分类号：　　编号：

河　北　联　合　大　学

硕　士　学　位　论　文

肿瘤可溶性抗原联合金葡素超抗原诱导杀瘤细胞的实验研究

STUDY ON TUMOR-KILLING CELLS INDUCED BY TUMOR SOLUBLE ANTIGEN AND STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXIN SUPERANTIGEN

所　在　学　院：基础医学院
学　科　专　业：病原生物学
研　　究　　生：刘　洪　梅
指　导　教　师：张　庆　波　教授/主任医师
　　朱　丽　华　副教授/ 博士
　　李　淑　英　教授/ 博士

学　位　类　别：医学硕士

论文起止时间：2009 年 9 月～2011 年 3 月
论文提交时间：2011 年 4

中国知网 https://www.cnki.net

独 创 性 说 明

本人郑重声明：所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得河北联合大学以外其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

论文作者签名：刘洪福 日期：2011 年 6 月 17 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解河北联合大学有关保留、使用学位论文的规定，即：已获学位的研究生必须按学校规定提交学位论文，学校有权保留、送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以将学位论文的全部或部分内容采用影印、缩印或编入有关数据库进行公开、检索和交流。

论文密级：

☑ 公开；

☐ 保密（至　　年　月）(保密论文在解密后遵守此规定)。

作者签名：刘洪福　　导师签名：

签字日期：2011 年 6 月 17 日　　签字日期：2011 年 6 月 17 日

中国知网 https://www.cnki.net

目　录

中文摘要…… 1

英文摘要…… 5

英文缩写…… 10

研究论文

肿瘤可溶性抗原联合金葡素超抗原诱导杀瘤细胞的实验研究

前言…… 11

材料与方法…… 13

结果…… 20

附图…… 24

讨论…… 32

结论…… 39

参考文献…… 40

综述…… 43

致谢…… 56

个人简历…… 57

中国知网　https://www.cnki.net

肿瘤可溶性抗原联合金葡素超抗原诱导杀瘤细胞的实验研究

中文摘要

肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发肿瘤免疫应答的关键，是机体识别肿瘤并激活免疫系统的物质基础。但大多数肿瘤抗原的免疫原性很弱，且宿主对肿瘤抗原的免疫应答导致肿瘤细胞表面抗原减少或丢失，而使肿瘤细胞不被免疫系统识别，不能诱发有效的抗肿瘤免疫应答。基于这个认识，运用增强肿瘤抗原的免疫原性的基本方法，诱发机体的抗肿瘤免疫应答，以达到缩小和消除肿瘤的目的。近年来，提高肿瘤抗原的免疫原性的方法很多，如使用免疫佐剂、丝裂原、超抗原等。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，无需抗原提呈细胞（APC）加工处理，即可直接与 APC 膜上的 MHC-Ⅱ类分子的抗原结合槽外侧非限定性的结合，以完整的蛋白质分子形式被提呈给 T 细胞，激活 T 细胞，激活数量为普通抗原数千倍。SE 具有多种免疫学活性，包括刺激大量的 T 细胞，及活化 NK 细胞，促进细胞因子大量分泌，诸如：白细胞介素 2，干扰素，肿瘤坏死因子，乃至集落刺激因子，是目前已知的人淋巴细胞最强的刺激剂和最有力的细胞因子诱生剂，对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用。

目的

基于提高肿瘤抗原免疫原性、超抗原的靶向作用，本研究通过体外实验，应用金葡素超抗原联合肿瘤可溶性抗原刺激 T 淋巴细胞，诱导产生杀瘤性免疫细胞，对肿瘤细胞进行杀伤作用研究，探讨新的治疗肿瘤的免疫疗法。

中国知网 https://www.cnki.net

方法

1. 外周血淋巴细胞的制备:正常献血者外周血，按 Ficoll-Hypaque 细胞分离液密度梯度离心，吸取淋巴细胞层，PBS 混匀，反复洗涤 3 次，在 37℃、5%CO2 孵箱中静置 60min，收集非粘附细胞,即为外周血淋巴细胞。

2. 肿瘤可溶性抗原的制备:取处于对数生长期的食管癌 Eca109 细胞，制成密度为 10^7～10^8/ml 的细胞悬液，-80℃/37℃条件下反复冻融 4 次后，5000r/min,离心 40min，收取上清即为肿瘤可溶性抗原。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。

3. SEC,TSA 刺激细胞增殖:完全 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为 1×10^6/ml，接种于 96 孔平底培养板，再加入含不同浓度 SEA 或 TSA 的等体积的完全 RPMI1640 培养液，各设 3 复孔，分别于培养的第 24h、48h、72h、96h，用 CCK-8 比色法测定淋巴细胞的增殖情况。确定 SEC/TSA 的最佳刺激浓度后，按实验分组：A L；B L+SEC；C L+TSA；D L+SEC+TSA ，分别于培养的第 24h、48h、72h、96h，用 cck-8 比色法测定实验组细胞的增殖情况。

4. 流式细胞仪分析细胞膜表型:按上述实验分组，完全 RPMI-1640 培养液调整淋巴细胞浓度为 10^6/ml，接种于 6 孔板，每组 4 孔，培养第 3 天，收集细胞样品，每组各孔分别加入 FITC 标记的 CD19/CD3/CD4/CD8，流式细胞仪检测。

5. 细胞培养上清中 TNF-α 水平的检测:用完全 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为 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 SEA（终浓度 0.1ng/ml）或 TSA（终浓度 50μg/ml）的等体积的完全 RPMI1640 培养液各 0.5ml，各设 3 复孔。分别于培养的第 1d、3d、5d，收集各组上清液，按 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

6. 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 CTLs 作为效应细胞，效/靶=20：1，另设单独

中国知网 https://www.cnki.net

效应细胞对照组和靶细胞对照组。培养 24h 后，CCK-8 法测各组效应细胞对肿瘤细胞的杀伤率。

7．瑞氏染色法检测细胞凋亡: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，调各组细胞浓度为 1×10^6/ml。收集 Eca109 细胞（1×10^5/ml），分别与培养 3 日的对照组、实验组细胞加于已放置盖玻片的六孔板中混合培养 24h 后，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。

结果

1.不同浓度的 SEC/ TSA 刺激体外培养的外周血淋巴细胞的增殖能力不同。SEC 浓度为 0.1ng/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著； TSA 浓度为 50μg/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著。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，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（$P<0.05$）。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、B、C 组比较，细胞增殖活性最高，于 72h 达到高峰。

2．诱导的 CTLs 细胞表型分析可见：不同刺激条件下细胞培养 3 日后，4 组 CD3 均为阳性表达，对照组 A 的 CD8+只有 26.31%，而 B、C、D 三组较之明显升高（$P<0.05$），D 组诱导的 $CD8^+$最高,为 39.19%，说明所诱导的细胞为 $CD8^+$CTL 细胞。

3．与对照组相比，B，C，D 3 组培养上清中 TNF-α，1d 活性已开始升高，于 3d 达峰值。其中以 SEC 联合 TSA 刺激的 D 组为最高，与其他两组试验组相比增高显著($P<0.05$)。

4．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 63.04%，效应细胞对 Eca109 的杀伤活性明显高于 Hela（$P<0.05$）。

5. 瑞氏染色法检测细胞凋亡，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。经瑞氏染色，光镜下见正常细胞核

中国知网 https://www.cnki.net

染成深蓝色或蓝紫色，色泽均一.凋亡细胞可见核固缩，破碎，染色变深，细胞膜皱缩，引发凋亡。

结论

1. SEC 联合 TSA 诱导淋巴细胞，提高淋巴细胞的活化和增殖能力,诱导的细胞为 $CD8^{+}$CTL 细胞。SEC,TSA 能够刺激淋巴细胞高水平的分泌 TNF-α 。

2. 经食管癌 Eca109 的 TSA 作用的效应细胞对靶细胞具有选择性，靶向作用。

3. SEC 联合 TSA 诱导活化的 CTL 能够诱导肿瘤细胞发生凋亡。

关键词：超抗原，肿瘤可溶性抗原，细胞毒性 T 细胞， 食管癌，肿瘤疫苗，肿瘤生物治疗

中国知网 https://www.cnki.net

STUDY ON TUMOR-KILLING CELLS INDUCED BY TUMOR SOLUBLE ANTIGEN AND STAPHYLOCOCCUS ENTEROTOXIN SUPERANTIGEN

ABSTRACT

Tumor antigen expressed by tumor cells is the key to inducing immune response to tumor,and the base of recognizing and activating the immune system. But most of tumor antigens have weak immunogenicity.The host immune response to tumor antigens leads to reduction or loss of surface antigen of tumor cells.Tumor cells are not recognized by the immune system, which can not induce effective anti-tumor immune response. Based on this understanding, the use of basic methods of enhancing immunogenicity of tumor antigens induce anti-tumor immune responses in the body in order to achieve the purpose of reducing and eliminating tumors. In recent years, there are many ways to improve the immunogenicity of tumor antigens, such as the use of adjuvants, mitogen, superantigen and so on. Staphylococcus enterotoxin (SE) is a highly biologically active proteins, is currently studied as bacterial superantigens. SE can be directly related to the outside the antigen binding groove of MHC-Ⅱ molecules of APC membrane,without processing of antigen presenting cells (APC). Tthe complete form of protein molecules is presented onto T cells to activate T cells. The aquantity of the cells activated by SE is thousands times more than that of the common antigen. SE have many immunological activity, including stimulation of a large number of T cells, and activation of NK cells, and promotion of a large number of cytokine secretion, such as: interleukin-2, interferon, tumor necrosis factor, and even colony stimulating factor. SE is the strongest stimulant of human lymphocytes and the most powerful inducer of cytokines at present, which may directly or indirectly kill and inhibit tumor

中国知网 https://www.cnki.net

cells.

Objective

Based on improving the immunogenicity of tumor antigen and targeting of superantigen, superantigen SEC and tumor soluble antigen were used to jointly act on T lymphocyte cells to induce the killing cells for us to explore the new cell immunotherapy on tumor.

Methods

1. Preparation of Peripheral Blood Lymphocytes： lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation through Ficoll-Hypaque from Peripheral blood of normal donors. The cells were washed for 3 times and then incubated 60min in 37 ℃, 5% CO2 incubator. Non-adherent cells were collected as peripheral blood lymphocytes.
2. Preparation of Soluble Tumor Antigen：Esophageal Eca109 cells were cultured. In the phase of logarithmic growth, the cells were taken out and made up in suspension of 10^7 -10^8 cells /ml, freezed and thawed for 4 times under the conditions of -80 ℃ / 37 ℃. centrifuged for 40min under the condition of 5000r/min. The supernatant was collected as the tumor soluble antigen (TSA). Concentration of protein were examined by Bradford method. TSA was filted with 0.22μm of membrane filter to eliminate microbials, then placed in -20 ℃ of freezing.
3. Proliferation of the Cells Stimulated by SEC and TSA ： The cell concentration was adjusted to 10^6/ml with complete RPMI-1640 medium. The cells were inoculated into flat-bottomed culture plate of 96-wells. And then same volume of complete RPMI1640 culture medium were added with different concentrations of SEA or TSA, each with three duplicate wells, while the negative control group were set (no SEC、TSA). Proliferation of the lymphocytes were determined by

中国知网 https://www.cnki.net

CCK-8 at 24h, 48h, 72h, 96h. Optimal stimulation concentration by the SEC / TSA were determine. Group A containe lymphocetes(L); group B L + SEC; group C L + TSA; group D L + SEC + TSA. Lymphocyte proliferation of experimental groups were determined by CCK-8 at 24h, 48h, 72h, 96h.

4. Analysis of Cell Phenotype by Flow Cytometry：According to the above experimental groups, the cell concentration was adjust to 10^6/ml with complete RPMI-1640 medium, then inoculated into 6-wells plate, 4-wells in per group. After 3 days, the cells were collected and were added with FITC labeled CD19/CD3/CD4/CD8 to each of the wells, tested by flow cytometry.

5. Test of the Levels of TNF-α in Cell Culture Supernatant：The cell concentration was adjust to 10^6/ml with complete RPMI-1640 medium, according to experimental groups inoculated in 24-wells of plate, and then added with the same volume of complete RPMI1640 culture medium, containing different concentrations of SEA (0.1ng/ml)or TSA (50μg / ml), each with three duplicate wells. Supernatants of each group were collected at the 1d, 3d, 5d, and tested with ELISA kit.

6. Test of Cytotoxic Activity：Esophageal Eca109 and cervical Hela cells were taken as target cells and the cells in experiment groups taken as effector cells. Effect / target is 20:1. Cells were stimulated by esophageal TSA with superantigen SEC as effector cells. After 24h culture, killing rates of each group were measured by CCK-8 method.

7. Test of Apoptosis by Wright Staining：Experiments was divided into control group (only cells) and experimental group (SEC + TSA group)，cultured 3 days in vitro. The cells were adjusted to the concentration to 1×10^6/ml. Eca109 cells were collected (1×10^5/ml), placed in six-well plate with coverslips, cultured after 1 day, mixed with the control group and experimental group cells. After 24h, the cells were

中国知网 https://www.cnki.net

8. washed with PBS for three times to remove suspended cells and non-adherent tumor cells. The cells on the cover- slips were stained and examined under microscopy.

Results

1. Proliferation of peripheral blood lymphocytes stimulated by different concentrations of SEC / TSA are different in vitro. proliferation of peripheral blood lymphocyte was the most significant when the concentration of SEC was 0.1ng/ml and TSA was 50μg/ml. Within the 96h, the lymphocyte proliferation is differences in the different time points.in the time between 24h-72h, Lymphocyte proliferation increased with the time increase in each group. The proliferation of experimental group cells were the most significant at 72h ($P < 0.05$). Lymphocyte proliferation is different in each group in the same time. The group D stimulating by the esophageal TSA combined superantigen SEC was the highest proliferation activity compared with groupA, groupB, groupC and peaked at 72h.

2. Phenotype analysis of the cells shown that: CD3 were positive in 4 groups, CD8 +T of the group A were 26.31%, but that of group B, group C, group D were significantly higher than that of the group A ($P < 0.05$), CD8 + of group D was the highest(39.19%), so indicating that the induced cells were CD8 + CTL cells.

3. Compared with the group A, TNF-α in culture supernatant in groups B、groups C、groups D begun to increase on 1d, peaked on 3d. Among them, the group D stimulated by TSA and SEC was the significantly difference compared with the group A and group B($P < 0.01$).

4. Cytotoxicity of CTLs induced by the esophageal TSA combined superantigen SEC was 97.36%, which significantly higher than that of group A(63.04%). Cytotoxicity of effector cells induced by TSA of Eca109

中国知网 https://www.cnki.net

was significantly higher than that of Hela, the difference was significant ($P<0.05$).

5. When target cells and effecter cells were mixed for 3h, which shown a large number of lymphocyte adhere around tumor cells under the microscope. By Wright's stain, Normal nucleus stained dark blue or blue-purple, color uniformity, apoptotic cell pyknosis, fragmentation, staining became deeper, membrane shrinkage, appearance of apoptotic bodies。

Conclusions

1. SEC and TSA can improve the co-stimulatory signals to enhance lymphocyte activation and proliferation, which are $CD8^+$ CTL.And can stimulate lymphocytes to secrete high levels of TNF-α.

2. The CTL induced by TSA of esophageal Eca109 have selective and targeting effect on tumor cells.

3. CTLs induced by the esophageal TSA with superantigen SEC can induce tumor cells to produce apoptotic bodies.

Key words: superantigen, tumor soluble antigen, CTL, Esophageal cancer, tumor vaccine,tumor biotherapy

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文译名
SE	staphlococcal enterotoxin	金葡菌肠毒素
SEC	staphlococcal enterotoxin C	金葡菌肠毒素 C 型
SAg	superantigen	超抗原
TSA	tumor soluble antigen	肿瘤可溶性抗原
CTL	cytotoxic T lymphocyte	细胞毒 T 细胞
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
OD	Optical Density	光密度
TCR	T cell receptor	T 细胞识别受体
IL-2	interleukin-2	白细胞介素 2
IFN-γ	interferon-γ	干扰素 γ
CSF	colony stimulatory factor	集落刺激因子
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
NK cell	natural killer cell	自然杀伤细胞
CD	cluster of differentiation	分化群
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定方法

中国知网 https://www.cnki.net

肿瘤可溶性抗原联合金葡素超抗原诱导杀瘤细胞的实验研究

前　言

恶性肿瘤严重危害人类健康。自上世纪以来,手术、放疗和化疗作为传统三大疗法,对恶性肿瘤的治疗取得较好的疗效,但由于肿瘤本身易侵袭转移和复发的生物学特性，使常规治疗效果比较局限，且有的伴有明显的副作用。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，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。有关肿瘤免疫治疗的新方法、新思路、新途径不断地涌现出来。肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发肿瘤免疫应答的关键所在，是机体识别肿瘤并激活免疫系统的物质基础。但大多数肿瘤细胞缺乏一种或多种抗原成分，导致其免疫原性低下，不易被免疫系统识别，不能有效刺激机体产生免疫应答[1]，而使肿瘤处于免疫逃逸状态。近年来，提高肿瘤免疫原性的方法有很多，例如增强 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。其中，超抗原(superantigen,SAg)是细菌或病毒产生的外毒素，1989 年由 White 提出[2]，特点是无需抗原提呈细胞（APC）的加工处理，即可直接与 APC 膜上的 MHC-Ⅱ类分子的抗原结合槽外侧非限定性的结合，以完整的蛋白质分子形式被提呈给 T 细胞，以 TCRVβ 特异性的方式激活 T 细胞，促使分泌大量及多种细胞因子[3-4]，成为新一代抗肿瘤的免疫分子，给肿瘤的治疗带来新的突破。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 SAg，SE 是目前已知的人淋巴细胞最强的刺激剂和最有力的细胞因子诱生剂，也是目前研究最多、临床使用最为广泛的

中国知网 https://www.cnki.net

SAg。其具有多种免疫学活性，包括刺激大量的 T 淋巴细胞，及活化 NK 细胞、单核细胞，促进细胞因子大量分泌（诸如：白细胞介素 2，干扰素，肿瘤坏死因子，乃至集落刺激因子）对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用，实验研究的效果较好[5-6]，但是单纯应用超抗原 SE 没有靶向作用[7]。基于提高肿瘤抗原的免疫原性、超抗原的靶向作用，本研究在河北省科技支撑计划项目资助下，通过体外实验，应用超抗原 SEC 联合肿瘤可溶性抗原刺激 T 淋巴细胞增殖，诱导产生杀瘤性免疫细胞，对肿瘤细胞进行杀伤作用研究，探讨肿瘤免疫治疗新的方法。

中国知网 https://www.cnki.net

材料与方法

1.实验材料

1．1 主要试剂

主要试剂

高聚金葡液 SEC	沈阳协和集团
食管癌 Eca109 细胞株	中科院基础医学研究所
宫颈癌 Hela 细胞株	中科院基础医学研究所
高糖 DMEM 培养基	美国 GIBCO 公司
PRMI-1640 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清	美国 GIBCO 公司
0.25%胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
青链霉素	美国 Sigma 公司
0.01M PBS (PH7.2～7.4)	北京中衫金桥生物技术有限公司
FITC 标记荧光抗体	美国 BD 公司
CCK-8	江苏碧云天生物科技公司
多聚甲醛	北京中山生物技术公司
Bradford 蛋白质定量试剂盒	天根生化科技有限公司
淋巴细胞分离液	天津 TBD 公司
瑞氏染色剂	贝真生物科技有限公司
细胞冻存液	Sigma 公司
人肿瘤坏死因子 α ELISA 试剂盒	美国 R&D 公司

中国知网 https://www.cnki.net

1.2 主要仪器和设备

仪器和设备名称	型号	生产厂家
二氧化碳培养箱	MODEL3164	美国 Forma Scientific 公司
生物安全柜	HR60-ⅡA2	海尔医用低温科技有限公司
血液冷藏箱	XY-530	沈阳市伟明医疗设备厂
立式超低温保存箱	DW-86L626	海尔医用低温科技有限公司
倒置式生物显微镜	IX70-S8F2	日本 OLYMPUS 原产
光学显微镜	BX40	日本 Olympus 公司
全自动酶标仪	CB3254	美国 Molecular Devices 公司
超声清洗器	KQ-500DE	昆山市超声仪器有限公司
电热恒温水温箱	HH.W21.Cu600	上海医疗器械七厂
电子天平	JY2002	上海精密科学仪器有限公司
高速冷冻离心机	KDC-160HR	科大创新股份有限
飞鸽牌台式离心机	TDL-40B	上海安亭科学仪器厂
蒸汽消毒器	YXQG01	上海三申医疗器械有限公司
流式细胞仪	FACSCalibur	美国 BD 公司
电热干燥箱	DHG102	山东潍坊医疗仪器厂
超纯水器	uPws-I-16T	杭州永洁达净化科技有限公司
数控超声清洗器	KQ3200DV	昆山市超声仪器有限公司
移液器	Q/ZQQYH001-2001	北京青云航空仪表公司
分光光度计	722 型	上海医疗仪器厂
台式震荡机	XW-80 型	上海第一医学院仪器厂

中国知网 https://www.cnki.net

2.实验方法

2．1 外周血淋巴细胞的制备

常规无菌采集健康献血者外周血 20ml， EDTA 抗凝。将 20ml 外周血与 20mlPBS 按 1：1 的比例稀释混匀。取 6 个 15ml 无菌离心管，先将淋巴细胞分离液加到离心管中，每管按血：淋巴细胞分离液=2：1 的比例，再小心的将稀释后的外周血细胞加于细胞分离液液面上。然后进行密度梯度离心，2000 r/min，15min。离心后分为四层，收集第二层即淋巴细胞层，放于一新的无菌离心管中，加适当 PBS 混匀，反复洗涤三次，每次离心 1000r/min，5min。倒掉上清，加适量完全 RPMI-1640 培养液充分吹打，制成细胞悬液，置于玻璃平皿中，在 37℃、5%CO2 孵箱中静置 60min，收集非粘附细胞,即为外周血淋巴细胞。

2．2 肿瘤可溶性抗原的制备

取处于对数生长期的食管癌 Eca109 肿瘤细胞，用 0.25%胰蛋白酶消化 3～5min 后加适量培养液终止消化，吹打混匀，制成单细胞悬液，1000 r/min，离心 5min，PBS 洗 2 次，镜下计数调整细胞浓度为 10^7～10^8/ml,细胞悬液装入冻存管，放于液氮中，10min 后取出迅速放入 37℃水中完全融化后，再放入液氮中，反复冻融 4 次后，5000r/min,离心 40min，小心收集上清即为肿瘤可溶性抗原。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。具体操作如下：

① 考马斯亮蓝染液在使用前应平衡温度至室温并温和颠倒混匀,预热全自动酶标仪。

② 将 0、1、2、3、4、5、6 μl 牛血清白蛋白(BSA)标准溶液（1 mg/ml）分别加入到试管中，加入 PBS 补足到 15μl；

③ 将适当体积的样品加入到试管中，并用 PBS 补足到 15μl；

④ 向各试管中加入 0.285 ml 考马斯亮蓝染液，混匀，室温放置 5--10 分钟；

中国知网 https://www.cnki.net

⑤ 用酶标仪测定 595 nm 处的吸光值，并记录读数；以不含 BSA 的样品的光吸收值作为空白对照。

⑥ 绘制标准曲线，计算样品中的蛋白浓度。

2．3 SEC,TSA 刺激细胞增殖

2．3.1 单一刺激物刺激细胞增殖

常规无菌分离外周血淋巴细胞后，镜下计数，用完全 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为 1×10^6/ml，接种于 96 孔平底培养板，每孔 100μl,每孔再加入含不同浓度 SEA（10、1、0.1、0.01、0.001ng/ml）或含不同浓度TSA(20、30、40、50、60μg/ml)的等体积的完全RPMI1640 培养液 100μl，同时设阴性对照组（无 SEC/TSA），各设 3 复孔，在 37℃、5%CO2 孵箱中培养。分别于培养的第 24h、48h、72h、96h，用 CCK-8 比色法测定淋巴细胞的增殖情况。具体操作如下：

① 从孵箱中取出培养一段时间的细胞，在 96 孔平底培养板中，每孔加入无菌的 CCK-8 溶液 20μl。

② 在 37℃、5%CO2 孵箱中继续培养 0.5-4h，终止培养。

③ 用酶标测定仪于波长 450nm 处测定吸光值（OD 值）。

2.3.2 联合刺激细胞增殖

上述实验中不同浓度 SEC/TSA 作用淋巴细胞，通过测定的吸光值结果，确定 SEC/TSA 的最佳刺激浓度，分别为 SEC 0.1ng/ml,TSA 50μg/ml。常规无菌分离外周血淋巴细胞，镜下计数，用完全 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为 1×10^6/ml，按实验分组：A 组：L；B 组：L+SEC；C 组：L+TSA；D:组 L+SEC+TSA ，接种于 96 孔平底培养板，每孔含细胞悬液 100μl 和含 SEA(终浓度 0.1ng/ml)和或 TSA(终浓度 50μg/ml)的等体积的完全 RPMI1640 培养液 100μl，各设 5 复孔，在 37℃、5%CO2 孵箱中培养。分别于培养的第 24h、48h、72h、96h，用 CCK-8 比色法测定每组细胞的增殖情况。具体操作如下：

中国知网 https://www.cnki.net

① 从孵箱中取出培养一段时间的细胞，在 96 孔平底培养板中，每孔加入无菌的 cck-8 溶液 20μl。
② 在 37℃、5%CO2 孵箱中继续培养 0.5-4h，终止培养。
③ 用酶标测定仪于波长 450nm 处测定吸光值（OD 值）。

2.4 细胞表型分析

按实验分组，A 组：L；B 组：L+SEC；C 组：L+TSA；D 组：L+SEC+TSA。完全 RPMI-1640 培养液调整外周血淋巴细胞浓度为 1×10^6/ml，接种于 6 孔板，每孔含细胞悬液 1ml 和含 SEA（终浓度 0.1ng/ml）和或 TSA（终浓度 50μg/ml）的等体积的完全 RPMI1640 培养液 1ml，每组 4 孔，培养第 3 天，收集细胞样品，每组各孔分别加入 FITC 标记的 CD19/CD3/CD4/CD8，流式细胞仪检测。具体步骤如下：
①收集培养的细胞离心 1000 r/min，5min，弃上清。
②加入荧光直标单抗 3μl 与单细胞悬液震荡混匀。
③室温（25℃左右），避光染色 30 分钟。
④用流式洗液洗涤两次，1000 r/min, 5min。
⑤弃上清，加入终浓度为 1%的多聚甲醛固定液 500μl 重悬细胞。
⑥尽早上流式细胞仪检测分析。

2.5 细胞培养上清中 TNF-α 水平的检测

用完全RPMI-1640 培养液调整外周血淋巴细胞密度为 1×10^6/ml，按实验分组：A L；B L+SEC；C L+TSA；D L+SEC+TSA ，接种于 24 孔平底培养板，每孔细胞悬液和含 SEA（终浓度 0.1ng/ml）或 TSA（终浓度50μg/ml)的等体积的完全RPMI1640 培养液各0.5ml，各设 3 复孔，在 37℃、5%CO2 孵箱中培养。分别于培养的第 1d、3d、5d，无菌管收集，离心 15min，3000 转/分，收集各组上清液。置于-20℃冰箱中冻存备用。TNF-α 测定具体步骤如下。
① 加样：按 ELISA 试剂盒说明书，标准品稀释和加样。
②将样品 50μl 加于酶标孔底，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。

中国知网 https://www.cnki.net

③温育：封板膜封板后置 37℃反应 30 分钟。
④配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。
⑤洗涤：小心掀掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
⑥加酶：每孔加入酶标试剂 50μl，空白孔除外。
⑦温育：操作同 3
⑧洗涤：操作同 5
⑨显色：每孔先加入显色剂 A50μl ，再加入显色剂 B50μl，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。
⑩终止：每孔加终止液 50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
⑪测定：以空白孔调零，455nm 波长依次测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

2.6 细胞毒活性检测

取处于对数生长期的食管癌细胞系 Eca109 和宫颈癌 Hela 细胞作为靶细胞，调 Eca109,Hela 细胞浓度为 1×10^5/ml。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 CTLs 作为效应细胞，调其细胞浓度为 2×10^6/ml，分别与 Eca109（1×10^5/ml）、Hela（1×10^5/ml）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 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%

2.7 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，调各组细胞浓度为 1×10^6/ml。收集 Eca109 细胞调细胞浓度 1×10^5/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%CO2 孵箱

中国知网 https://www.cnki.net

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，具体步骤如下：

①盖玻片无菌处理，，将剪裁好的爬片置于浓硫酸中浸泡并过夜，第二天自来水冲洗 20 遍，再置于无水酒精中浸泡 6 小时，再用超纯水冲洗 3 遍，烘干，高压消毒。

②向六孔板中加细胞时，先在每个孔里准备放爬片的位置滴加少量培养基，使爬片与六孔板靠培养基的张力粘合到一起，防止加细胞悬液时玻片漂起，造成双层细胞贴片。

③按实验设计加细胞，作用一定时间后取出爬片。

④爬片用甲醇固定 3～5min；

⑤将标本玻片插入 Wright 染液缸中染色 2 min；

⑥再插入 Wright 磷酸缓冲稀释液染色 4～10min；

⑦用蒸馏水冲洗。

⑧晾干，用中性树胶封片；

⑨镜下观察。

2．8 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 13.0 软件包对数据进行统计学处理，两组间数据比较采用 t 检验，多组间数据比较采用方差分析，显著性检验标准为 $P<0.05$。

中国知网 https://www.cnki.net

结　果

1.SEC 刺激体外培养的淋巴细胞增殖

不同浓度的 SEC 刺激体外培养的外周血淋巴细胞的增殖能力不同（Table1,Fig.1）。在 0.001-1ng/ml 之间时，外周血淋巴细胞的增殖能力随 SEC 浓度的增加而增强，SEC 浓度为 0.1ng/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著，为 0.224；但浓度增大到 10ng/ml 时，外周血淋巴细胞增殖的趋势开始下降。同时， SEC 浓度为 0.001-10ng/ml 时，均于 72h 达峰值。

Table 1　Detection of proliferation of cells induced by SEC

Hour	SEC(ng/ml)				
	0.001	0.01	0.1	1.0	10
24	0.063±0.005	0.065±0.005	0.077±0.008	0.056±0.008	0.027±0.002
48	0.090±0.009	0.104±0.004	0.131±0.018	0.139±0.015	0.054±0.002
72	0.152±0.004	0.196±0.012	0.224±0.012*	0.201±011	0.091±0.004
96	0.069±0.007	0.072±0.004	0.092±0.015	0.078±0.008	0.071±0.002

Note: compared among the different groups at 72h ， *P<0.05

2．TSA 刺激体外培养的外周血淋巴细胞增殖

不同浓度的 TSA 刺激体外培养的外周血淋巴细胞的增殖能力不同（Table 2,Fig.2）。在 20-50μg/ml 之间时，外周血淋巴细胞的增殖能力随 TSA 浓度的增加而增强，TSA 浓度为 50μg/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著；但浓度增大到 60ng/ml 时，外周血淋巴细胞增殖的趋势开始下降。同时在 96h 内，不同浓度 TSA 诱导的外周血淋巴细胞增殖变化也是不完全一样的。培养 48h 时，含 TSA 浓度为 50μg/ml 的细胞组吸光值达高峰，培养 72h 时，TSA 浓度为 20、30、40、60μg/ml

中国知网 https://www.cnki.net

的细胞组吸光值 ，均达峰值。

Table 2　Detection of proliferation of cells induced by TSA

	TSA(μg/ml)				
Hour	20	30	40	50	60
24	0.054±0.003	0.058±0.006	0.063±0.003	0.065±0.010	0.059±0.007
48	0.093±0.011	0.107±0.015	0.115±0.011	0.186±0.011*	0.126±0.012
72	0.122±0.009	0.139±0.014	0.157±0.010	0.171±0.010	0.157±0.119
96	0.071±0.002	0.082±0.003	0.085±0.002	0.104±0.005	0.095±0.007

Note: compared among different groups at 48h，*P<0.05

3．SEC、TSA 共同刺激外周血淋巴细胞增殖

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（Fig.3），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，A、B、D 组均于 72h 时细胞增殖最显著；C 组于 48h 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，经食管癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激的 D 组与 A、B、C 组比较，细胞增殖活性最高，于 72h 达到高峰。

Table 3　Detection of proliferation of cells among different groups

	24	48	72	96
A	0.066±0.007	0.079±0.009	0.126±0.012	0.083±0.010
B	0.079±0.007	0.130±0.012	0.231±0.007	0.126±0.006
C	0.069±0.008	0.187±0.009	0.166±0.010	0.094±0.008
D	0.085±0.011	0.196±0.008	0.255±0.009*	0.137±0.010

Note: compared among different groups at 72h, *P<0.05

中国知网 https://www.cnki.net

4．细胞表型分析

不同刺激条件下细胞培养 3 日后诱导的效应细胞表型分析可见（Fig.5-8）（Table 4）：4 组 CD3 均为阳性表达，表明所诱导的细胞大部分为 T 细胞。对照组 A 的 $CD8^+$只有 26.31%，而 B、C、D 三组较之明显升高（$P<0.05$），D 组诱导的 $CD8^+$最高,为 39.19%，说明所诱导的细胞主要为 $CD8^+$CTL 细胞。

Table 4 Test results of seffector cells phenotypic（$\overline{x}\pm s$, %）

group	CD3+	CD4+	CD8+
A	73.82±3.40	41.15±4.40	26.31±3.20
B	83.48±1.60	42.20±2.85	34.27±3.04*
C	81.24±1.84	43.19±0.91	35.30±2.94*
D	80.24±1.90	46.55±2.80	39.19±1.94*

Note: compared with the group A,* $P<0.05$

5．细胞培养上清中 TNF-α 水平的测定

采用ELISA法检测不同形式刺激L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，对照组 A 为无刺激的淋巴细胞。与对照组 A 相比，B，C，D 3 组培养上清中， TNFα，1d 活性已开始升高，于 3d 达峰值。其中以 SEC 联合 TSA 刺激的 D 组为最高，与其他两组试验组相比差异显著($P<0.05$)。（Fig.4）

6．效应细胞对靶细胞的杀伤效应

结果见(Table 5)，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

中国知网 https://www.cnki.net

淋巴细胞组 63.04%，效应细胞对 Eca109 的杀伤活性明显高于 Hela（$P<0.05$）。

Table.5 Killing activity of lymphocyte cells on target cells（$\bar{x}\pm s$,n=5）

		Killing activity in different cancer cells（%）	
group	E:T	Eca-109	Hela
L	20：1	63.04±2.95	65.56±3.27
L+SEC+TSA	20：1	97.36±2.11[ab]	78.67±4.74[a]

Note: compared with the group lymphocytes， [a] $P<0.05$； compared with Hela cells，[b] $P<0.05$

7．瑞氏染色法检测细胞凋亡

两种细胞混合 3h 时，镜下观察可见（Fig.9-10），大量淋巴细胞黏附在肿瘤细胞周围。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。细胞核碎裂,核染色质浓缩,有的聚集在核膜下呈环状或块状。（Fig.11-12）

中国知网 https://www.cnki.net

附　图

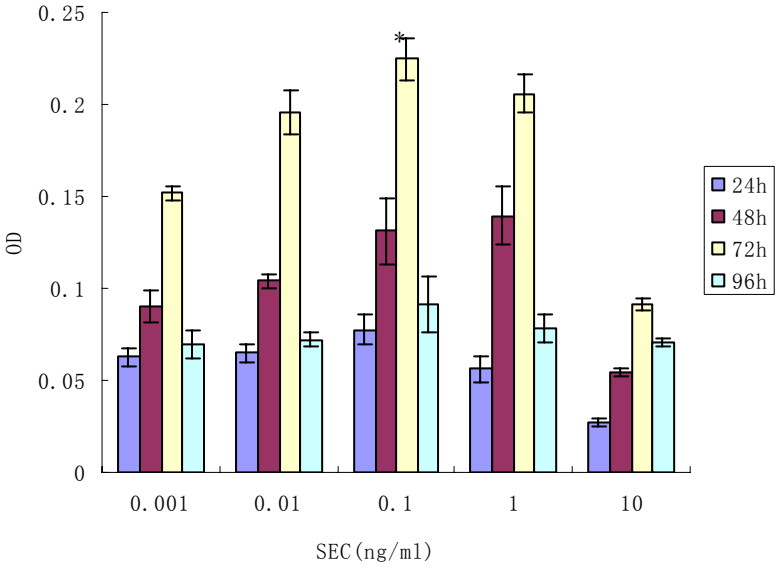


Fig.1 Detection of proliferation of cells induced by SEC

Note: compared among the different groups at 72 h，*P<0.05

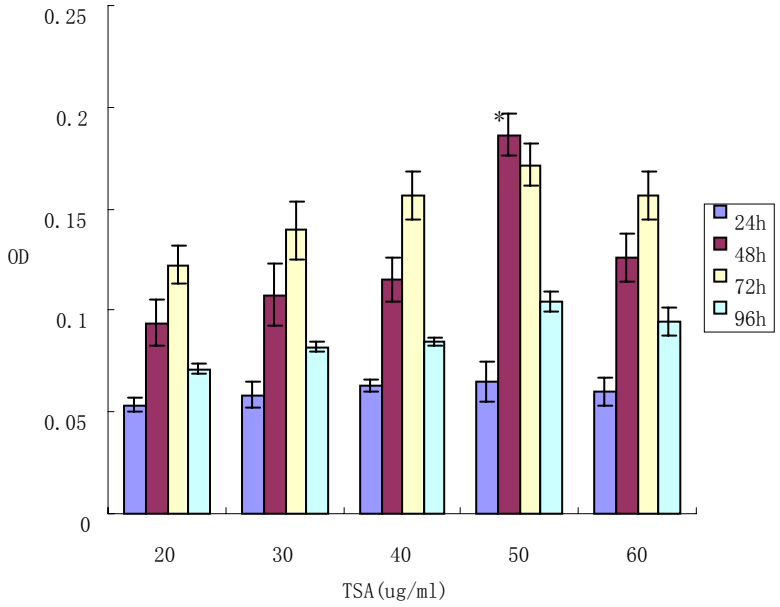


Fig.2 Detection of proliferation of cells induced by TSA

Note: compared among the different groups at 48h，*P<0.05

中国知网　https://www.cnki.net

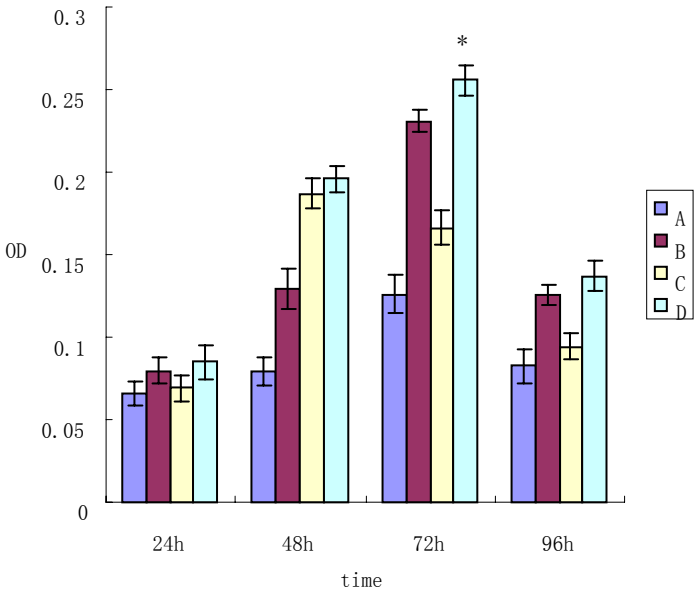


Fig.3 Detection of proliferation of cells among different groups

Note: compared among different groups at 72h, *P<0.05

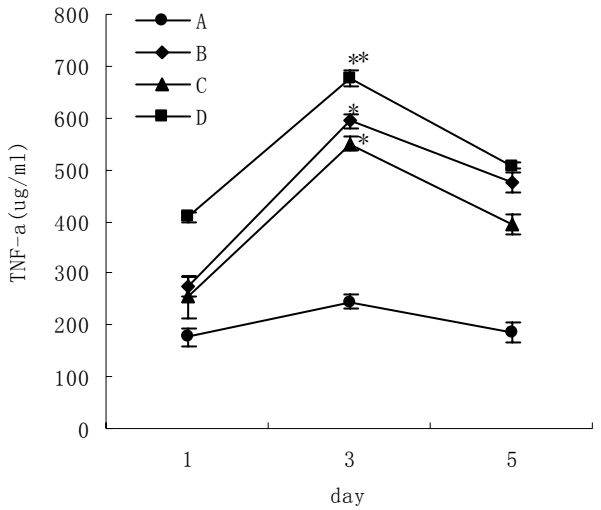
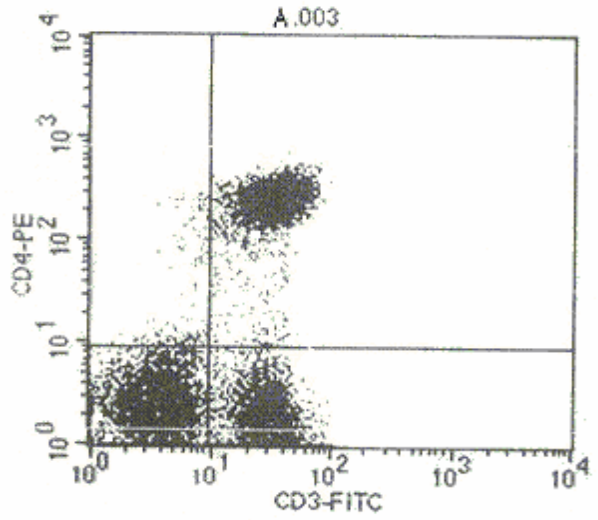


Fig.4 TNF-α production among different groups

Note: compared with the group A,* P<0.05;compared with groups B and C,* * P<0.05

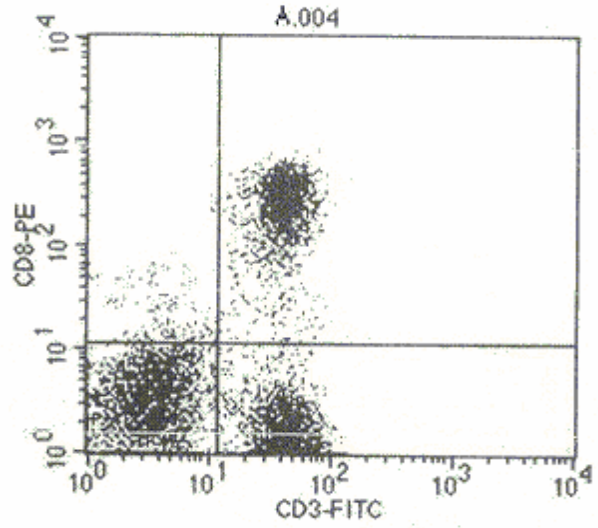
中国知网 https://www.cnki.net



Quadrant Statistics

File: A.003

Quad	Events	% Gated
UL	146	0.87
UR	6903	41.15
LL	4054	24.17
LR	5671	33.81



Quadrant Statistics

File: A.004

Quad	Events	% Gated
UL	142	1.82
UR	2055	26.31
LL	2377	30.44
LR	3236	41.43

Fig.5 Expressions of CD4 and CD8 in the control group

中国知网 https://www.cnki.net

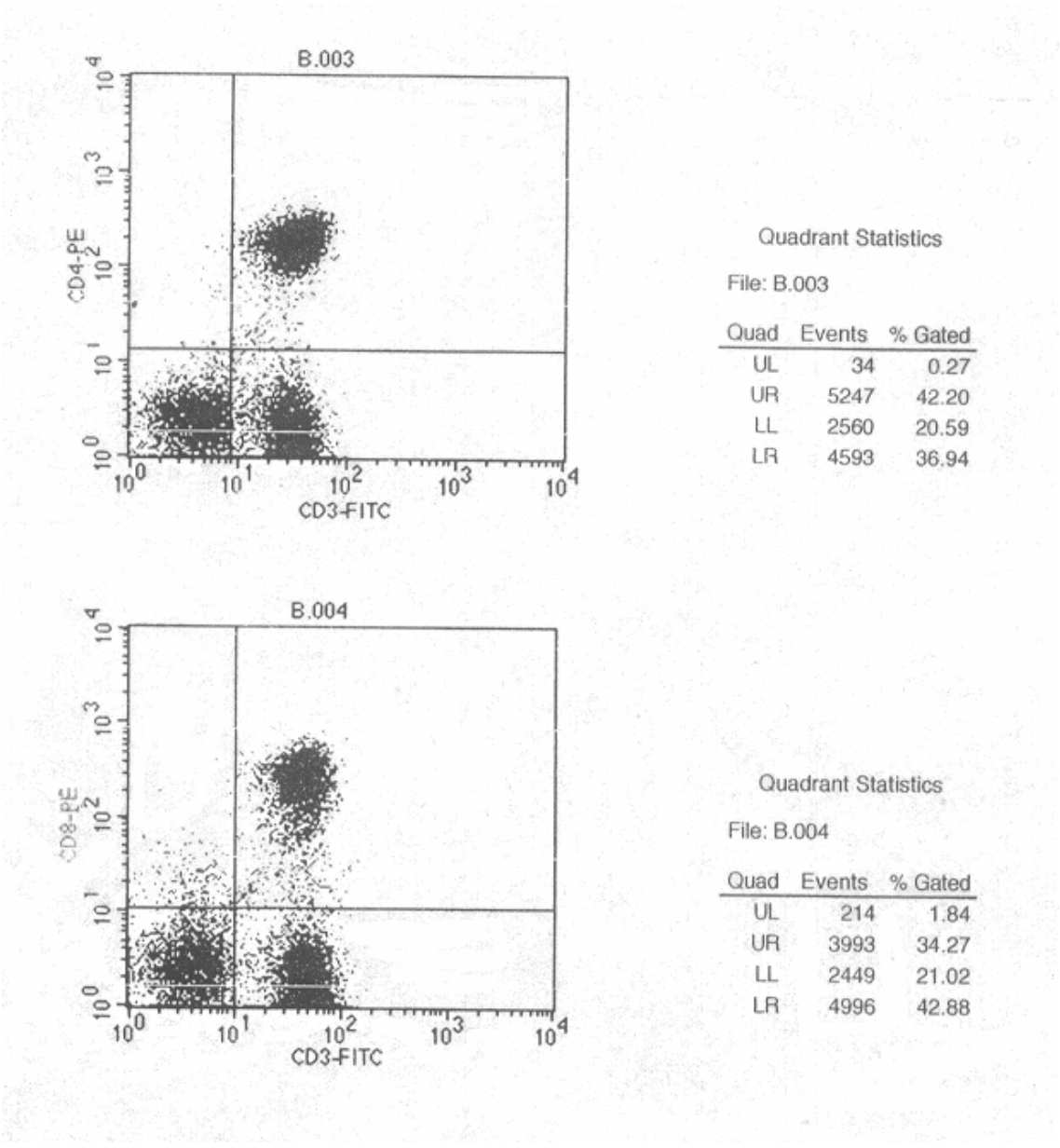
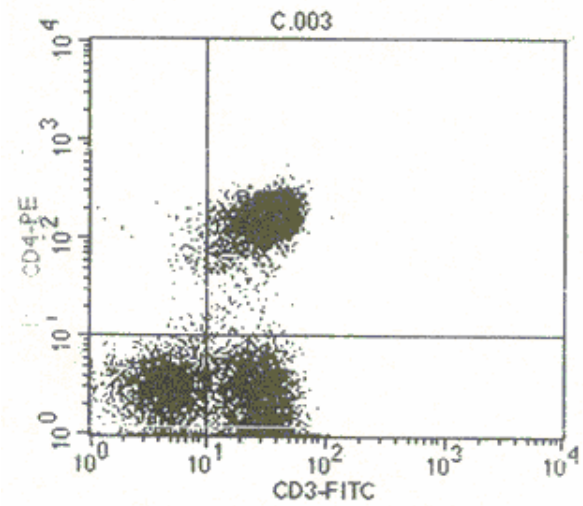


Fig.6 Expressions of CD4 and CD8 in the SEC-reactive lymphocytes

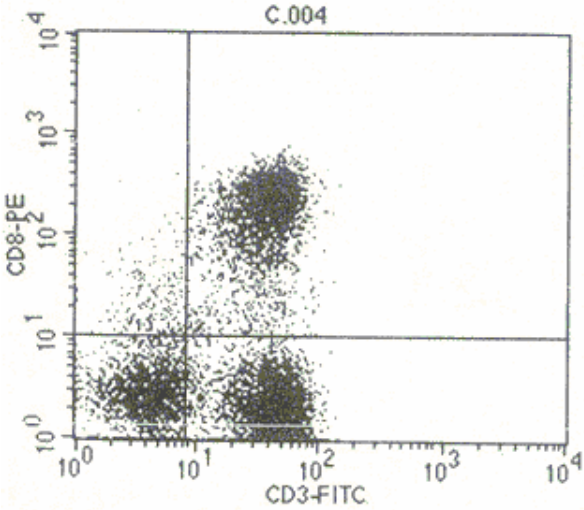
中国知网 https://www.cnki.net



Quadrant Statistics

File: C.003

Quad	Events	% Gated
UL	109	0.81
UR	5777	43.19
LL	2591	19.37
LR	4898	36.62



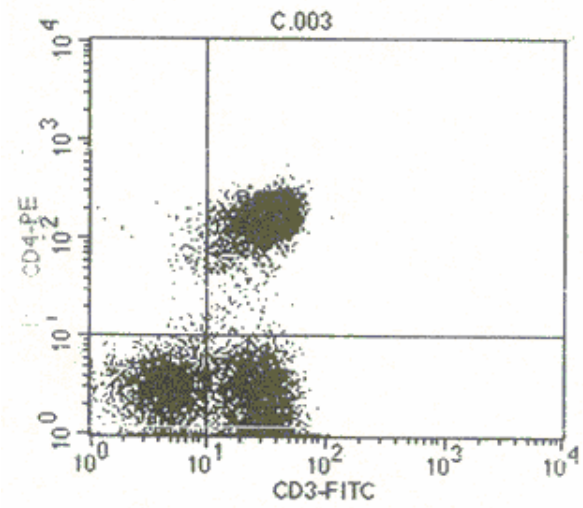
Quadrant Statistics

File: C.004

Quad	Events	% Gated
UL	212	1.61
UR	4645	35.30
LL	2218	16.85
LR	6085	46.24

Fig.7 Expressions of CD4 and CD8 in the TSA-reactive lymphocytes

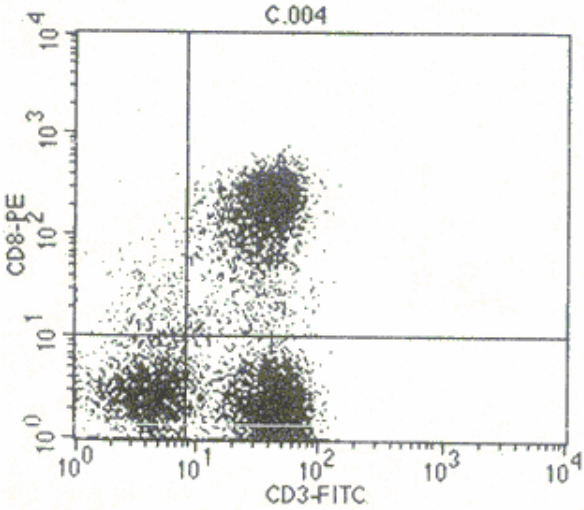
中国知网 https://www.cnki.net



Quadrant Statistics

File: C.003

Quad	Events	% Gated
UL	109	0.81
UR	5777	43.19
LL	2591	19.37
LR	4898	36.62



Quadrant Statistics

File: C.004

Quad	Events	% Gated
UL	212	1.61
UR	4645	35.30
LL	2218	16.85
LR	6085	46.24

Fig.8 Expressions of CD4 and CD8 in the SEC and TSA-reactive lymphocytes

中国知网 https://www.cnki.net

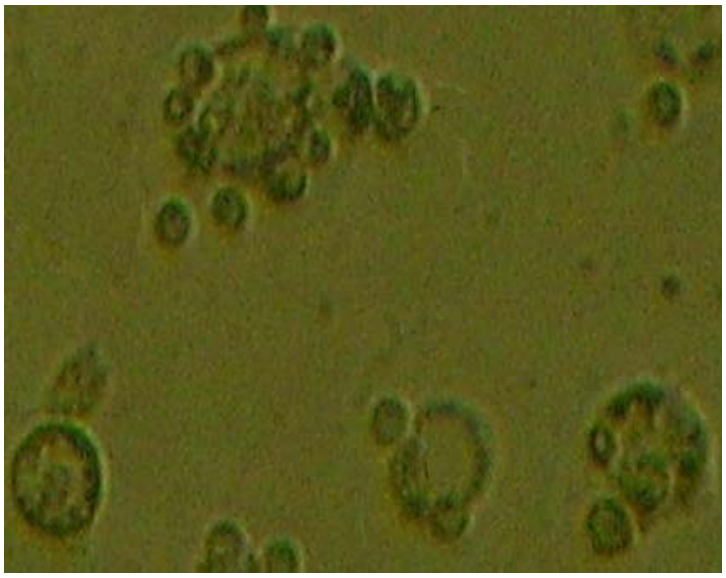


Fig.9

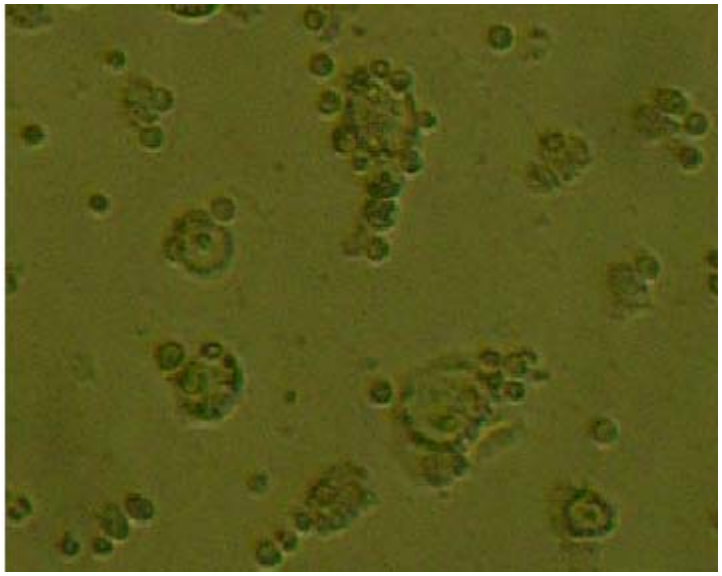


Fig. 10

Fig.9—10 a large number of lymphocytes adhered to tumor cells around （10×25）

中国知网 https://www.cnki.net

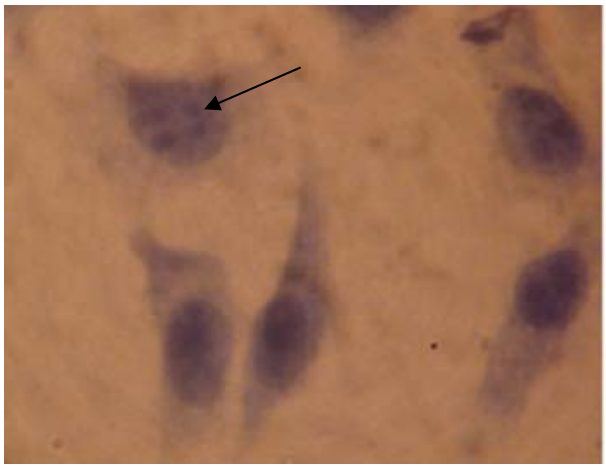


Fig.11

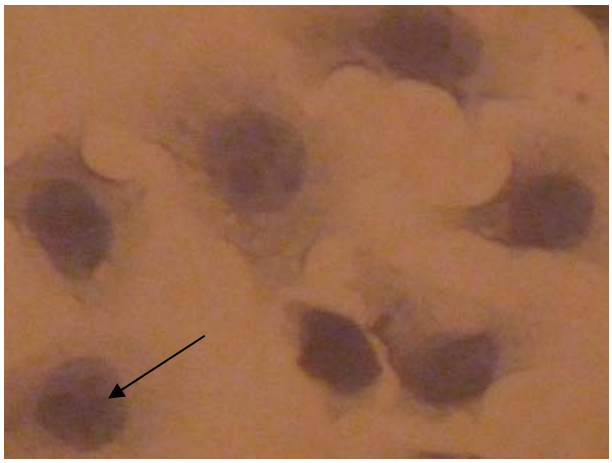


Fig.12

Fig.11-12 apoptotic cells observed under microscope byWright staining （10×40）

中国知网 https://www.cnki.net

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。传统的肿瘤治疗手段，包括手术、化疗与放疗，这三种手段不但存在肿瘤迁移与复发的危险，而且具有严重的损伤机体正常组织和免疫功能的毒副作用。而新型的肿瘤生物免疫治疗揭示了人类肿瘤抗原, 丰富了肿瘤抗原加工、呈递和识别的理论知识; T 细胞、NK 细胞、树突细胞的研究有了新的进展; 细胞过继免疫治疗、细胞因子治疗、肿瘤疫苗的临床研究持续稳定发展。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，并且具有特异性强、毒副作用小等特点。从理论上来说，每一位肿瘤患者都可以从生物免疫治疗中获得益处，并且早期肿瘤患者由于机体免疫系统尚未受到肿瘤的严重影响，对免疫治疗的应答较好，疗效相对也会更好。即使在晚期肿瘤患者群体中，免疫治疗所显现的疗效，已足以使其成为继手术、放化疗之后的第四种肿瘤治疗的手段。

尽管人机体内存在着一系列的免疫监视机制, 但是由于肿瘤细胞在长期的生长演变过程中, 形成了逃避机体免疫系统攻击杀伤的机制, 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可能包括以下几个方面[8-10]：1.肿瘤抗原表达缺陷或抗原调变,异质性大；2.肿瘤细胞 MHC-Ⅱ类分子表达不同程度的下降、缺如，且分化能力差的肿瘤细胞 HLA 表达更弱，大多数实体肿瘤不表达 HLA-Ⅱ分子抗原；3.肿瘤细胞产生的细胞因子的负性调节作用，分泌某些因子如 TGF-β、IL-10、血管内皮生长因子(VEGF)等；4. Fas/FasL 在肿瘤免疫逃逸中的作用，表达 FasL 的肿瘤细胞能诱导表达 Fas 的淋巴细胞发生凋亡,又由于瘤细胞本身表达的下调,使淋巴细胞促肿瘤细胞凋亡的作用处于弱势；5. 黏附分子/共刺激分子缺陷, 使得 T 细胞在活化过程中缺乏第二信号而不能被有效的激活,不能激发起有效的抗肿瘤免疫应答；6. 抑制性免疫细胞亚群的作用，抑制性细胞亚群包括:近年来被广为研究的调节性细胞(Treg),肿瘤相关巨噬细胞

中国知网 https://www.cnki.net

(TAM) ,髓系来源的抑制性细胞(MDSC)等[11-12]。这些方面作用导致了机体无法对肿瘤细胞进行有效的识别和杀伤。肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发机体肿瘤免疫应答的关键，肿瘤抗原需由 MHC 分子递呈，并被 T 细胞识别，机体通过肿瘤抗原激活 CTL 直接杀伤肿瘤细胞或激活 B 细胞分泌抗体产生特异性的免疫应答。但大多数肿瘤抗原的免疫原性很弱，且宿主对肿瘤抗原的免疫应答导致肿瘤细胞表面抗原减少或丢失，从而使肿瘤细胞不被免疫系统识别，不能诱发有效的抗肿瘤免疫应答作用。基于这个认识，需要运用增强肿瘤抗原的免疫原性的基本方法，诱发机体的抗肿瘤免疫应答，以达到缩小和消除肿瘤的目的。

超抗原是细菌或病毒产生的外毒素，1989 年由 White 提出[13]，特点是无需抗原提呈细胞（APC）加工处理，即可直接与 APC 膜上的 MHC-Ⅱ类分子的抗原结合槽外侧非限定性的结合，以完整的蛋白质分子形式被提呈给 T 细胞，以 TCRVβ 特异性的方式激活 T 细胞，激活数量为普通抗原数千。根据其来源分为细菌性和病毒性超抗原，也称为内源性超抗原和外源性超抗原。1、病毒性超抗原：是病毒（主要是逆转录病毒）感染抗体后，病毒 DNA 整合到宿主细胞 DNA 中，产生的超抗原。如可诱导乳腺肿瘤的逆转录病毒 B—小鼠乳腺肿瘤病毒（Mousemamary tumor virus，MMTV）编码的蛋白，即次要淋巴细胞刺激抗原，主要表达于 B 细胞表面，刺激相应的 T 细胞亚群增殖。MMTV 依赖此蛋白的超抗原反应而生存并经乳汁传播，促进宿主对病毒易感；人类免疫缺陷病毒（HIV）在体内的某些表达产物也属于内源性超抗原[14-15]。2、细菌性超抗原：大多数是细菌的外毒素，其共同特点是均为水溶性蛋白质，对靶细胞无直接伤害作用。如葡萄球菌肠毒素（SEs）超抗原系列（SEA-Q），毒素休克综合征毒素（Toxic shocksyndrome toxin,TSST），链球菌致热外毒素（streptococcus pyrogenic, SPE），产气荚膜梭菌和小肠结肠类耶氏菌肠毒素等[16~18]。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。超抗原 SE 能够对肿瘤细胞主要产生两个方面的杀伤作用:1、SE 活化的 $CD8^+$ T 细胞(抑制性/细胞毒性 T 细胞)和 $CD4^+$ T 细胞(辅助性/杀伤性 T 细胞)，使之形成 MHCⅡ 类分子-SE-TcRVβ 复合物，直接杀伤

中国知网 https://www.cnki.net

表达 MHCⅡ 类分子的肿瘤细胞，称为 SE 依赖的细胞介导细胞毒作用(SE dependen t cell mediated cycotoxity, SDCC) ,而对不表达 MHCⅡ类分子的肿瘤细胞也可产生间接的旁观者效应。被激活的 T 细胞可表达 MHCⅡ类分子, 又可与 SE 结合而再活化其它 T 细胞.2、SE 激活的 $CD4^+$ T 细胞, 可分泌足量的细胞因子, 如 IFN -γ、TN F-α、TN F-β、IL -1α、IL -1β、IL-2、IL -6 和 IL -12 等多种。这些分泌的细胞因子又可进一步激活 NK 细胞,使之发挥自然杀伤作用。而 IFN -γ 和 TN F 等细胞因子还可促进肿瘤细胞对 MHCⅡ类分子的表达, 增强 SE 的抑瘤效果，从而对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用[19]。SAg 直接用于抗肿瘤的应用还存在很多的限制，因为它无抗肿瘤的特异性，大多数肿瘤细胞不表达 MHC-Ⅱ类抗原，而且 MHC-Ⅱ类阳性的 APC 也能成为超抗原的靶细胞被杀伤而导致严重的副作用[20]。为避免超抗原引发疾病的危险，减低产生免疫耐受发生的机会，提高抗肿瘤的特异性，可将超抗原与单抗、肿瘤可溶性抗原等联合用于肿瘤的免疫导向治疗。故本实验观察了外周血淋巴细胞经超抗原和肿瘤可溶性抗原联合刺激的免疫应答相关反应及变化规律，为肿瘤免疫治疗提供一个新的思路和方法。

人外周血细胞，主要包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、红细胞和单核细胞等。在实验中我们通过淋巴细胞分离液和短时间的贴壁培养除去了红细胞和贴壁细胞，获得较高纯度和活性的淋巴细胞。从本实验的结果可知，作为 T 细胞超抗原，SEC 能显著刺激体外培养的 T 淋巴细胞的活化和增殖。实验中发现这种增殖受 SEC 浓度的限制，在 0.001-1ng/ml 之间时，外周血淋巴细胞的增殖能力随 SEC 浓度的增加而增强，SEC 浓度为 0.1ng/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著,浓度太低（SEA≤0.001ng/ml）不足以刺激细胞增殖；浓度过高（SEA≥10ng/ml)，细胞的增殖程度反而降低。同时，SEC 浓度为 0.001-10ng/ml 时，均于 72h 达峰值。所以我们选择 0.1ng/ml 作为观察 SEC 体外刺激能力的最佳剂量，其既能刺激 T 细胞的显著增殖，又不会导致过早的细胞死亡。将采用反复冻融法提取的食管癌 Eca109 细胞肿瘤可溶性抗原按不同浓度刺激淋巴细胞，从实验结果可知，不同浓度的 TSA 刺激体外培养的外周血淋巴细胞的增殖能力也不同。在 20-50μg/ml

中国知网 https://www.cnki.net

之间时，刺激外周血淋巴细胞的增殖能力随 TSA 浓度的增加而增强，TSA 浓度为 50μg/ml 时外周血淋巴细胞增殖最显著；但浓度增大到 60μg/ml 时，外周血淋巴细胞增殖的趋势开始下降。故我们选择 50μg/ml 作为观察 TSA 体外刺激淋巴细胞能力的最佳剂量。我们将 0.1ng/ml SEC ，50μg/ml TSA 作为不同刺激物对外周血淋巴细胞按实验分组进行单独或联合作用。在 96h 内，不同及同一时间点各组体外培养的淋巴细胞增殖能力不同，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，SEC+L 实验组于 72h 时细胞增殖最显著；TSA+L 实验组于 48 时细胞增殖最显著；SEC+TSA+L 实验组于 72h 时细胞增殖显著。但到 96h 时，各组淋巴细胞增殖趋势开始下降。经食管癌 TSA、超抗原 SEC 联合刺激的 D 组与 A、B、C 组比较，细胞增殖活性最高，并于 72h 达到高峰。说明金葡素超抗原联合肿瘤可溶性抗原体外冲击淋巴细胞，可以保证肿瘤抗原被有效摄取提呈，且可提高共刺激信号，提高淋巴细胞的活化和增殖能力。

在本实验中，通过对实验设计的各实验组细胞培养一段时间后，进行细胞表型的流式细胞仪分析检测，结果是 4 组细胞大部分为 CD3 阳性表达，说明诱导的细胞主要是 T 淋巴细胞。各实验组的 CD4 变化不显著，单独应用 SEC、TSA 对 CD8 亚群的作用相似。SEC 联合 TSA 诱导的实验组淋巴细胞 CD8 表达显著增高，为 39.19%，而单纯淋巴细胞对照组为 26.31%，说明所诱导的细胞主要为 $CD8^{+}$T 细胞，为细胞毒性 T 细胞（CTL）。在抗肿瘤免疫应答中，细胞免疫起了主要作用，特别是 CTL 细胞，它是抗肿瘤免疫的主要效应细胞。CTL 属细胞毒 T 细胞，是机体抗肿瘤反应中最主要的效应细胞。CTL 杀伤机制研究确定了三个不同阶段[21, 22]。首先是 CTL 与靶细胞的黏附，形成温和剪切力不能破坏的牢固附着。这种黏附需要在 37° C 下数分钟，低温和许多药物也可以阻断此过程。紧接着第二步称为致死性攻击或程序化裂解，也需要数分钟。其特性是媒介中需要钙离子，同黏附一样，低温和许多药物也可以阻断此过程。最后一步是 CTL 细胞毒性的靶细胞瓦解阶段，并以靶细胞的裂解结束。CTL 杀伤肿瘤细胞的作用方式主要有三种：1、L 与靶细胞接触产生脱颗粒作用，释放穿孔素插入靶细胞膜上，并使其形成通道，使 Na、水分进入靶细胞内，K 则从靶细胞内

中国知网 https://www.cnki.net

逸出，靶细胞内外渗透压改变，进而细胞溶解破裂。颗粒酶、TNF、分泌性 ATP 等效应分子进入靶细胞，导致其死亡。这是 CTL 杀伤靶细胞的主要机制。2、L 激活后表达 Fas 配体（FasL），它可释放到胞外与靶细胞的 Fas 分子结合，传导死亡信号进入胞内，活化靶细胞内的 DNA 降解酶，引起靶细胞死亡。3、两种方式共存[23]。在实验中，将效靶两种细胞混合培养 3h 时，镜下观察可见大量淋巴细胞黏附在肿瘤细胞周围。经过 24h 的培养，可见大量肿瘤细胞形状变圆、悬浮。

经 SEC,TSA 活化的 T 细胞可分泌大量的细胞因子，如 IFN-β、TNF-α、TNF-β、IL-2 等。而 TNF 和 IFN 等细胞因子促进肿瘤细胞对 MHC-Ⅱ分子的表达，增强抑瘤效果。在本实验中，通过检测不同形式刺激 L 培养液上清中细胞因子 TNF-α 的变化情况，结果表明 SEC,TSA 能够刺激淋巴细胞高水平的分泌 TNF-α，从而对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用。TNF-α 细胞来源及为广泛，包括各种免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞、表皮细胞、角质细胞、平滑肌细胞、星型胶质细胞、成骨细胞等。TNF-α 的主要生物学作用有：TNF-α 可促进树突细胞成熟、活化和抗原递呈功能，促巨噬细胞和其他细胞分泌 IL-12，后者可促进 T 细胞的分化；促进细胞因子分泌，如 IFN-γ、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、GM-CSF、M-CSF 和 NGF 等；调节细胞凋亡，通过增加细胞表达 FAS，FAS/FAS 途径诱导细胞的凋亡。TNF-α 可以抑制某些肿瘤的生长，主要是抑制肿瘤血管的生成。

在对肿瘤细胞的杀伤实验中，将淋巴细胞与肿瘤细胞共同培养，淋巴细胞由于 SEC、TSA 的不断刺激发生增殖分化而成为溶解肿瘤细胞的效应细胞，具有特异性。我们发现单独淋巴细胞与 SEC 联合食管癌 Eca109 的 TSA 冲击的淋巴细胞对食管癌 Eca109 细胞的杀伤率相比,SEC 联合 TSA 的淋巴细胞组(97.36%)比单纯淋巴细胞组(63.04%)具有更高的杀伤率。另外，SEC 联合食管癌 Eca109 的 TSA 冲击的淋巴细胞对肿瘤细胞（Eca109）的杀伤率为 97.36%明显高于不同来源的肿瘤细胞（Hela）78.67%，说明对靶细胞杀伤作用具有选择性，靶向作用。

细胞凋亡(Apoptosis) 是细胞受到一系列细胞代谢的改变而发生的细胞死亡,是一种由基因控制的细胞自杀性死亡过程,不引起炎症反

中国知网 https://www.cnki.net

应,是一种生化、形态特征明确的细胞死亡方式。肿瘤的发生和发展是细胞无限制过度积累的过程,其原因包括细胞的异常增殖和细胞凋亡受抑,增值和凋亡之间的平衡可能决定着肿瘤的增长速度,细胞凋亡的减少在肿瘤的发生发展中起着重要的作用。本实验中通过对肿瘤可溶性抗原联合金葡素诱导的效应细胞和肿瘤靶细胞混合培养一定时间后，对细胞爬片进行染色，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状。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 联合应用具有更为强大的活化淋巴细胞的能力，经 SEC,TSA 活化的 T 细胞可分泌大量的 TNF-α，诱导的效应细胞为 $CD8^+$T 细胞，为细胞毒性 T 细胞（CTL）。联合诱导的效应细胞对靶细胞的杀伤作用更为明显，且具有选择性，靶向作用。显示出一定的抗肿瘤免疫治疗应用前景。但是 ,真正将其用于临床还有许多困难 ,面临许多挑战 ,有一系列问题需要进一步深入揭示和研究。超抗原作为一种崭新的抗肿瘤治疗手段，正逐步临床推广应用，其抗肿瘤效果还有待于进一步的提高。目前存在问题主要是以下几点：1 微量的 SAg 就可激活大量的 T 细胞并分泌多种细胞因子，用量不当，就有可能引起机体免疫调节功能紊乱而产生变态反应导致一系列急慢性疾病的发生，如风湿热、川崎病、毒素中毒综合征等[24-25]；2 动物实验证明 SE 可使反应性 T 细胞，尤其是 $CD4^+$T 细胞急剧消失，造成免疫应答减退或消失，这就需要对 SE 的临床使用剂量、间隔时间及给药方式做进一步的研究。肿瘤的独特型抗原目前发现的还不多，分离纯化和鉴定方法相对困难，这就需要应用先进的生物技术发现更多的肿瘤特异性抗原，寻找和筛选有效的肿瘤抗原，激活机体的免疫应答，提高肿瘤免疫的疗效。现在尚不清楚恶性肿瘤发生的根本机制，肿瘤的演进中有许多影响因素，仅仅以其中的一个环节作为攻击的靶子，很难攻克恶性肿瘤这个堡垒，因此，多种免疫治疗方法的有机结合，以及将主动特异性免疫治疗与外科手术、化学治疗、放射治疗有机地结合起来,充分发挥综合治疗的优势, 实现根治肿瘤或抑制肿瘤发展将成为一个重要的研究方向。在对肿瘤免疫逃避的机制和肿瘤微环境的进一步深入认识的基础上，肿瘤的免疫治疗会成

中国知网 https://www.cnki.net

为一个进展更加迅速的新兴研究领域，成为肿瘤治疗的重要综合措施之一。

中国知网 https://www.cnki.net

结　论

1 金葡素超抗原 SEC、肿瘤可溶性抗原单独应用体外诱导淋巴细胞，可促进细胞增殖，两者联合应用可以更好的保证肿瘤抗原被有效摄取提呈，提高淋巴细胞的活化和增殖能力。

2 SEC 联合 TSA 诱导的淋巴细胞 CD8 显著增高，说明所诱导的细胞主要为 $CD8^{+}$CTL 细胞。

3 SEC, TSA 能够刺激淋巴细胞高水平的分泌 TNF-α，从而对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用。

4 经食管癌 Eca109 的 TSA 作用的效应细胞对靶细胞具有选择性，靶向作用。

5 SEC 联合 TSA 诱导活化的 CTL 与靶细胞共同培养，能够诱导肿瘤细胞凋亡。

中国知网　https://www.cnki.net

参考文献

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

[2]White J,Herman A,Pullen AM et al. The V beta-specific Superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimultion of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice [J]. Cell, 1989, 56(1): 27~35

[3]Wen R,Cole GA,Surman S,et al.Major histocompatibility complex class Ⅱ-associated peptides control the presentation of bacterial supe rantigens to T cell [J].J Exp Med,1996,183(3):1083~1092

[4]Woodland DL,Wen R,Blackman MA.Why do superantigens care about peptides [J].Immunol Today,1997,18(1):18~22

[5]Perabo FG， Willen PL,Wirger A,et a1.Preclinical evaluation of superantigenin the intravesical immunotherapy of Superficial bladder cancer[J].Int J Cancer,2005,115(4):591~598

[6]Thamm DH,Kurzman ID,Macewen EG,et al.Intralesional lipid-compl exed cytokine/superantigen immunogene therapy for spontaneous ca nine turnors [J].Cancer immunol Immnother,2003,52(8):473~480.

[7] 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):392~392

[8] Hahnel PS, Thaler S, Antunes E, et al. Targeting A KT signaling sensitizes cancer to cellular immunot herapy [J].Cancer Res, 2008, 68 (10): 3899~3906

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

[10] Rosenberg SA.New opportunities for the development of cancer Immunotherapies [J].Cancer J Sci Am,1998,4:1~4

[11] Nomura T,Sakaguchi S,Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cell in tumor immunity[J].Curr Top MicrobiolImmunol,2005,29 3:287~302

[12]Liu Z,Kim JH,Falo LD,et al.Tumor regulatory T cells potentlyabrogate

中国知网 https://www.cnki.net

antitumor immunity[J].J Immunol,2009,182(10):6160~6167

[13] White J, Herman A, Pullen AM. et al. The beta-specific Superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimultion of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice [J]. Cell, 1989, 56(1): 27~35

[14] Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, et al. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. Immunity. 2001, 15(4):579~589

[15] Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, et al. Interferon-alpha-induc ed endogenous superantigen model linking environment and autoi mmunity[J]. Immunity.2001,15(4):591~601

[16] Tristan A, Peyrat MA, LimA, et al. egc a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus. J Immunol. 2001, 166(1): 669~677

[17] Newton D, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al. Novel superantigens from streptococcal toxic shock syndrome Streptococcus pyogenes isolates. Adv Exp Med Biol. 1997, 418: 525~529

[18] McCormick JK, Pragman AA, Stolpa JC, et al. Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen[J]. Infect Immun. 2001, 69(3):1381~1388

[19] Matsushita K,Takenouchi T,Kobayashi S, et al. HLA-DR antigen expression in colorectal carcinomas: influence of expression by IFN-gamma in situ and its association with tumor progression [J]. Br J cancer, 1996, 73(5): 644~648

[20] 黄常新,王青青.超抗原的免疫功能及其作用机制研究现状.国外医学免疫学分册,2003,27(1): 92

[21] Martz E.Mechanism of specific tumor-cell lysis by alloimmune T lymphocytes :resolution and characterization of discrete steps in the cellular interaction .Contemp Top Immunobiol 1977,7:301~361

[22] Golstein P, Smith ET.Mechanism of T-cell-mediated cytolysis:the lethal hit stage .Contemp Top Immunobiol, 1977,7:273~300

[23] 王万祥,欧阳晓晖,杨成旺.基于肿瘤抗原的肿瘤免疫治疗

中国知网 https://www.cnki.net

[J].2005,27(3):245~250
[24] 黄常新,王青青.超抗原的免疫功能及其作用机制研究现状[J].国外医学免疫学分册,2003,26(6):287~292
[25] 黄杨,尹文,张秀敏,等.葡萄球菌肠毒素 A 体内诱导小鼠 T 细胞增殖的实验研究[J].现代肿瘤医学,2009,17(1):28~31

中国知网 https://www.cnki.net

综　述

肿瘤抗原联合超抗原制备肿瘤疫苗的研究进展

当今，肿瘤已成为世界上威胁人类健康的主要疾病之一，其发病率仅次于心血管疾病，如何对肿瘤细胞进行杀伤成为迫切需要解决的问题。由于肿瘤本身易侵袭转移和复发的生物学特性，使传统的手术、放疗和化疗效果比较局限。部分肿瘤患者在就诊时就已失去了手术机会，而放疗、化疗毒性反应大，无特异性。随着分子生物学及免疫基础研究的进展，肿瘤生物免疫治疗是继手术、化疗、放疗之后的肿瘤第四大基础疗法。从核酸水平讲，肿瘤是基因突变和基因表达调控失常的结果。从信号通路角度讲，肿瘤是信号调节异常的结果。从细胞生物学行为讲，肿瘤是与环境不协调发展的结果。化疗和放疗重点打击细胞 DNA 及其相关的酶类，杀伤增殖中的细胞。由于造血系统、消化系统和皮肤等也存在大量的增殖细胞，因此，毒副反应限制了化学治疗和放射治疗的剂量和治疗频率。肿瘤生物治疗是应用生物大分子（细胞、核酸、蛋白质等）或调节生物反应的小分子化合物来治疗肿瘤，其作用机制包括：1、干扰肿瘤生物学行为，如肿瘤的生长、分化、凋亡、侵袭、转移和血管生成等；2、调节宿主的抗肿瘤免疫反应；3、使细胞毒性物质集中于肿瘤组织。生物治疗的涵盖面甚广，大致包括：非特异免疫刺激剂及 BRMS 的应用；细胞因子的应用：IFN、TNF、IL-2 等；肿瘤疫苗；单克隆抗体治疗与抗体介导治疗；基因生物疗法等[1]。其中，肿瘤疫苗的应用成为目前肿瘤治疗研究的热点之一。疫苗治疗已成为一种比较有效的治疗方法，在个体体内注射肿瘤疫苗，可以达到有效减轻患者病情并防治高危个体癌症的复发的效果，由于肿瘤的疫苗治疗无明显的毒副作用[2]，近年来发展很快。目前，已有很多肿瘤疫苗成功治疗肿瘤的动物模型 ,而且应用于人体的临床实验也取得了肯定的疗效。1997 年,美国 Jefferson 大学报道 ,大约 60 %的黑色素细胞瘤转移患者 ,在注射肿瘤疫苗后存活 5 年以上。1998 年 10 月 ,波士顿研究人员制成一种经过生物工程改造的肿瘤疫苗 ,它包含一种可以刺激机体免疫系统，使 T 细胞保持较长时间的攻击力。2006 年人

中国知网 https://www.cnki.net

类历史上第一个宫颈癌预防疫苗“Gardasil”被批准上市，它能预防人乳头瘤状病毒 16/18 型感染长达 5.5 年以上，降低宫颈癌的发病率[3]。Jocham 等对术后肾癌患者进行自体肿瘤细胞疫苗的III期临床试验，共治疗 558 个患者，5 年和 70 个月的无进展生存率分别为 77.4%和 72.0%，比对照组明显提高。

一、基于肿瘤抗原的肿瘤疫苗

肿瘤疫苗（tumor vaccine）即是利用肿瘤细胞或肿瘤抗原物质诱导机体的特异性细胞免疫和体液免疫，以调节机体免疫功能，达到治疗肿瘤的目的。根据制备方法不同，目前肿瘤疫苗主要分为以下几种：肿瘤细胞疫苗，肿瘤抗原疫苗，抗独特型抗体疫苗，肿瘤核酸疫苗，肿瘤基因工程疫苗等[4-6]。

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可能包括以下几个方面[7-9]：1.肿瘤抗原表达缺陷/抗原调变,且异质性大；2.肿瘤细胞 MHC-Ⅱ类分子表达不同程度的下降或缺如，且分化差的肿瘤细胞 HLA 表达更弱，大多数实体瘤不表达 HLA-Ⅱ抗原；3.肿瘤细胞产生的细胞因子的负性调节作用，如 TGF-β、IL-10、血管内皮生长因子(VEGF)等；4. Fas/FasL 在肿瘤免疫逃逸中的作用,表达 FasL 的肿瘤细胞能诱导表达 Fas 的淋巴细胞发生凋亡,而由于瘤细胞本身表达的下调,使淋巴细胞促肿瘤细胞凋亡的作用处于弱势；5. 黏附分子/共刺激分子缺陷，使得 T 细胞活化过程中缺乏第二信号而不能被有效激活,不能激发起有效的抗肿瘤免疫应答,；6. 抑制性免疫细胞亚群的作用，抑制性细胞亚群包括:近年来被广为研究的调节性细胞(Treg),肿瘤相关巨噬细胞(TAM)),髓系来源的抑制性细胞(MDSC)等[10-11]。这些方面导致了机体无法对肿瘤细胞进行有效的识别和杀伤肿瘤细胞。肿瘤细胞表达肿瘤抗原是诱发肿瘤免疫应答的关键，肿瘤抗原需由 MHC 分子递呈，并被 T 细胞识别，机体通过肿瘤抗原激活 CTL 直接杀伤肿瘤细胞或激活 B 细胞分泌抗体产生特异性的免疫应答。

肿瘤疫苗的设计有两个先决条件，一是要选择合适的肿瘤抗原，第二就是要选择肿瘤抗原的给予方式，二者对于肿瘤疫苗能否激发免疫反应都是十分重要的因素。前者更依赖于肿瘤抗原鉴定方法的进步

中国知网 https://www.cnki.net

和肿瘤抗原的发现，而后者更依赖于对抗原递呈的规律指导设计有临床价值的疫苗。目前常用的肿瘤疫苗策略包括直接将肿瘤抗原作为疫苗，或用热休克蛋白、树突细胞作为载体，或者用肿瘤抗原的编码基因重组到 DNA 质粒、病毒载体中进行表达等。上述这些方法只能用于已知的肿瘤抗原，考虑到有一些肿瘤抗原目前还没有鉴定出来，在这种情况下，将肿瘤全细胞或全细胞衍生物作为疫苗可能是一种比较好的选择。肿瘤抗原是肿瘤免疫治疗潜在的靶位，肿瘤抗原分为肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen,TSA)和肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)。TSA 是指只存在于肿瘤细胞表面而不存在于相应正常细胞或其他种类肿瘤细胞表面的新抗原，而 TAA 并非肿瘤细胞特有的抗原，只是在发生肿瘤时此类抗原的表达明显上调。基于肿瘤抗原的肿瘤疫苗的作用是应用其表达特异性的、具有免疫原性的肿瘤抗原来刺激机体的免疫系统，进行杀伤，清除肿瘤细胞，其中最关键的是产生肿瘤特异的细胞毒性 T 细胞（cyctotoxic T lymphocyte,CTL）。CTL 属细胞毒 T 细胞，与肿瘤直接接触，通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性物质，溶解靶细胞，同时它还可能通过释放一些细胞因子诱导靶细胞的凋亡。在研究细胞毒过程的延时电影中，可观察到几分钟内 CTL 结合靶细胞并施加可见的损伤；有时再过几分钟即可见细胞死亡[12-14]。这种 CTL 诱导的快速死亡过程不能被蛋白质合成抑制剂所阻断，提示已预先形成裂解介体。CTL 诱导的细胞毒性最显著的特性是，严格的 TCR 识别的特异性，而 MHC 限制现象就是作为一个快速而方便的 TCR 识别结果，用细胞毒性来首次定义的[15]。

20 世纪 70 年代，CTL 杀伤机制研究确定了此过程的三个不同阶段[16]。首先是 CTL 靶细胞黏附，形成温和剪切力不能破坏的牢固附着。这种黏附需要在 37.C 下数分钟；如有镁离子存在可不需钙离子；低温和许多药物也可以阻断此过程。紧接着第二步称为致死性攻击或程序化裂解，也需要数分钟。其特性是媒介中需要钙离子；同黏附一样，低温和许多药物也可以阻断此过程。最后一步是 CTL 细胞毒性的靶细胞瓦解阶段，并以靶细胞的裂解结束。它持续的时间最长，其平均半衰期为 1.7 小时。此阶段的特性是二价阳离子非依赖性，目前尚无药物

中国知网 https://www.cnki.net

可有效阻断致死性损伤的靶细胞裂解。CTL 杀伤肿瘤细胞的作用方式主要有三种：1、CTL 与靶细胞接触产生脱颗粒作用，释放穿孔素插入靶细胞膜上，并使其形成通道，颗粒酶、TNF、分泌性 ATP 等效应分子进入靶细胞，导致其死亡。2、CTL 激活后表达 Fas 配体（FsaL），它可释放到胞外与靶细胞的 Fas 分子结合，传导死亡信号进入胞内，活化靶细胞内的 DNA 降解酶，引起靶细胞死亡。3、上述两种方式共存[16]。国内外多个体内外实验和动物实验表明[17-18]，以适当的形式的肿瘤抗原，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，从而产生特异性抗肿瘤效应。

应用于肿瘤抗原疫苗研究的主要有黑色素瘤、腺癌、结肠癌、淋巴瘤和前列腺癌等表达的肿瘤抗原 GM2、TF、MUC-1、HER-2／neu、CEA、C017-1A／GA733 和 PSA 等。Wierecky J 等[19]以 MUC1 的两种肿瘤抗原肽冲击 DC 制备 DC 疫苗,用于转移性肾癌患者的临床治疗研究,结果 20 例受试者有 6 例有效, 4 例 SD,受试者中可检测到针对特异抗原表位的细胞反应,且患者均容易耐受,无明显不良反应出现。齐慧等[20]研究多发性骨髓瘤 KM3 细胞株冻融抗原和弱酸洗脱抗原肽负载数突状细胞后诱导特异性的细胞毒性 T 细胞对 KM3 细胞的杀瘤作用，结果示其诱导生成的 CTL 对 KM3 肿瘤具有较强的杀伤效应。唐顺等[21]利用尤文肉瘤细胞系 A673 细胞与树突细胞相融合，激活 T 淋巴细胞产生 CTL，对尤文肉瘤细胞 A673 有一定的杀伤作用。张庆波等[22]用卵巢癌细胞提取可溶性成分作为肿瘤可溶性抗原和抗 CD3 单抗体外共同诱导产生 CTL，经分析这种 CTL 对肿瘤可溶性抗原来源的卵巢癌细胞具有选择性杀伤作用。

二、金葡素超抗原的相关研究

超抗原(superantigen,SAg)是细菌或病毒产生的外毒素，1989 年由 White 提出[23]，特点是无需抗原提呈细胞（APC）加工处理，即可直接与 APC 膜上的 MHC-Ⅱ类分子的抗原结合槽外侧非限定性的结合，以完整的蛋白质分子形式被提呈给 T 细胞，以 TCRVβ特异性的方式激活 T 细胞，激活数量为普通抗原数千。几乎从超抗原理论的一开始，人们就注意到超抗原作为强大的 T 细胞激活剂，有可能成为新一代抗肿瘤免疫分子，给肿瘤的治疗带来新的突破。近年来在以瑞典 Dohlsten

中国知网 https://www.cnki.net

等学者为首在研究超抗原理论方面取得突出成就，超抗原理论得到迅猛发展，已成为肿瘤免疫治疗的新的热点。根据其来源分为细菌性和病毒性超抗原，也有人称之为内源性超抗原和外源性超抗原。1、病毒性超抗原：是病毒（主要是逆转录病毒）感染抗体后，病毒 DNA 整合到宿主细胞 DNA 中，产生的超抗原。如可诱导乳腺肿瘤的逆转录病毒 B—小鼠乳腺肿瘤病毒（Mouse mamary tumor virus，MMTV）编码的蛋白，即次要淋巴细胞刺激抗原，主要表达于 B 细胞表面，刺激相应的 T 细胞亚群增殖。MMTV 依赖此蛋白的超抗原反应而生存并经乳汁传播，促进宿主对病毒易感；人类免疫缺陷病毒（HIV）在体内的某些表达产物也属于内源性超抗原[24-25]。2、 细菌性超抗原：大多数是细菌的外毒素，其共同特点是均为水溶性蛋白质，对靶细胞无直接伤害作用。如葡萄球菌肠毒素（Staphylococcal enteratoxins，SEs）超抗原系列（SEA-Q），毒素休克综合征毒素（Toxic shocksyndrome toxin, TSST），链球菌致热外毒素（streptococcus pyrogenic, SPE），产气荚膜梭菌和小肠结肠类耶氏菌肠毒素等[26-28]。

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，具有多种免疫学活性，包括刺激大量的 T 细胞，及活化 NK 细胞的单核细胞，促进细胞因子大量分泌，诸如：白细胞介素 2，干扰素，肿瘤坏死因子，乃至集落刺激因子[29]。根据其氨基酸组成的不同，金葡菌能够产生多种不同类型的 SAG（如 SEA、SEB、SEC、SED、SEE、SEG、SEH 等），其中研究最多的是 SEA、SEB、SEC。SE 能同时结合主要组织相容性复合体Ⅱ（major histo-compatibility complexⅡ, MHCⅡ）和 T 细胞识别受体（T cell receptor，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。

SE 对肿瘤细胞主要从三个方面的产生杀伤作用：1、经 SE 活化的 $CD8^+$T 细胞（抑制性/细胞毒性 T 细胞）和 $CD4^+$(辅助性/杀伤性 T 细胞)，使之形成 MHCⅡ类分子 -SE-TcRVβ复合物，直接杀伤表达 MHCⅡ类分子的肿瘤细胞,称为 SE 依赖的细胞介导细胞毒作用（SE dependent

中国知网 https://www.cnki.net

cell mediated cycotoxity,SDCC），而对不表达 MHCⅡ类分子的肿瘤细胞也可产生间接的旁观者效应。被激活的 T 细胞可表达 MHCⅡ类分子，又可与 SE 结合而再活化其他 T 细胞。2、被 SE 激活的 CD4+T 细胞，可分泌足量的细胞因子，如 IFN-γ、TNF-α、TNF-β、IL-1、IL-2、IL-6 和 IL-12 等多种。3、分泌的细胞因子又可进一步激活 NK 细胞，使之发挥自然杀伤作用，而 IFN-γ和 TNF 等细胞因子还可促进肿瘤细胞对 MHCⅡ类分子的表达，增强 SE 的抑瘤效果，从而对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤和抑制作用[30]。

不少研究中将 SE 用于肿瘤治疗和作为免疫增强剂。早在 1970 年代，Peavy 等和 Lanngford 等就研究了 SE 对小鼠和人 T 细胞的刺激活性。Lando[31]等用 SEA 激活外周血单个核细胞（PBMC）第 3 天，可使 PBMC 产生强大的杀伤肿瘤作用。Hedlund[32]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—100ug 不等。冯乐平[33]等用免疫组化及流式细胞术方法对经葡萄球菌肠毒素 B（SEB）培养的人外周血淋巴细胞（PBLC）进行染色及分析，发现 SEB 能够增加 PBLC 杀瘤的作用，并可选择增加 $CD4^+$T 细胞的数量。以 SE 等细菌性超抗原诱导免疫细胞的杀瘤活性，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。朱云等[34]应用高聚金葡素联合化疗治疗进展期消化道肿瘤的临床研究，结果显示高聚金葡素能有效提高及保持白细胞数量，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 [35]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。

三、肿瘤抗原联合超抗原抗肿瘤治疗

尽管各种治疗性肿瘤疫苗的设计思想各不相同，诱导免疫应答的方式不同，抗瘤效应各有特点，但不论采用何种方法制备，都是围绕如何提高肿瘤抗原的免疫原性以及如何打破肿瘤免疫耐受这一最关键的核心问题展开的。Montero 等人认为：在人或动物体内存在的具有自身肿瘤杀伤活性的自反应淋巴细胞是通过识别肿瘤细胞的自体抗原，诱发自体免疫反应而特异地摧毁肿瘤细胞的[36]。但大多数肿瘤抗原的免疫原性很弱，且宿主对肿瘤抗原的免疫应答导致肿瘤细胞表面

中国知网 https://www.cnki.net

抗原减少或丢失，从而肿瘤细胞不被免疫系统识别，不能诱发有效的抗肿瘤免疫应答，使肿瘤处于免疫逃逸状态[37-38]。所以在制作瘤苗时，人们常常需要使用能增强免疫作用的蛋白为载体。在诱导免疫细胞增生的成分中除了抗原外，还有三种成分 1、免疫佐剂。某些物质先于抗原或与抗原一起注入机体，可增强机体对该抗原的特异性免疫应答或改变免疫应答类型,此类物质称为免疫佐剂（immunoadjuvant），简称佐剂(adjuvant)。他一般分为以下四类：A、无机佐剂，如氢氧化铝、明矾等；B、有机佐剂，包括微生物及其代谢产物；C、合成佐剂，如近年来，人工合成一种卡介苗细胞壁中的有效佐剂成分胞壁酞二肽（MDP），其分子量小于 500Da，并含有异谷氨酞胺，对生物降解作用有抵抗力，易溶于水，可口服，无不良反应能增强机体免疫功能并提高疫苗的接种效果；D、油剂，如弗氏佐剂，他是动物实验中最常使用的佐剂。2、丝裂原。体外激活淋巴细胞的物质有两大类，即抗原和丝裂原(mitogen，又称有丝分裂原)。抗原能刺激杭原特异性淋巴细胞活化，这种活化具有高度特异性。一种特定的抗原只能激活具有相应抗原受体的淋巴细胞。而丝裂原是非特异的多克隆激活剂，能使某一淋巴细胞的所有克隆都被激活对人和小鼠起作用的重要丝裂原有：刀豆素 A(ConA)、植物血凝素(PHA)、美洲商陆(PWM)、脂多糖(LPS)、葡聚糖、抗 Ig 杭体、抗 CD3 抗体等。3、超抗原（SAg）。SAg 可与 APC 表面的 MHC-Ⅱ类分子及 TCR 的 V 区结合，非特异性地刺激 T 细胞的增生并释放细胞因子(CK)。SAg 有两类，1、外源性 SAg 主要是某些细菌的毒素，包括金黄色葡萄球菌肠毒素（SE）、A 族链球菌 M 蛋白和关节炎支原体丝裂原(MAM)等。细菌性 SAg 的共同特点是均为由细菌分泌的水溶性蛋白质，对靶细胞无直接伤害作用，可与 MHC-Ⅱ类分子结合，活化 $CD4^+$T 细胞。2、内源性 SAg。病毒（主要是逆转录病毒）感染机体后，病毒 DNA 整合到宿主细胞 DNA 中，可产生内源性 SAg。人类免疫缺陷病毒（HIV）在体内的某些表达产物即属于一种人的内源性 SAg。

超抗原作为一种崭新的抗肿瘤治疗手段，正逐步临床推广应用，其抗肿瘤效果还有待于进一步的提高。目前存在问题主要是以下几点：1、微量的 SAg 就可激活大量的 T 细胞并分泌多种细胞因子，用量不

中国知网 https://www.cnki.net

当，就有可能引起机体免疫调节功能紊乱而产生变态反应导致一系列急慢性疾病的发生，如风湿热、川崎病、毒素中毒综合征等[39-40]；2、动物实验证明 SE 可使反应性 T 细胞，尤其是 CD4+T 细胞急剧消失，造成免疫应答减退或消失；3、超抗原直接用于抗肿瘤的应有还存在很多的限制，单纯的超抗原没有靶向作用[41]。

为避免超抗原引发疾病的危险，减低产生免疫耐受发生的机会，提高抗肿瘤的特异性，可将超抗原与单抗、肿瘤可溶性抗原等联合用于肿瘤的免疫导向治疗。金葡素超抗原联合肿瘤可溶性抗原体外冲击淋巴细胞，可以保证肿瘤抗原被有效摄取提呈，且可提高共刺激信号，强烈诱导针对肿瘤抗原的 CTL 作用，可为肿瘤疫苗的研制和免疫治疗提供一种新的途径。Yamanaka 等[42]用胶质母细胞瘤病人的自身胶质瘤细胞的裂解产物致敏 DC 制成疫苗, 对 2 例再次手术治疗病人的肿瘤组织标本进行分析, 发现肿瘤组织中均存在明显的 $CD4^+$及 $CD8^+$T 细胞浸润。申志华等[43]应用肿瘤全溶物冲击 DC 联合 SEB 诱导效应淋巴细胞，结果显示联合作用后效应细胞明显增殖、活化，并产生高效的抗肿瘤作用。马昌云等[44] 通过肺癌肿瘤可溶性抗原(TSA)和 SEA 联合修饰致敏 DC 体外诱导对肺癌细胞进行杀伤作用，联合修饰后的 DC 具有较强的免疫刺激活性，产生 $CD8^+$表达增加的 CTL，对肺癌细胞有高效特异性，肺癌 TSA 和超抗原 SEA 联合修饰的 DC 的活性明显强于单用肺癌 TSA 修饰的杀伤作用，

四、前景展望

疫苗的发现对人类历史的发展上具有重要意义。因为从某种意义上来说人类繁衍生息的历史就是人类不断同疾病和自然灾害斗争的历史 ,控制疾病最主要的手段就是预防，而接种疫苗被认为是最行之有效的预防措施。而事实证明也是如此，威胁人类几百年的天花病毒在牛痘疫苗出现后便被彻底消灭了，迎来了人类应用疫苗战胜疾病曙光 ，也使人们更加坚信疫苗对控制和消灭疾病的作用。此后 200 年间疫苗家族不断扩大发展，目前用于人类疾病防治的疫苗有 20 多种。肿瘤疫苗的出现也有近百年的历史，肿瘤疫苗从早期的非特异性疫苗发展到今天的肿瘤抗原特异性疫苗，从上世纪 90 年代初以基因修饰肿瘤细胞为基础的疫苗发展到现在以树突状细胞为基础的肿瘤抗原特异性疫

中国知网 https://www.cnki.net

苗,都与分子生物学、免疫学及基因转移技术的发展密切相关。肿瘤疫苗具有独特的优势,弥补当今治疗手段的不足,为肿瘤治疗提供了新的方向和手段,但是,肿瘤疫苗的研发仍存在众多问题: 如何鉴定出更加特异的肿瘤抗原，建立一种方法诱导出足以清除癌细胞的免疫反应,并能克服机体对很多肿瘤抗原的耐受,克服肿瘤细胞对宿主免疫反应的逃避。对于已有的较弱的肿瘤抗原, 研究者们已经发展很多新的策略大大增强其免疫原性, 从而更能选择性地诱导 CTL 有效清除肿瘤。同时, 这些策略也在尽量克服各种负性的调节机制, 如对肿瘤免疫监视的抑制和肿瘤疫苗免疫应答的抑制。如何将主动特异性免疫治疗与外科手术、化学治疗、放射治疗有机地结合起来,充分发挥综合治疗的优势，将成为一个重要的研究方向。随着基础研究和临床试验进一步的开展，更多新的有前途的肿瘤疫苗将为人类肿瘤的治疗提供希望和战胜癌症的信心。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] 罗荣城,韩焕兴主编.肿瘤生物治疗学.北京:人民卫生出版社,2007,7

[2] Iannello A, Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancermonoclonal antibodies[J]. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(4): 487~499

[3] Herbert J, Coffin J. Reducing patient risk for human papillomavirus infection and cervical cancer[J]. J Am Osteopath Assoc, 2008, 108 (2): 65~70

[4] Baecher-Allan C, Anderson DE. Immune regulation in tumor-bearing hosts[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18 (2): 214~9

[5] Prell RA, Gearin L, Simmons A, et al. The anti-tumor efficacy of a GM-CSF-secreting tumor cell vaccine is not inhibited by docetaxel administration[J].Cancer Immunol Immunother,2006,55 (10):1285~93

[6] Cornet S, Miconnet I, Menez J, et al. Optimal organization of a-polypeptide-based candidate cancer vaccine composed of cryptic t-umor peptides with enhanced immunogenicity. Vaccine,2006,24 (12): 21022~109

[7] Hah nel P S,Thaler S,Antunes E,et al. Targeting A KT s-ignaling sensitizes cancer to cellular immunot herapy[J].Cancer Res,2008,68 (10):3899~3906

[8] Bronte V,Mocelln S.Suppressive influences in the immune respons-e to cancer [J].J immunother,2009,32(1):1~11

[9] Rosenberg SA.New opportunities for the development of cancer Immunotherapies [J].Cancer J Sci Am,1998,4:1~4

[10] Nomura T,Sakaguchi S,Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cell in tumor immunity[J].Curr Top MicrobiolImmunol,2005,29 3:287~302

[11]Liu Z,Kim JH,Falo LD,et al.Tumor regulatory T cells potentlyabrogate antittumor immunity[J].J Immunol,2009,182(10):6160~6167

[12]Rothstein TL,Mage M,Jones G,et al.Cytotoxic T lymphocyte sequential

中国知网 https://www.cnki.net

killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by timelapse microcinematography[J].J immunol,1978;121(5):1652~1656

[13]Sanderson CJ.The mechanism of T cell mediated cytotoxicity.Ⅱ. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography[J].Proc R Soc Lond,1976,192(1107):241~255

[14]Zagury D,Bernard J,Thierness N,Feldman M,Berke G.Isolation and characterization of individual functionally reactive cytotoxic T lymphocytes :conjuga-tion,killing and recycling at the single cell level[J].Eur J Immunol 1975,5:818~822

[15]Zinkernagel RM, Doherty PC.The discovery of MHC restriction[J]. Immunol Today, 1997,18(1):14~17

[16]王万祥,欧阳晓晖,杨成旺.基于肿瘤抗原的肿瘤免疫治疗[J].2005,27 99(3):245~250

[17] Mosca P J,Lyerly H K,Clay T M,et al.Dendritic cell vaccines[J]. Front Biosci,2007,12:4050~4060

[18]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

[19]Wierecky J, MüllerMR, Wirths S, et al. Immunologic and clinical responses after vaccinations with pep tide - pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients [J]. Cancer Res, 2006, 66(11):5910~5918

[20]齐慧,申建凯,肖乐,等.多发性骨髓瘤抗原致敏树突状细胞介导的体外抗癌治疗.中南大学学报,2006,31(2):222~227

[21]唐顺,郭卫,郭义,等.树突状细胞与尤文肉瘤融合诱导抗肿瘤免疫应答的体外研究[J].中华外科杂志,2005,43(12):803~806.

[22]张庆波,石卫,李艳芬,等.卵巢癌可溶性抗原和抗 CD3 单抗体外共同诱导产生细胞毒 T 细胞[J].实用肿瘤学杂志,1997,11(4):257~258

[23]White J, Herman A, Pullen AM et al. The V beta-specific Superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimultion of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice[J].Cell,1989,56(1):27~35

[24] Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, et al. Epstein-Bar virus

中国知网 https://www.cnki.net

transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen[J]. Immunity.2001,15(4):579~589

[25]Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, et al. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen.a model linking environment and autoimmunity[J]. Immunity. 2001, 15(4):591~601

[26]Tristan A, Peyrat MA, LimA, et al. egc a highly prevalent operon of enterotoxin gene,forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus[J]. J Immunol. 2001,166(1): 669~677

[27] Newton D, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al. Novel superantigens from streptococcal toxic shock syndrome Streptococcus pyogenes isolates[J]. Adv Exp Med Biol. 1997, 418: 525~529.

[28]McCormick JK,Pragman AA,Stolpa JC,et al. Functional characteri -zation of streptococcal pyrogenic exotoxin J,a novel superantigen [J]. Infect Immun.2001,69(3):1381~1388

[29] 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

[30]Matsushita K,Takenouchi T,Kobayashi S,et al. HLA-DR antigen expression in colorectal carcinomas: influence of expression by IFN-gamma in situ and its association with tumor progression [J]. Br J cancer, 1996, 73(5): 644~8

[31]Lando PA, Hedund G,Dohlsteen M,et al . Bacterial superantigens as antitumor agents:induction of tumor cytotoxicity in human ly mphocytes by staphylococcal enterotoxinA[J].Cancer Immu-nol Im munother, 1991,33(4): 231~237

[32] 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

[33] 冯乐平,陈军,王海,等.超抗原 SEB 对淋巴细胞抗肿瘤免疫效果的影响[J].实用肿瘤学杂志,2001,15(1):1~2

[34] 朱云,张南征,潘武,等.高聚生辅助化疗治疗消化道系统肿瘤的近期

中国知网 https://www.cnki.net

疗效观察[J].中华实用医药杂志,2005,5(3):63~69
[35] 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
[36]Montero E,Amador JF,Perez R,et al.Tumor-specilic immunotherapy based on dominat models of natural tolerance[J].Med Hyptheses, 2000,54(4):53l~536
[37]Smyth MJ,Godfrey DI,Trapani JA.A fresh look at tumor immuno-surveillance and immunotherapy[J].Nat Immunol,2001,2(4):293~9
[38]Hahnel P S,Thaler S,Antunes E,et al.Targeting AKT sign-aling sensitizes cancer to cellular immunotherapy[J].Cancer Res,2008,68 (10):3899~3906
[39] 黄常新,王青青.超抗原的免疫功能及其作用机制研究现状[J].国外医学免疫学分册,2003,26(6):287~292
[40] 黄杨,尹文,张秀敏,等.葡萄球菌肠毒素 A 体内诱导小鼠 T 细胞增殖的实验研究[J].现代肿瘤医学,2009,17(1):28~31
[41] 韩从辉,郑宝钟,田军,等.超抗原诱导杀伤 T 细胞体内外膀胱肿瘤的杀伤作用研究[J].中华肿瘤杂志,2000,22(5):392
[42]Yamanaka R,Abe T,Yajima N,et al.Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses:results of a clinical phase I/II trial.[J].Br J Cancer,2003, 89(7):1172~1179
[43] 申志华,揭伟,邢飞跃.肿瘤全溶物冲击的 DC 联合超抗原 SEB 对效应细胞免疫活性的影响[J].肿瘤防治杂志,2005,12(16):1228~1231
[44] 马昌云,吴芳,孔繁义,等.肺癌可溶性抗原联合超抗原诱导的 DC 疫苗对肺癌细胞杀伤作用的研究[J].中国肺癌杂志,2009,12:539~542

中国知网 https://www.cnki.net

致　谢

光阴荏苒，岁月如梭。三年苦乐交加的学习生涯即将结束，学位论文终于成稿，回首这段求学经历，心中感慨万千。我首先向尊敬的导师张庆波教授、朱丽华博士、李淑英教授以最诚挚的谢意！感谢他们三年来对我的谆谆教导，在工作上耐心指导，在思想上精心引导，在生活上热心关怀。导师敏捷严谨的思维、渊博精深的学识和敢于创新的科研精神是我终身的楷模，导师对我学习生活无微不至的关怀和为培养人才而无私奉献的精神将激励我不懈地而努力。在此谨对导师的辛勤培养和热情关怀表示最衷心的感激！

在本课题的研究过程中，我得到了生物科学系田喜凤教授、裴银辉教授、张秀军教授等的无私帮助，特此表示衷心的感谢！

感谢中心实验室的杨方、罗玲、郝小惠等老师的关怀和帮助，谢谢您们为我提供了一个良好的实验条件和环境。

感谢研究生部张柳、孙冬梅、郑桓、李会兰老师三年来在学习和生活方面给我的关怀和帮助。

感谢我的同学李会荣、马志红、晋晶、丁丽丽给我的关心和帮助，我从你们身上学到了很多非常有价值的知识。这些知识不仅对我今后的科研学习有着很大的帮助，而且对我的思想、做人都有很深刻的影响，是我人生路上的宝贵财富。

最后，我要特别感谢我的父母在这些年来对我的默默关怀，你们是我生命中最重要的人，我的每一个成功都离不开你们的支持，也正是有了你们的支持，我才能顺利的完成了我的学业。我将更加努力地工作，以实际行动报答你们对我的养育之恩与厚望。

中国知网　https://www.cnki.net

个人简历

一、 一般情况

姓名：刘洪梅　　性别：女　　民族：汉

出生日期：1982.10　　籍贯：唐山　　政治面貌：中共党员

二、 个人经历

2001.9—2004.7　承德医学院　　临床医学（专科）

2006.1—2008.1　华北煤炭医学院　　临床医学（本科）

2008.9—2011.7　华北煤炭医学院　　病原生物学（硕士研究生）

三、培训经历

2008年10月参加由北京生理科学会和中国医学科学院基础医学研究所主办的《细胞分子生物学及细胞培养相关技术学习班》。

四、 已发表论文

1、刘洪梅,张晓群,刘亚楠,等.胶质瘤抗原联合超抗原SEC诱导杀瘤性免疫细胞的实验研究[J].中国肿瘤临床,2011,38(6):301-303

2、李树义,刘洪梅,张庆波,等.肿瘤可溶性抗原联合金葡素超抗原共同诱导杀瘤细胞的实验研究[J].中国临床医学，2011,1:22-24

3、刘洪梅,马志红,晋　晶,等.酵母多糖对鲤鱼生长和免疫功能的影响[J].安徽农业科学，2010,38(4):1874-1875

4、朱延军,刘洪梅,边洪荣,等.酵母多糖对小鼠免疫功能影响的体外实验研究[J].安徽农业科学,2009,37(28):13636-13637

五、承担或主研课题情况

硕士研究生期间参与:

1、　河北省科技支撑计划项目资助的省级课题科研工作：肿瘤可溶性抗原和金葡素超抗原构建在肿瘤疫苗的研究(09276418D-18)。

2、　唐山市科学技术与发展计划资助的市科研工作：淡水鱼饲料免疫添加剂的研制与开发(07120203A-4)。并获技术成果一项。

中国知网　https://www.cnki.net