

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.013

去甲斑蝥素增强 IL-15 活化的 PBMC 对白血病 KG1a 细胞的杀伤作用

贺艳杰, 李玉华, 邓兰, 何颖芝, 郭坤元 (南方医科大学珠江医院血液科, 广东广州 510282)

[摘要] **目的:**探讨去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是否能增强 IL-15 活化的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对人急性髓系白血病 KG1a 细胞的杀伤作用及其可能机制。**方法:**锥虫蓝拒染法、CCK-8 法检测 NCTD 对 KG1a 细胞增殖的影响,流式细胞术检测 NCTD 对 KG1a 细胞周期的影响,LDH 释放法检测 IL-15 活化的 PBMC(IL-15-PBMC)对 NCTD 处理后 KG1a 细胞的细胞毒活性,流式细胞术检测 KG1a 细胞表面 NKG2D(natural killer group 2 member D)配体的表达。**结果:**NCTD 有效抑制白血病 KG1a 细胞的增殖,呈时间($r=0.398, P=0.000$)和剂量依赖性($r=0.861, P=0.000$),并阻滞 KG1a 细胞周期于 G₂/M 期;4 μg/ml 以下的 NCTD 对 IL-15-PBMC 没有明显的增殖抑制作用($P>0.05$)。当效靶比为 10:1 和 20:1 时,IL-15-PBMC 对 0.125 μg/ml NCTD 处理后 KG1a 细胞的杀伤率较对照组明显增加[志愿者 A:(37.44 ± 5.78)% vs (9.33 ± 1.69)%, (38.33 ± 3.07)% vs (16.75 ± 1.20)%; $P<0.05$]。NCTD 不影响 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体蛋白的表达($P>0.05$)。**结论:**NCTD 能增强 IL-15-PBMC 对白血病 KG1a 细胞的杀伤作用,可能与抑制细胞增殖、阻滞细胞周期于 G₂/M 期有关。

[关键词] 去甲斑蝥素;白血病;KG1a 细胞;IL-15;外周血单个核细胞;NKG2D 配体

[中图分类号] R733.7; R730.54; R730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2013)05-0580-06

Norcantharidin enhances cytotoxicity of IL-15 activated PBMCs on leukemic KG1a cells

He Yanjie, Li Yuhua, Deng Lan, He Yingzhi, Guo Kunyuan (Department of Hematology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether norcantharidin (NCTD) can enhance the cytotoxicity of IL-15 activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) on human acute myeloblastic leukemic KG1a cells and its underlying mechanism. **Methods:** The effect of NCTD on the proliferation of KG1a cells was detected by typan blue assay and CCK-8 assay. The effect of NCTD on the cell cycle of KG1a cells was examined by flow cytometry. The cytotoxicity of IL-15 activated PBMCs (IL-15-PBMCs) against NCTD treated-KG1a cells was detected by LDH releasing assay. The expressions of NKG2D (natural killer group 2 member D) ligands on KG1a cells were detected by flow cytometry. **Results:** NCTD effectively inhibited the proliferation of leukemic KG1a cells, in a time- ($r=0.398, P=0.000$) and dose-dependent manner ($r=0.861, P=0.000$), and arrested KG1a cell cycle at G₂/M phase. NCTD within a concentration of 4.00 μg/ml has no obvious cytotoxicity on the IL-15 activated PBMCs (IL-15-PBMCs) ($P>0.05$). Compared with the control group, the cytotoxic rate of IL-15-PBMCs on 0.125 μg/ml NCTD treated-KG1a cells was significantly increased (donor A: [37.44 ± 5.78] % vs [9.33 ± 1.69] %, [38.33 ± 3.07] % vs [16.75 ± 1.20] %, $P<0.05$). NCTD treatment showed no effect on expressions level of NKG2D ligands on KG1a cell surface ($P>0.05$). **Conclusion:** NCTD can enhance the cytotoxicity of IL-15-PBMCs on leukemic KG1a cells, which is possibly related to the inhibition of proliferation of KG1a cells and cell cycle arrest in G₂/M phase.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973454);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(No. NCET-09-0087)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973454), and the Program of Ministry of Education for New Century Excellent (No. NCET-09-0087)

[作者简介] 贺艳杰(1981-),女,内蒙古赤峰市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail:hyjgz2006@163.com

[通信作者] 郭坤元(Guo Kunyuan, corresponding author), E-mail:gzzyuan@pub. Guangzhou. gd. en

[**Key words**] norcantharidin; leukemia; KG1a cell; IL-15; peripheral blood mononuclear cell; NKG2D ligand

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 580-585]

急性髓系白血病(acute myeloblastic leukemia, AML)是一种以成髓细胞失控性增殖为特征的危及生命的恶性疾病,AML 的临床进展和预后与侵袭细胞类型、基因遗传学改变及克隆的生物学特性紧密相关。临床上针对 AML 治疗的化疗药物或靶向药物虽然能够提高完全缓解(complete remission, CR)率,但基于 AML 中存在具有自我更新和增殖的干细胞群^[1],故患者体内有可能存在无法清除的白血病微小克隆而导致缓解后复发。因此,寻找有效治疗 AML 的天然或合成药物已经成为肿瘤研究者研究的目标之一。KG1a 细胞株来源于一例由红白血病进展为急性髓系白血病的男性患者^[2],是由表达 CD34⁺CD38⁻ 的未分化原始细胞组成的细胞系,是研究筛选对 AML 有效药物的良好细胞模型。

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是斑蝥素的衍生物^[3],是一种特异性蛋白磷酸酶抑制药,具有显著的抗肿瘤活性,在临床上广泛应用于多种肿瘤的治疗,并能够增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,从而显著提高药物的临床疗效^[4-7]。免疫细胞治疗技术在 2009 年被纳入国家第三类医疗技术范畴,作为肿瘤治疗的方法之一,显示出一定的临床疗效。但是,临床上使用的大多数抗肿瘤药物对机体的免疫细胞均具有抑制作用,限制了免疫细胞治疗技术的应用。与其他抗肿瘤药物不同,NCTD 在杀伤肿瘤细胞的同时,具有提高白细胞数量的作用^[8]。NCTD 对被激活的免疫细胞有怎样的作用? 是否能够激发其免疫活性? 本研究旨在了解 NCTD 是否能够增强 IL-15 活化的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)对急性髓系白血病细胞杀伤的作用,并探讨其作用机制,以明确 NCTD 联合免疫细胞的抗肿瘤效果,为 AML 的治疗提供新的可行性方案。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

人急性髓系白血病细胞株 KG1a 由本实验室长期保存,培养体系为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,常规培养于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中。RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,0.4% 锥虫蓝染液购自 Gibco 公司,人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司,CCK-8 试剂盒购自上海同仁化学研究所,LDH

杀伤活性检测试剂盒购自 Promega 公司,重组人白细胞介素 15(recombinant human interleukin-15, rhIL-15)购自 PeproTech 公司,NCTD 由贵州益佰制药股份有限公司惠赠。

1.2 IL-15 活化的 PBMC 的诱导和培养

采用常规密度梯度离心法分离 PBMC:健康志愿者经签订知情同意后,无菌抽取其外周静脉血,肝素抗凝,Ficon-Hypaque 人淋巴细胞分离液分离 PBMC,小心吸取血浆层和淋巴细胞分离液交界面的单个核细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 次,锥虫蓝染色法检测细胞活力。将分离所得 PBMC 调整细胞密度至 2×10^6 /ml,接种至培养瓶中常规培养,并加入 rhIL-15(终浓度 20 ng/ml)进行诱导,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天半换液,培养 5 d 后收集细胞,即 IL-15-PBMC。

1.3 锥虫蓝拒染法检测 KG1a 细胞的增殖

收集处于对数生长期的 KG1a 细胞,将细胞密度调整至 1×10^5 /ml,于无菌条件下接种于 12 孔板,常规培养 12 h 后加入 NCTD,使其终质量浓度分别达到 0.075、0.15、0.30、0.60、1.20 μg/ml。以培养液作为空白对照,未加药物的 KG1a 细胞作为阴性对照,每组设 3 个复孔,加药后将 12 孔板放于水平摇床上缓慢摇匀,使药物与细胞之间得以充分接触。37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,分别在药物作用 12、24、36 h 后,采用锥虫蓝拒染法计数各组细胞的存活情况。细胞增殖抑制率(%) = (对照组存活细胞总数 - 实验组存活细胞总数) / 对照组存活细胞总数 × 100%。

1.5 流式细胞术检测 KG1a 细胞的细胞周期

取对数生长期 KG1a 细胞,按 1×10^5 /ml 细胞密度接种于培养瓶中常规培养,12 h 后加入 NCTD,使其终质量浓度分别达到 0.125、0.25、0.50 μg/ml。分别在药物作用 6、12、24 h 后离心收集细胞,PBS 缓冲液洗涤 2 次,加入 70% 冰乙醇重悬细胞,4 ℃ 固定过夜,离心弃上清,以 PBS 缓冲液洗涤洗细胞,加入 500 μl PBS 缓冲液,4 ℃ 避光孵育 30 min,PBS 缓冲液洗涤 2 次,流式细胞仪检测 KG1a 细胞的细胞周期。

1.6 CCK8 法检测 NCTD 对 IL-15-PBMC 增殖的影响

调整 IL-15-PBMC 密度至 1×10^5 /ml,接种 96 孔板,细胞常规培养 12 h 后加入 NCTD,使其终质量浓度分别达到 0.125、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 μg/ml,每组设 3 个复孔,以基础培养基作为空白对

照,未加药的 IL-15-PBMC 作为正常对照组。将培养板放于水平摇床上缓慢摇晃,使药物在体系中充分混匀。NCTD 作用 24 h 后,向各组中加入 10 μl CCK-8 溶液,孵育 4 h,酶标仪检测 450 nm 波长处每孔光密度 D 值。细胞的增殖抑制率(%)=(对照组细胞 D 值-加药组细胞 D 值)/对照组细胞 D 值 \times 100%。

1.7 LDH 释放法检测 IL-15-PBMC 对 NCTD 处理后 KG1a 细胞的杀伤作用

采用 LDH 释放测定法,参照试剂盒说明书,以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞密度将处于对数生长期的 KG1a 细胞接种至培养瓶中,常规培养 12 h 后加入 NCTD,使其终质量浓度分别至 0.125、0.25、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。NCTD 处理细胞 24 h 后,收集细胞并计数。以 NCTD 处理后的 KG1a 细胞作为靶细胞,将其以 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞密度接种于 96 孔板,常规培养 12 h 后,按效靶比为 10:1 和 20:1 加入 IL-15-PBMC,孵育 4 h,加入裂解液至培养基容积纠正孔和靶细胞 LDH 最大释放孔,孵育后离心取上清,加入 50 μl 底物,室温避光孵育 30 min,加入反应终止液。酶标仪检测 490 nm 波长处光密度 D 值。杀伤率(%)=(实验孔 D 值-靶细胞自发释放孔 D 值-效应细胞自发释放孔 D 值)/(靶细胞最大释放孔 D 值-靶细胞自发释放孔 D 值) \times 100%。

1.8 流式细胞术检测 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体的表达

收集对数生长期 KG1a 细胞,按 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞密度接种至培养瓶,12 h 后加入 NCTD,使其终质量浓度分别至 0.125、0.25、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。NCTD 处理 KG1a 细胞 24 h 后收集细胞,离心 5 min,预冷 PBS 重悬细胞,分别加入 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单克隆抗体 20 μl (25 mg/L),同型对照 IgG2A、IgG2B 作为阴性对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,预冷 PBS 洗涤后重悬细胞,加入 PE 标记的山羊抗小鼠 IgG1,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,预冷 PBS 洗涤 2 次后重悬细胞。流式细胞仪检测样品荧光强度,并计算 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体的表达。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间比较采用独立样本 t 检验、单因素方差分析和析因设计的方差分析;方差齐时,组间比较采用 LSD 法,方差不齐时,组间比较采用 Tamhane's T2 法。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NCTD 抑制白血病 KG1a 细胞的增殖

锥虫蓝染色法检测 NCTD 对白血病 KG1a 细胞增殖的影响,结果(图 1)显示,NCTD 能明显抑制 KG1a 细胞的增殖,其作用呈时间($r = 0.398, P = 0.000$)和剂量依赖性($r = 0.861, P = 0.000$)。NCTD 处理 KG1a 细胞 12、24、36 h 后,NCTD 对 KG1a 细胞的 IC_{50} 值分别为 1.10、0.51、0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果提示,NCTD 对 KG1a 细胞的增殖具有抑制作用。

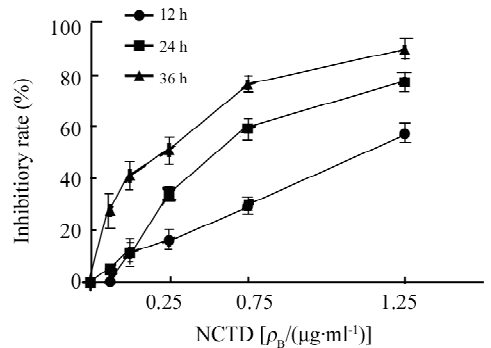


图 1 NCTD 抑制白血病 KG1a 细胞的增殖

Fig. 1 NCTD inhibited proliferation of leukemia KG1a cells

2.2 NCTD 阻滞白血病 KG1a 细胞周期于 G_2/M 期
流式细胞仪检测结果(表 1)显示,NCTD 作用后可导致 KG1a 细胞的周期发生改变,表现为 G_0/G_1 期细胞比例下降, G_2/M 期细胞比例增高,不同浓度 NCTD 作用 24 h 后可导致 KG1a 细胞周期阻滞于 G_2/M 期($P < 0.05$)。结果提示,NCTD 对 KG1a 细胞的周期阻滞作用具有浓度依赖性($r = 0.536, P = 0.000$)和时间依赖性($r = 0.598, P = 0.000$)。

2.3 NCTD 对 IL-15-PBMC 的毒性作用

本研究继续探讨 NCTD 对 IL-15-PBMC 的毒性作用,结果(表 2)显示,NCTD(4.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度以下)对不同个体来源的 IL-15-PBMC 没有明显的毒性作用,低浓度(0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)NCTD 对 IL-15-PBMC 还有一定程度的促增殖作用。

2.4 NCTD 增强 IL-15-PBMC 对白血病 KG1a 细胞的杀伤作用

LDH 释放测定法检测结果(图 2)显示,不同志愿者来源的 IL-15-PBMC 在效靶比 10:1 和 20:1 时,对 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD 处理后 KG1a 细胞的杀伤作用较对照组(未经 NCTD 处理的 KG1a 细胞)明显提高[志愿者 A:(37.44 \pm 5.78)% vs (9.33 \pm 1.69)%, (38.33 \pm 3.07) vs (16.75 \pm 1.20)%;志愿者 B:(51.41 \pm 3.74)% vs (33.07 \pm 2.20)%, (78.12 \pm 3.72)% vs (48.73 \pm 0.82)%;志愿者 C:

(36.99 ± 4.83)% vs (17.62 ± 1.20)% , (92.00 ± 8.54)% vs (63.20 ± 3.93)% ; 均 $P < 0.05$]。结果

提示, NCTD 能增强 IL-15-PBMC 对白血病 KG1a 细胞的杀伤作用。

表 1 NCTD 阻滞白血病 KG1a 细胞周期于 G₂/M 期($\bar{x} \pm s$, %)

Tab.1 NCTD arrested cell cycle of leukemia KG1a cells at G₂/M phase ($\bar{x} \pm s$, %)

NCTD [$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]	6 h		12 h		24 h	
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	G ₂ /M
0.00	58.87 ± 1.24	6.80 ± 0.85	58.87 ± 1.24	6.80 ± 0.85	58.87 ± 1.24	6.80 ± 0.85
0.125	53.03 ± 2.10	11.10 ± 1.87	50.27 ± 2.39*	13.90 ± 2.60	46.43 ± 1.29*	16.67 ± 0.60*
0.25	51.37 ± 1.70*	12.60 ± 2.61*	47.43 ± 0.87*	16.67 ± 2.15*	41.67 ± 2.01**	22.17 ± 3.90*
0.50	46.43 ± 1.29*	16.67 ± 0.60*	41.67 ± 2.01*	22.17 ± 3.90*	32.37 ± 3.79**	31.07 ± 2.95**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group

表 2 NCTD 对 IL-15-PBMC 的毒性作用($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, %)

Tab. 2 Cytotoxicity of NCTD against IL-15 activated PBMCs($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, %)

NCTD [$\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]	Volunteer A	Volunteer B	Volunteer C
0.25	112.89 ± 6.44	106.28 ± 10.60	126.11 ± 4.52
0.50	104.13 ± 11.68	99.40 ± 13.33	108.70 ± 9.17
1.00	95.36 ± 7.31	90.96 ± 11.29	121.76 ± 7.98
2.00	100.52 ± 7.79	82.52 ± 9.96	102.61 ± 6.91
4.00	96.91 ± 0.89	92.16 ± 2.76	126.11 ± 2.61

2.5 NCTD 对 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体蛋白表达的影响

流式细胞仪检测结果(图 3)显示,不同质量浓度 NCTD 处理后 KG1a 细胞表面 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2 和 ULBP3 蛋白的表达率组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 NCTD 并不能提高 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体的表达。

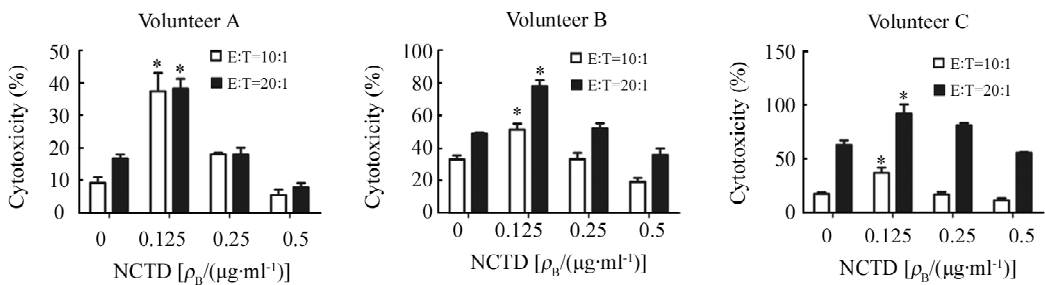


图 2 NCTD 增强 IL-15-PBMC 对白血病 KG1a 细胞的杀伤作用

Fig. 2 Cytotoxicity of IL-15 activated PBMCs to leukemia KG1a cells enhanced by NCTD

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NCTD group

3 讨论

研究证实, NCTD 能够抑制肝癌、胃癌、食管癌、胆囊癌等多种肿瘤细胞增殖, 并且具有抑制荷瘤小鼠体内肿瘤生长、延长小鼠生存期的作用。NCTD 的抗肿瘤机制包括阻断 DNA 合成、阻滞细胞周期、调控 P53 和 Bcl-2 基因表达, 调控 caspase 依赖线粒

体途径, 诱导细胞凋亡等^[9-12]。本研究结果显示, NCTD 能够有效抑制白血病 KG1a 细胞的增殖, 其作用具有时间和剂量依赖性; 同时, NCTD 作用后, 处于 G₂/M 期的 KG1a 细胞比例明显增加, G₀/G₁ 期细胞比例显著降低($P < 0.05$), 提示 NCTD 抑制 KG1a 细胞增殖的作用机制可能与诱导细胞周期阻滞有关。

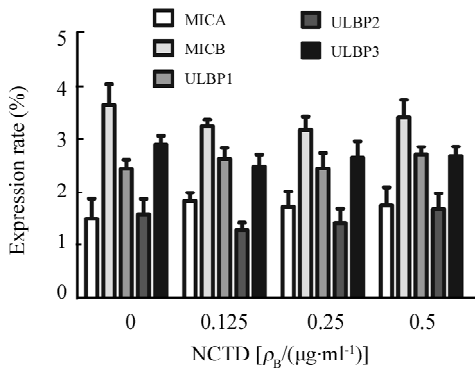


图3 NCTD处理后 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体的表达

Fig. 3 Expression of NKG2D ligands on KG1a cell surface after NCTD treatment

NKG2D 分子是 NK 细胞和 CD8⁺ T 细胞表面的活化型受体,与靶细胞(如肿瘤细胞)表面相应的配体结合产生活化信号,从而杀伤靶细胞^[13]。本实验室经长期研究,建立了一种以 rhIL-15 为干预因素、诱导 PBMC 的培养体系,经此培养体系诱导产生的细胞中 NKG2D⁺ 细胞比例可升高至 44.04%^[14],并具有更强的非特异性杀伤肿瘤细胞的功能,这与 Decot 等^[15]的研究结果一致。为探讨 NCTD 对 IL-15-PBMC 的毒性作用,本研究采用三位志愿者的外周血分别诱导产生 IL-15-PBMC,结果显示,实验中所用高浓度 NCTD (0.50 µg/ml)对 IL-15-PBMC 没有明显的毒性作用,而 0.25 µg/ml 浓度的 NCTD 对于 IL-15-PBMC 还有一定程度的促增殖作用,说明在能够有效抑制 KG1a 细胞增殖的剂量范围内, NCTD 对正常免疫细胞没有毒性作用,并验证了 NCTD 具有升高白细胞数量的特征性作用^[16]。

研究^[17-18]发现,肿瘤细胞在发生发展过程中与机体内的免疫细胞相互作用,经过免疫编辑后产生免疫耐受性,对免疫细胞的敏感性下降,多种药物均可通过上调肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达,增强其对免疫杀伤细胞的敏感性^[19-21]。为了探讨 NCTD 是否具有同样的作用,本实验以 NCTD 处理后 KG1a 细胞为靶细胞,不同志愿者来源的 IL-15-PBMC 为效应细胞,观察 NCTD 是否能够影响 KG1a 细胞对 IL-15-PBMC 的杀伤敏感性,并采用流式细胞仪检测 KG1a 细胞表面 NKG2D 配体表达情况。实验结果显示:不同个体来源的 IL-15-PBMC 对 KG1a 细胞的杀伤活性有高有低,在效靶比 20:1 时, IL-15-PBMC 对 KG1a 细胞的杀伤力显著高于效靶比为 10:1 时;不同浓度 NCTD 对 KG1a 细胞的影响

也有所不同,0.125 µg/ml NCTD 能够有效增强 KG1a 细胞对 IL-15-PBMC 的杀伤敏感性,而其他两组浓度的 NCTD 则未表现出这种效应;流式细胞术检测 NKG2D 配体结果显示,KG1a 细胞本身 NKG2D 配体表达率极低,NCTD 作用于 KG1a 细胞后,细胞表面 NKG2D 配体的表达水平与对照组相比无统计学差异。以上数据提示,不同志愿者来源的 IL-15-PBMC 对白血病细胞的杀伤能力有所差异,NCTD 处理后的 KG1a 细胞仍然可以被 IL-15-PBMC 杀伤,并且在适宜的浓度条件下(本实验中显示为 0.125 µg/ml),NCTD 具有调节 KG1a 细胞对免疫细胞杀伤敏感性的作用,但是其作用机制与调节肿瘤细胞表面 NKG2D 配体的表达无关,NCTD 对 KG1a 细胞的调节靶点需要进一步研究进行探索。

[参考文献]

- [1] Misaghian N, Ligresti G, Steelman LS, et al. Targeting the leukemic stem cell: The holy grail of leukemia therapy [J]. *Leukemia*, 2009, 23(1): 25-42.
- [2] HP Koefler, R Billing, AJ Lusic, et al. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1) [J]. *Blood*, 1980, 56(2): 265-273.
- [3] Massicot F, Dutertre-Catella H, Pham-Huy C, et al. *In vitro* assessment of renal toxicity and inflammatory events of two protein phosphatase inhibitors cantharidin and norcantharidin [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005, 96(1): 26-32.
- [4] Hill A, Stewart SG, Sauer B, et al. Heterocyclic substituted cantharidin and norcantharidin analogues-synthesis, protein phosphatase (1 and 2A) inhibition, and anti-cancer activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(12): 3392-3397.
- [5] Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, et al. Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells *in vitro* [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1): 72-80.
- [6] Lee YC, Lee LM, Yang CH, et al. Norcantharidin suppresses cell growth and migration with enhanced anticancer activity of gefitinib and cisplatin in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 237-243.
- [7] Chang C, Zhu Y, Tang X, et al. The anti-proliferative effects of norcantharidin on human HepG2 cells in cell culture [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 163-169.
- [8] Yan MS, Xiue S, Wei LX, et al. The preliminary observation on immunosuppressive effect of norcantharidin in mice [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1993, 15(1): 79-85.
- [9] 张金梅, 吴杰, 常城, 等. 去甲斑蝥素对肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(1): 33-37.
- [10] Dong X, Li JC, Jiang YY, et al. P38-NF-κB-promoted mitochondria-associated apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in norcantharidin-treated HeLa cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(11): 1008-1019.
- [11] Yang PY, Chen MF, Tsai CH, et al. Involvement of caspase and

- MAPK activities in norcantharidin-induced colorectal cancer cell apoptosis [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(3): 766-775.
- [12] Du HF, Yu LJ, Meng YF, et al. Norcantharidin enhances bortezomib-antimyeloma activity in multiple myeloma cells *in vitro* and in nude mouse xenografts [J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(3): 607-618.
- [13] Barber A, Rynda A, Sentman CL. Chimeric NKG2D expressing T cells eliminate immunosuppression and activate immunity within the ovarian tumor microenvironment [J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 6939-6947.
- [14] 贾振薇, 郭坤元, 孙明, 等. 白藜芦醇提高 CD34⁺ CD38⁻ KG1a 白血病细胞对人外周血单个核细胞的杀伤敏感 [J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(7): 622-625.
- [15] Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: Comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38(5): 351-362.
- [16] Deng L, Tang S. Norcantharidin analogues: A patent review (2006-2010) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(11): 1743-1753.
- [17] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state [J]. *Nature*, 2007, 450(7171): 903-907.
- [18] Poggi A, Massaro AM, Negrini S, et al. Tumor-induced apoptosis of human IL-2 activated NK cells: Role of natural cytotoxicity receptors [J]. *J Immunol*, 2005, 174(5): 2653-2660.
- [19] Elsner L, Muppala V, Gehrmann M, et al. The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands [J]. *J Immunol*, 2007, 179(8): 5523-5533.
- [20] Zhang C, Wang Y, Zhou Z, et al. Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lysis [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(8): 1275-1285.
- [21] Hu L, Cao D, Li Y, et al. Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1 cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytotoxicity through NKG2D ligands and TRAIL receptors [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 516-526.
- [收稿日期] 2013 - 05 - 08 [修回日期] 2013 - 07 - 22
[本文编辑] 韩丹, 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库源期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊和开放获取(OA)期刊。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。双月刊,每双月底 20 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 12 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 11 国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 12.00 元,全年定价 72.00 元。邮发代号: 4-576,请通过邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 72.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人:韩丹

联系电话: 021-55620605 × 22, 021-81871002 × 22

传真: 021-81871007

网址: www.biother.org

电子邮箱: cjcb@biother.org