SEC对淋巴细胞分泌 TNF－α的诱导作用

王 凡 黄 强 周丽英

[摘 要] **目的** 探讨超抗原 SEC的抗癌作用机制。**方法** 采用 ELISA法测定 SEC在不同浓度及作用时间促淋巴细胞分泌 TNF－α的作用;采用 RT－PCR法检测 SEC在不同作用时间促进淋巴细胞表达 TNF－α的 mRNA。**结果** ELISA法显示:淋巴细胞在未经 SEC激活之前,培养上清液中 TNF－α较低,经 SEC激活后的第 1天,培养上清液中 TNF－α迅速上升,到作用的第 3天,TNF－α上升至峰值。RT－PCR显示:经 SEC活化的淋巴细胞有大量 TNF－α mRNA的表达,高峰出现于第 3天。**结论** SEC能促进淋巴细胞大量分泌 TNF－α。

[关键词] 金葡菌肠毒素 C;超抗原;淋巴细胞;肿瘤坏死因子 －α

Tumor necrosis factor－α secretion of lymphocyte stimulated by SEC

Wang Fan, Huang Qiang, Zhou Liying

Department of Radiation Oncology, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022

[Abstract] Objective Probe to antitumor mechanism of superantigen SEC. Methods We measured TNF－α in lymphocyte stimulated by SEC(in different dose and time) with ELISA method; mRNA expression was measured by using RT－PCR. Results APAAP shows: There is little TNF－α before using SEC. The lymphocyte stimulated by SEC began to secrete TNF－α greatly at first day. Secreting amount reached peak at the third day and decreased slowly at the 5th、7th day; RT－PCR shows: Lymphocyte activated have expressed mRNA of TNF－α, contrast to this the lymphocyte unactivated did not expressed any mRNA of cytokine. Conclusion SEC can induce lymphocyte to secrete TNF－α

[Key words] Staphylococcal enterotoxin; Superantigen; Lymphocyte; Tumor necrosis factor－α

生物治疗现已被公认为除手术、放疗和化疗外的第四种肿瘤治疗手段。高聚生作为一种超抗原[1],经动物实验及人体临床试验,均显示出强大的抗瘤作用[2]。本文通过观察金葡菌肠毒素 C型(staphylococcal enterotoxin C, SEC)对淋巴细胞分泌 TNF－α的诱导作用,试图对 SEC高聚生的抗瘤作用机制进行阐明。

资料与方法

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。全自动酶联免疫检测仪:HYPERION, USA。

2.主要试剂 SEC,沈阳协合制药厂。Ficoll－Hypaque淋巴细胞分离液,比重 1.077±±0.022,上海试剂二厂。RPMI1640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。TFN－α检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

3.淋巴细胞的分离培养及活动 取健康志愿者静脉血 50 ml(肝素 1 250 U),100 ml PBS稀释,小心加入到等体积的淋巴细胞分离液,2 000 r/min离心 20分钟,小心吸出中层的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell)层,加 5倍 PBS稀释,1 000 r/min离心 5分钟,弃上清,将沉淀置于 RPMI1640完全培养基(含 20%小牛血清、青链霉素各 100 U/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 10 U/ml、5 U/ml、2.5 U/ml、0 U/ml,于用药前及用药后的第 1、3、5、7天离心,收集上清液及淋巴细胞,分别置于 －20℃及 －80℃冰箱保存备用。

4.ELISA检测淋巴细胞上清液 TNF－α 采用双抗体夹心法,取出已平衡至室温的板条,加入标准品稀释液 100 μl至空白孔和零孔,加入上述收集的上清液和已稀释的不同浓度的标准品各 100 μl至相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,37℃ 90分钟,洗涤液洗板 4

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院肿瘤放疗科
苏州大学附二院脑肿瘤研究室(黄 强,周丽英)

中国知网 https://www.cnki.net

次，除空白孔外，每孔加入已稀释好的生物学标记二抗 100 μl封住板孔，37℃ 60分钟，洗涤液洗板 4次，除空白孔外，每孔加已稀释好的酶联物 100 μl封住板孔，37℃ 30分钟，洗板液洗板 4次，每孔加底物 A、B各 1滴，避光 37℃ 15分钟，每孔加终止液 1滴，混匀，即刻在 450 nm处读数。

5. RT－PCR检测细胞因子和表达

(1)总 RNA抽提：取上述备用的淋巴细胞，PBS洗 2遍，在 1×10^6 细胞加入 1 ml Trizol裂解液，反复吹打置室温 5分钟，加入 0.2 ml氯仿，剧烈振摇 15秒，室温静置 3分钟于 4℃ 13 500 g离心 15分钟，转移上层水相，加入 0.5 ml异丙醇并混匀，室温静置 10分钟，于 4℃ 13 500 g离心 10分钟，弃上清，加入 1 ml 75%乙醇，震荡混匀，于 4℃ 7 500 g离心 5分钟，弃上清，超净台内干燥 5分钟，加入 50 μl DEPC处理水，溶液于 55～60℃，水浴 10分钟，分光光度计分析并定量，置 －80℃备用。

(2) cDNA的合成：取 5(1)抽提的 RNA 3 μl Oligodt 1 μl(0.5 μg/ml) DEPC处理水 12 μl置于 70℃水浴 10分钟，冰上冷却 3分钟，加入预先混匀的 PCR反应混合液 7 μl(10×反应缓冲液 2 μl 25 mmol/L氯化镁 2 μl 10 mmol/L dNTP 1 μl 0.1 mol/L DTT 2 μl)，轻轻混匀后置 42℃ 5分钟，加入 1 μl M－MLV逆转录酶 (200 U/ml)，混匀后于 42℃反应 50分钟，置 72℃ 15分钟终止反应，冰上冷却 10分钟，离心收集反应液，加入 1 μl RnaseH 于 37℃反应 20分钟，置 －20℃备用。

(3)引物合成：上海 SANGER公司产品

① β－actin F：5'－AGC AAG AGA GGC ATC CTC AC－3'
R：5'－GCA GCT CAT TGT AGA AGG TGT－3'

② TNF－α F：5'－TGT AGG CTC GAG GTC AGA TCA TCT TCT CGA AC－3'
R：5'－GCT ACC AAG CTT CAG GGC AAT GAT CCC AAA G－3'

(4) PCR扩增：在 50 μl反应体系中，加入 10×PCR缓冲液 5 μl氯化镁 (25 mmol/L) 2 μl dNTP(10 mmol/L) 1.2 μl上、下游引物 (10 mmol/L)各 2 μl模板 cDNA 2 μl Taq plus DNA聚合酶 1 μl，循环条件：94℃ 7分钟变性，然后 94℃ 60秒、57℃ 30秒及 72℃ 90秒，循环 30次，72℃延长 7分钟，2%琼脂糖凝胶电泳。

结　果

1. SEC活化淋巴细胞前后的 TNF－α检测结果　SEC活化淋巴细胞前后培养上清液中的 TNF－α在未经 SEC激活之前，培养上清液中 TNF－α较低，在 37.44～76.24 pg/ml之间，经 SEC激活后的第 1天，培养上清液中 TNF－α迅速上升，到作用的第 3天，TNF－α上升至峰值，其中 SEC 10单位 /ml剂量组的 TNF－α上升到 541.87 pg/ml到第 5天及第 7天，TNF－α开始下降，从不同剂量组显示的激活效果看，SEC 10 U/ml剂量组激活淋巴细胞的作用最强，见图 1。

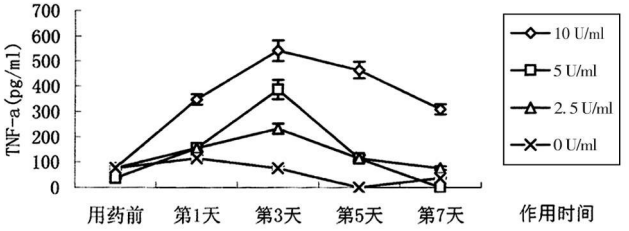


图 1　SEC促淋巴细胞分泌 TNF－α作用

2. SEC激活淋巴细胞 mRNA的表达　我们采用 RT－PCR法对 SEC(10 U/ml)作用前后的淋巴细胞(用药前、第 1、3、5、7天)进行 TNF－α进行检测，发现与 β－actin相比较，经 SEC活化的淋巴细胞均分泌表达 TNF－α mRNA，其中以第 3、5天表达量最高，见图 2。

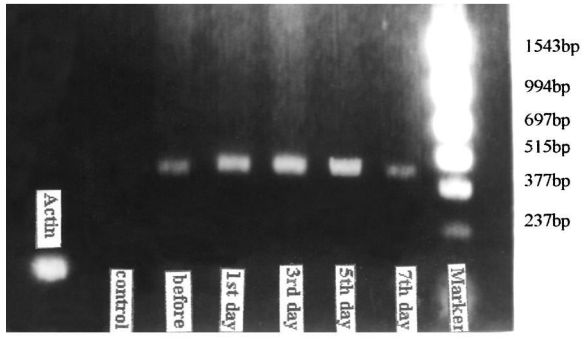


图 2　SEC促淋巴细胞表达 TNF－α结果

讨　论

从本实验结果来看，ELISA从蛋白质水平和 Rt－PCR从 mPNA水平检测的结果都可证实。SEC诱生的 CTL在 SEC刺激 PBMC第 1天就开始分泌细胞因子：TNF－α可持续 5～7天，其中，最大分泌出现在第 3～5天。这些细胞因子可对肿瘤细胞产生直接或间接的杀伤。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[3]。这是非常令人向往的设想，因为机体杀伤

中国知网 https://www.cnki.net

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呈指数级增殖,注入体内的 CTL可高达 5×10^8,未见任何毒性反应。因此,世界上有权威性的肿瘤研究机构 (美国国立癌症研究所、斯隆 -凯特癌症研究所、法国肿瘤免疫药理研究所等)都正致力于此项研究。美国国立癌症研究所 lotzw等[4]将 3例肺部有转移的肉瘤病人 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±1.9 CPM,经 IL-2孵育的 CTL,增至 253.6±15.4CPM。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[5,6]。关于 TNF-α在肿瘤免疫反应中的作用,体外实验早已证实 TNF-α可使肿瘤细胞坏死。研究发现, TNF-α诱导的肿瘤细胞杀伤作用,可通过诱导靶细胞调亡这一途径实现,肿瘤靶细胞表面有一种名为 FAS(APO-1)分子是 TNF受体家族成员, Fas有三个跨细胞膜区和一个胞浆尾端 (死亡区)这与 TNFR(P55)同源,后者的死亡区与 Fas完全一样。 Fas与效应细胞相结合迅速可诱导靶细胞凋亡,同理,细胞表面和可溶性 TNF与 TNFR结合后,亦发出死亡信号导致肿瘤靶细胞调亡。此外, TNF与处于间期的肿瘤细胞质模表面的特异性受体结合, TNF-受体复合物在细胞表面形成帽状聚集并入胞形成胞内小囊,小囊沿微管移动与溶酶体融合,在分裂期,由于细胞内膜系统变脆,在 TNF的作用下,溶酶体容易破裂,释出溶酶体酶致细胞自溶。除了上述 TNF-α直接作用于肿瘤细胞,显示出杀伤活性外, TNF-α还可使肿瘤细胞表面表达粘附分子 LFA-1、CD_2及 ICAM-1,从而增强效应细胞与肿瘤细胞的粘附性。另外 TNF-α作用于肿瘤细胞,使其增强 MHC-1类及Ⅱ类分子的表达,提高 CD_4^+或 CD_8^+细胞识别肿瘤细胞的能力。 TNF-α还可通过其它细胞因子活化的效应细胞来杀伤肿瘤细胞[7]。超抗原活化的 T细胞能分泌多种足量的细胞因子,包括 TNF-β、IFN-γ、IL-2或 IL-12。本文的实验亦表明:经 SEC活化的淋巴细胞有 NTF-α的 mRNA的表达及 NTF-α蛋白的分泌。

参 考 文 献

1 Bernhard T. Superantigen. APMIS, 1994; 102: 3～12

2 Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, et al. Superangen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. Int J Cancer, 1993; 54: 482～488

3 黄 强主编.脑肿瘤分子外科学.北京:中国科学技术出版社, 1998: 122～131

4 Maestrelli P, Tsai JJ, Cromwell O, et al. The identification and partial characterization of a human monounclear cell-derived neutrophil chemotactic factor apparently distinct from IL-1, IL-2, GM-CSF, TNF and IFN. Immunology, 1988; 64: 219～225

5 Callahan JE, Herman A, Kappler JW, et al. Stimulation of B10.BRT cells with superantigenic staphylococcal enterotoxins. J Immunol, 1990; 144: 2473～2479

6 Johnson HM, Torres BA, Soos JM, superantigens: structure and relevance to human disease. PSEBM, 1996; 212: 99～109

7 Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, et al. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. Int J Cancer, 1993; 54: 482

(2005-07-04收稿 2006-02-07修回)

论 文 中 的 表

表的编排,一般是内容和测试项目由左至右横读,数据依序竖排。表应有自明性。表应编排序号,一律用阿拉伯数字依序连续编排序号。每一表应有简短确切的题名,连同表号置于表上。必要时,应将表中的符号、标记、代码,以及需要说明事项,以最简练的文字,横排于表题下,作为表注,也可以附注于表下。表内附注的序号宜用小号阿拉伯数字加圆括号置于被标注对象的右上角,不宜用星号。

表的各栏均应标明“量或测试项目、标准规定符号、单位”。表内同一栏的数字必须上下对齐,表内空白代表未测或无此项。如数据已经绘成曲线图,可不再列表。

中国知网 https://www.cnki.net