

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000673

肝癌干细胞的培养、鉴定及 CIK 对其生长、增殖的影响

杨 涛¹, 王宏宇², 石 洋¹, 李启英¹, 黄德鸿¹, 肖春燕¹, 龚 奕¹, 王 刚², 项 颖¹

(1. 重庆市肿瘤医院血液肿瘤/生物治疗科, 重庆 400030; 2. 上海柯莱逊生物技术有限公司, 上海 201201)

【摘要】目的:探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer, CIK)对肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)生长、增殖的影响。**方法:**用含多种细胞因子(LIF、EGF、bFGF 及 B27)的无血清培养液(serum-free medium, SFM)诱导 SMMC7721 人肝癌细胞产生 LCSCs, 并行 LCSCs 表面标志 CD133、CD90 的流式仪(flow cytometry, FCM)检测鉴定与裸鼠致瘤能力观测。以 IFN- γ 、CD3 单克隆抗体(human CD3 monoclonal antibody, hCD3mAb)与 IL-2 等诱导肝癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的悬浮细胞生成 CIK。用 Transwell 培养小室将 LCSCs 与不同密度的 CIK 在同一培养体系内以该小室膜分隔培养 24、48、72 h, 采用 CCK-8 试剂盒检测 CIK 对 LCSCs 生长、增殖的影响。以 RT-PCR 与 Western blot 分别检测与 CIK 共培养的 LCSCs 的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)基因及其编码蛋白的表达变化。**结果:**FCM 检测显示, LCSCs 高表达干细胞表面标志分子 CD133、CD90。CCK-8 法检测表明, 与对照比较, 与相同密度的 CIK 共培养的 LCSCs, 其生长、增殖减慢, 48 h 开始变得更加明显($P < 0.01$)。RT-PCR、Western blot 检测显示, CIK 能明显下调 LCSCs 的 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。**结论:**成功诱导培养并鉴定到 LCSCs。肝癌患者的 CIK 可明显抑制 LCSCs 的生长、增殖与下调其 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。

【关键词】细胞因子诱导的杀伤细胞; 肝癌干细胞; 生长; 增殖

【中图分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-12-07

Effect of cytokine induced killer on the growth and proliferation of liver cancer stem cells

Yang Tao¹, Wang Hongyu², Shi Yang¹, Li Qiying¹, Huang Dehong¹,
Xiao Chunyan¹, Gong Yi¹, Wang Gang², Xiang Ying¹(1. Department of Bio-therapy & Hemato-oncology, Chongqing Cancer Institute;
2. Shanghai Claison Biotechnologic Limited Company)

【Abstract】Objective: To explore the effect of cytokine induced killer(CIK) on the growth and proliferation of liver cancer stem cells (LCSCs). **Methods:** LCSCs were prepared from liver cancer cell line SMMC7721 induced by serum-free medium(SFM) containing several cytokines(LIF, EGF, bFGF and B27), and their CD90 and CD133 were identified by flow cytometry(FCM). Meanwhile, CIK cells were produced from suspended peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) of patients with hepatocellular carcinoma(HCC) induced by IFN- γ , human CD3 monoclonal antibody(hCD3mAb) and IL-2. LCSCs and CIK were cultured in a same circumstance with a Transwell culturing cabin, but the LCSCs were cultured at one side of the membrane of the Transwell, and the CIK cells were cultured at another side of the same membrane for 24 h and 48 h respectively. The effects of CIK cells on the growth and proliferation of LCSCs were detected by cell count kit-8(CCK-8). The expression of gene and encoding protein of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) were assayed via RT-PCR and Western blot respectively. **Results:** The high expressions of CD90 and CD133 in LCSCs were tested by FCM. The results of CCK-8 indicated that the growth and proliferation of LCSCs co-cultured with the CIK cells were slower than those of control cells, which become more visible at 48 h after co-culturing($P < 0.01$). The results of RT-PCR and Western blot

revealed that CIK cells can significantly down-regulate the expression of gene and encode protein of PCNA in LCSCs. **Conclusion:** LCSCs are induced, cultured and identified successfully. The CIK cells induced from patients with HCC can significantly prevent LCSCs from growth and proliferation and down-regulate the gene and encode protein of PCNA in them.

【Key words】cytokine induced killer; liver cancer stem cells; growth; proliferation

作者介绍: 杨 涛, Email: ppyangtao@163.com,

研究方向: 肿瘤的生物治疗。

通信作者: 项 颖, Email: 1324339678@qq.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研计划重点项目(编号: 2012-1-127);

重庆市应用开发计划项目(编号: cstc2014yykfA110031);

中国医师协会研究项目。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150617.2246.013.html>

(2015-06-17)

癌症干细胞(cancer stem cells,CSCs)是恶性肿瘤中具有无限增殖、自我更新、多向分化能力,且数量极少的肿瘤细胞^[1]。CSCs 理论^[2]使人们重新认识肿瘤细胞的生物特性及肿瘤的发生机制。肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国常见的高度恶性肿瘤之一,其死亡率在所有恶性肿瘤中位居第 3。肝癌组织内含有不同细胞亚型的癌细胞,具有不同的增殖能力与不同细胞表型,且只有小部分具致瘤性,提示 HCC 可能来源于 CSCs^[3]。

肿瘤的生物治疗因其低毒、高效、目标明确,近年来成为手术、放、化疗后又一重要的肿瘤治疗手段。其中,恶性肿瘤的自体细胞免疫治疗已发展为其治疗的主要辅助手段之一,显示了一定的应用前景,但其疗效各异、机制不清。自体细胞免疫治疗所采用的效应细胞也各不相同,临床上常首选细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer,CIK)为其抗癌用效应细胞。

CIK 是以 CD3⁺、CD56⁺T 细胞为主要效应的一异质细胞群,同时具有 T 淋巴细胞强大的抑瘤活性与 NK 细胞非 MHC 限制性抗癌特性^[4-6],能以非特异性免疫作用方式根除患者体内微小的残余瘤灶。110 例晚期实体瘤患者经自体的 CIK 处理,获得了一定的疗效^[7]。

本实验首先诱导培养人肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)并予以流式检测与裸鼠致瘤能力鉴定。然后诱导培养肝癌患者 CIK,将其作用于 LCSCs,观测其对 LCSCs 生长、增殖的影响,并检测其对 LCSCs 的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)基因及其编码蛋白的表达变化,为深入探讨肿瘤,尤其 HCC 的自体免疫细胞治疗机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

rhIL-2、IFN- γ (美国 Peprotech 公司);人 CD3 单克隆抗体(human CD3 monoclonal antibody,hCD3mAb)、CD90 荧光抗体(ebioscience,美国);无血清培养基(serum-free medium,SFM)(美国 Lonza 公司);CD133 荧光抗体(德国 miltenyibiotec 公司);B27(美国 Gibco 公司);PCNA 抗体、EGF、bFGF、白血病抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor,LIF)(德国 millipore 公司);超低黏附培养板、Transwell 培养小室(美国 corning 公司);引物合成(上海捷瑞);Cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒(日本 Toyobo 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 LCSCs 的诱导培养及其表形鉴定 参照文献[8]进行 LCSCs 的富集,具体为常规培养人肝癌细胞 SMMC7721,取对数生长期的 SMMC7721 于内装干细胞诱导培养基(具体见后)的超低黏附培养板中行 LCSCs 的干细胞球悬浮诱导培养,每隔 2 d 行半量换液,14 d 后,用胰酶消化传代,传代后按相同条件再行诱导培养 7 d 获第 1 代细胞。干细胞诱导培养基含无血清培养基 SFM、LIF(20 ng/ml)、EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、2% B27、链霉素(100 U/ml)、青霉素(100 U/ml)。逐日观察 LCSCs 的成球情况

用胰酶消化经上述诱导培养 14 d 或第 1 代干细胞球成细胞悬液,洗涤并计数细胞,确保样本不得少于 1×10^5 个细胞。分别于细胞中添加 CD133 与 CD90 抗体,避光,37 °C 孵育 1.5 h,未加抗体细胞作对照。PBS 再重悬各细胞,FCM 分别检测经 CD133 与 CD90 抗体标记细胞的百分率,具体按抗体说明书进行。

1.2.2 LCSCs 的裸鼠致瘤能力观察 将第 1 代干细胞悬液按 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 个细胞/只的密度接种于裸鼠背侧皮下,以相同密度的未诱导培养的 SMMC7721 细胞接种裸鼠背侧皮下作对照,逐日观察其成瘤情况,观察时间为 3 周。

1.2.3 CIK 的诱导培养 参照本课题组以前建立的方法^[7]及相关文献^[9]分离、培养 CIK。

1.2.4 CIK 的质量控制 倒置显微镜镜检 CIK 的生长、增殖及有否污染等情况,CIK 收集前行真菌、细菌等培养及内毒素检测,确保 CIK 的真菌、细菌及内毒素等外源性因子均阴性。CIK 存活率>97%,冻存后复苏的 CIK 存活率>75%。

1.2.5 CIK 对 LCSCs 生长、增殖的影响 以 1×10^6 个细胞/ml 接种第 1 代 LCSCs 于 6 孔板,常规培养 24 h 后,用相同密度的 CIK 种植于与 6 孔板孔配套的 Transwell 培养小室,将该小室放入 6 孔板与 LCSCs 共培养;以单独培养的 LCSCs 作正常对照,相同密度共培养的未诱导 SMMC7721 细胞为阳性对照,单纯培养基为空白对照。分别于共培养 24、48、72 h 后取出 6 孔板,用胰酶消化各组细胞,并分别种植于 96 孔板(3 000 个细胞/150 μ l/孔),每孔加入 CCK-8(约 10 μ l/孔),相同条件下再培养 4 h 后取出,振荡 20 s,混匀,酶标仪检测波长在 450 nm 处吸光度(absorbance,A)值,以培养时间为 X 轴,A 值为 Y 轴绘制各组细胞增殖曲线。实验重复 3 次。

1.2.6 CIK 对 LCSCs 的 PCNA 基因表达的影响 分别根据人增殖细胞核抗原 PCNA 基因的 CDS 序列设计其检测引物,上游引物:5'-AGAAGGTGTTGGAGGCA-3',下游引物:5'-CCAAGGTATCCGCGTTA-3'。以与 CIK 共培养的 LCSCs 总 RNA 为模板,在 mRNA 水平检测 PCNA 基因的表达变化,未处理的 LCSCs 总 RNA 为模板检测的 PCNA 基因为正常对照,相同密度共培养的未诱导细胞的相同检测为阳性对照,同时检测的 β -actin 基因的表达作为内参。反转录反应条件为 30 °C 10 min 与 42 °C 30 min;99 °C 5 min;5 °C 5 min,1 个循环。PCR 反应条件为 95 °C 5 min,94 °C 45 s,59 °C 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,72 °C 延伸 5 min。电泳检测各 PCR

产物扩增情况。采用 Image-Pro Plus 专业图像分析软件 (Media Cybernetics Inc, USA) 进行灰度级 (gray level, GL) 定量分析, 以 PCNA/ β -actin 的灰度级比值代表 PCNA 基因的相对表达水平。

1.2.7 CIK 对 LCSCs 的 PCNA 基因编码蛋白表达的影响 以 Western blot 法, 将 1.2.6 的各细胞总蛋白转移至 PVDF 膜, 分别浸泡于含 PCNA 鼠单抗 (1:800) 封闭液, 4 °C 过夜孵育后与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1:700) 共同作用 1 h, 与化学发光底物结合 10 min, 以分子质量为 43 kD 的 β -actin 作内参。采用 Image-Pro Plus 软件进行 A 值定量分析, 以 PCNA/ β -actin 的 OD 值比值代表 PCNA 蛋白的相对表达水平。

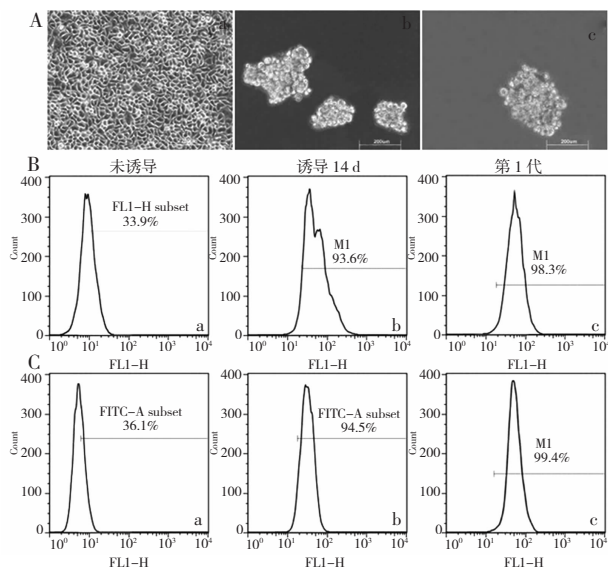
1.3 统计学处理

用 SPSS 11.0 统计软件对各数据进行方差分析以确定组间差异, 结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 LCSCs 的诱导培养与表型鉴定

FCM 检测表明, 未经诱导的 SMMC7721 细胞 (图 1Aa), 其 CD90 与 CD133 的阳性率分别为 33.9% (图 1Ba) 与 36.1% (图 1Ca); 经诱导培养 14 d 的 LCSCs 球 (图 1Ab), 其 CD90 与 CD133 阳性率分别为 93.6% (图 1Bb) 与 94.5% (图 1Cb); 第 1 代 LCSCs 球 (图 1Ac), 其 CD90 与 CD133 阳性率分别为 98.3% (图 1Bc) 与 99.4% (图 1Cc)。



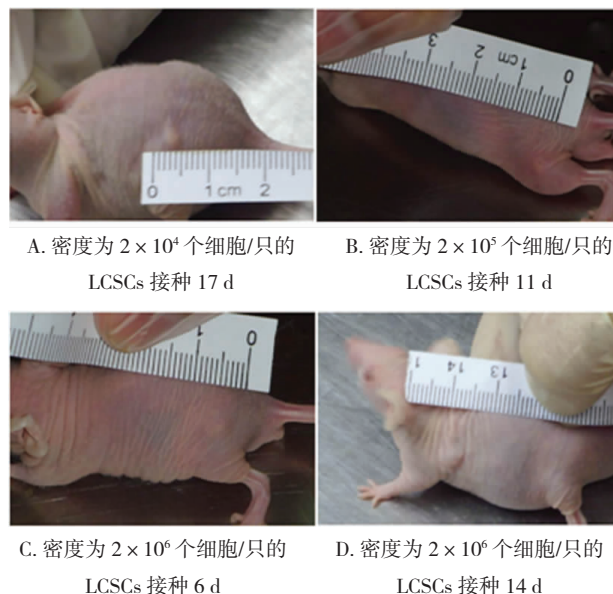
A. LCSCs 的悬浮球形成培养验证: 未诱导培养的 SMMC7721 细胞 (a); 经诱导培养 14 d (b) 与第 1 代 (c) 的 LCSCs 球, 标尺=200 μ m; B. LCSCs 球的 CD90 阳性率的 FCM 检测; C. LCSCs 球的 CD133 阳性率的 FCM 检测

图 1 LCSCs 的悬浮球形成培养及其表型鉴定

Fig.1 The suspended sphere-forming culture of LCSCs and their characteristics identification

2.2 LCSCs 的裸鼠致瘤能力观测

将第一代 LCSCs 与 SMMC7721 细胞分别以不同密度接种于裸鼠皮下后逐日观察发现, 接种密度为 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 个细胞/只的 LCSCs, 其成瘤时间分别为 17 d (图 2A)、11 d (图 2B)、6 d (图 2C); 而接种密度为 2×10^6 个细胞/只的 SMMC7721 细胞, 其成瘤时间为 14 d (图 2D), 接种密度为 2×10^4 、 2×10^5 个细胞/只的 SMMC7721 细胞, 在 3 周的观察时间内未见成瘤出现。由此提示, 本实验所采用的悬浮培养法可较好的培养到肝癌干细胞或肝癌干细胞样细胞。



A. 密度为 2×10^4 个细胞/只的 LCSCs 接种 17 d B. 密度为 2×10^5 个细胞/只的 LCSCs 接种 11 d

C. 密度为 2×10^6 个细胞/只的 LCSCs 接种 6 d D. 密度为 2×10^6 个细胞/只的 LCSCs 接种 14 d

图 2 LCSCs 的裸鼠致瘤能力观察

Fig.2 The tumorigenic ability observation of hcCSCs in nude mice

2.3 CIK 的形态观察

CIK 培养 4 d 后迅速增殖, 胞体变大, 呈簇状, 不规则生长。培养 5~7 d, 其增殖速度明显加快, 培养至第 9 天细胞密集, 仍呈簇状, 不规则生长 (图 3)。

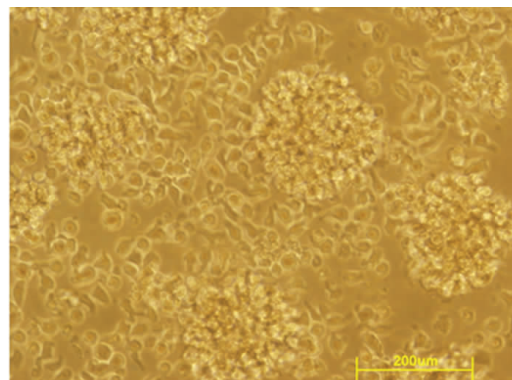
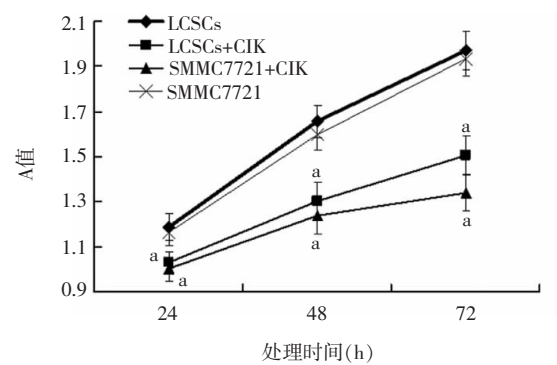


图 3 培养 9 d, CIK 呈簇状不规则生长 (标尺=200 μ m)

Fig.3 Cytokine induced killer (CIK) cells showed irregular cluster growth after being cultured for 9 d (scale bar=200 μ m)

2.4 CIK 对 LCSCs 生长、增殖的影响

与相同密度的 CIK 共培养的 LCSCs 组和 SMMC7721 细胞组在 24、48、72 h 后其 450 nm 处的 A 值较对照组明显减少($P<0.01$),未处理的 LCSCs 组及未诱导的 SMMC7721 细胞组间无明显差异(图 4,表 1),这表明 CIK 能有效抑制 LCSCs 的生长、增殖。



a: 与单独培养的 LCSCs 组及 SMMC7721 组比较, $P<0.01$

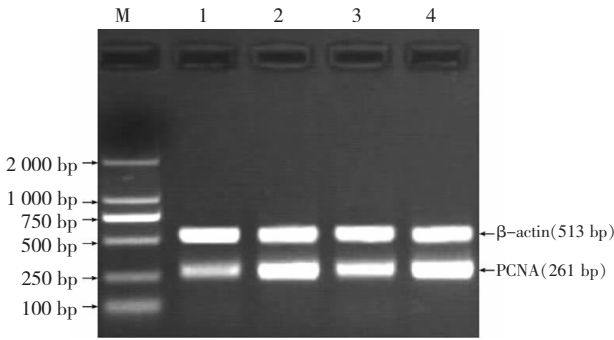
图 4 CCK-8 法检测 CIK 对 LCSCs 生长、增殖的影响

Fig.4 The effects of CIK on the growth and proliferation and growth of LCSCs detected via CCK-8

2.5 CIK 对 LCSCs 的 PCNA 基因表达的影响

与相同密度的 CIK 共培养 48 h 的 LCSCs 组和 SMMC7721 细胞组其 PCNA mRNA 的表达水平分别为 0.947 ± 0.026 、 0.839 ± 0.027 ,与未处理的 LCSCs 组(1.020 ± 0.029)及未诱导

的 SMMC7721 细胞组(1.010 ± 0.029)比较,PCNA mRNA 的表达明显降低(图 5、表 2)。由此提示,CIK 能有效抑制 LCSCs 的生长、增殖,并能下调其 PCNA 基因的表达。



M.DNA 标准 (DL 2000);1. 与相同密度的 CIK 共培养 48 h 的 SMMC7721 细胞;2. 未诱导的 SMMC7721 细胞;3. 与相同密度的 CIK 共培养 48 h 的 LCSCs;4. 未处理的 LCSCs

图 5 RT-PCR 检测 CIK 对 LCSCs 核抗原 PCNA 基因表达的影响

Fig.5 The effects of CIK on the expression of PCNA gene of LCSCs detected by RT-PCR

2.6 CIK 对 LCSCs 的 PCNA 基因编码蛋白表达的影响

与相同密度的 CIK 共培养 48 h 的 LCSCs 组和 SMMC7721 细胞组其 PCNA 蛋白的表达水平分别为 0.186 ± 0.07 、 0.150 ± 0.005 ,与未处理的 LCSCs 组(0.663 ± 0.021)及未诱导的 SMMC7721 细胞组(0.502 ± 0.018)比较,PCNA 蛋白的表达明显降低(图 6、表 2)。由此提示,CIK 能有效抑制 LCSCs 的生长、增殖,并能下调其 PCNA 蛋白的表达。

表 1 各组细胞的 $A_{450\text{nm}}$ 值检测($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.1 $A_{450\text{nm}}$ value in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	24 h	48 h	72 h
共培养的 SMMC7721 细胞组	0.999 ± 0.052^a	1.237 ± 0.082^a	1.339 ± 0.081^a
未诱导的 SMMC7721 细胞组	1.162 ± 0.057	1.598 ± 0.069	1.933 ± 0.079
共培养的 LCSCs 组	1.027 ± 0.049^a	1.300 ± 0.082^a	1.505 ± 0.087^a
未处理的 LCSCs 组	1.185 ± 0.060	1.655 ± 0.071	1.970 ± 0.085
F 值	96.857	153.481	312.147
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与单独培养的 LCSCs 组及 SMMC7721 组比较, $P<0.01$

表 2 各组 PCNA 基因及其编码蛋白的相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Relative expression of PCNA mRNA and PCNA protein in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 (48 h)	GL 级 (mRNA 水平)	P_a 值	P_b 值	A 值 (蛋白水平)	P_a 值	P_b 值
共培养的 SMMC7721 细胞组	0.839 ± 0.027	0.000	0.000	0.150 ± 0.005	0.000	0.000
未诱导的 SMMC7721 细胞组	1.010 ± 0.029	0.086	0.086	0.502 ± 0.018	0.143	0.143
共培养的 LCSCs 组	0.947 ± 0.026	0.000	0.000	0.186 ± 0.070	0.000	0.000
未处理的 LCSCs 组	1.020 ± 0.029	0.086	0.086	0.663 ± 0.021	0.143	0.143
F 值	823.516			1 674.082		
P 值	0.000			0.000		

注: P_a 值,与未处理的 LCSCs 组比较; P_b 值,与未诱导的 SMMC7721 细胞组比较

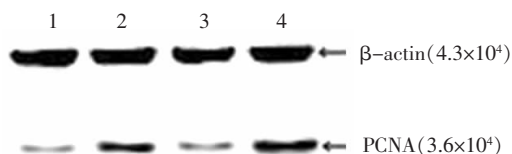


图6 Western blot 检测 CIK 对 LCSCs 核蛋白 PCNA 表达的影响

Fig.6 The effects of CIK on the expression of PCNA protein of LCSCs detected by Western blot

3 讨论

CSCs是肿瘤生长、增殖、侵袭与维持的基础,与肿瘤的复发、转移和对治疗的抵抗密切相关^[1,10-13],把 CSCs 作为研究抗肿瘤的真正靶标具有重要意义。为此,研究者需要从肿瘤细胞系诱导培养或从肿瘤组织分离培养出 CSCs,并予以鉴定,以便进一步研究这些 CSCs 的特征,为 CSCs 的靶向根治奠定基础,为肿瘤治疗提供新的思路。

CSCs 研究的基础与前提是能够分离或诱导培养相应的肿瘤类型的干细胞或干细胞样细胞。就肝癌干细胞的分离或诱导培养,目前主要运用细胞表面标记分子,如 CD90^[14]、CD44^[15]、CD133^[16]和 EpCAM^[17]等,采用流式细胞技术进行 LCSCs 的鉴定或分选。本实验选用 CD90、CD133 作为从肝癌细胞系SMMC7721诱导培养与鉴定 LCSCs 的表面标记分子。在无血清培养条件下,CSCs 较其他细胞能耐受无血清条件而免于凋亡,并能在添加生长因子的情况下增殖^[18]。本实验采用无血清干细胞培养基 SFM,辅以多种细胞因子诱导培养的第 1 代人 LCSCs 经流式细胞仪检测显示,其 CD90 与 CD133 的阳性率分别为 98.3%与 99.4%。其裸鼠致瘤能力观测显示,将 LCSCs 以 2×10^6 个细胞/只的密度种于裸鼠皮下 7 d 即可成瘤,而相同接种密度未诱导培养的 SMMC7721 细胞则需 14 d 方可成瘤。由此提示,本实验所采用的悬浮培养法可较好的培养到肝癌干细胞或肝癌干细胞样细胞。

肿瘤生物治疗(免疫细胞、基因、分子靶向及干细胞等治疗)已成为继手术、放疗、化疗后第四种治疗手段,已显示了良好的应用前景^[19-21]。其中免疫细胞治疗,包括肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞与 CD3 单抗激活的杀伤细胞等的治疗在临床应用较为广泛,亦较能体现生物治疗的抗癌特色。这些细胞在体外都具有一定的杀瘤活性,但因其扩

增量偏少,细胞毒力亦不够强,限制了其临床应用。

在外周血淋巴细胞中 CIK 的比例为 1%~5%,常经 CD3 单抗、多种细胞因子与人骨髓单个核细胞或外周血在体外共同培养诱导而来,又称自然杀伤细胞样 T 淋巴细胞^[22]。CIK 具有更强于 TIL、CD3A 与 LAK 等细胞的抗癌活性,能分泌多种抗癌细胞因子。肿瘤的 CIK 治疗可克服过继免疫疗法的体外细胞增殖量少、需输注 IL-2、副作用大和疗效低等不足,是肿瘤生物治疗的重要新措施之一。

目前,肿瘤,尤其恶性肿瘤的治疗主要采用手术、放疗及化疗,这些手段仅能在一定程度上阻抑肿瘤的发生、发展,不能从根本上解决肿瘤的转移及复发等问题,其患者生存率也未明显改善。其原因可能在于这些治疗手段未能完全抑制或彻底根除 CSCs。因此,针对 CSCs 的治疗应该是改善预后、治愈肿瘤的关键。CSCs 具有较高 DNA 修复能力,低水平表达促凋亡蛋白,一般处于 G0 期,对放、化疗不甚敏感^[23-24]。CSCs 一方面为肿瘤的根治带来了新的希望,另一方面又对其传统治疗方法提出了挑战。我们设想,正在兴起的肿瘤免疫治疗,尤其是运用 CIK 的免疫治疗可能会为 CSCs 的抑制或根除提供新的思路。

肿瘤细胞增殖活性反应肿瘤组织的增殖状态,取决于进入细胞周期的增殖细胞在所有肿瘤细胞中所占的比例,是反映肿瘤良恶性程度的重要指征,与肿瘤的生物行为密切相关。目前,多种生物标记物可用于检测肿瘤细胞增殖活性,增殖细胞核抗原 PCNA 是其中最为重要者之一。PCNA 是一种非组蛋白性的核蛋白,与细胞增殖和 DNA 合成有关,参与了许多重要的细胞事件,如细胞 DNA 损伤修复、细胞周期调控、染色体重组、DNA 甲基化及细胞凋亡等,是反映细胞,尤其是肿瘤细胞的增殖活性程度的指标,已广泛用于肿瘤的研究^[25-26]。PCNA 作为重要的预后因子,可用于预测肿瘤的发生、发展和早期复发,对制订早期治疗方案有参考意义^[27]。检测 PCNA 的表达在了解肿瘤细胞的增殖状态、正确判断肿瘤的生物行为及预后等有着重要的临床参考价值^[27]。

为提高特异的抗癌作用,本课题组前期研究分离培养了自体 CIK 用于百余例临床的恶性肿瘤,获得了一定的在体疗效^[7]。本实验在离体水平研究采用细胞因子从肝癌患者 PBMC 诱导的 CIK 对 LCSCs

的生长、增殖的影响,以探讨 CIK 的 LCSCs 抗癌机制,为 CSCs 的抑制或根除奠定基础。CCK-8 法检测表明,和 LCSCs 相同密度共培养的 CIK 能明显抑制 LCSCs 的生长、增殖,与对照相比其差异具统计学意义。mRNA 与蛋白水平检测显示,CIK 能有效下调增殖细胞核抗原相关基因 PCNA 及其编码蛋白的表达,提示 CIK 细胞与相同密度的 LCSCs 共培养可明显抑制 LCSCs 的增殖。因此,兴许 CIK 是抑制或根除 CSCs 的有效措施之一。

参 考 文 献

- [1] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. *Nat Med*, 2011, 17(3): 313–319.
- [2] Kasai T, Chen L, Mizutani A, et al. Cancer stem cells converted from pluripotent stem cells and the cancerous niche [J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2014, 10(1): 2–7.
- [3] 谭 岫, 陈积圣. 人肝癌干细胞的富集 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(8): 799–802.
- [4] Su X, Zhang L, Jin L, et al. Immunotherapy with cytokine-induced killer cells in metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25(4): 465–470.
- [5] Yu X, Xia W, Zhang T, et al. Enhanced cytotoxicity of IL-24 gene-modified dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells to hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Hematol*, 2010, 92(2): 276–282.
- [6] Sun JC, Pan K, Chen MS, et al. Dendritic cells-mediated CTLs targeting hepatocellular carcinoma stem cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(4): 368–375.
- [7] 杨 涛, 邵江河, 李启英, 等. 树突状细胞联合 CIK 细胞应用于晚期恶性实体瘤治疗的临床疗效观察 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(8): 700–705.
- [8] Jia Q, Zhang X, Deng T, et al. Positive correlation of Oct4 and ABCG2 to chemotherapeutic resistance in CD90(+)CD133(+) liver cancer stem cells [J]. *Cell Reprogram*, 2013, 15(2): 143–150.
- [9] González-Carmona MA, Märten A, Hoffmann P, et al. Patient-derived dendritic cells transduced with an a-fetoprotein-encoding adenovirus and co-cultured with autologous cytokine-induced lymphocytes induce a specific and strong immune response against hepatocellular carcinoma cells [J]. *Liver Int*, 2006, 26(3): 369–379.
- [10] Teitz-Tennenbaum S, Wicha MS, Chang AE, et al. Targeting cancer stem cells via dendritic-cell vaccination [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1(8): 1401–1403.
- [11] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 717–728.
- [12] Liao WT, Ye YP, Deng YJ, et al. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics [J]. *Am J Stem Cells*, 2014, 3(2): 46–62.
- [13] Zhou BB, Zhang H, Damelin M, et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discovery*, 2009, 8(10): 806–823.
- [14] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153–166.
- [15] Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133⁺CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067–2078.
- [16] You H, Ding W, Rountree CB. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor- β [J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1635–1644.
- [17] Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 964–973.
- [18] Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005, 10(1): 75–86.
- [19] Miyazawa M, Iwahashi M, Ojima T, et al. Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro [J]. *Cancer Lett*, 2011, 305(1): 32–39.
- [20] Niu Q, Wang W, Li Y, et al. Cord blood-derived cytokine-induced killer cells biotherapy combined with second-line chemotherapy in the treatment of advanced solid malignancies [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4): 449–456.
- [21] Jin J, Joo KM, Lee SJ, et al. Synergistic therapeutic effects of cytokine-induced killer cells and temozolomide against glioblastoma [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 33–39.
- [22] Gütgemann S, Frank S, Strehl J, et al. Cytokine-induced killer cells are type II natural killer T cells [J]. *Ger Med Sci*, 2007(10): 2–7.
- [23] Elliott A, Adams J, Al Hajj M. The ABCs of cancer stem cell drug resistance [J]. *Drugs*, 2010, 13(9): 632–635.
- [24] Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4R s of radiobiology revisited [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(4): 639–648.
- [25] 孙志敏, 李晓江. 增殖细胞核抗原在头颈部肿瘤中的应用进展 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(8): 157–159.
- [25] Sun ZM, Li XH. The progress in the application of PCNA in head and neck cancer [J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2013, 34(8): 157–159.
- [26] Trendell-Smith NJ, Oates J, Crocker J. The evaluation of salivary gland tumour using proliferating cell nuclear antigen [J]. *J Laryngol Otol*, 1997, 111(6): 551.
- [27] 徐妮妮, 刘 斌. CD24、CD44、PCNA 与乳腺癌的相关研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(18): 3321–3323.
- [27] Xu LL, Liu B. Research progress in CD24, CD44, PCNA and breast cancer [J]. *Medical Recapitulate*, 2013, 19(18): 3321–3323.

(责任编辑: 冉明会)