

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620141152526

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

人诱导性多能干细胞 (iPSc) 对人肺癌
A549 细胞裸鼠移植瘤生长、转移作用的研
究

The effect of induced pluripotent stem cells (iPSc) on the
growth and metastasis of human lung cancer A549 cells in
nude mice

陈雷

指导教师姓名: 彭兴跃 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩时间: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: 章军 副教授

评 阅 人: _____

2017 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

| | |
|---|-----------|
| 摘要 | I |
| Abstract | II |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 人 iPS 细胞简介..... | 1 |
| 1.1.1 人 iPS 细胞的建立..... | 1 |
| 1.1.2 iPS 细胞技术的短期和长期应用 | 2 |
| 1.1.3 人 iPS 细胞作为细胞治疗剂..... | 3 |
| 1.1.4 人 iPS 细胞治疗的安全性问题..... | 4 |
| 1.2 A549 细胞及人非小细胞肺癌治疗新方法简介..... | 4 |
| 1.3 肿瘤干细胞简介..... | 6 |
| 1.3.1 肿瘤的异质性与肿瘤干细胞概念的产生..... | 6 |
| 1.3.2 癌症作为干细胞疾病..... | 8 |
| 1.4 动物活体成像技术简介..... | 10 |
| 1.4.1 动物活体成像技术的发展..... | 10 |
| 1.4.2 光学成像技术简介..... | 11 |
| 1.4.2.1 光学成像与非特异性成像剂 | 11 |
| 1.4.2.2 光学成像与受体特异性成像剂 | 12 |
| 1.4.2.3 光学成像中的其他成像剂..... | 13 |
| 1.5 本论文研究的目的和意义 | 14 |
| 第二章 材料与方 法 | 15 |
| 2.1 实验材料、试剂、仪器..... | 15 |
| 2.1.1 实验材料..... | 15 |
| 2.1.2 实验试剂..... | 15 |
| 2.1.3 实验仪器..... | 16 |
| 2.2 实验方法..... | 17 |
| 2.2.1 A549-RFP 细胞的传代培养 | 17 |
| 2.2.2 A549-RFP 细胞的冻存与复苏 | 18 |
| 2.2.3 人 iPS 细胞从有饲养层到无饲养层培养环境的过渡..... | 18 |
| 2.2.4 人 iPS 细胞的无饲养层培养传代..... | 19 |
| 2.2.5 人 iPS 细胞的冻存与复苏..... | 20 |
| 2.2.6 裸鼠皮下细胞移植瘤模型的建立..... | 21 |
| 2.2.7 裸鼠尾静脉注射肺转移模型建立..... | 22 |
| 2.2.8 小动物活体荧光成像系统的使用..... | 23 |
| 第三章 结果与分析 | 26 |
| 3.1 共培养的 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞的形态特征及荧光观察 ... | 26 |
| 3.2 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞融合 | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞的细胞融合仪电融合 | 28 |
| 3.2.2 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞的离心融合 | 32 |
| 3.3 裸鼠 A549 细胞和 iPS 细胞的移植瘤模型 | 33 |
| 3.3.1 肿瘤体积生长曲线 | 33 |
| 3.3.2 不同处理的裸鼠及剥离肿瘤比较 | 34 |
| 3.3.3 肿瘤组织荧光观察 | 36 |
| 3.4 活体荧光成像 | 37 |
| 3.4.1 裸鼠 A549 细胞和 iPS 细胞的移植瘤模型建立及肿瘤体积生长曲线 | 37 |
| 3.4.2 肿瘤动物模型的活体成像观察 | 38 |
| 3.4.3 活体成像系统检测 A549 细胞和 ips 细胞在裸鼠体内的的转移 | 39 |
| 3.4.3.1 成瘤 11 周裸鼠荧光蛋白表达的活体成像检测 | 39 |
| 3.4.3.2 成瘤 12 周裸鼠荧光蛋白表达的活体成像检测 | 44 |
| 3.4.3.3 成瘤 14 周裸鼠荧光蛋白表达的活体成像检测 | 48 |
| 3.4.3.4 肿瘤组织切片中的可能共表达 GFP 和 RFP 的细胞 | 50 |
| 3.5 裸鼠尾静脉注射肺转移模型建立 | 51 |
| 第四章 讨论 | 53 |
| 4.1 共培养的 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞的形态特征的讨论 | 53 |
| 4.2 A549-RFP 细胞和 iPS-GFP 细胞融合结果讨论 | 53 |
| 4.3 裸鼠 A549 细胞和 iPS 细胞的移植瘤模型的讨论 | 54 |
| 4.4 活体荧光成像观测移植瘤中 A549 细胞和 iPS 细胞转移讨论 | 55 |
| 第五章 总结 | 57 |
| 参考文献 | 58 |
| 致谢 | 65 |

| | |
|---|-----------|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | II |
| Chapter 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Introduction to human iPS cells | 1 |
| 1.1.1 The establishment of human iPS cells..... | 1 |
| 1.1.2 The short and long term application of iPS cell technology | 2 |
| 1.1.3 Human iPS cells are used as cell therapy agents..... | 3 |
| 1.1.4 The safety of human iPS cell therapy..... | 4 |
| 1.2 Introduction of new methods for the treatment of A549 cells and human non - small cell lung cancer | 4 |
| 1.3 Introduction of Tumor Stem Cells | 6 |
| 1.3.1 Tumor heterogeneity and the generation of tumor stem cell concepts..... | 6 |
| 1.3.2 Cancer as a stem cell disease..... | 8 |
| 1.4 Introduction of Animal Live Imaging Technology | 10 |
| 1.4.1 The Development of Animal Live Imaging Technology..... | 10 |
| 1.4.2 Introduction to Optical Imaging Technology..... | 11 |
| 1.4.2.1 Optical imaging and nonspecific imaging agents..... | 11 |
| 1.4.2.2 Optical imaging and receptor - specific imaging agents | 12 |
| 1.4.2.3 Other imaging agents in optical imaging..... | 13 |
| 1.5 The Purpose and Significance of the Study | 14 |
| Chapter 2 Materials and Methods | 15 |
| 2.1 Experimental materials, reagents, instruments | 15 |
| 2.1.1 Experimental Materials..... | 15 |
| 2.1.2 Experimental reagents..... | 15 |
| 2.1.3 Experimental instrument..... | 16 |
| 2.2 Experimental methods | 17 |
| 2.2.1 Passaging culture of A549-RFP cells cells..... | 17 |
| 2.2.2 Accumulation and resuscitation of A549-RFP cells..... | 18 |
| 2.2.3 Human iPS cells transition from feeder layer to feederless culture environment..... | 18 |
| 2.2.4 Human iPS cells were cultured without feeder culture. | 19 |
| 2.2.5 Frozen and resuscitated human iPS cells..... | 20 |
| 2.2.6 Establishment of subcutaneous cell transplantation model in nude mice..... | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.7 Establishment of lung transit model of tail vein injection in nude mice..... | 22 |
| 2.2.8 Application of Small Animal Living Fluorescence Imaging System..... | 23 |
| Chapter 3 Results and discussion..... | 26 |
| 3.1 Morphological characteristics and fluorescence observation of co - cultured A549 - RFP cells and iPS - GFP cells..... | 26 |
| 3.2 A549-RFP cells and iPS-GFP cells were fused..... | 28 |
| 3.2.1 Cell fusion of A549-RFP cells and iPS-GFP cells..... | 28 |
| 3.2.2 Centrifugal fusion of A549-RFP cells and iPS-GFP cells..... | 32 |
| 3.3 Nude mice A549 cells and iPS cells transplanted tumor model | 33 |
| 3.3.1 Tumor volume growth curve..... | 33 |
| 3.3.2 Different treatments of nude mice and peeling tumors were compared..... | 34 |
| 3.3.3 Fluorescence observation of tumor tissue..... | 36 |
| 3.4 In vivo Fluorescence Imaging..... | 37 |
| 3.4.1 Establishment of transplanted tumor model of nude mice A549 cells and iPS cells and tumor volume growth curve..... | 37 |
| 3.4.2 In vivo imaging of tumor animal model..... | 38 |
| 3.4.3 The migration of A549 cells and ips cells in nude mice was detected by a live imaging system..... | 39 |
| 3.4.3.1 The expression of fluorescent protein in nude mice at 11 weeks was detected by in vivo imaging..... | 39 |
| 3.4.3.2 The expression of fluorescent protein in nude mice at 12 weeks was detected by in vivo imaging..... | 44 |
| 3.4.3.3 The expression of fluorescent protein in nude mice at 14 weeks was detected by in vivo imaging..... | 48 |
| 3.4.3.4 Probably co-expressing GFP and RFP cells in tumor tissue sections..... | 50 |
| 3.5 Establishment of lung transit model of tail vein injection in nude mice..... | 51 |
| Chapter 4 Discussion..... | 53 |
| 4.1 The morphological characteristics of co - cultured A549 - RFP cells and iPS - GFP cells were discussed..... | 53 |
| 4.2 A549-RFP cells and iPS-GFP fusion cells discussions..... | 53 |
| 4.3 Discussion on transplanted tumor models of nude mice A549 cells and iPS cells..... | 54 |
| 4.4 Observation of metastasis of A549 cells and iPS cells in transplanted tumor by living fluorescence imaging..... | 55 |
| Chapter 5 Summary..... | 57 |
| References..... | 58 |

Acknowledgments 65

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

人诱导性多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPS cells) 是通过基因稳定转染技术将特定的转录因子导入人的体细胞, 使体细胞重编程, 形成具有多能性干细胞分化能力的类似胚胎干细胞形态的多潜能细胞。人 iPS 细胞具有的多能干性及分化潜能使其成为基础研究的有利工具, 本实验通过裸鼠移植瘤模型研究 iPS 细胞对人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞移植瘤生长及转移的作用。

目的: 建立裸鼠 iPS 细胞和 A549 细胞移植瘤模型, 观察记录肿瘤成瘤情况, 绘制肿瘤体积生长曲线; 利用小动物活体成像技术, 以稳定表达荧光报告基因的细胞成瘤模型为对象, 观察裸鼠移植瘤动物模型的发展及转移等生物学特性, 探究 iPS 细胞对人非小细胞肺癌细胞肿瘤的影响。

方法: 采用 BALB/c 裸小鼠皮下成瘤方法, 注射不同种类、处理的细胞, 观察 A549 细胞和 iPS 细胞的移植瘤的表型和生长变化。利用荧光蛋白稳定表达的基因稳转细胞, 建立了移植 A549 细胞和 iPS 细胞的动物肿瘤模型, 采用小动物活体成像系统观察荷瘤裸鼠成像效果, 观察不同时期两种细胞在裸鼠主要脏器中的荧光表达及分布情况。采用组织切片的方法, 观察 iPS 细胞及 A549 细胞在肿瘤及脏器中的形态、结构及分化特征。

结果: 成功建立了小鼠皮下成瘤模型, 初步了解 A549 细胞肿瘤的生物学特征。活体成像系统检测得出 GFP 在小鼠的肝脏中高表达, 而 RFP 在肝脏中表达量低或不表达。揭示在早期的肿瘤细胞转移中, iPS 细胞更倾向于肝脏方向转移。在肿瘤组织切片观察时, 发现有可能共表达 GFP 和 RFP 两种蛋白的细胞, 表明在肿瘤生长过程中两种细胞可能出现融合。

关键词: 裸鼠成瘤; iPS 细胞; 活体成像

Abstract

Human induced pluripotent stem cells (hiPS cells) are introduced into human somatic cells by gene-stable transfection techniques, reproduce somatic cells, which form pluripotent cells of pluripotent stem cell differentiation and Embryonic stem cell-like morphology. The pluripotency and differentiation potential of human iPS cells make it a useful tool for basic research. In this study, the effect of iPS cells on the growth and metastasis of human non-small cell lung cancer cell line A549 cells was studied by nude mice transplanted tumor model.

OBJECTIVE: To establishment of nude mice iPS cells and A549 cells transplanted tumor model, observe the tumor formation and draw the tumor volume growth curve. The effects of iPS cells on the development of human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumor cells were investigated by using the small animal live imaging technique to observe the development and metastasis of nude mice tumor model established in stable expression of fluorescent reporter gene cells.

METHODS: BALB / c nude mice subcutaneous tumorigenesis method was used to inject different kinds of treated cells, and the phenotype and growth changes of A549 cells and iPS cells were observed. The lung cancer animal model of transplanted A549 cells and iPS cells was established by using the gene stably transfected with fluorescent protein. The imaging effect of tumor bearing nude mice was observed by small animal live imaging system. The fluorescence expression and distribution of two kinds of cells in nude mice were observed. The morphology, structure and differentiation of iPS cells and A549 cells in tumor and organ were observed by tissue section method.

RESULTS: The model of mouse subcutaneous tumor was successfully established, and the biological characteristics of A549 cell tumor were comprehensively understood. Vivo imaging system detects derived GFP expression in the liver of mice, and low or no expression of RFP expression in the liver. It is revealed that iPS cells tend to migrate toward the liver in the early tumor cell metastasis. In the observation

of tumor tissue, it was found that cells with two proteins were expressed at the same time, indicating that two cells may develop in the process of tumor growth.

Keywords: nude mice tumorigenesis; iPS cells; live imaging

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 人 iPS 细胞简介

1.1.1 人 iPS 细胞的建立

2006 年, Yamanaka 和 Takahashi 首次通过引入四种因子从小鼠成纤维细胞培养物产生诱导多能干细胞 (iPS)。从那以后的 10 年里, 这一突破性的发现一直在生物学和医学领域得到应用。例如, 已经开发了用于产生 iPS 细胞的各种技术, 并且我们已经更好地理解涉及重编程的机制。此外, 许多研究人员已经探索了 iPS 细胞的应用, 例如药物发现, 疾病机制和再生医学的研究, 以及用于细胞分化和鉴定的先进技术的发展。此外, iPS 细胞生成的概念已经启发了一些未使用过 iPS 细胞的研究。iPS 细胞技术的建立是一个伟大的科学成就, 产生于前面的科学潮流如“重编程”, “主”转录因子和胚胎干细胞^[1]的汇合。

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka 在 ES 细胞培养条件下通过逆转录病毒引入四种转录因子: Oct3 / 4, Sox2, Klf4 和 c-Myc, 可以在小鼠成纤维细胞培养物中产生具有 ES 细胞样特性的干细胞, 这些得到的细胞被称为 iPS 细胞^[2]。他们最初产生的 iPS 细胞 (第一代 iPS 细胞) 显示出与 ES 细胞类似的形态和生长模式, 并表达一些 ES 细胞标记基因, 同时可以导致畸胎瘤形成。这是一个划时代的发现, 然而在 ES 细胞和这些新的 iPS 细胞之间注意到许多性质的差异: 第一, 内源 ES 细胞标记基因的表达在 iPS 细胞中比在 ES 细胞中低; 第二, ES 细胞标记基因中的 DNA 甲基化状态不同: iPS 细胞的基因被中间甲基化, 而 ES 细胞的基因座几乎总是被去甲基化; 第三, iPS 细胞能够产生胎儿嵌合体, 而不是成年嵌合体^[2]。得出结论, 2006 年产生的 iPS 细胞在其多能性方面与 ES 细胞不相同。因此, iPS 细胞技术的可用性仍不清楚。

2007 年, Okita 等人^[3]提出希望 iPS 细胞技术可以真正应用于科学和医学。他们将小鼠胚胎成纤维细胞培养生成能力的 iPS 细胞与第一代 iPS 细胞相比, 增加了类似 ES 细胞的基因表达和 DNA 甲基化模式。四种转基因 (Oct3 /

4, Sox2, c-Myc 和 Klf4) 在这种新型的 iPS 细胞中强烈沉默。他们从 iPS 细胞克隆获得成年嵌合体, 一个克隆通过种系传递到下一代, 满足多能性的严格标准。另一组产生生殖细胞能力的 iPS 细胞^[4], 这两种 iPS 细胞系与多能性中的 ES 细胞相同。然而, 约 20% 的嵌合小鼠产生的肿瘤归因于 c-Myc 转基因的再活化^[3]。该事件表明, 尽管 iPS 细胞在多能性方面与 ES 细胞相同, 但它们不如 ES 细胞那么安全。c-Myc 与三种其它因子的组合对 iPS 细胞产生有积极贡献, 同时导致 iPS 细胞的致肿瘤性, 促使对 iPS 细胞技术因 c-Myc 的参与而导致的肿瘤产生风险的关注。Nakagawa 和 Koyanagi 解决了这个问题^[5], 通过技术优化仅使用 Oct3 / 4, Sox2 和 Klf4 成功产生 iPS 细胞, 这些 iPS 细胞显示成年嵌合体能力, 并且 Myc 逆转录病毒的不存在显著降低嵌合体中致肿瘤性的风险, 提高对 iPS 细胞的安全临床应用的期望。值得注意的是, 不使用 c-Myc 在安全性方面具有缺点和优点, 因为 c-Myc 显著增强嵌合体中 iPS 细胞产生和种系传递的效率。Nakagawa 通过使用 l -myc 而不是 c-Myc 来解决这种困境, 不仅提高了细胞产生效率, 而且没有肿瘤发生的风险^[6]

1.1.2 iPS 细胞技术的短期和长期应用

通过异位表达定义的转录因子从体细胞产生诱导多能干 (iPS) 细胞为再生医学领域提供了用于细胞替代策略的新工具。与其他干细胞来源相比, 这些多能细胞可的优点包括产生自患者自身的体细胞而不是胚胎组织, 同时保持通用的分化潜能。

变性疾病的流行率的增加对于目前可用的小分子和外科手术治疗仍然具有挑战性。这促使寻找替代策略追求损伤或退化组织的恢复, 而不仅仅是损伤功能的补偿^[7]。再生医学的中心充足的细胞来填补受损或退化组织, 干细胞由于其自我更新和分化成几种细胞类型的能力是合适的工具^[8]。包括胚胎, 胎儿和成人干细胞的各种干细胞类型已经被研究作为再生治疗的来源^[9]。干细胞的免疫相容性和分化潜能是其适合性的关键特征。但这两个方面通常不能令人满意, 这限制了干细胞使用^[10]。此外, 在胎儿 (分离自流产胎儿) 和围产期干细胞 (羊水, 脐带血和胎盘) 的情况下, 培养中的繁殖具有挑战性^[9]。最后, 围绕使用胚胎材料的伦理问题阻碍了干细胞的临床发展研究^[11]。

尽管面临挑战，数百个临床试验探讨了干细胞在再生医学中的应用。移植骨髓干细胞治疗造血疾病已经安全和成功地用于临床。可以衍生自患者的成人细胞的诱导多能干细胞（iPS）的产生克服了伦理道德上的束缚^[2]。iPS 细胞的分化潜力（被认为实际上等于 ES 细胞的分化潜力）以及从个体患者获得它们的可能性揭示了广泛的潜在利用^[12]。在短期内，产生的 iPS 细胞的可以在体外从患有特定疾病的个体中分化的能力，被认为有助于针对不同条件的疾病模型的研究^[13]。因为人类原代细胞在长时间培养中不容易维持，可靠的疾病模型通常难以获得，动物模型不可避免地涉及种间变异^[14]。iPS 衍生的体外模型可以更好地了解疾病的机制，并帮助研究致病性表型的特征^[15]。

iPS 细胞也逐渐成为基础研究中的宝贵工具。特别地，iPS 细胞分化成不同谱系细胞，对于发育生物学研究很有意义。例如，由于缺乏描述该过程的早期事件的适当模型，许多问题仍不清楚的哺乳动物脑中皮质发育过程。最近的一项研究报告说，iPS 细胞可以分化成填充这一脑区域的所有类型的锥体神经元，因此能够研究皮质发育^[16]。此外，在 iPS 细胞中发生的表观遗传变化也可能有助于了解由表观遗传机制驱动的其他生物过程，如致癌作用^[17]。除了它们在疾病建模，药物筛选和基本生物学研究中的应用之外，iPS 细胞被认为可能是用于再生疗法的个体化细胞的最有希望的来源。最终的目标是从需要治疗的患者产生 iPS 细胞（自体 iPS），在基因治疗的帮助下在体外分化为正常的细胞，以校正遗传缺陷，并最终移植回到特定患者，但成功和安全的细胞移植治疗仍有许多障碍^[18]。

1.1.3 人 iPS 细胞作为细胞治疗剂

ES 细胞被认为是最有希望的替代疗法的细胞来源之一，ES 细胞是多能的并且可以潜在地分化成任何发育谱系（即内胚层，中胚层和外胚层）的细胞。iPS 细胞具有类似的多能性，并且可以在培养中维持在这种状态，有优于 ES 细胞的某些特点。首先，ES 细胞的分离涉及胚泡的破坏，其产生了关于人 ES 细胞衍生伦理学的多个讨论。不同国家已经制定了不同的人类 ES 细胞使用和研究法规。在欧洲联盟，司法法院于 2011 年建立，任何涉及破坏人类囊胚的过程不能获得专利^[19]。iPS 细胞可以从多种不同的体细胞产生，规避了围绕 ES 细胞分离

的伦理和法律问题。异源细胞（获自不同于接受移植物的个体的个体）的免疫排斥，被认为是 ES 细胞衍生物在细胞治疗中的使用限制^[20]。iPS 细胞技术的目标是从患者中产生自体，定型和功能性细胞，通过移植物排斥风险的最小化将再生医学转化为个性化治疗方法^[21]。

Zhao 等人的初步研究显示在移植同基因（遗传上相同的）未分化 iPS 细胞在小鼠中发生免疫应答^[22]。这项研究利用了未分化细胞，如 iPS 细胞植入体内时形成畸胎瘤（未分化起源的肿瘤）的固有能力和^[23]。报道了针对 iPS 细胞衍生的畸胎瘤的免疫应答以及 Hormad 和 Zg16 基因的异常表达^[22]。相比之下，Guha 等人最近的两项研究有验证这些发现^[24]。这两个基因通常在肿瘤细胞中过表达，因此它们的异常表达可能与畸胎瘤形成比与 iPS 细胞自身的免疫原性更相关。这些研究之间的矛盾可进一步归因于由不同方案产生的 iPS 细胞系之间的差异^[25]。尽管有这样的观察，iPS 细胞衍生物对于再生医学的适用性已经有各种临床前模型的支持，iPS 细胞被移植而没有排斥反应的迹象^[26]。然而，需要对人 iPS 细胞衍生物的免疫原性进行更系统的研究，以确保该方法的安全性。

1.1.4 人 iPS 细胞治疗的安全性问题

即使当我们用非整合方法产生没有 c-Myc 的 iPS 细胞，仍然存在关于基于 iPS 细胞的治疗的安全问题，例如移植细胞的遗传和表观遗传异常，致肿瘤性和免疫原性^[27]。全基因组测序技术方面的最新进展揭示了与 iPS 细胞技术相关的遗传和表观遗传学缺陷的风险水平^[28]。通过用于检测残留的未分化细胞的高灵敏度方法^[29]，消除残留的未分化细胞的分化诱导方法^[27]和用于鉴定保留大量数目的 iPS 细胞系的策略，已经减少了由残留的未分化多能细胞导致的畸胎瘤形成的风险^[30]。虽然 iPS 细胞衍生细胞的致癌性转化仍有待解决，但最近的研究沿着正确的方向迈出了一步^[31]。合适的免疫抑制治疗以及匹配供体和受体之间的主要组织相容性复合物抗原的方法预期可以控制基于同种异体 iPS 细胞的移植治疗中的免疫原性^[32]。

1.2 A549 细胞及人非小细胞肺癌治疗新方法简介

A549 细胞系，即人非小细胞肺癌细胞系是由 Giard DJ 通过肺癌组织移植

培养建系，来自一位 58 岁的白人男性，能通过胞苷二磷脂酰胆碱途径合成富含不饱和脂肪酸的卵磷脂，角蛋白阳性，体外培养时呈上皮样、多角形，通常是贴壁生长。肺癌是所有癌症患者的主要杀手，肺癌的治疗不佳，并且不管使用何种治疗方案，晚期肺癌患者的平均存活期少于一年^[33]。肺癌分为小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（NSCLC），NSCLC 在人类肺癌中占 80% 以上，并且是恶性肿瘤相关死亡率的主要原因之一，其中少于 16% 的患者在诊断后 5 年内能够存活^[34]。NSCLC 对局部淋巴结，肝，肾上腺，对侧肺，脑和骨髓的表现出原发性肿瘤细胞侵袭性转移表型^[35]，NSCLC 患者预后不良^[36]。通常，癌发生是由外部刺激引发的多步过程，其导致肺或干细胞中的遗传改变，导致增殖性加强，凋亡减少，发育不良和瘤形成。尽管开发了新的治疗策略，晚期肺癌的预后仍然很差^[35]。

近年来，随着对致癌过程和调节肿瘤细胞增殖，分化，血管生成，侵袭和转移的多种信号传导途径及通路的认识了解，找到了几种潜在的治疗靶点，这驱动了分子靶向治疗的发展^[37]。对于晚期不可切除的肺癌，需要最有效的治疗工具，以提高患者的存活率。除了常规化学放射疗法之外的需要一种新方法延长肺癌患者的存活率。新兴的新治疗方式通常通过两种独立的方法靶向肿瘤细胞的特异性酪氨酸激酶^[38]。一种是使用高度特异性的单克隆抗体靶向对肿瘤细胞生长重要的生长因子的膜受体，并且抗体/抗原复合物引起宿主免疫系统反应以杀死肿瘤细胞。这种方法的例子是乳腺癌患者中的 Her2 / neu 受体和赫赛汀^[39]。第二种方法是开发小有机分子，其靶向肿瘤细胞中的信号通路中的特异性酪氨酸激酶，其可以容易地进入肿瘤细胞。这种方法最好的例子是 Gleevec 和在慢性骨髓性白血病 BCR-ABL 融合激酶。

关于癌症干细胞（CSCs）的作为可能的治疗方式的研究近年来已经引起了许多注意，在肺癌干细胞研究中也有许多进展。已经使用 Hoechst 33342 染料鉴定了称为“侧群（SP）细胞”的干细胞特征。流式细胞分析使得对 SP 或非 SP 细胞的分选成为可能。侧群细胞已从各种类型的成体组织中分离，其中它们显示干细胞活性^[40]。这些先前研究的发现表明 SP 表型代表干细胞的共同特征。肿瘤干细胞是具有干细胞特征如自我更新，高迁移能力，耐药性和异常分化的肿瘤细胞，其构成异质性肿瘤群体^[41]。癌症干细胞（CSCs）在 1990 年代

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库