

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.014

四种 NK 细胞体外扩增方案的比较

王晓梦¹, 李玲², 于津浦¹, 李慧¹, 齐静¹, 张澎¹, 于文文¹, 任秀宝¹, 曹水^{1△}(1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2. 天津医科大学 附属肿瘤医院 中西医结合科, 天津 300060)

[摘要] **目的:**通过对4种NK细胞体外培养方案扩增后产物的细胞免疫表型、扩增倍数以及杀伤活性进行比较,确定一种高效的NK细胞体外扩增方案。**方法:**建立4种NK细胞体外培养方案:方案1为经典的NK细胞体外扩增方案(IL-2 + IL-15);方案2为IL-2 + IL-15 + IL-18;方案3为IL-2 + IL-15 + IL-7;方案4为新型NK培养基(IL-2 + OKT3)。收集天津医科大学附属肿瘤医院生物治疗科2012年2月至2012年4月间10例晚期实体瘤患者的PBMC,按照4种方案进行体外扩增。在体外扩增的0、5、10、15 d,采用流式细胞仪检测各淋巴细胞亚群(尤其是NK细胞)的比例;比较各方案体外扩增15 d后的NK细胞的扩增倍数、淋巴细胞亚群比例变化,并采用LDH法检测各方案扩增产物对人白血病K562细胞的杀伤活性。**结果:**上述4种NK细胞培养方案体外扩增15 d后,细胞总数分别扩增(40.1 ± 20.00)、(44.08 ± 22.09)、(44.82 ± 23.67)、(46.82 ± 25.02)倍,其中NK细胞的扩增倍数分别为(75.86 ± 28.57)、(93.32 ± 32.16)、(88.66 ± 24.94)、(58.88 ± 41.53)倍。NK细胞比例由0 d的(20.44 ± 2.23)%分别扩增至15 d的(48.30 ± 13.90)%、(54.72 ± 12.25)%、(55.94 ± 12.70)%和(54.5 ± 14.93)%;各培养方案组在总细胞扩增倍数、NK细胞扩增倍数上的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。前3种培养方案体外扩增产物的杀伤活性明显高于方案4[(63.40 ± 5.00)%、(77.30 ± 9.40)%、(62.17 ± 5.60)% vs (37.39 ± 10.42)%],均 $P < 0.05$],而方案1、2、3之间体外扩增产物杀伤活性的差异则无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**细胞因子组合对于体外大规模培养NK细胞有着一定的优势,但不同的细胞因子组合(方案1中是否加入IL-18或IL-7)对NK细胞体外大规模扩增的影响差异并不显著;但前3个方案扩增产物对K562细胞的杀伤活性明显强于方案4。

[关键词] NK细胞;IL-2;IL-15;IL-18;IL-7;扩增;K562细胞;杀伤活性

[中图分类号] R733.71; R730.54; R392-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)03-0336-06

Comparison of four kinds of NK cell *in vitro* expansion methods

Wang Xiaomeng¹, Li Ling², Yu Jinpu¹, Li Hui¹, Qi Jing¹, Zhang Peng¹, Yu Wenwen¹, Ren Xiubao¹, Cao Shui^{1△}(1. Key Laboratory of Cancer Tumor Prevention and Therapy of Tianjin City, Department of Biotherapy, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** By comparing the cell immunophenotype, the expansion fold and the cytotoxic activity of the expansion products in various cell culture methods to identify a more effective solution for the *in vitro* expansion of NK cells.

Methods: Four methods for expansion of NK cells from peripheral blood were established, including method one, a classical culture protocol for NK cells (IL-2 + IL-15), method two (IL-2 + IL-15 + IL-18), method three (IL-2 + IL-15 + IL-7), and method four, a novel NK-specific culture medium (IL-2 + OKT3). 10 patients with advanced solid tumors in Department of Biotherapy, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University from February 2012 to April 2012 were obtained, and PBMCs from those patients were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The proportion of different lymphocyte subsets (especially for NK cells) were detected by flow cytometry on 0, 5, 10 and 15 days. The changes of NK cell expansion fold and the proportion of different lymphocyte subsets were detected among 4 groups after expansion *in vitro* for 15 days. The anti-tumor cytotoxicity against human K562 cell line among 4 groups were measured

[基金项目] 天津市科委应用基础面上项目基金资助(No. 11JCYBJC13200);天津医科大学附属肿瘤医院临床试验专项基金资助(No. 11L01)。Project supported by the General Foundation for Applicational Basic Research from Science and Technology Commission of Tianjin City(No. 11JCYBJC13200), and the Special Foundation for Clinical Trial of Affiliated Tumor Hospital, Tianjin Medical University(No. 11L01)

[作者简介] 王晓梦(1988-),女,山东省滨州市人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的基础和临床研究。E-mail: wxmdream1@163.com

[通信作者] 任秀宝(Ren Xiubao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com;曹水(Cao Shui, co-corresponding author), E-mail: caoshui@yahoo.com。△共同通信作者

using LDH assay. **Results:** After expansion for 15 days, the expansion folds of total cells in 4 groups were (40.1 ± 20.00), (44.08 ± 22.09), (44.82 ± 23.67) and (46.82 ± 25.02), respectively. The proportion of NK cells in 4 groups increased from (20.44 ± 2.23)% on day 0 to (48.30 ± 13.90)% , (54.72 ± 12.25)% , (55.94 ± 12.70)% and (54.5 ± 14.93)% on day 15, respectively. The expansion folds of NK cells in 4 groups were (75.86 ± 28.57), (93.32 ± 32.16), (88.66 ± 24.94) and (58.88 ± 41.53), respectively. No significant difference was found on the total cell expansion, NK cell expansion folds among the 4 groups ($P < 0.05$). The cytotoxic activity of the expansion products in methods one, two and three were higher than that of method four *in vitro* ([63.40 ± 5.00]% , [77.30 ± 9.40]% , [62.17 ± 5.60]% vs [37.39 ± 10.42]% , $P < 0.05$). There was no significant difference among the first 3 groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** NK-specific cytokines have great influence on the expansion of NK cells *in vitro*. However, no significant difference is found among various cytokine combinations. The cytotoxic activity of the expansion products in methods one, two and three against K562 cells are significantly higher than that of method four.

[**Key words**] NK cell; IL-2; IL-15; IL-18; IL-7; expansion; K562 cell; cytotoxic activity

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 336-341]

NK 细胞是机体重要的免疫细胞,是机体抵抗肿瘤和病毒感染的第一道防线。NK 细胞在杀伤靶细胞的过程中无 MHC 限制性,可有效杀伤多种肿瘤细胞^[1]。目前,NK 细胞治疗取得了一定的临床疗效,但是正常人体外周血中 NK 细胞数量较少,仅占外周血淋巴细胞的 10% ~ 20%^[2]。因此,如何获得高质量、高纯度的 NK 细胞成为 NK 细胞临床应用最为关键的问题之一^[3]。据报道^[4,5],多种细胞因子组合被广泛应用于 NK 细胞的体外扩增。IL-2 和 IL-15 的联合应用是体外扩增 NK 细胞的经典方案,IL-2 是重要的诱导 NK 细胞增殖的细胞因子;IL-15 可以上调 NK 细胞表面受体的表达,同时促进 CD56⁺ 细胞的扩增^[6]。除此之外,近年来发现其他细胞因子同样可以调节 NK 细胞的活化以及分化。IL-7 可以促进 NK 细胞分化和活化^[7];IL-18 能够诱导 Th1 细胞的活化,提高 NK 细胞的杀伤活性^[8]。研究者在探讨不同细胞因子组合对 NK 细胞体外扩增效果的同时,也对培养基的选择进行了研究,各种新型培养基已经被应用于临床,并取得了令人满意的疗效^[9]。虽然 NK 细胞体外扩增方案很多,但对于不同培养方案添加细胞因子以及不同培养基之间的平行比较尚未报道。为比较不同培养方案对 NK 细胞的体外扩增效率,本研究选取 4 种目前最常用的 NK 细胞培养方案,通过比较不同培养方案体外扩增产物的细胞表型、扩增倍数以及对肿瘤细胞的杀伤活性,试图确定一种最为高效的 NK 细胞体外扩增方案。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集天津医科大学附属肿瘤医院生物治疗科 2012 年 2 月至 2012 年 4 月期间 10 例晚期实体瘤患

者的外周血。患者年龄 50 ~ 56 岁,中位年龄 52 岁。根据 2009 年 UICC 制定的手术病理分期标准进行分期,均属 IV 期病变。所有实体瘤患者均为多轮放疗化疗后,经影像学检查确认无效。所有标本收集均征得患者或家属同意,并签署知情同意书。

1.2 主要试剂

新型 NK 培养基(含 IL-2 + OKT3)购自德国 Cell Genix 公司,无血清培养基(GT-T551)购自日本 TaKaRa 公司。IL-2、IL-15、IL-18 和 IL-7 购自 Pepro Tech 公司。FITC 标记 CD3、CD8、CD45RO、CD45RA 抗体及同型对照 IgG2 α , PE 标记的 CD4、CD25、CCR7 抗体及同型对照 IgG2 α , PerCP 标记的 CD3、CD4、CD45 抗体,APC 标记的 CD127 抗体,均购自美国 Biolegend 公司;PE-CD16 和 PE-CD56 抗体购自美国 BD 公司。LDH 试剂盒购自美国 Promega 公司。K562 为人白血病细胞系,本实验室保存。

1.3 NK 细胞的体外扩增

选取 10 例实体瘤患者外周血 4 ml,采用 Ficoll 法分离出单个核细胞,PBS 洗涤离心 4 次。分别于 1、2、3 组中加入无血清培养基至 20 ml,第 4 组培养瓶中加入新型 NK 培养基 20 ml,加入细胞并调整密度为 2.5×10^6 /ml。各组中加入的细胞因子分别为:方案 1 组 IL-2(10 ng/ml) + IL-15(50 ng/ml);方案 2 组 IL-2(10 ng/ml) + IL-15(50 ng/ml) + IL-18(10 ng/ml);方案 3 组 IL-2(10 ng/ml) + IL-15(50 ng/ml) + IL-7(10 ng/ml);方案 4 组 IL-2(10 ng/ml) + OKT3(10 ng/ml)。连续培养 15 d,每 3 d 补充培养液和所需细胞因子,使得培养液中细胞因子浓度保持不变。

1.4 流式细胞术检测扩增后细胞的表型

分别收集第 0、5、10、15 天的细胞,调整细胞

密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 以 PerCP-CD3、PE-CD4、FITC-CD8、FITC-CD45RO、FITC-CD45RA、PerCP-CD45、PE-CCR7 标记 T 细胞亚群; 以 PerCP-CD4、PE-CD25、APC-CD127 标记 Treg 细胞; FITC-CD3、PE-CD16、PE-CD 56 标记 NK、NKT 细胞, 同时标记 FITC-IgG2 α 、PE-IgG2 α 作为对照进行免疫表型检测。

1.5 LDH 释放法检测扩增后 NK 细胞的杀伤活性

采用 LDH 释放法检测各培养方案的扩增产物中 NK 细胞的杀伤活性。调整效应细胞(NK 细胞)密度至 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、靶细胞(K562 细胞)密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。取 96 孔圆底培养板, 每个样本做 3 个复孔, 按效靶比 40:1、20:1、10:1 加入效应细胞与靶细胞, 并设效应细胞自然释放对照孔(每孔 100 μl 效应细胞 + 100 μl 培养液), 以及最大和最小靶细胞对照孔(每孔 100 μl 靶细胞 + 100 μl 培养液), 再设本底和体积纠正孔(每孔 200 μl 培养液)。将培养板放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中 4 h, 在最大孔和体积纠正孔内加入 20 μl 的裂解缓冲液, 放置 30 min。以 800 $\times g$ 的转速离心 10 min 后, 每孔吸取 50 μl 上清到相应平底培养板, 再在避光的条件下加 50 μl 反应底物, 室温避光 20 ~ 30 min, 待各孔液体颜色转深时加终止液 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。将 96 孔板置于酶标仪中, 检测 492 nm 波长处的光密度(D)值。杀伤率(%) = (实验孔 D 值 - 效应细胞自然释放孔 D 值 - 靶细胞自然释放孔 D 值 + 本底纠正孔 D 值) / (靶细胞最大释放孔 D 值 - 靶细胞自然释放孔 D 值 - 体积纠正孔 D 值 + 本底纠正孔 D 值) $\times 100\%$ 。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种 NK 细胞扩增方案对 NK、NKT、及 CD56⁺ 细胞的影响

10 例实体瘤患者外周血经 4 种方案培养 15 d 后, 对各组细胞总数以及 CD3⁻CD56⁺ NK 细胞、CD3⁺CD56⁺ NKT 细胞及 CD56⁺ 细胞比例进行检测。结果显示, 4 组方案培养 15 d 后细胞总数明显增加, 分别为培养前的(40.1 \pm 20.00)、(44.08 \pm 22.09)、(44.82 \pm 23.67)、(46.82 \pm 25.02)倍; 其中 NK 细胞的扩增倍数分别为(75.86 \pm 28.57)、(93.32 \pm 32.16)、(88.66 \pm 24.94)、(58.88 \pm

41.53)倍。此外, 4 组方案培养后 NK、NKT、及 CD56⁺ 细胞的比例也逐渐增加(图 1), 其中 NK 细胞的比例由 0 d 的(20.44 \pm 2.23)% 分别扩增至 15 d 的(48.30 \pm 13.90)%、(54.72 \pm 12.25)%、(55.94 \pm 12.70)%、(54.5 \pm 14.93)%; NKT 细胞的比例由 0 d 的(3.88 \pm 1.30)% 分别扩增至 15 d 的(7.46 \pm 2.93)%、(9.28 \pm 4.20)%、(7.52 \pm 2.41)%、(6.64 \pm 3.58)%; CD56⁺ 细胞的比例由 0 d 的(24.32 \pm 0.96)% 分别扩增至 15 d 的(55.76 \pm 12.68)%、(64.00 \pm 10.81)%、(63.46 \pm 12.15)%、(61.14 \pm 16.16)% (图 2)。但各组间 NK、NKT、及 CD56⁺ 细胞扩增倍数以及比例之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

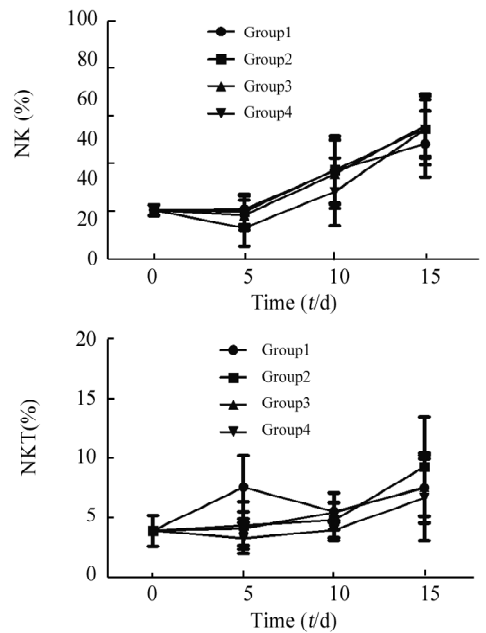


图 1 4 种扩增方案体外扩增后 NK、NKT 细胞的比例

Fig.1 Proportions of NK, NKT cells after expansion by four kinds of expansion methods

Group 1: IL-2 + IL-15; Group 2: IL-2 + IL-15 + IL-18; Group 3: IL-2 + IL-15 + IL-7; Group 4: IL-2 + OKT3

2.2 4 组扩增方案对于 T 细胞亚群比例的影响

本研究进一步对 4 组体外扩增方案扩增后不同 T 细胞亚群的比例进行了分析。结果(图 3)显示, 4 种扩增方案培养后 Treg 细胞比例的明显降低[(4.5 \pm 1.32)% vs (0.72 \pm 0.23)%、(2.20 \pm 1.24)%、(0.88 \pm 0.35)%、(1.16 \pm 0.55)%], $P < 0.05$ 。此外, 方案 1 培养组体外培养 15 d 后, CD4 细胞比例降低[(51.80 \pm 13.27)% vs (35.24 \pm

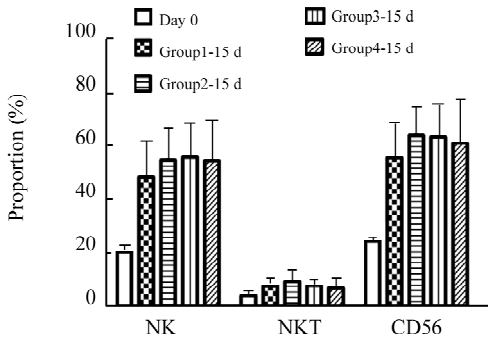


图2 4种扩增方案扩增15 d后NK,NK-T及CD56⁺细胞的比例

Fig. 2 Proportions of NK, NKT and CD56⁺ cells after expansion by four kinds of expansion methods for 15 d

Group 1: IL-2 + IL-15; Group 2: IL-2 + IL-15 + IL-18;
Group 3: IL-2 + IL-15 + IL-7; Group 4: IL-2 + OKT3

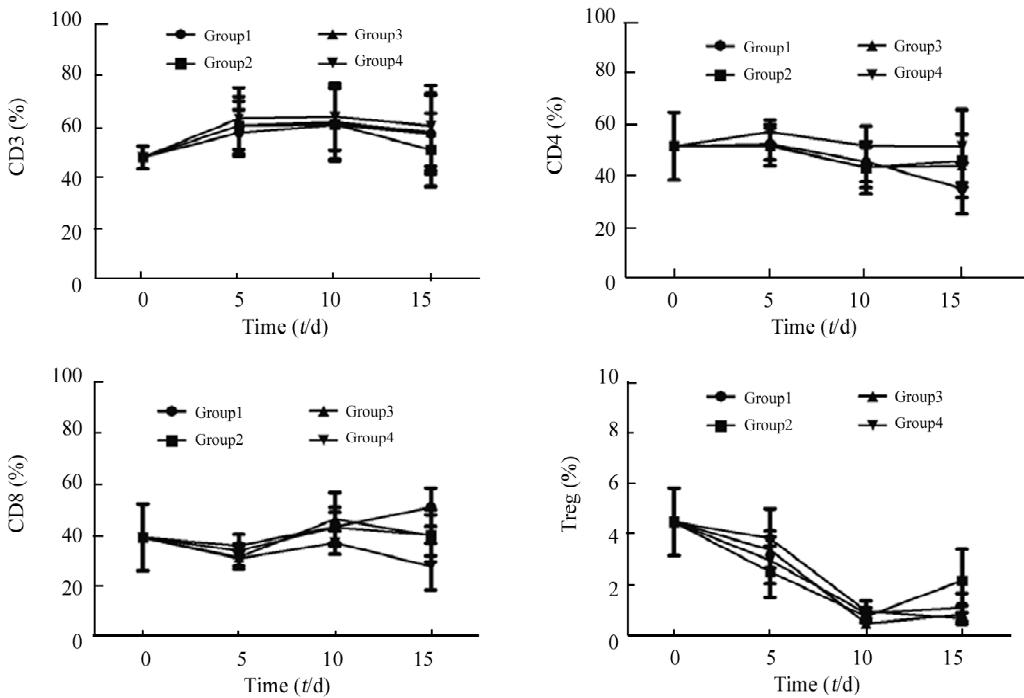


图3 4种方案扩增15 d后不同T细胞亚群的比例

Fig. 3 Proportions of different T cell subsets after expansion by four kinds of methods for 15 d

Group 1: IL-2 + IL-15; Group 2: IL-2 + IL-15 + IL-18; Group 3: IL-2 + IL-15 + IL-7; Group 4: IL-2 + OKT3

3 讨论

NK 细胞是一种天然免疫系统的效应细胞,主要来源于骨髓 CD34⁺ 淋巴细胞^[2],无需抗原致敏和 MHC 的限制即可以识别并且杀伤肿瘤细胞^[10];同时,又可以分泌多种细胞因子和趋化因子,调节获得

性免疫应答,是连接固有免疫应答和获得性免疫应答的桥梁^[11]。NK 细胞在恶性肿瘤的临床治疗中发挥了重要的作用^[12-13],尤其是异体 NK 细胞对肿瘤的治疗处于临床试验阶段^[14],异体 NK 细胞可以促进造血干细胞植入、降低 GVHD 的发生以及增强移植植物抗白血病 (graft versus leukemia, GVL) 效应

2.3 4种扩增方案对NK细胞杀伤活性的影响

经过4种方案体外扩增15 d之后,不同培养方案扩增产物对靶细胞 K562 均表现出较强的杀伤活性。在效靶比为 40:1 时,前3组培养方案的 NK 细胞杀伤活性明显高于方案 4 [(63.40 ± 5.00)%、(77.30 ± 9.40)%、(62.17 ± 5.60)% vs (37.39 ± 10.42)% , P < 0.05],但是前3组方案之间的差异无统计学意义 (P > 0.05) (图4)。

等^[15-17]。因此,如何通过体外扩增的方法获取大量高质量的NK细胞成为近年来人们研究的重点。

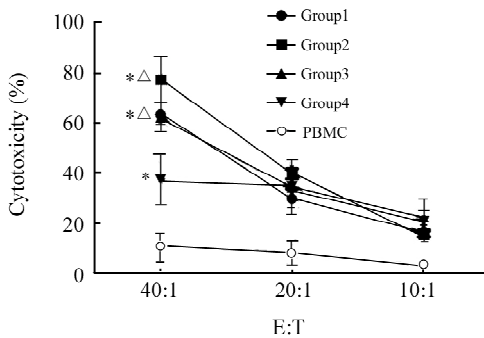


图4 4种扩增方案培养15 d后NK细胞的杀伤活性

Fig. 4 Cytotoxicity of NK cells after expansion by four kinds of methods for 15 d

Group1: IL-2 + IL-15; Group2: IL-2 + IL-15 + IL-18;
Group3: IL-2 + IL-15 + IL-7; Group4: IL-2 + OKT3
* $P < 0.05$ vs PBMC group; $\Delta P < 0.05$ vs Group 4

研究^[18]发现,骨髓CD34⁺细胞并无抑制K562细胞增殖的能力,只有经过IL-2等细胞因子诱导培养后,CD34⁺细胞定向分化为CD56⁺细胞,才可抑制K562细胞的增殖。IL-2具有激活NK细胞、促进NK细胞分化和产生细胞因子的能力,NK细胞可通过细胞接触的方式抑制K562细胞的增殖。IL-15不仅可以上调NK细胞表面的活化性受体(如CD16和NKG2D)的表达,产生大量的IFN- γ ,还可以诱导骨髓CD34⁺细胞分化为NK细胞^[19-20]。IL-2和(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1),促进靶细胞间的结合^[7]。除以上两种细胞因子外,IL-15联合应用可诱导产生白细胞功能相关抗原-1IL-7可以促进NK细胞分化,诱导产生颗粒酶和穿孔素。IL-18可活化Th1细胞产生大量的IFN- γ ,同时还可以通过Fas-FasL途径增强其杀伤作用^[8,21]。除了各种细胞因子之外,目前新型NK培养基在NK细胞体外扩增过程中的作用亦不容忽视,但是缺乏对于各种NK细胞培养方案进行平行比较的报道,故本研究针对4种常用的NK细胞体外扩增方案进行了比较。

在NK细胞体外扩增的过程中,不同细胞因子的刺激可以促进NK细胞增殖、分化^[19-20],也可促进T细胞亚群的增殖、分化。细胞毒性T细胞(CD8⁺)、辅助性T细胞(CD4⁺)细胞和Treg是T细胞发挥细胞免疫的重要组成部分,其数量与比例反映了机体的细胞免疫情况。NKT细胞的细胞表面

分子表型以CD3⁺CD56⁺为特征,主要通过NKG2D受体途径增强机体的抗肿瘤效应。不同T细胞亚群及NK、NKT细胞检测对于过继免疫治疗的预后判断具有重要意义。本研究发现,目前常用的4种NK细胞体外扩增方案扩增产物在扩增倍数、细胞表型上并没有明显差异;但在NK杀伤活性方面,经过体外大规模扩增之后,方案1(IL-2 + IL-15)、方案2(IL-2 + IL-15 + IL-18)和方案3(IL-2 + IL-15 + IL-7)扩增产物的杀伤活性明显优于方案4,然而方案1~3间NK细胞杀伤活性无差异($P > 0.05$)。因此,加入IL-18或IL-7对于NK细胞体外扩增的影响不大,方案1以最少的细胞因子组合作为NK细胞体外扩增的经典方案展现出了一定的优势。本研究为NK细胞体外扩增方案的选择提供了可靠的基础研究,在此基础上,可以进一步地探讨和优化扩增方案,从而获得高效高纯度的NK细胞。

[参考文献]

- [1] Balsamo M, Pietra G, Vermi W, et al. Melanoma immunoediting by NK cells [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(9): 1607-1609.
- [2] Zamai L, Ponti C, Mirandola P, et al. NK cells and cancer [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4011-4016.
- [3] Suck G, Koh MB. Emerging natural killer cell immunotherapies: Large-scale *ex vivo* production of highly potent anticancer effectors [J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2010, 3(3): 135-142.
- [4] Klingemann HG, Martinson J. *Ex vivo* expansion of natural killer cells for clinical applications [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(1): 15-22.
- [5] Pillet AH, Theze J, Rose T. Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes [J]. *Hum Immunol*, 2011, 72(11): 1013-1017.
- [6] Boyiadzis M, Memon S, Carson J, et al. Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 levels [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, 14(3): 290-300.
- [7] Barao I, Hudig D, Ascensao JL. IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34⁺ Lin⁻ bone marrow cells [J]. *J Immunol*, 2003, 171(2): 683-690.
- [8] Taniguchi M, Nagaoka K, Kunikata T, et al. Characterization of anti-human interleukin-18 (IL-18)/interferon-gamma-inducing factor (IGIF) monoclonal antibodies and their application in the measurement of human IL-18 by ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 206(1/2): 107-113.
- [9] Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, et al. Expansion of cytotoxic CD3⁺CD56⁺ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001, 7(4): 216-222.
- [10] Willemze R, Ruggeri A, Purtill D, et al. Is there an impact of kil-

- ler cell immunoglobulin-like receptors and KIR-ligand incompatibilities on outcomes after unrelated cord blood stem cell transplantation? [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010, 23(2): 283-290.
- [11] Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. Regulatory NK cells in autoimmune disease [J]. *J Autoimmun*, 2012, 39(3): 206-215.
- [12] Murphy WJ, Parham P, Miller JS. NK cells-from bench to clinic [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18(Suppl 1): S2-S7.
- [13] Liu RB, Engels B, Arina A, et al. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(8): 1964-1974.
- [14] Cho D, Shook DR, Shimasaki N, et al. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(15): 3901-3909.
- [15] Levy EM, Roberti MP, Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: From biological functions to clinical applications [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 676198-676208.
- [16] 李玲, 于津浦, 任秀宝. 异体 NK 细胞在恶性肿瘤临床治疗中的研究进展 [J]. *国际免疫学杂志*, 2011, 34(6): 357-360.
- [17] Boyiadzis M, Foon KA, Herberman RB. NK cells in cancer immunotherapy: Three decades of discovery [J]. *Discov Med*, 2006, 6(36): 243-248.
- [18] Sconocchia G, Provenzano M, Rezvani K, et al. CD34⁺ cells cultured in stem cell factor and interleukin-2 generate CD56⁺ cells with antiproliferative effects on tumor cell lines [J]. *J Transl Med*, 2005, 3(1): 15-22.
- [19] Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56⁺ natural killer cells from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 1996, 87(7): 2632-2640.
- [20] Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(2): 99-108.
- [21] French AR, Holroyd EB, Yang L, et al. IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation [J]. *Cytokine*, 2006, 35(5/6): 229-234.
- [收稿日期] 2013 - 02 - 25 [修回日期] 2013 - 04 - 16
[本文编辑] 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]// 专著主要责任者. 专著题名. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [M]// Soderman WA Jr, Soderman WA. *Pathologic physiology: Mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页.

- [1] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21370-21381.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/ 文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

- [1] Christine M. *Plant physiology: Plant biology in the genome era* [J/OL]. *Science*, 1998, 281: 331-332 [1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.