

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.017

· 短篇论著 ·

负载抗原的 DC 与 CIK 共培养对耐药乳腺癌细胞的杀伤作用

Effect of cytokine-induced killer cells co-cultured with dendritic cells pulsed with antigens on cytotoxicity against multidrug resistant breast cancer cells

岳玲玲,张连生,柴晔,曾鹏云,吴重阳,熊彬,刘璘(兰州大学第二医院血液科,甘肃兰州 730030)

[摘要] 目的:观察负载抗原的树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)对高表达 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的多药耐药(multidrug resistance, MDR)人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞的杀伤作用。**方法:**提取健康人外周血单个核细胞,常规诱导出 CIK 及 DC;制备 MCF-7/ADR 细胞冻融抗原后冲击 DC,并与 CIK 共培养作为实验组(冻融物 DC-CIK 组),未负载抗原的 DC 与 CIK 共培养作为对照组(DC-CIK 组),同时设单独培养的 CIK 组或 DC 组作为空白对照组。流式细胞术分析细胞的表型及 P-gp 表达,ELISA 法测定细胞上清中 IL-12、IFN- γ 水平,MTT 法检测对 MCF-7/ADR 及 MCF-7 细胞株的杀伤活性。**结果:**冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组细胞增殖活性均大于 CIK 组($P < 0.05$)。冻融物 DC-CIK 组对 MCF-7/ADR、MCF-7 细胞的杀伤活性在效靶比 10:1、20:1、40:1 时分别为(44.29 \pm 1.39)%、(58.24 \pm 3.52)%、(68.9 \pm 2.83)%和(33.51 \pm 2.18)%、(40.43 \pm 2.3)%、(44.62 \pm 1.19)% ,均高于 DC-CIK 组及 CIK 组($P < 0.05$);冻融物 DC-CIK 组对 MCF-7/ADR 耐药细胞株的杀伤活性高于非耐药细胞株 MCF7($P < 0.05$);而对于非耐药株 MCF-7 细胞的杀伤活性,冻融物 DC-CIK 组和 DC-CIK 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**DC 与 CIK 共培养细胞增殖活性和细胞毒活性均强于 CIK,经冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养可以显著提高对 MCF-7/ADR 耐药细胞株的杀伤活性。

[关键词] 细胞因子诱导的杀伤细胞;树突状细胞;多药耐药;P-糖蛋白

[中图分类号] R735.9; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0437-05

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知功能最强的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)是由多种细胞因子及 CD3 单抗等诱导产生的一群增殖能力较强、对多种肿瘤具有杀伤活性的免疫活性细胞。研究^[1]证明,CIK 和 DC 两者共培养后具有更强的增殖活性和细胞毒活性,已成为肿瘤细胞免疫治疗的重点。多药耐药(multidrug resistance, MDR)的发生是许多肿瘤化疗失败的主要原因,目前尚无有效的临床干预对策。研究^[2-3]已揭示,P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在肿瘤细胞中的过度表达是形成 MDR 的重要机制。有研究^[4]发现,免疫杀伤细胞对 MDR 肿瘤细胞具有一定的杀伤活性,故本实验欲将 CIK 细胞与负载耐药乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞冻融抗原的 DC 细胞共培养,观察其对 MCF-7/ADR 细胞杀伤活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI 1640 液购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所,重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF)

购自厦门特宝生物工程股份有限公司,干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、重组人肿瘤坏死因子- α (recombinant human tumor necrosis factor- α , rhTNF- α)、重组人白介素-2(recombinant human interleukin-2, rhIL-2)、重组人白介素-4(recombinant human interleukin-4, rhIL-4)、抗-CD3 单抗购自晶美生物公司,异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 CD80、CD83、HLA-DR、CD3、CD56、CD8 单抗、CD45RA 单抗购自 Bioscience 公司,藻红蛋白标记(phycoerythrin, PE)标记的 CD86、P-gp 单抗购自 Burlingme 公司。IL-12 及 IFN- γ ELISA 定量检测试剂盒购自上海裕平生物科技有限公司。FACS Calibur 流式细胞仪购自 Becton Dickinson 公司。耐药乳

[基金项目] 甘肃省技术与开发专项计划资助项目(No. 0709TCYA060)。Project supported by the Technology Research and Development of Special Project of Gansu Province (No. 0709TCYA060)

[作者简介] 岳玲玲(1970 -),女,甘肃省兰州市人,硕士,主治医师,主要从事血液肿瘤生物免疫治疗方面的研究。E-mail: yll8942344@163.com

[通信作者] 张连生(ZHANG Lian-sheng, corresponding author), E-mail: zls2170@yahoo.com

腺癌细胞株 MCF-7/ADR 及敏感株 MCF-7 购自兰州大学中心实验室。

1.2 细胞冻融抗原的制备

收集处于对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞, 生理盐水洗涤 3 次后收集细胞, 无菌蒸馏水稀释, 调整细胞密度至 1×10^8 /ml, 制成细胞悬液。放入液氮中, 5 min 后取出迅速放入 37 °C 水浴箱内, 待其完全融化后, 再次放入液氮中, 如此反复 3 次, $3\ 000 \times g$, 离心 10 min 后取上清制成的 MCF-7/ADR 细胞冻融抗原, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4 °C 保存备用。

1.3 DC 和 CIK 的诱导培养

采集健康志愿者骨髓 4 ~ 6 ml, 常规分离出骨髓单个核细胞, 培养 4 h 后收集贴壁细胞(另收集非贴壁细胞备用)。调整细胞密度, 加入终活性浓度为 500 U/ml 的 rhIL-4, 1 000 U/ml 的 rhGM-CSF, 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 孵箱中培养, 隔日半量换液并分别补入上述细胞因子, 培养第 4 天时将细胞分为 2 组: 一组添加 MCF-7/ADR 冻融物 50 μl ^[5], 另一组加 RPMI 1640 培养液 50 μl , 培养至第 6 天, 两组分别加入 TNF- α 100 ng/ml, 并继续培养。收集非贴壁细胞, 第 0 天加入 IFN- γ 1 000 U/ml, 培养 24 h, 加入抗 CD3 单抗 50 ng/ml 及 300 U/ml rhIL-2。以后每 3 d 更换新鲜培养液, 诱导产生 CIK 细胞。

1.4 DC 与 CIK 的共培养

DC、CIK 细胞分别培养至第 7 天, 计数后, 将细胞分组培养: 实验组(冻融物 DC-CIK)、对照组(DC-CIK)、CIK 组和 DC 组。DC 与 CIK 细胞混合比为 1:5。上述细胞培养当日起用锥虫蓝拒染法记数, 动态观察细胞形态。

1.5 流式细胞术检测 DC 及 CIK 的细胞免疫表型及 P-gp 的表达

收集培养 12 d 的上述细胞, 调整各组细胞密度, 分别加入相应单克隆抗体, 混匀后置室温下避光反应 30 min, 加 PBS 缓冲液, 离心洗涤后, 加入 1% 多聚甲醛固定, 以流式术检测 DC 表型(CD80、CD83、HLA-DR、CD86)和 CIK 表型(CD3、CD56、CD8、CD45RA)。

同法分别取培养的 MCF7/ADR-DC、MCF7/ADR、MCF7 细胞, 调整细胞密度, 分别加入 PE 标记的鼠抗人 P-gp 单抗, 避光反应, 离心洗涤, 固定后流式术检测 P-gp 的表达。

1.6 ELISA 检测冻融抗原负载 DC 与 CIK 共培养后 IL-12 和 INF- γ 的表达水平

分别收集 DC 组、DC-CIK 组和冻融物 DC-CIK 组细胞培养上清液。酶标板分别设标准品孔、待测样本

孔和空白对照孔, 分别加入标准品、待测样本。37 °C 恒温箱温育 30 min。洗板 4 次, 加酶标工作液, 温育, 洗板, 显色, 终止。以空白孔调零, 在终止后 15 min 内, 测量各孔 D_{450} 。以标准品 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.2、0 pg/ml 为横坐标, D 值为纵坐标, 制作标准曲线。根据样品 D 值在该曲线图上查出相应 IL-12 含量。同法测定 INF- γ 分泌水平。

1.7 MTT 法检测各组效应细胞对 MCF7/ADR 及 MCF7 细胞的杀伤活性

分别收集培养 12 d 的冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组、CIK 组的细胞作为效应细胞, 靶细胞为 MCF7/ADR 及 MCF7, 细胞密度均调整为 1×10^5 /ml。分别调整各效应细胞的浓度, 效靶比为 10:1、20:1、40:1。并设未与肿瘤细胞反应的各组 CIK 为效应细胞空白对照, 未与 CIK 反应的各种肿瘤细胞为靶细胞的空白对照。用 MTT 法检测光密度(D_{570}), 计算杀伤率(%)。

1.8 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养对细胞增殖活性的影响

冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组及 CIK 组的肿瘤细胞在第 3 天开始出现增殖, 3 组细胞增殖速度无明显区别。第 5 天后, DC-CIK 组 CIK 组的肿瘤细胞进入快速增殖期, 增殖活性明显高于单独培养的 CIK 组, 而冻融物 DC-CIK 组 CIK 的增殖活性进一步提高, 培养期内细胞存活率均达 95% 以上。因此, DC、CIK 共培养可以提高 CIK 的增殖活性, 尤其是经冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养可进一步提高增殖活性。

2.2 冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养对细胞免疫表型表达的影响

2.2.1 对 DC 免疫表型的影响 DC 培养第 12 天时, 各组细胞群 DC 的免疫表型变化见表 1。DC-CIK 组 DC 表型分子 CD80、CD83、CD86、HLA-DR 的表达较 DC 组明显增高($P < 0.05$); 冻融物 DC-CIK 组 DC 表型分子表达进一步上调, 与 DC-CIK 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果显示 DC 与 CIK 共培养后 DC 表面 CD83、HLA-DR、CD80、CD86 均表达上调, 经冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养后上述分子表达可进一步上调。

表 1 培养 12 天各组细胞群 DC 的免疫表型 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
DC 组	31.94 ± 2.66	16.87 ± 2.28	24.25 ± 2.16	31.48 ± 2.32
DC-CIK 组	39.79 ± 3.21 [▲]	37.71 ± 3.33 [▲]	31.62 ± 2.56 [▲]	45.78 ± 3.29 [▲]
冻融物 DC-CIK 组	54.04 ± 3.29 ^{*▲}	54.93 ± 3.29 [▲]	49.75 ± 3.56 [▲]	57.89 ± 3.12 ^{*▲}

* $P < 0.05$ vs DC-CIK 组; [▲] $P < 0.05$ vs DC 组

2.2.2 对 CIK 免疫表型的影响 培养 12 d 时, CIK 组、DC-CIK 组、冻融物 DC-CIK 组中 CIK 细胞 CD3⁺ CD8⁺、CD3⁺ CD56⁺ 细胞分别为(34.02 ± 1.12)%、(45.29 ± 1.99)%、(55.48 ± 1.99)% 和(9.27 ± 1.92)%、(21.98 ± 1.21)%、(30.24 ± 1.36)%。冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组表达高于单独培养的 CIK 组($P < 0.05$),但冻融物 DC-CIK 组与 DC-CIK 组相比差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

培养 7 d 时, CIK 表面 CD45RA 阳性表达率 CIK 组为(51.06 ± 5.96)%。培养 12 d 时,冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组和 CIK 组分别为(3.02 ± 0.74)%、(5.53 ± 0.82)%和(11.02 ± 1.63)%。结果提示,随培养时间延长,各组 CIK 中 CD3⁺ CD56⁺ 双阳性细胞的比例均上升,以冻融物 DC-CIK 组最为显著;且 CIK 细胞培养早期细胞表面高表达 CD45RA,随着 CIK 成熟度增加、细胞数量扩增,CD45RA 的表达显著性递减。

2.3 冻融抗原负载 DC 后 P-gp 阳性表达率的变化

流式结果显示, MCF-7/ADR 及 MCF-7 细胞的 P-gp 表达率分别为(88.06 ± 12.31)%、(1.04 ± 3.53)%;经冻融抗原冲击 DC 后, MCF-7/ADR 细胞 P-gp 阳性表达率为(66.31 ± 13.12)%,由此可见, MCF-7/ADR 高表达 P-gp,且本实验成功制备了细胞冻融抗原。

2.4 冻融抗原负载 DC 与 CIK 共培养对 IL-12 和 INF- γ 分泌水平的影响

收集 DC 组、DC-CIK 组和冻融物 DC-CIK 组细胞上清液,测得 IL-12 分泌水平分别为(25.2 ± 5.6)、(45.7 ± 10.5)、(254.4 ± 14.5)pg/ml,经冻融抗原冲击的实验组 IL-12 水平较其他两组均有显著上调($P < 0.01$)。

收集上述 3 组细胞上清液,进行 INF- γ 分泌水平测定,分别为(506 ± 8)、(1450 ± 85)、(3100 ± 286)pg/ml。冻融物 DC-CIK 组 INF- γ 水平较其他两组均显著上调($P < 0.01$)。结果证实,DC-CIK 共培养细胞 IL-12 和 INF- γ 的分泌水平显著提高,尤其是经冻融抗原冲击的 DC-CIK 共培养组提高更明显。

2.5 冻融抗原负载 DC 与 CIK 共培养对耐药细胞株 MCF-7/ADR 杀伤活性的影响

细胞杀伤活性测定结果(表 2)显示,冻融物 DC-CIK 组、DC-CIK 组对 MCF-7/ADR、MCF7 细胞的杀伤活性均高于 CIK 组($P < 0.05$);冻融物 DC-CIK 组对耐药株 MCF-7/ADR 的杀伤活性亦高于 DC-CIK 组($P < 0.05$);对非耐药株 MCF7 的杀伤活性,冻融物 DC-CIK 组与 DC-CIK 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。在效靶细胞比为 10:1 ~ 40:1 的范围内,3 组效应细胞对 MCF-7/ADR、MCF7 细胞的杀伤活性随效靶比的增高而提高。结果提示,DC、CIK 共培养可以增强 CIK 的杀伤活性;经冻融抗原冲击的 DC-CIK 组对 MCF-7/ADR 细胞的杀伤活性高于对非耐药细胞株 MCF7 的杀伤活性($P < 0.05$)。

表 2 三组效应细胞对 MCF-7/ADR 和 MCF7 细胞的杀伤活性($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	MCF-7/ADR			MCF-7		
	10:1	20:1	40:1	10:1	20:1	40:1
CIK 组	9.85 ± 3.32	12.36 ± 3.06	16.29 ± 6.03	11.31 ± 2.79	14.62 ± 2.01	21.21 ± 2.81
DC-CIK 组	26.73 ± 2.27 [*]	39.23 ± 3.10 [*]	42.84 ± 3.30 [*]	29.75 ± 3.12 [*]	35.21 ± 3.14 [*]	41.21 ± 2.09 [*]
冻融物 DC-CIK 组	44.29 ± 1.39 ^{*▲}	58.24 ± 3.52 ^{*▲}	68.9 ± 2.83 ^{*▲}	33.51 ± 2.18 [*]	40.43 ± 2.30 [*]	44.62 ± 1.19 [*]

* $P < 0.05$ vs CIK 组; [▲] $P < 0.05$ vs DC-CIK 组

3 讨论

恶性肿瘤是威胁人类健康的疾病,化疗是重要治疗手段之一,但MDR的发生是化疗失败的主要原因之一。MDR形成机制复杂,寻找有效的MDR逆转剂一直是研究热点。P-gp在肿瘤细胞中的过度表达是形成MDR的重要机制。文献[6]报道多种恶性肿瘤细胞MDR1 mRNA和P-gp表达增加,患者预后明显差于P-gp表达阴性的患者,化疗药物也不易诱导其缓解,且复发率高。P-gp是MDR基因的表达产物,是分子量为170 000 Da的跨膜糖蛋白^[7-8]。Savas等^[6]研究发现,免疫杀伤细胞对MDR肿瘤细胞的杀伤活性高于其亲代药物敏感株,故推测MDR肿瘤细胞上过度表达的P-gp增强了靶细胞的免疫原性,因而更易于成为免疫效应细胞攻击的靶点。

DC细胞是人体内最有效的APC,成熟DC主要作用于初始T细胞,有效提呈抗原,激活T细胞免疫应答,诱导持久及强有力的抗肿瘤免疫反应^[5]。CIK是免疫效应细胞中细胞毒活性及增殖能力较强的细胞,是以CD3⁺CD56⁺T细胞为主要效应细胞的异质性细胞群^[9-11],兼有T细胞强大的抗肿瘤活性与NK细胞的非主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)限制性杀瘤特点^[12-13],且对人体骨髓造血干细胞及祖细胞几乎无毒性。CIK和DC细胞二者共培养具有更强的增殖活性和细胞毒活性^[14],在肿瘤细胞免疫治疗中具有良好的应用前景。

目前肿瘤相关性抗原或特异性抗原得到明确鉴定的为数甚少,而细胞性肿瘤抗原则易于获得,故对大多数尚未确知抗原的肿瘤予以肿瘤细胞全部抗原信息(如肿瘤细胞裂解物、肿瘤细胞提取物、肿瘤细胞的总RNA或经过灭活的完整的肿瘤细胞)冲击DC,可以有效致敏和活化DC,促进DC分化成熟,增强其功能。流式检测MCF-7/ADR、MCF-7/ADR-DC及MCF-7细胞的P-gp阳性表达率,提示本实验成功制备细胞冻融抗原且成功负载DC。

本实验结果表明,DC与CIK共培养后,DC表面CD83、HLA-DR、CD80、CD86等表达均上调,同时CIK表面CD3、CD56表达也上调;而冻融物DC-CIK组表面标志表达量较CIK组、DC组及DC-CIK组更显著;就IL-12、IFN- γ 分泌水平而言冻融物DC-CIK组最高。以上结果证实了DC与CIK细胞共培养后可相互促进成熟,而且经冻融抗原冲击的DC-CIK共培养物成熟度进一步增高。其机制可能为成熟DC自身可分泌高水平的IL-2、IL-12和IFN- γ 等细胞因子,这些因子可诱导及活化CIK;冻融抗原负载

DC后可以有效致敏和活化DC,促进其分化成熟;同时,IL-12又能诱导CIK产生IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF和IL-8等细胞因子,而TNF- α 、GM-CSF等又能诱导DC分化与成熟,正反馈上调DC中IL-12和共刺激分子的分泌,进而相互促进成熟。

已有研究^[14-15]证实,DC与CIK共培养可以增强CIK的杀伤作用。本研究通过杀伤实验发现:冻融物DC-CIK组、DC-CIK组对MCF-7/ADR、MCF-7细胞的杀伤活性均高于CIK组($P < 0.05$)。说明DC和CIK共培养可以增强CIK的杀伤效果。可能的机制为DC表面有大量的树突状突起,使之有利于大量接触抗原,并提呈给CIK细胞;DC高表达MHC I、II类分子及CD80/CD86等共刺激分子,为CIK细胞充分活化提供信号刺激,DC分泌IL-12等多种细胞因子,可促进CIK细胞成熟并产生IFN- γ 等细胞因子,维持和增强CIK细胞的杀伤活性。

冻融物DC-CIK组对耐药株MCF-7/ADR的杀伤活性高于DC-CIK组($P < 0.05$);冻融物DC-CIK组、DC-CIK组对非耐药株MCF-7的杀伤活性无显著性差异($P > 0.05$)。说明DC-CIK共培养可以提高CIK的杀伤活性;而且经MCF-7/ADR冻融抗原冲击的DC-CIK组能显著激活CIK对耐药株MCF-7/ADR的杀伤活性,而对P-gp低表达的MCF-7敏感株的杀伤活性并无差异。其解释可能为DC与CIK共培养增强了CIK细胞的非MHC限制性细胞毒作用,但同时是否是MCF-7/ADR冻融物-DC提呈了具有免疫原性的P-gp,激发了负载抗原的DC介导的MHC限制性特异性杀伤效应,还有待进一步研究证实。

如果CIK只存在非MHC限制性杀伤作用,那经冻融抗原冲击的DC-CIK组与DC-CIK组对高表达P-gp的乳腺癌耐药细胞株MCF-7/ADR的杀伤作用就不会出现显著性差异,这提示存在一定的细胞特异性杀伤效应。研究^[10,15-18]证实,CIK细胞中存在CD3⁺CD56⁺及CD3⁺CD56⁻细胞。CD3⁺CD56⁺CIK细胞来源于CD3⁺CD56⁻T细胞,而不是来源于CD3⁻CD56⁺NK细胞。而CD3⁺CD56⁻细胞中大部分CD3⁺细胞被证明是CD8⁺细胞,CIK对肿瘤细胞的杀伤活性由其中的CD3⁺CD56⁺细胞决定。本实验对不同CIK进行细胞表型分析,发现抗原致敏的DC-CIK细胞群中,CD3⁺CD56⁺和CD3⁺CD8⁺两群双阳性细胞比例增高,尤其是CD3⁺CD8⁺双阳性细胞所占比例增高明显,两种双阳性细胞的比例明显高于同条件下的DC-CIK组和单纯CIK组细胞群。

本实验成功将P-gp高表达的MCF-7/ADR耐药

株制成细胞冻融抗原,负载 DC,制成负载有肿瘤抗原的 DC 瘤苗,利用 DC 高效加工提呈抗原的能力,更快速直接提呈抗原,使 T 细胞活化,从而启动特异性抗肿瘤免疫反应。另外,在 CIK 细胞培养早期细胞表面高表达 CD45RA,随着 CIK 成熟度增加、细胞数量扩增,CD45RA 的表达呈显著性递减。而 CD45RA 是幼稚 T 细胞(naïve T cell)表型,因此据本实验结果及其他研究资料推断,在 CIK 这种异质性细胞中,存在幼稚 T 细胞,当冻融抗原冲击的 DC 与 CIK 共培养后,在 DC 与 CIK 互促成熟的同时,DC 还可以将抗原提呈给幼稚 T 细胞,使其活化,从而发挥对 P-gp 高表达的 MCF-7/ADR 乳腺癌耐药细胞株的特异性杀伤作用。当然实验结果显示抗原致敏的 DC-CIK 细胞群中,CIK 中 CD3⁺CD56⁺和 CD3⁺CD8⁺两群双阳性细胞仍以 CD3⁺CD56⁺细胞为主,其杀伤作用仍以非 MHC 限制性杀伤作用为主。

总之,DC 与 CIK 是肿瘤免疫治疗的两种重要细胞,CIK、DC-CIK 共培养细胞对多药耐药肿瘤细胞 MCF-7/ADR 敏感,且具有较强的杀伤活性,更重要的是本实验采用 MCF-7/ADR 冻融抗原负载的 DC-CIK,产生了比 DC-CIK 细胞更有效的杀伤 P-gp 高表达的多药耐药肿瘤细胞 MCF-7/ADR 的效应,其中除发挥非 MHC 限制性杀伤作用外,还存在特异性杀伤作用,但其特异性杀伤作用的机制还有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine induced killer cells lead to an activation of both populations [J]. *J Immunol*, 2001, 24(6): 502-510.
- [2] Leitner I, Nemeth J, Feurstein T, et al. The third generation P-glycoprotein inhibitor tariquidar may overcome bacterial multidrug resistance by increasing intracellular drug concentration [J]. *Antimicrob Chemother*, 2011, 66(4): 834-839.
- [3] Breier A, Barancik M, Sulova Z, et al. P-glycoprotein—implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5(6): 457-468.
- [4] 张辉,赵群,左连富,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞对卵巢癌耐药细胞 SKOV3/CDDP 的作用机制 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(12): 1167-1171.
- [5] Märten A, Schöttker B, Ziske C, et al. Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA 19-9 protein [J]. *J Immunother*, 2000, 23(4): 464-472.
- [6] 李睿,徐海帆. 多药耐药蛋白 P-糖蛋白的研究进展 [J]. *中国实用医药*, 2009, 4(2): 240-241.
- [7] Savas B, Cole SP, Tsuruo T, et al. P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and lymphokine-activated killer cell susceptibility in ovarian carcinoma [J]. *Clin Immunol*, 1996, 16(6): 348-357.
- [8] Zhang YM, Zhang LS, Zhang YF, et al. Comparison of anti-leukemic effect of dendritic cells derived from multidrug-resistant leukemia K562/A02 cells with high expression of P-glycoprotein and sensitive K562 cells [J]. *Chin Med J*, 2005, 118(7): 595-597.
- [9] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 1994, 153(4): 1687-1696.
- [10] Linn YC, Lau SK, Liu BH, et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell [J]. *Immunology*, 2009, 126(3): 423-435.
- [11] Linn YC, Lau LC, Hui KM, et al. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with *in vitro* cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts [J]. *Br J Haematol*, 2002, 116(1): 78-86.
- [12] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [13] Wang FS, Liu MX, Zhang B, et al. Antitumor activities of human autologous cytokine induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 464-468.
- [14] 艾丽梅,毛淑丹,宋盈盈,等. DC-CIK 细胞体外抗淋巴瘤细胞的免疫效应研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(10): 898-899.
- [15] González-Carmona MA, Märten A, Hoffmann P, et al. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells [J]. *Liver Int*, 2006, 26(3): 369-379.
- [16] Wang J, He M, Shi W, et al. Inducible costimulator (ICOS) enhances the cytolytic activity of cytokine-induced killer cells against gallbladder cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(3): 244-250.
- [17] Oliosio P, Giancola R, Di Riti M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: A pilot clinical trial [J]. *Hematol Oncol*, 2009, 27(3): 130-139.
- [18] Qi JW, Hui W, Ke P, et al. Comparative study on antitumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(7): 641-648.

[收稿日期] 2012-03-11

[修回日期] 2012-05-16

[本文编辑] 王莹