高聚生对胃腺癌患者 TDLN 细胞抗肿瘤活性的影响 *

彭 正 陈 凛 李 荣 张 磊 金 婷
解放军总医院普通外科 (北京市 100853)

摘要 **目的**:观察高聚生(HAS)对胃腺癌患者肿瘤引流淋巴结(TDLN)细胞抗肿瘤活性的影响。**方法**:40 例胃腺癌患者随机分为实验组和对照组,实验组于术前 1 周静脉给予高聚生。术中取肿瘤引流区淋巴结,分离 TDLN 细胞,比较两组 TDLN 细胞对胃腺癌细胞系 KATO3 和黑色素瘤细胞系 A375 的杀伤作用。**结果**:实验组对 KATO3 细胞系的杀伤作用明显优于对照组;而对 A375 细胞,各组细胞的杀伤作用无明显差异。**结论**:高聚生可增强胃腺癌患者 TDLN 细胞的杀伤作用。

关键词 TDLN 细胞 抗肿瘤活性 高聚生
中图分类号:R730.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-8179(2006)11-0614-03

The Effect of Highly Agglutinative Staphylococcin on antitumor reactivity of TDLN cells of gastric carcinoma

Peng Zheng Chen Lin Li Rong et al
Department of General Surgery, General Hospital of PLA, Beijing

Abstract Objective: To explore the effect of Highly Agglutinative Staphylococcin (HAS) on anti-neoplastic activity of tumor-draining lymph node (TDLN) cells in patients with gastric carcinoma. Methods: Forty patients with gastric carcinoma were randomized into the experimental group (HAS group) and the controls. The patients in the experimental group were injected with HAS for 7 successive days before surgery. The TDLN were removed from patients during the operation. TDLN cells were isolated and purified from local lymph nodes of the patients. The cytotoxic activity of TDLN cells to gastric adenocarcinoma cell line KATO3 and the human melanoma cell line A375 were compared in the two groups. Results: The cytotoxicity of TDLN cells to KATO3 cells in the experimental group was significantly stronger than that of TDLN cells in the control group. In contrast, for A375 cells, cytotoxic activities of TDLN cells in the two groups showed no overt difference. Conclusion: The antineoplastic activity of TDLN cells can be enhanced significantly by HAS.

Key words TDLN cells Antineoplastic activity
Highly agglutinative staphylococcin (HAS)

肿瘤引流淋巴结 (tumor-draining region lymph nodes, TDLN)**与肿瘤的转移和扩散密切相关。由于其位置的特殊性,它既不同于产生** LAK **细胞的外周血,又异于产生** TIL **的肿瘤部位,而且** TDLN **可作为过继免疫治疗中特异性细胞毒性** T **细胞**(CTL)**的一个重要来源。**TDLN **中的特异性** CTL **已经肿瘤抗原的长期致敏,具备了针对肿瘤细胞的敏感性或者很容易被疫苗致敏,但由于激活信号转导障碍使** CTL **处于失能状态而丧失了对肿瘤细胞的杀伤能力。高聚生(高聚金葡素,**HAS**)是一种超抗原,具有刺激** T

* 本文课题受国家自然科学基金资助(编号:30570522)
通讯作者:彭正 pengzham@yahoo.com.cn

细胞增殖，产生细胞毒性和大量细胞因子的作用。因此，我们给胃腺癌患者静脉应用 HAS，观察其对 TDLN 细胞杀伤活性的影响。

1　材料与方法

1.1　一般资料

2005 年 3 月 10 日在本科住院确诊为胃腺癌并行手术切除的患者 40 例，其中男 26 例，女 14 例；平均年龄 48.7 岁。术前检查排除远位脏器转移，随机分为两组，实验组 20 例（男 14 例，女 6 例；平均年龄 50.1±8.93 岁），术后病理分期 II 期 6 例，III期 11 例，IV期 3 例。对照组 20 例（男 12 例，女 8 例；平均年龄 46.8±9.24 岁），术后病理分期 II 期 5 例，III期 13 例，IV期 2 例。两组各项指标无明显统计学差异。相关临床资料均来自解放军总医院存档病案。

1.2　材料

高聚生（沈阳协合集团有限公司产品）。Hanks 液及 RMPI1640 培养液为 Gibco 公司产品。小牛血清购于浙江金华生物制品厂。淋巴分离液购自上海试剂二厂。抗 CD3/抗 CD4/抗 CD8 mAb 为 CALTAG 公司产品。抗 CD3/抗 CD16+56/抗 CD45 mAb 为 B&D 公司产品。MTT 为 Sigma 公司产品。胃癌细胞株 KATO-3 及黑色素瘤细胞株 A375 均由本院免疫室提供。

1.3　方法

1.3.1　给药方案　实验组于术前 7 天给予高聚生 2 000U 加入 5%葡萄糖注射液 500ml 静脉滴注，每日 1 次。对照组无特殊治疗。

1.3.2　TDLN 细胞的制备　将手术获得的 TDLN 除去附着的脂肪，以含抗菌素的 Hanks 液冲洗后，剪碎、研磨、过筛并以 RPMI1640 悬浮。用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心（2 000r/min×30min），即获得 TDLN 细胞。加入含有 5%小牛血清的 RPMI1640 6ml，重悬细胞并记数。用流式细胞仪分别测定两组细胞中 $CD4^+$、$CD8^+$T、$CD56^+$细胞的数量。

1.3.3　TDLN 细胞杀伤活性的检测　采用混合培养及 MTT 比色法检验。分别以胃癌细胞系 KATO3 及黑色素瘤细胞系 A375 作为靶细胞包板，每孔的细胞数为 1×10^4。用 1.3.2 步骤获得的各组 TDLN 细胞作为效应细胞，按 10∶1 及 20∶1 的比例与靶细胞混合。每组 3 个复孔，于 37℃、50mL/L CO_2 条件下培养 72h。以 MTT 比色法检测 TDLN 细胞的杀伤活性，结果以 A_{590nm} 表示。杀瘤率（%）=[1-实验孔 A 值/（靶细胞 A 值+效应细胞 A 值）]×100%。

2　结果

2.1　两组 $CD4^+$、$CD8^+$、$CD56^+$细胞数的结构百分比以及 $CD4^+/CD8^+$T 细胞的相对比

应用 STATA 7.0 软件分析，$CD4^+$、$CD8^+$细胞数的结构百分比采用 t 检验，$CD56^+$细胞数的结构百分比以及 $CD4^+/CD8^+$T 细胞的相对比采用秩和检验（因方差不齐），结果见表 1。

表 1　两组中 $CD4^+$、$CD8^+$、$CD56^+$细胞的百分比及 $CD4^+/CD8^+$T 细胞的相对比　$\bar{x}\pm s$

项目	实验组	对照组	P
$CD4^+$	59.55±5.71	50.32±7.91	0.000 1*
$CD8^+$	19.51±4.45	15.39±4.96	0.008 7*
$CD4^+/CD8^+$	3.22±0.78	3.71±1.53	0.665 2
$CD56^+$	2.12±0.81	1.68±0.98	0.119 8

* P<0.01

2.2　两组细胞对两种靶细胞的杀伤作用

杀伤率统计见表 2，3。应用 SAS 软件进行多因素方差分析显示，两组细胞在不同效靶比时对 KATO3 细胞系的杀伤率有明显差异（P<0.001）。同时可以看出，两组 TDLN 细胞对 KATO3 细胞的杀伤率随效靶比的增加而升高。对于 A375 细胞的杀伤能力各组细胞间无明显差异，而且在不同效靶比时的杀伤率也无明显差异（P>0.05）。但两组 TDLN 细胞对 KATO3 细胞系的杀伤率在不同效靶比时均大于对 A375 细胞系的杀伤率（P<0.001）。

表 2　两组 TDLN 细胞对 KATO3 和 A375 细胞的杀伤率　$\bar{x}\pm s$

组别	KATO3		A375	
	效靶比=20∶1	效靶比=10∶1	效靶比=20∶1	效靶比=10∶1
实验组	53.02±8.93	42.49±8.06	21.39±1.99	17.73±9.40
对照组	35.47±7.48	26.28±7.94	18.73±9.63	16.1±9.64

表 3　两组 TDLN 细胞在不同效靶比时对两种靶细胞的杀伤率统计

项目	KATO3		A375	
	F	P	F	P
分组间差异	30.24	0.000 1*	0.45	0.638 4
效靶比差异	17.64	0.000 1*	2.78	0.192 7

* P<0.05

3　讨论

TDLN 细胞在机体肿瘤免疫中具有重要的作用[1]。TDLN 既是暂时阻止肿瘤细胞转移的天然屏障，也是肿瘤远处转移的中介者。TDLN 细胞中的特异性 CTL 虽可被肿瘤抗原刺激而致敏，但由于缺乏协同激活信号而处于失能状态，不能有效地发挥其杀伤肿瘤细胞的作用[2,3]。因此，如何有效提高 TDLN 中 T 细胞的杀伤活性，对于控制肿瘤转移、延长肿瘤患者生存期具有重要意义。既往曾采用体内或局部应用免疫制剂（如 IL-2，IFN-γ，GM-CSF，抗 CD3McAb 等）以及某些化疗药物（如低剂量的环磷

酰胺),试图打破局部的免疫抑制状态。由于免疫抑制状态并非由某一种因子独立引起,而是多因子共同影响的结果,同时还有多种细胞间的相互作用参与其中,故上述疗法的实际效果尚不理想[3~5]。HAS 的主要有效成分是金葡肠毒素 C1(Staphylococcal enterotoxin C1, SEC1)[6]。SEC1 现已确认为一种对 T 细胞具有强大刺激功效的超抗原。文献报道超抗原的浓度低至 1~10ug/L 就足以诱发最强的免疫应答,导致带有 TCR-Vβ序列的 T 细胞大量增殖和活化,同时释放大量细胞因子,产生相应的生物学效应[7]。另外有部分超抗原通过识别 TCR-Vα激活 T 细胞,产生相应的生物学效应,说明其具有高度多样性结合 MHC 和 TCR 的能力[8]。本实验通过静脉输注 HAS,以了解其对 TDLN 中 T 细胞、NK 细胞比例及杀伤能力的影响。

在实验中,我们分析了实验组与对照组的 $CD4^+$T、$CD8^+$T、$CD56^+$细胞结构百分比及 $CD4^+$/$CD8^+$T 细胞相对比的差异。结果表明,术前一周静脉应用 HAS 的实验组 TDLN 细胞中 $CD4^+$T、$CD8^+$T 细胞明显高于对照组,即 HAS 可显著提高 TDLN 细胞中 $CD4^+$T、$CD8^+$T 细胞的结构百分比,与文献[9,10]报道应用 HAS 后外周血中 T 细胞的变化相符。但与外周血结果不同的是 TDLN 中 $CD4^+$/$CD8^+$T 细胞的相对比无明显影响,导致出现这种现象的原因除了可能存在实验误差外,是否存在淋巴结微环境的影响尚需进一步研究。两组中 NK 细胞($CD56^+$)结构百分比无明显差异,而且结果显示在 TDLN 细胞中 NK 细胞占的比例很小,说明 TDLN 中起杀伤作用的主要是 CTL。

本实验比较了两组 TDLN 细胞对胃癌细胞系 KATO-3 及黑色素瘤细胞系 A375 杀伤的作用。结果表明,两组 TDLN 细胞在不同效靶比的情况下,对 KATO3 细胞系的杀伤率存在明显差异,说明静脉应用 HAS 可提高 TDLN 细胞对胃癌细胞系的杀伤率。两组 TDLN 细胞在不同效靶比的情况下对 A375 细胞的杀伤率相似,说明应用 HAS 对 TDLN 细胞杀伤黑色素瘤细胞的能力无明显影响。两组 TDLN 细胞对 KATO3 细胞系杀伤率均高于对 A375 细胞系的杀伤率,提示 TDLN 细胞可能在体内已被预致敏,其杀伤作用具有一定特异性。

综上所述,经静脉应用高聚生可增加胃腺癌患者体内 TDLN 中 $CD4^+$T、$CD8^+$T 的比例并增强其杀伤胃腺癌细胞系的活性。

参考文献

1 Santi AD. Lymph node matastases: the Important of the Microenvironment [J]. Cancer, 2000, 88(1):175~179

2 Wu H, Rodger JR, Perrard XY, et al. Deficiency of CD11b or CD11d result in reduced staphylococcal enterotoxin - induced T cell response and T cell phenotypic changes [J]. J Immunol, 2004, 173(1):297~306

3 Cohen PA, Peng L, Kjaergaard J, et al. T- cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance[J]. Crit Rev Immunol, 2001, 21: 215~248

4 Proter LE, Nelson H, Ethem Gecim L, et al. T cell activation and retargeting using staphylococcal enterotoxin B and bispecific antibody:an effective in vivo antitumor strategy [J]. Cancer Immunol Immunother, 1997, 45(3- 4):180~183

5 Romagnani P, Annunziato F, Piccnni MP, et al. Cytokines and Chemokines in T lymphopoiesis and T cell effector function[J]. Immunol Toaday, 2000, 21(9): 416~417

6 陈廷祚. 抗癌新药高聚金葡素评价 [J].中华肿瘤杂志,1998,20(6): 475~476

7 Fontenrau JF, Larsson M, Somersan S, et al. Generation of high quantities of viral and tumor- specific human $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell clones using peptide pulsed dendritic cells[J]. Immunol Methods, 2001, 258(1- 2):111~126

8 王玉琼,宋宏萍,隋延仿.超抗原和免疫受体间相互作用的研究[J]. 医学综述,2005,11(7):577~579

9 王 凡,黄 强,周丽英.超抗原 SEC 抗胶质瘤的研究[J]. 中国药理学通报,2003, 19(5): 518~520

10 田卫东, 汤 炜, 李声伟,等. 高聚金葡素联合化学药物治疗口腔癌的疗效与免疫功能观察[J]. 口腔颌面外科杂志,2001,11(1):45~48

(2005- 12- 15 收稿)
(2006- 04- 10 修回)
(李雅玲校对)