

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.013.html>

sFasL 及其受体在双阴性 T 细胞杀伤胰腺癌细胞中的作用及意义

胡丕波^{1,2} 陈炯^{1,2} 郜高华^{1,2} 周海波^{1,2} 赵金钱^{1,2} 杨旭东^{1,2}

摘要 目的 探讨 sFasL(CD178) 及其受体 Fas(CD95, APO-1) 在双阴性 T 细胞(DNT cell)杀伤胰腺癌细胞中的作用及意义。方法 采用 OKT3 抗体吸附法培养 DNT 细胞。ELISA 法检测 DNT 细胞上清液中的 sFasL 的含量。Western blot 和 qRT-PCR 法检测 3 株胰腺癌细胞中 Fas 的表达量。免疫组化法检测 60 例胰腺癌组织中 Fas 的表达情况, 并分析其与临床病理参数之间的关系。结果 ELISA 法显示 DNT 细胞上清液中 sFasL 含量比对照组高($t = 3.00, P < 0.01$)。Western blot 法检测 Fas 在 3 株胰腺癌细胞中均有较高表达, 从低到高依次为 Capan-1、BXPC-3、Panc-4。qRT-PCR 法检测 Fas mRNA 在 3 株胰腺癌细胞中均有表达, 从低到高依次为 Capa-1、BXPC-3、Panc-4, 且两两之间的差异均有统计学意义($F = 211.56, P < 0.05$)。免疫组化法检测 Fas 在癌旁组织的阳性表达率高于癌组织($\chi^2 = 8.62, P < 0.05$)。结论 sFasL/Fas 途径可能是 DNT 细胞杀伤胰腺癌细胞的机制之一。

关键词 胰腺癌; 双阴性 T 细胞; sFasL; Fas

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1547-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.013

近年来虽然医疗水平在不断的进步, 癌症的治疗效果逐年提高, 但是胰腺癌却是其中的一个例外, 其起病隐匿, 病情发现较晚, 且极易发生转移, 常规方法治疗预后不佳, 5 年生存率一直低于 5%^[1-2]。国际上热门的“免疫疗法”成为癌症目前治疗手段中最有前景的方法之一。“过继免疫”的提出更让人们看到了治愈肿瘤的曙光。其中双阴性 T 细胞(double negative T cell, DNT cell)由于其明显的抗肿瘤作用引起了众多研究者的关注。杨仁保等^[3]在利用裸鼠模型进行的体内实验中显示 DNT 细胞可以杀伤胰腺癌细胞, 但是其具体的杀伤机制尚无定

2018-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81071985); 安徽省国际科技合作计划项目(编号: 10080703038)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 普通外科、² 肝胆胰外科实验室, 合肥 230001

作者简介: 胡丕波, 男, 硕士研究生;

陈炯, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: ch_jiong@126.com

论。Chang et al^[4] 研究报道了可溶性的 FasL 与其受体 Fas 结合介导肺癌细胞的凋亡, 这为课题组提供了新的思路。该研究的目的是探索 sFasL/Fas 是否参与了 DNT 细胞杀伤胰腺癌细胞。

1 材料与方法

1.1 病例资料 人胰腺癌细胞株 Panc-1、BXPC-3、Capan-1(中科院上海细胞库)。人胰腺癌组织蜡块标本和癌旁组织蜡块标本各 60 例(距离癌组织 > 1 cm)。均取自 2014 年 3 月 ~ 2017 年 8 月安徽医科大学附属省立医院胆胰外科行切除术且病理证实为胰腺癌的组织。其中男 34 例, 女 26 例; 年龄(60.15 ± 12.32)岁。所选患者术前均未进行过放疗、化疗等抗肿瘤治疗。同时收集这 60 例胰腺癌患者的临床病理资料。分离 DNT 细胞的人外周血标本取自未服用药物、无免疫性疾病的健康人群。肿瘤分期参照美国癌症委员会 TNM 分期手册第 7 版。

1.2 主要试剂 胎牛血清(杭州四季青公司); RPMI1640 培养基、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司); FasL ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司); CD4+、CD8+ 去除液(加拿大 Stemcell Technologies 公司); 白介素 2(interleukin-2, IL-2)、白介素 4(IL-4)、抗人 T 淋巴细胞表面 CD3(OKT3) 抗体(美国 eBioscience 公司); 人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋公司); 兔抗人 Fas 抗体(英国 Abcam 公司); 蛋白提取试剂盒(南京 Keygen 公司); 实时定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司); TRIzol(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 DNT 细胞的培养采用 OKT3 抗体吸附法。将 CD4、CD8 去除液(50 μl/ml)加入肝素钠抗凝的 10 ml 健康人外周血中, 静置孵育 20 min 后, 缓慢加入到含有等量淋巴细胞分离液的离心管中, 保持液面分层然后离心, 吸取中间云雾层细胞两次洗涤, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞, 然后接种到 OKT3 包被的培养瓶中, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温条件下静置培养, 每隔 3 d 滴加 IL-2(1 μl/ml) 和 IL-4(1 μl/ml) 促进生长。2 ~ 3 d

换液 6 d 移至较大的培养瓶中, 12~13 d 使用细胞。胰腺癌细胞培养: 3 株胰腺癌细胞均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基静置于 37 °C、5% CO₂ 条件下恒温培养 2~3 d 换液传代。

1.3.2 Fas mRNA 检测 采用 qRT-PCR 法,首先按照 TRIzol 试剂盒说明书提取 3 株胰腺癌细胞的 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA。使用 qPCR 试剂盒进行扩增反应, 反应体系为 10 μ l。Fas 上游引物: 5'-TTGCTTAGGGTCCCTCCTG-3', 下游引物: 5'-AAACTGGAGACCAGACAGCA-3'。 β -actin 上游引物: 5'-GGGAAATCGTGCCTGACAT-TAAGG-3', 下游引物: 5'-CAGGAAGGAAGGCTG-GAAGAGTG-3'。qPCR 循环参数: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 表达量, 实验重复 3 次。

1.3.3 Fas 蛋白检测 采用 Western blot 法, 收取 3 株胰腺癌细胞并加入 RIPA 细胞裂解液提取蛋白, 按照 1:4 加入 5 \times 上样缓冲液。沸水浴加热 10 min, 冷却后上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 半干转法将蛋白质转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭; 滴加 Fas 一抗 4 °C 过夜; 加入适当稀释度的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 2 h, 然后 PBST 洗涤 3 次; 加入 ECL 曝光液, 曝光显影后, 使用 Image J 软件进行条带分析。

1.3.4 sFasL 检测 采用 ELISA 法, 将 DNT 细胞 (5 \times 10⁶ /ml) 的培养液 (换液过夜) 作为实验组, 将未培养 DNT 细胞的培养液 (换液过夜) 作为对照组, 各取 100 μ l 进行检测, 按照 ELISA 试剂盒进行操作, 读取 OD 值, 计算两组 sFasL 的浓度。

1.3.5 人胰腺癌组织 Fas 蛋白检测 采用免疫组化法, 取胰腺癌石蜡切片脱蜡后柠檬酸盐高压修复, 缓慢冷却至室温, 然后使用内源性过氧化物酶阻断剂消除内源性过氧化物酶活性 (30 min), PBS 冲洗 3 次, 再滴加一抗 Fas (1:200) 4 °C 过夜, 次日室温下放置 30 min, PBS 冲洗 3 次, 随后滴加二抗孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 加入适量 DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木精复染, 烘箱烘干, 最后中性树脂封片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 两组均数比较采用 *t* 检验, 3 组均数比较采用方差分析, 定性资料采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNT 细胞镜下形态

DNT 细胞从健康人外周

血中分离提取, 最初细胞数量较少 (1 \times 10⁵ /ml), 呈现悬浮生长状态, 经过 IL-2 和 IL-4 的促进生长作用, 细胞数量缓慢增加, 13 d 左右的可达到饱和状态 (细胞数量为 5 \times 10⁶ /ml), 见图 1。

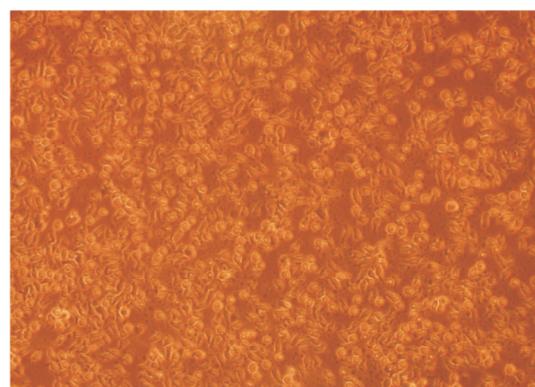


图 1 DNT 细胞形态 $\times 200$

2.2 Fas mRNA 在 3 种胰腺癌细胞中的表达差异

PCR 结果显示 mRNA 在 3 种胰腺癌细胞中表达均有表达, 3 组之间的差异有统计学意义 ($F = 211.56$, $P < 0.05$)。相互比较结果显示 Capan-1 表达量低于 BXPC-3 ($P < 0.05$), Panc-1 表达量高于 BXPC-3 ($P < 0.05$), 见图 2。

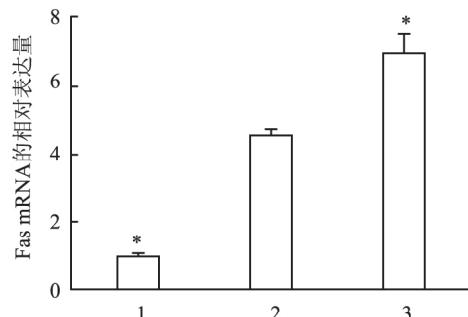


图 2 3 种胰腺癌细胞中 Fas mRNA 的表达情况

1: Capan-1; 2: BXPC-3; 3: Panc-1; 与 BXPC-3 细胞比较: * $P < 0.05$

2.3 Fas 蛋白在 3 种胰腺癌细胞中的表达差异

Western blot 结果显示 Fas 蛋白在 3 种细胞中均有较高表达, 由低到高顺序为 Capan-1、BXPC-3、Panc-1。见图 3、4。

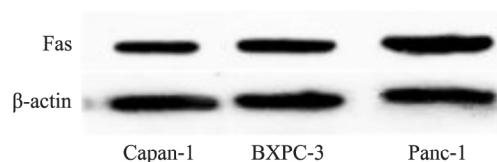


图 3 3 种胰腺癌细胞中 Fas 蛋白的表达情况

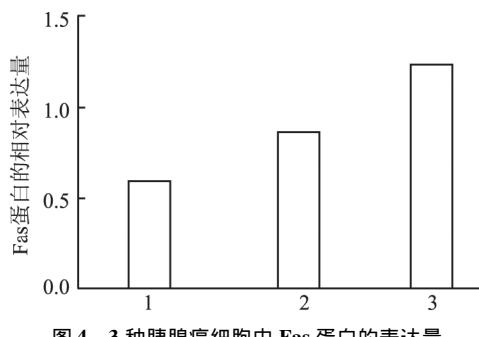


图4 3种胰腺癌细胞中Fas蛋白的表达量

1: Capan-1; 2: BXPC-3; 3: Panc-4

2.4 sFasL 在 DNT 细胞培养液中的含量 ELISA 法检测了 20 例健康人外周血来源分离培养的 DNT 细胞 ($5 \times 10^6 / \text{ml}$) 上清液以及未培养 DNT 细胞的上清液,结果显示培养 DNT 细胞组上清液中 sFasL 含量为 (64.52 ± 2.21) pg/ml,对照组上清液中含量为 (55.68 ± 1.95) pg/ml,差异有统计学意义 ($t = 3.00$, $P < 0.01$)。见图 5。

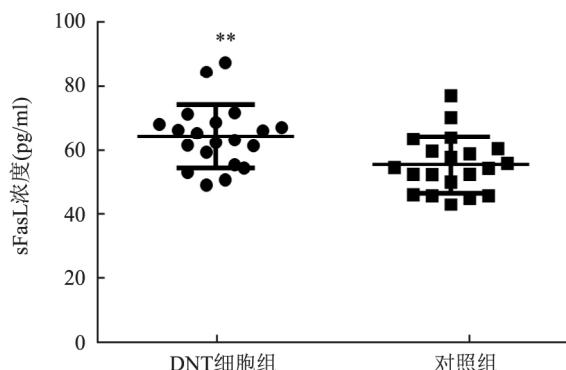
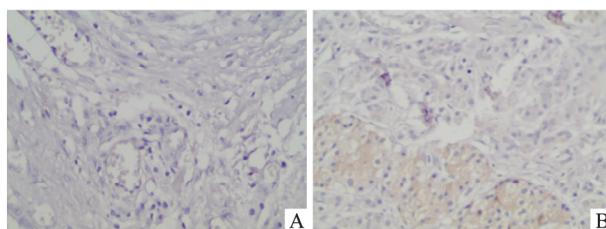


图5 DNT细胞上清液和对照组中sFasL的含量

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 Fas 在胰腺癌和癌周组织中的表达 免疫组化结果显示 Fas 蛋白主要的表达部位是在细胞质,胰腺癌组织的阳性表达率为 42% (25/60),在癌周组织的阳性表达率为 68% (41/60),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.62$, $P < 0.05$)。见图 6。

图6 Fas蛋白在胰腺癌和癌周组织中的表达情况 $\times 200$

A: Fas 在胰腺癌组织中的阴性表达; B: Fas 在胰腺癌组织中的阳性表达

2.6 Fas 的表达与临床资料的相关性 Fas 在胰腺癌组织中的表达与肿瘤的分化程度、神经浸润有关 ($\chi^2 = 5.659, 6.251$, $P < 0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤分期、有无淋巴结转移等无关。见表 1。

表1 胰腺癌组织中 Fas 蛋白的表达与临床病理关系(n)

临床病理特征	n	Fas 阳性 例数	Fas 阴性 例数	χ^2 值	P 值
性别					
男	34	16	18	0.939	0.333
女	26	9	17		
年龄(岁)					
≤ 60	27	10	17	0.433	0.511
> 60	33	15	18		
肿瘤位置					
胰头	31	16	15	2.611	0.106
胰尾	29	9	20		
分化程度					
高	23	14	9	5.659	0.017
中低	37	11	26		
TNM 分期					
I ~ II	38	18	20	1.386	0.239
III ~ IV	22	7	15		
神经浸润					
有	33	9	24	6.251	0.012
无	27	16	11		
淋巴结转移					
有	38	19	19	2.961	0.085
无	22	6	16		

3 讨论

胰腺癌是恶性程度极高的消化道肿瘤,虽然现代外科技术的发展使胰十二指肠切除术围手术期死亡率降至 5% 以下,但是 30 年来胰腺癌的长期存活率并未发生显著改变。DNT 细胞在各项疾病中均起到了关键的治疗作用,特别是其抗肿瘤作用已成为人们关注的点。Lee et al^[5] 研究发现 DNT 细胞可以抑制急性白血病细胞的生长。Xu et al^[6] 通过实验证明了 DNT 细胞通过 NK 细胞活化性受体 (NKG2D) 及其配体主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A (MICA) 途径杀伤胰腺癌细胞。最近有研究^[4] 报道 sFasL/Fas 可以介导杀伤肺癌细胞。而本研究在 DNT 细胞上清液中检测出了 sFasL 的表达,同时在胰腺癌细胞中检测出其受体 Fas 的高表达,所以笔者有理由推测 DNT 细胞可以通过分泌 sFasL 与胰腺癌细胞表面的 Fas 结合介导杀伤胰腺癌细胞。

Fas 是属于 TNF 受体超家族成员的 I 型跨膜蛋白与肿瘤坏死因子(TNF)受体具有一定的同源性。Fas 的基因位于 10 号染色体 , 其基因分子长度为 25 kb , 共编码了 325 个氨基酸。Fas 蛋白可分为膜表达型(mFas)和可溶型(sFas)两种形式。 mFas 分为 3 个部分 : 胞外部分、跨膜部分、胞内部分 , 其中胞内含有死亡结构域 , 可传递细胞凋亡信号。 FasL 属于 TNF 配体超家族 , 是一种分子量 40 ku 的 II 型跨膜蛋白 , 其基因位于 1 号染色体 , 共编码 281 个氨基酸 , 其蛋白分子同样也分为膜型(mFasL)和可溶型(sFasL)。 Fas 与 FasL 在体内是天然的受体与配体关系。 Fas 与 FasL 结合后 , 凋亡信号开始传递 , 受体分子中的死亡结构域构像改变 , 然后通过与死亡结构域相关蛋白(Fas-associated death domain , FADD)的 C 末端结合传递信号 , 信号在 FADD 中又通过 N 末端与 caspase8 结合 , 开启半胱氨酸蛋白酶(caspase)分子的级联反应 , 使得细胞凋亡^[7-9]。 Fas 与 FasL 的结合 , 是细胞凋亡的关键步骤 , 所以癌细胞表面 Fas 受体的表达量对研究 FasL 是否参与细胞凋亡具有重要意义。

表达 Fas 的靶细胞与 FasL 结合后 , 靶细胞就会被诱导进入死亡程序 , 维持着人体细胞凋亡与增殖的平衡^[10]。本研究在胰腺癌细胞和组织中均检测了 Fas 的表达情况 , 其结果为 : Fas mRNA 在 3 株胰腺癌细胞中均有表达且存在一定差异 , Fas 蛋白在胰腺癌细胞中均有较高表达且表达差异与 RNA 的表达差异一致。而在免疫组化法检测胰腺癌组织和癌周组织的结果中显示 : Fas 蛋白在胰腺癌组织中表达较癌周组织表达较低 , 且低分化组织中的表达量明显低于高分化组织。从中可以表明 , Fas 在胰腺癌组织中的表达下调 , 与其配体 FasL 的结合减少 , 导致胰腺癌细胞凋亡减少 , 发生免疫逃逸 , 细胞凋亡与增殖的动态平衡被打破 , 使得胰腺癌快速的

发生发展得以进行。

参考文献

- [1] Torre L A , Siegel R L , Ward E M , et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Res* , 2016 , 25(1) : 16 – 27.
- [2] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012 [J]. *CA Cancer J Clin* , 2015 , 65(2) : 87 – 108.
- [3] 杨仁保 , 陈炯 , 卢寅 . DNT 细胞的扩增及其对胰腺癌 Panc-1 细胞的影响 [J]. 安徽医科大学学报 , 2013 , 48(3) : 228 – 32.
- [4] Chang W A , Lin E S , Tsai M J , et al. Isolinderalactone inhibits proliferation of A549 human non-small cell lung cancer cells by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase and inducing a Fas receptor and soluble Fas ligand-mediated apoptotic pathway [J]. *Mol Med Rep* 2014 , 9(5) : 1653 – 9.
- [5] Lee J , Minden M D , Chen W C , et al. Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms [J]. *Clin Cancer Res* , 2017 , 24(2) : 370 – 82.
- [6] Xu H , Zhu X X , Chen J. DNT cell inhibits the growth of pancreatic carcinoma via abnormal expressions of NKG2D and MICA *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2016 , 469(2) : 145 – 50.
- [7] Zhou X , Hong T , Yu Q , et al. Exopolysaccharides from Lactobacillus plantarum NCU116 induce c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells [J]. *Sci Rep* , 2017 , 7(1) : 14247.
- [8] Wang M , Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: an update [J]. *Syst Biol Reprod Med* 2018 , 64(2) : 93 – 102.
- [9] Zhu A , Wang M , Zhou G , et al. Fas/FasL , Bcl2 and Caspase-8 gene polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int* 2017 , 36(6) : 807 – 18.
- [10] Kuo H M , Tseng C C , Chen N F , et al. MSP-4 , an antimicrobial peptide , induces apoptosis via activation of extrinsic Fas/FasL-and intrinsic mitochondria-mediated pathways in one osteosarcoma cell line [J]. *Mar Drugs* 2018 , 16(1) : 8.

The role and significance of sFasL and its receptor in killing pancreatic cancer cells by double negative T cells

Hu Pibo^{1,2} , Chen Jiong^{1,2} , Wu Gaohua^{1,2} , et al

(¹Dept of General Surgery , ²Anhui Provincial Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery ,

The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract **Objective** To investigate the role and significance of sFasL (CD178) and its receptor Fas (CD95 / APO-1) in killing pancreatic cancer cells by double negative T cells (DNT cells) . **Methods** DNT cells were cultured by OKT3 antibody adsorption method. ELISA method was used to detect the content of sFasL in DNT cell

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.014.html>

Pkhd1 基因缺陷对雄性小鼠生育能力的影响

毛军, 徐雨辰, 高晶晶, 彭党委, 窦贤明, 黄振宇, 程鹏, 沈旭峰, 张贤生

摘要 目的 观察 Pkhd1 基因缺陷对雄性小鼠生育能力的影响。方法 取同龄成年野生型和 Pkhd1 基因缺陷 (Pkhd1^{-/-}) 小鼠各 10 只, 取附睾尾精子, 观察记录两组精子各项参数: 精子浓度、活力、活率及形态; 另外 取同龄成年野生型和 Pkhd1^{-/-} 小鼠各 5 只, 将野生型雌鼠与之进行合笼试验, 观察记录两组小鼠的各项生育指标: 交配率 (FM)、怀孕率 (RP) 及平均产仔率 (ANP)。结果 与野生型比较, Pkhd1 基因缺陷小鼠精子浓度下降 ($P < 0.01$)、精子活力降低 ($P < 0.01$) 且精子尾部形态异常; 且与 Pkhd1^{-/-} 小鼠交配后的雌性小鼠 RP 显著下降 ($P < 0.01$)。结论 Pkhd1 基因缺陷可降低雄性小鼠的生育力。此研究结果为男性常染色体隐性多囊肾患者在生育能力方面的潜在并发症提供了新的见解。

关键词 男性不育; ARPKD; Pkhd1; 精子; 小鼠模型

中图分类号 R 691.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1551-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.014

常染色体隐性多囊肾 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) 是婴儿和儿童时期最常见的囊性肾病, 其发生率约为 1/20 000; 在人群中, 其隐性致病基因-纤囊蛋白基因 (polycystic kid-

ney and hepatic disease 1, Pkhd1) 携带率估计为 1/70^[1]。遗传连锁研究^[2]表明, 致病基因突变位于人类染色体区域 6p21.1-6p12。由 Pkhd1 基因编码的 FPC 是一种包含 4 074 个氨基酸的完整膜蛋白。ARPKD 患者的临床表现差异很大, 其典型的表现为先天性肝纤维化和多囊性肾病。因此, 至今对于 ARPKD 的研究主要集中在肾脏和肝脏。而常染色体显性多囊肾 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ADPKD) 的男性生育力已有长期大量的相关研究^[3], 且男性 ADPKD 患者的生育方面有相关缺陷。但相较于 ADPKD, ARPKD 的发病率低和死亡率高, 鲜有研究男性 ARPKD 患者的生育相关问题。然而, Dell^[4]发现 ARPKD 可以在从婴儿期到成年期的任何年龄发病。而且, 随着现代肝肾移植手术进步和呼吸系统并发症护理水平提高, 其存活率已经得到了极大的改善。相关数据^[5]显示, 接受肾移植的 ARPKD 患者的生存率可达到 78%~92%。因此, ARPKD 不再局限于儿科疾病, 成人患者也可有相对温和的临床表现。随着此类患者逐渐达到生育年龄, 生育问题将不可避免。所以对于男性 ARPKD 患者, 其生殖相关问题尤为迫切。研究^[6]表明, PKHD1 基因及其产物与小鼠同源且功能相似。该研究主要通过观察 APPKD 模型小鼠的生殖功能, 探究 Pkhd1 基因对雄性生育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Pkhd1 基因敲除小鼠

2018-06-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81370749)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230022

作者简介: 毛军, 男, 硕士研究生;

张贤生, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xiansheng-zhang@163.com

supernatant. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of Fas in three pancreatic cancer cells. Immunohistochemistry was used to detect the expression of Fas in 60 cases of pancreatic cancer and its relationship with clinicopathological parameters was analyzed. **Results** ELISA method showed that the content of sFasL in the supernatant of DNT cells was higher than that of the control group ($t = 3.00$, $P < 0.01$)。The results of Western blot suggested that Fas was highly expressed in all three pancreatic cancer cells, ranging from low to high were Capan-1, BXPC-3 and Panc-4。The expression of Fas mRNA was detected by qRT-PCR in all three pancreatic cancer cells, and the sequence was Capan-1, BXPC-3 and Panc-4 from low to high ($F = 211.56$, $P < 0.05$)。Immunohistochemistry results showed that the expression of Fas was decreased in pancreatic tissue compared with paracancerous tissue ($\chi^2 = 8.62$, $P < 0.05$)。**Conclusion** The sFasL/Fas pathway may be one of the mechanisms by which DNT cells kill pancreatic cancer cells。

Key words pancreatic cancer; double negative T cells; sFasL; Fas