

癌痛消方调节 NK 细胞治疗肝细胞癌的机制研究

彭丽珊,刘欢,刘显

(广西中医药大学广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室,广西南宁 530200)

摘要:目的 观察 NK1.1 及 CD96、CD95、PD-1 在小鼠肝癌组织中的表达,探讨癌痛消方对肝癌 NK 细胞的影响。**方法** 利用 C57BL/6小鼠构建 H22 原位肝癌模型,并随机分为模型组、癌痛消方低、中、高剂量组、索拉菲尼组,6 只/组,癌痛消方组给予不同剂量癌痛消方水煎剂灌胃治疗,索拉菲尼组予索拉菲尼灌胃治疗,模型组给予同等体积生理盐水灌胃。通过流式细胞术检测各组小鼠肿瘤组织 NK 细胞及其 CD96、CD95、PD-1 的表达频率。**结果** 与模型相比,癌痛消方低、中、高剂量组、索拉菲尼组 NK1.1 表达显著升高,CD96 表达显著降低,癌痛消方中、高剂量组 PD-1 表达显著降低。**结论** 癌痛消方可促进 NK 细胞向肝癌组织浸润并促进其细胞杀伤功能。

关键词:癌痛消方; 肝细胞癌; NK 细胞; 免疫调节

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A

The Mechanism of Aitongxiao Formula Regulating NK Cell Therapy for Hepatocellular Carcinoma

PENG Lishan, LIU Huan, LIU Xian

(Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530200, China)

Abstract:**Objective** To observe the expressions of NK1.1, CD96, CD95, and PD-1 in mouse liver cancer tissues and to explore the effect of Aitongxiao Formula on liver cancer NK cells. **Methods** A H22 in situ liver cancer model was constructed using C57BL/6 mice and study subjects were randomly divided into different model groups: low-, medium-, and high-dose groups of Cancer Pain Formula, and Sorafenib group, with 6 mice per group. The Cancer Pain Formula group was treated with different doses of Cancer Pain Formula decoction by gavage, while the Sorafenib group was treated with Sorafenib by gavage, and the model group was treated with the same volume of physiological saline by gavage. We detected the expression frequency of NK cells and levels of CD96, CD95, and PD-1 in tumor tissues of mice in each group by flow cytometry. **Results** Compared with the model group, the expression of NK1.1 was significantly increased in the low-, medium-, and high-dose groups of the Aitongxiao Formula and the Sorafenib group, while the expression of CD96 was significantly decreased. The expression of CD95 was significantly decreased in the medium- and high-dose groups of the Aitongxiao Formula. **Conclusion** Cancer Pain Relief Formula can increase the infiltration rate of NK cells in liver cancer tissue, enhance killing ability, and inhibit Fas mediated apoptosis.

Key words:Aitongxiao formula; Hepatocellular carcinoma; NK; Immune regulation

肝癌是癌症相关死亡的 3 大原因之一^[1],约 90% 的肝癌在组织学上被定义为肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma,HCC)^[2]。由于无明显早期症状,约 80% 的 HCC 患者会快速进展进入中晚期而失去了根治性手术切除的机会。目前尚无预后良好的 HCC 晚期治疗方案^[3]。多靶点激酶抑制剂索拉非尼是获 FDA 批准可用于治疗晚期 HCC 的有效药物^[4],但肿瘤细胞、基质细胞、细胞外基质构成肿瘤微环境 (tumor

microenvironment, TME)错综复杂的特殊生物学特征,导致仍有相当数量的 HCC 患者会产生耐药性^[5]。

自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)杀伤活性不受 MHC 限制,不依赖抗体,是宿主非抗原依赖性肿瘤免疫应答的重要组成部分。一方面, NK 细胞识别靶细胞后分泌释放颗粒酶、穿孔素、NK 细胞毒因子发挥直接杀伤作用;另一方面, NK 细胞分泌多种细胞因子和趋化因子募集 T 细胞、巨噬细胞等免疫细胞激活适应性免疫应答。而 T 细胞分泌的白细胞介素-2、干扰素- γ 等细胞因子可进一步促进 NK 细胞增殖,增强 NK 细胞活性。NK 细胞和 T 细胞功能耗竭会导致机体无法产生有效的抗肿瘤反应,加剧癌症进展^[6]。在以免疫检查点抑制剂为代表的免疫疗法中, NK 细胞的杀伤作用及其与 T 细胞之间的相互作用对设计更有效的癌症治疗策略至关重要^[7]。改善 NK 细胞耗竭是治疗 HCC 的关键。

癌痛消方是根据肝癌发生的“毒”、“瘀”、“虚”的病机,在清代王清任“膈下逐瘀汤”基础上辨证加减而成。具有清热解毒、化瘀散结、健脾益气之功效,切合肝癌发病机制。能明显改善肝癌患者的临床症状、提高生存质量^[8-9]。癌痛消方作为中药复方,其组份复杂,具有多靶点、多效应的特点,在抑制肿瘤和免疫调节方面具有独特优势。本研究探索癌痛消方对肝癌组织 NK 细胞的表达频率和白细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)96、CD95、程序性死亡受体 1(programmed death-1, PD-1)的影响,为中医药调节肿瘤微环境的作用机制提供数据支撑。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 无特定病原体级 C57BL/6 小鼠 33, 雄性, 6~8 周龄, 体重 20 ± 2 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 生产许可证号: SCXK(京)2016-0006, 检疫合格证号 N0.110324230100502216), 饲养环境温度 $22 \sim 26^\circ\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 60\%$ 。实验方案经广西中医药大学动物伦理委员会审批同意, 批准号: DW20211228-569。

1.2 药物与试剂 癌痛消方: 白花蛇舌草 20g、半枝莲 15g、解毒草 20g、煅牡蛎 30g、元胡 20g、香附 10g、党参 10g、黄芪 20g、绞股蓝 12g、三棱 10g、莪术 10g、炙甘草 10g, 水煎; 甲苯磺酸索拉菲尼(重庆药友制药责任有限公司, 批号: 23071730); H22 小鼠肝癌细胞株由广西中药药效研究重点实验室赠予; 淋巴细胞

分离液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号: P8620), 荧光素标记单克隆抗体 Anti-mouse CD45 AlexaFluor700(Biolegend 公司, 美国, 货号: 103128), Anti-mouseCD3 PerCP-cy5.5(Biolegend 公司, 美国, 货号: 100218), Anti-mouse NK1.1 PE(Biolegend 公司, 美国, 货号: 108707), Anti-mouse CD95 FITC(Biolegend 公司, 美国, 货号 152606), Anti-mouse CD96 Brilliant Violet650(BD 公司, 美国, 货号: 743880), Anti-mouse PD-1 PE-cy7(Biolegend 公司, 美国, 货号: 109110), ZombieYellow(Biolegend 公司, 美国, 货号: 423104), PBS 磷酸盐缓冲液(福州迈新公司, 中国, 货号: PBS-0060)。

1.3 仪器 可调微量移液器(Eppendorf 公司, 德国, 型号: Research plus), 台式低速离心机(湘仪公司, 中国, 型号: TD5A-WS), 光学显微镜(Leica 公司, 德国, 型号: dm750), 流式细胞仪(Beckman-Coulter 公司, 美国, 型号: CytoFlex S)。

2 方法

2.1 建立模型及分组 将 33 只 C57BL/6 小鼠肝脏注射 1×10^5 cells 小鼠肝癌细胞 H22 细胞建立小鼠原位移植性肝癌模型^[10]。随机抽取 3 只 7d 后进行解剖, 接种部位见肿瘤结节视为模型制作成功。剩余 30 只随机分为模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 索拉菲尼组, 6 只/组。

2.2 给药方法 癌痛消方经水煎浓缩。参考《药理实验方法学》, 以人临床用量按表面积折算的等效剂量为小鼠中剂量, 以中剂量的 2 倍为高剂量, 以中剂量的 1/2 为低剂量, 每日给药 2 次。癌痛消方组给予不同剂量癌痛消方水煎剂灌胃治疗, 索拉菲尼组予索拉菲尼溶液灌胃治疗, 模型组给予同等体积生理盐水灌胃。

2.3 标本的采集与处理 连续灌胃 14d 后摘眼球采血后断颈处死, 收集研磨肿瘤组织, 通过密度梯度法分离制备为细胞浓度为 1×10^8 cells/mL 的单个核细胞悬液。

2.4 流式细胞术检测 取 $100\mu\text{L}$ 制备好的单个核细胞悬液, 分别加入 Anti-mouse CD45 AlexaFluor700、Anti-mouse CD3 PerCP-cy5.5、Anti-mouse NK1.1 PE、Anti-mouse CD95 FITC、Anti-mouse CD 96 Brilliant Violet650、Anti-mouse PD-1 PE-cy7、ZombieYellow 适量, 4°C 下避光孵育 30min, 加入 $500\mu\text{L}$ PBS, $600g$ 水平离心 4min 洗去未结合抗体。用 CytoFLEX 型流式细胞仪检测样本, CytExpert 软件进行流式数据分析。

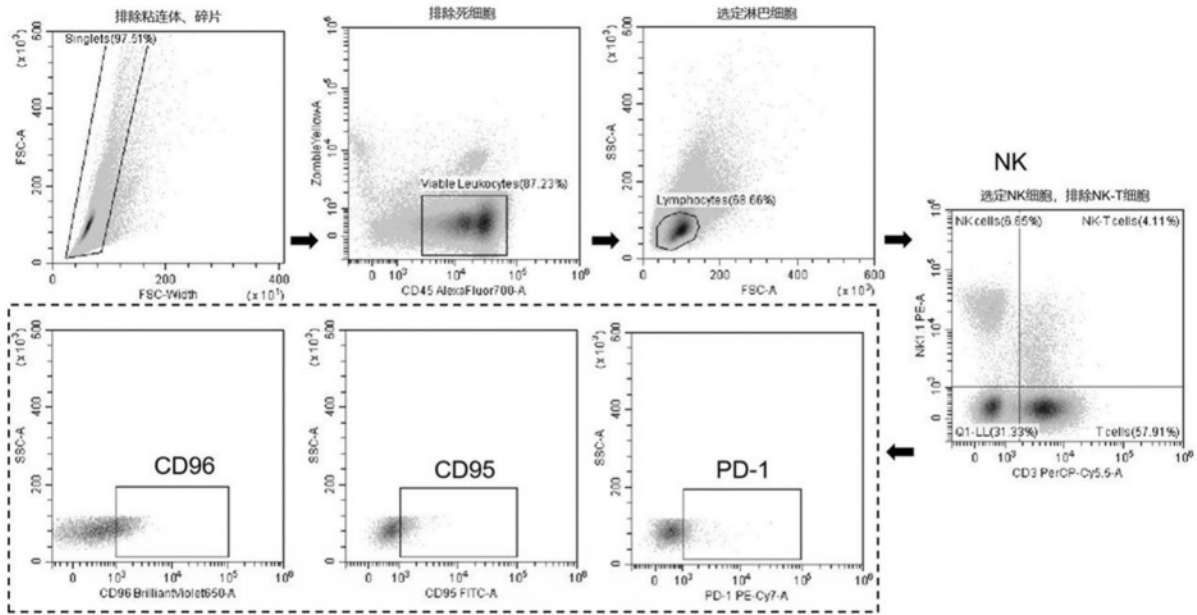


图1 检测指标流式设门策略

2.5 设门策略 CytExpert 软件进行流式数据分析 通过前向散射光、侧向散射光参数去除粘连细胞和碎片,根据细胞大小圈定单个核细胞,使用 ZombieYellow 染料区分死活细胞,以 CD45 标记白细胞,NK1.1 阳性标记 NK 细胞,CD3⁻ 阴性排除其中 NK-T 细胞,再分别从 NK 细胞上分别设门标记 CD96、CD95、PD-1 阳性细胞群。

3 统计学处理 采用 Graphpad prism 9.0 软件分析实验数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据之

间采用 Ordinary one way ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1 癌痛消方对小鼠肿瘤组织 NK 细胞表达频率的影响

与模型组相比较,低剂量组肿瘤组织 NK1.1 表达频率差异无统计学意义($P > 0.05$),中剂量组、高剂量组、阳性对照组肿瘤组织 NK1.1 表达频率显著升高(均 $P < 0.05$)。结果见图 2、表 1。

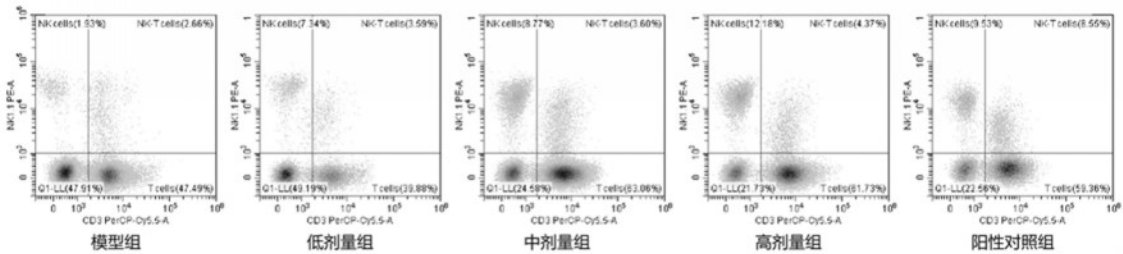


图2 肿瘤组织 NK 细胞表达

2 癌痛消方对小鼠肿瘤组织 NK 细胞 CD96 表达水平的影响 与模型组相比较,低剂量,中剂量组、高剂量组、

阳性对照组肿瘤组织 NK 细胞上 CD96 表达水平显著下降(均 $P < 0.05$)。结果见图 3、表 1。

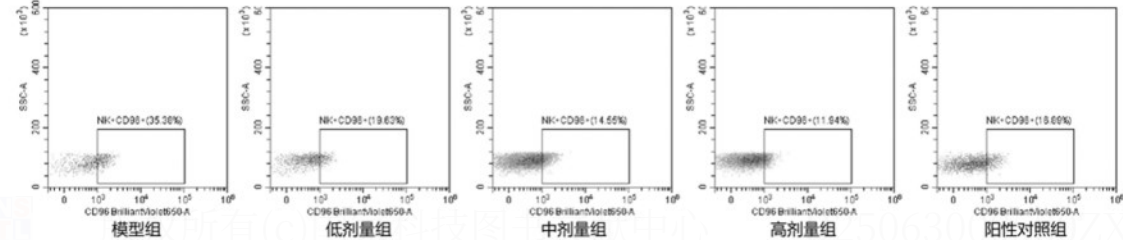


图3 肿瘤组织 NK 细胞 CD96 表达

3 癌痛消方对小鼠肿瘤组织 NK 细胞 CD95 表达水平的影响

与模型组相比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组、

阳性对照组肿瘤组织 NK 细胞上 CD95 表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图 4、表 1。

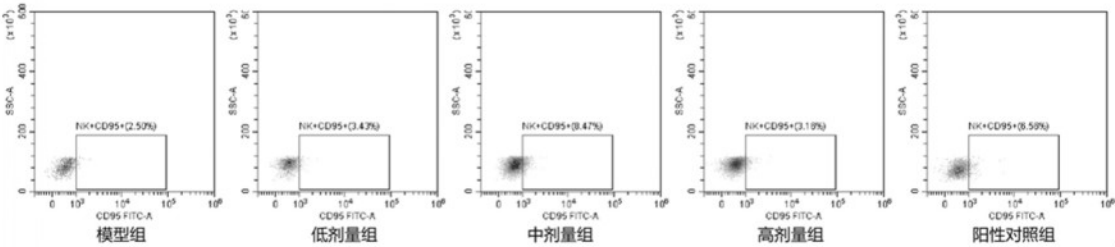


图 4 肿瘤组织 NK 细胞 CD95 表达

4 癌痛消方对小鼠肿瘤组织 NK 细胞 PD-1 表达水平的影响

与模型组相比较,中剂量组、高剂量组肿瘤组织

NK 细胞上 PD-1 表达水平显著下降(均 $P<0.05$),低剂量组、阳性对照组 NK 细胞上 PD-1 表达水平差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。结果见图 5、表 1。

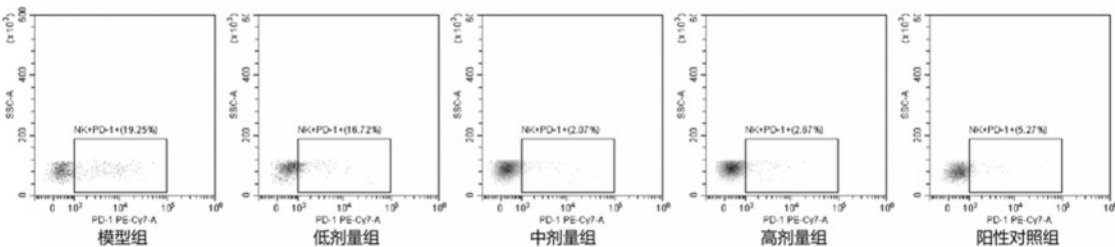


图 5 肿瘤组织 NK 细胞 PD-1 表达

表 1 癌痛消方对 TME 中 NK1.1、CD96、CD95、PD-1 表达(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	NK1.1	CD96	CD95	PD-1
模型组	6	3.263±1.707	23.750±9.180	2.812±3.852	14.500±3.276
低剂量组	6	4.957±1.431	12.960±4.738*	3.505±3.208	10.710±7.594
中剂量组	6	7.902±0.934*	12.350±2.9881**	14.120±10.330	3.163±2.0251**
高剂量组	6	8.722±3.892*	14.270±2.749*	10.780±20.940	4.815±3.7701**
阳性对照组	6	9.100±3.921**	11.806±4.1901**	25.940±22.270	8.157±2.694

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

近年来,诸中医药在防治肿瘤方面的优势日益凸显,尤其是配合现代医学手段在恶性肿瘤治疗领域取得了良好的成效。癌痛消方不但在临床应用上疗效显著,动物实验研究显示其具有免疫调节功能:癌痛消方可降低肿瘤疼痛模型大鼠血清中细胞因子白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 表达^[11];癌痛消方核心靶点为京都基因与基因组百科全书富集 TME 关键效应分子肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6,并通过大鼠移植性肝癌模型证实能抑制肝内瘤体生长^[12]。基于癌痛消方展现出来治疗 HCC 的巨大潜力,明确其免疫调节机制对制定 HCC 临床综合治疗方案具有迫切的现实意义。本研究通过制备小鼠原位移植性肝癌模型,以 NK 细胞为切入点观察癌痛

消方对 HCC TEM 的影响。

NK 细胞是固有免疫细胞的主要成分之一,其主要分化抗原特征为高表达 CD56,不表达 CD3。受肝细胞和 Kupffer 细胞分泌的细胞因子激活,杀灭肝脏中的肿瘤细胞和病毒,并通过消除肝星状细胞抑制肝脏的纤维化。在 HCC 发生过程中,肝脏 CD56 阳性细胞表达频率表达升高,活化标志物 CD49A 的表达增强^[13],提示 NK 细胞在肝脏肿瘤发生过程中发挥关键作用。然而,在 TEM 慢性炎症、免疫抑制的特殊环境中,NK 细胞表达频率降低、功能衰竭、细胞因子分泌减少,导致肿瘤免疫逃逸^[14-16]。基因表达谱数据显示,HCC 组织中 NK 细胞丰度低于邻近的正常组织,其丰度与 CD96、CD279、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 等编码免疫检查点蛋白基因相关^[17]。寻找恢复

NK 细胞抗肿瘤免疫功能的药物,是开发 HCC 治疗方案的思路之一。实验结果显示中、高剂量组 HCC 组织中 CD45 阳性 NK1.1 阳性 CD3 阴性细胞群的表达频率显著升高,提示癌痛消方治疗可促进 NK 细胞向肿瘤组织浸润。

除表达频率外,NK 细胞抗肿瘤效应还与其功能和状态有关。单细胞数据显示,肿瘤组织中的 NK 细胞和 T 细胞耗竭亚群患者预后不良,与促进肿瘤进展密切相关^[18]。我们进一步检测了肿瘤组织 NK 细胞活化耗竭相关抗原表位,以探讨分析癌痛消方对 NK 细胞的调节机制。CD96 是一种 I 型跨膜糖蛋白免疫球蛋白超家族受体,在静止的 NK 细胞上低表达,在活化的 NK 细胞上高表达。作为一种共抑制受体,CD96 与肿瘤细胞表面的 CD155 结合会限制 NK 细胞效应功能。肿瘤组织 CD96 表达较高的患者临床结果较差^[16],具有作为治疗靶点的潜力。研究结果显示高中低剂量,中剂量组、高剂量组、阳性对照组肿瘤组织 NK1.1 阳性 CD96 阳性表达水平显著下降,提示癌痛消方和索拉非尼均可促进 NK 细胞杀伤功能。CD95 是 Fas 基因编码的 I 型跨膜蛋白,CD95 配体与靶细胞上的 CD95 结合是触发细胞凋亡的重要机制。NK 细胞表面高表达 CD95 配体可诱导 HCC 细胞凋亡^[19]。索拉非尼抑制肝细胞增殖诱导肝细胞凋亡与 CD95 蛋白质巯基亚硝基化有关^[20]。反之,癌细胞也可以利用 CD95/CD95 配体作用逃避机体免疫监视,促进肿瘤增殖、侵袭、迁移。实验结果显示,各组间 NK 细胞 CD95 表达无差异,提示 CD95/CD95 配体介导的非经典信号通路不参与调节 TME 中的 NK 细胞。PD-1 为 CD28 超家族成员,是一种重要的免疫检查点分子。肿瘤细胞高表达 PD-1 配体 PD-L1(programmed death ligand 1,PD-L1)抑制淋巴细胞功能。利用抑制剂阻断 PD-1/PD-L1 信号通路恢复免疫细胞活性被广泛应用于治疗多种肿瘤。在小鼠体内模型中,阻断 PD-1/PD-L1 途径可改善 NK 细胞增殖能力和杀伤能力^[21]。实验结果显示,中剂量组、高剂量组肿瘤组织 NK1.1 阳性 PD-1 阳性表达水平显著下降,提示中、高剂量癌痛消方可能具有促进 NK 细胞抗肿瘤活性和增殖能力的功能。

总而言之,本研究发现癌痛消方和索拉非尼均可以提高 HCC 小鼠肿瘤组织 NK 细胞浸润,促进 NK 细胞杀伤功能。此外,中高剂量的癌痛消方还可下调 NK 细胞 PD-1 的表达。研究结果可为癌痛消方临床应用提供实验依据。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021,7(1):6.
- [3] GANESAN P, KULIK L M. Hepatocellular carcinoma: new developments[J]. Clin Liver Dis, 2023,27(1):85-102.
- [4] PECK-RADOSAVLJEVIC M, LENCIONI R, OZGURDAL K, et al. P-80 Sorafenib in extended patient populations in real-world clinical practice: Baseline characteristics from OPTIMIS and GIDEON[J]. Ann Oncol, 2024,32(1):124-125.
- [5] JU M, JIANG L, WEI Q, et al. A immune-related signature associated with TME can serve as a potential biomarker for survival and sorafenib resistance in liver cancer[J]. Onco Targets Ther, 2021,20(14):5065-5083.
- [6] LOU C, WU K, SHI J, et al. N-cadherin protects oral cancer cells from NK cell killing in the circulation by inducing NK cell functional exhaustion via the KLRG1 receptor[J]. J Immunother Cancer, 2022,10(9):e005061.
- [7] SIVORI S, PENDE D, QUATRINI L, et al. NK cells and ILCs in tumor immunotherapy[J]. Mol Aspects Med, 2021,80(8):100870.
- [8] 唐秋媛,韦艾凌,潘哲,等.癌痛消方联合肝动脉栓塞化疗治疗中晚期肝癌患者的临床疗效观察[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):906-908.
- [9] 林元佳,韦艾凌,张永琴,等.射频消融术联合癌痛消颗粒改善中晚期原发性肝癌患者生存质量的临床疗效分析[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):909-910.
- [10] 罗晓琴,丁冠茗,郑旭,等.小鼠肝癌原位移植性肿瘤动物模型的改良[J]. 中国比较医学杂志,2021,31(6):16-22.
- [11] MAO M, LI Y, WANG L, et al. Aitongxiao improves pain symptoms of rats with cancer pain by reducing IL-1, TNF- α , and PGE2[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2021,14(1):133-139.
- [12] 刘欢,刘显,金丽杰,等.基于网络药理学和大鼠移植性肝癌模型探讨癌痛消颗粒防治肝癌的分子作用机制[J]. 海南医学院学报,2023,29(21):1632-1641.
- [13] SUN H, LIU L, HUANG Q, et al. Accumulation of tumor-Infiltrating CD49a+ NK cells correlates with poor prognosis for human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Immunol Res, 2019,7(9):1535-1546.
- [14] ZECCA A, BARILI V, OLIVANI A, et al. Targeting stress 2sensor kinases in hepatocellular carcinoma-infiltrating human NK cells as a novel immunotherapeutic strategy for liver cancer[J]. Front Immunol, 2022,13(4):875072.
- [15] SUN, H, KIM, E, RYU, J, et al. TM4SF5-mediated liver malignancy involvesNK cell exhaustion-like phenotypes[J]. Cell Mol Life Sci, 2021,79(1):49.
- [16] SUN H, HUANG Q, HUANG M, et al. Human CD96 correlates to natural killer cell exhaustion and predicts the prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2019,70(1):168-183.

离心时血清红细胞分离不良,影响血液的正常分离,使血液检测时出现异常分离现象^[13-14]。②Ig:MM的发生会产生大量的免疫球蛋白,而免疫球蛋白可抑制抗凝血酶活性,降低血细胞黏附性及干扰纤维蛋白原的聚合,影响血凝块回缩,继而离心出现血液异常分离。此外免疫球蛋白异常增多可增加血液黏稠度,增加血液分离难度,导致上层血清量肉眼可见的减少,出现血液异常分离情况^[15-16]。③Hb、Hct:Hb、Hct均为评估人体营养状态的有效指标,当机体Hb、Hct浓度降低时,提示患者可能存在严重的贫血状况,而贫血伴随着红细胞生成减少及红细胞破坏,导致血清密度相对增加及红细胞分离不良情况,出现血液异常分离^[17-18]。④ β_2 -MG:其是构成细胞膜表面HLA的关键成分,它的表达能反应MM细胞的生长活力,并能反映肿瘤的负载状况。所以,更高的 β_2 -MG含量,提示MM患者肿瘤负荷加重,病情严重,而MM随着病情的进展会促进免疫球蛋白异常分泌,继而影响纤维蛋白原聚合,影响血凝回缩,出现血液异常分离情况。因此MM患者血液异常分离是TP、Ig、Hb、Hct等多种因素综合作用的结果,临床血液检测过程中若发现出现血液异常分离时,应考虑患者是否可能存在MM,以进一步进行诊断治疗。

综上所述,MM患者存在血液异常分离情况,可能受MM患者自身TP、Ig、Hb、Hct、 β_2 -MG等多因素的影响,故MM患者血液异常分离则提示患者存在高TP、Ig、 β_2 -MG,并可能伴有严重的贫血,可为临床MM早期诊治提供有效参考依据。

参考文献

[1] 余胜,郑磊,张鹏.血清球蛋白对多发性骨髓瘤的筛查价值[J].中国实验诊断学,2020,24(3):445-446.

[2] VARGA C,LAUBACH J P,ANDERSON K C,et al. Investigational agents in immunotherapy: A new horizon for the treat-

ment of multiple myeloma[J].Br J Haematol,2018,181(4):433-446.

[3] 张凯旋,蒋端凤,李晓鹏,等.157例多发性骨髓瘤患者预后因素分析及分期评价[J].实用医学杂志,2019,35(14):2238-2242.

[4] 何磊.1例多发性骨髓瘤的实验室诊断[J].检验医学与临床,2009,6(6):464-465.

[5] 张靖宇,范洪,张静,等.不同血液分离结果的多发性骨髓瘤患者临床特征及预后分析[J].中国实验血液学杂志,2020,28(2):547-552.

[6] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015年修订)[J].中华内科杂志,2015,54(12):1066-1070.

[7] 吴一狄,王海鹏,王金英,等.多发性骨髓瘤早期发现的实验室研究探讨[J].标记免疫分析与临床,2019,26(5):803-805.

[8] 何剑,秦凯伟.12例多发性骨髓瘤误诊为高血压并肾损害的临床表现分析[J].空军医学杂志,2019,35(5):418-421.

[9] 褚娜利,范洪,郭丽,等.多发性骨髓瘤患者血液异常分离结果的临床意义[J].中国医药导报,2020,17(34):157-160.

[10] 钱扬会,李艳君,丁毅伟,等.应用MALDI-TOF-MS联合分离胶法快速鉴定阳性血培养标本的初步研究[J].检验医学与临床,2019,16(9):1196-1199.

[11] 莫凡,赵洁,王琼,等.血液分离胶采血管在临床检验中的应用研究[J].现代检验医学杂志,2009,24(3):80-82.

[12] 黄娜剑,骆婷,张琴,等.真空采血管在临床使用所致不良事件的原因分析[J].东南国防医药,2018,20(6):651-653.

[13] 袁莉,郑兴,刘德生,等.高原患者不同血红蛋白浓度与凝血功能的相关性[J].临床麻醉学杂志,2020,36(12):1221-1223.

[14] 庞雅湘,聂启昊,刘晓宁,等.3种细胞裂解液提取总蛋白在Western blot中的效果分析[J].河北医科大学学报,2019,40(3):263-267.

[15] 张靖宇,范洪,路炳通,等.血清免疫球蛋白等因素对分离胶采血管血液分离效果的影响[J].检验医学,2018,33(4):275-278.

[16] 王娟,焦小杰.免疫球蛋白含量的检测与分离技术探讨[J].武警医学,2017,28(4):355-357.

[17] 卢建,王继成,姚翠泽,等.异常血红蛋白Hb New York的分子诊断及血液学特征分析[J].新医学,2018,49(6):421-424.

[18] 贺娜,熊志刚,高义敏.血细胞异常情况时不同检测系统血小板计数的准确性验证[J].四川医学,2019,40(2):180-183.

(上接第583页)

[17] WU M, MEI F, LIU W, et al. Comprehensive characterization of tumor infiltrating natural killer cells and clinical significance in hepatocellular carcinoma based on gene expression profiles[J]. BioMed Pharmacother, 2020,121(1):109637.

[18] CUI Z, LI H, LIU C, et al. Single-cell data revealed exhaustion of characteristic NK cell subpopulations and T cell subpopulations in hepatocellular carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(7):6550-6565.

[19] HWAN H L, HYOSUN C. Apigenin increases natural killer

cytotoxicity to human hepatocellular carcinoma expressing HIF-1 α through high interaction of CD95/CD95L[J].J Microbiol Biotechnol, 2022,32(4):397-404.

[20] GONZÁLEZ R, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ M A, NEGRETE M, et al. Downregulation of thioredoxin-1-dependent CD95 S-nitrosation by Sorafenib reduces liver cancer[J]. Redox Biol Redox Biol, 2020,34(7):101528.

[21] ALVAREZ M, SIMONETTA F, BAKER J, et al. Indirect impact of PD-1/PD-L1 blockade on a murine model of NK cell exhaustion[J]. Front Immunol, 2020,11:7.