

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.012

## CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞的体内外抗瘤活性

赵建夫, 赵凤芝, 陈文慧, 全强, 樊晶, 陈碧云, 张鼎, 徐萌(暨南大学附属第一医院 肿瘤科, 广东 广州 510632)

**[摘要]** **目的:** 探讨细胞因子诱导杀伤(CIK)细胞联合贝伐单抗(bevacizumab)对肝癌 HepG2 细胞的体内外抗肿瘤活性及其作用机制。**方法:** 提取健康供血者外周血的单个核细胞(PBMC), 加入多种细胞因子促进 CIK 细胞成熟, 在流式细胞仪上进行 CIK 细胞的免疫表型分析。CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合作用于 HepG2 细胞后, 利用 CCK-8 测定其对 HepG2 细胞体外增殖活性的影响; 利用侵袭小室(Transwell)和划痕实验测定其对 HepG2 细胞侵袭迁移活性的影响; Western blotting 检测 HepG2 细胞 Akt 和 Erk 信号通路相关蛋白磷酸化的变化。建立 HepG2 细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 并随机分为生理盐水组、CIK 组、贝伐单抗组及 CIK 细胞联合贝伐单抗组, 给药 28 d 后处死裸鼠, 剥取瘤体, 免疫组化法检测瘤组织 CD31 及 Ki67 蛋白的表达。**结果:** 提取健康人 PBMC 诱导 14 d 后, CIK 细胞表型分析显示 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞扩增达(36.33 ± 2.58)%。与单独治疗组比较, 联合组对 HepG2 细胞的抗肿瘤增殖活性显著增强( $P < 0.05$ ); CIK 细胞和贝伐单抗两药联合比单独给药组对 HepG2 细胞的侵袭[(75.6 ± 9.53) vs (304.8 ± 45.73), (359.8 ± 38.10)个,  $P < 0.01$ ]和迁移[(29.35 ± 8.14)% vs (55.07 ± 6.27)%, (60.50 ± 9.73)%,  $P < 0.05$ ]能力的抑制更强; CIK 细胞和贝伐单抗两药单独及联合都能抑制 Akt 和 Erk 的磷酸化; CIK 联合贝伐单抗组可显著抑制移植瘤生长以及移植瘤组织平均血管密度和 Ki67 表达, 与单独治疗及对照组细胞比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:** CIK 联合贝伐单抗在体内外对 HepG2 细胞增殖、侵袭、迁移均有抑制作用, 且优于单独治疗组。

**[关键词]** 细胞因子诱导杀伤细胞; 贝伐单抗; 肝癌; 抗肿瘤

**[中图分类号]** R734.2; R730.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2017)04-0404-07

## Anti-tumor activity of cytokine-induced killer cells combined with bevacizumab against hepatocellular carcinoma HepG2 cells *in vitro* and *in vivo*

ZHAO Jianfu, ZHAO Fengzhi, CHEN Wenhui, QUAN Qiang, FAN Jing, CHEN Biyun, ZHANG Ding, XU Meng (Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antitumor activity and the mechanism of cytokine-induced killer (CIK) cells combined with bevacizumab against hepatocellular carcinoma HepG2 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy blood donors were isolated and cultured in the presence of different cytokines to promote the maturation of CIK cells; and the immune phenotypes of CIK cells were analyzed by flow cytometry. The inhibitory effect on HepG2 cells of CIK cells combining with or without bevacizumab were analyzed by CCK-8 assay. Cell migration and invasion of HepG2 cells were detected by scratch assay and transwell assay. The phosphorylation levels of Erk/Akt signaling pathway related proteins were detected by Western blotting. HepG2 cell xenograft tumor model was established in nude mice. Tumor bearing mice were divided into normal saline control group, CIK group, bevacizumab group and CIK + bevacizumab group. On the 28<sup>th</sup> day after drug administration, the mice were sacrificed and tumors were isolated. Immunohistochemical staining was used to analyze the expressions of CD31 and Ki67. **Results:** Human PBMCs were stimulated for 14 days, and the CIK cell phenotype analysis showed that the amplification of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> CIK cells reached (36.33 ± 2.58)%. The inhibition rate of CIK cells combined with bevacizumab was significantly enhanced by comparing with CIK/bevacizumab alone groups (all  $P < 0.05$ ). CIK cells combined with bevacizumab showed a more in-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81273814)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273814)

**[作者简介]** 赵建夫(1980-),男,湖南省永州市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: 594357558@qq.com

**[通信作者]** 徐萌(XU Meng, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤分子诊治研究, E-mail: xumengjinan@yahoo.com

tensive inhibition on cell migration ( $[75.6 \pm 9.53]$  vs  $[304.8 \pm 45.73]$ ,  $[359.8 \pm 38.10]$ ,  $P < 0.01$ ) and invasion ( $[29.35 \pm 8.14]\%$  vs  $[55.07 \pm 6.27]\%$ ,  $[60.50 \pm 9.73]\%$ ,  $P < 0.05$ ) by comparing with those two single treatment groups; CIK cell treatment, bevacizumab treatment and the combined treatment could all decrease the phosphorylation level of Erk and Akt; the combined treatment significantly inhibited the tumor growth, mean vessel density (MVD) and Ki67 expression, which had statistical significance when compared with the other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The current study suggested that CIK cells combined with bevacizumab inhibited HepG2 cells proliferation, invasion and migration both *in vitro* and *in vivo*, which significantly precede the treatment efficacy of single treatment groups.

[ **Key words** ] cytokine-induced killer (CIK) cell; bevacizumab; hepatocellular carcinoma; antitumor

[ Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 404-410. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.012 ]

原发性肝癌(hepatic carcinoma, HPC)是临床常见的恶性肿瘤,因其发病隐匿,绝大多数患者确诊时已属晚期,给肝癌的防治带来严峻的挑战<sup>[1]</sup>。随着医学的发展,针对癌症的靶向药物已广泛投入临床使用<sup>[2]</sup>,贝伐单抗(bevacizumab)属于 VEGF 抑制剂,能特异阻断 VEGF 与 EGFR 结合,抑制肿瘤新生血管形成和肿瘤细胞的增殖、转移<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,肿瘤的发生、发展与机体免疫功能失调有密切联系。如免疫监视和免疫清除功能障碍时可引起肿瘤发生、增殖及转移。CIK 细胞是患者外周血单个核细胞在体外经多种细胞因子共同诱导而获得的一种新型抗肿瘤免疫活性细胞群体,其效应细胞以 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和 CD56<sup>+</sup> 异质细胞群为主,具有增殖快、杀瘤活性强、抗肿瘤谱广、不良反应小等优点,已成为肿瘤生物治疗研究热点<sup>[5-7]</sup>。CIK 细胞生物治疗为晚期不宜手术或无法承受放化疗副反应的肝癌患者开辟了新途径。研究表明,VEGF/EGFR 自分泌途径在 HepG2 细胞的增殖中起着重要作用,贝伐单抗阻断其自分泌途径,从而抑制 HepG2 细胞的增殖诱导调亡<sup>[8]</sup>。CIK 细胞与贝伐单抗联合作用可增强对肝癌肿瘤生长、增殖的抑制作用,为探索肝癌的治疗方案选择提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和主要试剂

雄性 BALB/c nu 裸鼠购自广东省医学实验动物中心;HepG2 细胞购自美国 ATCC 细胞库;CCK-8 试剂盒购自 Promega 公司;贝伐单抗购自 Roche 公司,Akt,p-Akt,Erk,p-Erk 和 Ki67 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;CD31 抗体购自 R&D 公司;HRP 偶联二抗购自 Santa Cruze 公司;苏木素伊红染色试剂盒购于杭州碧云天生物技术有限公司;DAB 免疫组织化学试剂盒为武汉博士德公司产品;酶标仪 ELX800 由 Bio-TEK 公司生产;流式细胞仪由 BD 公司生产。

### 1.2 CIK 细胞的制备及表型检测

采集健康志愿者外周血并肝素抗凝,经 Ficoll 密度梯度离心获得外周血单个核细胞(PBMC),悬浮于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h。收集悬浮细胞,调整细胞密度为  $2 \times 10^6$ /ml,加入 1000 IU/ml IFN- $\gamma$  培养。24 h 后加入 150 ng/ml 小鼠抗人 CD3 单抗、1500 IU/ml IL-2 和 100 U/ml IL-1 $\alpha$ ,继续常规培养。收集培养至第 1、7 和 14 天的 CIK 细胞,分别加入 4  $\mu$ l 荧光素标记的鼠抗人 CD3、CD4、CD8、CD56 及同型对照 IgG1 的单克隆抗体标记后,用流式细胞仪进行免疫表型检测。

### 1.3 CCK-8 实验检测 CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合应用对 HepG2 细胞增殖的抑制

取对数生长期 HepG2 细胞,调整细胞以  $2 \times 10^4$ /ml 的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l,于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养。待细胞贴壁后分为:CIK 联合贝伐单抗治疗组;CIK 组;贝伐单抗组;生理盐水组(NS 组);CIK 细胞效靶比为 40:1,贝伐单抗终浓度为 10  $\mu$ g/ml。每组 3 个复孔。继续培养 48 h 后加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ l/孔,37 °C 孵育 2 h。用酶联免疫分析仪检测每孔在 450 nm 波长处的的光密度(D)值。计算细胞增殖抑制率,计算公式如下:抑制率(%) =  $(D_{\text{对照}} - D_{\text{assay}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$

### 1.4 划痕实验检测 CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合应用对 HepG2 细胞迁移能力的影响

取对数生长期 HepG2 细胞,调整细胞以  $3 \times 10^4$ /ml 的密度接种于 6 孔板,每孔 2 ml,于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养。待细胞贴壁后用 200  $\mu$ l 枪头轻轻在板孔中划十字交叉痕迹,用 RPMI 1640 无血清培养基洗掉悬浮细胞并进行分组加药,药物分组为:CIK 联合贝伐单抗治疗组;CIK 组;贝伐单抗组;NS 组;CIK 细胞数及贝伐单抗浓度同 1.3 部分。在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C,饱和温度培养箱中继续培养 48 h。取细胞培养板在倒置荧光显微镜下观察拍照,观察并对

比细胞向划痕中间生长情况。划痕愈合率(%) = (W0-W48)/W0 × 100%, W0 为 0 h 各组划痕宽度, W48 为生长 48 h 后各组痕迹的宽度。

### 1.5 Transwell 实验 CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合应用对 HepG2 细胞侵袭能力的影响

收集经无血清培养基饥饿 24 h 的 HepG2 细胞, 调整细胞以  $1 \times 10^4$ /mL 的密度接种于预铺 Matrigel 胶的 Transwell 小室, 在小室下层加入 600  $\mu$ l 含有不同的药物的 RPMI-1640 培养基, 药物分组为: CIK 联合贝伐单抗治疗组; CIK 组; 贝伐单抗组; NS 组。于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 孵箱中培养 48 h 后, 取出 Transwell 小室, 用棉签轻轻擦除上层小室内粘附的细胞, 放入 4% 多聚甲醛中室温固定 15 min, 采用结晶紫染色。在倒置荧光显微镜下观察拍照, 计算每个小室发生侵袭细胞的数目。以阴性对照组侵袭细胞数为 100%, 计算细胞侵袭率。侵袭率 = (抗体组细胞侵袭数/阴性对照细胞侵袭数) × 100%。

### 1.6 Western blotting 检测 CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合应用对 HepG2 细胞内 Akt 和 Erk 信号通路磷酸化的影响

药物处理 HepG2 细胞用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 按上样量 40  $\mu$ g/孔经 SDS-PAGE 分离, 转印至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 1 h, 加入 5% BSA 稀释的一抗 (Akt, p-Akt, Erk, p-Erk 和 Ki67 抗体), 室温孵育 1 h, 洗膜后加入封闭液稀释的二抗, 室温孵育 1 h。用 ECL 化学发光液显色, 于暗室中进行曝光获得蛋白条带。

### 1.7 体内抗肿瘤实验观察 CIK 细胞与贝伐单抗单独或联合应用对 HepG2 细胞移植瘤生长的影响

将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化, 用 PBS 清洗 2 遍, 调整细胞密度为  $1 \times 10^7$ /ml, 每只 BALB/nu 雄性裸鼠皮下接种 0.2 ml。待瘤块长至 70 ~ 100 mm<sup>3</sup> 时, 裸鼠随机分为生理盐水对照组、CIK 联合贝伐单抗组、CIK 组和贝伐单抗治疗组, 每组 6 只, 分别经静脉注射药物, CIK 细胞 100  $\mu$ l, 浓度为  $11 \times 10^7$ /ml, 贝伐单抗 5 mg/kg, 4 d 一次, 共给药 4 周。治疗开始后每 4 d 一次用游标卡尺测量裸鼠瘤体的最大纵径(a)及最大横径(b), 观察肿瘤生长的情况, 肿瘤体积 =  $0.5 \times a \times b^2$ 。第 28 天时将裸鼠处死, 剥离肿瘤组织, 称瘤重, 计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率(%) = (1 - 实验组平均瘤质量/对照组平均瘤质量) × 100%。实验结束后, 处死裸鼠, 剥离瘤块并用 4% 多聚甲醛固定。

#### 1.7.1 移植瘤组织的病理学检测

经固定后的肿瘤组织进行常规脱水并用石蜡包埋, 用石蜡切片机

切成厚度为 4  $\mu$ m 薄片附于载玻片上, 脱蜡后按苏木素-伊红(H-E)染色试剂盒进行 H-E 染色。

#### 1.7.2 移植瘤组织免疫组织化学检测

肿瘤石蜡切片用 pH6.0 的柠檬酸缓冲液进行抗原修复后, 孵育 CD31 和 Ki67 一抗和二抗。按免疫组织化学试剂盒说明书进行染色, 并用中性树胶封片。最后拍照观察并计算每个视野下的微血管密度(Micro vessel density, MVD)和 Ki67 阳性率(%)。

### 1.8 统计学分析

采用 Graphpad5.0 软件统计分析数据, 所有试验至少重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均数间比较采用 t 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CIK 细胞表型的检测

分离的 PBMC 在体外用多种细胞因子共同培养 14 d, 经流式细胞分析检测发现(图 1), CD3<sup>+</sup> 细胞的比例为(85.21 ± 4.74)%, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞比例为(30.08 ± 3.09)%, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例为(42.5 ± 2.30)%, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞比例为(36.33 ± 2.58)% (表 1), 符合 CIK 细胞免疫表型。

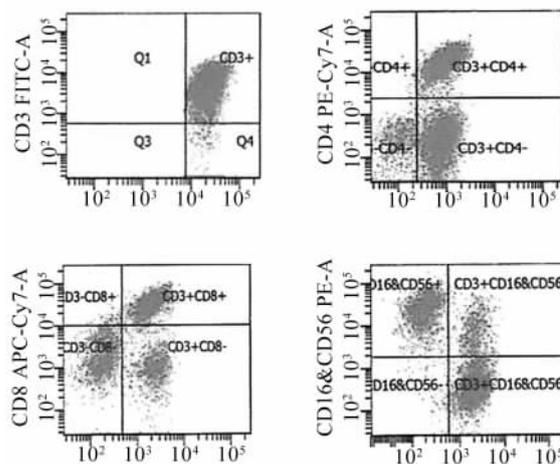


图 1 流式细胞术检测 CIK 细胞免疫表型

Fig.1 Immunophenotype of CIK cells checked by flow cytometry

### 2.2 CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用

贝伐单抗组、CIK 组及两者联用组均能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。CIK 联合贝伐单抗组的细胞增殖抑制率高于 CIK 组和贝伐单抗组[(71.12 ± 1.23)% vs (32.22 ± 2.34%), (27.86 ± 1.40)%, P < 0.05。且两药联用的细胞增殖抑制作用高于单

纯两组的叠加作用 ( $P < 0.05$ )。

表 1 CIK 细胞免疫表型变化 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Tab. 1 The change of immunophenotypes of CIK cells ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Immune phenotypes	Time (t/d)		
	1	7	14
CD3 <sup>+</sup>	62.24 ± 3.45	72.63 ± 5.35*	85.21 ± 4.74*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	40.60 ± 1.69	35.88 ± 2.86*	30.08 ± 3.09*
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	20.24 ± 2.05	34.02 ± 2.36*	42.5 ± 2.30*
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	2.17 ± 0.45	8.4 ± 1.7*	36.33 ± 2.58*

\*  $P < 0.05$  vs Day 1

### 2.3 CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞迁移抑制作用

划痕愈合实验结果显示,贝伐单抗组与 CIK 组 HepG2 细胞的划痕愈合率分别为 ( $60.50 \pm 9.73$ )%、( $55.07 \pm 6.27$ )%, NS 组的愈合率为 ( $80.79 \pm 9.41$ )%, CIK 及贝伐单抗联合用药组的愈合率为 ( $29.35 \pm 8.14$ )%。结果表明两单药组 HepG2 细胞的迁移能力低于 NS 组,联合用药组 HepG2 细胞的迁移能力明显低于 NS 组及两单药组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 CIK 联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞侵袭抑制作用

如图 2, Transwell 侵袭实验结果显示, CIK 细胞联合 bevacizumab 组穿过 Matrigel 胶及 Transwell 膜上小孔细胞数 [ $75.6 \pm 9.53$  个] 明显少于贝伐单抗组 [ $359.8 \pm 38.10$  个] 及 CIK 组 [ $304.8 \pm 45.73$  个],  $P < 0.01$ 。且两单药组穿过细胞数少于 NS 组 [ $521.6 \pm 66.7$  个],  $P < 0.05$ 。

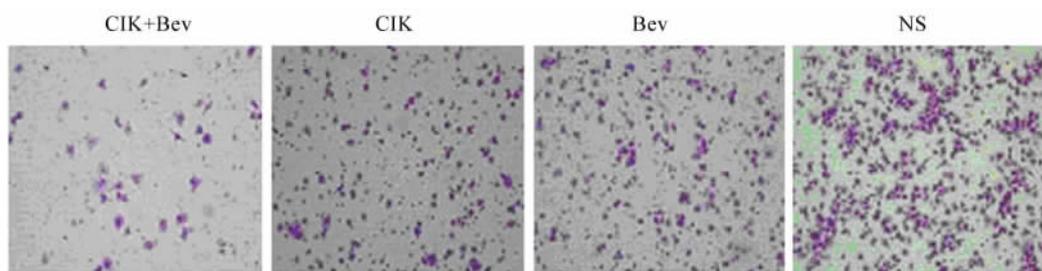


图 2 CIK 细胞单独或联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞侵袭的影响 ( $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of CIK cells combined with or without bevacizumab on HepG2 cells migration ( $\times 200$ )

### 2.5 CIK 细胞联合贝伐单抗影响肝癌 HepG2 信号通路中 Erk1/2 和 Akt 磷酸化水平

Western blotting 实验结果显示, CIK 细胞和贝伐单抗都能抑制 Erk1/2 和 Akt 的磷酸化, 而两者联合作用后, 抑制作用明显增强 (图 3)。

### 2.6 CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用

贝伐单抗可减慢移植瘤生长 ( $P < 0.05$ ), CIK 组存在减慢移植瘤生长趋势, 但差异无统计学意义; CIK 联合贝伐单抗给药组对移植瘤的抑制作用显著强于两者单药的效果 (图 4)。

不同分组的裸鼠给药后第 28 天处死, 然后分别取出肿瘤称重。不同分组的瘤体质量: NS 组为 ( $1.34 \pm 0.16$ ) g; CIK 组为 ( $0.89 \pm 0.08$ ) g; 贝伐单抗组为 ( $0.78 \pm 0.10$ ) g; CIK + 贝伐单抗组为 ( $0.50 \pm 0.18$ ) g。各个治疗组之间裸鼠的体重有明显差异, 给药组裸鼠瘤重与对照组相比明显减轻,

CIK 联合贝伐单抗组对瘤重增长抑制最显著。

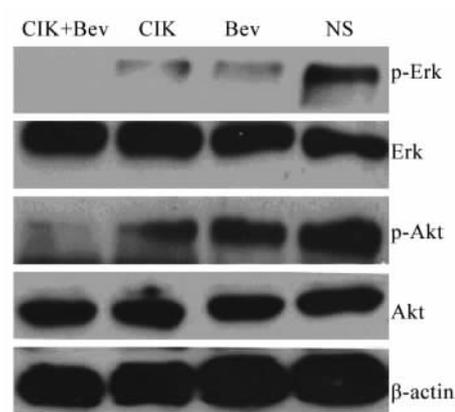
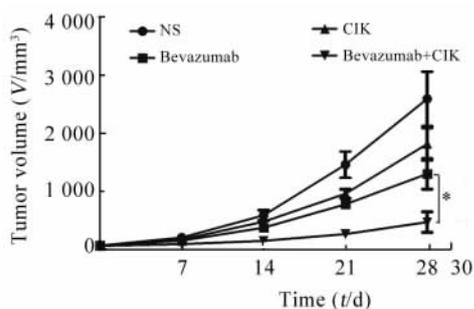


图 3 CIK 细胞和贝伐单抗单独或者联合对 HepG2 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化水平的影响

Fig. 3 Effect of CIK cells combined with or without bevacizumab on phosphorylation of Akt and Erk in HepG2 cells was determined by Western blotting



\* P < 0.05

图 4 CIK 细胞和贝伐单抗单独或联合治疗下裸鼠肝癌移植瘤的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of HepG2 cell xenografts in nude mice treated with CIK combined with or without bevacizumab

2.7 CIK 联合贝伐单抗对肝癌裸鼠移植瘤组织 MVD 及 Ki67 的影响

免疫组化结果(图 5, 表 2)显示, 生理盐水组肿瘤可见丰富的新生血管, 各给药组与生理盐水组相比 MVD 显著减少。而 CIK 联合贝伐单抗组瘤组织中的 MVD 减少最显著。生理盐水组的增值系数 Ki67 最高, 各给药组与生理盐水组相比 Ki67 阳性率较小, 而 CIK 联合贝伐单抗组瘤组织中的 Ki67 阳性率减少最显著(图 6, 表 2)。

表 2 贝伐单抗联合 CIK 细胞对移植瘤组织 MVD 以及 Ki67 的影响( n = 4 )

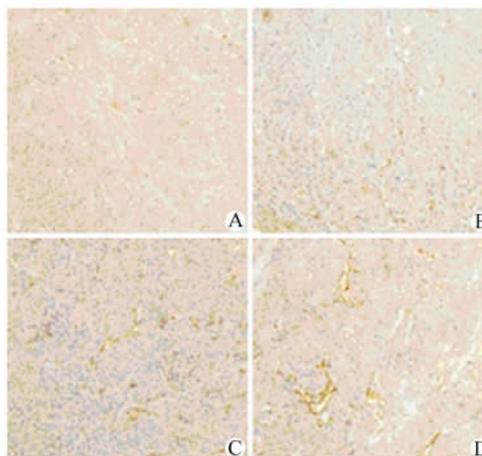
Tab. 2 Effect of CIK combining with or without bevacizumab on MVD and Ki67 of implanted tumor( n = 4 )

Group	MVD	Ki67( % )
NC	21.93 ± 3.12	77.14 ± 6.35
Bevacizumab	16.42 ± 2.57**	58.32 ± 5.41**
CIK	18.43 ± 3.42*	69.71 ± 3.49*
Bevacizumab + CIK	9.15 ± 2.62***##	42.30 ± 5.53***##

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs NC group; ## P < 0.01 vs

Bevacizumab group

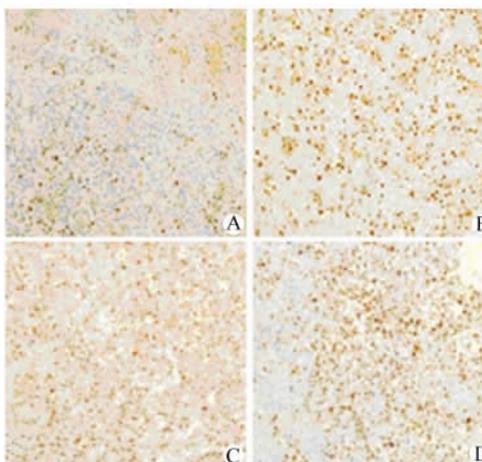
重要临床意义。目前尚未见文献报道 CIK 联合贝伐单抗治疗肝癌的研究, 本研究组采用二者联合培养 HepG2 细胞, 发现两药对 HepG2 细胞具有协同抑制作用。



A: CIK + Bevacizumab; B: Bevacizumab; C: CIK; D: NS

图 5 联合用药组的 MVD 较其他 3 组更低( × 200 )

Fig. 5 MVD in combination group was lower than that in the other 3 groups ( × 200 )



A: CIK + Bevacizumab; B: Bevacizumab; C: CIK; D: NS

图 6 联合用药组的 Ki67 阳性染色更明显( × 200 )

Fig. 6 Positive staining of Ki67 in combination group was more significant ( × 200 )

3 讨论

尽管肝癌的诊治取得了较大的进展, 但疗效仍较差<sup>[1]</sup>。肝癌切除术后 5 年生存率为 24% ~ 50%, 肝移植术后 5 年生存率也仅为 47% ~ 61%<sup>[9-10]</sup>, 介入栓塞术是治疗晚期肝癌患者的首选方式, 但仍未明显改善其预后。因此, 寻求新的治疗方案具有

免疫治疗在肿瘤的综合治疗中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。肝癌患者多伴有免疫缺陷, 容易致使肿瘤转移、复发。CIK 细胞不仅可以直接杀伤残余癌细胞, 而且可以通过分泌炎症细胞因子 IL-2、IL-6 和 IFN 改善肝癌患者免疫功能<sup>[12-14]</sup>。肿瘤起始细胞或肿瘤干细胞是肝癌不良预后的重要原因之一, CIK 细

胞可清除肿瘤起始细胞<sup>[15]</sup>,对体内外肝癌干细胞具有强效杀伤活性,与杀伤普通肝癌细胞的效果相当<sup>[16]</sup>。CIK 细胞治疗可降低 TACE 术和 RFA 治疗前行抗病毒治疗患者的乙肝病毒激活率,提高乙型或者丙型肝炎相关的肝癌患者的无病生存率<sup>[17-18]</sup>。DC-CIK 联合 TACE 治疗肝癌效果优于 TACE 单独治疗<sup>[19]</sup>。肝癌切除术后辅助 CIK 生物治疗可以改善患者预后<sup>[20-21]</sup>。

Bevacizumab 是一类人源化的抗 VEGF 单抗隆抗体,可特异性阻断 VEGF 与 VEGFR 结合。肿瘤新生血管迂曲、膨胀,内皮细胞间隙增宽,形态异常并突入官腔,血管泄露增加,导致血流紊乱、代谢物淤积,阻碍药物输送及免疫细胞的迁移。癌细胞过量分泌 VEGF 诱导新生血管形成,其管壁不完整,通透性高,为癌细胞的转移创制了条件。抗 VEGF 治疗可以降低新生血管的通透性<sup>[22]</sup>,阻碍癌细胞扩散。异常新生血管导致的肿瘤组织内酸性环境,酸性环境抑制 CIK 细胞抗肿瘤的活性<sup>[23]</sup>。贝伐单抗促进肿瘤血管正常化,改善肿瘤局部缺氧情况,减轻酸性代谢物瘀滞,利于 CIK 细胞的输送<sup>[24]</sup>。此外,bevacizumab 可降低肿瘤组织的血管密度,阻碍肝癌细胞的生长,转移和侵袭所需的营养供应<sup>[25]</sup>。

总之,本研究证实 bevacizumab 与 CIK 联合应用可有效抑制人肝癌细胞 HepG2 的生长,其抑制作用大于 bevacizumab 与 CIK 单药的作用。CIK 和 bevacizumab 可有效抑制肝癌细胞增殖及新生血管生成、迁移和诱导凋亡。该结果为 CIK 联合分子靶向治疗作为一种联合应用方案治疗肝癌提供新的思路。目前本研究 CIK 联合 bevacizumab 抑制肝癌仅仅是在细胞和动物水平的效果。其具体联合作用机制及临床疗效,有待大量基础及临床多中心实验研究证实。

## [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] RAMPONE B, SCHIAVONE B, MARTINO A, et al. Current management strategy of hepatocellular carcinoma[ J ]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15( 26 ): 3210-3216. DOI: 10.3748/wjg.15.3210.

[ 2 ] FERRARA N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy[ J ]. *Oncologist*, 2004, 9( Suppl 1 ): 2-10. DOI: 10.1634/theoncologist.9-suppl\_1-2.

[ 3 ] CARMELIET P, JAIN R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[ J ]. *Nature*, 2011, 473( 7347 ): 298-307. DOI: 10.1038/nature10144.

[ 4 ] YUN Y S, HARGROVE M E, TING C C. In vivo antitumor activity of anti-CD3-induced activated killer cells[ J ]. *Cancer Res*, 1989, 49( 17 ): 4770-4774.

[ 5 ] LU P H, NEGRIN R S. A novel population of expanded human CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency[ J ]. *J Immunol*, 1994, 153( 4 ): 1687-1696.

[ 6 ] AVELLO J, VAN DE VEN C, CAIRO E, et al. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: implications for adoptive cellular immunotherapy[ J ]. *Exp Hematol*, 2009, 37( 10 ): 1216-1229. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.07.009.

[ 7 ] LINN Y C, LAU S K, LIU B H, et al. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell[ J ]. *Immunology*, 2009, 126( 3 ): 423-435. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02910.x.

[ 8 ] OLSSON A K, DIMBERG A, KREUGER J, et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function[ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7( 5 ): 359-371. DOI: 10.1038/nrm1911.

[ 9 ] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[ J ]. *Gastroenterology*, 2007, 132( 7 ): 2557-2576. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.

[ 10 ] SCHUTTE K, BORNSCHEIN J, MALFERTHEINER P. Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors[ J ]. *Dig Dis*, 2009, 27( 2 ): 80-92. DOI: 10.1159/000218339.

[ 11 ] ZHANG L, ZHAO G, HOU Y, et al. The experimental study on the treatment of cytokine-induced killer cells combined with EGFR monoclonal antibody against gastric cancer[ J ]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29( 3 ): 99-107. DOI: 10.1089/cbr.2012.1381.

[ 12 ] WENG D S, ZHOU J, ZHOU Q M, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[ J ]. *J Immunother*, 2008, 31( 1 ): 63-71. DOI: 10.1097/CJI.0b013e31815a121b.

[ 13 ] ZHOU P, LIANG P, DONG B, et al. Phase clinical study of combination therapy with microwave ablation and cellular immunotherapy in hepatocellular carcinoma[ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11( 5 ): 450-456. DOI: org/10.4161/cbt.11.5.14669.

[ 14 ] SHI M, ZHANG B, TANG Z R, 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. DOI: 10.3748/WJG.v10.i8.1146.

[ 15 ] RONG X, WEI F, LI A, et al. Effective activity of cytokine induced killer cells against hepatocellular carcinoma including tumor-initiating cells[ J ]. *Med Hypotheses*, 2015, 84( 3 ): 159-161. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.08.022.

[ 16 ] RONG X X, WEI F, LIN X L, et al. Recognition and killing of cancer stem-like cell population in hepatocellular carcinoma cells by cytokine-induced killer cells via NKG2D-ligands recognition [ J ]. *Oncoimmunology*, 2016, 5( 3 ): e1086060. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1086060.

[ 17 ] 潘国政,徐教邦,郝龙,等. 射频消融及肝动脉化疗栓塞术后杀

- 伤细胞回输对肝癌患者预后的影响[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(9): 689-692. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.09.005.
- [18] WANG H, LIU A, BO W, et al. Adjuvant immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma patients after curative resection, a systematic review and meta-analysis[J]. Dig Liver Dis, 2016, 48(11): 1275-1282. DOI: 10.1016/j.dld.2016.07.010.
- [19] HE G, ZHENG C, HUO H, et al. TACE combined with dendritic cells and cytokine-induced killer cells in the treatment of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J/OL]. Int Immunopharmacol, 2016, 40: 436-442[2016-12-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576916303897>. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.09.015.
- [20] XU L, WANG J, KIM Y, et al. A randomized controlled trial on patients with or without adjuvant autologous cytokine-induced killer cells after curative resection for hepatocellular carcinoma[J/OL]. Oncoimmunology, 2016, 5(3): e1083671[2016-12-10]. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402x.2015.1083671>. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1083671.
- [21] LEE J H, LEE J H, LIM Y S, et al. Adjuvant immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2015, 148(7): 1383-1391. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.02.055.
- [22] GOEL S, WONG A H, JAIN R K. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease[J/OL]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(3): a6486[2016-12-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC32821093>. DOI: 10.1101/cshperspect.a006486.
- [23] YUAN Y H, ZHOU C F, YUAN J, et al. NaHCO<sub>3</sub> enhances the antitumor activities of cytokine-induced killer cells against hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3167-3174. DOI: 10.3892/ol.2016.5112.
- [24] TAO L, HUANG G, SHI S, et al. Bevacizumab improves the anti-tumor efficacy of adoptive cytokine-induced killer cells therapy in non-small cell lung cancer models[J/OL]. Med Oncol, 2014, 31(1): 777[2016-12-10]. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12032-013-0777-3>. DOI: 10.1007/s12032-013-0777-3.
- [25] SIEGEL A B, COHEN E I, OCEAN A, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(18): 2992-2998. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.9947.
- [收稿日期] 2016-12-13 [修回日期] 2017-02-21  
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》“转化医学”栏目征稿启事

转化医学(translational medicine)是近年国际医学领域出现的新热潮,是实验研究与临床研究双向转化(bench to bedside and bedside to bench)的研究体系,转化医学为基础研究和临床医疗之间架起了桥梁,从而把基础医学研究的最新成果快速、有效地转化为临床疾病诊治的药物、技术和手段,有力地推动医学科学的发展。

为了顺应转化医学的发展热潮,为我国广大肿瘤防治工作者提供有关“转化医学”信息传播和学术交流的平台,促进转化医学在肿瘤学领域的发展,本刊特开辟“转化医学”新栏目,并向广大肿瘤防治工作者征集“转化医学”相关稿件。

本刊“转化医学”栏目文稿内容包括以下几个方面:

- (1)宣传“转化医学”的观念、理论、研究体系、研究模式和方法、发展趋势等;
- (2)讨论我国肿瘤学领域深入开展“转化医学”研究的策略和措施;
- (3)介绍国外肿瘤学领域“转化医学”发展的新闻、成功案例和发展动向;
- (4)我国作者肿瘤学领域“转化医学”的研究成果和经验体会;
- (5)与“转化医学”有关的在肿瘤学领域有发表价值的其他文稿。

“转化医学”文稿的写作格式要求,如果是(4)类中的原创性研究成果文稿,格式同本刊论著(基础研究和临床研究);如果是(1)、(2)、(3)和(5)类的文稿,格式类似于本刊的综述,篇幅在5000字以内,附中文摘要(报道式、非结构式),文内图表用中文表达,参考文献应精选最主要的20篇左右。文稿的文字力求简洁明了、通顺流畅、层次清楚、重点突出。如文稿有新颖性,可进入本刊快速发表通道,在3个月左右发表。

(本刊编辑部)