论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201507174

CIK细胞免疫治疗在原发性肝癌中的应用及对免疫活性细胞的影响

宋 娟,钱 程 (400038 重庆,第三军医大学西南医院病理学研究所西南癌症中心)

[摘要] **目的** 探讨CIK细胞续灌输入治疗对原发性肝癌患者免疫功能的影响,研究其防止肝癌术后复发的有效性。**方法** 取重庆市西南医院2012年9月至2014年9月收治的资料齐全的原发性肝癌患者共54例。随机将所有患者分为治疗组与对照组。治疗组27例患者,接受CIK细胞续灌输入治疗;对照组27例,接受常规治疗。另取同时期我院体检中心的健康体检者16例为健康组。治疗组患者术后接受CIK细胞续灌输入治疗2个疗程,对照组患者术后仅接受常规支持治疗。对所有患者进行随访。在CIK细胞回输前后用流式细胞仪测定受试者外周血的T细胞亚群和树突状细胞亚群的比例变化,并分别统计治疗组与对照组患者治疗1年后的复发率,进行对比分析。**结果** 研究结果显示健康组患者相比,原发性肝癌患者的外周血$CD8^+/CD4^+$及DC1/DC2比值均有降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。接受CIK细胞治疗后,患者外周血$CD8^+$占外周血单个核细胞百分比较治疗前升高,DC1/DC2亦升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。治疗组复发率低于对照组(11.1% *vs* 33.3%,$P<0.05$),治疗组死亡率亦低于对照组,但差异无统计学意义(11.1% *vs* 18.5%,$P>0.05$)。治疗组无明显不良反应。**结论** 原发性肝癌患者自身免疫环境发生变化,CIK细胞在提高患者免疫功能,降低肝癌复发率方面有一定效果。

[关键词] CIK细胞;原发性肝癌;免疫功能;复发率

[中图法分类号] R392.12; R730.51; R735.7 [文献标志码] A

Autologous cytokine-induced killer cells in immunological treatment of hepatocellular carcinoma and their effect on immunological effector cells: a clinical study

Song Juan, Qian Cheng (Southwest Cancer Center, Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of continuous infusion of autologous cytokine-induced killer cells (CIK) on the immunological function in the patients with primary hepatocellular carcinoma, and investigate the efficiency in the prevention of tumor recurrence after surgery. **Methods** Full clinical data of 54 cases of primary hepatocellular carcinoma in Southwest Hospital from September 2012 to September 2014 were collected in the study. They were divided into 2 groups, treatment group (receiving CIK treatment after operation for 2 courses, $n=27$) and control group (receiving conventional therapy, $n=27$). Sixteen healthy individuals taking physical examination meanwhile served as normal control. All cases were followed up, and flow cytometry was used to detect the percentages of T lymphocyte subsets and dendritic cell subsets before and

[通信作者] 钱 程,电话:(023)68752247,E-mail: cqian8634@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1450.002.html(2015-11-18)

after continuous infusion. The recurrence was compared between the treatment group and control group in 1 year after treatment. **Results** Peripheral blood CD8 +/CD4 + and DC1/DC2 were significantly lower in the patients with primary hepatocellular carcinoma before CIK treatment than the normal control ($P < 0.05$). After continuous infusion, the CD8 + percentage and DC1/DC2 ratio were significantly increased in the treatment group than before ($P < 0.05$). The treatment group had obviously lower recurrence than the control group (11.1% *vs* 33.3%, $P < 0.05$), and lower mortality though without statistical difference (11.1% *vs* 18.5%, $P > 0.05$). No obvious adverse reaction was observed in the treatment group. **Conclusion** The immune functions of primary hepatocellular carcinoma patients are declined. CIK infusion improves their immune functions and decrease cancer recurrence.

[**Key words**] cytokine-induced killer cells; primary hepatocellular carcinoma; immunologic function; recurernce rate

Corresponding author: Qian Cheng, Tel: 86-23-68752247, E-mail: cqian8634@gmail.com

作为目前全球范围内对人类健康威胁最大的疾病之一，原发性肝癌（primary hepatocellular carcinoma，PHC）又被简称为肝癌。其由肝细胞和（或）肝内胆管上皮细胞癌变导致[1]。由于我国客观条件限制，多数肝癌患者在就诊时已经错过了最佳手术时机，导致部分患者无法彻底清除病灶，预后不良，严重影响生活质量，甚至威胁生命[2]。近年来，随着国内外关于CIK细胞续灌输入治疗相关研究的不断进展，我国对原发性肝癌患者进行CIK细胞续灌输入治疗这一治疗方案正在逐渐普及[3]。但关于CIK细胞续灌输入对于原发性肝癌治疗的具体机制仍不清楚。本研究选取2012年9月至2014年9月的54例原发性肝癌患者，以研究CIK细胞续灌输入治疗对原发性肝癌患者免疫功能的影响，并探讨其防止肝癌术后复发的有效性。现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

取重庆市西南医院2012年9月至2014年9月收治的资料齐全的原发性肝癌患者共54例进行研究。分期均为Ⅰ、Ⅱ期，Child-pugh分级均为A、B级。肿瘤直径4～7 cm。卡氏评分（Karnofsky，KPS）>90分。其中男性35例，女性19例，年龄44～79岁，平均51.2岁。并确保54例患者在接受治疗前未使用免疫抑制剂与激素类药物。全部患者根据相应体征、临床症状、B超以及病理学检查明确诊断，并且行外科手术治疗切除肿瘤，清扫淋巴结，病理确认无转移。随机将所有患者分为治疗组与对照组。治疗组27例患者，接受CIK细胞续灌输入治疗；对照组27例，仅接受常规治疗。其中治疗组男性16例，女性11例，年龄45～77岁，平均50.9岁；对照组男性18例，女性9例，年龄范围44～79岁，平均51.4岁。两组患者一般资料比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），详见表1。另取同时期我院体检中心的健康体检者16例为健康组。

1.2 材料

IL-1α购自美国PeproTech公司，anti-CD3McAb购自美国R&D公司，rhIFN-γ购自上海克隆生物高技术公司，IL-2购自美国Chiron公司，无血清培养基购自美国GIBCO公司，检测T细胞亚群与DC细胞亚群的各类抗体均购自美国BD公司。Spectra6.1成分血采血机购自美国COBE公司，FACSCalibur流式细胞分析仪购自美国BD公司。使用软件包括：CellQuest、SimulSET、MultiSET和FACSCOMP。

1.3 方法

1.3.1 CIK细胞制备 采取治疗组患者60 mL外周血，使用密度梯度离心法（density gradient centrifugation）分离得到$1 \times 10^7 \sim 7 \times 10^7$个单个核细胞（peripheral bloodmononuclear cell，PBMC）。将细胞浓度使用

表1 研究纳入2组原发性肝癌患者一般资料比较[例(%)]

组别	n	年龄		性别		Child-pugh分级		临床分期		肿瘤直径	
		<60岁	≥60岁	男	女	A	B	Ⅰ期	Ⅱ期	<5 cm	≥5 cm
治疗组	27	17(63.0)	10(37.0)	16(59.3)	11(40.7)	21(77.7)	6(22.3)	20(74.1)	7(25.9)	16(59.3)	11(40.7)
对照组	27	18(66.7)	9(33.3)	18(66.7)	9(33.3)	23(85.3)	4(14.8)	19(70.4)	8(29.6)	17(63.0)	10(37.0)

无血清培养基调整至 1×10^6/mL ~ 2×10^6/mL，加IFN-γ在37 ℃、5% CO_2环境中于透气性培养瓶进行培养24 h。随后将小鼠抗人CD3单抗(100 ng/mL)、IL-2(1 000 U/mL)和IL-1α(1 000 U/mL)依次加入，每日观察细胞生长情况并继续培养。每2~3天补充一次新鲜含1%自体血浆和IL-2(500 U/mL)培养液。继续培养2周，质控合格后将CIK细胞收集、离心、洗涤，用含20%人血白蛋白的生理盐水进行重悬。

1.3.2 CIK细胞质控 所有参与本研究CIK细胞培养、制备的人员均经过药品生产质量管理规范(GOOD MANUFACTURING PRACTICES，GMP)培训以及相应体检。制备操作过程与相应试剂、仪器亦符合临床规定的安全标准。在换液时，对CIK细胞制剂进行抽查，要求为：①CIK细胞存活率>95%；②CIK门(CIK gate)中 $CD3^+ \geqslant 80\%$，$CD8^+$ D $\geqslant 40\%$，$CD3^+CD56^+ \geqslant 30\%$；③未受外源真菌、细菌、病毒或其他微生物污染；④无血清蛋白、抗生素、抗体等添加成分。

1.3.3 CIK细胞回输 于CIK细胞培养第14日开始，每次收集约 5×10^9 CIK细胞，经过离心、洗涤、重悬后制成250 mL CIK细胞悬液，经静脉于1 h内回输入患者体内，隔日后再回输一次。2次为1疗程，共持续2个疗程。对照组患者不行CIK细胞续灌输注治疗。

1.3.4 T细胞亚群与DC细胞亚群测定 所有患者(治疗组、对照组)与健康者均于治疗前抽取静脉抗凝血5 mL，进行相应的T细胞亚群($CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$)与DC细胞亚群测定(DC1：$CD45^+LIN^-CD123^-CD11C^+$；DC2：$CD45^+LIN^-CD11C^-CD123^+$)。治疗组患者于CIK细胞回输后的第14日重复测定。

1.4 临床复发率评价

对所有患者从症状、体征、生化指标、病毒学指标、免疫学指标以及影像学指标方面进行评价。并统计随访1年时(死亡患者则为死亡时)的复发率。

1.5 统计学处理

应用SPSS 20.0软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用独立样本 t 检验与配对样本 t 检验。计数资料以百分比(%)表示，采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 治疗前治疗组、对照组与健康组患者外周血T细胞亚群和DC细胞亚群比较

术前对本研究治疗组与健康组患者进行外周血T细胞亚群和DC细胞亚群的检验分析，结果显示治疗组患者外周血 $CD3^+$ 占外周血单个核细胞百分比水平高于健康组($P<0.05$)，$CD8^+$ 低于健康组($P<0.05$)，$CD4^+/CD8^+$ 高于健康组($P<0.05$)，DC1/DC2低于健康组($P<0.05$)，差异有统计学意义。而两组间 $CD4^+$、DC1和DC2占外周血单个核细胞百分比水平差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表2。

2.2 治疗组患者外周血T细胞亚群和DC细胞亚群治疗前后比较

治疗组接受术后CIK细胞续灌输入治疗后，外周血 $CD8^+$ 占外周血单个核细胞百分比水平较治疗前提高(26.39% ±7.85% *vs* 29.14% ±9.18%)，$CD4^+/CD8^+$ 则明显下降(1.74 ±0.54 *vs* 1.56 ±0.62)，DC1/DC2高于治疗前(1.15 ±1.13 *vs* 1.52 ±1.53)，差异有统计学意义($P<0.05$)。而 $CD3^+$、$CD4^+$、DC1、DC2则与治疗前相比差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表3。

表2 不同组间治疗前外周血T细胞亚群和DC细胞亚群比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$CD3^+$(%)	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$	DC1(%)	DC2(%)	DC1/DC2
治疗组	27	78.31 ±17.31[a]	42.74 ±10.74	26.39 ±7.85[a]	1.74 ±0.54[a]	0.90 ±0.89	0.82 ±0.36	1.15 ±1.13[a]
健康组	16	70.97 ±8.63	41.21 ±6.52	31.48 ±5.47	1.36 ±0.34	0.82 ±0.09	0.60 ±0.19	1.29 ±0.22

a：$P<0.05$，与健康组比较

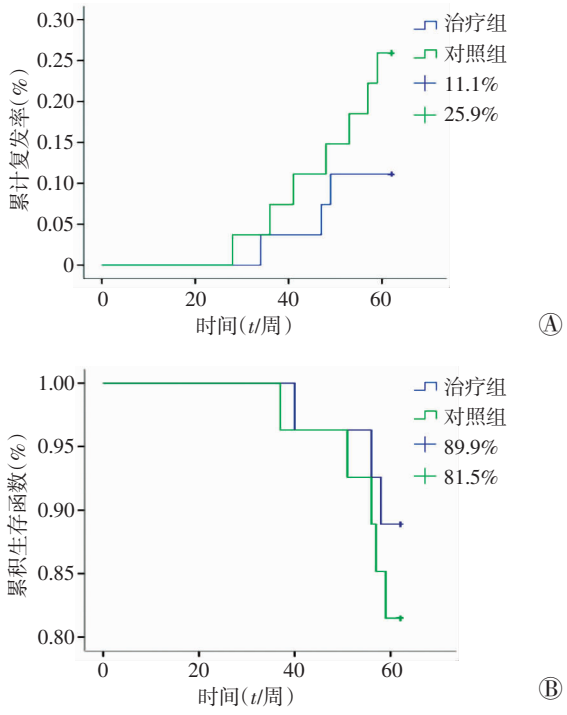
表3 治疗组患者治疗前后外周血T细胞亚群和DC细胞亚群比较($n=27$，$\bar{x} \pm s$)

时间	$CD3^+$(%)	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$	DC1(%)	DC2(%)	DC1/DC2
治疗前	78.31 ±17.31	42.74 ±10.74	26.39 ±7.85	1.74 ±0.54	0.90 ±0.89	0.82 ±0.36	1.15 ±1.13
治疗后	78.69 ±17.31	41.39 ±11.59	29.14 ±9.18[a]	1.56 ±0.62[a]	0.87 ±0.68	0.74 ±0.63	1.52 ±1.53[a]

a：$P<0.05$，与治疗前比较

2.3 两组患者接受不同治疗后复发率、死亡率以及不良反应比较

两组患者接受不同治疗后，进行随访并，记录死亡率和治疗后 1 年的复发率（死亡患者为死亡时）。治疗组共有 3 例患者肝癌复发，全部死亡，复发率为 11.1%，死亡率 11.1%；对照组共 9 例复发，其中 5 例死亡，复发率为 33.3%，死亡率 18.5%，两组间复发率差异有统计学意义（$P<0.05$），但两组间的死亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。K-M 曲线详见图 1。治疗组 27 例患者，有 5 例在 CIK 细胞回输后的 6 h 内出现 37.3～38.0 ℃的低烧，且能在 6 h 内自行退烧。余无明显不良反应。



A：累计复发率曲线；B：生存率曲线

图 1 两组患者接受不同治疗后复发率、死亡率以及不良反应比较

3 讨论

原发性肝癌（primary hepatocellular carcinoma，PHC）是一种由肝细胞和（或）肝内胆管上皮细胞癌变导致的恶性肿瘤疾病，被简称为肝癌。根据文献报道，每年全世界直接或间接死于原发性肝癌的人数高达 60 万，而近年来，其也逐渐成为国内死亡率第二的肿瘤性疾病[4]。并且伴随人口老龄化问题的加重，其死亡率仍有进一步上升的趋势。外科手术切除作为当前原发性肝癌的治疗首选方法，在对患者进行严格的手术指征选择的前提下，5 年生存率能够达到 70%[5]，但由于我国客观条件限制，多数肝癌患者在就诊时已经错过了最佳手术时机，只能选择管肝动脉化疗栓塞（transcatheter arterial chemoembolization，TACE）、射频消融（radiofrequency ablation，RFA）、放化疗或肝移植（liver transplantation operation，LTO）中的一种或几种进行综合治疗，往往不能完全清除病灶，甚至对患者本身的免疫功能造成影响，治疗效果差强人意[6~8]。

CIK 细胞（cytokine induced killer，CIK）作为自体脐血或外周血来源的单个核细胞，是由细胞因子诱导的具有免疫活性的杀伤细胞。其最早在 1991 年被斯坦福大学的 Schmidt-Wolf 等人发现并研制[9]。因其是具有 $CD3^+$ 与 $CD56^+$ 双阳性、兼具自然杀伤细胞（nature kill cell，NK）的主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）限制性杀伤与淋巴 T 细胞的高效杀瘤作用的细胞毒性杀伤细胞，并且体外扩增快，杀瘤效率高，抗瘤谱广泛，毒副作用少，对多重耐药性肿瘤细胞敏感性高，已作为继手术治疗、化学药物治疗、放射治疗之后对原发性肝癌的第 4 中治疗模式：生物治疗，并成为研究热点[10]。

和刚等的研究发现[11]，人体的主要免疫调节作用由辅助性 T 细胞（$CD4^+$）与杀伤性 T 细胞（$CD8^+$）相互作用形成，而 $CD4^+/CD8^+$ 比值在一定程度上能够代表当前机体的免疫状态。施明等也认为[4]，肿瘤细胞能够逃避免疫系统监视的能力是导致其较难根治的主要原因之一，而原发性肝癌患者的细胞免疫往往功能低下，这可能与肿瘤细胞免疫原性弱，使机体难以产生针对性的 $CD8^+$ 有关。因此，若要提高原发性肝癌的治疗效果，不仅要提升体内细胞毒作用效应细胞水平，还需要提升相应辅助性细胞水平。本研究结果显示，与健康患者相比，原发性肝癌患者的外周血 $CD8^+$ 和 DC1/DC2 均有不同程度降低，提示患者细胞免疫功能受限。在接受 CIK 细胞续灌输入治疗后，研究组患者以上指标均较治疗前有显著提升，这可能与 CIK 细胞中 $CD8^+$ 水平较高，且能分泌大量 IL-2、IFN-γ、IL-12 等 Th1 类细胞因子，对体内其他细胞因子的释放产生调节作用，进而产生一系列提升细胞免疫功能的反应有关[12]。DC 细胞作为目前发现的人体中抗原提呈功能最强的免疫细胞，对刺激、促进 T 细胞的增殖作用显著，在先天性免疫与获得性免疫中均扮演重要角色[13]。本研究发现，经 CIK 细胞续灌输入治疗后，原

发性肝癌患者DC1/DC2水平较治疗前显著改善,提示CIK细胞不仅能够增强机体针对癌细胞的细胞免疫功能,还能提升免疫监视功能水平,这可能与治疗组经CIK细胞续灌输入治疗后复发率较常规治疗明显降低有关,但两组间死亡率差异无统计学意义,是否与样本量过小有关,仍有待于进一步研究。

综上所述,原发性肝癌患者自身免疫环境发生变化。流式细胞术具有快速、准确、灵敏的优点,通过流式细胞术对原发性肝癌患者治疗前后的免疫功能进行评价,认为CIK细胞在提高患者免疫功能,降低肝癌复发率方面有一定效果,可以改善患者预后,值得临床推广。

参考文献:

[1] 孙燕, 石元凯. 临床肿瘤内科手册[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 79-93.

[2] 周启明, 吴沛宏, 赵明, 等. 原发性肝癌经综合微创治疗后联合细胞因子诱导杀伤细胞灌注的近期疗效观察[J]. 癌症, 2006, 25(11): 1414-1418.

[3] Kuci S, Rettinger E, Voss B, *et al*. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2010, 95(9): 1579-1586.

[4] 施明, 张冰, 汤紫荣, 等. 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[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(23): 2049-2053.

[5] Ladhams A, Schmidt C, Sing G, *et al*. Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(8): 889-896.

[6] Chen H Y, Juan C C, Ker C G. Laparoscopic liver surgery for patients with hcpatoccllular carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(3): 800-806.

[7] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, *et al*. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis[J]. N Engl J Med, 1996, 334(11): 693-699.

[8] 唐云强,江鹏,何璐,等. 三维重建联合超声引导下射频消融治疗肝癌的疗效分析[J]. 中华消化外科杂志,2014,13(9):678-682.

[9] 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.

[10] Ma Y, Xu Y C, Tang L, *et al*. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: efficacy and safety [J]. Exp Hematol Oncol, 2012, 1(1): 11.

[11] 和刚, 杨峄, 张顺. 自体CIK回输对转移性恶性肿瘤细胞免疫指标变化的影响[J]. 实用肿瘤杂志, 2014, 29(1): 45-48.

[12] 孙保木, 罗明. CIK细胞治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 海军医学杂志, 2014, 35(6): 518-520.

[13] Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors [J]. J Cancer, 2011, 2: 363-368.

(**收稿**:2015-07-15;**修回**:2015-09-29)

(编辑 栾 嘉)