

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.004

· 基础研究 ·

## 不同负载的 DC-CIK 联合 5-FU 治疗方案对结肠癌 HT-29 细胞移植瘤裸鼠的疗效观察

郭虎林<sup>1</sup>, 崔晓旭<sup>2</sup>, 冯青青<sup>2</sup>, 时珊珊<sup>3</sup>, 姚文腾<sup>4</sup>, 司玉玲<sup>2</sup> (1. 青海省第五人民医院 肿瘤内二科, 青海 西宁 810007; 2. 天津市第四中心医院, 天津 300140; 3. 滕州市中心人民医院, 山东 滕州 277500; 4. 天津医科大学, 天津 300070)

**[摘要]** **目的:** 探讨树突状细胞诱导的杀伤细胞(DC-CIK)联合5-氟尿嘧啶(5-FU)并加载CD133<sup>+</sup>HT-29细胞的裂解液或RNA,对裸鼠结肠癌细胞HT-29移植瘤治疗的有效性及其作用机制。**方法:** 取对数生长期的结肠癌HT-29细胞系,建立BALB/c裸鼠结肠癌移植瘤模型,分别注射无抗原加载的DC-CIK、5-FU+DC-CIK、R+DC-CIK(加载CD133<sup>+</sup>细胞总RNA)、L+DC-CIK(加载CD133<sup>+</sup>细胞裂解液)、5-FU及生理盐水,观察不同治疗方案治疗3个周期对移植瘤生长的影响,并绘制裸鼠生长曲线;治疗结束2d后采用颈髓离断法处死裸鼠并测定瘤体积和体质量。qPCR法检测移植瘤组织中AKT mRNA的表达水平、WB法检测磷酸化AKT蛋白的表达水平。**结果:** 治疗结束后R+DC-CIK组、L+DC-CIK组、5-FU+DC-CIK组裸鼠体质量呈现总体平稳上升,而DC-CIK组与5-FU组体质量逐渐下降;R+DC-CIK组、5-FU+DC-CIK组、L+DC-CIK组裸鼠肿瘤生长速度明显慢于对照组( $P < 0.05$ )。加载裂解液和RNA联合化疗比单独给予5-Fu化疗和DC-CIK治疗对移植瘤组织AKT mRNA和蛋白表达水平影响更加明显(均 $P < 0.05$ )。**结论:** 不同负载的DC-CIK或其与5-FU联合治疗的疗效优于单独化疗,其机制之一与下调AKT水平有关。

**[关键词]** 树突状细胞诱导的杀伤细胞;结肠癌;HT-29细胞;干细胞;AKT基因;治疗方案

**[中图分类号]** R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)12-1318-06

## Treatment efficacy of DC-CIK with different loading combined with 5-FU on nude mice bearing colon cancer HT-29 cell transplanted tumor

GUO Hulin<sup>1</sup>, CUI Xiaoxu<sup>2</sup>, FENG Qingqing<sup>2</sup>, SHI Shanshan<sup>3</sup>, YAO Wenteng<sup>4</sup>, Si Yuling<sup>2</sup> (1. The Second Department of Oncology, the Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810007, Qinghai, China; 2. The Fourth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China; 3. Tengzhou City Central People's Hospital, Tengzhou 277500, Shandong, China; 4. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect of dendritic cell-induced killer cells (DC-CIK) combined with 5-fluorouracil (5-FU) and loaded with CD133<sup>+</sup> HT-29 cell lysate or RNA on mice bearing colon cancer HT-29 cell transplanted tumor, and to explore the underlying mechanism. **Methods:** Colon cancer xenograft model was established in BALB/c nude mice by using human colon cancer HT-29 cells at logarithmic growth phase; Antigen-free DC-CIK, 5-FU+DC-CIK, R+DC-CIK (loaded with total RNA of CD133<sup>+</sup> cells), L+DC-CIK (loaded with CD133<sup>+</sup> cell lysate), 5-FU and normal saline were respectively injected into transplanted mice, and the treatment efficacies on the growth of transplanted tumor in each group after three treatment cycles were observed, and the tumor growth curve was drawn. The nude mice were sacrificed by cervical dislocation and the tumor volume and body weight were measured. qPCR was used to detect the expression of AKT mRNA in transplanted tumor tissue, and WB was used to detect the expression of phosphorylated AKT protein. **Results:** After treatment, the body mass of nude mice in R+DC-CIK group, L+DC-CIK group and 5-FU+DC-CIK group increased steadily, while the body mass of nude mice in DC-CIK group and 5-FU group decreased gradually; the tumor growth speed of nude mice in R+DC-CIK group, 5-FU+DC-CIK group and L+DC-CIK group was significantly slower than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Compared with 5-FU and DC-CIK alone, the combined treatment with loaded lysate/RNA had more sig-

**[基金项目]** 天津市应用基础与前沿技术研究计划(No.14JCYBJC26900);天津市卫生行业重点攻关项目(No.13KG116)。Project supported by the Application Foundation and Cutting Edge Technology Research Plan of Tianjin(No.14JCYBJC26900), and the Key Health Industry Projects of Tianjin(No.13KG116)

**[作者简介]** 郭虎林(1982-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤临床治疗的研究,E-mail:xiao5656Jing@163.com

**[通信作者]** 司玉玲(Si Yuling, corresponding author),硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事血液病和肿瘤治疗的研究,E-mail:Yulingsi1101@sina.com

nificant effect on mRNA and protein expressions of AKT ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The effect of DC-CIK with different loading or its combination with 5-FU is better than that of chemotherapy alone. One of the mechanisms is related to the down-regulation of AKT level.

**[Key words]** dendritic cells induced killer cells (DC-CIK); colon cancer; HT-29 cell; stem cell; AKT gene; treatment plan

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(12): 1318-1323. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.12.004]

结肠癌(colon cancer)是常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率呈逐年上升趋势,对人体健康造成了严重威胁。有研究<sup>[1]</sup>显示,全国恶性肿瘤发病率结直肠癌排在第3位,病死率仅次于肺癌、胃癌。早期结肠癌的治疗以手术为主,术后辅以化疗、放疗、靶向及生物治疗等,化疗成为局部晚期或转移复发结肠癌的主要治疗手段之一。但在治疗中化疗耐药的出现,给许多患者的治疗带来了问题,化疗的不良反应有恶心、呕吐、脱发、骨髓抑制等,对肿瘤患者的生活质量造成了不小的影响,因此,探寻更好的治疗方案显得非常紧迫。树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内功能强大的抗原提呈细胞,细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞是具有强大抗瘤、杀瘤活性的免疫细胞,将DC与CIK细胞共同培养可获得DC-CIK细胞,两者在共同培养过程中互相促进成熟,且DC能增强CIK细胞的杀瘤活性<sup>[2]</sup>。将DC-CIK细胞与传统治疗联合应用,能显著提高总生存率和无进展生存率<sup>[3]</sup>。在乳腺癌患者治疗中,DC-CIK细胞联合高剂量化疗可以提高治疗反应率,能显著提高总生存率和无进展生存率<sup>[4]</sup>。在非小细胞肺癌患者的试验中,DC-CIK细胞联合化疗与单纯化疗相比,平均无瘤生存期延长6个月,3年累计复发率降低约30%<sup>[5]</sup>。在一项术后和放化疗后的胃癌和结直肠癌患者的临床试验中,接受自体肿瘤抗原荷载的DC-CIK细胞治疗组,相比对照组,4年术后复发率显著降低,总生存期也显著延长<sup>[6]</sup>。有研究<sup>[7]</sup>显示,大多数化疗药物不仅有直接的肿瘤细胞毒作用,还具有抗肿瘤免疫反应的协同作用,而且免疫治疗也能增强化疗敏感性。单一化疗或生物治疗均不能有效地治疗肿瘤,而将两者联合使用却具有潜在的协同效应。AKT信号通路是一种具有酶活性的细胞内信号转导通路,研究<sup>[8]</sup>发现,人类的胃癌、肝癌、大肠癌、肾癌、乳腺癌等大多数肿瘤均与AKT信号通路有关,该通路中多种上、下游分子的改变均可影响肿瘤的发生与发展,机制为通过影响下游不同效应分子的活化状态,细胞内发挥抑制凋亡、促进增殖的关键作用。本研究旨在探讨免疫治疗联合5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)及加载结肠癌干细胞裂解液或RNA后对裸鼠结肠癌细胞HT-29移植瘤组织中AKT基因表达水平的影响;探寻不同方法联合免疫治疗在实体瘤治疗中的安全性和有效性,为治疗人结肠癌提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、主要试剂和实验动物

人结肠癌细胞株HT-29由天津市肿瘤医院馈赠;健康人外周血由天津市中心血站馈赠。

DMEM培养基、青链霉素(Gibco公司),0.25%胰酶消化液(索来宝公司),标准胎牛血清购自(Hyclone公司),RhGM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、RhIL-1 $\alpha$ 、RhIL-2、RhIL-4(Peprotech公司),人淋巴细胞裂解液(天津美德太平洋科技有限公司),Matrigel(Corning公司),Taq酶、dNTP、反转录试剂盒(TaKaRa公司),PCR相关引物合成(北京奥科公司),RNA提取试剂盒(美国Qiagen公司),预染色的蛋白Marker、增强化学发光显色试剂盒(LuminataTM)(Millipore公司),5%脱脂奶粉(伊利乳业),一抗工作液(兔抗人AKT多克隆抗体1:500,鼠抗人多克隆抗体-actin1:1 000标记)、二抗工作液(羊抗兔多克隆抗体与羊抗鼠多克隆抗体均为1:5 000标记)(赛信通上海生物试剂有限公司),0.45  $\mu$ m PVDF膜(Immobilon-P技术公司),CD133磁珠抗体(美天旎公司)。

3~4周龄的雌性BALB/c裸鼠共18只,购自维通利华公司,体质量16~19 g,动物合格证号:11400700106716。饲养于天津市第四中心医院为中心试验室,SPF级饲养环境。

### 1.2 细胞培养

HT-29细胞培养 HT-29细胞株培养于DMEM液(其中含1%青链霉素、10%胎牛血清)中,放置于37 $^{\circ}$ C、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中。当细胞处于对数生长期时用0.25%胰酶消化,继续传代培养。

### 1.3 HT-29干细胞分选

收集对数生长期的HT-29细胞,冰预冷的PBS液洗涤后计数,将 $1 \times 10^8$ 个细胞重悬于300  $\mu$ l的PBS液中,加100  $\mu$ l的CD133磁珠抗体和100  $\mu$ l的Fc受体,4 $^{\circ}$ C孵育30 min,再加入1~2 ml的PBS,300 $\times$ g离心10 min,洗涤细胞1次,留500  $\mu$ l的PBS重悬细胞备用。3 ml的PBS致敏LS型细胞分选柱,等液体流干后加入细胞悬液,开始收集未结合的细胞,此步骤可重复。用PBS液3 ml洗涤3遍,洗去未结合的细胞后加入5 ml的PBS,立即推下细胞后收集CD133<sup>+</sup>细胞。

### 1.4 HT-29干细胞全细胞裂解液的制备

将上述CD133<sup>+</sup>细胞收集后冻存,反复冻融4次,裂解后,4 $^{\circ}$ C 12 000 $\times$ g离心10 min,收集上清液,然后

使用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌, BCA 法测定蛋白浓度, 留存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.5 HT-29 干细胞总 RNA 提取

收集上述 CD133<sup>+</sup> 细胞, 细胞计数不少于  $1 \times 10^7$  个, 依据 Qiagen Rneasy mini kit 试剂盒说明书操作。收集洗脱下来的 HT-29 干细胞总 RNA, 使用 Nano-drop2000 分光光度计检测提取的 HT-29 干细胞总 RNA 浓度, 置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 1.6 分离诱导 DC-CIK

分离健康人的白细胞 50 ml, 收集其中的贴壁细胞, 悬浮细胞转移后备用, 向贴壁细胞中加入 1640 培养基 (含 10% 小牛血清、RhGM-CSF 1 000 U/ml、RhIL-4 1 000 U/ml) 并继续培养。第 5 天开始进行抗原加载, 培养第 6 天加入 TNF- $\alpha$  10 ng/ml, 继续培养 2~3 d 后得到成熟的 DC 细胞。上述悬浮细胞加入含有 10% 小牛血清及 IFN- $\gamma$  50 ng/ml 的 1640 培养基中, 24 h 后加入 CD3 抗体 50 ng/ml、IL-1 $\alpha$  5 ng/ml、IL-2 500 U/ml, 每 2~3 d 后进行半量换液。于培养的第 8 天开始将 DC 细胞与 CIK 细胞混合在一起培养, 培养条件不变, 每 2 d 行半量换液, 同时补加 IL-2, 培养至第 14 天 CIK 细胞即成熟<sup>[6]</sup>。

### 1.7 建立裸鼠结肠癌模型

裸鼠于实验室喂养 1 周, 第 8 天开始接种造模。将收集的 HT-29 CD133<sup>+</sup> 细胞, 调整至密度为  $5 \times 10^5$  个/ml, 用无血清的培养基与 Matrigel 按 1:1 的比例混匀后, 并与细胞混合均匀, 置于冰上保存, 尽快开始接种动物, 在裸鼠右下腹部皮肤消毒, 用 0.2 ml 微量注射器将细胞逐一皮下接种于腹壁右下部, 每日按时监测裸鼠摄食、饮水及体重, 观察成瘤情况, 裸鼠接种后, 成瘤率 100%, 肿瘤成局部结节状生长, 皮下接种 4~5 d 后, 肿瘤可以触及, 每 2 d 测量瘤体体积, 在体积均达到约 150 mm<sup>3</sup> 时开始实验。

### 1.8 荷瘤裸鼠的分组及免疫治疗

荷瘤鼠按照数字表法随机分成 6 组 (每组 3 只)。DC-CIK 组: 每周于尾静脉注射 2 次无抗原加载的 DC-CIK 细胞, 每次 0.2 ml  $1 \times 10^6$  个; 5-FU+DC-CIK 组: 每周于尾静脉注射 2 次无抗原加载的 DC-CIK 细胞, 每次 0.2 ml  $1 \times 10^6$  个, 同时每周第 1 次行 DC-CIK 治疗前 1 d, 通过尾静脉注射 50 mg/kg 的 5-FU, 每周 1 次, 共 3 周; R+DC-CIK 组: 每周于尾静脉注射 2 次 CD133<sup>+</sup>HT-29 细胞总 RNA 加载的 DC-CIK 细胞, 每次 0.2 ml  $1 \times 10^6$  个; L+DC-CIK 组: 每周于尾静脉注射 2 次 CD133<sup>+</sup>HT-29 细胞裂解加载的 DC-CIK 细胞, 每次 0.2 ml  $1 \times 10^6$  个; 5-FU 组: 5-FU 50 mg/kg+NS 0.2 ml 尾静脉注射, 每周 1 次; NS 组: NS 0.2 ml 尾静脉注射, 每周 2 次; 观察肿瘤生长并绘制荷瘤裸鼠生长曲

线。各组实验裸鼠在治疗 3 周期间每 2 d 测量裸鼠体重及瘤体大小 [体积 (mm<sup>3</sup>) = 长 (mm)  $\times$  宽 (mm)  $\times$  宽 (mm)  $\times$  0.52]。各组首次进行免疫治疗时间均为肿瘤干细胞接种后第 5 天。治疗结束 2 d 后采用颈髓离断法处死裸鼠并取出瘤体称重,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.9 qPCR 法检测 AKT mRNA 的表达水平

分别取各组存储于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱的人结肠癌移植瘤组织, 各称取 20 mg 后加入装有液氮的研磨器中研磨, 研磨至粉碎后转移至无 RNA 的 EP 管中, 按照 Qiagen Rneasy mini Kit 试剂盒说明书操作并提取总 RNA, 并立即检测 RNA 浓度。利用 TaKaRa Prime-Script RT-PCR Kit 试剂盒进行 cDNA 合成。根据 NCBI 给出的 AKT 基因序列, 利用 Oligo 6 软件设计引物, 采用 BLAST 验证其特异性。其中  $\beta$ -actin F: 5'-ACTGTCATCGAACGCACCTT-3', R: 5'-TCCTTCT-TAAGCAGCCCAGC-3'; AKT F: 5'-TCCTCCTCCTCCTGCTTCT-3', R: 5'-GCCTCTTCGAGCTCATCC T-3'。qPCR 扩增: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 53  $^{\circ}\text{C}$  30 s (AKT 与  $\beta$ -actin 退火温度相同), 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 30 个循环, 最后于 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统中计算每个样本所测得的 AKT 与  $\beta$ -actin 的积分光密度比值, 实验结果均一后再行各组实验平行操作 3 次, 计算荷瘤裸鼠结肠癌组织 AKT mRNA 的表达量。

### 1.10 WB 实验检测磷酸化 AKT 蛋白的表达水平

分别取各组存储于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱的人结肠癌移植瘤组织, 各称取 30 mg 加入装有液氮的研磨器中研磨, 研磨至粉碎后转移至无 RNA 的 EP 管中, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 再用 BCA 试剂盒测定提取蛋白的总浓度和纯度。添加 10% 聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳调整电流至最大, 调整电压为 80 V, 恒压条件下进行跑胶 2.5 h; 之后采用电转法将蛋白转印到 PVDF 膜上, 调整电流至最大, 电压为 80 V 持续转膜 1 h。成功转膜后, 蛋白密封于 5% 的脱脂奶粉中维持 1 h, 再向其中加入按 1:1 000 稀释的一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。次日, 去除一抗, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min。随后加入按 1:5 000 稀释的二抗, 室温封闭 1 h。TBST 洗膜 3 次后, 加入 ECL 化学发光液置于凝胶成像系统中采集图像, 用 Image J 对蛋白条带进行定量分析。按照蛋白质萃取试剂盒提取结肠癌组织总蛋白, 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。照相保存实验结果。结果均一后再行各组实验平行操作 3 次。计算目的蛋白 AKT 和内参蛋白  $\beta$ -actin 的半定量数值作为定量根据。

### 1.11 统计学处理

qPCR 和 WB 实验均重复 3 次。应用 SPASS17.0

统计软件分析比较, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 各组裸鼠肿瘤体积、体质量、AKT mRNA 及蛋白比较采用重复测量方差分析, 率的比较采用  $\chi^2$  检验, 多组均数的比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用  $t$  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 荷瘤裸鼠生存状况

裸鼠生存状态: R+DC-CIK、L+DC-CIK、DC-CIK 3组活动自如、情绪较为稳定、进食水正常, 治疗期间未发现明显变化; 5-FU+DC-CIK组、5-Fu组在注射化疗药物后逐渐出现活动减弱、精神萎靡、进食水减少, 同时出现体质量减轻及弓背现象, 于治疗的第3周开始处于濒死状态; NS组于第3周开始出现活动受阻, 处于濒死状态。治疗结束后R+DC-CIK组、L+DC-CIK组、5-FU+DC-CIK组裸鼠体质量呈现总体平稳上升, 而DC-CIK组与5-Fu组体质量逐渐下降。体质量变化曲线见图1。

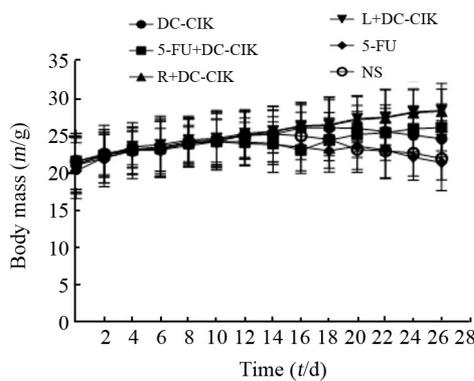


图1 免疫治疗期间各组裸鼠体质量变化曲线

Fig.1 The curve of tumor mass in nude mice of each group during immunotherapy

### 2.2 加载DC-CIK治疗对裸鼠皮下HT-29移植瘤体积的影响

6组荷瘤裸鼠自用药开始每2d观察肿瘤生长情况, 随后观察至第26天, 结果(图2)显示, R+DC-CIK组、5-FU+DC-CIK组、L+DC-CIK组裸鼠肿瘤增长速度明显慢于对照组( $P < 0.05$ ); DC-CIK组、5-FU组肿瘤体积小于对照组, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 加载DC-CIK治疗降低裸鼠皮下HT-29移植瘤模型组织AKT mRNA的表达量

WB实验检测结果(图3)显示, R+DC-CIK组、5-FU+DC-CIK组肿瘤组织AKT mRNA表达量明显低于对照组(均 $P < 0.05$ ), 而L+DC-CIK组、DC-CIK组、5-FU组肿瘤组织AKT mRNA与对照组比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

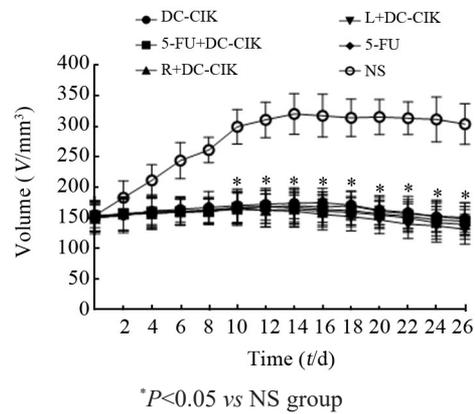


图2 免疫治疗期间各组瘤体体积变化曲线

Fig.2 The curve of tumor volume in nude mice of each group during immunotherapy

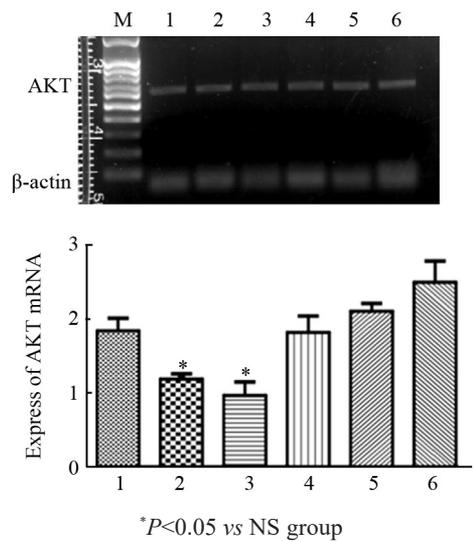


图3 加载免疫治疗对裸鼠皮下HT-29细胞移植瘤模型中AKT mRNA表达量的影响

Fig.3 Effect of immunotherapy on AKT mRNA expression in subcutaneous HT-29 cell xenograft tumor model in nude mice

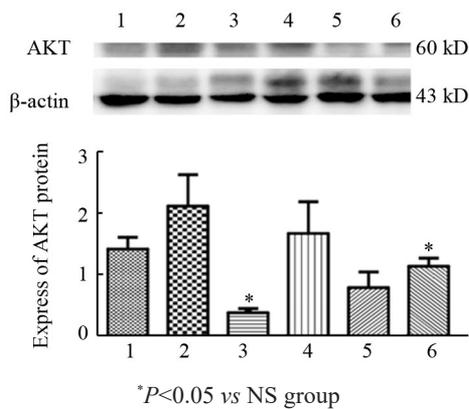
### 2.4 加载DC-CIK治疗明显降低结肠癌移植瘤组织中AKT蛋白的表达量

WB实验检测结果(图4)显示, R+DC-CIK、L+DC-CIK和5-FU+DC-CIK组肿瘤组织AKT蛋白表达量明显低于对照组(均 $P < 0.01$ ); 而5-FU组、DC-CIK组肿瘤组织AKT蛋白表达量变化不明显, 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

当前, 生物免疫治疗在抗肿瘤方面的作用日益受到重视, 而细胞免疫治疗中的DC、CIK细胞以及两者共同培养的DC-CIK细胞是目前肿瘤治疗研究的

热点。肿瘤细胞免疫治疗的体内、外实验均取得了良好的结果。然而,起初临床应用中肿瘤的免疫杀伤效应一般。ROSENBERG 等<sup>[9]</sup>报告的一项免疫治疗临床试验,有效率只有 2.6%。近期研究<sup>[10-11]</sup>发现,肿瘤细胞的免疫逃逸及微环境的免疫耐受是肿瘤生物治疗当中的主要障碍。有学者<sup>[12]</sup>进行了许多以 DC-CIK 细胞为主的肿瘤免疫治疗的基础以及临床研究,在多淋巴瘤、发性骨髓瘤的研究中取得良好效果。



1: DC-CIK group; 2: NS group; 3: R+DC-CIK group; 4: 5-FU group; 5: 5-FU+DC-CIK group; 6: L+DC-CIK group

图4 加载 DC-CIK 治疗对结肠癌移植瘤组织中 AKT 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of DC-CIK with different loading on AKT protein expression in tissues of colon cancer transplanted tumors

本研究结果显示,加载 DC-CIK 细胞对 HT-29 荷瘤结肠癌组织中 AKT 均起到下调作用,对荷瘤裸鼠结肠癌细胞起到有效的杀伤性。有研究<sup>[13-14]</sup>发现,将加载免疫细胞与化疗药物联合应用可增强抗肿瘤作用。可见,加载 DC-CIK 以及联合 5-FU 后对人结肠癌移植瘤细胞的杀伤作用比单用 DC-CIK 或化疗药物更强,由此猜测,DC-CIK 与 5-FU 起到了协同的杀瘤效应,且提高了荷瘤裸鼠的总生存率。因此,化疗药物与加载不同细胞的生物免疫治疗联合应用既能减小化疗药物的毒副作用,同时也提高了生物免疫治疗的杀瘤活性,这种化疗加生物免疫治疗的联合方案可减轻肿瘤患者的畏惧心理,增加治疗的依从性。

由于治疗早期癌细胞可能存在淋巴细胞的浸润以及炎症反应而增大,亦或存在转移瘤的情况,单纯检测肿瘤大小不能完全实际地反应免疫治疗的效应,因此,整体生存率、体质量可能是最重要的指标。总之,恶性肿瘤治疗是一个艰难、耗时、复杂及需要不同方案协同进行的过程,更加深入、精准地了解免疫反应的调控机制和因素,协同增强了免疫细胞治

疗的效应,将为肿瘤的免疫细胞治疗提供更多的方法和途径。

综上所述,本研究通过制备 DC-CIK 细胞及加载全细胞裂解液和 RNA,观察其联合化疗对人结肠癌 HT-29 细胞移植瘤裸鼠 AKT mRNA 和蛋白质表达水平的影响,观察和比较不同加载方式对 HT-29 细胞移植瘤的杀伤作用,显示加载总 RNA 的 DC-CIK 细胞具有巨大的治疗潜力,为临床治疗其他肿瘤提供了新的治疗思路。

## [参考文献]

- [1] 陈晓庆,王念雪,龙世棋,等. 体外扩增的 NK 细胞运载溶瘤呼肠孤病毒对结直肠癌细胞的杀伤效应[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(5): 492-499. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X. 2019.05.002.
- [2] 杨岩丽,王丹红,廖丽,等. DC 疫苗联合细胞因子诱导的杀伤细胞治疗转移性肾癌的长期疗效分析[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(6): 695-699. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.013.
- [3] 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.
- [4] REN J, DI L J, SONG G H, et al. Selections of appropriate regimen of high-dose chemotherapy combined with adoptive cellular therapy with dendritic and cytokine-induced killer cells improved progression-free and overall survival in patients with metastatic breast cancer: reargument of such contentious therapeutic preferences[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(10): 780-788. DOI: 10.1007/s12094-013-1001-9.
- [5] ZHAO M, LI H B, LI L, et al. Effects of a gemcitabine plus platinum regimen combined with a dendritic cell-cytokine induced killer immunotherapy on recurrence and survival rate of non-small cell lung cancer patients[J/OL]. Exp Ther Med, 2014, 7(5): 1403-1407 [2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991503/>. DOI:10.3892/etm.2014.1574.
- [6] GAO D Q, LI C Y, XIE X H, et al. Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in gastric and colorectal cancer patients[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e93886 [2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974849/>. DOI:10.1371/journal.pone.0093886.
- [7] 武博荣,金萌,王卫真,等. PI3K/AKT 信号通路在肿瘤调控中的免疫作用及分子机制[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(16): 135-137. DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2013.16.138.
- [8] 孙雯雯,崔晓旭,窦金霞,等. 不同方式诱导的树突状细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞对荷结肠癌 HT-29 细胞干细胞瘤裸鼠免疫治疗的研究[J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(2): 118-122. DOI: 10.16386/j.cjpcd.issn.1004-6194.2016.02.010.
- [9] ROSENBERG S A, YANG J C, RESTIFO N P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines[J/OL]. Nat Med, 2004, 10(9): 909-915 [2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1435696/>. DOI:10.1038/nm1100.

- [10] LEEMHUIS T, WELLS S, SCHEFFOLD C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(3): 181-187. DOI: 10.1016/j.bbmt.2004.11.019.
- [11] 李欢, 王梦杰, 张翔宇, 等. 桥接整合因子1通过c-MYC途径抑制非小细胞肺癌A549细胞中PD-L1的表达[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 762-766. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.002.
- [12] MARTEN A, RENOTH S, VON LILIENFELD-TOAL M, et al. Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells[J]. *Haematologica*, 2001, 86 (10): 1029-1037. DOI: 10.1016/S0301-472X(01)00719-6.
- [13] 宋东, 杨晓玲, 杨雪晶, 等. DC-CIK免疫治疗晚期胰腺癌的临床疗效分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(4): 401-406. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.014.
- [14] DING Z C, BLAZAR B R, MELLOR A L, et al. Chemotherapy rescues tumor-driven aberrant CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation and restores an activated polyfunctional helper phenotype[J/OL]. *Blood*, 2010, 115(12): 2397-2406[2019-08-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2845898/>. DOI:10.1182/blood-2009-11-253336.
- [收稿日期] 2019-08-10 [修回日期] 2019-11-29  
[本文编辑] 王映红