

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.038

唑来膦酸联合 IL-2 体外诱导胃癌患者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的研究 *

田 爱 夏志强 黄勇亮 李万狮 许永春[△]

(解放军第九四医院消化内科 江西 南昌 330003)

摘要 目的:探讨唑来膦酸联合白细胞介素-2(IL-2)诱导胃癌患者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的作用。**方法:**收集胃癌患者和健康捐献者各 30 例,分别采集外周静脉血并分离出单核细胞(PBMC),采用流式细胞仪(FCM)检测唑来膦酸联合 IL-2 诱导前后 $\gamma\delta$ T 细胞的数量及其 CD69 分子的表达情况。**结果:**胃癌组的 $\gamma\delta$ T 细胞数量和百分比均明显低于健康对照组 ($P<0.05$);唑来膦酸联合 IL-2 诱导 PBMC 后,胃癌实验组和健康对照组中的 $\gamma\delta$ T 细胞的数量和百分比均较诱导前明显升高($P<0.05$)。**结论:**唑来膦酸联合 IL-2 体外诱导 PBMC 可显著扩增 $\gamma\delta$ T 细胞,以加强杀伤肿瘤细胞的目的。

关键词: $\gamma\delta$ T 细胞;胃癌;唑来膦酸;IL-2;过继性免疫治疗

中图分类号:R735.2;R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)19-3750-04

Effects of Zoledronate and Interlukin 2 on the Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Gastric Cancer in Vitro*

TIAN Ai, XIA Zhi-qiang, HUANG Yong-liang, LI Wan-shi, XU Yong-chun[△]

(Chinese People's Liberation Army No. 94 Hospital, Nanchang, Jiangxi, 330003, China)

ABSTRACT Objective: To determine the effects of zoledronate plus interleukin 2 (IL-2) on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with gastric cancer in vitro. **Methods:** PBMCs were isolated from 30 healthy donors and 30 patients with gastric cancer respectively, and then stimulated with zoledronate plus IL-2 in vitro. Flow cytometry (FCM) was used to evaluate the $\gamma\delta$ T cell subpopulation of PBMCs and detect the expression of CD69 in $\gamma\delta$ T cells. **Results:** The percentage and absolute number of $\gamma\delta$ T cells from PBMCs were both lower in patients with gastric cancer than those of the control group ($P<0.05$). The combination of zoledronate and interleukin 2 could significantly increase the percentage and absolute number of $\gamma\delta$ T cells from PBMCs in patients with gastric cancer and healthy control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Zoledronate and IL-2 could obviously stimulate the proliferation of $\gamma\delta$ T cells from PBMCs to further kill the cancer cells.

Key word: $\gamma\delta$ T cells; Gastric cancer; Zoledronate; IL-2; Adoptive immunotherapy

Chinese Library Classification(CLC): R735.2; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)19-3750-04

前言

胃恶性肿瘤是我国常见的消化道肿瘤中,呈区域性高发,其年发病率及死亡率均居人体所有恶性肿瘤的第 3 位^[1],其发生、发展与多种因素有关,其中机体免疫功能异常与肿瘤发生密切相关。在人类外周淋巴细胞中, $\gamma\delta$ T 细胞占 1%-10%,主要分为 V δ 1+T 细胞和 V δ 2+T 细胞两大亚群,后者主要存在于外周血中^[2],其作用介于适应性免疫及固有免疫之间,具有不受相关抗原肽体和主要组织相容性复合体(MHC)I、II 类分子的限制、不依赖抗原的呈递及处理过程及可直接识别抗原等特点^[3,4],在免疫调节、初次免疫应答和肿瘤免疫监视中的关键作用已得到越来越广泛的关注^[5,6]。研究显示 $\gamma\delta$ T 细胞属于固有免疫细胞,广泛分布于消化道、呼吸道及生殖器等黏膜及上皮组织,具有免疫调节、抗原提呈、杀伤肿瘤细胞等作用。 $\gamma\delta$ T 细胞的过继性

免疫治疗已广泛应用于临床^[7]。目前研究已证明使用一些人工合成的磷酸抗原体外诱导和扩增 $\gamma\delta$ T 细胞在抗肿瘤方面取得了一定的效果。翻阅相关文献,发现在诱导胃恶性肿瘤方面的研究甚少,而本研究主要探讨唑来膦酸联合 IL-2 诱导体外扩增胃癌患者的 $\gamma\delta$ T 细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择解放军第 94 医院普外科 2014 年 11 月-2015 年 6 月收入院的胃癌患者 30 例为实验组,其临床病理分期为 IIA-B 期 15 例,IIIA 期 15 例;男性 16 例,女性 14 例;年龄为 53-76 岁,平均 64.7 岁。以解放军第 94 医院检验科的 30 例健康人群作为对照组,男性 15 例,女性 15 例,年龄 50-74 岁,平均为 59.3 岁。分别采集实验组和对照组患者静脉外周全血 15-20 mL。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600451)

作者简介:田爱(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:消化道肿瘤的临床及相关基础研究,E-mail: mengyusitian@126.com

[△] 通讯作者:许永春(1971-),男,硕士生导师,副教授,主要研究方向:消化道肿瘤的临床及相关基础研究,

E-mail: 13970039129@139.com,电话:0791-88848538

(收稿日期:2017-01-18 接受日期:2017-02-22)

1.2 实验试剂和仪器

唑来膦酸(Zoledronate)购自 Sigma 公司;rhIL-2 购自北京四环生物制药公司;RPMI1640 培养基、0.25 %胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)均为 Gibco 公司产品;青链霉素混合液(P/S)购自 Solarbio 公司;淋巴细胞分离液购自中国医科院血液研究所;人 AB 型血清购自江西省血站;藻红蛋白(Phycoerythrin,PE)标记抗体和荧光素异硫氰酸盐(Fluorescein Isothiocyanate,FITC);anti-CD69、anti-CD3-FITC、羊抗鼠 IgG-FITC、anti-TCRgd-PE 均购自美国 BD 公司;anti-CD4 磁珠、anti-CD8 磁珠,羊抗鼠 IgG 磁珠购自 Miltenyi Biotec 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司、CO₂ 培养箱购自 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞分离与培养 分别采集胃癌患者和健康对照者外周静脉全血 15-20 mL, 放置于含有肝素钠的 BD 管中, 采用 Tramonti D[®] 等的方法, 加入淋巴细胞分离液, 2000 rpm, 15 min, 吸取单个核细胞层, 用生理盐水洗涤 3 遍(1500 rpm, 10 min), 加入 RPMI 1640 培养液中(配制方法为 90% RPMI1640+10% FBS+1% P/S), 调整细胞数约为 $1-3 \times 10^6/L$, 加入 $5 \mu M$ 唑来膦酸、1000 IU/mL rhIL-2 和 10 % 人 AB 型血清, 置于 75 cm² 细胞瓶中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每隔 2-3 天弃去上清, 加入含有 1000 IU/mL rhIL-2 的上述 RPMI 1640 培养液, 根据细胞生长情况进行传代至 6 孔板中, 并设置未加唑来膦酸/rhIL-2 为对照组, 直至 12 天时收集贴壁生长细胞进行下一步实验。

1.3.2 $\gamma\delta T$ 细胞的分离 用磁珠激活细胞分选法(MACS)分离得到 $\gamma\delta T$ 细胞按照说明书操作步骤。具体如下:取一瓶细胞培养 4 小时后, 将非贴壁细胞用 anti-CD4 磁珠选出 CD4⁺T 细胞, 然后用鼠抗人 CD16 单抗及羊抗鼠 IgG 二抗磁珠去除 NK 细胞, 用 anti-CD8 磁珠除去 CD8⁺T 细胞, 剩余的细胞主要为 $\gamma\delta T$ 细胞。其余瓶中细胞具体方法同上。

1.3.3 $\gamma\delta T$ 细胞鉴定 单克隆抗体表型分析如下:将上述分离

所得到的 $\gamma\delta T$ 细胞中分别加入抗 TCRab-PE、抗 TCRgd-FITC、抗 CD3-FITC、抗 TCRD2-FITC、抗 TCRG9-FITC 20 μL , 充分混匀, 放置 4℃, 30 min, 避光, 用含有 1% FBS 的 PBS 洗涤 2 遍, 再用含有 0.5 mL 1 %多聚甲醛染色固定液重悬细胞, 并设置对照组, 使用流式细胞仪分析其百分率。

1.3.4 $\gamma\delta T$ 细胞表面受体鉴定 将 $\gamma\delta T$ 细胞中加入荧光标记的 CD69, 方法同上, 同样设置对照组, 采用流式细胞仪分析其表面受体表达情况。

1.4 统计学处理

所有数据均使用 SPSS17.0 软件分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 镜下观察 $\gamma\delta T$ 细胞的形态

唑来膦酸联合 IL-2 诱导 $\gamma\delta T$ 细胞, 24h 后显微镜下即可见贴壁, 培养第 3 天镜下可观察到细胞成梭状和簇状生长, 并有少量悬浮细胞。在培养第 12 天时镜下观察到大量集落形成和单个呈梭状贴壁细胞。唑来膦酸联合 IL-2 诱导 $\gamma\delta T$ 细胞 24h 后, 显微镜下即可见贴壁, 培养第 3 天镜下可观察到细胞成梭状和簇状生长, 并有少量悬浮细胞。在培养第 12 天时, 镜下观察到大量集落形成和单个呈梭状贴壁细胞。

2.2 流式细胞仪(FCM)检测 $\gamma\delta T$ 细胞的数量及百分率

分别收集健康人群和胃癌患者培养前及培养 12 天后的 $\gamma\delta T$ 细胞进行 mAb 荧光标记后经流式细胞仪检测并分析其细胞数量, 具体按照说明书操作步骤。PBMC 未诱导前, 健康人群的 $\gamma\delta T$ 细胞数及百分比分别为 51.7 ± 18.3 、 19.74 ± 3.61 %; 诱导 12 天后, 其细胞数及百分比分别高达 473.5 ± 101.3 、 92.31 ± 10.23 % (见表 1)。PBMC 未诱导前, 胃癌患者的 $\gamma\delta T$ 细胞数及百分比分别为 13.2 ± 3.83 、 6.12 ± 1.94 %, 诱导 12 天后其细胞数及百分比分别达到 182.0 ± 3.51 、 70.63 ± 9.23 % (见表 2)。

表 1 对照组中唑来膦酸/IL-2 诱导前后的 CD3⁺ $\gamma\delta T$ 细胞数值比较

Table 1 Comparison of the absolute count and percentage of CD3⁺ $\gamma\delta T$ cell of the control group before and after the induction by zoledronate and interleukin 2

	The absolute count(/ μL)	Percentage (%)	P value
Before induction(n=30)	51.7 ± 18.3	19.74 ± 3.61	0.000
After induction(n=30)	473.5 ± 101.3	92.31 ± 10.23	0.013

Note: $P < 0.05$ vs Before stimulation in control group.

表 2 在胃癌组中唑来膦酸/IL-2 诱导前后的 CD3⁺ $\gamma\delta T$ 细胞数值比较

Table 2 Comparison of the absolute count and percentage of CD3⁺ $\gamma\delta T$ cell of the gastric cancer group before and after the induction by zoledronate and interleukin 2

	The absolute count(/ μL)	Percentage (%)	P value
Before induction(n=30)	13.2 ± 3.83	6.12 ± 1.94	0.002
After induction(n=30)	182.0 ± 3.51	70.63 ± 9.23	0.023

Note: $P < 0.05$ vs Before stimulation in gastric cancer group.

2.3 T 细胞的表面标志物 CD69 测定

分别收集健康人群和胃癌患者培养 12 天的 $\gamma\delta T$ 细胞行 mAb 荧光标记后经流式细胞仪分析其表面标志物表达。外周

静脉全血 PBMC 未诱导前, 健康人群的 CD69 表达为 0.74 ± 0.14 %, 诱导 24 h 后其细胞数高达 72.31 ± 9.01 %; PBMC 诱导前胃癌患者 CD69 为 0.22 ± 0.06 %; 诱导 24 h 后胃癌患者的

CD69 达到 $49.47 \pm 5.09\%$, 随后随着时间的延长其降低, 72 h 时, 其分别下降至 $47.62 \pm 4.56\%$ 、 $37.32 \pm 3.12\%$, (见图 1)。

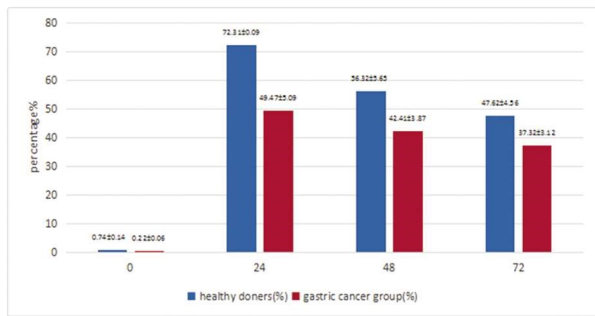


图 1 唑来膦酸/IL-2 活化 $\gamma\delta$ T 细胞 CD69 的表达

Fig.1 CD69 expression in $\gamma\delta$ T cells activated by zoledronate and IL-2

3 讨论

关于 $\gamma\delta$ T 细胞的分类, 目前还没有相关共识, 多为 CD4CD8⁻ 的双阴性 T 细胞(少部分为 CD8⁺), 由 TCR 信号途径调节表达的锌指转录因子 ThPOK 控制 $\gamma\delta$ T 细胞的发育和成熟^[9]。Ribot 等^[10]发现 $\gamma\delta$ T 细胞在胸腺分化过程中可形成具有不同功能特性的亚群, 比如 CD27⁺ $\gamma\delta$ T 细胞主要分泌 IFN- γ , CD27⁻ $\gamma\delta$ T 细胞主要分泌 IL-17。已有研究表明 $\gamma\delta$ T 细胞活性强且杀瘤谱广, 对体内多种肿瘤有较强的杀伤作用^[11], 无需肽段配基作用, 能够直接识别 MHC 类分子^[12]。人类 $\gamma\delta$ T 细胞有些特性与树突状细胞类似, 能够提供诱导增殖、分化及杀伤靶细胞的信号, 发挥抗原提呈等作用^[13,14]。Lei F 等^[15]研究发现经过抗原特异性 CTL 诱导多向性干细胞(iPS)分化成 CD8⁺CTL, 在体内形成的 TCR 转导的 iPS 细胞在体外用肽类刺激通过分泌 IL-2 和 IFN- γ , 以达到杀伤肿瘤细胞的目的。敲除 $\gamma\delta$ T 细胞基因 CD3⁺ $\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤免疫监视中起到重要作用^[16,17]。活化的 $\gamma\delta$ T 细胞可直接被激活成为具有细胞毒作用的免疫细胞, 同时能够分泌 TNF- α 、GM-CSF、INF- γ 、巨噬细胞趋化因子、巨噬细胞炎症因子等一系列趋化性细胞因子, 继而能够杀伤对 NK 细胞不敏感的靶细胞^[18]。同时也能分泌颗粒酶 B、穿孔素和 CD107a 等淋巴细胞细胞毒活性的标志, 其表达水平可以反映淋巴细胞的抗肿瘤活性^[19,20]。

$\gamma\delta$ T 细胞在过继性免疫治疗方面的作用已应用于临床^[21], 比如其能够浸润肺癌、胃癌及淋巴瘤等肿瘤中, 并对肿瘤表现出高效的杀伤活性^[22]。最近研究显示其还可以增殖活化、诱导免疫效应细胞, 进一步发挥抗肿瘤的作用。Lertworapreecha M 等^[23]研究证明二磷酸盐可与 $\gamma\delta$ T 细胞分子独特结合并使其活化, 但单独使用二磷酸盐诱导 $\gamma\delta$ T 细胞扩增不明显, 而与 IL-2 联合使用可显著诱导健康人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖; Li Z 等^[24]用体外扩展 $\gamma\delta$ T 细胞来杀伤骨肉瘤细胞株 HOS 和 U2OS 并发现用 IFN- γ 预处理的靶细胞通过 $\gamma\delta$ T 细胞增强对肿瘤细胞的杀伤性, 同时 INF- γ 通过 Fas/FasL 途径激活 $\gamma\delta$ T 细胞来增强细胞毒活性。由此可见, $\gamma\delta$ T 细胞在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。

有实验显示, IL-17 是 $\gamma\delta$ T 细胞合成和分泌的主要细胞因子, 在炎症和免疫反应中起重要的调控作用^[25,26]。Wada 等^[27]利

用膦酸联合 IL-2 体外培养 V δ 2+ $\gamma\delta$ T 治疗晚期胃恶性肿瘤伴腹水的患者, 发现治疗后患者腹水中的肿瘤细胞数量较治疗前显著减少, 且腹水得到控制, 提示 V δ 2+ $\gamma\delta$ T 细胞具有抗肿瘤效果。而本实验结果显示对照组和胃癌患者(各 30 例)的 PBMC 经唑来膦酸联合 IL-2 诱导后, $\gamma\delta$ T 细胞数量均明显增加, 但健康对照组的 $\gamma\delta$ T 细胞明显高于胃癌组, 其原因可能为肿瘤宿主处于免疫抑制状态, 免疫水平低下所致, 具体机制尚需进一步研究。而 CD69 为 T 细胞活化标志性分子, 活化后 2 小时即可被检测。 $\gamma\delta$ T 细胞与其他治疗方法联合应用, 主要是因为其具有强大的抗肿瘤细胞毒性及其在体外相对容易传代的能力^[28]。已有报道^[29]早期胃癌患者外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞比例显著增加, 晚期胃癌患者中 $\gamma\delta$ T 细胞明显降低, 可推断 $\gamma\delta$ T 细胞在早期胃癌患者外周血中升高可具有抗肿瘤作用, 而在晚期胃癌中下降可能与肿瘤进展、免疫系统被抑制有关。本实验的研究结果显示未活化时的对照组和胃癌患者的 $\gamma\delta$ T 细胞很少表达 CD69, 经唑来膦酸联合 IL-2 刺激 24h 后达到高峰, 其分别为 72.31%、49.47%, 而后随着时间的延长其表达呈下降趋势, 以上结果表明唑来膦酸与 IL-2 联合诱导 $\gamma\delta$ T 细胞增殖方案有周期短、特异性高等特点, 可充分发挥其广谱杀伤靶细胞和特异性识别肿瘤抗原等效能, 可为 $\gamma\delta$ T 细胞生物学特性的进一步研究和临床上肿瘤的过继性免疫治疗提供细胞来源。但由于体外增值条件要求严格, 程序性复杂, 不利于临床推广, 加之其研究机制复杂, 并可识别多种抗原, 目前难以全面概括其在人类疾病中的作用, 其抗肿瘤方面的远期效果还需进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Chen WQ, Zeng HM. Report of cancer incidence and mortality in China, 2011[J]. China Cancer, 2015, 24(1): 1-10
- [2] Tyler CJ, Doherty DG, Moser B, et al. Human V γ 9/V δ 2 T cells in- nate adaptors of the immune system [J]. Cell Immunol, 2015, 296 (1): 10-21
- [3] Braza MS, Klein B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9 δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside [J]. Br J Haematol, 2013, 160 (2): 123-132
- [4] Vantourout p, Hayday A. Six-of-the-best unique contribution of $\gamma\delta$ T cell to immunology[J]. Nat Rev Immunol, 2015, 296(1): 10-21
- [5] Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity [J]. Current Opinion in Immunology, 2006, 18 (1): 31-38
- [6] Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2000, 50(1): 7-33
- [7] Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trials [J]. Cell Mol Immunol, 2013, 10(1): 35-41
- [8] Tramonti D, Andrew EM, Rhodes K, et al. Evidence for the opposing roles of different $\gamma\delta$ T cell subsets in macrophage homeostasis[J]. European Journal of Immunology, 2006, 36(7): 1729-1738
- [9] Lee AJ, Kim SG, Chae HD, et al. $\gamma\delta$ T cells are increased in the peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(19-20): 1495-1499
- [10] Ribot JC, Ribeiro ST, Correia DV, et al. Human $\gamma\delta$ thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector

- T cells upon IL-2/IL-5 signaling [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (5): 2237-2243
- [11] Kato, Tanaka Y, Miyagawa F, et al. Targeting of tumor cells for human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptide antigens [J]. *J Immunol*, 2001, 167: 5092-5098
- [12] Bautista-Quach MA, Tong T, Nademanee A, et al. Primary Cutaneous Gamma-Delta T-Cell Lymphoma With Marked Pagetoid Epidermotropism Shortly After Allogeneic Stem Cell Transplantation[J]. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2013, 13(6): e6-e9
- [13] Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, et al. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells [J]. *J Immunol*, 2012, 188(4): 1708-1716
- [14] Meuter S, Eberl M, Moser B. Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human gammadelta T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8730-8735
- [15] Lei F, Zhao B, Haque R, et al. In vivo programming of tumor antigen-specific T lymphocytes from pluripotent stem cells to promote cancer immunosurveillance[J]. *Cancer Res*, 2013, 71(14): 4742-4747
- [16] Born W K, O'Brien R L. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 31-38
- [17] Moser B, Brandes M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC[J]. *Trends Immunol*, 2006, 27: 112-118
- [18] Wesch D, Peters C, Oberg H-H, et al. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 68(14): 2357-2370
- [19] He J, Li L, Wei W, et al. Expression of perforin and granzyme-B in peripheral blood lymphocyte in patients with Prostate cancer and the clinical significance [J]. *Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, 2015, 40(4): 387-391
- [20] Viel S, Charrier E, Marccais A, et al. Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(9): e26011
- [21] Fournie JJ, Sicard H, Poupot M, et al. What lessons can be learned from gammadelta T cell-based cancer immunotherapy trial [J]. *Cell Mol Immunol*, 2013, 10(1): 35-41
- [22] Gertner-Dardenne J, Castellano R, Mamessier E, et al. Human V γ 9 δ 2T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts[J]. *J Immunol*, 2012, 188(9): 4701-4708
- [23] Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, et al. Cytotoxic function of gamma delta (gamma/delta) T cells against pamidronate-treated cervical cancer cells[J]. *Indian J Exp Biol*, 2013, 51(8): 597-605
- [24] Li Z, Xu Q, Peng H, et al. IFN- γ enhances HOS and U2OS cell lines susceptibility to $\gamma\delta$ T cell-mediated killing through the Fas/Fas ligand pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 496-503
- [25] Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases[J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2014, 31: 256-261
- [26] Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation [J]. *J Autoimmun*, 2015, 60: 1-11
- [27] Wada I, Matsushita H, Noji S, et al. Intraperitoneal injection of in vitro expanded V γ 9V δ 2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2014, 3(2): 362-375
- [28] Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, et al. Harnessing $\gamma\delta$ T cells in anti-cancer immunotherapies[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(5): 199-206
- [29] Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best unique contribution of $\gamma\delta$ T cell to immunology[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 296(1): 10-21

(上接第 3702 页)

- [12] Frantz TL, Steenburg SD, Gaski GE, et al. Tissue damage volume predicts organ dysfunction and inflammation after injury [J]. *J Surg Res*, 2016, 202(1): 188-195
- [13] Arakawa R, Mori N, Kagawa N, et al. Meningococcal Septicemia Revealing Multiple Myeloma: A Case Report[J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 2016, 90(3): 336-339
- [14] Protonotariou E, Arampatzi A, Ourailoglou V, et al. An unusual case of Streptococcus agalactiae meningitis in a patient with systemic lupus erythematosus[J]. *Hippokratia*, 2015, 19(4): 372-373
- [15] Yeung KK, Groeneveld M, Lu JJ, et al. Organ protection during aortic cross-clamping [J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2016, 30(3): 305-315
- [16] Chu LP, Zhou JJ, Yu YF, et al. Clinical effects of pulse high-volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Ther Apher Dial*, 2013, 17(1): 78-83
- [17] Tang Y, Zhang L, Fu P, et al. Hemoperfusion plus continuous veno-venous hemofiltration in a pregnant woman with severe acute pancreatitis: a case report[J]. *Int Urol Nephrol*, 2012, 44(3): 987-990
- [18] Sirvent JM, Vailes M, Navas E, et al. Outcome of critically ill patients with acute renal failure and multiple organ failure treated with continuous venovenous haemodiafiltration [J]. *Med Intensiva*, 2010, 34(2): 95-101
- [19] Li M, Wang Z, Wang Y, et al. Part of plasmapheresis with plasma filtration adsorption combined with continuous hemodiafiltration in the treatment of severe acute liver failure[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2582-2584
- [20] Safaei Asl A, Dadashzadeh P. Acute kidney injury in patients with paraquat intoxication; a case report and review of the literature [J]. *J Renal Inj Prev*, 2016, 5(4): 203-206