

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2006 )06-0412-05

## 抗人 P185<sup>erbB2</sup> scFv-Fc-IL-2 调变肿瘤细胞表面分子和激活免疫效应细胞

王 军<sup>1</sup>, 张 玲<sup>1</sup>, 顾洪涛<sup>1</sup>, 郭 宁<sup>2</sup>, 施 明<sup>2</sup>, 沈倍奋<sup>2</sup>, 毛海婷<sup>1</sup>, 李翠玲<sup>1</sup>, 温培娥<sup>1</sup>( 1. 山东省医学科学院基础医学研究所, 山东省医药卫生肿瘤免疫与中药免疫重点实验室, 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 济南 250062; 2. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850 )

[ 摘 要 ] **目的:** 将抗人 P185<sup>erbB2</sup> scFv-Fc-IL-2 融合蛋白( HFI )作用于人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞和人外周血单个核细胞( PBMC ), 通过体外实验阐明 HFI 调变肿瘤细胞表面分子和激活免疫效应细胞的抗肿瘤机制, 为 HFI 临床应用提供实验依据。**方法:** MTT 法检测细胞增殖、杀伤活性; 流式细胞术观察细胞表面分子的表达水平; 生物活性法检测细胞膜相关 TNF 杀伤活性; RT-PCR 检测细胞穿孔素表达水平。**结果:** HFI 处理后, 未观察到对 SKOV3 细胞增殖活性的直接抑制作用; SKOV3 细胞表面杀伤相关分子 ICAM-1、Fas 表达率分别由 24. 85%、0. 53% 增高到 85. 36%、59. 19% (  $P < 0. 01$  ); 人 PBMC 的增殖活性增强, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞分别由 24. 37%、6. 90% 提高到 38. 80%、13. 45% (  $P < 0. 01$  ); CD25、LFA-1、FasL 表达水平分别由 3. 99%、86. 52%、5. 02% 提高到 12. 96%、99. 06%、16. 19% (  $P < 0. 01$  ); 穿孔素基因、膜相关 TNF 均表达增强, LAK 样、NK 样杀伤活性在各靶靶比时均明显增高 (  $P < 0. 01$  )。**结论:** HFI 提高 SKOV3 细胞杀伤相关分子 ICAM-1、Fas 表达水平, 并且对人 PBMC 有明显的增殖活化作用, 通过激活 LFA-1/ICAM-1、Fas/FasL 途径提高杀伤介质穿孔素和膜相关 TNF 的释放, 增强 LAK 样、NK 样杀伤活性。

[ 关键词 ] erbB2; P185<sup>erbB2</sup> scFv-Fc-IL-2 融合蛋白; 卵巢癌; 免疫细胞因子; 杀伤活性

[ 中图分类号 ] R730. 5 [ 文献标识码 ] A

## Anti-P185<sup>erbB2</sup> scFv-Fc-IL-2 modulates tumor cell surface molecules and activates immune effector cells

WANG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>1</sup>, GU Hong-tao<sup>1</sup>, GUO Ning<sup>2</sup>, SHI Ming<sup>2</sup>, SHEN Bei-fen<sup>2</sup>, MAO Hai-ting<sup>2</sup>, LI Cui-ling<sup>2</sup>, WEN Pei-e<sup>2</sup>( 1. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science; Key Medical Laboratory for Tumor Immunology and Chinese Medicine Immunology of Shandong Province; Key Laboratory of Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Ji'nan 250062, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medicine, Beijing 100850, China )

[ Abstract ] **Objective:** To elucidate the mechanisms by which anti-P185<sup>erbB2</sup> scFv-Fc-IL-2 ( HFI ) modulates tumor surface molecules and activates immune effector cells *in vitro*. **Methods:** Ovarian Cancer Cell Line SKOV3 and human peripheral blood monocyte peripheral blood mononuclear cells ( PBMC ) were treated with HFI. MTT assay was used to detect the proliferation and cytotoxicity; flow cytometry assay was used to examine expression of surface molecules; bioassay was used to examine cytotoxicity of membrane-associated TNF; and perforin mRNA level was analyzed by RT-PCR assay. **Results:** HFI had no direct inhibitory effect on proliferation of SKOV3 cells. After HFI treatment, the expression levels of ICAM-1 and Fas on SKOV3 cells rose from 24. 85% and 0. 53% to 85. 36% and 59. 19% , respectively (  $P < 0. 01$  ). Besides, HFI significantly enhanced the proliferation of human PBMC. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells and CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T cells rose from 24. 37% and 6. 90% to 38. 80% and 13. 45% , respectively (  $P < 0. 01$  ). Expression levels of CD25, LFA-1, and FasL significantly increased from 3. 99% , 86. 52% , and 5. 02% to 12. 96% , 99. 06% , and 16. 19% , respectively (  $P < 0. 01$  ). Expression levels of Perforin and membrane-associated TNF were also up-regulated. Cytotoxicities of LAK and NK were both improved (  $P < 0. 01$  ). **Conclusion:** HFI can enhance the expression of ICAM-1 and Fas in SKOV3

[ 基金项目 ] 山东省科技攻关基金资助项目( No. 2004GG2202149 )

[ 作者简介 ] 王 军( 1974- ), 男, 山东省济南市人, 硕士在读, 主要从事抗肿瘤免疫方面研究

[ 通讯作者 ] 张 玲, E-mail: zhlnln@tom.com

cells and has obvious activating effect on PBMC. HFI can up-regulate the expression level of LFA-1/ ICAM-1, Fas/ FasL, promote the release of TNF and perforin, and improve LAK and NK cytotoxicity.

[ **Key words** ] erbB2; P185<sup>erbB2</sup>scFv-Fc-IL-2 fusion protein; ovarian cancer; immunocytokine; cytotoxicity

[ Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 412-416 ]

erbB2 属酪氨酸激酶受体家族成员之一, 不适当活化与多种肿瘤的发生发展有密切关系。在乳腺癌、卵巢癌、胃癌等多种恶性肿瘤中, 25% ~ 35% 的患者有 *erbB2* 基因过表达的现象, 表现为肿瘤侵袭性增强、患者预后差<sup>[1]</sup>。erbB2 是肿瘤生物治疗的靶点, 针对 erbB2 胞外区的单抗可有效抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[2]</sup>。

重组单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 是在免疫球蛋白 VH 和 VL 之间插入一定长度的氨基酸残基 Linker 连接而成, 它是抗体的最小功能单位, 与亲代抗体相比, scFv 对实体肿瘤穿透性强, 备受关注<sup>[3]</sup>。然而 scFv 有抗原亲和力不高、半衰期短、容易被机体清除、难以达到有效治疗浓度等缺点。本课题组曾制备了由抗 erbB2scFv、人 IgG1 的 Fc 段、IL-2 三部分组成的抗人 erbB2scFv-Fc-IL-2 融合蛋白 (HFI), 经鉴定该融合蛋白相对分子质量为 66 000, 仅是完整抗 erbB2 单克隆抗体的三分之一, 能与肿瘤细胞 erbB2 受体胞外区特异结合, 并且具有 IL-2 的生物学活性; 其携带的 IL-2 在肿瘤微环境中激活免疫效应细胞, 可更好地发挥抗肿瘤作用<sup>[4]</sup>。本研究将 HFI 作用于人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞 (高表达 erbB2 受体) 和人外周血单个核细胞 (PBMC), 探讨 HFI 激活免疫效应细胞的抗肿瘤机制, 为临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人卵巢癌细胞株 SKOV3、人红白血病细胞株 K562、TNF 敏感靶细胞小鼠成纤维细胞 WEHI164.13 均由本实验室常规培养。

### 1.2 主要试剂

HFI 由本课题组研制<sup>[4]</sup>, Herceptin 由军事医学科学院基础医学研究所分子免疫重点实验室惠赠。RPMI 1640、胰蛋白酶为 Gibco 产品, MTT 系 Promega 公司产品, rhIL-2 系威海安捷医药生物技术有限公司产品, FITC 标记的抗人 LFA-1 系 eBioscience 公司产品, FITC 标记的抗 ICAM-1 单抗系 Santa Cruz 公司产品, 抗 Fas 单抗、抗 FasL 单抗、FITC 标记的羊抗鼠 IgG 单抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 荧光标记的抗 CD 分子单抗系 Immunotech 公司产品。RT-PCR 试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司, 穿孔素基因<sup>[5]</sup>上游引物 5'-TGTATGATGGCTGGGG-3', 下游引物

5'-CCTGTGGTAAGCATGCT-3', 扩增基因片段长度 523 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCG-3', 下游引物 5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGC-3', 扩增基因片段长度 816 bp, 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 流式细胞术观察 HFI 处理后 SKOV3 细胞表面分子 ICAM-1、Fas 表达变化<sup>[6]</sup>

取对数生长期的 SKOV3 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调细胞密度至  $5 \times 10^4$ /ml, 接种于 6 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育过夜。加入 HFI, 终质量浓度为 2  $\mu$ g/ml, 对照组加 1640 培养液, 继续培养 120 h。ICAM-1 检测加入 FITC 标记抗体; Fas 检测加入抗 Fas 单抗和 FITC 标记的二抗, 并设同型对照, 分别作用后上机检测。

### 1.4 MTT 法检测 HFI 对人 PBMC 的激活增殖作用<sup>[7]</sup>

常规制备人外周血单个核细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调细胞密度至  $2 \times 10^6$ /ml, 加入 96 孔板。IL-2 组加入 rhIL-2, 终质量浓度 1 000 U/ml。HFI 实验组和 Herceptin 组分别加入 HFI 和 Herceptin, 终质量浓度均为 400 ng/ml。另设对照组、调零孔。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 分别培养 3、4、5 d 后, 酶标仪检测 *D* 值。

### 1.5 流式细胞术观察 HFI 活化的人 PBMC 表型的变化<sup>[6]</sup>

收集新鲜人 PBMC 和 HFI 400 ng/ml 活化 5 d 的 PBMC, 分别加入荧光标记的抗 CD3、CD8、CD25、CD16、CD56、LFA-1、FasL 抗体, 作用后上机检测。

### 1.6 生物活性法观察 HFI 活化的人 PBMC 膜相关 TNF 杀伤活性<sup>[8]</sup>

取 HFI 活化 5 d 的 PBMC, 调细胞密度至  $4 \times 10^6$ /ml, 加入 96 孔板。用含 1% 多聚甲醛的 1640 溶液固定, 按效靶比 40:1 加入靶细胞 WEHI164.13, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h。同时设新鲜 PBMC 和靶细胞对照组, 以 K562 细胞为阴性对照。MTT 法检测细胞膜相关 TNF 杀伤活性, 并按下式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = (1 - \text{实验孔 } D \text{ 值} / \text{靶细胞 } D \text{ 值}) \times 100\%$$

### 1.7 RT-PCR 法观察 HFI 活化的人 PBMC 杀伤相关介质穿孔素的表达变化<sup>[9]</sup>

收集新鲜 PBMC 和 HFI 活化 5 d 的 PBMC, 按照 TRIZOL Rengent 说明, 提取总 RNA, 定量后进行 RT-

PCR。DNA 扩增产物以  $\beta$ -actin 基因作内参照,采用 Gel Dos 1000 凝胶分析仪扫描分析并相对定量。

1.8 MTT 法观察 HFI 活化的人 PBMC 的 LAK 样、NK 样杀伤作用<sup>[7]</sup>

取对数生长期的 SKOV3 细胞和 K562 细胞,分别调细胞密度至  $5 \times 10^4$ /ml,为 LAK 样杀伤和 NK 样杀伤靶细胞,并将以上两种靶细胞分别加入 96 孔板。收集新鲜 PBMC, HFI 活化 PBMC, IL-2 活化 PBMC,按效靶比 5:1、10:1、20:1、40:1 调细胞密度,分别加入靶细胞板中。同时设靶细胞对照、各浓度新鲜和活化效应细胞对照。37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。酶标仪检测 D 值,并按下式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = [1 - (\text{实验孔 } D \text{ 值} - \text{效应细胞对照孔 } D \text{ 值}) / \text{靶细胞对照孔 } D \text{ 值}] \times 100\%$$

1.9 统计学处理

采用 SPSS12 统计软件包进行  $\chi^2$  检验、t 检验。

2 结果

2.1 HFI 处理后 SKOV3 细胞表面分子 ICAM-1、Fas 表达的变化

SKOV3 细胞经 HFI 处理 5 d, ICAM-1、Fas 表达水平分别从 24.85%、0.53% 增高至 85.36%、59.19% ( $\chi^2$  检验,  $P < 0.01, n = 3$ )。

2.2 HFI 对人 PBMC 的激活增殖作用

如图 1 所示, HFI 组 PBMC 增殖活性在 96、120 h 后较对照组明显增高 ( $P < 0.01$ ), 与 IL-2 组相似, Herceptin 无激活作用。

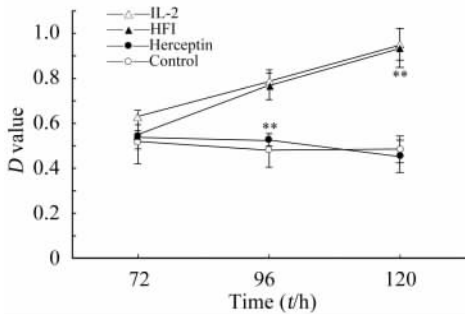


图 1 HFI 对人 PBMC 的激活增殖作用

Fig. 1 Effect of HFI on human PBMC proliferation activity

\*\*  $P < 0.01$  vs control,  $n = 3$

2.3 HFI 活化的人 PBMC 表型的变化

人 PBMC 经 HFI 活化后, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup> T 细胞、CD3-16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> NK 细胞在 PBMC 中所占比例分别由 24.37%、6.90% 增加到 38.80%、13.45%。CD25、LFA-1、FasL 的表达水平分别从 3.99%、86.52%、5.02% 上升到

12.96%、99.06%、16.19%, HFI 组与对照组相比均有非常显著的差异 ( $\chi^2$  检验,  $P < 0.01$ )。

2.4 HFI 活化的人 PBMC 膜相关 TNF 杀伤活性

HFI 活化的人 PBMC 膜相关 TNF 杀伤活性为 (37.48 ± 4.70)%, 明显高于对照组的 (12.20 ± 2.77)%, 有非常显著的差异 ( $P < 0.01, n = 3$ ), 无关对照组 K562 仅为 (1.47 ± 0.59)%。

2.5 HFI 活化的人 PBMC 杀伤相关介质穿孔素表达的变化

如图 2 示, 在 2、3 泳道中清晰可见位于 816 bp 处的  $\beta$ -actin 和 523 bp 处的穿孔素基因片段, 与对照组相比, HFI 活化 PBMC 的穿孔素基因表达水平显著增高, 相对定量值由 0.47 升高至 0.80。

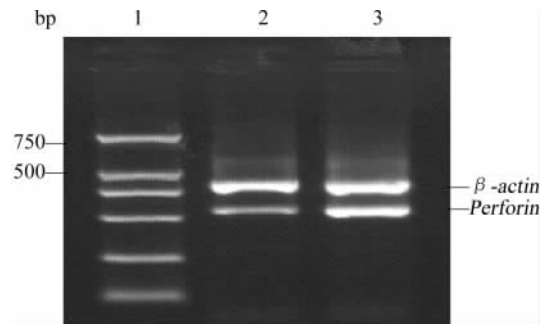


图 2 穿孔素基因的 RT-PCR 扩增片段电泳结果

Fig. 2 DNA electrophoresis analysis of perforin mRNA expression

1: Marker; 2: Control; 3: HFI

2.6 HFI 活化的人 PBMC 对 SKOV3 细胞的 LAK 样杀伤作用

如图 3 所示, 在效靶比分别为 5:1、10:1、20:1、40:1 时, 新鲜 PBMC 的杀伤率依次为 (6.58 ± 2.47)%、(10.33 ± 3.52)%、(13.36 ± 4.14)%、(21.29 ± 5.19)%。IL-2 活化 PBMC 的杀伤率依次为 (10.11 ± 3.55)%、(32.98 ± 5.34)%、(46.32 ± 7.18)%、(56.23 ± 6.59)%。HFI 活化 PBMC 的杀伤率依次为 (13.64 ± 3.89)%、(35.45 ± 6.17)%、(52.12 ± 5.96)%、(63.02 ± 6.81)%, 与 IL-2 组相似。HFI 活化 PBMC 较新鲜 PBMC 对 SKOV3 细胞各效靶比的杀伤率明显升高, 有非常显著的差异 ( $P < 0.01$ )。

2.7 HFI 活化的人 PBMC 对 K562 细胞的 NK 样杀伤作用

如图 4 所示, 在效靶比分别为 5:1、10:1、20:1、40:1 时, 新鲜 PBMC 的杀伤率依次是 (9.36 ± 3.45)%、(13.70 ± 3.89)%、(22.80 ± 3.68)%、(48.71 ± 8.12)%。IL-2 活化 PBMC 的杀伤率依次为 (18.51 ±

5.23)%、(28.17 ± 4.68)%、(53.19 ± 9.32)%、(83.54 ± 7.49)%。HFI 活化 PBMC 的杀伤率依次为 (19.43 ± 4.77)%、(32.45 ± 5.83)%、(55.22 ± 7.81)%、(87.90 ± 8.55)%，与 IL-2 组相似。经 HFI 活化 PBMC 较新鲜 PBMC 对 K562 细胞各效靶比的杀伤率明显升高，有非常显著的差异 ( $P < 0.01$ )。

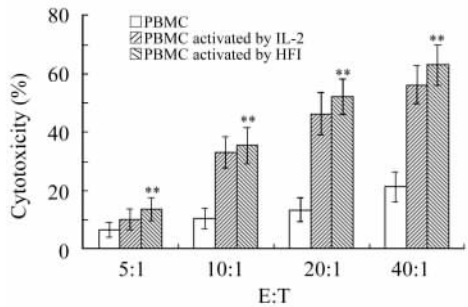


图3 HFI 刺激活化的人 PBMC 对 SKOV3 细胞的 LAK 样杀伤作用

Fig. 3 LAK-like cytotoxicity of human PBMC activated by HFI against SKOV3 cell

\*\*  $P < 0.01$  vs PBMC,  $n = 3$

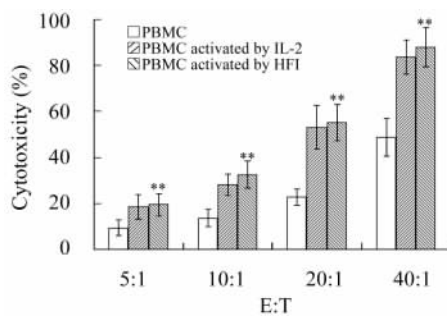


图4 HFI 刺激活化的人 PBMC 对 K562 细胞的 NK 样杀伤作用

Fig. 4 NK-like cytotoxicity against K562 cells of human PBMC activated by HFI

\*\*  $P < 0.01$  vs PBMC,  $n = 3$

### 3 讨论

国际上将肿瘤特异性抗体与细胞因子基因融合后的表达产物命名为免疫细胞因子(Immunocytokine)，利用其可与肿瘤抗原特异结合的靶向性，将细胞因子携带至肿瘤微环境中，促进免疫效应细胞增殖活化，增强抗肿瘤免疫应答<sup>[10]</sup>。该抗肿瘤治疗策略，降低了单独使用细胞因子带来的不良反应，疗效确切，具有广阔的应用前景<sup>[11]</sup>。

IL-2 具有多种生物学功能，在免疫调节中扮演了

重要的角色。IL-2 可刺激 CTL 细胞、NK 细胞、巨噬细胞等免疫效应细胞的增殖和分化，增强其细胞毒活性，诱导杀伤细胞产生 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子，刺激抗体的生成，提高 ADCC 作用等<sup>[12]</sup>。但是抗肿瘤治疗过程中，大剂量使用 IL-2 不但可引起严重的不良反应，如毛细血管渗漏综合征(capillary leak syndrome, CLS)，而且在肿瘤部位不能达到有效治疗浓度，限制了其在抗肿瘤治疗中的应用<sup>[13]</sup>。本研究中 HFI 是利用基因工程技术将 IL-2 和抗 erbB2 肿瘤特异性抗体基因融合后表达的免疫细胞因子，可将 IL-2 携带至肿瘤微环境中，促进机体产生抗肿瘤特异性免疫应答<sup>[14]</sup>。研究表明 IL-2 激活的 LAK 样细胞典型标志之一是 IL-2 受体表达升高。高亲和力的 IL-2 受体是由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  链组成的异源三聚体，其中  $\alpha$  链的相对分子质量为 55 000，也被称为 Tac 抗原或 CD25。T 细胞处于静息期时，CD25 表达较低，而刺激活化后的 T 细胞 CD25 表达明显上调，所以 CD25 是活化 T 淋巴细胞的标志，IL-2 与其受体的表达存在正反馈的关系<sup>[15]</sup>。本研究结果显示 HFI 具有较高的 IL-2 活性，经其刺激后的人 PBMC 增殖活性增强，活化的 LAK 样细胞中 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CD3-CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞数量明显增加，表面分子 CD25 表达明显增高。介导细胞黏附结合和免疫反应的表面分子 LFA-1、FasL 表达增高。因此表明 HFI 与同类抗体 Herceptin 作用机制<sup>[16-17]</sup>不同，具有激活免疫效应细胞的特点。

Fas 作为 I 型跨膜蛋白，属肿瘤坏死因子受体家族成员，广泛存在于多种类型的细胞膜上。但研究发现，细胞癌变过程中胞膜上 Fas 表达明显下调<sup>[18]</sup>，机体免疫系统通过 Fas/FasL 途径介导肿瘤细胞凋亡的能力大大下降，促进肿瘤细胞的免疫逃逸。肿瘤细胞上表达的 ICAM-1 又名 CD54，属于黏附受体免疫球蛋白超家族，是免疫细胞表达的淋巴细胞功能抗原 1(LFA-1)的配体，两者的结合在免疫反应中起重要作用<sup>[19]</sup>。本研究中，经 HFI 处理后的人卵巢癌 SKOV3 细胞表面 ICAM-1、Fas 的表达明显增高，表明 HFI 与肿瘤细胞表面 erbB2 受体结合后，可能通过 LFA-1/ICAM-1、FasL/Fas 途径提高肿瘤细胞对免疫效应细胞的杀伤敏感性。研究表明，活化的免疫效应细胞借助其表面的 LFA-1 与肿瘤细胞表面 ICAM-1 相互识别后紧密结合，释放穿孔素和颗粒酶导致靶细胞溶解；通过 Fas/FasL 途径诱导肿瘤细胞的凋亡。LAK 细胞除对肿瘤细胞有直接杀伤作用外，还通过分泌多种细胞因子起间接杀伤作用，其中 LAK 样细胞的膜相关 TNF 在杀伤肿瘤细胞的过程中起重要作用<sup>[20]</sup>。本研究结果显示 HFI 激活的 LAK 样细胞对人卵巢癌 SKOV3 细胞的 LAK 样杀伤活

性增强,对 K562 细胞的 NK 样杀伤活性增强,并呈随效靶比增高而增高效应。同时效应细胞杀伤介质穿孔素表达增高,膜相关 TNF 增加。因此表明 HFI 上调效/靶细胞表面分子 LFA-1/ICAM-1、FasL/Fas 的表达,有利于免疫效应细胞与肿瘤细胞紧密接触,FasL 与 Fas 相互识别,通过 Fas 触发肿瘤细胞内部的凋亡程序,使肿瘤细胞发生程序性细胞死亡。HFI 刺激活化的人 PBMC 穿孔素表达增高,膜相关 TNF 增加,可能也是其杀伤活性增强的机制之一。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Takehana T, Kunitomo K, Kono K, *et al.* Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: A comparative study of immunohistochemistry, fluorescence *in situ* hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay[ J ]. *Int J Cancer*, 2002, 98( 6 ): 833-837.
- [ 2 ] Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer[ J ]. *Clin Ther*, 1999, 21( 2 ): 309-318.
- [ 3 ] 郭建巍,蔡美英. 新型小分子抗体 scFv 多聚体与肿瘤靶向[ J ]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20( 2 ): 361-365.
- [ 4 ] Shi M, Xie Z, Feng J, *et al.* A recombinant anti-erbB2, scFv-Fc-IL-2 fusion protein retains antigen specificity and cytokine function[ J ]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25( 10 ): 815-819.
- [ 5 ] Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, *et al.* Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta[ J ]. *J Immunol*, 1991, 146( 10 ): 3289-3297.
- [ 6 ] 左连富. 流式细胞术样品制备技术[ M ]. 北京: 华夏出版社, 1991: 81-98.
- [ 7 ] 李晓燕, 张 玲, 王 芸, 等. 淫羊藿甙逆转转化生长因子  $\beta 2$  免疫抑制作用的抗肿瘤研究[ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7( 2 ): 127-130.
- [ 8 ] Peck R, Brockhaus M, Frey JR. Cell surface tumor necrosis factor ( TNF ) accounts for monocyte- and lymphocyte-mediated killing of TNF-resistant target cells[ J ]. *Cell Immunol*, 1989, 122( 1 ): 1-10.
- [ 9 ] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[ M ]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 157-159.
- [ 10 ] Liu Y, Zhang W, Cheung LH, *et al.* The antimelanoma immunocytokine scFvMEL/TNF shows reduced toxicity and potent antitumor activity against human tumor xenografts[ J ]. *Neoplasia*, 2006, 8( 5 ): 384-393.
- [ 11 ] Lode HN, Xiang R, Becker JC, *et al.* Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy[ J ]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80( 3 ): 277-292.
- [ 12 ] Gottlieb D. Cytokine manipulation of the immune response in the treatment of human acute leukaemia[ J ]. *Curr Pharm Des*, 2002; 8( 5 ): 419-431.
- [ 13 ] Gillies SD, Lan Y, Williams S, *et al.* An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma[ J ]. *Blood*, 2005, 105( 10 ): 3972-3978.
- [ 14 ] Lode HN, Xiang R, Dreier T, *et al.* Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy[ J ]. *Blood*, 1998, 91( 5 ): 1706-1715.
- [ 15 ] Morris JC, Waldmann TA. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment[ J ]. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59( Suppl 1 ): 109-114.
- [ 16 ] Alexandrescu DT, Vaillant J, Wiernik PH. Trastuzumab/docetaxel-induced nail dystrophy[ J ]. *Int J Dermatol*, 2006, 45( 11 ): 1334-1336.
- [ 17 ] Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy lessons learned and future directions[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9( 14 ): 5078-5084.
- [ 18 ] Costello RT, Gastaut JA, Olive D. Mechanisms of tumor escape from immunologic response[ J ]. *Rev Med Interne*, 1999, 20( 7 ): 579-588.
- [ 19 ] Xingyuan M, Wenyun Z, Tianwen W. Leukocyte function-associated antigen-1: Structure, function and application prospects[ J ]. *Protein Pept Lett*, 2006, 13( 4 ): 397-400.
- [ 20 ] Kimura K, Abe Y, Horiuchi A, *et al.* Membrane-associated lymphotoxin-expressing lymphokine-activated killer cells up-regulate intercellular adhesion molecule-1 expression on target tumor cells *in vitro*[ J ]. *Cell Immunol*, 1995, 164( 1 ): 119-125.
- [ 收稿日期 ] 2006 - 10 - 27 [ 修回日期 ] 2006 - 11 - 13  
[ 本文编辑 ] 韩 丹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

## 文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》,文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。( 1 ) 公历世纪、年代、年、月、日和时刻必须使用阿拉伯数字,如 20 世纪 90 年代、2006 - 02 - 15、5 h、30 min、30 s、14:36:08 等;年份不能用简称,“1998 年”不能写作“98 年”。( 2 ) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。( 3 ) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字,如 3 支、5 根等。( 4 ) 数值范围的表达要求:5 万至 10 万应写成 5 万 ~ 10 万,不能写成 5 ~ 10 万;  $3 \times 10^9$  至  $5 \times 10^9$  应写成  $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ , 或  $(3 \sim 5) \times 10^9$ , 不能写成  $3 \sim 5 \times 10^9$ ; 60% 至 70% 不能写成 60 ~ 70%, 应写成 60% ~ 70%;  $25.5 \pm 0.5$  mg 应写成  $(25.5 \pm 0.5)$  mg。( 5 ) 带单位的量值相乘时,每个数值后单位不能省略,如 4 mm  $\times$  2 mm  $\times$  3 mm, 不能写成 4  $\times$  2  $\times$  3 mm 或 4  $\times$  2  $\times$  3 mm<sup>3</sup>。(本刊编辑部)