DOI：10.13455/j.cnki.cjcor.2002.03.001

·论著·

高聚金葡素活化淋巴细胞对胶质瘤的体外细胞毒作用

王凡，黄强，兰青，周丽英，王爱东
（苏州大学附属第二医院神经外科，暨脑肿瘤研究室，江苏 215004）

[摘要] **目的** 评估高聚金葡素对胶质瘤的杀伤效果。**方法** 利用MTT法，在不同的剂量和不同的活化时间下，观察高聚金葡素对胶质瘤细胞的杀伤效果。**结果** 高聚金葡素对胶质瘤有较强的杀伤效果，随其剂量、作用时间及胶质瘤细胞株的不同，杀伤效果亦略有不同。**结论** 作为一种免疫增强剂，高聚金葡素有良好的应用前景。

[关键词] 高聚金葡素；胶质瘤；超抗原
[中图分类号] R739.41；R73.36+2 [文献标识码]A [文章编号]1005－8664(2002)03－0001－03

Cytotoxicity assay in vitro of highly agglutinative staphylococcin against glioma

Wang Fan，Huang Qiang，Lan Qing
Department of Neurosurgery，Second Affiliated Hospital，Suzhou University，Suzhou 215004，China

[Abstract] **Objective** To probe antitumor effect of highly agglutinative staphylococcin against glioma. **Methods** The killing effect of highly agglutinative staphylococcin against glioma was evaluated by MTT method in different doses and stimulation time. **Results** Highly agglutinative staphylococcin had intense killing activity against glioma which varied when the dose，stimulation time and glioma strain varied. **Conclusion** As an immunity regulation agent，highly agglutinative staphylococcin has bright future for clinical use

[Key words] highly agglutinative staphylococcin；glioma；superantigen

高聚金葡素作为一种超级抗原在抗肿瘤研究中方兴未艾。超抗原可不通过抗原呈递细胞(APC)加工而直接与MHC-Ⅱ类分子非限制性结合，随后同TCRV β片段结合而激活T细胞，致后者分化为杀伤力很强的细胞毒性T细胞(CTL)及分泌大量多种细胞因子。超抗原的这一特性备受抗肿瘤研究者的青睐。本文观察高聚金葡素激活的淋巴细胞对胶质瘤的体外杀伤效果。

材料和方法

试剂 高聚金葡素(沈阳协合制药厂)、Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)、MTT(华美生物工程公司)、RPMI 1640培养液(Sigma公司)

细胞株 人胶质瘤SHG-44(本室自建)、人胶质瘤MGR2、MGR3、SF767、SF295、SKMG1、T98G及UW28(由加拿大麦吉尔大学panasci教授惠赠)。

淋巴细胞的分离和活化 1.选用同一健康志愿者的外周血，常规分离外周血淋巴细胞(PBL)，用含20%胎牛血清的RPMI1640培养液培养。2.在上述培养液中加入高聚金葡素，终浓度分别为20、10、5及2.5u/ml。

体外细胞毒性实验与高聚金葡素的剂量关系 采用MTT法，在96孔细胞培养板每孔加入1×10^4个胶质瘤细胞。效应细胞为高聚金葡素活化的淋巴细胞，分4个剂量组，分别为高聚金葡素20u/ml、10u/ml、5u/ml及2.5u/ml，活化时间为72小时。每孔加入效应细胞为1×10^5，使效应细胞与靶细胞的比例为10∶1，混合培养24小时，每组设置4个平行复孔。此外，设置单独效应细胞对照孔、靶细胞对照孔及单细胞培养液对照孔。根据下列公式计算杀伤率。

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

体外实验与高聚金葡素作用时间的关系 在96孔细胞培养板每孔加入1×10^4个胶质瘤细胞。效应细胞为高聚金葡素(10u/ml)活化的淋巴细胞，设置活化时间组为0、1、2、3、4及5d。每孔加入效应细胞为1×10^5，使效应细胞和靶细胞比例为10∶1，混合培养24h，采用MTT法计算杀伤率(方法同1,4)。

结 果

一、不同剂量的高聚金葡素激活的淋巴细胞毒性比较 结果见图1。从中可看出，应用不同剂量的高聚金葡素活化的淋巴细胞对肿瘤的杀伤效果不一样，其中以10u/ml剂量组的杀伤效果最强。在高聚金葡素剂量及效应细胞与靶细胞比例相同的情况下，高聚金葡素激活的T淋巴细胞所产生的抗肿瘤活性，因靶细胞的不同而略有差异。在相关显微镜下可见。随10倍于靶细胞的淋巴细胞加入，肿瘤细胞迅速崩解呈

收稿日期：2000－05－31
作者简介：王凡(1967－)，男，安徽人，博士，副主任医师，从事神经外科专业。

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

碎片状，其效果与作用时间呈正相关。

二、不同作用时间的高聚金葡素激活的淋巴细胞毒性比较 用 10μ/ml 的高聚金葡素对淋巴细胞进行诱导活化，设置不同的作用时间，将活化的淋巴细胞同胶质瘤细胞混合培养所观察到的杀伤效果列于图 2。与未用药组(0 天)相比较，应用高聚金葡素的第一天，淋巴细胞迅速被激活并对胶质瘤细胞产生较强的杀伤效应，随着作用时间的延长，杀伤率继续上升，约第 3 天杀伤率达到峰值。

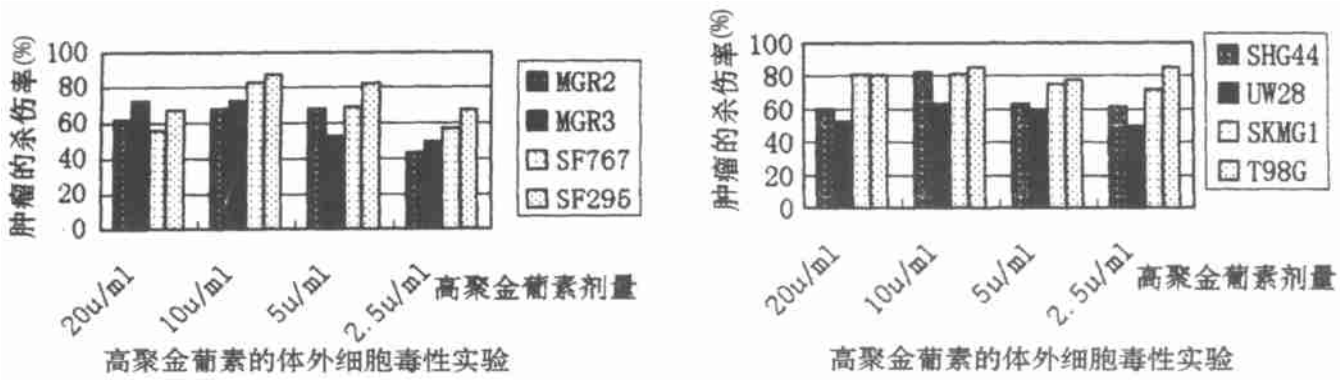


图 1 高聚金葡素活化淋巴细胞的剂量对肿瘤细胞杀伤的影响

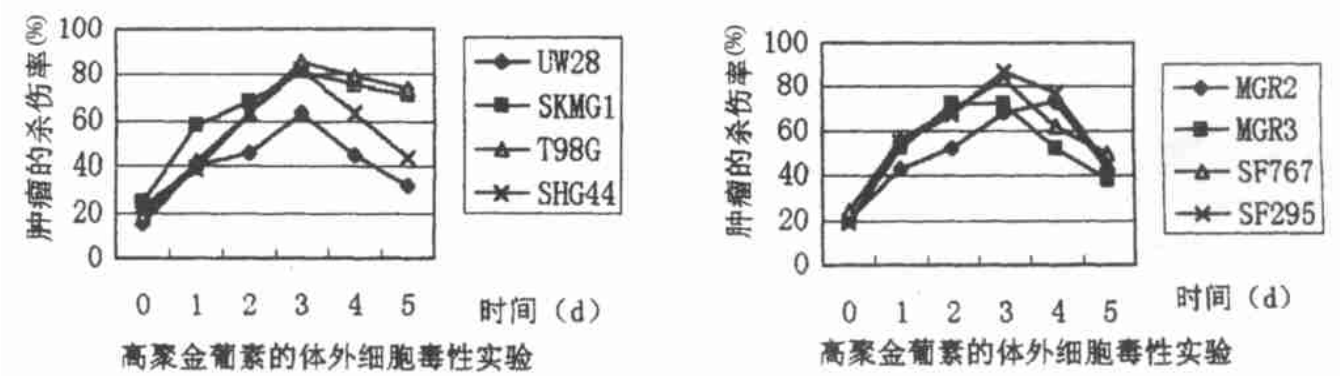


图 2 淋巴细胞活化时间胶质瘤细胞杀伤的影响

讨 论

人脑胶质瘤是一种呈浸润生长的恶性肿瘤，手术难以完全切除，由于血脑屏障的存在，使许多化疗药物不能到达；同时，胶质瘤细胞对放射线具有一定的耐受力。近年来，超抗原的抗肿瘤作用及临床应用已受到广泛的关注[1,2]，但应用超抗原对胶质瘤进行抗肿瘤活性的报道甚少。本研究显示，经高聚金葡素活化的淋巴细胞对胶质瘤有较强的杀伤作用，这与有关报告结果一致[3]。随高聚金葡素的剂量不同，这种杀伤效应亦有变化。另外，我们还观察到，不同个体来源的效应细胞对同种靶细胞的杀伤程度亦不尽相同，这可能系由于不同个体对高聚金葡素的反应能力和T 淋巴细胞的功能状态不同所致。

在本实验的设计过程中，考虑到不同的胶质瘤细胞株可能对高聚金葡素诱发的细胞毒作用反应不同。我们除了采用本室自建的 SHG-44，而且还采用了另外 7 株胶质瘤细胞。虽然高聚金葡素诱发的细胞毒作用在所有 8 株胶质瘤细胞中有一定范围的波动，但从总体看，这种杀伤效应是类似的、有效的，其中以高聚金葡素 10u/ml 剂量组的杀伤效果最佳。活化时间为 72 小时时，这种细胞毒作用达到顶峰。在混合培养中，我们观察到随着十倍于靶细胞的淋巴细胞加入，肿瘤细胞迅速崩解呈碎片状，其效果与作用时间呈正相关(24 小时以内)，我们认为由于高聚金葡素对淋巴细胞的活化而使 T 细胞转变成 CTL 细胞，这种 CTL 细胞与肿瘤细胞接触，通过释放穿孔素等物质使肿瘤细胞溶解坏死，此外，激活的 T 淋巴细胞分泌多种细胞因子，如 IFN-γ、TNF-α、IL-2 等亦对肿瘤细胞进行攻击。

就实验结果而言，高聚金葡素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 H 的结果一致[4]。超抗原虽然可激活 T 细胞，但也可能使 T 细胞减少或无反应，超抗原引起的T 细胞耐受原因不明，可能是由于被激活的 T 细胞发生凋亡所致，亦可能与体内对细胞因子起作用的转录因子的调控作用有关[5,6]。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。在注射抗体－超抗原之后 24～48 小时，血清中可

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

检测到高水平的IL-2,TNF-α、TFN-β和CTLs,再过3天后机体进入弱反应期,产生细胞因子和CTLs的能力开始下降,1～2周之后机体产生上述细胞因子和CTLs的能力又恢复到起始水平。说明在注射抗体－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。

应用免疫效应细胞对相应靶细胞的杀伤是细胞免疫学中一项重要的研究内容。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。为此,我们在进行淋巴细胞和瘤细胞共同孵化时,不进行分离处理,而是通过设定单独的淋巴细胞对照孔来去除淋巴细胞带来的影响。

参 考 文 献

[1] Johnson HM, Torres BA and Soos JM. Superantigens: structure and relevance to human disease[J]. P.S.E.BM. 1996,212:99.

[2] Choi Y, KOtzin B, Herron L et al. Interaction of staphylococcus aureus toxin"superantigens" with human T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:8941.

[3] Hackett SP and Stevens DL. Superantigens associated with staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome are potent inducers of tumor necrosis factor-β synthesis[J]. J Infect Dis, 1993, 168:232.

[4] Belfrage H, Bhiladvala P, Hedlund G et al. Combined activation of murine lymphocytes with staphylococal enterotoxin and interleukin-2 results in additive cytotoxin activity[J]. Cancer Immunol Immunother, 1994, 38:265.

[5] Vchiyama Y, Yan X, Imanishi K et al. Mechanism of T cell activation by the superantigens and their role in the pathogenesis of infectious disease[J]. Microbiol Immonol, 1994, 38:245.

[6] Dohlsen M, Abrahmsen L, Bjork P et al. Monoclonal actibody-superantigen fusion proteins: tumor-specific agents for T cell based tumor therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19): 8945.

晚期肺癌介入治疗观察

高艳霞[1],王永成[2],隋秋燕[3]

(1.济南铁路局中心医院,山东 250001;2.齐鲁医院;3.济南医院)

[中图分类号] R734.2 [文献标识码]B [文章编号]1005－8664(2002)03－0003－01

我院1998年至2000年期间应用数字减影技术,进行选择性支气管动脉灌注化疗的58例病人进行总结分析如下。

资料 1998年至2000年我院对58例晚期肺癌患者采用了经支气管动脉灌注化疗技术进行治疗,58例中男53例,女5例,年龄32～84岁,平均60.2岁。按病理分型鳞癌46例,鳞腺癌3例,小细胞未分化癌9例。按病变部位右肺癌36例,左肺癌22例。

方法 术前进行必要的化验检查及影像学检查,明确患者的凝血状况及肿瘤的部位,做好充分的术前准备。选择性支气管动脉造影术采用Seldinger氏法,先行支气管动脉造影确认导管置入支气管动脉后注入化疗药物,灌注完毕后常规局部加压包扎,全身进行静脉输液治疗及对症处理。化疗每隔2～3周给药一次。使用药物:多数病例使用以丝裂霉素、5-FU、卡铂、顺铂为主,通常选择三种药物联合使用。

结果 58例患者中成功地寻找到支气管动脉的开口,准确地进行支气管动脉灌注化疗的有49例,插管成功率为84.5%。9例插管没有成功者,其中8例欲选择左支气管动脉,1例欲选择右支气管动脉。58例患者术后观察,临床症状仅出现了化疗药物的毒副反应,部分病人出现了发热。没有发现因插管引起的严重并发症。58例患者中43例疗效满意,2例患者拒绝再次接受灌注治疗,6例病情无变化,7例因其它原因引起死亡。

讨论 晚期肺癌的治疗多强调综合性治疗。但是,作为选择性强,治疗效果确切的支气管动脉灌注化疗技术仍为综合性治疗中一项重要的治疗措施。据有关资料报道,原发性支气管肺癌大部分由支气管动脉供血,少部分由肺动脉供血。因此,支气管动脉灌注化疗既能增加药物的输送能力,同时又能延长抗肿瘤药物的接触时间,增加局部肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,克服其耐药性,避免或减轻化疗药物的全身毒性反应,达到治疗肿瘤的目的。近年来,我院应用数字减影技术,选择性经支气管动脉对晚期肺癌的患者进行较系统和较规范的灌注化疗,插管成功率达到84.5%,与有关报道基本相符(80%～90%)。43例患者经联合治疗后病情得到不同程度的缓解,肿瘤缩小,病人的自觉症状得到改善,提高了肿瘤患者的生存质量和5年存活率,达到了肿瘤治疗的目的。

支气管动脉插管不成功的9例患者中,8例为预行左支气管动脉插管,1例预行右支气管动脉插管。因此,不成功的原因主要考虑为左支气管动脉开口变化较右侧为多,所以造成了插管的困难。

经过回顾性分析临床医师对支气管动脉灌注化疗病人的病情观察,发现各级医师对术前的准备工作都十分重视,检验项目和影像检查准备充分。但术后的观察工作比较局限,只侧重于穿刺局部的观察和化疗药物的毒副作用的观察治疗,而对于支气管动脉灌注化疗引起的并发症如胸痛、上腹痛、吞咽痛及吞咽困难、脊髓损伤、支气管粘膜坏死等的观察记录几乎没有。这就提示每一位临床工作者,在支气管动脉灌注化疗技术作为肺癌综合治疗的重要方法的同时,要注意预防严重并发症的发生,做好术后病情特殊变化的监测和治疗,以提高肺癌的治疗效果,降低全身副反应的发生率。

收稿日期:2001－03－26

作者简介:高艳霞(1956－),女,山东泗水人,学士,副主任医师,从事肿瘤内科专业。

隋秋燕(1950－),女,山东烟台人,副主任医师。

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