

肝癌患者自体细胞因子诱导杀伤细胞治疗后 免疫活性细胞的检测及其临床意义

施明 张冰 汤紫荣 雷周云 王慧芬 冯永毅
刘敬超 范振平 李捍卫 牟劲松 王福生

【摘要】 目的 观察肝癌患者自体细胞因子诱导杀伤细胞(CIK细胞)回输后,外周血中T细胞亚群及树突状细胞亚群的变化,评价CIK细胞治疗肝癌的临床效果。方法 采用成份血采血机采集13例肝癌患者的外周血单个核细胞(PBMC),经多种细胞因子诱导后,于培养的第4、7、10、13、15天流式细胞仪检测细胞表型;CIK细胞回输前及回输后取病人外周血,流式细胞仪测定 型树突状细胞(DC1)和 型树突状细胞(DC2)的比例。结果 诱导培养后,CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺, CD25⁺效应细胞的比例明显升高,分别由最初的33.5%±10.1%、7.7%±2.8%和12.3%±4.5%,上升至36.6%±9.0%、18.9%±6.9%和16.4%±5.9%,其中CD3⁺CD8⁺可维持较高水平,CD25⁺和CD3⁺CD56⁺比例分别于培养后的第7天和第13天开始下降。CD3⁺CD4⁺和NK细胞比例略有下降,但差异无显著意义。CIK细胞回输后DC1和DC2细胞亚群的比例明显升高,分别由回输前的0.59%±0.23%和0.26%±0.12%上升至回输后的0.85%±0.27%和0.43%±0.20%。CIK细胞治疗后患者临床症状明显改善,无明显副作用。结论 CIK细胞治疗可以提高肝癌患者的细胞免疫功能,提高对肿瘤细胞的杀伤作用。

【关键词】 杀伤细胞; 表型; 癌,肝细胞; 树突细胞

Identification of immunological effector cells after autologous cytokine-induced killer cells treatment and its clinical implication in hepatocellular carcinoma patients

SHI Ming, ZHANG Bing, TANG Zi-rong, LEI Zhou-yun, WANG Hui-fen, FENG Yong-yi, LIU Jir-chao, FAN Zher-ping, LI Han-wei, MU Jir-song, WANG Fu-sheng. Division of Biological Engineering, Beijing Institute of Infectious Disease, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: WANG Fu sheng

【Abstract】 Objective To investigate the alteration of the cellular profiles of T lymphocyte subsets and dendritic cell subsets in peripheral blood of primary hepatocellular carcinoma (HCC) patients after being transfused with autologous cytokine-induced killer cells (CIK) in patients, then to evaluate the clinical efficacy of the immune therapeutic strategy. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 13 patients with primary were collected using blood cell separator, and expanded in the fresh AIM-V medium in the presence of cytokine cocktail including interferon gamma (IFN- γ), monoclonal antibody (mAb) against CD3 and interleukin-2 (IL-2). The phenotypic patterns of CIK cells were longitudinally characterized by flow cytometry on day 0, 4, 7, 10, 13 and 15 during the incubation period. PBMCs obtained from HCC patients before or after CIK cells transfusion into bodies to assay the changes of proportion of DC1 or DC2 in peripheral blood. **Results** After in vitro incubation for 14 or 15 days, a large of CD3⁺CD56⁺ cells were produced from their progenitors and the percentages of CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺, CD25⁺ cells significantly increased from 33.5%±10.1%, 7.7%±2.8%, and 12.3%±4.5% at the beginning to 36.6%±9.0% ($P < 0.05$), 18.9%±6.9% ($P < 0.01$), and 16.4%±5.9% ($P < 0.05$) at the day 15, respectively. In contrast, the percentages of CD3⁺CD4⁺ and NK cells displayed no significant difference. The percentages of CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ cells was held at a higher level during the whole incubation period, however those of the CD25⁺, and CD3⁺CD56⁺ cells began decreasing on day 7 and day 13, respectively. The proportion of type of dendritic cells (DC1) and type of dendritic cells (DC2) subsets increased from 0.59%±0.23% and 0.26%±0.12% before CIK cell transfusion to 0.85%±0.27% and 0.43%±0.20% (all $P < 0.01$) after CIK cell transfusion. The symptom of HCC patients receiving the CIK cell therapy was markedly ameliorated, and not side effect was seen in the treatment. **Conclusion** Our results indicated that autologous CIK cells is able to boost the cellular immunological function in HCC patients, which

作者单位:100039 北京,解放军第三二医院全军艾滋病与病毒性肝炎防治重点实验室

通讯作者:王福生

probably provide a potent immune therapeutic strategy for HCC patients.

【Key words】 Killer cells; Phenotype; Carcinoma, hepatocellular; Dendritic cells

肝癌患者机体特异免疫(adaptive immunity)和天然免疫(innate immunity)功能低下^[1],手术、化疗、放疗效果差,且容易复发和转移,综合治疗成为提高肝癌疗效的重要措施之一。肿瘤免疫主要依赖细胞免疫,机体细胞免疫功能的低下往往是肿瘤难以治愈和容易复发转移的重要原因。细胞因子诱导杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞为一类异质细胞群,主要为共同表达 CD3⁺CD56⁺细胞,对肿瘤的杀伤作用具有高效和非 MHC 限制性特点^[2],是目前抗肿瘤过继细胞免疫治疗最为有效的方案。我们的前期研究工作表明,CIK 细胞对肝癌细胞具有明显的抑制作用,并且可以抑制裸鼠肝癌移植瘤的生长^[3-6]。树突状细胞(dendritic cell, DC)来源于骨髓造血干细胞,是免疫系统中功能最强的一种抗原递呈细胞,在机体外周血中的数量很少,能显著刺激纯真 T 细胞的增殖,在先天免疫和获得性免疫(adaptive immunity)过程中均有重要作用^[7]。根据细胞表面标志的不同可将人类 DC 分为两个亚群,即 DC1 和 DC2。DC1 主要发挥抗原递呈功能;DC2 主要产生干扰素(IFN),抗原递呈功能较弱,它们在机体的抗病毒和抗肿瘤免疫反应中均具有十分重要的作用^[8,9]。我们在完成一系列体外和动物实验研究基础上,建立了符合药品生产质量管理规范(good practice in the manufacturing and quality control of drug, or good manufacturing practice, GMP)要求的 CIK 细胞培养和质量控制方法,通过申报 CIK 细胞治疗肝癌临床治疗试验,并获得批准。本文分析比较肝癌患者自体 CIK 细胞回输前、后外周血中淋巴细胞亚群及 DC1 和 DC2 比例的变化,为综合评价临床应用 CIK 细胞治疗肝癌的效果提供依据。

对象与方法

一、对象

1. 病例:解放军第三二医院收治的经临床确诊为原发性肝癌患者 13 例,其中早期肝癌 2 例,中晚期 11 例,全部伴有肝硬化,患者平均年龄 47 ± 8 岁(29 ~ 66 岁),其中男性 12 例,女性 1 例。

2. 材料:无血清培养基(美国 GIBCO 公司);IL-2(北京瑞得合通药业有限公司);anti-CD3McAb(古巴分子免疫中心);rhIFN- γ (上海克隆生物高技术有限公司);检测 T 细胞亚群的各种抗体(美国 BD 公

司);成份血采血机 Spectra 6.1(美国 COBE 公司);流式细胞分析仪(FACSCalibur,美国 BD 公司),所采用的软件有 CellQuest, SimulSET, MultiSET, FACSCOMP。

二、方法

1. CIK 细胞的培养:参加 CIK 细胞培养、质量控制人员均经过 GMP 培训和健康查体,符合 GMP 上岗要求。在肝癌患者签定知情同意书以后,用采血机(Spectra v 6.1)采集患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),每例患者采集细胞数约(1 ~ 4) × 10⁹,体积 40 ~ 70 ml。在符合 GMP 的实验室条件下,用无血清培养基调整细胞浓度至(1 ~ 2) × 10⁶/ml,置于透气性培养袋中,于不同时间加入一定剂量的各种细胞因子,37 °C,5% CO₂ 悬浮培养。在培养的第 0、4、7、10、13、15 天进行细胞计数和表型分析。

2. CIK 细胞悬液的制备及回输:CIK 细胞于培养的第 10 天开始分 3 次回输给患者,方法是每次取出 1/3 体积培养的 CIK 细胞悬液,离心、洗涤和重悬浮后制备成体积 400 ~ 500 ml 的 CIK 细胞悬液,静脉回输给患者。

3. T 细胞亚群的测定:于采血时及 CIK 细胞回输后的第 8 ~ 10 天,静脉抽取患者抗凝血 5 ml,进行 T 细胞亚群的测定,包括 DC1 和 DC2。

4. 临床疗效判断标准:(1)症状:包括肝区疼痛、食欲、精神、疲乏、睡眠、体力等;(2)体征:包括体重、皮肤黄染、肝掌、蜘蛛痣、肝脏大小、肝区叩痛、移动性浊音、双下肢水肿等;(3)生化指标:包括血浆蛋白、胆红素、丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、甲胎蛋白等;(4)病毒学指标:包括乙肝病毒 5 项、HBV DNA 载量;(5)免疫学指标:包括淋巴细胞亚群、DC 亚群等;(6)影像学指标:包括 CT 检查及 B 超检查。显效:以上 6 个指标均有改善。有效:观察指标的后 2 项或 3 项有改善。无效:以上 6 个指标均无效。

5. 统计处理:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件进行统计分析,实验设计为自身配对设计。

结 果

1. 培养不同时间对效应细胞表型的影响:各类

细胞表型的比例随培养时间变化而改变,CD3⁺T 细胞比例在培养后缓慢上升,并维持较高水平,CD3⁺CD4⁺细胞的比例略有下降,CD3⁺CD8⁺细胞比例培养后逐渐升高,CD25⁺的比例培养后迅速上升,至培养后第 7 天达最高水平,而后快速下降(图 1)。CD3⁺CD56⁺细胞比例培养后显著升高,至培养后的第 13 天左右达最高水平,而后逐渐下降(图 2)。

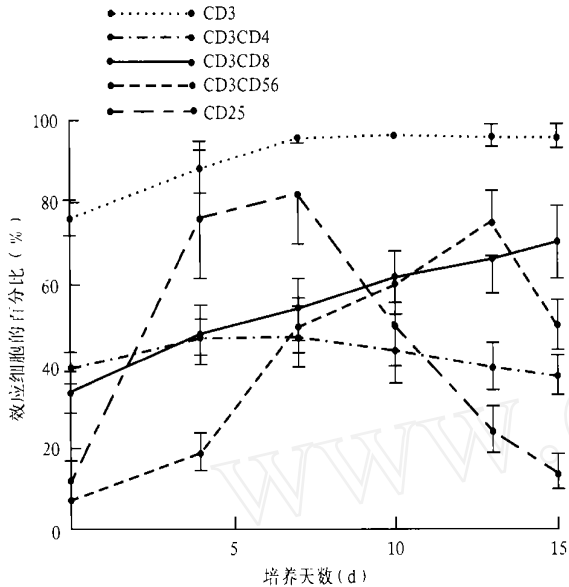
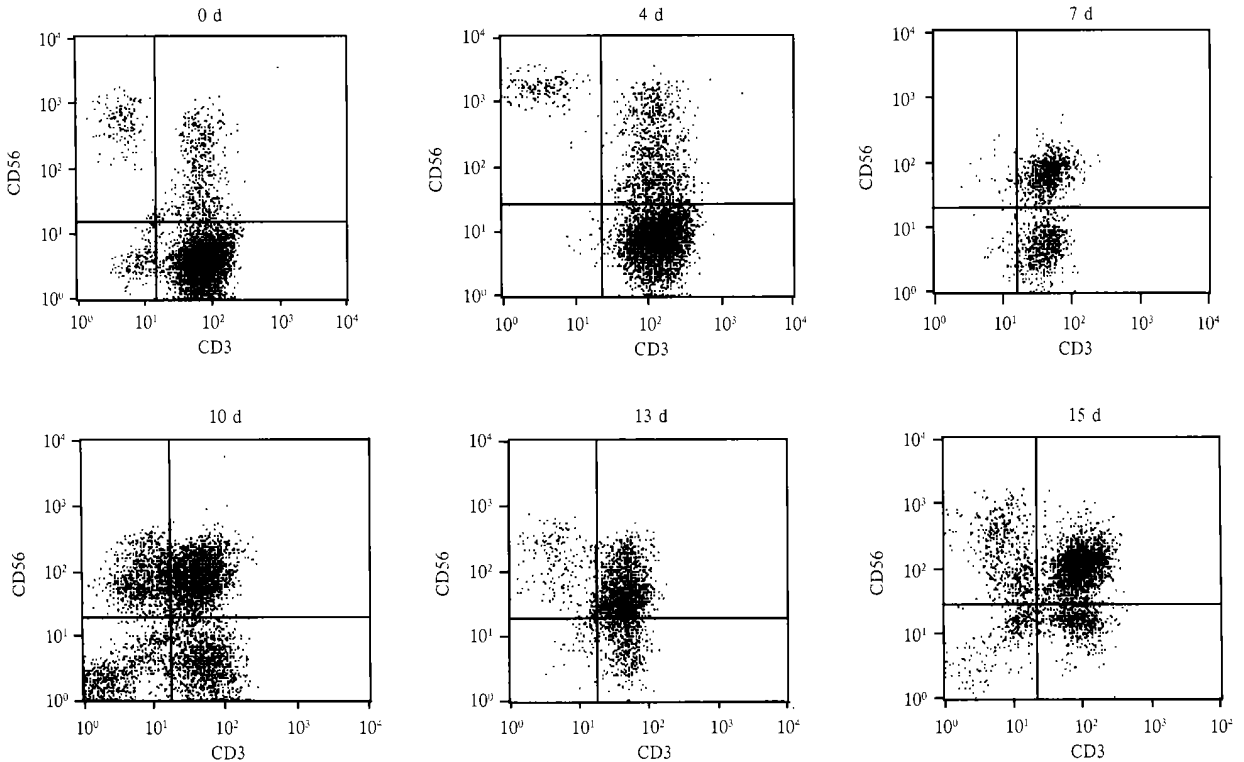


图 1 效应细胞表型与培养时间的关系



右上角方框中显示的是 CD3⁺CD56⁺ 细胞

图 2 1 例患者不同培养时间 CD3⁺CD56⁺ 细胞流式测定结果

2. CIK 细胞回输前、后淋巴细胞亚群的变化:肝癌患者定期进行血常规、T 细胞亚群、外周血 DC1/DC2 分析。CIK 细胞回输后 8~10 d,外周血中 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 和 CD25⁺ 细胞的比例显著增多,分别由最初的 33.5% ± 10.1%、7.7% ± 2.8% 和 12.3% ± 4.5%, 上升至 36.6% ± 9.0% (P < 0.05)、18.9% ± 6.9% (P < 0.01) 和 16.4% ± 5.9% (P < 0.05)。CD3⁺CD4⁺ 和 NK 细胞的比例略有下降,但差异无显著意义。在随访的患者中,最长的 1 例为回输后 108 d,其余为回输后 20~90 d,其淋巴细胞亚群的比例与回输后 8~10 d 测定的结果相似,差异无显著意义,因此 CIK 细胞回输后其效应细胞比例有可能维持 108 d 以上。所有病例均在继续随访中。

3. CIK 细胞回输前、后外周血中 DC 亚群的变化:CIK 细胞治疗前患者外周血中 DC1 和 DC2 的百分比分别为 0.59% ± 0.23% 和 0.26% ± 0.12%, 治疗后升高至 0.85% ± 0.27% 和 0.43% ± 0.20%, 差异有显著意义 (P < 0.01)。说明 CIK 细胞治疗后可以显著提高患者外周血中 DC1 和 DC2 的百分比。

4. 治疗效果:经 CIK 细胞治疗后显效的 3 例,有效的 9 例,无效的 1 例。所有经 CIK 细胞治疗的肝

癌患者至今还未有死亡病例出现,其中最长的 1 例已存活 6 个月。CIK 细胞回输后大部分病人自觉症状改善,食欲增强,睡眠改善,体重增加,介入化疗后的副作用减轻。肿瘤生长延缓,其中有 3 例经 B 超检查出现肿瘤缩小。

5. 不良反应:回输过程中及回输后 6 h 内,大部分患者出现发烧,体温范围 37.5~40。持续时间约 6 h,绝大部分患者(12/13)均能自行消退,只有 1 例给予退烧药。回输前及回输后的不同时间进行肝功、肾功及血常规测定,结果未发现 CIK 细胞对肝功和肾功有损害作用,因此自体 CIK 细胞治疗具有很好的安全性。

讨 论

PBMC 经多种细胞因子刺激诱导后产生的 CIK 细胞,是一组异质细胞群,其主要效应细胞为 CD3⁺CD56⁺,曾认为其抗瘤活性为非 MHC 限制性。近来研究表明,CIK 细胞也可通过有效的 MHC 限制性杀伤肿瘤细胞^[10]。肿瘤难以根治的原因之一是肿瘤能逃避免疫系统监视,肿瘤免疫主要依赖细胞免疫,而肿瘤病人往往细胞免疫功能低下,或由于肿瘤免疫原性较弱,机体缺乏针对肿瘤的特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)。要达到有效的治疗,不仅需要具有高细胞毒作用的效应细胞,而且效应细胞必须有足够的数量。自体 CIK 细胞过继免疫疗法为肿瘤的免疫治疗提供了最为有效的手段。

正常情况下外周血淋巴细胞中具有 CD3⁺CD56⁺ 表型的细胞仅占 1%~5%^[11],经细胞因子诱导处理后,CIK 细胞的数量可呈数十倍乃至数百倍增加,细胞毒活性也大大增加。本研究结果,CIK 细胞回输前病人外周血中 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 和 CD25⁺ 细胞比例分别为 33.5%、7.7% 和 12.3%,CIK 细胞回输后上升至 36.6%、18.9% 和 16.4%,其中 CD3⁺CD8⁺ 可维持较高水平,CD25⁺ 和 CD3⁺CD56⁺ 比例分别于培养后的第 7 天和第 13 天开始下降,但这已可满足过继免疫治疗的要求。CD3⁺CD4⁺ 细胞和 NK 细胞的比例略有下降,但差异无显著意义($P > 0.05$)。综合各种细胞表型和数量,培养的第 10 天细胞数量增殖明显,活力较好,适合回输,这与我们先前的实验研究结果一致^[3]。

乙型肝炎病毒慢性感染是肝硬化和原发性肝癌的主要病因,肝癌病人在一定程度上存在免疫功能缺陷,包括天然免疫和特异免疫功能低下。研究表

明,这与机体外周血中 DC 数量减少、功能降低有关^[12,13]。DC 是免疫系统中功能最强的一种抗原递呈细胞,它能显著刺激纯真 T 细胞的增殖,在先天免疫和获得性免疫过程中均有重要作用。CIK 细胞回输后患者外周血中的 DC1 和 DC2 比例显著升高,分别由回输前的 0.59% 和 0.26% 上升至回输后的 0.85% 和 0.43% ($P < 0.01$)。原因可能是 CIK 细胞分泌的一些细胞因子,能诱导 DC1 和 DC2 增殖,促使 DC1 和 DC2 的数量及百分比的增加,功能增强,提高机体的免疫功能。DC1 和 DC2 数量的增多和功能的增强,通过分泌细胞因子和抗原的递呈,又进一步诱导针对肿瘤的特异性 CTL,维持 CIK 效应细胞的活性,达到有效杀伤肿瘤细胞的目的。通过肿瘤抗原致敏的 DC 的刺激,可以有效提高 CIK 细胞杀伤肿瘤的活性^[14,15]。有研究表明,CIK 细胞与自体 DC 共培养后,不仅能提高 CIK 细胞的细胞毒作用,而且也能显著提高 DC 的功能^[16],这为今后利用 CIK 细胞与自体 DC 相结合治疗肿瘤提供了新思路。长期的疗效及治愈率在继续观察随访中。我们制定了 CIK 细胞治疗肝癌的临床方案,初步明确了 CIK 细胞治疗肝癌的临床适应症,结果显示 CIK 细胞治疗结合手术或化疗效果较好,对不宜进行手术或化疗的晚期肝癌患者具有改善症状、提高生活质量、延长生命的作用。

总之,自体 CIK 细胞的回输可通过直接杀伤肿瘤细胞和提高机体免疫功能两方面来抑制肿瘤细胞的生长,为肝癌的免疫治疗提供了一新的有效的手段。

参 考 文 献

- Ladhams A, Schmidt C, Sing G, et al. Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17: 889-896.
- Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, et al. Propagation of T cells with NK cell marker. *Br J Haematol*, 1994, 87: 453-458.
- Shi M, Lei ZY, Wang FS, et al. Human cytokine-induced killer cells inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells transplanted in nude mice. *Chin J Cancer Biother*, 2002, 9: 179-182.
- Wang FS, Liu MX, Zhang B, et al. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 464-468.
- Du QY, Liu MX, Wang FS, et al. The effect of CIK against hepatocellular carcinoma cells in vivo or ex vivo. *Chin J Cancer*, 2001, 11: 325-327.
- Du QY, Wang FS, Xu DP, et al. Cytotoxic effects of CIK against hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World Chin J Digestol*, 2000, 8: 863-866.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 767-811.

- 8 Kunitani H, Shimizu Y, Murata H, et al. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. *J Hepatol*, 2002, 36:734-741.
- 9 Hiasa Y, Akbar SM, Abe M, et al. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decreased expression of HLA DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepato Res*, 2002, 22:241-249.
- 10 Baxevasis CN, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, et al. HER-2/neu derived peptide epitopes are also recognized by cytotoxic CD3⁽⁺⁾ CD56⁽⁺⁾ (natural killer T) lymphocytes. *Int J Cancer*, 2002, 98:864-872.
- 11 Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺ CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo anti-tumor activity in mice with potent severe combined immunodeficiency. *J Immunol*, 1994, 153: 1687-1696.
- 12 Xing LH, Wang FS, Liu MX, et al. Property and implication of dendritic cells from peripheral blood monocytes in patients with persistent hepatitis B virus infection. *Chin J Infect Dis*, 2001, 19:348-351.
- 13 Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, et al. Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Med*, 1998, 188:341-350.
- 14 Marten A, Renoth S, von Lilienfeld-Toal M, et al. Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells. *Haematologica*, 2001, 86:1029-1037.
- 15 Ziske C, Marten A, Schottker B, et al. Resistance of pancreatic carcinoma cells is reversed by coculturing NK-like T cells with dendritic cells pulsed with tumor-derived RNA and CA 19-9. *Mol Ther*, 2001, 3: 54-60.
- 16 Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother*, 2001, 24:502-510.

(收稿日期:2003-05-29)

(本文编辑:刘雪松)

·读者·作者·编者·

本刊“疑难病例析评”栏目征稿

根据广大读者的建议,《中华医学杂志》自 2001 年第 1 期开辟“疑难病例析评”栏目,希望通过对疑难、复杂或罕见病例的析评,交流临床工作经验,帮助临床医生掌握科学的临床思维方式,提高多学科综合分析判断能力,进而提高医疗水平。论文的主要结构分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分,先后发表在本刊序号相邻的两期杂志上,以给读者留下较为充裕的思考时间。与本刊“临床病理讨论”栏文稿的不同之处为:(1)作者在文题下署名,而非仅在文末注明由何人整理,作者拥有本文的著作权。(2)“分析与讨论”部分不采用依次发言的形式,而由作者系统归纳,形成思路清晰、条理清楚、分析得当、科学性强的原创性临床论文。论文性质等同于本刊“论著”。(3)所分析的病例不一定都具备病理检查结果,但必须经科学手段确诊。

1. 病例选择:(1)疑难病例,特别是涉及多学科、多领域的疑难病例。(2)误诊且有经验教训的病例。(3)诊断已经明确,但病情危重或有诸多并发症,治疗上甚为棘手的病例。(4)罕见病例。(5)其他对临床实践有指导或提示意义的病

例。以上病例须最终获得明确诊断或成功治疗,临床资料应齐全,能提供实验室、影像学和/或病理确诊证据。

2. 写作格式:文题可用主要症状、体征或诊断命题,各短语之间用一字线连接。正文分“病历摘要”和“分析与讨论”两部分。“病历摘要”部分:交代清楚病人主诉、病史(包括既往史)、作者接诊后的诊治经过等。应提供必要的实证图片。字数以不超过 1 000 字为宜(不包括图片)。“分析与讨论”部分:要求逻辑性强,条理清楚,能较好地体现正确的临床思维,对读者的临床工作有实际借鉴意义。重点部分可采用序号标示法,以突出层次。写作上应满足以下要求:(1)开门见山,首先说明本例需要从哪几个方面讨论;(2)写清诊断和治疗思路,如何发现并优先处理疾病的关键问题;(3)写清鉴别诊断要点,通过什么手段排除相关疾病;(4)给出本例的最后诊断和诊断依据;(5)若为误诊,则总结经验教训;(6)若为罕见病,则介绍目前国内外的最新进展;(7)列出相关的国内外主要参考文献。字数以控制在 2 000~2 500 字为宜。

本刊“临床医学影像”栏目征稿

医学影像学检查是临床常用的诊断手段。影像学改变是病理改变的反映,但不同的病理改变往往有相似的影像学表现,这给诊断带来很大困难。为了促进临床影像诊断经验的交流和诊断、鉴别诊断水平的提高,《中华医学杂志》自 2001 年第 1 期开辟“临床医学影像”栏目,为特殊的、少见的、但具有临床启发意义的影像学表现提供一个展示园地,使局部的、个人的经验尽快地为广大临床医师借鉴,为临床医学影像诊断积累宝贵的第一手资料。本栏目是一个以图

片展示为主的栏目,要求提供高质量的影像图片,图片必须清晰、对比度好、病变特征显示明确。每篇文章可提供 2~4 幅不同影像技术的图片,如 X 线、CT、磁共振成像、超声、核素显像或病理图片等。文字部分则宜简炼,描述病人的简要病史,主要影像学表现,经病理或临床科学手段确定的最后诊断结果,不进行讨论,不引用参考文献,字数在 400 字以内。欢迎踊跃投稿。