

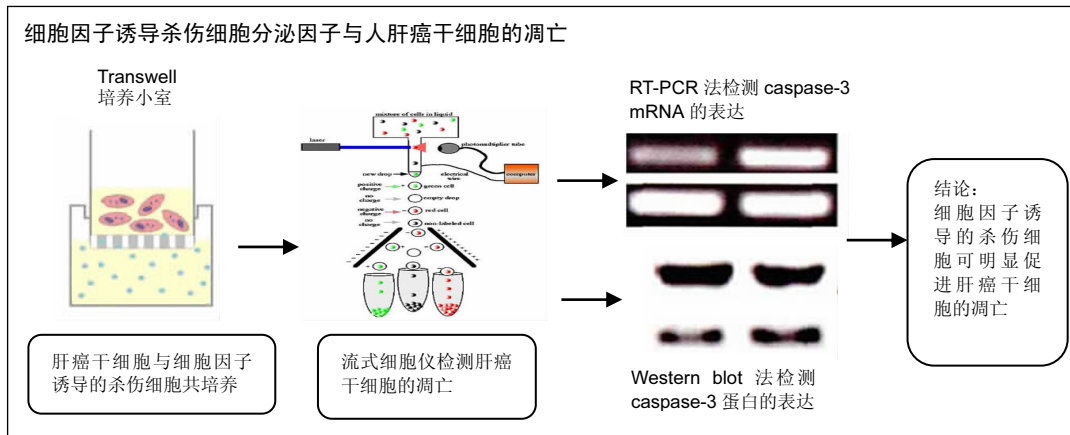
细胞因子诱导杀伤细胞分泌因子影响人肝癌干细胞的凋亡

闪海霞, 范崇柱, 霍丽亚, 张怀宏, 翟玉峰(南阳市中心医院感染性疾病科, 河南省南阳市 473000)

引用本文: 闪海霞, 范崇柱, 霍丽亚, 张怀宏, 翟玉峰. 细胞因子诱导杀伤细胞分泌因子影响人肝癌干细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(14):2033-2039.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.14.008 ORCID: 0000-0002-8672-7109(翟玉峰)

文章快速阅读:



闪海霞, 女, 1982 年生, 河南省开封市人, 2008 年南方医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事感染性疾病及肝病方面的研究。

通讯作者: 翟玉峰, 主任医师, 南阳市中心医院感染性疾病科, 河南省南阳市 473000

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)14-02033-07

稿件接受: 2016-02-16

http://www.crter.org

文题释义:

杀伤细胞: 是细胞表面具有 IgG 的 Fc 受体, 当靶器官细胞与相应的 IgG 结合, 杀伤细胞可与结合在靶细胞上的 IgG 的 Fc 结合, 从而使自身活化, 释放细胞毒素, 裂解靶细胞。

细胞凋亡: 指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一件被动的过程, 而是主动过程, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用, 它并不是病理条件下自体损伤的一种现象, 而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。

摘要

背景: 采用自体免疫细胞进行免疫治疗已发展为治疗恶性肿瘤的主要辅助手段之一, 但其作用机制尚未阐明。

目的: 探讨细胞因子诱导的杀伤细胞分泌因子对人肝癌干细胞凋亡的影响。

方法: 采用无血清悬浮细胞培养法富集获得人肝癌干细胞; 以 γ -干扰素、CD3 单克隆抗体和重组人白介素 2 诱导肝癌患者外周血单个核细胞产生细胞因子诱导的杀伤细胞。将第 1 代肝癌干细胞分为 2 组, 对照组单纯进行肝癌干细胞培养, 实验组将细胞因子诱导的杀伤细胞与肝癌干细胞共培养, 培养 48 h 后用流式细胞仪检测肝癌干细胞的凋亡情况, RT-PCR 和 Western blot 检测凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 与蛋白的表达。

结果与结论: ①对照组的肝癌干细胞凋亡率显著低于细胞因子诱导的杀伤细胞组 ($P < 0.05$)。②实验组的促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 和蛋白表达显著高于对照组 ($P < 0.05$)。③实验结果表明, 细胞因子诱导的杀伤细胞会明显促进肝癌干细胞的凋亡, 并显著上调肝癌干细胞促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达水平。

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 肝癌干细胞; 肝癌; 杀伤细胞; 细胞凋亡; caspase-3

主题词:

肝肿瘤; 肿瘤干细胞; 细胞因子诱导杀伤细胞; 细胞凋亡; 组织工程

Shan Hai-xia, Master,
Attending physician,
Department of Infectious
Diseases, Nanyang
Central Hospital, Nanyang
473000, Henan Province,
China

Corresponding author:
Zhai Yu-feng, Chief
physician, Department of
Infectious Diseases,
Nanyang Central Hospital,
Nanyang 473000, Henan
Province, China

Cytobine-induced killer cells promote apoptosis of human liver cancer stem cells

Shan Hai-xia, Fan Chong-gui, Huo Li-ya, Zhang Huai-hong, Zhai Yu-feng (Department of Infectious Diseases, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Immunotherapy with autologous immune cells has been developed as a major adjuvant therapy for malignant tumors, but its mechanism of action has not been elucidated.

OBJECTIVE: To investigate the relationship between cytokine-induced killer cell secretion and apoptosis in human liver cancer stem cells.

METHODS: Human liver cancer stem cells, HepG2 cells, were isolated and enriched using serum-free suspension method. The peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cancer were induced by γ -interferon, CD3 monoclonal antibody and recombinant human interleukin-2 to form killer cells. Passage 1 liver cancer stem cells were divided into control group (culture alone) and experimental group (co-culture of cytokines-induced killer cells and human liver cancer stem cells). At 48 hours after culture, apoptosis in human liver cancer stem cells was detected using flow cytometry, and expression of caspase-3 mRNA and protein was detected using RT-PCR and western blot, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The apoptotic rate in the control group was significantly lower than that in the experimental group ($P < 0.05$). The expressions of caspase-3 at mRNA and protein levels were both higher in the experimental group than the control group ($P < 0.05$). Experimental findings show that cytokines-induced killer cells can significantly promote apoptosis in human liver cancer stem cells, and up-regulate the caspase-3 mRNA and protein expressions dramatically.

Subject headings: Liver Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Cytokine-Induced Killer Cells; Apoptosis; Tissue Engineering

Cite this article: Shan HX, Fan CG, Huo LY, Zhang HH, Zhai YF. Cytobine-induced killer cells promote apoptosis of human liver cancer stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(14):2033-2039.

0 引言 Introduction

肿瘤是当今世界威胁人类健康的主要疾病之一,其发病率仅次于心血管疾病。尽管人类在肿瘤的治疗上已经取得重大进步,但在过去的20年,所有肿瘤的5年期存活率只提高了10%左右,恶性肿瘤的转移和复发仍无法得到有效控制^[1]。化疗和放疗等方法会导致患者机体免疫力下降^[2]。近年来,随着分子细胞生物学的发展,免疫学理论不断丰富,现代免疫学技术也在不断地推陈出新,大量的肿瘤抗原尤其是T细胞可识别的肿瘤抗原不断被发现,人们从细胞和分子水平上对肿瘤与免疫系统的关系有了更深刻的认识,为肿瘤免疫疗法在临床上的应用奠定了坚实的基础^[3-4]。

免疫治疗过程中,细胞因子诱导的杀伤细胞是一种常用的效应细胞,可以通过非特异性免疫的方式达到消灭病灶,治疗疾病的目的^[5]。

肿瘤干细胞是肿瘤组织中极少数具有自我更新能力,能自我无限增殖的细胞。这群细胞有更强的侵袭、转移能力,能耐受常规的放化疗^[6]。现有的肿瘤治疗方法主要是针对肿瘤组织内的大多数已经分化的细胞,而不是肿瘤干细胞,即使绝大多数肿瘤细胞被杀死,但只要有幸存的肿瘤干细胞,仍然会造成肿瘤的复发和转

移^[7]。为此,实验探讨细胞因子诱导的杀伤细胞分泌因子与人肝癌干细胞凋亡的关系及其对肝癌干细胞的影响,以肿瘤干细胞特有的分子标记为靶点,采用全新的免疫治疗方法去攻击肿瘤干细胞,以此来发展新的肿瘤免疫疗法,具有十分重要的临床意义。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞实验与体外观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年6至8月在南阳市中心医院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 外周血标本 采集2例肝癌患者外周血,均经临床病理学确诊,患者凝血功能正常,未合并严重心、肝、肾功能异常。

1.3.2 实验细胞、试剂和仪器 肝癌HepG2细胞由南阳市中心医院标本室提供。

实验用主要试剂: 高糖DMEM完全培养液(北京清大天一科技有限公司),表皮生长因子(天津润泰科技发展有限公司),碱性成纤维细胞生长因子(生兴生物技术(南京)有限公司提供),鼠抗人GAPDH单克隆抗体(上海拓然生物科技有限公司),B27(北京沃比森科技有限公

司), 白血病抑制因子(上海晨易生物科技有限公司), 青霉素(上海晨易生物科技有限公司), 链霉素(上海天呈医流科技股份有限公司), 羊抗人caspase-3多克隆抗体(上海根生生物科技有限公司), 胰蛋白酶(北京格源天润生物技术有限公司), 重组人白细胞介素2(杭州沃森生物技术有限公司), 碘化丙啶(上海前尘生物科技有限公司), PBS(北京诺博莱德科技有限公司), 辣根过氧化物酶(上海元龙生物技术有限公司), RPMI 1640培养液(上海常斤生物科技有限公司), 驴抗羊 IgG(上海万疆生物科技有限公司), 干扰素 γ (上海凯茂生物医药有限公司), 硝酸纤维素膜(Bio-Rad公司), 异硫氰酸荧光素(Promega公司)。

实验用主要仪器: CO₂培养箱(上海三腾仪器有限公司), Transwell 培养小室(北京恒泰丰科试验设备有限公司), 超低黏附培养板(美墨尔特(上海)贸易有限公司), 紫外高效分析仪(上海济成分析仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 肝癌干细胞培养与鉴定 将肝癌HepG2细胞接种于高糖DMEM完全培养液, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱培养, 观察细胞生长情况, 取对数生长期细胞接种在超低黏附培养板上富集培养, 同时弃去原培养液, 改用干细胞专用无血清培养液(含20 μ g/L碱性成纤维细胞生长因子、20 μ g/L表皮生长因子、2% B27、20 μ g/L白血病抑制因子及100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素), 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱培养。每隔2 d进行1次半量换液, 连续培养14 d, 用胰蛋白酶消化并进行传代培养。传代后的细胞利用上述相同方法进行富集培养7 d, 获得第1代微球体细胞。收集第3代细胞, 分别添加抗CD133、CD90抗体孵育1 h, PBS洗涤3次, 添加二抗, 避光反应后再次PBS洗涤, 上流式细胞仪检测CD90与CD133的阳性率。

1.4.2 细胞因子诱导的杀伤细胞制备 采集肝癌患者外周血, 分离获得外周血单个核细胞, 进行常规离心和洗涤后, 利用RPMI 1640培养液进行细胞重悬, 调整细胞浓度为 1×10^9 L⁻¹, 置于含 γ -干扰素的培养袋内培养1 d, 添加CD3单克隆抗体和重组人白细胞介素2继续培养, 每3 d进行1次细胞计数, 并加入新的RPMI1640培养液和重组人白细胞介素2, 连续培养10 d后收集细胞, 置于倒置光学显微镜下观察细胞形态。

1.4.3 实验分组与干预 取第1代肝癌干细胞, 以 1×10^9 L⁻¹的细胞浓度接种于6孔板中, 用干细胞专用无血清培养液进行培养。实验分为2组, 对照组单纯进行

肝癌干细胞培养; 实验组将细胞因子诱导的杀伤细胞(细胞浓度 5×10^9 L⁻¹)与肝癌干细胞共培养, 将细胞因子诱导的杀伤细胞接种在Transwell培养小室内, 然后将培养小室置于已接种肝癌干细胞的6孔培养板中。

1.4.4 细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌干细胞增殖的影响 在培养后1, 3, 5, 7 d取出培养板, 利用紫外高效分析仪检测两组细胞在450 nm波长处的吸光度值, 相同实验过程进行3次重复测定, 描绘两组细胞的增殖曲线。

1.4.5 细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌干细胞凋亡的影响 在培养48 h收集两组肝癌干细胞, 用PBS洗涤和重悬, 调整细胞浓度为 5×10^9 L⁻¹。取100 μ L细胞悬液, 添加Annexin V-FITC在室温、避光条件下反应10 min, 最后添加碘化丙啶冰浴中避光环境下放置, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4.6 RT-PCR 检测促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 表达 在培养48 h收集两组肝癌干细胞, 提取总RNA, 通过cDNA合成试剂盒将RNA反转录合成cDNA, 按反转录聚合酶链反应检测促凋亡相关基因caspase-3 mRNA表达, 以GAPDH为内参基因, 以目的基因与GAPDH mRNA比值表示目的基因表达量。基因引物序列见表1。

表1 不同基因引物序列

Table 1 Primer sequences of different genes

基因	上游引物序列	下游引物序列
GAPDH (内参基因)	5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3'	5'-CTT CTG GGT GGC AGT GAT-3'
caspase-3	5'-TGG CAT TGA GAC AGA CAG-3'	5'-AAA GTA GCG TCA AAG GAA-3'

1.4.7 Western blot检测caspase-3蛋白表达 在培养48 h收集两组肝癌干细胞, 提取细胞总蛋白, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 蛋白恒压转移到硝酸纤维素膜上, 5%牛奶封闭45 min, 添加羊抗人caspase-3多克隆抗体, 置于4 °C环境下反应过夜, 添加辣根过氧化物酶标记驴抗羊IgG二抗, 置于室温环境下孵育2 h, 采用增强化学发光法进行显色处理, 以GAPDH为内参照。

1.5 主要观察指标 ①肝癌干细胞的富集培养形态。②细胞因子诱导的杀伤细胞培养形态。③两组肝癌干细胞增殖情况。④两组肝癌干细胞凋亡率。⑤两组肝癌干细胞促凋亡相关基因caspase-3 mRNA及蛋白表达。

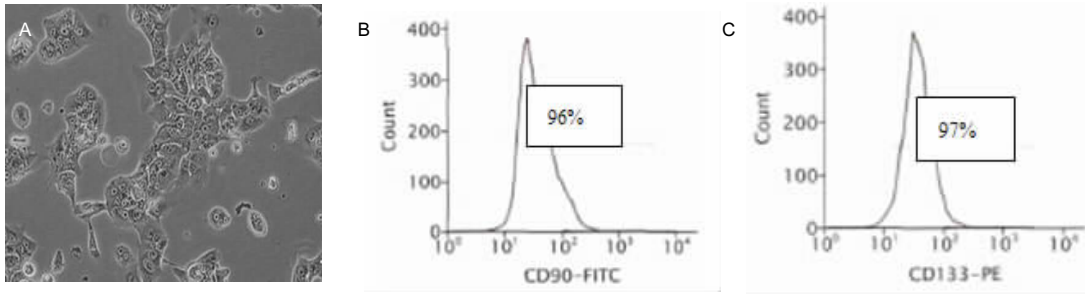


图1 肝癌干细胞培养与鉴定

Figure 1 Cultivation and identification of human liver cancer stem cells

图注: 图中A为肝癌干细胞连续培养14 d, 可观察到细胞微球体形成($\times 200$); B, C为第3代细胞CD90与CD133的阳性率均达到95%以上。

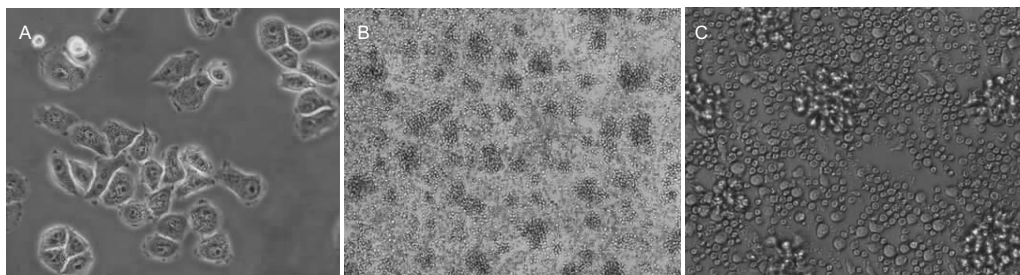


图2 细胞因子诱导的杀伤细胞培养形态

Figure 2 Cytokine-induced killer cell culture and morphology

图注: 图中A为培养1 d, 细胞开始发生增殖($\times 100$); B为培养3 d, 细胞快速增殖, 细胞体积显著增大, 且呈不规则簇状($\times 100$); C为培养7 d, 细胞增殖速度进一步加快, 细胞呈簇状密集生长($\times 400$)。

1.6 统计学分析 使用SPSS 19.0进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 肝癌干细胞的培养与鉴定 连续培养14 d, 可观察到细胞微球体形成(图1)。第3代细胞CD90与CD133的阳性率均达到95%以上。

2.2 细胞因子诱导的杀伤细胞培养形态 培养1 d, 细胞开始发生增殖(图2A); 培养3 d, 细胞快速增殖, 细胞体积显著增大, 且呈不规则簇状(图2B); 培养7 d, 细胞增殖速度进一步加快, 细胞呈簇状密集生长(图2C)。

2.3 细胞因子诱导杀伤细胞对肝癌干细胞增殖的影响 培养1, 3, 5, 7 d, 对照组细胞培养不同时间的吸光度值均显著高于实验组($P < 0.05$), 表明细胞因子诱导的杀伤细胞会对肝癌干细胞的增殖产生明显的抑制作用, 见表2, 图3。

2.4 细胞因子诱导杀伤细胞的分泌因子对肝癌干细胞凋亡的影响 对照组的肝癌干细胞凋亡率为(0.065 \pm 0.007)%, 显著低于实验组(12.145 \pm 1.025)%, 差异有

显著性意义($P < 0.05$)。

表2 两组肝癌干细胞培养不同时间吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Absorbance values of human liver cancer stem cells in the two groups at different time of culture

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	0.64 \pm 0.05	1.44 \pm 0.08	1.62 \pm 0.15	2.49 \pm 0.23
实验组	0.41 \pm 0.01	0.53 \pm 0.02	0.87 \pm 0.03	1.12 \pm 0.04
P	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

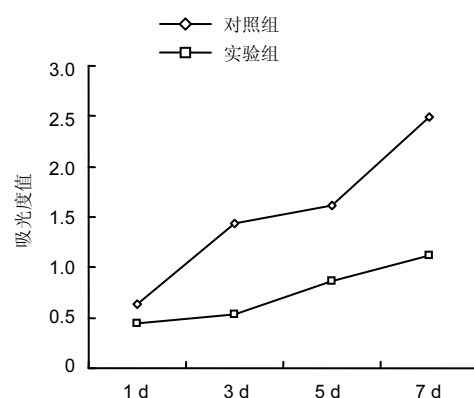


图3 两组肝癌干细胞培养不同时间吸光度值

Figure 3 Absorbance values of human liver cancer stem cells in the two groups at different time of culture

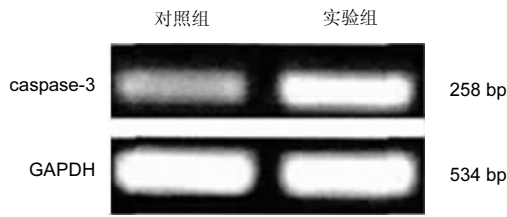


图4 RT-PCR 检测肝癌干细胞促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 表达
Figure 4 Expression of caspase-3 mRNA in human liver cancer stem cells detected by RT-PCR

2.5 细胞因子诱导杀伤细胞的分泌因子对肝癌干细胞促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 表达的影响 经 RT-PCR 检测, 实验组的促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见图4。

2.6 细胞因子诱导杀伤细胞的分泌因子对肝癌干细胞 caspase-3 蛋白表达的影响 经蛋白质印迹法检测, 实验组的促凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见图5。

3 讨论 Discussion

现如今, 各种恶性肿瘤的发病率呈现出不断提高的趋势, 严重危害到人体健康^[8]。传统的恶性肿瘤治疗方法包括手术、放疗、化疗, 这些常规治疗可以杀死肿瘤细胞, 但却无法消灭肿瘤组织中存在数量很少的肿瘤干细胞, 导致肿瘤复发转移^[9-11]。因此, 临床需要能够建立起全新的靶向攻击肿瘤干细胞的免疫疗法, 开辟出抗癌新路。

细胞免疫治疗技术具有杀伤肿瘤细胞、肿瘤干细胞, 提高机体免疫的作用, 与手术、放化疗配合, 可有效提高治疗效果^[12]。大量研究表明, 恶性肿瘤的发生与人体免疫系统有一定的关系, 即免疫系统无法发挥正常清除变异细胞、癌细胞时, 导致形成恶性肿瘤^[13-15]。生物免疫治疗是通过激活人体主动免疫、提高自身免疫力, 将肿瘤控制住, 从而实现人与肿瘤和平共处, 即肿瘤病灶虽然还在体内, 但已经不能对人体造成生命威胁^[16-18]。自然杀伤细胞是人体免疫系统的第一道防线, 与机体的抗肿瘤和免疫调节功能密切相关, 能广泛识别、迅速溶解、杀伤、摧毁癌细胞, 对肿瘤干细胞具有显著杀伤作用^[19-23]。

自然杀伤细胞贴壁生长的特性与癌细胞相似, 因此对分化好的癌细胞也具有明显的杀伤功能。Rosenberg 等^[24]学者通过研究发现, 利用一些细胞生长因子对动物脾脏淋巴细胞进行特定的诱导和刺激之后, 细胞的抗癌

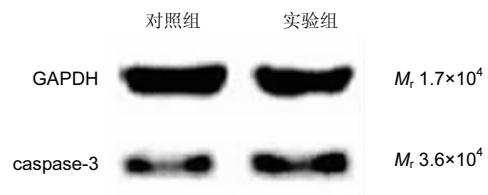


图5 蛋白质印迹法检测肝癌干细胞 caspase-3 蛋白表达
Figure 5 Expression of caspase-3 protein in human liver cancer stem cells detected by western blot

活性可以得到显著提高。自然杀伤细胞或 T 细胞体外培养时, 在高剂量白细胞介素 2 等细胞因子诱导下成为能够杀伤自然杀伤细胞不敏感肿瘤细胞的杀伤细胞, 称为淋巴因子激活的杀伤细胞, 这一细胞类型开始被广泛应用于各种晚期实体肿瘤治疗。Grimm 等^[25]学者通过研究指出, 利用淋巴因子激活的杀伤细胞治疗原发性肝癌患者可以获得明显的临床效果。Gutgemann 等^[26]利用一些细胞因子对人体外周血单个核细胞进行诱导, 获得细胞因子诱导的杀伤细胞。还有一些学者对原发性肝癌患者分别实施肝动脉灌注化疗栓塞治疗联合淋巴因子激活的杀伤细胞治疗以及单纯肝动脉灌注化疗栓塞治疗, 比较两组患者术后 1, 2, 3 年的复发情况以及术后 2, 3 年生存率, 结果显示联合治疗的效果显著优于单纯肝动脉灌注化疗栓塞治疗, 可见淋巴因子激活的杀伤细胞可以显著提高治疗效果^[27]。国内学者鲍锋等^[28]和杨涛等^[29]也通过较大样本的临床研究发现, 利用细胞因子诱导的杀伤细胞治疗晚期原发性肝癌等实体肿瘤, 可以有效提高患者机体免疫功能, 并显著改善其生存质量, 延长患者的生存时间, 且具有安全性高的特点。施明等^[30]还指出自体细胞因子诱导杀伤细胞回输治疗肝癌患者, 患者的临床症状得到显著改善, 细胞免疫功能明显提高, 且不良反应轻微。研究结果显示, 细胞因子诱导的杀伤细胞分泌因子可以抑制肝癌干细胞的增殖能力, 提高肝癌干细胞的细胞凋亡率^[31]。

caspase 家族在介导细胞凋亡过程中发挥出十分重要的作用^[32], 其中 caspase-3 可以积极参与到凋亡信号传导等诸多途径中, 是十分关键的执行分子之一^[33-35]。在正常情况下, caspase-3 基因可以以酶原的形式在细胞胞浆中稳定存在。在凋亡的早期阶段, caspase-3 基因会被激活并产生活化^[36-38], 分解为 2 个小亚基以及 1 个大亚基, 并裂解相应的胞浆核底物^[39]。通过对 caspase-3 基因及蛋白表达水平的检测, 可以较为直观了解到细胞的凋亡情况^[40]。实验结果显示, 细胞因子诱

导的杀伤细胞组促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.05$)。

上述结果表明, 细胞因子诱导的杀伤细胞会对肝癌干细胞的增殖产生明显的抑制作用, 并显著上调肝癌干细胞促凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 及蛋白的表达水平, 对肝癌干细胞的凋亡产生明显的促进作用。

作者贡献: 实验设计为闪海霞、范崇桂, 实验实施为闪海霞、霍丽亚, 实验评估为闪海霞、张怀宏, 资料收集为闪海霞、翟玉峰。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

[1] 秦建民, 黄涛, 盛霞, 等. 索拉菲尼联合树突状细胞与细胞因子诱导杀伤细胞抗肝细胞癌生长作用的实验研究[C]. 2014年肝胆胰外科张家港学术论坛暨第26届全国肝胆胰外科学术经验交流会论文集, 2014:65-71.

[2] 韩照予, 周宜强, 孙君, 等. 介入治疗联合DC+CIK细胞疗法治疗肝癌初步观察[C]. 2009年国际中医药肿瘤大会论文集, 2009:452-454.

[3] 王广伟, 顾元龙, 刘敏丰, 等. 树突状细胞(DC)联合CIK对原发性肝癌术后患者细胞因子的影响[J]. 中国保健营养: 中旬刊, 2012, 9:23-24.

[4] 杨茂, 郭志, 司同国, 等. 动脉化疗栓塞联合CIK细胞过继免疫治疗对中晚期肝癌患者免疫功能的影响[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20(2):116-119.

[5] Zhu R, Mancini-Bourguine M, Zhang XM, et al. Plasmid vector-linked maturation of natural killer (NK) cells is coupled to antigen-dependent NK cell activation during DNA-based immunization in mice. J Virol. 2011;85(19):10201-10212.

[6] Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. J Exp Med. 2001;193(6):661-670.

[7] 陈健, 桂永忠, 敬新蓉, 等. 肝动脉化疗栓塞联合高强度聚焦超声、CIK细胞治疗原发性肝癌的疗效分析[J]. 临床超声医学杂志, 2009, 11(10):656-660.

[8] 杨晓亚, 高裕华, 刘素蕊, 等. 肝癌特异性靶标致敏DC诱导CIK细胞对肝癌HuH-7细胞及移植瘤的抑制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(5):505-509.

[9] 秦建民, 黄涛, 盛霞, 等. 索拉菲尼联合树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌生长与侵袭转移的作用[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(5):364-368.

[10] 陈晚华, 刘辉, 王延春, 等. 表达人IL-21的细胞因子诱导的杀伤细胞对裸鼠肝癌的治疗研究[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(10):1045-1050.

[11] Muench MO, Humeau L, Paek B, et al. Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors. Exp Hematol. 2000;28(8):961-973.

[12] 张嵩, 张尚权, 白春学, 等. 树突状细胞与同源细胞因子诱导的杀伤细胞共培养细胞在肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(5):315-319.

[13] Huang J, Li C, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133(high) cancer stem cells in vitro and in vivo. Clin Immunol. 2013;149(1):156-168.

[14] 蒋淑莲, 文剑, 杜建霞, 等. 华蟾素增强细胞因子诱导的杀伤细胞对肝癌细胞的杀伤活性[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(3):164-166.

[15] Yuanying Y, Lizhi N, Feng M, et al. Therapeutic outcomes of combining cryotherapy, chemotherapy and DC-CIK immunotherapy in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer. Cryobiology. 2013;67(2):235-240.

[16] 隋承光, 李卿, 蒋涛, 等. CIK细胞联合表柔比星对肝癌的体内外杀伤作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(21):3220-3222, 3226.

[17] 喻晓, 孙振纲. DC 和 CIK 免疫细胞及其在原发性肝癌治疗中的应用进展[J]. 长江大学学报, 2015, 12(2):82-84.

[18] 张丹, 何翦太. DC-CIK细胞协同索拉菲尼对肝癌细胞的杀伤作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(6):664-667.

[19] 李卿, 王新利, 隋天博, 等. 索拉菲尼联合细胞因子活化的杀伤细胞对肝癌的杀伤效应研究[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(19):2885-2888.

[20] 史跃, 罗中华, 孙立军, 等. 肝动脉灌注细胞因子诱导杀伤细胞联合超液化碘油栓塞介入治疗原发性肝癌[J]. 实用放射学杂志, 2008, 24(2):231-233, 282.

- [21] 秦建民,黄涛,盛霞,等.索拉菲尼联合树突状细胞与细胞因子诱导杀伤细胞抗肝细胞癌生长作用的实验研究[J].肝胆外科杂志,2014,22(2):148-151.
- [22] 严舒,范德庆.微波消融和自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肝癌的现状与展望[J].检验医学与临床,2014,11(2):251-253.
- [23] 王悦华,刘岩青.源于肝癌患者细胞因子诱导杀伤细胞的生物学特性及抗癌活性[J].中国现代医学杂志,2011,21(1):19-22.
- [24] Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 1985;313(23):1485-1492.
- [25] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 1982;155(6):1823-1841.
- [26] Gütgemann S, Frank S, Strehl J, et al. Cytokine-induced killer cells are type II natural killer T cells. *Ger Med Sci.* 2007;5:Doc07.
- [27] 赵明,吴沛宏,曾益新,等.经肝动脉栓塞化疗序贯联合射频消融和细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肝细胞癌的随机研究[J].中华医学杂志,2006,86(26):1823-1828.
- [28] 鲍锋,盛春华,杨光. DC-CIK 细胞治疗中晚期恶性肿瘤 531 例分析[J].中国免疫学杂志,2011,27(4):360-362.
- [29] 杨涛,邵江河,项颖,等. DC-CIK 细胞联合治疗 110 例晚期恶性实体瘤临床观察[J].肿瘤,2010,30(8):700-705.
- [30] 施明,张冰,汤紫荣,等.肝癌患者自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗后免疫活性细胞的检测及其临床意义[J].中华医学杂志,2003,83(23):2049-2053.
- [31] Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, et al. Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica.* 2010;95(12):2144-2152.
- [32] Motamedi M, Arab S, Moazzeni SM, et al. Improvement of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with components of *Toxoplasma gondii*. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(10):1393-1398.
- [33] Lin CC, Yu YL, Shih CC, et al. A novel adjuvant Ling Zhi-8 enhances the efficacy of DNA cancer vaccine by activating dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(7):1019-1027.
- [34] 周启明,吴沛宏,赵明,等.原发性肝癌经综合微创治疗后联合细胞因子诱导杀伤细胞灌注的近期疗效观察[J].癌症,2006,25(11):1414-1418.
- [35] 李卿,王新利,王杨,等.DC-CIK共培养细胞联合索拉菲尼对肝癌细胞体内外的杀伤效应[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2010,17(1):46-50.
- [36] Xie L, Pang R, Jin Y, et al. Effects of hepatic artery chemotherapeutic embolization combined with perfusing LAK cells into hepatic artery after radical operation of liver cancer. *Zhonghua Gan Zang Bing Zhi.* 2000;8(3):142-143.
- [37] Li H, Yu JP, Cao S, et al. CD4 +CD25 + regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients. *J Clin Immunol.* 2007;27(3):317-326.
- [38] Ren J, Di L, Song G, et al. Selections of appropriate regimen of high-dose chemotherapy combined with adoptive cellular therapy with dendritic and cytokine-induced killer cells improved progression-free and overall survival in patients with metastatic breast cancer: reargument of such contentious therapeutic preferences. *Clin Transl Oncol.* 2013;15(10):780-788.
- [39] 王颖,吴德平,明平静,等.DC与CIK共培养细胞体外抗肝癌细胞活性研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2014,34(1):42-46.
- [40] 施明,姚莉,王福生,等.人源细胞因子诱导的杀伤细胞联合化疗药物对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用[J].中华肿瘤杂志,2004,26(8):465-468.