析选择治疗方式。

参考文献

1 周明其. 特重型颅脑损伤 84 例救治探讨. 海南医学, 2008, 19: 37-38, 127.

2 Hemanshu P, Mary A, Neerja J, et al. Acute open brain herniationduring elective tumour resection. Internet J Anesthesiology, 2007, 11: 125-128.

3 王忠诚主编. 王忠诚神经外科学. 第 1 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005. 434-440.

4 蔡文华, 郭协力, 蒋宇钢. 改良去骨瓣减压术在重型颅脑损伤救治中的应用. 创伤外科杂志, 2011, 13: 139-140.

5 马宝林, 方耀春, 房正华. 正中人字型切口双侧去骨瓣减压术治疗重型颅脑损伤. 临床和实验医学杂志, 2011, 10: 743-744.

6 田金彪. 双侧去骨瓣减压术治疗重型颅脑损伤的效果. 中国伤残医学, 2012, 20: 33-35.

7 牛大伟. 重型颅脑损伤的治疗及死亡原因分析. 中国实用医学, 2011, 6: 74-75.

8 董吉荣, 胡旭, 王玉海, 等. 双侧平衡去骨瓣减压术对特重型颅脑伤致双瞳散大患者的救治. 中华神经外科杂志, 2011, 27: 706-709.

9 李建亭, 李天栋, 白红民, 等. 双侧平衡去骨瓣减压术治疗重型闭合性颅脑损伤. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11: 65-67.

（收稿日期：2012－12－25）

doi: 10.3969/j.issn.1002－7386.2013.09.024

·论著·

食管癌抗原和超抗原构建肿瘤疫苗的抗癌作用研究

胡万宁 马淑芹 张庆波 李博 幺文博 杨雷 王静怡 刘印华

【摘要】 **目的** 利用食管癌肿瘤可溶性抗原（TSA）和超抗原（SEC）构建肿瘤疫苗，刺激外周血淋巴细胞，诱导产生细胞毒性 T 细胞（CTLs），对肿瘤细胞进行体内外杀伤作用研究，以探讨其抗肿瘤作用。**方法** 外周血淋巴细胞经肿瘤疫苗作用，进行体外培养，诱导产生细胞毒性 T 细胞；细胞毒实验测定效应细胞杀伤活性；建立小鼠移植瘤模型，用肿瘤疫苗进行干预治疗，观察其治疗效果。**结果** 经肿瘤疫苗刺激的淋巴细胞组诱导的 CTLs 对靶细胞杀伤活性显著高于单纯淋巴细胞组（$P<0.05$），对 TSA 来源的食管癌细胞具有选择性杀伤作用；体内研究发现肿瘤疫苗能显著减轻小鼠荷瘤负担，延长生存期。**结论** 肿瘤可溶性抗原与超抗原 SEC 构建的肿瘤疫苗能产生高效特异性的抗肿瘤效果，显示出良好的抗肿瘤免疫治疗作用。

【关键词】 癌症疫苗；食管肿瘤；肿瘤可溶性抗原；肿瘤生物治疗；超抗原

【中图分类号】 R 392.12 【文献标识码】 A 【文章编号】 1002－7386(2013)09－1331－02

恶性肿瘤严重地危害着人类健康，成为医学研究的首要难题。手术、放疗和化疗作为传统三大疗法，对恶性肿瘤的治疗具有一定的疗效，但由于肿瘤本身易侵袭转移和复发的生物学特性，使常规治疗效果欠佳，且有的伴有明显的不良反应。因此，寻找损伤小又能有效控制肿瘤生长和转移的治疗方法，成为临床肿瘤治疗的急切需要。近年来，随着肿瘤学、免疫学以及分子生物学等相关学科的迅速发展和交叉渗透，肿瘤免疫治疗的研究突飞猛进，以免疫学原理为基础、以免疫学技术为方法而建立起来的肿瘤免疫治疗，其基础和临床研究均呈上升趋势，并向纵深发展。本文用食管癌抗原和超抗原构建肿瘤疫苗，探讨其体内外抗癌作用，为进一步临床应用打下良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 （1）主要试剂：PBMC 分离液（购于天津 TBD 公司），超抗原 SEC（购于沈阳协和集团），CCK-8（购于武汉碧云天公司），FITC 标记的 CD3 单抗，CD4 单抗，CD8 单抗（购于美国 BD 公司），RPMI-1640 细胞培养液（购于 Gibco 公司）。（2）肿瘤细胞系：人食管癌细胞株 Eca109，宫颈癌细胞株 Hela（由河北联合大学医学实验中心提供）。（3）实验用小鼠：BALB/C 裸鼠（由中国医学科学院动物研究所提供），在 SPF 条件下喂养。

1.2 方法

1.2.1 PBMC 的分离：取健康献血者外周血 10 ml，肝素抗凝，用细胞分离液（比重：1.077）分离外周血单个核细胞（PBMC）。

1.2.2 TSA 制备：培养 Eca109 细胞，胰蛋白酶消化，PBS 洗细胞 3 次，调整细胞浓度为 $10^7 \sim 10^8$/ml，反复冻融法破碎细胞 4 次，5 000 r/min，离心 40 min，取上清即为 TSA。Bradford 法测定蛋白含量，0.22 μm 滤膜过滤除菌，－20℃保存备用。

1.2.3 CD^{8+} CTL 细胞的检测：RPMI-1640 培养液调整淋巴细胞浓度为 10^6/ml，接种于 6 孔板，每孔 2 ml。分为肿瘤疫苗组（PBMC＋TSA＋SEC）、肿瘤抗原组（PBMC＋TSA）、超抗原组（PBMC＋SEC）和空白对照组（PBMC），每组 3 孔，培养第 3 天，每组各孔分别加入 FITC 标记的 CD3 单抗，CD4 单抗和 CD8 单抗，FCM 检测。

1.2.4 靶细胞和效应细胞：分别取食管癌细胞系 Eca109 和宫颈癌细胞 Hela 作为靶细胞，单独 PBMC 组和经肿瘤疫苗（食管

项目来源：河北省科学技术研究与发展支撑计划项目（编号：07120203A-4）

作者单位：063000 河北省唐山市人民医院（胡万宁、李博、幺文博、王静怡）；河北省遵化市第二医院（马淑芹、杨雷）；河北联合大学（张庆波）；河北省南堡盐场医院（刘印华）

通讯作者：张庆波，063000 河北联合大学；

E-mail：zqb1955@163.com

癌 TSA + 超抗原 SEC)刺激 PBMC 组培养诱导的 CTLs 作为效应细胞。

1.2.5 体外抗癌作用检测:效应细胞浓度为 2×10^6/ml,靶细胞浓度为 1×10^5/ml(效∶靶 =20∶1),另设单独效应细胞对照组和靶细胞对照组,每组 3 个复孔。效应细胞作用靶细胞 24 h 后,CCK-8 法测各组效应细胞对靶细胞的杀伤率。细胞杀伤率(%) = [1 - (实验组 OD 值-效应细胞组 OD 值)/靶细胞组 OD 值] × 100%。

1.2.6 裸鼠体内抑瘤实验:将效应细胞培养到第 3 天时,调细胞浓度为 4×10^7/ml。将食管癌细胞(0.1 ml)接种至裸鼠皮下,长至直径 1 cm 左右时,无菌取下肿瘤组织,剪切研磨成单个细胞,用 RPMI-1640 培养基调细胞浓度为 2×10^6/ml 作为靶细胞,然后按 Winn 氏中和法进行:效应细胞和靶细胞等量混合作为 CTL 组,靶细胞与 PBS 等量混合作为对照,每只裸鼠皮下注射 0.1 ml,每组 6 只裸鼠,然后观察裸鼠体内肿瘤的生长情况和裸鼠的生存情况。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 16.0 统计软件,多组间数据比较采用方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $CD8^+$ CTL 细胞的检测 肿瘤免疫主要是细胞免疫,在细胞免疫中 $CD8^+$ CTL 起着非常重要的作用。肿瘤疫苗是否能诱导 PBMC 产生 CTL 是此项研究的关键。因此,首先对其进行检测。4 组 $CD3^+$ 细胞所占比例明显增加。空白对照组的 $CD8^+$ 为 27.47%,超抗原组、肿瘤抗原组和肿瘤疫苗组均比空白对照组高,肿瘤疫苗组诱导的 $CD8^+$ 最高($P < 0.05$),为 46.27%,说明肿瘤疫苗所诱导的细胞为 $CD8^+$ CTL 细胞。见表 1。

表 1 FCM 检测结果 %, $\bar{x} \pm s$

组别	CD^{3+}	CD^{4+}	CD^{8+}
空白对照组	72 ±4	40 ±4	27 ±4
超抗原组	80 ±6	42 ±5	41 ±5 *
肿瘤抗原组	81 ±5	43 ±6	43 ±3 *
肿瘤疫苗组	83 ±6	41 ±5	46 ±7 *

注:与空白对照组比较,*$P < 0.05$

2.2 体外抗癌作用 经食管癌疫苗刺激 PBMC 诱导产生的效应细胞对靶细胞 Eca-109 杀伤活性(为 95.78%)显著高于空白对照组(63.89%),效应细胞对抗原来源的肿瘤细胞(Eca-109)的杀伤活性明显高于其他细胞(Hela),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 效应细胞对靶细胞的杀伤作用 $n = 5$, %, $\bar{x} \pm s$

组别	Eca-109	Hela
空白对照组	64 ±3	65 ±4
肿瘤疫苗组	96 ±5 *#	77 ±6 *

注:与空白对照组比较,*$P < 0.05$;对 Eca-109 的杀伤活性与 Hela 细胞比较,#$P < 0.05$

2.3 CTL 对裸鼠食管癌移植瘤的抑瘤作用 将裸鼠分为2 组:疫苗组(效应细胞 + 肿瘤细胞)和肿瘤细胞组,每组 6 只。将细胞接种到裸鼠皮下后。每 3 天观察记录肿瘤的生长情况。第 3 天时,肿瘤细胞组有 3 只已长出肿瘤,平均体积 = 总体积/6(只) = (22.5 + 22.5 + 8)/6 = 8.83mm^3,疫苗组未长出肿瘤;第 6 天时,肿瘤细胞组肿瘤平均体积为 61.5 mm^3,疫苗组尚未长出肿瘤;第 9 天时,肿瘤细胞组肿瘤平均体积为(443 ± 159)mm^3,疫苗组肿瘤平均体积为:(44 ± 24)mm^3。疫苗组与肿瘤细胞组比较,差异有统计学意义($t = 4.27$, $P < 0.01$)。

2.4 对荷瘤裸鼠生存期的影响 每天观察裸鼠生存情况,对照组裸鼠 16 d 出现死亡,19 d 全部死亡;疫苗组 22 出现死亡,35 d 全部死亡。疫苗组和肿瘤细胞组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

传统的肿瘤治疗方法是手术、放疗和化疗,手术为首选方法,它能切除肿瘤病灶,但它不能防止肿瘤的复发和转移。肿瘤生物治疗作为肿瘤治疗的第四模式,越来越引起人们的重视。肿瘤疫苗是肿瘤生物治疗的一个重要组成部分,它配合手术或其他方法,渴望能达到人们预想的结果。用免疫治疗配合常规疗法以减少肿瘤的复发和转移。多数人类肿瘤的抗原性弱,不易刺激特异性免疫反应的产生[1]。如何增强肿瘤抗原的免疫原性,诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫反应,是研制肿瘤疫苗的关键。提高肿瘤疫苗免疫原性的方法有很多,如增强 MHC-肽复合物的稳定性,增强共刺激信号的表达、使用免疫佐剂、超抗原等。金葡菌肠毒素(staphlococcal enterotoxin,SE)是一种具有高度生物活性的蛋白质,是目前研究较多的细菌性超抗原(super antigen,SAg),SE 能同时结合主要组织相容性复合体Ⅱ(MHCⅡ)和 T 细胞识别受体(TCR)而连接抗原递呈细胞(APC),因其不需要 APC 的内处理,在 MHCⅡ的抗原结合槽的外侧直接与之特异性结合,并通过结合 T 细胞受体 Vβ 片段(TCR Vβ)的不同片段高效的激活 T 细胞,促使分泌大量及多种细胞因子[2,3],对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用,实验研究效果较好[4,5]。本研究将食管癌肿瘤可溶性抗原与超抗原 SEC 构建肿瘤疫苗作用于免疫细胞,可以保证肿瘤抗原被有效摄取提呈,诱导针对肿瘤抗原的 CTL 应答。动物实验结果发现,疫苗诱导的效应细胞作用荷瘤裸鼠,能够抑制瘤体生长,延长生存期,此研究结果具有一定的抗肿瘤免疫治疗应用前景。

参考文献

1 Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. Nat Immunol, 2001, 2: 293-299.

2 Wen R, Cole GA, Surman S, et al. Major histocompatibility complex class Ⅱ-associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cell. J Exp Med, 1996, 183: 1083-1092.

3 Woodland DL, Wen R, Blackman MA. Why do superantigens care about peptides. Immunol Today, 1997, 18: 18-22.

4 Perabo FG, Willen PL, Wirger A, et al. Preclinical evaluation of superantigen(staphylococcal enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of Superficial bladder cancer. Int J Cancer, 2005, 115: 591-598.

5 Thamm DH, Kurzman ID, Macewen EG, et al. IntralesionaI lipid-complexed cytokine/Superantigen immunogene therapy for spontaneous canine turnors. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52: 473-80.

(收稿日期:2012 - 10 - 11)