·论著·

食管癌抗原联合金葡素诱导杀瘤性细胞的实验研究

李树义[1] 刘洪梅[2] 张庆波[2]

(1. 河北省唐山市第九医院检验科，河北唐山 063000；2. 华北煤炭医学院生物系，河北唐山 063000)

摘要 目的：体外应用超抗原金葡素 C 型(SEC)联合食管癌可溶性抗原(TSA)刺激外周血淋巴细胞，诱导产生细胞毒 T 细胞(CTLs)，对肿瘤细胞进行杀伤，探讨其治疗肿瘤的可行性。方法：外周血淋巴细胞经 TSA、超抗原 SEC 联合作用，进行体外培养。用酶联免疫吸附测定法(ELISA)法和细胞毒试验测定细胞因子含量和杀伤活性。结果：经 TSA 与超抗原 SEC 联合刺激，淋巴细胞增殖活性增强，在刺激后 72 h 达到峰值；与空白对照组相比，SEC、TSA 以及 SEC 与 TSA 联合刺激，人肿瘤坏死因子 α(TNF-α)活性从第 1 天开始升高，在 3 d 达峰值；并且联合刺激的淋巴细胞组诱导的效应细胞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。结论：肿瘤可溶性抗原与超抗原SEC 联合应用能诱导效应细胞明显增殖、活化、并产生高效特异性的抗肿瘤效果。

关键词 淋巴细胞； 肿瘤可溶性抗原； 超抗原； 杀伤活性

中图分类号 R730.51 **文献标识码** A

Study on Tumor-Killing Cells Induced by Esophageal Cancer Antigen and Staphlococcal Enterotoxin

LI Shuyi[1] *LIU Hongmei*[2] *ZHANG Qingbo*[2] 1. *Department of Clinical Laboratory, the Ninth Hospital of Tangshan* 063000, *China*; 2. *Department of Biology of North China Coal Medical University, Tangshan* 063000, *China*

Abstract **Objective**: To study the effect of tumor soluble antigen (TSA) and staphlococcal enterotoxin(SEC) on the cyctotoxic T lymphocyte(CTL), and to evaluate the new cell immunotherapy on tumor. **Methods**: Lymphocyte cells were isolated from peripheral blood and then stimulated in vitro with soluble antigen and superantigen SEC, test levels of cytokine and killing activity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and cytotoxic assay. **Results**: Proliferation activity of lymphocyte cells group stimulated by TSA and SEC was the strongest, peaked at 72h. Compared with the control group, the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the study groups begun to increase after 1d, and peaked at 3d. The killing activity of lymphocyte cell group stimulated by TSA and SEC against target cells were significantly higher than the control group($P<0.05$). **Conclusions**: The seffector cells stimulated by TSA and SEC induce effective proliferation, activation and high antitumor efficiency and show a potential kind of operative antitumor immunotherapy.

Key Words Lymphocytes; Tumor soluble antigen; Superantigen; Killing activity

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤，目前主要治疗方法主要为手术治疗、放射治疗和化疗，但这 3 种治疗方法均未能显著提高患者的生存率。免疫治疗作为治疗肿瘤的新方法，具有安全性高和疗效持久等优点，正逐渐应用于肿瘤治疗[1-2]。本研究通过体外联合应用超抗原金葡素 C 型(staphlococcal enterotoxin, SEC)和食管癌可溶性抗原(tumor soluble antigen, TSA)刺激 T 淋巴细胞，诱导其产生杀瘤性免疫细胞，研究免疫治疗对食管癌细胞的杀伤作用，探讨其在食管癌治疗中的可行性。

1 资料与方法

1.1 主要试剂 SEC(药品名：金葡液，沈阳协和集团)，胆囊收缩素 8(CCK-8，武汉碧云天公司)，人肿瘤坏死因子 α 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司)，淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司)，RPMI-1640(Gibco 公司)。

1.2 肿瘤细胞系 人食管癌细胞株 Eca109、宫颈癌 Hela 细胞株由本校免疫学实验室提供。

1.3 淋巴细胞的分离 健康献血者外周血，肝素抗

基金项目：河北省科技支撑计划项目(编号：09276418D-18)

通讯作者 张庆波，E-mail：zqb1955@yahoo.com

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

凝，用淋巴细胞分离液密度梯度离心，常规分离外周血单个核细胞(PBMC)。37℃、5%CO_2孵箱培养 90 min，收集非黏附细胞，即为淋巴细胞(L)。

1.4 *肿瘤可溶性抗原制备* Eca109 细胞置于含 10%FBS 的 RPMI1640 中培养，取对数生长期的细胞，0.25%胰蛋白酶消化，PBS 洗细胞 2 次，PBS 调整细胞密度为 1×10^8/mL，放入离心管内，封口，置于-80 ℃冰箱中快速冷冻 20 min，再迅速放入 37 ℃水浴中解冻 10 min，反复 4 次，以 5 000 r/min 离心 40 min，收集上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后即为肿瘤可溶性抗原。用考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白含量，-20℃保存备用。

1.5 *淋巴细胞增殖的测定* 实验分 4 组：A 组：单独淋巴细胞；B 组：SEC + 淋巴细胞；C 组：TSA + 淋巴细胞；D 组：SEC + TSA + 淋巴细胞。SEC 浓度 0.1 ng/mL，TSA 浓度 50 μg/mL。用完全 RPMI-1640 培养液调整淋巴细胞浓度为 10^6/mL，接种于 96 孔板，每孔 100 μL，各组设 3 复孔。分别培养 24 h、48 h、72 h、96 h，用 CCK-8 显色法测定。

1.6 *细胞培养上清液中人肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平的检测* 用完全 RPMI-1640 培养液调整外周血淋巴细胞浓度为 1×10^6/mL，按实验分组接种于 24 孔平底培养板，每孔细胞悬液和含等体积 SEA(终浓度 0.1 ng/mL)或 TSA(终浓度 50 μg/mL)的完全 RPMI1640 培养液各 0.5 mL，各设 3 个复孔，在 37℃、5% CO_2孵箱中培养。分别于培养的第 1 天、第 3 天、第 5 天用无菌管收集，3 000 r/min，离心 15 min，收集各组上清液。按 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF-α 水平。

1.7 *细胞毒活性检测* 分别取食管癌细胞系 Eca109 和宫颈癌 Hela 细胞作为靶细胞，单独淋巴细胞组和经食管癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激淋巴细胞组培养诱导的细胞作为效应细胞，调整细胞浓度为 2×10^6/mL，分别与 Eca109(1×10^5)、Hela(1×10^5)共同加于 96 孔板中，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 复孔。培养 24 h 后用 CCK-8 法测各组效应细胞对肿瘤细胞的杀伤率。肿瘤细胞杀伤率(%) = 1-[(实验组 OD 值-效应细胞组 OD 值) /靶细胞组 OD 值] × 100%

1.8 *统计学处理* 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 16.0 软件包对数据进行统计学处理。多组间数据比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *淋巴细胞增殖的测定* 在 24～72 h 时，每组淋巴细胞增殖能力随时间的增加而增强，各实验组均于 72 h 时细胞增殖最显著($P<0.05$)；培养达 96 h时，淋巴细胞增殖趋势开始下降。同一时间点，每组淋巴细胞增殖能力也不同，经食管癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激的 D 组与 A 组、B 组、C 组比较，细胞增殖活性最高，于 72 h 达到高峰(图 1)。

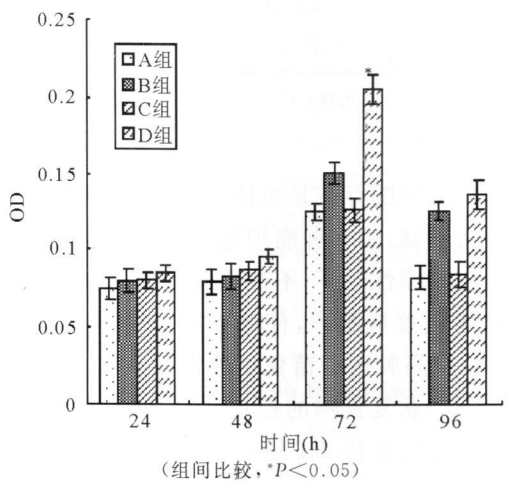


图 1 不同时间点各实验组细胞增殖的测定

2.2 *细胞培养上清液中 TNF-α 分泌水平的测定* 采用 ELISA 法检测不同形式刺激淋巴细胞培养液上清液中细胞因子的变化，实验过程按照试剂盒说明书进行操作，每组试验均重复 3 次，对照组 A 为无刺激的淋巴细胞。从图 2 可见，与 A 组相比，B 组、C 组、D 组培养上清液中 TNF-α，1 d 活性已开始升高，于 3 d 达峰值。其中以 SEC 联合 TSA 刺激的 D 组为最高，与其他 2 组试验组相比差异显著($P<0.01$)。

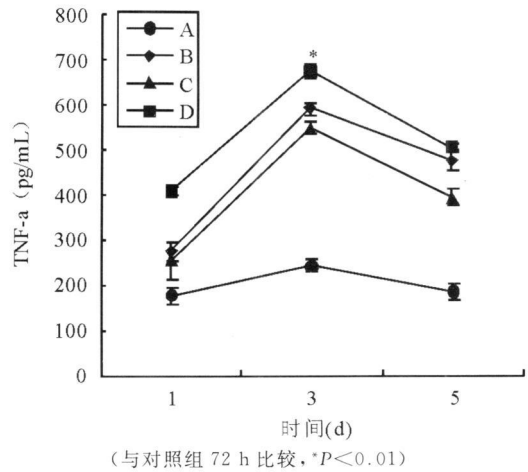


图 2 不同时间点 TNF-α 水平测定

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 效应细胞对靶细胞的杀伤效应 经食管癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激的淋巴细胞组诱导的 CTLs 对靶细胞 Eca109 杀伤活性为 97.36%，显著高于单纯淋巴细胞组 64.21%，效应细胞对 Eca109 的杀伤活性显著高于 Hela，有显著差异（$P<0.05$）（表 1）。

表 1 效应细胞对靶细胞系的杀伤活性的检测（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）（%）

组别	Eca109	Hela
A 组	64.21±2.95	65.18±3.27
D 组	97.36±3.11[ab]	78.67±4.74[a]

注：A 组与 D 组间比较，[a] $P<0.05$；与 Hela 细胞比较，[b] $P<0.05$

3 讨 论

肿瘤抗原的存在是机体识别肿瘤并激活免疫系统的物质基础，由于肿瘤细胞缺乏一种或多种成分，导致其免疫原性低下，不被免疫系统识别，不能有效刺激机体免疫应答[3]，使肿瘤处于免疫逃逸状态。近年来，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）的不同片段高效地激活 T 细胞，促使分泌大量及多种细胞因子，对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用，实验研究[4-5]效果较好，但单纯应用超抗原 SE 无靶向作用[6]。由于多数肿瘤细胞的特异性抗原不清楚，本研究选用反复冻融法制备的全细胞可溶性抗原将可溶性抗原与超抗原 SEC 联合作用 T 细胞，可以保证肿瘤抗原被有效摄取提呈，且可提高共刺激信号，诱导针对肿瘤抗原的免疫应答。本研究结果发现，食管癌肿瘤可溶性抗原与超抗原 SEC 联合应用具有更为强大的活化效应细胞的能力，对食管癌靶细胞的杀伤率更为明显，显示出一定的抗肿瘤免疫治疗应用前景，为抗肿瘤治疗提供了新的思路和方法。但是，肿瘤可溶性抗原与超抗原 SEC 诱发 CTL 的反应机制及体内实验还需进一步的探讨。

参考文献

[1] Cheson BD, Leonald JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell Non-Hodgkin's lymphoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(6): 613-626.

[2] 吴擎颐，徐建民. CIK 细胞：过去、现在与将来[J]. 中国临床医学，2006，13(5)：782-784.

[3] Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy [J]. Nat Immunol, 2001, 2(4): 293-299.

[4] Perabo FG, Willen 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.

[5] Thamm DH, Kurzman ID, Macewen EG, et al. Intralesional lipid complexed cytokine/Superantigen immunogene therapy for spontaneous canine turnors [J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(8): 473-480.

[6] 韩从辉，郑宝钟，田军，等. 超抗原诱导杀伤性 T 细胞体内外对膀胱肿瘤的杀伤作用研究[J]. 中华肿瘤杂志，2000，23(5)：392-396.

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net