

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.27.003

# 斑蝥酸钠对膀胱癌患者树突状细胞及 BIU-87 细胞的影响

宁 波,李朵璐,阚全程  
(郑州大学第一附属医院肿瘤科 450000)

**[摘要]** **目的** 探讨斑蝥酸钠对膀胱癌患者外周血来源的树突状细胞(DC)成熟、功能的影响及斑蝥酸钠对膀胱癌细胞 BIU-87 增殖、凋亡的影响。**方法** 分离 15 例临床确诊的中晚期膀胱癌患者外周血单核细胞,在含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)及不同浓度斑蝥酸钠培养条件下制备 DC。观察 DC 形态学变化,流式细胞仪检测 DC 表面 CD1a 和 CD83 表达水平,并用 MTT 法测定 DC 刺激同种异体淋巴细胞增殖能力。采用 MTT 法测定不同浓度斑蝥酸钠作用后 BIU-87 细胞的生长情况。Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术观察斑蝥酸钠作用后细胞的凋亡情况。Western blot 法检测 Caspase-3 和 PARP 的表达的变化。**结果** 在斑蝥酸钠高剂量组,DC 膜表面分子 CD83、CD1a 的表达最高。与对照组相比,斑蝥酸钠处理组 DC 膜表面分子 CD83 和 CD1a 表达增高( $P<0.05$ )。斑蝥酸钠处理组刺激异体淋巴细胞增殖指数显著高于对照组。MTT 法证实斑蝥酸钠能明显抑制膀胱癌细胞株 BIU-87 的生长。斑蝥酸钠作用 24 h 后,流式细胞术双染法检测细胞凋亡显示斑蝥酸钠可使 BIU-87 细胞发生凋亡;Western blot 法检测显示斑蝥酸钠使 BIU-87 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达明显增加。**结论** 斑蝥酸钠能够诱导膀胱癌患者 DC 成熟,促进淋巴细胞的增殖能力,斑蝥酸钠能够抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖,诱导细胞凋亡。

**[关键词]** 树突状细胞;膀胱肿瘤;斑蝥酸钠;凋亡

**[中图分类号]** R737.14      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2018)27-3494-05

**Effects of sodium cantharidinate on dendritic cells in patients with bladder carcinoma and BIU-87 cells**  
NING Bo, LI Duolu, KAN Quancheng  
(First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of sodium cantharidinate on the maturation and function of peripheral blood monocyte-derived dendritic cells(DC) from bladder carcinoma patients and to study its effect on the proliferation and apoptosis of human bladder cancer BIU-87 cells. **Methods** The peripheral blood monocytes in the patients with middle and advanced stage bladder carcinoma were separated for preparing DC under the culture condition containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) plus IL-4 and different concentrations of sodium cantharidinate. The cell morphology was observed and DC surface CD1a and CD83 expression levels were detected by flow cytometry. Allogeneic lymphocytes proliferation ability stimulated by DC was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The cell growth situation of BIU-87 cells after action by different concentrations of sodium cantharidinate was detected by MTT assay. The AV-PI double staining flow cytometry was carried out to detect the cell apoptosis. And the Caspase-3 and PARP expression changes were detected by Western blotting. **Results** The expression levels of DC phenotype molecule CD83 and CD1a in the sodium cantharidinate high dose group were the highest. Compared with the control group, DC membrane molecule CD83 and CD1a expression in the sodium cantharidinate treatment group was increased( $P<0.05$ ). The stimulating allogeneic lymphocytes proliferation index in the sodium cantharidinate treatment group was significantly higher than that in the control group. The MTT method verified that sodium cantharidinate could effectively inhibit the growth of bladder cancer BIU-87 cells. After 24 h action by sodium cantharidinate treatment, detecting cellular apoptosis by flow cytometry double-staining method showed that sodium cantharidinate could make the BIU-87 cells apoptosis, and Western blot detection showed that sodium cantharidinate could make the expression of Caspase-3 and PARP proteins in BIU-87 cells was markedly increased. **Conclusion** Sodium cantharidinate can induce the DC maturation, promotes the proliferation ability of lymphocytes, can inhibit the proliferation of bladder cancer BIU-87 cells and induces the cellular apoptosis.

**[Key words]** dendritic cells; urinary bladder neoplasms; disodium cantharidinate; apoptosis

膀胱瘤是最常见的恶性肿瘤之一,它具有发病率 高、复发率高、恶性程度低等特点<sup>[1]</sup>。膀胱癌患者的

作者简介:宁波(1983—),副主任医师,本科,主要从事肿瘤方面的研究。

主要症状为血尿,临床上常采用造影和膀胱镜检作为膀胱肿瘤的诊断方法。膀胱癌可分为表浅性和浸润性两类,表浅性膀胱癌具有复发率高,转移率低的特点。浸润性膀胱癌具有浸润性和转移率高等特点<sup>[2]</sup>。树突状细胞(DC)是一种抗原递呈细胞,具有摄取、加工及递呈抗原,刺激 T 细胞活化和增殖,启动机体特异性免疫应答等功能,因此在肿瘤免疫过程中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。有研究发现,如果 DC 数量减少或者功能缺失,使得 DC 不能刺激淋巴细胞增殖及免疫应答,最终导致机体免疫耐受,从而使肿瘤细胞逃脱机体免疫系统,在肿瘤的发生、发展和转移过程中起重要作用<sup>[4]</sup>。研究证实 DC 与膀胱癌有十分紧密的关系,与膀胱癌的分级和患者预后有紧密联系<sup>[4-5]</sup>。

DC 在发育过程中能表达一系列分化抗原,其中最直接与其功能有关的是 CD1a,CD1a 主要表达于人胸腺细胞,是鉴定人外周血与骨髓中 DC 的最好标记<sup>[6]</sup>。CD83 是 DC 成熟的标志,在 DC 发育成熟的早期不表达 CD83,当成熟时才表达 CD83。由于肿瘤细胞 CD83 的低水平表达,不能使肿瘤抗原引起有效的免疫应答,从而诱导了 T 细胞的无能状态,使得机体的免疫系统不能将肿瘤细胞清除,是肿瘤无限制性生长的主要原因之一<sup>[7]</sup>。膀胱癌细胞 BIU-87 来源于人膀胱乳头状移行上皮癌,通常采用  $5 \times 10^8$  细胞 0.2 mL 接种裸鼠皮下,肿瘤呈进行性生长,肿瘤结节病理检查与原标本癌组织相似,是临床实验室常用的实验用途膀胱癌细胞系。

斑蝥酸钠是斑蝥素的一种衍生物,目前临床上用于治疗肝癌和胃癌,与先导化合物斑蝥素比较,斑蝥酸钠具有毒性低和刺激性小等特点<sup>[8-11]</sup>。斑蝥酸钠抗肿瘤机制复杂多样,它能通过多种途径抑制肿瘤细胞,其中包括阻断细胞周期、诱导细胞产生凋亡、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、提高患者机体免疫力等<sup>[12-14]</sup>。

在本实验中,一方面研究斑蝥酸钠对膀胱癌患者外周血来源的 DC 的成熟及功能的影响,另一方面研究斑蝥酸钠对膀胱癌细胞 BIU-87 增殖和凋亡的影响,进而从改变患者机体免疫力和抑制膀胱肿瘤细胞来综合探讨斑蝥酸钠的作用,为斑蝥酸钠临床应用于膀胱癌患者提供研究基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rh-GM-CSF)和重组人白细胞介素-4(rh-IL-4)(R&D Systems, USA);FITC 标记的抗人 CD1a 和 CD83(USA);Caspase-3、PARP、GAPDH 一抗、HRP 标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司);Ficoll paque plus 淋巴细胞分离液(GE Amersham Biosciences, USA);RPMI-1640 培养基、胎牛血清(HyClone Laboratories, USA);BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 AimexinV-FITC 凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

**1.2 DC 体外培养及给药方法** 选取 15 例膀胱癌患

者及 10 例健康成人,每人抽取静脉血 20 mL,采用 Ficoll Paque Plus 淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞,在  $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养 2 h 后,洗涤除去悬浮细胞,得到贴壁细胞。然后用含 GM-CSF(1 000 IU/mL)、IL-4(500 IU / mL)和 10% 自体血清的 RPMI-1640 培养基培养,每 24 h 半量换液。在第 5 天将培养的细胞进行分组试验,分成以下组别:对照组(Control)、斑蝥酸钠低剂量组(0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、斑蝥酸钠中剂量组(0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、斑蝥酸钠高剂量组(0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、健康人组,第 8 天收集细胞行相关检测。

### 1.3 流式细胞仪检测 DC 表面 CD1a 和 CD83 的变化

分别收集第 8 天的细胞,然后加入 CD1a 和 CD83 荧光抗体,室温、暗室避光孵育 30 min,然后再加入 2 mL 预冷磷酸缓冲液,最后用流式细胞仪检测各组 DC 表面 CD1a 和 CD83 的表达情况。

### 1.4 MTT 法检测斑蝥酸钠对 DC 刺激淋巴细胞增殖的影响

取健康体检人静脉血,分离出单核细胞,在  $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养细胞,2 h 后吸取未贴壁的细胞,得到的即为淋巴细胞。收集培养第 8 天的各组 DC 并用丝裂霉素 C(50 g/mL)孵育 30 min,调整细胞密度为  $1 \times 10^7/\text{L}$ ,按照 DC 与淋巴细胞比例为 1:10 混合,将混合细胞集中于 96 孔板,每组设 6 个复孔,连续培养 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞活力,在 570 nm 处检测各孔吸光度值,按照公式计算淋巴细胞刺激指数。刺激指数=试验组 OD 值/对照组 OD 值。

### 1.5 MTT 法检测斑蝥酸钠对膀胱癌 BIU-87 细胞的抑制作用

BIU-87 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养,培养条件为  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 。实验分为对照组(不加药物)、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  斑蝥酸钠组、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  斑蝥酸钠组,每组设 6 个复孔,分别培养 12、24、36 和 48 h 后,加入 MTT 工作液,继续孵育 4 h 后,加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO,酶标仪检测 570 nm 的吸光度值,计算细胞存活率。

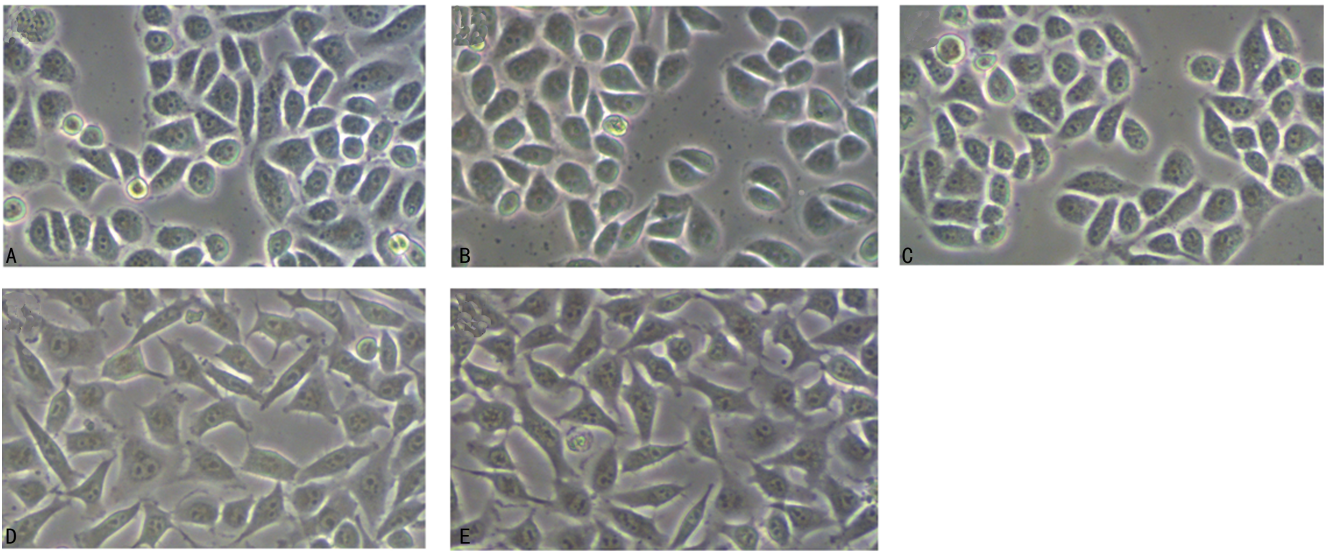
### 1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测斑蝥酸钠对膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡的影响

按照 1.5 的分组方法,取对数生长期的 BIU-87 细胞分别接种于 6 孔板中,给药作用 24 h 后,消化、离心收集细胞,然后加入 0.3 mL 的结合缓冲液,混匀,每个测试样品加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V 和 5  $\mu\text{L}$  PI,在室温孵育 15 min 后,补加 0.2 mL 结合缓冲液,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 1.7 Western blot 法检测 Caspase-3 和 PARP 的表达的变化

按照 1.5 方法处理细胞后,细胞用胰酶消化,收集细胞,用细胞裂解液破碎细胞,低温离心 5 min,收集上清液即为提取蛋白。用 BCA 法进行蛋白浓度测定,采用 SDS-PAGE 法进行电泳,湿法转膜,脱脂奶粉封闭,分别加入 Caspase-3、PARP 和 GAPDH 一抗, $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,滴加 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h 后,暗室滴加 ECL 发光液,扫描纪录。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析数



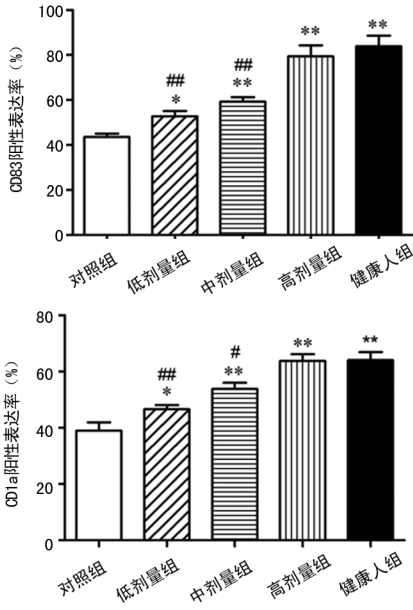
A:对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组;E:健康人组

图 1 DC 形态(×400)

据,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式细胞仪检测 DC、CD1a 和 CD83 的变化  
倒置显微镜拍照结果见图 1,与对照组相比,斑蝥酸钠处理组细胞体积变大,细胞变长,斑蝥酸钠高剂量组(图 1D)细胞出现突起,形如树枝,和健康人组(图 1E)的细胞形态类似。流式细胞仪检测结果如图 2 所示,与对照组相比,CD83 与 CD1a 在斑蝥酸钠处理组中显著升高( $P<0.05$ )。另外 CD83 与 CD1a 在斑蝥酸钠高剂量组中表达最高,且与健康人组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

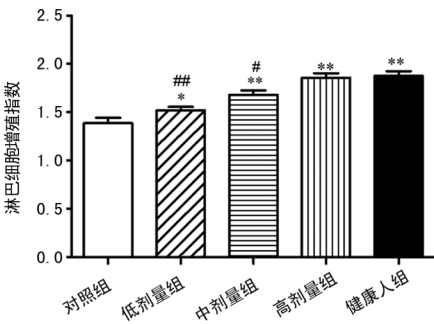


\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , 与对照组比较; #:  $P<0.05$ , ##:  $P<0.01$ , 与健康人组比较

图 2 CD1a 和 CD83 在 DC 中的表达

2.2 斑蝥酸钠刺激异体淋巴细胞增殖能力的检测  
与对照组相比,斑蝥酸钠处理组刺激淋巴细胞增殖指数显著高于对照组( $P<0.05$ )。另外在斑蝥酸钠各剂

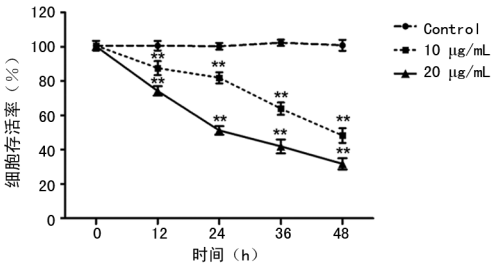
量组中,高剂量组刺激淋巴细胞增殖指数最高,且与健康人组相比,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 3。



\*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ , 与对照组比较; #:  $P<0.05$ , ##:  $P<0.01$ , 与健康人组比较

图 3 斑蝥酸钠刺激异体淋巴细胞增殖指数

2.3 MTT 法检测斑蝥酸钠对膀胱癌 BIU-87 细胞的抑制作用  
与对照组相比,各给药组中细胞存活率均有不同程度的降低,药物的抑制作用随斑蝥酸钠浓度和时间的增加而增大,同一时间点不同处理组之间相比,细胞存活率差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 4。

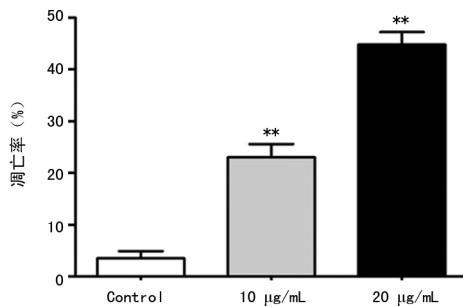


\*\* :  $P<0.01$ , 与对照组比较

图 4 MTT 法检测不同浓度斑蝥酸钠处理后细胞的存活率

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测斑蝥酸钠对膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡的影响  
斑蝥酸钠组与对照组相比,细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义( $P<$

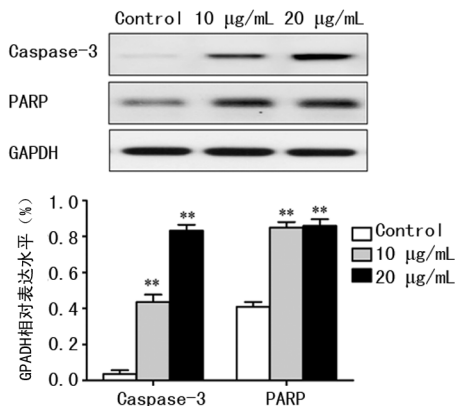
0.01), 见图 5。



\*\* :  $P < 0.01$ , 与对照组比较

图 5 流式细胞术检测不同处理组细胞凋亡状况

**2.5 Western blot 法检测 caspase-3 和 PARP 蛋白表达的变化** 与对照组相比,斑蝥酸钠组 BIU-87 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达显著增强 ( $P < 0.01$ ), 见图 6。



\*\* :  $P < 0.01$ , 与对照组比较

图 6 Western blot 法检测 Caspase-3 和 PARP 蛋白的表达

### 3 讨 论

膀胱癌是最常见恶性肿瘤之一,临床上主要采用保留膀胱的手术治疗。这种治疗方法会使肿瘤切除不彻底,导致一半左右的患者 2 年内肿瘤的复发率非常高。目前,为了解决这一弊端,临床上在患者进行手术后,进行膀胱内灌注药物治疗,但是膀胱癌肿瘤常常发生耐药现象。斑蝥酸钠作为从天然化合物优化而来的化合物,不仅具有抗肿瘤活性,而且还能够调节机体的免疫功能。斑蝥酸钠具有相对分子质量小,容易进入细胞内的特点,另外还能提高患者免疫力。目前,临床上采用斑蝥酸钠与其他抗肿瘤药物联合,主要应用于肺癌、胃癌和老年膀胱癌等肿瘤的治疗<sup>[15-17]</sup>。斑蝥酸钠能够提高机体免疫功能,通过增加白细胞的数量,使得细胞因子分泌增多,提高免疫反应的速度和强度<sup>[18-19]</sup>。

DC 能够摄取抗原,然后将抗原进行处理成具有免疫原性的多肽,在细胞表面表达 MHC-抗原肽复合物,另外 DC 膜表面的特异分子能与淋巴细胞表面相应的配体结合,使抗原特异性 T 细胞得到激活和增殖,最终激活机体产生免疫应答<sup>[20-22]</sup>。DC 广泛分布于体内各个部分,但是整体细胞数量少,不能满足实

验研究和临床应用的要求,所以已经开发出多种途径产生大量 DC,来源主要包括骨髓、脐血、外周血,其中最常用的途径为采集机体外周血,诱导成为 DC<sup>[23]</sup>。

本实验从患者外周静脉血中梯度离心得到分离 PBMC 细胞,然后进行纯化,剩余的贴壁细胞即为单核细胞,利用 GM-CSF 和 IL-4 诱导单核细胞转化成 DC。采用显微镜观察细胞形态变化,然后用流式细胞仪检测了 DC 表面的 CD1a 和 CD80 的表达情况。CD1a 作为 DC 的特异性标志,CD1a 表达量能够显示 DC 的数量,另外 CD83 分子是 DC 的成熟的标志<sup>[24-25]</sup>。

研究结果证明,斑蝥酸钠与 DC 共孵育后,培养细胞表面产生突起,形如树枝,同时 DC 表面 CD1a 和 CD80 的表达显著升高,斑蝥酸钠高剂量组与健康人组 DC 比较,差异无统计学意义。另外采用 MTT 方法检测了斑蝥酸钠对 DC 刺激淋巴细胞增殖能力,结果发现斑蝥酸钠能够增强淋巴细胞增殖能力。表明斑蝥酸钠能够增强膀胱癌患者 DC 的形成和 CD1a 与 CD80 分子的表达,进而提高患者的免疫能力。

细胞内环境的变化导致细胞应激反应的产生,进而会导致细胞发生自毁性死亡,即细胞凋亡。多种基因参与细胞的凋亡的整个过程,其中 Caspase-3 在此过程中发挥关键作用,当 Caspase-3 被激活后,细胞将会进入不可逆的凋亡进程,而且多种因素诱导的凋亡很大一部分都通过 Caspase-3 这一信号途径实现。PARP 是一种 DNA 修复酶,定位于细胞核内,当细胞通过 Caspase-3 导致凋亡产生时,活化的 PARP Caspase-3 能够剪切激活 PARP,进而导致细胞发生凋亡。

本实验通过 MTT 法证明斑蝥酸钠能够显著抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的生长,且呈剂量和时间依赖性。通过 Annexin V-FITC/PI 双染法证明斑蝥酸钠能够诱导膀胱癌 BIU-87 细胞发生凋亡。另外进一步研究了斑蝥酸钠对凋亡蛋白 Caspase-3 和 PARP 表达的影响,结果发现,与对照组相比,斑蝥酸钠组 BIU-87 细胞中 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达升高,促进 BIU-87 细胞发生凋亡。

综上所述,斑蝥酸钠一方面能够促进膀胱癌患者 DC 的成熟和增加 DC 刺激淋巴细胞的增殖能力,另一方面能够抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖,并促进其发生凋亡。本研究为斑蝥酸钠治疗膀胱癌的临床应用提供了一种新的策略,即膀胱灌注高剂量斑蝥酸钠杀灭肿瘤细胞,然后体内给予低剂量斑蝥酸钠激活机体免疫系统。

### 参考文献

[1] TRINCHIERI G, SHER A. Cooperation of toll-like receptor signals in innate immune defence[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(3): 179-190.  
[2] KRIEG A M. Therapeutic potential of toll-like receptor 9



- activation[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(6):471-484.
- [3] INABA K, PACK M, INABA M, et al. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(5):665-672.
  - [4] PIRTSKHALAISHVILI G, SHURIN G V, GAMBOTTO A, et al. Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice[J]. *J Immunol*, 2000, 165(4):1956-1964.
  - [5] INOUE K, YAMASHITA A, YAMASHITA M, et al. Distribution of S-100 protein-positive dendritic cells inside the cancer nest and expression of HLA-DR antigen and blood group antigen on the cancer cell in transitional cell carcinoma of the urinary bladder--in relation to tumor progression and prognosis[J]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 1994, 85(3):495-503.
  - [6] TROY A J, DAVIDSON P J, ATKINSON C H, et al. CD1a dendritic cells predominate in transitional cell carcinoma of bladder and kidney but are minimally activated [J]. *J Urol*, 1999, 161(6):1962-1967.
  - [7] EFFERTH T, DAVEY M, OLBRICH A, et al. Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-over expressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 28(2):160-168.
  - [8] KOK S H, HONG C Y, KUO M Y, et al. Comparisons of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes[J]. *Oral Oncol*, 2003, 39(1):19-26.
  - [9] MCCLUSKEY A, ACKLAND S P, BOWYER M C, et al. Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines [J]. *Bioorg Chem*, 2003, 31(1):68-79.
  - [10] VERMA A K, PRASAD S B. Changes in glutathione, oxidative stress and mitochondrial membrane potential in apoptosis involving the anticancer activity of cantharidin isolated from redheaded blister beetles, *epicauta hirticornis* [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(7):1096-1114.
  - [11] LI W, XIE L, CHEN Z, et al. Cantharidin, a potent and selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G2/M cell-cycle arrest and apoptosis[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5):1226-1233.
  - [12] CHEN X F, QIU J R, YANG D P, et al. MDM2 promotes invasion and metastasis in invasive ductal breast carcinoma by inducing matrix metalloproteinase-9 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78794.
  - [13] ZHAN Y P, HUANG X, CAO J, et al. Clinical study on safety and efficacy of Qinin (cantharidin Sodium) injection combined with chemotherapy in treating patients with gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(9):4773-4776.
  - [14] LIU Z Y, QIU H O, YUAN X J, et al. Suppression of lymphangiogenesis in human lymphatic endothelial cells by simultaneously blocking VEGF-C and VEGF-D/VEGFR-3 with norcantharidin[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(5):1762-1772.
  - [15] SHOU L, ZHANG Q, LI W, et al. Cantharidin and norcantharidin inhibit the ability of MCF-7 cells to adhere to platelets via protein kinase C pathway-dependent down-regulation of  $\alpha 2$  integrin [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3):1059-1066.
  - [16] KUNITANI H, SHIMIZU Y, MURATA H, et al. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2002, 36(6):734-741.
  - [17] SZABOLCS P, MOORE M A, YOUNG J W. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34<sup>+</sup> bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha [J]. *J Immunol*, 1995, 154(11):5851-5861.
  - [18] SZABOLCS P, MOORE M A, YOUNG J W. Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34<sup>+</sup> bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha [J]. *J Immunol*, 1995, 154(11):5851-5861.
  - [19] RODRIGUEZ-FERNANDEZ J L, CORBI A L. Adhesion molecules in human dendritic cells[J]. *Curr Opin Investig Drug*, 2005(6):1103-1111.
  - [20] ANGUILLE S, SMITS E L, LION E. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7):257-267.
  - [21] COLLINS L E, DECOURCEY J, SOLEDAD M, et al. An emerging role for SNARE proteins in dendritic cell function[J]. *Front Immunol*, 2015(6):133.
  - [22] SCHMITT N, UENO H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines[J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 34(34):130-136.
  - [23] ROUARD H, LEON A, KLONJKOWSKI B, et al. Adenoviral transduction of human clinical grade immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity[J]. *J Immunol Meth*, 2000, 241(1/2):69-81.
  - [24] SEAGER DANCIGER J, LUTZ M, HAMA S, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 288(1/2):123-134.
  - [25] LI Z, JO J, JIA J M, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization[J]. *Cell*, 2010, 141(5):859-871.