

文章编号: 1001-764X(2012)10-837-05

细胞因子诱导的杀伤细胞抗肿瘤机制及应用*

蒋敬庭(常州市第一人民医院肿瘤生物诊疗中心, 江苏常州 213003)



作者简介:蒋敬庭,男,教授,博士,硕士研究生导师。享受国务院政府特殊津贴,江苏省“333 高层次人才培养工程”中青年科学技术带头人。任常州市医学生物技术重点实验室主任,常州市第一人民医院肿瘤生物诊疗中心主任,中国医药生物技术协会理事,江苏省生物技术协会常务理事,江苏省中西医结合学会实验医学专业委员会常务委员,兼任《Clinical Oncology and Cancer Research》、《中国医药生物技术》、《临床检验杂志》等杂志编委。

曾获得“江苏省有突出贡献中青年专家”、“江苏省优秀科技工作者”和江苏省“五一创新能手”称号。主持国家自然科学基金项目 2 项(30950022;81171653)与江苏省自然科学基金项目 1 项(BK2011246),参与承担卫生部、江苏省卫生厅、常州市国际合作与社会发展计划等科研项目 27

项。并获得江苏省科技进步奖三等奖 3 项,江苏省医学科技二等奖 1 项,常州市科技进步奖一等奖 3 项,江苏省卫生厅医学新技术引进奖一等奖 4 项,二等奖 5 项。以第一作者或通信作者在 JBC、PLoS One 等期刊上发表 SCI 收录论文 25 篇,国家发明专利 5 项。

摘要:细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)是一群体外诱导的以 CD3⁺CD56⁺T 细胞为主的异质细胞群,具有效应 CD8⁺T 细胞的 TCR 特异性和非 MHC 限制性抗肿瘤活性的特点。采用荷瘤小鼠模型进行 CIK 临床前研究,结果表明 CIK 对实体肿瘤和血液系统肿瘤均有明显的抗肿瘤效应。临床研究证实 CIK 可用于治疗多种恶性肿瘤,显著延长患者的生存期且无毒副作用。用免疫学与基因工程方法增强 CIK 疗法的特异性和细胞毒活性,寻求其疗效判断的生物学标志及 CIK 治疗的纳入与排除标准是目前研究的热点。

关键词:细胞因子诱导的杀伤细胞;过继免疫治疗;肿瘤

中图分类号:R392.12;R73

文献标志码:A

细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cell, CIK)是将人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)在体外经多种细胞因子特定时间下刺激诱导培养后获得的一群异质细胞群,主要的效应细胞为 CD3⁺CD56⁺T 细胞,兼有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和 NK 细胞非 MHC 限制性抗肿瘤的特点^[1]。与用于过继免疫治疗的其他细胞相比,具有增殖速度快、抗肿瘤活性高和杀瘤谱广等优点。随着 CIK 抗肿瘤作用的机制逐步明确,其临床应用也越来越广泛^[2-9]。

1 CIK 的特性

PBMC 经 IL-2 诱导培养生成淋巴因子激活的杀伤(lymphocyte activated killer, LAK)细胞,在体内、外以非 MHC 限制性杀瘤形式促进肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤效应^[10]。但 LAK 细胞在体外增殖能力弱且体内细胞毒性低,过继免疫抗肿瘤疗效不显著^[11-12]。从动物免疫治疗模型推测,LAK 细胞数量

需达到 2×10^{11} 在体内才能产生充分抗肿瘤免疫应答^[13]。在外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocytes, PBLs)培养体系中加入抗 CD3 单抗和 IL-2 不仅提高 LAK 细胞在体外增殖活性,且培养 21 d 后细胞数可增长 1 000 倍,这些细胞具有潜在的抗肿瘤活性^[12]。为进一步提高细胞抗肿瘤效应, Schmidt-Wolf 将 INF- γ 加入 PBMC 培养体系,24 h 后再加入 IL-2 和抗 CD3 单抗以及其他相关的细胞因子,此培养体系产生的 CIK 毒性比采用单一 IL-2 培养条件下生成的 LAK 细胞毒性提高了 70 倍^[14-15]。

Leemhuis 等^[16]发现 PBMC 培养 21 d 后,90% 的增殖细胞表达 CD3,70% 和 30% 的细胞表达 CD8 和 CD4,CD3⁺CD56⁺T 细胞比例同样也极大地提高并且达到相对稳定状态。大部分 CD3⁺CD56⁺T 细胞同时表达 CD2、TCR $\alpha\beta$ 和 CD8,不表达 CD4 及 CD16。并发现该培养条件下增殖的 CD3⁺CD56⁺T 细胞来源于 CD3⁺CD56⁻T 淋巴细胞而非 CD3⁻CD56⁺NK 细胞。CD3⁺CD8⁺T 细胞表达高水平 CD56,而

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171653,30950022);江苏省自然科学基金项目(BK2011246);六大人才高峰第六批资金资助项目(BRA2010037)。

CD3⁺CD4⁺T 细胞不表达。CIK 还高表达 CD45RA, 中表达 CD11a、CD27、CD28、巨噬细胞炎症蛋白 1a、穿孔蛋白、Fas 蛋白配体和低表达 CCR7、CD62L, 表明它们为终末分化记忆型 T 细胞^[17]。因此, CIK 是与 CD8⁺T 细胞具有不同效应的异质细胞群, 具有不同 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 特异性和非 MHC 限制性抗肿瘤细胞毒活性特点。

2 CIK 抗肿瘤的生物学作用

经抗 CD3 单克隆抗体或敏感肿瘤靶细胞刺激后的 CIK 出现脱粒, 而环孢素和 KF506 能抑制抗 CD3 介导的脱粒, 但不影响 CIK 抗肿瘤细胞毒活性^[18]。CIK 介导的抗肿瘤细胞毒活性需通过形成 CIK 与肿瘤细胞复合物来实现。细胞表面黏附分子白细胞功能抗原-1 (leukocyte function associated antigen-1, LFA-1) 参与识别目标效应器, 同时稳定复合物结构^[19]。CIK 表达 LFA-1, 敏感的肿瘤细胞表达 LFA-1 配体如 ICAM-1、-2 和 -3, CIK 与肿瘤细胞结合可以有效增强 CIK 抗肿瘤细胞毒活性, 表明 LFA-1 在绑定靶点和发挥 CIK 毒性方面起关键作用^[18-19]。除 LFA-1, CIK 还表达激活的 NK 受体, 包括 NKG2D、DNAX 附属分子-1 (DNAM-1) 和 NKp30。细胞信号传递通过 NKG2D、DNAM-1 或 NKp30 激活 CIK 发挥抗肿瘤效应。通过 NKG2D、DNAM-1 及 NKp30 抗体证实这些分子参与 CIK TCR 非依赖性肿瘤细胞的识别及杀伤作用^[19-20]。

CIK 对多种实体肿瘤, 如肾癌^[21]、胃癌^[7]、肺癌^[8]、肝癌^[4]、胶质瘤^[9] 等和血液系统疾病包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病和 B 系淋巴瘤^[22-23] 具有体内抗肿瘤作用。CIK 对体外正常骨髓及脾细胞无细胞毒活性, 提示 CIK 对肿瘤细胞具有相对的特异性^[24]。

3 临床前研究

在严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠注射人类淋巴瘤细胞评估 CIK 及 LAK 细胞的体内抗肿瘤作用的研究中发现, 与单一注射淋巴瘤细胞及输注 LAK 细胞的小鼠相比, CIK 输注组小鼠的生存期显著延长, 表明 CIK 在体内抗肿瘤活性方面具有优势^[14]。将小鼠脾细胞在 CIK 培养体系中培养 21 d 发现大部分细胞为 TCR⁺CD3⁺CD8⁺T 细胞, 且与 CD8⁺T 淋巴细胞表型一致, 提示小鼠 CIK 也具有抗肿瘤活性^[25]。另有研究^[26]证实, 过继免疫的小鼠 CIK 对异源基因和同源基因转移瘤均有较强的抗肿瘤活

性。研究^[27]发现, 14 d 能诱导出典型的 CIK, 细胞处于对数生长期, 可确立 CIK 过继免疫治疗恶性肿瘤输注的最佳时间为第 14 d。此外, CIK 可分泌改变肿瘤微环境的细胞因子及炎症趋化因子, 有利于杀伤肿瘤细胞。

CIK 对多种肿瘤细胞具有杀伤效应并对多重耐药肿瘤细胞也同样具有敏感性, 而对化疗敏感的亲本细胞和不敏感的转化细胞杀伤活性差异无统计学意义。免疫抑制剂 CsA 和 FK506 虽然可以抑制抗 CD3 单抗介导的 CIK 脱颗粒过程, 但不影响靶细胞诱导的 CIK 脱颗粒, 且 CIK 对靶细胞的杀伤活性不会由此降低^[18, 28]。CIK 强大的增殖能力和广谱的细胞毒活性使之成为临床应用的一种理想效应细胞。

4 临床应用研究

作为一种新型肿瘤过继免疫治疗细胞, 已有多项临床试验评估了 CIK 治疗的安全性与有效性。Schmidt-Wolf 将转染 IL-2 的自体 CIK 输入 15 例转移性肾癌、结直肠癌、淋巴瘤患者体内, 通过分析发现转染 IL-2 的 CIK 在体内持续发挥作用 2 周, 期间 3 例患者出现轻微的发热反应, 而未观察到其他明显毒副作用^[29]。Leemhuis 等^[16]使用自体 CIK 治疗自体骨髓移植后出现病情恶化的 7 例霍奇金和 2 例非霍奇金淋巴瘤患者, 未见明显的毒副反应。这些临床研究均显示 CIK 是一种安全的免疫治疗方法。

我们^[2]曾报道了自体 CIK 联合化疗治疗进展期胃癌的疗效, 将 57 例患者分成 CIK 治疗组和单纯化疗组。与单纯化疗组相比, 化疗联合 CIK 治疗组患者血清肿瘤标志物水平显著下降, 短期疗效和生存质量 (QOL) 得到提高, 2 年生存期得到延长。为进一步评价 CIK 辅助免疫治疗局部晚期胃癌术后患者的长期疗效, 研究了 151 例 III/IV 期胃癌根治术后患者, 其中 74 例患者于辅助化疗结束后接受 CIK 治疗, 77 例患者作为对照组。两组患者的 5 年总生存率 (OS) 分别为 32.4% 与 23.4%, 两组患者的 5 年无病生存率 (DFS) 分别为 28.3% 与 10.4%。肠型胃癌患者免疫治疗组的 5 年总生存率与 5 年无病生存率均显著高于对照组 (OS: 46.8% vs 31.4%, $P=0.045$; DFS: 42.4% vs 15.7%, $P=0.023$)。该研究结果提示采用 CIK 辅助治疗局部晚期胃癌可提高患者的无瘤生存时间, 显著延长肠型胃癌患者的总生存时间, 肠型胃癌可作为 CIK 治疗的适应证。辅助化疗结束后行 CIK 治疗可以改善患者 T 细胞亚群分布, 促进患者免疫功能的重建^[5]。我们

又对 156 例胃癌患者大样本队列随访研究,采用时间依赖变量(time dependent covariates)的统计学方法进一步证实了 CIK 治疗的次数与其生存时间密切相关^[6]。我们也评估了肺癌化疗联合 CIK 相比单纯化疗的疗效^[3],59 例非小细胞肺癌患者随机分成单纯化疗组与化疗联合 CIK 输注组。两组总有效率 43.3% 和 44.8%; 疾病进展时间为 4.67 个月和 6.65 个月; 中位生存时间为 11.0 个月和 15.0 个月。这些研究显示: 化疗联合 CIK 治疗对多种恶性肿瘤具有一定的疗效, 且没有明显的毒副作用^[2,3,6]。

Hui 等^[30]报道了肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)根治术后联合 CIK 辅助免疫治疗的疗效, 127 例患者中 43 例患者接受 6 个疗程 CIK 治疗, 41 例患者接受 3 个疗程 CIK 治疗, 另 43 例患者未接受术后 CIK 治疗作为对照组, 结果表明 CIK 治疗患者的无瘤生存率显著高于对照组。Weng 等^[31]发现 CIK 免疫治疗降低 HCC 的复发, 85 例经导管动脉栓塞化疗和射频消融术(RFA)治疗后的 HCC 患者随机分为 CIK 免疫治疗组和无辅助性治疗组, CIK 治疗组的 12 个月与 18 个月复发率为 8.9% 和 15.6%, 对照组为 30.0% 和 40.0%。

2011 年国际 CIK 统计机构报道了全球范围内 11 项 CIK 临床试验治疗资料, 评价了 384 例患者的治疗疗效, 其中复发率(RR)为 23.7% (91/384), 疾病稳定(SD) 161 例, 疾病进展(PD) 129 例, 毒副作用小且有较高的无瘤生存率^[32]。本研究组回顾了国内 CIK 临床治疗 563 例患者的疗效, 用于治疗的 CIK 总数在 $6 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^{10}$, 其中 RR 为 51.7% (291/563), 完全缓解(CR) 40 例, 部分缓解(PR) 126 例, 稍有缓解(MR) 125 例, SD 135 例, PD 58 例, 进一步证实了 CIK 治疗的有效性^[33]。

5 CIK 研究的现状

5.1 CIK 与树突状细胞(dendritic cells, DC)共培养

DC 是体内最强的抗原提呈细胞, 也是启动、调控与维持免疫反应的中心环节。DC 能将抗原信息传递给 T 淋巴细胞, 引发一系列特异性的免疫应答反应。Linn 等^[34]报道了 CIK 与 DC 共培养后对骨肉瘤细胞的杀伤力大于 CIK 细胞杀伤力的 6 倍。

5.2 双特异性抗体与 CIK 双特异性抗体的特点是同一抗体分子上具有的两个抗原结合位点, 一个与靶抗原结合, 另一个与免疫效应细胞上的标记抗原结合。作为治疗用的双特异抗体, 能高度特异性地结合肿瘤相关抗原和免疫效应细胞的表面抗原,

能更好地发挥细胞毒性功能, 靶向促进肿瘤细胞凋亡。Jager 等^[35]将 CD3 × Her2/neu 双特异性抗体用于低表达 Her2/neu 并对曲妥单抗治疗无效的恶性肿瘤细胞, 建立了 SCID/hu 尤文肿瘤(EFT)模型, 体内、外实验发现该双特异性抗体可增强 CIK 导向性和增加对 EFT 肿瘤的细胞毒活性。

5.3 转基因 CIK 研究 转基因 CIK 是通过基因转染法将相关基因导入 CIK 改变某些特性。利用电穿孔法将多药耐药基因导入 CIK, 转染后的 CIK 对多柔比星的耐受性较转染前增强 22.3 ~ 45.8 倍; 对秋水仙碱的耐受性增强了 6.7 ~ 11.35 倍^[36]。

5.4 CIK 协同溶瘤病毒 溶瘤病毒是指能特异性感染肿瘤细胞, 并在其内繁殖使肿瘤细胞裂解的一类病毒。该类病毒并非外源基因的载体, 而是依靠病毒本身特异性在肿瘤细胞中复制以杀死、裂解肿瘤细胞, 细胞裂解后释放出来的病毒又可以进一步感染周围的肿瘤细胞。Weibel 等^[37]研究显示, CIK 与溶瘤病毒相结合能产生强大的协同抗肿瘤作用。

5.5 CIK 对负性协同分子的干预 协同刺激分子在 T/B 细胞的活化、增殖和分化过程中提供正性或负性调控信号从而起促进或抑制作用。其中程序死亡蛋白 1(PD-1)/程序死亡配体(PD-L1)与 B7-H4 作为免疫球蛋白超家族协同刺激分子的重要成员, 参与自身免疫、移植免疫及肿瘤免疫等机体免疫调节过程^[38-39], 在肿瘤微环境中选择性表达并抑制肿瘤特异性 T 细胞免疫, 用 CIK 干预这些分子可起到重要的抗肿瘤作用^[40-42]。

CIK 主要通过非特异性机制识别和杀伤肿瘤细胞, 也可通过双功能特异性抗体或溶瘤病毒协同发挥抗肿瘤效应。RFA 是一种微创治疗恶性肿瘤的重要手段, 肿瘤消融可导致肿瘤抗原暴露, RFA 联合 CIK 治疗可激发特异性抗肿瘤免疫应答。过继转移基因修饰后表达肿瘤抗原受体的 CIK 或许可成为治疗化疗耐药性恶性肿瘤的新手段。

大量研究证实 CIK 过继免疫治疗后的肿瘤患者 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高, 而 CD4⁺/CD8⁺ 与其他标志物是否有关联尚未明确, 目前还没有用于评估临床反应和预测 CIK 疗效的可靠生物标志物。此外, 需尽快确立 CIK 治疗的纳入标准与排除标准, 同时增强其抗肿瘤特异性的研究也需进一步加强。

6 参考文献

- [1] 蒋敬庭. CIK 细胞培养液及培养 CIK 细胞的方法: 中国, ZL200710079562. X[P]. 2010-09-22.

- [2] Jiang J, Xu N, Wu C, *et al.* Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(3B): 2237-2242.
- [3] Wu C, Jiang J, Shi L, *et al.* Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6B): 3997-4002.
- [4] Kim HM, Kang JS, Lim J, *et al.* Antitumor activity of cytokine-induced killer cells in nude mouse xenograft model[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(5): 781-787.
- [5] Shi L, Zhou Q, Wu J, *et al.* Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. doi 10.1007/s00262-012-1289-2.
- [6] Jiang JT, Shen YP, Wu CP, *et al.* Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(48): 6155-6162.
- [7] Na D, Liu FN, Miao ZF, *et al.* Astragalus extract inhibits destruction of gastric cancer cells to mesothelial cells by anti-apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(5): 570-577.
- [8] Xu X, Liu Y, Wang L, *et al.* Gambogic acid induces apoptosis by regulating the expression of Bax and Bcl-2 and enhancing caspase-3 activity in human malignant melanoma A375 cells[J]. *Int J Dermatol*, 2009, 48(2): 186-192.
- [9] Zhao Q, Zhang H, Li Y, *et al.* Anti-tumor effects of CIK combined with oxaliplatin in human oxaliplatin-resistant gastric cancer cells in vivo and in vitro[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 118.
- [10] Le HK, Graham L, Miller CH, *et al.* Incubation of antigen-sensitized T lymphocytes activated with bryostatin 1 + ionomycin in IL-7 + IL-15 increases yield of cells capable of inducing regression of melanoma metastases compared to culture in IL-2[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(10): 1565-1576.
- [11] Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, *et al.* Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(19): 6287-6297.
- [12] Mule JJ, Shu S, Schwarz SL, *et al.* Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2[J]. *Science*, 1984, 225(4669): 1487-1489.
- [13] Ayello J, van de Ven C, Cairo E, *et al.* Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells; implications for adoptive cellular immunotherapy[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(10): 1216-1229.
- [14] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, *et al.* Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [15] Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, *et al.* Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2010, 151(1): 37-46.
- [16] 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.
- [17] Franceschetti M, Pievani A, Borleri G, *et al.* Cytokine-induced killer cells are terminally differentiated activated CD8 cytotoxic T-EMRA lymphocytes [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5): 616-628 e612.
- [18] Mehta BA, Schmidt-Wolf IG, Weissman IL, *et al.* Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3⁺ CD56⁺ killer cells[J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3493-3499.
- [19] Pievani A, Borleri G, Pende D, *et al.* Dual-functional capability of CD3⁺ CD56⁺ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity[J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3301-3310.
- [20] Chen X, Bai F, Sokol L, *et al.* A critical role for DAP10 and DAP12 in CD8⁺ T cell-mediated tissue damage in large granular lymphocyte leukemia[J]. *Blood*, 2009, 113(14): 3226-3234.
- [21] Liu L, Zhang W, Qi X, *et al.* Randomized study of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1751-1759.
- [22] Callera F, Cavenaghi L, de Melo CM. Peripheral blood progenitor cell collection without close monitoring of peripheral blood CD34⁺ cells: A feasible strategy for multiple myeloma or pre-treated Non-Hodgkin's lymphoma patients mobilized with low-dose cyclophosphamide plus G-CSF [J]. *Transfus Apher Sci*, 2009, 40(2): 91-95.
- [23] Linn YC, Lau SK, Liu BH, *et al.* Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell[J]. *Immunology*, 2009, 126(3): 423-435.
- [24] Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, *et al.* NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects[J]. *Blood*, 2010, 115(21): 4293-4301.
- [25] Yang J, Gao L, Liu Y, *et al.* Adoptive therapy by transfusing expanded donor murine natural killer T cells can suppress acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Transfusion*, 2010, 50(2): 407-417.
- [26] Maes W, Deroose C, Reumers V, *et al.* In vivo bioluminescence imaging in an experimental mouse model for dendritic cell based immunotherapy against malignant glioma[J]. *J Neurooncol*, 2009, 91(2): 127-139.
- [27] 邓海峰, 陆明洋, 徐斌, 等. 自体 CIK 过继免疫治疗恶性肿瘤的输注时间[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(9): 674-677.
- [28] Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Johnston V, *et al.* Sensitivity of multidrug-resistant tumor cell lines to immunologic effector cells [J]. *Cell Immunol*, 1996, 169(1): 85-90.
- [29] Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, *et al.* Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer,

- colorectal cancer and lymphoma[J]. Br J Cancer, 1999, 81(6): 1009-1016.
- [30] Hui D, Qiang L, Jian W, *et al.* A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(1): 36-41.
- [31] Weng DS, Zhou J, Zhou QM, *et al.* Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[J]. J Immunother, 2008, 31(1): 63-71.
- [32] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, *et al.* Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 305-310.
- [33] Li X, Xu B, Wu J, *et al.* Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies[J]. Clin Transl Oncol, 2012, 14(5): 242-245.
- [34] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced NK-like T cells: from bench to bedside[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 435745.
- [35] Jager M, Schoberth A, Ruf P, *et al.* The trifunctional antibody er-tumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4270-4276.
- [36] Wang QJ, Wang H, Pan K, *et al.* Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(7): 641-648.
- [37] Weibel S, Raab V, Yu YA, *et al.* Viral-mediated oncolysis is the most critical factor in the late-phase of the tumor regression process upon vaccinia virus infection[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 68.
- [38] 陈俊俊, 蒋敬庭, 吴昌平. PD-L1 信号在免疫应答中的作用及对 T 细胞的调控机制[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(6): 450-452.
- [39] Jiang J, Zhu Y, Wu C, *et al.* Tumor expression of B7-H4 predicts poor survival of patients suffering from gastric cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(11): 1707-1714.
- [40] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. 协同刺激分子 B7-H4 影响细胞因子诱导的杀伤细胞治疗胃癌预后的多因素 COX 模型分析[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(5): 656-660.
- [41] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. 共刺激分子 B7-H4 表达对胃癌患者细胞因子诱导的杀伤细胞治疗预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(5): 366-370.
- [42] 蒋敬庭, 吴昌平, 沈月平, 等. B7-H4 表达对细胞因子激活的杀伤细胞治疗胃癌患者生存时间的影响[J]. 中华消化杂志, 2010, 30(4): 276-277.
- (收稿日期:2012-08-16)
- (本文编辑:许晓蒙,陈维忠)
-
- (上接第 836 页)
- or biometrics? [J]. Asian J Androl, 2010, 12(1):36-46.
- [8] Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A, *et al.* Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa[J]. Fertil Steril, 2008, 89(2):449-455.
- [9] Coetzee K, Kruger TF, Vandendael A, *et al.* Comparison of two staining and evaluation methods used for computerized human sperm morphology evaluations[J]. Andrologia, 1997, 29(3): 133-135.
- [10] Meschede D, Keck C, Zander M, *et al.* Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis[J]. Int J Androl, 1993, 16(6): 362-369.
- [11] Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis[J]. Fertil Steril, 1993, 59(2): 412-417.
- [12] Lacquet FA, Kruger TF, Du Toit TC, *et al.* Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology[J]. Arch Androl, 1996, 36(2): 133-138.
- [13] 陆金春, 黄宇烽, 张红焯. 现代男科实验室诊断[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2009: 36-42.
- [14] 刁英, 杨智敏, 谭兵兵, 等. Testsimplents 染色玻片法与改良巴氏染色法分析精子形态的比较[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 356-357.
- [15] Graves JE, Higdon HL 3rd, Boone WR, *et al.* Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory[J]. J Assist Reprod Genet, 2005, 22(5): 219-225.
- [16] 张欣宗, 姚康寿, 熊承良. 《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版与第 4 版精子形态评估标准的比较研究[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(11): 989-992.
- [17] 吴根凤, 朱卫中. 精子形态分类计数不同判断标准的结果差异[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(5): 395.
- [18] Carrell DT, Cartmill D, Jones KP, *et al.* Prospective, randomized, blinded evaluation of donor semen quality provided by seven commercial sperm banks[J]. Fertil Steril, 2002, 78(1): 16-21.
- [19] Eustache F, Auger J. Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods[J]. Hum Reprod, 2003, 18(5): 1018-1022.
- [20] Garrett C, Liu DY, Clarke GN, *et al.* Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples[J]. Hum Reprod, 2003, 18(8): 1643-1649.
- [21] 黄茜, 刘锋, 邹彦, 等. 计算机辅助分析与人工计数分析精子形态结果比较[J]. 山东医药, 2010, 50(15): 72-73.
- [22] Harr R. Characterization of spermatozoa by planar morphometry [J]. Clin Lab Sci, 1997, 10(4): 190-196.
- (收稿日期:2012-08-31)
- (本文编辑:许晓蒙,陈维忠)