高聚生(SEC)联合手术放化疗治疗胶质瘤及其机制的探讨 *

王　凡　黄　强①　周丽英①
安徽医科大学附属第一医院肿瘤放疗科　(合肥市　230022)

摘要　**目的**:观察高聚生(SEC)联合手术、放疗、化疗对胶质瘤的治疗效果及 SEC 促淋巴细胞诱生 IL-2 作用。**方法**:92 例胶质瘤患者,均经手术切除。随机分为对照组、治疗 A 组(全身应用 SEC)及治疗 B 组(局部应用经 SEC 活化的淋巴细胞),联合放疗、化疗,通过颅脑 CT 片观察疗效。采用免疫组化及 RT-PCR 测定 SEC 促淋巴细胞分泌 IL-2 作用。**结果**:对照组有效率为 32.0%,治疗 A 组及治疗 B 组有效率分别为 51.6%及 63.6%。经 SEC 活化的淋巴细胞在作用第一天开始分泌 IL-2,第 3~5 天达峰值。**结论**:SEC 作为一种超抗原,与手术、放疗、化疗联合能明显提高临床疗效。被其活化的淋巴细胞能大量分泌 IL-2。

关健词　超抗原　胶质瘤　综合治疗　金葡菌肠毒素 C 型
中图分类号:R739.41　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-8179(2006)08-0445-04

The Studies of SEC Therapy Combined with Radiochemotherapy on Glioma and Analysis of Treatment Mechanism

Wang Fan　Huang Qiang　Zhou Li-ying
Department of Tumor and Radiotherapy, No. 1 Hospital of Anhui Medical University, Hefei

Abstract　Objective: To probe into the anti-glioma effects of SEC combined with surgery, radiotherapy and chemotherapy and to observe the effects releasing IL-2 of lymphocyte activated by SEC. Methods: A total of 92 patients suffering from glioma were randomly divided into control group, treatment group A and B and then the analytical results were observed through CT. IL-2 in lymphocyte activated by SEC was measured using immunohistochemistry and RT-PCR method. Results: Clinical materials showed that the rate of effect (CR and PR) in the control group was 32%, while The effective-rate was 51.6% in treatment group A and 63.6% in the group B. The secreting activity of IL-2 of lymphocyte activated by SEC reached peak at the third day and then decreased slowly at the 5th and the 7th day. Conclusion: SEC combined with surgical operation, radiotherapy and chemotherapy can raise the the treatment-effect in patient with glioma. The lymphocyte activated by SEC has obviously can release IL-2.

Key words　Superantigen　Glioma　Combined modality therapy　Staphylococcal enterotoxin C

生物治疗现已被公认为除手术、放疗和化疗外的第 4 种肿瘤治疗手段。高聚生(SEC)作为一种超抗原[1],经动物试验及人体临床试验,均显示出强大的抗瘤作用[2]。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[3],可以激活比普通抗原多达数千倍的 T 淋巴细胞[4,12]。本文通过对 SEC 联

*　本文课题受安徽省教育厅自然科学基金资助(编号:2003KJ218)
①　苏州大学附属二院脑肿瘤研究室
通讯作者:王凡　wangfan1965@sina.com

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

合手术、放化疗治疗胶质瘤的疗效分析，观察 SEC 对淋巴细胞分泌 IL-2 的诱导作用。

1 材料和方法

1.1 一般资料

累计病例 92 例，为苏州大学附属第二医院神经外科 1998 年 4 月至 1999 年 12 月患者 37 例和安徽医科大学附属第一医院肿瘤放疗科 2001 年 10 月至 2004 年 6 月患者 55 例，全部病例均经手术和病理切片证实为胶质瘤Ⅱ~Ⅲ级，均位于幕上，CT 扫描病灶≤5cm。详细资料见表 1。

表 1 两组病例临床资料 例

项目	治疗组		对照组
	A 组	B 组	
例数	31	11	50
男性	17	7	22
女性	14	4	28
年龄(岁)	23~70	22~72	14~73
平均年龄	46.5	46.7	40.8
类型及分级			
星形细胞瘤(Ⅱ~Ⅲ)	15	5	23
胶质母细胞瘤(Ⅱ~Ⅲ)	8	2	12
少突胶质细胞瘤(Ⅱ~Ⅲ)	5	3	12
室管膜瘤(Ⅱ~Ⅲ)	3	1	3

1.2 治疗方法

全部 92 个病例，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 10 天给予替尼泊甙 100mg 静脉滴注，1 次/天，共 3 天。洛莫司汀 100mg 顿服。术后 1 个月全脑照射 DT 40Gy/20 次，缩野继续照射至 DT 60Gy。治疗组分 A、B 两组，A 组：手术+化疗+放疗，方法与对照组相同，同时加用 SEC 1000U 静脉滴注，隔天一次，共 7 次。B 组：手术+化疗+放疗，方法亦与对照组相同，同时按 1.3.3 方法分离患者淋巴细胞，将其置于含 SEC 10U/ml 的 RPMI1640 完全培养基中活化扩增，取 2×10^7 个已激活的淋巴细胞经 Ommya 管向瘤床注入，隔天一次，共 7 次。

1.3 实验部分

1.3.1 仪器 相差显微镜：Nikon，日本。二氧化碳培养箱，ESOEC-BAN-311 型，日本。离心机：LD4-2A，北京医用离心机厂。DNA 热循环仪：PE 公司。电泳仪：TS600，上海复旦生物工程研究所。

1.3.2 主要试剂 高聚生（Staphylococcal Enterotoxin C SEC），沈阳协合生物制药股份有限公司生产。Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液，比重 1.077±0.022，上海试剂二厂。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。RNA 抽提试剂 TRIZOL 及 cDNA 合成试剂盒，GIBCO BRL 公司产品。高保真 Taq 酶及 dNTPS，Sigma 公司产品。IL-2 分泌细胞检测试剂盒购自北京邦定生物医学公司。

1.3.3 淋巴细胞的分离培养及活化 取患者静脉血 20ml（肝素 1 250U），50ml PBS 稀释，加入到等体积的淋巴细胞分离液上层，2 000 转/min，离心 20min，吸出中层的外周血单个核细胞（peripheralblood mononuclear cell）层，加 5 倍 PBS 稀释，1 000 转/min，离心 5min，弃上清，将沉淀置于 RPMI 1640 完全培养基（含 20%小牛血清、青链霉素各 100U/ml）37℃ 50%CO_2 饱和湿度下培养，在上述培养基中加入 SEC，使其终浓度分别为 10U/ml、5U/ml、2.5U/ml。于用药前及用药后的第 1、3、5、7 天离心，收集上清及淋巴细胞，分别置于-20℃及-80℃冰箱保存备用，并收集淋巴细胞涂片备用。

1.3.4 APAAP 法检测 IL-2 分泌型细胞 取收集的淋巴细胞涂片，干燥后用丙酮固定 10min，0.01ml pH7.2 PBS 液洗 3 遍，加一抗 20μl，放湿盒 37℃作用 30min，0.01ml pH7.2 PBS 液洗 3 遍，加羊抗鼠 IgG 二抗 20μl，湿盒 37℃作用 30min，洗 3 遍，加 APAAP 复合物 20μl，湿盒 37℃作用 30min，冲洗 3 遍，加坚固红底物液覆盖样本，37℃作用 30min，加苏木素复染液一滴 1~2min，自来水洗，高倍镜下观察，计数。

1.3.5 RT-PCR 检测细胞因子和表达 1）总 RNA 抽提 取备用的淋巴细胞，PBS 洗 2 遍，在 1×10^6 细胞加入 1ml Trizol 裂解液，反复吹打置室温 5min，加入 0.2ml 氯仿，剧烈振摇 15s，室温静置 3min 于 4℃ 13 500g 离心 15min，转移上层水相，加入 0.5ml 异丙醇并混匀，室温静置 10min，于 4℃ 13 500g 离心 10min，弃上清，加入 1ml 75%乙醇，震荡混匀，于 4℃ 7 500g 离心 5min，弃上清，超净台内干燥 5min，加入 50μl DEPC 治疗水，溶解于 55~60℃，水浴 10min，分光光度计分析并定量，甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量，置-80℃备用。2）cDNA 的合成：取总 DNA 3μl，OligodT 1μl（0.5μg/ml）DEPC 治疗水 12μl，置于 70℃水浴 10min，冰上冷却 3min，加入预先混匀的 PCR 反应混合液 7μl（10×反应缓冲液 2μl，25mmol/L 氯化镁 2μl，10mmol/L dNTP 1μl，0.1mol/L DTT 2μl），轻轻混匀后置 42℃ 5min，加入 1μl M-MLV 逆转录酶（200U/ml），混匀后于 42℃反应 50min，置 72℃ 15min 终止反应，冰上冷却 10min，离心收集反应液，加入 1μl RnaseH 于 37℃反应 20min，置-20℃备用。3）引物合成：上海 SANGER 公司产品。IL-2 F：5'-ATG TAC AGG

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

ATG CAA CTC CTG TCT T-3'; R: 5'-AGT CAG TGT TGA GAT GAT GCT TTG ACA-3'。4) PCR 扩增: 在 50μl 反应体系中, 加入 10×PCR 缓冲液 5μl, 氯化镁(25mmol/L) 2μl, dNTP(10mmol/L) 1.2μl, 上、下游引物(10mmol/L) 各 2μl, 模板 cDNA2μl, Taq plus DNA 聚合酶 1μl。循环条件: 94℃ 7min 变性, 然后 94℃ 60s、57℃ 30s 及 72℃ 90s, 循环 30 次, 72℃ 延长 7min。2%琼脂糖凝胶电泳。

2　结果

2.1　近期疗效

所有 92 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 32.0%; 而治疗组(包括 A、B 两组), 在传统手术+化疗+放疗的基础上, 加用 SEC, 有效率为 54.8%。统计学分析 χ^2=4.84, P<0.05, 对照组与治疗组间存有差异。其中, 治疗 A 组, 即全身静脉滴注 SEC 组, 有效率为 51.6%; 治疗 B 组, 即在瘤床局部注入经 SEC 活化的淋巴细胞组, 有效率高达 63.6%, 无一例出现恶化(PD)。见表 2。

表 2　治疗组与对照组之间疗效比较　例

组别	例数	疗效					有效率
		CR	PR	MR	NC	PD	(%)
对照组	50	0	16	22	6	6	32.0
治疗 A 组	31	3	13	5	7	3	51.6
治疗 B 组	11	2	5	3	1	0	63.6

治疗 A 组有 2 例患者在应用 SEC 过程中出现发热反应, 占 6.5%, 但体温低于 38℃, 而且出现在用药的前三天, 继续用药发热反应自行消退。1 例患者在静脉注射局部出现红肿, 经对症治疗局部红肿消退。治疗 B 组通过 Ommya 管向瘤床注入由 SEC 活化的淋巴细胞, 均未见不适。

2.2　随访

治疗结束后第 1 年内每 3 个月复查 1 次, 1 年后每半年复查 1 次。苏州大学附属第二医院神经外科 37 例病例均随访达 5 年时间。安徽医科大学附属第一医院肿瘤放疗科 55 例随访时间均达 1、3、5 年随访仍在进行中。结果为: 治疗组 1、3、5 年生存率为 85.7%(36/42)、66.7%(18/27)、45.0%(9/20)。其中治疗 A 组 1、3、5 年生存率分别为 83.9%(26/31)、66.7%(12/18)、41.6%(5/12); 治疗 B 组 1、3、5 年生存率分别为 90.9%(10/11)、66.7%(6/9)、50%(4/8)。对照组 1、3、5 年生存率为 82.0%(41/50)、60.0%(18/30)、41.2%(7/17)。治疗组生存率较对照组为高, 但无显著性差异(P>0.05)。

2.3　SEC 促淋巴细胞诱生 IL-2

2.3.1　SEC 活化淋巴细胞前后 IL-2 分泌型细胞的检测结果　采用连续密度梯度离心法分离出的健床志愿者外周血淋巴细胞, 按 APAAP 法标记淋巴细胞, 在显微镜下计数每 100 个细胞中的标记细胞。在未经 SEC 激活前, IL-2 分泌细胞频度较低, 用药后的第一天, IL-2 标记细胞迅速上升, 第 3 天达峰值, 第 5、7 天缓慢下降。结果见表 3。方差分析: 各时间组间 F=360.65, P<0.01。q 检验一一比较: 3~1、3~7、3~5、5~7、5~1 天之间 P<0.01; 7~1 天之间 P>0.05。各剂量组间 F=49.74, P<0.01。各组之间有差异。

表 3　SEC 活化细胞的 IL-2 分泌型细胞　($\bar{x}\pm s$)%

组别	用药前	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
10U/ml	2	18.0±1.2	42.3±2.1	29.7±2.0	17.3±1.1
5U/ml	0	9.2±0.6	28.5±1.7	21.4±1.8	10.2±0.7
2.5U/ml	1	9.8±0.5	25.7±1.7	18.4±1.6	9.6±0.4
对照	2	3	1	2	3

2.3.2　SEC 激活淋巴细胞 mRNA 的表达　我们采用 RT-PCR 法对 SEC(10U/ml) 作用前后的淋巴细胞(用药前、第 1、3、5、7 天) 进行 IL-2 检测, 经 SEC 活化的淋巴细胞均有 IL-2 的 mRNA 表达, 以第 1、3、5 天最为明显, 见图 1。

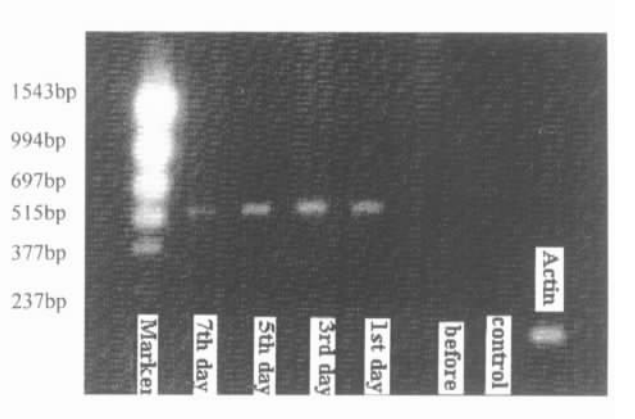


图 1　经 SEC 活化淋巴细胞表达 IL-2 的 RT-PCR 电泳结果

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。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) 金葡菌肠毒素 (SE) 依赖性细胞介导的细胞毒作用(SDCC)。SDCC 已在五型(A、B、C、D、E) SE 中发现[10]。SE 是潜在、高效的 T 细胞激动剂, 其作用先通过与 MHC-Ⅱ

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

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，用皮克水平的 SE 可在数分钟内致敏 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞[5]；2) 由超抗原激活的 T 淋巴细胞释放多种细胞因子，通过 ELISA 发现超抗原活化的淋巴细胞可分泌多种细胞因子—IL-1、IL-2、IL-6、IL-16、TNF-α β和 IFN-γ[6,7]；3) LAK 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[11]。

从临床资料看，单纯采用传统的手术、放疗、化疗，有效率为 32.0%；而结合 SEC 的生物治疗，有效率则达 51.6%和 63.6%。其中治疗 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。因此我们主张局部应用超抗原以扬超抗原抗瘤之长，避其之短。

从本实验结果看，免疫组化从蛋白质水平和 RT-PCR 从 mRNA 水平检测的结果都可证实。在 SEC 刺激下，PBMC 第一天就开始分泌 IL-2，可持续 5~7 天。其中，最大分泌出现在第 3~5 天。多年来许多肿瘤学者，特别是肿瘤免疫学家，曾设想应用肿瘤特异性细胞毒 T 细胞(CTL)来防治肿瘤[8]。这是非常令人向往的设想。因为机体杀伤瘤细胞的主要效应细胞是 CTL，并具有特异性，既对肿瘤细胞发挥强大的杀伤作用，而又无损于正常细胞，比化疗优越。IL-2 问世以来，将 IL-2 与瘤细胞或肿瘤抗原、淋巴细胞在体外共孵，不仅可诱导出该肿瘤特异性 CTL，以杀伤瘤细胞，而且使 CTL 呈指数级扩增，注入体内的 CTL 可高达 5×10^8，未见任何毒性反应。美国国立癌症研究所 lotze 等[9]将 3 例肺部有转移的肉瘤患者 PBL($1\sim2\times10^5$)培养于 IL-2 与肉瘤细胞中，经 3~4 周后，CTL 增殖到 $1\times10^8\sim10^9$，可维持生长达数月，且对自身肉瘤细胞的杀伤作用增加 2~3 倍，如新鲜淋巴细胞对瘤细胞的杀伤作用为 85.0±.9CPM，经 IL-2 孵育的 CTL 增至 253.6±5.4CPM。此外 IL-2 还能增强 NK 细胞活性及其抗肿瘤作用。超级抗原是一种潜在的高效的 T 淋巴细胞激活剂。被超抗原激活的 T 淋巴细胞即 CTL，其胞浆内积聚很多穿孔素和粒酶，通过细胞排粒作用分泌到瘤细胞上，聚集形成孔道，一些效应分子如粒酶、TNF、分泌性 ATP、多腺苷酸结合蛋白 TIA-1 等可以从孔道进入瘤细胞，导致细胞死亡。

参考文献

1 Fleischer B. Superantigens [J]. APMIS, 1994, 102(2):3~12

2 Rossi RJ, Muralimohan G, Maxwell JR, et al. Staphylococcal entertoxin condition cells of the innate immune system for Toll-like receptor 4 stimulation[J]. Int Immunol, 2004, 16(12):1751~1760

3 Shinbori T, Walczak H, Krammer PH. Activated T killer cells induce apoptosis in lung epithelial cells and the release of proinflammatory cytokine TNF-alpha [J]. Eur J Immunol, 2004, 34(6):1762~1770

4 Johnson HM, Torres BA, Soos JM. Superantigens : structure and relevance to human disease[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1996, 212(2):99~109

5 Ma W, Yu H, Wang Q, et al. A noval approach for cancer immunotherapy: Tumor cells with anchored superantigen SEA generate effective antitumor immunity [J]. J Clin Immunol, 2004, 24(3):294~301

6 Holzer U, Orlikowsky T, Zehrer C, et al. T-cell stimulation and cytokine release induced by staphylococcal enterotoxin A [J]. Immunology, 1997, 90(1):74~80

7 Ren S, Terman DS, Bohach G, et al. Intrapleural staphylococcal superantigen induces resolution of malignant pleural effusion and a survival benefit in non-small cell lung cancer [J]. Chest, 2004, 126(5):1529~1539

8 黄 强,主编.脑肿瘤分子外科学[M].北京:中国科学技术出版社, 1998.122~131

9 Peraba FG, Willert PL, Wirger A, et al. Preclinical evaluation of superantigen (staphylococcal enterotoxin B)in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2005, 115(4):591~598

10 Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, et al. Superangen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 1993, 54(3):482~ 488

11 Litton MJ, Hedlund G, Kalland T, et al. Tumor therapy with an antibody-targeted superantigen generates a dichotomy between local and system immune responses [J]. Am J Pathol, 1997, 150(5):1607~1618

12 Ragin MJ, Sahu N, August A, et al. Differential regulation of cytokine production by CD1d restricted NKT cells in response to superantigen staphylococcal enterotoxin B exposure [J]. Infect Immun, 2006, 74(1):282~288

(2005-06-06 收稿)
(2006-02-01 修回)
(杨红欣校对)

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