

## CIK 细胞联合西妥昔单抗对结直肠癌细胞的杀伤效应\*

孔娟<sup>1</sup>, 龙世棋<sup>1</sup>, 王念雪<sup>1</sup>, 刘尧翠<sup>2</sup>, 王代琴<sup>2</sup>, 赵星<sup>1,3,\*</sup>

(1. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)联合西妥昔单抗对 KRAS 突变(DLD-1)及野生型(Caco-2)结直肠癌细胞的杀伤效应。方法: 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离正常外周血的单个核细胞(PBMC), 在体外经抗-CD3 单抗及多种细胞因子联合诱导生成 CIK 细胞; ELISA 实验检测 CIK 细胞培养前后上清中干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )及转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )的水平, 流式细胞检测 DLD-1 及 Caco-2 细胞表面表皮生长因子受体(EGFR)及 CIK 细胞表面分子的表达, 采用实时无标记细胞分析仪(RTCA)检查 CIK 细胞联合西妥昔单抗对 DLD-1 及 Caco-2 细胞的杀伤作用。结果: DLD-1 及 Caco-2 肿瘤细胞表面均高表达 EGFR, 培养前后 CIK 细胞亚群可见培养后 CD8<sup>+</sup>T、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT 及 CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞比例均较培养前显著增高; 与培养第一天比较, 培养至第 14 天, CIK 细胞培养基上清中细胞因子 IFN- $\gamma$  水平显著增高( $P < 0.01$ ), 而同时 TGF- $\beta$  的水平显著降低( $P < 0.01$ ); RTCA 检测发现 CIK 细胞联合西妥昔单抗对 DLD-1 及 Caco-2 杀伤作用明显高于单一的 CIK 细胞组。结论: CIK 联合西妥昔单抗对 EGFR 受体阳性的野生型结直肠癌细胞与突变型结直肠癌细胞均有杀伤效果。

**[关键词]** 结直肠癌; 西妥昔单抗; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 联合治疗

**[中图分类号]** R392.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)05-0503-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.05.002

## The Study of Cytotoxicity Effect of CIK Cells Combined with Cetuximab against Colorectal Tumor Cells

KONG Juan<sup>1</sup>, LONG Shiqi<sup>1</sup>, WANG Nianxue<sup>1</sup>, LIU Yaocui<sup>2</sup>, WANG Daiqin<sup>2</sup>, ZHAO Xing<sup>1,3</sup>  
(1. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Bioengineering Institute, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** In order to solve the existing problems for CIK cells and cetuximab in clinical application, this project explored the antitumor effect of CIK cells combined with cetuximab against KRAS-WT and KRAS-mutant colorectal tumor cells, we expect to provide a new strategy for colorectal tumor treatment. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were isolated by Ficoll density gradient centrifugation. CIK cells were generated from PBMCs with anti-CD3 antibody and several recombinant cytokines *in vitro*; IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  levels in supernatant were measured by ELISA; The expression of EGFR on tumor cells and the phenotype of CIK cells were analyzed by flow cytometry; RTCA was applied to analyze cytotoxicity of CIK cells combined with cetuximab against colorectal tumors cells. **Results:** EGFR were expressed on tumor cell lines; The percentage of CD8<sup>+</sup>T, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NK were significant increased after cultured for 14 days *in vitro*. The level of IFN- $\gamma$  increased and TGF- $\beta$  decreased in supernatant after cultured for

\*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360346); 贵州省应用基础研究计划重大专项资助(黔科合 J 重大字 2003); 贵州省科技厅社会发展攻关项目资助[黔科合 SY(2012)3094 号]; 贵州省科技厅贵阳医学院联合基金资助项目[黔科合 LG 字(2011)011 号]

\*\* 通信作者 E-mail: xingzhao@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2017-5-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170518.2227.031.html>

14 d. Compared with single CIK cells, the cytotoxicity of CIK cells combined with cetuximab against DLD-1 and Caco-2 cells increased. **Conclusion:** Equal efficacy of cytotoxicity against *KRAS*-WT and *KRAS*-mutant colorectal tumors cells were observed when CIK cells combined with cetuximab, it will lay the foundation for the next research work.

[**Key words**] colorectal cancer; cetuximab; cytokine-induced killer cell; combination therapy

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国恶性肿瘤发病率中位居第四。靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的单克隆抗体西妥昔单抗(cetuximab)是目前研究最为广泛的肿瘤靶向抗体治疗药物之一,2004 年被 FDA 批准用于转移性结直肠癌的治疗,虽有一定疗效,但单一的靶向治疗仍存在着局限性,部分使用西妥昔单抗治疗的患者在治疗一段时间后出现耐药,最终导致肿瘤的复发。目前发现 *KRAS* 突变会导致肿瘤细胞对西妥昔单抗的原发性耐药,使用西妥昔单抗的指征被严格限定在 *KRAS* 野生型的患者<sup>[1-2]</sup>。约有 35% ~ 40% 结直肠癌患者存在 *KRAS* 突变,这部分 *KRAS* 突变患者不能从单独西妥昔单抗治疗中获益<sup>[3-4]</sup>。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)是由外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)在体外经多种细胞因子及 CD3 单抗诱导培养的一群异质性细胞群,包括 CD8<sup>+</sup>T、NK 和 NKT 细胞等<sup>[5-7]</sup>。CIK 作为抗肿瘤过继细胞免疫治疗的方案之一已在临床肿瘤治疗中被广泛应用,有研究报告 CIK 在结直肠癌治疗中的临床疗效及安全性,但 CIK 细胞不能长久地对肿瘤细胞进行抑制而疗效有限<sup>[5,8-9]</sup>,CIK 细胞与其他抗肿瘤治疗手段联合使用来促进抗肿瘤效应被越来越多的学者所关注<sup>[10-13]</sup>。本课题组前期的研究中发现,NK 细胞在联合西妥昔单抗后可通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒(antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)作用对 *KRAS* 突变及野生型结直肠癌细胞发挥相同的杀伤效应<sup>[14-16]</sup>。本研究通过观察 CIK 细胞联合西妥昔单抗后对 *KRAS* 突变及野生型结直肠癌细胞株的杀伤效应,探讨 CIK 细胞联合靶向治疗抗体在结直肠癌治疗中的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及抗体

人结肠癌细胞 DLD-1 (colorectal adenocarcinoma cell line, *KRAS* mutant G13D) 及 Caco-2 (colorec-

tal adenocarcinoma cells line, *KRAS* WT) 细胞株均购自中国典型培养物保藏中心,由本实验室传代后液氮保存。用于细胞培养的 RPMI-1640 培养基购自 Hyclone,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素及 Trypsin-EDTA (0.05%) 均购自 Gibco 公司。西妥昔单抗(cetuximab, 鼠/人嵌合抗 EGFR 抗体, IgG1) 购于百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb)公司。

### 1.2 方法

**1.2.1** CIK 细胞的体外扩增及鉴定 肝素抗凝管收集健康志愿者外周静脉血 30 mL, Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。将分离的 PBMC 接种于 T25 细胞培养瓶内,用 GT-T551 无血清培养基(Takara 公司)调整细胞密度为  $1 \times 10^9$  个/L。细胞培养瓶置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养,第 1 天加入 1 000 000 IU/L IFN- $\gamma$  (PeproTech 公司)及 1% 的自体血浆,24 h 后加入 300 000 U/L 白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2, 北京四环生物公司)和 50  $\mu$ g/L 抗 CD3 单克隆抗体(R&D 公司)继续培养,每隔 3 ~ 4 d 补充新鲜培养基,调整细胞密度为  $1 \times 10^9$  个/L,同时补加 300 000 U/L IL-2,第 14 ~ 16 天时开始收集细胞。

**1.2.2** CIK 细胞表型和 DLD-1、Caco-2 细胞膜表面分子检测 通过流式细胞检测,按照  $1 \times 10^6$  个/样本将 CIK、DLD-1 及 Caco-2 细胞加入流式管中,洗细胞 2 次,震荡混匀后加入 Fc 封闭抗体 anti-CD16/CD32 封闭作用 30 min。分别加入流式抗体 FITC-鼠抗人 EGFR 单抗(ebioscience)、FITC-鼠抗人 CD3 单抗(BD)、PE-鼠抗人 CD56 单抗(BD)、APC-鼠抗人 CD8 单抗、APC-鼠抗人 CD16 单抗或同型对照抗体,混匀后 4 ℃ 避光结合 30 min,洗细胞 2 次去除未结合的抗体, PBS 重悬细胞。Beckman FC500 型流式细胞仪检测, Flowjo 10.0 软件分析实验结果,满足 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>  $\geq 20\%$ , CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  $\geq 60\%$  的 CIK 细胞用于后续实验。

**1.2.3** 培养液上清中的细胞因子水平检测 通过 ELISA 法,分别收集培养第 1 天及第 14 天的 CIK

细胞培养上清液,分装后-80℃保存备用。细胞因子检测:IFN- $\gamma$ 及TGF- $\beta$ 测定均采用双抗体夹心ELISA法,按试剂盒说明书操作;以标准品450nm处的吸光度(OD)值做标准曲线,计算待测样品中细胞因子的含量,每份样本设3个复孔。

**1.2.4 CIK 细胞联合西妥昔单抗对人结直肠癌细胞的杀伤作用** 通过实时无标记细胞分析仪(real time cellular analysis, RTCA, 美国 ACEA 公司)检测,向 RTCA 检测板的检测孔分别加入 100  $\mu$ L 完全培养液,放入 RTCA 中读取背景数据。取出 RTCA 检测板接种预先制备的细胞悬液,DLD-1 及 Caco-2 细胞分别以  $2 \times 10^4$  及  $1.5 \times 10^4$  个/孔接种,设肿瘤细胞单独组、CIK-肿瘤细胞组及 CIK 联合西妥昔单抗-肿瘤细胞组,每组细胞设置 3 个复孔,将 RTCA 检测板再次放回 RTCA,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后加入西妥昔单抗(1 mg/L) 50  $\mu$ L,其余孔补加 50  $\mu$ L 完全培养基。抗体孵育 1 h 后按照 20:1 效靶比加入 CIK 细胞 50  $\mu$ L。将 RTCA 检测板再次放回 RTCA 仪,设置每隔 15 min 监测并记录细胞指数(cell index, CI)值,连续监测 45 h,选择实验第 45 h 数据计算杀伤率。按照下列公式计算:

细胞杀伤率%=(对照组 CI 值-实验组 CI 值)/对照组 CI 值 $\times$ 100%。

1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 软件来进行数据统计学处理,数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,符合正态分布的计量资料比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caco-2 及 DLD-1 细胞表面的 EGFR 表达

本实验中所使用的 Caco-2 及 DLD-1 细胞表面 EGFR 均高表达,分别为 81.6% 及 82.9%。见图 1。

2.2 CIK 细胞亚群

倒置显微镜下观察 CIK 细胞生长情况,诱导前细胞体积较小,呈圆形散在分布,在诱导培养过程中细胞体积逐渐增大,培养第 5 天细胞开始形成细胞集落,随着培养时间延长而集落增多,培养至第 14 天时细胞体积明显增大,CIK 细胞于培养基中悬浮成团分布,数量显著增多。见图 2。与培养前比较,CIK 细胞经过 14 d 的体外活化扩增后 CIK 细胞亚群中 CD8<sup>+</sup>T、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT 及 CD16<sup>+</sup>

CD56<sup>+</sup>NK 细胞比例均显著增高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。见表 1。

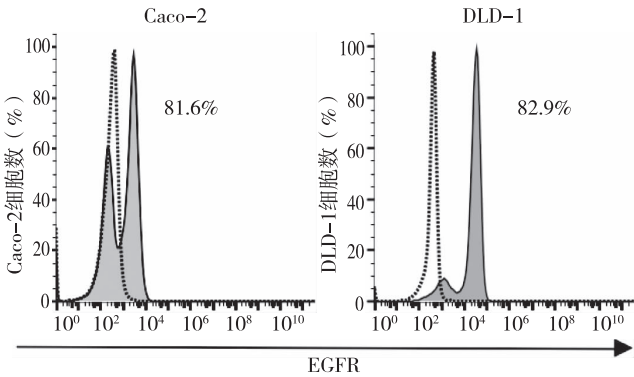


图 1 流式细胞术检测 DLD-1 及 Caco-2 细胞株上 EGFR 的表达

Fig. 1 The expression of EGFR on DLD-1 and Caco-2 cell lines detected by flow cytometry

表 1 流式细胞仪检测培养前后 CIK 细胞亚群( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 CIK cell subsets detected by flow cytometry before and after culture

指标	培养前	培养后
CD8 <sup>+</sup> T	26.7 $\pm$ 9.5	67.5 $\pm$ 16.5 <sup>(1)</sup>
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> NK	3.1 $\pm$ 1.8	7.0 $\pm$ 6.6 <sup>(2)</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> NKT	2.6 $\pm$ 2.7	20.1 $\pm$ 13.7 <sup>(1)</sup>

与培养前比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.05$

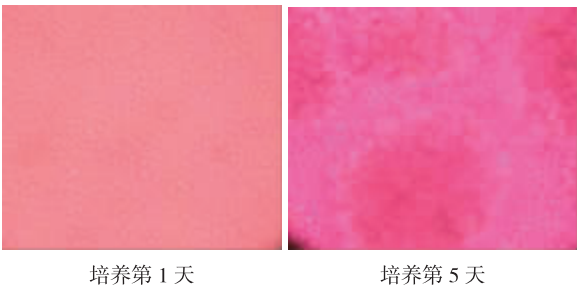


图 2 培养第 1、5 天 CIK 细胞( $\times 100$ )

Fig. 2 CIK cells under inverted microscope

2.3 CIK 细胞培养基上清液中的 IFN- $\gamma$  及 TGF- $\beta$  水平

ELISA 结果显示,与培养第 1 天比较,CIK 细胞培养第 14 天时,培养基的上清液中 IFN- $\gamma$  水平由 (34.8 $\pm$ 35.4) ng/L 增高为 (2 041.8 $\pm$ 697.9) ng/L ( $P < 0.01$ ),而 TGF- $\beta$  的水平由 (1 293.8 $\pm$ 633.9) ng/L 下降为 (116.7 $\pm$ 26.8) ng/L ( $P < 0.01$ )。见图 3。

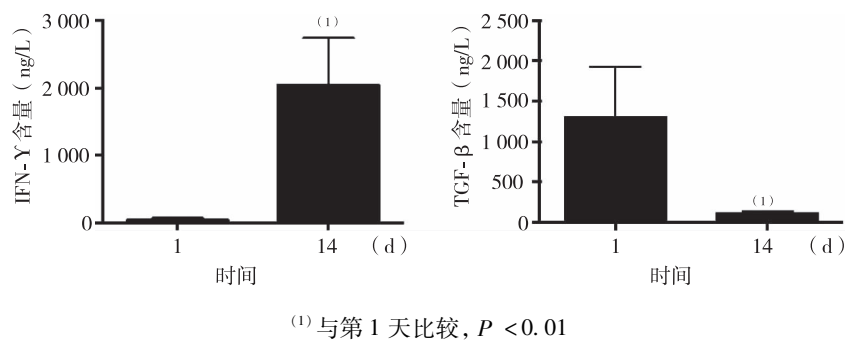


图 3 CIK 细胞培养第 1 及第 14 天细胞培养上清中 IFN- $\gamma$  及 TGF- $\beta$  水平  
Fig. 3 IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  levels in supernatant after CIK cell cultured for 1 and 14 days

2.4 CIK 细胞联合西妥昔单抗对 DLD-1 及 Caco-2 细胞的杀伤作用

将经过 14 d 体外扩增培养的 CIK 细胞作为效应细胞,结合有抗 EGFR 单抗西妥昔单抗的肿瘤细胞作为靶细胞,按照 20:1 的效靶比将效应细胞与靶细胞共培养,RTCA 法检测 CIK 细胞对肿瘤细胞

的杀伤效应。图 4 中显示 CIK 细胞对 DLD-1 及 Caco-2 细胞株的杀伤率分别为  $16.04\% \pm 0.87\%$  及  $27.67\% \pm 3.10\%$ ,而当联合使用 1 mg/L 抗 EGFR 西妥昔单抗后杀伤率分别增高到  $31.56\% \pm 3.55\%$  及  $35.96\% \pm 1.73\%$ 。

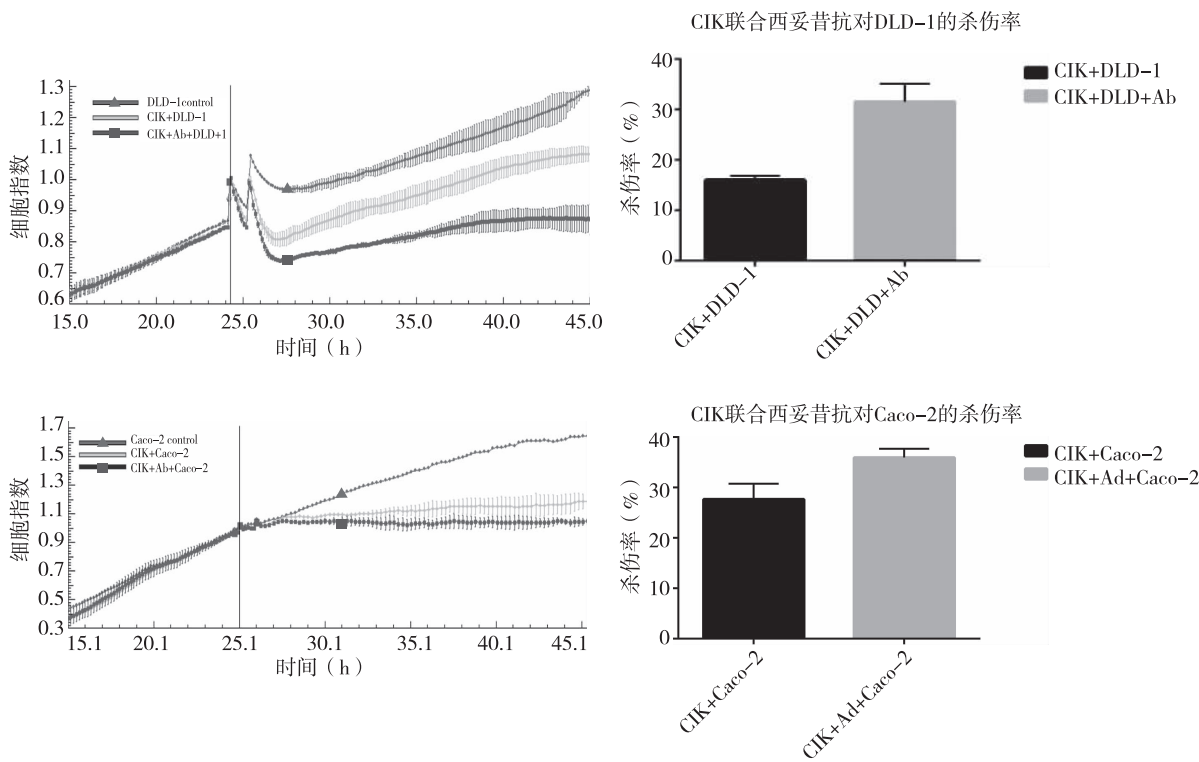


图 4 RTCA 检测 CIK 联合西妥昔单抗对 DLD-1 及 Caco-2 肿瘤细胞株的杀伤作用  
Fig. 4 Cytotoxicity of CIK cells combined with cetuximab against DLD-1 and Caco-2 tumor cells measured by RTCA

3 讨论

CIK 细胞主要由其中的 CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NKT 细胞通过非 MHC 限制性的细胞毒作用来杀伤肿瘤

细胞,此外,在本研究中还检测到在培养 14 d 时 CIK 细胞培养上清中 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平增高近 60 倍,而可抑制抗肿瘤免疫应答的 TGF- $\beta$  水平降低了近 10 倍,因而 CIK 细胞还可通过释放的细胞因子改善肿瘤微环境促进 Th1 型免疫应答

而增强机体抗肿瘤效应<sup>[17]</sup>。本研究使用的 CIK 细胞对 DLD-1 及 Caco-2 结直肠癌细胞株均可发挥杀伤效应,而在联合西妥昔单抗后杀伤效应进一步增强,对 KRAS 突变型 DLD-1 及 KRAS 野生型 Caco-2 肿瘤细胞均可发挥增强的杀伤效应。由西妥昔单抗介导的 ADCC 作用是通过 NK 细胞表面的 CD16 识别结合于肿瘤细胞上的抗体 Fc 段,NK 细胞活化而杀伤肿瘤细胞。有研究发现,CIK 细胞联合抗 CD20 单抗后所增强的细胞毒效应与 CIK 细胞中含有的 NK 细胞有关,由于 CIK 细胞并不高表达所有的 Fc $\gamma$ R III (CD16、CD32 及 CD64),且在 CIK 细胞中去除 NK 细胞后显著降低了联合抗体后所增强的细胞毒性,因而推测 CIK 细胞对肿瘤细胞所发挥的细胞毒作用主要是由 CIK 细胞中的 NKT 细胞发挥,而在联合抗体后所增强的细胞毒作用是由 CIK 细胞中的 NK 细胞所发挥<sup>[18]</sup>,该结论与本研究中的发现一致,通过 14 d 的体外诱导培养,本课题中所使用的 CIK 细胞中的 NK 细胞数量较培养前有所增高 ( $7.0\% \pm 6.6\%$ ),因而也推测在本研究中联合西妥昔单抗后所增强的细胞毒作用是由 CIK 中部分 NK 细胞所发挥的 ADCC 效应。

CIK 细胞有着体外扩增能力强、安全性高、具有广谱的肿瘤杀伤能力及肿瘤趋化性等优势。而西妥昔单抗不仅可直接抑制肿瘤生长,还可活化 NK 细胞通过 ADCC 效应而杀伤肿瘤细胞<sup>[3,19-20]</sup>。因而,将 CIK 细胞与西妥昔单抗联合用于结直肠癌的治疗具有以下优势,首先,体外活化扩增的 CIK 细胞将为结直肠癌的治疗提供大量的效应细胞而发挥抗肿瘤效应,在联合西妥昔单抗后 CIK 细胞中的部分 NK 细胞与西妥昔单抗的 Fc 段结合将进一步通过 ADCC 效应来促进抗肿瘤作用;其次,由于 KRAS 突变不改变 EGFR 胞外段构象,西妥昔单抗仍能与 EGFR 结合,因而 CIK 细胞联合西妥昔单抗可对 KRAS 突变及野生型结直肠癌细胞均发挥杀伤效应,从而扩大了西妥昔单抗的应用适应症。据此,CIK 细胞与西妥昔单抗的联合应用有可能成为一种新型有效的抗肿瘤治疗方案用于临床应用。虽然该联合策略在体外实验中效果显著,但由于体内抗肿瘤的作用机制复杂,任何一种抗肿瘤治疗手段在体内都可能会出现比体外实验中更为复杂甚至相去甚远的效应,因而,进行深入的体内实验研究以及制定合理的联合治疗方案将是研究联合抗肿瘤治疗策略的关键。

## 4 参考文献

- [1] Dunn EF, Iida M, Myers RA, et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab[J]. *Oncogene*, 2011(5):561-574.
- [2] Nakadate Y, Kodera Y, Kitamura Y, et al. KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells[J]. *International journal of cancer*, 2014(9):2146-2155.
- [3] Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, et al. Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer[J]. *Oncology reports*, 2014(5):2115-2122.
- [4] Kohrt HE, Colevas AD, Houot R, et al. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2014(6):2668-2682.
- [5] Jäkel CE, Vogt A, Gonzalez-Carmona MA, et al. Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of gastrointestinal tumors[J]. *Journal of immunology research*, 2014(2014):897214-897226.
- [6] Liu L, Zhang W, Qi X, et al. Randomized study of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2012(6):1751-1759.
- [7] 童刚领, 农巧红, 秦洁, 等. 自体 CIK 细胞治疗对恶性肿瘤患者免疫功能和生活质量的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015(4):504-508.
- [8] Zhang Q, Liu X, Zhang T, et al. The dual-functional capability of cytokine-induced killer cells and application in tumor immunology[J]. *Human immunology*, 2015(5):385-391.
- [9] 郑劼, 江龙委, 姚露, 等. DC-CIK 细胞治疗晚期结直肠癌的临床疗效[J]. *中国肿瘤生物治疗志*, 2015(4):459-464.
- [10] Li J, Gu M, Pan K, et al. Autologous cytokine-induced killer cell transfusion in combination with gemcitabine plus cisplatin regimen chemotherapy for metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. *Journal of immunotherapy*, 2012(2):189-195.
- [11] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. *Science*, 2006(5768):1780-1784.
- [12] Zhao X, Chester C, Rajasekaran N, et al. Strategic combinations; the future of oncolytic virotherapy with reovirus[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2016(5):767-773.

(下转第 522 页)

- [11] Okubo H, Miyake Y, Tanaka K, et al. Maternal total caffeine intake, mainly from Japanese and Chinese tea, during pregnancy was associated with risk of preterm birth; the Osaka Maternal and Child Health Study [J]. Nutrition Research, 2015(4):309-316.
- [12] Armstrong E, Harris LH, Kukla R, et al. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2008(5):e13.
- [13] Chen LW. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of pregnancy loss: a categorical and dose-response meta-analysis of prospective studies[J]. Public Health Nutrition, 2016(7):1233.
- [14] Li DK, Ferber JR, Odouli R. Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of obesity in offspring: a prospective cohort study[J]. International Journal of Obesity, 2015(4):658.
- [15] Sata F, Yamada H, Suzuki K, et al. Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss[J]. Molecular Human Reproduction, 2005(5):357-360.
- [16] 苏兴文, 皮荣标, 林穗珍, 等. 咖啡因对谷氨酸诱导神经元凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报, 1999(6):509-512.
- [17] 郑祚康. 咖啡因通过促进肌肉中 PGC-1 $\alpha$  的表达缓解抑郁症的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2016.
- [18] 王晨. DRP1-Ser637 去磷酸化促进多巴胺能神经元细胞线粒体自噬在咖啡因抗帕金森病中的作用研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [19] 万红平, 潘磊, Sue McPherson. 咖啡因对大鼠及家兔致畸敏感期发育毒性试验[C]// 中国毒理学会湖北科技论坛, 2015.
- [20] Pan X, Liu D, Wei M, et al. Influences of Caffeine Exposure on Embryonic Development in Mice[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2008(2):165-168.
- [21] Brent RL, Christian MS, Darkener RM. Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2011(2):152-187.
- [22] 郭彦君. 咖啡因暴露对胎儿生长发育的影响[J]. 中外医学研究, 2012(36):151-154.  
(2017-02-14 收稿, 2017-04-18 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅

(上接第 507 页)

- [13] 朱卫, 李佳丽, 张利红, 等. 自体免疫细胞治疗联合化疗治疗大肠癌的临床研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2016(2):116-119.
- [14] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Reovirus activated NK cells show enhanced cetuximab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against colorectal cancer cells[J]. Journal for immunotherapy of cancer, 2015(2):1-12.
- [15] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Natural killer cells activated by oncolytic reovirus enhance cetuximab mediated antibody dependent cellular cytotoxicity in an in vitro and in vivo model of colorectal cancer[J]. Blood, 2015(23):3439.
- [16] Zhao X, Rajasekaran N, Chester C, et al. Abstract B082: Reovirus treated NK cells exhibit enhanced cetuximab mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against colorectal cancer cell lines[J]. Cancer Immunology Research, 2016(1):B082-B082.
- [17] 庞翠, 王金燕, 胡志昊, 等. 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肠直肠癌细胞的杀伤作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016(6):751-758.
- [18] Pievani A, Belussi C, Klein C, et al. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies[J]. Blood, 2011(2):510-518.
- [19] Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, et al. Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2014(5):2115-2122.
- [20] Yang X, Zhang X, Mortenson ED, et al. Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses[J]. Mol Ther, 2013(1):91-100.  
(2017-03-20 收稿, 2017-05-07 修回)  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周凌