

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¹,白 雪¹,高 珂¹,杨力建²,陈少华²,李扬秋²

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

LIN Chen¹, BAI Xue¹, GAO Ke¹, YANG Li-jian², CHEN Shao-hua², LI Yang-qiu²

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⁺ 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⁺ / CD8⁺ 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⁺ 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⁺ / CD8⁺ 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⁺ 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) , 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^[1]。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^[2-3]。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 (PS₀ 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 5×10^5 u/L, 抗人 CD3 单抗 1 mg/L, 抗人 CD28 单抗 0.6 mg/L^[4]。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% CO₂ 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)^[2]。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 μl/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 μl/孔)。每组均设 3 个平行孔。各组于 37℃、5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养 4 h。继而在各孔内加入 10 μl 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, 在酶标仪上测定各孔 A 值。

对靶细胞的杀伤百分率

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

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 μl 分别加入 PerCP-CD3、FITC-CD4 和 PE-CD8 标记单抗各 5 μl, 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, PS₀、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 PS₀、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 (PS₀、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、PS₀、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-RAR_x 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 ±6.94	11.17 ±7.21
SEA 组	57.92 ±8.84 *	62.57 ±9.45 *
PML-RAR 组	61.95 ±9.39 *	19.41 ±8.63
PS ₀ 组	92.89 ±8.51 **	57.41 ±8.12 *
PS 组	78.23 ±9.35 **	53.68 ±7.99 *
PS 组	81.77 ±9.04 **	55.74 ±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⁺ / CD8⁺ 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⁺ / CD3⁺ CD8⁺ T 细胞比值变化, 见图 1。阴性对照组与 SEA 组 CD4⁺ / CD8⁺ 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⁺ / CD3⁺ CD8⁺ T 细胞比值均随诱导时间下降比较明显, 第 10 天开始 CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺ 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。

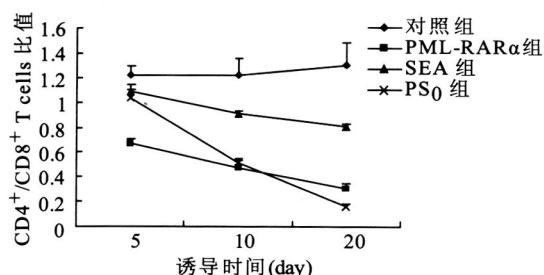


图 1 外周血 MNC 特异性诱导 20 天 CD4⁺ / CD8⁺ T 细胞比值动态变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

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

2.3 诱导后 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞的动态变化

比较各实验组诱导后 CD3⁺ CD8⁺ 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。

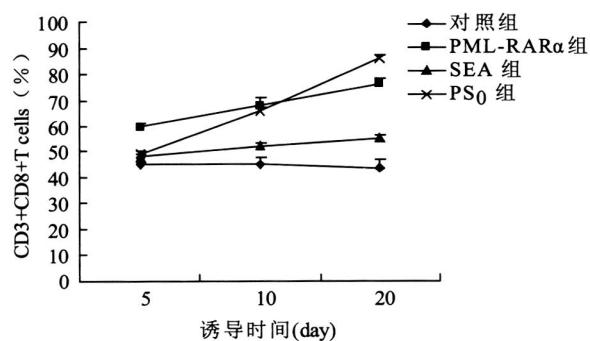


图 2 外周血 MNC 特异性诱导 20 天 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞动态的变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 1 Comparsion of dynamic change of CD3⁺ / CD8⁺ 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^[5-6]。

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^[4]。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⁺ Th 和 CD8⁺ 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^[7]。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⁺ Th 和 CD8⁺ Tc 比值明显下降,CD8⁺ 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⁺ 细胞为主。使用单纯 SEA 超抗原对 T 细胞诱导后,CD4⁺ / CD8⁺ T 细胞动态比值变化不大,证实了 SEA 对 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞具有同等刺激活化的作用^[8]。SEA 联合 PML-RAR 多肽共同诱导 T 细胞,检测发现 CD4⁺ / CD8⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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] 杨建力, 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学杂志, 2005, 11 (6): 467-469.
- [3] 汤冀, 李扬秋, 杨建力, 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, Habermann 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]