

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151950

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**JAK-STAT 信号通路对 CIK 细胞杀伤肝癌
细胞的影响**

**Influence of the JAK-STAT Signal Pathway on the
Antitumor Activity of CIK Cell on Hepatoma Cell**

马飞剑

指导教师姓名: 颜江华 副教授

王彦海 副教授

专 业 名 称: 动物学

论文提交日期: 2010 年 4 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

目 录

中文目录	I
英文目录	III
摘要	V
ABSTRACT	VII
第一章 前言	1
1 CIK 细胞	2
1.1 过继免疫疗法与 CIK 培养方法的建立过程	2
1.2 CIK 的生物学特性	3
1.3 CIK 细胞的作用机制	5
1.4 CIK 细胞的研究现状	5
2 JAK-STAT 信号通路	8
2.1 JAK-STAT 信号通路的发现	8
2.2 JAK 蛋白家族	9
2.3 STAT 蛋白家族	10
2.4 JAK-STAT 信号转导途径概述	11
2.5 JAK-STAT 信号通路的调控	13
2.6 JAK-STAT 信号通路与健康的关系	17
2.7 JAK-STAT 信号通路的抑制剂与激活剂	20
3 立题背景	22
第二章 材料和方法	23
1 材料	23
1.1 细胞株与外周血	23
1.2 主要实验试剂	23
1.3 主要实验仪器和设备	24

1.4 主要试剂的配制:	25
2 方法	26
2.1 肝癌细胞 HepG2 的复苏、传代与冻存	26
2.2 CIK 细胞的分离、诱导与培养	26
2.3 分组加药: 对 CIK 细胞中的 JAK-STAT 途径进行调控	27
2.4 CIK 细胞的增殖与免疫表型鉴定	28
2.5 CIK 细胞毒活性检测 (Alamar-Blue 法)	28
2.6 RT-PCR 检测 CIK 中 SOCS1 mRNA 表达水平	29
2.7 统计学处理	30
第三章 结果与讨论	31
1 结果	31
1.1 CIK 细胞的生长与增殖情况	31
1.2 CIK 细胞的免疫表型分析	33
1.3 CIK 细胞中 SOCS1 蛋白 mRNA 的 RT-PCR 分析	38
1.4 CIK 对肝癌细胞 HepG2 的杀伤活性检测	40
2 分析与讨论	43
参考文献	48
致谢	58
缩略词表 (按英语字母排列)	59

TABLE OF CONTENT

TABLE OF CONTENT (IN CHINESE)	I
TABLE OF CONTENT (IN ENGLISH)	III
ABSTRACT (IN CHINESE)	V
ABSTRACT (IN ENGLISH)	VII
CHAPTER 1 Introduction	1
1 Cytokine-induced Killer Cell	2
1.1 Foundation of adoptive immunotherapy and CIK culture.....	2
1.2 Biological characters of CIK	3
1.3 Mechanism of CIK's function activities	5
1.4 Current research situation of CIK	5
2 JAK-STAT signal pathway	8
2.1 Discovery of JAK-STAT signal pathway	8
2.2 JAK protein family	9
2.3 STAT protein family	10
2.4 General induction of JAK-STAT pathway	11
2.5 Regulation of JAK-STAT pathway	13
2.6 Relationship between JAK-STAT pathway and diseases	17
2.7 Antagonists and agonists of JAK-STAT pathway	20
3 Background	22
CHAPTER 2 Materials and Methods	23
1 Materials	23
1.1 Cell line and peripheral blood.....	23
1.2 Main chemicals and reagents.....	23
1.3 Main instruments and equipments	24

1.4 Preparation of main reagents	25
2 Methods	26
2.1 Recovery, culture and storage of HepG2 Hepatoma cell	26
2.2 Separation, induction and culture of CIK	26
2.3 Drug treatment: regulation of JAK-STAT pathway in CIK	27
2.4 Proliferation and immunophenotype detection of CIK	28
2.5 SOCS1 mRNA expression level of CIK by RT-PCR	28
2.6 Cytotoxicity of CIK(by Alamar-Blue)	29
2.7 Statistics analysis	30
CHAPTER 3 Result and discussion	31
1 Result	31
1.1 Proliferation of CIK	31
1.2 Immunophenotype analysis of CIK	33
1.3 SOCS1 mRNA analysis by RT-PCR in CIK	38
1.4 Cytotoxicity detection of CIK on HepG2 cells	40
2 Discussion	43
REFERENCES	48
ACKNOWLEDGEMENTS	58
ABBREVIATIONS	59

摘要

细胞因子诱导的杀伤细胞 (Cytokine-induced Killer Cell, CIK) 是人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)经细胞因子诱导成的具有肿瘤杀伤能力的一群异质细胞。JAK-STAT信号通路与细胞的生长、增殖、分化和凋亡关系十分密切。研究显示, JAK-STAT信号通路参与了机体中的许多免疫调控活动。IFN- γ 和IL-2是激活JAK-STAT信号通路的重要配体, 也是刺激和活化CIK细胞杀伤肿瘤细胞的重要细胞因子。本论文的研究目的, 在于观察JAK-STAT信号通路的激活或抑制状态对CIK细胞发挥肿瘤杀伤能力的影响, 以探索一种提高CIK细胞肿瘤杀伤活性的新途径。

用淋巴细胞分离液分离人外周血单个核细胞 (PBMCs), 按 Wolf 等人报道的方法, 用 IFN- γ 、IL-2、CD3mAb 等细胞因子培养 CIK 细胞。在显微镜下观察细胞生长状况, 用台盼蓝染色法进行活细胞计数, 记录生长曲线。用流式细胞术对第 0、7、14 天的 CIK 细胞进行表型鉴定。为了观察 JAK-STAT 信号通路的激活或抑制状态对 CIK 细胞发挥其肿瘤杀伤能力的影响, 在 CIK 细胞培养过程中, 分组加入 JAK-STAT 信号通路的激活剂 pJAK2 多肽或化学抑制剂 AG490, 分组如下: CIK 组、激活剂 pJAK2 组、抑制剂 AG490 组和 (pJAK2+AG490) 联合组 (在 CIK 培养第 0-10 天加 25uM pJAK2 共培养, 第 11-14 天换 50uM 或 75uM AG490 共培养)。以上各组细胞培养 14 天后, 与靶细胞 HepG2 以效靶比 20: 1 的比例混合培养, 用 Alamar-Blue 法检测 36h、48h 各组 CIK 细胞对肝癌细胞系 HepG2 的细胞毒活性。用 Trizol 法提取各组 CIK 细胞的总 RNA, RT-PCR 法检测 JAK-STAT 通路下游分子 SOCS1 的 mRNA 表达水平。

在培养过程中, CIK 细胞第 4 天起开始出现成团生长, 第 6-7 日起进入快速生长期, 到第 14 天时 CIK 细胞数扩增了约 248 倍。流式细胞术结果显示, CIK 细胞中 CD3⁺细胞亚群的比例在培养过程中不断提高, 第 0、7、14 天时分别为 41.96% \pm 3.1%、80.94% \pm 7.91%和 92.81% \pm 6.87%; 经过 14 天的培养, CD3⁺CD56⁺细胞亚群也由培养之初的 2.51% \pm 0.5%上升到 20.56% \pm 0.68%, CD4⁺、CD8⁺ 细胞亚群的比例在第 0、7、14 天时分别为 22.81% \pm 3.6%、54.43% \pm 6.4%、68.72% \pm 8.33% 和 28.61% \pm 4.75%、39.19% \pm 4.03%、27.42% \pm 1.85%。

Alamar-Blue 法检测细胞毒活性结果如下：与 HepG2 共培养 48h 后，CIK 组细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤效率为 40.83%，pJAK2 组的 CIK 细胞对 HepG2 的肿瘤杀伤效率为 85.4%。使用抑制剂 AG490 共培养的 AG490 组 CIK，在 AG490 加药浓度为 50 uM 时，对 HepG2 的毒活性为 13.71%，当 AG490 浓度为 75 uM 时，对 HepG2 的毒活性为 3.62%。培养时先加激活剂 pJAK2 培养 10 天，后加抑制剂 AG490 培养 4 天的 (pJAK2+AG490) 组，肿瘤杀伤能力介于 pJAK2 组和 AG490 组之间，即 AG490 浓度为 50 uM 时，CIK 对 HepG2 的毒活性为 42.14%；AG490 浓度为 75 uM 时，CIK 对 HepG2 的毒活性为 25.25%。RT-PCR 结果显示：CIK 组和 DMSO 组细胞中可检测到 SOCS1 mRNA，但含量低，而 pJAK2 组细胞的 SOCS1 mRNA 表达量比 CIK 组高约 5.8 倍 ($p < 0.05$)，加入抑制剂 AG490 的各组 CIK 中均未检测到 SOCS1 mRNA 的表达。

细胞毒性实验说明：当 CIK 细胞中的 JAK-STAT 信号通路被 IFN- γ 和 IL-2 激活，并且活化时间被 pJAK2 多肽有效延长时，CIK 细胞对肝癌细胞 HepG2 的细胞毒活性显著提高 ($p < 0.05$)；当 CIK 细胞与 AG490 共培养时，JAK-STAT 信号通路的活性被抑制剂 AG490 抑制时，AG490 组 CIK 细胞的肿瘤细胞毒活性也明显降低 ($p < 0.05$)；在先用 pJAK 共培养 10 天，后换用 AG490 培养的 (pJAK2+AG490) 组实验组中，可以观察到 pJAK2 多肽有助于延长 JAK-STAT 信号通路的激活状态，继而使 CIK 细胞对后期培养中加入的 AG490，对 JAK-STAT 信号通路的抑制具有一定的拮抗作用，并且这种拮抗对低浓度抑制剂组的作用更明显 ($p < 0.05$)。

综合以上结果，显示当 JAK-STAT 信号通路被激活，而且活化时间被有效延长时，CIK 细胞对肝癌细胞 HepG2 的细胞毒活性显著提高，当 JAK-STAT 被抑制时，CIK 细胞对 HepG2 的肿瘤细胞杀伤能力明显降低。可见，JAK-STAT 信号通路对 CIK 细胞发挥肿瘤杀伤活性确实有影响作用，且二者具有一定的正向关系，从而为提高 CIK 细胞的肿瘤杀伤活性提供了一种新思路 and 途径。

关键字： JAK-STAT；CIK 细胞；HepG2

Abstract

Cytokine-induced killer cell (CIK) is a group of heterogeneous cells induced from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which have an antitumor activity. JAK-STAT signal pathway is closely related to cell growth, proliferation, differentiation and apoptosis. As revealed, JAK-STAT pathway is involved in many activities of immune activities in human body. IFN- γ and IL-2 are critical ligands of JAK-STAT, and also important cytokines used in CIK induction and activation. The purpose of this paper is to observe whether the status of the JAK-STAT pathway has an impact on the antitumor activity of CIK, so as to explore a new strategy to enhance the antitumor activity of CIK.

PBMCs were separated by ficoll-hypaque and induced into CIK by IFN- γ , IL-2 and CD3mAb according to the method covered by Wolf etc. The growth status of CIK was observed by a microscope. The amount of cells alive was counted by trypan blue dye method, and cell proliferation was also recorded. The cell phenotype was analysed by flow cytometry on day 0, 7 and 14. In order to find out the impact of JAK-STAT on CIK, cells were separated to several groups: CIK group, agonist pJAK2 group, inhibitor AG490 group and (pJAK2+ AG490) combined group. In the combined group, CIK cells were treated with 25 μ M pJAK2 on day 0-10 and changed with 50 μ M or 75 μ M AG490 on day 11-14. CIK was collected on day 14 and cocultured with HepG2 cells in the ratio of 20:1 for 36h or 48h. The cytotoxicity of CIK on HepG2 was detected by the Alamar-Blue method. Samples from all the CIK groups were collected, and the total RNA of these cells were extracted by Trizol, and the mRNA expression level of SOCS was determined by RT-PCR.

During the culture, CIK appeared to proliferate by congregating into cell groups on day 4. CIK began to enter the fast growing phase on day 6-7, and the cell amount on day 14 was 3.327×10^7 , 248 times of cells on day 0. Flow cytometry revealed CD3⁺ subgroup in CIK constantly increased, the percentage of this subgroup in CIK was $41.96\% \pm 3.1\%$, $80.94\% \pm 7.91\%$ and $92.81\% \pm 6.87\%$ on day 0, 7, 14 respectively. The

percentage of CD3⁺CD56⁺ subgroup, main effector cells in CIK, also increased from 2.51%±0.5% on day 0 to 20.56%±0.68% on day 14. And on day 0, 7 and 14, the percentage of CD4⁺ cells in CIK was 22.81%±3.6%, 54.43%±6.4% and 68.72%±8.33%, and the percentage of CD8⁺ cells was 28.61%±4.75%、39.19%±4.03% and 27.42%±1.85% respectively.

The cytotoxicity result: the cytotoxicity of CIK group on HepG2 cells was 40.83%, and the cytotoxicity of the pJAK2-treated group on HepG2 cells was 85.4%. The cytotoxicity of AG490 group was 13.71% when treated with 50 uM AG490 and 3.62% when treated with 75 uM AG490. The cytotoxicity of (pJAK2+ AG490) group was 42.14% when treated with 50 uM AG490 and 25.25% when treated with 75 uM AG490. Lower expression of SOCS mRNA was observed by RT-PCR in CIK group and DMSO control group, only about 1/6 compared to pJAK2 group (p<0.05). All the groups treated with AG490 were observed no evident SOCS mRNA expression.

The results of cytotoxicity experiment showed, when the JAK-STAT pathway was activated and maintained effectively, the cytotoxicity of CIK on HepG2 tumor cells would remarkably enhanced (p<0.05), and it would obviously weakened when the pathway was inhibited (p<0.05). We observed that the treatment of pJAK2 peptide, the JAK-STAT agonist, could effectively antagonize the inhibition of AG490 on JAK-STAT pathway in CIK, recovered the cytotoxicity of CIK on HepG2 cells. This antagonism effect was dose-dependent.

In conclusion, the JAK-STAT pathway does have an influence on the antitumor activity of CIK. Our studies provide a new strategy to enhance the antitumor activity of CIK.

Keywords: JAK-STAT; CIK; HepG2

第一章 前言

原发性肝癌是严重危害人类生命健康的重大疾病之一,据统计,每年全球新增肝癌人数62.6万人,因肝癌死亡者59.8万人,居全球恶性肿瘤发病率第6位,死亡原因第3位。而新发肝癌病例中55%发生于中国,根据卫生部统计,我国肝癌死亡率在各种癌症死亡率中居第2位。我国的肝癌诊治形势十分严峻^[1],对肝癌治疗方法的研究就显得十分迫切和必要。

随着科学技术的发展,人们已经发展出多种医学治疗策略来治疗肝癌。目前,肝癌的治疗主要包括手术切除、肝移植术、生物治疗、全身化学疗法、经皮治疗、激素治疗、经动脉化学栓塞、综合治疗等。

临床上的肝癌治疗被分为两种:适于手术切除的肝癌和不适于手术切除的肝癌。外科手术曾是唯一一种有望治愈肝癌的治疗方式,在小肝癌手术方面也已取得良好效果^[2-4],但是,由于多数肝癌病例严重肝病,如伴有肝炎、肝硬化等,使得总体手术切除率低,术后复发率高^[5,6]。对于不适于手术切除的肝癌,近十余年兴起了以局部破坏和毁损为目的的研究。始于20世纪80年代的经导管肝动脉化疗栓塞 (Transcatheter Arterial Chemoembolization, TACE)^[7]和20世纪90年代的射频消融(Radiofrequency Ablation, RFA)^[8]技术已相继成为不能手术切除肝癌的主要治疗手段。但是,肝癌REA与TACE联合应用仍不能完全解决肝癌复发转移问题。

虽然肝癌治疗的新技术和新方法层出不穷,肝癌研究已取得了很大的进步,疗效也已得到明显改观,但就肝癌整体而言,其疗效仍很不理想。

近几年来,伴随着分子生物学,免疫学基础理论及生物工程的迅猛发展,肿瘤免疫学已成为生命科学研究最活跃的领域之一。肿瘤的生物治疗成为继手术、放疗、化疗之后的第四种治疗模式。肿瘤免疫治疗作为生物治疗的方式,充满了生机和活力。免疫治疗分为主动免疫治疗、被动免疫治疗、化学免疫治疗和过继免疫治疗。

大量研究表明,体内回输免疫活性细胞的过继免疫疗法可以在不损伤机体免疫系统结构和功能的前提下直接杀伤肿瘤细胞。目前,过继免疫疗法已成为肿瘤

手术放疗化疗的重要辅助治疗方法。其中，适用CIK细胞作为过继免疫疗法的一种具体疗法，已在临床上被广泛研究。

1 CIK 细胞

1.1 过继免疫疗法与 CIK 培养方法的建立过程

自上世纪70年代开始，人们逐渐开展对肿瘤过继免疫治疗方面的研究，其中以人外周血单个核细胞(PBMCs)为培养对象的研究经过80、90年代的发展，获得了一系列成果。

淋巴因子激活的杀伤细胞(Lymphokine-Activated Killer, LAK)是最早的细胞因子诱导的免疫效应细胞之一。早在20世纪80年代初，研究就显示，LAK细胞是种不受主要组织相容复合物MHC限制的效应淋巴细胞，它可以杀伤新取的肿瘤细胞和原本对NK细胞不敏感的肿瘤细胞系^[9]。

只需要用IL-2进行短暂的培养(大约5天)，即可扩增出LAK细胞，培养后的LAK细胞是一个异质细胞群，其中有CD3⁺CD56⁻ T细胞，CD3⁻CD56⁺ NK细胞和CD3⁺CD56⁺ T细胞，而CD3⁺CD56⁺细胞也是非MHC限制的细胞毒T细胞。CD3⁺CD56⁺ T细胞和CD3⁺CD56⁻ T细胞这两个细胞组群的存在使LAK具备了细胞毒活性^[10]。

多年来，人们通过多种方法改进对LAK细胞的培养，如在培养初期加入OKT3，延长培养时间，以及在培养后期加入各种不同的细胞因子。这些方法在一定程度上使LAK细胞的增殖能力和杀伤能力得以增强^[11]。

在体外，LAK细胞显示出对一部分肿瘤细胞的杀伤能力，同时，在动物实验中，LAK细胞也具有抑制肿瘤增殖的能力^[12, 13]。在临床研究中，LAK细胞对诸如肾细胞癌、黑素瘤等转移性癌症具有中等程度的杀伤效力^[14]。90年代，在一个使用LAK细胞进行过继免疫治疗的随机化临床实验中，LAK细胞有效延长了原发性肝癌患者外科手术后的复发时间^[15]。

但由于LAK细胞杀伤力不够强、增殖能力有限，临床应用需要大量细胞输注($3 \times 10^{10-11}$)，同时大剂量应用IL-2，容易产生患者的不良生理反应，所以目前LAK细胞在临床上无法被广泛应用。但对LAK细胞的深入研究为随后的相关工作打下了良好的理论和实验基础^[16, 17]。

细胞毒T淋巴细胞 (Cytotoxic T lymphocytes, CTL) 作用于自体白血病细胞, 可能是过继免疫疗法中特异性最高的效应细胞。但是要诱导和扩增出针对患者白血病细胞的特异性CTL存在一定的困难, 目前还没有找到白血病的特异性抗原。除了IL-2以外, 多种细胞因子也可以诱导出CTL。

1986年, Rosenberg等^[18]提出肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的概念, 它是一种具有抗肿瘤活性的T淋巴细胞。TIL细胞的主要效应细胞具有CD3⁺CD56⁻CD8⁺免疫表型, 并且TIL细胞发挥肿瘤杀伤能力依赖于MHC^[17, 19]。TIL的肿瘤杀伤力较LAK细胞有了明显提高^[17, 19], 并且无需联合使用大剂量的IL-2。淋巴细胞中只有一小部分亚群分布于肿瘤节点, 这部分淋巴细胞中有一些细胞可能由于与肿瘤抗原直接接触, 所以细胞表面带有IL-2受体, 其生长、增殖受到IL-2的影响。但是由于细胞难以获取, 并且从人体组织中分离时可能发生功能改变^[19], 限制了TIL的临床应用。

1989年一个研究小组^[20]以CD3单抗扩增小鼠脾细胞得到了一个细胞群, 命名为CD3激活的杀伤细胞(CD3-AK), 在体外实验中CD3-AK显示出了比LAK细胞更高的杀伤力。

1991年, 美国斯坦福大学的Schmidt-Wolf等人在以上工作的基础上^[21], 用IFN- γ 、IL-2、CD3-mAb、IL-1 α 共培养外周血单个核细胞(PBMCs), 诱导得到一种比LAK细胞具有更强肿瘤杀伤活力的细胞群, 他们将其命名为细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced Killer Cell), 即CIK细胞。在体内治疗过程中, CIK完全无需联合使用IL-2, 并且, CIK达到类似疗效所需的细胞数比之前的LAK细胞大约要少10-100倍^[16, 17, 22]。较之前在过继免疫治疗中的效应细胞, CIK由于具有更明显的优势和更好的临床应用前景而备受关注, 二十多年来国内外学者对其进行了各种广泛和深入的研究。

1.2 CIK 的生物学特性

CIK细胞是一种非MHC限制型T细胞, 比LAK细胞具有更显著的增殖效率和肿瘤毒活性。CIK细胞是一群异质性细胞, 含有少量(大约2%)的CD3⁻CD56⁺NK细胞, 绝大部分细胞(超过90%)表面含有CD3⁺表面标记, 其中约35%表达CD56, 剩下的是CD3⁺CD56⁻T细胞^[23]。CIK中的CD3⁻CD56⁺细胞表现出典型的NK细胞的活性, 可以杀伤自体急性骨髓白血病(AML)细胞^[24]。CD3⁺CD56⁺细胞可以

杀伤自体或异体的可疑肿瘤细胞^[23]，它是一群非MHC限制性的T细胞，但CIK需要通过T细胞受体(TCR)和目标细胞表面的MHC分子来识别目标细胞^[24]。这部分CD3⁺CD56⁺细胞被证明是CIK细胞群体中的主要效应细胞^[21, 25]。

CD3⁺CD56⁺细胞比CD3⁺CD56⁻细胞具有更高的细胞毒活性，研究显示，CD3⁺CD56⁺细胞CD8⁺细胞的比例比CD3⁺CD56⁻细胞更高，而且，CD3⁺CD56⁺细胞亚群表面具有CD27⁺CD28⁻或CD27⁻CD28⁻表型，是一种分化更完全的晚期效应T细胞，CD3⁺CD56⁻细胞则是处于分化早期阶段的效应T细胞^[24]。Negrin^[22]等人的实验证明，CD3⁺CD56⁺细胞主要来源于PBMC中的T细胞(CD3⁺CD56⁻)而非NK细胞(CD3⁻CD56⁺)。

CIK细胞有如下几个最显著的生物学特性：

首先，增殖速度快。大量实验证实，CIK细胞在加入IFN- γ 、IL-2、CD3单抗和IL-1 α 等因子培养后，细胞增殖速度迅速，其增殖能力远超过LAK细胞。CD3⁺CD56⁺细胞在未经培养的PBMC中大约占1%-5%，培养后CD3⁺CD56⁺细胞可扩增为原来的几十倍甚至上百倍。CIK细胞的高增殖特性有效解决了过继免疫治疗中，效应细胞在体外扩增所获细胞数目少的难题。

其次，肿瘤毒活性强。CIK细胞是以CD3⁺CD56⁺细胞为效应细胞的一个异质细胞群，比LAK细胞、TIL细胞等具有更强的肿瘤毒活性。任欢等^[26]体外实验中发现，虽然CIK细胞与LAK细胞对肿瘤细胞系的杀伤能力在细胞水平上无显著差别，但由于CIK在体外的增殖数量多，如果换算成总杀瘤单位(TLU)来计算的话，则杀伤效率远高于LAK细胞。而在体内实验中，对于重症联合免疫缺陷鼠(SCID)/人淋巴瘤模型、H-22(肝癌腹水瘤)动物模型、S180(克洛肉瘤)荷瘤鼠模型及肝癌(BEL-7402细胞系)动物模型等的研究均表明，在清除病灶，抑制转移，延长生存方面，CIK细胞均明显优于LAK细胞或CD3AK细胞。

肿瘤杀伤范围广。CIK细胞又称为NK细胞样T淋巴细胞，既具有T淋巴细胞强大杀伤活性，也具有自然杀伤细胞杀伤时的非MHC限制性。对于多种肿瘤细胞系(包括NK敏感的K562和NK不敏感的Hela，人B淋巴瘤细胞系OCI-LY8，人胃癌腹膜转移细胞株OCUM-2MD3，肝癌细胞系BEL-7402)等均表现出强大的杀伤活性。

最后，对正常骨髓造血前体细胞毒性小。Schmidt-Wolf等^[21]研究认为，CIK细胞对正常骨髓细胞毒性较小，可以保存超过75%的粒细胞-巨噬细胞集落形成单位集落。

1.3 CIK 细胞的作用机制

目前,针对CIK细胞的作用机制,还没有一个最终定论,但是有相关研究显示了CIK细胞发挥肿瘤杀伤能力的几种可能途径。

1.3.1 对肿瘤细胞的直接杀伤

Mehta等^[27]研究认为,CIK细胞通过向细胞外间隔释放胞浆颗粒,由颗粒内含物发挥对靶细胞直接杀伤作用。释放颗粒途径有两条:1.CIK识别目标结构刺激其表面配体LFA-1导致颗粒依赖性细胞溶解,该途径对细胞内cAMP水平敏感,而对免疫抑制药物CsA和FK506有抵抗作用;2.CIK表面的CD3或类似CD3受体被激活导致颗粒介导的杀伤作用,该途径对细胞内cAMP水平和免疫抑制药物CsA和FK506都很敏感。LFA-1和细胞间黏附分子(ICAM-1)在介导CIK细胞杀伤靶细胞时起着非常重要的作用,LFA-1抗体和ICAM-1抗体均可使CIK细胞对靶细胞的杀伤活性明显受阻。

1.3.2 活化后产生大量具有肿瘤抑制作用的炎症细胞因子

培养的CIK细胞可以分泌多种细胞因子,如TNF- α 、IL-2、GM-CSF、IFN- γ 等,一方面可以对肿瘤细胞产生直接的抑制作用,另一方面也可通过调节机体的免疫系统间接杀伤肿瘤细胞。

1.3.3 诱导肿瘤细胞凋亡

Verneris等^[28]通过实验发现,CIK细胞在培养过程中可以通过表达FasL来抵抗FasL⁺肿瘤细胞引发的效应细胞Fas-FasL凋亡,而且可以诱导Fas⁺肿瘤细胞的凋亡。

1.3.4 促进T细胞增殖活化

任欢等研究认为,CIK细胞的体内抑瘤作用,可能与促进体内T细胞增殖活化有关。并推测,原始的CD3⁺CD56⁺T细胞随CIK输注体内后,在宿主机体状态或肿瘤抗原刺激下可转变成具有杀瘤活性的细胞毒性T细胞,发挥抗癌作用。

1.4 CIK 细胞的研究现状

1.4.1 联合树突状细胞(DC细胞)

树突状细胞(DC)是目前发现的功能最强的专职抗原呈递细胞(APC),在激发T细胞免疫应答及提高T细胞对DC所提呈肿瘤抗原的识别发挥着重要作用。为进一步提高CIK细胞的肿瘤杀伤潜力,研究人员使用树突状细胞与CIK联合培养。共

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫