

超抗原SEA对C57BL/6荷瘤小鼠S180肉瘤的抑制检测及肿瘤坏死因子的分析

陈自辉, 孙嘉琳, 张云, 王雪, 冯艳敏, 张洪娜
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 通过在C57BL/6小鼠腋下注射S180肉瘤细胞, 隔日注射生理盐水(对照组)和葡萄球菌肠毒素A(staphylococcal enterotoxin A, SEA)(实验组), 九日后解剖小鼠测量抑瘤率和脾指数, 并通过ELISA和免疫组化方法检测TNF- α 。解剖后测量发现实验组小鼠肿瘤重较对照组轻, 分别为(0.52 \pm 0.10)g和(1.02 \pm 0.11)g(p <0.05); 两组的脾指数分别为15.9和4.8; 同时发现实验组脾脏和血清中TNF- α 的含量均高于对照组。因此认为超抗原SEA可以有效提高小鼠的免疫能力, 从而更高效的杀伤癌细胞。

关键词: 金黄色葡萄球菌肠毒素A(SEA); ELISA; 免疫组织化学; 抑瘤率; 脾指数; TNF- α

文章编号: 1673-9078(2010)1-43-3

Inhibitory Effect of SEA on S180 Growing in C57BL/6 Mouse and Analysis of the Tumor Necrosis Factor

CHEN Zi-hui, SUN Jia-lin, ZHANG Yun, WANG Xue, FENG Yan-min, ZHANG Hong-na
(College of Bioengineering, Tian Jin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: This experiment studies the anti-tumor effect of the staphylococcal enterotoxin A on S180 solid tumor in C57BL/6 mouse model and detect the anti-tumor rate and the spleen index. And the TNF- α content in the spleen and blood serum was also studied through ELISA and immunohistochemistry. S180 cells was injected to the oexter of the C57BL/6 to build up the solid tumor mouse model, then physiologic saline (control) and SEA (test) were intraperitoneally injected to these mouse every two days. Nine days later, the mouse were dissected to detect anti-tumor rate, spleen index and TNF- α . It was found that the weights of solid tumor in the test group (0.52 \pm 0.10 g) were lighter than the control group (1.02 \pm 0.11 g) (p <0.05). The spleen indexes of the two groups were 15.9 and 4.8, respectively. Results also showed that TNF- α content in the test group was more than that in the control group. It was concluded that SEA can effectively improve the immunity of the mice, thus killing the tumor cells in mouse model group.

Key words: staphylococcal enterotoxin A; anti-tumor rate; spleen index; ELISA TNF- α ; immunohistochemistry

金黄色葡萄球菌肠毒素(staphylococcal enterotoxins, SEs)是一大类由金黄色葡萄球菌分泌产生的细菌毒素, 按其抗原性的差异, 目前发现至少有9个血清型。已经证实, 葡萄球菌肠毒素A(staphylococcal enterotoxin A, SEA)除能引起人类食物中毒和毒性休克综合征外, 尚具有细菌超抗原的作用。SEA在极低剂量(ng或pg)时, 即可刺激哺乳动物及人的T细胞增殖, 并能明显增强T细胞活性, 诸如释放多种细胞因子和细胞毒作用, 因而具有开发成升白细胞、抗肿瘤药物的可能。因此, 利用葡萄球菌肠毒素研制治疗白细胞减少症及抗肿瘤药物已成为国际上新药研究的

收稿日期: 2009-08-28

基金项目: 天津市科委资助的应用基础研究重点项目(06YFJJC02600)

作者简介: 陈自辉, 微生物与生化药理学硕士

热点之一, 本实验室通过大肠杆菌系统成功的表达了SEA, 并利用SEA进行了抗肿瘤实验。

1 材料和方法

1.1 药物

金黄色葡萄球菌肠毒素(SEA): 由本实验室合成; Mouse IL-2 ELISA Kit(北京四正柏生物科技有限公司); SP-9000/9001/9002免疫组化试剂盒(美国ZYMED)

1.2 动物及瘤系

C57BL/6小鼠30只, 四周龄, 体重18~22g, 雄性, 购自解放军军事医学科学院实验动物中心, S180肉瘤癌细胞系均为本校食品科学与生物技术学院液氮保存。

1.3 主要仪器

HS-1300 超净工作台(苏州净化), KD-202 轮转式切片机(浙江金华市科迪仪器有限公司), YSQ-LS-75L 灭菌器(上海博奕实业有限公司), Multiskan MK3 酶标仪(Thermo), 超低温冰箱(Sanyo), TE2000-u 显微成像系统(Nikon), TD5A-ws 台式低速离心机(湘仪离心机仪器公司), Forma Series II Water Jacketed co² Incubator(Thermo)。

1.4 肿瘤细胞悬液的制备及接种

自液氮罐中取出冻存的 S180 细胞株, 在 37℃ 水浴中迅速融化, 于超净工作台分别转移至 50 mL 离心管中, 加入适量的 DMEM 完全培养基混匀, 以 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 在 25 mL 培养瓶中加入适量的 DMEM 完全培养基, 混匀, 培养过夜, 第 2d 以 1000 r/min 离心 5 min, 加入适量生理盐水, 在光学显微镜下计数, 配成 10⁶·cfu/mL 的细胞悬液, 以无菌注射器抽取 0.2 mL 细胞悬液, 分别注入小鼠腹腔。7 d 后无菌条件下取小鼠腹水, 以 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入适量的无菌生理盐水, 在光学显微镜下计数, 配成 10⁶ cfu/mL 的细胞悬液, 于每只小鼠右侧腋下注射 0.2 mL。

1.5 实验方法

腋下接种后的 20 只小鼠随机分成两组, 每组 10 只, 对照组注射生理盐水 0.2 mL, 实验组注射 SEA 蛋白 0.2 mL, 浓度为 50 μg/mL。每组均是隔天注射腹腔给药, 第 4 天开始测量瘤体体积, 注射 4 次后解剖小鼠, 取血提取血清, 并称取瘤重和脾重, 计算抑瘤率和脾指数。将脾细胞研碎培养, 取血清和脾脏细胞培养, 上清液做 ELISA, 测定 TNF-α 的含量。取得的瘤组织常规甲醛固定, 做免疫组化。

1.6 检测方法及指标

(1) 肿瘤体积与抑瘤率

第 9 天颈椎脱臼法处死小鼠, 剥离原位肿瘤, 测量肿瘤最大径(a)和最小径(b)。

$$\text{肿瘤体积}(v) = ab^2/2;$$

肿瘤生长抑制率(%)=(对照组平均瘤重-治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。

(2) 脾指数计算

表 1 超抗原 SEA 对 S180 肉瘤的抑制作用及脾指数 (x±s, n=10)

Table 1 The inhibition effect of the SEA on S180 and the spleen index of the mouse bearing S180

	体重(g)	体积(mm ³)	瘤重(g)	脾重(g)	抑瘤率(%)	脾指数(mg/g)
生理盐水组	20.41±0.99	325.36±64.52	1.02±0.11	0.10±0.02	—	4.8
SEA 组	18.31±1.00	127.11±41.97	0.52±0.10	0.29±0.03	49.02	15.9

从表 1 可知, 注射 SEA 后实验组小鼠的脾重显著

脾指数=脾脏平均质量(mg)/平均体重(g)。

(3) 免疫组化

肿瘤组织取出后经 10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 检测肿瘤坏死因子 TNF-α。

(4) 脾脏及血清中的肿瘤坏死因子 TNF-α 含量检测: ELISA 法

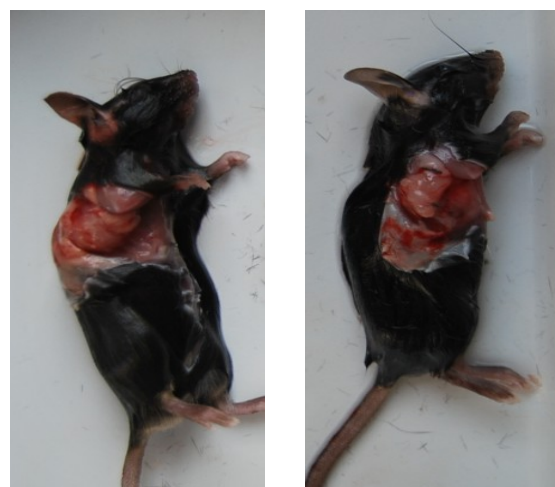
1.7 统计学分析

用 SPSS 统计分析软件进行统计学分析, 数据用均数±标准差 (x±s) 表示, 各组均数的比较用单因素方差分析 (ANOVA), p<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 SEA 对肿瘤细胞生长的抑制作用

图 1 可知, SEA (注射量 10 μg/只) 隔日 1 次腹腔注射能明显抑制 S180 细胞在 C57BL/6 小鼠体内的生长, 抑制率为 49.02%。实验组与对照组瘤重分别为 (1.02±0.11) g 与 (0.52±0.10) g, 二者间差异有统计学意义 (p<0.05), 表明 SEA 对 S180 细胞有显著的杀伤作用。可知 SEA 可以有效的杀伤癌细胞, 减小瘤体体积。



(a) 注射生理盐水的对照组 (b) 注射 SEA 的实验组

图 1 小鼠解剖图

Fig.1 Photography of dissected mouse

2.2 SEA 对脾重和脾指数的影响

大于对照组的脾重, 分别为 (0.29±0.03) g 和

(0.10±0.02) g, 两者差异有统计学意义 ($p<0.05$), 脾指数分别为 15.9 (SEA 组) 和 4.8 (对照组), 表明 SEA 可以高效的提高机体的免疫能力, 以杀伤癌细胞。

2.3 SEA 对小鼠体内 TNF- α 含量的影响

从标准品可得 TNF- α 与 OD 值的线性公式为: $y=507.31x-178.1$, $R^2=0.9324$ 。其中, y 为 TNF- α 浓度, x 为 OD 值。

根据公式可得出脾脏和血液中 TNF- α 的含量 (pg/mL), 具体见表 2。

表 2 小鼠脾脏和血清中的 TNF- α 含量 (pg/mL)

Table 2 Content of the TNF- α in the spleen and the blood serum of the mouse (pg/mL)

	脾脏	血清
生理盐水组	910.45	80.08
SEA 组	1511.6	272.86

可见 SEA 组脾脏和血清中含有较高的 TNF- α , 因此可以更有效的杀伤机体内的癌细胞。

2.4 免疫组织化学方法检测瘤组织中的 TNF- α

从图 2 可知, 通过免疫组化分析, 可以见到在 SEA 组的肿瘤组织中, 含有更多的 TNF- α , 说明 SEA 可以有效的杀伤癌症细胞, 减小瘤组织的体积。

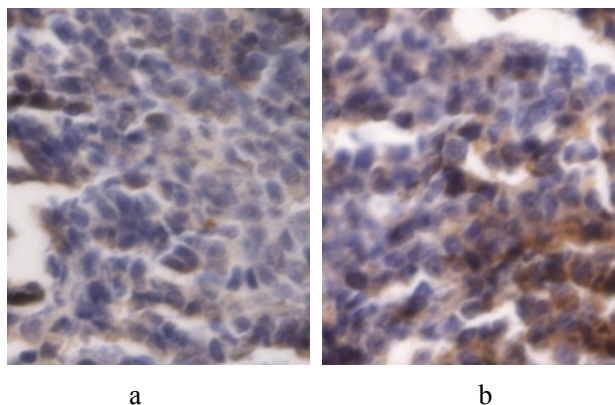


图 2 对照组及实验组小鼠解剖瘤组织中 TNF- α 的常规免疫组化检测

Fig.2 Immunity analysis of the TNF- α in dissected S-180 tumor of mouse

注: A: 对照组小鼠解剖后瘤组织做常规的免疫组化, 检测 TNF- α ; b: 实验组小鼠解剖后瘤组织做常规免疫组化检测 TNF- α 。

3 讨论

实验证明超抗原 SEA 对肿瘤有较大的杀伤作用,

实验组和对照组的瘤重有较大的差异 ($p<0.05$), 肿瘤的抑制率达到了 49.02%, 证明 SEA 在癌症的治疗上有很大的发展前景。

SEA 虽然对于小鼠肉瘤的生长具有明显的抑制作用, 但实验中各组小鼠状态也有差异, 给药组小鼠体重有所下降, 考虑系药物刺激免疫系统所致。具体机制目前仍不十分明确, 需要进一步的研究。SEA 组小鼠的脾指数较对照组大 ($p<0.05$), 说明 SEA 可以显著的提高机体的免疫力, 提高机体杀伤癌细胞的能力。同时通过 ELISA 和免疫组织化学方法证明, 注射 SEA 的小鼠, 脾脏, 血清, 和瘤组织中都含有较高含量的 TNF- α , 说明 SEA 可以刺激机体产生更多的肿瘤坏死因子, 引发癌细胞的凋亡。

本实验证明了超抗原 SEA 具有高效的诱导机体抗肿瘤免疫反应的特性, 把它作为抗肿瘤生物制剂, 应用于抗肿瘤疗法中, 将会有广泛的应用前景, 也必将会取得更快更显著的进展。

参考文献

- [1] Tordsson J M, Ohlsson L G, Abrahmsen L B, et al. Phage2 selected Primate Antibodies Fused to Superantigens for Immunotherapy of Malignant Melanoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 48(12): 691-702.
- [2] Pulaski B A, Terman D S, Khan S, et al. Cooperativity of Staphylococcal Aureus Enterotoxin B Superantigen, Major Histocompatibility Complex Class II, and CD80 for Immunotherapy of Advanced Spontaneous Metastases in a Clinically Relevant Postoperative Mouse Breast Cancer Model[J]. Cancer Res, 2000, 60(10): 2710-2715.
- [3] Dohlsten M, Abrahmsen L, Bjork P, et al. Monoclonal antibody superantigen fusion proteins: Tumor specific agents for T cell based tumor therapy[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1994, 91: 8945 ~ 8949.
- [4] 毕允力, 高解春, 姚明. 肾母细胞瘤裸鼠移植瘤模型的建立及其生物学特性[J]. 中华小儿外科杂志, 2000, 21(2): 115-118.
- [5] 马文学. 跨膜型超抗原 SEA 融合蛋白的抗肿瘤作用研究 [D]. 中国优秀硕士学位论文全文数据库 (博士), 2002
- [6] 罗金凤, 孙嘉琳, 朱宏丽. EGF-SEA 融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化. 工业微生物, 2008, (4): 31~34.
- [7] 张国蓉, 梁玲玲, 付辞. 软骨多糖对小鼠 Ca761 乳腺癌血管生成的影响. 现代食品科技, 2009, (6): 581-583