

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.003

· 研究快报

脐血来源的 CIK 高表达激活型表面标志物及耐药基因 *ABCG2*

张震^{1,2}, 赵先兰⁵, 王丽萍³, 杨玲竹⁵, 杨黎⁶, 张斌^{1,4}, 张毅^{1,2,3}(1. 郑州大学第一附属医院生物细胞治疗中心, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学生物工程系, 河南 郑州 450001; 3. 郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450052; 4. 美国德州大学圣安东尼奥医学中心医学系, 德克萨斯 圣安东尼奥 77027703; 5. 郑州大学第一附属医院产科, 河南 郑州 450052; 6. 郑州大学第一附属医院临床医学重点实验室; 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:**比较脐血来源的细胞因子诱导杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)和肿瘤患者外周血来源 CIK 的增殖、激活型和抑制型细胞表面标志物、耐药基因 *ABCG2* 以及干细胞转录因子表达的差异,探讨脐血 CIK 应用于肿瘤过继细胞免疫治疗的优越性。**方法:**采用 Ficoll-Plaque 淋巴分离液分离脐血及肿瘤患者外周血单个核细胞,加入细胞因子诱导培养 CIK。流式细胞术检测 CIK 的增殖、免疫表型、激活型表面标志物 CD28、CD27 和抑制型表面标志物 PD-1 的表达,RT-PCR 检测耐药基因 *ABCG2* 和干细胞转录因子 *c-Myc*、*Nanog*、*Oct-4*、*Sox2* 的表达。**结果:**脐血 CIK 与外周血 CIK 体外培养第 4 天时均开始增殖,第 10 天时脐血 CIK 的增殖指数明显高于外周血 CIK [(251.52 ± 16.76) vs (158.00 ± 43.19), $P < 0.05$]。体外诱导培养 13 d 后脐血 CIK 中 CD3⁺CD56⁺ 细胞比例较外周血 CIK 高[(21.20 ± 4.82)% vs (10.06 ± 3.46)% , $P < 0.05$];激活型 CD4⁺CD28⁺、CD4⁺CD27⁺ 和 CD8⁺CD27⁺ 细胞比例在脐血 CIK 中也明显升高[(32.40 ± 16.81)% vs (18.65 ± 9.23)% , (27.48 ± 13.53)% vs (0.98 ± 0.55)% , (41.76 ± 13.98)% vs (2.58 ± 2.10)% ; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$];而抑制型 CD8⁺PD-1⁺ 细胞比例明显降低[(3.25 ± 2.13)% vs (8.05 ± 9.23)% , $P < 0.01$]。此外,脐血 CIK 与外周血 CIK 均表达干细胞转录因子 *c-Myc*、*Nanog*、*Oct-4*、*Sox2*,但两者之间无显著差异($P > 0.05$);而仅脐血 CIK 表达高水平的耐药基因 *ABCG2*。**结论:**脐血 CIK 较外周血 CIK 增殖速度快、激活型表面标志物表达水平高、抑制型表面标志物表达水平低,高表达耐药基因 *ABCG2*,应用于肿瘤过继细胞免疫治疗有一定的优势。

[关键词] 细胞因子诱导杀伤细胞;脐血;外周血;激活型表面标志物;抑制型表面标志物;耐药基因 *ABCG2*;肿瘤

[中图分类号] R737.9; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0-05

Highly expressions of activated cell surface markers and drug-resistance gene *ABCG2* in cytokine-induced killer cells derived from umbilical cord blood

ZHANG Zhen^{1,2}, ZHAO Xian-lan⁵, WANG Li-ping³, YANG Ling-zhu⁵, YANG Li⁶, ZHANG Bin^{1,4}, ZHANG Yi^{1,2,3}(1. Biotherapy Center, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, He'nan, China; 3. Department of Oncology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 4. Department of Medicine, San Antonio Health Science Center, University of Texas, San Antonio 77027703, Texas; 5. Department of Obstetrics, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan, China; 6. Key Laboratory of Clinical Medicine, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the proliferation and differential expressions of activated and inhibitory cell surface markers, drug-resistance gene *ABCG2* and stem cell transcription factors in cytokine-induced killer cell (CIK) derived from umbilical cord blood or peripheral blood in cancer patients, and to explore the superiority of umbilical cord blood derived-CIKs (CB-CIKs) in adoptive cellular immunotherapy. **Methods:** Cord blood mononuclear cells (CBMNCs) and pe-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81171985, No. 81171986, No. 812111102)。Project support by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171985, No. 81171986, No. 812111102)

[作者简介] 张震(1989-),女,河南省确山县人,硕士生,主要从事肿瘤的细胞免疫治疗。E-mail:yuchen.2008.com@163.com

[通信作者] 张毅(ZHANG Yi, corresponding author),E-mail:chyizhang@gmail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R>

ipheral blood mononuclear cells in cancer patients were isolated using Ficoll-Plaque density gradients and incubated with cytokines. The proliferation, immunophenotypes, activated cell surface markers (CD28, CD27) and inhibitory cell surface marker (PD-1) were analyzed by flow cytometry, and the drug-resistance gene *ABCG2* or stem cell transcription factors (*c-Myc*, *Nanog*, *Oct-4* and *Sox2*) were determined by RT-PCR. **Results:** CB-CIKs and peripheral blood derived-CIKs (PB-CIKs) started to proliferation on the fourth day *in vitro*, and the proliferation index of CB-CIKs was statistically significantly higher than that of PB-CIKs on day 10 ([251.52 ± 16.76] vs [158.00 ± 43.19], *P* < 0.05). Thirteen days after incubation, the proportion of CD3⁺CD56⁺ cells in CB-CIKs was higher than that in PB-CIKs ([21.20 ± 4.82]% vs [10.06 ± 3.46]% , *P* < 0.05). When detecting the status of CIKs, the proportions of activated CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD27⁺ and CD8⁺CD27⁺ cells were significantly higher in CB-CIKs than PB-CIKs ([32.40 ± 16.81]% vs [18.65 ± 9.23]% ; [27.48 ± 13.53]% vs [0.98 ± 0.55]% ; [41.76 ± 13.98]% vs [2.58 ± 2.10]% , *P* < 0.05 or *P* < 0.01), while the proportion of inhibitory CD8⁺PD-1⁺ cells was significantly lower in the CB-CIKs ([3.25 ± 2.13]% vs [8.05 ± 9.23]% , *P* < 0.01). The stem cell transcription factors (*c-Myc*, *Nanog*, *Oct-4* and *Sox2*) were expressed both in CB-CIKs and PB-CIKs. Moreover, no significant differences were found between the two kinds of CIKs. Furthermore, only CB-CIKs expressed high level of drug-resistance gene *ABCG2*. **Conclusion:** Compared with the PB-CIKs, the CB-CIKs demonstrate increased proliferation rates, higher expressions of activated surface markers, and lower expression of inhibitory surface marker. Besides, drug-resistant gene *ABCG2* is highly expressed in CB-CIKs, showing several advantages in applying to tumor adoptive cellular immunotherapy.

[**Key words**] cytokine-induced killer cell; umbilical cord blood; peripheral blood; activated cell surface marker; inhibitory cell surface marker; drug-resistant gene *ABCG2*; tumor

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): -]

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)是一群增殖能力强、杀伤活性高的免疫效应细胞。CIK 中起杀伤作用的主要效应细胞同时表达 CD3 和 CD56 两种膜蛋白分子,兼具有 T 细胞抗瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀伤优点,称为 NK 样 T 细胞^[1]。肿瘤患者外周血来源的 CIK 过继细胞免疫治疗已广泛应用于临床,但外周血 CIK 回输后在体内活性低、存活时间短,治疗效果不是十分理想;而且由于肿瘤患者免疫功能低下,抑制性免疫细胞数量增多,故肿瘤患者自体外周血体外诱导时不易获得足够数量和杀伤活性的 CIK^[2]。与外周血 CIK 相比,脐带血 CIK 具有以下优点:(1)来源广泛,前体细胞含量高,较易扩增出大量 CIK;(2)淋巴细胞数量多,具有较强的增殖潜力;(3)免疫原性低,移植后移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)发生率低^[3]。本课题将脐血来源 CIK 与肿瘤患者外周血来源 CIK 的增殖速度、免疫表型、表面激活型和抑制型标志物及耐药基因的表达进行比较,为脐血来源 CIK 的临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

脐血由郑州大学第一附属医院产科提供,取标本征得产妇及家属的同意,并签署知情同意书。脐血系

健康足月产妇分娩时,无菌条件下采集,采集脐静脉血量为 50 ml(肝素钠抗凝)。肿瘤患者外周血由郑州大学第一附属医院生物细胞治疗中心接受治疗的肿瘤患者提供,已征得患者及家属同意,并签署知情同意书。研究方案和程序报医院伦理委员会审批并获批准。

1.2 主要试剂

重组人白介素-2(interlukin-2, IL-2)购自北京双鹭药业股份有限公司,重组人干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)购自上海凯茂生物医药有限公司,抗 CD3 单克隆抗体购自以色列 ProSpec-Tany 公司, RPMI 1640 培养基购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司,胎牛血清、淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司, CFSE 购自 Sigma 公司,琼脂糖购自 Biowest 公司,反转录试剂盒、PCR 试剂盒购自 Fementas 公司, TRIzol 购自 Invitrogen 公司。各种免疫荧光抗体 CD3、CD4、CD8、CD56、CD28、CD27、PD-1 及同型对照均购自美国 BD Pharmingen 公司。

1.3 脐血 CIK 与外周血 CIK 的培养

取脐血与肿瘤患者外周血各 50 ml, 肝素钠抗凝。采用 Ficoll 密度梯度离心法(2 500 × *g*, 25 min)获得单个核细胞,用 RPMI 1640 培养基(含 10% 灭活的胎牛血清)调整细胞密度至 2 × 10⁶/ml, 加入 IFN-γ(1 000 U/ml), 培养 24 h 后加入 CD3 单抗(25 ng/ml)和 IL-2(1 000 U/ml), 每 2 ~ 3 d 换液一次。

1.4 流式细胞术检测 CIK 的增殖

取脐血和肿瘤患者外周血诱导培养 6 d 后的 CIK,离心洗涤后,加入 1 ml 无血清 RPMI 1640 培养基重悬细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,避光加入 CFSE 至终浓度为 5 mmol/L,37 °C 孵育 10 min 后加入 200 μl 胎牛血清,4 °C 放置 8 min 后,终止染色。取 1×10^5 个细胞进行流式细胞仪检测,连续检测 5 d。采用 Modify 软件分析脐血 CIK 与外周血 CIK 的增殖。

1.5 流式细胞术检测 CIK 免疫表型及表面激活型和抑制型标志物的表达

取脐血与肿瘤患者外周血诱导培养 13 d 后的 CIK,加入免疫荧光标记抗体或相应的同型抗体,混匀后室温避光孵育 15 min,加入 PBS 缓冲液,离心 ($1500 \times g, 5 \text{ min}$) 洗涤后,流式细胞术检测 CIK 免疫表型 ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ 、 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ 、 $\text{CD3}^+ \text{CD56}^+$) 及表面激活型标志物 (CD28 、 CD27) 和抑制型标志物 (PD-1) 的表达。

1.6 RT-PCR 检测耐药基因 *ABCG2* 与干细胞转录因子的表达

取脐血与肿瘤患者外周血诱导培养 13 d 的细胞 1×10^6 个,TRIzol 法提取总 RNA,20 μl 无 RNase 水溶解后检测 RNA 的纯度与浓度。耐药基因 *ABCG2* 和干细胞转录因子的检测采用两步法,先将总 RNA 反转录成 cDNA,再以逆转录产物为模板,进行 RT-PCR 扩增目的基因。引物序列见表 1。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。琼脂糖凝胶电泳鉴定产物并拍照,采用 Image J 软件对电泳条带进行灰度值分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本符合正态分布,均数方差齐,各样本测量值相互独立,采用成组 *t* 检验,若不符合 *t* 检验标准,采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 RT-PCR 检测 *ABCG2* 与干细胞转录因子时的引物

Tab.1 Primers of *ABCG2* and stem cell transcription factors for RT-PCR

Gene	Sense	Antisense
<i>GADPH</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
<i>ABCG2</i>	5'-GGGTCTCTTCTTCTGACGACC-3'	5'-TGTTGTGAGATTGACCAACAGAC-3'
<i>c-Myc</i>	5'-TGAAAGGCTCTCCTTGCAGC-3'	5'-GCTGGTAGAAGTTCTCTCC-3'
<i>Nanog</i>	5'-TTCCTTCTCCATGGATCTG-3'	5'-TCTGCTGGA GGCTGAGGTAT-3'
<i>Oct-4</i>	5'-GACAACATGAAAATCTTCA-3'	5'-TTCTGGCGCCGGTTACAGAA-3'
<i>Sox2</i>	5'-CCCCGGCGCAATAGCA-3'	5'-TGGGCGCCGGGAGATACAT-3'

2 结果

2.1 脐血 CIK 与肿瘤患者外周血 CIK 的增殖情况

脐血与外周血 CIK 培养至第 4 天时均开始增殖,培养 6 d 后开始检测 CIK 的增殖指数。第 6 天时,脐血 CIK 和外周血 CIK 的增殖指数无显著性差异,而第 10 天时脐血 CIK 的增殖指数明显高于外周血 CIK [(251.52 ± 16.76) vs (158.00 ± 43.19)], $P < 0.05$ (图 1)。

2.2 脐血 CIK 与外周血 CIK 的免疫表型

脐血 CIK 与外周血 CIK 培养 13 d 后,流式细胞术检测 CIK 的免疫表型(图 2)。脐血 CIK 与外周血 CIK 中 $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ 、 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ 细胞比例无显著差异;但脐血 CIK 中 $\text{CD3}^+ \text{CD56}^+$ 细胞的比例显著高于外周血 CIK 中的 $\text{CD3}^+ \text{CD56}^+$ 细胞的比例

[$(21.20 \pm 4.82)\%$ vs $(10.06 \pm 3.46)\%$, $P < 0.05$]。

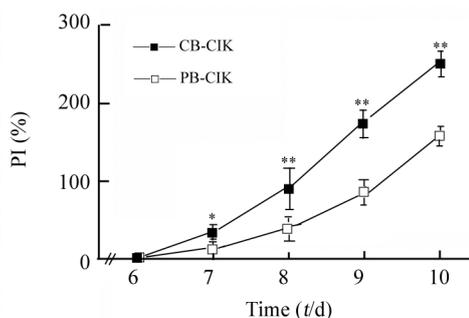


图 1 脐血 CIK 与外周血 CIK 体外扩增情况

Fig. 1 *In vitro* expansions of umbilical cord blood-derived CIKs (CB-CIKs) and peripheral blood-derived CIKs (PB-CIKs)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PB-CIK group

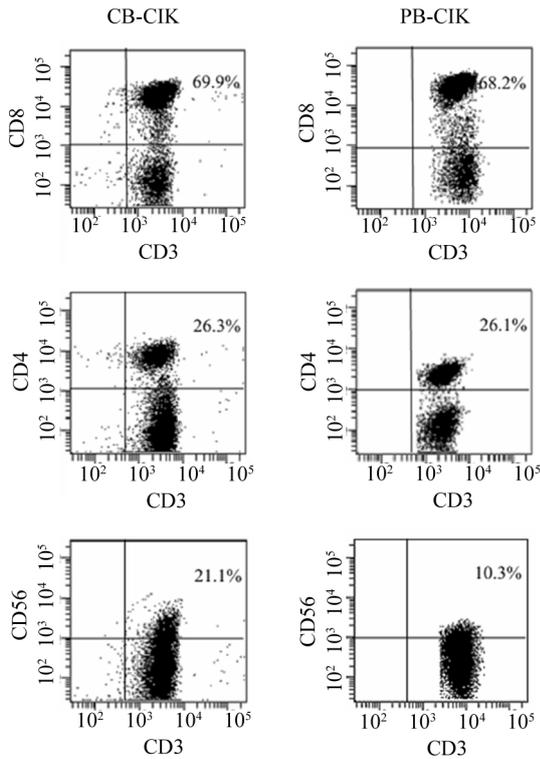


图 2 流式细胞术检测脐血 CIK 与外周血 CIK 的免疫表型
Fig. 2 Immunophenotype of CIK cells derived from umbilical cord blood or peripheral blood detected by flow cytometry

2.3 脐血 CIK 与外周血 CIK 表面标志物 CD28、CD27、PD-1 的表达

为了检测不同来源 CIK 的活性, 取培养 13 d 的脐血 CIK 和外周血 CIK 各 10 例, 用流式细胞仪检测 CIK 表面激活型标志物 CD28、CD27 以及抑制型标志物 PD-1 的表达。结果(图 3)显示, 脐血 CIK 中激活型 CD4⁺CD28⁺、CD4⁺CD27⁺ 及 CD8⁺CD27⁺ 细胞的比例高于外周血 CIK [(32.40 ± 16.81)% vs (18.65 ± 9.23)%, *P* < 0.05; (27.48 ± 13.53)% vs (0.98 ± 0.55)%, *P* < 0.05; (41.76 ± 13.98)% vs (2.58 ± 2.10)%, *P* < 0.05], 而抑制型 CD8⁺PD-1⁺ 细胞的比例低于外周血 CIK [(3.25 ± 2.13)% vs (8.05 ± 9.23)%, *P* < 0.05]。此外, 脐血和外周血 CIK 中激活型 CD8⁺CD28⁺ 细胞和抑制型 CD4⁺PD-1⁺ 细胞的比例没有显著差异。

2.4 脐血 CIK 与外周血 CIK 中耐药基因及转录因子的表达

RT-PCR 检测脐血 CIK 与外周血 CIK 中耐药基因 *ABCG2* 和干细胞转录因子 *c-Myc*、*Nanog*、*Oct-4*、*Sox2* 的表达, 结果(图 4)显示, 脐血 CIK 和外周血 CIK 均表达这 4 种干细胞转录因子, 且两者间表达水平无显著差异; 然而脐血 CIK 表达高水平的耐药基因 *ABCG2*, 而外周血 CIK 几乎不表达 *ABCG2* 基因 [(1.56 ± 0.03) vs (0.6 ± 0.06), *P* < 0.05]。

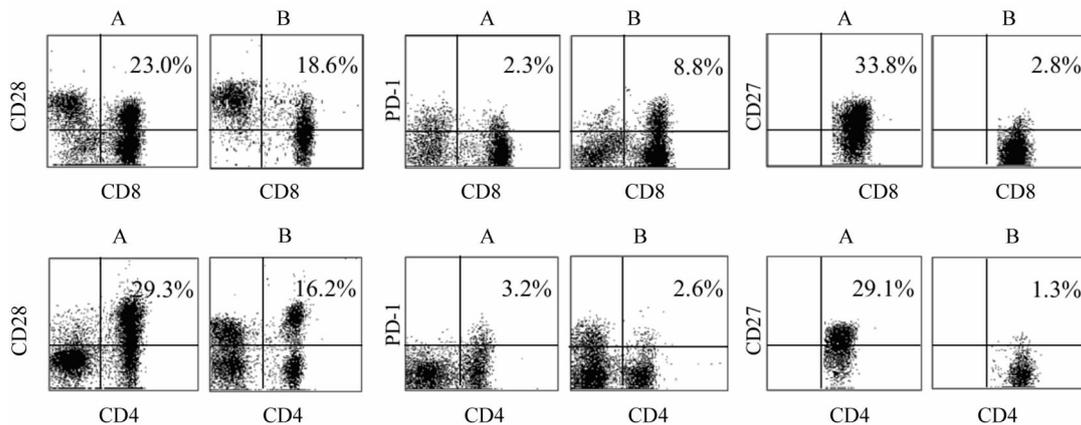


图 3 流式细胞术检测脐血 CIK 与外周血 CIK 表面 CD28、CD27 和 PD-1 的表达
Fig. 3 Expressions of CD28, CD27 and PD-1 in umbilical cord blood-derived CIKs (A) and peripheral blood-derived CIKs (B) detected by flow cytometry

3 讨论

CIK 是继 LAK、TIL、CD3AK 之后的又一种高效

免疫效应细胞。CIK 过继性免疫治疗可促进机体免疫系统的重建, 防止肿瘤的复发和转移^[4], 不同来源的 CIK 在临床应用上具有较高的安全性和有效

性^[5],但外周血 CIK 还存在一定的局限性。脐血由于来源方便、免疫原性低、含有大量造血干细胞、移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GvHD)发生率低,成为 CIK 的另一个重要来源,越来越引起人们的关注^[6]。

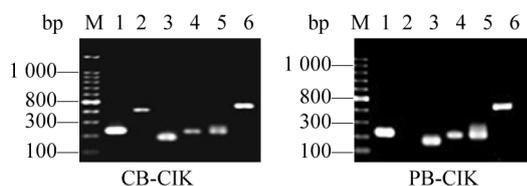


图4 脐血 CIK 与外周血 CIK 耐药基因 *ABCG2* 及干细胞转录因子的表达

Fig. 4 Expressions of drug resistant gene *ABCG2* and stem cell transcription factors in CIK cells

derived from umbilical cord blood or peripheral blood

M: Marker; 1: GADPH; 2: *ABCG2*; 3: c-Myc; 4: Nanog; 5: Oct-4; 6: Sox2; CB-CIK: Cord blood-derived CIK; PB-CIK: Peripheral blood-derived CIK

本实验比较了脐血来源的 CIK 和外周血来源的 CIK 在增殖、免疫表型、表面激活型标志物、表面抑制型标志物、耐药基因及干细胞转录因子表达方面的差异。结果发现,脐血 CIK 扩增速度显著高于外周血 CIK,其可能的原因是脐血 CIK 中造血前体细胞含量较高,并含有一定比例的幼稚细胞,具有较强的增殖潜力^[7-8]。脐血 CIK 中 $CD3^+ CD56^+$ 细胞比例是外周血 CIK 的 2 倍,这与文献^[9-10]报道有一定差别,其原因可能与细胞培养过程中细胞因子的活性、脐血来源的差异等有关。而 CIK 抗肿瘤作用主要通过 $CD3^+ CD56^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 细胞实现,故脐血 CIK 抗肿瘤效果可能优于外周血 CIK。

近几年对脐血 CIK 扩增速度和免疫表型的研究较为深入,但对脐血 CIK 的激活型和抑制型表面标志物的报道甚少^[11]。本实验分析了 CD28、CD27、PD-1 在脐血 CIK 和肿瘤患者外周血 CIK 的表达差异。CD28 是活化的 T 细胞表面标志物,表达于几乎所有的 $CD4^+$ T 细胞和大多数 $CD8^+$ T 细胞上,其配体是表达于抗原提呈细胞上的 B7 分子,两者结合产生的协同刺激信号在 T 细胞活化中发挥重要作用^[12-13]。脐血 CIK 中 $CD4^+ CD28^+$ 细胞比例高于外周血 CIK 中 $CD4^+ CD28^+$ 细胞的比例,初步说明脐血 CIK 能更有效地促进 T 细胞的增殖与分化,输注脐血 CIK 到肿瘤患者体内后,可有效杀伤肿瘤细胞。

CD27 分子是 TNF 受体超家族成员,表达于 T 细胞表面,参与 T 细胞活化、分化和细胞毒作用。CD27 与其配体 CD70 结合后,促进 B 细胞的活化和免疫球蛋白的合成^[14-15]。本研究中,脐血 CIK $CD4^+ CD27^+$ 和 $CD8^+ CD27^+$ 细胞的比例分别为 $(41.76 \pm 13.98)\%$ 、 $(27.48 \pm 13.53)\%$,显著高于外周血 CIK 中 $CD4^+ CD27^+$ 和 $CD8^+ CD27^+$ 细胞的比例,CD27 在脐血 CIK 中的高表达提示脐血 CIK 中 T 细胞大多数处于未激活状态,这种处于未激活状态的细胞,能向记忆性和 CTL 分化。若将脐血 CIK 输注到患者体内,遇到抗原刺激后进一步分化,其治疗潜能可能更大。

PD-1 是一种负性协同刺激分子,属于 CD28/CTLA-4 超家族成员,表达于活化 T 细胞表面,与其配体 PD-L1 和 PD-L2 结合后,向胞内转导抑制性信号,抑制 T 细胞的增殖及 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子的产生^[16-17]。外周血 CIK 中 $CD8^+ PD-1^+$ 细胞的比例高于脐血 CIK 中 $CD8^+ PD-1^+$ 细胞的比例 ($P < 0.05$),初步提示外周血 CIK 易促进 $CD8^+$ T 细胞凋亡,而脐血 CIK 不易促进 $CD8^+$ T 细胞凋亡。

耐药基因 *ABCG2* 是一种分子转运蛋白,在肿瘤细胞中高表达,参与肿瘤细胞对放化疗的耐药^[18-19]。CIK 联合放化疗可以提高患者对放、化疗的敏感性,但需要在放疗前采血,放疗结束后回输 CIK。本实验结果表明,脐血 CIK 表达耐药基因 *ABCG2*,对放化疗可能会产生耐受,增加 CIK 在体内的存活时间,提示脐血 CIK 在与放化疗联合治疗肿瘤时,效果可能比外周血 CIK 更好。干细胞转录因子 c-Myc、Nanog、Oct-4、Sox2 等在参与胚胎的发育过程中细胞的增殖和自我更新^[20],在两种 CIK 中均有表达,可能与维持 CIK 在体内的增殖、分化和活性有关。

综上,与肿瘤患者外周血 CIK 相比,脐血 CIK 具有增殖速度快,诱导出的 $CD3^+ CD56^+$ 细胞比例高,激活型表面分子表达水平高,抑制型表面分子表达水平低等特点,脐血 CIK 有望成为一种有效的免疫治疗方法,然而其具体的分子机制尚不甚清楚,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12 (6): 673-684.
- [2] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immuno-

therapy for solid tumors [J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.

[3] Clark EM, Joshi DS, Grimm AB, et al. Ultrastructural basis of enhanced antitumor cytotoxicity of cord blood-derived CTLs: A comparative analysis with peripheral blood and bone marrow [J]. Int J Oncol, 2010, 37(3): 645-653.

[4] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, Iet al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: A preclinical study [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1859-1867.

[5] Rutella S, Iudicone P, Bonanno G, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells generated with a new good manufacturing practice-grade protocol [J]. Cytotherapy, 2012, 14(7): 841-850.

[6] Niu Q, Wang W, Li Y, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(4): 449-456.

[7] Introna M, Franceschetti M, Ciocca A, et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: An innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 38(9): 621-627.

[8] Quah BJ, Parish CR. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* using CFSE-like fluorescent dyes [J]. J Immunol Methods, 2012, 379(1/2): 1-14.

[9] 牟青杰, 王洁, 崔为发, 等. 三种来源 CIK 体外增殖及杀伤活性比较 [J]. 山东医药, 2010, 50(11): 7-9.

[10] Pievani A, Borderi G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3⁺CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity [J]. Blood, 2011, 118(12): 3301-3310.

[11] 肖琼, 张乐玲, 沈柏均. 脐血 CIK 细胞的研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2011, 38(5): 500-502.

[12] Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients [J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1822-1826.

[13] Pufnock JS, Cigal M, Rolczynski LS, et al. Priming CD8⁺ T cells with dendritic cells matured using TLR4 and TLR7/8 ligands together enhances generation of CD8⁺ T cells retaining CD28 [J]. Blood, 2011, 117(24): 6542-6551.

[14] Yamaura K, Boenisch O, Watanabe T, et al. Differential requirement of CD27 costimulatory signaling for naïve versus alloantigen-primed effector/memory CD8⁺ T cells [J]. Am J Transplant, 2010, 10(5): 1210-1220.

[15] Denoed J, Moser M. Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance [J]. J Leukoc Biol, 2011, 89(2): 195-203.

[16] Matsuyama-Kato A, Murata S, Isezaki M, et al. Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus [J]. Virol J, 2012, 9(1): 94-105.

[17] Prosser ME, Brown CE, Shami AF, Forman SJ, Jensen MC. Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8⁺ cytotoxic T cells modified to express a PD1: CD28 chimeric receptor [J]. Mol Immunol, 2012, 51(3/4): 263-272.

[18] Guo Y, Liu S, Wang P, et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas [J]. Histopathology, 2011, 59(4): 763-775.

[19] Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis [J]. Pharmacol Ther, 2007, 114(3): 345-358.

[20] Dai CL, Liang YJ, Wang YS, et al. Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2 [J]. Cancer Lett, 2009, 279(1): 74-83.

[收稿日期] 2012-09-27 [修回日期] 2012-11-24

[本文编辑] 周玲琳

· 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、分、秒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； 3×10^9 至 5×10^9 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 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 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×2 mm×3 mm，不能写成 $4 \times 2 \times 3$ mm 或 $4 \times 2 \times 3$ mm³。

（本刊编辑部）