

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.013

· 基础研究 ·

IL-15 基因修饰的 NK 细胞对原代卵巢癌细胞的杀伤作用

马杰¹, 赵卫东¹, 马娟², 金夏¹, 张丽娜¹, 丁玉兰¹, 周虎¹, 宣恒华¹, 桂云¹(1. 安徽医科大学 附属省立医院 妇产科, 安徽 合肥 230001; 2. 肥西县人民医院 妇产科, 安徽 肥西 231200)

[摘要] 目的: 探讨 γ 射线照射后的 *IL-15* 基因修饰的 NK 细胞(简称 NK-ustc 细胞)对原代卵巢癌细胞的体内外杀伤活性。方法: 分离卵巢癌患者腹水原代卵巢癌细胞。不同剂量 γ 射线(0、1、2、4、8、16 Gy)照射 NK-ustc 细胞,³H-TdR 掺入法检测照射后 NK-ustc 细胞的增殖情况,⁵¹Cr 释放法检测 NK-ustc 细胞对 K562 和原代卵巢癌细胞的杀伤活性。建立人裸鼠荷卵巢癌模型, 随机分为 NK-ustc 治疗组(模型鼠腹腔注射辐照后的 NK-ustc 细胞)和培养基对照组, 同时设空白对照组(正常裸鼠腹腔注射辐照后的 NK-ustc 细胞), 观察各组裸鼠体重、腹围及生存期。结果: 1、2、4、8、16 Gy 辐照后 NK-ustc 细胞的增殖率分别为(62.1 ± 9.8)%、(41.3 ± 8.7)%、(14.6 ± 4.1)%、(0.1 ± 0.03)% 和(0.2 ± 0.04)%。当效靶比为 10:1 时, 0、8 Gy 辐照后 NK-ustc 细胞对 K562 的杀伤率分别为(45.4 ± 8.9)% 和(43.1 ± 6.4)%, 对原代卵巢癌细胞的杀伤率分别为(54.6 ± 6.4)% 和(48.3 ± 5.8)%, 说明辐照不影响 NK-ustc 细胞的杀伤活性($P > 0.05$)。辐照后 NK-ustc 细胞治疗组荷瘤小鼠的中位生存期为 75 d, 对照组为 39 d ($P < 0.05$), 空白对照组小鼠全部存活。结论: γ 射线照射可有效抑制 NK-ustc 细胞增殖, 但保留该细胞对原代卵巢癌细胞的杀伤活性。

[关键词] 自然杀伤细胞; *IL-15* 基因; 卵巢癌; 免疫治疗

[中图分类号] R737.31; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0409-05

Cytotoxic activity of *IL-15* gene modified-NK cells against primary ovarian cancer cells

MA Jie¹, ZHAO Wei-dong¹, MA Juan², JIN Xia¹, ZHANG Li-na¹, DING Yu-lan¹, ZHOU Hu¹, XUAN Heng-hua¹, GUI Yun¹(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, People's Hospital of Feixi, Feixi 231200, Anhui, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the cytotoxic activity of *IL-15* gene modified-NK cells (NK-ustc cells) against primary ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Primary ovarian cancer cells were isolated from ascites of patients. NK-ustc cells were irradiated with different dosages of gamma ray (0, 1, 2, 4, 8, 16 Gy), and the proliferation of irradiated NK-ustc cells were detected by ³H-TdR incorporation assay. Cytotoxic activities of NK-ustc cells against K562 and primary ovarian cancer cells were measured by ⁵¹Cr release assay. The tumor-bearing mouse model was established using primary ovarian cancer cells and randomly divided into NK-ustc treatment group (intraperitoneal injection of 8 Gy irradiated NK-ustc cells) and medium control group; moreover, blank control group (8 Gy irradiated NK-ustc cells were injected into nude mice) was also included in the present study. The body weight, abdomen circumference and survival time of nude mice were monitored. **Results:** After 1, 2, 4, 8 and 16 Gy irradiation, the proliferation rates of NK-ustc cells were (62.1 ± 9.8)%, (41.3 ± 8.7)%, (14.6 ± 4.1)%, (0.1 ± 0.03)% and (0.2 ± 0.04)%, respectively. The cytotoxic rates of 0 and 8 Gy irradiated-NK-ustc cells against K562 cells were (45.4 ± 8.9)% and (43.1 ± 6.4)% when the effector to target ratio was 10:1, and those against ovarian cancer cells were (54.6 ± 6.4)% and (48.3 ± 5.8)%, respectively. Thus, irradiation had no influence on cytotoxicity of NK-ustc cells ($P > 0.05$). The median survival time of

[基金项目] 安徽省科技攻关重大专项资助项目(No. 08010302101)。Project supported by the Major Science and Technology Program of Anhui Province (No. 08010302101)

[作者简介] 马杰(1977-),女,安徽省合肥市人,硕士,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail: mj77927@163.com

[通信作者] 赵卫东(ZHAO Wei-dong, corresponding author), E-mail: victorzhao@163.com

irradiated-NK-ustc cells treated mice was 75 d, and that of control group was 39 d ($P < 0.05$). All the mice in the blank control group survived. **Conclusion:** Gamma ray irradiation can effectively inhibit proliferation of NK-ustc cells, but retain their cytotoxic activities against primary ovarian cancer cells.

[**Key words**] natural killer cell; *IL-15* gene; ovarian carcinoma; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 409-413]

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病隐匿,缺乏有效的筛查手段,70%以上患者确诊时已为晚期。尽管近年来手术方式的有所改进及新的化疗药物不断出现,但卵巢癌患者的5年生存率仍徘徊在20%~30%,多数患者死于复发和转移^[1]。因此,寻找新的治疗方法具有重要的意义。自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)能杀伤多种肿瘤细胞,不仅可以用于肿瘤的过继免疫治疗^[2],还可以作为手术、放疗和化疗后的辅助疗法,以清除微小残留病灶、降低肿瘤复发^[3]。NK细胞可被一些细胞因子激活,其中IL-15的作用尤为重要^[4]。应用*IL-15*基因修饰NK细胞系可以增强NK细胞的扩增效率及杀伤活性^[5]。本研究采用*IL-15*基因修饰的自然杀伤细胞系(简称NK-ustc细胞)^[6],通过体内外实验观察NK-ustc细胞对原代卵巢癌细胞的杀伤活性,为卵巢癌的过继性细胞免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠和主要试剂

BALB/c裸鼠,鼠龄3~4周,雌性,购自南京大学模式动物研究所,许可证编号:SCXK(苏)2005-0002,饲养于中国科学技术大学SPF级动物实验室。NK-ustc细胞由中国科学技术大学免疫学研究所提供^[6],人红白血病细胞系K562细胞为本室冻存。NK-ustc细胞的培养基为 α -MEM培养基(含10%胎牛血清、100 U/ml的rhIL-2),K562细胞培养基为RPMI 1640培养基(含10%小牛血清),置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。

RPMI 1640培养基、 α -MEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司,重组人白细胞介素2(rhIL-2)购自长春生物制品研究所,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司,³H-TdR购自北京原子高科核技术公司。 γ 射线辐照仪BIOBEAM 2000购自德国贝欧宝公司。

4例Ⅲc期卵巢癌患者来自安徽省立医院妇科住院接受手术治疗患者,术后病理诊断为浆液性囊腺癌,患者中位年龄43岁(29~56岁),术前均未给予任何治疗。术中取腹水200~300 ml,参考文献[7]使用Ficoll不连续密度梯度离心法分离卵巢癌

患者腹水中的原代细胞,4 h内分离肿瘤细胞,培养于含10%小牛血清的RPMI 1640培养基中,反复贴壁法分离纯化原代卵巢癌细胞。

1.2 ³H-TdR掺入法检测照射后NK-ustc细胞的增殖

使用 γ 射线辐照仪对NK-ustc细胞进行照射,剂量分别为1、2、4、8、16 Gy,剂量率为1 Gy/min。按照参考文献[8]的方法,检测经不同剂量照射48 h后NK-ustc细胞的增殖,以³H-TdR掺入量占对照组掺入量的百分比来表示NK-ustc细胞的增殖活性。

1.3 ⁵¹Cr释放法检测照射后的NK-ustc细胞的杀伤活性

参考文献[9]中的检测方法进行,以K562和原代卵巢癌细胞为靶细胞,按效靶比分别为1:1、5:1、10:1和20:1加入相应数量的NK-ustc效应细胞,37℃孵育4 h后,吸100 μ l上清于检测管中,上机检测。每次实验要求自然释放组cpm值小于最大释放组cpm值的25%。细胞杀伤活性(%)=(实验组cpm值-自然释放组cpm)/(最大释放组cpm值-自然释放组cpm)×100%。

1.4 荷卵巢癌裸鼠移植瘤模型的建立

参考文献[10]建立原代卵巢癌细胞裸鼠移植瘤模型。收集对数生长期的原代卵巢癌细胞,调整细胞密度为 5.0×10^7 /ml,腹腔注入200 μ l/只,SPF环境中饲养,接种后裸鼠出现腹围增加明显、腹部触及瘤体、活动减少、消瘦等症状即判断为成瘤。移植瘤和腹水应用H-E染色法行病理学检查,其病理组织学形态与人卵巢浆液性囊腺癌相似。

1.5 辐照后NK-ustc细胞对荷卵巢癌裸鼠的治疗实验

将荷瘤裸鼠随机分为治疗组(腹腔注射8 Gy辐照后的NK-ustc细胞)和对照组(腹腔注射无血清 α -MEM培养基),每组10只。治疗组剂量按下列公式计算: 2×10^9 个/60 kg×小鼠体质量(kg)×10倍,每周连续3天腹腔注入,共3周。空白对照组为正常裸鼠腹腔直接注射辐照后的NK-ustc细胞,以观察照射后的细胞是否存在致瘤性。每周2次观察小鼠精神状态、活动变化,测量体重、腹围。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0软件进行

统计学处理,小鼠生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代卵巢癌细胞的分离

应用反复贴壁法从腹水中成功分离 4 例卵巢癌患者的原代卵巢癌细胞,分离获得的肿瘤细胞总数为 $(0.6 \sim 1.6) \times 10^6/\text{ml}$ 。

2.2 不同剂量 γ 射线对 NK-ustc 细胞增殖的影响

不同剂量的 γ 射线 (0、1、2、4、8、16 Gy) 照射 NK-ustc 细胞,培养 48 h,用 ^3H -TdR 掺入法检测照射后 NK-ustc 细胞的增殖。结果(图 1)表明,随着放射剂量增加,NK-ustc 细胞的增殖活性逐渐降低。与 0 Gy 组相比,1、2 Gy 剂量组 NK-ustc 细胞增殖率分别为 $(62.1 \pm 9.8)\%$ 、 $(41.3 \pm 8.7)\%$;4、8、16 Gy 组 NK-ustc 细胞的平均增殖率分别为 $(14.6 \pm 4.1)\%$ 、 $(0.1 \pm 0.03)\%$ 和 $(0.2 \pm 0.04)\%$,由此可见,与 1、2、4 Gy 相比,8 Gy 的照射剂量对 NK-ustc 细胞增殖的抑制作用最明显 ($P < 0.01$),而与 16 Gy 无明显差异 ($P > 0.05$)。

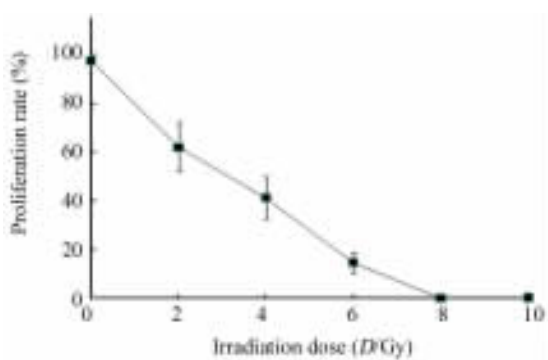


图 1 不同剂量 γ 射线照射后 NK-ustc 细胞的增殖

Fig. 1 Proliferation of NK-ustc cells after γ -ray irradiation at different dosages

2.3 γ 射线照射后的 NK-ustc 细胞对靶细胞的杀伤作用

8 Gy 照射后的 NK-ustc 细胞继续培养 24 h, ^{51}Cr 释放法检测不同效靶比时,NK-ustc 细胞对 K562 和原代卵巢癌细胞的杀伤活性。结果(图 2)表明,照射后的 NK-ustc 细胞对 K562 和原代卵巢癌细胞仍保持较高的杀伤活性。当效靶比为 10:1 时,0、8 Gy 辐照后 NK-ustc 细胞对 K562 的杀伤率分别为 $(45.4 \pm 8.9)\%$ 和 $(43.1 \pm 6.4)\%$,对原代卵巢癌细胞的杀伤率分别为 $(54.6 \pm 6.4)\%$ 和 $(48.3 \pm 5.$

8)% ,0 Gy 组和 8 Gy 组相比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),说明 8 Gy 照射不影响 NK-ustc 细胞的杀伤活性。

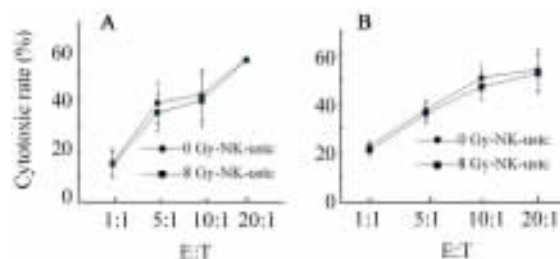


图 2 照射后的 NK-ustc 细胞对 K562 (A) 和原代卵巢癌 (B) 细胞的杀伤

Fig. 2 Cytotoxicity of irradiated NK-ust cells against K562 (A) and tumor cells (B)

2.4 荷卵巢癌裸鼠模型的成功建立

腹腔注射原代卵巢癌细胞 (1.0×10^7 个/只),注射后 19 ~ 40 d,裸鼠腹隆,可触及实体肿瘤组织,脱臼处死裸鼠后,打开腹腔,可见转移的实体肿瘤组织,取瘤组织及腹水行病理学检查,H-E 染色,镜下见癌细胞核大、深染,可有核分裂象,核仁明显,部分区域见凝固性坏死。组织病理学形态与人卵巢浆液性囊腺癌相符(图 3),证实成功建立荷人卵巢癌裸鼠瘤模型。

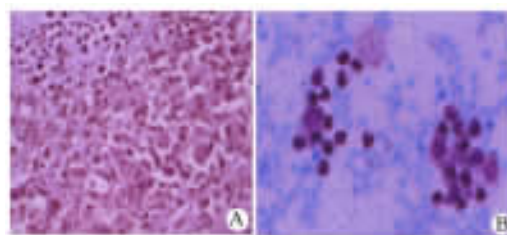


图 3 移植瘤组织 (A) 和腹水细胞 (B) 的病理检测 (H-E, $\times 200$)

Fig. 3 Pathology examination of tumor tissues (A) and ascites cells (B) (H-E, $\times 200$)

2.5 NK-ustc 细胞治疗延长荷瘤小鼠的生存时间

经 NK-ustc 细胞治疗后,治疗组裸鼠较对照组裸鼠精神好转,活动增多,体质量无明显改变,腹围低于对照组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 4);观察到 90 d,治疗组中位生存期为 75 d,对照组裸鼠第 60 天全部死亡,中位生存期为 39 d,两组相比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 5)。辐照后的 NK-ustc 细胞直接注射裸鼠腹腔后(空白对照组)小鼠全

部存活, 生长状态良好, 说明照射后的 NK-ustc 细胞对裸鼠无致瘤性。结果表明, NK-ustc 细胞治疗可延长荷瘤鼠的生存期。

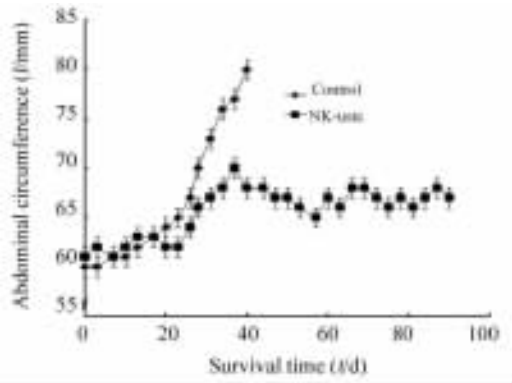


图 4 NK-ustc 细胞治疗组小鼠的腹围
Fig. 4 Abdominal circumference of mice in NK-ustc cell treatment group

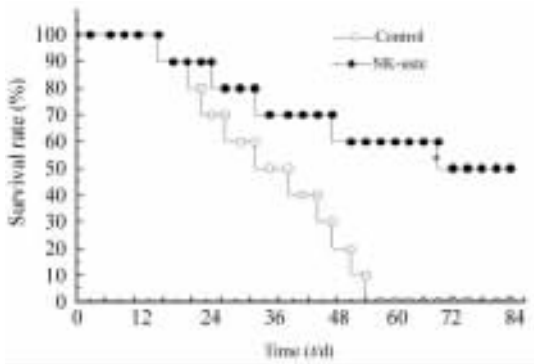


图 5 NK-ustc 细胞治疗延长荷瘤小鼠生存时间
Fig. 5 NK-ustc cell treatment prolonged survival of tumor-bearing mice

3 讨论

卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤, 因早期诊断困难, 70% ~ 80% 的患者确诊时已为晚期, 治疗后达到临床完全缓解的患者最终仍然有 70% 复发^[11]。近年来, 随着手术方法的改进及新化疗药物的应用^[12-13], 卵巢癌的预后有所改善, 但 5 年生存率仍徘徊在 25% ~ 30%, 因此须探寻新的治疗方法。

NK 细胞作为机体天然免疫的主要承担者, 能直接杀伤肿瘤细胞, 调节和增强机体的免疫功能, NK 细胞的过继性免疫治疗是肿瘤免疫治疗的新方法^[14]。研究^[15-16]报道, NK 细胞对于白血病、淋巴瘤、卵巢癌、胃癌、大肠癌及肾细胞癌等肿瘤细胞均表现出较高的杀伤活性。但 NK 细胞仅占外周血单

个核细胞的 5% ~ 10%, 体外扩增、培养技术尚不完善, 限制了其在临床上的应用。因此, 构建 NK 细胞系成为获得 NK 细胞的主要方法。

体内外研究结果表明, NK 细胞系能有效杀伤卵巢癌细胞^[17]; Arai 等将 NK 细胞系应用于肾细胞癌和恶性黑色素瘤患者, 结果表明, NK 细胞疗法是安全有效的^[18]。研究^[19]报道, 在体外应用基因修饰技术可以增强 NK 细胞的抗肿瘤效应, 为 NK 细胞免疫治疗开辟了新途径。因 IL-15 可通过上调 NK 细胞活化性受体的表达增强 NK 细胞的杀伤活性^[20], 本研究采用的 NK-ustc 细胞为中国科学技术大学免疫学研究所构建的一种 IL-15 基因修饰的 NK 细胞系, 适合体外长期培养, 对多种肿瘤细胞具有杀伤能力^[6]。由于 NK-ustc 细胞系具有永生性, 直接输注患者体内有成瘤的潜在危险。因此, 本研究参照 NK-92 细胞照射的方法对 NK-ustc 细胞进行放射线照射^[21], 抑制其增殖活性, 使其丧失致瘤性, 并保留了对肿瘤细胞的杀伤作用。前期的研究^[22]表明, 辐照后的 NK-ustc 细胞对卵巢癌细胞系 HO8910 具有较高的杀伤活性, 给予荷人卵巢癌 HO-8910 细胞腹水瘤裸鼠过继转输治疗后, 可明显提高荷瘤鼠的生存期。本研究进一步研究了辐照后的 NK-ustc 细胞对原代卵巢癌细胞的体内外杀伤作用。

在原代培养取材时选取卵巢癌患者的腹水, 由于转移组织中的肿瘤细胞已经过生长优势的选择, 因此腹水中肿瘤细胞更易生长。本研究成功分离了 4 例卵巢癌患者腹水中的原代肿瘤细胞, 细胞总数为 $(0.6 \sim 1.6) \times 10^6 / \text{ml}$, 培养鉴定后一部分用于体外杀伤实验, 一部分用于裸鼠腹水瘤模型的建立。

体外研究的结果显示, NK-ustc 细胞的增殖率随着 γ 照射剂量的增加而降低, 8 Gy 的照射能明显抑制 NK-ustc 细胞的增殖, 从而降低了其潜在成瘤的可能性。为进一步检测照射是否影响 NK-ustc 细胞的杀伤活性, 本研究选择了 K562 细胞株和原代卵巢癌细胞作为 NK-ustc 细胞的靶细胞。K562 为人类红白血病细胞系, 是经典的测定人 NK 细胞活性的靶细胞^[23], 结果表明, 照射后的 NK-ustc 细胞对 K562 及原代卵巢癌细胞的杀伤活性与未照射的 NK-ustc 细胞相比差异无统计学意义。说明经合适剂量放射线照射, 可以抑制 NK-ustc 细胞的增殖活性和成瘤性, 且同时保持了对肿瘤靶细胞较高的杀伤活性。

体内实验发现, 在观察期内对照组荷瘤小鼠全部死亡, 而 NK-ustc 细胞治疗组仍有 50% 荷瘤小鼠存活, 治疗组小鼠的中位生存期明显延长, 说明 NK-

ustc 治疗可延长荷瘤小鼠的生存期。两组小鼠的体质量和腹围改变不明显,考虑可能是受小鼠生长和测量误差影响,因此对于疗效的评估无明显意义。将 8 Gy 辐照后的 NK-ustc 细胞直接注射入裸鼠腹腔,观察到 90 d 时裸鼠全部存活,说明在裸鼠体内输注射后的 NK-ustc 细胞是安全的,无成瘤性,且对正常的组织没有杀伤作用。

本研究表明,8 Gy 照射后的 NK-ustc 细胞对于人卵巢癌荷瘤裸鼠的治疗是安全、有效的,为卵巢癌患者术后复发或转移、术后耐药及晚期卵巢癌患者的治疗提供了新的思路和方法。由于肿瘤患者个体免疫系统的差异,NK-ustc 细胞治疗的疗效最终还需要临床试验进一步验证。

[参 考 文 献]

- [1] Sathapong D, Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, et al. Chemotherapy in patients with recurrent or refractory epithelial ovarian cancer [J]. *J Med Assoc Thai*, 2007, 90 (3): 411-419.
- [2] Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, et al. Natural killer cell-directed therapies: Moving from unexpected results to successful strategies [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9 (5): 486-494.
- [3] Malmberg KJ, Bryceson YT, Carlsten M, et al. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57 (10): 1541-1552.
- [4] Huntington ND, Legrand N, Alves NL, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2009, 206 (1): 25-34.
- [5] Jiang W, Zhang J, Tian Z. Functional characterization of interleukin-15 gene transduction into the human natural killer cell line NK-92 [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10 (3): 265-274.
- [6] Zhang J, Sun R, Wei H, et al. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: Implications for adoptive cellular immunotherapy [J]. *Haematologica*, 2004, 89 (3): 338-347.
- [7] Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110 (10): 1515-1523.
- [8] Gong JH, Maki G, Klingemann HC. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells [J]. *Leukemia*, 1994, 8 (4): 652-658.
- [9] Friberg DD, Bryant JL, Whiteside TL. Measurements of natural killer (NK) activity and NK-cell quantification [J]. *Methods*, 1996, 9 (2): 316-326.
- [10] Hamilton TC, Young RC, Louie KG, et al. Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice [J]. *Cancer Res*, 1984, 44 (11): 5286-5290.
- [11] Le T, Williams K, Senterman M, et al. Histopathologic assessment of chemotherapy effects in epithelial ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and delayed primary surgical debulking [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106 (1): 160-163.
- [12] González Martín A. Safety profile of trabectedin in combination with liposomal pegylated doxorubicin in relapsed ovarian carcinoma: Considerations for optimal management [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21 (10 Suppl 1): S6-S8.
- [13] Zillhardt M, Park SM, Romero IL, et al. Foretinib (GSK1363089), an orally available multi-kinase inhibitor of c-Met and VEGFR-2, blocks proliferation, induces anoikis, and impairs ovarian cancer metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2011 [Epub ahead of print].
- [14] Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: Current insights and future prospects [J]. *J Intern Med*, 2009, 266 (2): 154-181.
- [15] Carlsten M, Malmberg KJ, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated lysis of freshly isolated human tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124 (4): 757-762.
- [16] Carlsten M, Björkström NK, Norell H, et al. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (3): 1317-1325.
- [17] 陈纲, 凌斌, 祝怀平, 等. 自然杀伤细胞系 NK-92 治疗卵巢癌的体外及动物实验研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40 (7): 476-479.
- [18] Arai S, Meagher R, Swearingen M, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: A phase I trial [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10 (6): 625-632.
- [19] Pegram HJ, Kershaw MH, Darcy PK. Genetic modification of natural killer cells for adoptive cellular immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2009, 1 (4): 623-630.
- [20] Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, et al. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59 (1): 73-79.
- [21] Tonn T, Becker S, Esser R, et al. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92 [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10 (4): 535-544.
- [22] 马娟, 费保珍, 程民, 等. 辐照后基因修饰自然杀伤细胞的特征及对卵巢癌细胞杀伤活性研究 [J]. *中国临床保健杂志*, 2010, 13 (3): 278-280.
- [23] 张建华, 田志刚. MTT 比色法测定细胞毒效应的应用进展 [J]. *国外医学: 肿瘤学分册*, 1997, 24 (4): 196-198.

[收稿日期] 2011-04-22

[修回日期] 2011-06-10

[本文编辑] 王莹