

# 超抗原 SEA 体外对 Jurkat T 淋巴细胞增殖活性与表面超微结构的影响

郇世隽<sup>1</sup>, 林晨<sup>1</sup>, 龚超群<sup>3</sup>, 杨力建<sup>2</sup>, 李扬秋<sup>2</sup>,  
蔡继业<sup>3</sup>, 田红霞<sup>1</sup>, 高永鹏<sup>1</sup>

(暨南大学 1. 医学院微生物学与免疫学教研室; 2. 医学院血液病研究所; 3. 生命科学技术学院化学系, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 通过显微形态观察和功能检测分析超抗原(SEA)对 Jurkat T 淋巴细胞的影响。方法: 应用 CCK-8 法, 原子力显微镜(AFM)体外检测 Jurkat T 淋巴细胞增殖活性、及其细胞膜超微结构的改变。结果: 与对照组比较, 不同浓度的 SEA 随着作用时间的增加, 细胞膜超微结构与 Ra 值明显发生改变。Jurkat T 淋巴细胞经过质量浓度为 0.1 ~ 100 mg/L SEA, 作用 48 h 期间, Jurkat T 细胞的表面超微结构(平均粗糙度, Ra)和增殖活性(A 值)变化非常明显。其中, 质量浓度 10 mg/L SEA 作用 24 h, Jurkat T 淋巴细胞表面结构变化最明显, 而细胞增殖活性在 48 h 达最强。结论: SEA 作为超抗原作用于 Jurkat T 淋巴细胞后, Jurkat T 淋巴细胞的活化表现出表面形态结构改变先于代谢水平的改变, 较后者更灵敏。

**[关键词]** Jurkat T 细胞; 超抗原; 原子力显微镜; CCK-8; 增殖活性; 表面结构

**[中图分类号]** R371.122; R733.174 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0590-05

## Effect of superantigens SEA on the proliferative activity and surface ultrastructure of Jurkat T in vitro

GAO Shi-jun<sup>1</sup>, LIN Chen<sup>1</sup>, GONG Chao-qun<sup>3</sup>, YANG Li-jian<sup>2</sup>, LI Yang-qiu<sup>2</sup>,  
CAI Ji-ye<sup>3</sup>, TIAN Hong-xia<sup>1</sup>, GAO Yong-peng<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology and Immunology, Medical College; 2. Institute of Hematology, Medical College;  
3. Department of Chemistry, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To study the effect of superantigens(SEA) on the T cell(Jurkat cell) by observing morphology and functions. **Methods:** Cell counting kit-8(CCK-8), atomic force microscope(AFM) was used to check up the proliferation and membrane ultrastructure of T cell. **Results:** Compared to the untreated cell, the cellular membrane ultrastructure and Ra value was significantly changed. The T cell treated with SEA(0.1 ~ 100 mg/L) for 48 hours, membrane ultrastructure Ra and proliferative activity was changed obviously. The T cell treated with 10 mg/L SEA for 24 hour, the changes of membrane ultrastructure were more remarkable, and at 48 hour the proliferation of T cell was more active. **Conclusion:** SEA as a superantigens, which treated T cell, and the activation of the T cell showed the morphology changes earlier than the metabolic changes.

**[收稿日期]** 2009-04-08

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(06025169); 广东省科技计划项目(2005B50301016); 广州市科技计划项目(2003J1-I0011, 2005Z1-E4015); 中德生物技术合作项目(CHN02/319); 血液病学国务院侨办重点学科建设基金项目

**[作者简介]** 郇世隽(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 血液肿瘤免疫学研究

通讯作者: 林晨, 男, 教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220257; E-mail: tlinch@jnu.edu.cn

[Key words] Jurkat T; superantigen; atomic force microscope; cell counting kit-8; proliferative activity; surface structure

超抗原(superantigen, SAg)是一类具有多种免疫活性的特殊抗原分子,主要是一些细菌毒素和逆转录病毒基因产物,可直接与 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的某些 V $\beta$  区结合,不受主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)的限制。由于微量的超抗原就可以激活 20% 以上的 T 细胞,且与 T 细胞抗原特异性无关,故称之为超抗原<sup>[1]</sup>。

原子力显微镜(atomic force microscope, AFM),具有高分辨率,可在生理条件下观察细胞表面细微结构变化。本研究通过 AFM 观察葡萄球菌肠毒素 A(staphylococcal enterotoxin A, SEA)不同时间、浓度作用于 Jurkat T 细胞后超微结构的改变,结合细胞增殖活性变化情况,分析 SEA 作用 Jurkat T 淋巴细胞超微结构的可视化信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

SEA 购自军事医学科学院;细胞增殖检测试剂盒(cellcountingKit-8, CCK-8)购自日本株式会社同仁化学研究所;人急性 T 淋巴细胞性白血病细胞(Jurkat T 淋巴细胞)购自广州中山大学实验动物中心细胞库;RPMI-1640、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)等细胞培养试剂购自 GibcoBRL 公司;戊二醛购自日本京都公司。

### 1.2 方法

(1)细胞培养及 SEA 刺激处理 Jurkat T 细胞在采用 RPMI-1640 培养液,按体积分数为 10% 添加胎牛血清及青霉素和链霉素质量浓度分别为 100 mg/L,在 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 条件下进行细胞培养。取指数生长期 Jurkat T 淋巴细胞,台盼蓝染色观察细胞活力,活细胞数占 98%,调整细胞数。SEA 作用终质量浓度依次为 1 000、100、10、1、0.1、0.01 mg/L,将各浓度 SEA 分别与培养细胞加入 96 孔平底培养板中,每孔终体积 100  $\mu$ L,细胞 5.0  $\times$  10<sup>5</sup>/mL;设 SEA 处理组与未加 SEA 刺激对照组,置于 37℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 6、12、24、48、72 h。

(2)细胞增殖活力检测 经培养后 Jurkat T 细胞液每孔加 CCK-8 10  $\mu$ L,继续培养 1 h 后用酶联检测仪在 450 nm 波长下测定各孔光吸收值(A)。

(3)原子力显微镜(AFM)检测 分别取与不同浓度 SEA 作用 6、12、24、48、72 h 后的 Jurkat T 淋巴细胞;滴于新剥离的云母片上自然铺展;吸附 10 min;然后用体积分数为 2.5% 的戊二醛固定 15 min;用蒸馏水冲洗 3 次;室温自然干燥。根据 CCK-8 法检测结果选择待测样品;将制备好的样品置于 AFM(autoprobe CP research thermomicroscopes 公司,美国)的 XY 扫描台上,用监视器定位所要扫描的样品区域,在空气中室温下利用接触或非接触模式成像。AFM 图像仅经过自带软件(IP2.1 版)的平滑处理,以消除扫描方向上的背景噪音。

### 1.3 统计分析

SPSS 13.0 统计软件分析各组实验数据,数据用(均数  $\pm$  标准差)( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 SEA 不同浓度与作用时间对细胞增殖的影响

经 CCK-8 法测定不同时间点、不同质量浓度 SEA 刺激 Jurkat T 淋巴细胞的增殖情况吸光度(A 值)(图 1)。在 6、12、24、48 h 内各 SEA 浓度组 Jurkat T 淋巴细胞增殖均呈现明显上升,48 h 达到高峰,且各 SEA 浓度组之间增殖差异有显著性( $P < 0.05$ ),随后细胞增殖开始下降。随时间推移,不同质量浓度组细胞增殖的差异缩小。质量浓度为 1 000 mg/L 组低于其他组( $P < 0.05$ ),尤其 48、72 h 均表现为细胞增殖活性最低。48 h,质量浓度为 10、1、0.1 mg/L 的 A 值相对高于其他质量浓度组。

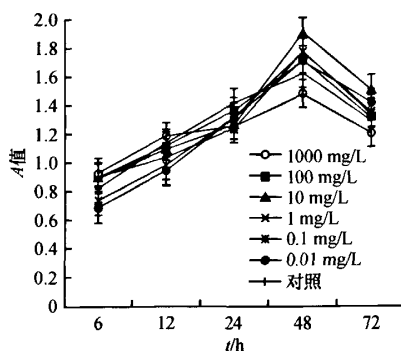
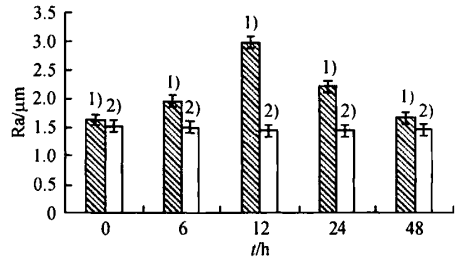


图 1 SEA 不同质量浓度及不同时间作用 Jurkat T 淋巴细胞的增殖情况

## 2.2 AFM 扫描成像及计算平均粗糙度 (average roughness, $R_a$ )

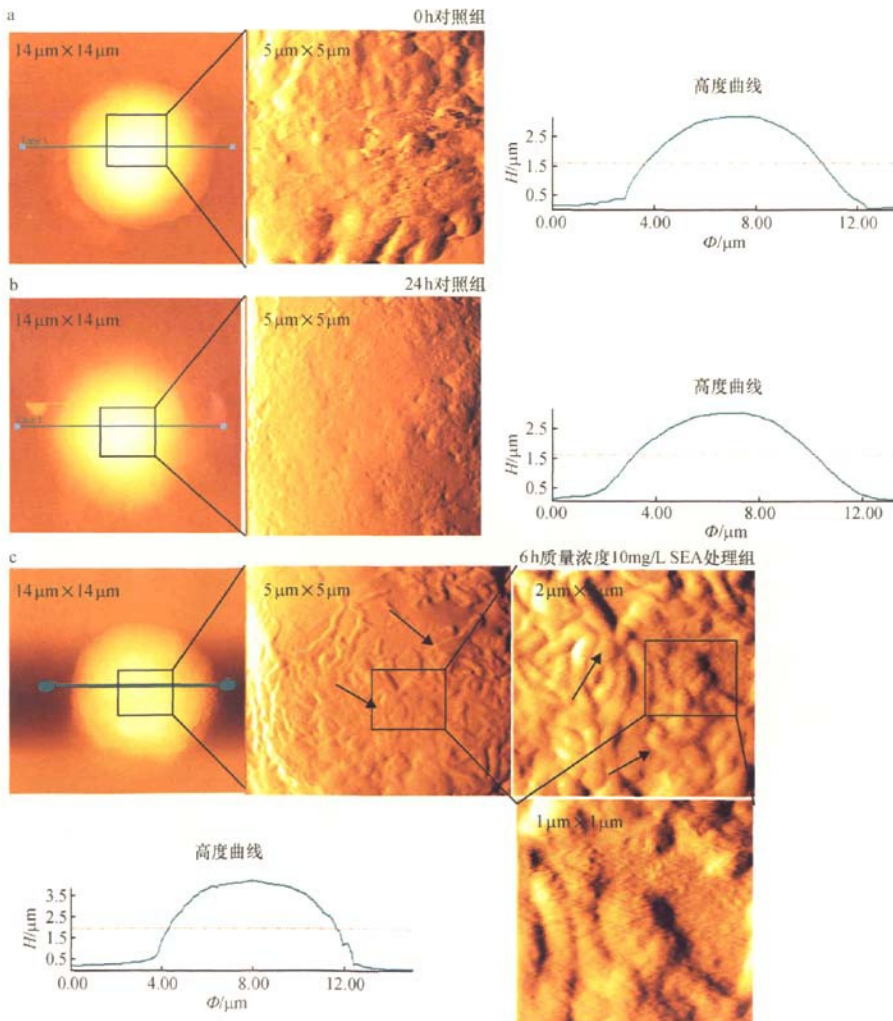
依据不同质量浓度 SEA 刺激细胞增殖测定结果,以质量浓度 10 mg/L 的 SEA 作用于 Jurkat T 淋巴细胞为例,利用 AFM 观察不同时间作用后的淋巴细胞拓扑形貌图 (topography) 和误差信号图 (error signal),分别对其表面超微结构进行了扫描分析,并计算细胞总体的平均粗糙度 (average roughness,  $R_a$ ) 观察细胞数超过 30 个。结果显示,SEA 刺激后的 Jurkat T 淋巴细胞整体形貌无较大变化,中间隆起、呈圆形;对照组细胞  $R_a$  值随时间推移变化不大。与对照组相比, $R_a$  随着时间的推移呈现先升高后降低的变化趋势,在 12 h  $R_a$  值最大,在 0、48 h  $R_a$  值较小。同一时间,SEA 刺激组与对照组, $R_a$  值差异

明显(图 2)。对照组细胞,在 24 h 拓扑形貌图(图 3a,b),颜色深浅表示细胞与基地高度的差异,颜色越浅,表示此位置在细胞上的位置越高,图呈现周围颜色深,中央浅,且深浅颜色过渡均匀的圆形,表明



1)SEA 处理组; 2) 对照组

图 2 质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  SEA 作用不同时间 T 细胞的  $R_a$  值变化



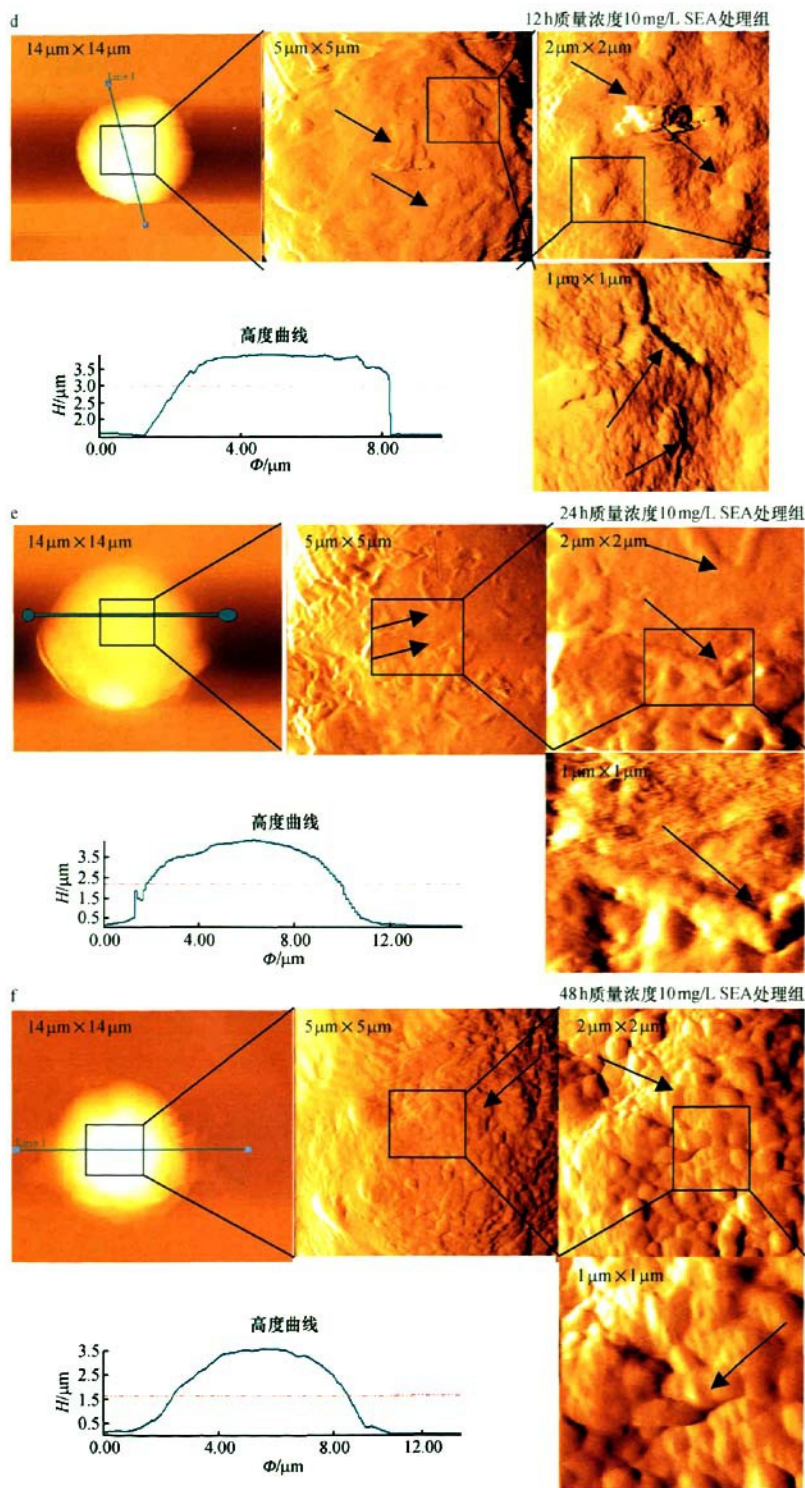


图 3 质量浓度为 10 mg/L SEA 组与对照组不同时间细胞拓扑形貌图 (topography)

细胞为较规则圆形,中间隆起、向四周均匀延伸,细胞表面总体较为平滑;局部扫描( $5\text{ }\mu\text{m}\times 5\text{ }\mu\text{m}$ )未见特异的超微结构。SEA 刺激6 h,细胞表面出现较密集蚓状条纹(图3c 箭头)。12 h,细胞 Ra 值最大,说明细胞表面单位面积上的颗粒含量较高以及超微结构较复杂;细胞表面出现许多斑片状结构,缩小扫描范围( $2\text{ }\mu\text{m}\times 2\text{ }\mu\text{m}$ ,  $1\text{ }\mu\text{m}\times 1\text{ }\mu\text{m}$ ),斑片状结构为块状堆积物构成;另外,细胞表面能看到“一”字形裂隙(图3d 箭头)。24 h,细胞表面呈现稀疏的条纹,相互有所交叉、连接(图3e)。48 h,细胞表面条纹状结构消失,代之球形颗粒,颗粒表面光滑、连接紧密,彼此之间过渡平滑,且有融合倾向(图3f)。

图3a、b 细胞呈现周围颜色深,中央浅圆形;图3c 细胞表面出现较为密集的蚓状条纹;图3d 细胞表面出现斑片状结构,“一”字形裂隙;图3e 细胞表面呈现稀疏且相互交叉、连接条纹;图3f 细胞表面条纹状结构消失代之球形颗粒。

### 3 讨论

SEA 作为超抗原,激活 T 细胞、促进 T 细胞增殖具有两个特点:SEA 不需经过抗原加工或蛋白酶解过程,可被直接呈递给 T 淋巴细胞,产生相应的免疫效应;SEA 的呈递不受 MHC 限制。SEA 对 TCR V $\beta$  的激动是第一信号,CD80 对 T 细胞 CD28 的激动是第二信号。另外,有研究显示 SEA 可直接激活 T 细胞,而不需要 MHC 二类分子<sup>[2-3]</sup>。本实验结果显示不同浓度的 SEA,在缺乏 MHC II 的情况下,能促进 Jurkat T 淋巴细胞增殖。随着 SEA 刺激时间延长,一定浓度范围的 SEA 促进作用逐渐加强;而质量浓度 1 000 mg/L 组在刺激后 48、72 h 表现出 Jurkat T 淋巴细胞增殖明显低于对照组,可能与高质量浓度 SEA 在免疫活化后又发生了免疫抑制有关。

淋巴细胞在经多克隆活化剂作用后,细胞形态和膜表面的超微结构都明显的改变;随着活化剂作用时间延长,细胞超微结构也有所改变,与细胞表面高分子物质、蛋白质、磷脂、糖等的迁移、聚合、表达有关;高分子物质状态改变可直接引起淋巴细胞本身结构、功能的改变,如 T 细胞表面脂筏聚集可以直接引起 T 细胞活化<sup>[4]</sup>。本实验结果显示 Jurkat T 细胞在经 SEA 作用 12 h,细胞表面高分子物质达到

最大动员。有报道,体外多克隆活化剂活化 T 细胞 CD69 表达增强,并呈一定的聚集趋势。推测经 SEA 作用 12 h 的细胞,表面出现的斑片状结构可能与 CD69 等表面分子依托脂筏聚集有关,细胞活化已经启动;随后,12、24、48 h 细胞增殖活性不断增强。SEA 刺激 48 h,细胞表面出现球形颗粒,类似外周单核细胞体外经佛波醇酯和离子霉素刺激 48 h 后表面密集分布大量球形颗粒现象<sup>[5]</sup>;而细胞 Ra 值减低,与以往报道有所不同。

由于不同刺激剂的作用特点,活化后的 T 细胞表面超微结构也呈现差异。SEA 在缺少 MHC 二类分子的情况下,可通过与 CD80/CD28 交联形成共刺激作用<sup>[2-3]</sup>;佛波醇酯是磷酸蛋白激酶 C (protein kinase, PKC) 的激活剂,而离子霉素则能使胞外钙离子内流,导致细胞内钙快速升高,在一定程度上模拟抗原提呈细胞刺激产生的信号传导,激活包括 IFN- $\gamma$  在内的细胞因子的表达<sup>[6-7]</sup>。本实验 Ra 值与有关报道的差异则进一步显示 SEA 自身的作用特点,有待探讨。

### [参考文献]

- [1] 邵世雱,林 晨.超抗原及其增强疫苗免疫效应的意义[J].癌症进展,2008,6(4):352-355.
- [2] 黄 杨,宋祖军,张秀敏,等.超抗原 SEA 对小鼠脾淋巴细胞活化和增殖的影响[J].中国急救医学,2007,27(3):299-231.
- [3] LIEWELYN M, COHEN J. Superantigens microbial agents that corrupt immunity [J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(3):156-162.
- [4] ANTHONY I M, ADLER J, PARMRYD I. Cold-induced coalescence of T-cell plasma membrane microdomains activates signaling pathways [J]. J Cell Sci, 2005, 118: 3141-3151.
- [5] 钟丽云,廖问陶,王小平,等. SNOM 结合量子点标记进行 T 淋巴细胞体外刺激活化的研究[J].电子显微学报,2006,25(5):404-401.
- [6] 邓晓芳,曾波航,胡伟民,等.超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素 A 对 T 淋巴细胞分化的作用[J].广州医学院学报,2006,34(3):6-8.
- [7] XU G, ZHU X, BO G B, et al. Involvement of CTLA-4 in T-cell anergy induced by staphylococcal enterotoxin A in vitro [J]. Mol Immunol, 2004, 4(1):1-8.

[责任编辑:朱颖嫒]