

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.20.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 20-0034-07

DC-CIK 细胞诱导宫颈癌细胞凋亡的研究

韦玮¹, 陈心秋²

(1. 广西省柳州市工人医院 妇产科, 广西 柳州 545005; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院 妇瘤科, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 探讨树突状细胞 (DC) 与杀伤细胞 (CIK) 共培养后对宫颈癌细胞 (Hela) 凋亡的影响。**方法** 采集宫颈癌患者外周血, 分离外周血单个核细胞 (PBMC), 分别诱导 DC 和 CIK 细胞, 并扩增培养, 显微镜下观察细胞形态, 流式细胞仪检测 DC 细胞表面分子 CD8、CD40 及 CIK 细胞 CD3、CD8、CD56。采用 CCK-8 检测 DC-CIK 细胞对 Hela 细胞存活率的影响, Annexin V /PI 双染检测 Hela 细胞的凋亡, 逆转录聚合酶链反应检测 Hela 细胞 Bax/Bcl-2 mRNA 比值和 c-myc mRNA 水平。**结果** DC 细胞培养第 7 天时 CD8 的阳性表达率为 21.62%, CD40 的阳性表达率为 76.67%。CIK 细胞培养第 14 天时 CD3、CD8 及 CD56 的阳性表达率分别为 86.85%、82.69% 和 47.65%。DC-CIK 细胞与 Hela 细胞共培养后, Hela 细胞的存活率下降 58.40%。流式细胞仪检测 Hela+DC-CIK 细胞凋亡率增加 4.12 倍。Hela+DC-CIK 共培养的 Hela 组 Bax/Bcl-2 mRNA 比值为 Hela 组的 (3.49±0.08) 倍 ($P<0.05$), c-myc mRNA 水平提高 60.72% ($P<0.05$)。**结论** 该实验成功构建 DC-CIK 共培养体系, 初步验证 DC-CIK 可能通过调控 Bax/Bcl-2 及 c-myc 基因的表达, 诱导 Hela 细胞凋亡。

关键词: DC-CIK 细胞; 宫颈癌细胞; 凋亡

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Apoptosis of cervical cancer cells induced by DCs-CIKs

Wei Wei¹, Xin-qiu Chen²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545005, China; 2. Department of Gynecologic Oncology, the Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of co-culture of dendritic cells (DCs) and cytokine induced killer cells (CIKs) on apoptosis of cervical cancer Hela cells. **Methods** The peripheral blood of cervical cancer patients was collected, and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated, then DCs and CIKs were induced and cultured. The cell morphology was observed under microscope. Flow cytometry was used to investigate the surface markers CD8 and CD40 of the DCs, and the surface marker CD3, CD8 and CD56 of the CIKs. CCK-8 was used to detect the Hela cell survival rate after being treated with DCs-CIKs. Annexin V/PI double-staining was used to investigate the apoptosis of Hela cells after being treated with DCs-CIKs. The Bax/Bcl-2 mRNA ratio and the level of c-myc mRNA in Hela cells were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) after treatment with DCs-CIKs. **Results** The positive expression rates of CD8 and CD40 were 21.62% and 76.67% respectively after DCs were cultured for 7 days. The positive expression rates of CD3, CD8 and CD56 were 86.85%, 82.69% and 47.65% respectively after CIKs were cultured for 14 days. After co-cultured with DCs and CIKs, the survival rate of Hela cells decreased by 58.40% ($P<0.05$), and the apoptosis rate of Hela cells increased 4.12 times.

收稿日期: 2017-11-09

The Bax/Bcl mRNA ratio in the DCs-CIKs and HeLa co-culture group was (3.49 ± 0.08) times that in the simple HeLa group ($P < 0.05$), and the level of c-myc mRNA increased by 60.72% ($P < 0.05$). **Conclusions** The co-culture system of DCs-CIKs was successfully constructed. It was basically validated that DCs-CIKs could induce the apoptosis of HeLa cells by regulating the expression of Bax/Bcl-2 and c-myc genes.

Keywords: DCs-CIKs; cervical cancer cell; apoptosis

宫颈癌在女性生殖器官类癌症中占首位, 宫颈癌的治愈率低, 死亡率高, 发病率呈年轻化^[1-3]。树突状细胞 (dendritic cells, DC) - 细胞因子激活的杀伤细胞 (cytokine induced killer, CIK) 混合生物免疫疗法作为肿瘤生物治疗中最成熟、应用最广的治疗方法, 能激活患者自身的免疫系统辨别和杀伤肿瘤细胞, 可改善患者的生活质量, 延长生存期^[4-6]。本文从分子机制探讨 DC-CIK 细胞对宫颈癌细胞 (HeLa) 杀伤及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

肝素钠 (美国 Sigma 公司), 标准胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 1640 培养液 (美国 Gibco 公司), 二甲基亚砷 (dimethyl sulphoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司), CCK-8、RNA 提取试剂盒及 RNA 逆转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒, 粒细胞巨噬细胞刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)、白介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、白介素-1 α (Interleukin-1 α , IL-1 α)、白介素-4 (Interleukin-4, IL-4)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 CD3 单克隆抗体 (北京同立海源公司), CD8-PE、CD40-FITC、CD3-PITC、CD8-PerCP 及 CD56-PE 抗体 (美国 Abcam 公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Bcl-2、Bax 及 c-myc 引物 (上海生工生物工程股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HeLa 细胞的培养 HeLa 细胞购于中国科学院上海细胞库, 于 10% 胎牛血清和 1% 抗生素的 1640 培养基, 37℃、5% 二氧化碳 CO₂、95% 相对湿度培养箱中培养。

1.2.2 CIK 细胞的培养 选取 2015 年 9 月于广西省柳州市工人医院妇科、肿瘤科未做任何治疗的宫颈癌患者 58 例。每位患者取静脉血 80 ml, 加肝素钠 200 μ l。

取 50 ml 淋巴细胞分离液, 分装 10 支离心管, 每管加 8 ml 血液, 3 000 r/min 离心 20 min。离心后吸每管上层血清至 50 ml 离心管, 吸取中间层细胞至另一个 50 ml 离心管中, 补加生理盐水至 50 ml, 计数并离心 (5 000 r/min 离心 5 min)。取 5×10^7 个细胞用于 DC 细胞的培养, 剩余细胞用于 CIK 细胞的培养, 计作第 0 天, 加入 IFN- γ (1 000 u/ml)、腺嘌呤核苷三磷酸和 20% 自体血清。第 1 天补加 IL-2 (300 u/ml)、IL-1 α (100 u/ml) 及 CD3 单克隆抗体 (50 ng/ml), 之后根据细胞的数量补加培养基进行扩增。第 7 天与 DC 细胞共培养。

1.2.3 DC 细胞的培养 DC 细胞的铺板密度为 5×10^7 个/ml, 铺 6 孔板, 2 ml/孔, 计作第 0 天, 加入 GM-CSF (1 000 u/ml) 和 IL-4 (500 u/ml), 第 3 天补加 DC 培养液 2 ml, 第 5 天加入抗原, 第 6 天加入 TNF- α (500 u/ml)。

1.2.4 DC-CIK 细胞的培养 第 8 天用巴氏管收集铺板密度 1×10^7 个/ml 的 DC 细胞与 1×10^9 数量级的 CIK 细胞混合共培养, 据细胞的数量补加培养基进行扩增, 培养的 DC-CIK 于第 10 天做微生物检测, 培养第 14 天用于实验。

1.2.5 DC 细胞表型检测 收集 5×10^6 个/ml 的 DC 细胞, 悬于 5 ml 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 1 000 r/min 离心 10 min, 洗去血清, 以 PBS 调浓度至 1×10^6 个/ml, 1.5 EP 管分装, 分别加入 20 μ l CD8-PE、CD40-FITC, 均为鼠抗人单抗, 以相应同型抗体为对照, 4℃标记 30 min, 3 ml PBS 1 000 r/min 离心 10 min, 冲洗 2 次, 最后以 PBS 重悬调浓度至 1×10^6 个/ml, 用流式细胞仪 (FACSria, 美国 BD 公司) 检测。

1.2.6 CIK 细胞表型检测 收集铺板密度 5×10^6 个/ml 的 CIK 细胞, 悬于 5 ml PBS, 1 000 r/min 离心 10 min, 洗去血清, 以 PBS 调浓度至 1×10^6 个/ml, 1.5 EP 管分装, 分别加入 20 μ l CD3-PITC、CD8-PerCP 及 CD56-PE 一抗, 4℃孵育 30 min 后, PBS 洗涤细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 冲洗 2 次, 用 PBS 重悬细胞调浓度至 1×10^6 个/ml, 用流式细胞仪检测。

1.2.7 CCK-8 选取生长状态良好的对数生长期

Hela 细胞,胰酶消化细胞后,接种于 96 孔板,接种细胞浓度为 5×10^4 个 / (100 μ l · 孔),将 96 孔板放入 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中,细胞贴壁培养过夜。分别将 100 μ l 1640 完全培养基、培养至第 5 天的 DC 细胞 [1×10^5 个 / (100 μ l · 孔)]、第 7 天的 CIK 细胞 [1×10^5 个 / (100 μ l · 孔)] 和联合培养生长 3 d 的 CIK-DC 细胞 [1×10^5 个 / (100 μ l · 孔)] 接种于铺有靶细胞的 96 孔板,即实验分组为 Hela 组、Hela+DC 组、Hela+CIK 组及 Hela+CIK-DC 组。培养箱内继续培养 24 h,拿出孔板加入 CCK-8 试剂 20 μ l / 孔,培养箱内孵育 2 h,用酶标仪 (SpectraMax M4, 美国 Molecular Devices 公司) 在 450 nm 处检测每孔光密度 (optical density, OD) 值,取 3 个平行复孔的平均值。

1.2.8 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 Hela 细胞、CIK 细胞和 DC-CIK 共培养 24 h Hela 细胞的 RNA,并检测 RNA 含量。样品 OD260/OD280 比值在 1.8 ~ 2.0,纯度较好。逆转录反应体系: 2 $\times$ TS Reaction Mix (10 μ l), TransScript RT/RI Enzyme Mix (1 μ l), Anchored Oligo (dT) 18 (1 μ l), Total RNA (500 μ g), RNase-free Water to 20 μ l (美国赛默飞世尔科技公司)。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 共 30 个循环后, 72℃再延伸 1 min。琼脂糖凝胶电泳检测目的 RNA 表达。采用凝胶成像系统 (SA-1000, 美国 Alpha Innotech 公司) 进行拍照并分析。GAPDH 上游引物: 5-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3, 下游引物: 5-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3; *c-myc* 上游引物: 5-CAGGACTGTATGTGGAGCGGTTTC-3, 下游引物: 5-TGCTGTCGTTGACCGGCTAG-3; *Bax* 上游引物: 5-GTGCACCAAGGTGCCGAAC-3, 下游引物: 5-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3; *Bcl-2* 上游引物: 5-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3, 下游引物: 5-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3。

1.2.9 Annexin V/PI 双染 取处于对数生长期的 Hela 细胞,消化重悬细胞后接种于 6 孔板中,按 5×10^4 个 / ml 的密度培养于 2 ml 1640 培养液中。待细胞贴壁后加入培养的 DC-CIK 细胞 1×10^6 个培养 24 h。倒掉悬浮的 DC-CIK 细胞,胰蛋白酶适宜时间消化细胞后加入 1640 培养液 (10% PBS) 终止消化并离心收集细胞。用 PBS 洗涤细胞反复离心 (2 000 r/min

离心 5 min) 2 次,离心后重悬细胞计数,实验需 5×10^5 个细胞。每管按顺序依次加入 500 μ l 的 Binding Buffer, 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 涡旋混匀后。室温下避光反应 15 min。用流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计数资料以例表示,组间比较用 χ^2 检验;计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 *t* 检验或方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DC、CIK 细胞的形态学观察

外周血中分离出的单个核细胞贴壁 2 h,细胞呈圆形并贴壁,加入 IL-4 和 GM-CSF 后细胞形态不规则,悬浮细胞增多,细胞表面有毛刺样突起生成,且细胞体积变大后开始悬浮生长,分布均匀,具有典型的树突状突起。显微镜下可见单个核细胞在细胞因子的刺激下,细胞体积开始增加,细胞核逐渐变大,培养至第 5 天的 CIK 细胞集落开始聚集生长,后逐渐成簇状克隆生长。见图 1。

2.2 DC 细胞的 CD8、CD40 的阳性表达

流式细胞仪检测 DC 细胞第 0 和 7 天时的细胞表面分子 CD8 和 CD40,第 0 天时 CD8 的阳性表达率为 1.59%, CD40 的阳性表达率为 2.54%。相对于第 0 天,第 7 天时 CD8 的阳性表达率为 21.62%, CD40 的阳性表达率为 76.67%。第 0 与 7 天的 CD8 与 CD40 阳性表达率比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=19.555$ 和 11.833, 均 $P=0.000$),第 7 天时 CD8 和 CD40 的阳性表达率升高。见图 2。

2.3 CIK 细胞的 CD3、CD8 及 CD58 的阳性表达

流式细胞仪检测 CIK 细胞第 0 和 14 天时的细胞表面分子 CD3、CD8 及 CD56,第 0 天时 CD3 的阳性表达率为 37.06%, CD8 的阳性表达率为 26.36%, CD56 的阳性表达率为 14.29%。第 14 天时 CD3 的阳性表达率为 86.85%, CD8 的阳性表达率为 82.69%, CD56 的阳性表达率为 47.65%。第 0 与 14 天的 CD3、CD8 及 CD56 阳性表达率比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=52.113$ 、63.985 和 26.028, 均 $P=0.000$),第 14 天时 CIK 细胞的细胞表面分子 CD3、CD8 和 CD56 阳性表达率升高。见图 3。

2.4 DC-CIK 细胞对 Hela 细胞存活率的影响

Hela 组、Hela+DC 组、Hela+CIK 组、Hela+DC-

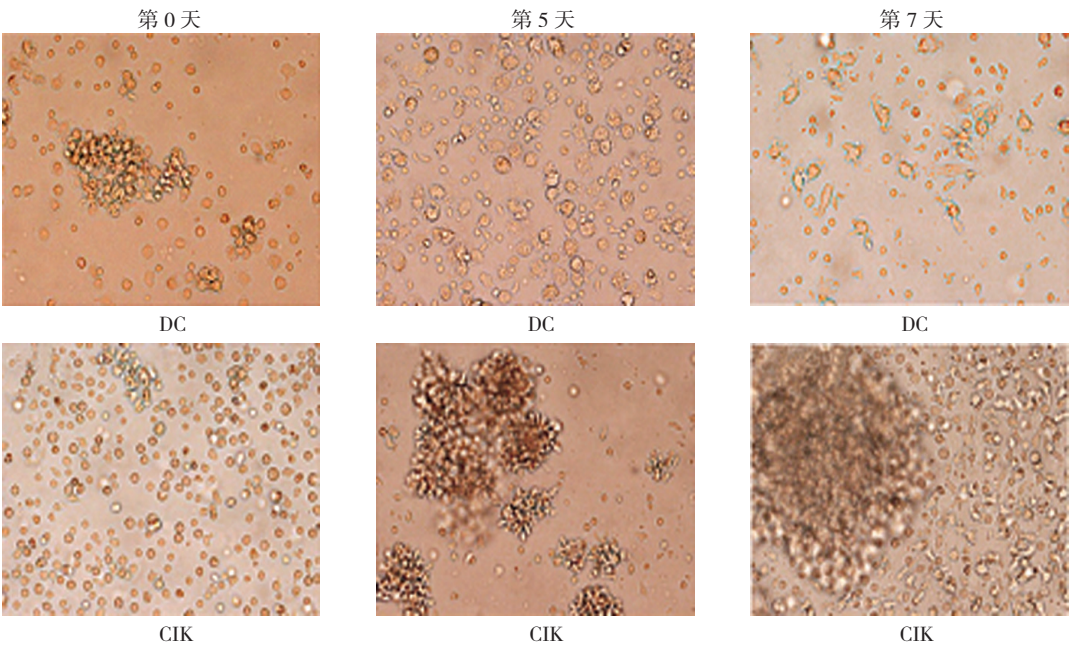


图 1 显微镜下观察 DC、CIK 细胞的形态 (× 100)

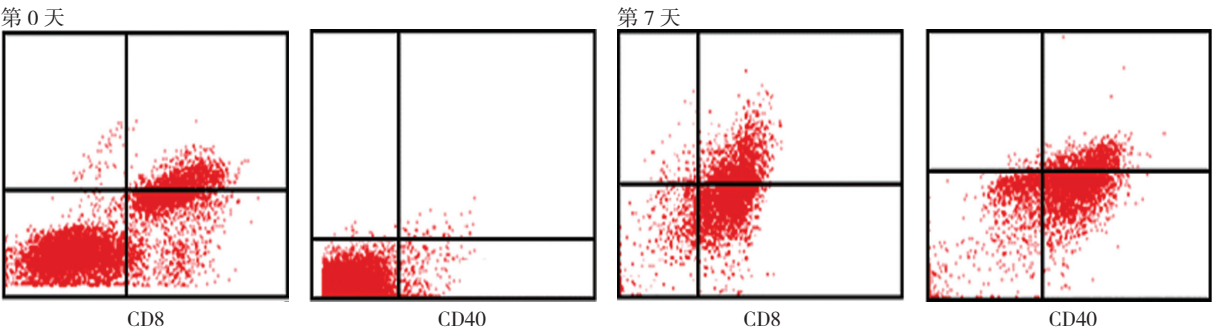


图 2 流式细胞仪检测 DC 细胞表面分子 CD8 和 CD40 的表达

CIK 组的细胞存活率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, Hel+DC 组与 Hel+组细胞存活率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 DC 细胞不具有肿瘤细胞杀伤能力; Hel+CIK 组与 Hel+组细胞存活率比较, 差异有统计学意义 ($t = 22.504$, $P = 0.002$), Hel+CIK 组比 Hel+组下降 39.72%; Hel+DC-CIK 组与 Hel+组细胞存活率比较, 差异有统计学意义 ($t = 34.045$, $P = 0.001$), Hel+DC-CIK 组比 Hel+组下降 58.40%。见附表和图 4。

2.5 DC-CIK 细胞对 Hel+细胞凋亡的影响

Hel+组凋亡率为 $(5.9 \pm 3.8)\%$, 与 Hel+组相比, Hel+DC-CIK 组凋亡增加了 4.12 倍, 其凋亡率为 $(22.0 \pm 3.8)\%$, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 7.851$, $P = 0.001$)。见附表和图 5。

2.6 DC-CIK 细胞对 Hel+细胞 Bax/Bcl-2 mRNA 比值的影响

Hel+组、Hel+DC 组、Hel+CIK 组、Hel+DC-CIK 组的 Bax/Bcl-2 mRNA 比值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, Hel+DC-CIK 组与 Hel+组的 Bax/Bcl-2 mRNA 比值比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.314$, $P = 0.010$)。Hel+DC-CIK 组为 Hel+组的 (3.49 ± 0.08) 倍。见附表和图 6。

2.7 DC-CIK 细胞对 Hel+细胞 c-myc mRNA 表达水平的影响

Hel+组、Hel+DC 组、Hel+CIK 组、Hel+DC-CIK 组的 c-myc mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Hel+CIK 组、Hel+DC-CIK 组与 Hel+组相比 c-myc mRNA 表达升高, 但

Hela+DC-CIK 组升高更明显。Hela+DC-CIK 组与 Hela 组 c-myc mRNA 水平比较, 差异有统计学意义 ($t=22.079, P=0.000$), Hela+DC-CIK 组增加了 60.72%。见附表和图 7。

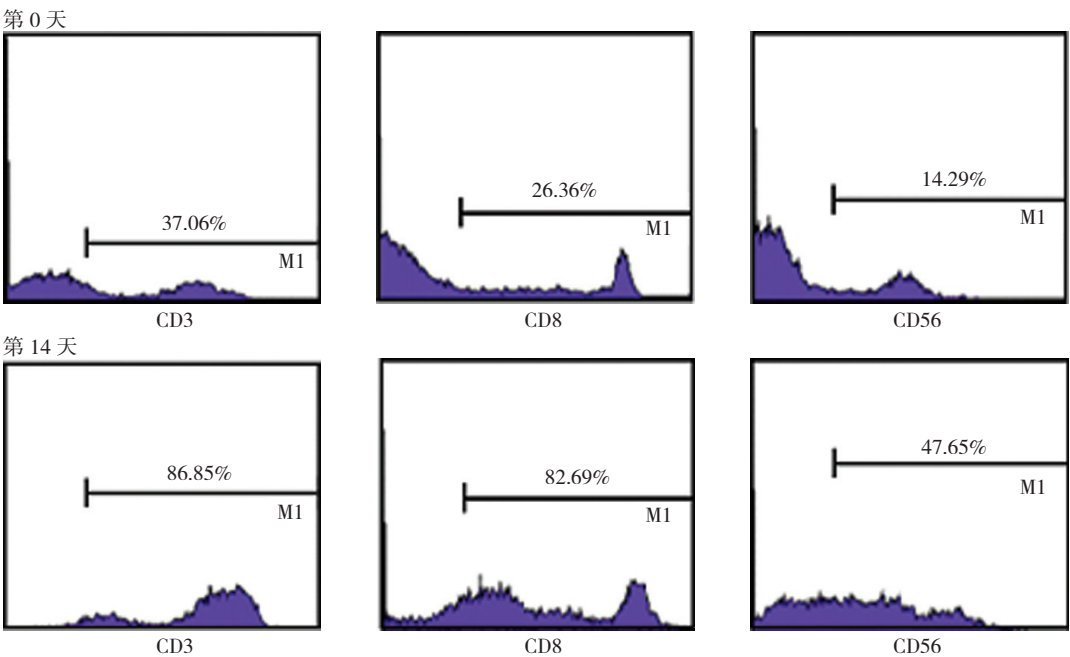


图 3 CIK 细胞表面分子 CD3、CD8 和 CD56 的表达

附表 4 组细胞各试验指标比较

组别	存活率 /%	凋亡率 /%	Bax/Bcl-2 mRNA	c-myc mRNA
Hela 组	100.0 ± 0.1	5.9 ± 3.8	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01
Hela+DC 组	95.3 ± 21.1	-	-	-
Hela+CIK 组	61.7 ± 15.2	-	1.26 ± 0.08	1.18 ± 0.07
Hela+DC-CIK 组	40.3 ± 15.5	22.0 ± 3.8	2.35 ± 0.47	1.58 ± 0.09
F/t 值	10.456	5.189	20.001	60.218
P 值	0.004	0.007	0.002	0.000

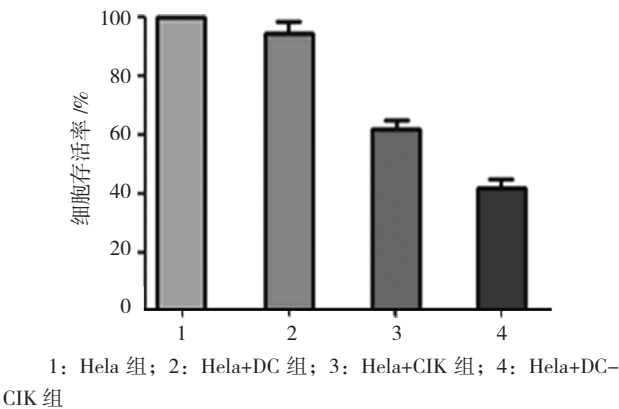


图 4 DC-CIK 细胞对 Hela 细胞存活率的影响

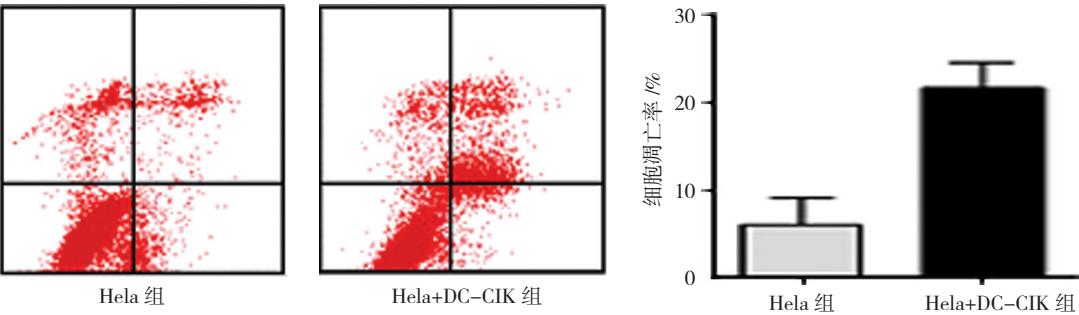
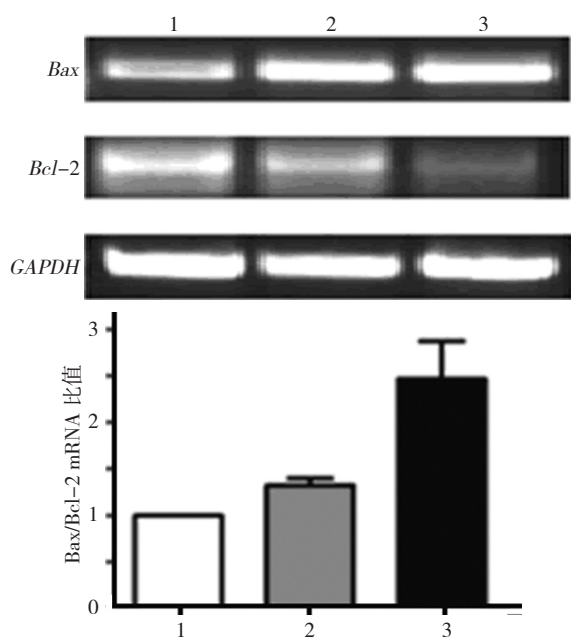
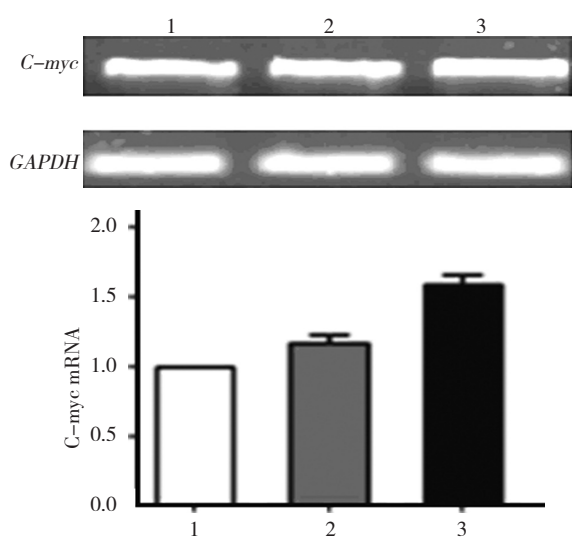


图 5 DC-CIK 细胞对 Hela 细胞凋亡的影响



1: HeLa 组; 2: HeLa+CIK 组; 3: HeLa+DC-CIK 组

图 6 DC-CIK 细胞对 HeLa 细胞 Bax/Bcl-2 mRNA 比值的影响



1: HeLa 组; 2: HeLa+CIK 组; 3: HeLa+DC-CIK 组

图 7 DC-CIK 细胞对 HeLa 细胞 c-myc mRNA 表达水平的影响

3 讨论

DC 细胞是机体内具有提呈抗原作用的细胞,成熟的 DC 细胞表面具有丰富的抗原呈递分子,DC 细胞具有激活 T 淋巴细胞免疫应答和抵制肿瘤细胞免疫逃逸机制的作用。CIK 细胞分泌的抗体与肿瘤细胞表面分子结合,具有较强的杀伤肿瘤细胞的能力,同时具有自然杀伤细胞的非主要组织相容性复合体限制性杀

瘤优点和 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性,CIK 细胞在体外经因子诱导,扩大培养后回输到癌症患者体内,显著提高其免疫活性,也明显增强其抗肿瘤效果。DC 细胞和 CIK 细胞分别通过不同因子的诱导后共培养,获得的 DC-CIK 细胞兼顾 DC 细胞的抗原递呈能力和 CIK 细胞杀瘤能力,发挥高效的抗肿瘤作用。

目前,DC-CIK 细胞在其他癌症的治疗中已经取得较满意的效果。DC 细胞与 CIK 细胞共培养后可有效抑制裸鼠肺腺癌移植瘤组织中血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶及 Bcl-2 的表达,从而抑制裸鼠肺腺癌移植瘤的生长^[7]。DC-CIK 免疫细胞治疗可以提高固体瘤的化疗疗效以及降低其副作用。在非小细胞肺癌的治疗中,与单纯化疗相比,DC-CIK 联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌不仅安全有效还可以提高缓解率,延长生存期,改善患者的生活质量^[8]。临床上 DC-CIK 对恶性黑色素瘤、乳腺癌、胃癌、肠癌及食管癌患者有较好的临床疗效,并能有效增强患者的免疫功能,改善患者的生活质量,提高生存期^[9-12]。因此,本研究通过生物学实验探讨 DC-CIK 细胞对宫颈癌细胞 HeLa 存活率及凋亡的影响,为临床上 DC-CIK 细胞治疗宫颈癌提供理论依据。

本研究发现,DC-CIK 细胞与 HeLa 细胞共培养后,HeLa 细胞的存活率下降,经 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测后 DC-CIK 共培养的 HeLa 细胞凋亡和坏死细胞百分比增加。研究表明乳腺癌干细胞抗原负载的 DC 与 CIK 细胞作用后诱导乳腺癌细胞凋亡,其发生机制与 Bcl-2 蛋白超家族蛋白表达有关^[13]。因此本文进一步检测了 DC-CIK 细胞与 HeLa 细胞共培养后 HeLa 细胞促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的变化,结果表明 Bax 蛋白的 mRNA 水平升高,而 Bcl-2 蛋白的 mRNA 水平降低。c-myc 基因是一种可异位基因,也是一种可调节基因。c-myc 基因作为癌基因具有双重作用,不仅参与细胞增殖还参与细胞凋亡,c-myc 基因与正调节的生长因子协同促进细胞增殖,而与具有负调控的生长抑制基因如 Fas、FasL 及 Bas 结合后可加速细胞凋亡,在癌症的发生发展中发挥重要的作用^[14]。宫颈癌细胞中 c-myc 基因高表达,因此本文进一步检测 DC-CIK 细胞与 HeLa 细胞共培养后 HeLa 细胞中 c-myc 基因的影响,RT-PCR 结果表明 DC-CIK 与 HeLa 细胞共培养后 HeLa 细胞内 c-myc mRNA 水平增加 60.72%。本研究表明 DC-CIK 可通过提高 HeLa 细胞 Bax/Bcl-2 的比值和 c-myc 的表达诱

导 HeLa 细胞凋亡, 这只是 DC-CIK 细胞诱导 HeLa 细胞凋亡的 1 个机制, DC-CIK 细胞也可能通过释放其他因子来杀伤 HeLa 细胞, 或者通过其他信号通路诱导 HeLa 细胞凋亡, 其还有待进一步研究探索。

参 考 文 献:

- [1] AL-MANDEEL H M, SAGR E, SAIT K, et al. Clinical practice guidelines on the screening and treatment of precancerous lesions for cervical cancer prevention in Saudi Arabia[J]. *Ann Saudi Med*, 2016, 36(5): 313-320.
- [2] 叶黔, 王翠兰, 丁建昆, 等. 放化疗与介入性动脉化疗治疗局部晚期宫颈癌的临床研究[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(36): 7122-7125.
- [3] FENG Y, CAO T, WANG Y, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by conization to spare fertility in cases of locally advanced cervical cancer: A case report and review of the literature[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 5(4): 411-416.
- [4] CAMPOS N G, SHARMA M, CLARK A, et al. Resources required for cervical cancer prevention in low-and middle-income countries[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): DOI: 10.1371/journal.pone.0164000.
- [5] ZHAO X, JI C Y, LIU G Q, et al. Immunomodulatory effect of DC/CIK combined with chemotherapy in multiple myeloma and the clinical efficacy[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13146-13155.
- [6] ZHAO Y J, JIANG N, SONG Q K, et al. Continuous DC-CIK infusions restore CD8+cellular immunity, physical activity and improve clinical efficacy in advanced cancer patients unresponsive to conventional treatments[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2419-2423.
- [7] SHAN C C, SHI L R, DING M Q, et al. Cytokine-induced killer cells co-cultured with dendritic cells loaded with the protein lysate produced by radiofrequency ablation induce a specific antitumor response[J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(4): 1549-1556.
- [8] ZHANG L, YANG X, SUN Z, et al. Dendritic cell vaccine and cytokine-induced killer cell therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2605-2610.
- [9] MAO Q, LI L, ZHANG C, et al. Clinical effects of immunotherapy of DC-CIK combined with chemotherapy in treating patients with metastatic breast cancer[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(3): 1055-1058.
- [10] 单海霞, 黄广清. DC-CIK 联合化疗治疗进展期胃癌 45 例的临床疗效评价[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2014, 23(12): 1416-1419.
- [11] LIN T, SONG C, CHUO D Y, et al. Clinical effects of autologous dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells followed by chemotherapy in treating patients with advanced colorectal cancer: a prospective study[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4367-4372.
- [12] YAN L, WU M, BA N. Efficacy of dendritic cell-cytokine-induced killer immunotherapy plus intensity-modulated radiation therapy in treating elderly patients with esophageal carcinoma[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 898-905.
- [13] WANG X, REN J, ZHANG J, et al. Prospective study of cyclophosphamide, thiotepa, carboplatin combined with adoptive DC-CIK followed by metronomic cyclophosphamide therapy as salvage treatment for triple negative metastatic breast cancer patients (aged < 45)[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(1): 82-87.
- [14] DANG C V. MYC on the path to cancer[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 22-35.

(李科 编辑)