

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.004

## 来源于未缓解白血病患者 DC-CIK 细胞对白血病细胞的杀伤活性

张素芳, 郭晓玲, 张娜娜, 张静楠, 任金海, 郭晓楠(河北医科大学第二医院 血液科, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的:** 体外诱导培养缓解期及未缓解期急性白血病患者来源的树突状细胞(dendritic cell, DC)联合细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞, 比较两者的增殖能力、免疫表型及对白血病细胞的杀伤活性。**方法:** 提取 2013 年 4 月 25 日至 2014 年 1 月 17 日河北医科大学第二医院血液科收治的复发难治未缓解期白血病患者(7 例)和缓解期患者(7 例)的外周血单个核细胞, 分别按常规方法诱导产生 DC-CIK 细胞, 在培养过程中检测细胞增殖倍数, 流式细胞术检测 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例, 细胞涂片法和流式细胞术检测培养前后 CD34<sup>+</sup> 白血病细胞比例, CCK-8 法检测两组 DC-CIK 细胞对 K562 细胞及患者单个核细胞的杀伤活性。**结果:** 缓解组和未缓解组来源的 DC-CIK 细胞均以相似的速度快速增殖, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例均随培养时间延长显著升高( $P < 0.05$ ), 但两组间差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。培养第 15 天时, 非缓解组 DC-CIK 细胞涂片检测未见 CD34<sup>+</sup> 原始白血病细胞, 流式细胞术检测显示 CD34<sup>+</sup> 细胞比例较培养前显著降低[( $0.1 \pm 0.05$ )% vs ( $8.3 \pm 3.1$ )%,  $P < 0.05$ ]。效靶比在 5:1 ~ 20:1 范围内时, 缓解组与未缓解组 DC-CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤率差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ), 但未缓解组 DC-CIK 对患者单个核细胞的杀伤率显著高于缓解组( $P < 0.05$ ), 并且显著高于未缓解组对 K562 细胞的杀伤率( $P < 0.05$ )。**结论:** 未缓解期白血病患者来源的 DC-CIK 细胞在增殖活性、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 表达水平和对 K562 细胞的非特异性杀伤活性方面与缓解期患者来源的 DC-CIK 细胞均相似, 但对患者单个核细胞的杀伤具有更强的特异性。

**[关键词]** 树突状细胞; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 生物学活性; 白血病; 细胞因子

**[中图分类号]** R733.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)06-0624-06

## Cytotoxic activity of DC-CIK cells derived from non-remission leukemia patients against leukemia cells

Zhang Sufang, Guo Xiaoling, Zhang Nana, Zhang Jingnan, Ren Jinhai, Guo Xiaonan (Department of Hematology, Second Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the cytotoxicity of dendritic cells-cytokine-induced killer cells (DC-CIK cells) derived from patients with remission leukemia or a non-remission disease against leukemia cells. **Methods:** Blood was sampled from 7 seven patients with refractory non-remission acute leukemia and 7 patients with remission leukemia who were admitted to the Department of Hematology, Hebei Medical University-Affiliated Second Hospital between April 25, 2013 and June 17, 2014. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and induced into DC-CIK cells by conventional methods. The proportions of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells in the induced DC-CIK cell population were assessed by flow cytometry. Their proliferation rate was calculated and their killing activity against K562 cells and mononuclear cells were determined by CCK-8 assay. **Results:** DC-CIK cells derived from both patients with a remission disease and patients with a non-remission disease proliferated at similarly rapid rates ( $P > 0.05$ ). Proportions of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells increased dramatically with time in both groups of DC-CIK cells ( $P < 0.05$ ) but there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). After 15 days of induction, no leukemia cells were found and the proportion of CD34<sup>+</sup> cells was significantly reduced in DC-CIK cell preparations as compared with untreated PBMCs ([ $0.1 \pm$

**[基金项目]** 国家高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No. 200800890011)。Project supported by the Research Foundation for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 200800890011)

**[作者简介]** 张素芳(1981-),女,山西省大同市人,硕士,主要从事恶性肿瘤的细胞免疫治疗方面的研究, E-mail: sxdtzsf@163.com

**[通信作者]** 郭晓玲(Guo Xiaoling, corresponding author), E-mail: 13932113351@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20141209.1507.004.html>

0.05 ]% vs [ 8.3 ± 3.1 ]% ,  $P < 0.05$  ). At effector to target cell ratios from 5:1 to 20:1, DC-CIKs derived from both groups of patients displayed a similar cytotoxic activity against K562 cells (  $P > 0.05$  ), but DC-CIKs derived from patients with a non-remission disease had a significantly higher cytotoxic activity against mononuclear cells (  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** DC-CIK cells derived from PBMCs of both patients with non-remission leukemia and patients with remission leukemia have similar proliferative activities, similar profiles of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> expression and similar cytotoxic activities against K562 cells. However, DC-CIK cells from patients with non-remission leukemia display a higher sensitivity against autologous mononuclear cells.

[ **Key words** ] dendritic cell ( DC ); cytokine induced killer ( CIK ) cell; biological activity; leukemia; cytokine  
[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21( 6 ): 624-629 ]

白血病在我国发病率较高,对人体健康危害性极大,目前以药物、骨髓干细胞移植治疗为主,但都不能完全清除瘤细胞,存在难治和易复发等难题。随着医学的不断发展,细胞免疫治疗已成为继手术、放疗、化疗后的第四大肿瘤治疗方法,其中树突状细胞( dendritic cell, DC )与细胞因子诱导的杀伤( cytokine induced killer, CIK )细胞是两个主要部分。目前以来源于健康供者和缓解期患者的 CIK 细胞治疗最常见,未缓解或初治白血病患者外周血存在一定比例的白血病细胞,能否用其诱导出抗肿瘤 CIK 细胞,诱导出的 CIK 细胞是否残存白血病细胞值得进一步探讨。本研究分离未缓解和缓解期急性白血病患者的外周血单个核细胞( peripheral blood mononuclear cell, PBMC ),体外诱导 DC-CIK 细胞,观察其形态、增殖能力、免疫表型和细胞毒性变化,为进一步提高 DC-CIK 细胞的抗肿瘤性能,从而扩大白血病细胞免疫治疗的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司, rhGM-CSF、rhIL-2, rhIL-4、rhIFN- $\gamma$ 、rhTNF- $\alpha$  均购自美国 PeproTech 公司, MabCD3 购自美国 Biologend 公司,用于流式细胞仪检测的 CD3、CD4、CD8、CD16、CD56、CD34、CD45 标记抗体均购自美国 Becton-Dickinson 公司。

### 1.2 细胞来源

白血病 K562 细胞由本实验室保存。患者的 PBMC 来源于 2013 年 4 月 25 日至 2014 年 1 月 17 日河北医科大学第二附属医院血液科住院的复发难治未缓解白血病患者( 7 例)以及缓解期患者( 7 例)的外周血样本,收集后冻存于液氮罐中。所有病例都完全按照《血液病诊断及疗效标准》确诊,主要是通过临床症状及体征的观察、外周血细胞的检查及形态分析、骨髓细胞的形态特征以及骨髓组织活检

结果分析,并结合细胞分子生物学、细胞免疫学的检测结果进行综合分析。试验方案已获医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

### 1.3 DC-CIK 细胞的体外培养、扩增

抽取缓解期及未缓解期急性髓系白血病患者的外周血 5 ~ 8 ml( 外周血细胞原始细胞比例均小于 20% ),分离 PBMC,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h,收集贴壁细胞种植于 6 孔板中,调整细胞密度至  $2 \times 10^6$ /ml,加入 rhGM-CSF 和 rhIL-4( 终活性浓度均为 1 000 U/ml ),继续培养,适时补充培养基及细胞因子。于收细胞前 24 h 加入 rhTNF- $\alpha$  至 1 000 U/ml,诱导 DC 细胞成熟。以采集患者 PBMC 当天为第 1 天,培养至第 6 天收获成熟 DC。

收集悬浮细胞,调整细胞密度至  $2 \times 10^6$ /ml,移至 6 孔板中,加入 rhIFN- $\gamma$  使终活性浓度为 1 000 U/ml,培养 24 h 后加入 rhIL-2 500 U/ml、CD3 单抗 50 ng/ml,继续培养,并适时补充培养基及细胞因子,培养至第 6 天后收获 CIK 细胞。将成熟的 DC 细与 CIK 细胞以 1:5 的比例混合培养,每 3 d 计数 1 次,并补充新鲜培养基及细胞因子,每次调整细胞密度至  $4 \times 10^6$ /ml,继续培养。DC-CIK 细胞培养过程中计算细胞增殖倍数。

### 1.4 流式细胞术检测不同来源的 DC-CIK 细胞免疫表型

取缓解及未缓解组患者 PBMC 和培养第 9、12、15 天的 DC-CIK 细胞,调整细胞密度至  $1 \times 10^6$ /ml,流式细胞术检测缓解组与未缓解组的 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例。细胞涂片法和流式细胞技术检测两组培养前和培养 15 d 时标本中的 CD34<sup>+</sup> 原始白血病细胞比例。

### 1.5 CCK-8 法检测不同来源 DC-CIK 细胞对 K562 细胞及患者 PBMC 的杀伤作用

将缓解组、未缓解组培养至第 15 天的 DC-CIK 细胞密度调整至  $0.5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ /ml 作为效应细胞;同时取 K562 细胞和患者 PBMC 作为靶

细胞,调整密度至  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,即效靶比为 5:1、10:1 和 20:1。在 96 孔板加入效应细胞和靶细胞各 100  $\mu\text{l}$ ,同时设靶细胞和效应细胞的对照孔,各组均设 3 个复孔。于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24 h,每孔加入 CCK-8 20  $\mu\text{l}$ ,继续培养 4 h,用酶标仪测定波长 570 nm 处的光密度( $D$ )值,按下式计算效应细胞的杀伤率。杀伤率(%) =  $[1 - (\text{实验孔 } D \text{ 值} - \text{效应细胞对照孔 } D \text{ 值}) / \text{靶细胞对照孔 } D \text{ 值}] \times 100\%$

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,细胞表面抗原比较采用重复测量方差分析,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验,细胞杀伤活性比较采用配对样本  $t$  检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缓解组与未缓解组来源 DC-CIK 细胞的增殖能力相似

缓解组与未缓解组来源的 PBMC 均按同样方案培养,此过程中两组细胞形态发生相似的变化,细胞数量亦明显增加。未缓解组 DC 培育第 2 天起细胞体积变大,边缘发出胞质突起,外形不规整,并成团生长(图 1)。该组非黏附 PBMC 最初散在均匀分

布,个头小,亮而圆,形体较一致,在多种细胞因子的诱导下,细胞增殖成团;培养的第 4 天,细胞形态开始呈现出不规则形态;第 6 天后收获的 CIK 细胞明显增殖成丛或以集落状态生长,并悬浮于培养基中(图 2)。

在细胞培养的第 6 天,将 DC 细胞与 CIK 共培养得 DC-CIK 细胞,通过观察计数细胞,分析结果(表 1)显示,两组细胞均不断快速增殖,第 12 天时增殖倍数均显著大于第 9 天,且两组增殖倍数无显著性差异。镜下可见 DC 与较多的 CIK 细胞聚集成团,呈团块生长(图 3)。

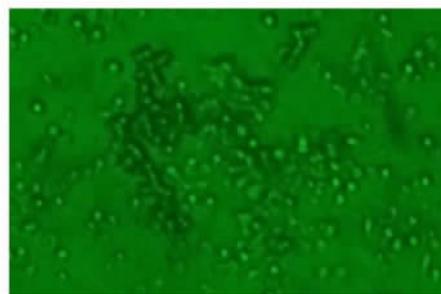


图 1 未缓解组体外培养第 2 天 DC 的形态(  $\times 200$  )  
Fig.1 Morphology of DCs in non-remission group at the second day of culture *in vitro* (  $\times 200$  )

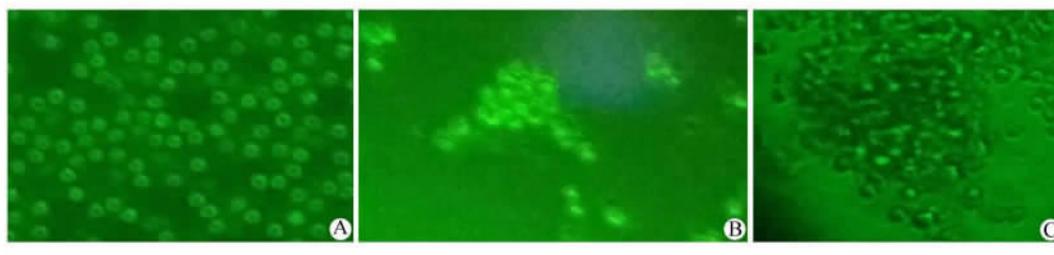


图 2 未缓解组体外培养的第 0( A ),4( B ),6( C )天 CIK 细胞(  $\times 200$  )

Fig.2 Morphology of CIK cells in non-remission group at the 0( A ), 4th( B ) and 6th( C ) day of culture *in vitro* (  $\times 200$  )

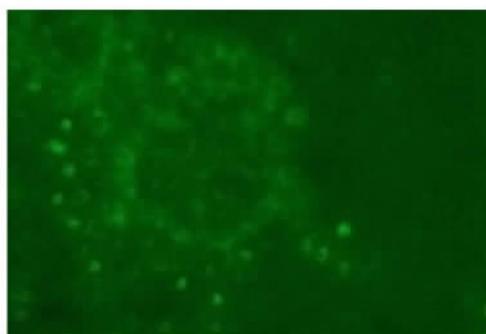


图 3 未缓解组体外培养第 9 天的 DC-CIK 细胞(  $\times 200$  )  
Fig. 3 Morphology of DC-CIK cells in non-remission group at the 9th day of culture *in vitro* (  $\times 200$  )

表 1 缓解组与未缓解组 DC-CIK 细胞的增殖倍数  
Tab. 1 Proliferation multiple of DC-CIK cells in remission and non-remission groups

Group	d 9	d 12	d 15
Remission	16.4 $\pm$ 1.9	42.6 $\pm$ 3.9*	65.2 $\pm$ 1.8*
Non-remission	17.0 $\pm$ 2.2	40.2 $\pm$ 3.0*	65.4 $\pm$ 2.6*

\*  $P < 0.05$  vs d 9 in the same group

2.2 缓解组与未缓解组来源的 DC-CIK 细胞分子表型的变化

流式细胞术检测结果(图 4,表 2)显示,缓解组

与未缓解组来源的 DC-CIK 细胞 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 细胞比例均随时间的延长而显著增加

( $P < 0.05$ ),但两组间差异不显著。

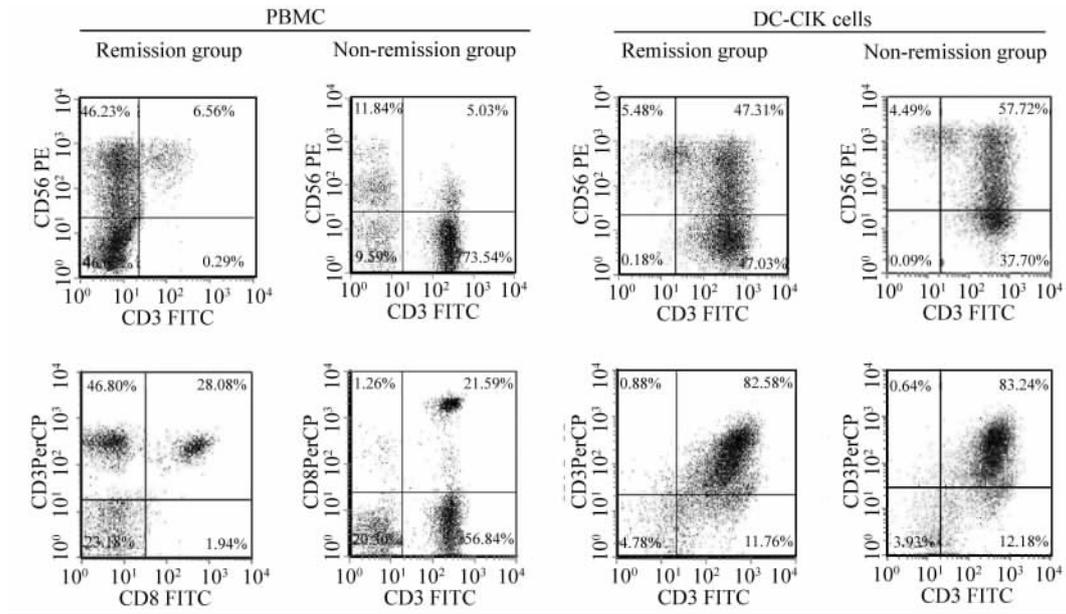


图 4 缓解组与未缓解组来源的 DC-CIK 细胞内 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 亚群细胞比例

Fig. 4 Proportion of CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> sub-group cells of DC-CIK cells in remission and non-remission groups

表 2 缓解组、未缓解组 DC-CIK 细胞免疫表型的变化(%)

Tab. 2 Immune phenotypic changes of DC-CIK cells derived from remission and non-remission patients (%)

Culture time (t/d)	Remission		Non-remission	
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>
1	23.4 ± 5.4	3.81 ± 1.4	21.8 ± 7.3	4.0 ± 1.6
9	53.0 ± 1.6	31.4 ± 1.1	54.0 ± 3.0	32.4 ± 2.2
12	71.2 ± 2.6	49.0 ± 1.0	71.4 ± 1.8	50.0 ± 3.2
15	87.5 ± 1.3	63.8 ± 1.9	88.6 ± 3.4	66.8 ± 4.1

2.3 未缓解组来源 DC-CIK 细胞培养后白血病细胞显著减少

细胞涂片法结果显示,培养第 15 天,未缓解组 DC-CIK 细胞中的原始白血病细胞比例较培养前明显减少,培养前涂片计数原始细胞比例为(8.3 ± 3.1)%,培养后显微镜下观察涂片未见原始细胞;流式细胞术检测也得到了相似的结果,培养前 CD34<sup>+</sup> 白血病细胞占(4.2 ± 3.5)%,培养后降至(0.1 ± 0.05)%( $P < 0.05$ )。

2.4 缓解组和未缓解组 DC-CIK 细胞对 K562 细胞及患者 PBMC 的杀伤活性

CCK-8 检测(表 3)显示,在效靶比 5:1 ~ 20:1 范

围内,缓解组和未缓解组 DC-CIK 细胞对 K562 细胞均有较强杀伤力,未缓解组来源 DC-CIK 的作用略强于缓解组,但没有统计学意义( $P > 0.05$ )。而在相同效靶比条件下,未缓解组 DC-CIK 细胞对患者 PBMC 的杀伤率显著高于对 K562 细胞的杀伤率( $P < 0.05$ ,表 4),提示未缓解组 DC-CIK 细胞对患者肿瘤细胞的杀伤具有较强的特异性。

表 3 缓解组和未缓解组 DC-CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤率(%)

Tab. 3 Kill rate of DC-CIK cells in remission and non-remission group on K562 cells (%)

Group	E: T		
	5: 1	10: 1	20: 1
Remission	21.7 ± 4.64	28.9 ± 3.8	42.6 ± 3.3
Non-remission	30.4 ± 2.73	42.4 ± 3.2	57.5 ± 2.9

3 讨论

近年来 DC-CIK 细胞疗法以其强大的抗肿瘤效应受到人们的关注,其在减轻各种化疗并发症,消除微小残留肿瘤灶,减少复发和延长患者生命方面空间广阔。CIK 细胞兼具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活

性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特点,而这部分效应细胞被证明为 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞<sup>[14]</sup>。CIK 细胞增殖能力明显高于 LAK 和 AK-T 细胞<sup>[5]</sup>,抗瘤活性亦较之更强。而且 CIK 细胞对正常细胞毒性较小,可以保存 3/4 以上的 CFU-GM 集落<sup>[6]</sup>。CIK 细胞除本身有直接杀伤恶性细胞的作用,还可机通过机体免疫机制间接杀死恶性细胞;培育的杀伤细胞表面的 FasL 分子,不仅使 Fas<sup>+</sup> 恶性细胞发生程序性死亡,还可防止效应细胞发生 Fas-FasL 程序性死亡,展示了很好的抑瘤和杀瘤功效<sup>[7]</sup>。多家研究<sup>[8-12]</sup>报道,CIK 细胞对急性白血病患者有较好疗效,对 G<sub>0</sub> 期 CD34<sup>+</sup> 白血病细胞有明显的杀伤作用,尤其对于老年白血病的治疗显示出较好的疗效。

表 4 未缓解组来源 DC-CIK 对 K562 细胞和患者 PBMC 的杀伤率(%)

Tab. 4 Kill rate of DC-CIK cells of non-remission group on the K562 cells and the patient's PBMCs (%)

Group	E: T		
	5: 1	10: 1	20: 1
K562 cells	30.4 ± 2.7	42.4 ± 3.2	57.5 ± 2.8
PBMCs	35.2 ± 3.4*	47.7 ± 5.9*	67.3 ± 8.0*

\* P < 0.05 vs K562 cells

以往白血病的 CIK 免疫治疗细胞来源都是处于缓解期患者的外周血 PBMC,未缓解患者的外周血存在一定数量的白血病细胞,能否应用于难治性白血病的挽救治疗值得进一步探讨。已有研究<sup>[13-17]</sup>表明,髓系白血病细胞能诱导分化为白血病 DC,DC 提呈已知或未知的白血病抗原,从而诱导产生 T 淋巴细胞的抗白血病效应,共培养 DC 和 CIK,可以分别增强两者的增殖活性,可使 IFN 分泌量增高。本研究发现,缓解组和未缓解组两组来源的 DC-CIK 细胞增殖能力相仿,并且培养后的细胞中均未残留白血病细胞;具有抗肿瘤活性的 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例均明显增多,与文献<sup>[18]</sup>报道一致,并且两组 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例的增殖程度也相似。以上数据表明,未缓解白血病患者来源的 PBMC 可以诱导 DC-CIK 的产生,为临床提供足量的免疫活性细胞,满足临床治疗的需要。此外,以肿瘤细胞 K562 为靶细胞,以缓解期、未缓解期来源的 DC-CIK 细胞为效应细胞,在 5:1 ~ 20:1 效靶比范围内,两组对 K562

细胞均有较强的杀伤作用;而以患者来源的 PBMC 为靶细胞时,未缓解组来源 DC-CIK 细胞的杀伤率较缓解组显著增强。

综上所述,未缓解白血病患者外周血 PBMC 所诱导的 DC-CIK 细胞不残留白血病细胞,对患者自身的白血病细胞具有更特异的杀伤能力。本研究初步探索了一种更为有效的 DC-CIK 细胞培养方法,所获得的 DC-CIK 细胞具有较强的抗肿瘤特异性,并且能够方便地由未缓解期患者自体外周血诱导获得,为进一步扩大白血病 DC-CIK 细胞免疫治疗的临床应用提供依据。

[参考文献]

[1] Introna MI, Golay J, Rambaldi A. Cytokine induced killer (CIK) cells for the treatment of haematological neoplasms [J]. Immunol Lett, 2013, 155(1/2): 27-30.

[2] Leembuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed HD and NHL [J]. Biol Blood Marrow Trans, 2005, 21(13): 181-187.

[3] Dervovic' D, Zúñiga-Pflücker JC. Positive selection of T cells, an in vitro view [J]. Semin Immunol, 2010, 22(5): 276-86.

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

[5] 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.

[6] Qu HQ, Zhou XS, Zhou XL, et al. Effect of DC-CIK cell on the proliferation, apoptosis and differentiation of leukemia cells [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(8): 659-662.

[7] Verneris MR, Komacker M, Mailander V, et al. Resistance of ex vivo expanded CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> T cells to Fas-mediated [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49(6): 335-345.

[8] 童春容, 耿彦彪, 陆道培. 自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗急性白血病的临床研究 [J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(5): 473-477.

[9] 惠吴函, 徐娟, 万岁桂, 等. CIK 细胞对 G<sub>0</sub> 期急性髓系白血病细胞的杀伤作用 [J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(5): 666-667.

[10] Linn YC, Yong HX, Niam M, et al. A phase I/II clinical trial of autologous cytokine-induced killer cells as adjuvant immunotherapy for acute and chronic myeloid leukemia in clinical remission [J]. Cytotherapy, 2012, 14(7): 851-859.

[11] Dong MI, Liang D, Li Y, et al. Autologous dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells synergize low-dose chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukaemia [J]. J Int Med Res, 2012, 40(4): 1265-1274.

[12] Schöttker B, Schmidt-Wolf IG. Pulsing with blast cell lysate or blast-derived total RNA reverses the dendritic cell-mediated cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells against allogeneic acute myelogenous leukemia cells [J]. Ger Med Sci, 2011, 9:

- Doc18.
- [ 13 ] Liepert A, Grabrucker C, Kremser A, et al. Quality of T-cells after stimulation with leukemia-derived dendritic cells ( DC ) from patients with acute myeloid leukemia( AML ) or myeloid dysplastic syndrome ( MDS ) is predictive for their leukemia cytotoxic potential [ J ]. *Cell Immunol*, 2010, 265( 1 ): 23-30.
- [ 14 ] Kremser A, Dressig J, Grabrucker C, et al. Dendritic cells ( DCs ) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: An evaluation of different methods [ J ]. *J Immunother*, 2010, 33( 2 ): 185-199.
- [ 15 ] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms [ J ]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80( 6 ): 1345-1353.
- [ 16 ] Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, et al. Prolonged IFN gamma producing NK response induced with alpha galactosylceramide loaded DCs [ J ]. *Nat Immunol*, 2002, 3( 9 ): 867-874.
- [ 17 ] 魏绪仓, 翟欣辉, 韩秀蕊, 等. 脐血树突状细胞对同源 CIK 细胞生物学活性及抗白血病作用影响的研究 [ J ]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18( 4 ): 946-951.
- [ 18 ] Wang QJ, Wang H, Pan K, et al. Comparative study on anti-tumor 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 ] 2014 - 07 - 16 [ 修回日期 ] 2014 - 11 - 10  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

## · 科技动态 ·

## 长链非编码 RNA 调控转录因子 21 基因启动子的去甲基化

德国美茵兹大学分子生物学研究所的 Niehrs 教授和他的研究团队发现,长链非编码 RNA( long noncoding RNA, lncRNA ) TARID ( TCF21 antisense RNA inducing demethylation )可通过募集生长阻滞与 DNA 损伤诱导蛋白 45A( growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha, GADD45A )/胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶( thymine-DNA glycosylase, TDG )实现肿瘤抑制基因转录因子 21 ( transcription factor 21, TCF21 )启动子的去甲基化,从而激活 TCF21 的表达。其相关研究成果发表在 2014 年 8 月 21 日的 *Molecular Cell* 杂志上。

DNA 甲基化是一种广泛参与基因表达调控的动态可逆的表观遗传修饰,在正常的生理条件以及一些病理过程中均起着重要作用。通常 DNA 的甲基化抑制基因转录,代表着基因功能的“关闭”。DNA 的甲基化状态对胚胎发育、染色体结构以及正常细胞功能的维持乃至疾病的发生都是十分重要的。在胚胎发育过程中,基因组范围内的 DNA 甲基化修饰异常会导致胚胎畸形甚至致死,而在成体中,异常的甲基化则意味着疾病如肿瘤、神经退行性疾病等的发生。因此,对可调节 DNA 甲基化状态的表观遗传学研究显得尤为重要。

lncRNA 是指一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,其在基因转录的各个水平如转录起始的调控、转录及转录后的调控中均发挥着重要作用,进而影响着多个生物学过程。同时,lncRNA 在组蛋白修饰、DNA 甲基化等表观遗传修饰过程中也发挥重要的作用,通过结合并募集特定的表观修饰酶复合物至目标基因区域,改变靶基因染色质或 DNA 修饰状态,从而影响靶基因的表达。然而人们对这种特异性的 DNA 甲基化的定位机制仍然了解不多。Niehrs 研究团队在之前的研究中已经发现,在多种间充质来源的肿瘤中 TCF21 基因由于发生异常的高甲基化而导致 TCF21 蛋白表达沉默,并且异常的高甲基化主要发生于编码 TCF21 蛋白基因的 CpG 岛 1( CpG island 1, CGI1 )和 CGI3 区域,而 CGI1 与 TCF21 基因的启动子区相关联,由此提出假设:TCF21 基因的 CGI3 区域可能存在一个可变转录起始位点( transcription start site, TSS ),此区域或许与调控 TCF21 基因表达相关。

Niehrs 研究团队首先证实,TCF21 基因的 CGI3 区域存在一个可编码一系列反义转录物的启动子区,并证明这些反义转录物是 TCF21 基因的 lnc RNA,并将其命名为 TARID。进一步研究发现,TARID 可定位于 TCF21 启动子区,同时招募 GADD45A 结合到该区域。已有文献报道 GADD45A 参与调节 TDG 介导的 DNA 碱基对切除修复,从而实现 DNA 去甲基化。最后该研究团队还证实,DNA 去甲基化酶家族 Tet( Ten-eleven translocation )也参与了 TARID 所介导的 TCF21 启动子区去甲基化这一过程。该研究揭示了 lncRNA 能介导特异目标基因的 DNA 去甲基化过程,从而激活靶基因的表达,而且为癌症的研究又开启了新的方向。

在此研究中,仍有未解决的问题:并没有找出 lncRNA TARID 与去甲基化复合物中直接发生结合的蛋白,其相互识别机制还需进一步探讨。近年来,lnc RNA 对于正常机体基因表达的调控作用以及疾病发生发展的科学价值引起人们越来越多的关注,其不仅可以为包括癌症在内的许多复杂疾病的诊断和治疗提供新的依据和靶点,还有助于人们进一步认识高等真核生物极其复杂的调控网络。

[ 沈奇骢 摘译, 张迁 审阅. Arab K, Park YJ, Lindroth AM, et al. *Mol Cell*, 2014, 55( 4 ): 604-614. ]