

本文引用:张世魁,梅家转,刘桂举,等.厄洛替尼作用后表皮生长因子受体突变的人肺腺癌 HCC827 细胞对细胞因子诱导的杀伤细胞的杀伤敏感性[J].新乡医学院学报,2015,32(4):306-309,313.

【基础研究】

# 厄洛替尼作用后表皮生长因子受体突变的人肺腺癌 HCC827 细胞对细胞因子诱导的杀伤细胞的杀伤敏感性

张世魁<sup>1,2</sup>, 梅家转<sup>2</sup>, 刘桂举<sup>2</sup>, 冯睿婷<sup>2</sup>

(1. 新乡医学院, 河南 新乡 453003; 2. 郑州人民医院肿瘤内科, 河南 郑州 450003)

**摘要:** **目的** 观察表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼及 EGFR 下游主要分子对人肺腺癌 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体表达的影响,探讨厄洛替尼作用于肺腺癌 HCC827 细胞后,细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞对 HCC827 细胞杀伤活性的变化。**方法** HCC827 细胞分为空白对照组及厄洛替尼 5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组,应用流式细胞仪检测细胞表面 NKG2D 配体主要组织相容性复合体 I 类链相关蛋白(MIC) A、B 及 UL16 结合蛋白(ULBP) 1、2、3 的表达。HCC827 细胞培养 24 h 后,分别以 EGFR 下游分子磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂 LY294002、丝裂原活化蛋白激酶抑制剂 SB203580、信号传导及转录激活因子 3 抑制剂 STAT21、蛋白激酶 C 抑制剂 Rottlerin 进行作用,应用流式细胞仪分析 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 的表达,并与空白对照组进行比较。乳酸脱氢酶释放法检测 CIK 细胞对空白对照组和厄洛替尼组 HCC827 细胞的杀伤活性。**结果** 与空白对照组比较,厄洛替尼 5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICB、ULBP1 表达显著增高( $P < 0.05$ ),MICA、ULBP2、ULBP3 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ );厄洛替尼 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组与 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较,HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与空白对照组比较,SB203580 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),STAT21 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB 表达显著增高( $P < 0.05$ ),LY294002 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA 表达显著降低( $P < 0.05$ ),Rottlerin 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 ULBP1 表达显著增高( $P < 0.05$ )。同一效靶比时,CIK 细胞对厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率均显著高于未经药物作用组( $P < 0.05$ )。效靶比 20 : 1 时经 NKG2D 单抗封闭后的 CIK 细胞对未经药物作用组和 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 厄洛替尼能增高 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体表达,增强 CIK 细胞的杀伤活性。

**关键词:** 肺癌;表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂;细胞因子诱导的杀伤细胞;NKG2D 配体

**中图分类号:** R392.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)04-0306-05

## Susceptibility of human lung adenocarcinoma cancer HCC827 cells with epidermal growth factor receptor mutation to cytokine-induced killer cells after treated with erlotinib

ZHANG Shi-kui<sup>1,2</sup>, MEI Jia-zhuan<sup>2</sup>, LIU Gui-ju<sup>2</sup>, FENG Rui-ting<sup>2</sup>

(1. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Oncology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of epidermal growth factor receptor(EGFR) tyrosine kinase inhibitor erlotinib and EGFR downstream regulators on the expression of natural killer group 2, member D receptor(NKG2D) ligands on human lung adenocarcinoma cancer HCC827 cells and detect the cytotoxicity mediated by cytokine-induced killer(CIK) cells against HCC827 cells after treated with erlotinib. **Methods** The HCC827 cells were divided into blank control group and erlotinib 5, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group. The expression of NKG2D ligands major histocompatibility complex class I chain-related protein(MIC) A, B and UL16 binding protein(ULBP) 1, 2, 3 on HCC827 cells was detected by flow cytometry. After cultured for 24 h and treated with the inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase LY294002, the inhibitors of mitogen-activated protein kinases SB203580, the inhibitors of signal transducers and activators of transcription 3 STAT21, and the inhibitors of protein kinase C rottlerin respectively, the expression of NKG2D ligands(MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) was assayed by flow cytometry.

DOI: 10.7683/xyxyxb.2015.04.005

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 郑州市科技创新领军人才基金项目(编号: 121PLJRC532)

作者简介: 张世魁(1981-), 男, 山东东明人, 在读硕士研究生, 医师, 主要从事肿瘤内科临床工作。

通信作者: 梅家转(1966-), 男, 河南南阳人, 博士, 主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究; E-mail: mjzhuan@163.com。

tery again, then the result was compared with the blank control group. Cytotoxicities of CIK cells against HCC827 cells in the blank control group and erlotinib group was detected by lactate dehydrogenase releasing assay. **Results** Compared with the blank control group, the expression of MICB and ULBP1 increased more significantly ( $P < 0.05$ ), while the expression of MICA, ULBP2 and ULBP3 had not changed significantly ( $P > 0.05$ ) on HCC827 cells in the erlotinib 5, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group. There was no significant difference of the expression of NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) between the erlotinib 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group and 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of NKG2D ligands (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3) between the SB203580 group and the blank control group ( $P > 0.05$ ), the expression of MICA and MICB in the STAT21 group and ULBP1 in the rottlerin group was significantly higher ( $P < 0.05$ ), and the expression of MICA in the LY294002 group was significantly lower compared with that in the blank control group ( $P < 0.05$ ). The killing activity of CIK cells to HCC827 cells in the erlotinib group was significantly stronger than that in the blank control group at the same effector-to-target cell ratio ( $P < 0.05$ ). At the effector-to-target cell ratio of 20 : 1, the killing activity of CIK cells which blocked by NKG2D monoclonal antibody to HCC827 cells between the blank control group and erlotinib 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group showed no significance difference. **Conclusion** Erlotinib can upregulate the expression of NKG2D ligands on HCC827 cells and enhance the killing activity of CIK cells.

**Key words:** lung cancer; epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor; cytokine-induced killer cells; natural killer group 2, member D receptor ligands

肺癌的发病率逐年增高, 目前其发病率和病死率居恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>, 传统的化学治疗效果已达到了一个平台期。近年来, 分子靶向药物治疗以其毒副作用小、安全性高等优点成为晚期非小细胞肺癌的主要治疗手段。有研究表明, 对于表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变的患者, EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 较传统化学治疗更能提高患者的反应率并延长其无进展生存期<sup>[2-3]</sup>。但大部分患者在平均治疗 10 个月后会发生耐药<sup>[4]</sup>, 导致治疗失败。近年来有 EGFR 家族药物联合免疫生物疗法治疗恶性肿瘤的相关研究<sup>[5]</sup>, 二者联合应用在提高肿瘤临床缓解率的同时改善了晚期癌症患者的生存质量。刘桂举等<sup>[6]</sup>研究表明, 作为 EGFR-TKI 的厄洛替尼能提高野生型 EGFR 的肺腺癌 A549 细胞表面 NKG2D 配体的表达, 增加细胞因子诱导的杀伤 (cytokine-induced killer, CIK) 细胞对 A549 细胞的杀伤能力。本研究选取 EGFR 突变型肺腺癌细胞 HCC827 为研究对象, 观察厄洛替尼及其下游分子磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 对 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体表达的影响, 探讨厄洛替尼是否提高 EGFR 突变型肺腺癌细胞对 CIK 细胞杀伤的敏感效应。

# 1 材料与方法

**1.1 细胞** 肺腺癌 HCC827 细胞由本实验室常规传代培养。

**1.2 主要试剂与仪器** Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) 培养基购自美国 Gibco 公司; CD3 单抗购自美国 Pharmingen 公司; 乳酸脱氢酶杀伤活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司; MAPK 抑制剂 SB203580、PI3K 抑制剂 LY294002、STAT3 抑制剂 STAT21、PKC 抑制剂 Rottlerin 购自美国 Sigma 公司; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgG1 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗及流式细胞仪购自美国 Becton, Dickinson and Company 公司; 厄洛替尼购自上海罗氏公司, 用二甲基亚砷溶解, 含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度。

**1.3 CIK 细胞的制备** 采取健康成年人的外周静脉血 50 mL, 参照文献<sup>[7]</sup>方法培养 CIK 细胞, 每 2~3 d 更换新鲜培养液, 培养 14 d 后, 使用流式细胞仪测定 CIK 细胞表型。

**1.4 HCC827 细胞培养** 肺腺癌 HCC827 细胞接种于含 RPMI1640 细胞培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清、12 kU  $\cdot \text{L}^{-1}$  庆大霉素) 的培养瓶中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育, 待铺满培养瓶的 70%~80%, 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 计数、传代。

**1.5 流式细胞仪检测厄洛替尼对 HCC827 细胞 NKG2D 配体表达的影响** HCC827 细胞以  $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$  接种于 100 mL 培养瓶中, 分为空白对照组及厄洛替尼 5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组, 培养 24 h 后, 空白对照组不加药物, 厄洛替尼 5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组分别加入 5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  厄洛替尼, 继续培养 24 h, 弃上清液, 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集 HCC827 细胞,

磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤, 计数、分管, 分别按  $10^6$  个细胞  $1\text{ }\mu\text{g}$  加入 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 单抗, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $30\text{ min}$ , PBS 洗涤, 再加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG1 二抗,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  继续反应  $30\text{ min}$ , 以离心法用 PBS 洗去未结合的单克隆抗体和二抗, 上机, 同型 IgG1 作为阴性对照抗体, 用流式细胞仪分析  $1\times 10^4$  细胞中的阳性细胞数, 计算阳性细胞百分率, 检测细胞表面 NKG2D 配体主要组织相容性复合体 I 类链相关蛋白 (major histocompatibility complex class I chain-related protein, MIC) A、B 及 UL16 结合蛋白 (UL16 binding protein, ULBP) 1、2、3 的表达, 重复实验 3 次。

**1.6 流式细胞仪检测 EGFR 下游分子抑制剂对 HCC827 细胞 NKG2D 配体表达的影响** 取对数生长期的 HCC827 细胞, 培养  $24\text{ h}$  后, PBS 洗涤, 计数、分管, 分为空白对照组、SB203580 组、LY294002 组、STAT21 组和 Rottlerin 组, 空白对照组不加药物, SB203580 组、LY294002 组、STAT21 组、Rottlerin 组分别加入  $\text{SB203580 } 25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{LY294002 } 15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{STAT21 } 30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Rottlerin  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 继续培养  $24\text{ h}$  后收集细胞, 以流式细胞仪分析 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 的表达。

**1.7 乳酸脱氢酶释放法检测 CIK 细胞的杀伤活性** 以培养  $14\text{ d}$  的 CIK 细胞为效应细胞, 处于对数生长期的 HCC827 细胞 (分为 2 组: 未经药物作用组和  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度厄洛替尼作用后组) 为靶细胞, 按表 1 厄洛替尼对 HCC827 细胞 NKG2D 配体表达的影响

Tab.1 Effect of erlotinib on expression of NKG2D ligands in HCC827 cells ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	MICA/%	MICB/%	ULBP1/%	ULBP2/%	ULBP3/%
空白对照组	3	95.42±2.52	79.03±2.47	2.71±0.89	20.44±0.93	1.75±0.47
厄洛替尼 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	3	95.26±0.34	87.02±0.83 <sup>a</sup>	12.14±0.30 <sup>a</sup>	20.60±0.62	1.88±0.14
厄洛替尼 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	3	96.10±1.59	89.53±3.27 <sup>a</sup>	11.96±1.22 <sup>a</sup>	21.27±1.72	1.94±0.28

注: 与空白对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

**2.3 EGFR 下游分子抑制剂对 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达的影响** 结果见表 2。与空白对照组比较, SB203580 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与空白对照组比较,

表 2 EGFR 下游分子抑制剂对 HCC827 细胞 NKG2D 配体表达的影响

Tab.2 Effect of inhibitors of EGFR downstream molecules on expression of NKG2D ligands in HCC827 cells ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	MICA/%	MICB/%	ULBP1/%	ULBP2/%	ULBP3/%
空白对照组	3	95.42±2.52	79.03±2.47	2.71±0.89	20.44±0.93	1.75±0.47
SB203580 组	3	94.60±1.31	77.69±1.82	2.57±0.33	21.66±1.09	1.76±0.19
STAT21 组	3	98.62±0.14 <sup>a</sup>	86.43±0.65 <sup>a</sup>	3.26±0.22	20.27±0.22	1.86±0.14
LY294002 组	3	78.67±1.44 <sup>a</sup>	77.28±3.24	2.58±0.56	21.33±1.15	1.83±0.20
Rottlerin 组	3	93.72±2.54	77.81±6.08	29.15±1.18 <sup>a</sup>	20.31±1.74	1.81±0.18

注: 与空白对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

效靶比  $10:1$ 、 $20:1$ 、 $30:1$  共同培养  $24\text{ h}$ , 按乳酸脱氢酶杀伤活性检测试剂盒说明书操作, 参照文献 [8] 方法进行, 分别检测 CIK 细胞对 2 组 HCC827 细胞的杀伤活性。取效靶比  $20:1$  时, CIK 细胞先与 NKG2D 单抗室温共同孵育  $15\text{ min}$ , 然后加入  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  厄洛替尼作用后的 HCC827 细胞, 计算 CIK 细胞杀伤活性。重复实验 3 次。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 10.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 采用  $t$  检验和单因素方差分析,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CIK 细胞表型** 培养  $14\text{ d}$  后的 CIK 细胞经流式细胞仪检测,  $\text{CD3}^{+}$  细胞数在 CIK 群体细胞中的比例  $>95\%$ , 其中  $\text{CD3}^{+}\text{CD56}^{+}$  ( $32.57\pm2.38$ )%,  $\text{CD3}^{+}\text{CD8}^{+}$  ( $85.16\pm3.94$ )%,  $\text{CD3}^{+}\text{CD4}^{+}$  ( $21.08\pm3.15$ )%,  $\text{CD3}^{+}$  细胞中 NKG2D 表达率  $>80\%$ 。

### 2.2 厄洛替尼对 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达的影响

结果见表 1。与空白对照组比较, 厄洛替尼  $5$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICB、ULBP1 表达显著增高 ( $P<0.05$ ), MICA、ULBP2、ULBP3 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。厄洛替尼  $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组与  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较, HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3 表达差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

STAT21 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA、MICB 表达显著增高 ( $P<0.05$ ), LY294002 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICA 表达显著降低 ( $P<0.05$ ), Rottlerin 组的 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 ULBP1 表达显著增高 ( $P<0.05$ )。

**2.4 CIK 细胞对未经药物作用组和厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤活性** 效靶比 10 : 1、20 : 1、30 : 1 时, CIK 细胞对未经药物作用组 HCC827 细胞的杀伤率分别为 ( 14. 85 ± 2. 20 ) %、( 42. 15 ± 3. 02 ) %、( 50. 08 ± 1. 16 ) % ; CIK 细胞对 10 μmol · L<sup>-1</sup> 厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率分别为 ( 21. 44 ± 1. 04 ) %、( 51. 60 ± 1. 48 ) %、( 61. 99 ± 0. 90 ) % ; 同一效靶比时, CIK 细胞对厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率均显著高于未经药物作用组 ( *P* < 0. 05 )。效靶比 20 : 1 时经 NKG2D 单抗封闭后的 CIK 细胞对未经药物作用组和 10 μmol · L<sup>-1</sup> 厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率分别为 ( 7. 82 ± 0. 84 ) %、( 8. 20 ± 0. 54 ) % , 2 组比较差异无统计学意义 ( *P* > 0. 05 )。

### 3 讨论

NKG2D-NKG2D 配体信号通路介导的肿瘤杀伤是机体抗肿瘤免疫的主要机制。NKG2D 是机体免疫细胞抗肿瘤的主要活化性受体<sup>[9]</sup>, 在自然杀伤 ( natural kill, NK ) 细胞、NKT 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、γδT 细胞及某些状态下的 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面均有表达。NKG2D 配体主要包括 MICA/B 及 ULBP<sup>[9]</sup>, 这些配体在肿瘤细胞表面广泛表达, 其与免疫细胞表面 NKG2D 受体相结合, 激发抗肿瘤免疫应答, NKG2D 配体作为新的抗肿瘤免疫治疗靶点越来越引起关注<sup>[10-12]</sup>。

靶向 EGFR 药物延长了肺癌患者的生存, 但是随着病情的发展仍会产生多种形式的耐药, 导致靶向治疗的临床受益受到限制。近年来, 肿瘤靶向治疗联合免疫治疗受到关注<sup>[13]</sup>。研究表明肿瘤驱动基因如慢性粒细胞白血病断裂点簇集区、艾贝逊白血病病毒融合基因及人类表皮生长因子受体 2 ( human epidermal growth factor receptor 2, HER2 ) 阳性乳腺癌的 HER2/HER3 基因调控肿瘤细胞表达 MICA、MICB<sup>[14-15]</sup>, 进一步研究证实赫赛汀治疗 HER2 阳性乳腺癌的疗效与患者体内 NK 细胞功能密切相关<sup>[16]</sup>。上述研究结果提示, 驱动基因可能调控肿瘤细胞表面 MIC 表达, 靶向治疗疗效和体内免疫细胞功能密切相关。因此, 探索突变型 EGFR 信号通路

与 NKG2D 配体表达之间的关系, 研究靶向治疗药物对 EGFR 突变型肺腺癌患者肿瘤细胞表面 NKG2D 配体表达的影响及其对免疫细胞杀伤活性的影响, 为肺癌的免疫靶向治疗提供了新的思路。

EGFR 基因突变是肺腺癌的驱动基因, 其重要的下游信号通路包括 Ras-Raf-MAPK 通路、PI3K-丝/苏氨酸蛋白激酶 ( serine-threonine kinase, AKT ) 通路

和 STAT 通路等, EGFR 激活后通过上述信号通路调控肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、血管新生和迁移。NKG2D 配体表达受多种因素调节, 其中 MICA 的表达受 STAT3、PI3K、MAPK 等分子活性调节<sup>[17-18]</sup>。本研究观察了上述信号通路中主要分子在调控 NKG2D 配体表达中的作用, 结果显示, STAT3 分子抑制剂 STAT21 增高了 HCC827 细胞表面 MICA、MICB 的表达, 提示抑制 STAT3 分子活化能提高 MICA、MICB 表达; PI3K 抑制剂 LY294002 降低了 MICA 的表达, 提示 PI3K 分子本身可能参与 MICA 高表达; MAPK 分子抑制剂 SB203580 不影响 HCC827 细胞表面 MICA 表达, 表明 MAPK 分子不参与 MICA 的调控; PKC 抑制剂 Rottlerin 增高了 HCC827 细胞表面 ULBP1 表达, 考虑厄洛替尼增高 HCC827 细胞 ULBP1 的表达可能与其抑制 PKC 活性有关。另外, 本研究结果显示, 厄洛替尼干预后 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICB、ULBP1 表达显著增高, CIK 细胞对厄洛替尼作用后组 HCC827 细胞的杀伤率均显著高于未经药物作用组, 提示厄洛替尼可以增高 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体表达, 增强其对 CIK 细胞杀伤的敏感性; 经 NKG2D 单抗封闭后, CIK 细胞对厄洛替尼处理后的 HCC827 细胞的杀伤活性明显下降, 这表明 CIK 细胞对突变型肺腺癌 HCC827 细胞的杀伤是通过 NKG2D-NKG2D 配体信号通路发挥作用, 厄洛替尼主要通过增高 HCC827 细胞表面 NKG2D 配体 MICB、ULBP1 的表达, 增强 CIK 细胞对 HCC827 细胞的杀伤活性。

本研究结果提示, EGFR-TKI 可能通过增强肿瘤细胞表面配体的表达激发免疫细胞的活性, 从而提高免疫细胞的抗肿瘤效应。EGFR-TKI 联合 CIK 细胞治疗有望成为肺癌过继性细胞免疫治疗的一种方案, 特别是对体质较差的晚期非小细胞肺癌患者。然而二者联合应用的抗肿瘤机制尚未完全明确, 有待更多相关的研究证实。

### 参考文献:

[1] 肖颖, 王正晖, 牛秀珑, 等. RNA 干扰 INK4 位点反义非编码 RNA 抑制人肺癌细胞系生长的分子机制 [ J ]. 新乡医学院学报, 2013, 30 ( 4 ) : 259-261.

[2] Roengvoraphoj M, Tsongalis G J, Dragnev K H, *et al.* Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients [ J ]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39 ( 8 ) : 839-850.

[3] Lee C K, Brown C, Gralla R J, *et al.* Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis [ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105 ( 9 ) : 595-605.

色着色逐渐减弱,通过观察培养至第 5 代后软骨细胞的形态及生物学特征均有变化。这些形态学变化与胡志俊等<sup>[7]</sup>报道基本一致。本研究明显提高了软骨细胞的传代次数并能保持细胞的特性。

骨性关节炎是关节表面软骨损伤的一种临床表现,关节软骨主要由软骨细胞和基质组成,因其无血管及淋巴管,损伤后自我修复能力较弱,至今仍缺乏改善骨性关节炎病情进展的有效治疗方法,软骨移植是当前较为有效的治疗方法<sup>[8]</sup>。软骨移植主要有骨软骨移植和软骨细胞移植;软骨细胞移植又分为异体软骨细胞移植和自体软骨细胞移植,自体软骨细胞移植来源有限并可造成供区的破坏,异体软骨细胞移植则容易造成免疫排斥反应,均给软骨移植带来困难。软骨细胞培养即自体软骨细胞在体外培养扩增后接种到一种生物相容性良好、具有生物可降解性及一定三维空间结构的生物材支架上,形成细胞材料复合物,然后移植入体内形成某种结构和功能的组织和器官<sup>[9]</sup>,是治疗骨性关节炎的有效方法。

本研究建立了简便快捷获取高纯度软骨细胞的方法,对软骨细胞的生长、传代、鉴定等提供了实验研究基础,也为下一步的软骨细胞移植创造了条件。

参考文献:

[1] Altman R, Asch E, Bloch D, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis; classification of osteoarthritis of the knee [J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29 (8) : 1039-1049.

[2] 高春华, 张仲文. 人关节软骨细胞体外培养的传代特点及鉴定 [J]. *武警医学*, 2007, 18 (12) : 922-925.

[3] 秦俊, 陈廖斌, 汪辉. 人骨关节炎软骨细胞的体外培养 [J]. *武汉大学学报*, 2007, 28 (2) : 129-133.

[4] Lin Z, Willers C, Xu J, *et al.* The chondrocyte: biology and clinical application [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12 (7) : 1971-1984.

[5] Duke P J, Daane E L, Montufar-Solis D. Studies of chondro-genesis in rotating system [J]. *J Cell Biochem*, 1993, 51 (3) : 274-282.

[6] 李兵, 吴志宏, 刘广源, 等. 三种软骨细胞分离培养方法对细胞骨架的影响比较 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24 (9) : 1108-1110.

[7] 胡志俊, 胡波, 唐德志, 等. 兔膝关节软骨细胞的分离培养及形态学特征 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14 (46) : 8555-8558.

[8] Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, *et al.* Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cell to investigate stable neo-cartilage tissue formation *in vitro* [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 245-259.

[9] Chiang H, Jiang C C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives [J]. *J Formos Med Assoc*, 2009, 108 (2) : 87-101.

( 本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博 )

( 上接第 309 页 )

[4] Asami K. Treatment strategy for activating EGFR-mutated non-small cell lung cancer after failure of first-generation EGFR-TKIs [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2014, 41 (5) : 533-538.

[5] Zhang L, Zhao G, Hou Y, *et al.* The experimental study on the treatment of cytokine-induced killer cells combined with EGFR monoclonal antibody against gastric cancer [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29 (3) : 99-107.

[6] 刘桂举, 梅家转, 张晓娟, 等. 厄洛替尼增强肺腺癌 A549 细胞对 CIK 细胞杀伤的敏感性 [J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40 (11) : 617-620.

[7] 李瑞君, 梅家转, 禹萌, 等. 顺铂、氟尿嘧啶增强食管癌细胞 NKG2D 配体的表达及 CIK 细胞的杀伤活性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39 (7) : 765-768.

[8] 张晓娟, 梅家转, 赵继智, 等. 顺铂对 CIK 细胞杀伤肺腺癌 A549 细胞敏感性影响的研究 [J]. *中华肿瘤防治*, 2013, 20 (16) : 1229-1231.

[9] Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, *et al.* New prospects on the NKG2D/ NKG2DL system for oncology [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (10) : e26097.

[10] Paschen A, Baingo J, Schadendorf D. Expression of stress ligands of the immunoreceptor NKG2D in melanoma: regulation and clinical significance [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93 (1/2) : 49-54.

[11] Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, López-Soto A, *et al.* Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 106.

[12] Marcus A, Gowen B G, Thompson T W, *et al.* Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells [J]. *Adv Immunol*, 2014, 122: 91-128.

[13] Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12 (4) : 237-251.

[14] Boissel N, Rea D, Tieng V, *et al.* BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (8) : 5108-5116.

[15] Okita R, Mougiakakos D, Ando T, *et al.* HER2/HER3 signaling regulates NK cell-mediated cytotoxicity via MHC class I chain-related molecule A and B expression in human breast cancer cell lines [J]. *J Immunol*, 2012, 188 (5) : 2136-2145.

[16] Beano A, Signorino E, Evangelista A, *et al.* Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients [J]. *J Transl Med*, 2008, 6: 25.

[17] Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, *et al.* Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (5) : 1615-1626.

[18] Molinero L L, Fuertes M B, Fainboim L, *et al.* Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73 (6) : 815-822.

( 本文编辑: 李胜利 英文编辑: 王 燕 )