超抗原 SEC 抗胶质瘤的研究

王 凡 黄 强[1] 周丽英[2]

(安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科,合肥 230022)

中国图书分类号 R 392;R 730.264

文献标识码 A **文章编号** 1001-1978(2003)05-0518-03

摘要 **目的** 观察超抗原 SEC 活化淋巴细胞对胶质瘤的杀伤作用。**方法** 采用 APAAP 法对 SEC 活化的淋巴细胞进行亚群分析;按 MTT 法测定经 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤的体外杀伤作用;通过建立荷瘤动物模型及人外周血淋巴细胞——SCID 小鼠免疫嵌合模型,观察肿瘤生长曲线。**结果** 经 SEC 活化的淋巴细胞主要为 $CD4^+$ 细胞;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 1×10^4 U·L^{-1} 剂量组作用最明显。生长曲线显示:A 组、C 组和 B 组对胶质瘤生长抑制率分别为 58.5%、46.2% 及 36.3%。**结论** 经超抗原 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤有杀伤作用。

关键词 超抗原; 金葡菌肠毒素 C 型; 胶质瘤; 淋巴细胞

自从 Kappler 和 Marrack 于 1989 年首先提出超抗原(Super antigen)一词以来,超抗原愈来愈受到抗肿瘤研究者的关注。外源性超抗原是一种细菌性外毒素,多由革兰阳性球菌产生,其中最有代表性的是金黄色葡萄球菌分泌的肠毒素(staphylococcal enterotoxin, SE)[1]。这些毒素可分为 SEA、SEB、SEC、SED 和 SEE 5 型,其中国内、外学者多应用 SEA 和 SEB 进行抗肿瘤实验,SEC 则少见报道。笔者观察 SEC 对淋巴细胞的活化及对胶质瘤的杀伤作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 SEC:沈阳协合制药厂;Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液:比重 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生产;T 淋巴细胞亚群检测试剂盒:邦定生物医学公司。

2002-05-08 收稿,2002-07-25 修回

[1] 苏州大学第二附属医院神经外科,苏州 215006

[2] 香港中文大学肿瘤研究所,香港

作者简介:王 凡,男,37 岁,博士,副教授,主治医师。研究方向:肿瘤免疫。Tel:0551-2922357;

黄 强,男,65 岁,教授,博士生导师。研究方向:胶质瘤的分子生物学

中国知网 https://www.cnki.net

1.2 细胞株和动物 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 MGR2、MGR3、SF767、SF295、SKMG-1、T98G 及 UW28 由加拿大麦吉尔大学 PANASCI 教授惠赠。常规解冻复苏,用 RPMI1640 完全培养基(含质量分数为 20%小牛血清,青链霉素各 1×10^5 U·L^{-1})传代培养,胰酶消化,PBS 洗涤 2 遍,用无色 RPMI 1640 调整细胞浓度至 2×10^8·L^{-1} 待用。重度联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠[2]从中科院上海药物所引进。SPF 环境饲养,荷瘤前 1 d 给所有 SCID 小鼠注射 20 μl ASGM1 多抗(Wako 化学公司),去除 SCID 小鼠体内 NK 细胞对实验的影响。

1.3 淋巴细胞的分离和活化 选用同一健康志愿者的外周血,常规分离人外周血淋巴细胞(HuPBL),用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培育液培养。在上述培养液中加入 SEC,使其终浓度分别为 2×10^4 U·L^{-1}、1×10^4 U·L^{-1}、5×10^3 U·L^{-1} 及 2.5×10^3 U·L^{-1}。

1.4 淋巴细胞亚群分析 选用胶质瘤患者(病理切片证实,应用 SEC 1×10^3 U·d^{-1})外周静脉血,分别于用药前、用药后 d 1~5 采样,常规分离淋巴细胞,应用 APAAP 法测定患者 $CD3$、$CD4$、$CD8$ 淋巴细胞。

1.5 体外细胞杀伤试验 采用 MTT 法,在 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μl(约 1×10^4 个)胶质瘤细胞。作用细胞为 SEC 活化的淋巴细胞,分 4 个剂量组,分别为 SEC 2×10^4 U·L^{-1}、1×10^4 U·L^{-1}、5×10^3 U·L^{-1} 及 2.5×10^3 U·L^{-1},作用时间为 72 h,收集细胞,调整其浓度至 2×10^9·L^{-1},每孔加入 50 μl(约 1×10^5 个)效应细胞,使效应细胞和靶细胞比例为 10∶1,混合培养 24 h,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培养液对照孔。根据下列公式计算杀伤率。

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

1.6 体内试验 应用 SCID 鼠,6~8 wk 龄,♀♂兼用。常规传代培养的胶质瘤细胞系 SHG-44 经消化、离心、计数,用 RPMI 1640 重悬到 2×10^9·L^{-1},

Tab 1 Reaction of T lymphocyte induced by SEC in patients with glioma($n=6$)

Group		Reaction of T lymphocyte			$CD4^+/CD8^+$
		$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	
Before treatment		55.5±5.0	25.4±3.6	28.7±2.8	0.85
After treatment	1 d	61.2±5.2	38.2±4.0	27.9±3.0	1.37
	2 d	61.7±5.4	42.1±4.2	30.1±3.1	1.40
	3 d	69.8±6.0	49.1±4.5	29.4±2.9	1.60
	4 d	68.2±5.8	40.5±5.0	36.8±3.1	1.10
	5 d	64.3±5.9	42.6±4.8	32.1±3.8	1.32

0.5 ml 右腋皮下接种 SCID 小鼠，肿瘤长至 1～2 mm^3 开始实验治疗，取已分离的淋巴细胞，离心重悬至 $2\times10^{10}\cdot L^{-1}$，每只 0.5 ml(约 1×10^7)，经尾静脉注入，每 7 d 1 次，共 4 次。SEC 10 U 经腹腔注射，每 2 d 1 次，共 15 次。16 只 SCID 鼠随机分为 4 组。A 组：SEC＋HuPBL；B 组：HuPBL；C 组：SEC；D 组：生理盐水。从治疗日开始每 4 d 称一次体重和测肿瘤结节短径(a)和长径(b)，根据肿瘤体积＝$a^2\times b/2$，绘制肿瘤生长曲线。

2 结果

2.1 淋巴细胞亚群分析 为了确定 SEC 对淋巴细胞的活化能力及活化淋巴细胞类型，用抗 $CD3$、$CD4$、$CD8$ 单抗按 APAAP 法对淋巴细胞进行标记，从胶质瘤患者收集的外周血淋巴细胞检测(Tab 1)可以看出，胶质瘤患者应用 SEC 之前，外周血 $CD3^+$ 细胞为 55.5%，略低于正常值(60%～80%)，而 $CD4^+$ 细胞为 25.4%，明显低于正常值约 35%～55%，$CD8^+$ 细胞正常，$CD4^+/CD8^+$ 比值较低，低于正常约 1.5～2.0 范围。应用 SEC 刺激后，$CD4^+$ 细胞由开始的 25.4%上升到 49.1%(d 3)，幅度为 93.33%；$CD8^+$ 亦由 28.7%上升到 36.8%，幅度为 28.22%，而 $CD4/CD8$ 亦由 0.85 上升到 1.60。

2.2 体外细胞杀伤实验 用 2×10^4、1×10^4、5×10^3 及 2.5×10^3 $U\cdot L^{-1}$ 等 4 个剂量组的 SEC 对淋巴细胞进行诱导活化(作用时间 72 h)，将活化的淋巴细胞同胶质瘤细胞混合培养，应用 MTT 法观察杀伤效果(Fig 1)。从中可看出 SEC 活化的淋巴细胞对 8 株胶质瘤细胞均能产生强大的杀伤，应用不同剂量的 SEC 活化的淋巴细胞对肿瘤的杀伤效果不一样，其中以 1×10^3 $U\cdot L^{-1}$ 剂量组的杀伤效果最强。

2.3 体内实验 将 1×10^6 SHG-44 注入 SCID 鼠右腋皮下，d 13 肿瘤长至粟粒大小，剔除肿瘤较大或未长出肿瘤的 SCID 鼠，余下 16 只随机分成 4 组进行实验。从生长曲线(Fig 2)看，A 组对 SCID 鼠移植胶质瘤有明显抑制作用，C 组与 B 组亦对胶质瘤有一定的抑制作用。取处死鼠的瘤结节做病理切片显示：A 组镜下见瘤细胞呈圆、椭圆形，核大而圆，偶见双核，可见疏松细纤维组织，有部分坏死，整个肿瘤实质内均有淋巴细胞浸润。而 B 组只有肿瘤边缘区域有少量淋巴细胞，未见坏死的纤维组织。

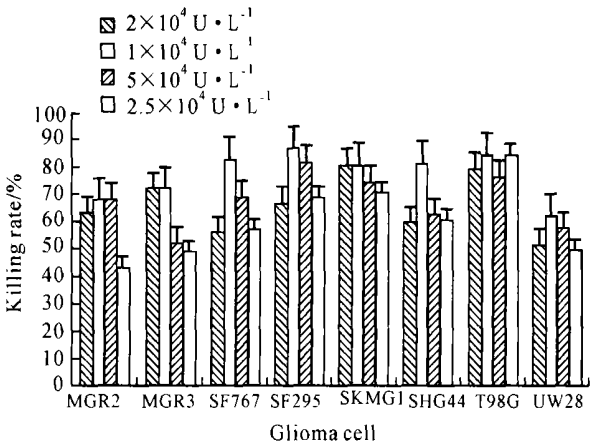


Fig 1 cytotoxicity effect *in vitro* in different concentration of SEC

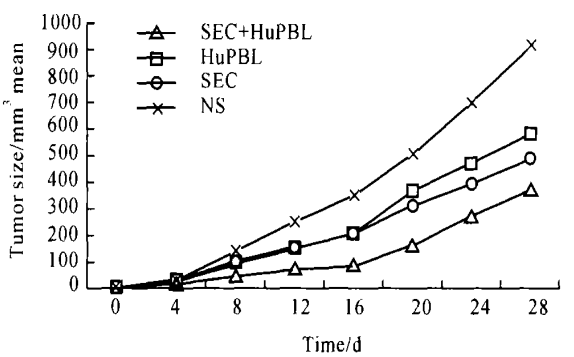


Fig 2 Cytotoxicity of SEC *in vivo*

3 讨论

免疫治疗是肿瘤生物治疗的一项重要内容。普通抗原必须借助抗原递呈细胞(APC)的内化、加工产生短链多肽，然后结合在 MHC-Ⅱ类分子的重链槽上，形成复合物被 T 细胞受体(TCR)识别，一种普通抗原对 TCR 的特异性识别涉及所有 5 个可变区成分($V\alpha$、$J\alpha$、$V\beta$、$D\beta$、$J\beta$)，故只能与 $1/10^4$～$1/10^5$ 的 T 细胞反应。而超抗原可以不借助 APC 而直接与 MHC-Ⅱ类分子结合，随后，超抗原-MHC 复合物与 $TCR\beta$ 链的 V 节段反应，而不涉及到 TCR 的其

中国知网 https://www.cnki.net

它成分。人类有 50 多种不同的 V^{β} 基因，一种超抗原可与一种或几种特定的 V^{β} 成分结合，故一种超抗原可与 1/50 以上的 T 细胞结合，可见其效果较普通抗原强 10^3～10^4 倍。通过激活细胞毒 T 细胞(CTL)来杀伤靶细胞[3]。被超抗原激活的 T 细胞可对肿瘤产生 2 种主要作用：①超抗原依赖的细胞介导的细胞毒作用(superantigen-dependent cell-mediated cytoxocity SDCC)[4]。②超抗原活化的 T 细胞能分泌多种、足量的细胞因子，包括 TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-6 及 IL-12 而对肿瘤细胞进行杀伤[5]。T 细胞是肿瘤免疫中最重要的淋巴细胞。从 T 淋巴细胞亚群分析看，应用 SEC 活化的 T 细胞以 $CD4^+$ 细胞最为明显，胶质瘤患者由 25.4%上升到 49.1%(健康人由 42.5%上升到 56.8%)，用药 d 1 就可见明显的活化增殖，d 3 增殖到最高峰，d 4、5 开始下降，与 Belfrage 结果相似[6]。$CD3^+$、$CD8^+$ 细胞亦显示类似结果，但幅度较 $CD4^+$ 小。故我们推测 SDCC 主要由 $CD4^+$ 细胞引起。体外细胞毒性实验发现，经 SEC 活化的淋巴细胞对 8 株不同的胶质瘤均有杀伤，杀伤率由 43%到 89%不等，证明了 SEC 活化的淋巴细胞对胶质瘤杀伤的可靠性和有效性。其中以 SEC 1×10^3 U·L^{-1} 的杀伤率为最高。体内实验显示 SEC 活化的淋巴细胞亦对肿瘤生长有明显的抑制作用，荷瘤小鼠生存期延长(实验数据另文报道)。体内、外实验结果与国外报道相近[7,8]。

参考文献

1 Fleischer B. Superantigen. *APMIS*, 1994;**102**(1): 3～12

2 Bosmic GC, Custer RP, Bosma MJ *et al*. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 1983;**301**(5900): 527～30

3 Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S *et al*. Cytotoxic lymphocytes require granzyme for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis allogeneic target cell. *Cell*, 1994;**76**(6): 977～87

4 Dohlsten M, Lando PA, Hedlund G *et al*. Targeting of human cytotoxic T lymphocyte to MHC class Ⅱ expressing all by staphylococcal enterotoxins. *Immunology*, 1990;**71**(1):96～104

5 Dohlsten M, Hedlund G, Segren S *et al*. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1993;**54**(3):482～91

6 Belfrage H, Mollick JA, Betley MJ *et al*. Combined activation of murine lymphocyte with staphylococcal enterotoxin and interleukin-2 results in additive cytotoxin activity. *Cancer Immunol Immuother*, 1994;**38**(4):265～71

7 Litton MJ, Dohlsten M, Hansson J *et al*. Tumor therapy with an antibody-targeted superantigens a dichotomy between local and system immune responses. *Am J Pathol*, 1997;**150**(5):1607～18

8 Inoue M, Plautz GE, Shu S *et al*. Treatment of intracranial tumor by systemic transfer of superantigen-activated tumor draining lymph node T cells. *Cancer Res*, 1996;**56**(20):4702～8

Study on superantigen SEC against glioma

WANG Fan, HUANG Qiang[1], ZHOU Li-Ying[2]

(*Dept of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei* 230022)

ABSTRACT **AIM** To probe into antitumor effect of lymphocyte activated by superantigen SEC against glioma. **METHODS** Lymphocyte subset was analysed with APAAP method after the lymphocyte had been activated by SEC. The cytotoxicity of lymphocyte against glioma *in vitro* was evaluated by MTT method. With established animal model of glioma xenografted and immunity embeded model of HuPBL-SCID, we observed the growth of glioma. **RESULTS** The lymphocyte activated was mainly composed of $CD4^+$ T lymphocyte. Lymphocyte activated by SEC had killing activety against 8 glioma cells and the group of 1×10^3 U·L^{-1} had shown the strongest killing power. The growth curve showed that: each of the rate of producing A, C and B group different suppress effect on glioma its suppress rate was 58.5%, 46.2% and 36.3% respectively. **CONCLUSION** Lymphocyte stimulated by superantigen SEC produces killing power against glioma.

KEY WORDS superantigen; staphylococcal enterotoxin C; glioma; lymphocyte

[1]Dept of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou 215006

[2]Hong Kong Cancer Institute, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

中国知网 https://www.cnki.net