

# 超抗原 SEA 增强 PML - RAR 多肽体外诱导特异性 CTL 杀伤活性的机制

林 晨<sup>1</sup>, 白 雪<sup>1</sup>, 高 珂<sup>1</sup>, 杨力建<sup>2</sup>, 陈少华<sup>2</sup>, 李扬秋<sup>2</sup>

Effects of Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) on Cytotoxicity of T Cells Stimulated by PML-RAR Peptide *in vitro*

LIN Chen<sup>1</sup>, BAI Xue<sup>1</sup>, GAO Ke<sup>1</sup>, YANG Li-jian<sup>2</sup>, CHEN Shao-hua<sup>2</sup>, LI Yang-qiu<sup>2</sup>

1. Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Ji nan University, Guangzhou 510632, China, 2. Institute of Hematology

**Abstract:** **Objective** To investigate the Effects of staphylococcal enterotoxin A (SEA) on the cytotoxicity of T cells stimulated by PML-RAR peptide *in vitro*. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were cultured with PML-RAR peptide and SEA for 20 days. After induction, the cytotoxicity of T cells induced against NB4 and K562 cell lines were examined by Cell Counting Kit-8 (CCK-8). The CD4 and CD8 surface markers on the harvested CD3<sup>+</sup> T cells were detected by flow cytometry (FCM). **Results** The cytotoxicity of T cells induced by PML-RAR peptide with SEA was higher than that of T cells induced only by PML-RAR peptide against NB4 cells. The FCM assay showed that the ratio of CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> T cells were gradually decreased in both groups of PML-RAR peptide whether with SEA or not at the intervals of day 5, 10 and 20 after induction, but the most significantly decreased by PML-RAR peptide with SEA. **Conclusion** The specific cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells induced by PML-RAR peptide against NB4 cells could be enhanced with superantigen SEA.

**Key words:** Superantigen; PML - RAR peptide; NB4 cells; T cells

**摘 要:** **目的** 探讨超抗原 SEA 体外增强 PML-RAR 多肽诱导特异性 CTL 杀伤活性的机制。 **方法** 分别将 SEA、PML-RAR 多肽以及 SEA 联合 PML-RAR 多肽与正常人外周血单个核细胞共同培养, 利用 CCK-8 比色法检测诱导后 T 细胞对 NB4 和 K562 细胞株杀伤活性, 同时利用流式细胞术测定诱导 T 细胞表面 CD4 与 CD8 表达情况。 **结果** 诱导后第 20 天, SEA 能明显增强 PML-RAR 多肽特异性杀伤 NB4 细胞株的作用。诱导后第 5、10、20 天动态检测表明, 多肽及 SEA 联合多肽组 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 比值逐渐降低, 其中 SEA 联合 PML-RAR 多肽诱导组降低最显著。 **结论** 超抗原 SEA 能明显增强 PML-RAR 多肽体外诱导特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖与特异性的杀伤作用。

**关键词:** 超抗原; PML-RAR 多肽; NB4 细胞; T 细胞

**中图分类号:** R733.71;73-36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2008)09-0627-03

## 0 引言

金黄色葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxins A, SEA) 是一种超抗原 (Superantigen, SA<sub>g</sub>), 直接与 T 细胞受体 (TCR) 的 V 区结合, 具有很强的非特异性激活 T 细胞能力。PML-RAR 融合蛋白是急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 特异的分子标志<sup>[1]</sup>。我们前期研究发现, PML-RAR 多肽体外能够诱导特异

性 T 细胞产生, 但其诱导增殖能力不强<sup>[2-3]</sup>。本文进一步从特异性细胞杀伤效应以及细胞表型方面, 分析比较两者联合应用的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PML-RAR 合成多肽 (Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala-Ala-Ile-Glu-Thr-Gln-Ser, 上海博亚生物公司), 金黄色葡萄球菌肠毒素 A (军事医学科学院), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), Cell Counting Kit-8 (日本同仁化学研究所), PerCP-CD3、FITC-CD4 和 PE-CD8 单抗, PerCP-IgG, FITC-IgG, PE-IgG (Immunotech 公司)。外周血单个核细胞来自一名健康未婚成年女性。

### 1.2 方法

收稿日期: 2007-09-20; 修回日期: 2007-11-14

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2005B50301016); 广东省自然科学基金资助项目 (06025169); 广州市科技计划资助项目 (2005Z1-E4015); 暨南大学病理生理重点实验室开放课题基金资助项目

作者单位: 1. 510632 广州, 暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室, 2. 血液病研究所

作者简介: 林晨 (1961-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤免疫研究

1.2.1 SEA 及 PML-RAR 多肽体外联合诱导外周血单个核细胞增殖 将常规分离的外周血 MNC,调整终浓度为  $1 \times 10^9/L$ ,加入 12 孔培养板,每孔 1.5 ml。实验分为空白对照组、单纯 PML-RAR 多肽组(P 组)、单纯 SEA 组(SEA 组),SEA 联合 PML-RAR 多肽诱导组( $PS_0$  组、PS 组、PS 组,即 PML-RAR 多肽诱导培养第 0、5、10 天后加入 SEA 溶液)。基础培养体系如下:外周血单个核细胞  $1 \times 10^9/L$ ,150 ml/L 胎牛血清,青、链霉素各  $10^5$  u/L, rhIL-2  $5 \times 10^5$  u/L,抗人 CD3 单抗 1 mg/L,抗人 CD28 单抗 0.6 mg/L<sup>[4]</sup>。诱导培养体系中 PML-RAR 多肽终浓度为 500 mg/L,SEA 终浓度为 10 mg/L。空白对照加 RPMI1640 培养液。置 37、5 %CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每 3 天半量换液,补充多肽抗原以维持浓度不变。分别收集第 5、10 和 20 d 培养的 T 细胞。

1.2.2 CTL 杀伤活性试验 分别以诱导培养后各组 T 细胞为效应细胞,以维持培养的 NB4 细胞或 K562 细胞为靶细胞,进行混合淋巴细胞培养(MLTC)<sup>[2]</sup>。效靶比为 20:1,靶细胞浓度  $1 \times 10^7/L$ ,接种于 96 孔培养板内 100  $\mu$ l/孔,微量混合器振荡 5 min,以促进效、靶细胞之间接触;同时分别设效应细胞对照组和靶细胞对照组(100  $\mu$ l/孔)。每组均设 3 个平行孔。各组于 37、5 % CO<sub>2</sub>,饱和湿度培养箱中培养 4 h。继而在各孔内加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 试剂,在培养箱内培养 4 h 后,以 450 nm 为检测波长,600 nm 为参考波长,于酶标仪上测定各孔 A 值。

对靶细胞的杀伤百分率

$$= \frac{\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞对照孔 A 值}}{\text{靶细胞对照孔 A 值}} \times 100 \%$$

1.2.3 流式细胞术检测 T 淋巴细胞表型 直接免疫荧光染色及流式细胞术(FCM)检测 T 细胞表面 CD3、CD4、CD8 分子的表达情况。收集诱导培养第 5、10、20 d 后的 T 细胞,洗涤计数后,待测细胞 100  $\mu$ l 分别加入 PerCP-CD3、FITC-CD4 和 PE-CD8 标记单抗各 5  $\mu$ l,对照管中分别加入 PerCP-IgG、FITC-IgG、PE-IgG 作为阴性对照组,室温(25 左右)避光染色 15 min。用洗涤液洗涤 2 次,加入终浓度 2 %的多聚甲醛固定,流式细胞仪(FACSCalibur E4573, Becton Dickinson 公司)上机检测,利用 MultiSET V 1.1.1 软件进行分析。

1.2.4 统计学方法 利用 SPSS 10.0 软件进行数据的统计分析。

2 结果

2.1 特异性诱导外周血 T 细胞的杀伤活性分析 将收集诱导 20 d 后的细胞进行细胞杀伤性分

析,结果见表 1。单纯 PML-RAR 多肽抗原诱导的 T 细胞对 NB4 细胞株的杀伤活性高于阴性对照组也高于对 K562 细胞株的杀伤( $P < 0.05$ );单纯 SEA 不仅能明显刺激 T 细胞对 NB4 靶细胞的杀伤,同时对 K562 靶细胞产生明显杀伤作用( $P < 0.05$ ),但两者之间杀伤活性没有差别。PML-RAR 多肽与 SEA 两者联合应用进行诱导后, $PS_0$ 、PS 及 PS 组的 T 细胞则表现出更高的对 NB4 细胞株杀伤活性,而且杀伤效果也高于同组对 K562 细胞株的杀伤( $P < 0.05$ )。比较  $PS_0$ 、PS 及 PS 三组间的 T 细胞对 NB4 细胞的杀伤活性,各组间差异无统计学意义。此外,与单纯多肽诱导组 T 细胞对 K562 细胞株的杀伤作用相比较,SEA 诱导组和多肽联合 SEA 诱导组( $PS_0$ 、PS、PS 组)的 T 细胞也表现出对 K562 细胞株更高的杀伤活性( $P < 0.05$ ),但 SEA、 $PS_0$ 、PS、PS 组之间也没有差别。

表 1 体外诱导的 T 细胞对 NB4 细胞和 K562 细胞的杀伤活性比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 1 Comparison of cytotoxicity of T cells stimulated by SEA and PML-RARx on NB4 and K562 cell lines in vitro ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	CTL 活性(%)	
	NB4 cells	K562 cells
对照组	10.74 $\pm$ 6.94	11.17 $\pm$ 7.21
SEA 组	57.92 $\pm$ 8.84 *	62.57 $\pm$ 9.45 *
PML-RAR 组	61.95 $\pm$ 9.39 *	19.41 $\pm$ 8.63
$PS_0$ 组	92.89 $\pm$ 8.51 * #	57.41 $\pm$ 8.12 *
PS 组	78.23 $\pm$ 9.35 * #	53.68 $\pm$ 7.99 *
PS 组	81.77 $\pm$ 9.04 * #	55.74 $\pm$ 8.84 *

\*:对相同靶细胞杀伤活性与对照组比较, $P < 0.05$ ; #:对相同靶细胞的杀伤活性与 PML-RAR 组比较, $P < 0.05$ ; :同组对不同靶细胞杀伤活性比较, $P < 0.05$

2.2 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值动态变化

根据杀伤性细胞毒实验结果,动态检测单纯 SEA、单纯 PML-RAR 多肽、SEA 联合 PML-RAR 诱导 5、10、20 天后,CD3 + CD4<sup>+</sup>/CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞比值变化,见图 1。阴性对照组与 SEA 组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值变化比较平稳,PML-RAR 多肽、SEA 联合 PML-RAR 两个诱导组 CD3 + CD4<sup>+</sup>/CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞比值均随诱导时间下降比较明显,第 10 天开始 CD3 + CD4<sup>+</sup>/CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞比值均明显低于阴性对照组,其中 PML-RAR 多肽组与 PML-RAR 多肽联合 SEA 诱导组也明显低于单纯 SEA 诱导组(均  $P < 0.05$ ),但两组之间没有差别。第 20 d 联合诱导组下降幅度超过 PML-RAR 多肽组。

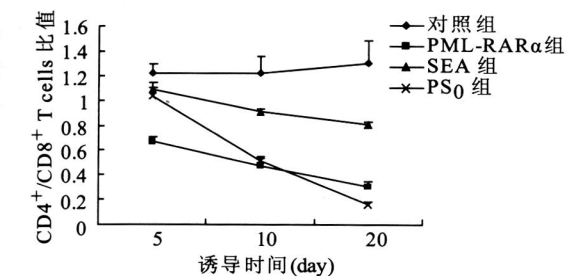


图1 外周血 MNC 特异性诱导 20 天 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值动态变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig 1 Comparison of dynamic ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells in MNC peripheral blood in 20 days after induced by PML-RAR and SEA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.3 诱导后 CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞的动态变化

比较各实验组诱导后 CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖情况,显示其随诱导时间而呈升高的趋势。SEA 联合 PML-RAR 多肽诱导组呈现出升高的趋势最为显著 ( $P < 0.05$ ),第 10 天时已开始超过其他三组,20 天时增殖量高达 87 %,见图 2。

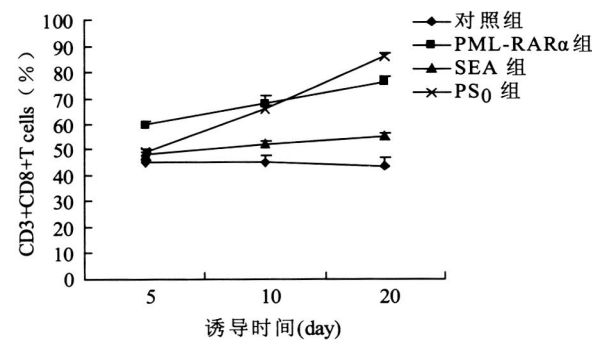


图2 外周血 MNC 特异性诱导 20 天 CD3 + CD8<sup>+</sup> T 细胞动态的变化比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig 1 Comparison of dynamic change of CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells in MNC from peripheral blood in 20 days after induced by PML-RAR and SEA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3 讨论

虽然诱导分化治疗和化疗在急性早幼粒细胞白血病 (APL) 治疗中已经取得较好的治疗效果,但微小的残留病变所导致疾病复发依然是一个棘手的问题<sup>[5-6]</sup>。

杀伤性试验证实,经 PML-RAR 多肽特异性诱导二十天的外周血 T 细胞对 APL 细胞株 NB4 表现出了特异性的杀伤作用,与已有研究结果相符<sup>[4]</sup>。单独 SEA 刺激也能增强 T 细胞对两种白血病细胞株的杀伤效应,但杀伤效应没有特异性。将 SEA 联合 PML-RAR 多肽共同诱导,结果,两者的联合应用可以诱导出对 NB4 特异性杀伤作用更高的 T 细胞,这可能是 PML-RAR 多肽诱导出特异性的 T 细胞克隆大量增殖,SEA 与优势增殖的特异性 T 细胞克隆的 TCRV 片段非特异性结合,进一步刺激细胞活化,并产生多种细胞因子,放大所诱导的具有特异性杀伤作用的 T 细胞克隆。

CD4<sup>+</sup> Th 和 CD8<sup>+</sup> Tc 在免疫应答中发挥各自不同的作用,T 淋巴细胞亚群的数量和相对比值的变化,成了一种十分便捷的评估机体免疫状态的重要指标<sup>[7]</sup>。为进一步探讨所诱导 T 细胞的杀伤机制,我们利用流式细胞术动态测定诱导后 T 细胞表型变化。本研究中,外周血 T 细胞经 PML-RAR 多肽特异性诱导后,CD4<sup>+</sup> Th 和 CD8<sup>+</sup> Tc 比值明显下降,CD8<sup>+</sup> T 细胞逐渐占据了主导地位,提示 PML-RAR 融合多肽诱导的 T 细胞以 CD8<sup>+</sup> 细胞为主。使用单纯 SEA 超抗原对 T 细胞诱导后,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞动态比值变化不大,证实了 SEA 对 CD4<sup>+</sup> 及 CD8<sup>+</sup> T 细胞具有同等刺激活化的作用<sup>[8]</sup>。SEA 联合 PML-RAR 多肽共同诱导 T 细胞,检测发现 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值降低更为明显,降低程度明显大于单纯 PML-RAR 多肽诱导组,联合诱导后 CD8<sup>+</sup> T 细胞占据绝对优势。这些结果从 T 细胞表面结构上充分提示,SEA 可以增强 PML-RAR 多肽对 CD8<sup>+</sup> T 细胞特异性克隆的诱导作用。从诱导后 T 细胞受体 TCR V 亚家族基因克隆优势表达的结果也证实这点 (另文报道)。

综上,本研究首次揭示,超抗原 SEA 可以明显增强 PML-RAR 多肽诱导特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞毒 T 细胞的杀伤作用,初步展示 SEA 联合 PML-RAR 多肽在 APL 免疫治疗中的可行性。

参考文献:

[1] Lichl JD. Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia [J]. Cancer Cell, 2006, 9(2): 73-74.

[2] 杨力建,李扬秋,陈少华,等. PML-RAR 多肽和 NB4 细胞体外诱导 CTL 细胞杀伤活性分析 [J]. 现代临床医学生物工程杂志, 2005, 11(6): 467-469.

[3] 汤冀,李扬秋,杨力建,等. PML-RAR 多肽诱导脐血 TCR V T 细胞增殖研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(9): 529-532.

[4] Holzer U, Orlikowsky T, Zenhrer C, et al. T-cell stimulation and cytokine release induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) and the SEAD227A mutant [J]. Immunology, 1997, 90(1): 74-80.

[5] Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy [J]. Ann Oncol, 2006, 17(1): 131-134.

[6] 贺鹏程,张梅,李静,等. IFN2 和 IFN2 逆转 MR2 细胞维甲酸耐药的实验研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 205-208.

[7] Kiani A, Habernann I, Schäke K, et al. Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib [J]. Haematologica, 2003, 88(7): 754-761.

[8] 许桂莲,朱锡华,杨劲. 超抗原 SEA 对外周血 T 细胞的活化作用 [J]. 免疫学杂志, 2001, 17(2): 85-87.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]