

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0103-04

重组金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的抗癌效应研究

胥全彬, 张艳红, 张雷雷, 刘传暄, 马清钧 (军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:** 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 作为一种超抗原, 其抑瘤活性一直受到关注, 其直接应用于肿瘤治疗的报道较少, 本研究对其抑瘤活性进行了分析。**方法:** 利用亲和层析纯化出重组 SEA, 注射接种了黑色素瘤的小鼠, 观察其抑瘤效应。**结果:** 各组剂量的重组 SEA 均能有效抑制肿瘤的生长, 其高、中、低剂量重组 SEA 的抑瘤率分别为 79.3%、75.6% 和 73.8%, 而原位注射(中剂量) 的抑瘤率为 90.6%。治疗小鼠的肿瘤组织出现大量的 T 细胞浸润; 此外, SEA 以免疫的形式刺激动物, 能明显产生特异性抗体, 并在一定程度上增强小鼠对肿瘤转移的抵抗力。**结论:** 重组 SEA 对小鼠黑色素瘤的能产生明显的抑制效应, 尤其是原位注射, 这为 SEA 的靶向治疗肿瘤奠定了基础。

[关键词] 金黄色葡萄球菌肠毒素 A; 肿瘤; 免疫治疗

[中国分类号] R392.12 [文献标识码] A

Growth Inhibition of Tumor by Recombinant SEA

XU Quan-bin, ZHANG Yan-hong, ZHANG Lei-lei, LIU Chuan-xuan, MA Qing-jun (Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

[**Abstract**] **Objective:** To evaluate the antitumor activity of recombinant SEA for therapy of B16 melanoma established in C57BL/6 mice. **Methods:** C57BL/6 mice with melanoma were treated with the purified rSEA. The tumors were isolated and weighted. **Results:** Tumor growth was apparently inhibited by rSEA at high, middle, and low doses intraperitoneally, whose inhibition ratio were 79.3%, 75.6% and 73.8% respectively. rSEA treatment *in situ* could inhibit tumor growth more effectively(90.6%). Further study showed that numerous CD8⁺ and CD4⁺ T cell were infiltrated in tumor tissues, which were consistent with tumor growth inhibition induced by rSEA. **Conclusions:** rSEA could inhibit tumor growth effectively, especially the treatment *in situ*. This study paves the way for tumor immunotherapy with targeted SEA.

[**Key words**] staphylococcal enterotoxin A; tumor; immunotherapy

超抗原是指一类逆转录病毒蛋白和细菌外毒素, 它们无需抗原递呈细胞的加工, 而能直接与抗原递呈细胞的 MHC 及 T 细胞的 TCR 结合, 并激活 T 细胞, 由于这类抗原以微量存在时, 即可激活大量的 T 细胞, 因而被称为超抗原(super antigen, SAg)。早期研究^[1-3]发现, 超抗原能对 MHC- II⁺ 肿瘤细胞产生超抗原依赖的细胞毒作用(SAg-dependent cell-mediated T-cell-derived cytotoxicity, SDCC), 同时产生大量的细胞因子, 如 TNF- α , IL-2, IFN- γ 等, 从而产生系统的抗肿瘤反应, 因此超抗原概念一经提出, 其在治疗恶性肿瘤上的潜力便受到重视^[4-7]。金黄色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins) 是由金黄色葡萄球菌分泌的一组具有超抗原活性的细菌肠毒素, 包括金黄色葡萄球菌肠毒素 A, B 及 C₁₋₃ 等。本研究小组克隆表达了重组金

黄色葡萄球菌肠毒素 A (recombinant SEA, rSEA), 并对其体外活性进行了分析, 结果表明其具有体外抑瘤活性^[8]。本研究以接种了黑色素瘤的 C57BL/6 小鼠为模型, 进一步对其抑瘤活性进行分析。

1 材料与方法

1.1 主要材料

鼠源黑色素瘤细胞 B16, 本室保存; C57BL/6 购自本院动物中心; 细胞培养基 Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) 购自 GIBCO 公司, 胎牛血清(FCS) 均

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30300417)

[作者简介] 胥全彬(1973-), 四川彭州人, 博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究, 与张艳红为共同第一作者, E-mail: xuqb@nic.bmi.ac.cn,

购自杭州四季青生物制品公司;青霉素、链霉素等抗生素具购自 GIBCO 公司;牛血清白蛋白(BSA)、胰酶等为 Sigma 公司生产。rSEA 表达大肠杆菌工程菌株为本室构建。C57BL/6 小鼠购自军医科学院动物中心。

1.2 重组 SEA 的制备

重组 SEA 蛋白的纯化,基本参照胥全彬等^[8],并略有修改。将 pET-SEA 转化 BL-21(DE3),低温诱导制备 rSEA 的可溶表达上清,过滤后 4℃ 保存。装好 Chelating Sepharose 柱,按常规上 Ni²⁺、平衡层析柱,上样品,用平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl)平衡至基线后,用洗脱液(20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 80 mmol/L 咪唑, pH6.0)洗脱,收集洗脱峰,将含目标蛋白洗脱组分进行浓缩、除盐,并对纯度进行分析。

SDS-PAGE 中蛋白相对含量的确定在天能 GIS 凝胶图象处理系统中完成。纯化蛋白浓度的测定按 BCA Protein Assay Kit(Pierce)说明进行。

1.3 B16 实体瘤小鼠模型的构建及治疗方案

模型制备及治疗方案参考文献^[9]并有修改,基本步骤如下:复苏 B16 细胞,并将细胞扩增至所需数目;将肿瘤细胞用含 10% C57BL/6 小鼠血清的 DMEM 将细胞浓度调节至 1.0×10^6 /ml;将 0.5 ml 细胞悬液皮下接种 C57BL/6 小鼠,次日将小鼠称重,然后随机分成 5 组,每组 10 只:PBS 阴性对照组,重组 SEA 高、中、低剂量组以及中剂量原位注射组;8 d 后,此时肿瘤大小约 0.5 cm × 0.5 cm,将 0.2 ml PBS 及 0.2 ml 含低(11 ng)、中(110 ng)及高剂量(1.1 μg) rSEA 的 PBS 溶液经腹腔注射荷瘤小鼠;原位注射:按中剂量进行,注射至荷瘤小鼠瘤旁皮下。连续治疗 4 d;12 d 后处死小鼠,称重、测量小鼠肿瘤大小。

1.4 组织化学分析

将治疗小鼠的肿瘤组织按常规取材、福尔马林固定、脱水、包埋、切片及制片。然后进行抗体结合及底物显色:将切片置过氧化物酶灭活液中,灭活 10 min,倾去溶液;加入 100 μl 正常羊血清封闭 10 min 后,倾去溶液;用 PBST 洗 3 次,每次 2 min,加入鼠抗 CD4(1:500)或 CD8(1:400),室温孵育 60 min;用 PBST 洗 3 次,每次 2 min,加入兔抗鼠二抗 100 μl(1:5000),室温孵育 10 min 后,用 PBST 洗 3 次,每次 2 min;加入过氧化物酶标记的链霉卵白素 100 μl,孵育 10 min,用 PBST 洗 3 次,每次 2 min;加入过氧化物酶的底物-色素混合液 100 μl,显色 5~10 min 后,用 PBST 清洗 3 次,每次 2 min。苏木素复染细胞核后,脱水封片照相。

1.5 rSEA 免疫小鼠及肺侵袭模型的建立

小鼠肿瘤肺转移模型参考 Pulaski(2000)^[10]。取

KM 小鼠,随机分为 2 个组,每组 10 只:① rSEA 处理组、② 生理盐水对照组;免疫前称重、采血。首次每鼠免疫 14 μg,2 周后 28 μg 加强免疫 1 次,1 月后 28 μg 再加强 1 次。第 5 周后,将传代培养的 B16 细胞经胰酶消化后,用含 10% 同源小鼠血清的 RPMI-1640 稀释至 4×10^5 /ml,取 0.1 ml 注射小鼠尾静脉。3 周后,解剖小鼠取肺,将肺用 10% 中性福尔马林固定,随后的病理切片制作同前,分析数据。小鼠特异性抗体效价的测定按照常规 ELISA 方法进行。

1.6 统计分析

各剂量 rSEA 处理组与 PBS 对照组间肿瘤重量的差异分析,采用单向方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 重组金葡菌肠毒素 A 的纯化

重组 SEA 在大肠杆菌中诱导表达后,其可溶部分经金属螯合层析后,行 SDS-PAGE 电泳分析,其纯度在 95% 以上。

2.2 重组金葡菌肠毒素 A 的抑瘤效果分析

与 PBS 对照组比,各剂量的重组 SEA 均能显著抑制肿瘤的生长($P < 0.001$)。重组 SEA 高、中、低剂量治疗组的抑瘤率分别为 79.3%, 75.6%, 73.8%, 而中剂量原位注射的抑瘤率高达 90.6%。这提示超抗原靶向治疗较直接利用,其抗癌效果更好(图 1)。

图 1 重组 SEA 治疗对肿瘤生长的影响

Fig. 1 Affection of rSEA treatment to tumor growth

2.3 rSEA 治疗小鼠的组织化学分析

取 2.2 中的中剂量 SEA 治疗组的小鼠肿瘤组织,固定后,切片进行组化染色分析。结果表明 SEA 治疗能够明显增加 T 细胞尤其是 CD8⁺T 细胞在肿瘤组织的浸润(图 2)。

2.4 重组金葡菌肠毒素 A 的免疫对肿瘤转移的影响

有研究表明,超抗原融合蛋白在临床应用时,可诱发抗超抗原的抗体,该抗体可以降低融合蛋白反复应

用的毒副作用^[11]。这就提示用超抗原融合蛋白对机体进行预先免疫有可能提高融合蛋白的应用剂量,降低毒副反应。而直接用超抗原融合蛋白免疫机体势必会干扰融合蛋白的靶向作用,因此用 SEA 进行单独免疫可能是一个较好的选择。但用 SEA 直接免疫,能否产生抗体以及对肿瘤免疫治疗是否有不利影响,目前并不清楚。本研究将 rSEA 以免疫的形式肌注,能够有效激发特异性抗体的产生,效价在 1:20 000 以上。以免疫小鼠制备黑色素瘤肺转移模型,结果 PBS 对照组小鼠均出现转移的黑色瘤(见图 3),而 rSEA 处理组仅有 2/3 有转移,这表明免疫不会对肿瘤发展产生积极影响,相反能一定程度降低肿瘤的转移。

SEA 免疫小鼠能够增强小鼠抵抗肿瘤转移,这提示 SEA 对 B16 黑色素瘤的抑制效应可能(至少部分是)是机体免疫力非特异性增强的结果,即 SEA 可在 MHC-II 分子阳性细胞的递呈下激活 CD4⁺ T 细胞。Shrayer 等^[14]将编码 SEA 的真核表达载体转染小鼠黑色素瘤细胞 B16,以该基因修饰辐射细胞免疫 C57BL/6 小鼠,能有效抑制肿瘤随后的侵袭,而针对黑色素瘤抗原 B700 的抗体也明显高于单纯的辐射 B16 细胞免疫组。本室将 EGF 嵌合分子/SEA 融合蛋白免疫小鼠,结果融合蛋白产生了高滴度的抗 EGF 嵌合分子抗体,而用 EGF 嵌合分子直接免疫则未见明显特异性的抗体产生(结果另行发表)。上述研究表明 SEA 能够以免疫增强剂的方式发挥作用。

图 2 重组 SEA 治疗荷瘤小鼠后 T 细胞在肿瘤组织的浸润

Fig. 2 T cells infiltration in tumor tissues treated by rSEA

A: CD8/rSEA; B: CD4/rSEA; C: CD4/PBS; D: CD8/PBS

3 讨论

超抗原治疗肿瘤的机理因分子的设计而有略有不同,但总的说来其作用机理主要有如下两方面^[12]:(1)超抗原在肿瘤细胞的“呈递”下,激活 CD8⁺ T 细胞,后者进而对该肿瘤细胞产生超抗原依赖的细胞毒作用(SAg-dependent cell-mediated cytotoxicity, SDCC),穿孔素是该反应主要效应分子。(2)超抗原能激活 CD4⁺ T 细胞,分泌大量的细胞因子,如 IL-2, TNF- α , IFN- γ 等,细胞因子激活 NK 细胞成为 LAK 细胞,两者协同作用,对肿瘤细胞产生直接和间接的杀伤作用,其中 IFN- γ 的作用是主要的,而 TNF- α 可能起协同作用。在本研究中,由于所用 B16 黑色素瘤细胞的 MHC 分子很少甚至不表达, MHC 分子并未参与到肿瘤细胞呈递;但由于呈递 SEA 的分子还可以是其它分子,如 CD1a 分子^[13]。因此,本研究利用超抗原所产生的抗癌效应是否来自 SDCC 作用有待进一步研究。此外,由于重组

图 3 rSEA 免疫小鼠对肿瘤肺转移的影响

Fig. 3 Effect of KM mice immunized with rSEA on metastasis of tumor cells

A: The antibody titre of rSEA in immunized KM mice;
B: Verification of tumor tissue in lung a: Tumor tissue stained by HE, b: Normal lung tissue stained by HE

最近,Perabo 等^[15]对金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SEB)应用于膀胱癌进行了临床前评估,结果表明 SEB 能够有效杀伤肿瘤;以最大剂量 100 μ g/ml 处理膀胱,也未见毒副作用。在本研究中,用 rSEA 注射荷瘤小鼠,能够有效抑制肿瘤的生长,而尤以中剂量原位注射(每只鼠 110 ng)效果最佳。这表明,将超抗原进行局部给药或加以靶向修饰,可较好地应用于肿瘤的治疗。

致谢:感谢任冽、靳彦文、李晓荣、郭艳梅等同志对本研究所提供的帮助。

[参考文献]

- [1] White J, Herman A, Pullen AM, *et al.* The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal detection in neonatal mice [J]. *Cell*, 1989, 56(1): 27-35.
- [2] Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, *et al.* Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove [J]. *Cell*, 1990, 62(6): 1115-1121.
- [3] Irwin MJ, Hudson KR, Fraser JD, *et al.* Enterotoxin residues determining T cell receptor V β binding specificity [J]. *Nature*, 1992, 359(6398): 841-843.
- [4] Dohlsten M, Lando PA, Hedlund G, *et al.* Targeting of human cytotoxic T lymphocytes to MHC class II-expressing cells by staphylococcal enterotoxins [J]. *Immunology*. 1990, 71(1): 96-100.
- [5] Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, *et al.* Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colo-carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(3): 482-488.
- [6] 杨连君, 隋延仿, 陈志南. 单克隆抗体导向的超抗原葡萄球菌肠毒素 A 抗肝癌实验研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 265-267.
- [7] 王青青, 余海, 杨骅, 等. 单抗和超抗原的融合蛋白与 5-氟尿嘧啶对人大肠癌细胞的协同抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(3): 196-197.
- [8] 胥全彬, 刘传暄, 马清钧, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的基因克隆、表达及活性试验 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(4): 402-406.
- [9] Kodama H, Suzuki M, Katayose Y, *et al.* Specific and effective targeting cancer immunotherapy with a combination of three bispecific antibodies [J]. *Immunol Lett*, 2002, 81(2): 99-106.
- [10] Pulaski BA, Terman DS, Khan S, *et al.* Cooperativity of staphylococcal enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastase in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(10): 2710-2715.
- [11] Giantonio BJ, Alpaugh RK, Schultz J, *et al.* Superantigen-based immunotherapy: A phase I trial of PNU-214565, a monoclonal antibody-staphylococcal enterotoxin A recombinant fusion protein, in advanced pancreatic and colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(5): 1994-2007.
- [12] 胥全彬, 刘传暄, 马清钧, 等. 超抗原抗癌药物研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2003, 14(3): 238-240.
- [13] Gregory S, Zilber MT, Choqueux C, *et al.* Role of the CD1a molecule in the superantigen-induced activation of MHC class II negative human thymocytes [J]. *Hum Immunol*. 2000, 61(5): 427-437.
- [14] Shrayner DP, Kouttab N, Hearing VJ, *et al.* Immunization of mice with melanoma cells transfected to secrete the superantigen, staphylococcal enterotoxin A [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 46(1): 7-13.
- [15] Perabo FG, Willert 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.

[收稿日期] 2005 - 03 - 01

[修回日期] 2005 - 04 - 16

[本文编辑] 韩丹

中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会和中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会联合会议于 2005 年 5 月 26 日在福州市召开

中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会和中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会联合会议于 2005 年 5 月 26 日在福州市召开,会议由福建省肿瘤医院承办,中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会主任委员、第二军医大学曹雪涛教授以及中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会主任委员、中国医学科学院董志伟教授共同主持了会议。与会人员包括中国医学科学院张友会教授和张叔人教授、北京大学寿成超教授、上海市肿瘤研究所朱景德教授、北京大学人民医院童春容教授、军事医学科学院黎燕教授等。会议听取了张叔人教授提出的关于发展中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会会员的议案并作了讨论;《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部主任于益芝教授介绍了业已开通的《中国肿瘤生物治疗杂志》网站和两个专业委员会联合网站的建设情况,与会委员提出了多条丰富网站建设的建议;会议确定于 2006 年 6 月在青岛市召开第九届全国肿瘤生物治疗学术会议;会议还就编写抗癌协会继续教育教材《肿瘤生物治疗》展开了讨论,并提出了具体编写计划。

[撰稿] 韩丹