

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.017

· 临床研究 ·

CD3 和 CD28 单克隆抗体联合作用对 CIK 细胞及其亚群增殖及功能的影响

李玉^{1a,b}, 韩娇玲³, 张震^{1a}, 王菲^{1a,b}, 李红^{1a}, 黄建敏^{1a}, 赵璇^{1a}, 杨黎^{1a,b,c}, 黄岚^{1a,c}, 张毅^{1a,b,c,2} (1. 郑州大学第一附属医院 a. 生物细胞治疗中心; b. 肿瘤科; c. 河南省肿瘤免疫治疗工程技术研究中心, 河南 郑州 450052; 2. 郑州大学生命科学院, 郑州 450052; 3. 郑州市骨科医院 检验科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 探讨 CD3 和 CD28 单克隆抗体联合作用对细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞及其亚群增殖及功能的影响。**方法:** 采集 2014 年 6 月至 2015 年 6 月在郑州大学第一附属医院接受生物细胞治疗的 20 例肿瘤患者(肾癌 6 例, 肺癌 5 例, 肝癌、乳腺癌和恶性黑色素瘤各 2 例, 胆囊癌、淋巴瘤和卵巢癌各 1 例)的外周血, 每例外周血均分为 4 组(对照组, 单用 CD3 单抗组, 单用 CD28 单抗组, CD3 和 CD28 单抗联合作用组)进行 CIK 细胞的诱导培养。用 CFSE 染色检测 CIK 细胞的增殖能力; ELISA 检测 CIK 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 的水平; 磁珠分选 CIK 细胞亚群 CD4⁺、CD8⁺ 和 CD56⁺ 细胞, 然后用 ELISA 检测对 CIK 细胞亚群分泌 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 能力的影响。**结果:** CD3/CD28 单抗联合作用(PI = 59.35)对 CIK 细胞的增殖能力的影响与单独使用 CD3 单抗(PI = 64.4)相比效果并不明显, 但是可以刺激 CIK 细胞分泌较高水平的 IFN- γ 和 TNF- α [IFN- γ : (384.6 ± 263.1) vs (201.5 ± 271.5) pg/ml, $P = 0.0361$; TNF- α : (4.795 ± 1.251) vs (2.835 ± 0.443) pg/ml, $P = 0.0265$]; 进一步分析发现, 两单抗的联合作用可增强亚群细胞 CD8⁺ 分泌 IFN- γ 、CD56⁺ 分泌 IL-2 和 TNF- α 的活性, 从而起到对淋巴细胞功能的增强作用。**结论:** CD3 与 CD28 单抗联合作用不能增强 CIK 的增殖能力, 但可以在一定程度上增强 CIK 细胞的功能, 在肿瘤的细胞免疫治疗应用中具有一定的潜力。

[关键词] CD3 单克隆抗体; CD28 单克隆抗体; 细胞因子诱导的杀伤细胞; IFN- γ ; TNF- α ; IL-2; 肿瘤免疫治疗

[中图分类号] R730.51; R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0255-06

Influence of combined action of anti-CD3 monoclonal antibody and anti-CD28 monoclonal antibody on proliferation and function of CIK cells and its subpopulations

LI Yu^{1a,b}, HAN Jiaoling³, ZHANG Zhen^{1a}, WANG Fei^{1a,b}, LI Hong^{1a}, HUANG Jianmin^{1a}, ZHAO Xuan^{1a}, YANG Li^{1a,b,c}, HUANG Lan^{1a,c}, ZHANG Yi^{1a,b,c,2} (1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, a. Biotherapy Center; b. Department of Oncology; c. Tumor Immunotherapy Engineering Research Center of Henan Province, Zhengzhou 450052, Henan, China; 2. School of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Orthopaedic Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of combined action of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies on the proliferations and functions of cytokine-induced killer (CIK) cell and its subsets. **Methods:** Twenty peripheral blood samples of the patients with tumors (6 cases of renal carcinoma, 5 cases of lung cancer, every 2 cases of hepatic carcinoma, breast cancer and melanoma, and every 1 case of gallbladder carcinoma, lymphoma and ovarian cancer) who received biotherapy at the First Hospital Affiliated to Zhengzhou University from June 2014 to June 2015 were collected. Each sample of the peripheral blood was divided into four groups on average, namely control group, anti-CD3 monoclonal antibody

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(No. 81271815, 81171986); 国家自然科学基金中美生物医学合作研究项目(No. 812111102); 卫生部科研攻关基金资助项目(No. 20110110001); 河南省科技厅基础与前沿技术研究基金(No. 112300410153, 122300410155)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81271815, 81171986), the National Natural Science Foundation of China and Sino-US Cooperation in Biomedical Research Projects (No. 812111102), the Research Grant from the Ministry of Public Health (No. 20110110001), and the Basic and Advanced Technology Research Foundation from Department of Science and Technology of Henan Province (No. 112300410153, 122300410155)

[作者简介] 李玉(1991-), 女, 河南省永城市人, 硕士, 主要研究方向为肿瘤免疫与生物细胞治疗, E-mail: liyu1031@163.com

[通信作者] 张毅(ZHANG Yi, corresponding author), E-mail: yizhang@zzu.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.2029.014.html>

alone group, anti-CD28 monoclonal antibody alone group and anti-CD3 combined with anti-CD28 monoclonal antibodies group, which were cultured with CIKs. Proliferation of the CIK cells was detected with CFSE staining. Secretion levels of IFN- γ , TNF- α and IL-2 by the CIK cells were detected by ELISA. CD4⁺, CD8⁺ and CD56⁺ cells of CIK cell subsets were sorted with magnetic beads. Then their abilities of secreting IFN- γ , TNF- α and IL-2 were examined by ELISA assay.

Results: No significant difference in the proliferation ability of the CIK cells was detected between the anti-CD3/anti-CD28 combined group (PI = 59.35) and anti-CD3 alone group (PI = 64.4). However, combination of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies could stimulate CIK cells to secrete higher level of IFN- γ and TNF- α than those done by anti-CD3 alone, IFN- γ : (384.6 ± 263.1) pg/ml vs (201.5 ± 271.5) pg/ml, $P = 0.0361$; TNF- α (4.795 ± 1.251) pg/ml vs (2.835 ± 0.443) pg/ml, $P = 0.0265$. Further analysis found that the combined action of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies could enhance activity of CD8⁺ cell subset to secrete IFN- γ and activity of CD56⁺ cell subset to secrete IL-2, thus strengthen the functions of lymphocytes. **Conclusion:** The combined action of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies could not enhance proliferation of the CIK cells, but strengthen function of the CIK cells to a certain extent, which has certain potential to be used in the immunotherapy of tumor cells.

[**Key words**] CD3 monoclonal antibody; CD28 monoclonal antibody; cytokine-induced killer (CIK) cell; IFN- γ ; TNF- α ; IL-2; tumor immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 255-260. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.017]

T 淋巴细胞活化的整个过程不仅需要第一信号,即由 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)识别抗原产生,经 CD3 分子将信号转导至细胞内,还需要第二信号,即由抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)或者靶细胞表面的协同刺激分子与 T 细胞表面的相应协同刺激分子相互作用产生^[1-2]。目前,研究^[3-4]已经发现,CD80、CD86 等是一类重要的协同刺激分子,主要表达在 APC 细胞表面,通过与 T 细胞表面受体 CD28 相互作用,激活已经接受第一信号刺激的 T 细胞,使其增殖并分泌 IL-2 及其他细胞因子。细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是一群增殖能力强、杀瘤活性高的免疫效应细胞,兼具有 T 淋巴细胞强大的抗癌活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤等优点^[5-6]。研究^[7]表明 CD3 单抗和 CD28 单抗联合作用可以促进 CIK 细胞增殖,并在一定程度上增强 CIK 细胞的功能,但是目前对 CIK 细胞哪个亚群具有影响的相关报道较少。本实验就 CD3 与 CD28 单抗联合作用对 CIK 细胞及其亚群功能的影响进行了研究,旨在深入了解第二信号系统对 CIK 细胞亚群的影响,并为 CIK 细胞在临床上的应用提供更详实的依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

郑州大学第一附属医院生物细胞治疗中心接受生物细胞治疗的肿瘤患者 20 例(肾癌 6 例,肺癌 5 例,肝癌、乳腺癌和恶性黑色素瘤各 2 例,胆囊癌、淋巴瘤和卵巢癌各 1 例)。病例纳入标准:(1)所有病例

均经两位病理学专家会诊以明确诊断;(2)临床病例资料完整。经患者同意并签署知情同意书,并经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(FBS, 天津市正江现代生物技术有限公司),淋巴分离液(上海华精生物高科技有限公司),ELISA 试剂盒(美国 Biolegend 公司),改良型 Hyclone RPMI 1640 培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],重组人 IL-2(北京双鹭药业股份有限公司),IFN- γ (上海凯茂生物医药有限公司),MACS GMP CD3 Pure、MACS GMP CD28 Pure、Human CD4 McAb Microbeads、Human CD8 McAb Microbeads、Human CD56 McAb Microbeads(德国美天旌公司)。FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司),倒置显微镜(Leica),显微镜(Primo star iLED),百级超净工作台(珠海市再鑫仪器有限公司),酶标仪、大容量离心机(赛默飞世尔仪器有限公司),磁珠分选仪(德国美天旌公司)。

1.3 外周血单个核细胞的提取

无菌环境下,采集患者外周血 10 ml,肝素抗凝, PBS 等体积稀释后,经 Ficoll 密度梯度离心法(dec5, acc5, $2\ 500 \times g$ 离心 25 min)获取 PBMC。PBS 洗涤 2 次后,用 RPMI 1640 完全培养基(含 10% 灭活 FBS、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)调整 PBMC 密度为 2×10^6 个/ml。实验设计见表 1。

第 0 天,各组处理相同,加入 IFN- γ ($2\ 000$ U/ml)。第 1 天,各组分别加入 IL-2 ($2\ 000$ U/ml)和相

应单抗, CD3 组加入 CD3 单抗(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$); CD3/CD28 组加入 CD3 单抗(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 CD28 单抗(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$);CD28 组加入 CD28 单抗(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$);空白对照组不加单抗。之后的培养过程各组均相同。每隔 2~3 d 换液,加入 IL-2(1 000 U/ml),培养至 13 d。

表 1 实验设计
Tab. 1 Experiment design

Group	IL-2	CD28 McAb	CD3 McAb
Control	+	-	-
CD3	+	-	+
CD3/CD28	+	+	+
CD28	+	+	-

1.4 CFSE 染色流式细胞仪检测 CD3/CD28 联合作用对淋巴细胞增殖的影响

细胞培养至第 5 天时,进行羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(5, 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)标记,FCM 检测淋巴细胞的增殖情况。具体步骤如下:收集 1×10^6 个细胞,离心,弃上清,加入无血清培养基重悬,避光加入 2 μl CFSE(终浓度 2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。1 200 $\times g$ 离心 8 min,弃上清,加入 0.5 ml FBS 终止反应,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 min。无菌 PBS 洗去未结合 CFSE 的细胞。加入 4 ml 培养基含 10% FBS,重悬,取一部分细胞行 FCM,其余细胞转移至培养板中继续培养。第 6 天起,每天取样 500 μl 行 FCM,至第 13 天。FCM 检测的样本制备流程:取细胞悬液 500 μl 离心,弃上清,加入相应抗体及同型对照,同型对照管加入 TITC Mouse IgG2a, κ , Isotype Ctrl、APC Mouse IgG2a, κ , Isotype Ctrl 和 PE Mouse IgG2a, κ , Isotype Ctrl。样本管加入相应的荧光抗体, human CD8 antibodies PE 和 human CD4(VIT4) antibodies APC,避光 30 min,离心,弃上清,用 PBS 洗涤一次,然后加入 500 μl PBS,行 FCM。

1.5 ELISA 检测细胞因子的分泌情况

取培养 12 d 的细胞,对各组细胞进行计数,调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。用无菌的 EP 管,取出 1 000 μl 悬液,1 200 $\times g$ 离心 8min,弃上清,用 PBS 重悬洗涤 1 次,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬于 1 ml 培养基中,分组培养 48 h 后,取上清,ELISA 检测细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 分泌情况。

1.6 磁珠分选 CIK 细胞亚群

细胞培养至第 13 天,对各组细胞进行计数,取一定量细胞悬液,1 200 $\times g$ 离心 8 min,弃上清。加入磁分选缓冲液重悬,再加入相应的磁珠,轻轻吹打均匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,每隔 5 min 轻轻摇匀一次。孵育期间用预冷的缓冲液冲洗磁柱,后加入一定量的缓冲液轻轻重悬,再加入到磁柱中。自然流下的为阴性细胞。然后用缓冲液洗涤柱子 3 次。将柱子移出磁场,加入一定量的缓冲液后将阳性细胞推出柱子,洗涤后,完全培养基重悬,进行培养。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 示,ELISA 结果比较采用单因素方差分析,采用 Kaplan-Meier 法绘制变化曲线。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD3 与 CD28 单抗联合作用对 CIK 细胞增殖的影响

ModFit 软件分析 CD3 与 CD28 单抗联合作用对 CIK 细胞增殖的影响结果如图 1 所示:从图 1A、1B、1C 可知,CD3 单抗对 CIK 细胞的增殖具有重要影响,CIK 细胞大多数增殖到第 7~9 代。CD3 与 CD28 单抗联合应用时,当 CD28 单抗浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时对 CIK 细胞的增殖影响不大。以 PI 指数表示细胞的增殖情况如图 1D 所示:增殖结果说明,CD3 组和 CD3/CD28 组细胞增殖差异不明显,即当 CD28 单抗浓度在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,CD28 和 CD3 单抗联合作用对 CIK 的增殖与 CD3 单抗单独作用相比差异不明显。单纯的 CD28 单抗以及不加单抗均不能有效促进 CIK 细胞增殖。

2.2 两单抗联合作用对 CIK 细胞分泌细胞因子的影响

结果如图 2 所示:由图 2A 可知,与 CD3 单独作用组相比 CD28 与 CD3 联合作用可以促进 IFN- γ 的分泌,CD3 组的分泌量为(201.5 $\pm$ 271.5)pg/ml,CD3/CD28 组为(384.6 $\pm$ 263.1)pg/ml,差异具有统计学意义($P = 0.0361$);由图 2B 可知,加入 CD28 单抗与单独的 CD3 单抗作用对分泌 IL-2 的能力没有明显差异($P > 0.05$);由图 2C 可知,与 CD3 单独作用组相比 CD28 与 CD3 联合作用可以促进 TNF- α 的分泌,CD3 组的分泌量为(2.835 $\pm$ 0.443)pg/ml,CD3/CD28 组为(4.795 $\pm$ 1.251)pg/ml,差异具有统计学意义($P = 0.0265$)。

ELISA 结果表明,CD28 与 CD3 单抗联合应用可以促进 CIK 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α ,

对淋巴细胞的功能具有增强的作用,但不能增强 CIK 细胞分泌 IL-2 的能力。

2.3 成功分选 CIK 细胞亚群

CIK 细胞培养至 13 d 时,磁珠分选出各细胞亚

群,流式细胞仪检测分选前后的 CIK 细胞及其亚群的比例见图 3。结果表明磁珠分选后的细胞纯度可以进行后续的实验。

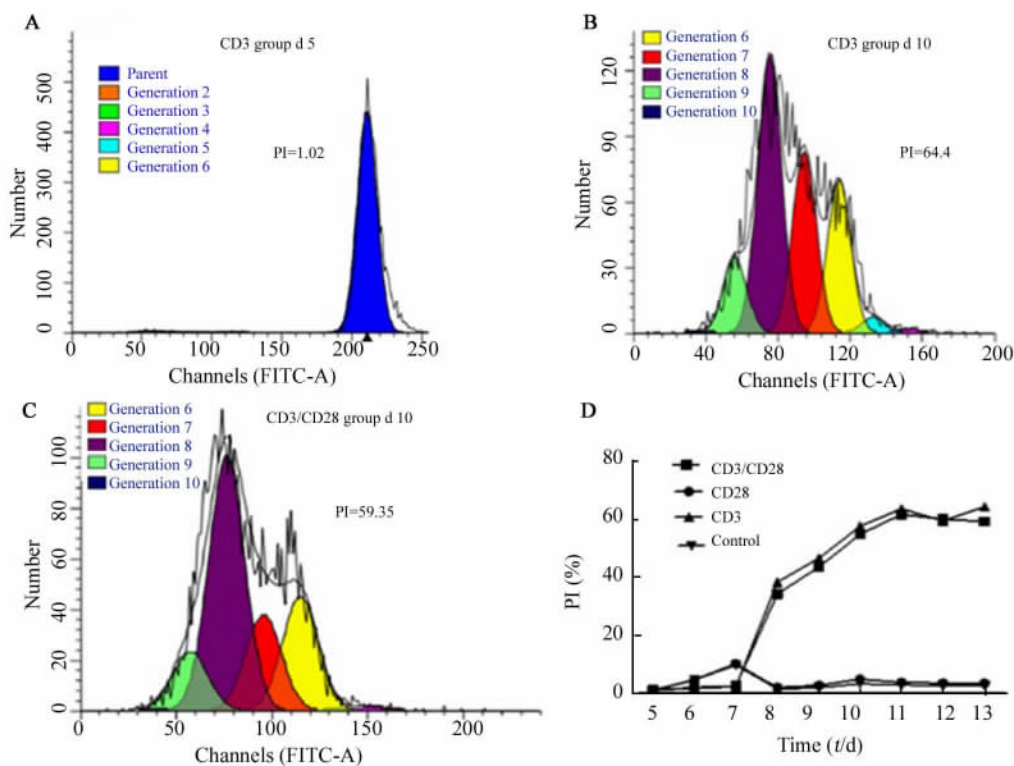


图 1 CFSE 染色流式细胞术检测 CIK 细胞的增殖

Fig. 1 Proliferation index of CIK cells was detected by CFSE staining and Flow cytometry

A:The proliferation index of CIK cells was detected by flow cytometry 5 d after culture;

B:The proliferation index of CIK cells was analyzed by flow cytometry 10 d after culture with only CD3;

C:The proliferation index of CIK cells was analyzed by flow cytometry 10 d after culture under the condition of CD3 combined with CD28;D:The index of cell proliferation was compared, the horizontal axis represent the time of cell culture,vertical axis represent

the proliferation index (PI) of CIK cells. PI :The total number of generations of cells obtained by dividing the percentage of cells in the maternal, it can be used to compare the ability to divide under different culture conditions

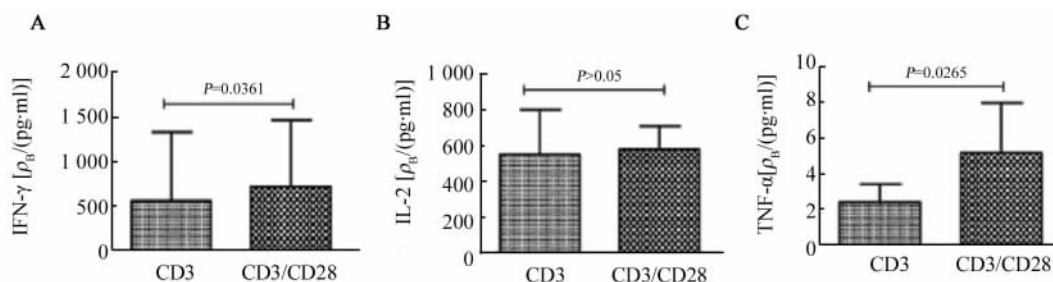


图 2 ELISA 检测 CIK 细胞因子 IFN-γ、IL-2、TNF-α 分泌情况

Fig. 2 Secretion of IFN-γ,IL-2 and TNF-α of CIK cells were detected by ELISA

A:Under the condition of CD3 combined with CD28,CIK cells produce more IFN-γ than culture with only CD3 12 d after culture($P=0.0361$); B:Secretion of IL-2 under two different culture conditions were equal;C:Under the

condition of CD3 combined with CD28,CIK cells produce more TNF-α than culture with only CD3 12 d after culture($P=0.0265$)

2.4 CD3 和 CD8 单抗对 CIK 细胞亚群细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌的影响

CIK 细胞分选后用无血清培养基重悬,培养 48 h 后,取上清,进行 ELISA 检测细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 的分泌。每组实验共做 3 例独立的实验,

结果经 SPSS 分析,CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD4⁻CD8⁻ 细胞分泌细胞因子的结果见表 2。ELISA 结果表明,CD3 和 CD28 单抗联合作用可以促进 CD8⁺ 细胞分泌 IFN- γ , 促进 CD56 细胞分泌 IL-2 和 TNF- α , 对 CD4⁺ 细胞细胞因子的分泌没有影响。

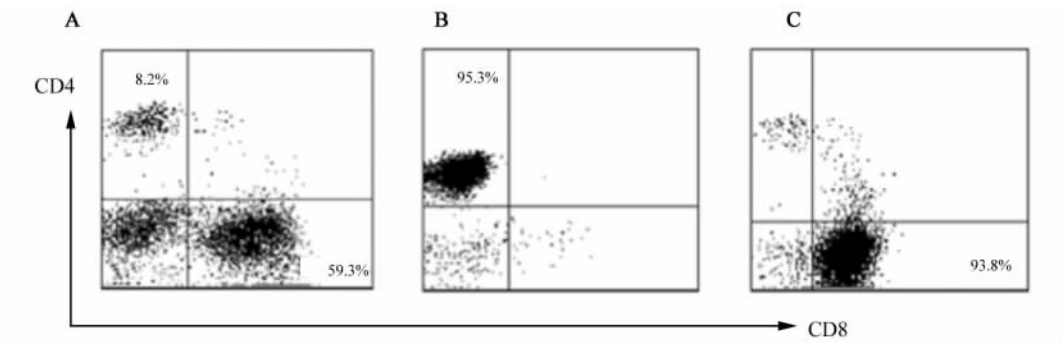


图3 流式细胞仪检测 CIK 细胞亚群的磁分选效果

Fig. 3 Efficiency of magnetic separation was analyzed by flow cytometry

A:Before sorter; B:Persent of CD4⁺ cell after sorters; C:Persent of CD8⁺ cells after sorter

表2 ELISA 检测 CIK 细胞亚群细胞因子的分泌[$\rho_B/(pg \cdot ml)$]

Tab. 2 Cytokines secreted by different subsets of CIK cell were detected by ELISA[$\rho_B/(pg \cdot ml)$]

	CD3 McAb	CD3 + CD28 McAb	P
Secretion of IFN- γ			
CD3 ⁺ CD8 ⁺	131.7 $\pm$ 11.48	210.6 $\pm$ 13.79	<0.01
CD3 ⁺ CD4 ⁺	67.57 $\pm$ 0.73	72.09 $\pm$ 35.81	>0.05
CD56 ⁺	609.4 $\pm$ 101.4	465.4 $\pm$ 95.76	<0.01
Secretion of IL-2			
CD3 ⁺ D8 ⁺	666.1 $\pm$ 157.8	488.7 $\pm$ 201.1	>0.05
CD3 ⁺ D4 ⁺	477.6 $\pm$ 232.7	654.8 $\pm$ 202.6	>0.05
CD56 ⁺	90.57 $\pm$ 228.5	119.6 $\pm$ 190.1	<0.01
Secretion of TNF- α			
CD3 ⁺ D8 ⁺	1.28 $\pm$ 8.63	0.94 $\pm$ 1.29	>0.05
CD3 ⁺ D4 ⁺	3.69 $\pm$ 1.98	1.02 $\pm$ 2.39	>0.05
CD56 ⁺	4.02 $\pm$ 1.05	4.45 $\pm$ 2.71	<0.01

3 讨论

CIK 是一群增殖能力强、杀瘤活性高的免疫效应细胞,目前临床应用广泛,已有多项 CIK 细胞治疗肿瘤的研究取得较好成效^[8-10]。CD28 是活化的 T 细胞表面标志物,表达于几乎所有的 CD4⁺ T 细胞

和大多数 CD8⁺ T 细胞上,其配体是表达于抗原提呈细胞的 B7 分子,两者结合产生的协同刺激信号在 T 细胞活化中发挥重要作用^[11-13]。CD28 单抗与 CD3 单抗联合应用可以有效促进 CIK 细胞的增殖,有文献^[14]表明 CD28 的浓度在 0.5 ~ 10 $\mu g/ml$ 之间可以促进淋巴细胞的增殖,5 $\mu g/ml$ 时效果最佳,本实验的增殖结果显示,在加入 CD28 单抗 10 $\mu g/ml$ 时对 CIK 细胞的增殖效果并不明显。

IFN- γ 是由 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞产生的同源二聚体糖蛋白,可通过多种途径直接或间接发挥抗肿瘤作用,增强 NK 细胞、巨噬细胞以及细胞毒性 T 细胞(CTL)的活性^[15-16]。IL-2 是由 Th1 型细胞分泌的细胞因子,是人体免疫应答的核心物质,具有免疫增强、抗肿瘤和抗感染等作用^[17-18]。接受了预刺激信号的 CD8⁺ T 细胞可以受 IL-2 的作用活化成 CTL,发挥细胞毒作用;在一定条件下,CD4⁺ T 细胞也可以受 IL-2 的诱导而具有杀伤作用。TNF- α 是由 Th1 型细胞分泌的细胞因子,对肿瘤细胞的杀伤具有重要作用。本实验结果显示,CD3/CD28 联合作用可以促进 IFN- γ 、TNF- α 的分泌,与文献^[19-20]报道结果一致;CD28 与 CD3 联合作用可以增强 CIK 细胞分泌细胞因子的能力,提高 CIK 细胞的功能。为了进一步验证是 CIK 细胞的哪个亚群分泌各种细胞因子,对培养 13 d 的细胞进行了磁珠分选,以检测各个亚群的细胞因子的分泌情况。本实验结果显示,CD3/CD28 联合作用可以促进 CD8⁺ 细胞分泌

IFN- γ , 促进 CD56⁺ 细胞释放 IL-2、TNF- α , 但对 CD4⁺ 细胞细胞因子分泌没有影响, 分选前 CD3/CD28 联合作用对 CIK 细胞分泌 IL-2 没有显著影响; 但是分选后发现, CD3/CD28 联合作用可以促进 CD56⁺ 细胞分泌 IL-2, 其原因可能是 CIK 细胞是一群异质性的细胞, 功能可能会相互影响, 分选后各个亚群细胞的功能突显出不一致的地方, 但是各个细胞亚群之间具体是怎么相互作用的, 以及细胞因子分泌的具体机制还需要更进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] BRETSCHER P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later [J]. Immunol Today, 1992, 13(2): 74-76. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90138-w.
- [2] JUNE C H, BLUESTONE J A, NADLER L M, et al. The B7 and CD28 receptor families [J]. Immunol Today, 1994, 15(7): 321-331. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90080-9.
- [3] BOISE L H, MINN A J, NOEL P J, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL [J]. Immunity, 1995, 3(1): 87-98. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90161-2.
- [4] ZHENG X G, TURKA L A. Blocking T-cell costimulation to prevent transplant rejection [J]. Transplant Proc, 1998, 30(5): 2146-2149. DOI: 10.1016/s0041-1345(98)00568-5.
- [5] MESIANO G, TODOROVIC M, GAMMAITONI L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(6): 673-684. DOI: 10.1517/14712598.2012.675323.
- [6] CHEN Y, LIN J, GAO Z Q, et al. MHC I-related chain a expression in gastric carcinoma and the efficacy of immunotherapy with cytokine-induced killer cells [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(10): 3221-3230. PMID: 26693072.
- [7] YAMADA-OHNISHI Y, AZUMA H, URUSHIBABA N, et al. Cytotoxic difference of T cells expanded with anti-CD3 monoclonal antibody in the presence and absence of anti-CD28 monoclonal antibody [J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(3): 315-322. DOI: 10.1089/15473.2804323099244.
- [8] ZHAO X, ZHANG Z, LI H, et al. Cytokine induced killer cell-based immunotherapies in patients with different stages of renal cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2015, 362(2): 192-198. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.043.
- [9] ZHANG Y, SONG Y, GAO Q, et al. Increased survival time of a patient with metastatic malignant melanoma following immunotherapy: a case report and literature review [J]. Oncol Lett, 2015, 10(2): 883-886. DOI: 10.3892/ol.2015.3296.
- [10] LIU K, SONG G, HU X, et al. A positive role of cytokine-induced killer cell therapy on gastric cancer therapy in a Chinese population: a systematic Meta-analysis [J/OL]. Med Sci Monit, 2015, 21: 3363-3370 [2015-11-01] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46382801/>. PMID: 26535882.
- [11] CHEN Y H, KUO M L, CHENG P J, et al. Regulation of CD28 expression on umbilical cord blood and adult peripheral blood CD8⁺ T cells by interleukin(IL)-15/IL-21 [J]. Cytokine, 2012, 58(1): 40-46. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.12.013.
- [12] SAVOLDO B A, RAMOS C A, LIU E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients [J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1822-1826. DOI: 10.1172/JCI46110.
- [13] CHMIELEWSKI M, HOMBACH A A, ABKEN H. CD28 cosignaling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redirectioned T-cell attack [J]. Gene Ther, 2011, 18(1): 62-72. DOI: 10.1038/gt.2010.127.
- [14] 王顺友, 孙雨, 马宝骊. 抗 CD3、CD28 单抗对人 T 淋巴细胞共刺激作用的影响因素 [J]. 上海免疫学杂志, 1999, 19(4): 38-40.
- [15] ZHANG Z, WANG L, et al. Pseudomonas aeruginosa injection enhanced antitumor cytotoxicity of cytokine-induced killer cells derived from cord blood [J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(8): 1057-1063. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.10.024.
- [16] ZHANG Z, ZHAO X, ZHANG T, et al. Phenotypic characterization and anti-tumor effects of cytokine-induced killer cells derived from cord blood [J]. Cytotherapy, 2015, 17(1): 86-97. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.09.006.
- [17] CHEN Y, LIN W S, ZHU W F, et al. Tumor MICA status predicts the efficacy of immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with gastric cancer [J]. Immunol Res, 2016, 64(1): 251-259. DOI: 10.1007/s12026-015-8743-0.
- [18] LI W, WANG Y, KELLNER D B, et al. Efficacy of cytokine-induced killer cells in the treatment of elderly patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma [J]. Cent Eur J Immunol, 2015, 40(2): 188-193. DOI: 10.5114/ceji.2015.52833.
- [19] 刘军权, 朱云, 陈复兴, 等. 多种活化因子共刺激对外周血单个核细胞体外增殖和表型的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(4): 367-370.
- [20] LI Y X, KURLANDER R E. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation [J/OL]. J Transl Med, 2010, 8: 104 [2015-11-01] <http://translational-medicine.biomedcentral.com/article/10.1186/1479-5876-8-104>. DOI: 10.1186/1479-5876-8-104.

[收稿日期] 2015 - 11 - 06

[修回日期] 2016 - 02 - 18

[本文编辑] 党瑞山

欢迎登录《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 www.biother.org