

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.06.002

## CD16a 对 U937 细胞联合西妥昔单抗杀伤结直肠癌细胞作用的影响\*

梁正子<sup>1</sup>, 曹飞龙<sup>1,2</sup>, 颜登国<sup>1△</sup>, 王 磊<sup>1</sup>, 徐 伟<sup>1</sup>, 龙佑萍<sup>1</sup>

(1. 贵州医科大学附属医院结直肠肛门外科, 贵阳 550004; 2. 江西省龙南县人民医院外科 341700)

**[摘要]** **目的** 探讨 CD16a 表达变化对 U937 细胞联合西妥昔单抗杀伤结直肠癌细胞作用的影响。**方法** 将 CD16a 基因通过慢病毒转染的方法导入 U937 细胞中, 通过检测结肠癌细胞的增殖情况, 凋亡情况, 细胞周期, 迁移、侵袭能力的变化来评价 CD16a 基因过表达后的 U937 细胞对结直肠癌细胞杀伤力的影响。**结果** 西妥昔单抗+CD16a 过表达 U937 细胞组, 西妥昔单抗+U937 细胞组, 西妥昔单抗组, U937 细胞组, CD16a 过表达 U937 细胞组, 空白对照组乳酸脱氢酶(LDH)活性分别为(159.28±7.92), (126.69±17.62), (120.23±5.67), (124.10±16.44), (123.30±6.86)U/L 和(95.90±11.44)U/L, 西妥昔单抗+CD16a 过表达 U937 细胞组能明显影响结直肠癌细胞的增殖; 各组肿瘤细胞凋亡率分别为 90.60%±3.57%, 74.00%±7.51%, 68.10%±8.03%, 73.50%±30.67%, 68.10%±8.02% 和 46.20%±17.27%, 西妥昔单抗+CD16a 过表达 U937 细胞组诱导肿瘤细胞凋亡率明显高于其余各组; CD16a 过表达 U937 细胞组能够抑制体外培养结直肠癌细胞的侵袭能力。**结论** CD16a 过表达的 U937 细胞能够增强西妥昔单抗对结直肠癌细胞的杀伤作用, 能够抑制体外培养结直肠癌细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; 抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用; 靶向治疗; CD16a

**[中图分类号]** R657.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2020)06-0866-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Effect of CD16a expression in U937 monocyte on cetuximab on cell growth in colorectal cancer\*

LIANG Zhengzi<sup>1</sup>, CAO Feilong<sup>1,2</sup>, YAN Dengguo<sup>1△</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, XU Wei<sup>1</sup>, LONG Youping<sup>1</sup>

(1. Department of Colorectal and Anal Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Surgery, Longnan County People's Hospital, Longnan, Jiangxi 341700, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of CD16a expression changes on monocytes combined with cetuximab in colorectal cancer cells. **Methods** CD16a gene was imported into U937 monocyte by means of lentivirus infection. The effect of CD16a gene overexpression on the kill ability of U937 monocytes on colorectal cancer cells was evaluated by detecting the tumor proliferation, apoptosis, cell cycle, migration and invasive ability of colorectal cancer cells. **Results** The activities of LDH in the cetuximab + CD16a overexpression cells group, cetuximab + U937 cells group, cetuximab group, U937 cells group, CD16a overexpression U937 cells group and blank control group were 159.28±7.92, 126.69±17.62, 120.23±5.67, 124.10±16.44, 123.30±6.86 and 95.90±11.44 respectively. U937 cells with cetuximab+CD16a overexpression significantly inhibited the proliferation of colorectal cancer cells, which showed the statistical difference compared with the other 4 groups. The tumor cell apoptosis rates in various groups were 90.60%±3.57%, 74.00%±7.51%, 68.10%±8.03%, 73.50%±30.67%, 68.10%±8.02% and 46.20%±17.27% respectively. The tumor cell apoptosis induced by U937 cells group with cetuximab + CD16a overexpression was significantly higher than

\* 基金项目: 贵州省科技厅高校联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7117, 黔科合 LH 字[2015]7440); 北京 CSCO-默克雪兰诺肿瘤研究基金项目(Y-MX2016-072)。 作者简介: 梁正子(1979—), 副主任医师, 硕士, 主要从事结直肠癌的研究。 △ 通信作者, E-mail: dengguoy@163.com。

in the other groups. U937 cells with CD16a overexpression could inhibit the invasive ability of colorectal cancer cells in vitro. **Conclusion** U937 monocytes with CD16a overexpression can enhance the killing effect of cetuximab on colon cancer cells, and can inhibit the invasive ability of colon cancer cells cultured in vitro.

**[Key words]** colorectal neoplasms; ADCC; targeted therapy; CD16a

靶向药物抗肿瘤作用中一个重要的机制是抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC),这需要单抗的 FC 段与免疫效应细胞膜上的 FC 段受体结合才能发挥作用,如果免疫效应细胞缺乏 FC 段受体,就会使单抗因不能募集到足够的免疫效应细胞而无法发挥有效的细胞毒作用。FC $\gamma$ RⅢA 能与 IgG1、IgG3 的 FC 段结合,是肿瘤局部免疫效应细胞发挥抗肿瘤作用和介导单克隆抗体靶向治疗恶性肿瘤的一个重要的结合位点。免疫效应细胞中 FC $\gamma$ RⅢA 的表达变化可能会影响免疫效应细胞及单克隆抗体的抗肿瘤作用<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期研究发现,FC $\gamma$ RⅢA 在有肝脏转移的结直肠癌患者原发肿瘤组织中表达明显低于无肝脏转移者<sup>[3]</sup>。目前靶向药物对于晚期结直肠癌患者的疗效仍然不理想,其原因是否与免疫效应细胞中 FC $\gamma$ RⅢA 的表达低下有关?本实验将通过基因工程的方法把 FC 段受体(CD16a)基因通过慢病毒转染的方法导入免疫效应细胞 U937 中,通过比较 CD16a 过表达的免疫细胞和普通免疫细胞联合西妥昔单抗在体外对结直肠癌细胞株 DLD-1 的杀伤力的影响来评估 CD16a 受体是否能够作为联系细胞免疫治疗和靶向治疗的桥梁,为结直肠癌的治疗提供一个新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

结直肠癌细胞 DLD-1;来自贵州医科大学临床医学研究中心生物样本库;免疫细胞:U937 细胞株购自南京凯基生物技术股份有限公司;CD16a(FCGR3A)过表达慢病毒购自上海吉凯基因公司。设计的 CD16a 引物扩增产物长度为 74 bp,上游引物序列:5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGA C-3';下游引物序列:5'-CTG AAG ACA CAT TTT TAC TCC CAA AC -3'。内参基因选择 GAPDH,GAPDH 引物扩增产物长度为 138 bp,上游引物序列:5'-CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT-3';下游引物序列:5'-GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'。两种引物设计及合成均由上海生工生物技术有限公司完成。

### 1.2 试剂

细胞培养材料:1640 培养基(Gibco 公司);慢病毒构建:CD16a(FCGR3A)基因过表达慢病毒(吉凯基因);基因表达检测试剂:TransZol Up Plus RNA Kit RNA 反转录试剂盒(全式金);EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 荧光

定量 PCR 试剂盒(全式金);TransStart Tip Green qPCR SuperMix(全式金);Trans2K DNA Maiker(全式金);免疫印迹法检测蛋白浓度试剂及材料:十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);细胞损伤情况检测:乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);细胞活性检测:CCK8 检测试剂盒(日本东仁 CK04);实验抗体:西妥昔单抗(爱必妥,德国默克公司);细胞凋亡和周期检测:细胞凋亡检测试剂盒(凯基 Annexin V-APC/PI),细胞周期检测试剂盒(凯基 KGA512)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 免疫细胞 U937 的培养、转染及鉴定

将复苏后的 U937 细胞用 RPMI 1640 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素双抗于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2~3 d 用胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行转染。实验分为 CD16a 基因阳性慢病毒转染组[加入 CD16a(FCGR3A)过表达慢病毒],CD16a 基因阴性慢病毒对照组(加入普通慢病毒)和空白对照组(加入培养液)。按照制造商提供的说明书进行转染操作。混匀后于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 8 h 以后,更换新鲜完全培养基,在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养,细胞培养过程中根据细胞状态换液,保持细胞活性转染 3~4 d 时开始在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况并拍照。慢病毒转染成功的 U937 细胞在倒置荧光显微镜下可以观察到绿色荧光,本研究通过流式细胞仪的 FITC 通道进行细胞分选,分选出来的带绿色荧光的细胞为 CD16a 阳性细胞(即目的细胞)。收集慢病毒转染后第 7 天的细胞进行分选,收集细胞并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  / mL,在流式细胞仪 FITC 通道上进行分选,收集绿色荧光细胞(CD16a 阳性细胞)进行传代培养并进行下一步实验。

#### 1.3.2 CD16a 过表达 U937 免疫细胞和普通 U937 免疫细胞 CD16a mRNA 和蛋白表达的比较

采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 检测 U937 免疫细胞 mRNA 和蛋白表达情况。CD16a mRNA 表达的比较:Trizol 法提取 CD16a 过表达 U937 细胞和普通 U937 细胞总 RNA,反转录反应合成 cDNA。取上述反转录产物 2  $\mu$ L 于 20  $\mu$ L PCR 反应体系中进行反应,每 1 个样品至少 3 个复孔,并使

用内参 GAPDH 作为参照。反应体系在 ABI ViiA7 荧光定量 PCR 仪上进行。最终产物经 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定,实时荧光定量 PCR 检测结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值计算拷贝数。以 GAPDH 为内参基因。CD16a mRNA 相对表达量 = CD16a mRNA  $\Delta Ct$  值 / GAPDH mRNA  $\Delta Ct$  值。

CD16a 蛋白表达的比较:转染后和未转染的细胞每孔加入 200  $\mu$ L 蛋白裂解液,匀浆后在冰上裂解 30 min,将裂解液转入 BP 管中 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。用 10  $\mu$ L 加样器贴壁按顺序加样,每孔上样量 10  $\mu$ L (60  $\mu$ g),将制好的样品放入水浴锅 100  $^{\circ}$ C 加热变性 10 min 后 SDS-PAGE 电泳。采用湿转法将凝胶上的蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉室温于摇床上封闭 4 h 后用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入 1:1 000 稀释的一抗,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜,在摇床上使用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。然后加入 1:5 000 稀释的二抗,室温孵育 90 min,在摇床上使用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。用免疫化学发光试剂盒及显影液处理 PVDF 膜,将显影液均匀滴在需要显影的 PVDF 膜上,放入曝光仪器中进行曝光显影。目的基因蛋白相对表达量计算为目的蛋白 A 值 / GAPDH A 值。

### 1.3.3 细胞共培养模型的建立

用 50 mg/L Matrigel 胶 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4  $^{\circ}$ C 风干。吸出培养板中的残余液体,每孔加入 50  $\mu$ L 含 10 g/L BSA 的无血清培养液,37  $^{\circ}$ C 培养 30 min。将结直肠癌细胞 DLD-1 和 U937 单核细胞按 1:1 的比例制成细胞悬液,取 200  $\mu$ L 加入小室中。24 孔板下室一般加入 500  $\mu$ L 含 FBS 的培养基,注意下层培养液和小室间不能有气泡产生,实验中上室不足 200  $\mu$ L 液体的加入无血清培养基补足 200  $\mu$ L。放入细胞培养箱中进行培养。

### 1.3.4 CD16a 不同表达情况下,U937 细胞联合西妥昔单抗对结直肠癌细胞 DLD-1 的杀伤作用

将实验细胞分为 6 组:西妥昔单抗 + CD16a 过表达 U937 细胞组(A 组)、西妥昔单抗 + U937 细胞组(B 组)、西妥昔单抗组(C 组)、U937 细胞组(D 组)、CD16a 过表达 U937 细胞组(E 组)、空白对照组(F 组),同时设 U937 单核细胞自然释放孔、结直肠癌细胞 DLD-1 释放孔和最高释放孔对照。取对数生长期的 CD16a 过表达 U937 细胞和 U937 细胞,用 PBS 漂洗 2 次并用培养液将细胞调整到  $5 \times 10^6$  个/mL,结直肠癌细胞 DLD-1 制成细胞悬液,用完全培养基调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL。分别加入 96 孔板中,每组 3 个复孔,采用的单抗浓度为 20  $\mu$ g/mL,放入 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  细胞培养箱中培养 24 h。用离心法收集细

胞上清液,按 LDH 测定试剂盒说明书进行 LDH 水平检测。并用酶标仪检测相关光密度(OD)值。根据下列公式计算培养上清液中 LDH 的活性(U/L):

LDH 活性(U/L) = (实验孔 OD - 靶细胞自然释放孔 OD - 效应细胞自然释放孔 OD) / (靶细胞最大释放孔 OD - 靶细胞自然释放孔 OD - 校正孔 OD)  $\times$  标准品浓度  $\times$  稀释倍数  $\times$  1 000。

### 1.3.5 肿瘤细胞凋亡及细胞周期情况

实验分组和实验方法同 1.3.4。培养 24 h 后用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化收集 DLD-1 细胞;用 PBS 漂洗 2 次(2 000 r/min 离心 5 min)收集细胞,加入 500  $\mu$ L Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5  $\mu$ L Annexin V-APC 混匀后,加入 5  $\mu$ L PI 染液混匀;室温下避光反应 15 min;30 min 内在流式细胞仪上进行检测。

### 1.3.6 细胞周期的检测

培养 24 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化收集 DLD-1 细胞,PBS 洗涤细胞 1 次(2 000 r/min 离心 5 min)收集并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的单细胞悬液离心后去除上清液,加入 70%冷乙醇 500  $\mu$ L 固定,4  $^{\circ}$ C 过夜;用 PBS 洗去固定液并用 200 目筛网过滤 1 次,1 000 r/min 离心 3 min;加入 500  $\mu$ L PI/RNase A 染色液,室温避光 60 min 上机检测。

### 1.3.7 肿瘤细胞 Transwell 实验

实验分组如下:西妥昔单抗 + CD16a 过表达 U937 细胞组(A 组);西妥昔单抗 + U937 细胞组(B 组);空白对照组(F 组)。实验操作如 1.3.4,常规放入细胞培养箱中培养 24 h,取出小室,用棉拭子擦去 Matrigel 胶和上室内的细胞,甲醛固定 10 min,按 Giemsa 说明染色,使用正置显微镜进行观察和拍照。随机计数 5 个视野中的细胞数,实验重复 3 次。

### 1.3.8 肿瘤细胞迁移实验

实验分组及实验操作如 1.3.5,常规放入细胞培养箱中培养 24 h,取出小室,用棉拭子擦去 Matrigel 胶和上室内的细胞,甲醛固定 10 min,按 Giemsa 说明染色,使用正置显微镜进行观察和拍照。随机计数 5 个视野中的细胞数,实验重复 3 次。

## 1.4 统计学处理

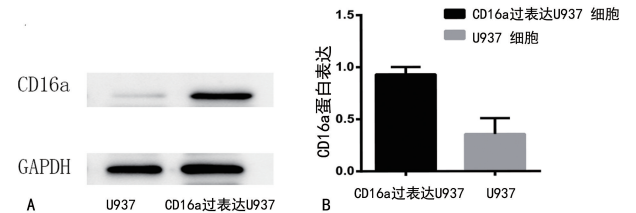
采用 SPSS24.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 CD16a 过表达 U937 细胞和普通 U937 细胞 CD16a mRNA 和蛋白表达结果

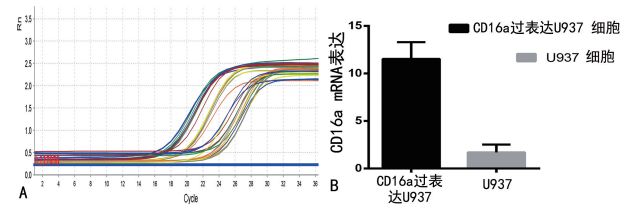
CD16a 过表达 U937 细胞和普通 U937 细胞 CD16a mRNA 相对表达量分别为  $11.50 \pm 1.76$  和  $1.70 \pm 0.82$ ,差异有统计学意义( $t = 9.501, P = 0.011$ );蛋白相

对表达量分别为  $0.94 \pm 0.07$  和  $0.36 \pm 0.15$ , 差异有统计学意义( $t=6.096, P=0.026$ ), 见图 1、2。



A: Western blot 检测 CD16a 过表达 U937 细胞和普通 U937 细胞的 CD16a 蛋白表达情况; B: 用 Graphpad Prism 6 绘制的两种细胞 CD16a 蛋白表达情况的统计图。

图 1 两种细胞的 CD16a 蛋白表达情况



A: CD16a 过表达 U937 细胞和普通 U937 细胞 CD16a mRNA 的表达情况; B: 用 Graphpad Prism 6 绘制的 CD16a 基因表达情况的统计图。

图 2 两种细胞的 CD16a mRNA 表达情况

2.2 LDH 活性检测

A、B、C、D、E、F 组 LDH 活性分别为( $159.28 \pm 7.92$ ), ( $126.69 \pm 17.62$ ), ( $120.23 \pm 5.67$ ), ( $124.10 \pm 16.44$ ), ( $123.30 \pm 6.86$ )U/L 和 ( $95.90 \pm 11.44$ )U/L, 见图

1。A 组明显影响结直肠癌细胞的增殖, 与 B、C、D、E 组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。虽然 B 组 LDH 的活性稍高, 但与 C、D、E 组比较对结直肠癌细胞的增殖作用的影响差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 见图 3。

2.3 细胞周期及细胞凋亡率的变化

A、B、C、D、E、F 组肿瘤细胞凋亡率分别为  $90.60\% \pm 3.57\%$ ,  $74.00\% \pm 7.51\%$ ,  $68.10\% \pm 8.03\%$ ,  $73.50\% \pm 30.67\%$ ,  $68.10\% \pm 8.02\%$  和  $46.20\% \pm 17.27\%$ 。各实验组(A、B、C、D、E 组)和对照组(F 组)比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 而实验组中 A 组与其余各组比较差异均有统计学意义(A 组 vs. B 组,  $P=0.026$ ; A 组 vs. C 组,  $P=0.000$ ; A 组 vs. D 组,  $P=0.039$ ; A 组 vs. E 组,  $P=0.001$ ), 见图 4、5、6。检测细胞周期结果显示, 各组细胞周期未见明显差异, 见表 1。

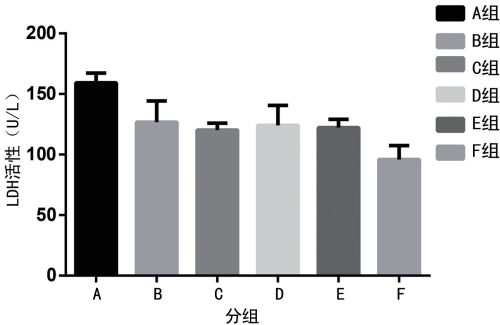
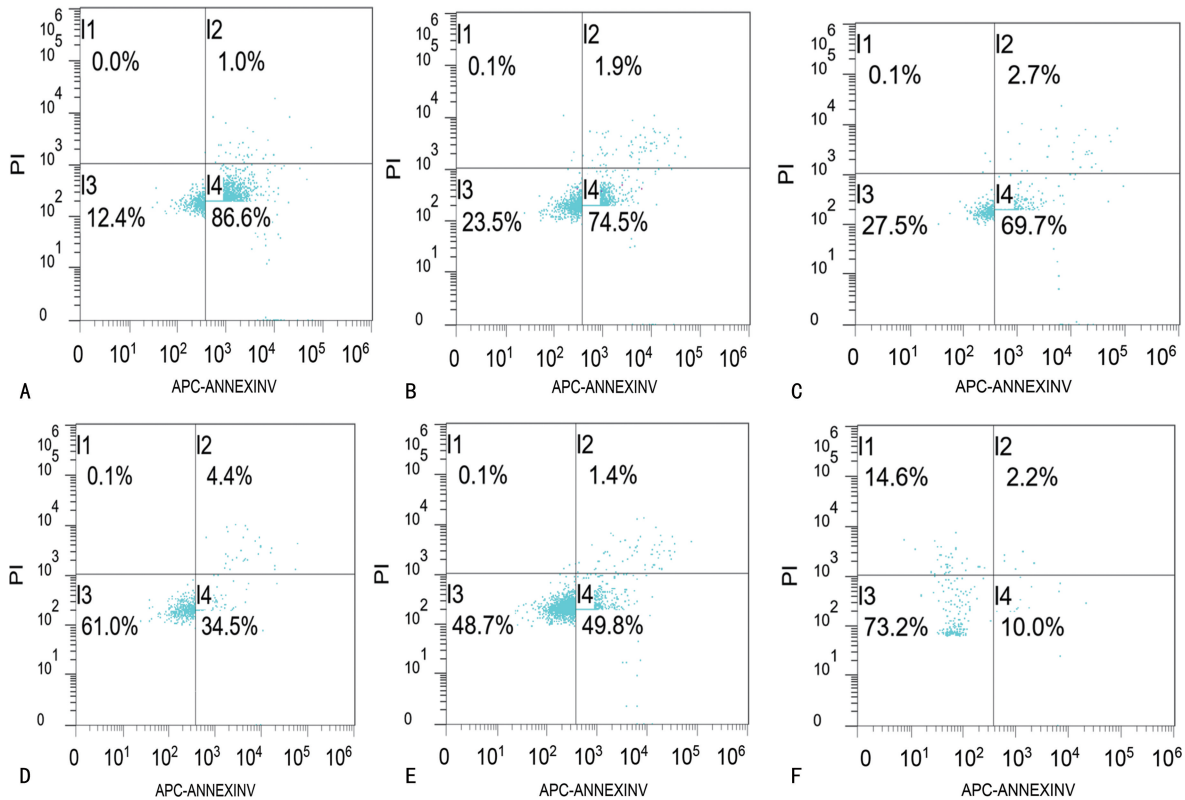


图 3 6 组细胞的 LDH 活性检测



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组; F: F 组。

图 4 流式细胞术检测 6 组细胞凋亡率

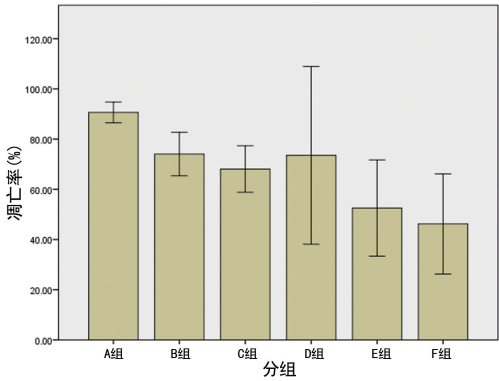


图 5 6 组细胞凋亡率柱状图

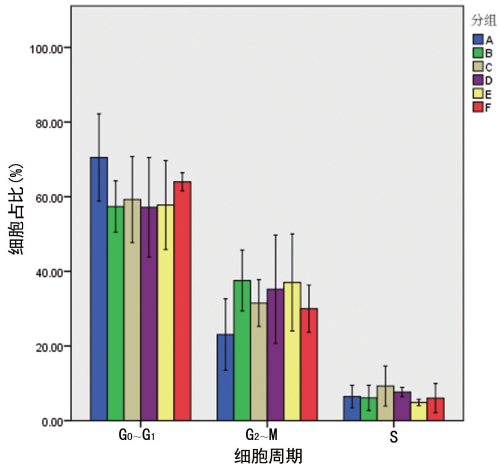


图 6 6 组细胞的细胞周期分布

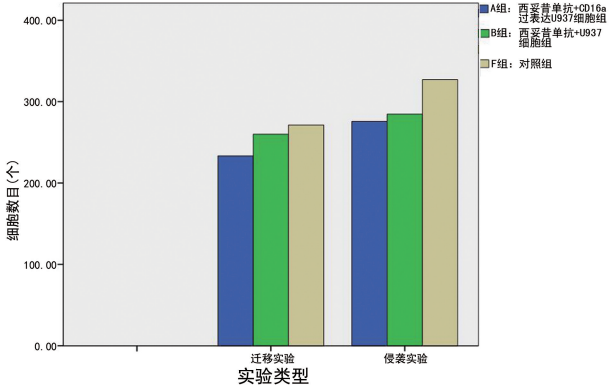


图 7 3 种细胞对结直肠癌细胞 DLD-1 侵袭及迁移的影响

3 讨论

目前单抗靶向药物已广泛应用于晚期结直肠癌的治疗并取得较好的效果<sup>[4-7]</sup>,但是不少患者仍然不能从中获益。CD16a 也称为 IgGⅢA 受体(FC fragment of IgG, low affinity Ⅲ a receptor, FCγ RⅢ A),或淋巴细胞表面 FCγ RⅢ A,为 IgG 受体,是一种表达于自然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞、中性粒细胞等免疫效应细胞表面的跨膜蛋白,是机体细胞免疫功能发挥作用一个比较重要的结合位点。FCRⅢ A 表达在相关细胞的表面并激活细胞后通过细胞的吞噬、内吞、细胞因子的释放作用参与细胞毒作用<sup>[8-10]</sup>。CD16a 介导的细胞毒作用对调节抑制结直肠肿瘤和抗肿瘤免疫作用及肿瘤患者无疾病生存期的提高和控制肿瘤生长有极其重要的作用<sup>[11-12]</sup>。当减弱 CD16a 在 kupffer 细胞中的表达以后,kupffer 细胞对肝癌细胞的杀伤能力明显下降<sup>[13]</sup>。CD16a 高表达的单核细胞联合巨噬细胞,较 CD16a 阴性表达的单核细胞联合巨噬细胞的抗肿瘤细胞毒作用明显增强<sup>[11]</sup>。CD16a 高表达的免疫效应细胞无论联合其他免疫细胞还是联合单克隆抗体均能够增强对肿瘤细胞的杀伤作用,其作用机制包括增强细胞毒作用,促进抗体与肿瘤细胞的结合,促进肿瘤细胞的凋亡,促进细胞因子、干扰素(IFN)的释放等<sup>[14-16]</sup>。SCONOCCHIA 等<sup>[17]</sup>的临床回顾性研究也发现,结直肠癌患者的癌组织中 CD16a 阳性免疫细胞浸润多者远期生存率较 CD16a 阳性免疫细胞浸润少的患者更高,癌组织中 CD16a 表达水平可以作为结直肠癌患者生存时间预测的一个生物标志物。这些研究表明 CD16a 的表达变化对于机体免疫状况、药物治疗疗效有一定影响。

本实验结果显示,与普通 U937 细胞+西妥昔单抗及其他实验组相比,通过慢病毒转染 CD16a 过表达 U937 细胞+西妥昔单抗对于结直肠癌细胞 DLD-1 有更强的杀伤作用,但是单纯用 CD16a 过表达 U937 细胞

表 1 流式细胞术检测细胞周期结果统计( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别 | G <sub>0</sub> ~G <sub>1</sub> 期 | G <sub>2</sub> ~M 期 | S 期     |
|----|----------------------------------|---------------------|---------|
| A  | 70.5±10.1                        | 23.1±8.1            | 6.4±2.6 |
| B  | 57.4±6.0                         | 37.5±7.1            | 6.1±2.9 |
| C  | 59.2±10.0                        | 31.5±5.4            | 9.3±4.6 |
| D  | 57.2±11.5                        | 35.2±12.6           | 7.6±1.1 |
| E  | 57.8±10.3                        | 37.0±11.0           | 4.9±0.8 |
| F  | 64.0±2.1                         | 30.0±5.5            | 6.0±3.4 |

2.4 CD16a 过表达 U937 细胞及普通 U937 细胞对结直肠癌细胞 DLD-1 侵袭及迁移的影响

按 1.3.7 的实验分组,A、B、F 组肿瘤细胞迁移结果分别为(275.7±11.7),(284.6±6.5)个和(327.0±8.9)个。A 组和 B 组比较差异无统计学意义( $P=0.216$ ),A 组和 F 组比较差异有统计学意义( $P=0.04$ ),B 组和 F 组比较差异有统计学意义( $P=0.018$ )。

细胞侵袭实验中,A、B、F 组肿瘤细胞侵袭结果分别为(233.3±29.7),(260.0±9.0)个和(271.3±11.2)个。A 组和 B 组比较差异有统计学意义( $P=0.02$ ),A 组和 F 组比较差异有统计学意义( $P=0.023$ ),B 组和 F 组比较差异无统计学意义( $P=0.126$ ),见图 7。

对于肿瘤细胞的杀伤作用与单纯用西妥昔单抗的抗肿瘤作用无明显差异,也与普通 U937 细胞的抗肿瘤作用无明显差异。说明增强免疫细胞 CD16a 的表达需要与西妥昔单抗共同作用才能发挥抗肿瘤作用。这表明通过增强免疫效应细胞 CD16a 的表达可以提高靶向药物治疗的疗效。进一步实验显示 CD16a 过表达 U937 细胞联合西妥昔单抗对结直肠癌细胞 DLD-1 有最明显的诱导凋亡的作用,CD16a 过表达 U937 细胞联合西妥昔单抗较单独使用 CD16a 过表达 U937 细胞或者单独应用西妥昔单抗效果好。而 CD16a 过表达 U937 细胞单独应用时对 DLD-1 的杀伤作用和普通 U937 细胞没有区别。即 CD16a 过表达 U937 细胞联合西妥昔单抗对 DLD-1 促进凋亡作用较 U937 联合西妥昔单抗、单独应用西妥昔单抗、单独使用 CD16a 过表达 U937 细胞强。U937 细胞联合西妥昔单抗对 DLD-1 促进凋亡作用较单独应用西妥昔单抗、单独使用 U937 免疫细胞强。对 DLD-1 杀伤作用和诱导肿瘤细胞凋亡的作用一致,说明导致肿瘤细胞凋亡是其抗肿瘤作用机制之一。

有研究发现癌组织中 CD16a 表达水平下降的患者,结直肠癌的病理分期较晚<sup>[18]</sup>。在前期的研究中本课题组采用基因芯片技术分析结直肠癌患者原发肿瘤组织中基因表达情况时发现,在有肝脏转移的结直肠癌患者原发肿瘤组织中 CD16a 表达水平明显低于无肝脏转移的患者<sup>[3]</sup>。这提示肿瘤组织中 CD16a 的表达下调可能有利于结直肠癌细胞的转移。从本实验研究结果来看,与 CD16a 正常表达组和对照组相比较,CD16a 过表达 U937 细胞联合西妥昔单抗组更能够抑制体外培养结直肠癌细胞的侵袭,说明 CD16a 的表达变化对结直肠癌细胞的侵袭迁移能力的影响较为明显,当肿瘤组织中 CD16a 的表达下调时,肿瘤细胞更容易通过侵入循环系统发生远处转移,当然还有待进行更多的细胞实验及动物实验加以明确。

## 参考文献

- [1] CECCHETTI S, SPADARO F, LUGINI L, et al. Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(10):2912-2922.
- [2] WU J M, EDBERG J C, REDECHA P B, et al. A novel polymorphism of FC gamma R III a (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(5):1059-1070.
- [3] 颜登国, 王国栋, 程海玉. 基因芯片技术分析结直肠癌肝转移患者免疫基因表达的变化[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2012, 19(11):1182-1186.
- [4] HELDEN E J, MENKE C W, HEYMANS M W, et al. Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(6):395-406.
- [5] PINTO C, NORMANNO N, ORLANDI A, et al. All the investigators of ERMES study group. phase III study with FOLFIRI+cetuximab versus FOLFIRI+cetuximab followed by cetuximab alone in RAS and BRAF WT mCRC[J]. *Future Oncology*, 2018, 14(14):1339-1346.
- [6] OSUMI H, SHINOZAKI E, MASHIMA T, et al. Phase II trial of biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy for pretreated KRAS exon 2 wild-type colorectal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(8):2567-2575.
- [7] SU J, LAI J, YANG R, et al. Capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine in maintenance treatment for untreated characterised KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer: a retrospective analysis in Chinese postmenopausal women[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019, 19(1):17.
- [8] MOGA E, ALVAREZA E, CANTO E, et al. NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(1):69-77.
- [9] OCHOA M C, MINUTE L, RODRIGUEZ I, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC): immunotherapy strategies enhancing effector NK cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(4):347-355.
- [10] CANOSSA A, AURELI A, DEL BEATO T, et al. Role of KIR and CD16A genotypes in colorectal carcinoma genetic risk and clinical stage[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1):239.
- [11] KOBAYASHI E, MOTOI S, SUGIURA M, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and cytokine/chemokine secretion by KHYG-1 cells stably expressing FC gamma R III A[J]. *Immunol Lett*, 2014, 161(1):59-64.

CX3CR1、CD11b/c、NMDAR 表达的调节有关。说明乌头可显著性下调寒痹模型组大鼠的痛觉过敏,明显促进热痹模型大鼠的痛觉过敏的形成,因而适用于治疗寒痹证,佐证了中医治疗原则“寒者热之”。

## 参考文献

- [1] 吴迪,王键. 痹证理论及其中医证候治研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(7): 147-150.
  - [2] 李鑫,魏艳霞,林也. 风寒湿外邪对痹证(佐剂性关节炎)发生发展的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(12): 1496-1501.
  - [3] 周瑾,潘扬,袁振华,等. 乌头汤证治及临床应用[J]. 河南中医, 2017, 37(12): 2058-2060.
  - [4] 钱兆丰,王付. 王付运用乌头汤经验探索[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(7): 86-89.
  - [5] 黄茜,孙明丽,李腾飞,等. 乌头生物碱镇痛作用及机制研究进展[J]. 神经药理学报, 2017, 7(3): 21-32.
  - [6] 张天睿,张硕峰,宋敬怡,等. 祖师麻肠溶微丸对结扎坐骨神经所致痛觉敏感大鼠背根神经 P2X4 受体及 P38MAPK 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 37-40.
  - [7] 曹丽君,王瑞,刘永惠. 刘永惠教授临床辨治痹证经验[J]. 河北中医, 2018, 40(4): 485-488.
  - [8] 刘风雨,万有. 神经病理性疼痛治疗的新靶点: Cav3. 2T 型钙离子通道[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(6): 401, 406.
  - [9] 王乙茹,王浩伟,袁红斌. 神经病理性疼痛的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2018, 39(2): 165-169.
  - [10] 孙彩霞,苏兆亮,许化溪. 神经病理性疼痛中枢敏化的免疫炎症机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3): 331-333.
  - [11] BRADESI S, BRADESI S. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception[J]. Neurogastroenterol Motil, 2010, 22(5): 499-511.
  - [12] 端木程琳,乔丽娜,闫娅霞. 针刺镇痛与脊髓胶质细胞参与慢性痛作用机制研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 153-156.
  - [13] 董源基,喻志源,谢敏杰,等. 脊髓损伤和炎症[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(3): 142-145.
  - [14] REYNOLDS G P, NEIL J C. Modelling the cognitive and neuropathological features of schizophrenia with phencyclidine[J]. J Psychopharmacol, 2016, 30(11): 1141.
  - [15] ZHOU H X, WOLLMUTH L P. Advancing NMDA receptor physiology by integrating multiple approaches[J]. Trend Neur, 2017, 40(3): 129-137.
  - [16] 黄喜,陈慧英,韦廷佳,等. NMDA 受体靶向拮抗剂的研究进展[J]. 生理科学进展, 2018, 49(3): 212-216.
- (收稿日期: 2019-06-10 修回日期: 2019-10-26)
- 
- (上接第 871 页)
- [12] WEI H Y, WONG K L, SHIMASAKI N, et al. Corrigendum: CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34310.
  - [13] LI X Y, WU L, LI S W, et al. Effect of CD16a, the surface receptor of Kupffer cells, on the growth of hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6): 1465-1474.
  - [14] 张林,侯艳红,张健,等. 增强 CD16 分子表达对 CIK 细胞杀伤胃癌细胞能力影响的研究[J]. 临床消化病杂志, 2013, 25(3): 147-150.
  - [15] HERTER S, BIRK M C, KLEIN C, et al. Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity[J]. J Immunol, 2014, 192(5): 2252-2260.
  - [16] CHUNG S, LIN Y L, REED C, et al. Characterization of in vitro antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity of therapeutic antibodies-impact of effector cells[J]. J Immunol Methods, 2014, 407(3): 63-75.
  - [17] SCONOCCHIA G, ZLOBEC I, LUGLI A, et al. Tumor infiltration by FC gamma R III (CD16)<sup>+</sup> myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma[J]. Int J Cancer, 2011, 128(11): 2663-2672.
  - [18] CANOSSI A, AURELI A, DEL BEATO T, et al. Role of KIR and CD16A genotypes in colorectal carcinoma genetic risk and clinical stage[J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 239.
- (收稿日期: 2019-06-03 修回日期: 2019-10-27)