

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.052

肿瘤的分子分型在当代结直肠癌中的应用*

申高飞 李进晶 汪鑫 耿蕾 王新[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要:以分子检测为基础的肿瘤分子分型及个体化治疗方案使当代的结直肠癌治疗逐步走向“同病异治”模式,结直肠癌同病异治两个最常见的应用,一是 RAS 基因突变与分子靶向药物的应用,二是微卫星不稳定(MSI)状态与林奇综合征的诊断和治疗。其中 RAS 基因野生型患者使用西妥昔单抗联合化疗方案获益显著,而林奇综合征的患者与微卫星稳定患者相比,显示了更好的预后,且其不能从化疗药物氟尿嘧啶中获益。然而,为了让更多的结肠癌患者获益,我们还需要继续探寻对结肠癌更有效更全面的分子分型标准。

关键词:肿瘤;分子分型;结直肠癌

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)10-1994-04

Applications of Molecular Classification in Colorectal Cancer*

SHEN Gao-fei, LI Jin-jing, WANG Xin, GENG Lei, WANG Xin[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology & Xijing Hospital of Digestive Disease, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT: Based on the modern molecular detection, molecular classification of tumors and individualized treatment plan successfully makes the patient with the same disease treated with various methods. And the most widely used are the RAS gene mutations with the molecular targeted drugs applied and MSI status with lynch syndrome diagnosed and treatment. However, the benefit of cetuximab was limited to patients with RAS wild-type tumors, and patients of lynch syndrome have a better prognosis but no benefits from fluorouracil (FU)-based adjuvant therapy compared with patients who have microsatellite-stable tumors. Then we are led to explore more effectively and comprehensive molecular classification standards to benefit more patients with colorectal cancer.

Key words: Carcinoma; Molecular classification; Colorectal cancer

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1994-04

前言

随着生物科学进入全基因组大数据时代,当代肿瘤的治疗出现了很多新的方法和理念,而基于分子检测的个体化治疗方案使得肿瘤的治疗进入了“同病异治”的新模式。而在此概念提出之前,基于组织学形态特征的病理学诊断是临床肿瘤诊断和治疗的基础,国际通用的 TNM 分期^[1,2]和 Dukes 分期^[3]也仅仅从组织学角度为肿瘤的发生发展提供了分期的标准,而癌症作为一种高度异质性疾病,在临床中常常有同样的病人、同样的肿瘤、同样的分期,却有不同的治疗效果和不同的预后。为此,1991 年美国国立研究所(NCI)提出肿瘤分子分型的概念^[4],基于综合的分子分析技术,使肿瘤分类的基础从形态学为基础转向分子特征为基础的新的分类体系。结直肠癌是一个高度异质性的肿瘤,其发病由一系列多种遗传事件和表观遗传学事件组合所造成,目前根据微卫星不稳定性 MSI、微卫星稳定 MSS、CpG 岛甲基化表基因沉默(CIMP)可将结直肠癌进行不同的分子亚型分类。目前,基于分子检测的个体化治疗方案应用最广

泛的一为 RAS 突变检测与分子靶向药物的应用,二为微卫星不稳定性 MSI 与林奇综合征的诊断治疗。

1 RAS 突变状态与分子靶向药物治疗

目前 FDA 已批准用于晚期结肠癌分子靶向药物包括以血管内皮生长因子(vescular endothelial growth factor,VEGF)为靶点的单克隆抗体贝伐单抗(Bevacizumab),多靶点酪氨酸激酶抑制剂瑞格菲尼(Regorafenib)^[5],和以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的单克隆抗体西妥昔单抗(Cetuximab)和帕尼单抗(Panitumumab)。

其中西妥昔单抗作用的机制是通过高亲和力特异性结合 EGFR 胞外部分,竞争性结合可阻碍表皮生长因子 EGF/转化生长因子 α (TGF- α)等内源性配体与 EGFR 的结合,进而阻断了受体二聚化、酪氨酸磷酸化及信号转导,进一步抑制了肿瘤细胞的增殖和转移^[6],其次,西妥昔与 EGFR 结合后,可以介导 EGFR 的自身降解,下调其表达,进一步抑制了信号转导。其三,BAX 基因的高表达可以促进细胞凋亡的发生,BCL-2 则

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81272650;81472701)

作者简介:申高飞,女,硕士研究生,主要研究方向:结直肠癌的侵袭转移分子机制,电话:029-884771520,E-mail: shengaoifei1989@163.com

[△] 通讯作者:王新,电话:029-84771516,E-mail: wangx@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-08-24 接受日期:2014-09-17)

可以抑制细胞凋亡,西妥昔单抗的治疗可以提高 BAX 表达水平,降低 BCL-2 的表达水平^[7],从而促进肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤的作用。西妥昔的研发上市是成功的,BOND 临床试验显示,西妥昔单抗在晚期结直肠癌患者中,明显改善了肿瘤的缓解率、TTP 及中位生存期^[8]。

西妥昔疗效显著的同时,研究者发现部分 EGFR 表达阳性的患者对西妥昔治疗无效,是什么原因导致 EGFR 受体不能通过 EGFR 发挥作用呢?研究者通过结合 EGFR 下游信号通路的基础研究和临床患者的病理分子检测,将目光锁定在 RAS 基因突变上。

RAS 基因作为 EGFR 下游的关键信号通路之一,KRAS 基因突变可以使 RAS 蛋白持续活化,不再依赖上游 EGFR 信号的激活,从而对 EGFR 靶向药物不敏感。临床试验结果也支持了这一结论^[9-13],2009 年的 CRYSTAL 研究显示 KRAS 野生型转移性结直肠癌患者(mCRC)在一线 FOLFIRI 方案联合西妥昔单抗治疗中的 PFS 和 RR 比单用 FOLFIRI 方案组显著提高^[9]。因此 NCCN 指南明确指出拟使用抗 EGFR 单抗前,必须明确 KRAS 基因状态。

然而后续的临床试验和基础研究发现临床上很多 KRAS 基因野生型患者也对西妥昔单抗治疗无效,也有很多 KRAS 野生型患者在西妥昔治疗后发生了 KRAS 突变和西妥昔继发性耐药^[14]。那么,必然存在其他影响西妥昔疗效的因素。研究发现,NRAS、BRAF、PI3KCA 外显子多个位点突变均会降低西妥昔的治疗效率^[15,16]。在非一线治疗中,BRAF 突变存在时,使用西妥昔治疗是无效的,但是在一线治疗中联合标准化疗方案时能够带来一定的生存获益^[17,18]。

2014 年 ASCO 会议上公布的 CRYSTAL 研究和 OPUS 研究的 RAS 基因突变分析结果显示,原来 KRAS 野生型患者在采用 BEAMing 技术进行额外检测后,均有部分患者检出额外的 RAS 突变,而新 RAS 野生型患者使用西妥昔单抗联合化疗总生存时间比 KRAS 密码子 12/13 野生型患者延长了 4.9 个月。这些更新的研究结果显示,增加新的 RAS 分子指标可以进一步提高预测抗 EGFR 抗体疗效的效能^[19,20]。因此,2014 年 NCCN 指南推荐 mCRC 患者均需检测 RAS 基因突变状态,KRAS 状态或 NRAS 状态不明时不应使用西妥昔单抗或帕尼单抗。

目前在 EGFR 单抗使用同时,应用比较广泛和成熟的是 RAS 基因及 BRAF 基因突变状态的检测,其他多个位点的突变与西妥昔疗效的关系仍然需要大量临床数据支持。

2 MSI 与林奇综合征

作为一种遗传性结直肠癌综合征,微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)是林奇综合征(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC, 遗传性非息肉病性结直肠癌)特征性的分子变化,主要表现为基因组上的错配修复基因(mismatch repair, MMR)缺陷。

1997 年美国 NCI 专家制定了判定 MSI 的 5 个微卫星标准位点,BAT26,BAT25,D2S123,D5S346,D17S250,通过和正常组织和肿瘤组织比较,如果 2 个及以上位点不稳定者认为是微卫星不稳定(MSI-H),即错配修复功能缺陷(defective MMR,

dMMR);如果小于 2 个位点存在 MSI 状态或无一位点存在 MSI 状态,则认为是低度微卫星不稳定(MSI-L)或微卫星稳定(MSS),即错配修复功能完整(proficient MMR, pMMR)^[21]。

大量回顾性研究结果显示林奇综合征患者一般预后比较好^[22],且 2010 年 Sargent^[23]在 JCO 杂志上发表包含 457 例结直肠癌患者 MSI 状态检测及随访结果:术后分期无论是 II 期还是 III 期,dMMR 或 MSI-H 的患者术后采用 5-FU 单药辅助化疗,与术后不化疗的患者相比,无病生存期 DFS 和总生存期 OS 不仅没有改善,尤其对于 II 期患者 OS 反而降低了($p=0.04$)。因此 NCCN 指南建议,对于 II 期患者应常规检测 MSI 状态,dMMR 或 MSI-H 的患者应避免使用氟尿嘧啶进行辅助治疗。因此可避免相关药物毒性,也可减少患者花费及化疗所引起的生活质量的下降。

目前检测肿瘤 MSI 状态的方法有两种,一种是通过 PCR 方法,用引物扩增 5 个微卫星位点的方法进行检测,即 BER 实验,一种是通过免疫组织化学的方法检测肿瘤组织中 h MLH1, h MSH2, h MSH6, h PMS2 蛋白的表达^[24],如果四个蛋白均表达阳性,说明患者为 pMMR 状态,任一蛋白阴性表达,则为 dMMR 状态。第二种检测方法在临床中应用更为广泛。BRAF V600E 突变的检测应用于免疫组织化学 IHC 可以提示 MLH1 蛋白表达缺失,因此 BRAF 阳性突变的患者即可排除林奇综合征^[25]。这种方法可以用作林奇综合征的筛查和排除诊断的重要依据。

3 结直肠癌分子分型标准的研究现状

结直肠癌是一个高度异质性的肿瘤,其发病由一系列多种遗传事件和表观遗传学事件组合所造成,除了上部分所讲的微卫星不稳定性 MSI,微卫星稳定 MSS,还有一种研究较多的结直肠癌分子分型特征,CpG 岛甲基化表基因沉默(CIMP),即通过 DNA 甲基化而导致的表观基因的沉默。临床研究发现 CpG 岛甲基化程度高的结直肠癌多定位于近端结肠,患者年龄偏大,肿瘤分化程度低,常伴有微卫星不稳定性^[26]。依据 MSI 状态、CIMP 程度,曾出现过多种结直肠癌分子分型标准。

2007 年 Jass^[27]等根据 MSI 和 CIMP 状态将结直肠癌分为五型。即 1 型,CIMP-H、MSI-H、B-raf 突变,占 12%;2 型,CIMP-H、MSI-L/MSS、B-raf 突变,占 8%;3 型,CIMP-H、MSS / MSI-L、KRAS 突变,占 20%;4 型,CIMP-L、MSS,占 57%;5 型 Lynch 综合征,占 3%^[28]。

2008 年 Ogino 等提出了一个新的分类系统^[29],分为六个亚型:MSI-H,CIMP-H;MSI-H,CIMP-Low/0;MSI-L/MSS,CIMP-H;MSI-L,CIMP-Low;MSS,CIMP-Low;MSI-L/MSS,CIMP-0。它们在病理、临床、治疗反应、分子特征等方面都有所不同。

2013 年 N.JEWEL SAMADDER 在 Gastroenterology 上发表论文称^[30],根据微卫星稳定、微卫星不稳定程度的高低、CpG 岛甲基化程度高或低,CpG 岛甲基化表型阴性、BRAF 和 / 或 KRAS 突变的阴性和阳性将结直肠癌患者归纳整合为经典型、替换型、锯齿型、未定义型。研究结果显示结直肠癌患者的临床病理特征与分子分型之间存在明显的相关,然而这些分子变化特征与疾病预后的关系还需要进一步的研究。迄今为止,还未找到一种全面评估结直肠癌诊断、治疗与预后的分子分型标

准。

4 总结与展望

肿瘤分子生物学和应用新型分子靶向药物的临床试验都显示,我们逐步走向肿瘤个体化治疗方案。基于高速发展的分子生物学技术和组学技术,国内成立了多个大型临床试验中心,肿瘤的分子分型在结直肠癌临床中的作用将会越来越大:(1)我们可以通过基因芯片、基因测序、基因扩增等实验手段,检测DNA水平、RNA水平、蛋白水平上某些基因产物的表达与突变情况,再结合某些基因的系统的分子生物学研究,用临床试验中心的大样本量的患者标本中去验证,来制定更有效的肿瘤分子分型的标准,以及寻找更多的可以用于肿瘤诊断和预后的分子标志物。(2)分子靶向药物治疗结直肠癌分子机制研究方面,关键的通路及分子如何与传统化疗方案如何有效的配伍、如何降低分子靶向药物所致的耐药性等,都是今后研究的重点。

MC3是笔者所在的国家重点肿瘤生物实验室前期自主建立的一株结肠癌特异单抗,我们鉴定出其识别的抗原为Tx1-2,后期发现Tx1-2的剪接体Tx1-2b与小G蛋白Ran相互作用,显著促进结肠癌的转移。在此基础上,我们在胃癌、结肠癌、胰腺癌中对Ran做了系统功能学验证和机制探索^[31-35]。下步准备在西京消化病医院所建立的大型临床样本组织库中进行血样、组织学中的验证,以明确在肿瘤诊断及预后中应用。这也是分子分型理论在我们实验中心和临床中心应用实践的探索。

未来好的分子分型标准是在解决肿瘤异质性、肿瘤分期合理性、预后估计的准确性、治疗方案设计合理性上都能够提供更多帮助的一种准则。总之,为了这种更有效的给患者“量身定做”治疗方案,我们任重而道远。

参考文献(References)

- [1] Chapuis P H, Dent O F, Newland R C, et al. An evaluation of the American Joint Committee (pTNM) staging method for cancer of the colon and rectum[J]. Dis Colon Rectum, 1986, 29(1): 6-10
- [2] Akkoca A N, Yanik S, Ozdemir Z T, et al. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2828-2835
- [3] Ramcharan S K, Lip G Y, Stonelake P S, et al. Angiogenin outperforms VEGF, EPCs and CECs in predicting Dukes' and AJCC stage in colorectal cancer[J]. Eur J Clin Invest, 2013, 43(8): 801-808
- [4] Willems S M, Engelsman-Theelen W, Blaauwgeers J L. Molecular pathology in tumour classification: the present and future molecular revolution[J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2014, 158: A7364
- [5] Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2013, 381(9863): 303-312
- [6] Van Cutsem E, Kohne C H, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 360(14): 1408-1417
- [7] Li X, Fan Z. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1 α and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex [J]. Cancer Res, 2010, 70(14): 5942-5952
- [8] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(4): 337-345
- [9] Tural D, Selcukbiricik F, Erdamar S, et al. Association KRAS G13D tumor mutated outcome in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(125): 1035-1040
- [10] Bando H, Yoshino T, Yuki S, et al. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan [J]. Jpn J Clin Oncol, 2012, 42(12): 1146-1151
- [11] Nakamoto K, Nagahara H, Maeda K, et al. Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4): 1295-1300
- [12] Lieberman R. Food and Drug Administration approval of cetuximab and a new KRAS genetic test for metastatic colorectal cancer: major advance but just the tip of the biomarker iceberg[J]. Am J Ther, 2012, 19(6): 395-396
- [13] Gao J, Wang T T, Yu J W, et al. Wild-Type KRAS and BRAF Could Predict Response to Cetuximab in Chinese Colorectal Cancer Patients [J]. Chin J Cancer Res, 2011, 23(4): 271-275
- [14] Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer[J]. Nature, 2012, 486(7404): 532-536
- [15] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(8): 753-762
- [16] Wan P T, Garnett M J, Roe S M, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF[J]. Cell, 2004, 116(6): 855-867
- [17] Tian S, Simon I, Moreno V, et al. A combined oncogenic pathway signature of BRAF, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction [J]. Gut, 2013, 62(4): 540-549
- [18] Al-Marrawi M Y, Saroya B S, Brennan M C, et al. Off-label use of cetuximab plus sorafenib and panitumumab plus regorafenib to personalize therapy for a patient with V600E BRAF-mutant metastatic colon cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(8): 703-710
- [19] Douillard J Y, Oliner K S, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2013, 369(11): 1023-1034
- [20] Douillard J Y, Rong A, Sidhu R. RAS mutations in colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2013, 369(22): 2159-2160
- [21] Boland C R, Thibodeau S N, Hamilton S R, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5248-5257
- [22] Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, et al. Microsatellite

- instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(15): 2788-2798
- [23] Sargent D J, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(20): 3219-3226
- [24] Walsh M D, Cummings M C, Buchanan D D, et al. Molecular, pathologic, and clinical features of early-onset endometrial cancer: identifying presumptive Lynch syndrome patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1692-1700
- [25] Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives[J]. *Genet Med*, 2009, 11(1): 35-41
- [26] Ogino S, Kawasaki T, Kirkner G J, et al. CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations[J]. *J Mol Diagn*, 2006, 8(5): 582-588
- [27] Jass J R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features [J]. *Histopathology*, 2007, 50(1): 113-130
- [28] Soreide K, Nedrebo B S, Knapp J C, et al. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist [J]. *Surg Oncol*, 2009, 18(1): 31-50
- [29] Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(1): 13-27
- [30] Samadder N J, Vierkant R A, Tillmans L S, et al. Associations between colorectal cancer molecular markers and pathways with clinicopathologic features in older women[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(2): 348-356
- [31] Fan H, Lu Y, Qin H, et al. High Ran level is correlated with poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2013, 18(5): 856-863
- [32] Lu Y, Wang X, Liu Z, et al. Identification and distribution of thioredoxin-like 2 as the antigen for the monoclonal antibody MC3 specific to colorectal cancer[J]. *Proteomics*, 2008, 8(11): 2220-2229
- [33] Deng L, Lu Y, Zhao X, et al. Ran GTPase protein promotes human pancreatic cancer proliferation by deregulating the expression of Survivin and cell cycle proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(2): 322-329
- [34] Deng L, Shang Y, Guo S, et al. Ran GTPase protein promotes metastasis and invasion in pancreatic cancer by deregulating the expression of AR and CXCR4[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(8): 1087-1093
- [35] Lu Y, Zhao X, Li K, et al. Thioredoxin-like protein 2 is overexpressed in colon cancer and promotes cancer cell metastasis by interaction with ran[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(9): 899-911

(上接第 1993 页)

- [20] Niam M, Linn YC, Fook Chong S, et al. Clinical scale expansion of cytokine-induced killer cells is feasible from healthy donors and patients with acute and chronic myeloid leukemia at various stages of therapy[J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(9): 897-903
- [21] Lu XC, Yang B, Yu RL, et al. Clinical study of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(1): 257-265
- [22] Yu J, Ren X, Li H, et al. Synergistic effect of CH-296 and interferon gamma on cytokine-induced killer cells expansion for patients with advanced-stage malignant solid tumors [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(4): 485-494
- [23] Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations[J]. *Immunother*, 2011, 24(6): 502-510
- [24] Ge W, Li CH, Zhang W, et al. Coculture of dendritic cell with cytokine-induced killer results in a significant increase in cytotoxic activity of CIK to tumor cells in vitro and in vivo[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2004, 25(5): 277-280
- [25] Liebowitz D, Lee K, June C. Costimulatory approaches to adoptive immunotherapy[J]. *Curr Opin Oncol* 1998, 10: 533-541
- [26] Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, et al. Systemic administration of interleukin 2 enhances therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 2268-2273
- [27] Schmidt J, Eisold S, Bächler MW, et al. Dendritic cells reduce number and function of CD4⁺CD25⁺ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(11): 1018-1026
- [28] Märten A, Renoth S, von Lilienfeld-Toal M, et al. Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells [J]. *Haematologica*, 2011, 86(10): 1029-1037
- [29] 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): 1076-1083
- [30] Yang L, Ren B, Li H, et al. Enhanced antitumor effects of DC-activated CIKs to chemotherapy treatment in a single cohort of advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(1): 65-73
- [31] 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: 181-187
- [32] Zhong GC, Yan B, Sun Y, et al. Clinical efficacy of immunotherapy of dendritic cell and cytokine-induced killer cell combined with chemotherapy for treatment of multiple myeloma[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2012, 33(12): 1000-1003
- [33] Zhan HL, Gao X, Pu XY, et al. A randomized controlled trial of postoperative tumor lysate-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells immunotherapy in patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(21): 3771-3777