

负载抗原的 DC 与 CIK 共培养对多药耐药肝癌细胞 HepG2/ADM 的杀伤作用及其机制研究*

徐巧元¹, 杨志祥^{2△}, 罗 阔² (1. 重庆市第五人民医院肿瘤科 400062; 2. 重庆市中山医院肿瘤科 400013)

【摘要】 目的 观察负载抗原的树突状细胞(DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)对高表达 P-糖蛋白(P-gp)的多药耐药(MDR)的肝癌细胞株 HepG2/ADM 细胞的杀伤作用和机制研究。方法 用常规方法诱导健康志愿者外周血中单个核细胞产生 DC 和 CIK 细胞,制备 HepG2/ADM 细胞冻融抗原后冲击 DC,并与 CIK 细胞分别共培养 24、48、72、96 h,并将未负载抗原的 DC 和 CIK 细胞共培养作为对照。采用流式细胞术鉴定 DC、CIK 细胞的表型,采用 CCK-8 试剂检测 HepG2/ADM 细胞的增殖活力。用 RT-PCR 检测各组细胞内 *mdr-1* mRNA 的水平变化,Western blot 检测细胞内 P-gp 蛋白水平的变化。结果 与未负载抗原的 DC-CIK 相比,负载抗原的 DC-CIK 表面分子表达明显增高($P < 0.05$),对 HepG2/ADM 细胞增殖活力抑制作用更加明显($P < 0.05$)。RT-PCR 和 Western blot 结果分别显示,随着作用时间的延长,未负载抗原的 DC-CIK 和负载抗原 DC-CIK 的 HepG2/ADM 细胞内的 *mdr-1* mRNA 和 P-gp 蛋白水平分别都有明显的降低($P < 0.05$),而且后者的抑制作用更明显($P < 0.05$)。结论 经抗原冲击的 DC 和 CIK 共培养可以明显提高对多药耐药 HepG2/ADM 细胞株的杀伤活性,其机制可能与抑制与 MDR 密切相关的 *mdr-1* 基因和其编码的 P-gp 蛋白水平有关。

【关键词】 细胞因子诱导的杀伤细胞; 树突状细胞; 多药耐药; P-糖蛋白; HepG2/ADM 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)15-2161-04

Killing effects of co-culture of antigen-loaded DC and CIK cells on multidrug resistant liver cancer HepG2/ADM and its potential mechanism* XU Qiao-yuan¹, YANG Zhi-xiang^{2△}, LUO Kuo² (1. Department of Oncology, Chongqing Fifth People's Hospital, Chongqing 400062, China; 2. Department of Oncology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China)

【Abstract】 Objective To observe the killing effects of the antigen-loaded dendritic cells(DC) and cytokine-induced killer cells(CIK) on multidrug resistance liver cancer line HepG2/ADM with highly expressed permeability glycoprotein(P-gp) and to explore its potential mechanisms. **Methods** DC cells and CIK cells were induced from the peripheral blood in healthy volunteers by the conventional methods, and DC cells were impacted with HepG2/ADM cells after frozen-thawed antigen, which were co-cultured with CIK cells for 24, 48, 72, 96 h respectively. The DC cells without antigen-loading and CIK cells were co-cultured as control. The cell phenotype of DC and CIK was identified by the flow cytometry, the cell proliferation vitality of HepG2/ADM was detected by CCK-8; The expression of *mdr-1* mRNA was determined by realtime-PCR, the P-gp protein level was detected by Western blot. **Results** Compared with non-antigen-loaded DC-CIK group, the expression of surface molecules in the antigen-loaded DC-CIK group was significantly increased ($P < 0.05$), the vitality of HepG2 cells was inhibited more significantly ($P < 0.05$). The RT-PCR and Western blot results showed that with the time extension, the expression of *mdr-1* mRNA and P-gp protein both were significantly decreased in the above two groups respectively ($P < 0.05$); Furthermore, the inhibitory effects was more significant in the antigen-loaded group ($P < 0.05$). **Conclusion** The co-culture of DC and CIK after antigen impact could improve its killing activity to multidrug-resistant HepG2/ADM cell line, its potential mechanism may be via inhibiting the MDR closely related *mdr-1* gene expression and its encoded P-gp protein level.

【Key words】 cytokine-induced killer cells; dendritic cells; multidrug-resistance; P-gp; HepG2/ADM cells

树突状细胞(DC)是体内已知功能最强、唯一能活化静息 T 细胞的专职抗原提呈细胞。细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)一种新型的免疫活性细胞,它是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子共同培养一段时间后获得的一群异质细胞。研究表明,CIK 和 DC 两者共培养后具有更强的增殖活性和细胞毒性,能刺激机体的免疫系统,诱导产生特异性的抗肿瘤免疫反应,从而达到治疗肿瘤的目的。目前 DC 联合 CIK

细胞免疫治疗在多种实体肿瘤和血液系统疾病中得到令人鼓舞的效果,而对于肝癌细胞多药耐药性调节方面报道较少,故本研究欲将 CIK 细胞与负载耐药肝癌 HepG2/ADM 细胞冻融抗原的 DC 细胞共培养,观察其对细胞杀伤性的影响,并探讨其机制^[1-3]。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞系 DC 和 CIK 细胞取自健康志愿者的外周血,

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20120225)。

作者简介:徐巧元,女,副主任医师,硕士,主要从事肿瘤学方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:yzhixiang122@tom.com。

HepG2 肝癌细胞株来自重庆医科大学分子与肿瘤研究中心, 并建立由阿霉素诱导的多药耐药细胞株 HepG2/ADM。

1.2 仪器与试剂 RPMI-1640 培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司; 人淋巴细胞分离液为 TBS 产品; RHGM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 购自厦门特宝生物工程股份有限公司; CD3 单克隆抗体(CD3McAb)购自深圳达科为生物有限公司; FITC 标记的 CD3、CD8、CD56、CD80、CD83、CD86 和主要组织相容性复合体 II (MHC II) 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司; IL-2 和 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒购自博士德生物公司; CCK-8 试剂盒购自日本株式会社; Annexin V-FITC/PI 购自凯基生物。RT-PCR 试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司, mdr-1 引物由 Invitrogen 公司设计并合成。P-gp 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 内参抗体 β -actin 购自博螯森生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞冻融抗原的制备 常规收集对数生长期的 HepG2/ADM 细胞, 磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 遍后, 再用 PBS 稀释将浓度调整至 1×10^8 /mL, 制成细胞悬液。在 -80°C 冰冻, 后于 37°C 融解, 如此反复冻融 3 次, 再于冰浴中超声波破碎, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 过滤除菌, 存放于 4°C 备用。

1.3.2 DC 和 CIK 细胞的诱导培养和共培养 取自于健康志愿者的外周血, 经血细胞分离机和淋巴细胞分离液梯度离心法分离纯化单个核细胞。用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基将细胞浓度调整为 5×10^6 /mL, 加入 6 孔板中, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 2 h。收集培养上清中的悬浮细胞作为诱导 CIK 细胞备用。用含有 1 000 U/mL CM-CSF、500 U/mL IL-4、500 U/mL TNF- α 以及 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基继续培养贴壁细胞。每 3 天换 1 次液, 在第 4 天, 向一部分 DC 培养液中按 100 U/mL 加入冻融抗原, 诱导至第 7 天收获成熟 DCs。将收集的悬浮细胞密度调整至 2×10^6 /mL 加入 6 孔板中, 用含 50 ng/mL 抗 CD3 单抗、2 000 U/mL IFN- γ 、1 000 U/mL IL-2 以及 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基继续培养。每 3 天换 1 次液, 诱导至 14 d 收获 CIK 细胞。将收获的负载抗原和未负载抗原的 DC 分别与 CIK 细胞共培养(DC : CIK = 1 : 100), 采用 CIK 培养液, 分别命名为 Ag-DC-CIK 和 DC-CIK。共培养 4 d 后, 收集细胞备用。

1.3.3 流式细胞术鉴定 DC 和 CIK 细胞的免疫表型 共培养 4 d 的 DC 以及 CIK 细胞, 用 PBS 将细胞密度调整至 1×10^6 /mL, 分别加入相应的抗体, 混匀后在室温下避光孵育 30 min, 再用 PBS 洗涤 3 遍, 加入 1% 多聚甲醛固定。采用流式细胞仪检测 DC 表型(CD80、CD83、CD86、MHC II)和 CIK 表型(CD3、CD8、CD56)。

1.3.4 CCK-8 检测共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞的杀伤作用 将处于对数生长期的 HepG2/ADM 细胞以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 培养 12 h 细胞贴壁后, 将 DC-CIK 细胞或 Ag-DC-CIK 细胞加入 HepG2/ADM 培养体系中(效靶比 1 : 1、10 : 1、100 : 1), 继续培养 24、48、72、96 h。在培养相应时间点后加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 37°C 孵育 2 h, 于酶标仪上 490 nm 处比色。根据公式计算细胞活力: 细胞活力 = A_{490} (处理组) / A_{490} (自然生长组) $\times 100\%$ 。

1.3.5 RT-PCR 收集 DC-CIK 细胞或 Ag-DC-CIK 细胞共培养的各组 HepG2/ADM 细胞, PBS 充分洗涤后, 参照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 用 RT-PCR 法检测各组细胞中 mdr-1 基因的表达量。Mdr-1 上游引物: 5'-GTA CCC ATC

ATT GCA ATA GC-3'; 下游引物: 5'-CAA ACT TCT GCT CCT GAG TC-3', 扩增产物大小为 167 bp。内参 GAPDH 上游引物: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'; 下游引物: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3', 扩增产物大小为 228 bp。扩增条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 5 min, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 凝胶成像扫描。用 Quantity One 灰度分析软件进行吸光度值计算。以目的基因 mdr-1 条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值作为 mdr-1 mRNA 的表达量, 并重复 3 次。

1.3.6 Western blot 收集各组细胞提取总蛋白, 并测定蛋白的浓度为 (2.12 ± 0.24) mg/mL。取蛋白样品 20 μL , 经过 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白电转移至 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉 TBST 液封闭后, 加入 P-糖蛋白(P-gp)抗体 4°C 孵育过夜, 洗涤后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h 后, ECL 底物化学发光显色后曝光显影。通过 Chemi DocXRS 化学发光成像系统, 进行曝光分析, 然后计算其比值表示结果, 即: 相对吸光度 = 目的蛋白 P-gp 吸光度 / β -actin 蛋白吸光度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 独立变量 t 检验和单因素方差分析; 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DC 与 Ag-DC 细胞的免疫表型的比较 在 DC 诱导培养 7 d 后, 分别收集 DC 和 Ag-DC, 采用流式细胞术鉴定 DC 表面标志物 CD80、CD83、CD86、MHC II, 结果见表 1。DC 分别为: $(24.13 \pm 2.31)\%$ 、 $(18.77 \pm 0.63)\%$ 、 $(33.99 \pm 1.53)\%$ 、 $(32.02 \pm 2.30)\%$, 而 Ag-DC 分别为: $(42.42 \pm 2.27)\%$ 、 $(36.08 \pm 2.10)\%$ 、 $(36.66 \pm 2.10)\%$ 、 $(42.39 \pm 2.55)\%$ 。因此, 结果显示 DC 负载抗原后, 表面标志物的表达均有上升, 且 2 组间 CD80、CD83 以及 MHC II 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 诱导 7 d 后 DC 与 Ag-DC 细胞的免疫表型的表达量 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD80	CD83	CD86	MHC II
DC 组	24.13 \pm 2.31	18.77 \pm 0.63	33.99 \pm 1.53	32.02 \pm 2.30
Ag-DC 组	42.42 \pm 2.27*	36.08 \pm 2.10*	36.66 \pm 2.10	42.39 \pm 2.55*

注: DC 组与 Ag-DC 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 与 DC 或 Ag-DC 共培养后 CIK 细胞的免疫表型比较 在 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养 4 d 后, 收集 2 组 CIK 细胞, 采用流式细胞术进行表型鉴定, DC-CIK 组的 CIK 细胞 CD3⁺ CD8⁺、CD3⁺ CD56⁺ 细胞分别为 $(25.79 \pm 1.70)\%$ 、 $(8.94 \pm 0.63)\%$, 而 Ag-DC-CIK 组的 CIK 细胞分别为 $(32.48 \pm 1.00)\%$ 、 $(13.97 \pm 1.25)\%$ 。该结果提示, 负载抗原的 DC 比未负载抗原的 DC 更能提高 CD3⁺ CD8⁺ CIK 和 CD3⁺ CD56⁺ CIK 的百分比。见表 2。

表 2 共培养 4 d 后 2 组 CIK 细胞的免疫表型 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
DC-CIK 组	25.79 \pm 1.70	8.94 \pm 0.63
Ag-DC-CIK 组	32.48 \pm 1.00*	13.97 \pm 1.25*

注: DC-CIK 组与 Ag-DC-CIK 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/

ADM 细胞的杀伤作用 将 DC-CIK 或 Ag-DC-CIK 按效靶比分别为 1 : 1、10 : 1、100 : 1 与肝癌细胞 HepG2/ADM 共培养,采用 CCK-8 试剂检测 2 组共培养细胞对肝癌细胞增殖活力的杀伤作用。当效靶比为 1 : 1 时,无论作用多长时间,2 组 HepG2/ADM 细胞增殖活力下降均不明显。当效靶比为 10 : 1 时,2 组共培养细胞在 48 h 出现杀伤作用,随着作用时间延长,HepG2/ADM 细胞增殖活力下降越明显 ($P < 0.05$),且 Ag-DC-CIK 组的细胞活力明显低于 DC-CIK 组 ($P < 0.05$)。当效靶比在 100 : 1 时,共培养细胞的杀伤作用更强,Ag-DC-

CIK 组在 24 h 就使 HepG2/ADM 细胞增殖活力下降至 (81.8 ± 4.67)%,当作用时间至 96 h,DC-CIK 组的 HepG2/ADM 细胞活力大大降低至 (42.23 ± 3.01)%,甚至在 Ag-DC-CIK 组仅剩 (19.14 ± 2.06)%。该结果显示,效靶比在 1 : 1 到 100 : 1 范围内时,共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞的杀伤作用与效靶比呈正相关,且具有时间依赖性,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 Ag-DC-CIK 细胞抗癌作用明显优于 DC-CIK 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

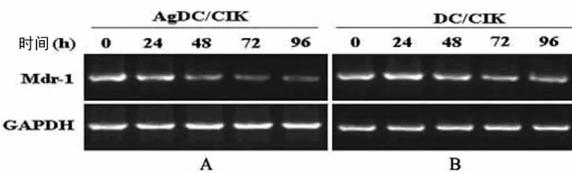
表 3 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞的杀伤作用 ($\bar{x} \pm s, \%$)

培养时间	自然生长组	DC-CIK 组			Ag-DC-CIK 组		
		1 : 1	10 : 1	100 : 1	1 : 1	10 : 1	100 : 1
24 h	100 ± 3.32	105.46 ± 5.48	105.40 ± 7.03	93.15 ± 12.8	100.74 ± 4.62	95.39 ± 4.81	81.80 ± 4.67*
48 h	100 ± 4.36	101.17 ± 3.75	90.13 ± 5.45*	81.97 ± 3.3*	99.48 ± 3.6	64.42 ± 2.57*△	51.55 ± 2.53*△
72 h	100 ± 1.06	93.29 ± 2.54	74.45 ± 2.65*	49.70 ± 2.56*	89.70 ± 4.24*	41.79 ± 4.08*△	25.59 ± 2.36*△
96 h	100 ± 2.66	91.85 ± 1.20*	69.04 ± 3.56*	42.23 ± 3.01*	91.70 ± 2.68*	35.69 ± 4.06*△	19.14 ± 2.06*△

注:与自然生长组比较,* $P < 0.05$;与相同比效靶比的 DC-CIK 组比较,△ $P < 0.05$ 。

2.4 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 表达的影响 根据前面的实验结果,将 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 按效靶比为 10 : 1 与肝癌细胞 HepG2/ADM 共培养,分别于培养 24、48、72 和 96 h 后收集各组细胞。采用 RT-PCR 法和凝胶电泳成像分析,在 DC-CIK 与 HepG2/ADM 共培养 72 h 后,细胞内 mdr-1 mRNA 的表达量才有明显的下降,作用 96 h 后,其表达下降更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而在 Ag-DC-CIK 与 HepG2/ADM 共培养 48 h 后,细胞内 mdr-1 mRNA 的表达已有明显降低,且随着作用时间的延长,细胞内的 mdr-1 mRNA 下降更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),具有时间依赖性。而且,在 48 h 时,与 DC-CIK 比较,Ag-DC-CIK 对 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 的抑制作用较更明显 ($P < 0.05$)。见图 1、表 4。

ADM 细胞内 P-gp 蛋白表达水平的影响 将 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 按效靶比为 10 : 1 与肝癌细胞 HepG2/ADM 共培养,分别于培养 24、48、72 和 96 h 后收集各组细胞。采用 WB 法和凝胶成像分析,在 DC-CIK 与 HepG2/ADM 共培养 48 h 后,细胞内 P-gp 蛋白的表达量有明显的下降,作用 72、96 h 后,其表达下降更明显,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);在 Ag-DC-CIK 与 HepG2/ADM 共培养 48 h 后,细胞内 P-gp 蛋白的表达也有明显降低,且随着作用时间的延长,细胞内的 P-gp 蛋白大量下降更明显,具有时间依赖性差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而且,在 72 h 后,与 DC-CIK 比较,Ag-DC-CIK 对 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 蛋白水平的抑制作用更明显差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、表 5。



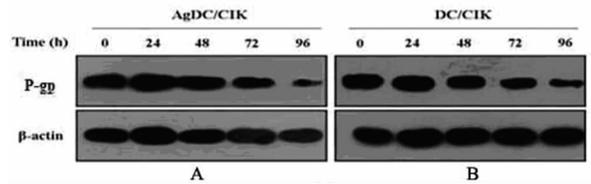
注:A 表示 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 表达的影响;B 表示 DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 表达水平的比较。

图 1 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 表达的影响和比较

表 4 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 mdr-1 mRNA 表达水平相对 OD 值的比较

培养时间	Ag-DC-CIK	DC-CIK
0 h	0.83 ± 0.06	0.87 ± 0.07
24 h	0.81 ± 0.10	0.91 ± 0.13
48 h	0.54 ± 0.11* §	0.83 ± 0.15
72 h	0.37 ± 0.09** §	0.45 ± 0.13**
96 h	0.32 ± 0.11** §	0.34 ± 0.10**

注:与 0 h 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Ag-DC-CIK 组与 DC-CIK 组相比,§ $P < 0.01$ 。



注:A 表示 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 蛋白表达水平的影响;B 表示 DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 蛋白表达水平的比较。

图 2 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 蛋白表达水平的影响和比较

表 5 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/ADM 细胞内 P-gp 蛋白表达相对 OD 值的比较

培养时间	Ag-DC-CIK	DC-CIK
0 h	0.97 ± 0.08	1.02 ± 0.17
24 h	0.99 ± 0.14	1.04 ± 0.15
48 h	0.81 ± 0.12#	0.85 ± 0.12#
72 h	0.67 ± 0.05## §	0.51 ± 0.20##
96 h	0.30 ± 0.15## §	0.43 ± 0.18##

注:与 0 h 组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;Ag-DC-CIK 组与 DC-CIK 组相比,§ $P < 0.01$ 。

2.5 DC-CIK 和 Ag-DC-CIK 共培养细胞对肝癌 HepG2/

3 讨论

多药耐药(MDR)是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生抗药性的同时,对结构和作用机制不同的多种抗肿瘤药物产生交叉抗药性,从而极大地降低了抗肿瘤药物的疗效。MDR的发生是许多种肿瘤化疗失败的主要原因,其形成的机理复杂多样,而多药耐药基因 *mdr1* 编码的 P-gp 过度表达是其重要原因之一,P-gp 能够将亲脂类化疗药物泵出细胞外,从而导致耐药特性^[4]。*Mdr-1* 和 P-gp 在多种恶性肿瘤细胞中的过度表达是形成 MDR 的重要机制,也是肿瘤患者化疗效果差、预后差、复发率高的重要原因,因此寻找有效的 MDR 逆转剂一直是抗肿瘤研究的热点^[5-6]。

肝癌是消化系统最为常见的恶性肿瘤之一,针对因糖蛋白 P-gp 高表达引发 MDR 而导致的肝癌居高不下的发病率和死亡率,各种新型的治疗策略正在迅速地被发掘,其中细胞免疫治疗因其能提高肝癌患者的生存率和降低复发率而备受临床医生和患者的青睐。

CIK 是一类具有非 MHC 限制性的 T 细胞,具有强大的光谱的杀瘤效应,如肺癌、胃癌、乳腺癌等,而其主要的效应细胞给 CD3⁺ 和 CD6⁺ 淋巴细胞^[7-9]。DC 分布于全身各处,它具有强大的抗原呈递作用,它能激活初始型的 T 细胞增殖并建立初级免疫应答。DC 在体外可以通过多种细胞因子诱导生成。将 DC 与 CIK 共培养,前者可识别病原、激活获得性免疫系统,后者通过发挥自身的细胞毒性与分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞,因此能够提高 CIK 的抗癌疗效。因此,在本研究中,通过利用 DC-CIK 联合培养,然后作用于多药耐药肝癌细胞株 HepG2/ADM,效靶比在 100:1 时,显示出了强大的抗肝癌细胞增殖作用,此种抗癌作用随时间延长而增强,并持续到 96 h,具有时间依赖性。其可能的机制为 DC 表面有大量的树突状突起,使之有利于大量接触抗原,提呈给 T 细胞;高表达 MHC I、II 类分子及 CD80/CD86 等共刺激分子,为 CIK 细胞充分活化提供了有效的刺激,分泌出多种细胞因子,包括 IL-12、IFN 等,维持和增强 CIK 细胞的杀伤作用。进一步研究还发现,DC-CIK 联合培养后能够显著降低 *mdr-1* mRNA 水平的表达及其编码的 P-gp 蛋白水平的表达,而且这种抑制作用也呈现时间依赖性 ($P < 0.05$)。

DC 除能刺激初始型 T 细胞活化增殖外,还能把抗原有效的呈递给 T 细胞,使 T 细胞对抗原蛋白酶致敏,从而杀死肿瘤细胞。将肿瘤细胞全部抗原信息(如提取的肿瘤细胞总 RNA 或经过灭活的完整的肿瘤细胞)冲击 DC,可以有效地致敏和活化 DC,促进其分化成熟,增强其功能,因此,将负载有抗原的 DC-CIK 共培养,可以提高 CIK 的抗癌能力^[10]。在本研究中,将肝癌 HepG2/ADM 细胞反复冻融制作的抗原负载于 DC 上,DC 表面的共刺激分子(CD80、CD83 和 CD86)、MHC II、CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD56⁺ 的表达均高于未负载抗原的 DC,说明负载了抗原的 DC,其成熟度更高,抗原呈递功能更强。进一步的研究发现,与未负载抗原的 DC-CIK 比较,负载抗原组的抗癌作用明显强于未负载抗原组,且效靶比在 10:1 和 100:1 时差异有统计学意义,此种差异随着作用时间延长而渐明显 ($P < 0.05$);且细胞内 *mdr-1* mRNA 水平的表达以及其编码的 P-gp 蛋白水平的表达明显降低,也呈现时间依赖性 ($P < 0.05$)。

目前,负载有特异性的抗原 DC 疫苗已运用于临床,此种疫苗作为强有力的宿主免疫刺激物,具有超强的免疫应答激发

功能,能特异性的杀死肿瘤细胞,提高治疗效果并无明显毒副作用^[11]。在本研究中,采用 HepG2/ADM 冻融抗原负载的 DC-CIK,产生了比未负载抗原的 DC-CIK 细胞更有效杀伤 *mdr-1* 和 P-gp 高表达的多药耐药肝癌细胞 HepG2/ADM 的效应,这为肝癌的综合治疗指出了新的方向。

参考文献

- [1] Wang D,Zhang B,Gao H,et al. Clinical research of genetically modified dendritic cells in combination with cytokine-induced killer cell treatment in advanced renal cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(11): 1-7.
- [2] Shi SB, Tang XY, Tian J, et al. Efficacy of erlotinib plus dendritic cells and cytokine-induced killer cells in maintenance therapy of advanced non-small cell lung cancer [J]. J Immunother, 2014, 37(4): 250-255.
- [3] 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.
- [4] Leitner I, Nemeth J, Feurstein T, et al. The third generation P-glycoprotein inhibitor tariquidar may overcome bacterial multidrug resistance by increasing intracellular drug concentration [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 66(4): 834-839.
- [5] Liu Z, Duan ZJ, Chang JY, et al. Sinomenine sensitizes multidrug-resistant colon cancer cells (Caco-2) to doxorubicin by downregulation of MDR-1 expression [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98560.
- [6] Oliveira RFF, Santos RE, Oliveira AL, et al. Prognostic assessment of polymorphisms of the MDR-1 and GSTP1 genes in patients with stage II and III breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy [J]. Breast J, 2012, 18(2): 185-187.
- [7] Jin C, Li J, Wang J, et al. Impact of cellular immune function on prognosis of lung cancer patients after cytokine-induced killer cell therapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(15): 6009-6014.
- [8] Du X, Jin R, Ning N, et al. In vivo distribution and antitumor effect of infused immune cells in a gastric cancer model [J]. Oncol Rep, 2012, 28(5): 1743-1749.
- [9] Pan K, Guan XX, Li YQ, et al. Clinical activity of adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with post-mastectomy triple-negative breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(11): 3003-3011.
- [10] 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, 19(4): 437-441.
- [11] Shah AH, Bregy A, Heros DO, et al. Dendritic cell vaccine for recurrent high-grade gliomas in pediatric and adult subjects: clinical trial protocol [J]. Neurosurgery, 2013, 73(5): 863-867.