# 可溶性抗原联合超抗原诱导的 CTL 抗瘤作用的实验研究

张庆波[1]，么文博[2]，徐卫国[1]，苏铁柱[3]，刘洪梅[2]，董雪松[4]，徐丽晓[5]

## Anti – tumor effect of CTL induced by tumor soluble antigen and superantigen SEC

ZHANG Qingbo[1], YAO Wenbo[2], XU Weiguo[1], SU Tiezhu[3], LIU Hongmei[2], DONG Xuesong[4], XU Lixiao[5]

[1] *Hebei United University, Hebei Tangshan* 063009, *China*; [2] *People Hospital of Tangshang, Hebei Tangshan* 063001, *China*; [3] *Kangli Hospital of Qianxi, Hebei Qianxi* 064300, *China*; [4] *Fourth Hospital of Tangshan, Hebei Tangshan* 063001, *China*; [5] *People Hospital of Zunhua, Hebei Zunhua* 064200, *China*.

**【Abstract】 Objective:** To study the anti – tumor effect of the CTL induced by tumor soluble antigenand superantigen SEC in vitro. **Methods:** Lymphocyte cells were isolated from peripheral blood and then stimulated in vitro with soluble antigen, test levels of proliferation, cytokine and killing activity. **Results:** Proliferation activity in lymphocyte cells group stimulated by TSA and SEC was the strongest, the killing activity of lymphocyte cell group stimulated by TSA and SEC against target cells was significantly higher than only lymphocyte cell group ($P < 0.05$), apoptosis of tumor was induced by CTL. **Conclusion:** The seffector cells stimulated by TSA and SEC induce effective proliferation, activation and high antitumor efficiency and with potential effect.

**【Key words】** lymphocytes; tumor soluble antigen; staphlococcal enterotoxin; killing activity

Modern Oncology 2012, 20(07): 1341 – 1343

**【摘要】 目的：**探讨肿瘤可溶性抗原联合超抗原 SEC 诱导的细胞毒性 T 细胞(CTLs)对肿瘤细胞杀伤机理。**方法：**外周血淋巴细胞经肿瘤可溶性抗原、超抗原 SEC 联合作用，进行体外培养。对其增殖、细胞因子分泌、杀瘤活性和形态学变化进行观察和测定。**结果：**经肿瘤可溶性抗原、超抗原 SEC 联合刺激的淋巴细胞组增殖活性最强，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 来源的肺癌细胞具有选择性杀伤作用，能够诱导肿瘤细胞出现凋亡的形态学变化。**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; 金葡素; 杀伤活性

**【中图分类号】** R73 – 36$^{+}$2 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672 – 4992.2012.07.07

**【文章编号】** 1672 – 4992 – (2012)07 – 1341 – 03

近年来，恶性肿瘤严重威胁人类的生命健康，由于肿瘤具有的侵袭和复发的生物学特性，使传统的手术、放疗和化疗的治疗效果受限。随着免疫学理论和分子生物学知识的不断发展和突破，生物免疫疗法成为控制和消除肿瘤的新途径。本研究通过体外实验，应用超抗原金葡菌肠毒素 C(staphlococcal enterotoxin, SEC)联合肿瘤可溶性抗原(tumor soluble antigen, TSA)刺激 T 淋巴细胞，诱导产生细胞毒 T 细胞(cyctotoxic T lymphocyte, CTL)，对肿瘤细胞进行杀伤作用研究，以探讨其治疗肿瘤的可行性。

【收稿日期】 2011 – 11 – 01

【修回日期】 2012 – 01 – 29

【基金项目】 河北省科技支撑计划项目(编号：09276418D – 18)

【作者单位】 [1]河北联合大学，河北 唐山 063009

[2]唐山市人民医院，河北 唐山 063001

[3]迁西县康力医院，河北 迁西 064300

[4]唐山市第四医院，河北 唐山 063001

[5]遵化县人民医院，河北 遵化 064200

【作者简介】 张庆波(1955 – )，男，河北人，硕士研究生导师，教授，主任医师。主要从事微生物及其产物对机体免疫功能的影响的研究。E – mail: zqb1955@yahoo.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** CCK – 8(武汉碧云天公司)，ELISA 检测试剂盒(R&D)，瑞氏染色剂(贝真生物科技有限公司)，淋巴细胞分离液(天津 TBD 公司)，RPMI – 1640(Gibco 公司)。

**1.1.2 肿瘤细胞系** 人肺癌细胞株 CALU – 6，Hela 细胞株由本校免疫学实验室提供。

**1.1.3 高聚金葡液** 购于沈阳协和集团，主要成分为金葡菌肠毒素 C，含量为 10ng/ml。

### 1.2 方法

**1.2.1 淋巴细胞的分离** 健康献血者外周血，EDTA 抗凝，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 90min，收集细胞悬液，即为淋巴细胞(L)。

**1.2.2 肿瘤可溶性抗原制备** 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期的 CALU – 6 细胞，PBS 洗 3 次，调整细胞浓度为($1 \times 10^7$) – ($1 \times 10^8$/ml)，– 80℃/37℃ 条件下反复冻融 4 次，5000r/min，离心 40min，取上清即为 TSA。考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白含量，0.22μm 滤膜过滤，– 20℃ 保存备用。

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

**1.2.3　淋巴细胞增殖的测定**　实验分 4 组。A：单独淋巴细胞（L）；B：SEC + L；C：TSA + L；D：SEC + TSA + L。SEC 浓度 0.1ng/ml，TSA 浓度 50μg/ml。用完全 RPMI－1640 培养液调整淋巴细胞浓度为 $1\times10^6$/ml，接种于 96 孔板，每孔 100μl，各组设 5 个复孔。分别于培养 24h、48h、72h、96h 使用 CCK－8 显色法测定细胞增殖率。

**1.2.4　细胞因子的检测**　取上述不同分组诱导的 CTLs 上清按 ELISA 检测试剂盒所示方法测定细胞因子 IL－2、TNF－α 含量。

**1.2.5　细胞毒活性检测**　分别取肺癌细胞株 CALU－6 和宫颈癌 Hela 细胞作为靶细胞，经肺癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激淋巴细胞组培养诱导的 CTLs 作为效应细胞，调整其细胞浓度为 $1\times10^6$/ml 和 $2\times10^6$/ml，分别与 CALU－6（$1\times10^5$）、Hela（$1\times10^5$）共同加于 96 孔板中，效靶比分别为 10∶1 和 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 24h 后，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%

**1.2.6　细胞凋亡形态学观察**　实验分对照组（单纯淋巴细胞），实验组（SEC + TSA 刺激的淋巴细胞组），体外培养 3 日，调整各组细胞浓度为 $1\times10^6$/ml。收集 CALU－6 细胞，调整细胞浓度为 $1\times10^5$/ml，分别与培养 3 日的对照组、实验组细胞混合，加于已放置经无菌处理盖玻片的六孔板中，在 37℃、5% $CO_2$ 孵箱中培养 24h 后，吸掉培养液，PBS 洗 3 次，去除悬浮的淋巴细胞和未贴壁的肿瘤细胞，取出带有细胞的盖玻片，进行染色，镜下观察。

### 1.3　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，显著性检验标准为 $P<0.05$。

## 2　结果

### 2.1　不同刺激物对淋巴细胞增殖的影响

在 96h 内，不同时间点各组体外培养的淋巴细胞增殖能力不同（见图 1），在 24h－72h 之间时，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 72h 时细胞增殖最显著；但到 96h 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，经肺癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激组与其他 3 组比较，细胞增殖活性最高，于 72h 达到高峰并且显著高于其他组（$P<0.05$）。

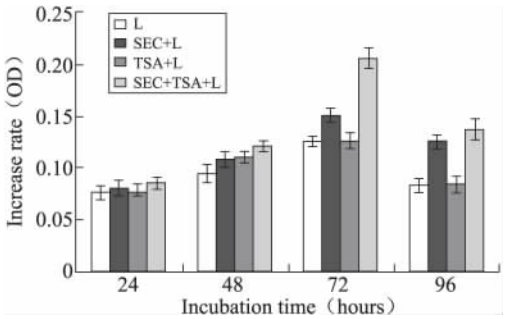



图 1　各实验组细胞增殖率的测定

Fig. 1　Detection of proliferation of cells among different groups

### 2.2　各组细胞因子的测定

采用 ELISA 法检测不同形式刺激淋巴细胞培养液上清中细胞因子的变化，实验过程完全按照试剂盒说明书进行操作，每组试验均重复 3 次，结果见表 1。结果表明试验组所测两种细胞因子 IL－2，TNF－α 均较单纯淋巴细胞组有明显的增加，其中以 SEC + TSA + L 组为最高，与其他两试验组相比差异显著（$P<0.05$）。

表 1　不同实验组分泌细胞因子的测定（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab. 1　Cytokine production among different groups（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

| | L | SEC + L | TSA + L | SEC + TSA + L |
|---|---|---|---|---|
| IL－2 | 31.2 ± 3.7 | 143.0 ± 2.3 | 137.7 ± 4.8 | 218.4 ± 5.2* |
| TNF－α | 198.2 ± 8.1 | 537.0 ± 10.1 | 624.9 ± 9.8 | 1021.6 ± 12.5* |

Note：Compared among different groups，* $P<0.05$.

### 2.3　效应细胞对靶细胞的杀伤效应

经肺癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激淋巴细胞组培养诱导的 CTLs，对靶细胞的杀伤活性显著高于单纯淋巴细胞组（$P<0.05$）。当效靶比为 20∶1 时，对靶细胞 CALU－6 杀伤活性为 95.75%，显著高于效靶比 10∶1 时的 51.47%。效应细胞对 CALU－6 的杀伤活性明显高于对 Hela 的杀伤活性，差异有显著性（$P<0.05$，表 2）。

表 2　效应细胞对靶细胞的杀伤作用（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab. 2　Killing activity of effector cells on target cells（%，$\bar{x}\pm s$）

| E∶T | CALU－6 | Hela |
|---|---|---|
| 10∶1 | 51.47 ± 3.15 | 48.16 ± 2.27 |
| 20∶1 | 95.75 ± 2.51* | 68.32 ± 3.74 |

Compared with Hela cells group，* $P<0.05$.

### 2.4　凋亡细胞的形态观察

两种细胞混合 3h 时，镜下观察可见，大量淋巴细胞黏附在肿瘤细胞周围。培养 24 小时光镜观察：经瑞氏染色，镜下见正常细胞核染成深蓝色或蓝紫色，色泽均一。凋亡的肿瘤细胞分散存在，多数呈圆形，少数为不规则形，体积缩小，胞膜完整，胞浆红染。核染色质浓缩，有的聚集在核膜下呈环状或块状。细胞核碎裂，有的细胞似出芽状，或形成凋亡小体，并可见到凋亡的细胞或凋亡小体被相邻的细胞吞噬的现象。

## 3　讨论

肿瘤是由于机体的免疫功能不足以战胜各种致病因素而造成的，其发生、发展与宿主的免疫状态有着密切的关系。通过恢复和增强肿瘤患者的免疫监视能力和免疫杀伤功能，可以清除手术和放疗后患者体内残存的肿瘤细胞，达到预防肿瘤复发、转移及根治肿瘤的目的，与传统的肿瘤治疗手段比较，具有特异性强、毒副作用小等特点。但是肿瘤细胞可通过多种方式来逃避免疫监视，目前已经认识到的肿瘤免疫逃逸的相关机制很多[1]，最主要的是肿瘤抗原表达缺陷及抗原调变。肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发机体肿瘤免疫应答的关键，国内外多个体内外实验和动物实验表明[2-4]，以适当形式的肿瘤抗原，不论是蛋白质、多肽，还是核酸加载的 DC 疫苗，都能够激活肿瘤特异性 CTL 细胞，直接杀伤肿瘤细胞或激活 B 细胞分泌抗体，从而产生特异性抗肿瘤效应。金葡菌肠毒素（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，对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用[5-7]，是近年来应用超抗原进行肿瘤生物治疗的基本研究思路，已逐步应用于临床，并获得了十分显著的临床效果。Hedlund[8] 研究证明 SEA 激活 T 细胞使之增殖和产生细胞毒作用呈剂量依赖关系，其范围在每小鼠 0.1－100μg 不等。朱云等[9] 应用高聚金葡素联合化疗治疗进展

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

期消化道肿瘤的临床研究,结果显示高聚金葡素能有效保持及提高白细胞数量,提高中性粒细胞水平,预防及防止化疗药物的骨髓抑制,增强患者的化疗耐受性。程慧桢等[10]用葡萄球菌肠毒素协助无水酒精局部注射治疗肝癌发现能够增强肝癌患者局部抗肿瘤细胞免疫。本实验应用肿瘤可溶性抗原联合 SEC 超抗原诱导的 CTLs 对肿瘤细胞进行杀伤作用研究。实验结果显示,TSA 联合 SEC 体外作用于淋巴细胞,提高了淋巴细胞的活化和增殖,促进细胞分泌 IL - 2、TNF - α 等细胞因子。SEC 联合 CALU - 6 的 TSA 诱导的效应细胞对肿瘤细胞(CALU - 6)的杀伤率为 95.75%,明显高于不同来源的肿瘤细胞(Hela 68.32%),说明对靶细胞杀伤作用具有选择性,靶向作用。本实验中通过对效靶细胞混合培养一定时间的细胞爬片进行染色后,镜下观察见肿瘤细胞胞质浓缩,体积缩小,呈圆形或不规则形,核染色质浓缩或形成块,部分细胞膜形成凋亡小体,被邻近的肿瘤细胞所吞噬。这说明经联合刺激淋巴细胞诱导生成的 CTL 细胞能够导致靶细胞的凋亡。

综上所述,经肿瘤可溶性抗原与超抗原 SEC 联合应用具有强大的活化淋巴细胞的能力,对靶细胞的杀伤率更为明显,显示出抗肿瘤免疫治疗应用前景。

【参考文献】


[1] Bronte V, Mocelln S. Suppressive influences in the immune response to cancer [J]. J Immunother, 2009, 32(1): 1 - 11.

[2] Fujita Y, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases [J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 41: 193 - 198.

[3] Mosca PJ, Lyerly HK, Clay TM, et al. Dendritic cell vaccines [J]. Front Biosci, 2007, 12: 4050 - 4060.

[4] 杨惠祥,王志勇,于满. 肿瘤抗原致敏的树突状细胞诱导特异性抗膀胱癌作用的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(7): 985 - 988.

[5] Perabo FG, Willen PL, Wirger A, et a1. Preclinical evaluation of superantigen(staphylococcal enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2005, 115(4): 591 - 598.

[6] Pumphrey N, Vuidepot A, Jakobsen B, et al. Cutting edge: Evidence of direct TCR alpha - chain interaction with superantigen [J]. J Immunol, 2007, 79(5): 2700 - 2704.

[7] Thamm DH, Kurzman ID, Macewen EG, et al. In tralesionaI lipid complexed cytokine/ superantigen immunogene therapy for spontaneous canine tumors [J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(8): 473 - 480.

[8] Hedlund G, Dohlsten M, Petersson C, et al. Superantigen - based tumor therapy: in vivo activation of cytotoxic T cells [J]. Cancer Immunol Immunother, 1993, 36(2): 89 - 93.

[9] 朱云,张南征,潘武,等. 高聚生辅助化疗治疗消化系统肿瘤的近期疗效观察 [J]. 中华实用医药杂志, 2005, 5(3): 63 - 69.

[10] 程慧桢,王秀玲,郑慕白. 肝癌灭活后瘤周注射超抗原的临床研究 [J]. 实用癌症杂志, 2007, 22(2): 177 - 182.


(编校:张志明)

# 辛伐他汀联合吡喃阿霉素对肝癌 SMMC - 7721 细胞的协同抑制作用

杨士杰

# The effect of simvastatin plus priarubicin on proliferation of liver cancer cell line SMMC - 7721

YANG Shijie

*Department of Radiation and Chemotherapy, Jizhong Eneral Xingtai Mig General Hospital, Hebei Xingtai* 054000, *China*.

【**Abstract**】 **Objective:** To examine the interaction effect of simvastatin and priarubicin on proliferation ability of SMMC - 7721. **Methods:** After treated SMMC - 7721 cell with simvastatin and priarubicin 48 hours, proliferation of SMMC - 7721 were examined with MTT test. **Results:** The interaction index for simvastatin and priarubicin used in combination in SMMC - 7721 was 0.71. **Conclusion:** The combination therapy with simvastatin and priarubicin may be due to the synergistic interaction of these two drugs.

【**Key words**】simvastatin; liver cancer; SMMC - 7721

Modern Oncology 2012, 20(07): 1343 - 1344

【摘要】 目的:研究辛伐他汀联合吡喃阿霉素对人肝癌细胞 SMMC - 7721 的增殖抑制作用。方法:辛伐他汀、吡喃阿霉素分别及联合处理细胞 48 小时,MTT 法测量细胞的增殖抑制,按公式计算相互作用指数。结果:按照文献报道计算相互作用指数,相互作用指数小于 1。结论:辛伐他汀和吡喃阿霉素对于 SMMC - 7721

【收稿日期】 2011 - 08 - 03

【修回日期】 2011 - 09 - 13

【作者单位】 冀中能源邢台矿业集团总医院放化疗科,河北 邢台 054000

【作者简介】 杨士杰(1977 - ),男,河北巨鹿人,主治医师,主要从事恶性肿瘤的放疗化疗工作。

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