

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.014

DC-CIK 对 K562/A 多药耐药基因 *mdr1* 表达的影响 *平超强¹ 张宇晶¹ 孙国勋¹ 董 敏¹ 周鑫磊² 平家奇² 刘 晔³ 洪珞珈^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学第四临床医院血液科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 上海克莱逊生物治疗有限公司 上海 200020;

3 美国橡树岭国家实验室 田纳西 奥克达 37831)

摘要 目的:体外观察树突状细胞(dendritic cell, DC)联合细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)对 K562/A 细胞株多药耐药基因 *mdr1* 表达的影响。**方法:**采集健康人的外周血,分离出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),在体外加入多种细胞因子经诱导生成 DC 及 CIK 细胞,以流式细胞仪检测其表面标志,将 DC 细胞内加入 K562/A 细胞裂解物致敏后,再与 CIK 细胞混合培养 48 小时。将致敏后的 DC-CIK 细胞与 K562/A 及 K562 分组培养后以荧光定量 PCR 检测其 *mdr1* 基因表达的情况, PBMC 作为对照组。**结果:**RT-PCR 中可见 K562/A+DC-CIK 组中 *mdr1* mRNA 表达较 K562/A 明显降低,经荧光定量 PCR 观察到 K562/A 内 *mdr1* mRNA 表达为 K562 的 10.27 倍、K562/A/PBMC 略低于未处理的 K562/A ($P>0.05$), K562/A/DC-CIK 细胞中 *mdr1* mRNA 含量较 K562/A、K562/A/PBMC 少 ($P<0.05$)。DC-CIK 细胞与细胞株混合培养后, *mdr1* 基因表达较混合培养前明显降低。**结论:**实验数据显示 DC-CIK 可使耐药细胞株内 *mdr1* 基因表达下调。但 K562 与 DC-CIK 混合培养后该基因降低不明显,提示该基因在细胞中存在着基础表达,意义在于维持细胞内稳态。目前针对逆转白血病耐药的研究较少,需要多进行相关研究以拓宽细胞免疫治疗在逆转耐药领域的应用。DC-CIK 是具有发展潜力的抗肿瘤方法。本实验将为下一阶段研究逆转耐药的机制提供依据, DC-CIK 细胞免疫疗法有望成为逆转肿瘤耐药的新方法。

关键词:树突状细胞(DC);细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK);K562/A; *mdr1*; 逆转耐药

中图分类号:R733.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)14-2667-05

The Expression Effect of DC-CIK on K562/A Multidrug Resistance Gene *mdr1* *PING Chao-qiang¹, ZHANG Yu-jing¹, SUN Guo-xun¹, DONG Min¹, ZHOU Xin-lei², PING Jia-q², LIU Ye³, HONG Luo-jia^{1Δ}

(1 The fourth hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Shang hai cls Biotherapy limited company, Shanghai, 200020, China;

3 Oak Ridge National Laboratory, Oakdale, Tennessee, 37831, America)

ABSTRACT Objective: Observe the expression effect of dendritic cells (DC) combined with cytokine-induced killer cells (CIK) on the multidrug resistance gene *mdr1* of K562/A cell line *in vitro*. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from peripheral blood of healthy people were collected, and induced them to DC and CIK by mixing in a variety of cytokines, then detected their surface markers by flow cytometry. Added cell lysates of K562/A to DC, and then made the sensitized DC culturing with CIK for 48 hours. Detected the expression of *mdr1* gene by Quantitative PCR after sensitized DC-CIK were cultured with K562/A and K562 respectively, used PBMC as a control group. **Results:** The *mdr1* mRNA in K562 / A + DC-CIK group was significantly lower than K562 / A group by RT-PCR. Through Quantitative PCR we observed that the expression of *mdr1* mRNA in K562 / A group was 10.27 times than K562 group, K562/A/PBMC group was slightly lower than the untreated K562/A group ($P>0.05$), and K562/A/DC-CIK group was lower than K562/A, K562/A/PBMC group ($P<0.05$). The expression of *mdr1* gene after mixed culture was significantly lower than DC-CIK mixed culture with two cell lines before. **Conclusion:** The experimental datas showed that *mdr1* gene in resistant cell lines can be downregulated by DC-CIK. But this gene was not reduced significantly after K562 mixed culture with DC-CIK, and it suggesting that there is basal gene expression in cells to maintain the intracellular homeostasis. The research about reversing resistance against leukemia is few currently, need to conduct more research in order to broaden the immunotherapy field of application in reversing drug resistance. DC-CIK is a anti-tumor approach with development potential. This experiment will provide a basis for the study of reversing drug resistance mechanisms next phase, and DC-CIK cellular immunotherapy is expected to become a new way reversing tumor resistance. The method is expected to become the leader in cancer treatment, it has broad prospects for development.

* 基金项目:黑龙江省留学归国人员基金(LC08C24);黑龙江省科技厅课题(QC2012C050)

作者简介:平超强(1984-),男,硕士研究生,医师,主要研究方向:白血病的生物治疗,

电话:18646393987, E-mail: pingchaoqinag@163.com

Δ 通讯作者:洪珞珈, E-mail: hongluojia@sina.com

(收稿日期:2013-09-20 接受日期:2013-10-15)

Key words: Dendritic cells; Cytokine-induced killer cells; K562/A ; Mdr1; Reversal of drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2667-05

前言

化疗是白血病临床治疗中最重要的方法之一。随着化疗药物的长期作用,白血病细胞的耐药性被逐渐诱导,最终导致临床治疗的失败。白血病的耐药形式主要以多药耐药(multidrug resistance,MDR)为主,介导这一过程的多药耐药基因 mdr1,也是最为经典的途径^[1,2],目前已成为影响白血病预后的主要因素^[3]。因此,逆转耐药是白血病治疗中迫切需要解决的问题。为解决这一难题人们不断努力寻找着各种逆转耐药的方法,从最初的药物逆转发展到针对基因的逆转。但是各自又有诸多不足之处目前尚未应用于临床。

随着免疫学、分子生物学及肿瘤医学的发展,过继免疫治疗成为倍受瞩目的治疗手段,该方法是继放化疗后又一肿瘤治疗的重要手段。已经成为肿瘤综合治疗的一部分^[4]目前研究较多的为 DC-CIK 细胞免疫疗法。在白血病的临床治疗中我们发现部分复发耐药患者经 DC-CIK 治疗后,再次巩固化疗时,仍可获得完全缓解,考虑该方法可以使耐药的白血病细胞对药物变得敏感。

基于临床观察到的这种现象,我们以高表达 mdr1 的 K562/A 细胞株为研究对象,应用荧光定量 PCR 检测 DC-CIK 对多药耐药基因 mdr1 表达的影响。DC-CIK 细胞治疗作为一种新型的医疗技术已被广泛用于肾癌、淋巴瘤、黑色素瘤等实体肿瘤,并取得明显的疗效。该方法也在逐步应用于白血病的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

K562/A 细胞株(购自中国医学科学院天津血液病研究所)、K562 细胞株(哈尔滨医科大学附属第一医院惠赠)、DC 和 CIK 细胞(哈尔滨医科大学附属第四医院生物治疗中心提供) RPMI 1640 培养液、10%胎牛血清(美国 GIBCO 公司)、双抗、台盼蓝(美国 Sigma 公司)、mdr1 引物(上海生工生物工程技术服务有限公司)、细胞计数板、MDF-U32V 超低温、CK300-F200 倒置显微镜、5%CO₂ 培养箱、LightCycler®480 II RT-PCR System instrument PCR 仪、低温高速离心机等。

1.2 方法

1.2.1 K562/A、K562 细胞培养 将 K562/A 及 K562 细胞复苏后重悬于含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液(含 1%双抗),分别取细胞悬液与 0.4%台盼蓝各 50 μL 混合,室温下染色 2 min 后加入到细胞计数板中应用公式:活细胞率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数)×100%,计算细胞存活率,细胞活率>95%,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养传代,根据细胞生长情况隔日半量换液(K562/A 培养时需加 0.1 mg/mL 的阿霉素以维持其耐药性,实验前需无药培养 1 周)。

1.2.2 可溶性抗原制备 将 K562/A 重悬于培养液中并计数,

-80℃,37℃ 反复冻融 3 次,再经漩涡振荡器震荡至细胞破裂,移入离心管中 5000 r/min,20 min 离心后取上清,并以 0.22 μm 滤器过滤备用。

1.2.3 DC-CIK 细胞制备 将可溶性抗原按效靶比 10:1 的比例加入至培养 5 d 的 DC 细胞中继续培养 48 h,再将致敏后的 DC 与 CIK 以 1:3 比例混合继续培养 3 d 后收集并计数^[5]。

1.2.4 DC-CIK 与细胞株混合培养 将 K562 及 K562/A 以 1×10⁶/L 平行接种于六孔板中,分别加入 PBMC、DC-CIK 细胞成分(比例为 1:5),混匀后置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中,隔日半量换液,培养至第 7 d。

1.2.5 RT-PCR 检测 mdr1 mRNA 表达情况 收集共培养前后各组细胞洗涤后以 Trizol 裂解,加入 300 μL 三氯甲烷,震荡,12000 r/min,10 min,4℃离心;保留氯仿层,加入与上清液等量异丙醇使 RNA 沉淀,12000 r/min,10 min,4℃离心。倒去上清液,加入 1 mL 75%乙醇,震荡,12000 r/min,10 min,4℃离心,取出后 55℃开盖烘干。分别用 20 μL 0.1%DEPC 溶解烘干的沉淀,混匀后取 17.5 μL 加入提前准备好的装有 1 μL oligo (DT)的 EP 管中。PCR 仪更改体系为 19 μL,70℃,5 min,完成后取出,放入冰盒 2 min。准备 EP 管,每管加入 1 μL dNTP、0.5 μL 逆转录酶、5 μL buffer 混匀。PCR 仪更改体系为 25 ul,42℃,60 min,93℃,3 min,逆转录成 cDNA 置于 -20℃冰箱保存(避免反复冻融)。mdr1 上游引物:5'-TGTTTCGTTTCCTTTAG-GTCTTTCC-3',下游引物:5'-CCCACCACCATATACAACCTTG-TCA-3',扩增片段 254bp;GAPDH 上游引物:5'-ACCCACTCC-TCCACCTTTGAC-3',下游引物:5'-TGTTTGAGCACAGGGT-ACTTTATTG-3',扩增片段 250 bp。取小 EP 管按顺序加入 10 ul taq 酶、2 μL 模板、目的基因或 GAPDH 上、下游引物各 0.5 μL、7 μL 去离子水,进行 PCR 仪反应,设置循环参数如下:94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃延伸 7 min,共 30 个循环。扩增完毕后进行琼脂糖凝胶电泳并采集图像。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测 mdr1 的表达 设定体系为 20 μL,将对照组及实验组分别依照下列条件加样:10 μL taq 酶、目的基因 mdr1 上、下游引物各 0.5 ul、模板 2 μL、去离子水 6 μL、SYBR GREEN 1 μL 逐个加入八连管,每个样本三个复孔。设置与前述实验相同的 PCR 循环条件,进行荧光定量 PCR 检测,以 GAPDH 作为内参,获取相应 Ct 值,重复三次试验。根据公式计算数据 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的}} - Ct_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{目的}} - \Delta Ct_{\text{内参}}$ 。若 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$,则提示 mdr1 表达量升高,若 $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$,则提示 mdr1 表达量下降。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,样本间采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 DC、CIK 细胞的光镜下形态

下图为倒置显微镜观察到的 DC、CIK 细胞:DC 细胞大小不一,体积较单个核细胞大,成团分布,表面不规则突起(见图

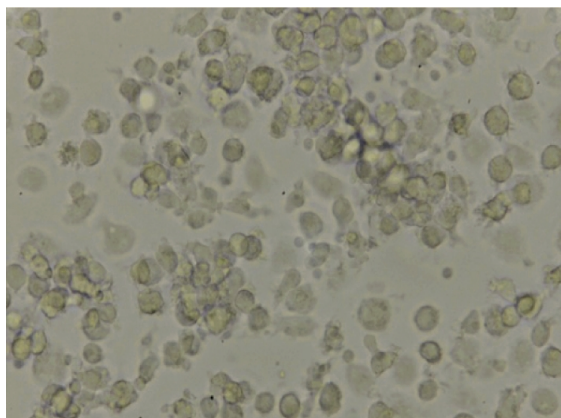


图 1 DC 细胞光镜下形态(400 倍)

Fig.1 The morphology of DC($\times 400$)

1);CIK 细胞形态不规则,呈梭形及类圆形,也可见到细胞成团分布(见图 2)。

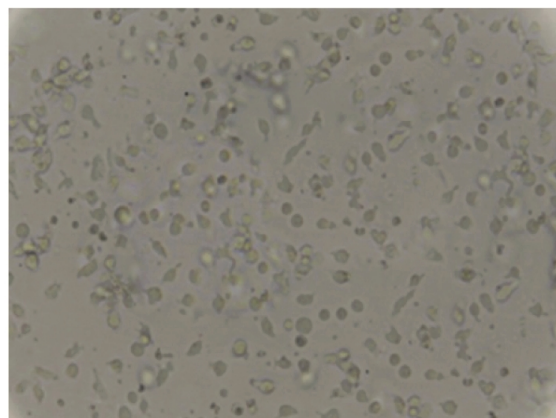


图 2 CIK 细胞光镜下形态(200 倍)

Fig.2 The morphology of CIK($\times 200$)

2.2 流式细胞仪检测 DC、CIK 表面标志

流式细胞仪检测培养至 7 d 的 DC 细胞各表面标志所占阳性比为:CD3⁺ (2.72 %)、CD83⁺ (26.4 %)、CD86⁺ (99.7 %)、HLA-DR⁺ (99.5 %)、CD14⁺ 仅占(0.34 %);培养至 14 d 的 CIK 细胞显示:CD3⁺ (96.9 %)、CD4⁺ (21.5 %)、CD8⁺ (66.4 %)、CD3⁺CD8⁺ (64.7 %)、CD3⁺CD56⁺ (28.7 %)。

2.3 RT-PCR 检测细胞内 mdrl mRNA 表达的变化

目的基因产物大小为 254 bp、细胞内参照为 GAPDH 产物大小为 250 bp。(图 3)可见在 K562、K562+PBMC、K562+DC-CIK 所处的泳道处 mdrl 基因条带无明显变化;K562/A+DC-CIK 泳道处的 mdrl mRNA 荧光强度明显较 K562/A 及 K562/A+DC-CIK 处减弱。

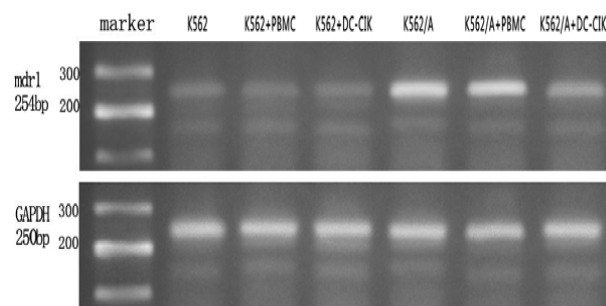


图 3 K562、K562/A 与 PBMC 及 DC-CIK 混合培养前后 mdrl 基因表达的变化

Fig.3 The change of mdrl gene expression before and after K562 and K562 / A mixed culture with PBMC and DC-CIK

表 1 各组细胞内 mdrl mRNA 含量的变化

Table 1 The change of mdrl mRNA content in every group of cells

Group	MDR1 Ct $\bar{x} \pm s$	GAPDH $\bar{x} \pm s$	MDR1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
K562	24.08 $\pm$ 1.05	19.53 $\pm$ 1.26	1
K562+PBMC	25.03 $\pm$ 0.79	20.56 $\pm$ 2.12	1.06 $^{\Delta}$
K562+DC-CIK	24.01 $\pm$ 1.78	19.36 $\pm$ 1.45	0.93 $^{\Delta}$
K562/A	21.25 $\pm$ 1.13	20.16 $\pm$ 1.01	10.27 $^{\Delta}$
K562/A+PBMC	22.46 $\pm$ 2.14	21.16 $\pm$ 1.16	9.51 $^{\Delta\Delta}$
K562/A+DC-CIK	23.05 $\pm$ 3.27	20.89 $\pm$ 2.07	5.24 $^{\Delta\Delta}$

注: $^{\Delta}$ 与 K562 比较, $^{\Delta\Delta}$ 与 K562/A 比较。

Note: $^{\Delta}$ Compared with K562, $^{\Delta\Delta}$ Compared with K562/A.

2.4 荧光定量 PCR 检测细胞内 mdrl mRNA 表达的变化

(表 1) 中 K562 为低表达对照、K562/A 为高表达对照; PBMC 为对照组、DC-CIK 为实验。荧光定量 PCR 可明确各组细胞内 mdrl mRNA 含量, 耐药细胞内 mdrl mRNA 表达为 K562 的 10.27 倍、K562/A/PBMC 略低于未处理的 K562/A ($P>0.05$), K562/A/DC-CIK 细胞中 mdrl mRNA 含量较 K562/A、K562/A/PBMC 较少 ($P<0.05$) 有统计学意义, 但 mdrl mRNA 含量仍高于对照组。

3 讨论

Markus 等人^[9]随机对成人的急性髓系白血病患者进行了检测, 结果发现高表达 mdrl 的患者完全缓解率较低, 预后较差。研究发现^[7,8]多次化疗的白血病患者 P-gp 表达较初发患者高 50%, 化疗后 P-糖蛋白表达增多、功能增强, 且相关基因表达也明显上调。

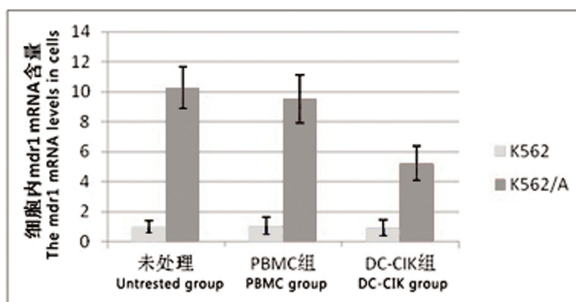


图4 K562、K562/A与PBMC及DC-CIK混合培养前后mdrl mRNA含量的变化

Fig.4 The change of mdrl mRNA content before and after K562 and K562 / A mixed culture with PBMC and DC-CIK

mdrl基因在正常组织细胞中均有表达,它所编码的P-糖蛋白嵌于细胞膜表面形成具有外排功能的“泵”,还具有分泌、脂质转运等功能,其中以逆向转运功能为主,其生理意义在于防止内源性或外源性脂溶性物质如某些细胞代谢产物、毒物等在胞内积聚对细胞造成毒性损害,从而保持细胞内环境的相对稳定^[9-11]。一些脂溶性及天然来源的药物可诱导P-糖蛋白表达,易导致交叉耐药性的产生,如蒽环类药物、长春碱类药物。因此有效降低该基因成为白血病临床治疗中的突破口。

DC-CIK细胞免疫疗法是国际公认的具有直接杀伤肿瘤细胞作用的手段。树突状细胞(dendritic cell, DC)是已知的机体内功能最强的抗原递呈细胞,未成熟DC细胞可捕获抗原,成熟DC则可将先前捕获到的抗原信息呈递给T细胞,激活抗原相关的主要组织相容性复合体(MHC)限制性免疫应答^[12]。细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer cell, CIK),是一种非MHC限制性的免疫活性细胞,同时具有T淋巴细胞抗肿瘤活性和NK细胞非MHC限制性杀瘤的特点,具有广谱抗肿瘤能力^[13,14]。二者混合培养,DC细胞的增殖速度及表面标志均发生变化^[15],DC细胞的成熟可促进细胞因子的分泌及CIK细胞的增殖,并可增强其对靶细胞的杀伤活性,另外也可降低CIK细胞群中抑制性T细胞的表达,在机体免疫功能低下时,仍可发挥抗肿瘤活性。

DC-CIK细胞免疫疗法目前在白血病方面应用大多停留在清除微小残留病及预防移植后复发上,在耐药基因方面的研究比较少。有文献表明^[16],DC细胞可能通过竞争性抑制P-gp上ATP位点,而影响P-gp泵功能,使细胞与化疗药物结合后药物外排减少。Min Dong等^[17]用低剂量化疗联合自体DC-CIK治疗老年髓系白血病,观察到患者血清中T细胞亚群和细胞因子均较治疗前升高,临床入组患者中细胞免疫联合化疗组缓解率明显高于单用化疗组。DC-CIK在培养过程中可以分泌一些细胞因子如 α -INF、TNF- α 、IL-2等,有文献报道^[18]这些细胞因子可通过改变细胞膜的脂质组成,影响P糖蛋白的活性来增强肿瘤细胞对化疗的敏感性。另外,这些细胞因子还具有促进凋亡的作用。Rosell R等人^[19]利用 α -INF来提高肺癌对化疗敏感性,研究表明 α -INF可能通过直接抑制P糖蛋白功能活性、改变细胞膜通透性,也可通过抑制蛋白质合成,使P糖蛋白合成减少来提高细胞对药物的聚集能力从而发挥逆转耐药作用。贾庆瑞等人^[20]以IL-2结合化疗来治疗白血病患者,治疗后检测发现白血

病细胞中P-gp及LRP表达降低。付劲蓉等人^[21]以IL-4处理HL-60/VCR后发现细胞株中P-gp表达降低。另有文献表明^[22],二者混合培养后可通过降低CIK中免疫抑制T细胞(CD4⁺CD25⁺细胞)的数量及其分泌的细胞因子IL-10,增强抗肿瘤免疫细胞的作用。

本实验以PBMC作为对照组,DC-CIK组为实验组,观察到各组K562细胞内的mdrl mRNA始终处于低表达状态,该基因在正常组织细胞中均与表达。PBMC组中K562/A细胞内mdrl mRNA表达较未处理K562/A略低,初步考虑由于耐药细胞株在培养时脱离药物压力所引起的该基因下调^[23]。DC-CIK组中K562/A mdrl mRNA含量明显降低。综合本实验结论DC-CIK细胞可以降低耐药细胞K562/A中mdrl mRNA的含量,mdrl mRNA的降低可能与上述这些因素有关。

白血细胞的耐药机制与mdrl基因关系密切,因此有效降低该基因是逆转耐药的首要问题。本实验中DC-CIK细胞可有效降低耐药细胞株内mdrl mRNA的含量,这将为临床治疗及下一步实验提供了依据。接下来我们将该实验重复于人白血病细胞,并通过扩大样本量,来观察逆转效果。同时DC-CIK逆转耐药的机制也是我们下一步所要解决的问题。

白血细胞的耐药一直困扰着临床治疗。发现有效的逆转方法是目前需要解决的问题,在今后的临床工作中应不断发现及探索更为有效的方法,从而为临床治疗及克服耐药提供新的思路。关于DC-CIK逆转耐药方面我们研究较少,DC-CIK细胞作为一种肿瘤治疗的新手段,因其杀瘤活性高、副作用小等特点被纳入肿瘤的临床治疗。这一方法具有很广阔的应用前景,我们应进行更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate [J]. *Leukemia*, 2004, 18(3): 401-408
- [2] Kisucka J, Barancik M, Bohacova V, et al. Reversal effect of specific inhibitors of extracellular-signal regulated protein kinase pathway on P-glycoprotein mediated vincristine resistance of L1210 cells [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2001, 20(4): 439-444
- [3] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273-286
- [4] 陈复兴, 刘军权, 张南征, 等. 自身细胞因子诱导的杀伤细胞过继性免疫治疗恶性肿瘤的临床观察[J]. *癌症*, 2002, 21(7): 797-801
Chen Fu-xing, Liu Jun-quan, Zhang Nan-zheng, et al. Clinical Observation on Adoptive Immunotherapy with Autologous Cytokine-Induced Killer Cells for Advanced Malignant Tumor [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2002, 21(7): 797-801
- [5] 徐艳, 刘丽娟, 高建梅, 等. DCIK细胞特异性抗肿瘤生物活性研究[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(27): 8-10
Xu Yan, Liu Li-juan, Gao Jian-mei, et al. Specific Anti-tumor Biological Activity of DCIK Cells [J]. *China Modern Doctor*, 2010, 48(27): 8-10
- [6] Schaich M, Soucek S, Thiede C, et al. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute

- myeloid leukemia [J]. Br J Haematol, 2005, 128(3): 324-332
- [7] Han K, kahng J, Kim M, et al. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia [J]. Acta Haematol, 2000, 104(4): 174-180
- [8] Rootenberg S, Nygren AO, Pajic M, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(29): 12117-12122
- [9] Kimura Y, Mat suo M, Takahashi K, et al. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter: MDR1/P-glycoprotein [J]. Curr Drug Metab, 2004, 5(1): 1-10
- [10] Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, et al. Detect ion of Pgycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells [J]. Int J Cancer, 1998, 75(6): 885-893
- [11] Shapiro AB, Fox K, Lee P, et al. Functional intracellular P-glycoprotein [J]. Int J Cancer, 1998, 76(6): 857-864
- [12] Machy P, Serre K, Baillet M, et al. Induction of MHC class I presentation of exogenous antigen by dendritic cells is controlled by CD4+ T cells engaging class II molecules in cholesterol-rich domains [J]. J Immunol, 2002, 168(3): 1172-1180
- [13] Kim HM, L im J, Yoon YD, et al. Anti-tumor activity of ex vivo expanded cytokine-induced killer cells against human hepatocellular carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(13): 1793-1801
- [14] Baker J, Verneris MR, Ito M, et al. Expansion of cytolytic CD8+ natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon γ production [J]. Blood, 2001, 97(10): 2923-2931
- [15] 岳玲玲, 张连生, 张玉芳, 等. 树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养对白血病耐药细胞杀伤作用的实验研究[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(17): 1340-1342
- Yue Ling-ling, Zhang Lian-sheng, Zhang Yu-fang, et al. Effect of dendritic cells pulsed with tumor lysate antigens co-cultured with cytokine induced killer cells on cytotoxicity against multidrug resistant cells [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2006, 26(17): 1340-1342
- [16] Van de Ven R, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The ABC of dendritic cell development and function [J]. Trends Immunol, 2009, 30(9): 421-429
- [17] Min Dong, Dong Ling, Yinghong Li, et al. Autologous dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells synergize low-dose chemotherapy in elder patients with acute myeloid leukemia [J]. The Journal of International Medical Research, 2012, 40(4): 1265-1274
- [18] 李睿, 徐海帆. 多药耐药蛋白 P-糖蛋白的研究进展 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(2): 240-242
- Li Rui, Xu Hai-fan. Research progress of the multidrug resistance protein P-glycoprotein [J]. China Practical Medicine, 2009, 4(2): 240-242
- [19] Rosell R, González-Larriba JL, Alberola V, et al. Single-agent paclitaxel by 3-hour infusion in the treatment of on-small cell lung cancer: links between p53 and K-ras gene status and chemosensitivity [J]. Semin Oncol, 1995, 22(6 Suppl 14): 12-18
- [20] 贾庆瑞, 葛祥花, 隋金财. 白细胞介素-2 逆转急性白血病细胞多药耐药的临床研究[J]. 白血病. 淋巴瘤, 2003, 12(1): 28-30
- Jia Qing-rui, Ge Xiang-hua, Sui Jin-cai. Clinical study of reversal effect of multidrug resistance in acute leukemia cells by interleukin-2 [J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2003, 12(1): 28-30
- [21] 付劲蓉, 李成荣, 杨锡强, 等. 白血病细胞多药耐药细胞系的建立及白细胞介素 4 对其多药耐药的逆转研究 [J]. 中华内科杂志, 2000, 38(10): 614-616
- Fu Jin-rong, Li Cheng-rong, Yang Xi-qiang, et al. Establishment of multi drug resistant cell line HL-60/VCR and the reversal of multidrug resistance by interleukin4[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2000, 38(10): 614-616
- [22] Schmidt J, Eisold S, Büchler MW, et al. Dendritic cells reduce number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(11): 1018-1026
- [23] Budeorh J, Gant TW, Gescher A. Co-ordinate loss of protein kinase an f multidrug resistance gene expression in revertant MCF-7/Adr breast carcinoma cell [J]. Br J Cancer, 1997, 75(9): 1330-1335
- kidney disease [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 17(10): CD008176
- [19] Palmer SC, Di Micco L, Razavian M, et al. Perkovic V Antiplatelet agents for chronic kidney disease [J]. Cochrane Database Syst Rev. 2013, 28(2):C008834
- [20] Palmer SC, Di Micco L, Razavian M, et al. Effects of antiplatelet therapy on mortality and cardiovascular and bleeding outcomes in persons with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Intern Med, 2012, 20, 156(6):445-459

(上接第 2707 页)