

胃癌干细胞抗原负载树突细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞

文利红¹, 胡文杰¹, 叶恒曦², 向卫东³(¹乐山职业技术学院, 四川省乐山市 614000; ²乐山市中医医院肾病科, 四川省乐山市 614000; ³西南医科大学附属医院(原泸州医学院附属医院), 四川省泸州市 646000)

引用本文: 文利红, 胡文杰, 叶恒曦, 向卫东. 胃癌干细胞抗原负载树突细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(36):5345-5350.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.36.004

ORCID: 0000-0002-0113-628X(文利红)

文章快速阅读:

胃癌干细胞抗原负载树突细胞结合细胞因子诱导杀伤细胞对胃癌细胞的影响

分离人胃癌侧群细胞,
即胃癌干细胞, 冻融法
制备肿瘤抗原

将胃癌干细胞负载树
突细胞-结合细胞因
子诱导杀伤细胞

胃癌干细胞作为抗原刺激树突细胞, 可
增强树突细胞免疫表达, 提高对胃癌细
胞的杀伤作用

文利红, 女, 1980年生, 四川省仁寿县, 汉族, 主要从事肿瘤方面的研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)36-05345-06

稿件接受: 2016-06-04

文题释义:

侧群细胞: 是利用 Hoechst 染料和流式细胞术进行造血干/祖细胞分离时发现的一群特殊细胞, 广泛分布于多种成体组织、胚胎和某些肿瘤细胞系中; 它既具有类似于干细胞的自我更新和多向分化潜能, 还具有独特的表型标记和生物学特征, 代表了一种新的干细胞类型。对侧群细胞的研究, 不仅有助于人们增加对干细胞增殖、分化及其发育调控机制的理解, 同时还提供了一种从不同组织中分离纯化和利用多能干细胞的新策略, 为组织工程和细胞治疗提供新的干细胞来源。

树突状细胞与杀伤细胞: 是肿瘤免疫治疗的两个重要部分, 前者识别病原、激活获得性免疫系统, 后者通过发挥自身细胞毒性与分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞, 二者联合确保了一个高效和谐的免疫反应的完成。树突状细胞和杀伤细胞两者在抗肿瘤细胞中有一定的互补作用, 联合应用将取得“1+1>2”的疗效。树突状细胞-杀伤细胞免疫细胞疗法, 就是在体外培养诱导其分化为树突状细胞, 再用经抗原刺激的树突状细胞诱导杀伤细胞产生特异性肿瘤杀伤作用。

摘要

背景: 目前临床常用的治疗手段难以彻底消灭肿瘤, 其原因主要是由于肿瘤干细胞的存在。

目的: 探讨胃癌干细胞抗原负载树突细胞结合细胞因子诱导杀伤细胞对胃癌细胞的影响。

方法: 分离人胃癌细胞系侧群细胞, 利用冻融法制备肿瘤抗原, 将胃癌干细胞与树突细胞、树突细胞-杀伤细胞、胃癌细胞抗原、胃癌干细胞抗原进行联合培养, 采用 MTT 检测胃癌细胞杀伤率, 记录各组树突细胞表面成熟标志 CD83 表达率。

结果与结论: ①树突细胞组、树突细胞-杀伤细胞组、胃癌细胞抗原组的树突细胞表面成熟标志 CD83 表达率均显著低于胃癌干细胞抗原组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); ②树突细胞组、树突细胞-杀伤细胞组、胃癌细胞抗原组的胃癌细胞杀伤率均显著低于胃癌干细胞抗原组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); ③结果表明, 以胃癌干细胞作为抗原刺激树突细胞, 并结合细胞因子对杀伤细胞进行诱导, 可以促进细胞增殖以及提高胃癌细胞的杀伤能力。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 胃癌; 胃癌细胞; 胃癌干细胞; 抗原; 杀伤细胞; 树突细胞; 细胞因子; 诱导

主题词:

胃肿瘤; 肿瘤干细胞; 树突细胞; 组织工程

Tumor-killing effects of gastric cancer stem cells as antigens to stimulate dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells

Wen Li-hong¹, Hu Wen-jie¹, Ye Heng-xi², Xiang Wei-dong³ (¹Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000, Sichuan Province, China; ²Department of Nephropathy, Leshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Leshan 614000, Sichuan Province, China; ³Affiliated Hospital of Sichuan Medical University (formerly Affiliated Hospital of Luzhou Medical College), Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

Wen Li-hong, Leshan
Vocational and Technical
College, Leshan 614000,
Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: As the existence of tumor stem cells, it is difficult to completely eliminate tumors in clinic.
OBJECTIVE: To explore the tumor-killing effect of gastric cancer stem cells as antigen to stimulate dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells.

METHODS: Side population cells from human gastric cancer cell lines were isolated, and tumor antigen was prepared by freeze thawing method. After coculture with dendritic cells, dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells, gastric cancer cell antigen, and gastric cancer stem cell antigen, killing rates of gastric cancer cells were detected using MTT assay. Expression rate of CD83, a mature dendritic cell surface marker, was also detected.

RESULTS AND CONCLUSION: The CD83 expression level and killing rate of gastric cancer cells were both significantly lower in the gastric cancer stem cell antigen group than the other groups (both $P < 0.05$). These results indicate that gastric cancer stem cells as antigen to stimulate dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells can promote the proliferation of gastric cancer cells and elevate the ability to killing gastric cancer cells.

Subject headings: Stomach Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Dendritic Cells; Tissue Engineering

Cite this article: Wen LH, Hu WJ, Ye HX, Xiang WD. Tumor-killing effects of gastric cancer stem cells as antigens to stimulate dendritic cells combined with cytokine-induced killer cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(36):5345-5350.

0 引言 Introduction

早期研究认为肿瘤组织中所有细胞的分裂增殖能力基本相同^[1]。但是, Heimbürgert等^[2]对肿瘤细胞进行体外培养, 仅有少数肿瘤细胞发生分裂克隆, 其余的细胞则不具备分裂能力, 这一研究结果表明, 在肿瘤细胞中, 仅有少数具有致瘤性, 并由此提出肿瘤干细胞理论。之后, 经过大量的研究也发现, 肿瘤组织中的干细胞数量很少, 但会对肿瘤的发生、发展、浸润及转移等起到决定性的作用^[3-6]。肿瘤干细胞能够进行自我更新, 且具有多向分化潜能, 并表现出较强的不敏感性和耐药性等^[7]。肿瘤干细胞理论的出现, 为临床治疗各种肿瘤提供了新思路。

胃癌是一种常见恶性肿瘤, 发病率、病死率高, 严重威胁到人体健康。临床常采用手术、放疗、化疗等多种方式治疗, 但术后容易复发和转移, 预后较差。为此, 将肿瘤干细胞理论应用于胃癌相关研究之中, 探讨胃癌的发病机制及有效治疗方法已成为重要课题。树突细胞是一种抗原递呈细胞, 能高效摄取、加工处理以及呈递抗原等, 从而激发免疫反应^[8]。不同成熟度的树突细胞对机体生物免疫学功能的影响不同, 其中未成熟树突细胞刺激T细胞增殖活化功能较弱, 而成熟树突细胞能刺激T细胞增殖活化, 诱导机体免疫应答, 并在免疫应答的启动、调控以及维持等环节中发挥十分重要的作用^[9]。

负载胃癌干细胞作为抗原, 让树突细胞对相应的肿瘤信息予以精确记忆并进行捕获, 可以获得更好的肿瘤杀伤效果。为此, 实验采用胃癌干细胞作为抗原刺激树突细胞, 并结合细胞因子诱导杀伤细胞, 分析其在杀伤

胃癌细胞方面的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2015年5至6月在泸州医学院实验室完成。

1.3 材料

胃癌干细胞抗原负载树突细胞与细胞因子诱导杀伤细胞实验所用主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
重组人白细胞介素2	北京双鹭药业股份有限公司
重组人白细胞介素4	广州市振康医药有限公司
重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子	华北制药金坦生物技术股份有限公司
重组人干扰素 γ	上海东昕生物技术有限公司
肿瘤坏死因子 α	武汉博士德生物工程有限公司
抗CD3单抗	上海丰寿生物科技有限公司
DMEM培养基	上海扶生实业有限公司
5-氟尿嘧啶	西安海欣制药有限公司
四甲基唑蓝	南京绿合生化技术有限公司
Hoechst33342染色剂	北京雷根生物技术有限公司
胎牛血清	天津百蚩生物科技有限公司
离心机	江苏华大离心机股份有限公司
水浴锅	金坛市精达仪器制造有限公司
低温冰箱	浙江爱雪制冷电器有限公司

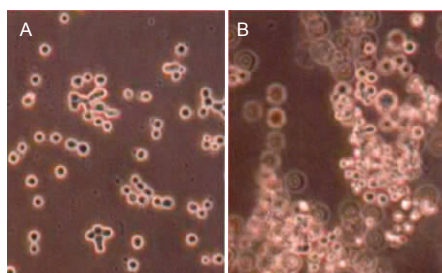


图1 侧群细胞在无血清培养基中的形态(×40)

Figure 1 Morphology of side population cells in the serum-free medium (×40)

图注: 图中A为初始状态下, 细胞呈悬浮生长; B为培养7 d之后, 形成克隆球。

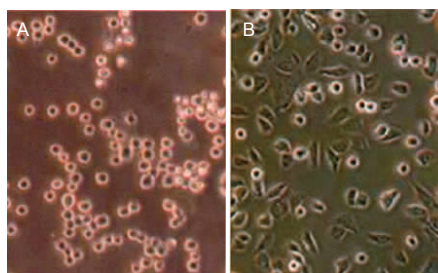


图2 非侧群细胞在无血清培养基中的形态(×40)

Figure 2 Morphology of non-side population cells in the serum-free medium (×40)

图注: 图中A为初始状态下, 细胞贴壁生长; B为培养7 d之后, 细胞缓慢增殖。

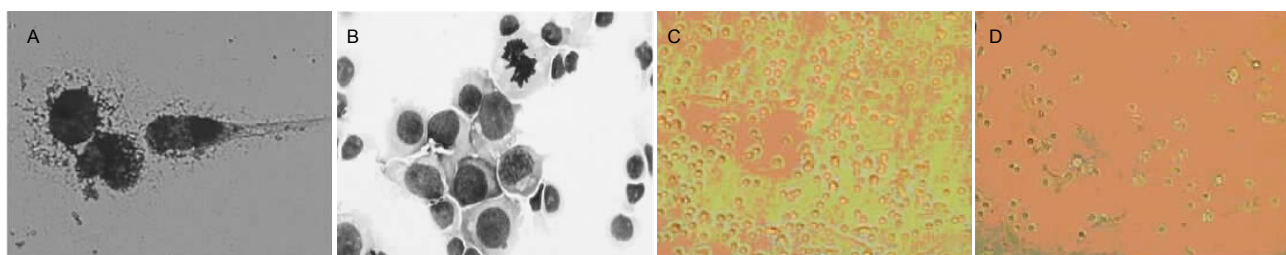


图3 树突细胞、杀伤细胞培养形态(×200)

Figure 3 Morphology of dendritic cells and killer cells (×200)

图注: 图中A为荧光显微镜下树突细胞; B为荧光显微镜下杀伤细胞; C为胃癌细胞抗原刺激下的树突细胞; D为胃癌干细胞抗原刺激下的树突细胞。

表1 各组树突细胞表面成熟标志 CD83 表达率 ($\bar{x} \pm s$, %)
Table 1 CD83 expression level in each group

组别	CD83 表达率
胃癌干细胞抗原组	80.40±10.23
树突细胞组	72.20±8.35 ^a
树突细胞联合杀伤细胞组	65.80±6.12 ^a
胃癌细胞抗原组	62.10±7.25 ^a

表注: 与胃癌干细胞抗原组比较, ^a $P < 0.05$ 。

人胃癌细胞系购自上海生博生物医药科技有限公司, 人胃癌侧群细胞系由泸州医学院肿瘤实验室提供。

1.4 实验方法

1.4.1 分离人胃癌细胞系侧群细胞 收集对数生长期的人胃癌细胞, 用Hoechst 33342染色并进行筛选, 其中Hoechst33342弱阳性/阴性细胞为侧群细胞, Hoechst33342阳性细胞为非侧群细胞。将分选后的细胞以PBS进行重悬计数, 用含青霉素、链霉素的DMEM培养基培养。

1.4.2 肿瘤抗原制备 采用冻融法制备肿瘤抗原, 收集对数生长期的胃癌细胞以及胃癌干细胞, 置于无血清的DMEM培养基中培养, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 置于低温冰箱中冻存, 然后置于水浴锅中孵育, 重复操作5

次, 离心后收集上清备用。

1.4.3 树突细胞联合杀伤细胞(DC-CIK)培养 获取健康孕妇脐血(均事先征得孕妇及其家属同意), 采用密度梯度离心法得到单核细胞, 置于培养箱中培养2 h, 其中悬浮细胞进行杀伤细胞培养, 贴壁细胞进行树突细胞培养。

悬浮细胞中添加50 μL 干扰素 γ (1 000 U/mL), 24 h之后添加50 μL 白细胞介素2 (1 000 U/mL), 24 h之后添加20 μL CD3 (100 g/L)。贴壁细胞中添加50 μL 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (50 g/L) 以及50 μL 白细胞介素4 (20 g/L)。于第5天将制备好的肿瘤抗原刺激树突细胞, 于第10天进行树突细胞联合杀伤细胞培养。细胞培养的第7天, 分别收集 2×10^6 个细胞直接荧光染色标记, 以流式细胞仪分析细胞表型CD83的表达。

1.4.4 MTT检测 收集处于对数生长期的胃癌细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 加入96孔板中, 每孔100 μL , 收集树突细胞、树突细胞联合杀伤细胞、胃癌细胞抗原刺激的树突细胞联合杀伤细胞和胃癌干细胞抗原刺激的树突细胞联合杀伤细胞, 将胃癌细胞设为靶细胞对照孔, 各设3个复孔, 效靶比20 : 1。利用酶标仪测得570 nm波长处各孔的吸光度值, 计算细胞杀伤率。

杀伤率=[1-(实验孔吸光度值-效应细胞对应孔吸光度值)/靶细胞对应孔吸光度值]×100%。

1.5 主要观察指标 ①胃癌细胞杀伤率; ②树突细胞表面成熟标志CD83表达率。

1.6 统计学分析 所有研究数据均录入SPSS 19.0统计学软件, 组间比较予以单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 胃癌干细胞培养 将侧群细胞置于无血清培养基中进行培养, 初始状态下, 细胞呈悬浮生长, 培养7 d之后, 形成克隆球(图1), 而非侧群细胞置于无血清培养基中进行培养, 呈现出逐渐贴壁生长且增殖缓慢的情况(图2)。

2.2 树突细胞、杀伤细胞培养形态 从脐血中分离得到单核细胞, 可见其表面光滑, 整体呈球形。在受到白细胞介素4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子刺激之后, 细胞形态出现变化, 长出毛刺。随着细胞培养时间的推移, 胞体体积和毛刺长度均逐渐增加, 见图3。

2.3 各组树突细胞表面成熟标志CD83表达率分析 树突细胞组、树突细胞联合杀伤细胞组、胃癌细胞抗原组的树突细胞表面成熟标志CD83表达率均显著低于胃癌干细胞抗原组, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

2.4 各组MTT检测结果分析 树突细胞组、树突细胞联合杀伤细胞组、胃癌细胞抗原组的胃癌细胞杀伤率分别为(49.7±0.8)%、(58.4±0.2)%、(72.3±0.6)%, 均显著低于胃癌干细胞抗原组(80.6±0.8)%, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

从干细胞角度进行分析, 肿瘤干细胞的出现是导致肿瘤产生的根本原因, 只有彻底消灭肿瘤干细胞才能实现真正的治愈^[9-10]。传统的手术、放化疗并不能完全消灭肿瘤干细胞^[11]。肿瘤干细胞具有很强耐药性^[12], 在接受常规化疗等治疗后, 肿瘤缩小, 而一旦停药之后仍可能原位复发^[13]。

在患有肿瘤之后, 机体会发生特异性细胞免疫过程, 进行抗肿瘤免疫, 其中主要参与的细胞为T淋巴细胞^[14-17]。在整个免疫过程中, 抗肿瘤免疫治疗疗效的首要关键是对T淋巴细胞进行有效特异性激活^[18]。在抗原递呈细胞家族中包含多种细胞, 其中树突细胞具有最强

的抗原递呈功能^[19]。树突细胞可以发挥出识别、吞噬、加工和向T淋巴细胞递呈抗原的作用, 能对初始型T淋巴细胞予以有效特异性激活, 使其成为效应型T淋巴细胞, 从而杀灭肿瘤细胞, 激发高效而特异的抗肿瘤免疫反应^[20-24]。根据多种不同类型细胞之间复杂的相互作用, 适应性免疫系统通过免疫反应这个过程, 消除外来物质和细胞^[25]。树突状细胞在这个过程中起着至关重要的作用, 可识别和内化入侵的病原体。在树突状细胞中, 各种入侵者的蛋白质, 包括那些将其与宿主细胞区分开来的蛋白(“抗原”)会遭到降解, 成为大量的短片段, 并显示在与特异性结合蛋白相联系的细胞表面上^[26-28]。暴露于树突细胞的外来抗原, 反过来又提醒另一类免疫细胞(即T细胞), 主动攻击入侵者, 有效地诱导对特定病原体的免疫应答^[29]。

随着抗肿瘤免疫机制的不断深入了解、新肿瘤特异性基因的不断发现以及对树突状细胞功能的进一步发掘, 以树突状细胞理论体系为基础的抗肿瘤生物免疫治疗研究已成为抗肿瘤细胞治疗领域的研究热点^[30-32]。生物免疫治疗利用树突细胞-杀伤细胞, 对人体的免疫功能进行调节, 积极影响机体的新陈代谢状态, 并加快毒素的排出。通过生物免疫治疗, 可以在有效杀伤各种肿瘤细胞的同时, 对人体的免疫功能产生十分积极的影响, 并能有效清除手术以及放、化疗治疗之后所残留的各种肿瘤细胞和微小病灶。在生物免疫治疗过程中, 主要通过树突细胞和杀伤细胞的共同作用来消灭肿瘤细胞, 其中树突状细胞可以发挥出搜索以及识别作用, 及时发现肿瘤细胞, 而杀伤细胞通过发挥自身细胞毒性与分泌细胞因子杀伤肿瘤细胞^[33-37], 二者联合确保了一个高效和谐的免疫反应的完成。为了保证效果, 需要寻找一种具有较强特异性的抗原刺激树突细胞, 以提高靶向杀伤效果, 成为肿瘤治疗的重要研究方向。钟国成等^[38]将负载自身肿瘤抗原的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共培养后, 细胞因子诱导的杀伤细胞的体外特异性和非特异性杀瘤活性明显提高, 说明负载自体肿瘤细胞裂解物的树突状细胞疫苗联合细胞因子诱导的杀伤细胞在体外能明显增强对乳腺癌细胞的杀伤作用, 亦能增强乳腺癌患者的细胞免疫功能, 取得较理想的临床免疫疗效。梁芳芳等^[39]研究表明来源白血病耐药株 K562/A02 干细胞的树突细胞功能正常, 同时该来源树突细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞能杀伤 K562/A02 干细胞, 但对其无明显凋亡作用。

实验发现, 树突细胞-杀伤细胞在负载胃癌干细胞之后, 杀伤胃癌细胞能力得到显著提高, 这一结果表明, 胃癌干细胞刺激的树突细胞-杀伤细胞显著提高对肿瘤细胞杀伤能力, 与其他学者的报道基本一致^[33-39]。分析出现这一结果的原因, 可能是胃癌干细胞抗原参与了免疫系统对肿瘤的特异性识别能力, 从而达到较好的肿瘤细胞杀伤效果^[39-40]。在利用胃癌干细胞作为抗原刺激树突细胞之后 CD83 表达率增加, 胃癌干细胞刺激的树突细胞-杀伤细胞能促进树突细胞成熟, 提高免疫原性。经过胃癌干细胞抗原刺激的树突细胞成熟之后, 与杀伤细胞进行联合培养, 还可以增强杀伤细胞活性, 从而提高其杀伤肿瘤细胞的能力。受到实验样本数量以及观察时间等因素的影响, 研究所得到的相关结果以及相应的结论可能存在一定的片面性和不准确, 还需要在今后的研究中予以进一步完善和分析。

作者贡献: 第一作者文利红负责设计和实施, 向卫东、胡文杰负责实施及文章的修改, 叶恒曦负责修改。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 吴婷, 李锦毅, 陆士新, 等. 人胃癌侧群细胞的分离鉴定和生物学特性分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(4): 264-268.
- [2] Heimberger AB, Sampson JH. The PEPvIII-KLH (CDX-110) vaccine in glioblastoma multiforme patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(8):1087-1098.
- [3] Giannakis M, Chen SL, Karam SM, et al. Helicobacter pylori evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(11):4358-4363.
- [4] Fonge H, Leyton JV. Positron emission tomographic imaging of iodine 124 anti-prostate stem cell antigen-engineered antibody fragments in LAPC-9 tumor-bearing severe combined immunodeficiency mice. *Mol Imaging*. 2013;12(3):191-202.
- [5] Hasegawa T, Yashiro M, Nishii T, et al. Cancer-associated fibroblasts might sustain the stemness of scirrhous gastric cancer cells via transforming growth factor- β signaling. *Int J Cancer*. 2014;134(8):1785-1795.
- [6] Cheng LL, Itahana Y, Lei ZD, et al. TP53 genomic status regulates sensitivity of gastric cancer cells to the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep). *Clin Cancer Res*. 2012;18(15):4201-4212.
- [7] 肖宗宇. 脑肿瘤干细胞RNA致敏树突状细胞治疗9L脑肿瘤的实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [8] 卢璐祥. 负载胶质瘤干细胞抗原的树突状细胞对脑胶质瘤治疗作用的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [9] 张娜. 5-氟尿嘧啶联合DC-CIK细胞对胃癌细胞及其侧群细胞杀伤作用的体外研究[D]. 承德: 承德医学院, 2014.
- [10] 荣黎, 吴小翎. 胃癌侧群细胞耐药性研究及干细胞相关基因检测[J]. 世界科技研究与发展, 2011, 33(6): 1081-1084.
- [11] Liu G, Neumeister M, Reichensperger J, et al. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a cancer stem cell-like gastric cancer cell model. *Int J Oncol*. 2013;43(4):1301-1309.
- [12] Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, et al. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(5):411-418.
- [13] Zhou W, Sun M, Wang DL, et al. Silencing of RegIV by shRNA causes the loss of stemness properties of cancer stem cells in MKN45 gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 2013;30(6):2685-2690.
- [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, 42(6): 554-557.
- [15] Kim KY, Yi BR, Lee HR, et al. Stem cells with fused gene expression of cytosine deaminase and interferon- β migrate to human gastric cancer cells and result in synergistic growth inhibition for potential therapeutic use. *Int J Oncol*. 2012;40(4): 1097-1104.
- [16] Uehara T, Ma D, Yao Y, et al. H. pylori infection is associated with DNA damage of Lgr5-positive epithelial stem cells in the stomach of patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2013;58(1):140-149.
- [17] 谢云青, 郑秋红, 应敏刚, 等. 靶向乳腺癌干细胞树突细胞瘤苗核酸抗原的制备[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(2): 144-147.

- [18] 邸立军,任军,宋国红,等.自体外周血CD34⁺干细胞来源树突状细胞体外扩增治疗恶性体腔积液[J].北京大学学报:医学版,2008,40(5):486-488.
- [19] 张丽莉,李世俊,司玉玲,等.来源于干细胞的树突细胞激活免疫细胞对同源白血病干细胞的杀伤作用[J].天津医药,2012,40(5):420-423.
- [20] 吕翔,王益华,陈蕾.组织细胞肉瘤和树突细胞肿瘤的WHO分类介绍[J].临床与实验病理学杂志,2005,21(5):525-528.
- [21] 沈冬,何志旭,刘俊峰,等.胚胎干细胞来源的树突状细胞骨髓瘤疫苗抗肿瘤功能的观察[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(14):1068-1072.
- [22] Wu C, Xie Y, Gao F, et al. Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers. *Gene*. 2013; 525(1):18-25.
- [23] 郑秋红,谢云青,刘健,等.乳腺癌干细胞样细胞mRNA致敏的树突状细胞疫苗免疫治疗研究[J].福建医科大学学报,2012,46(3):156-160.
- [24] 梁芳芳.干细胞来源DC与CIK共培养抗K562/A02及其干细胞的体外研究[D]. 天津:天津医科大学,2013.
- [25] Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, et al. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology*. 2012;79(6):290-306.
- [26] She JJ, Zhang PG, Wang X, et al. Side population cells isolated from KATO III human gastric cancer cell line have cancer stem cell-like characteristics. *World J Gastroenterol*. 2012;18(33):4610-4617.
- [27] 刘俊峰,何志旭,沈冬,等.树突细胞骨髓瘤疫苗的体外抗肿瘤活性[J].实用儿科临床杂志,2008,23(3):176-178.
- [28] 罗社文,毛积分,赵凤翎,等.自体肿瘤抗原负载的树突细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞治疗中晚期非小细胞肺癌[J].肿瘤研究与临床,2011,23(9):588-590,597.
- [29] 斯晓明,张红梅,张利旺,等.肿瘤患者造血干细胞来源的树突状细胞的制备及鉴定[J].陕西医学杂志,2009, 38(11):1445-1447.
- [30] Kanzawa M, Semba S, Hara S, et al. WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells. *Pathobiology*. 2013;80(5):235-244.
- [31] 王守练,俞继卫,蔡成,等.RNA干扰抑制KATO-III CD133阳性胃癌细胞CD133基因表达及其生物学特性的影响[J].中华胃肠外科杂志,2013,16(9):889-894.
- [32] 吴松洁,贾晓渊,钱其军,等.人胃癌细胞系BGC-823中SP细胞的耐药性研究[J].浙江理工大学学报,2008,25(5):573-577.
- [33] Yu X, Xia W, Zhang T, et al. Enhanced cytotoxicity of IL-24 gene-modified dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells to hepatocellular carcinoma cells. *Int J Hematol*. 2010;92(2):276-282.
- [34] 何跃,谢新波,秦文珍,等.特异性抗原致敏的 DC-CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤效应[J]. 中国生物制品学杂志,2007,20(5):343-345.
- [35] 徐林,张维东. 树突状细胞在非小细胞肺癌治疗中的研究进展[J].实用癌症杂志,2009,24(4):427-428,431.
- [36] Ho VT, Vanneman M, Kim H, et al. Biologic activity of irradiated, autologous, GM-CSF-secreting leukemia cell vaccines early after allogeneic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15825-15830.
- [37] Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, et al. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(25):17635-17651.
- [38] 钟国成,敬新蓉,李莉,等.负载抗原的树突细胞联合细胞因子诱导的杀伤细胞在乳腺癌的临床研究[J].泸州医学院学报,2008,31(2):130-135.
- [39] 梁芳芳,庞华,司玉玲,等.干细胞来源DC与CIK共培养抗K562/A02干细胞的体外研究[J].天津医药,2013,41(4):289-292.
- [40] 庞冲,张腾月,王长利,等.肿瘤干细胞来源的DC-CIK对同源肿瘤细胞的杀伤作用[J].天津医药,2014,42(10):972-976.