

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.006

· 基础研究 ·

顺铂和紫杉醇对 CIK 细胞杀伤肺癌 A549 细胞的影响及其可能的机制

徐虹, 梅家转(南方医科大学附属郑州人民医院 肿瘤内科, 河南 郑州, 450003)

[摘要] **目的:** 研究顺铂、紫杉醇分别对 CIK 细胞杀伤肺癌 A549 细胞的影响并初步探讨其可能的分子机制。**方法:** MTT 法分别检测顺铂、紫杉醇处理 A549 细胞 24 h 的半数抑制浓度(IC_{50}), LDH 释放法检测 IC_{50} 的顺铂、紫杉醇分别作用 24 h 对 CIK 细胞杀伤 A549 细胞能力的影响; 流式细胞术检测顺铂、紫杉醇作用 24 h 对 A549 细胞表面 NKG2D 配体(MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3)表达的影响, 荧光定量 PCR 检测顺铂、紫杉醇作用对 A549 细胞内 DNA 损伤修复基因(*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*P53*)表达的影响。**结果:** 顺铂和紫杉醇对 A549 细胞作用 24 h 的 IC_{50} 分别为 70、39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。 IC_{50} 的顺铂、紫杉醇分别作用 24 h 后, CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性均明显增强($P < 0.05$); 同时 A549 细胞表面 MICA、MICB、ULBP2、ULBP3 表达均明显增加($P < 0.05$), ULBP1 表达降低($P < 0.05$); 顺铂诱导 A549 细胞 *ATM* 基因表达明显增加[(3.23 ± 1.62) $\times 10^{-6}$ vs (5.49 ± 3.91) $\times 10^{-8}$, $P < 0.05$], 紫杉醇诱导 A549 细胞 *P53* 基因表达明显增加[(14.90 ± 5.49) $\times 10^{-6}$ vs (3.68 ± 2.82) $\times 10^{-6}$, $P < 0.05$]。**结论:** 顺铂、紫杉醇均可增强 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性, 其分子机制可能与激活 DNA 损伤修复基因, 进而增加 NKG2D 配体表达有关。

[关键词] 非小细胞肺癌; 顺铂; 紫杉醇; CIK 细胞; NKG2D 配体; DNA 损伤修复基因

[中图分类号] R734.2; R730.54; R730.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)04-0443-05

The effect of cisplatin or paclitaxel on the activity of CIK cells to kill lung cancer A549 cells and its possible mechanism

Xu Hong, Mei Jiazhuang (Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of cisplatin and paclitaxel on the cytotoxic activity of cytokine-induced killer (CIK) cells toward human lung adenocarcinoma cell A549 and further explore the possible molecular mechanism involved. **Methods:** The IC_{50} of cisplatin and paclitaxel in inhibiting A549 cells were measured by using MTT assay. Cytotoxicity of CIK cells toward A549 cells that were pre-cultured with cisplatin or paclitaxel was measured through LDH releasing assay. The expression of NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) on A549 cells were analyzed by flow cytometry. The level of DNA damage response genes (*ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2*, *P53*) were assessed by fluorescent quantitative PCR. **Results:** The IC_{50} of cisplatin and paclitaxel in inhibiting A549 were 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. Cytotoxicity of CIK cells against A549 cells was significantly increased after the cells were pre-treatment with cisplatin (70 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or paclitaxel (39 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ($P < 0.05$). Expression of MICA, MICB, ULBP2, and ULBP3 on A549 cells was significantly increased by the cisplatin or paclitaxel pretreatment ($P < 0.05$), whereas the level of ULBP1 was decreased after the expose ($P < 0.05$). Furthermore, *ATM* expression in A549 cells was decreased by cisplatin treatment [(3.23 ± 1.62) $\times 10^{-6}$ vs (5.49 ± 3.91) $\times 10^{-8}$, $P < 0.05$], whereas the level of *P53* mRNA elevated significantly after treatment with paclitaxel [(14.90 ± 5.49) $\times 10^{-6}$ vs (3.68 ± 2.82) $\times 10^{-6}$, $P < 0.05$]. **Conclusion:** The results indicated that cisplatin and or paclitaxel can enhance the cytotoxic activity of CIK cells toward lung cancer cells. It is conceivable that they activate DNA-damage response genes, which in turn upregulate the expression of NKG2D ligands that make cells more susceptible to CIK cells.

[基金项目] 郑州市科技领军人才项目(No. 121PLJRC532)。Project supported by Science and Technology Leading Talents Program of Zhengzhou City (No. 121PLJRC532)

[作者简介] 徐虹(1989-), 女, 河北省邢台市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: xhmedic@163.com

[通信作者] 梅家转(Mei Jiazhuang, corresponding author), E-mail: mjzhuang@163.com

[**Key words**] non-small cell lung cancer; cisplatin; paclitaxel; CIK cell; NKG2D ligand; DNA damage repair gene [Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 443-447]

化疗是晚期非小细胞肺癌,特别是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)野生型肺癌治疗的主要手段。通过造成 DNA 损伤来杀伤肿瘤细胞是大多数化疗药物共同的分子机制。有研究^[1-2]表明, DNA 损伤能够诱导肿瘤细胞表面自然杀伤细胞活化性受体(natural killer cell group 2 member D, NKG2D)配体的表达,增强免疫细胞的杀伤活性。细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞表达 NKG2D 受体,其对肿瘤细胞的杀伤作用与肿瘤细胞表面 NKG2D 配体表达密切相关^[3-5]。本研究观察顺铂和紫杉醇对 CIK 细胞杀伤 EGFR 野生型非小细胞肺癌 A549 细胞的影响,并探讨其分子机制,为临床开展化疗联合 CIK 细胞治疗非小细胞肺癌提供依据。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

酶标仪购自美国 Beckman Coulter 公司, 荧光定量 PCR 仪购自美国 Agilent 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司。顺铂购自齐鲁制药有限公司(规格: 10 mg, 批号: 312042CF); 紫杉醇购自海南中化联合制药工业股份有限公司(规格: 60 mg/10 ml, 批号: 20140301)。LDH 释放实验试剂盒购自美国 Promega 公司, RNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Life Technologies 公司。鼠抗人 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗和 FITC 标记山羊抗鼠 IgG1 二抗均购自美国 R&D 公司。人肺癌 A549 细胞株由本实验室冻存。

1.2 引物设计与合成

用 Primer Express 3.0 软件设计 DNA 损伤修复基因(*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*P53*)及 *β-actin* 基因特异引物(表 1), 经美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库 BLAST 验证后, 由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.3 CIK 细胞制备

参考文献[6-7]进行。

1.4 MTT 法检测顺铂和紫杉醇杀伤肺癌 A549 细胞的 IC₅₀

取对数生长期 A549 细胞计数并稀释至 5 × 10⁴ 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μl, 培养 24 h, 分别加入顺铂或紫杉醇, 使其终浓度为 10、20、40、80 和 100 μg/ml, 培养 24 h(预实验发现, 药物和 CIK 作用

24、48、72 h 时对 A549 细胞杀伤作用基本相同, 因此选择 24 h 进行研究), 每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl, 继续培养 4 h, 吸去上清, 加入 DMSO 150 μl。酶标仪检测 490 nm 波长处光密度(*D*)值, 计算细胞增殖抑制率, 得出顺铂、紫杉醇的 24 h 半数抑制浓度(IC₅₀)^[8]。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 *D* 值 / 对照组 *D* 值) × 100%。实验重复 3 次。

表 1 DNA 损伤修复基因及 *β-actin* 基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences of DNA damage repair genes and *β-actin*

Gene	Primer sequence	Fragment size(bp)
<i>ATM</i>	F: 5'-GGTGGACATTATGAGAGCTTCTCAG-3'	139
	R: 5'-GCAGCTTCCAACAGCCTCTAGA-3'	
<i>ATR</i>	F: 5'-GAATGGAGTGCATGCTAACAGGT-3'	147
	R: 5'-CCCAGTCTGACACTCCATGTTGT-3'	
<i>CHK1</i>	F: 5'-TGCTCCTCTAGCTCTGCTGCAT-3'	147
	R: 5'-TCTGACACACCACCTGAAGTGACT-3'	
<i>CHK2</i>	F: 5'-AGAGGCAGACCCAGCTCTCA-3'	158
	R: 5'-CCACCACTTTGTCAAACAGCTCT-3'	
<i>P53</i>	F: 5'-TCACACTGGAAGACTCCAGTGGT-3'	163
	R: 5'-GGCAGTGTCTCGCTTACTGCT-3'	
<i>β-actin</i>	F: 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3'	162
	R: 5'-AGTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3'	

1.5 LDH 释放法检测 CIK 细胞联合顺铂、紫杉醇对 A549 细胞的杀伤活性

取对数生长期 A549 细胞计数并稀释至 5 × 10⁴ 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 50 μl, 顺铂组、紫杉醇组分别加入 IC₅₀ 的顺铂和紫杉醇, 对照组不做处理。24 h 后, 以 CIK 细胞为效应细胞, A549 细胞为靶细胞, 各组分别按效靶比为 10: 1、20: 1、30: 1 加入不同浓度 CIK 细胞 50 μl。另设效、靶细胞自然释放组(50 μl 效应细胞/靶细胞 + 50 μl RPMI 1640 培养液), 靶细胞最大释放组(50 μl 靶细胞 + 50 μl 1% NP-40)。按照试剂盒说明, 进行 4 h LDH 释放实验。酶标仪检测 490 nm 波长处 *D* 值, 计算 CIK 细胞的杀伤活性^[9-11]。CIK 细胞杀伤率(%) = (实验组 *D* 值 - 靶细胞自然释放组 *D* 值 - 效应细胞自然

释放组 D 值)/(靶细胞最大释放组 D 值 - 靶细胞自然释放组 D 值) $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测顺铂、紫杉醇对 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达的影响

对数生长期 A549 细胞以 5×10^4 个/ml 的密度接种于 2 个 100 ml 培养瓶中,培养 24 h 后,分别加入 IC_{50} 的顺铂、紫杉醇,对照组不加药物处理。24 h 后收集各组细胞,分入离心管,分别加入鼠抗人 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗 ($1 \mu\text{g}/10^6$ cells), 4°C 孵育 30 min, PBS 洗涤后加入 FITC 标记山羊抗鼠 IgG1 二抗, 4°C 孵育 30 min。流式细胞术分析 1×10^4 个细胞中阳性细胞数,计算阳性细胞百分率。实验重复 3 次。

1.7 荧光定量 PCR 法检测顺铂、紫杉醇对 A549 细胞 DNA 损伤修复基因表达的影响

使用 RNA 提取试剂盒分别提取顺铂、紫杉醇作用 24 h 前后 A549 细胞的 RNA,紫外分光光度计检验纯度并定量,将所得 RNA 逆转录为 cDNA。荧光定量 PCR 反应体系为: SYBR Green PCR Master Mix ($2 \times$) $10 \mu\text{l}$, 上游引物 (10 mmol/L) $0.4 \mu\text{l}$, 下游引物 (10 mmol/L) $0.4 \mu\text{l}$, cDNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 加水至总体积 $20 \mu\text{l}$ 。Real-time PCR 检测 *ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*P53* 的表达,反应条件为: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火/延伸 1 min, 共 50 个循环。采用相对定量法处理数据,以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,相对表达量 $Z = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组资料之间的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂、紫杉醇增强 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤活性

MTT 检测结果显示,顺铂和紫杉醇作用于肺癌 A549 细胞 24 h 的 IC_{50} 分别为 $70 \mu\text{g/ml}$ 、 $40 \mu\text{g/ml}$ 。LDH 释放实验检测结果(表 2)显示,以 IC_{50} 的顺铂、紫杉醇分别作用于 A549 细胞 24 h 后,效靶比为 10:1、20:1、30:1 时,CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤率均较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。

2.2 顺铂、紫杉醇增加 A549 细胞表面 NKG2D 配体表达

流式细胞术检测结果(表 3)显示, IC_{50} 的顺铂、紫杉醇分别作用 24 h 后,A549 细胞表面 MICA、MICB、ULBP2、ULBP3 表达均较对照组显著增加 ($P < 0.05$),而 ULBP1 表达均降低 ($P < 0.05$)。

表 2 顺铂或紫杉醇增强 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤力(%)

Tab. 2 Killability of CIK cells against A549 cells was enhanced by cisplatin or paclitaxel treatment (%)

Group	CIK cells: A549 cells		
	10:1	20:1	30:1
Control	11.88 \pm 1.57	35.56 \pm 1.98	45.03 \pm 1.74
Cisplatin	17.64 \pm 1.44*	46.39 \pm 3.51*	73.81 \pm 1.62*
Paclitaxel	18.24 \pm 2.56*	47.19 \pm 1.17*	61.21 \pm 2.33*

* $P < 0.05$ vs control group

表 3 顺铂或紫杉醇对 A549 细胞 NKG2D 配体表达的影响(%)

Tab. 3 Effects of cisplatin or paclitaxel on NKG2D ligands expression of A549 cells (%)

Group	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
Control	66.62 \pm 1.42	32.75 \pm 2.37	9.80 \pm 2.40	4.09 \pm 1.94	34.96 \pm 4.22
Cisplatin	75.48 \pm 2.62*	51.17 \pm 2.20*	3.74 \pm 0.24*	39.57 \pm 1.28*	73.06 \pm 4.88*
Paclitaxel	74.93 \pm 1.91*	38.22 \pm 2.43*	3.77 \pm 1.04*	29.26 \pm 1.92*	66.08 \pm 4.36*

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 顺铂、紫杉醇增加 A549 细胞 DNA 损伤修复基因表达

Real-time PCR 结果(表 4)显示, IC_{50} 的顺铂、紫杉醇分别作用 A549 细胞 24 h 后,顺铂诱导 *ATM* 基

因表达较对照组明显增加 [$(3.23 \pm 1.62) \times 10^{-6}$ vs $(5.49 \pm 3.91) \times 10^{-8}$, $P < 0.05$],紫杉醇诱导 *P53* 基因表达较对照组明显增加 [$(14.90 \pm 5.49) \times 10^{-6}$ vs $(3.68 \pm 2.82) \times 10^{-6}$, $P < 0.05$]。

表 4 顺铂或紫杉醇对 A549 细胞 DNA 损伤修复基因表达的影响
Tab.4 Effect of cisplatin or paclitaxel on the expression of DNA damage repair genes of A549 cells

Gene	Control	Cisplatin	Paclitaxel
<i>ATM</i>	$(5.49 \pm 3.91) \times 10^{-8}$	$(3.23 \pm 1.62) \times 10^{-6} *$	$(3.53 \pm 3.73) \times 10^{-6}$
<i>ATR</i>	$(2.05 \pm 1.37) \times 10^{-2}$	$(6.15 \pm 6.04) \times 10^{-3}$	$(4.78 \pm 7.67) \times 10^{-2}$
<i>CHK1</i>	$(2.63 \pm 1.68) \times 10^{-3}$	$(6.68 \pm 4.56) \times 10^{-4}$	$(1.22 \pm 1.01) \times 10^{-3}$
<i>CHK2</i>	$(6.10 \pm 8.73) \times 10^{-5}$	$(5.74 \pm 4.10) \times 10^{-5}$	$(10.30 \pm 6.73) \times 10^{-5}$
<i>P53</i>	$(3.68 \pm 2.82) \times 10^{-6}$	$(3.88 \pm 2.44) \times 10^{-6}$	$(14.90 \pm 5.49) \times 10^{-6} *$

* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

CIK 细胞表面表达 NKG2D 活化性受体,对肿瘤细胞杀伤作用依赖 NKG2D 受体和肿瘤细胞表面 NKG2D 配体结合,释放穿孔素和颗粒酶发挥作用^[11-14]。NKG2D 配体表达于肿瘤细胞表面,是 CIK 细胞识别肿瘤细胞的重要分子。NKG2D 配体包括两大类:MHC-I 类链相关分子 A 或 B (MHC class I chain-related molecule A /B, MICA/B)及 UL16 结合蛋白(UL16 binding proteins 1/2/3, ULBP1/2/3)。增加 NKG2D 配体表达能显著增强 CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性^[15-16]。研究^[17]表明,DNA 损伤能促使机体启动 DNA 损伤修复系统,上调 DNA 损伤修复基因(*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*P53* 等)表达,进而诱导肿瘤细胞表面 NKG2D 配体表达,增强 CIK 细胞的抗肿瘤活性。

化疗是 EGFR 野生型肺癌最主要的治疗手段,紫杉醇联合铂类是该类患者的标准治疗方案。顺铂可与 DNA 交联,直接造成 DNA 结构损伤。本研究发现,顺铂、紫杉醇均可诱导肺癌 A549 细胞 DNA 损伤修复基因表达,顺铂诱导 *ATM* 表达增加,紫杉醇诱导 *P53* 表达增加。紫杉醇是细胞有丝分裂抑制剂,目前尚未有研究发现其可直接造成 DNA 损伤,紫杉醇诱导 *P53* 表达可能与其间接导致 DNA 损伤有关。本研究发现,紫杉醇、顺铂作用后,A549 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP2、ULBP3 表达均增强,对 CIK 细胞杀伤敏感性也增强,说明紫杉醇、顺铂可诱导大部分 NKG2D 配体的表达,从而增强肿瘤细胞对 CIK 细胞的杀伤敏感性。而 ULBP1 表达降低,并没有显著影响肿瘤细胞对 CIK 细胞的杀伤敏感性,其表达降低的原因有待进一步研究。

临床研究^[18-19]亦证实,化疗联合自体 CIK 细胞

治疗能够延长肿瘤患者的生存期。本研究发现,紫杉醇、顺铂联合 CIK 细胞能够增强 CIK 细胞对 A549 细胞的杀伤力,并初步探索了其分子机制,为化疗联合 CIK 细胞治疗恶性肿瘤提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, et al. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31(1): 413-441.
- [2] Le Bert N, Lam AR, Ho SS, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensor pathways regulate NKG2D ligand expression [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3: e29259.
- [3] Durrieu L, Lemieux W, Dieng MM, et al. Implication of different effector mechanisms by cord blood-derived and peripheral blood-derived cytokine-induced killer cells to kill precursor B acute lymphoblastic leukemia cell lines [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(6): 845-856.
- [4] 何金媛,贾祝霞,蔡晓辉,等. NKG2D 在细胞因子诱导的杀伤性细胞(CIK)抗血液肿瘤细胞的作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(6): 1380-1384.
- [5] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. *J Cancer*, 2011, 2: 363-368.
- [6] 梅家转,刘桂举,李瑞君,等. IL-15 上调 NKG2D 表达对 CIK 细胞杀伤活性的增强效应 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(5): 495-497.
- [7] 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.
- [8] 梅家转,刘桂举,冯睿婷,等. 顺铂对鼻咽癌细胞 NKG2D 配体表达和 NK 细胞杀伤活性的增强作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(12): 996-998.
- [9] 陈伟,简迪,姜志明,等. Thymoglobulin 与 CD3 单克隆抗体在细胞因子诱导的杀伤细胞制备中的作用比较 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(7): 681-685, 690.
- [10] 于开影,孙英慧,简迪,等. 肿瘤患者自体 CIK 细胞输注增强再次制备时 CD3⁺CD56⁺ 细胞的体外扩增能力 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(7): 748-753, 758.
- [11] 梅家转,刘桂举,张晓娟,等. IL-12 增强 CIK 细胞对食管癌

- EC9706 细胞的杀伤活性 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20 (2): 197-200.
- [12] Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote anti-tumor immunity [J]. J Transl Med, 2013, 11(1): 83.
- [13] Rajbhandary S, Zhao MF, Zhao N, et al. Multiple cytotoxic factors involved in IL-21 enhanced antitumor function of CIK cells signaled through STAT-3 and STAT5b pathways [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(10): 5825-5831.
- [14] Chen Y, Lin G, Guo ZQ, et al. Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy [J/OL]. PLoS ONE. 2013, 8(7): e69044 [2015-01-12]. <http://Journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069044/>.
- [15] Bae JH, Kim SJ, Kim MJ, et al. Susceptibility to natural killer cell-mediated lysis of colon cancer cells is enhanced by treatment with epidermal growth factor receptor inhibitors through ULL16-binding protein-1 induction [J]. Cancer Sci, 2012, 103(1): 7-16.
- [16] Lam AR, Le Bert N, Ho SS, et al. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma [J]. Cancer Res, 2014, 74(8): 2193-2203.
- [17] Morisaki T, Hirano T, Koya N, et al. NKG2D-directed cytokine-activated killer lymphocyte therapy combined with gemcitabine for patients with chemoresistant metastatic solid tumors [J]. Anticancer Res, 2014, 34(8): 4529-4538.
- [18] Li JJ, Gu MF, Pan K, et al. Autologous cytokine-induced killer cell transfusion in combination with gemcitabine plus cisplatin regimen chemotherapy for metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. J Immunother, 2012, 35(2): 189-195.
- [收稿日期] 2015 - 02 - 05 [修回日期] 2015 - 05 - 18
- [本文编辑] 黄静怡

· 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, Sodeman 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/anatormp>.
- [2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.