

- 3238-3247.
- [13] BEZJAK A, TU D, SEYMOUR L, *et al.* Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(24): 3831-3837.
- [14] HERBST RS, PRAGER D, HERMANN R, *et al.* TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride(OSI-774)combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(25): 5892-5899.
- [15] FUKUOKA M, YANO S, GIACCONE G, *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial)[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.

[文章编号]1007-7669(2007)10-0797-04

## 细胞因子诱导的杀伤细胞对肿瘤病人体内淋巴细胞活化的影响

吴肇颀<sup>1</sup>, 徐建民<sup>1</sup>, 吴直江<sup>2</sup>, 高奇蓉<sup>2</sup>, 孙 汛<sup>2</sup>, 李 锋<sup>1</sup>, 邹善华<sup>1</sup>

(1. 复旦大学附属中山医院 血液科, 上海 200032; 2. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200032)

[关键词] 免疫疗法; T淋巴细胞; 杀伤细胞; 临床试验, I期; 细胞因子诱导的杀伤细胞

[摘要] 目的: 探讨细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK细胞)临床应用的安全性和CIK细胞对肿瘤病人体内淋巴细胞活化的影响。方法: 进行CIK细胞抗肿瘤I期临床试验, 21例恶性肿瘤病人采集外周血单个核细胞诱导CIK细胞, 按CIK细胞静脉滴注(静滴)剂量分为4个治疗组观察不良反应, 并测定静滴前后病人外周血淋巴细胞活化相关表面标志。结果: 21例恶性肿瘤病人中未出现导致研究中断的严重不良反应, CIK细胞最大耐受剂量 $20.1 \times 10^9$ 个, 观察到WHO 2级发热5例, 一过性白细胞减少2例, 均能迅速恢复正常; CIK细胞静滴后, 病人外周血淋巴细胞表面CD25、CD38、CD69表达均有明显上调,  $P < 0.01$ 。结论: I期临床试验表明CIK细胞临床应用不良反应轻微, 除了直接杀伤作用外还可能活化体内T淋巴细胞从而增强抗肿瘤活性。

[中图分类号] R979.1; R969.4 [文献标识码] B

## Evaluation of cytokine-induced killer cells in activating lymphocytes of tumor-bearing patients *in vivo*

WU Bo-ting<sup>1</sup>, XU Jian-min<sup>1</sup>, WU Zhi-jiang<sup>2</sup>, GAO Qi-rong<sup>2</sup>, SUN Xun<sup>2</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, ZOU Shan-hua<sup>1</sup>

(1. Department of Hematology, Zhongshan Hospital, Fudan University, SHANGHAI 200032, China; 2. Shanghai Institutes for Biological Sciences, China Academy of Science, SHANGHAI 200032, China)

[KEY WORDS] immunotherapy; T-lymphocytes; killer cells; clinical trial, phase I; cytokine-induced killer cells

[收稿日期] 2007-02-25 [接受日期] 2007-07-25

[基金项目] 上海市科学技术委员会生物医药重大科技攻关项目(05DZ19313)

[作者简介] 吴肇颀(1982-), 男, 上海人, 研究生, 主要从事血液学临床研究。

[联系人] 徐建民。Phn: 86-21-6404-1990, ext 2441

[**ABSTRACT**] **AIM:** To evaluate the clinical safety and discuss the activation effect of cytokine-induced killer (CIK) cells on lymphocytes of tumor-bearing patients. **METHODS:** This study was a phase I anti-tumor clinical trial for CIK cells in tumor-bearing patients. The mononuclear cell induced CIK cells of the peripheral blood were prepared from 21 tumor-bearing patients, and then distributed into four therapeutic groups with different doses for observing adverse reactions, through measuring activation signs of peripheral blood lymphocyte surface markers before and after CIK intravenous infusion. **RESULTS:** No severe adverse reactions leading to abruption of the study occurred in all 21 subjects. The highest tolerance dose for CIK cells was  $20.1 \times 10^9$ . Five patients with WHO-grade-2 fever and two patients with transient leukocytopenia were observed but all of them recovered sooner or later uneventfully. Surface expressions CD25, CD38 and CD69 of subjects' peripheral blood lymphocytes were up-regulated significantly after CIK intravenous infusion ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** CIK cells are safe with minor adverse reactions during phase I clinical trial. Besides the direct anti-tumor activity, CIK cells might have enhanced anti-tumor effects by activating T-lymphocytes *in vivo*.

细胞因子诱导的杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK 细胞) 是近年来国内外研究者致力于推向临床的一种有着良好应用前景的免疫效应细胞, 可成为肿瘤被动免疫治疗的理想工具。1991 年美国 Stanford 大学医学院骨髓移植研究中心首次报道了 CIK 细胞<sup>[1]</sup>, 后续研究发现了它在临床应用中的潜在优势如细胞毒性强、细胞扩增率高等。自 90 年代中后期以来, 美国 Stanford 大学、德国 Humboldt 大学以及国内的北京大学等机构的研究人员对 CIK 细胞的临床应用进行了初步探索, 在各种实体肿瘤的治疗、骨髓移植后的免疫净化甚至是慢性乙型肝炎的治疗方面得到了许多有意义的成果。本研究受国家食品药品监督管理局的批准进行 CIK 细胞抗肿瘤 I 期临床试验, 现就临床应用 CIK 细胞的安全性和 CIK 细胞在体内淋巴细胞活化方面的作用进行报道。

**研究对象** 2005 年 5 月至 2005 年 11 月间在本院国家药品临床研究基地入组参加 CIK 细胞 I 期临床试验的恶性肿瘤病人共 21 例, 其中男性 13 例, 女性 8 例, 中位年龄 50 a (17 ~ 60 a), 病种包括肝癌 10 例、白血病 3 例、淋巴瘤 2 例、肾癌 2 例、胃癌 1 例、肺癌 2 例、卵巢癌 1 例。入选病人一般状况良好, 各系统无功能障碍, 无明显免疫抑制, 无严重药物过敏史, 目前无活动性感染, 并能签署知情同意书, 配合进行治疗后观察。

**CIK 细胞制备<sup>[1,2]</sup>** 以 CS-3000PLUS 血细胞分离机采集 60 mL 浓缩的人自体外周血单个核细胞 ( $0.5 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$  个·L<sup>-1</sup>), 分离得到的单个核细胞悬浮于 AIM-V 无血清培养基中。培养体系包括: RPMI 1640、10% 胎牛血清、25 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES、2 mmol·

L<sup>-1</sup> 左旋谷氨酰胺、100 kU·L<sup>-1</sup> 青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素、50 μmol·L<sup>-1</sup> 2-ME。培养环境温度 37 ℃, 二氧化碳浓度 5%, 初始细胞浓度为  $1 \times 10^9$  个·L<sup>-1</sup>。首先在培养体系中加入 1 000 kU·L<sup>-1</sup> 重组人干扰素 γ (IFN-γ), 孵育 24 h 后加入 50 μg·L<sup>-1</sup> CD3 单克隆抗体、300 kU·L<sup>-1</sup> 重组人白细胞介素 2 (IL-2)、100 kU·L<sup>-1</sup> 重组人白细胞介素 1 (IL-1), 继续孵育, 随后每 3 ~ 5 d 更换培养液和 IL-2, 2 次培养细胞浓度为  $2 \times 10^8$  个·L<sup>-1</sup>, 10 ~ 15 d 后得到 CIK 细胞产品。应用于病人的 CIK 制剂经过了药品生物制品检定所的检验, 各项指标符合标准规定 (细胞数量  $\geq 8 \times 10^8$  个、细胞存活率  $\geq 80\%$ 、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞数  $\geq 30\%$ 、IL-2 阳性细胞数  $\geq 30\%$ 、IL-4 阳性细胞数  $\geq 10\%$ 、IFN-γ 阳性细胞数  $\geq 20\%$ 、TNF-α 阳性细胞数  $\geq 40\%$ 、细胞杀伤活性  $\geq 50\%$ 、内毒素  $\leq 500$  EU·L<sup>-1</sup>、细菌阴性、支原体阴性)。

**分组与 CIK 细胞给药方式<sup>[3-5]</sup>** 依照试验对象外周血单个核细胞扩增 CIK 细胞的实际数量设置高、中、低 3 个治疗组, 细胞数量分别不低于  $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$  个。给药途径为静脉滴注 (静滴)。高剂量组分单次给药与多次给药 2 种方式。因此, 在本研究中实际包括 4 个治疗组: 低剂量单次静滴组、中剂量单次静滴组、高剂量单次静滴组、高剂量多次静滴组, 其中, 高剂量多次静滴组的病人接受隔日静滴共 3 次, 每次剂量均为中低剂量组范围。

**外周血淋巴细胞免疫表型检测** 采用流式细胞术检测 CIK 细胞静滴前后病人外周血淋巴细胞免疫表型, 包括: CD3、CD4、CD8、CD16、CD56、

CD25、CD38、CD69。

**统计学方法** 采用自身配对 *t* 检验方法评价 CIK 细胞静滴前后相关指标变化。

### 结果

1 一般资料 高、中、低 3 个剂量组实际细胞数量分别为  $(14 \pm 4) \times 10^9$ 、 $(7.0 \pm 1.0) \times 10^9$ 、 $(3.0 \pm 1.0) \times 10^9$  个。单次静滴组包括低剂量 6 例、中剂量 6 例、高剂量 3 例, 最高单次剂量为  $11.1 \times 10^9$  个; 高剂量多次静滴组 6 例, 最高总剂量为  $20.1 \times 10^9$  个。

2 总体反应情况 全部 21 例受试者均能完成 CIK 细胞疗程, 在试验过程中未出现危及生命或导致中断治疗的严重不良反应, 病人静滴后的主诉良好(食欲增加、体力恢复等), 对常规抗肿瘤治疗无不良影响。随访 6 mo, 21 例受试者中 18 例病情得到控制并持续生存, 1 例白血病复发死亡, 2 例肝癌疾病进展, 具体疗效情况目前仍在继续随访中。

3 治疗相关不良反应 试验过程中观察到 WHO 2 级发热 5 例, 其中高剂量单次静滴组出现 1 例一过性高热, 对症处理后均能迅速缓解。此外, 低剂量单次静滴组还发现一过性白细胞减少 2 例, 与发热病例无重叠。白细胞最低为  $3.1 \times 10^9$  个·L<sup>-1</sup>, 发生在静滴后 1 h, 未予处理自行恢复正常范围, 其后各采样点均正常。具体分布情况见表 1。未发现其他有临床意义的实验室指标变化, 见表 2。

表 1 治疗相关不良反应 例

| 组别       | 例数 | 低热 | 中度热 | 一过性白细胞减少 |
|----------|----|----|-----|----------|
| 单次静滴 低剂量 | 6  | 0  | 2   | 2        |
| 中剂量      | 6  | 4  | 0   | 0        |
| 高剂量      | 3  | 1  | 2   | 0        |
| 多次静滴 高剂量 | 6  | 3  | 1   | 0        |

表 2 4 组实验室指标治疗前后变化

| 组别    | 时间        | 红细胞/ $10^{12} \cdot L^{-1}$ | 白细胞/ $10^9 \cdot L^{-1}$ | 血小板/ $10^9 \cdot L^{-1}$ | 丙氨酸转氨酶/ $U \cdot L^{-1}$ | 尿素氮/ $mmol \cdot L^{-1}$ | 肌酐/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ |
|-------|-----------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 低剂量单  | 治疗前       | $3.6 \pm 0.4$               | $4.6 \pm 1.3$            | $120 \pm 43$             | $39 \pm 19$              | $3.6 \pm 1.3$            | $46 \pm 6$                 |
| 次静滴   | 治疗 72 h 后 | $3.67 \pm 0.21$             | $5.0 \pm 0.5$            | $123 \pm 43$             | $41 \pm 19$              | $15 \pm 20$              | $64 \pm 35$                |
| (n=6) | 差值        | $0.05 \pm 0.28^a$           | $0.4 \pm 0.9^a$          | $4 \pm 7^b$              | $2 \pm 5^c$              | $11 \pm 21^b$            | $19 \pm 30^c$              |
| 中剂量单  | 治疗前       | $4.2 \pm 0.4$               | $5.3 \pm 1.6$            | $136 \pm 34$             | $34 \pm 27$              | $5.2 \pm 1.5$            | $74 \pm 23$                |
| 次静滴   | 治疗 72 h 后 | $4.1 \pm 0.4$               | $6.5 \pm 2.0$            | $154 \pm 41$             | $37 \pm 22$              | $6.0 \pm 2.4$            | $66 \pm 15$                |
| (n=6) | 差值        | $-0.09 \pm 0.14^a$          | $1.1 \pm 2.0^b$          | $19 \pm 31^b$            | $3 \pm 12^c$             | $0.8 \pm 2.5^c$          | $-8 \pm 8^c$               |
| 高剂量单  | 治疗前       | $4.3 \pm 0.5$               | $4.4 \pm 1.3$            | $135 \pm 52$             | $32 \pm 12$              | $4.4 \pm 1.1$            | $57 \pm 17$                |
| 次静滴   | 治疗 72 h 后 | $4.3 \pm 0.4$               | $5.3 \pm 1.3$            | $141 \pm 57$             | $36 \pm 14$              | $4.1 \pm 1.4$            | $63 \pm 18$                |
| (n=3) | 差值        | $0.04 \pm 0.12^a$           | $0.9 \pm 0.7^a$          | $5 \pm 15^a$             | $4 \pm 8^b$              | $-0.3 \pm 0.7^c$         | $5 \pm 17^c$               |
| 高剂量多  | 治疗前       | $4.3 \pm 0.6$               | $5.4 \pm 1.5$            | $175 \pm 12$             | $26 \pm 8$               | $4.3 \pm 1.4$            | $56 \pm 10$                |
| 次静滴   | 治疗 72 h 后 | $4.2 \pm 0.4$               | $4.8 \pm 0.9$            | $206 \pm 47$             | $26 \pm 4$               | $4.4 \pm 1.3$            | $60 \pm 22$                |
| (n=6) | 差值        | $-0.2 \pm 0.4^a$            | $-0.7 \pm 1.5^a$         | $31 \pm 47^a$            | $0 \pm 10^a$             | $0.2 \pm 1.2^c$          | $4 \pm 20^c$               |

治疗前后自身配对比较, 经 *t* 检验: <sup>a</sup>*P* > 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.05, <sup>c</sup>*P* < 0.01

4 外周血淋巴细胞免疫表型 病人接受 CIK 细胞静滴前后的外周血淋巴细胞免疫表型经流式细胞术测定, CIK 细胞静滴后 24 h 检测发现 CD69 表达率增加 107.6%、CD25 表达率增加 91.0%、CD38 表达率增加 54.8% (其中 CD3<sup>+</sup>亚群的 CD38 表达率增加 89.2%)。淋巴细胞群体标记如 CD3、CD4、CD8、CD16、CD56 在治疗前后的比例无明显变化, 但是活化和增殖标记如 CD69、CD38、CD25 在治疗后均有不同程度的升高, 具有显著差异 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 见表 3。

表 3 外周血淋巴细胞免疫表型治疗前后变化

| 项目                                  | n = 21, $\bar{x} \pm s$ , % |               |                 |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------|
|                                     | 静滴前                         | 静滴后 24 h      | 差值              |
| CD3 <sup>+</sup>                    | $67 \pm 12$                 | $68 \pm 8$    | $1 \pm 13^a$    |
| CD4 <sup>+</sup>                    | $30 \pm 10$                 | $34 \pm 12$   | $4 \pm 8^b$     |
| CD8 <sup>+</sup>                    | $35 \pm 17$                 | $35 \pm 13$   | $0 \pm 10^c$    |
| CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> | $12 \pm 4$                  | $12 \pm 6$    | $-1 \pm 6^c$    |
| CD69 <sup>+</sup>                   | $2.4 \pm 1.5$               | $4.9 \pm 2.8$ | $2.6 \pm 2.3^c$ |
| CD38 <sup>+</sup>                   | $24 \pm 11$                 | $38 \pm 10$   | $13 \pm 8^c$    |
| CD25 <sup>+</sup>                   | $5.1 \pm 1.0$               | $10 \pm 3$    | $5 \pm 3^c$     |
| CD3 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>  | $12 \pm 6$                  | $22 \pm 8$    | $10 \pm 8^c$    |

治疗前后自身配对比较, 经 *t* 检验: <sup>a</sup>*P* > 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.05, <sup>c</sup>*P* < 0.01

讨论 病人对于 CIK 细胞静滴具有良好的耐受性, 主要不良反应为发热 (13/21), 中度热及以上的发生率为 24% (5/21), 此结果与既往临床研究的报道 (20%左右) 具有高度一致性<sup>[3-5]</sup>。研究过程中观察到的发热为一过性, 多在静滴后 1~8 h 出现, 1 日内可自行缓解, 仅见 1 例病人出现高热 (39.2℃), 对症处理后 0.5 h 缓解, 对研究的进行没有影响, 至于其他的不良反应皆为实验室检查异常发现, 病人无不适主诉。一过性白细胞减少见于 2 例低剂量单次静滴组病人 (这 2 例病人均未出现发热), 最低点在静滴后 1 h, 1 日内均能自行恢复正常范围, 推测可能与 CIK 细胞静滴后产

生的相关细胞因子引起的白细胞归巢有关, 目前未发现长期的白细胞减少, 文献也未有 CIK 细胞引起骨髓抑制的相关报道, 故可以认为类似的一过性白细胞减少不影响 CIK 细胞的临床应用。在静滴 CIK 细胞前后, 各组受试者中主要的肝、肾功能指标变化无显著临床意义, 其中绝大部分亦未发现统计学差异, 可以认为 CIK 细胞在无明显肝、肾基础病变的人群中不会造成肝、肾损害。本研究中 CIK 细胞的最大耐受总剂量达到  $20.1 \times 10^9$  个, 最大单次耐受剂量达到  $11.1 \times 10^9$  个, 目前仅见发热的严重程度以及发生率似有一定的剂量相关性(低剂量单次组有 33% 的病人发热, 中剂量单次组为 67%, 高剂量单次组为 100% 并出现 1 例高热病人), 并主要与单次剂量有关, 在多次静滴组中未发现发热与剂量累加的相关性(高剂量多次组有 67% 的病人发热, 与中剂量单次组一致), 表明临床提高 CIK 细胞静滴耐受剂量可以通过同一疗程中多次给药的方式实现。我们认为, 每疗程总量定为  $10 \times 10^9$  个是安全的, 并可以通过分次给药减少不良反应发生。

恶性肿瘤病人多为免疫抑制人群, 除了肿瘤本身对机体的消耗和免疫系统的逃逸之外, 病人接受的各种放、化疗在杀伤肿瘤细胞的同时也打击了自身的免疫功能, 因此, 若能提高肿瘤病人自身免疫细胞的活化水平, 也许可以对病人的生存带来益处。以往的相关研究发现 CIK 细胞除了对肿瘤细胞有直接杀伤作用以外, 还可能通过分泌多种细胞因子如 IL-12、IFN- $\gamma$  从而增强体内抗肿瘤活性<sup>[3, 4]</sup>。本研究发现 CIK 细胞静滴后病人外周血淋巴细胞表面 CD69、CD38、CD25 的表达均有明显升高, 具有显著统计学差异。CD69 主要参与淋巴细胞激活信号传递; 是最早表达的激活抗原, 并与 T 细胞发育密切相关<sup>[6]</sup>; CD38 是一个 II 型跨膜糖蛋白, 参与了 T、B 淋巴细胞激活的后期过程<sup>[7]</sup>; CD25 是低亲和力 IL-2 受体, 与 CD-122 结合, 诱导 T 细胞激活和增殖<sup>[8]</sup>。机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用主要是通过 T 细胞和 NK 细胞来实现的, 而本研究结果表明 CIK 细胞静滴后, 体内 T 细胞活化相关的淋巴细胞表面标志的表达有明显上调(CD25、CD69 均大于 90%, CD38 虽然只有 50% 左右但在其中 CD3<sup>+</sup> 的 T 细胞亚群中仍接近 90%), 提示 CIK 细胞除了直接杀伤肿瘤细胞

之外还可能活化了体内 T 细胞从而进一步增强了抗肿瘤活性。IL-12 被认为是 NK 细胞刺激因子和 CTL 成熟因子<sup>[9]</sup>, 并与 IL-2 有协同作用, 促进 CTL 和 LAK 细胞的增殖, CIK 细胞静滴后体内 T 细胞的活化可能与此机制有较密切的关联, 在后续研究中可进一步阐明并为临床应用拓展新的途径。

综上所述, CIK 细胞抗肿瘤 I 期临床试验结果表明, CIK 细胞临床应用不良反应轻微, 除了直接杀伤作用外还可能活化体内 T 细胞从而增强抗肿瘤活性, 有望成为一种新的抗肿瘤治疗模式。

#### [参考文献]

- [1] SCHMIDT-WOLF IG, NEGRIN RS, KIEM HP, *et al.* Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [2] MEHTA BA, SCHMIDT-WOLF IG, WEISSMAN IL, *et al.* Two pathways of exocytosis of cytoplasmic granule contents and target cell killing by cytokine-induced CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> killer cells[J]. *Blood*, 1995, 86(9): 3493-3499.
- [3] SCHMIDT-WOLF IG, FINKE S, TROJANECK B, *et al.* Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(6): 1009-1016.
- [4] 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.
- [5] LEEMBUIS T, WELLS S, SCHEFFOLD C, *et al.* A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed HD and NHL[J]. *Biol Blood Marrow Trans Plant*, 2005, 11(3): 181-187.
- [6] HARE K, JENKINSON E, ANDERSON C. CD69 expression discriminates MHC-dependent and-independent stages of thymocyte positive selection[J]. *J Immunol*, 1999, 162(7): 3978-3983.
- [7] HOSHINO S, KUKIMOTO I, KONTANI K, *et al.* Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD<sup>+</sup> glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus[J]. *J Immunol*, 1997, 158(2): 741-747.
- [8] YADATSUGU T, YASUHIRO M. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview[J]. *Cell*, 1993, 73(1): 5-8.
- [9] WOLF SF, TEMPLE PA, KOBAYASHI M, *et al.* Cloning of cDNA for natural killer cells stimulating factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and NK cells[J]. *J Immunol*, 1991, 146(9): 3074-3081.