

两种外周血单个核细胞采集方法体外诱导 CIK 细胞的比较

苏晓三¹⁾, 汪 珺²⁾, 张 蕾¹⁾, 金良昆³⁾, 陈 睿¹⁾, 王翼寅¹⁾

(1) 昆明医科大学附属甘美医院生物医学实验中心, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学附属甘美医院肿瘤科, 云南昆明 650011)

[摘要] **目的** 比较两种外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 采集方法诱导的细胞因子诱导杀伤细胞 (cytokine-induced killer, CIK) 扩增效率、细胞表型、杀伤肿瘤细胞的活性及其回输至肿瘤患者体内的免疫调节作用. **方法** 12 例肿瘤患者共进行 36 次 CIK 细胞体外诱导、扩增, 其中 6 例患者共 18 次扩增采用血细胞分离机采集 PBMCs, 另外 6 例患者共 18 次培养采用 Ficoll 密度梯度分离 50 mL 外周血方法采集 PBMCs. **结果** 采用血细胞分离机或 Ficoll 分离法采集 PBMCs 经体外诱导获得 CIK (分别为 A-CIK 和 F-CIK) 细胞数分别为 7.47×10^9 ($3.7-13.6 \times 10^9$) 和 6.37×10^9 ($3.8-11.8 \times 10^9$). 培养至 14 d 时, >90% 的 A-CIK 和 F-CIK 细胞表型为 CD3⁺, 其中 CD3⁺CD56⁺, NKG2D⁺ 细胞及细胞内 TH1 细胞因子均显著升高. 效靶比为 60:1 时, A-CIK 和 F-CIK 细胞对 Daudi、K562 及 293 的杀伤活性分别为 (49.1 ± 17.8) % 和 (55.3 ± 11.5) %、(67.6 ± 24.1) % 和 (58.1 ± 17.6) %、(36.4 ± 11) % 和 (33.7 ± 14.8) %. 给肿瘤患者回输自体 A-CIK 或 F-CIK 细胞 14 d 后, 外周血中 CD3⁺、CD8⁺ 及 CD3⁺、CD56⁺ 细胞以及 PBMCs 内 IFN- γ 均显著升高. **结论** 采集肿瘤患者 50 mL 外周血分离的 PBMCs 足以制备临床治疗使用的 CIK 细胞.

[关键词] 免疫疗法; 过继; 细胞分离; 肿瘤; 体外

[中图分类号] R735.37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 06-0107-05

Comparison of CIK Cells Induced in Vitro from Two Different Peripheral Blood Mononuclear Cells Collecting Methods

SU Xiao-san¹⁾, WANG Jun²⁾, ZHANG Lei¹⁾, JIN Liang-kun³⁾, CHEN Rui¹⁾, WANG Yi-yin¹⁾

(1) Biomedical Research Center, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011; 2) Dept. of Anesthesiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Oncology, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To compare the regulating effect of two kinds of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collection methods on cytokine-induced killer (CIK) cell proliferation rate, immunophenotype, cytotoxicity in vitro and immune modulation effects after infusion into cancer patients. **Methods** Thirty-six CIK cell expansions were performed from 12 cancer patients, including 18 from apheresis derived peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (A-CIK) and 18 from ficoll density centrifugation separated PBMCs (F-CIK). **Results** The median number of A-CIK and F-CIK cells was 7.47×10^9 (range 3.7-13.6) and 6.37×10^9 (range 3.8-11.8), respectively. Predominant phenotype of A-CIK and F-CIK cells was CD3 positive (>90%), and CD3⁺CD56⁺, NKG2D⁺ cells and intracellular TH1 cytokines significantly increased after 14 days culture. At a 60:1 effector-target ratio, the killing effects of A-CIK and F-CIK cells on the Daudi, K562 and 293 tumor cells were (49.1 ± 17.8) % and (55.3 ± 11.5) %, (67.6 ± 24.1) % and (58.1 ± 17.6) %, (36.4 ± 11) % and (33.7 ± 14.8) %, respectively. 14 days after A-CIK and F-CIK cells infusion, the percentage of CD3⁺, CD8⁺ and CD3⁺CD56⁺ cells and intracellular interferon- γ (IFN- γ) significantly increased in the PBMCs of patients.

[基金项目] 昆明市卫生局科研基金资助项目(2010-07)

[作者简介] 苏晓三 (1975~), 男, 山西大同市人, 医学博士, 助理研究员, 主要从事肿瘤免疫及免疫治疗研究工作.

Conclusion As little as 50 mL of peripheral blood was sufficient to serve as the source of PBMCs for CIK cells preparation especially for clinical application.

[**Key words**] Immunotherapy; Adoptive; Cell Separation; Neoplasms; In vitro

细胞因子诱导的杀伤 (cytokine-induced killer, CIK) 细胞是将外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 在体外用多种细胞因子 (如抗 CD3 单抗、IL-2、IFN- γ 、IL-1 α) 共培养一段时间后获得的一群异质细胞^[1,2], 具有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性和非主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 限制性杀瘤的优点。目前用于临床治疗的 CIK 细胞制备方法主要有两种, 最初制备用于临床治疗 CIK 细胞是采用血细胞分离机采集 PBMCs 并将 PBMCs 用于诱导和扩增 CIK 细胞^[3]。随后 Weng 等报道从 50 mL 外周血分离的 PBMCs 可以制备足够临床使用的 CIK 细胞^[4]。显然, 建立一套安全、标准化和稳定的制备流程是开展 CIK 细胞临床应用的前提。本研究对上述两种 CIK 细胞体外扩增方法获得的 CIK 细胞的生物学活性进行比较从而为 CIK 细胞的临床应用提供具有参考意义的信息。

1 材料与方法

1.1 病例选择

12 例经病理确诊为白血病、淋巴瘤或肾癌患者, ECOG 分级 \geq III 级, 预计生存期 \geq 3 个月; 治疗前心、肝、肾功能及血象正常; 距上次治疗时间均超过 1 个月。12 例患者随机分为 2 组, 每组 6 例患者, 分别采用血细胞分离机采集 PBMCs 或 Ficoll 密度梯度分离 50 mL 外周血 PBMCs 的方法制备 CIK 细胞。

1.2 血细胞分离机采集 PBMCs 制备 CIK 细胞

6 例患者经 COBE Spectra 血细胞分离机采集 PBMCs, 分离体积约为患者 1 倍血容量, 离心收集血浆, 将细胞重悬于含 10% 自体血浆的人淋巴细胞培养基 (Takara Bio.) 中, 加入人重组 IFN- γ (rhIFN- γ , 1 000 U/mL), 调整细胞浓度为 2×10^6 /mL 并将细胞转移至 640 cm \times 640 cm 细胞培养袋中 (Takara Bio.)。24 h 后加入抗人 CD3 单抗 OKT3 (100 ng/mL) 及人重组 IL-2 (rhIL-2, 1 000 U/mL)。每 3 ~ 4 d 加入含 10% 自体血浆和 rhIL-2 (1 000 U/mL) 新鲜培养基。

1.3 密度梯度分离 50 mL 外周血 PBMCs 制备 CIK 细胞

采集患者 50 mL 外周血 (肝素抗凝), Ficoll

密度梯度离心法分离 PBMCs。含 1% ~ 2% 自体血浆和 rhIFN- γ (1 000 U/mL) 的人淋巴细胞培养基重悬细胞, 细胞浓度调整为 2×10^6 /mL 加入 75 cm \times 75 cm 培养瓶中。24 h 后将细胞转移至 OKT3 包被的培养瓶中并加入 rhIL-2 (1 000 U/mL)。培养至第 5 d 时, 将细胞转移至 640 cm \times 640 cm 培养袋中, 每 3 ~ 4 d 加入含 1 ~ 2% 自体血浆和 rhIL-2 (1 000 U/mL) 新鲜培养基。

1.4 CIK 细胞回输

CIK 细胞收集前做需氧、厌氧菌培养并确保培养结果为阴性方可收集、回输。培养至第 14 天收集 CIK 细胞, 生理盐水洗 2 次。100 mL 生理盐水重悬细胞经静脉回输。每位患者至少接受 3 次治疗, 2 次治疗至少间隔 3 周。

1.5 PBMCs 及 CIK 细胞表型和细胞内细胞因子检测

FITC-、PE-、ECD 或 APC 等荧光染料标记的抗 CD3、CD4、CD8、CD56 和 NKG2D 及抗 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IL-4、IL-6 和 IL-10 单抗 (Beckman Coulter Inc.) 标记 PBMCs 及 CIK 细胞, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗 1 次, 流式细胞仪 CytomicsTM FC500 检测。

1.6 细胞毒试验

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放法检测 CIK 细胞杀伤活性, 靶细胞选择 Daudi、K562 及 293。设效靶比 60:1, 30:1 和 15:1。按公式:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{E - Se - St}{Mt - St} \times 100$$

计算 CIK 细胞的杀伤活性, 其中 E 为效应细胞与靶细胞共培养的 LDH 释放, Se 为效应细胞自发释放; St 为靶细胞自发释放; Mt 为靶细胞最大释放。

1.7 患者外周血淋巴细胞表型及淋巴细胞内细胞因子检测

CIK 细胞治疗前及治疗后第 14 天, 采集患者外周血, 荧光标记抗 CD3、CD4、CD8、CD56 和 NKG2D 及抗 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IL-4、IL-6 和 IL-10 单抗标记, CytomicsTM FC500 检测。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计学软件进行数据的统计学处理, 采用配对资料的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 CIK 细胞培养

本研究共入选 12 例恶性肿瘤患者, 每例患者接受 3 次 CIK 细胞治疗, 共进行 36 次 CIK 细胞的体外培养。采用血细胞分离机采集 PBMCs 的 6 例患者中有 3 例在采集过程中及采集后出现嘴唇麻木、乏力或头晕等不良反应 (表 1)。

血细胞分离机采集的 PBMCs (Apheresis derived PBMCs, A-PBMCs) 细胞总数为 1322.2×10^6 ($630 \sim 3300 \times 10^6$), 其中的 $CD3^+CD56^+$ 为 $46.6 \sim 313.5 \times 10^6$ (表 2)。Ficoll 密度梯度离心 50 mL 外周血分离的 PBMCs (Ficoll derived PBMCs, F-PBMCs) 细胞总数为 11.16×10^6 ($5.9 \sim 18.3 \times 10^6$), 其中 $CD3^+CD56^+$ 细胞数为 0.92×10^6 ($0.55 \sim 1.59 \times 10^6$)。培养至第 14 天时, 由 A-PBMCs 和 F-PBMCs 诱导、扩增的 CIK 细胞 (A-CIK 和 F-CIK) 总数分别为 7466.7×10^6 ($3700 \sim 13600 \times 10^6$) 和 6372.2×10^6 ($3800 \sim 11800 \times 10^6$) ($P=0.16$)。A-CIK 及 F-CIK 细胞中 $CD3^+CD56^+$ 细胞百分含量分别为 18.3% 和 19.1% (图 1), 其绝对数分别较培养前扩增 14.7 (4.9 ~ 37.5) 和 1404.2 (743.7 ~ 2505.1) 倍。培养前 NKG2D 分子在 A-PBMCs 和 F-PBMCs 表达水平分别为 20.7% (10.6% ~ 28.5%) 和 20.2% (10.5% ~ 29.6%), 培养至第 14 天时 A-CIK 和 F-CIK 细胞

表面 NKG2D 分子的表达水平分别为 50.4% (37.1% ~ 66.1%) 和 53.7% (36.4% ~ 64.3%)。

培养前 A-PBMCs 和 F-PBMCs 胞内 TH1 和 TH2 细胞因子无显著差别 (图 1B)。培养至第 14 天时 A-CIK 和 F-CIK 细胞内 TH1 细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 均较培养前显著升高。另外, A-CIK 细胞内 IL-6 及 A-CIK 和 F-CIK 细胞内的 IL-10 较培养前也有显著增加。培养至第 14 天时 A-CIK 及 F-CIK 中活细胞比例分别为 94% (90% ~ 98%, $n=18$) 和 95.2% (93% ~ 98%, $n=18$)。

2.2 CIK 细胞的杀伤活性

效靶比为 60:1 时, A-CIK 和 F-CIK 细胞对 K562 杀伤活性为 67.6% 和 58.1%; 对 Daudi 杀伤活性为 49.1% 和 55.3%; 对 293 细胞杀伤活性为 36.4% 和 33.7% (图 2)。

2.3 CIK 细胞治疗前后患者外周血淋巴细胞表型及胞内细胞因子分析

A-CIK 或 F-CIK 回输 14 d 后患者 PBMCs 中 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 和 $CD3^+CD56^+$ 细胞比例分别为 $(62.3 \pm 9.7)\%$ 和 $(60.8 \pm 5.9)\%$; $(28.6 \pm 5.8)\%$ 和 $(27.5 \pm 4.8)\%$ 、 $(8.8 \pm 3.8)\%$ 和 $(8.5 \pm 2.5)\%$, 均较治疗前显著升高 (图 3A)。另外 A-CIK 细胞治疗后患者外周血中 NKG2D⁺ 细胞比例也较治疗前显著升高。胞内细胞因子检测显示, A-CIK 和 F-CIK 细胞内 IFN- γ , F-CIK 细胞内 IL-2 及 A-CIK 细胞内 IL-6 较治疗前升高 (图 3B)。

表 1 患者基本资料 (1)

Tab. 1 Patient characteristics (1)

组别	年龄 (岁)	性别	诊断	血细胞采集相关不良反应	回输细胞量 ($\times 10^9$)
血细胞分离机采集 PBMCs					
1	54	男	急性髓性白血病	嘴唇麻木, 乏力	7.3, 10.2, 5.4
2	42	女	非何杰金淋巴瘤	无	6.8, 11.7, 8.7
3	59	男	肾细胞癌	无	5.2, 4.8, 8.1
4	66	男	急性淋巴细胞性白血病	乏力, 头晕	13.6, 8.4, 7.9
5	44	男	何杰金病	无	11.5, 4.1, 6.6
6	61	女	非何杰金淋巴瘤	嘴唇麻木, 乏力, 头晕	3.7, 6.1, 4.3
密度梯度离心采集 PBMCs					
1	41	男	何杰金病	-	4.8, 6.6, 5.7
2	55	男	非何杰金淋巴瘤	-	3.8, 4.7, 4.2
3	58	女	肾细胞癌	-	8.4, 7.2, 6.9
4	61	男	肾细胞癌	-	11.8, 8.4, 9.2
5	37	女	急性髓性白血病	-	4.1, 4.8, 5.6
6	28	女	急性髓性白血病	-	5.8, 5.3, 7.4

表 1 患者基本资料 (2)
Tab. 1 Patient characteristics (2)

组别	有核细胞总数 (× 10 ⁶)	有核细胞扩增倍数	T 细胞总数 (× 10 ⁶)	T 细胞扩增倍数	NKT 细胞总数 (× 10 ⁶)	NKT 细胞扩增倍数	NKG2D 细胞总数 (× 10 ⁶)	NKG2D 细胞扩增倍数
血细胞分离机采集 PBMCs 诱导的 CIK 细胞								
第 0 天	1 322.2 (630 ~ 3 300)		702.8 (272.2 ~ 1 184.3)		110.9 (46.6 ~ 313.5)		277.5 (98.6 ~ 684.0)	
第 14 天	7 466.7 (3 700 ~ 13 600)	6.2 (3.9 ~ 12.9)	6 861.7 (3 600.1 ~ 12 960.8)	10.9 (5.7 ~ 26.8)	1 338.2 (584.8 ~ 2 187.9)	14.7 (4.9 ~ 37.5)	3854.9 (1 521.1 ~ 7 733.7)	16.5 (9.1 ~ 58.3)
密度梯度离心采集 PBMCs 诱导的 CIK 细胞								
第 0 天	11.16 (5.9 ~ 18.3)		6.29 (3.43 ~ 10.19)		0.92 (0.55 ~ 1.59)		2.32 (0.82 ~ 4.74)	
第 14 天	6 372.2 (3 800 ~ 11 800)	595.6 (354.4 ~ 1 008.5)	5 848.7 (3 427.6 ~ 11 080.2)	979.9 (513.8 ~ 1 948.6)	1 206.4 (596.6 ~ 2 162)	1 404.2 (743.7 ~ 2 505.1)	3442.5 (1 747.2 ~ 5 529.2)	1 685.8 (734.4 ~ 3 262.5)

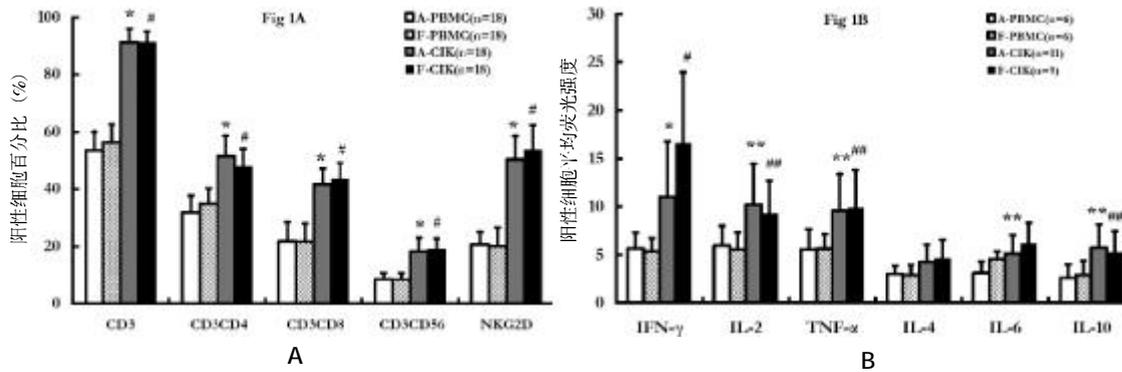


图 1 血细胞分离机及 Ficoll 密度梯度法分离的 PBMCs 及其诱导、扩增的 CIK 细胞表型和细胞内细胞因子检测结果
Fig. 1 Phenotypic and intracellular cytokine production analysis of cytokine-induced killer cells generated from apheresis or Ficoll density centrifugation derived PBMCs

A:CIK 细胞表型; B:CIK 细胞内细胞因子. 与 A-PBMC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 F-PBMC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

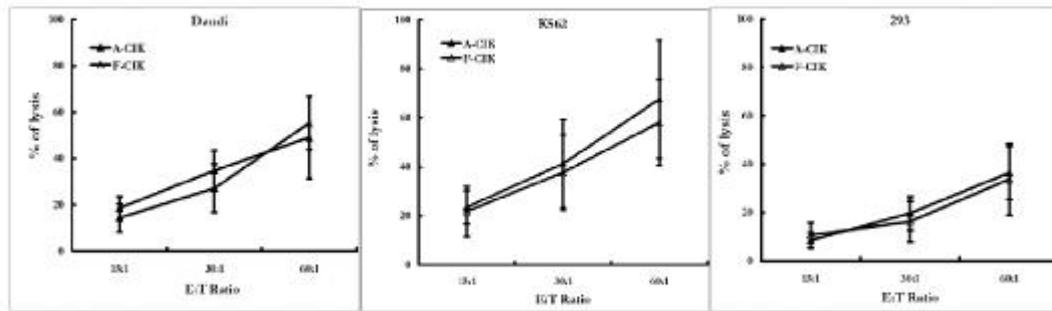


图 2 CIK 细胞杀伤活性

Fig. 2 Cytotoxicity effects of cytokine-induced killer cells

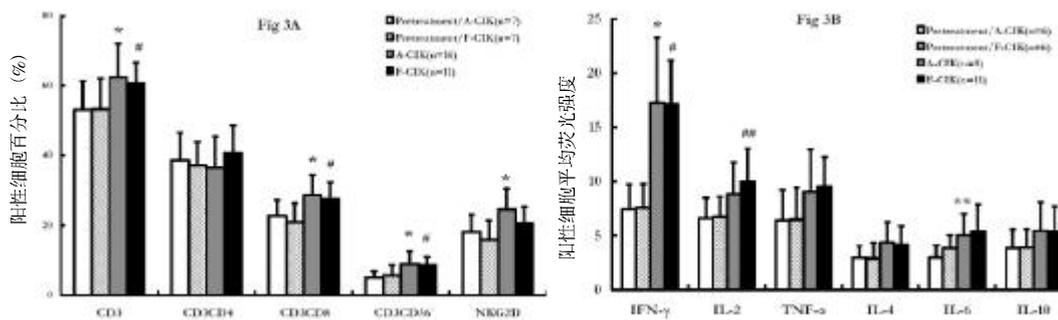


图 3 CIK 细胞治疗前和治疗 14 d 后患者外周血中淋巴细胞亚群百分含量和细胞内细胞因子检测结果

Fig. 3 Percentages of lymphocyte subsets and intracellular cytokine production in peripheral blood mononuclear cells of patients before and 14 days after cytokine-induced killer cell therapy

与 A-CIK 治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 F-CIK 治疗前比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$.

3 讨论

过继性细胞治疗 (adoptive cell therapy, ACT) 是指给患者输注具有识别肿瘤细胞、诱导特异性抗肿瘤免疫应答等活性的免疫效应细胞, 进而使其在肿瘤患者体内发挥抗肿瘤作用^[5]. CIK 细胞最早是 1991 年由美国 Stanford 大学血液中心 Robert Negrin 教授的研究小组首次报道. 在此之后大量的临床研究结果显示 CIK 细胞具有显著的抗肿瘤活性, 如白血病、淋巴瘤、肾癌和肝癌^[6-11].

最早的一项临床研究中 CIK 细胞制备是采用血细胞分离机采集 PBMCs. 目前的血细胞分离机大量采集 PBMCs 的方法已相当成熟, 临床研究中多数研究者采集至少一个血循环量中的 PBMCs 用于制备 CIK 细胞^[3,7,8,11]. 显然, 短时间大量采集 PBMCs (其中包括淋巴细胞和单核细胞) 后会导致机体免疫功能低下, 而免疫功能低下与感染、肿瘤及自身免疫性疾病密切相关^[12,13]. 有研究者对肿瘤患者 PBMCs 采集之后淋巴细胞和血清免疫球蛋白降低及其对肿瘤的影响进行了探讨^[14,15]. 总体上来说, 肿瘤患者 PBMCs 采集之后血液中淋巴细胞

和血清免疫球蛋白呈轻至中度下降但未发现严重的不良反应. 关于 PBMCs 采集之后肿瘤患者免疫系统远期改变的报道很少, 尚缺乏大样本前瞻性研究结果. 尽管如此, PBMCs 采集还是会引发一些不良反应, 如嘴唇麻木、乏力和头晕等^[6].

来自中山大学的 Weng 等首先报道了 Ficoll 密度梯度离心法分离 50 mL 外周血 PBMCs 制备 CIK 细胞的方法, 该方法可获得大量具有抗肿瘤活性的 CIK 细胞^[4]. 关于上述两种制备方法获得的 CIK 细胞的数量、表型、细胞毒活性及临床效应等目前尚无明确的报道. 笔者对这两种临床制备 CIK 细胞的方法进行了评价. 研究结果显示, 采用血细胞分离机或抽取患者外周血并 Ficoll 密度梯度离心法采集的 PBMCs 经体外诱导、扩增后均可获得大量 CIK 细胞, 且细胞表型、细胞毒活性等生物学活性无显著差别. CIK 细胞治疗后肿瘤患者外周血淋巴细胞表型和细胞内细胞因子检测结果同样表明这两种方法制备的 CIK 细胞具有相同的免疫调节功能.

近期的 II 期临床研究结果表明采用单纯 CIK 细胞治疗肾癌较 IL-2+IFN- α 治疗组患者无疾病进展生存期 (progressive free survival, PFS) 和总生

存期 (overall survival, OS) 均显著延长^[17]; 化疗联合 CIK 细胞治疗肺癌或肝癌较单纯化疗组可延缓肿瘤复发、延长 PFS 并最终延长患者的 OS^[18,19]。上述 II 期临床研究结果为开展 III 期临床研究奠定了基础, 但是, 要完成多中心的 III 期临床研究就必须对现有的 CIK 细胞体外制备方案进行整合、优化并制定一套标准化的制备流程^[20]。本研究结果表明采集肿瘤患者 50 mL 外周血分离的 PBMCs 就足以制备供临床治疗使用的 CIK 细胞。该制备方法具有高效、成本低、耗时短且无毒副作用等优点, 更便于 CIK 细胞的标准制备, 进而有利于免疫治疗项目的临床应用。

[参考文献]

- [1] SCHMIDT-WOLF I G, NEGRIN R S, KIEM H P, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity [J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1):139 - 149.
- [2] LU P H, NEGRIN R S. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency [J]. *J Immunol*, 1994, 153(4):1 687 - 1 696.
- [3] LEEMHUIS T, WELLS S, SCHEFFOLD C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(3):181 - 187.
- [4] WENG D S, ZHOU J, ZHOU Q M, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas [J]. *J Immunother*, 2008, 31(1):63 - 71.
- [5] RESTIFO N P, DUDLEY M E, ROSENBERG S A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4):269 - 281.
- [6] HONTSCHA C, BORCK Y, ZHOU H, et al. Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC) [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2):305 - 310.
- [7] OLIOSSO P, GIANCOLA R, DI RITI M, et al. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial [J]. *Hematol Oncol*, 2009, 27(3):130 - 139.
- [8] LAPORT G G, SHEEHAN K, BAKER J, et al. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(11):1 679 - 1 687.
- [9] SU X S, ZHANG L, WU S M, et al. Cascading adoptive cell therapy for metastatic melanoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(3):401 - 406.
- [10] SU X S, ZHANG L, JIN L K, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(4):465 - 470.
- [11] LI H, WANG C, YU J, et al. Dendritic cell-activated cytokine-induced killer cells enhance the anti-tumor effect of chemotherapy on non-small cell lung cancer in patients after surgery [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(8):1 076 - 1 083.
- [12] SENHAUSER D A, WESTPHAL R G, BOHMAN J E, et al. Immune system changes in cytopheresis donors [J]. *Transfusion*, 1982, 22(4):302-304.
- [13] TRAN-MI B, STORCH H, SEIDEL K, et al. The impact of different intensities of regular donor plasmapheresis on humoral and cellular immunity, red cell and iron metabolism, and cardiovascular risk markers [J]. *Vox Sang*, 2004, 86(3):189 - 197.
- [14] WALDMAN S R, ROTH J A, SILVERSTEIN M, et al. Effects on cancer patients of leukapheresis with the continuous-flow blood cell separator. I. Hematologic and immunologic parameters in vivo [J]. *J Lab Clin Med*, 1975, 86(6):938 - 949.
- [15] WALDMAN S R, ROTH J A, KERN D H, et al. Effects on cancer patients of leukapheresis with the continuous-flow blood cell separator. II. Immunologic parameters in vitro [J]. *J Lab Clin Med*, 1975, 86(6):950 - 961.
- [16] WINTERS J L. Complications of donor apheresis [J]. *J Clin Apher*, 2006, 21(2):132 - 141.
- [17] LIU L, ZHANG W, QI X, et al. Randomized study of autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in metastatic renal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6):1 751 - 1 759.
- [18] LI R, WANG C, LIU L, et al. Autologous cytokine-induced killer cell immunotherapy in lung cancer: a phase II clinical study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(11):2 125 - 2 133.
- [19] HUI D, QIANG L, JIAN W, et al. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2009, 41(1):36 - 41.
- [20] SANGIOLO D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. *J Cancer*, 2011, 2:363 - 368.

(2013-02-14 收稿)