

· 论 著 ·

## DC-CIK 细胞对人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移的影响\*

项颖<sup>1</sup>,李启英<sup>1</sup>,王莉<sup>1</sup>,黄德鸿<sup>1</sup>,唐显军<sup>1</sup>,张曼<sup>1</sup>,杨威<sup>2</sup>,吴仙宇<sup>2</sup>,郑晓东<sup>3△</sup>(1. 重庆市肿瘤研究所生物治疗、血液肿瘤科,重庆 400030;2. 上海柯莱逊生物技术有限公司,上海 201201;  
3. 重庆市肿瘤研究所乳腺科,重庆 400030)

**摘要:**目的 探讨经细胞因子从肝癌患者外周血贴壁单个核细胞(PBMCs)诱导的树突状细胞(DC)与杀伤细胞(CIK)对人肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移的影响。方法 用肝癌患者肝癌组织裂解物(肿瘤抗原)致敏经粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素-4(IL-4)等诱导该患者 PBMCs 产生的 DC。用干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-2 和人 CD3 单克隆抗体(human CD3 monoclonal antibody, hCD3mAb)等诱导该 PBMCs 的悬浮细胞产生 CIK 细胞。用 Transwell 培养小室将 DC-CIK 细胞与 HepG2 细胞在同一培养体系内经该小室膜分隔培养 24、48 h。CCK-8 法检测 HepG2 细胞生长变化,并绘制其生长曲线;划痕实验检测其增殖、迁移能力。RT-PCR、Western blot 分别检测其增殖细胞核抗原(PCNA)基因及其编码蛋白的表达。结果 CCK-8 法检测显示,DC-CIK 细胞对人 HepG2 细胞生长具显著杀伤作用,与对照组细胞比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。划痕实验、基因与蛋白水平检测表明,DC-CIK 细胞可明显抑制该癌细胞的增殖与迁移,能在基因与蛋白水平下调该癌细胞 PCNA 的表达。结论 DC-CIK 细胞可显著下调肝癌细胞的 PCNA 基因表达,明显抑制其增殖与迁移,以发挥其杀癌作用。

**关键词:**细胞增殖;细胞运动;DC-CIK 细胞;肝癌 HepG2 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)14-1571-04

## Effect of DC-CIK cells on proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells\*

Xiang Ying<sup>1</sup>, Li Qiyang<sup>1</sup>, Wang Li<sup>1</sup>, Huang Dehong<sup>1</sup>, Tang Xianjun<sup>1</sup>,  
Zhang Man<sup>1</sup>, Yang Wei<sup>2</sup>, Wu Xianyu<sup>2</sup>, Zheng Xiaodong<sup>3△</sup>(1. Department of Biotherapy & Hemooncology, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China;  
2. Shanghai Claison Biotechnologic Co., Ltd., Shanghai 201201, China; 3. Department of Breast Cancer, Chongqing  
Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of cytokine induced killer(CIK) cells and dendritic cells(DC) induced from peripheral blood mononuclear cell(PBMC) in the patient with liver cancer on the proliferation and migration of human HepG2 cell line of liver cancer. **Methods** The adherent PBMCs were induced by GM-CSF, TNF- $\alpha$  and IL-4 in order to produce DCs, which were sensitized with antigen of autologous tissue of liver cancer. Meanwhile, CIK cells were obtained from the suspended PBMCs induced by IFN- $\gamma$ , IL-2 and human CD3 monoclonal antibody(hCD3mAb). The DCs, CIK cells and HepG2 cell line were cultured in a same circumstance with the Transwell culturing cabin, but the DCs-CIK cells were cultured at one side of the membrane of the Transwell, HepG2 cell line at another side of the same membrane for 24 h and 48 h respectively. Subsequently the proliferation of human HepG2 cell line cultured with DC-CIK cells of 24 h and 48 h were detected with cell count kit-8(CCK-8), and the proliferation curve was made. The scratch test was employed to analyze the proliferation and migration of the same cell line, and the expression of PCNA gene related closely proliferation of this cells and its coded protein were inspected with reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot respectively. **Results** The detection results of CCK-8 showed that DC-CIK cells had significantly killing effect on HepG2 cell line compared with the control cells, difference showing statistical significance( $P < 0.01$ ). The results of the scratch test, gene and protein detection indicated that DC-CIK cells can significantly inhibit the proliferation and migration of human HepG2 cell line and down-regulated the expression of PCNA in the gene and protein levels. **Conclusion** DC-CIK cells can obviously down-regulate the expression of PCNA gene of human HepG2 cell line, noticeably inhibit its proliferation and migration and play a role in killing tumor.

**Key words:** cell proliferation; cell movement; DC-CIK cell; human HepG2 cell

近年来,基础医学和实验室技术的发展,给自体细胞免疫治疗恶性肿瘤带来了广阔的应用前景。自体细胞免疫治疗是指将肿瘤患者自身有抗肿瘤活性的细胞分离出来,在体外一定条件下培养增殖后再回输至患者体内,通过不同的机制如接触杀伤、诱导凋亡、调节免疫等进行抗肿瘤治疗的一种手段。目前可供回输治疗的细胞种类很多,临床上肿瘤治疗常用细胞是树突状细胞(dendritic cell, DC)与细胞因子诱导的杀伤细胞

(cytokine induced killer, CIK)。

DC是机体内惟一能刺激初始型T淋巴的功能强大之专职抗原提呈细胞<sup>[1]</sup>,其功能主要表现在摄取、加工、提呈抗原物质。随DC的分化成熟,摄取功能下降而提呈能力增强,其强大的抗原提呈能力可达到巨噬细胞的数百甚至上千倍<sup>[2-5]</sup>。能在机体内诱导较为持久的、针对某一特定肿瘤特异性的免疫反应,从而达到治疗恶性肿瘤的目的。CIK亦称自然杀伤(NK)

细胞样 T 淋巴细胞<sup>[6]</sup>, CIK 的 CD3、CD56 表面标志阳性, 决定了其兼具 T 淋巴细胞和 NK 细胞的一些功能特点。因而在抗肿瘤方面, 其杀伤肿瘤细胞的作用更为强大和直接, 可不需要其他辅助细胞和因子即可发挥抗肿瘤作用, 且其抗肿瘤谱广泛, 对放疗化疗耐药或不敏感的恶性肿瘤也具有一定杀伤作用。

将肿瘤抗原致敏后的 DC 加入 CIK 中共同培养, 从理论上来说, CIK 细胞的抗肿瘤靶向性更强。为提高晚期实体瘤患者的生活质量和延长其生存期, 本研究将自身 CIK 联合自身 DC 用于晚期恶性实体瘤患者, 取得了较好在体疗效<sup>[7]</sup>。本实验从离体水平研究经细胞因子从肝癌患者外周血贴壁单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 诱导的 DC 与 CIK 对人肝癌 HepG2 细胞系增殖、迁移的影响, 探讨 DC-CIK 细胞的离体杀瘤效应及其机制, 为肿瘤的自体细胞免疫治疗奠定基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 主要试剂: 重组人白细胞介素-4(rhIL-4)(上海创未生物技术有限公司); rhIL-2(北京四环生物); 粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)(厦门特宝); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(上海唯科); CD3Mab(美国 ebioscience); 干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )(上海克隆高科); Tanswell 培养小室(美国 Invitrogen); Annexin V-PI 双染试剂盒(北京碧云天); CCK-8(日本 DojinDo)。

## 1.2 方法

**1.2.1 肿瘤抗原的制备及细胞的分离、培养** 参照文献<sup>[7]</sup>进行肿瘤抗原制备, 备后续致敏 DC 用。按文献<sup>[7]</sup>进行 CIK、DC 的分离、培养, 备后续实验用。

**1.2.2 DC 及 CIK 的质量控制** 细胞培养过程中通过倒置显微镜观察并计数 DC 及 CIK 增殖情况, 有无污染, 细胞收集前行细菌、真菌培养及内毒素检测。确保细胞制品的外源性因子, 包括细菌、真菌、内毒素等皆为阴性。细胞存活率大于 95%, 经冻存后复苏的细胞存活率大于 70%。

**1.2.3 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞增殖、迁移影响的检测** 以  $1 \times 10^6$  个/mL 接种对数生长期 HepG2 细胞于 6 孔板, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 饱和湿度培养至 100% 汇片生长, 采用划痕法, 即用 1 mL 无菌枪头划“一”字形划痕, 随后用相同密度的 DC-CIK 细胞种植于与 6 孔板孔配套的 Tanswell 培养小室, 将其放入 6 孔板与 HepG2 细胞共培养 5~15 d, 以单独培养的 HepG2 细胞作对照, 单纯培养液为空白对照。用 Image-Pro Plus 图像分析系统(Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA) 测算划痕平均残留面积值, 并计算划痕修复面积百分率(healing rate, HR)<sup>[8]</sup>;  $HR = [1 - \text{划痕残留修复面积(AI)} / \text{原划痕面积(AO)}] \times 100\%$ 。

**1.2.4 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞生长的影响-增殖曲线绘制方法** 将肝癌 HepG2 细胞接种至 4 个 6 孔板(每孔:  $4 \times 10^4$  个/2 mL), 相同密度的 DC-CIK 细胞种植于与 6 孔板孔配套的 Tanswell 培养小室, 将其放入 6 孔板与 HepG2 细胞共培养, 以单独培养的 HepG2 细胞作对照, 单纯培养液为空白对照。分别于 1、3、5、7 d 取出 1 个 6 孔板, 每孔加换新培养基与 CCK-8, 相同条件下继续培养 4 h, 振荡 30 s, 混匀, 紫外高效分析仪测定 450 nm 波长处光密度值, 相同实验重复 3 次, 以平均光密度值为 Y 轴, 时间为 X 轴绘制增殖曲线。

**1.2.5 DC-CIK 细胞对人肝癌增殖细胞核抗原(PCNA)基因的影响** 分别根据 PCNA 与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 基因全长 cDNA 序列, 自行设计其特异性扩增引物。PCNA 上游: 5'-ATG GCC GGA GCT GGC GCC CTG G-3', 下游: 5'-CGC TAC AGG CAG GCG GGA AG-3'; GAPDH 上游: 5'-CGC GGG GCT CTC CAG AAC AT-3', 下游: 5'-GTG GGG GAC TGA GTG TGG CAG G-3'。采用 RT-PCR 法, 以与 DC-CIK 细胞共培养的 HepG2 细胞总 RNA 为模板扩增 PCNA 基因 cDNA, 未处理的相应细胞总 RNA 为模板扩增的 PCNA 基因 cDNA 为对照, 同时扩增的 GAPDH 基因 cDNA 作内参。逆转录(RT)反应条件: 30 °C 反应 10 min 与 42 °C 反应 30 min 合成第一链 cDNA; 99 °C 反应 5 min 以灭活逆转录酶; 5 °C 冷却 5 min, 1 个循环。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 取 PCR 产物(5~10  $\mu$ L) 行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, GoldViewTM 染色, 确认 PCR 产物。

**1.2.6 DC-CIK 细胞对人肝癌 PCNA 蛋白影响的检测** 采用 Western blot 法, 将与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞(观察组)总蛋白转移至硝酸纤维素膜, 浸泡于含 PCNA 兔多抗(1:300)封闭液, 4 °C 过夜孵育, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 25 °C, 与化学发光底物结合 5~10 min, 保存图片。以未处理的同种细胞的相应检测作为对照组,  $\beta$ -Actin(相对分子质量:  $4.3 \times 10^4$ ) 作内参。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.0 统计软件包行方差分析, 采用 microsoft excel 作图。确定组间差异, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DC 形态观察** 初始分离的 PBMC 均匀散在, 呈圆形贴壁生长, 3~4 d 后, 细胞体变大, 为圆形或不规则形, 形成大小不等的克隆, 细胞膜出现细小伪足。随培养时间延长, 细胞体更大, 大多表面出现枝状突起, 呈典型 DC, 见图 1。

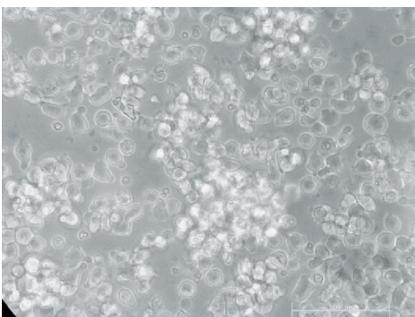


图 1 倒置显微镜下培养第 4 天 DC(标尺=200  $\mu$ m)

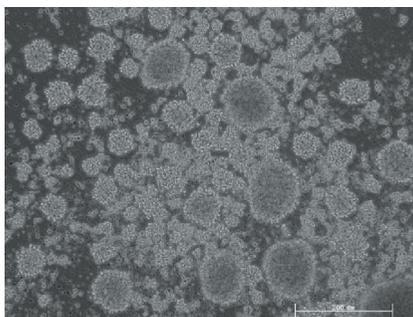


图 2 倒置显微镜下培养第 5 天 CIK(标尺=200  $\mu$ m)

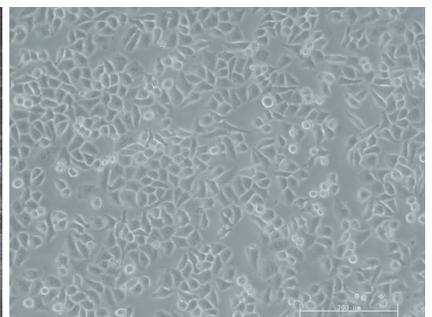
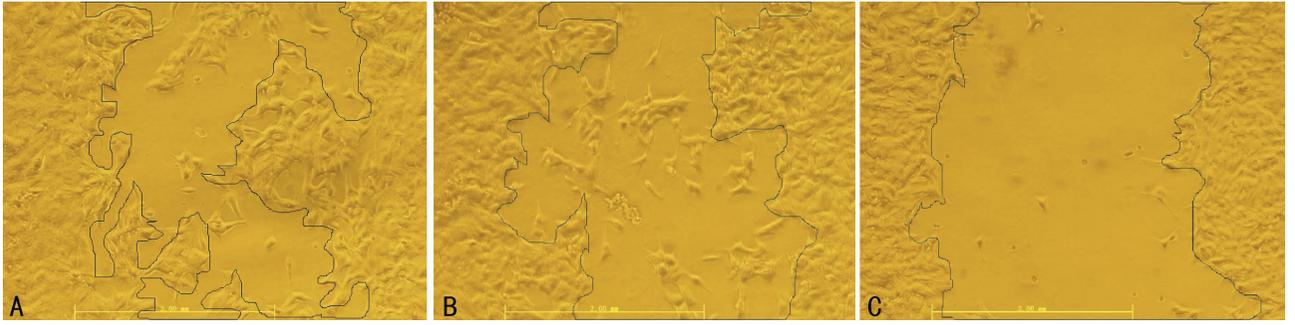


图 3 倒置显微镜下生长的肝癌 HepG2 细胞(标尺=200  $\mu$ m)



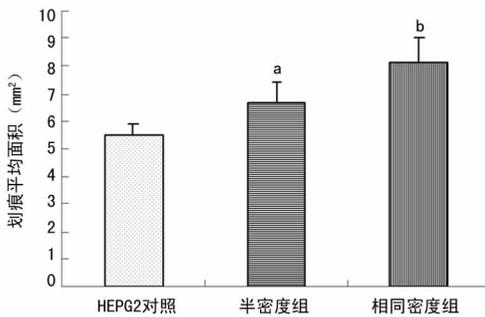
A: HepG2 对照组; B: 半密度组; C: 相同密度组。

图 4 图像分析法测算 5 d 划痕平均修复残留面积 (标尺 = 2 mm)

**2.2 CIK 的形态观察** 培养前 3 d, 细胞小, 数量少, 第 5 天开始倍增(图 2), 此后每 3 天增长 2~3 倍, 至第 12 天, 细胞体明显变大, 呈不规则形, 簇状生长, 数量约为培养前 3 d 的 15 倍左右。此时加入 DC 共同培养, CIK 增殖速度更快, 再培养 12 d 其数量约为未加 DC 的 3~4 倍。

**2.3 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞增殖、迁移的影响** 图像分析法测算 5 d 划痕平均修复残留面积( $\text{cm}^2$ )。结果显示, 肝癌 HepG2 细胞系 [ $(5.49 \pm 0.42) \text{cm}^2$ ] 与相同密度 [ $(8.14 \pm 0.86) \text{cm}^2$ ] 及一半密度 [ $(6.64 \pm 0.83) \text{cm}^2$ ] 的 DC-CIK 细胞共培养 5 d (分别为相同密度组及半密度组), 与未共培养的 HepG2 细胞系(图 3) 比较, 其划痕修复残留面积平均值差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4、5。提示 DC-CIK 细胞能显著抑制肝癌 HepG2 细胞系的增殖与迁移。

**2.4 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞生长的影响-增殖曲线绘制** CCK-8 法检测显示, DC-CIK 细胞对 HepG2 细胞生长具显著杀伤作用, 与对照组细胞比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 6。



a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与 HepG2 对照组比较。

图 5 DC-CIK 细胞对人肝癌细胞增殖、迁移的影响

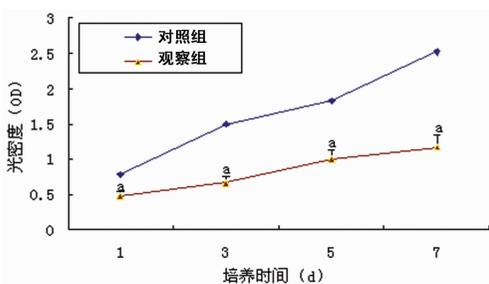
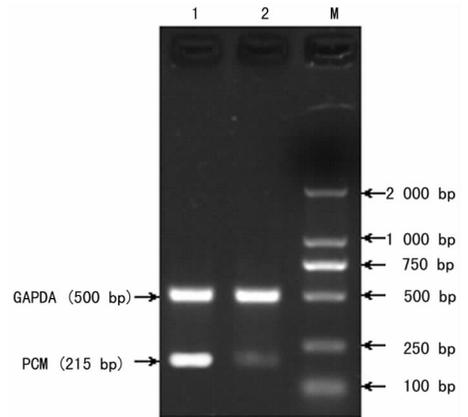


图 6 DC-CIK 细胞对 HepG2 细胞生长的影响-增殖曲线图

**2.5 DC-CIK 细胞对人肝癌 PCNA 基因的影响** 以与 DC-CIK 细胞共培养的 HepG2 细胞总 RNA 为模板可扩出核抗原

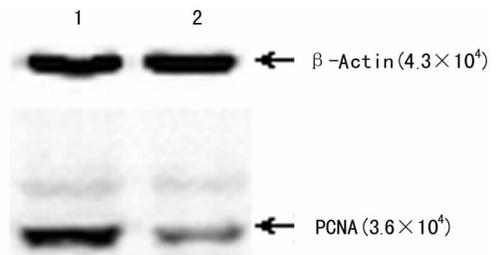
PCNA 基因的较弱 cDNA, 以未共培养的相应细胞总 RNA 为模板扩出的 PCNA 基因 cDNA 则较强(图 7)。提示 DC-CIK 细胞与 HepG2 细胞共培养可显著抑制 HepG2 细胞增殖。

**2.6 DC-CIK 细胞对人肝癌 PCNA 蛋白的影响** 与 DC-CIK 细胞共培养的 HEPG2 细胞检测在约  $3.6 \times 10^4$  处出现较弱 PCNA 抗原染色带, 未共培养的相应细胞的该条带则较强(图 8), 提示 DC-CIK 细胞与 HEPG2 细胞共培养可明显抑制 HepG2 细胞增殖。



1: 对照组; 2: 观察组; M: 标记物。

图 7 HepG2 细胞的 PCNA 基因表达



1: 对照组; 2: 观察组。

图 8 两组 HepG2 细胞抗原 PCNA 蛋白表达

### 3 讨论

原发性肝癌为临床上常见多发肿瘤, 据统计每年大约有 60 万以上的新发病例, 目前全世界范围内其发病率、死亡率在所有恶性肿瘤中分别排名第 5 位和第 3 位。而在中国, 原发性肝癌发病总人数占全世界所有患者总数的一半以上, 其肿瘤相关死亡率排名所有恶性肿瘤第 2 位, 这仅次于原发性支气管肺癌。近年来原发性肝癌发病率有上升趋势, 预计在未来 20 年, 其发病率和死亡率均会迅速上升<sup>[9-10]</sup>。原发性肝癌起病大多

较为隐匿,确诊时绝大多数患者已属晚期,病程短、病死率高。现有的各种治疗手段在近年来虽有发展,但疗效仍不理想,尤其对患者总的生存期仍无明显改善,未能根本改善肝癌患者的预后。故寻求新的治疗方法,提高原发性肝癌的疗效和生存期,改善其预后和生存质量尤为重要。

DC 是 20 世纪 70 年代初由 Steinman 等首先发现,因其细胞外形极似树枝状向外突起故被命名,是目前发现的惟一能激活初始 T 淋巴细胞的免疫细胞。未成熟的 DC 高表达 IgGFc 受体、C3b 受体、甘露糖受体等, MHC-I/II 类分子表达较低,摄取、加工抗原能力强。成熟的 DC 细胞膜上高表达 MHC-I/II 类分子,并具有相对特异性的表面标志如 CD80/CD86、CD40、ICAM-1 等共刺激分子和 CD1a、CD83 分子,摄取、加工抗原能力较弱而抗原呈递能力强。CIK 在健康人外周血淋巴细胞中所占的比例极少,大约为 1%~5%。但也可以在一定的实验室条件下,经多种细胞因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-2、抗 CD3 等通过诱导来源于外周血、脐带血或骨髓的单个核细胞而大量获得。肿瘤的 CIK 治疗可克服既往过继免疫疗法的一些缺陷,如体外细胞增殖数量少、疗效低、需输注 IL-2 及不良反应大等,已成为肿瘤生物治疗的新措施之一。CIK 能分泌多种细胞因子,具更强于早期人们发现的 LAK 等细胞的杀肿瘤细胞活性。但以往相关研究多以体外培养的单纯 CIK 进行肝癌的生物治疗,因缺乏对肿瘤细胞的特异性,其疗效不佳。同时也有相关资料证明,某些恶性肿瘤细胞可对诸如 CIK 类的免疫细胞出现耐受现象,从而导致机体内的免疫细胞不能及时有效地对发生了癌变细胞进行监控和清除,这可能与恶性肿瘤病人体内的 DC 发生功能失调有关<sup>[11-12]</sup>。

DC-CIK 细胞是在体外实验室中,把上述两种细胞在一定条件下,共同培养而成,因而被认为有更高的增殖活性和靶向抗癌活性。临床上 DC-CIK 细胞用于治疗原发性肝癌方面已有一些报道。有文献报道了利用 DC-CIK 治疗能降低原发性肝癌术后复发风险和延长生存期的两项随机临床试验<sup>[13-14]</sup>。Hui 等<sup>[15]</sup>认为,若原发性肝癌患者术后予以适当的免疫细胞巩固治疗,可提高总体疗效,杀灭亚临床病灶和(或)微小转移病灶,降低术后肿瘤复发和转移的风险,并且在精神食欲及自身机体免疫功能方面恢复快,从而改善患者的生活质量。Shi 等<sup>[16]</sup>应用 CIK 治疗不能耐受常规治疗的中晚期原发性肝癌患者,治疗后患者免疫功能、生活质量得以改善,并可延长生存期,且安全。李建旺等<sup>[17]</sup>用索拉非尼治疗晚期原发性肝癌患者的同时,联合 DC-CIK 细胞进行治疗,显示疗效满意,治疗相关不良反应少且轻微。有文献比较了单纯性肝动脉栓塞化疗和联合 DC-CIK 细胞巩固治疗的原发性肝癌患者的远期疗效,认为后者有更高的远期生存率,并能提高原发性肝癌中位生存时间和延缓复发时间<sup>[18]</sup>。

本实验从离体水平研究经细胞因子从肝癌患者 PBMC 诱导并负载肿瘤抗原的 DC 与 CIK 对肝癌 HepG2 细胞系增殖、迁移的影响,探讨负载肿瘤抗原的 DC 与 CIK 的离体杀瘤效应及其机制。细胞增殖曲线实验显示,与 HepG2 细胞相同密度共培养的 DC-CIK 细胞对 HepG2 细胞生长具显著杀伤作用(与 HepG2 对照细胞比较,  $P < 0.01$ )。基因与蛋白水平检测表明,DC-CIK 细胞能明显抑制 HepG2 细胞增殖相关基因 PCNA 之表达,提示 DC-CIK 细胞与 HepG2 细胞共培养可明显抑

制 HepG2 细胞的增殖。划痕实验的图像分析测算结果表明,肝癌 HepG2 细胞系与相同密度及一半密度的 DC-CIK 细胞共培养 5 d 后,与未共培养的 HepG2 细胞系比较,其划痕修复残留面积平均值差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),由此提示 DC-CIK 细胞能显著抑制肝癌 HepG2 细胞系的增殖与迁移。

#### 参考文献:

- [1] Park HY, Jin JO, Song MG, et al. Expression of dendritic cell markers on cultured neutrophils and its modulation by anti-apoptotic and pro-apoptotic compounds[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(4): 439-449.
- [2] 匡志鹏, 梁安民. CIK 细胞联合树突状细胞治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(2): 240-242.
- [3] 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[J]. *Hematology*, 2010, 95(12): 2144-2152.
- [4] Motamedi M, Arab S, Moazzeni SM, et al. Improvement of a dendritic cell-based therapeutic Cancer vaccine with components of *Toxoplasma gondii*[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(10): 1393-1398.
- [5] 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[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(7): 1019-1027.
- [6] Gütgemann S, Frank S, Strehl J, et al. Cytokine-induced killer cells are type II natural killer T cells[J]. *Ger Med Sci*, 2007(5): Doc07.
- [7] González-Carmona MA, Märten A, Hoffmann P, et al. Patient-derived dendritic cells transduced with an  $\alpha$ -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.
- [8] 闫国和, 粟永萍, 程天民, 等. 羊膜负载骨髓间充质干细胞与表皮细胞对放创性皮肤损伤促愈研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2004, 18(6): 497-501.
- [9] Ma S, Chan KW, Guan XY. In search of liver Cancer stem cells[J]. *Stem Cell Rev*, 2008, 4(3): 179-192.
- [10] Tomuleasa C, Soritau O, Rus-Ciucu D, et al. Isolation and characterization of hepatic Cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2010, 19(1): 61-67.
- [11] Lin J, Zhu H, Lu X, et al. Autologous cytokine-induced killer cells in the treatment of multiple myeloma concomitant with lung Cancer and paraneoplastic dermatoses[J]. *Intern Med*, 2010, 49(21): 2341-2346.
- [12] Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, et al. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after(下转第 1577 页)

下几个特征:气道高反应、炎症、黏膜上皮化生及激活气道成纤维细胞增殖而形成气道重构<sup>[3,7]</sup>。Esnault 等<sup>[8]</sup>证实无论哮喘或健康人,外周血单核细胞自发的 IL-13 表达在不同的个体间存在差异。

由于人类基因组中 SNP 分布广泛并且相对稳定,是人类个体差异主要的分子标记,因此,常用于反应个体表型差异以及不同个体对疾病易感性的研究<sup>[9-11]</sup>。Park 等<sup>[12]</sup>的研究显示了 IL-13R130Q 位点与韩国人群哮喘患者降低的肺功能(表现在降低的 FEV1%值和较低的 FEV1/FVC 比值)显著相关。最近又有研究显示,一个与 IL-13 或高 Th2 表型密切相关的哮喘亚型已经被发现<sup>[13]</sup>。因而从 IL-13 基因区域存在多个 SNP 揭示哮喘的易感性有重要意义。

本研究结果显示,在 160 例哮喘患者中检测到 46 例野生基因型(GG),占 28.8%,突变基因型中 5 例为突变型纯合子(AA),占 3.1%,109 例为杂合子(GA),占 68.1%;维吾尔族 47 例哮喘患者中 9 例野生基因型(GG),占 19.1%,突变基因型中 3 例为突变型纯合子(AA),占 6.4%,35 例为杂合子(GA)占 74.5%;汉族 113 例哮喘患者中 37 例野生基因型(GG),占 32.7%,突变基因型中 2 例为突变型纯合子(AA),占 1.8%,74 例为杂合子(GA),占 65.5%;在汉族 20 例健康者中检测到 3 例野生基因型(GG),占 15.0%,17 例为突变基因型杂合子(GA),占 85%;在维吾尔族 20 例健康者中没有野生基因型(GG),突变基因型中 20 例均为杂合子(GA)。

哮喘患者与健康者对照、哮喘维吾尔族组患者与对照维吾尔族组比较均显示:IL-13 基因 2100A/G 突变位点基因型频率有差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而等位基因频率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),原因可能是某个核苷酸突变单独存在时并不起作用,只有它处于纯合或者杂合状态时才与疾病相关。由此可见,IL-13 基因 2100A/G 突变位点多态性可能与新疆维吾尔族支气管哮喘发病有关。

#### 参考文献:

- [1] Barnes KC. Genetic studies of the etiology of asthma[J]. Proc Am Thorac Soc, 2011, 8(2):143-148.
- [2] 侍杏华,周建平. IL-13 基因和  $\beta 2$ -AR 基因多态性与哮喘的关系[J]. 山东医药, 2008, 48(32):118-120.
- [3] Saha SK, Berry MA, Parker D, et al. Increased sputum and bronchial biopsy IL-13 expression in severe asthma

[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 121(3):685-691.

- [4] 汤兆明,王琳,胡丽华. 中国人群白细胞介素-13 基因多态性与哮喘易感性关系的 Meta 分析[J]. 循证医学, 2011, 11(3):154-159.
- [5] 中华医学会呼吸病学会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸病杂志, 2008, 31(3):177-185.
- [6] Giubergia V, Gravina LP, Castanos C, et al. Influence of beta2-adrenoceptor polymorphisms on the response to chronic use of albuterol in asthmatic children[J]. Pediatr Pulmonol, 2008, 43(5):421-425.
- [7] Ingram JL, Huggins MJ, Church TD, et al. Airway fibroblasts in asthma manifest an invasive phenotype[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(12):1625-1632.
- [8] Esnault S, Benbernou N, Lavaud F, et al. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients[J]. Clin Exp Immunol, 1996, 103(1):111-118.
- [9] Levy S, Sutton G, Ng PC, et al. The diploid genome sequence of an individual human[J]. PLoS Biol, 2007, 5(10):e254.
- [10] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing[J]. Nature, 2008, 452(7189):872-876.
- [11] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome[J]. Science, 2001, 291(5507):1304-1351.
- [12] Park HW, Lee JE, Kim SH, et al. Genetic variation of IL13 as a risk factor of reduced lung function in children and adolescents: a cross-sectional population-based study in Korea[J]. Respir Med, 2009, 103(2):284-288.
- [13] Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(5):388-395.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-02-18)

(上接第 1574 页)

- Ther, 2009, 9(7):831-840.
- [13] Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial[J]. Lancet, 2000, 356(9232):802-807.
- [14] Peng B, Liang L, Chen Z, et al. Autologous tumor vaccine lowering postsurgical recurrent rate of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2006, 53(69):409-414.
- [15] Hui D, Qiang L, Jian W, et al. A randomized, controlled trial of postoperative adjuvant cytokine-induced killer cells immunotherapy after radical resection of hepatocel-

lular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(1):36-41.

- [16] Shi M, Zhang B, Tang ZR, et al. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8):1146-1151.
- [17] 李建旺,彭大为,黄春珍,等. 自体 CIK 细胞及 DC 细胞联合索拉非尼治疗晚期肝癌的临床观察[J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(5):459-461.
- [18] 韩照予,周宜强. 介入治疗联合 DC+CIK 细胞疗法治疗肝癌疗效观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(20):112-113.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2013-01-22)