

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.004

· 基础研究 ·

肝癌特异性靶标致敏 DC 诱导 CIK 细胞对肝癌 HuH-7 细胞及移植瘤的抑制

杨晓亚, 高裕华, 刘素蕊, 李焯, 马印图, 高军, 王更银(白求恩国际和平医院 输血科, 河北 石家庄 050082)

[摘要] **目的:**观察负载肝癌特异性 DC 靶标的树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer cell, CIK)细胞共培养后对肝癌细胞 HuH-7 的杀伤作用以及对裸鼠肝癌移植瘤的治疗效果。**方法:**外周血单个核细胞经不同细胞因子作用后培养成 DC 和 CIK 细胞。分别利用肝癌特异性 DC 靶标和肝癌 HuH-7 细胞冻融抗原刺激 DC, ELISA 法测定其对 DC IL-12 分泌的影响。DC_{HuH-7}、DC_{target} 分别与 CIK 细胞共培养后, ELISA 法检测其对 CIK 细胞 IFN- γ 分泌的影响, CCK-8 法检测效靶比为 10:1、20:1、40:1、100:1 时 DC_{HuH-7}-CIK 和 DC_{target}-CIK 细胞对 HuH-7 细胞的杀伤作用。构建 HuH-7 细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分为对照组、CIK 组、DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组, 尾静脉注射细胞悬液, 观察效应细胞的抑瘤效果。**结果:**DC_{HuH-7} 与 DC_{target} 的 IL-12 p70 分泌水平较 DC 显著升高[(179.33 \pm 14.04)、(173.33 \pm 6.66) vs (59.33 \pm 11.84) pg/ml, 均 $P < 0.01$]; 与 CIK 细胞共培养后, DC_{HuH-7}-CIK 与 DC_{target}-CIK 细胞分泌 IFN- γ 的能力也显著高于 DC-CIK 细胞(均 $P < 0.01$), 且 DC_{HuH-7}-CIK 与 DC_{target}-CIK 细胞之间无显著差异($P > 0.05$)。在相同效靶比时, DC_{HuH-7}-CIK 细胞以及 DC_{target}-CIK 细胞对 HuH-7 细胞的杀伤活性明显高于单纯 CIK 细胞($P < 0.05$), 且 DC_{HuH-7}-CIK 与 DC_{target}-CIK 组之间无显著差异($P > 0.05$)。DC_{target}-CIK 细胞对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用与 DC_{HuH-7}-CIK 细胞相仿, 且均显著高于单纯 CIK 细胞[(78.48 \pm 14.58)%、(85.78 \pm 15.69)% vs (54.69 \pm 28.07)%], 均 $P < 0.05$], 无明显不良反应。**结论:**肝癌特异性 DC 靶标能够显著提高 CIK 细胞对 HuH-7 细胞及其裸鼠移植瘤的杀伤活性, 可替代肝癌组织抗原负载 DC。

[关键词] 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 肝细胞癌; HuH-7 细胞; 肝癌特异性 DC 靶标

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0505-05

Inhibiting effects of cytokine-induced killer cells co-cultured with hepatoma target peptide-sensitized dendritic cells on hepatoma cancer: Preliminary observations *in vitro* and in nude mice

Yang Xiaoya, Gao Yuhua, Liu Surui, Li Zhu, Ma Yintu, Gao Jun, Wang Gengyin (Department of Blood Transfusion, the Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of cytokine-induced killer (CIK) cells co-cultured with dendritic cells (DCs) challenged with hepatoma target peptides on hepatoma cancer cell growth *in vitro* and in nude mice *in vivo*. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from healthy volunteer subjects, were induced to differentiate into DCs and CIK cells with different cytokines, respectively. DCs were then stimulated with target peptides or whole cell lysates from human hepatoma HuH-7 cells to develop into DC_{HuH-7} or DC_{target} which were co-cultured with CIK cells for 6 days to obtain DC_{HuH-7}-CIK or DC_{target}-CIK cells. Concentrations of IL-12 and INF- γ produced by CIK cells, DC-CIK cells, DC_{HuH-7}-CIK or DC_{target}-CIK cells were measured by ELISA. The cytotoxicity of these four types of effector cells against HuH-7 cells respectively was evaluated by CCK-8 assays *in vitro* and by HuH-7 cell transplantation assays in nude mice *in vivo*. **Results:** IL-12 production was significantly increased ($P < 0.01$) in DC_{HuH-7}-CIK cells (179.33 \pm 14.04 pg/ml) and DC_{target}-CIK cells (173.33 \pm 6.66 pg/ml) as compared with DCs (59.33 \pm 11.84 pg/ml). Similarly, IFN- γ production was significantly increased in CIK cells co-cultured with DC_{HuH-7} or DC_{target} ($P < 0.01$) but was not significantly differ-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81001106)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001106)

[作者简介] 杨晓亚(1979-),女,河北省石家庄市人,博士,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究, E-mail: yangxy1979@gmail.com

[通信作者] 王更银(Wang Gengyin, corresponding author), E-mail: wgy1962@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1509.004.html>

ent between DC_{HuH-7}-CIK and DC_{target}-CIK cells ($P > 0.05$). Compared with untreated CIK cells, DC_{HuH-7}-CIK cells and DC_{target}-CIK cells possessed a similarly higher cytotoxic activity against HuH-7 cells *in vitro* ($P < 0.05$) and a similarly stronger inhibitory effect on tumor growth in nude mice bearing hepatoma cancer ($[54.69 \pm 28.07]$ vs $[78.48 \pm 14.58]$ % and $[85.78 \pm 15.69]$ % respectively, $P < 0.05$). **Conclusion:** Hepatoma target peptides-sensitized DCs may significantly enhance the cytotoxicity of CIK cells against human hepatoma cells, thus offering a potential strategy to enhance cell-based immunotherapy for liver cancer.

[**Key words**] dendritic cell (DC); cytokine-induced killer (CIK) cell; hepatoma; HuH-7- cell; hepatoma target peptide-pulsed dendritic cells

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 505-509]

如今,树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer cell, CIK)细胞过继免疫治疗在临床肿瘤治疗中的应用越来越广泛^[1]。DC是目前发现的功能最强的专职抗原提呈细胞^[2],CIK细胞能够选择性地杀伤肿瘤细胞,具有广谱的抗肿瘤杀伤作用^[3,4]。DC与CIK细胞共培养后产生的细胞比同源CIK细胞具有更强的增殖活性和杀伤活性^[5,6]。

在DC细胞的体外培养中,抗原的负载是DC成熟的必要条件^[7]。肿瘤特异性DC靶标是商品化肿瘤组织特异的抗原肽复合物,多种常见组织类型的肿瘤(肝癌、膀胱癌、卵巢癌等)都有其相应的特异靶标。靶标是集群化的,每种组织类型的肿瘤组织靶标均含有多条小分子多肽;同时也是特定型别肿瘤组织共有的,并且是具有免疫原性的。利用肿瘤特异性DC靶标,理论上能够在体外成功致敏肿瘤特异性DC。但是商品化的DC靶标是否能够确切使DC负载肿瘤抗原信息,提高DC-CIK细胞对肿瘤的杀伤效果,迄今尚未有相关的文献报道。

本研究从我国多发的肝癌着手,使DC负载肝癌特异性靶标,然后将其与CIK细胞共培养,进行肿瘤特异的免疫细胞治疗。观察负载肝癌特异性靶标的DC-CIK细胞对肝癌细胞或对移植瘤的抑瘤作用,并与肿瘤细胞冻融抗原致敏DC-CIK细胞的抗癌效果作比较,以期能为不能获取肿瘤相关抗原负载DC进行细胞治疗的晚期肝癌患者提供一种特异、高效的治疗手段。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司,IFN- γ 购自上海凯茂药业,CD3单抗、鼠抗人CD80-FITC、CD83-FITC、CD86-PE、HLA-DR-FITC、CD14-PE及相应同型对照均购自eBioscience公司,IL-2购自上海华新生物高技术有限公司,IL-4购自

Promaga公司,GM-CSF购自海南通用药业,GT-T551培养基购自TaKaRa公司,高糖DMEM培养基及小牛血清购自Gibco公司,活细胞计数试剂盒(CCK-8试剂盒)购自同仁化学研究所,肝癌特异性DC靶标购自河北博海生物工程开发有限公司,人IL-12 p70 ELISA检测试剂盒及人IFN- γ ELISA检测试剂盒购自浙江联科生物技术有限公司。人肝癌细胞系HuH-7购自中国科学院上海细胞库,DC-CIK前体细胞来自健康志愿者外周血。SPF级BALB/c裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号为11401300005408。

1.2 肝癌细胞冻融抗原的制备

用胰蛋白酶消化对数生长期肝癌HuH-7细胞,PBS洗涤3次,用PBS重悬至 4×10^7 /ml,封装入冻存管,置 -80°C 冰箱内冷冻2h,取出立即放入 37°C 水浴10min,重复3次。 $8\,000 \times g$ 离心30min,收集上清即为肝癌细胞冻融抗原, -20°C 保存备用。

1.3 CIK细胞的诱导扩增

分离健康志愿者外周血单个核细胞,于饱和湿度、 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中静置培养1~3h。轻摇培养瓶,吸取不贴壁的悬浮细胞培养CIK细胞。贴壁细胞按照DC培养流程培养。悬浮细胞加入1000 U/ml IFN- γ ,第2天依次加入以下细胞因子:anti-CD3 McAb 100 ng/ml、IL-2 1000U/ml、IL-1 α 1 ng/ml。每2~3d半量补液,第14天收集CIK细胞,离心后收集培养上清,ELISA检测不同处理组CIK细胞IFN- γ 的分泌水平,每组设3个平行样品,实验重复5次。

1.4 DC细胞的诱导培养

上述单个核细胞静置培养1~3h之后,贴壁细胞加入DC培养液(GT-T551培养基含30 ng/ml IL-4、100 ng/ml GM-CSF)进行DC细胞培养。第3天补加IL-4及GM-CSF,加肝癌细胞冻融抗原(50 μg)或者肝癌特异性DC靶标(50 μg)刺激,诱导获得DC_{HuH-7}和DC_{target}。第6天补加IL-4、GM-CSF及10

ng/ml TNF- α 。第 7 天收集各组 DC 培养上清, ELISA 检测 DC_{HuH-7} 和 DC_{target} 的 IL-12 p70 分泌水平, 每组设 3 个平行样品, 实验重复 5 次。

1.5 DC-CIK 细胞共培养

第 8 天收集 DC_{HuH-7} 和 DC_{target}, 加入 CIK 细胞中 (DC: CIK = 1: 20), 用 CIK 培养液 (GT-T551 培养基 + 1 000 U/ml IL-2) 共培养, 6 d 后 (即培养的第 14 天) 收获 DC_{HuH-7}-CIK、DC_{target}-CIK 细胞。

1.6 CCK-8 法检测 CIK 细胞体外肿瘤杀伤能力

以培养第 14 天的 CIK 细胞及共同培养 6 d 的 DC-CIK 细胞为效应细胞, 肝癌细胞 HuH-7 为靶细胞, 进行细胞毒活性检测。根据效应细胞的不同, 分为 CIK 组、DC-CIK 组、DC_{HuH-7}-CIK 组、DC_{target}-CIK 组, 以未经效应细胞作用的靶细胞为对照。

取对数生长期 HuH-7 细胞, 调整至 1×10^5 /ml, 加入 96 孔培养板中, 每孔 100 μ l。将培养至第 14 天的各组效应细胞分别调整为 1×10^6 /ml、 2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 10×10^6 /ml, 各取 100 μ l 加入 HuH-7 细胞中, 效靶比依次为 10: 1、20: 1、40: 1、100: 1。置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h, 吸弃培养上清与悬浮的 CIK 细胞, 加入 PBS 再次轻轻清洗、重悬细胞。CCK-8 法检测每孔中活细胞的数量, 酶标仪检测各孔在 450 nm 波长处的光密度 (D) 值, 计算杀伤率, 评价 CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。每组设 3 个平行样品, 实验重复 5 次。

杀伤率 (%) = $[1 - (\text{效应细胞 } D \text{ 值} - \text{靶细胞对照孔 } D \text{ 值}) / \text{靶细胞对照孔 } D \text{ 值}] \times 100\%$ 。

1.7 裸鼠体内抑瘤实验观察各组 CIK 细胞的抗肿瘤作用

将 HuH-7 细胞悬液接种于裸鼠右前腹部皮下, 建立裸鼠肝癌移植瘤模型, 将注射 HuH-7 细胞当天记为第 1 天。18 只荷瘤裸鼠随机分为 4 组, (1) 对照组 ($n = 4$); (2) CIK 组 ($n = 5$); (3) DC_{HuH-7}-CIK 组 ($n = 5$); (4) DC_{target}-CIK 组 ($n = 4$)。以生理盐水悬浮效应细胞, 每次治疗每只裸鼠经尾静脉注射 0.1 ml 细胞悬液, 含免疫细胞 4×10^7 ; 对照组注射 0.1 ml 生理盐水。从第 14 天开始对荷瘤裸鼠进行免疫治疗, 隔天注射 1 次, 连续 3 次为 1 疗程, 于第 24、34、44 天各重复 1 疗程, 共进行 4 个疗程治疗。记录裸鼠体质量; 观察肿瘤生长情况, 每周用卡尺测量肿瘤长短径, 绘制移植瘤体积变化曲线。按照文献 [8] 方法计算肿瘤体积 (V): $V = 1/2 \text{ 长径} \times \text{宽径}^2$ 。第 56 天以颈椎脱臼方式处死裸鼠, 剥出肿瘤, 去除血污、脂肪等非瘤组织, 测量瘤质量, 计算各组平均瘤质量及抑制率 (inhibition ratio, IR)。IR (%) =

$[(\text{对照组平均瘤质量} - \text{治疗组平均瘤质量}) / \text{对照组平均瘤质量}] \times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌特异性靶标促进 DC 分泌 IL-12

ELISA 检测结果显示, 未经抗原刺激的 DC 的 IL-12 p70 分泌水平较低。负载 HuH-7 细胞冻融抗原或肝癌特异性靶标后, DC 的 IL-12 p70 分泌水平较未负载抗原的 DC 显著提高 [(179.33 ± 14.04) , (173.33 ± 6.66) vs (59.33 ± 11.84) pg/ml, 均 $P < 0.05$]。负载肝癌特异性靶标与 HuH-7 细胞冻融抗原的 DC 的 IL-12 p70 分泌水平相似 ($P > 0.05$)。

2.2 肝癌特异性靶标促进 CIK 细胞分泌 IFN- γ

ELISA 检测结果显示, 与负载肝癌特异性靶标抗原的 DC 共培养和与负载肝癌细胞冻融抗原的 DC 共培养一样, 均可以显著增强 CIK 细胞分泌 IFN- γ 的能力 [(345.00 ± 22.34) , (380.67 ± 10.11) vs (166.67 ± 11.23) pg/ml, 均 $P < 0.05$]。DC_{HuH-7} 和 DC_{target} 对 CIK 细胞分泌 IFN- γ 的影响相似, 两者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 DC_{HuH-7}-CIK 和 DC_{target}-CIK 细胞对 HuH-7 细胞的杀伤作用

CCK-8 法检测结果 (图 1) 显示, 同一组 CIK 中, 随着效靶比的增加, 对 HuH-7 肝癌细胞的杀伤作用逐步增强 (均 $P < 0.05$)。在相同效靶比下, DC_{HuH-7}-CIK 与 DC_{target}-CIK 细胞对 HuH-7 细胞的杀伤率均明显高于单纯 CIK 细胞 ($P < 0.05$), 也显著高于未经抗原负载的 DC 诱导的 CIK 细胞 ($P < 0.05$), 但 DC_{HuH-7}-CIK 组与 DC_{target}-CIK 组间杀伤率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 DC_{HuH-7}-CIK 和 DC_{target}-CIK 细胞对裸鼠体内肝癌移植瘤的抑制作用

裸鼠移植瘤体积变化曲线 (图 2) 显示, 对照组肿瘤体积迅速增大, 而注射 CIK 细胞明显抑制裸鼠皮下移植瘤的生长。第二疗程治疗结束后, CIK 组、DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组的肿瘤体积均显著小于未治疗组 (均 $P < 0.05$)。第 49 天起, DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组的肿瘤体积均显著小于 CIK 细胞治疗组 ($P < 0.05$)。DC_{target}-CIK 组与 DC_{HuH-7}-CIK 组抑瘤作用差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。并且, DC_{HuH-7}-CIK 组 5 只裸鼠中有 1 只在经过两个疗

程的治疗之后肿瘤结节完全消失。处死裸鼠后收集移植瘤组织, CIK 组、DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组抑瘤率均显著高于对照组[(54.69 ± 28.07)%、(85.78 ± 15.69)%、(78.48 ± 14.58)% vs 0, 均 $P < 0.05$]。DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组平均抑瘤率无显著差异($P > 0.05$), 且均显著高于 CIK 组(均 $P < 0.05$)。

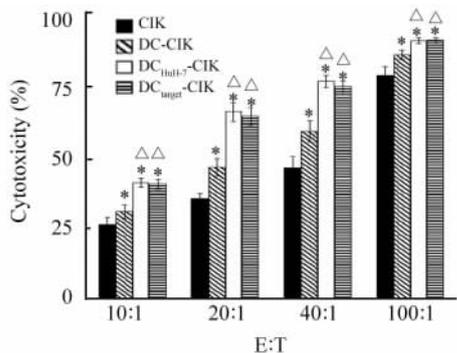


图 1 DC_{HuH-7}-CIK 和 DC_{target}-CIK 细胞高效杀伤 HuH-7 细胞

Fig. 1 DC_{HuH-7}-CIK and DC_{target}-CIK cells killed HuH-7 target cells efficiently

* $P < 0.05$ vs CIK group, $\Delta P < 0.05$ vs DC-CIK group

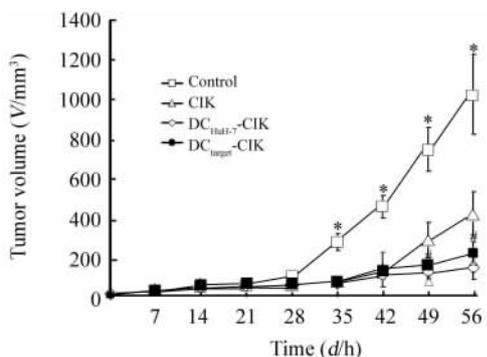


图 2 肿瘤生长曲线

Fig. 2 Tumor growth curves

* $P < 0.05$ vs CIK, DC_{HuH-7}-CIK, DC_{target}-CIK group; # $P < 0.05$ vs CIK group; $\Delta P < 0.05$ vs CIK group

经细胞治疗后, CIK 组、DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组裸鼠体质量均显著高于对照组 [(17.2 ± 1.64)、(21.0 ± 1.58)、(21.5 ± 1.70) vs (15.5 ± 1.29)g, 均 $P < 0.05$], 并且 DC_{HuH-7}-CIK 组和 DC_{target}-CIK 组裸鼠体质量无显著差异($P > 0.05$), 且均显著高于 CIK 组(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

体外培养 DC 关键一步是选择何种形式的抗原

来刺激 DC。目前临床上主要是利用手术切除肿瘤组织的裂解产物冲击致敏 DC^[9], 这种方法的确可以致敏和活化 DC, 促进 DC 分化成熟, 增强 DC 的功能, 但是对于不能手术的晚期肿瘤病人, 得不到相应的肿瘤抗原, 因而不能诱导产生肿瘤特异性的 DC。另外一种方式是用已知的肿瘤相关抗原, 如黑色素瘤相关抗原 MAGE、前列腺特异抗原 PSA 等刺激 DC^[10-11]。将人工合成的肿瘤相关抗原在体外致敏 DC, 可诱导相应的特异免疫应答^[12], 方法虽可以解决没有肿瘤组织患者应用 DC 治疗的困难, 但也有明显的缺点: 负载在 DC 表面的肿瘤抗原肽存在时间短^[13]、肿瘤基因变异快^[14], 针对单一肿瘤抗原的治疗在肿瘤基因变异后会失效。肿瘤特异性 DC 靶标是由某些生物公司研制的、商品化的肿瘤组织特异的抗原肽复合物。如果肿瘤特异性 DC 靶标能够像生物公司宣传的那样成功致敏 DC, 就能解决无法获得肿瘤组织的癌症患者使用 DC 细胞的难题。然而迄今为止尚未有商品化的 DC 靶标致敏 DC 的相关文献报道。本研究观察负载肝癌特异性 DC 靶标的 DC 与 CIK 细胞共培养后对体外培养的肝癌细胞 HuH-7 的杀伤作用以及对裸鼠体内肝癌移植瘤的治疗效果, 从而验证肝癌特异性 DC 靶标致敏 DC 的效果及可行性。

本研究结果表明, 与未负载抗原的 DC 相比, 负载肝癌特异性 DC 靶标后 DC 分泌 IL-12 的能力显著增强。IL-12 是 DC 细胞分泌的重要细胞因子。DC 与 T 细胞结合后可以分泌 IL-12, 激发 T 细胞增殖, 诱导大量特异性细胞毒性 T 细胞(CTL)的生成, 主导了 Th1 型的免疫应答, 有利于肿瘤细胞的清除^[15]。IL-12 能诱导 T 细胞分泌 IFN- γ , 进一步活化 CIK 细胞和诱导 Th1 型免疫应答^[16]。IL-12 可促使 CIK 细胞高表达对杀瘤活性起重要作用的 CD56⁺ 细胞, 提高 CIK 细胞的细胞毒作用及抗肿瘤活性。在本研究中, 负载肝癌特异性 DC 靶标后, DC 细胞分泌 IL-12 p70 显著增强, 说明经肝癌特异性 DC 靶标刺激后, DC 的成熟度明显提高。此结果证实了肝癌特异性 DC 靶标可以成功地刺激 DC, 且与肝癌细胞冻融抗原对 DC 的刺激能力相当。

研究^[17-19]证明, 成熟 DC 与 CIK 细胞共培养后产生的细胞比同源 CIK 细胞具有更强的增殖活性和杀伤活性。成熟 DC 能通过直接接触或分泌功能性细胞因子等方式促进 CIK 细胞增殖, 提高 CIK 细胞分泌细胞因子的能力, 增强其抗肿瘤活性, 同时 DC-CIK 细胞共培养的上清液也能促进 DC 的成熟^[5]。本研究的结果表明, 和负载肝癌特异性 DC

靶标的 DC 共培养后,CIK 细胞分泌 IFN- γ 的能力显著增强。IFN- γ 是 CIK 细胞分泌的重要效应因子,可上调 MCH- I、II 类分子的表达以刺激免疫应答,IFN- γ 也可以通过多种凋亡相关因子如 Fas-FasL、Bcl-2 家族促进肿瘤细胞凋亡,不仅对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可通过调节机体免疫系统的反应性来间接杀伤肿瘤细胞^[20]。和负载肝癌特异性 DC 靶标的 DC 共培养后,培养上清中含有更高浓度的效应细胞因子 IFN- γ ,表明经肝癌特异性 DC 靶标刺激的 DC 能起到增强 CIK 细胞抗肿瘤活性的目的。

本研究进而从体内体外两方面验证了经肝癌特异性靶标刺激的 DC 诱导 CIK 后对肝癌细胞的杀伤能力。负载肝癌特异性 DC 靶标的 DC-CIK 细胞在体外对 HuH-7 细胞的杀伤活性明显高于未经抗原刺激的 DC-CIK 细胞,说明负载肝癌特异性 DC 靶标能够提高 DC-CIK 细胞对肿瘤的杀伤能力。在裸鼠体内,DC_{target}-CIK 细胞与单纯 CIK 细胞相比也起到更好的杀瘤效果。

用患者肿瘤细胞制成可溶性抗原并对进行个体治疗,相应的可溶性抗原即可起到相对的特异性作用^[6, 21]。但是自体肿瘤细胞制备过程较复杂且要求较高,需要进行冻融等过程^[19]。本研究中,DC 经特异性 DC 靶标和肿瘤抗原刺激后与 CIK 共培养,两者的杀瘤效果无明显差异,而且肿瘤特异性靶标相对于肿瘤细胞全抗原来说更加安全、有效、稳定。

总之,肿瘤特异性靶标刺激 DC 的效果与肿瘤细胞抗原相仿,因此,对于因不能或者难以获得肿瘤细胞抗原以及获得的肿瘤细胞抗原较少而不能满足临床治疗需要的肿瘤患者,采用商品化的肿瘤特异性靶标刺激 DC 后再与 CIK 共培养来进行细胞治疗,不失为一个较佳的替代治疗方案,本研究为此方法的临床应用奠定了实验基础。

[参 考 文 献]

[1] Cui Y, Yang X, Zhu W, et al. Immune response, clinical outcome and safety of dendritic cell vaccine in combination with cytokine-induced killer cell therapy in cancer patients [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2): 537-541.

[2] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 265-277.

[3] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(9): 1457-1462.

[4] Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote anti-tumor immunity [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 83-92.

[5] 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 Immunother*, 2001, 24(6): 502-510.

[6] Wang YF, Kunda PE, Lin JW, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with complete tumor antigen-loaded dendritic cells, have enhanced selective cytotoxicity on carboplatin-resistant retinoblastoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(5): 1841-1850.

[7] Anguille S, Smits EL, Lion E, et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): 257-267.

[8] Naito S, von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(8): 4109-4115.

[9] 杨前,徐国政,张端莲. DC-CIK 细胞免疫治疗的生物学基础及临床应用 [J]. *数理医药学杂志*, 2013, 26(3): 345-348.

[10] 吴鸣宇,蔡兵,赵翼,等. MAGE-1 多肽负载树突状细胞对人肝癌细胞的体外杀伤作用 [J]. *中国临床医学*, 2008, 15(2): 181-183.

[11] 徐丹枫,高铁,刘玉杉,等. 前列腺癌 PSA 特异性树突状细胞瘤苗的构建及其体外免疫活性的观察 [J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(3): 265-270.

[12] Cohn L, Delamarre L. Dendritic cell-targeted vaccines [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 255.

[13] Amoscatto AA, Prenovitz DA, Lotze MT. Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1998, 161(8): 4023-4032.

[14] Bertram JS. The molecular biology of cancer [J]. *Mol Aspects Med*, 2000, 21(6): 167-223.

[15] Kelsall BL, Stuber E, Neurath M, et al. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 795(1): 116-126.

[16] Wongkajornsilp A, Wamanuttajinda V, Kasetsinsombat K, et al. Sunitinib indirectly enhanced anti-tumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells and CD3⁺CD56⁺ subset through the co-culturing dendritic cells [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78980.

[17] Pan Y, Tao Q, Wang H, et al. Dendritic cells decreased the concomitant expanded Tregs and Tregs related IL-35 in cytokine-induced killer cells and increased their cytotoxicity against leukemia cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93591.

[18] Gao D, Li C, Xie X, et al. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in gastric and colorectal cancer patients [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93886.

[19] 章焯,朱寿兴,申小苏,等. 多肽负载 DC 联合 CIK 治疗激素难治性前列腺癌的疗效 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4): 414-420.

[20] Hoyle C, Bangs CD, Chang P, et al. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3⁺CD56⁺ cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: In vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice [J]. *Blood*, 1998, 92(9): 3318-3327.

[21] Alaniz L, Rizzo MM, Mazzolini G. Pulsing dendritic cells with whole tumor cell lysates [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1139(3): 27-31.

[收稿日期] 2014 - 05 - 14

[修回日期] 2014 - 08 - 30

[本文编辑] 阮芳铭