胞,分泌多种足量的细胞因子,甚至使机体免疫调节紊乱。此外,已活化的 T 淋巴细胞在增生过后往往对该超抗原的再刺激产生免疫耐受,解决超抗原上述问题的最好办法就是限制超抗原的活性,使其仅在瘤床发挥作用,这样既可免除超抗原激活全身大量 T 淋巴细胞而引发疾病的危险,又可使肿瘤区的 T 细胞得到外周血未接触过超抗原的 T 细胞之源源不断的补充。因此笔者主张局部应用超抗原以扬超抗原抗瘤之长,避其之短。

致谢:感谢导师黄强的精心指导,感谢周丽英、王爱东、兰青的帮助和关心,感谢苏州大学附二院所有给予帮助的人们。

[参 考 文 献]

[1] TLEISCHER B. Superantigen [J]. *APMIS*, 1994, 102: 3-12.

[2] DOHLSTEN M, SUNDSTEDT A, BJORKLUND M, *et al*. Targeting of human cytotoxin T lymphocytes to MHC class Ⅱ expressing all by staphylococcal enterotoxins [J]. *Immunology*, 1990, 71: 96-100.

[3] HEDLUND G, KALLAND T, DOHLSTEN M, *et al*. Staphylococcal enterotoxins direct and trigger CTL killing of autologous HLA-DR$^+$ mononuclear leukocytes and freshly prepared leukemia cells [J]. *Cell Immunol*, 1990, 129: 426-430.

[4] HOLZER U, ORLIKOWSKY T, ZEHRER C, *et al*. T-cell stimulation and cytokine release induced by staphylococcal enterotoxin A [J]. *Immunology*, 1997, 90: 74-80.

[5] DOHLSTEN M, SUNDSTEDT A, BJORKLUND M, *et al*. Superantigen induced cytokines suppress growth of human colon carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54: 482-488.

[6] GATELY M K. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine IL-12 (cytotoxin lymphocyte maturation factor) [J]. *J Immunol*, 1991, 147: 874-882.

[7] BELFRAGE H, BHILADVALA P, HEDLUND G, *et al*. Combined activation of murine lymphocyte with staphylococcal enterotoxin and interleukin-2 results in additive cytotoxin activity [J]. *Cancer Immunol Immuother*, 1994, 265: 3-16.

[8] VEHIYAMA Y, WALLACE V, TIMMS E, *et al*. Mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infection disease [J]. *Microbiol Immunol*, 1994, 91: 8945-8951.

[**收稿日期**] 2005-01-15　　[**修回日期**] 2005-03-18

[**本文编辑**] 褚敬申

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