

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071152027

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

文蛤提取物诱导 Hela 细胞凋亡的研究

Studies on the apoptosis of Hela cells induced by the extract
from *Meretrix meretrix* Linnaeus

张 剑

指导教师姓名: 陈清西 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月 15 日

论文答辩时间: 2010 年 05 月 26 日

学位授予日期: 2010 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 5 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 日

缩略语中英文对照

- MM2, Anti-cancer extracts from *Meretrix Meretrix Linnaeus*, 文蛤抗癌活性提取物
- MMT, Methyl Thiazolyltetrazolium, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑
溴盐
- AO, Acridine orange, 吖啶橙
- EB, Ethidium bromide, 溴乙锭
- PI, Propidium iodide, 碘化丙啶
- DCFH-DA, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐
- CSC, Cancer stem cell, 肿瘤干细胞
- TNF, Tumor necrosis factor, 肿瘤坏死因子
- Apaf-, Apoptotic protease activating factor 1, 凋亡蛋白酶活化因子 1
- EPA, Eicosapentaenoic Acid, 二十碳五烯酸
- DHA, Docosahexenoic acid, 二十碳六烯酸
- SOD, Superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶
- AP, Ammonium Persulfate, 过硫酸铵
- PAGE, Polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳
- SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 十二烷基磺
酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
- CAN, Acetonitrile, 乙腈
- CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate, 3-[3-(胆酰胺丙
基)二甲基]丙磺酸内盐
- TFA, Trifluoroacetic acid, 三氟乙酸
- IEF, Isoelectric focusing, 等电聚焦
- 2DE, Two dimensional electrophoresis, 双向凝胶电泳
- PMF, Peptide mass fingerprinting, 肽指纹图谱
- MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass
spectrometry, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱
- MS, Mass spectrometry, 质谱

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
1 前言	4
1.1 癌症的危害及防治	4
1.1.1 癌症的危害	4
1.1.2 癌症的治疗方法	5
1.2 天然抗肿瘤药物研究进展	7
1.2.1 天然植物源抗肿瘤药物	7
1.2.2 海洋生物源抗肿瘤药物	8
1.2.3 微生物源抗肿瘤药物	10
1.3 细胞凋亡与肿瘤	11
1.3.1 细胞凋亡主要信号传导途径	12
1.3.2 抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡机制	13
1.4 文蛤及其食疗药用价值	15
1.4.1 文蛤的抗癌功效	16
1.4.2 文蛤的免疫调节功效	18
1.4.3 文蛤的降糖、降血脂功效	18
1.4.4 文蛤的抗氧化、抗衰老、防突变功效	19
1.5 本课题的研究内容与研究意义	19
2 实验材料、仪器与方法	21
2.1 材料与仪器	21
2.2 试剂	22
2.3 主要试剂的配制	24
2.4 方法	27
2.4.1 文蛤抗癌活性物质的分离纯化	27
2.4.2 蛋白浓度测定	27
2.4.3 多糖含量测定	28
2.4.4 紫外吸收光谱及分子量的测定	29

2.4.5 肿瘤细胞培养.....	29
2.4.6 MTT 法测定 HeLa 细胞增殖率.....	29
2.4.7 倒置光学显微镜下 HeLa 细胞形态观察.....	30
2.4.8 姬姆萨染色细胞形态观察.....	30
2.4.9 Hoechst 33258 染色细胞形态观察.....	31
2.4.10 AO/EB 染色细胞形态观察.....	31
2.4.11 透射电镜下细胞超微结构的观察.....	31
2.4.12 细胞周期检测.....	32
2.4.13 FITC-Annexin V/PI 双染流式细胞术.....	32
2.4.14 DNA 抽提及琼脂糖凝胶电泳.....	33
2.4.15 Caspase-3 活性的测定.....	33
2.4.16 细胞内活性氧 ROS 的测定.....	34
2.4.17 Real Time PCR 检测凋亡调控因子的表达.....	34
2.4.18 MM2 对 HeLa 细胞蛋白组表达的影响.....	37
3 实验结果与分析.....	40
3.1 文蛤活性提取物 (MM2) 的分离纯化.....	40
3.2 MM2 成分分析、紫外特征光谱及分子量.....	40
3.3 MM2 对 HeLa 细胞增殖抑制效应.....	42
3.4 MM2 对 HeLa 细胞形态的影响.....	42
3.4.1 倒置光学显微镜下 HeLa 形态的观察.....	42
3.4.2 姬姆萨染色 HeLa 细胞形态的观察.....	43
3.4.3 Hoechst33258 染色 HeLa 细胞形态的观察.....	44
3.4.4 AO/EB 双染色 HeLa 细胞形态的观察.....	45
3.4.5 透射电镜观察 MM2 作用前后 HeLa 细胞超微结构的变化.....	46
3.5 MM2 对 HeLa 细胞周期的影响.....	47
3.6 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率.....	50
3.7 MM2 诱发 HeLa 细胞染色体 DNA 片段化.....	53
3.8 MM2 激活 HeLa 细胞中 Caspase-3.....	54
3.9 MM2 提高 HeLa 细胞内 ROS 的水平.....	54
3.10 MM2 对凋亡信号调控相关基因转录水平的影响.....	56

3.10.1 总 RNA 的提取	56
3.10.2 Real Time PCR 溶解曲线分析	56
3.10.3 相对定量法分析目的基因的转录水平	58
3.11 蛋白质组学技术研究 MM2 对宫颈癌 HeLa 细胞蛋白表达的影响	60
3.11.1 MM2 作用后 HeLa 细胞全蛋白谱的差异表达变化	60
3.11.2 差异点质谱分析结果	62
4 讨论	68
4.1 文蛤提取物的抗癌活性及成分分析	68
4.2 MM2 诱导 HeLa 细胞发生凋亡	69
4.3 MM2 诱导 HeLa 细胞凋亡的机制	71
4.3.1 MM2 通过激活 Caspase-3 诱导细胞凋亡	71
4.3.2 MM2 通过提高细胞内 ROS 水平诱导细胞凋亡	72
4.3.3 凋亡调控因子对 MM2 诱导的 HeLa 细胞凋亡的调控	74
4.3.4 MM2 作用细胞后蛋白点差异表达分析	76
5. 结论	81
参考文献	82
在学期间发表的论文	90
致 谢	91

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
1 Introduction	4
1.1 Danger and therapy method of cancer	4
1.1.1 Danger of cancer	4
1.1.2 Therary method of cancer.....	5
1.2 Progress of research in antitumor drug from natural organism	7
1.2.1 Antitumor drug from plant	7
1.2.2 Antitumor drug from marine organism.....	8
1.2.3 Antitumor drug from microorganism.....	10
1.3 Apoptosis and tumor	11
1.3.1 Signal transduction pathway of apoptosis.....	12
1.3.2 Mechanism of apoptosis induced by antitumor drug.....	13
1.4 Mercenia and therapeutic medicinal value of them	15
1.4.1 Anticancer	16
1.4.2 Immune regulation.....	18
1.4.3 Depressing of blood sugar and lipid.....	18
1.4.4 Antioxidant, anti-aging,anti-mutation.....	19
1.5 Significance and Contents of The Research	19
2 Materrals, Instruments and Methods	21
2.1 Materials and Instruments	21
2.2 Reagents	22
2.3 Reagent confection	24
2.4 Experiment methods	27
2.4.1 Purification of anticancer extract from Mercenia.....	27
2.4.2 Titer of protein.....	27
2.4.3 Determine of sugar content.....	28
2.4.4 Determine of UV absorption spectra and molecular weight.....	29
2.4.5 Culture of tumor cells.....	29
2.4.6 Cells survival rate determined by MTT assay.....	29
2.4.7 Observation of cell morphology by ordinary light microscope.....	30

2.4.8 Observation of cell morphology after staining Giemsa	30
2.4.9 Observation of cell morphology after staining Hoechst 33258.....	31
2.4.10 Observation of cell morphology after staining AO/EB.....	31
2.4.11 Observation of cell ultrastructure by transmission electron microscope ..	31
2.4.12 Cells cycle determined.....	32
2.4.13 FITC-Annexin V/PI double staining flow cytometry.....	32
2.4.14 DNA extraction and agarose gel electrophoresis	33
2.4.15 Caspase-3 activity assay.....	33
2.4.16 Determination of Intracellular ROS.....	34
2.4.17 Effect on transcription of apoptosis related genes by Real Time PCR assay.....	34
2.4.18 Effect of MM2 on proteomic of HeLa cells	37
3 Results and analysis	40
3.1 Purification of anticancer extract (MM2)from merenia	40
3.2 Component analysis and UV absorption spectra determine	40
3.3 MM2 inhibit the growth of HeLa cells	42
3.4 Effect of MM2 on HeLa cells' morphology.....	42
3.4.1 Observation of cell morphology by ordinary light microscope.....	42
3.4.2 Observation of cell morphology after staining Giemsa	43
3.4.3 Observation of cell morphology after staining Hoechst 33258.....	44
3.4.4 Observation of cell morphology after staining AO/EB.....	45
3.4.5 Observation of cell ultrastructure by transmission electron microscope....	46
3.5 Effect of MM2 on the cell cycle of HeLa cells	47
3.6 Determined apoptosis rate with Annexin V-FITC/PI staining.....	50
3.7 MM2 induce DNA fragmentation of HeLa cells.....	53
3.8 MM2 enhance the activity of Caspase-3 in HeLa cells	54
3.9 MM2 increase the level of ROS in HeLa cella	54
3.10 Effect of MM2 on transcription of apoptosis related genes	56
3.10.1 Extraction of total RNA	56
3.10.2 Real Time PCR dissolution curve analysis.....	56
3.10.3 Relative quantitative analysis of target gene transcription.....	58
3.11 Effect of MM2 on expressed proteins of cells by proteomics method.....	60
3.11.1 Change of expressed proteins of HeLa cells treated by MM2	60

3.11.2 Identification of proteins by searching 2-D database	62
4 Discussion	68
4.1 Anticancer activity determination and component analysis of extract from <i>Mercenia</i>	68
4.2 MM2 induce apoptosis in Hela cells	69
4.3 Apoptosis mechanism promoted by MM2	71
4.3.1 MM2 induce apoptosis though ehnhance the activity of caspase-3	71
4.3.2 MM2 induce apoptosis thourh increase the level of ROS	72
4.3.3 Effect of the apoptosis factors on apoptosis induced by MM2	74
4.3.4 Ananalyses of differentially expressed proteins of cells before and after treated by MM2	76
5. Conclusions	81
Refernces	82
Publications	90
Acknowledgements	91

摘 要

本文采用乙醇抽提、分子筛层析等方法从文蛤 (*Meretrix Meretrix*) 中提取到具有抗癌活性物质, 将它命名为 MM2。成分分析显示其中含糖 4.82 mg/mL, 蛋白 2.08 mg/mL, 质谱测定其分子量为 3987.7 Da, 推测其可能是一种糖肽。MTT 结果显示 MM2 对 HeLa 细胞增殖生长有显著的抑制作用, 且呈时间和剂量效应。采用 Giemsa、Hoechst、AO/EB 染色及透射电镜等细胞形态观察, 发现 MM2 处理后 HeLa 细胞形态发生明显改变, 轮廓变得不清晰, 细胞皱缩变圆, 连接减少, 细胞脱壁而至悬浮状态; Giemsa 染色可见核处于溶解状态, 核仁消失, 染色质高度凝集且边缘化; Hoechst 染色可见致密深染、发亮蓝色荧光大小不等的颗粒状、新月体状或小体状结构; AO/EB 染色后细胞发出橙色荧光, 并可见典型的凋亡小体; 透射电镜下可见细胞核发生皱缩, 染色质凝集在核边缘化, 胞浆中出现空泡化等典型的凋亡特征。DNA 片段化琼脂糖凝胶电泳分析, 经 MM2 处理组细胞可见典型的 ladder 状电泳条带, 提示凋亡的发生。

PI 单染、Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞周期及凋亡率; 结果发现 MM2 处理组细胞, 在其周期 DNA 直方图 G_1 前可观察到明显的凋亡峰, 且当作用时间延长至 48 h, 其周期被一定程度地阻滞于 S 期; 双染结果显示: 当 MM2 浓度 80 $\mu\text{g/mL}$, 48、72 h 的凋亡率分别为: 27.88%, 42.20%。

进一步用 DCFH-DA 单染流式细胞术、Caspase-3 活性检测试剂盒、实时荧光定量 PCR、蛋白组学等技术检测细胞内 ROS 的水平, Caspase-3 的活性, 凋亡调控因子 (p53、Bcl-2、Bax、Caspase-3、p21) 的转录情况, 蛋白组表达差异, 以期探讨 MM2 诱导 HeLa 细胞凋亡的主要机理。结果显示, 在 MM2 诱导的细胞凋亡过程中, 细胞内的 ROS 及 Caspase-3 的活性有均一定增加, p53、p21、Bax、Caspase-3 等促凋亡因子转录增加, 而抑凋亡因子 Bcl-2 转录则减少。这些结果提示 p53 介导线粒体凋亡途径很有可能是 MM2 诱导 HeLa 细胞凋亡的主要机制之一。蛋白组学最终鉴定出 12 种差异蛋白。其中 7 个蛋白表达下调, 5 个蛋白表达上调。分析归纳有细胞骨架蛋白、分子伴侣蛋白、膜联蛋白、着丝粒蛋白、RNA 解旋酶等, 对部分差异点的功能进行了初步探讨, 其涵盖了从细胞结构到生理调控等相关方面。

关键词: 文蛤; MTT; 细胞凋亡; ROS; 凋亡因子; 蛋白组学

Abstract

In our study, we purified the active component from *Meretrix Meretrix Linnaeus*, named it as MM2, with a series of methods including, organic extraction and column chromatogram. Component analysis showed that the extract contained sugar and peptide simultaneously, the concentration of them were 4.82 mg/mL and 2.08 mg/mL, respectively, with 3987.7 KD molecular weight. The results showed that the active extract was possible a sugar-peptide. The research of cell biology with MMT methods indicated that MM2 could strongly inhibited proliferation of the cervix cancer HeLa cells in low concentration, in a time and dose-dependent manner in vitro. We observed the morphology of HeLa treated MM2 though Giemsa, Hoechst, AO/EB staining techniques. The results showed that the cells' morphology have changed significantly, the morphological profile becoming blurred, shrinkage, the intercellular connections decreased and lost their adhesive ability to the suspension. We can observed the chromatin gathered to the nuclear membrane and was stained compactly and deeply, the nuclear membrane and nucleolus disappeared after Giemsa staining; the granular, crescent structures or apoptosis bodies with compact deep-dyed, bright blue fluorescence, a typical characteristic of apoptotic, after Hoechst33258 staining. And we can observed orange fluorescence, it is peculiar characteristic of apoptotic, after AO/EB staining. We also can observed typical characteristics of apoptosis through the transmission microscopy, nuclear collapse, chromatin marginalized, and cytoplasm vacuolation and so on. We also detected occurrence of apoptosis with DNA agarose gel electrophoresis analysis, There is a ladder-like electrophoretic bands, after treated by MM2, which further verified the occurrence of apoptosis.

We analyzed the cell cycled and detected the rate of apoptosis by flow cytometry with PI or Annexin V-FITC/PI staining. It was found that there is a apoptotic peak on the DNA histogram, after treated with MM2. And the cell proportions M phases were significantly increased, treated with MM2 to 48 hour. When the MM2 concentration is 80 $\mu\text{g/mL}$, the the apoptosis rate of 48 hour and 72 hour were 27.88% and 42.2%.

To further study the mechanism of the MM2 induced HeLa cell apoptosis, we detected changes of ROS, Caspase-3 activity, and the transcription of apoptosis-related factors (p53, Bcl-2, Bax, Caspase-3, p21), It was found that the levels of ROS has a Slightly increase, the Caspase-3 activity has significantly enhance. And MM2 can enhanced the transcription of p53, p21, Bax, Caspase-3, reduced the transcription of Bcl-2. So we speculated that the p53-dependent

mitochondrial apoptosis pathway possibly is the mechanism of MM2. We eventually identified 12 differential expressed proteins between the control and the treated group by proteomics technology. There were 7 down-regulated proteins and 5 up-regulated proteins in two pieces of patterns. These proteins included cytoskeletal protein, molecular chaperones, membrane associated protein, centromere protein, RNA helicase enzymes and so on. Finally, we discussed the functions of some of these proteins and attempted to come up with the hypotheses to explain the potential molecular mechanism of inhibitory effects of MM2 on the HeLa.

Key words: *Meretrix Meretrix Linnaeus*; MTT; apoptosis; Apoptotic factors; proteomics

1 前言

1.1 癌症的危害及防治

1.1.1 癌症的危害

癌症，医学术语亦称恶性肿瘤，中医学中称岩，是控制细胞生长增殖机制失常，组织和器官异常增生、弱化或丧失应有功能所致的一种古老的疾病，早在距今约 3500 多年的殷周时代，殷墟甲骨文上已有“瘤”的病名的记载。国内外医学界已经证实，人类 80%~90% 以上的癌症与外部环境因素密切相关。当前环境污染日趋加剧，人类的生活环境不断恶化，与致癌因素的接触越来越紧密。当致癌因素过强或累积效应过大，而人体免疫功能不足或身体修复功能有缺欠情况下，就有可能发生癌症。癌症已成为严重危害人类生命健康的主要常见病、多发病之一^[1]。在中国，癌症已经成为死亡率最高的疾病，取代了心血管疾病成为危害人类生命的“头号杀手”。据世界卫生组织统计，每年世界有 1100 万人患上癌症，而死于癌症人数约 600 万，占全球死亡人数的 12%。中国癌症发病占全球的 20.3%，每年新增癌症患者 220 万，死亡 140 万，平均每 3 分钟就有 1.3 人死于癌症，而且癌症的发病率呈急剧上升的趋势。据《文汇报》报道，在过去不到 20 年的时间内，我国癌症发病率上升 69%，死亡率增长了 29.4%。目前各种癌症中死亡率最高的是胃癌、肝癌、肺癌和食管癌，约占全部癌症患者死亡人数的 74.3%^[2]。由于治疗癌症费用高，在许多经济不发达国家和地区往往因高昂的医疗费用而放弃治疗，这给统计准确性带来了困难，因此实际的肿瘤患者数字可能远超过以上的统计数字。

20 世纪以来，探索癌症的病因，治愈癌症一直是人类的梦想，人类也为此在不断地努力探索和研究。随着肿瘤分子生物学和现代细胞生物学的不断深入，人们认识到肿瘤的发生、发展是一个长期的过程。细胞癌变是一种基因表达紊乱、增殖异常、分化失调的疾病^[3]。其特征表现为细胞的失控生长，并由原发部位向他处扩散，这种扩散无法控制，将侵犯要害器官和引起衰竭，最后导致死亡^[3,4]。近半世纪以来，经科学工作者的不断探索，人们逐步认识到癌症是由环境、营养、饮食、遗传，病毒感染和生活方式等多种不同因素作用导致的，它的发生、发展是一个多步骤、多因子的复杂的生物学过程，由启动、促进和演进三个不同而又连续的阶段组成，涉及了多种癌基因的激活和抑癌基因的失活及其相

互作用等复杂机制，此外细胞周期调控及细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及退化密切相关^[5,6]。

1.1.2 癌症的治疗方法

现代临床癌症主要疗法有：手术治疗、放射治疗、化学治疗和生物治疗^[7]。

(1) 手术治疗主要是利用手术将固性肿瘤摘除，包括根治性手术，姑息性手术，探查性手术，但一般只对早期癌症有治疗效果。手术切除通常无法完全清除癌细胞，术后复发可能性及癌细胞转移可能性也极高^[7]。

(2) 放射治疗简称放疗，它是利用高能电磁辐射作用于生命体，使生物分子结构改变，达到破坏癌细胞目的的一种治疗方法。目前临床上应用的放射线有 X 线治疗和 γ 线治疗两种，但应指出的是放射性治疗具有较大的副作用，属辅助疗法，因此在进行放疗前须对长远期的毒性反应和剂量限制性毒性有足够的估计^[8]。

(3) 化学治疗是将具有细胞毒和促进分化作用的化学药物经血管带到全身，通过抑制肿瘤细胞生长、杀死肿瘤细胞及促进肿瘤细胞分化等达到治疗的效果，但由于药物可经血液、淋巴循环到达身体的各个部位，所以其对身体所有细胞都有影响。一般使用的化学治疗药物有抑制核苷酸生成的抗代谢药物、干扰基因复制的烷基化剂、干扰酵素作用的抗生素类药物、抑制有丝分裂的药物、类固醇或荷尔蒙拮抗剂等^[9]。化学治疗的临床应用有四种方式：晚期或播散性肿瘤的全身化疗、辅助化疗、新辅助化疗、特殊途径化疗。然而由于化疗药物的非特异性，使得它对癌细胞杀伤的同时对正常细胞也有一定的毒副作用。此外肿瘤细胞对化疗药物的耐药性，残存肿瘤细胞复发并转移的可能性也是引起化疗失败的主要原因。

(4) 生物疗法 (biotherapy) 亦称为“生物调节疗法 (bioregulator therapy)”至今尚无统一公认的定义。生物治疗是近十年来，在分子免疫学、分子生物学、肿瘤学以及基因重组技术飞速发展的基础上发展起来的一种全新的肿瘤治疗方法，主要有以下四大类，即干细胞治疗、免疫治疗、基因治疗和抗血管生成治疗^[10,11]。肿瘤的发生发展和播散是由于肿瘤与机体防御之间的动态平衡破坏的结果，生物治疗是应用现代生物技术及产品提高肿瘤病人的抗肿瘤免疫力或给予天然产生的靶向性很强的物质，起到治疗、控制肿瘤的效果和目的。

近年来随着干细胞研究的深入，发现多种肿瘤中都存具有自我更新能力和分

化潜能的肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC), 这部分细胞是肿瘤生长、增殖和转移的根源^[12]。此外肿瘤干细胞还具有正常干细胞的自我保护特性, 如有效的 DNA 修复、高表达多药耐药型膜转运蛋白、处于相对静止状态并拥有特定的微环境, 使其能够逃逸现有的肿瘤治疗手段, 导致肿瘤复发^[13,14]。因此探讨肿瘤干细胞与正常干细胞对某些特定的信息通路的依赖性的区别, 从而进行靶向性治疗, 选择性地去除肿瘤干细胞而对正常干细胞不产生明显毒性, 是治愈癌症、改善患者愈后的关键^[15]。

免疫治疗是通过激发或调动机体的免疫系统, 增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力, 从而控制和杀伤肿瘤细胞的一种治疗方法。免疫治疗可分为三大类: 特异性主动免疫治疗、非特异性主动免疫治疗、过继性免疫治疗^[16]。由于肿瘤特异性抗原被人体免疫系统识别并激发免疫反应, 调动、激发或增强机体自身的能力去破坏肿瘤细胞, 因此它可以限制瘤体生长, 阻止转移和扩散, 促使肿瘤消退。如果用各种自体或异体肿瘤细胞、瘤组织提取物或纯化的特异性肿瘤抗原制剂, 注人体内, 使之产生和增强特异性细胞免疫活性, 提高机体对肿瘤的抵抗力, 诱导体内的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞来杀伤肿瘤, 就可以达到预防和治疗肿瘤的目的, 这种疗法称之为特异性主动免疫治疗。目前已从细胞水平、分子水平及基因水平制备了肿瘤疫苗有以下 4 类: ①肿瘤细胞疫苗; ②肿瘤抗原或抗原肽疫苗; ③抗独特型抗体疫苗; ④基因工程疫苗^[17]。非特异性主动免疫治疗常用的非特异免疫制剂包括: ①微生物及其制剂, 如卡介苗、溶血性链球菌等; ②化学制剂, 左旋咪唑等; ③一些中草药; ④生物制剂, 主要是重组细胞因子、白介素、干扰素、单克隆抗体等^[17]。过继性免疫治疗是指通过分离获取患者自身免疫细胞, 在体外细胞因子的诱导下, 大量扩增出具有高抗肿瘤活性的免疫细胞, 使它变成一种杀伤细胞, 再回输到血液中去, 使其继承特定的免疫性, 提高机体的抗肿瘤能力的一种疗法。此类细胞包括 DC 细胞, LAK 细胞, TIL 细胞, CIK 细胞, AKM 细胞, CD3AK 细胞等^[11]。

基因治疗是指利用细胞工程技术将外源目的基因导入人体靶细胞或组织以取代有缺陷的基因, 通过其正常表达, 以达到防治肿瘤的目的^[11]。肿瘤基因治疗包括两个方面: 其一降低引起细胞恶性转化的原癌基因的表达; 其二增强抑癌基因的功能, 从而封闭被激活原癌基因的表达^[18]。肿瘤基因治疗基本策略主要有以下几种方式: 基因替代、基因添加、基因修饰、基因补充、基因沉默等^[11]。国外

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库