

• 论 著 •

IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞对 HL60 细胞体内 外杀伤作用的实验研究*

沈 燕,程诗迪,张 萍,白凤霞,娄世锋[△]

(重庆医科大学附属第二医院血液内科 400010)

摘 要:**目的** 研究 IL-3-PE38KDEL 基因转染细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK)对 HL60 白血细胞细胞的杀伤作用。**方法** 应用脂质体将融合基因 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞,酶联免疫吸附试验(ELISA)和流式细胞术(FCM)法检测转基因前后 CIK 分泌细胞因子能力及细胞表型的变化,MTS 法检测基因转染 CIK 细胞对 HL60 细胞细胞毒活性的变化,建立 HL60 裸鼠模型,给予 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞、空质粒转染 CIK 细胞、未转染 CIK 细胞及生理盐水,观察其对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**结果** 通过脂质体成功将 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞,转染前后 CIK 细胞的分泌细胞因子能力及细胞表型无明显变化,转染后 CIK 细胞对 HL60 细胞的杀伤活性较空质粒转染 CIK 细胞及未转染 CIK 细胞明显提高,体内实验表明基因转染 CIK 细胞可明显抑制裸鼠皮下 HL60 细胞移植瘤的生长。**结论** IL-3-PE38KDEL 基因转染 CIK 细胞能够明显抑制体内外 HL60 细胞的生长,同时不影响 CIK 分泌细胞因子能力及细胞表型。

关键词:IL-3-PE38KDEL; CIK 细胞; HL60 细胞; 裸鼠

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.18.005 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)18-2667-04

The cytotoxicity of CIK cells transfected with IL-3-PE38KDEL fusion gene against HL60 cells*

SHEN Yan, CHENG Shidi, ZHANG Ping, BAI Fengxia, LOU Shifeng[△]

(Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anti-tumor effect of cytokine induced-killer (CIK) cells transfected with IL-3-PE38KDEL fusion gene on HL60 cells in vitro and in vivo. **Methods** IL-3-PE38KDEL fusion gene was transfected into CIK cells by liposome mediate. The phenotype of CIK cells was detected by flow cytometry. The concentration of IFN- γ and TNF- α in supernatant of CIK cells was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cytotoxicity of CIK cells transfected with IL-3-PE38KDEL gene against HL60 cells was detected by MTS assay. The human leukemia HL60 cell line subcutaneous xenograft tumor model in nude mice was established. CIK cells transfected with IL-3-PE38KDEL, CIK cells transfected with empty vector, non-transfected CIK cells and normal saline were given respectively to study the growth inhibitory effect on the transplanted tumor in nude mice. **Results** The phenotype and the level of cytokine remained unaltered in the IL-3-PE38KDEL gene transfected CIK cells. By comparison with non-transfected CIK cells and those transfected by empty vector, CIK cells transfected with IL-3-PE38KDEL had a significantly high anti-tumor cytotoxic activity against HL60 cells in vitro, and decreased tumor weight. **Conclusion** IL-3-PE38KDEL fusion gene transfection can enhance the anti-tumor activity of CIK cells.

Key words: IL-3-PE38KDEL; cytokine induced-killer cells; HL60; nude mice

近年来,随着化疗、特异靶向治疗、造血干细胞技术的不断提高,白血病的治疗效果日益改善,然而复发仍是困扰白血病治愈的一个难题。白血病复发主要原因之一是由于体内微小残留白血病(MRD)的存在,微小残留白血病是指白血病患者经过治疗达到完全缓解(包括骨髓移植治疗)后体内残存少量的白血病细胞的状态($10^3 \sim 10^6$ 白血病细胞)^[1]。随着肿瘤过继免疫治疗的研究,采用细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK 细胞)介导的过继免疫治疗清除白血病残留病灶已日益引起人们的重视,并在临床应用中取得一定的疗效,如何进一步增强这些免疫活性细胞的抗肿瘤活性以提高疗效是关系到治疗成败的关键因素之一^[2-4]。

前期工作中,本课题组构建了以人白细胞介素 3(IL-3)作为导向分子,以铜绿假单胞菌外毒素(PE)的活性片段 PE38KDEL 作为细胞毒分子的融合蛋白 IL-3-PE38KDEL,对高表达白细胞介素 3 受体(IL-3R)的白血病细胞有相对靶向杀

伤效应^[5-6],当融合基因 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞后,发现转染后的 CIK 细胞能表达有细胞毒活性的融合蛋白 IL-3-PE38KDEL。本研究拟探讨 IL-3-PE38KDEL 基因转染 CIK 细胞后,CIK 细胞的生物学活性及对白血病细胞 HL60 的杀伤活性变化。

1 材料与方法

1.1 材料来源 质粒 pcDNA3.1(+)IL-3-PE38KDEL 由本课题组构建, BALB/c 裸鼠鼠龄 4~6 周, 体重 16~20 g, 购自重庆医科大学实验动物中心。干扰素 γ (IFN- γ)购自上海凯茂生物医药有限公司, IL-2 购自北京双鹭药业股份有限公司, 抗 CD3 单克隆抗体(OKT3)购自北京邦定生物医学技术有限公司, 1640 培养基及胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司, Lipofectamine2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, CD3、CD4、CD8 及 CD56 单抗购自 eBioscience、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IFN- γ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自北京四正柏生

* 基金项目:重庆市自然科学基金项目(CSCT,2009BB5266);重庆市科技攻关重点项目(CSTC,2009AB5215)。

作者简介:沈燕,女,主治医师,主要从事白血病的治疗研究。 [△] 通信作者,E-mail:13508331213@163.com。

物科技有限公司;MTS 试剂购自 Sigma 公司;重庆医科大学 Ficoll 淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;HL60,K562 细胞株由本室保存。

1.2 方法

1.2.1 融合基因 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞 取健康献血者新鲜外周血,常规 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC),用含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基调整细胞密度为 5×10^6 /mL,加入 IFN- γ 1 000 U/mL,37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后添加抗 CD3 单克隆抗体 100 ng/mL,IL-2 1 000 U/mL。每 3 天调整细胞密度为 1×10^6 /mL,更换培养基,并补加 IL-2 1000 U/mL 继续培养。将培养至第 9 天的处于对数生长期的 CIK 细胞用无血清 RPMI1640 培养液洗涤两次,用转染缓冲液调整细胞密度为 5×10^6 /mL,A 组(IP-CIK)在每个培养孔的培养细胞中加入质粒 pcDNA3.1(-)-IL-3-PE3KDEL;B 组(vector-CIK)在每个培养孔的培养细胞中加入空质粒 pcDNA3.1(-);C 组为对照组(未转染组,仅加入 PBS),按 Invitrogen 公司 Lipofectamine2000 转染试剂盒说明书操作步骤进行转染。转染后 6 h 换液培养。

1.2.2 流式细胞术(FCM)分析基因转染后 CIK 细胞表型的变化 分别于第 9、13 天用流式细胞仪检测 CIK 细胞表面分子的变化,方法如下:流式管中每管加入 CIK 细胞悬液 100 μ L (大于 10^5 个细胞),加磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,1 000 r/min 离心 5 min,去上清液,加入不同组合的荧光素标记的 CD 分子单抗,每种单抗加 5 μ L,混匀,4 ℃避光放置 30 min,PBS 洗 2 次,去上清液后加 300 μ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.3 ELISA 法检测基因转染后 CIK 细胞分泌细胞因子水平的变化 收集转染 4 d 后(培养至第 13 天)CIK 细胞(IP-CIK 及 vector-CIK)培养上清液,用 ELISA 法检测 IFN- γ 和 TNF- α 的浓度,具体操作按试剂盒说明书进行。同时收集未转染的 CIK 培养至第 13 天的 CIK 细胞培养上清液作为对照。

1.2.4 IL-3-PE38KDEL 基因转染 CIK 细胞杀瘤活性鉴定 采用 MTS 方法检测。取转染后第 4 天的 IL-3-PE38KDEL 基因转染 CIK 细胞(IP-CIK)、空载体转染 CIK 细胞(vector-CIK)和培养至 13 天单纯 CIK 细胞作为效应细胞,分别检测其对 HL60 和 K562 肿瘤细胞株的杀伤作用。效靶比分别为 10 : 1、20 : 1、40 : 1,每组设 3 个复孔,37 ℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h,每孔加入 MTS 20 μ L,孵育 2 h 后检测 490 nm 波长吸光值(OD 值),计算杀伤活性。

杀伤率(%)=
$$\frac{1-(\text{效应细胞}+\text{靶细胞})\text{组 OD}-\text{单纯效应细胞组 OD}}{\text{单纯靶细胞 OD 值}} \times 100\%$$

1.2.5 转染前后的 CIK 细胞对 HL60 荷瘤裸鼠的抑制作用 裸鼠置于清洁级动物房由专人饲养,实验员具备重庆市动物实验从业人员资质。实验在超净工作台内进行,收集对数生长期的 HL60 细胞,PBS 洗两遍,用含 10%FBS 的 1640 完全培养基稀释为 5×10^7 /mL 的单细胞液,接种裸鼠的右后肢外侧,使其成为荷瘤鼠,待移植瘤长至 0.5 cm³,随即分为 4 组,每组 4 只。第 1 组每只小鼠瘤旁注射转染 IL-3-PE38KDEL 基因的 CIK 细胞 1×10^7 /0.2 mL;第 2 组每只小鼠瘤旁注射转染空载体的 CIK 细胞 1×10^7 /0.2 mL;第 3 组每只小鼠瘤旁注射未转染的 CIK 细胞 1×10^7 /0.2 mL;第 4 组每只小鼠瘤旁注射 0.2 mL 生理盐水,1 周 2 次(每周二、周五注射),连续 2 周。第 3 周切除移植瘤测各组瘤重,按下面公式分别计算各组荷瘤鼠的

瘤重抑制率(TWI)。TWI(%)=(对照组瘤重-用药组瘤重)/对照组瘤质量 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,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 基因转染 CIK 细胞分泌 TNF- α 和 IFN- γ 的影响 用 TNF- α 和 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒检测,结果发现 A 组、B 组及 C 组培养上清液中 IFN- α 和 TNF- γ 的浓度无明显变化,两者相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 IL-3-PE38KDEL 基因转染对 CIK 细胞分泌细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

组别	IFN- γ	TNF- α
A 组(重组质粒转染组)	552.7 $\pm$ 63.1	289.2 $\pm$ 33.6
B 组(空载体转染组)	592.5 $\pm$ 59.3	268.9 $\pm$ 29.3
C 组(未转染组)	578.3 $\pm$ 54.8	271.6 $\pm$ 28.7

2.2 CIK 细胞表型的变化 用流式细胞仪检测在培养过程中细胞表型的变化,结果随着培养时间的延长,CD3⁺ 细胞和 CD3⁺CD56⁺ 细胞的百分率均呈明显上升趋势,培养至第 13 天时分别达到(89.2 $\pm$ 5.8)%和(24.1 $\pm$ 4.0)%,CIK 细胞的主要效应细胞 CD3⁺CD56⁺ 细胞得到了显著扩增。培养至第 9 天时将 IL-3-PE38KDEL 基因及空载体转入 CIK 细胞,再培养 4 d 后,与培养相同时间的未转基因组相比 CIK 细胞 CD3⁺、CD3⁺CD56⁺ 的细胞比例无明显改变,两者相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 CIK 细胞表型变化($\bar{x} \pm s$,%)

组别	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD56 ⁺
A 组(重组质粒转染组)	89.2 $\pm$ 5.8	11.7 $\pm$ 4.6	59.3 $\pm$ 7.5	24.1 $\pm$ 4.0
B 组(空载体转染组)	88.6 $\pm$ 4.3	12.4 $\pm$ 6.2	60.2 $\pm$ 5.4	23.9 $\pm$ 1.7
C 组(未转染组)	89.8 $\pm$ 5.3	12.0 $\pm$ 2.0	57.8 $\pm$ 3.5	24.3 $\pm$ 2.8

2.3 基因转染 CIK 细胞的抗白血病效应 转染前后的 CIK 细胞均对 HL60 及 K562 细胞有很强的杀伤作用,并表现为明显的效靶比依赖性。IP-CIK 细胞对 HL60 的细胞毒性高于 vector-CIK 细胞及未转染 CIK 细胞,差异有统计学意义($P > 0.05$),vector-CIK 及未转染 CIK 细胞对 HL60 细胞的杀伤作用差异无统计学意义($P > 0.05$);转染前后的 CIK 细胞对 K562 细胞的杀伤作用无变化($P > 0.05$),见表 3。

表 3 不同效靶比时各组 CIK 细胞的杀伤活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	效靶比	抑制率(%)		
		A 组(IP-CIK)	B 组(vector-CIK)	C 组(未转染 CIK)
HL60	10 : 1	25.76 $\pm$ 3.61	17.96 $\pm$ 4.50	17.12 $\pm$ 5.58
	20 : 1	39.12 $\pm$ 5.43	29.26 $\pm$ 3.16	28.82 $\pm$ 3.95
	40 : 1	63.39 $\pm$ 4.71	43.30 $\pm$ 2.42	46.44 $\pm$ 6.19
K562	10 : 1	18.25 $\pm$ 4.38	15.32 $\pm$ 5.27	15.84 $\pm$ 3.52
	20 : 1	30.21 $\pm$ 5.29	26.92 $\pm$ 4.83	25.68 $\pm$ 6.02
	40 : 1	49.93 $\pm$ 2.97	43.64 $\pm$ 5.24	44.39 $\pm$ 3.71

2.4 基因转染 CIK 细胞对 HL60 移植瘤的抑制作用 4 组小鼠分别予瘤旁注射 IP-CIK、vector-CIK、未转染 CIK 细胞及生理盐水,测各组瘤重,计算抑瘤率。4 组小鼠肿瘤在瘤重、瘤体积及瘤重抑制率的比较见表 4。输注 IP-CIK、vector-CIK 及未转染 CIK 细胞的抑瘤率高于生理盐水对照组($P<0.05$),但 IP-CIK 细胞组抑瘤率明显高于 vector-CIK 及未转染的 CIK 细胞组($P<0.05$),vector-CIK 及未转染的 CIK 细胞组的抑瘤率和生存时间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 各组 CIK 细胞对 HL60 荷瘤裸鼠的作用($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	瘤质量(g)	瘤体积(cm ³)	抑瘤率(%)
IP-CIK	4	1.72±0.13	0.54±0.12	45.39±6.54
vector-CIK	4	2.29±0.17	0.89±0.23	27.30±3.82
未转染 CIK	4	2.36±0.35	0.85±0.21	25.13±4.39
生理盐水	4	3.15±0.26	1.81±0.19	

3 讨 论

目前,急性白血病的治疗主要依靠联合化疗及造血干细胞移植,但是通过以上治疗后仍有部分患者因体内残存的白血病细胞而复发,而应用肿瘤的生物治疗可以改善这些患者的预后。肿瘤的过继免疫治疗(ACI)是肿瘤生物治疗中最活跃的研究领域之一,除干细胞移植后供者淋巴细胞输注外,CIK 细胞以其更高的增殖活性和更强的细胞毒活性越来越被重视。CIK 细胞最初是指在健康人体外周血中只占 1%~5%的 CD3⁺CD56⁺的 T 淋巴细胞。目前国内外制备的用于过继免疫治疗的 CIK 细胞,实际上是在多种细胞因子如 IL-2、IFN- γ 及单克隆抗体的刺激下,由从外周血、骨髓或脐血中分离出来的单个核细胞在体外培养扩增的一组具有细胞杀伤活性的 NK 样细胞,具有非 MHC 限制性、增殖速度快、杀瘤活性高、杀瘤谱广等独特的优势,其免疫表型特征为 CD3⁺CD56⁺[8]。同时 CIK 细胞对肿瘤存在一定靶向性,Thorne 等[9]发现,预先将病毒育苗转染入 CIK 细胞,可以利用 CIK 细胞在肿瘤组织中滞留而将病毒靶向分布至肿瘤组织。CIK 细胞对肿瘤组织的靶向性可能由一组 NK 配受体介导。CIK 细胞表达 NKG2D 受体,而肿瘤细胞表面可存在 NKG2D 配体,该受配体对 CIK 细胞聚集于实体肿瘤组织可能有重要作用[10-11]。

CIK 细胞对急性髓细胞白血病(AML)细胞有溶解毒性,在小鼠白血病模型中体现出抗 AML 效应,且不诱导移植瘤抗宿主病[12]。将 CIK 细胞在急性白血病患者化疗后第 1 天回输,化疗联合自体 CIK 细胞治疗 AML 的持续 CR 率明显优于单纯化疗,疗效与疗程有关,疗程大于或等于 3 个患者的疗效优于疗程小于 3 个的患者[13],采用异基因干细胞移植序贯输注供者 CIK 细胞治疗 9 例复发/难治性血液肿瘤患者,发现患者均顺利造血重建,移植后均获得完全缓解,但 CIK 的杀伤效应仍受细胞数量的限制,对 AML 细胞最适比例在 40:1(效应细胞:靶细胞),可获得 50%细胞毒性,如何提高 CIK 细胞肿瘤杀伤活性是需要进一步解决的问题[14]。研究表明将 IL-2、IL-7、IL-24 转染 CIK 细胞后能明显提高 CIK 细胞的肿瘤杀伤活性[15-17]。

前期工作中本课题组利用基因转染的方法成功将 IL-3-PE38KDEL 融合基因转入 CIK 细胞,转染后的 CIK 细胞能表达有杀伤活性的融合蛋白 IL-3-PE38KDEL。在本研究中,发现 IL-3-PE38KDEL 转染后的 CIK 细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ 及

细胞表型与转染前相比无明显差异,其抗肿瘤效应强于空质粒转染 CIK 及未转染 CIK 细胞,对 IL-3 受体(CD123)阳性的 HL60 细胞的杀伤活性明显高于 IL-3 受体阴性的 K562 细胞[18],说明 IL-3-PE38KDEL 转染后的 CIK 细胞本身抗肿瘤效应没有受到损害,且其表达的 IL-3-PE38KDEL 融合蛋白可以杀伤 IL-3 受体阳性的 HL60 细胞,故抗肿瘤效应高于空载体转染 CIK 及普通 CIK 细胞,由于 K562 细胞不表达 IL-3 受体,融合毒素对其杀伤作用有限,故 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞对 K562 细胞的抑制率低于 HL60 细胞,空载体转染的 CIK 细胞不表达 IL-3-PE38KDEL 融合蛋白,其抗肿瘤效应与未转染 CIK 细胞相同。在动物实验中也证实了 IL-3-PE38KDEL 转染 CIK 细胞的抑瘤率明显高于空质粒转染 CIK 和未转染 CIK 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$)。

以上研究表明,将 IL-3-PE38KDEL 基因转染到 CIK 细胞,通过分泌融合毒素,可相对选择性杀伤 CIK 细胞不能杀伤的 AML 细胞,实际上大大提高 CIK 细胞的效应/靶细胞比;同时 IL-3-PE38KDEL 融合毒素对 AML 细胞有相对靶向性,CIK 细胞通过 NK 受/配体等机制可能在肿瘤细胞丰富区域滞留,两者结合可能进一步增强其靶向作用,可提高 CIK 细胞的抗 AML 效应,对清除 AML 残余病灶、提高根治率有重要意义。

参考文献

[1] Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? [J]. Curr Hematol Malig Rep,2012,7(2):170-177.

[2] 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]. Biod Blood Marrow Transplant,2005,11(3):181-187.

[3] Introna M,Franceschetti M,Ciocca A,et al. Rapid and massive expansion of cord blood-derived cytokine-induced killer cells: an innovative proposal for the treatment of leukemia relapse after cord blood transplantation [J]. Bone Marrow Transplant,2006,38(9):621-627.

[4] 罗云,张萍,张颖,等. 异基因造血干细胞移植后序贯输注供者 CIK 细胞治疗 9 例复发/难治性血液肿瘤疗效的初步探讨[J]. 肿瘤,2012,32(7):546-550.

[5] 沈燕,陈好,娄世锋. 免疫毒素 IL-3-PE38KDEL 的表达及活性测定[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(11):1362-1364.

[6] 白凤霞,娄世锋,曾瀚庆,等. 重组融合蛋白 IL-3-PE38KDEL 对急性髓性白血病细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国生物制品学杂志,2011,24(2):179-183.

[7] Verneris MR,Karami M,Baker J,et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells[J]. Blood,2004,103(8):3065-3072.

[8] Schmidt RE,Murray C,Daley JF,et al. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype[J]. J EXP Med,1986,164(1):351-356.

[9] Thorne SH,Negrin RS,Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. Science,2006,311(5768):1780-1784.

[10] Verneris MR,Karami M,Baker J,et (下转第 2672 页)

他莫拉菌的总检出率, 冬季检出率最高, 秋季最低 ($P < 0.001$), 与王淑会等^[10]报道一致, 提示季节是影响其检出率的因素, 原因可能是寒冷刺激卡他莫拉菌, 通过延长信使 RNA 半衰期使其主要黏附分子普遍存在的表面蛋白 1 表达增加, 进而使其黏附呼吸道上皮细胞能力增加, 毒力增强^[11]。

由于儿童是个特殊群体, 部分抗菌药物的不良反应如氯霉素会导致儿童灰婴综合症、四环素引起四环素牙、磺胺类的肝肾毒性、氨基糖苷类的肝肾耳毒性、喹诺酮类造成关节软骨组织损伤, 所以即便这些药物敏感性高, 也使得这些药物用于治疗儿童受限。儿科用药多使用青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类抗菌药物^[12]。 β -内酰胺酶可水解青霉素类抗菌药物, 它主要可分为 BRO-1、BRO-2 及 BRO-3, 为染色体基因编码的脂蛋白, 且耐药基因易于通过接合在细菌间转移^[13]。本研究卡他莫拉菌产酶率为 87.5% 与袁少伟等^[8]报道 85.71% 较一致, 其高产酶率提示青霉素类药物不能作为治疗其感染的首选。而卡他莫拉菌对阿莫西林/克拉维酸和头孢噻肟敏感率大于 95%, 对头孢克洛和头孢呋辛敏感率大于 50%, 因此治疗卡他莫拉菌感染, 阿莫西林/克拉维酸和头孢噻肟等第三代头孢类抗菌药物可作为在药敏结果未报告之前的经验首选, 在药敏结果报告后根据实际菌株的耐药情况调整用药。

综上所述, 儿童是感染卡他莫拉菌的高危人群, 特别是冬季和小于 3 岁的儿童下呼吸道感染, 应及时行培养、鉴定、药敏试验, 合理选择抗菌药物控制病情。

参考文献

- [1] World Health Organization (WHO). Indonesia: Health Profile[R]. WHO Media Centre, Geneva, Switzerland: 2014.
- [2] Murphy TF, Brauer AL, Kirkham CA, et al. Role of the Zinc uptake ABC transporter of moraxella catarrhalis in persistence in the respiratory tract [J]. Infect Immun, 2013, 81(9): 3406-3413.
- [3] Zomer A, De Vries SP, Riesbeck KA, et al. Genome sequence of moraxella catarrhalis RH4, an isolate of serore-

sistant lineage[J]. J Bacteriol, 2012, 194(24): 6969.

- [4] 孙慧明, 周卫芳, 季伟, 等. 苏州地区下呼吸道感染住院患儿卡他莫拉菌感染与气候因素相关性研究[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(6): 524-527.
- [5] 唐萍, 史伟, 曾海玲, 等. 1 082 例呼吸道感染住院患儿鼻咽部携带卡他莫拉菌状况及其耐药性分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(8): 707-712.
- [6] 李振国, 贵琳, 黄洋, 等. 儿童卡他莫拉菌呼吸道感染的耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(1): 185-187.
- [7] 杨海娟, 陈霞, 吴佳辉, 等. 患儿呼吸道感染 91 例卡他莫拉菌及耐药性分析[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(5): 527-529.
- [8] 袁少伟, 李慧. 儿童呼吸道卡他莫拉菌感染分布及耐药分析[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 36(5): 451-453.
- [9] Hsu SF, Lin YT, Chen TL, et al. Antimicrobial resistance of Moraxella catarrhalis isolates in Taiwan[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(2): 134-140.
- [10] 王淑会, 季伟, 张新星, 等. 苏州地区 14994 例儿童呼吸道感染细菌病原学特点[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(1): 44-50.
- [11] Spaniol V, Troller R, Aebi C. Physiologic cold shock increases adherence of moraxella catarrhalis to and secretion of interleukin 8 in human upper respiratory tract epithelial cells[J]. J Infect Dis, 2009, 200(10): 1593-1601.
- [12] 孙秋凤, 陈正荣, 黄莉, 等. 2008 至 2012 年苏州地区住院患儿下呼吸道感染细菌病原学分布及耐药性分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2014, 7(1): 39-44.
- [13] 王频佳, 谢成彬, 吴雨露. 儿童呼吸道卡他莫拉菌分离株耐药性与 BRO 基因分型研究[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(8): 719-722.

(收稿日期: 2017-03-17 修回日期: 2017-05-25)

(上接第 2669 页)

- al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells[J]. Blood, 2004, 103(8): 3065-3072.
- [11] Sun S, Li XM, Li XD, et al. Studies on inducing apoptosis effects and mechanism of CIK cells for MGC2803 gastric cancer cell lines[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2005, 20(2): 173-180.
- [12] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(9): 1457-1462.
- [13] 江浩, 刘开彦, 童春荣, 等. 化疗联合自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗急性白血病的临床观察[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(3): 198.
- [14] 罗云, 张萍, 张颖, 等. 异基因造血干细胞移植后序贯输注供者 CIK 细胞治疗 9 例复发/难治性血液肿瘤疗效的初步探讨[J]. 肿瘤, 2012(7): 546-550.

- [15] Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Human cytokine-induced killer cells have enhanced in vitro cytolytic activity via non-viral interleukin-2 gene transfer[J]. Genet Vaccines Ther, 2004, 2(1): 12-16.
- [16] Finke S, Trojaneck B, Lefterova P. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3⁺ CD56⁺ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene[J]. Gene Ther, 1998, 5(1): 31-39.
- [17] 夏卫, 郁心, 王浦南, 等. IL-24 基因修饰增强 CIK 细胞对 HL-60 细胞的细胞毒作用[J]. 中国免疫学杂志, 2009(12): 1080-1084.
- [18] Frankel A E, Ramage J, Kiser M, et al. Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor[J]. Protein Engineering, 2000, 13(8): 575.

(收稿日期: 2017-03-25 修回日期: 2017-06-02)