

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.003

· 研究快报 ·

## 负载肿瘤干细胞膜微粒的 DC-CIK/CTL 细胞协同西妥昔单抗对结直肠癌细胞的杀伤作用及其机制

庞翠<sup>1a,1b</sup>,王金燕<sup>1a,2</sup>,胡志昊<sup>1a</sup>,段琼<sup>1a,1b</sup>,李丁<sup>3</sup>,刘文超<sup>1b</sup>,张菊<sup>1a</sup>(1. 第四军医大学 a. 药学系药物基因组学教研室, b. 西京医院肿瘤科,陕西 西安 710032; 2. 武警陕西省总队医院 妇产科,陕西 西安 710054; 3. 北京军区 261 医院 生物诊疗中心,北京 100094)

**[摘要]** **目的:** 探讨负载结直肠癌干细胞膜微粒(membrane microparticles, MMPs) DC-CIK 与西妥昔单抗(Cetuximab, C225)对 EGFR 靶向药耐药结直肠癌细胞的靶向协同杀伤作用及其机制。**方法:** PCR 法检测结直肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞 *k-RAS* 突变状态,无血清悬浮细胞培养法富集 SW480、HCT116 肿瘤干细胞,RT-PCR 检测干细胞标志物 Sox-2 和 Oct-4。提取外周血单个核细胞培养 DC 与 CIK,将结直肠癌干细胞 MMPs 负载 DC 后再与 CIK 共孵育。形态观察及 MTT 法分别检测 DC-CIK/CTL 细胞及其培养上清、C225 单独和合并处理对 SW480、SW620、HCT116 及其干细胞的杀伤效应;RT-PCR 检测 DC-CIK/CTL 细胞培养上清、C225 单独和合并作用对 SW480、SW620、HCT116 细胞凋亡相关基因 *Fas* 和上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关 E-钙黏蛋白和波形蛋白基因的表达,划痕实验测定 DC-CIK/CTL 细胞培养上清、C225 单独及联合作用对结直肠癌细胞侵袭行为影响。**结果:** SW480、SW620 和 HCT116 细胞均为 *k-RAS* 突变型;富集培养获得的结直肠癌干细胞样细胞高表达 Sox-2 和 Oct-4 mRNA。MMPs 负载 DC-CIK/CTL 细胞及其分泌上清与 C225 对结直肠癌细胞的抑制有协同作用。C225 与 MMPs 负载 DC-CIK/CTL 上清联合组相对于两者单独作用组能提高 *Fas* 与 E-钙黏蛋白基因的表达;联合组的迁移率比两者单独作用组小。**结论:** 负载结直肠癌干细胞 MMPs 的 DC-CIK/CTL 细胞对 EGFR 靶向药耐药结直肠癌细胞有体外特异靶向杀伤效应,且与 C225 显著协同,其发生机制与逆转细胞 EMT 和诱导细胞凋亡有关。

**[关键词]** 结直肠癌;肿瘤干细胞;西妥昔单抗;树突状细胞;细胞因子诱导的杀伤细胞;膜微粒;耐药

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>;R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)06-0751-08

## Killing effect of DC-CIK/CTL loaded on membrane microparticles of the cancer stem cell synergisted with cetuximab on colorectal cancer cells and the mechanism of its action

PANG Cui<sup>1a,1b</sup>, WANG Jinyan<sup>1a,2</sup>, HU Zhihao<sup>1a</sup>, DUAN Qiong<sup>1a,1b</sup>, LI Ding<sup>3</sup>, LIU Wenchao<sup>1b</sup>, ZHANG Ju<sup>1a</sup>(1 a. Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacology, 1 b. Department of Oncology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Armed Police Corps Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710054, Shaanxi, China; 3. Center of Bio-diagnosis and Treatment, the 261st Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100094, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore killing effect of DC-CIK/CTL loaded on membrane microparticles (MMPs) of the colorectal cancer stem cells synergisted with cetuximab (C225) on colorectal cancer cells which are resistant to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeting drug C225, and their mechanisms. **Methods:** Mutation status of *k-RAS* gene for colorectal cancer cell SW480, SW620 and HCT116 line cells were identified by PCR. Cancer stem cells of the SW480 and

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 31170880, 81371891)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31170880, 81371891)

**[作者简介]** 庞翠(1991-),女,河南新乡人,硕士生,主要从事肿瘤个体化治疗研究, E-mail: 2535658904@qq.com

**[通信作者]** 刘文超(LIU Wenchao, corresponding author), E-mail: liuch@fmmu.edu.cn; 张菊(ZHANG Ju, co-corresponding author), E-mail: jianzhong@fmmu.edu.cn

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20161110.1425.012.html>

HCT116 were enriched with serum free suspension cell culture method. Stem cell markers, Sox-2 and Oct-4, were detected by RT-PCR. Peripheral blood mononuclear cells were extracted to culture DC and CIK, CIK was co-cultured with DC loaded with MMP of the colorectal cancer stem cells. Observation of morphology and MTT assay were respectively used to detect killing effects of DC-CIK/CTL cells, their culture supernatant (DC-CIK/CTL'S) and C225 alone as well as both combination on the SW480, SW620, HCT116 line cells and their stem cells. Expressions of apoptosis-related gene Fas, epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins, E-cadherin and vimentin, in the SW480, SW620, HCT116 line cells after treatment by DC-CIK/CTL'S and C225 alone as well as both combination were detected by RT-PCR. Effects of DC-CIK/CTL'S and C225 alone as well as both combination on invasion acts of the colorectal cancer cells were detected by a scratch assay. **Results:** All of the SW480, SW620 and HCT116 cell lines were identified as K-RAS mutation type. Stem cells of the colorectal carcinoma which obtained from enrichment culture had a high expression of the stem cell marker Sox-2 and Oct-4. The DC-CIK/CTL cells loaded with MMPs, their secretion supernatant and C225 had a synergistic effect on inhibition of colorectal cancer cells. The combination group of C225 with DC-CIK/CTL'S enhanced expressions of Fas and E-cadherin proteins, comparing with groups of C225 and DC-CIK/CTL'S alone. Migration rate of the cells in the combination treatment group was smaller than those in the single treatment groups. **Conclusion:** The DC-CIK/CTL loaded with the MMPs of colorectal cancer stem cell could be of specific targeting killing effect in vitro on the colorectal cancer cells which are resistant to EGFR-target drug. It could have a obvious synergistic effect with C225. Their mechanisms could be related to reverse of EMT and improvement of apoptosis of the cells.

[ **Key words** ] colorectal cancer; cancer stem cell; cetuximab (C225); dendritic cell (DC); cytokines-induced killer (CIK) cell; membrane microparticle (MMP); drug resistance

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(6): 751-758. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.003 ]

结直肠癌是我国常见消化道肿瘤,发病和病死率在近 30 年明显升高,由常见肿瘤第 6 位上升到第 4 位<sup>[1]</sup>。西妥昔单抗(cetuximab, C225)是临床结直肠癌治疗应用最广的 EGFR 靶向单克隆抗体药,与 EGFR 胞外区特异结合竞争性抑制其与天然配体结合,阻断 EGFR 酪氨酸激酶磷酸化而抑制肿瘤细胞生长和转移,也可引发抗体依赖型细胞毒作用,增强抗肿瘤活性。但 *k-RAS* 基因突变型患者对 C225 耐药,总生存期也显著缩短<sup>[2-3]</sup>。近年,肿瘤细胞免疫治疗成为继手术、放化疗和靶向治疗的又一重要治疗方式<sup>[4-5]</sup>。DC 和 CIK 细胞越来越多地用于抗肿瘤免疫治疗。在特定条件下肿瘤细胞释放高表达其母细胞全肿瘤抗原的球囊状结构膜微粒(membrane-based microparticles, MMPs), MMPs 可被 DC 细胞内吞摄取、降解<sup>[6-9]</sup>,通过 MHC I、MHC II 提呈诱导特异 CTL 而放大免疫效应。因而耐药结直肠癌干细胞 MMPs 可能作为结直肠癌全抗原致敏 DC-CIK,从而建立一种特异有效的结直肠癌免疫治疗新模式,而 DC-CIK 培养上清含多种细胞因子,有助改善肿瘤微环境<sup>[10-12]</sup>。本课题分别研究结直肠癌干细胞 MMPs 负载 DC-CIK 细胞及其培养上清、EGFR 靶向药 C225 单独或联合对 EGFR 靶向药耐药结直肠癌细胞作用,以期制定 C225 耐药结直肠癌靶向和免疫细胞的综合治疗方案提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人结直肠癌 SW480、SW620 和 HCT116 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞库。rhGM-CSF、CD3 单克隆抗体、rhIL-4、TNF- $\alpha$ 、IL-2、重组 EGF 和重组 bFGF 均购自美国 Peprotech 公司。结直肠癌干细胞 MMPs 购自西安瑞泽生物技术公司。C225 由德国默克公司生产。FITC 标记的鼠抗人 CD3 单克隆抗体(FITC-CD3), PE 标记的鼠抗人 CD56 单克隆抗体(PE-CD56)、鼠抗人 CD4 单克隆抗体(PE-CD4)和鼠抗人 CD8 单克隆抗体(PE-CD8)购自生工生物技术公司。1640 培养基、DMEM/F12 培养基、B27、小牛血清购自美国 Gibco 公司,低黏附培养瓶购自美国 Corning 公司。噻唑蓝(MTT)试剂、高糖 DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司。DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、RT-PCR 定量检测试剂盒购自 TaKaRa 公司, *GAPDH*、*Sox2*、*Oct4*、*K-ras*、*Fas*、*E-cadherin* 和 *Vimentin* 引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

### 1.2 结直肠癌细胞株及干细胞的培养鉴定

结直肠癌细胞株 *k-RAS* 基因状态鉴定: SW480、SW620、HCT116 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 °C、90% 相对湿度及 5% CO<sub>2</sub> 培

养箱培养后, 分别收集对数生长期的 SW480、SW620、HCT116 细胞, 提取基因组 DNA, PCR 扩增并基因测序鉴定 SW480、SW620、HCT116 细胞 *k-RAS* 基因突变。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C

45 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂凝胶确定正确且无杂带后, 送上海桑尼生物科技有限公司采用测序。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequence

Primer	Forward( 5'→3' )	Reverse( 5'→3' )	Product length( bp )
<i>k-RAS</i>	TGGAGTATTTGATAGTGATTA	CCCAAGGTACATTTTCAGATAACT	337
<i>Fas</i>	CACTCACCAGCAACACCAAG	TCCTTCTCTTCACCCAAACA	109
<i>E-cadherin</i>	CCCCATACCAGAACCTCGAAC	TTCTTGGGTTGGGTCGTGTA	169
<i>Vimentin</i>	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	CTCAATGTCAAGGGCCATCT	144
<i>Oct-4</i>	AGCCCTCATTTACCAGGCC	TGGGACTCCTCCGGTTTTG	456
<i>Sox2</i>	ATGTCCCAGCACTACCAGAGC	GTGTGGATGGGATTGGTGTCTC	266
<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGACC	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138

结直肠癌肿瘤干细胞的培养鉴定: 参照闫秀萍等<sup>[13]</sup>和其他文献<sup>[14-16]</sup>分别进行 SW480、HCT116 结直肠癌肿瘤干细胞培养, 取对数生长期的 SW480、HCT116 细胞在 DMEM/F12 不完全培养基[ 含碱性成纤维生长因子( bFGF) 20 ng/ml、表皮生长因子( EGF) 20 ng/ml、2% B27、白血病抑制因子( leukemia inhibitory factor, LIF) 20 ng/ml ]中培养, 每天观察生长因子诱导细胞球形成情况。分别收集各自第 3~4 代的细胞球, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后 RT-PCR 检测干细胞转录因子 *Sox2* 和 *Oct4* 在 SW480、HCT116 细胞及细胞球中的表达。cDNA 合成条件: RNA 中加入反转录体系 42 °C 15 min, 95 °C 3 min。以 cDNA 为模板, PCR 扩增获得目的基因。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 1 min、72 °C 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 10 min。实验重复 3 次。

### 1.3 DC-CIK 共培养细胞的制备及鉴定

参照文献[ 17-19 ]方法培养 DC 和 CIK 细胞。收集健康志愿者外周血单个核细胞, 于培养第 3 天半量补液加 rhGM-CSF 和 rhIL-4, 第 5 天加结直肠癌干细胞膜微粒( 终质量浓度 1 μg/ml ), 诱导培养 72 h 后观察 DC 细胞成熟情况。

悬浮 CIK 细胞调整密度至 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 转入含 IFN-γ( 1 000 U/ml )、CD3 单克隆抗体( 100 ng/ml )、rhIL-2( 500 U/ml ) 培养液继续培养至第 8 天时, DC 与 CIK 细胞按 1: 100 比例混合共培养, 并在倒置光学显微镜下观察 DC-CIK 细胞形态、生长及增殖情况。至第 15 天时分别收集细胞和上清, 锥虫蓝排斥法检测细胞存活率并计数。收集部分 DC-

CIK 细胞, 调整密度至 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml, 分别或同时加入 FITC-CD3、PE-CD56、PE-CD4 和 PE-CD8 抗体, 流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 及 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 细胞比例。实验重复 3 次。

### 1.4 MTT 检测负载肿瘤干细胞 MMPs 的 DC-CIK/CTL 细胞( MMPs-DC-CIK/CTL )、C225 及两者联合对结直肠癌细胞杀伤效应

实验共设 MMPs-DC-CIK/CTL 实验组、C225 实验组、MMPs-DC-CIK/CTL 与 C225 联合作用实验组和空白对照组( 正常培养液培养细胞组 ) 共 4 组, 每组设 6 个复孔。将对数生长期靶细胞结直肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞( 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml ), 加入 96 孔板( 100 μl/孔 )。培养 6 h 贴壁后, MMPs-DC-CIK/CTL 实验组: 按效应细胞( MMPs-DC-CIK/CTL ) 和靶细胞( 肿瘤细胞 ) 10: 1 比例每孔加效应细胞 100 μl; C225 实验组: C225 终浓度 100 μg/ml; MMPs-DC-CIK/CTL 与 C225 联合作用实验组: 效应细胞和靶向细胞按 10: 1 比例加入 96 孔板中, C225 终浓度 100 μg/ml; 空白对照组: 正常培养液培养细胞。共培养 48 h 后, 在倒置光学显微镜下观察效应细胞和靶细胞形态及杀伤情况, 其中 3 个复孔用四甲基唑蓝( MTT ) 法检测效应细胞对靶细胞杀伤率, 酶标仪上读取波长 570nm 处光密度( *D* ) 值, 计算各实验组和对照组的平均 *D* 值和杀伤率。杀伤率( % ) = [ 1 - ( 实验组 *D* 值 - 空白对照组 *D* 值 ) / 空白对照组 *D* 值 ] × 100%。另 3 个复孔 HE 染色, 显微镜观察免疫细胞集中贴附到肿瘤细胞表面的 DC-CIK/CTL 细胞的趋向性。

### 1.5 划痕实验检测负载 MMPs 的 DC-CIK/CTL 细

胞培养上清(DC-CIK/CTL'S)、C225及两者共同作用对结肠癌细胞侵袭迁移能力的影响

分别以对数生长期结肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞为靶细胞, 每孔加入  $5 \times 10^5$  个靶细胞, 当每孔细胞密度达 70% ~ 80% 时作划痕实验。实验分 4 组, 第 1 组培养液含终体积分数 50% DC-CIK/CTL'S, 第 2 组培养液为 C225 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 第 3 组培养液是 50% MMPs-DC-CIK/CTL'S 加 C225 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 第 4 组用正常培养液, 共培养细胞 48 h 后, 拍照观察两侧划痕的距离。细胞迁移率(%) = (0 h 两侧划痕的距离 - 48 h 后两侧划痕的距离) / 0 h 两侧划痕的距离  $\times 100$ , 对照组细胞迁移率为 100%。

1.6 MTT 检测 DC-CIK/CTL'S、C225 及两者共同作用对结肠癌细胞杀伤效应

收集负载 DC-CIK/CTL'S, 按 ELISA 说明书检测 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  分泌水平。将对数生长期结肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞 ( $1 \times 10^5$  个/ml) 加入 96 孔板 (100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ), 培养 6 h 贴壁后进行实验。实验分组同划痕实验, 每组 6 个复孔, 共培养 48 h 后, 在倒置光学显微镜下观察效应细胞对靶细胞趋向性及杀伤情况, MTT 法检测 3 个复孔中靶细胞杀伤率。实验重复 3 次。

1.7 RT-PCR 检测各组细胞中 *Fas* 和 E-钙黏蛋白、波形蛋白基因的表达

分别收集上述实验组另 3 个复孔中 SW480、SW620、HCT116 细胞, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后 RT-PCR 检测 *Fas* 和 E-钙黏蛋白、波形蛋白基因在各组细胞中的表达。cDNA 合成条件: 30  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  30 min, 99  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 5  $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。实验重复 3 次。

1.8 MTT 检测 DC-CIK/CTL'S、C225 及两者联合对结肠癌肿瘤干细胞杀伤效应

将培养获得的结肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞肿瘤干细胞分别接种于 96 孔板 ( $1 \times 10^4/\text{孔}$ ), 培养 4 h 后进行实验。实验分 3 组: 第 1 组含终浓度 50% DC-CIK/CTL'S、第 2 组含 C225 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、第 3 组含终浓度 50% DC-CIK/CTL'S 加 C225 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 每组设 3 个复孔。并设置效应细胞和靶细胞空白对照。共培养 48 h 后, MTT 法检测 3 个复孔中靶细胞杀伤率。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件行统计学分析, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内

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 结肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞的 *k-RAS* 突变情况及成功获得其肿瘤干细胞

结肠癌 SW480、SW620、HCT116 株细胞基因测序结果(图 1)获知 HCT116 株细胞第 13 位密码子为 GG/AC 杂合突变; 而 SW480 和 SW620 株细胞的 *k-RAS* 第 12 位密码子由 GGT 突变为 GTT, 三株细胞均为 *k-RAS* 突变型。

SW480 和 HCT116 株细胞在有血清培养条件下呈不规则形贴壁生长; 在无血清培养基, SW480 和 HCT116 株细胞悬浮培养 3 d 开始有细胞成球, 至

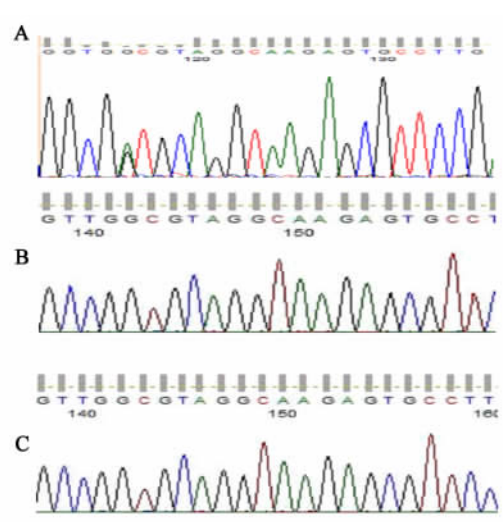


图 1 结肠癌细胞 *k-RAS* 测序结果

Fig. 1 *k-RAS* gene sequences of the colorectal carcinoma SW480, SW620 and HCT116 line cells

A: HCT116 line cell; B: SW480 line cell; C: SW620 line cell

第 12 天时悬浮培养细胞中已有明显细胞微球体形成。RT-PCR 技术检测 *Sox2* 和 *Oct4* mRNA 表达结果(图 2)提示, 细胞球的干细胞特性标记物 *Sox2* 和 *Oct4* 的 mRNA 表达水平显著高于普通贴壁 SW480、HCT116 株细胞 ( $P < 0.05$ ), 提示细胞球富含结肠癌肿瘤干细胞, 无血清悬浮培养可获得结肠癌肿瘤干细胞。

2.2 负载 MMPs 的 DC-CIK 共培养细胞观察鉴定

倒置光学显微镜下观察, 负载 MMPs 的 DC-CIK 细胞混合培养 3 d 后增殖迅速, 胞体变大。培养 5 ~ 6 d 后增殖速度加快, 培养至 10 d 时细胞呈不规则簇状密集生长。培养 15 d 时锥虫蓝排斥法测细胞

存活率 >97%。流式细胞术检测负载 MMPs 的 DC-CIK 细胞 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 表型分别为 (97.5 ± 2.2)%、(23.3 ± 5.6)%、(66.5 ± 6.9)% 和 (32.3 ± 7.7)%。

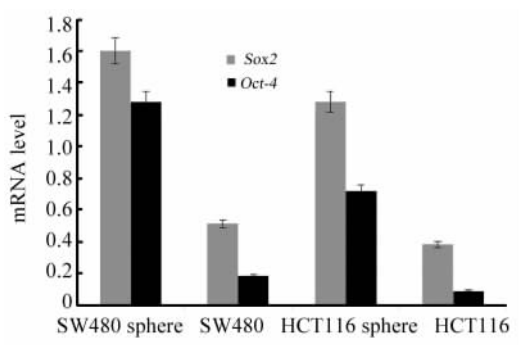


图2 Sox2 和 Oct4 在 SW480 和 HCT116 株细胞及各自细胞球中 mRNA 表达

Fig.2 The expressions of Sox2 and Oct4 mRNAs in the SW480 and HCT116 line cells and their cell spheres

### 2.3 MMPs-DC-CIK/CTL 和 C225 联合作用显著提高杀伤耐药结直肠癌细胞的效应

倒置光学显微镜下观察效应细胞对结直肠癌细胞杀伤情况, MMPs-DC-CIK/CTL 对结直肠癌细胞有显著的靶向杀伤性, DC-CIK/CTL 以结直肠癌细胞为核心簇状分布(图3), 与 H-E 染色结果一致(图4)。MTT 法检测(表2)显示, MMPs-DC-CIK/CTL、C225 对结直肠癌细胞有杀伤效应, C225 对耐药结直肠癌细胞 SW480、SW620 杀伤效应低于 HCT116 细胞, 而 DC-CIK/CTL 与 C225 共同作用可显著提高对耐药结直肠癌细胞的杀伤能力 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用抑制结直肠癌细胞迁移

C225 处理后 3 种细胞迁移能力与对照组基本相同, DC-CIK/CTL'S 处理后的 3 种细胞迁移能力较对照组下降, 而 C225 和 DC-CIK/CTL'S 联合组处理后的 3 种细胞迁移能力下降最多(图5)。

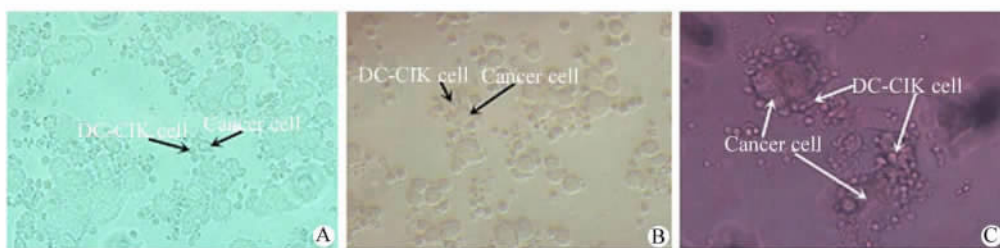


图3 MMPs-DC-CIK/CTL 对结直肠癌细胞的靶向趋向性观察(×400)

Fig.3 Targeting trend of the MMPs-DC-CIK/CTL to the colorectal cancer cells(×400)

- A: MMPs-DC-CIK/CTL were distributed as cluster around the SW480 line cells;
- B: MMPs-DC-CIK/CTL were distributed as cluster around the SW620 line cells;
- C: MMPs-DC-CIK/CTL were distributed as cluster around the HCT116 line cells

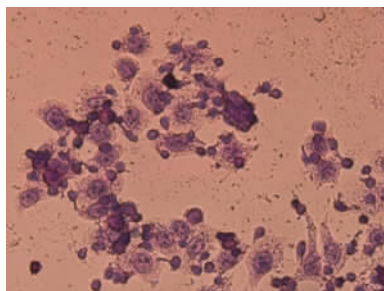


图4 MMPs-DC-CIK/CTL 对结直肠癌细胞的靶向趋向性杀伤观察(×400)

Fig.4 Target killing effect of the MMPs-DC-CIK/CTL cells on the colorectal cancer cells(×400)

表2 MMPs-DC-CIK/CTL 细胞、C225 及两者联合作用对结直肠癌细胞的杀伤率(%)

Tab.2 Cyto-killing rates of MMPs-DC-CIK/CTL, C225 and combination of both for the colorectal cancer cells (%)

Group	SW620 (10:1)	SW480 (10:1)	HCT116 (10:1)
MMPs-DC-CIK/CTL	35.3 ± 2.8	32.5 ± 12	44.1 ± 2.9
C225	25.2 ± 3.3	26.2 ± 5.7	37.1 ± 5.1
MMPs-DC-CIK/CTL + C225	55.9 ± 3.3*	55.1 ± 8.5*	58.7 ± 2.4*

\*  $P < 0.05$  vs DC-CIK/CTL or C225 group

2.5 DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用提高杀伤结直肠癌细胞效应

DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用后对 SW480、SW620、HCT116 3 种结直肠癌细胞的杀伤率显著高于 DC-CIK/CTL'S、C225 单独作用组(均  $P < 0.05$ , 表 3)。

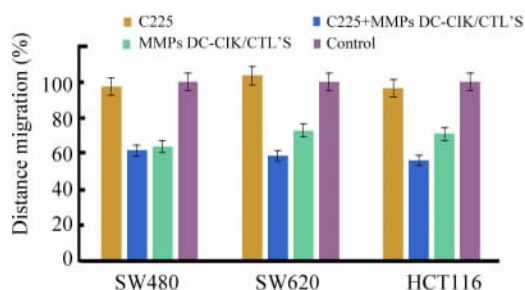


图 6 划痕实验检测各处理组细胞的迁移率

Fig. 6 Cell migration rates in the various treatment groups detected by scratch test

表 3 DC-CIK/CTL'S、C225 联合对结直肠癌细胞的杀伤率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.3 Cyto-killing rates of DC-CIK/CTL'S,C225 and the combination of them for the colorectal cancer cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	SW620	SW480	HCT116
DC-CIK/CTL'S	37.1 ± 5.7	42.5 ± 5.7	43.9 ± 3.2
C225	24.8 ± 3.1	25.8 ± 6.2	37.1 ± 5.3
DC-CIK/CTL'S+C225	57.1 ± 6.2*	56.2 ± 3.5*	54.2 ± 4.0*

\*  $P < 0.05$  vs DC-CIK/CTL'S or C225 group

2.6 DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用提高杀伤结直肠癌细胞效应

DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用组对 SW480、SW620、HCT116 3 种结直肠癌干细胞的杀伤率显著高于 DC-CIK/CTL'S 和 C225 单独作用组( $P < 0.05$ , 表 4), 结果与对结直肠癌细胞的杀伤效应(表 3)一致。

表 4 DC-CIK/CTL'S、C225 及两者联合对结直肠癌干细胞的杀伤率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab.4 Cyto-killing rates of DC-CIK/CTL'S C225 and combination of them on the colorectal cancer stem cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Colorectal cancer stem cell		
	SW620	SW480	HCT116
DC-CIK/CTL'S	22.9 ± 4.5	27.1 ± 3.3	42.2 ± 3.1
C225	21.4 ± 3.3	25.3 ± 6.4	35.3 ± 5.7
DC-CIK/CTL'S+C225	51.2 ± 6.1*	53.7 ± 6.7*	57.1 ± 5.4*

\*  $P < 0.05$  vs DC-CIK/CTL'S or C225 group

2.7 DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用提高结直肠癌细胞 Fas 和 E-钙黏蛋白基因的表达

DC-CIK/CTL'S 和 C225 联合作用组三株细胞的 E-钙黏蛋白基因表达均显著高于 2 个单独作用组, 而 Fas 表达仅 SW480 和 HCT116 两株细胞联合作用组显著高于 2 个单独作用组, 波形蛋白基因表达联合作用组和单独作用组间无显著差异(图 7)。

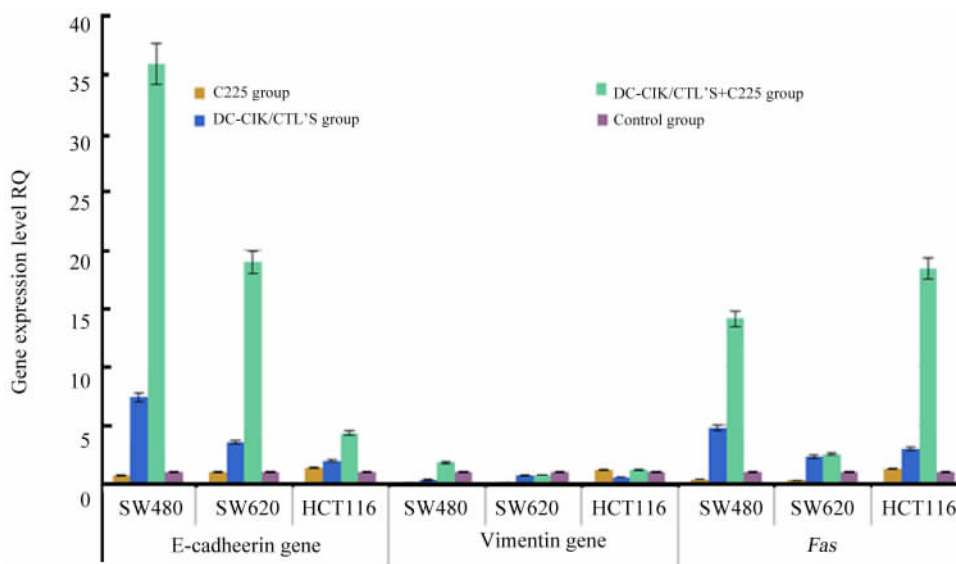


图 7 三株细胞处理后 EMT 标志物和 Fas 的表达

Fig. 7 Expressions of EMT markers and Fas in three lines of the colorectal cancer cell after the treatments

### 3 讨论

结直肠癌是我国发病率增长较快的恶性肿瘤, 尽管目前结直肠癌治疗取得一定进展, 但对放疗、靶向治疗的抵抗是结直肠癌治疗失败复发的主要原因, C225 并不能有效用于所有结直肠癌患者。

肿瘤组织中存在少量肿瘤干细胞<sup>[20]</sup>, 结直肠癌肿瘤干细胞在维持结直肠癌的侵袭、转移复发中发挥决定性作用, 而突变耐药细胞则决定着靶向药的疗效<sup>[21]</sup>, 针对结直肠癌干细胞和耐药细胞进行特异免疫细胞治疗, 将为提高结直肠癌患者疗效和生活质量、延长生存期带来新希望<sup>[22-23]</sup>。MMPs 是指细胞在激活或凋亡过程中从细胞膜上释放的直径 0.1 ~ 1  $\mu\text{m}$  的膜包裹小囊泡。不同细胞来源的 MMPs 组成及功能不同, 它不仅表达来源细胞的表面标志, 而且可携带细胞中多种信号分子、膜脂类、细胞因子和 mRNA 等物质, 直接或间接参与靶细胞生物活性的调节<sup>[24]</sup>。本研究建立负载结直肠癌干细胞 MMPs 的 DC-CIK/CTL 细胞, 确定其对 EGFR 耐药结直肠癌细胞有更强的靶向杀伤作用, 同时, 负载结直肠癌干细胞 MMPs 的 DC-CIK/CTL 细胞与 C225 存在显著协同作用。

EMT 是一种从有极性不能移动的上皮细胞转化为间质细胞的分子重塑和表型改变, 主要表现为上皮标志物(如 E-钙黏蛋白等)的下降和间质标志物(如波形蛋白和  $\beta$ -连环蛋白)的升高, 是肿瘤侵袭、转移的重要步骤, 结直肠癌上皮细胞间质化和发生表皮生长因子受体靶向治疗耐药有密切关系<sup>[25-29]</sup>。有文献<sup>[30]</sup>报道, E-钙黏蛋白可与 TRAIL 受体偶联, 形成 TRAIL 信号复合物。而 EMT 可诱导细胞逃避 TRAIL 诱导的死亡, 促进 MET 则能增加细胞对药物的敏感性。有研究<sup>[31]</sup>显示 EGFR 靶向药厄洛替尼通过 EGFR 受体与肺癌细胞结合, 上调肺癌细胞表面 NKG2D 配体表达而增强 NK 细胞杀伤活性; 临床上 EGFR 靶向抗体药与化疗药联合应用对肿瘤的治疗具增敏效应。而免疫细胞治疗是否会影响 EGFR 靶向抗体药的肿瘤治疗作用及细胞免疫治疗影响 EGFR 靶向药物治疗疗效的作用机制研究还较少。本研究结果表明, 结直肠癌干细胞 MMPs 负载 DC 细胞, 诱导结直肠癌细胞特异性的抗肿瘤免疫细胞治疗, 可激发对 EGFR 靶向药耐药结直肠癌细胞的特异高效杀伤作用。并且, 负载结直肠癌肿瘤干细胞 MMPs 的免疫细胞及其培养上清均能显著增强 EGFR 靶向药 C225 对 *k-RAS* 基因突变型结直肠癌细胞的杀伤作用, C225 和免疫细胞培养

上清能显著促进结直肠癌细胞凋亡信号 *Fas* 和 EMT 过程中 E-钙黏蛋白基因表达增加, 降低结直肠癌细胞侵袭迁移活性, 并导致细胞的凋亡。提示免疫细胞治疗提高 EGFR 靶向抗体药的抗肿瘤作用的协同机制可能与凋亡诱导和 EMT 逆转有关。

肿瘤局部的免疫微环境可以激活细胞毒性淋巴细胞, 从而起到杀灭肿瘤细胞的效果, 但是肿瘤局部持续的慢性炎症反应, 可加速肿瘤的生长、浸润甚至远处转移, 恶性肿瘤细胞可产生或分泌免疫抑制因子、诱发抑制性免疫细胞, 使宿主免疫功能损害, 促进肿瘤发展<sup>[32-33]</sup>。本研究发现, 免疫细胞培养上清参与结直肠癌综合治疗中靶向 DC-CIK/CTL 细胞的免疫活性, 并与 C225 有相互协同作用, 预实验检测表明 DC-CIK/CTL 的 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 分泌水平较高(893.2  $\pm$  57.7 ng/L、487.6  $\pm$  39.8 ng/L 和 233.6  $\pm$  29.1 ng/L), 提示免疫细胞因子可能是一种重要调节机制, 能改善肿瘤细胞周围的免疫微环境, 但是否还存在其他影响因素及其机制仍需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 李道娟, 李倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势 [J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(3): 305-310. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2015.03.020.
- [2] Van CUTSEM E, LENZ H J, KÖHNE C H, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(7): 692-702. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4812.
- [3] SOTELO M J, GARCÍA-PAREDES B, AGUADO C, et al. Role of cetuximab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(15): 4208-4219. DOI: 10.3748/wjg.v20.i15.4208.
- [4] HE S, YIN T, LI D, et al. Enhanced interaction between natural killer cells and lung cancer cells: involvement in gefitinib-mediated immunoregulation [J]. J Transl Med, 2013, 11: 186. DOI: 10.1186/1479-5876-11-186.
- [5] MEI J Z, LIU G J, ZHANG X J, et al. Erlotinib enhances the CIK cell-killing sensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 3082-3089. DOI: 10.4238/2015.April.10.18.
- [6] 庞翠, 王长利, 张腾, 等. 恶性肿瘤患者的靶向肿瘤干细胞免疫治疗疗效观察 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2014, 22(4): 451-454.
- [7] MIGNOT G, ROUX S, THERY C, et al. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer [J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(2): 376-388. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00406.x.
- [8] HAO S, MOYANA T, XIANG J. Review: cancer immunotherapy by exosomes-based vaccines [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 22(5): 692-703. DOI: 10.1089/cbr.2000.15.185.

- [ 9 ] BAJ-KRZYWORZEKA M, SZATANEK R, WEGLARCZYK K, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55( 7 ): 808-818. DOI:10.1007/s00262-005-0075-9.
- [ 10 ] 匡幼林, 邓远忠, 梁思敏, 等. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞抗前列腺癌细胞的免疫效应 [ J ]. *重庆医学*, 2014, 43( 17 ): 2167-2169. DOI: 10.3969/j.issn.671-8348.2014.17.02.
- [ 11 ] 王颖, 吴德平, 明平静, 等. DC 与 CIK 共培养细胞体外抗肝癌细胞活性研究 [ J ]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2014, 1( 34 ): 42-46. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2014.01.010.
- [ 12 ] 岳玲玲, 张连生, 柴晔, 等. 负载抗原的 DC 与 CIK 共培养对耐药乳腺癌细胞的杀伤作用 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 4( 19 ): 437-441. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.017.
- [ 13 ] 闫秀萍, 罗虎, 周向东. 人肺癌细胞系 A549 中肿瘤干细胞样细胞的分离及鉴定 [ J ]. *第三军医大学学报*, 2012, 34( 12 ): 1153-1156. DOI:10.16016/j.1000-5404.2012.12.030.
- [ 14 ] 于喜贞, 韩光魁, 杨文涛, 等. TJ905 胶质瘤细胞系中脑肿瘤干细胞的培养、分离与鉴定 [ J ]. *广西医学*, 2015, 37( 1 ): 11-14. DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2015.01.0.
- [ 15 ] 齐玲, 金玄, 丁丽娟, 等. 脑肿瘤干细胞的培养及生物学特性研究 [ J ]. *中国实验诊断学*, 2011, 15( 2 ): 227-228. DOI:10.3969/j.issn.1007-4287.2011.02.012.
- [ 16 ] 魏红. 无血清培养法在肿瘤干细胞培养中的应用 [ J ]. *济宁医学院学报*, 2010, 33( 5 ): 370-372. DOI :10.3969/j.issn.1000-9760.2010.05.025.
- [ 17 ] 李卿, 王新利, 王杨, 等. DC-CIK 共培养细胞联合索拉菲尼对肝癌细胞体内外的杀伤效应 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17( 1 ): 46-49. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2010.1.009.
- [ 18 ] YU X, ZHAO H, LIU L, et al. A randomized phase II study of autologous cytokine-induced killer cells in treatment of hepatocellular carcinoma [ J ]. *J Clin Immunol*, 2014, 34( 2 ): 194-203. DOI: 10.1007/s10875-013-9976-0.
- [ 19 ] 王琦, 任秀宝, 蒋敬庭. 肺癌免疫细胞治疗临床转化的研究进展 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22: 375-378. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.3.017.
- [ 20 ] 李媛, 曾世京, 翟震, 等. 癌干细胞的研究进展 [ J ]. *中国医学工程*, 2011, 19( 7 ): 177-180.
- [ 21 ] BAJ-KRZYWORZEKA M, SZATANEK R, WEGLARCZYK K, et al. Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes [ J ]. *Immunol Lett*, 2007, 113( 2 ): 76-82. DOI :10.1016/j.imlet.2007.07.014.
- [ 22 ] 唐家平, 李晋, 李锦毅. 胃癌干细胞抗原负载的 DC-CIK 对胃癌细胞的杀伤活性 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40( 10 ): 917-920. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.10.001.
- [ 23 ] 庞春森, 吕艳, 孙雯雯, 等. 负载干细胞抗原的 DC 联合 CIK 细胞对乳腺癌荷瘤鼠肿瘤杀伤研究 [ J ]. *天津医药*, 2014, 42( 6 ): 555-558. DOI:10.3969/j.issn.0253-9896.2014.06.012.
- [ 24 ] Kim H S, Choi D Y, Yun S J, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells [ J ]. *J Proteome Res*, 2012, 11( 2 ): 839-849. DOI: 10.1021/pr200682z.
- [ 25 ] KUROKAWA M, ISE N, OMI K, et al. Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes [ J ]. *Cancer Sci*, 2013, 104( 7 ): 904-911. DOI: 10.1111/cas.12171.
- [ 26 ] ZHANG P, LIU H, XIA F, et al. Epithelial-mesenchymal transition is necessary for acquired resistance to cisplatin and increases the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells [ J ]. *Int J Mol Med*, 2014, 33( 1 ): 151-159. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1538.
- [ 27 ] 萨日那, 欧娟娟, 耿培亮, 等. 上皮-间质转化在人结肠癌细胞系 SW480 对西妥昔单抗及氟尿嘧啶耐药中的作用 [ J ]. *第三军医大学学报*, 2011, 33( 8 ): 776 - 779. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.08.024.
- [ 28 ] MONTEIRO J, FODDE R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives [ J ]. *Eur J Cancer*, 2010, 46( 7 ):1198-1203. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.02.030.
- [ 29 ] MICALIZZI D S, FARABAUGH S M, FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer parallels between nodal development and tumor progression [ J ]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15( 2 ):117-134. DOI: 10.1007/s10911-010-9178-9.
- [ 30 ] Lu M, Marsters S, Ye X, et al. E-cadherin couples death receptors to the cytoskeleton to regulate apoptosis [ J ]. *Mol Cell*, 2014, 54( 6 ),987-998. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.029.
- [ 31 ] 栗敏. 厄洛替尼联合 CIK 细胞治疗 EGFR 基因突变的肺腺癌 [ J ]. *天津医药*, 2013, 41( 10 ):1017-1018. DOI:10.3969/j.issn.0253-9896.2013.10.024.
- [ 32 ] 刘国科, 赵健. 肿瘤微环境与肿瘤耐药 [ J ]. *现代免疫学*, 2015, 35( 3 ):245-248.
- [ 33 ] 宋楠, 李涛, 张学敏. 免疫细胞与肿瘤微环境 [ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41( 10 ):1075-1084. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00245.

[ 收稿日期 ] 2016 - 07 - 06 [ 修回日期 ] 2016 - 10 - 28

[ 本文编辑 ] 宋关鸿

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅