

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.003

· 基础研究 ·

## 化疗诱导损伤相关分子模式强化 CIK 对肺癌 A549 细胞的抑制作用

王晓栋<sup>1</sup>, 胡志昊<sup>1</sup>, 张淮<sup>2</sup>, 庞翠<sup>2</sup>, 段琼<sup>2</sup>, 王金燕<sup>1</sup>, 刘文超<sup>2</sup>, 张菊<sup>1</sup> (1. 空军军医大学药理学系 药物基因组学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 空军军医大学第一附属医院暨西京医院, 陕西 西安 710032)

**[摘要]** **目的:** 探讨化疗诱导损伤相关分子模式(damaged associated molecular patterns, DAMP)对 CIK 细胞抑制 RAS 突变 A549 肺腺癌细胞的影响及其机制。**方法:** 体外分离人外周血单个核细胞且培养 CIK 细胞, 以顺铂(cisplatin, DDP)和多柔比星(doxorubicin, ADM)单独或联合作用于 A549 细胞, 镜下观察 A549 细胞的形态, 将药物后的 A549 细胞上清加入 CIK 细胞共培养, 流式细胞术检测共培养后 CIK 细胞免疫表型, MTT 实验检测 A549 细胞上清诱导 CIK 细胞对 A549 肺腺癌细胞增殖的抑制, ELISA 实验检测多种浓度化疗药物杀伤 A549 细胞上清中 CRT、ATP、HMGB1 含量。**结果:** 低质量浓度化疗药杀伤 A549 细胞后呈现较多的免疫原性死亡特征。杀伤后 A549 细胞上清加入 CIK 细胞共培养使 CIK 细胞 CD8<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup> 的比例较对照 CIK 细胞明显升高(均  $P < 0.05$ )。A549 细胞损伤后上清诱导 CIK 细胞对 A549 肺腺癌细胞增殖抑制率明显高于同质量浓度化疗药组 [DDP 组 (31.34±1.51)% vs (5.97±1.74)%, ADM 组 (45.46±1.78)% vs (6.22±1.34)%, DDP+ADM 组 (45.78±1.14)% vs (11.94±3.11)%, 均  $P < 0.05$ ], 并且低质量浓度化疗药物杀伤 A549 细胞上清诱导的 CIK 对 A549 细胞的抑制率高于较高浓度化疗药物杀伤后细胞上清诱导的 CIK (均  $P < 0.05$ )。低质量浓度化疗药物杀伤 A549 细胞上清中免疫原性死亡相关分子 CRT、ATP、HMGB1 含量增加得最多(均  $P < 0.05$ )。低质量浓度组该上清诱导的 CI 对 A549 肺腺癌细胞的增殖抑制率随着 CRT、ATP、HMGB1 水平的增高而增加。**结论:** 较低质量浓度的 DDP 和 ADM 单独或联合用药更易引起 A549 细胞免疫原性死亡并释放较高水平的 DAMP 分子, 能更强的促进 CIK 对肺癌 A549 细胞的抑制作用。

**[关键词]** 肺癌; CIK; RAS 突变; 化疗; 免疫原性死亡; 损伤相关分子模式

**[中图分类号]** R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)07-0674-06

## Inhibitory effects of CIK on lung cancer A549 cells intensified by chemotherapy-induced damaged associated molecular pattern

WANG Xiaodong<sup>1</sup>, HU Zhihao<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, PANG Cui<sup>2</sup>, DUAN Qiong<sup>2</sup>, WANG Jinyan<sup>1</sup>, LIU Wenchao<sup>2</sup>, ZHANG Ju<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacogenomics, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. The Air Force Military Medical University First Affiliated Hospital And Xijing Hospital, Xi 'an 710032, Shaanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of DAMP (damaged associated molecular pattern) on the inhibition of RAS-mutant A549 lung adenocarcinoma cells by CIK cells and its mechanism. **Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells were isolated in vitro and CIK cells were cultured. A549 cells were treated with cisplatin (DDP) and doxorubicin (ADM) alone or in combination, and the morphology of A549 cells was observed under a microscope. The supernatant of A549 cells was co-cultured with CIK cells. Flow cytometry was used to detect the CIK cell immunophenotype after co-culture. MTT assay was used to detect the inhibition of A549 lung cancer cell proliferation induced by A549 cell supernatant. The concentration of chemotherapeutic drugs kills A549 cell supernatant CRT, ATP, HMGB1 content. **Results:** Low-level chemotherapeutic drugs showed more immunogenic death characteristics after killing A549 cells. The ratio of CD8<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> in CIK cells was significantly higher than that in control CIK cells ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of CIK cells induced by A549 cells after injury on A549 lung adenocarcinoma cells was significantly higher than that of the same dose chemotherapy group [DDP group (31.34±1.51)% vs (5.97±1.74)%, ADM group (45.46±1.78)% vs (6.22±1.34)%, DDP+ADM group (45.78±1.14)% vs (11.94±3.11)%, all  $P < 0.05$ ], and low-mass chemotherapeutic agents killed C549 induced by A549 cell supernatant on A549 The inhibition rate of the cells was higher than that of the supernatant induced by the higher concentration of che-

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

**[作者简介]** 王晓栋(1978-),男,硕士生,主治医师,主要从事胸外科肿瘤的基础及临床研究,E-mail:2671074974@qq.com

**[通信作者]** 张菊(ZHANG Ju, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤的基础与临床研究,E-mail: jianzhong@fmmu.edu.cn; 刘文超(LIU Wenchao, co-corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤的临床与基础研究,E-mail: liuch@fmmu.edu.cn

motherapeutic drugs (all  $P < 0.05$ ). The level of CRT, ATP, and HMGB1 in immunogenicity-related molecules in the supernatant of A549 cells was significantly increased by low-concentration chemotherapy drugs (all  $P < 0.05$ ). In the low-concentration group, the supernatant-induced inhibition of the proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells increased with the increase of CRT, ATP, and HMGB1 levels. **Conclusion:** The combination of lower concentration of DDP and ADM alone or in combination could more easily induce the immunogenic death of A549 cells and release higher levels of DAMP molecules, which could promote the inhibitory effect of CIK on lung cancer A549 cells.

**[Key words]** lung cancer; CIK; RAS mutation; chemotherapy; immunogenicity of death, damaged associated molecular patterns(DAMP)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 674-679. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.003]

肿瘤微环境存在免疫抑制致肿瘤细胞免疫逃逸,肿瘤化疗非特异损伤免疫细胞也致机体免疫抑制而肿瘤细胞免疫逃逸。但在某些抗癌化疗中,肿瘤细胞会进入一种特殊的细胞死亡形式——免疫原性死亡(immunogenic cell death, ICD),这种即将死亡的瘤细胞膜表面可释放一系列介质,被Toll样受体(toll-like receptor, TLR)和Nod样受体(Nod-like receptor, NLR)识别,诱导机体固有和特异免疫应答的发生,这一系列介质被称为损伤相关分子模式(damaged associated molecular patterns, DAMP),主要包括死亡早期CRT、HSPs分子暴露及死亡晚期ATP和HMGB1分子释放<sup>[1-2]</sup>。因此,DAMP有可能是有效联合肿瘤化疗和免疫治疗的关键中间分子。

肺癌是我国常见恶性肿瘤,目前主要采取手术、放化疗和靶向治疗,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号通路的靶向治疗药酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)易瑞沙、厄洛替尼等是肺癌个体化治疗的重大突破,但EGFR激酶外显子野生型及K-RAS突变患者对EGFR-TKI类药物耐药,总生存期也显著缩短<sup>[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>,细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer, CIK)越来越多地与化疗联合应用于抗肿瘤免疫治疗,CIK细胞对癌细胞有杀伤性,参与体内微小残余瘤灶免疫去除,但目前临床疗效尚不满意,可能与体内免疫抑制微环境及化疗损伤免疫细胞等机制有关<sup>[6]</sup>。本实验在体外模拟化疗作用,用顺铂(cisplatin, DDP)和多柔比星(doxorubicin, ADM)单药或联合用药杀伤A549细胞,同时,所得上清诱导共培养CIK细胞以模拟体内化疗损伤微环境对免疫细胞的作用,探讨化疗药杀伤A549肿瘤细胞对环境中免疫细胞的影响,并初步探讨其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

对靶向药物易瑞沙耐药的RAS突变人肺癌细胞株A549购自中国科学院上海生命科学院细胞库。 $\gamma$ -

干扰素、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、CD3单克隆抗体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子均购自美国Peprotech公司。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的CD3、CD16单克隆抗体(FITC-CD3、FITC-CD16)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的CD8、CD56单克隆抗体(PE-CD8、PE-CD56)、1640培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司,DAMP分子ELISA检测试剂盒购自北京绿源伯德生物技术有限公司,噻唑蓝(MTT)试剂购自美国Sigma公司。流式细胞仪型号Beckman fc500。

### 1.2 流式细胞术检测免疫原性死亡细胞上清诱导的CIK细胞免疫表型

参照文献[7-8]方法培养效应细胞CIK细胞。采用淋巴细胞分离液分离健康供者外周血单个核细胞,洗涤2遍,用培养液培养,加入灭活的自体血清、 $\gamma$ -干扰素,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后,加IL-2、CD3MAb,以后每2~3 d适量添加含IL-2、自体血清的新鲜培养基扩增培养CIK细胞。

常规培养靶细胞A549细胞,待细胞长至瓶底的80%,给予消化、悬浮、计数,向24孔板每孔加入细胞 $1 \times 10^5$ 个,待贴壁生长至瓶底的80%,给予DDP( $1 \mu\text{g/ml}$ )、ADM( $0.25 \mu\text{g/ml}$ )、联合用药(DDP  $1 \mu\text{g/ml}$  + ADM  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ),杀伤A549细胞48 h后,镜下观察形态,可见免疫原性死亡的细胞形态改变:细胞核浓缩,细胞质内见空泡。收集上清,加入24孔板内。

将成熟的CIK细胞约 $2 \times 10^6$ 个加入含上清的24孔板内,同等质量浓度的化疗药及同样数量的CIK细胞加入24孔板内作为对照。12 h后取出所有CIK细胞,洗涤,分别取100  $\mu\text{l}$ 细胞悬液( $1 \times 10^6$ 个细胞)加入2支流式管内。第一支管加入20  $\mu\text{l}$  FITC-CD3单抗、20  $\mu\text{l}$  PE-CD56单抗,用流式细胞仪分析CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>阳性细胞百分率;另一管内加入20  $\mu\text{l}$  FITC-CD16单抗、20  $\mu\text{l}$  PE-CD8单抗,流式细胞仪分析CD16<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>阳性细胞百分率。实验重复3次。

### 1.3 MTT实验检测免疫原性死亡细胞上清诱导CIK对A549细胞增殖的影响

实验设DDP上清组、ADM上清组、联合用药上

清组,以 DDP 组、ADM、联合用药组分别作为对照,并设 DDP、ADM、联合用药的低浓度组、标准浓度组、高浓度组,每组设 3 个复孔(表 1、2)。常规培养 A549 细胞,待细胞长至瓶底 80%,给予消化、悬浮、计数,向 96 孔板里每孔加入细胞  $1 \times 10^4$  个,待贴壁生长至瓶底 80%,给予 DDP( $1 \mu\text{g/ml}$ )、ADM( $0.25 \mu\text{g/ml}$ )、联合用药(DDP  $1 \mu\text{g/ml}$ 、ADM  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ),杀伤 A549 细胞 48 h 后,镜下观察形态,收集上清,加入 96 孔板内,将成熟的 CIK 细胞约  $5 \times 10^4$  个加入每孔,同浓度的化疗药中加入同样的 CIK 细胞作为对照,12 h 后吸出所有 CIK 细胞洗涤。将对数生长期 A549 细胞  $1 \times 10^4$  个,加入 96 孔板,培养 6 h 贴壁,将诱导后的 CIK 细胞加入进行抑制杀伤实验,8 h 后结束抑制杀伤,在倒置光学显微镜下观察效应细胞和靶细胞形态及抑制杀伤情况,MTT 法检测效应细胞对靶细胞抑制率,酶标仪上读取波长 570 nm 处光密度( $D$ )值,计算各实验组和对照组的平均  $D$  值和抑制率。抑制率( $\%$ )=(空白组  $D$  值-处理组  $D$  值)/空白组  $D$  值 $\times 100\%$ 。

表 1 免疫原性死亡的 A549 细胞上清诱导 CIK 对 A549 细胞抑制的分组 [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Tab.1 The inhibition on A549 cells of CIK induced by ICD supernatants [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	DDP	ADM	Combination
Chemotherapy	1	0.25	1+0.25
Supernatant	1	0.25	1+0.25

表 2 不同质量浓度化疗药致免疫原性死亡 A549 细胞上清诱导 CIK 对 A549 细胞抑制的分组 [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Tab.2 The inhibition on A549 cells of CIK induced by different concentrations of chemotherapeutic drugs induce ICD A549 cells supernatants [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	DDP	ADM	Combination
Low dose	0.5	0.12	0.5+0.12
Standard dose	1	0.25	1.0+0.25
High dose	2	0.5	2.0+0.5

#### 1.4 ELISA 法检测化疗药致免疫原性死亡 A549 细胞上清中的 DAMP 分子

常规培养 A549 细胞,待细胞生长至瓶底 80%,给予消化、悬浮、计数,向 24 孔板每孔加入细胞  $1 \times 10^5$  个,待贴壁生长至瓶底 80%,给予 DDP( $0.5$ 、 $1$ 、 $2 \mu\text{g/ml}$ )、ADM( $0.12$ 、 $0.25$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ )、联合用药(DDP  $0.5 \mu\text{g/ml}$ +ADM  $0.12 \mu\text{g/ml}$ 、DDP  $1 \mu\text{g/ml}$ +ADM  $0.25 \mu\text{g/ml}$ 、DDP  $2 \mu\text{g/ml}$ +ADM  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ),杀伤 A549 细胞 48 h 后,收集上清,860 $\times$ g,离心 20 min,上清为待测样

品。按照 CRT-ELISA、HMGB1-ELISA、ATP-ELISA 试剂盒说明书操作,将标准品稀释为要求的倍数,设标准孔 8 孔建立标准曲线,待测样品加入检测孔,将反应板置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 min。洗板用洗涤液将反应板充分洗涤 5 次,滤纸上印干,每孔加  $50 \mu\text{l}$  酶标试剂,将反应板充分混匀后置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 min。用洗涤液将反应板充分洗涤 5 次,滤纸上印干。每孔加  $50 \mu\text{l}$  A 显色剂、 $50 \mu\text{l}$  B 显色剂,将反应板置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 min,注意避光。每孔加入  $50 \mu\text{l}$  终止液混匀,15 min 内用 ELX-800 酶标仪检测波长 450 nm 处光密度( $D$ )值。将各孔读数减去空白孔( $0 \text{ ng/L}$ )读数。使用 curve expert 软件绘制标准曲线,标准品浓度为纵坐标, $D$  值为横坐标,求回归方程,将样本  $D$  值带入方程计算出各样品的浓度。

表 3 ELISA 法检测化疗药致免疫原性死亡 A549 细胞上清 DAMP 分子的分组 [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Tab.3 ELISA assay to detect chemotherapeutic drugs induce ICD A549 cells supernatants DAMP molecular [ $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ ]

Group	DDP	ADM	Combination
Low dose	0.5	0.12	0.5+0.12
Standard dose	1.0	0.25	1.0+0.25
High dose	2.0	0.5	2.0+0.5

#### 1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。实验均重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 化疗药致 A549 细胞发生免疫原性死亡的形态改变

镜下观察形态(图 1),可见化疗药杀伤后免疫原性死亡细胞的形态改变:细胞核浓缩,细胞质内见大量空泡。

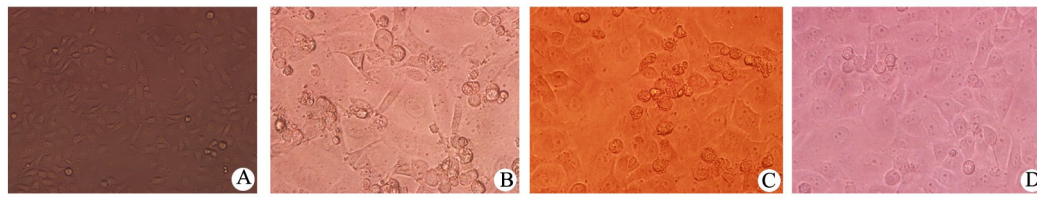
### 2.2 免疫原性死亡的 A549 细胞上清诱导 CIK 的免疫表型

流式细胞术结果(图 2、3)显示,与对照组相比,化疗杀伤 A549 细胞上清诱导的 CIK 细胞免疫  $\text{CD}8^+$  与  $\text{CD}56^+$  表型的改变差异显著(均  $P < 0.05$ )。CD3 和 CD16 表型变化无明显差异(均  $P > 0.05$ )。

### 2.3 免疫原性死亡细胞上清诱导 CIK 对 A549 细胞增殖的抑制

MTT 实验结果(图 4、5)显示,化疗药杀伤 A549 细胞上清诱导的 CIK 对 A549 细胞增殖的抑制率明显增高(均  $P < 0.05$ )。不同质量浓度化疗药单独或联合

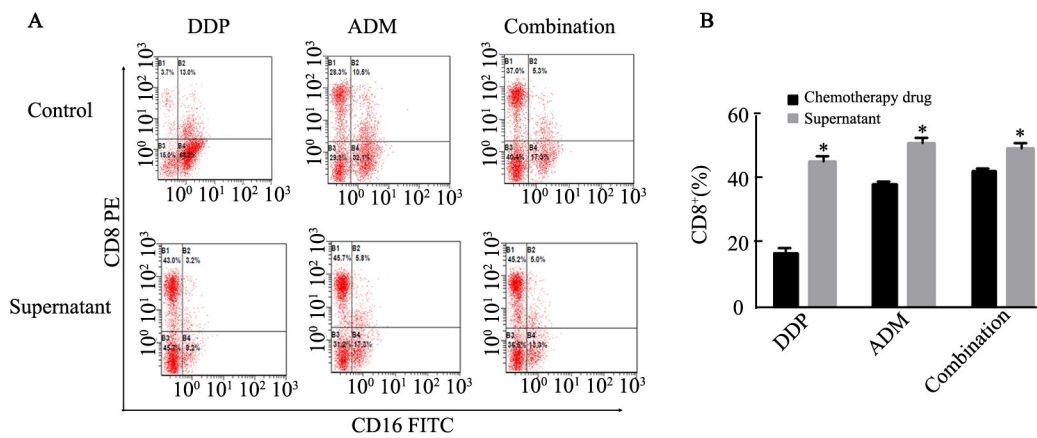
杀伤A549细胞上清诱导CIK对A549细胞增殖的抑制率不同,抑制率随药物质量浓度的降低而升高(均  $P < 0.05$ )。



A: Ctrl; B: DDP; C: ADM; D: Combination

图1 DDP和ADM单独及联合用药杀伤A549细胞48 h后形态改变( $\times 200$ )

Fig. 1 Morphological changes of A549 cells killed 48 hours after cisplatin, doxorubicin and combination therapy( $\times 200$ )



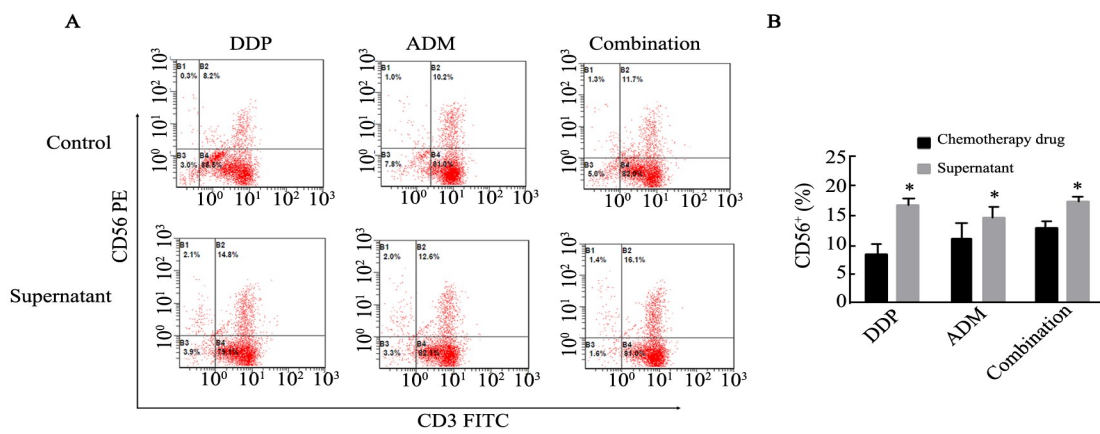
\* $P < 0.05$  vs Chemotherapy drug group

图2 A: 化疗药对照组与上清处理组CIK细胞的CD16<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>表型

B: 化疗药或上清诱导后CIK细胞CD8<sup>+</sup>的比例

Fig.2 A: CD16<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> phenotypes of CIK cells in control and supernatant treatment groups

B: Percentage of CD8<sup>+</sup> in CIK cells after chemotherapy or supernatant induction



\* $P < 0.05$  vs Chemotherapy drug group

图3 A: 化疗药对照组与上清处理组CIK细胞的CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>表型

B: 化疗药或上清诱导后CIK细胞CD56<sup>+</sup>的比例

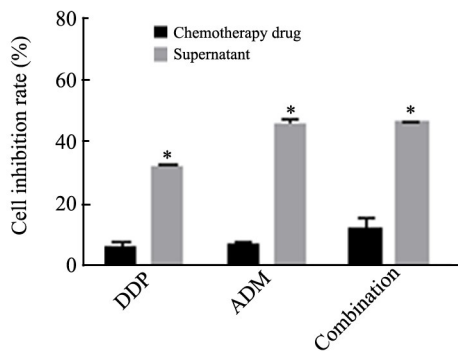
Fig.3 A: CD3<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> phenotypes of CIK cells in control and supernatant treatment groups

B: Percentage of CD56<sup>+</sup> in CIK cells after chemotherapy or supernatant induction

2.4 免疫原性死亡A549细胞上清中CRT、HMGB1和ATP含量

ELISA实验结果(图6)显示,与正常培养无肿瘤细胞杀伤的A549细胞上清对照比较,化疗药杀伤

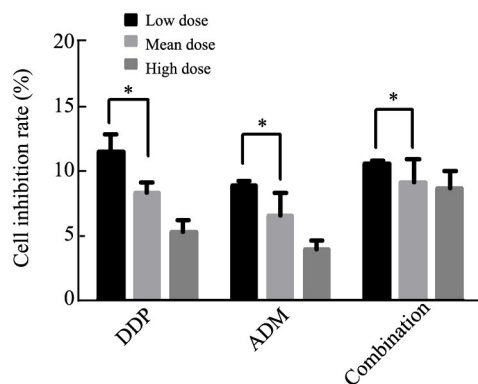
A549细胞上清中测得的CRT、HMGB1、ATP的浓度有显著改变,较低质量浓度化疗药致肿瘤细胞免疫原性死亡的上清中可以测得更高质量浓度的CRT、HMGB1、ATP,而较高浓度化疗药物杀伤A549细胞上清中测得的CRT、HMGB1、ATP的浓度却降低。



\*P<0.05 vs Chemotherapy group

图4 上清与化疗药分别诱导CIK细胞对A549细胞增殖的抑制

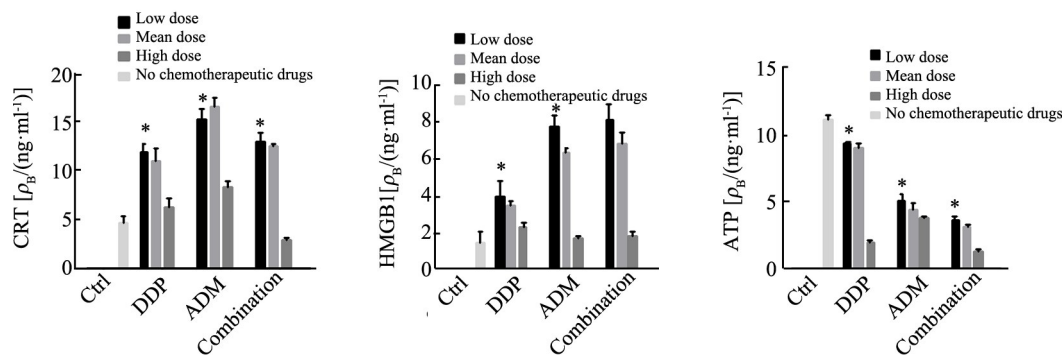
Fig. 4 Comparison of the inhibitory rate of CIK cells on A549 cells induced by the supernatant and chemotherapeutic agents



\*P<0.05 vs Mean dose group

图5 DDP和ADM单独或联合用药不同浓度杀伤A549上清诱导CIK细胞对A549细胞增殖的抑制

Fig.5 Different concentrations of cisplatin, doxorubicin, and combination drugs kill A549 cells effect of supernatant on the inhibition of A549 cells by CIK cells



\*P<0.05 vs Mean dose group

图6 不同质量浓度药物致免疫原性死亡A549细胞上清中CRT、HMGB1、ATP的含量

Fig.6 CRT, HMGB1 and ATP in the supernatant of immunogenic death caused by different drug concentrations

### 3 讨论

肺癌是我国发病率和死亡率占据第一位的恶性肿瘤,尽管目前肺癌治疗取得一定进展,但发现时已经失去手术机会,对化疗、靶向治疗的耐药,肿瘤复发与转移仍是肺癌治疗失败的主要原因<sup>[9]</sup>。

传统化疗在非特异性杀伤肿瘤细胞的同时,不可避免的损伤了免疫细胞,不利于机体免疫系统的抗肿瘤作用的产生,并且耐药与毒副作用仍是临床难以解决的问题。将化疗与免疫治疗结合起来,适时的给予免疫治疗,将可能逆转化疗耐药、减少化疗药物用量<sup>[10-11]</sup>。特定情况下,化疗能致死亡肿瘤细胞

释放DAMP分子,驱动肿瘤靶向免疫应答,进而靶向杀伤抑制残余肿瘤细胞,实现预防癌症复发的目标。当细胞损伤或受到压力后释放DAMP分子,宿主通过DAMP特异受体识别反应,激活抗原提呈细胞对肿瘤相关抗原重新识别,重新激活肿瘤特异性细胞毒性T细胞,激活宿主特异抗癌免疫,重新激活肿瘤免疫,并增强肿瘤的免疫监视应用<sup>[12-13]</sup>。CIK细胞是人外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子培养诱导获得的异质细胞群,主要效应细胞为CD56<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞亚群。CIK细胞的免疫治疗为防止肿瘤复发提供了新的手段<sup>[14-16]</sup>。本研究使用对靶向药物易瑞沙耐药的RAS突变人肺癌细胞株A549细胞,经过

特定化疗诱导肿瘤细胞免疫原性死亡,上清中CRT、HMGB1、ATP的浓度升高,该上清诱导的CIK效应细胞CD56<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞亚群比例均显著提高,上清诱导的CIK抑制A549细胞的活性也明显提高。而上清中CRT、HMGB1、ATP的浓度与上清诱导的CIK抑制A549细胞的活性密切相关,提示所得上清能改善免疫抑制微环境,激活肿瘤特异免疫,而DAMP可能是其杀伤效果提高的分子机制。

化疗与免疫治疗联合应用在抗肿瘤中有协同作用<sup>[17-19]</sup>,本课题为如何选择最佳给药方式、给药剂量,增强疗效、减低毒性提供了体外实验数据。本研究提示,传统的肿瘤化疗需要充分考虑DAMP释放可能对机体抗肿瘤免疫应答及未来治疗的影响,监测化疗前、后患者体内肿瘤微环境中DAMP浓度的动态变化,保持肿瘤微环境中免疫有益的化疗损伤微环境状态,是今后化疗与免疫治疗联合方案设计和实施必须考虑的问题。本研究结果提示,CRT、HMGB1、ATP等免疫相关生物标志物的浓度,可能有助于预测体内抗肿瘤免疫的状态,有助于判断联合治疗最佳时机,从而有助于提高患者的个体化综合治疗疗效。

#### [参 考 文 献]

- [1] GARG A D, GALLUZZI L, APETOH L, et al. Molecular and translational classifications of DAMPs in immunogenic cell death[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 588. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00588.
- [2] HERNANDEZ C, HUEBENER P, SCHWABE R F. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword[J]. *Oncogene*, 2016, 35(46): 5931-5941. DOI: 10.1038/ncr.2016.104.
- [3] KOSAKA T, YATABE Y, ENDOH H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(19): 5764-5769. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0714.
- [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] 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.
- [7] 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): 46-50. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.009.
- [8] 夏冰,江洪,王利民,等. 肺癌30年临床研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*, 2016, 31(4): 296-300.
- [9] 庞翠,王金燕,胡志昊. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(12): 751-758. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.003.
- [10] REN J, DI L, SONG G, 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.
- [11] MA Y, AYMERIC L, LOCHER C, et al. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 491-503. DOI: 10.1084/jem.20100269.
- [12] SHOWALTER A, LIMAYE A, OYER J L, et al. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy[J]. *Cytokine*, 2017, 97: 123-132. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.05.024.
- [13] ADKINS I, SADILKOVA L, HRADILOVA N, et al. Severe, but not mild heat-shock treatment induces immunogenic cell death in cancer cells[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(5): e1311433. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1311433.
- [14] 庞春淼,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, (6): 554-557.
- [15] 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, (10): 917-920.
- [16] REN J, DI L, SONG G, 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.
- [17] BELL C W, BOTOS I, HALL P R, et al. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(6): C1318-25. DOI: 10.1179/096805106X118780.
- [18] APETOH L, GHIRINGHELLI F, TESNIERE A, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy[J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 47-59. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00573.x.
- [19] MARTIN S, DUDEK-PERIC A M, MAES H, et al. Concurrent MEK and autophagy inhibition is required to restore cell death associated danger-signalling in Vemurafenib-resistant melanoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(3): 290-304. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.003.

[收稿日期] 2018-03-04

[修回日期] 2018-05-09

[本文编辑] 韩丹,阮芳铭